

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



**Zusammenhang zwischen genetischen Variationen der  
TOMM40-APOE-Genregion und Kognition**

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

vorgelegt von  
Pia Buttler, geb. Netza-Götz  
aus Georgsmarienhütte

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: PD Dr. Ina Giegling

Zweiter Gutachter: PD Dr. Susanne Karch

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Michael Ewers

Weitere Gutachter: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: \_\_\_\_\_

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.09.2023

## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung .....	5
Abstract (English) .....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung .....	8
1.1 Alzheimer-Demenz.....	8
1.1.1 Überblick .....	8
1.1.2 Diagnosekriterien .....	8
1.1.3 Ätiologie .....	9
1.1.4 Epidemiologie und Verlauf.....	10
1.1.5 Pathophysiologie.....	10
1.1.6 Genetische Grundlagen der Erkrankung.....	12
1.2 Das „Translocase of outer mitochondrial membrane 40“-Gen .....	13
1.2.1 Funktion von TOMM40 .....	13
1.2.2 Genetik von TOMM40.....	16
1.3 Weitere Gene der untersuchten Genregion .....	18
1.3.1 „Apolipoprotein E“-Gen .....	18
1.3.2 „Apolipoprotein C1“-Gen und „Nectin cell adhesion molecule 2“-Gen .....	19
1.4 Endophänotypen.....	20
1.4.1 Mittels TMT gemessene Exekutivfunktionen als kognitive Endophänotypen.....	21
1.5 Zielstellung .....	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Vorbedingungen und Studiendesign.....	25
2.1.1 Voraussetzung der Studiendurchführung .....	25
2.1.2 Stichprobe, Auswahl der Probanden, Ein- und Ausschlusskriterien .....	25
2.2 Trail Making Test.....	26
2.2.1 Hintergrund und Einsatzgebiet des Trail Making Tests.....	26
2.2.2 Durchführung .....	27
2.2.3 Bewertung.....	27
2.3 Laborverfahren.....	28
2.3.1 DNA-Extraktion.....	28
2.3.2 DNA-Konzentrationseinstellung.....	29
2.3.3.1 Bestimmung der APOE Genotypen .....	31
2.3.3.2 Bestimmung der TOMM40 Genotypen.....	32
2.4 Analyse und Verarbeitung der Daten.....	32

## Inhaltsverzeichnis

2.4.1 Apolipoprotein E $\epsilon$ 4-Dosis-Bestimmung .....	32
2.4.2 Qualitätskontrolle .....	33
2.4.3 Statistische Analyse.....	35
2.4.4 Clumping .....	35
2.4.5 Signifikanzniveau.....	36
3. Ergebnisse .....	37
3.1 Beschreibung der Stichprobe .....	37
3.2 Lokalisation der Polymorphismen.....	37
3.3 Assoziation von SNPs der TOMM40-Region mit den Ergebnissen des TMT .....	41
3.3.1 Ergebnisse im Trail Making Test-A.....	41
3.3.2 Ergebnisse der Frauen im Trail Making Test-A.....	42
3.3.3 Ergebnisse der Männer im Trail Making Test-A.....	42
3.3.4 Ergebnisse im Trail Making Test-B .....	42
3.3.5 Ergebnisse der Frauen im Trail Making Test-B.....	43
3.3.6 Ergebnisse der Männer im Trail Making Test-B .....	44
4. Diskussion.....	45
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	45
4.2 Einflussmöglichkeiten der untersuchten Polymorphismen .....	45
4.2.1 Polymorphismen des Gens TOMM40 .....	46
4.2.2 Polymorphismen des Gens Nectin2 .....	48
4.2.3. Polymorphismen des Gens APOE.....	50
4.3 TOMM40 und APOE – Eine Genregion mit starkem Kopplungsungleichgewicht .....	52
4.4 Exekutivfunktionen als Endophänotyp .....	53
4.4.1 Präklinische AD versus kognitiver Phänotyp.....	55
4.5 Vergleich der Geschlechter .....	56
4.6 Diskussion der Methoden .....	57
4.6.1 Auswahl der Probanden .....	57
4.6.2 Trail Making Test.....	58
4.6.3. Qualitätskontrolle der Daten .....	59
4.7 Fazit.....	59
Literaturverzeichnis.....	61
Danksagung.....	76
Affidavit.....	77
Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## **Zusammenfassung**

Die Alzheimer-Demenz ist eine schwerwiegende psychiatrische Erkrankung, die aufgrund steigender Lebenserwartung immer mehr Menschen weltweit betrifft. Obwohl bereits eine Vielzahl der pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung verstanden ist, gibt es derzeit keine Medikamente, die die Erkrankung heilen oder das Fortschreiten der Alzheimer-Demenz aufhalten können. Die Genregion um die Gene „*Tanslocase of outer mitochondrial membrane 40*“ (TOMM40) und Apolipoprotein E (APOE) wurde mehrfach durch genomweite Assoziationsstudien mit der späten Form der Alzheimer-Demenz sowie generell mit kognitiver Leistung assoziiert.

In der vorliegenden Studie wurden 558 Probanden einer gesunden Screeningstichprobe dem Trail Making Test (TMT) unterzogen, welcher insbesondere die Exekutivfunktionen misst. Es wurden gesunde Probanden untersucht, um herauszufinden, ob ohne das Vorliegen einer Alzheimer-Demenz Polymorphismen des Gens TOMM40 mit Ergebnissen des TMT nominal signifikant assoziiert sind und somit generell eine Assoziation des Gens zu kognitiven Leistungen besteht. Signifikante Ergebnisse wurden anschließend an einer Replikationsstichprobe von 617 gesunden Probanden repliziert.

Von den 113 untersuchten Variationen der TOMM40-APOE-Genregion zeigten sich 39 nominal signifikant mit den Ergebnissen des TMT assoziiert. Davon wurden diejenigen SNPs betrachtet, die unabhängig vom Kopplungsungleichgewicht waren (Index-SNPs). Im TMT-A waren 2 Index-SNPs nominal signifikant assoziiert, die Assoziation dieser Polymorphismen zeigte sich jedoch nicht vom APOE  $\epsilon$ 4-Allel unabhängig. In der Replikations-Gesamtstichprobe zeigte sich keine signifikante Assoziation zu den TMT-A-Ergebnissen, allerdings konnte in der Subgruppe der Männer über einen Proxy-SNP die Assoziation des Index-SNPs rs76692773 zum TMT-A als Trend repliziert werden. Im TMT-B zeigten sich 5 Index-SNPs nominal signifikant assoziiert. Davon zeigten 4 Index-SNPs eine von APOE  $\epsilon$ 4 unabhängige Assoziation. Zwei Polymorphismen (rs769449 und rs76692773) hielten multiplem Testen stand. Der Index-SNP rs769449 zeigte auch in der Replikationsstichprobe eine nominal signifikante Assoziation und in der Subgruppe der Frauen einen Trend zu einer Assoziation zu den TMT-B-Ergebnissen.

Es wurde somit eine Assoziation zwischen SNPs der TOMM40-APOE-Genregion und kognitiven Leistungen, wie den im TMT gemessenen Exekutivfunktionen, beobachtet. Inwiefern diese Assoziation einen Einfluss auf die Entwicklung einer kognitiven Verschlechterung im Sinne einer Alzheimer-Demenz hat, sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

## **Abstract (English)**

Alzheimer's dementia is a severe psychiatric disorder, affecting an increasing amount of people worldwide, as life expectancies rise. Even though we understand a multitude of pathophysiological mechanisms, there is still no effective treatment that could cure, or slow the process of Alzheimer's dementia. Various genome-wide association studies found regions around the genes „Tanslocase of outer mitochondrial membrane 40“ (TOMM40) and Apolipoproteine E (APOE) to be associated with both late-onset Alzheimer's disease and cognitive performance.

This study assessed 558 subjects of a healthy screening sample on the Trail Making Test (TMT), known to represent the executive function performance. We examined healthy subjects to ascertain whether TOMM40 polymorphisms were significantly associated with TMT performance even in the absence of Alzheimer's dementia. Significant results were replicated on a sample of 617 healthy subjects. This could reveal a general association between TOMM40 and cognitive performance.

39 of the assessed 113 polymorphisms of the TOMM40-APOE- gene region showed nominally significant associations to cognitive performance in the TMT. We then focussed on the linkage disequilibrium (LD) of independent Index-SNPs. In the TMT-A, 2 Index-SNPs showed nominally significance but did not withstand the correction for APOE  $\epsilon$ 4 allele. The replication showed no significant association to TMT-A results, excluding a subgroup of men who showed a trend to TMT-A results for the Index-SNP rs76692773 via a proxy SNP. With the TMT-B, 5 Index-SNPs showed nominally significant association. 4 of those proved to be independent of APOE  $\epsilon$ 4 allele. Two polymorphisms (rs769449 and rs76692773) withstood testing multiples. When replicated Index-SNP rs769449 showed nominally significant association to TMT-B results for the entire sample and a trend to significant association in the subgroup of women to TMT-B results.

An association between SNPs of the TOMM40-APOE- gene region and cognitive performance like the executive function performance tested via TMT was observed. Future studies should emphasize on how this association influences the development of cognitive impairment typical for Alzheimer's disease.

**Abkürzungsverzeichnis**

AA	<i>Alzheimer's Association</i>
AD	Alzheimer-Demenz
APOE	Apolipoprotein E
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
A1	Effektallel
B	Regressionskoeffizient
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. Auflage</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOAD	<i>Early-Onset Alzheimer's Disease</i>
FHAM	<i>Family History Assessment Module</i>
F+M	Frauen und Männer
FRQ	Frequenz
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HWE	<i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>
ICD	<i>International Classification of Diseases</i>
IQ	Intelligenzquotient
L	<i>long</i>
LD	<i>Linkage Disequilibrium</i>
LOAD	<i>Late-Onset Alzheimer's Disease</i>
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
MCI	<i>Mild Cognitive Impairment</i>
MINI	<i>Mini International Neuropsychiatric Interview</i>
MMST	<i>Mini Mental Status Test</i>
n	Anzahl
NECTIN2	<i>Nectin cell adhesion molecule 2</i>
NIA	<i>National institute on aging</i>
NINCDS/ADRDA	<i>National institute of neurological and communicative disorders and stroke/ Alzheimer's disease and related disorders association</i>
P	p-Wert
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PGC	<i>Psychiatric Genomics Consortium</i>
PSEN1, PSEN2	Presenilin-1/2-Gen
rpm	<i>revolutions per minute</i>
S	<i>short</i>
SCID	<i>Structured Clinical Interview for DMS Disorders</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TMT	<i>Trail Making Test</i>
TOM	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane</i>
UTR	Untranslatierte Region
VL	<i>Very long</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
WAIS-IV	<i>Wechsler Adult Intelligence Scale, 4. Auflage</i>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Alzheimer-Demenz**

#### **1.1.1 Überblick**

Demenz ist ein Syndrom, welches kognitiven Abbau und den Verlust bestimmter Fähigkeiten aufweist und über das normale Altern hinausgeht. Mit ca. 60-70 % der Fälle ist die Alzheimer-Demenz (AD) die vorrangige Form der Demenz (WHO, 2022). Erkrankte zeigen kognitive Beeinträchtigungen, die vor allem das Gedächtnis, aber auch Orientierung, Sprache, Aufmerksamkeit und Exekutivfunktionen betreffen. Daneben zeigen Betroffene emotionale Instabilität und eine zunehmend eingeschränkte Alltagsfähigkeit (McKhann et al., 1984). In den verschiedenen Stadien der AD sind die Defizite unterschiedlich ausgeprägt. So wird die AD mittlerweile als ein Kontinuum betrachtet, welches sich aus einer präklinischen Phase heraus über eine Phase der leichten kognitiven Beeinträchtigung (MCI: engl. *Mild Cognitive Impairment*) hin zu einer vollständig ausgeprägten AD entwickelt (Villemagne et al., 2013). Derzeit gibt es keine Heilung, nur wenige symptomatisch wirkende Präparate sind zugelassen. Es wird an therapeutischen Kombinationsmöglichkeiten geforscht, um der Komplexität der Erkrankung zu begegnen (Übersicht in Cummings et al., 2019).

#### **1.1.2 Diagnosekriterien**

Die Alzheimer-Demenz (AD) wird anhand ihrer kognitiven Beeinträchtigungen klinisch diagnostiziert. Dies wird durch Liquorpunktion und bildgebende Verfahren ergänzt. Die Diagnosestellung der AD kann jedoch schwierig sein und unterschiedliche Testverfahren können zu divergierenden Ergebnissen führen (Dolci et al., 2017).

Dem *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/ Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS/ADRDA), zusammengefasst von McKhann et al. (1984), zufolge wird eine AD für wahrscheinlich gehalten, wenn sich bei der klinischen Untersuchung und bei psychologischen Tests eine Demenz abzeichnet, wenn sich zudem in mindestens zwei kognitiven Bereichen Beeinträchtigungen zeigen und sich das Gedächtnis des Betroffenen zunehmend verschlechtert. Es darf keine Bewusstseinsstörung vorliegen, der Ausbruch der Krankheit muss im Alter zwischen 40 und 90 Jahren erfolgen (meist bei ca. 65 Jahren) und es dürfen keine anderen körperlichen oder psychischen Erkrankungen vorliegen, die die Symptomatik ebenso erklären könnten (vgl. McKhann et al., 1984: S. 940, Table 1). Zusätzlich können die Betroffenen Verhaltensauffälligkeiten zeigen und in ihren Alltagsaktivitäten



## Einleitung

eingeschränkt sein. Die sichere Diagnose kann nur post mortem mittels einer pathologischen Untersuchung des Gehirns gestellt werden. Ergänzend fügten die Arbeitsgruppen des *National Institute on Aging* (NIA) und der *Alzheimer's Association* (AA), berichtet durch McKhann et al. (2011), folgende Punkte hinzu: ein schleichender Ausbruch der Symptome und eine subjektiv oder durch Fremdanamnese ermittelte kognitive Verschlechterung, welche entweder den amnestischen Defiziten oder den nicht-amnestischen Defiziten angehört. Die meist auftretenden amnestischen Defizite bezeichnen das Gedächtnis betreffende Verschlechterungen, besonders beeinträchtigt Lernen und Wiedergeben neuer Informationen. Nicht-amnestische Defizite sind das Gedächtnis nicht betreffende Beeinträchtigungen, die in drei Kategorien unterteilt werden: 1. Defizite der Kategorie Sprachstörungen, 2. Defizite der Kategorie räumlich-visuelle Wahrnehmung, u. a. verschlechterte Objekt- und Gesichtserkennung oder Alexie (Verlust der Lesefähigkeit), 3. Defizite der Kategorie Exekutivfunktionen, vor allem betreffend logisches Denken, Urteilsvermögen und Fähigkeit zur Problemlösung. Zum Teil werden Subtypen diskutiert, welche besonders in einer dieser Kategorien Defizite zeigen, wie z. B. der dysexekutive Subtyp (Crane et al., 2017).

### 1.1.3 Ätiologie

Definition aus dem ICD-10-Katalog: F00.0\* - Demenz bei Alzheimer-Krankheit:

*„Die Alzheimer-Krankheit ist eine primär degenerative zerebrale Krankheit mit unbekannter Ätiologie und charakteristischen neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen. Sie beginnt meist schleichend und entwickelt sich langsam aber stetig über einen Zeitraum von mehreren Jahren.“* (Krollner und Krollner, 2021)

Eine Vielzahl verschiedener Risikofaktoren wurde im Zusammenhang mit der AD identifiziert (Übersicht in Armstrong, 2019). Ein genetischer Risikofaktor ist beispielsweise die Trisomie 21, sodass Menschen mit Down Syndrom mit hoher Wahrscheinlichkeit die früh auftretende Form der AD (*Early-Onset Alzheimer's Disease*, kurz EOAD) entwickeln (Sekijima et al., 1998). Die spät ausbrechende Form der AD (*Late-Onset Alzheimer's Disease*, kurz LOAD) wurde insbesondere mit höherem Alter (Kukull et al., 2002), sowie mit dem Vorliegen des  $\epsilon 4$ -Allels des Gens APOE (Apolipoprotein E) assoziiert (Corder et al., 1993; Yu et al., 2017b). Frauen scheinen evtl. aufgrund hormoneller Veränderungen während der Menopause ein höheres LOAD-Risiko zu haben als Männer (Mosconi et al., 2017). Einen positiven Effekt auf die kognitiven Fähigkeiten zeigten die Gegenmaßnahmen sportliche Betätigung (Podewils et al., 2005; Morris et al., 2017;

## Einleitung

Sobol et al., 2018), Ernährungsumstellung (Nolan et al., 2018) sowie kognitives Training (Emsaki et al., 2017), insbesondere in Kombination (Rosenberg et al., 2018).

### 1.1.4 Epidemiologie und Verlauf

In Deutschland leben etwa 1,6 Millionen Menschen mit Demenz, davon die meisten mit der LOAD (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V., 2020b). Im Jahr 2018 lag die Prävalenz in Deutschland bei 1.585.166 AD-Erkrankten (Bintener et al., 2019). Weltweit leiden schätzungsweise 50 Millionen Menschen an Demenz, davon mindestens 60-70 % an AD, bis zum Jahr 2050 könnten es bis zu 152 Millionen demenziell erkrankte Menschen werden (WHO, 2022).

Die Erkrankung wird nach ihrem Krankheitsbeginn in 2 Subtypen eingeteilt: die sogenannte *Early-Onset Alzheimer's Disease* (EOAD), die frühe Form der Alzheimer-Demenz (AD), welche vor dem 60. bis 65. Lebensjahr ausbricht und nur einen geringen Teil der Fälle ausmacht. Die Prävalenz ist je nach Population und je nachdem, was in der Studie unter früher Demenz verstanden wird, sehr unterschiedlich. So berichten Kvello-Alme, Brathen et al. (2019) von einer Prävalenz von 76 pro 100.000 norwegische Einwohner und merken an, dass im Vergleich zu Studien aus England und Japan die Prävalenz in Norwegen etwas höher zu sein scheint. In Deutschland ist im Alter zwischen 45 und 65 Jahren etwa jeder 1000. betroffen (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V., 2020a). Frühe Formen der AD zeigen oft einen aggressiveren Verlauf als die späte Form der AD (Barnes et al., 2018).

Hiervon lässt sich die *Late-Onset Alzheimer's Disease* (LOAD), die späte Form der AD abgrenzen, welche nach dem 60. bis 65. Lebensjahr ausbricht und mit schätzungsweise 95 % den Großteil der Fälle ausmacht (Übersicht in Yamazaki et al., 2019). Die Inzidenzrate der LOAD steigt mit dem Alter exponentiell an und verdoppelt sich alle 5 Jahre ab einem Alter von 65 Jahren (Kukull et al., 2002). Nach Diagnosestellung leben die Betroffenen noch durchschnittlich 4 bis 8 Jahre (Übersicht in Rabinovici, 2019), wobei das Überleben von verschiedenen Faktoren abhängt. Prognostisch ungünstig sind: männliches Geschlecht, höheres Alter und schlechtere kognitive Testergebnisse (Rhodius-Meester et al., 2018).

### 1.1.5 Pathophysiologie

Die hauptsächliche pathophysiologische Veränderung der Hirnstruktur bei von Alzheimer betroffenen Menschen ist das Auftreten der intrazellulären Tau-Fibrillen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein und der extrazellulären Amyloid-Plaques, aus Amyloid  $\beta$ -

## Einleitung

Peptiden (Übersicht in Hardy und Allsop, 1991). La Joie, Visani et al. (2020) fanden heraus, dass anhand von Positronen-Emissions-Tomografie (PET) gemessene Tau-Fibrillen-Signale je nach ihrer Intensität den Schweregrad der zukünftigen Atrophie der Hirnrinde vorhersagen können. Dieser Effekt wurde für Amyloid  $\beta$  nicht beobachtet. Somit könnten Tau-Signale im PET einen wichtigen Biomarker für den Progress der Erkrankung darstellen.

Die von Hardy et al. (1991) postulierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese besagt, dass die Pathogenese der LOAD hauptsächlich auf der veränderten Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP: engl. *amyloid precursor protein*) begründet ist, welches im weiteren Verlauf akkumuliert und für den Synapsenuntergang, Neuronenverlust und die Bildung der Taufibrillenbündel verantwortlich ist (Übersicht in Hardy und Allsop, 1991). APP wird entweder durch die  $\alpha$ - und die  $\gamma$ -Sekretase gespalten, wobei ein nicht-pathogenes Peptid entsteht oder durch die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Sekretase, wodurch das toxische A $\beta$ -Peptid entsteht (Übersicht in Esler und Wolfe, 2001). Mutationen in den Genen APP, Presenilin 1 und Presenilin 2 (PSEN1 und PSEN2), welche für das Amyloid-Vorläufer-Protein, beziehungsweise für zwei Hauptbestandteile der  $\gamma$ -Sekretase kodieren, führen sehr wahrscheinlich zur familiären autosomal vererbten Form der AD (Janssen et al., 2003). Möglicherweise könnte eine Modulation dieser Sekretasen die Produktion des Amyloid  $\beta$  verringern (van Maanen et al., 2018). Der enge Zusammenhang zwischen den für die familiäre AD untersuchten Risikogenen und der Amyloid-Kaskaden-Hypothese macht deutlich, dass diese Hypothese mehr für die frühe Form der AD, als für die LOAD zutreffen mag. Trotz Hinweisen auf einen Zusammenhang mit der LOAD ist noch immer unklar, in welchem Ausmaß die Ablagerung oder die veränderte Verarbeitung des Amyloids  $\beta$  eine Rolle bei der Entstehung der Krankheit spielt. Andere Prozesse, wie metabolische, mitochondriale oder synaptische Veränderungen sowie Entzündungsprozesse, welche die Pathogenese der LOAD ebenfalls beeinflussen könnten, werden zurzeit diskutiert (Übersicht in Swerdlow, 2018).

Eine weitere pathophysiologische Auffälligkeit ist die morphologische Veränderung verschiedener Regionen des Hippocampus. Dies konnten Gordon et al. (2013) bei LOAD-Erkrankten im Vergleich zu kognitiv gesunden älteren Probanden nachweisen. Auch zeigte sich im Mausmodell eine regionenspezifische Vulnerabilität des Hippocampus gegenüber oxidativem Stress (Mehder et al., 2020). Weiterhin könnte die veränderte Genexpression des Glykoproteins Neuroplastin ein Biomarker für Neurodegeneration sein, welche in den Hippocampusregionen von LOAD-Erkrankten nachgewiesen wurde (Ilic et al., 2019). Nicht nur der Hippocampus, auch der Nucleus basalis Meynert zeigt sich bei LOAD degeneriert, sodass auch seine Degeneration als Biomarker der LOAD zum Einsatz kommen könnte (Fernández-Cabello et al., 2020). Um die Pathogenese der LOAD vollständig zu begründen ist unter anderem die Auswertung großer

Datenmengen notwendig. Dies könnte zukünftig durch die Technik der künstlichen Intelligenz ermöglicht werden (Übersicht in Mishra und Li, 2020).

### 1.1.6 Genetische Grundlagen der Erkrankung

Bei der AD wird zwischen EOAD und LOAD unterschieden. Wingo et al. (2012) berechneten eine Heritabilität der EOAD, also das Ausmaß der Erbllichkeit, von etwa 92 bis 100 %, was für eine beinahe ausschließlich genetisch bedingte Erkrankung spricht. Die EOAD kann autosomal-dominant über eines der drei Risikogene *Amyloid Precursor Protein (APP)*, Presenilin 1 (PSEN1) oder Presenilin 2 (PSEN2) vererbt werden, wobei neueren Erkenntnissen zufolge nur eine geringe Zahl der von EOAD betroffenen Menschen diese Risikogene trägt und weitere Gene eine Rolle bei der Entstehung der EOAD spielen müssen (Jarmolowicz et al., 2015). Sie kann familiär gehäuft vorkommen, in diesen Fällen wird sie auch als familiäre Alzheimer-Demenz (FAD: engl. *familial Alzheimer's Disease*) bezeichnet; Jarmolowicz et al. (2015) zufolge weisen etwa 35 % der an EOAD Erkrankten mindestens einen Verwandten ersten Grades mit AD auf. Beachtet werden muss die in den verschiedenen Studien uneinheitliche Verwendung der Bezeichnung „EOAD“, die z. T. für jedwede frühe AD-Form und z. T. nur für die autosomal-dominant vererbte Form verwendet wird.

Im Gegensatz zur EOAD handelt es sich bei der weit häufigeren LOAD um eine multifaktorielle Erkrankung, für die viele verschiedene Risikofaktoren und Risikogene (Suszeptibilitätsgene) identifiziert wurden (Übersicht in Armstrong, 2019). Träger<sup>1</sup> dieser Suszeptibilitätsgene scheinen eine erhöhte Prädisposition (Erkrankungswahrscheinlichkeit) für die LOAD zu haben. Für die LOAD berechneten Wingo et al. (2012) eine Heritabilität von etwa 70 %. Damit bestätigen sie die These, dass es sich bei der LOAD um eine polygenetische Erkrankung handelt.

Bei der Erforschung der polygenetischen LOAD erwiesen sich genomweite Assoziationsstudien (GWAS) als nützlich. Mithilfe von GWAS ist es möglich, Millionen von SNPs (engl. *single nucleotide polymorphisms*), verteilt über das gesamte Genom, auf eine Assoziation zu einer Erkrankung zu untersuchen. SNPs, also Einzelbasenaustausche, beschreiben die häufigste Form der DNA-Mutation, bei der jeweils eine DNA-Base (A, T, C, G) durch eine andere ausgetauscht wird (U. S. National Library of Medicine, 2018). Dieser Basenaustausch kann ohne Konsequenz bleiben oder aber einen Marker für eine Prädisposition für bestimmte Erkrankungen darstellen

---

<sup>1</sup> Der Übersichtlichkeit halber wurde in der vorliegenden Arbeit die männliche Schreibweise zur Beschreibung gemischter Kohorten (Träger, Probanden, Teilnehmer etc.) genutzt, die weibliche Schreibweise nur bei ausschließlich weiblichen Kohorten.

## Einleitung

(U. S. National Library of Medicine, 2018). Diese Mutationen können einen Einfluss auf die Proteinsynthese nehmen, indem sie beispielsweise in epigenetische Mechanismen, wie die DNA-Methylierung eingreifen oder zu alternativem Spleißen führen, was Ursache verschiedener Erkrankungen sein kann (Klinger-König et al., 2019; Chiara et al., 2020; Übersicht in Abramowicz und Gos, 2019). So wurden bei an LOAD Erkrankten andere Methylierungsmuster nachgewiesen als bei kognitiv Gesunden (Shao et al., 2018; Fransquet et al., 2020). Liu et al. (2018) zeigten zudem einen Einfluss der Methylierungsgrade der TOMM40-APOE-Region auf das Erinnerungsvermögen bei gesundem kognitiven Altern. Polymorphismen innerhalb nicht-kodierender Abschnitte der DNA können die Genexpression beeinflussen, indem sie mit einer funktionellen Variante im Kopplungsungleichgewicht liegen oder im Kopplungsungleichgewicht mit einer anderen nicht-kodierenden Variante gemeinsam eine RNA-Bindungsstelle stabilisieren (Martin et al., 2012). Weiterhin können nicht-kodierende Varianten innerhalb regulatorischer DNA-Abschnitte liegen, wodurch sie zur Ausprägung bestimmter Phänotypen beitragen können (Maurano et al., 2012). Oder sie beeinflussen die Genexpression, indem sie vermehrt innerhalb der Erkennungsstellen für Transkriptionsfaktoren liegen und diese beeinflussen, wie Ketharnathan et al. (2018) zeigen konnten.

Aktuell werden Unterschiede zwischen den Geschlechtern viel diskutiert, deren Einfluss auf die LOAD ebenfalls beachtet werden sollte. So fanden Mosconi et al. (2017), dass die präklinische Phase der LOAD bei Frauen mit der hormonellen Umstellung der Perimenopause zusammenhängt und somit früher beginnt als bei Männern. Besonders für die Therapie der LOAD könnte dieses Forschungsfeld entscheidend sein, wie die Studie von Claxton et al. (2013) zeigt. Die Autoren untersuchten das Ansprechen auf eine Therapie mit intranasalem Insulin bei MCI-, bzw. LOAD-Patientinnen und Patienten mit und ohne APOE  $\epsilon$ 4-Allel. Dabei zeigten APOE  $\epsilon$ 4-negative Männer eine Verbesserung und APOE  $\epsilon$ 4-negative Frauen eine Verschlechterung ihrer kognitiven Leistungen. Einen Überblick über die geschlechtsspezifischen epigenetischen Einflüsse der Polymorphismen bieten Ratnu et al. (2017) in ihrem Review-Artikel.

## **1.2 Das „Translocase of outer mitochondrial membrane 40“-Gen**

### **1.2.1 Funktion von TOMM40**

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Region um das Gen „*Translocase of outer mitochondrial membrane 40*“ kDa, kurz TOMM40 (Synonyme: TOM40, PEREC1, C19orf1, PER-EC1, D19S1177E), welches bereits mehrfach als mögliches Suszeptibilitätsgen für die LOAD identifiziert wurde (Grupe et al., 2007; Abraham et al., 2008; Ma et al., 2013). Es liegt auf

## Einleitung

Chromosom 19 (19q13.32), zwischen den Basenpaaren 45.394.477 und 45.406.946 und umfasst 10 Exons, laut *build GRCh37* (NCBI, 2021b). Das Gen „*Translocase of outer mitochondrial membrane 40*“, kodiert für das gleichnamige Protein. Dieses ist für die Ausformung des Kanals der Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM) verantwortlich und an Transport und Filterung der passierenden Proteinvorformen beteiligt. Der fertige TOM-Komplex enthält als Trimer drei TOMM40-Kanäle oder als Dimer zwei TOMM40-Kanäle, wobei er zwischen beiden Isoformen hin und her wechselt. Weiterhin besteht der TOM-Komplex aus der Proteinuntereinheit TOMM22, welche die TOMM40-Kanäle miteinander verbindet und essentiell für die Stabilität des Komplexes ist, aus TOMM20 und TOMM70, die vermutlich Rezeptorproteine sind und aus drei kleineren Proteinen TOMM5, TOMM6 und TOMM7, deren Funktion noch nicht abschließend geklärt wurde (Shiota et al., 2015; Bausewein et al., 2017).

Die Funktionsstudie von Zeh (2013) zeigt die Bedeutung des Gens anhand von TOMM40-Knock-Out-Mäusen. Homozygote Knock-Out-Mäuse, d. h. Mäuse, denen beide Genkopien des TOMM40-Gens fehlen, waren nicht lebensfähig und verstarben schon im Embryonalstadium. Heterozygote Knock-Out-Mäuse mit nur 50 % TOMM40-mRNA-Expression zeigten eine zunächst normale Entwicklung, jedoch mit einer um 30 % erhöhten Mortalitätsrate. Diese Mäuse wiesen leichte kardiale Beeinträchtigungen und langsam voranschreitende neurologische Veränderungen auf. Die mangelnde TOMM40-Expression konnte von den jungen Mäusen verhältnismäßig gut kompensiert werden, während die Kompensierung mit zunehmendem Alter versagte. Alte heterozygote Mäuse zeigten im Gegensatz zu jungen heterozygoten Mäusen einen schwer beeinträchtigten Sauerstoffverbrauch in den Mitochondrien des Herzens und des Gehirns. Es gab jedoch keinen Anhaltspunkt für die Entwicklung AD-typischer Phänotypen, wie zum Beispiel Gedächtnisverlust.

Taylor et al. (2003) konnten in ihrer Funktionsstudie anhand von *Neurospora crassa* (ein Schimmelpilz, der in der Biologie als Modellorganismus dient) nachweisen, dass das TOMM40-Gen für das Überleben der Pilze essentiell ist. *N. crassa* mit reduzierten TOMM40-Spiegeln zeigten einen defekten Import von Proteinvorformen in die Mitochondrien. Außerdem wurden erniedrigte Spiegel von TOMM6 und TOMM22 festgestellt, deren Stabilität und/oder Import von der Anwesenheit von TOMM40 abzuhängen scheinen. Die Ergebnisse dieser beiden Funktionsstudien zeigen, dass reduzierte TOMM40-Spiegel zu schweren Funktionseinschränkungen der Mitochondrien führen.

Swerdlow et al. (2004) postulierten, dass eine Fehlfunktion der Mitochondrien mit der spät-ausbrechenden nicht-familiären Form der AD (LOAD) assoziiert sein könnte (Mitochondrien-Kaskaden-Hypothese). Zuvor wurden geschwollene und dysfunktionale Mitochondrien in

## Einleitung

Hybridzellen beobachtet, welche mit der mitochondrialen DNA von LOAD-Erkrankten bestückt worden waren (Trimmer et al., 2000). Swerdlow et al. (2004) zufolge könnten Polymorphismen der Kern- sowie der mitochondrialen DNA für eine vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen sorgen, die schließlich zu verstärkter A $\beta$ -Ablagerung, Apoptose der betroffenen Neuronen und Bildung von phosphorylierten Tau-Fibrillenbündeln führt. Unklar ist bislang, ob Amyloid  $\beta$  die Mitochondrienschäden mit verursacht oder ob diese unabhängig von Amyloid  $\beta$  entstehen und somit die Mitochondrien-Kaskaden-Hypothese die ältere Amyloid-Ablagerungshypothese ablöst (Übersicht in Swerdlow, 2018).

Wie könnten aber Polymorphismen des TOMM40-Gens einen Einfluss auf Mitochondrienschäden haben? Die große Mehrheit der mitochondrialen Proteine, so auch A $\beta$ -Peptide und APP, wird von der DNA im Zellkern kodiert, im Zytosol synthetisiert und anschließend erfolgt der Protein-Import über die TOM-Pore (Übersicht in Gottschalk et al., 2014). Da TOMM40 ein essentieller Bestandteil der TOM ist, könnte eine Strukturänderung des Kanalproteins dafür sorgen, dass passierende Proteine mit der Pore interagieren und akkumulieren. So konnten Anandatheerthavarada et al. (2003) in ihrer Studie zeigen, dass APP unter bestimmten Umständen innerhalb der TOM-Pore akkumuliert, toxisches Amyloid  $\beta$  freisetzt und somit hauptverantwortlich für Fehlfunktionen der Mitochondrien, wie gestörtes Membranpotenzial und ATP-Gewinnung ist. Besonders Neurone zeigten sich anfällig für durch Amyloid  $\beta$  verursachte Mitochondrienschäden (Cha et al., 2012). Der Metabolismus der Mitochondrien, welcher besonders im Gehirn eine entscheidende Bedeutung für die Verstoffwechslung von Sauerstoff und Glukose innehat, könnte durch TOMM40-Variationen (durch TOMM40-Mutationen bedingte Strukturveränderungen des Proteins) bereits von Geburt an beeinflusst werden (Übersicht in Roses et al., 2016). Eine erhöhte Expression des TOMM40-Proteins zeigte in der Studie von Zeitlow et al. (2017) einen positiven Effekt für die Mitochondrien, u. a. festgestellt durch ein erhöhtes mitochondriales Membranpotenzial und eine verstärkte ATP-Produktion sowie vor allem eine gewisse Resistenz gegenüber zugefügtem Amyloid  $\beta$ .

Es besteht weiterer Forschungsbedarf darüber, wie die molekularen Mechanismen ablaufen, die über Polymorphismen des TOMM40-Gens zu einer Interaktion der Pore mit dem APP und somit zu dysfunktionalen Mitochondrien führen, und ob dieser Vorgang zur Entstehung der Alzheimer-Pathogenese beiträgt. Geklärt werden muss außerdem, ob durch ein Eingreifen in die Expression des TOMM40 ein protektiver Effekt auf die Mitochondrien erzielt werden kann.

### 1.2.2 Genetik von TOMM40

Schon vor etwa 10 Jahren konnten mehrere genomweite Assoziationsstudien (GWAS) einen Zusammenhang zwischen TOMM40 und der LOAD bestätigen. So stellten Grupe et al. (2007) in ihrer Metaanalyse verschiedener GWAS sowie Yu et al. (2007) und Abraham et al. (2008) in ihren GWAS eine signifikante Assoziation von Polymorphismen des Gens TOMM40 mit der LOAD fest. Ebenso konnten Harold et al. (2009) in ihrer GWAS eine genomweit signifikante Assoziation verschiedener TOMM40-Polymorphismen, u. a. rs2075650, zur LOAD beobachten. Sie wiesen darauf hin, dass der SNP rs2075650 mit dem SNP rs429358, der u. a. für das APOE ε4-Allel ausschlaggebend ist, im Kopplungsungleichgewicht (engl.: *linkage disequilibrium*, kurz LD) liegt. Die gesamte TOMM40-APOE-Region liegt in einem hohen LD und je nach Studie zeigten SNPs des TOMM40-Gens unabhängige oder von APOE-abhängige Assoziationen zur LOAD. So zeigte sich beispielsweise die von Yu et al. (2007) beobachtete Assoziation von TOMM40 zur LOAD nicht länger signifikant nach Korrektur für das APOE ε4-Allel. Auch Bao et al. (2016) und Huang et al. (2016) fanden in ihren Metaanalysen verschiedener Studien eine Assoziation des Gens TOMM40 mit der LOAD. Bislang konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob sämtliche Effekte der TOMM40-Polymorphismen eigentlich auf APOE zurückzuführen sind. Ma et al. (2013) und Takei et al. (2009) zeigten in ihren Assoziationsstudien eine signifikante Assoziation mehrerer TOMM40-Polymorphismen bzw. Polymorphismen der direkten Umgebung von TOMM40 mit der LOAD. Du et al. (2019) konnten eine Assoziation von rs76692773 zur LOAD beobachten. Jiao et al. (2015) führten eine polygenetische Analyse durch und identifizierten drei TOMM40-Polymorphismen, von denen zwei einen protektiven Effekt bezüglich der LOAD zeigten und ein Polymorphismus mit einem höheren Risiko für LOAD einherging. Sie stellten fest, dass die Variationen sich untereinander beeinflussen und ihre Effekte entweder abschwächen oder verstärken können.

Roses et al. (2010) konnten in ihrer Studie durch genetische Abstammungsuntersuchungen herausfinden, dass der Polymorphismus rs10524523 im Gen TOMM40 signifikant mit dem Ausbruchsalter und dem Erkrankungsrisiko für eine LOAD assoziiert ist. Es handelt sich bei rs10524523 um ein Desoxythymidin-Homopolymer, das eine variable Anzahl von Thymidin (T)-Basen, sogenannte Poly-T-Wiederholungen aufweist, welche in S (engl. *short*) bei  $\leq 19$  T-Basen, L (engl. *long*) bei  $\geq 20$  bis  $\leq 29$  T-Basen und VL (engl. *very long*) bei  $\geq 30$  T-Basen eingeteilt werden (Roses et al., 2014). Die Assoziation zur AD hängt stark von der Länge der Poly-T-Wiederholungen ab und davon, welche Allelkombination der APOE-Allele der Betroffene trägt. Die verschiedenen Allele des APOE-Gens sind populationsspezifisch jeweils mit unterschiedlichen Längen von TOMM40'523-Poly-T-Wiederholungen gekoppelt: Das Allel ε4 des APOE-Gens ist bei Kauasiern stark mit dem TOMM40'523-L-Allel (20-29 Basen) gekoppelt (Yu



## Einleitung

et al., 2017b). Probanden mit dem Haplotyp APOE  $\epsilon 3/\epsilon 4$  entwickelten im Durchschnitt 7 Jahre früher die LOAD, wenn ihr APOE  $\epsilon 3$ -Allel mit längeren Poly-T-Wiederholungen gekoppelt war, als Probanden, deren APOE  $\epsilon 3$ -Allel mit kürzeren Poly-T-Wiederholungen gekoppelt war (Roses et al., 2010). Dagegen stellten Yu et al. (2017a) fest, dass 5 Poly-T-Wiederholungen bei APOE  $\epsilon 3/\epsilon 3$ -Trägern mit stärkerem kognitiven Verlust assoziiert waren als  $\epsilon 3/\epsilon 3$ -Homozygote mit VL Poly-T-Wiederholungen. Johnson et al. (2011) stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen längeren Poly-T-Wiederholungen in TOMM40 (rs10524523) und abnehmendem Hirnvolumen sowie abnehmender kognitiver Leistung bei asymptomatischen APOE  $\epsilon 3/\epsilon 3$ -Trägern fest. Und bei APOE  $\epsilon 3/\epsilon 3$ -Trägern zeigte sich der SNP rs2075650 signifikant mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Ausbrechen der LOAD assoziiert (Soyal et al., 2020). Der Polymorphismus rs10524523 könnte die Möglichkeit bieten, den Effekt des TOMM40-Gens auf die AD unabhängig von dem des APOE-Gens zu betrachten. Der Zusammenhang zwischen den APOE-Allelen und den TOMM40'523 Poly-T-Wiederholungen ist je nach Ethnie unterschiedlich (Yu et al., 2017b).

Mehrere Studien untersuchten den Einfluss von Polymorphismen auf verschiedene Endophänotypen bei Late-onset Alzheimer-Patienten (in Kapitel 1.4 wird das Konzept erläutert). So fanden Cruchaga et al. (2013) in ihrer GWAS einen genomweit signifikanten Zusammenhang zwischen SNPs des Gens TOMM40 und den für die LOAD bekannten Biomarkern im Liquor p-Tau und Tau fest. Souza et al. (2016) stellten eine signifikante Assoziation zwischen dem Polymorphismus rs2075650 des Gens TOMM40 und dem Biomarker A $\beta$  42 fest, welcher je nach Konzentration im Liquor die Amyloidablagerung im Gehirn widerspiegelt. Potkin et al. (2009) fanden in ihrer GWAS heraus, dass die Polymorphismen rs2075650 und rs11556505 des Gens TOMM40 genomweit signifikant mit Hippocampus-Atrophie als quantitativ messbarem Endophänotyp der AD assoziiert sind. Dies wurde durch Arpawong et al. (2017) bestätigt, die eine Assoziation zwischen erniedrigtem Hippocampusvolumen und verminderter Merkfähigkeit bei Trägern der Variation rs11556505-T und des APOE- $\epsilon 4$  Allels beobachteten. Auch Marioni et al. (2018) fanden SNPs des TOMM40-Gens mit der LOAD assoziiert. Sie fanden Hinweise darauf, dass die Assoziation durch die Genexpression des TOMM40-Gens und durch DNA-Methylierung besonders im präfrontalen Kortex vermittelt wird. Da für diese Aufgaben eine Vielzahl verschiedener SNPs in Frage kommt, schlossen die Autoren, dass mehrere SNPs im TOMM40-Gen an der so vermittelten Assoziation zur LOAD beteiligt sein müssen.

Davies et al. (2014) und De Jager et al. (2012) beobachteten in ihren GWAS, dass TOMM40 und die umgebende APOE-Region mit nicht-pathologischem kognitiven Altern assoziiert ist. Auch Mise et al. (2017) fanden einen Zusammenhang zwischen TOMM40 und kognitivem Abbau. Sie stellten fest, dass dieser mit einer geringeren mRNA-Expression von TOMM40 bei AD-Patienten

## Einleitung

assoziiert war. Eine veränderte Genexpression des Gens TOMM40 könnte so Einfluss auf die Kognition nehmen.

In einer prospektiven Studie untersuchten Shadyab et al. (2017) Polymorphismen, welche in verschiedenen GWAS mit langer Lebensdauer bei Frauen unterschiedlicher Ethnien assoziiert wurden. Dabei fanden sie heraus, dass u. a. der TOMM40 SNP rs2075650 (Allel G) bei kaukasischen Frauen signifikant mit langer Lebensdauer assoziiert ist. Yashin et al. (2018) konnten hingegen für Männer und Frauen für die Variation rs2075650-A eine signifikante Assoziation zu langer Lebensdauer feststellen.

### 1.3 Weitere Gene der untersuchten Genregion

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Genregion umfasst neben dem TOMM40-Gen das Apolipoprotein E-Gen sowie die Gene Apolipoprotein C1 (APOC1) und „Nectin cell adhesion molecule 2“ (NECTIN2). Die gesamte Genregion steht im Verdacht, mit Kognition, langer Lebensdauer und der AD assoziiert zu sein.

#### 1.3.1 „Apolipoprotein E“-Gen

Von den vielen Genen, welche einen Einfluss auf die Entstehung der LOAD zu haben scheinen, ist das Apolipoprotein E-Gen, kurz APOE, (v. a. das  $\epsilon 4$ -Allel) das am besten untersuchte Gen. Als Erste postulierten Corder et al. (1993) APOE als mögliches Risikogen für die sporadische späte Form der AD. Das Gen APOE liegt auf Chromosom 19 (19q13.32), zwischen den Basenpaaren 45.409.039 und 45.412.650 (NCBI, 2021a). Dort liegt es mit den Apolipoprotein-Genen C1 und C2 in einem Gencluster. Genprodukt des APOE-Gens ist das Apolipoprotein E, ein wesentlicher Bestandteil von Chylomikronen, welche im Körper in die Verteilung triglyzeridreicher Lipoproteinkomponenten involviert sind. Es sorgt für die Aufnahme der Lipidpartikel in die Leberzellen. Mutationen des Gens führen zu verschiedenen Formen der Hyper- oder Dyslipoproteinämie durch gestörte Abläufe im Fettstoffwechsel (Übersicht in Marais, 2019).

Die APOE-Allele  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  und  $\epsilon 4$  unterscheiden sich an zwei Positionen, was den Einfluss ihrer Proteinprodukte auf die LOAD zu beeinträchtigen scheint (Übersicht in Yamazaki et al., 2019). Das Allel  $\epsilon 2$  wurde mit einem protektiven Effekt hinsichtlich der LOAD assoziiert (Saddiki et al., 2020). Das Allel  $\epsilon 4$  ist hingegen mit einem höheren Risiko für die LOAD assoziiert, wobei sich dieses Risiko mit jedem  $\epsilon 4$ -Allel verdoppelt (Yu et al., 2017b). Weiterhin ist das APOE  $\epsilon 4$ -Allel mit einem früheren Ausbruch der Krankheit assoziiert. So lag das Alter des Krankheitsausbruchs

## Einleitung

ohne APOE  $\epsilon$ 4-Allel bei durchschnittlich 84,3 Jahren, mit einem APOE  $\epsilon$ 4-Allel bei 75,5 Jahren und bei 68,4 Jahren mit zwei APOE  $\epsilon$ 4-Allelen (Corder et al., 1993).

APOE liegt in unmittelbarer Nachbarschaft des Gens TOMM40 und wurde zumindest teilweise in der vorliegenden Arbeit mit analysiert. Die beiden Gene zeigen ein starkes Kopplungsungleichgewicht (LD) untereinander (Yu et al., 2017b), wobei an LOAD Erkrankte ein stärkeres LD zwischen Risikovariationen der Gene TOMM40, APOE und APOC1 aufwiesen als gesunde Probanden (Zhou et al., 2019). Mithilfe des Polymorphismus rs10524523 (kurz '523), welcher sich in Intron 6 des TOMM40-Gens befindet, kann das Ausbruchsalter der LOAD noch genauer vorhergesagt werden, als es bislang aufgrund der APOE  $\epsilon$ 4-Allele möglich war.

### 1.3.2 „Apolipoprotein C1“-Gen und „Nectin cell adhesion molecule 2“-Gen

In der vorliegenden Studie wurden neben TOMM40 einige SNPs der unmittelbar benachbarten Genregion, unter anderem innerhalb der Gene Apolipoprotein C1 (APOC1) und „Nectin cell adhesion molecule 2“-Gen (NECTIN2), untersucht. APOC1 liegt auf Chromosom 19 (19q13.32) zwischen den Basenpaaren 45.417.577 und 45.422.606 innerhalb eines Apolipoprotein-Genclusters (NCBI, 2022b). Es kodiert für das Apolipoprotein C1, welches vor allem in der Leber synthetisiert wird. Apolipoprotein C1 ist in den Stoffwechsel des HDL (*high density lipoproteins*) und VLDL (*very low density lipoproteins*) involviert (Fuior und Gafencu, 2019). NECTIN2 liegt ebenfalls auf Chromosom 19 (19q13.32), zwischen den Basenpaaren 45.349.393 und 45.392.485 (NCBI, 2022a). Es kodiert für ein Membranglykoprotein aus drei Immungobulin-ähnlichen Domänen. Das NECTIN2-Protein ist als Plasmamembrankomponente an der Ausbildung von Adhäsionsverbindungen zwischen Zellen beteiligt und wirkt als Eintrittspforte für Mutationsvariationen bestimmter Viren, wie zum Beispiel des Herpes-simplex-Virus (Molfetta et al., 2019). Porcellini et al. (2010) vermuten, dass dies einen Einfluss auf die Prädisposition gegenüber zerebralen Virusinfektionen haben könnte, welche sie mit dem zunehmenden Auftreten der LOAD in Verbindung bringen. Han et al. (2017) beobachteten, dass ein Polymorphismus des NECTIN2-Gens (rs6857) mit einem niedrigeren Spiegel an NECTIN2 assoziiert ist und stellten die Vermutung auf, dass dieser SNP eine Risiko-Variation für LOAD sein könnte, indem er die Expression des Gens NECTIN2 mittels Mikro-RNA (miRNA) herunterreguliert. Ferrari et al. (2017) konnten, neben der Assoziation zur AD, auch eine Assoziation zwischen rs6857-T und Frontotemporaler Demenz beobachten. Szymczak et al. (2020) stellten eine Assoziation einer NECTIN2-Variation (rs11672399-A) zu längerer Lebensdauer fest. Da jedoch die gesamte Genregion um TOMM40 und APOE mit langer

## Einleitung

Lebensdauer assoziiert zu sein scheint, ist unklar, ob diese Assoziation unabhängig von den Einflüssen der Gene APOE und TOMM40 ist (Sebastiani et al., 2017).

### 1.4 Endophänotypen

Die zugrundeliegenden genetischen Faktoren komplexer psychiatrischer Erkrankungen, wie der LOAD, zu untersuchen, hat sich in den letzten Jahren als aufwendig und nicht immer erfolgreich herausgestellt, sodass es gewinnbringend sein kann, quantifizierbare und möglichst objektive Endophänotypen zu finden (Übersicht in Ertekin-Taner et al., 2013). Die Hoffnung ist, dass diese Endophänotypen monogenetisch oder durch eine kleinere Anzahl von Risikogenen vererbt werden als die komplexe Erkrankung, was die Zuordnung von Variationen leichter macht und dass diese Endophänotypen somit diagnostische Biomarker oder neue Therapieansätze darstellen (Übersicht in Gottesman und Gould, 2003).

Endophänotypen sollten Gottesman und Gould zufolge (Übersicht in Gottesman und Gould, 2003; modifiziert nach Gershon und Goldin, 1986) bestimmte Kriterien erfüllen: (1.) Sie sollten in der Bevölkerung mit einer Erkrankung zusammenhängen, (2.) vererbbar sein, (3.) unabhängig vom Krankheitsstatus auffindbar sein (auch bei Individuen, bei denen die Krankheit noch nicht ausgebrochen ist), (4.) innerhalb betroffener Familien gemeinsam mit der Erkrankung auftreten bzw. gemeinsam vererbt werden und wenn möglich (5.) bei nicht-betroffenen Familienmitgliedern in einem höheren Maße festgestellt werden als in der Allgemeinbevölkerung. Besonders in der Erforschung psychiatrischer Erkrankungen ist es jedoch eine Herausforderung, Endophänotypen zu finden, die alle diese Kriterien erfüllen. Ertekin-Taner et al. (2013) führen dies in ihrem Reviewartikel darauf zurück, dass die Diagnosestellung psychiatrischer Erkrankungen in erster Linie auf dem klinischen Erscheinungsbild beruht und dieses aufgrund vielfältiger genetischer und umweltbedingter Ursachen heterogen sein kann. Endophänotypen können unterschiedlicher Natur sein; so gibt es neben biochemischen oder neuroanatomischen auch kognitive oder neuropsychologische Endophänotypen (Übersicht in Gottesman und Gould, 2003). Bei der LOAD haben sich bisher unterschiedliche Endophänotypen als informativ erwiesen. Aufgrund der spezifischen Pathophysiologie, hauptsächlich definiert durch Amyloid  $\beta$ -Plaques und hyperphosphorylierte Tau-Protein-Fibrillen, konnten Amyloid  $\beta$ - und Tau-Spiegel im Liquor als neuropathologische Endophänotypen genutzt werden (Racine et al., 2016). Erhöhtes Amyloid  $\beta$  wurde zum Beispiel mit stärkerer Abnahme der exekutiven Funktionen und möglichem Übergang zu einer MCI assoziiert (Clark et al., 2016). Ein Vorteil von Endophänotypenstudien ist, dass auch Individuen aufgenommen werden können, die noch nicht mit der Erkrankung diagnostiziert wurden. Neuroanatomische Endophänotypen, wie die

## Einleitung

strukturellen Veränderungen bestimmter Hirnregionen, bieten den Vorteil, dass keine Kontamination der Kontrollprobandengruppe durch Probanden stattfindet, welche sich unbekannterweise bereits in einer präklinischen Phase der AD befinden, wie es in Fall-Kontroll-Studien vorkommen kann, die sich vor allem auf das klinische Erscheinungsbild verlassen. Neuroanatomische Endophänotypen können vor allem durch MRT-Studien untersucht werden (Fernández-Cabello et al., 2020). Die Ausprägung der Genexpression wurde ebenfalls als Endophänotyp für einige Risikogene untersucht, wie z. B. die Genexpression der protektiven oder mit erhöhtem Risiko assoziierten Allele des APOE-Gens (Corder et al., 1994; Corder et al., 1993).

Kognitive Endophänotypen bieten ähnliche Vorteile wie neuropathologische Endophänotypen, weil auch sie bereits in frühen (wenn auch nicht in präklinischen) Phasen der Erkrankung zum Einsatz kommen können und die statistische Aussagekraft über die Vererbbarkeit der Variation erhöhen, da sie quantitativ messbar sind. So können, besser als in herkömmlichen Fall-Kontroll-Studien, durch kognitive Veränderungen in den frühesten Stadien der LOAD genetische Risikofaktoren identifiziert werden (Übersicht in Ertekin-Taner et al., 2013). Ein weiterer Vorteil kognitiver Endophänotypen ist die Möglichkeit, den Verlauf des kognitiven Abbaus anhand wiederholter neuropsychologischer Testungen zu beobachten. Sie bieten damit Hinweise auf den Einfluss verschiedener Risiko-Loci zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

### **1.4.1 Mittels TMT gemessene Exekutivfunktionen als kognitive Endophänotypen**

Auch unabhängig von der LOAD konnten zahlreiche Studien genetische Polymorphismen der TOMM40-APOE-Genregion mit kognitiven Leistungen assoziieren. So beobachteten Davies et al. (2014) in ihrer GWAS eine Assoziation zwischen der TOMM40-APOE-Genregion und nicht-pathologischem kognitiven Altern. Yu et al. (2017a) und Johnson et al. (2011) beobachteten, dass nicht-demenziell erkrankte Probanden mit einem bestimmten APOE  $\epsilon$ 3/3-TOMM40'523-Haplotypen mit stärkerem kognitiven Abbau assoziiert waren, als solche mit längeren bzw. kürzeren Poly-T-Wiederholungen.

Kognitive Funktionen, welche in kristalline und fluide Intelligenz unterteilt werden (Übersicht in Brown, 2016), nehmen im Alter unterschiedlich stark ab. Die kristalline Intelligenz, wie zum Beispiel Allgemeinwissen oder Vokabeln, bleibt häufig bis ins hohe Alter unverändert, während die fluide Intelligenz, wie Anpassungsfähigkeit, Verarbeitungsgeschwindigkeit und die Exekutivfunktionen, im Alter stark nachlässt (Stankov, 1988; Gilsoul et al., 2019; Schubert et al., 2019).

## Einleitung

Für die Erfüllung des ersten Gütekriteriums für Endophänotypen laut Gottesman und Gould spricht, dass die Arbeitsgruppen des *National Institute on Aging* (NIA) und der *Alzheimer's Association* (AA) Defizite in der Kategorie exekutive Dysfunktionen in die Diagnostikkriterien für eine wahrscheinliche LOAD aufgenommen haben (McKhann et al., 2011). Collette et al. (1999) stellten bereits Ende der Neunziger Jahre fest, dass von der LOAD Betroffene, im Vergleich zu Menschen mit nicht eingeschränkter Kognition, signifikant schlechter in Tests abschnitten, die verschiedene Exekutivfunktionen (u. a. geteilte Aufmerksamkeit, Inhibition, sowie Manipulation des Arbeitsgedächtnisses) untersuchten. Vor allem die Exekutivfunktionen Unterdrückung und Wechseln zwischen verschiedenen Aufgaben (gemessen anhand des TMT) können einen generellen kognitiven Abbau bei älteren Menschen vorhersagen (Clark et al., 2012). Schlechte Exekutivfunktionen zeigten sogar eine validere Vorhersage für kognitiven Abbau als die Diagnostik von APOE-Genotypen (Fine et al., 2008). So sind die Ergebnisse des TMT-A gemeinsam mit denen des TMT-B ein Maß für die derzeitige kognitive Gesamtfunktion, sowie ein möglicher Hinweis auf zukünftigen kognitiven Abbau (Blacker et al., 2007) und ein Screeninginstrument für Alltagstauglichkeit (Cornelis et al., 2019). Damit ist das erste Kriterium erfüllt, welches verlangt, dass der Endophänotyp in der Bevölkerung mit der untersuchten Erkrankung zusammenhängen sollte (Übersicht in Gottesman und Gould, 2003).

Es gibt drei Hauptbereiche der Exekutivfunktion: Diese sind das Wechseln zwischen verschiedenen Aufgaben (*task switching*), die Unterdrückung (*inhibition*) vorbestehender, jedoch unpassender Antworten und das Aktualisieren bzw. Überblicken der vom Arbeitsgedächtnis dargebotenen Informationen (*updating/monitoring*) (Miyake et al., 2000). Die Exekutivfunktionen zeigen eine hohe Heritabilität (Mez et al., 2016) und haben einen im höchsten Maße gemeinsamen erblichen Faktor, der über allgemeine Intelligenz hinausgeht und ihre Korrelation bedingt (Friedman et al., 2008). Die Auswahl des TMT als Testmethode für die Fragestellung der vorliegenden Studie basiert also auf dem Erkenntnis, dass die drei o. g. Exekutivfunktionen miteinander in ausreichendem Maße korrelieren und somit gemeinsam gemessen werden können. Die individuelle Ausprägung der drei Exekutivfunktionen ist, wie Zwillingsstudien zeigen, zeitlich stabil und durch zusätzliche genetische Faktoren zu erklären (Friedman et al., 2008). Veränderungen der Exekutivfunktionen als Gesamtes sind dagegen eher umweltbedingt (Friedman et al., 2016). Für die vorliegende Studie könnte das bedeuten, dass gerade der TMT, der mehrere Exekutivfunktionen zusammen misst, für die Auswertung ebenjener verlässlicher sein könnte als ein Test, der sich auf eine bestimmte Exekutivfunktion spezialisiert, welche individuell verschieden ausgeprägt sein kann. Mit den Studienergebnissen zur Heritabilität der Exekutivfunktionen durch Friedman et al. (2008; 2016) und Mez et al. (2016)

## Einleitung

wird das zweite Kriterium von Gottesman et al. (2003) erfüllt, welches besagt, dass valide Endophänotypen vererbbar sein sollten.

Das dritte Kriterium von Gottesman und Gould, welches verlangt, dass ein Endophänotyp unabhängig vom Krankheitsstatus auffindbar sein sollte, ist bei der LOAD nicht erfüllt. Denn während in der MCI-Phase leichte kognitive Beeinträchtigungen beobachtbar sind, kommen diese in der zuvor unauffälligen präklinischen Phase noch nicht vor. Diese kognitiven Beeinträchtigungen können amnestischer (das Gedächtnis betreffender) oder nicht-amnestischer Art sein sowie vielfältig oder einzeln auftreten (Brandt et al., 2009). Auch die Exekutivfunktionen zeigen sich bei von einer MCI Betroffenen gestört, wobei die Einbußen je nach Art der MCI unterschiedlich ausfallen können (Brandt et al., 2009; Summers und Saunders, 2012). Wie früh kognitive Defizite eintreten und ab wann sie als messbarer Endophänotyp für die LOAD gewertet werden können, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unklar. Bis zu einem gewissen Grad können kognitive Beeinträchtigungen in der MCI-Phase kompensiert werden, da noch immer ein Teil der neuronalen Plastizität vorhanden ist (Belleville et al., 2011). Das jährliche Risiko einer Verschlechterung der kognitiven Funktionen, im Sinne eines Übergangs zur LOAD, liegt jedoch bei MCI-Betroffenen bei 22 % im Vergleich zu 8 % bei kognitiv gesunden Probanden (Davis et al., 2018). Summers und Saunders (2012) fanden heraus, dass besonders die von multiplen Beeinträchtigungen (amnestischen und z. B. exekutiven Funktionen) betroffenen MCI-Patienten (*amnestic multidomain* MCI) häufig eine Progression zur LOAD zeigten, während Gedächtnisdefizite (amnestische MCI) allein keine zuverlässige Vorhersage einer Verschlechterung hin zu einer LOAD ermöglichten. Das vierte Kriterium ist nach heutigem Verständnis der LOAD als erfüllt anzusehen, da gestörte Exekutivfunktionen als Teil der Alzheimersymptome bei LOAD-Patienten in betroffenen Familien auftreten müssten, jedoch war die Studienlage dazu wenig auskunftsfähig. Das fünfte Kriterium von Gottesman und Gould wurde Hazlett et al. (2015) zufolge erfüllt: Nicht von der LOAD betroffene ältere Menschen mit einer Familienanamnese der Erkrankung zeigten deutlich schlechtere Exekutivfunktionen als solche ohne positive Familienanamnese. Die Exekutivfunktionen stellen somit kognitive Endophänotypen dar, welche für die kognitive Gesundheit und Eigenständigkeit der Probanden aussagekräftig sind und die, bis auf das dritte (und ggf. vierte) Kriterium, die Kriterien für valide Endophänotypen von Gottesman und Gould (2003) erfüllen.

### 1.5 Zielstellung

Die genaue Ätiologie der schwerwiegenden Late-onset Alzheimer-Demenz konnte bislang nicht eindeutig festgestellt werden. Als gesichert gilt, dass vor allem genetische Faktoren eine essentielle Rolle spielen, es sich jedoch um eine polygenetische Erkrankung handelt, bei der im Rahmen einer Vielzahl von GWAS verschiedene Suszeptibilitätsgene detektiert werden konnten. Eines dieser mit der Late-onset Alzheimer-Demenz assoziierten Gene ist das „*Translocase of outer mitochondrial membrane 40*“-Gen (Ma et al., 2013).

Dieses TOMM40-Gen sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden, um der Frage auf den Grund zu gehen, ob es sich bei der LOAD um eine spezifische Erkrankung oder um ein Kontinuum kognitiver Verschlechterung handelt, welches als Teil des physiologischen Alterungsprozesses betrachtet werden muss.

Es stellt sich die Frage: Gibt es Polymorphismen im „*Translocase of outer mitochondrial membrane 40*“-Gen, die mit kognitiver Leistungsfähigkeit bei gesunden Probanden assoziiert sind?

Um dieser Frage nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine erste Screeningstichprobe von 558 gesunden jungen Erwachsenen dem Trail-Making-Test mit seinen Untertests TMT-A und TMT-B unterzogen. Dieser Test misst die kognitive Gesamtfunktion und spiegelt die Exekutivfunktionen wider, welche als kognitive Endophänotypen gewertet wurden. Signifikante Assoziationen wurden daraufhin in einer zweiten Replikationsstichprobe von 617 Probanden weiterverfolgt.

Ziel der Arbeit war es, durch die Assoziation der Polymorphismen der Genregion um das „*Translocase of outer mitochondrial membrane 40*“-Gen zu den Testergebnissen des TMT an gesunden Probanden, einen Beitrag zur Ursachenforschung der komplexen Late-onset Alzheimer-Demenz zu leisten.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Vorbedingungen und Studiendesign**

#### **2.1.1 Voraussetzung der Studiendurchführung**

Die Studie wurde zunächst an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Screeningstichprobe) und später an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Replikationsstichprobe) durchgeführt. Alle Teilnehmer gaben ihr informiertes Einverständnis, die Studie wurde sowohl durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München als auch der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt und unter Berücksichtigung der in der Deklaration von Helsinki festgelegten ethischen Standards durchgeführt.

#### **2.1.2 Stichprobe, Auswahl der Probanden, Ein- und Ausschlusskriterien**

Für die erste Stichprobe wurden nichtverwandte Freiwillige zufällig aus der Allgemeinbevölkerung Münchens ausgewählt. Der Erstkontakt fand per Brief statt und Personen, die sich zurückmeldeten, wurden zunächst per Telefon bezüglich ihres Gesundheitszustandes befragt. Bei Interessenten ohne relevante psychiatrische Vorerkrankungen wurden anschließend anhand eines semi-strukturierten Interviews detaillierte medizinische und psychiatrische Anamnesen der Teilnehmer und deren Verwandten ersten Grades erhoben. Blieben diese Anamnesen leer, wurden die Teilnehmer zu einem umfassenden Interview ins Studienzentrum der Klinik eingeladen, in welchem die deutsche Version des *Structured Clinical Interviews* für DSM-IV (SCID I und II gemäß der Klassifikation des DSM-IV) (First et al., 1997a; First et al., 1997b) genutzt wurde, um das Vorhandensein jedweder psychiatrischer Störung über die bisherige Lebenszeit auszuschließen. Zusätzlich wurde das FHAM (*Family History Assessment Module*) (Rice et al., 1995) teilweise in überarbeiteter Form durchgeführt, um psychiatrische Störungen unter den Verwandten ersten bis dritten Grades auszuschließen. Es erfolgte außerdem eine neurologische Untersuchung, um Personen mit derzeitigen Beeinträchtigungen des zentralen Nervensystems zu erfassen. Bei über 60 Jahre alten Testpersonen wurde der MMST (*Mini Mental Status Test*) (Folstein et al., 1975) durchgeführt, um Personen mit möglichen kognitiven Beeinträchtigungen auszuschließen. Es musste dabei ein Score von mindestens 27 von 30 möglichen Punkten erreicht werden. Bei allen Studienteilnehmern handelte es sich um Kaukasier.

## Material und Methoden

Bei der Replikationsstichprobe handelt es sich um ältere Probanden aus der Allgemeinbevölkerung von Halle (Saale). Diese mussten für den Studieneinschluss volljährig sowie einwilligungsfähig sein. Ausgeschlossen wurden Probanden mit Sprachbarrieren gegenüber der deutschen Sprache, Unzulänglichkeiten bei der Testdurchführung (z.B. Blindheit, Taubheit), bei Vorliegen aktueller medizinischer oder neurologischer Zustände, die die Kognition beeinflussen können oder mit fortgeschrittenen schweren progressiven oder instabilen Krankheiten, die die Beurteilung der kognitiven Leistungsfähigkeit bzw. der möglichen Diagnose einer demenziellen Störung beeinträchtigen sowie bei Malignität jeglicher Organsysteme innerhalb der vergangenen 60 Monate. Alle Probanden wurden einer ausführlichen neuropsychologischen Testung (CERAD-Plus (Memory Clinic, 2009) und WAIS-IV (Petermann, 2012)) sowie einer körperlichen und neurologischen Untersuchung unterzogen. Mögliche frühere oder aktuelle neuropsychiatrische Symptome wurden mittels des MINI (*Mini International Neuropsychiatric Interview*) (Ackenheil et al., 1999) erhoben. Dieses Interview erfasst psychiatrische Störungen auf Grundlage des DSM-IV und des ICD 10. Probanden mit einem MMST < 27 (aus CERAD), einem IQ < 80 (WAIS-IV) oder psychischen Auffälligkeiten (MINI) wurden ausgeschlossen.

### 2.2 Trail Making Test

#### 2.2.1 Hintergrund und Einsatzgebiet des Trail Making Tests

Der Trail Making Test wurde von der US-Armee als Teil der *Army Individuals Tests Battery* als Instrument zur Beurteilung eventueller Hirnschäden angewandt (War Department, Adjutant Generals Office, 1944) und anschließend in die Testbatterie von Halstead-Reitan aufgenommen (Reitan und Wolfson, 1985). Heutzutage handelt es sich dabei um ein weitverbreitetes neuropsychologisches Screening-Instrument für die Erfassung von Aufmerksamkeitsstörungen und Störungen der Exekutivfunktionen, wobei Teil A Aufschluss über die Wahrnehmungsgeschwindigkeit gibt, während Teil B die Exekutivfunktionen (Verarbeitungsgeschwindigkeit und Aufgabenwechsel) misst (Sánchez-Cubillo et al., 2009). Weitere Einsatzmöglichkeiten des TMT sind die Differenzierung zwischen Alzheimer-Erkrankten und Menschen mit ungestörter Kognition (Wei et al., 2017) oder Screening nach generellen Hirnschäden (MacPherson et al., 2017). Weniger gut geeignet scheint der TMT für die Differenzierung zwischen LOAD und Frontotemporaler Demenz zu sein (Ritter et al., 2017).

### 2.2.2 Durchführung

Der TMT enthält zwei Teile (A und B), in jedem Teil finden sich jeweils 25 auf dem Testblatt verteilte Kreise. In Teil A enthalten alle Kreise Zahlen (von 1 bis 25), welche durch die Testperson in aufsteigender Reihenfolge verbunden werden sollen. In Teil B kommen zusätzlich zu den Zahlen auch Buchstaben vor, die in alphabetischer Reihenfolge alternierend mit den aufsteigenden Zahlen verbunden werden müssen. Somit ergibt sich eine Folge von 1-A-2-B-3-C und so weiter. Das Testergebnis ist die gemessene Zeit in Sekunden, welche der Proband für die Durchführung der beiden Untertests jeweils benötigt. Der Trail Making Test sollte so schnell wie möglich und fehlerlos durchgeführt werden. Im Falle eines Fehlers muss der Proband zum letzten korrekten Kreis zurückgeführt werden. Die Stoppuhr läuft stetig weiter und führt bei Fehlern zu einem zeitlich schlechteren Ergebnis. Die Aufgabe ist bewältigt, wenn der mit „Ende“ markierte Kreis erreicht ist. Vor Teil A und Teil B gibt es jeweils eine Beispielaufgabe, um zu prüfen, ob der Proband die Aufgabenstellung verstanden hat und sowohl körperlich als auch geistig in der Lage ist, den Test zu bewältigen. Wenn der Proband das Beispiel erfolgreich beendet hat, darf er mit dem eigentlichen Teil A bzw. Teil B beginnen (Reitan, 1992).

### 2.2.3 Bewertung

Die benötigte Zeit in Sekunden stellt den erreichten Score dar. Dieser wird für Teil A und Teil B getrennt betrachtet. Der *Cut-Off*-Punkt zwischen „normal“ bzw. „gesund“ auf der einen Seite und „beeinträchtigt“ auf der anderen Seite liegt für Teil A zwischen 39 und 40 Sekunden und für Teil B zwischen 85 und 86 Sekunden (Reitan, 1992). Die nach Reitan (1992) festgelegten Punktwerte für den TMT-A und den TMT-B sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Cut-off-Werte führten im Rahmen der vorliegenden Studie nicht zum Ausschluss von Teilnehmern.

**Tabelle 1** Punktränge des TMT nach Reitan und Wolfson (1985)

	<b>vollkommen normal</b>	<b>normal</b>	<b>geringfügig/ mittelgradig beeinträchtigt</b>	<b>mittelgradig/ schwer beeinträchtigt</b>
Teil A	0 – 26 Sek.	27 – 39 Sek.	40 – 51 Sek.	52 Sek. +
Teil B	0 – 65 Sek.	66 – 85 Sek.	86 – 120 Sek.	121 Sek. +

### 2.3 Laborverfahren

Labortechnische Verfahren wurden aufgrund der Komplexität von geschultem Personal durchgeführt.

#### 2.3.1 DNA-Extraktion

Da für die Genotypisierung der SNPs der zu untersuchenden Genregion um TOMM40 und APOE hochreine genomische DNA benötigt wurde, erfolgte bei jedem Probanden eine Blutentnahme mit anschließender DNA-Extraktion. Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2** Material für die DNA-Extraktion

Material	Hersteller
EDTA-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Qiagen DNA Blood Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
50 ml Zentrifugenröhre	Sarstedt, Nümbrecht
Vortex Genie	Scientific Industries, New York, USA

Von allen Studienteilnehmern wurden jeweils 7 ml venöses Blut in EDTA-Monovetten abgenommen. Anschließend erfolgte, dem Protokoll des Qiagen DNA Blood Maxi Kits (Qiagen, 2005) folgend, die DNA-Extraktion. Ziel war es, die DNA zur weiteren Verarbeitung von anderen Bestandteilen (wie RNA und Proteinen) zu isolieren. Um zunächst ein Zelllysat zu erhalten, wurden 500 µl Qiagen Protease und 12 ml des Guanidinhydrochlorid (GHCl)-haltigen Lysepuffers zu den Blutproben gegeben. Guanidinhydrochlorid denaturiert u. a. die DNA-Bindeproteine, wodurch die Freisetzung der DNA erleichtert wurde. Die so entstandene Blutmischung wurde anschließend 60 Sekunden auf einem Vortex homogenisiert und dann für 30 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Durch die Zugabe von 10 ml Ethanol wurde die Hydrathülle der DNA entfernt. Die Blutmischung wurde erneut für 2 Minuten auf dem Vortex gemischt. Anschließend wurde die Blutmischung sukzessive auf eine QIAamp Maxi Säule überführt und bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 3000 rpm (engl. *revolutions per minute*) zentrifugiert. So wurde eine selektive Bindung der DNA an die Silicagelmembran erreicht. Nun folgte der erste Waschschriff, bei dem die Protein- und RNA-Kontaminationen entfernt wurden, da sie, im Gegensatz zur DNA, nicht an der Membran haften bleiben. Hierfür wurden 5 ml Guanidin-HCl-

## Material und Methoden

haltiger Puffer dazugegeben. Das Gemisch wurde anschließend bei Raumtemperatur für 2 Minuten mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 4000 rpm zentrifugiert. In einem zweiten Waschschrift wurde ein ethanolhaltiger, salzreicher Puffer zugegeben und das Gemisch für 15 Minuten bei wiederum 4000 rpm zentrifugiert. Bei diesem Waschschrift wurde das Guanidinhydrochlorid-Salz herausgewaschen und anschließend wurde die Silicagelmembran getrocknet. Nun folgte die Elution der DNA, also das Herauslösen der DNA aus der Gelmembran. Die Silicagelmembran wurde hierfür zweimal hintereinander mit jeweils 0,75 ml TRIS-haltigem Puffer (bestehend aus 10 mM Tris-Cl und 0,5 mM EDTA) (Qiagen, 2021) für je 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 2 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert.

### 2.3.2 DNA-Konzentrationseinstellung

**Tabelle 3** Material für die Konzentrationseinstellung der DNA

Material	Hersteller
96 well Platte, schwarz, mit flachem Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Humane genomische DNA 100 ng/ $\mu$ l	Clontech, Mountain View USA
Janus Automated Workstation	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
Quant iT PicoGreen dsDNA reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Thermo Fast 96 well Platte	Abgene, Hamburg
Victor 3 Multilabel Counter 1420	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA

Der nächste Schritt war die Konzentrationseinstellung der DNA, bei der die in Tabelle 3 aufgelisteten Materialien verwendet wurden. Für die Genotypisierung ist es notwendig, dass alle DNA-Lösungen die gleiche Konzentration aufweisen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration der Proben erfolgte mittels einer Standardverdünnungsreihe und unter Verwendung des Farbstoffs PicoGreen. Dabei handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der doppelsträngige DNA (dsDNA) selektiv bindet. Um die Konzentrationen der unbekannt DNA-Lösungen zu quantifizieren, wurde im Vorfeld die Standardverdünnungsreihe vorbereitet. Dafür wurde ein DNA-Standard mit bekannter Konzentration (100 ng/ $\mu$ l) verwendet und dieser in 8 Punkten in einem Verhältnis von 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt. So

## Material und Methoden

entstand eine Verdünnungsreihe mit 100 ng/ $\mu$ l, 50 ng/ $\mu$ l, 25 ng/ $\mu$ l, 12,5 ng/ $\mu$ l, 6,25 ng/ $\mu$ l, 3,125 ng/ $\mu$ l, 1,5625 ng/ $\mu$ l und 0 ng/ $\mu$ l. Die DNA-Lösungen unbekannter Konzentration wurden 1:10 mit destilliertem Wasser in einer 96 well Platte verdünnt.

Anschließend wurden in eine schwarze 96 well Platte mit flachem Boden pro Vertiefung je 50  $\mu$ l autoklaviertes, destilliertes Wasser vorgelegt. Nun wurden in Duplikaten je 5  $\mu$ l der Standardverdünnungsreihe beziehungsweise der verdünnten Proben-DNA dazu pipettiert. Parallel wurde vom Farbstoff PicoGreen eine Verdünnung im Verhältnis 1:156 hergestellt. Zu jeder zu messenden Probe wurden jeweils 145  $\mu$ l PicoGreen hinzugefügt. Dies ergab eine Endverdünnung des PicoGreens von 1:200. Die Konzentrationsmessung erfolgte halbautomatisiert durch den Roboter (*Janus Automated Workstation*). Durch den Greifarm der *Janus Workstation* wurde die Platte automatisch in den *Victor 3 Multilabel Counter 1420* überführt. Um eine homogene Durchmischung der Proben zu erreichen, wurde die Platte im Messgerät für 30 Sekunden in horizontaler Ebene in Doppellellipsen geschüttelt. Nun wurde das PicoGreen durch Licht einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und bei 520 nm wurde die Emission gemessen. Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden vom Messgerät direkt an einen Rechner weitergegeben, welcher die Konzentrationen der unbekanntes DNA-Lösungen anhand der Fluoreszenzwerte der Standardkurve berechnen konnte. Zudem wurden jeweils die Mittelwerte der in Duplikaten gemessenen Proben ermittelt. Die Mengen an DNA und Wasser, welche nötig waren, um die gewünschte Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l zu erreichen, wurden berechnet und die Verdünnung der Proben erfolgte automatisch durch den Pipettierroboter.

### 2.3.3.1 Bestimmung der APOE Genotypen

**Tabelle 4** Material

Material	Hersteller
APOE rs7412, TaqMan <sup>®</sup> SNP Assays, Assay ID: C_904973_10	Applied Biosystems, Foster City, CA
APOE rs429358, TaqMan <sup>®</sup> SNP Assays, Assay ID: C_3084793_20	Applied Biosystems, Foster City, CA
TaqMan <sup>®</sup> Genotyping Mastermix	Thermo Fisher Scientific
MicroAmp <sup>®</sup> Optical 96-well Reaktionsplatte mit Barcode	Thermo Fisher Scientific
MicroAmp <sup>®</sup> Optical Adhesive Film (Klebefolie)	Thermo Fisher Scientific
Bio-RAD CFX Connect System	Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA
10 ng genomische DNA	Aus den vorherigen Arbeitsschritten erhalten

Die Genotypisierung der APOE  $\epsilon$ -Allele erfolgte durch Allelkombinationen der SNPs rs7412 und rs429358 mittels vorgefertigter TaqMan SNP Genotyping Assays. Es wurden die in Tabelle 4 genannten Materialien und Geräte genutzt. Für jeden SNP (also insgesamt zweimal) wurden je 5  $\mu$ l TaqMan Mastermix, 0,25  $\mu$ l SNP spezifischer Genotyping Assay Mix und 3,75  $\mu$ l DNase-freies Wasser gemischt und auf eine MicroAmp<sup>®</sup> Optical 96-well Reaktionsplatte gegeben. Die Platte wurde mit dem MicroAmp<sup>®</sup> Optical Adhesive Film abgedeckt und kurz zentrifugiert. Nun wurde die Klebefolie entfernt und je Vertiefung 10 ng genomischer DNA zugegeben, was ein Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l pro Vertiefung (engl. *well*) ergab. Um die gewünschten SNPs zu vervielfältigen, wurde im nächsten Schritt eine PCR durchgeführt. Bei 95°C wurde die Mischung 10 Minuten lang erhitzt, um die Taq-Polymerase zu aktivieren und die DNA-Stränge vollständig zu denaturieren, die Denaturierung wurde in weiteren Zyklen auf 15 Sekunden verkürzt. Nun wurde die Mischung für eine Minute auf 60°C heruntergekühlt, sodass sich die spezifischen Primer an die DNA anlagern (Annealing) und die Taq-Polymerase komplementäre Basen anbauen konnte (Extension). Diese zwei Schritte wurden insgesamt 40mal wiederholt, um genügend DNA-Material zu erhalten. Anschließend wurde die Polymerase-Kettenreaktion bei 4°C angehalten. Mit Hilfe des Bio-RAD CFX Connect Systems wurden zum Schluss die Genotypen ausgelesen und die Allele unterschieden.

### 2.3.3.2 Bestimmung der TOMM40 Genotypen

Die Genotypisierung der Screening- und Replikations-Stichproben erfolgte auf SNP-Chips unterschiedlicher Hersteller (Illumina und Affymetrix), deren Prinzip sich jedoch ähnelt. So wurden z.B. bei Illumina-Chips nach Fragmentierung der Probanden-DNA und Vervielfältigung der DNA-Fragmente diese Fluoreszenz-markiert und auf ein Trägermaterial (*Array*) gegeben. Für jedes Allel eines zu typisierenden SNPs fanden sich an definierten Stellen des *Arrays* 100 % komplementäre Sonden. Wenn eine Hybridisierung an diesen Stellen stattgefunden hatte, konnte diese nach mehreren Reinigungsschritten anhand der Fluoreszenzsignale durch einen Scanner detektiert werden.

Für die Genotypisierung der Screening-Stichprobe kamen sowohl SNP-Arrays von Illumina (Human610-Quadv1\_B, Human660W-Quad\_v1\_A, HumanHap 300 v1.0.0, OmniExpress 12v1.0, Omni1-Quad) als auch von Affymetrix (Affymetrix 6.0) zum Einsatz. Die Genotypen der Replikationsstichprobe wurde mittels Global Screening Array von Illumina bestimmt.

## 2.4 Analyse und Verarbeitung der Daten

### 2.4.1 Apolipoprotein E ε4-Dosis-Bestimmung

Wie unter 3.3.3 beschrieben, wurden die SNPs rs7412 und rs429358 genotypisiert. Anschließend wurden die Haplotypen und die APOE ε4-Dosis bestimmt. Die häufigsten Allelvariationen des APOE-Gens lauten: ε2 (rs7412-T, rs429358-T), ε3 (rs7412-C, rs429358-T) und ε4 (rs7412-C, rs429358-C) (Rall et al., 1982; SNPedia, 2019). Jeder Mensch besitzt zwei APOE-Allele, je eines von jedem Elternteil. Dementsprechend ergeben sich homozygote und heterozygote Genotypen sowie die daraus resultierende APOE ε4-Dosis, welche in Tabelle 5 dargestellt sind. Für den APOE-Status wurde die APOE ε4-Dosis verwendet.

**Tabelle 5** Kodierung der Apolipoprotein E-Genotypen und ε4-Dosis

APOE-Genotypen	Haplotypen	APOE ε4-Dosis
APOE-ε2/ε2	TT TT	0
APOE-ε2/ε3	TT CT	0
APOE-ε2/ε4	TT CC	1
APOE-ε3/ε3	CT CT	0
APOE-ε3/ε4	CT CC	1
APOE-ε4/ε4	CC CC	2



#### 2.4.2 Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle und Imputation erfolgte für jede der 6 Chargen der Screeningstichprobe separat, für die Chargen 1 (Priebe et al., 2013; Drago A. et al., 2014), 2 (Need et al., 2009) und 3 (Bramon et al., 2014) im Rahmen einer Schizophrenie-Assoziationsstudie des PGC (Ripke et al., 2014). Die Chargen 4 (Stefansson et al., 2008), 5 (Lencz et al., 2014) und 6 (Galfalvy et al., 2015) wurden unter Beachtung derselben Kriterien qualitätskontrolliert und imputiert.

Für die Qualitätskontrolle der Genotypisierungsdaten wurde die Software PLINK 1.9 (Chang et al., 2015) genutzt. Zunächst wurden alle SNPs mit Genotypen von weniger als 95 % im *Batch* entfernt, dann wurden Probanden(-daten) entfernt, deren SNP basiertes Geschlecht nicht mit dem erhobenen Geschlecht übereinstimmte, um Probenverwechslungen oder Prozessierungsfehler auszuschließen und wenn weniger als 96-99 % erfolgreich genotypisierte SNPs vorhanden waren. Anschließend wurde die SNP *call rate* erneut bestimmt, welche sich durch den Ausschluss dieser Probandendaten im restlichen Datensatz verbessert zeigte.

Nun erfolgte eine weitere Qualitätskontrolle der SNPs. Dabei wurden SNPs ausgeschlossen, die auf Autosomen lagen und eine SNP *call rate* < 99 % und/oder eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE; mittels des exakten Tests nach Fischer) in den Probanden aus der Allgemeinbevölkerung  $p < 10^{-6}$  aufwiesen. SNPs auf dem x-Chromosom wurden in Frauen bei einer SNP *call rate* < 95 % und/oder einer Abweichung vom HWE mit  $p < 10^{-6}$  in Probanden aus der Allgemeinbevölkerung ausgeschlossen, in Männern bei einer haploiden Heterozygotenfrequenz  $|F_{\text{het}}| \geq 0,02$ .

Im Anschluss wurden Probanden ausgeschlossen, welche miteinander verwandt waren ( $\hat{r} \geq 1,875$ ), eine stark abweichende Ethnie (Populationsstratifikation) zeigten oder Auffälligkeiten in der Heterozygotenfrequenz aufwiesen. Dazu wurde ein stringent qualitätskontrolliertes Set von aussagekräftigen SNPs verwendet, d. h. es wurden nur autosomale SNPs mit MAF  $\geq 5$  % (minore Allelfrequenz), mit Abweichung vom HWE mit  $p \geq 0,05$  und mit SNP *call rate* > 99 % verwendet, die zuvor auf LD-Unabhängigkeit (linkage disequilibrium) mit  $r^2 < 0,2$  kontrolliert wurden. Die Analyse der Ethnizität erfolgte mittels Hauptkomponentenanalyse durch Verwendung von EIGENSTRAT (Price et al., 2006). Nach der Chip-spezifischen Qualitätskontrolle wurden bekannte Duplikate auf verschiedenen Chips miteinander verglichen. Lag die Konkordanzrate unter 99 %, wurden beide Proben verworfen, lag sie darüber, wurde die Probe mit der schlechteren Qualität ausgeschlossen. Schließlich wurden für die Screeningstichprobe 558 Probanden aus der Allgemeinbevölkerung mit validen Genotyp- und Phänotypdaten für die Assoziationsanalyse ausgewählt.

Die Genotypdaten wurden mithilfe der Software SHAPEIT (Delaneau et al., 2012) und IMPUTE2 (Howie et al., 2009; 2011) auf das 1000 *Genomes reference sample* (Phase 1 Version 3) imputiert (Auton et al., 2015). Die Imputation für das X-Chromosom erfolgte für Frauen und Männer getrennt. Nach der Imputation wurden die sechs Chargen zu einem großen Datensatz kombiniert, wobei diejenigen Marker mit einem INFO-Wert  $< 0,6$  in einer der Chargen oder im kombinierten Datensatz ausgeschlossen wurden, ebenso wie Marker, deren minore Allelfrequenz zwischen den Datensätzen um mehr als 0,1 abwich. Genau wie auf den einzelnen Chips wurden auf dem kombinierten Datensatz Analysen zur Erkennung unbekannter Verwandtschaft, Abweichungen von der Heterozygotenfrequenz und Populationsstratifikation durchgeführt. Aus diesem Datensatz wurden 113 SNPs für die Datenanalyse ausgewählt, die im Gen TOMM40 oder 20kb *up-* oder *downstream* des Gens lokalisiert waren. Für die Screeningstichprobe wurden 558 Probanden aus der Allgemeinbevölkerung mit validen Genotyp- und Phänotypdaten für die Assoziationsanalyse ausgewählt.

In der Replikationsstichprobe wurden zur Qualitätskontrolle vergleichbare Grenzwerte sowie dieselbe Software (PLINK 1.9) verwendet. Die Genotypisierung dieses *batches* erfolgte auf dem Illumina Global Screening Array. Für die Bestimmung der Probanden *call rate* und für die Geschlechtsüberprüfung wurde ein vorgefiltertes SNP-Set mit einer *call rate* von über 95 % verwendet. Probanden wurden ausgeschlossen, wenn das Geschlecht nicht mit dem angegebenen übereinstimmte oder die *call rate* unter 98 % lag, ebenso Varianten mit einer SNP *call rate*  $\geq 99$  %, MAF  $\geq 1$  %, HWE  $\geq 10^{-5}$ . Es wurde ein stringenter kontrolliertes SNP-Set verwendet (MAF  $\geq 0,05$ , HWE  $p \geq 0,05$ , *call rate*  $\geq 0,99$ ,  $r^2 \leq 0,2$  innerhalb 1500 kb, Ausschluss von Regionen in hohem LD (z.B. die MHC Region)), um doppelte oder verwandte Probanden und mögliche Populationsstratifikationseffekte zu erkennen. Bei Probandendopplung und bei einer unbekanntem Verwandtschaft zwischen zwei Probanden ( $\hat{\pi} > 0,1875$ ) wurde ein Proband entfernt. Schließlich ergaben sich in der Replikation Daten für 617 Probanden.

Für die Replikation wurden SNPs ausgewählt, für die in der Screeningstichprobe eine signifikante Assoziation identifiziert wurde. Waren die zu replizierenden SNPs nicht in der Replikationsstichprobe enthalten, wurden Proxy-SNPs unter Verwendung der Software SNIQA des Helmholtz Zentrums München (Arnold M. et al., 2014), basierend auf Daten des 1000-Genomes-Projects (Phase 3 v5) (Auton et al., 2015) untersucht. Dabei handelt es sich um SNPs, die sich im LD zu den Index-SNPs der Screeningstichprobe befanden.

### 2.4.3 Statistische Analyse

Die Screeningstichprobe umfasste 558 Probanden. Die unterschiedliche Verteilung der TMT-Werte zwischen den Geschlechtern wurde mit dem Wilcoxon Rank Sum-Test berechnet, die unterschiedliche Werte-Verteilung nach Alter mit dem Spearman's Correlation-Test und die der Ausbildung anhand des Kruskal-Wallis Rank Sum-Test. Die Assoziationsanalyse für die Phänotypen des TMT erfolgte an 113 Markern der TOMM40-APOE-Region mittels additiver linearer Regression in PLINK 1.9 (Chang et al., 2015). Dabei wurden die Rohwerte der Indexskalen für Alter, Geschlecht und Bildungsgrad adjustiert. Durch inverse Rang-Transformation wurden Residuen normalisiert und standardisiert, diese Residuen gingen als abhängige Variablen in die lineare Regressionsgleichung ein. Es korrelierten hohe Werte der Rohdaten mit hohen Werten der transformierten Variablen. Für die verschiedenen Chargen wurden mittels *Dummy* Variablen korrigiert.

Die Wahrscheinlichkeiten der drei APOE-Genotypen wurden in einen einzelnen Wert zwischen 0 und 2 (Dosis) umgewandelt. Für den APOE-Status bzw. die Korrektur für die Kovariable APOE wurde statt der Genotypen diese Dosis des  $\epsilon 4$ -Allels verwendet. Dieser Wert ging als unabhängige Variable in die Gleichung der linearen Regression ein. Dabei wurde eine Korrektur für *batch* und die APOE-Dosis durchgeführt.

Die erste Hauptkomponente der EIGENSTRAT Analyse (Price et al. 2006) wurde zur Korrektur möglicher Populationsstruktureffekte als Kovariable in die Analyse einbezogen.

Bei der Berechnung der Assoziation zu den Phänotypen in den Untergruppen (Männer/Frauen) wurde mittels linearer Regression für Alter und Bildungsgrad adjustiert.

Auch für die Replikationsstichprobe, welche 617 Probanden umfasste, wurde eine additive lineare Regressionsanalyse der in der Screeningstichprobe signifikant gefundenen SNPs durchgeführt. Dabei wurden die Rohwerte für Alter und Geschlecht adjustiert.

### 2.4.4 Clumping

Unter Verwendung des „*clump*“ Befehls in PLINK 1.9 (Chang et al., 2015) wurden die Ergebnisse der Screeningstichprobe basierend auf den Assoziationsergebnissen für TMT-A und TMT-B getrennt nach folgendem Schema zu chromosomalen Regionen zusammengefasst: Der SNP mit dem niedrigsten p-Wert wurde als Index-SNP definiert. Alle Marker im LD ( $r^2 > 0,1$ ) und in einer Distanz von 3000 kb zum Index-SNP wurden diesem zugeordnet. Mit den verbleibenden

## Material und Methoden

Variationen wurde genauso verfahren, bis alle SNPs einem Index-SNP zugewiesen waren. So konnten sowohl für TMT-A als auch für TMT-B 10 LD-unabhängige Regionen betrachtet werden.

### **2.4.5 Signifikanzniveau**

In allen Analysen der Screening- und Replikationsstichprobe wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  als Grundlage der statistischen Berechnungen festgelegt. Das nach multiplem Testen korrigierte  $\alpha$ -Level für die Screeningstichprobe betrug  $p < 0,005$  ( $0.05/10$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Beschreibung der Stichprobe

Insgesamt wurden in der Screeningstichprobe 558 Probanden genotypisiert und mittels TMT-A und TMT-B getestet, dabei wurden etwa gleich viele Frauen und Männer untersucht. Das Durchschnittsalter betrug 50,6 Jahre. Eine Übersicht der Screeningstichprobe gibt Tabelle 6. Unterschiede zwischen Männern und Frauen fanden sich in der Verteilung des Bildungsstatus wobei die Männergruppe einen höheren Bildungsstand aufwies.

Es lagen für 460 Screeningprobanden Daten zum APOE-Status vor, sodass die APOE  $\epsilon$ 4-Dosis (kein/ein/zwei  $\epsilon$ 4-Allele) bestimmt wurde. Es zeigten sich in der gesamten Screeningstichprobe keine signifikanten Unterschiede zwischen dem APOE-Status und der Testleistung im TMT-A ( $p = 0,24$ ) und TMT-B ( $p = 0,08$ ).

**Tabelle 6** Beschreibung der Screeningstichprobe

	<b>Gesamt</b>	<b>Männer</b>	<b>Frauen</b>
<b>Gesamtzahl</b> n (%)	558	274 (49,10)	284 (50,89)
<b>Mindestalter</b> in Jahren	22	22	22
<b>Maximales Alter</b> in Jahren	75	75	72
<b>Durchschnittsalter</b> in Jahren (SD)	50,59 (13,52)	51,82 (13,46)	49,41 (13,49)
<b>Niedrige Ausbildung</b> n (%)	114 (20,43)	57 (20,8)	57 (20,07)
<b>Mittlere Ausbildung</b> n (%)	201 (36,02)	88 (32,12)	113 (39,79)
<b>Hohe Ausbildung</b> n (%)	243 (43,55)	129 (47,08)	114 (40,14)
<b>n APOE</b>	460	220	240
<b>APOE <math>\epsilon</math>4<sup>-</sup> / <math>\epsilon</math>4<sup>-</sup></b> n (%)	348 (75,65)	163 (74,09)	185 (77,08)
<b>APOE <math>\epsilon</math>4<sup>+</sup> / <math>\epsilon</math>4<sup>-</sup></b> n (%)	105 (22,83)	53 (24,09)	52 (21,67)
<b>APOE <math>\epsilon</math>4<sup>+</sup> / <math>\epsilon</math>4<sup>+</sup></b> n (%)	7 (1,52)	4 (1,82)	3 (1,25)

n = Anzahl, SD = Standardabweichung

Die Replikationsstichprobe bestand aus 617 Probanden, davon waren 255 männlich und 362 weiblich. Das Durchschnittsalter der Replikationsstichprobe war mit einem Mittelwert von 68,36 Jahren und einer Standardabweichung von 6,95 höher als das der Screeningstichprobe.

#### 3.2 Lokalisation der Polymorphismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 113 SNPs in der TOMM40-Gen-Region ( $\pm 20$  kb oberhalb und unterhalb des TOMM40-Gens) auf Chromosom 19 untersucht und einzelne signifikant assoziierte SNPs in der TOMM40-APOE-Genregion in der Replikationsstichprobe nachverfolgt.

## Ergebnisse

Für die Screeningstichprobe werden nachfolgend 39 verschiedene mit dem TMT-A und/oder TMT-B nominal signifikant assoziierte SNPs beschrieben. Durch das testspezifische *clumpen* wurden diese 39 Varianten teilweise unterschiedlichen Index-SNPs zugeordnet. Die untersuchten SNPs und ihre jeweilige Genposition zeigen Tabelle 7 und Abbildung 1. Die Lokalisierung der SNPs auf der DNA erfolgte mit Hilfe des Variation Viewers von NCBI (NCBI - Variation viewer). Alle Angaben beziehen sich auf den NCBI build GRCh37.p13.

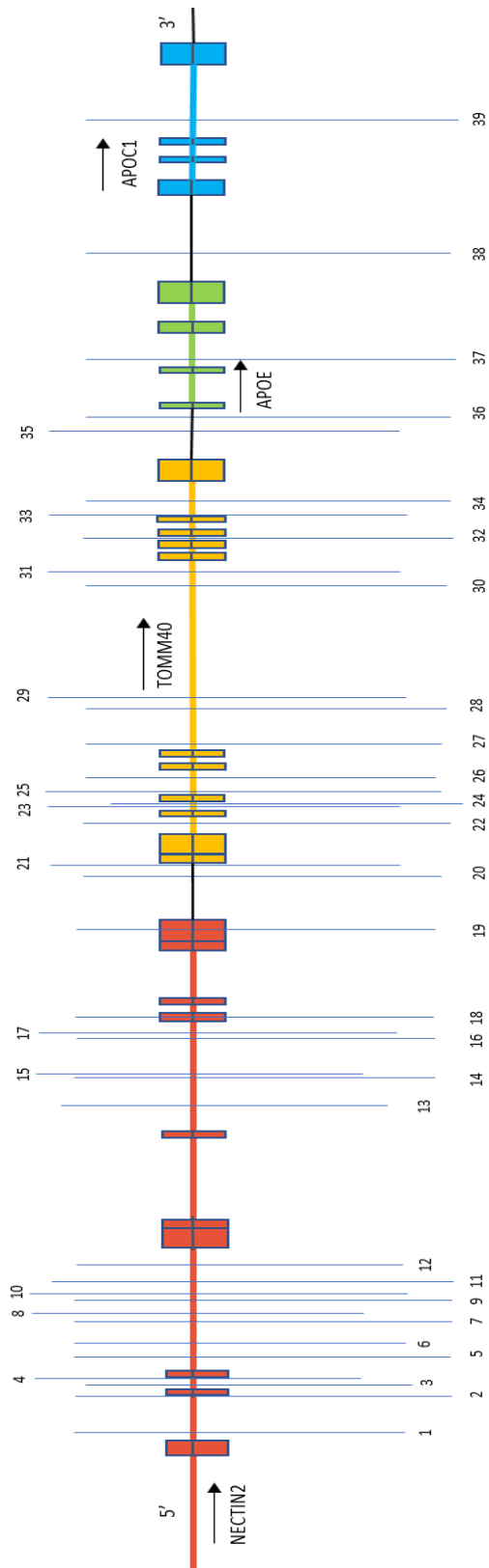
Im Gen TOMM40 befinden sich 12 der 39 mit TMT-A und/oder B assoziierten SNPs in intronischen Bereichen und ein SNP in Exon 4 als *missense* Variante. Zwei SNPs liegen in der Intergenregion zwischen TOMM40 und APOE; rs7259620 1.251 bp und rs405509 203 bp vor dem 5'-Ende von APOE. Zwei Polymorphismen liegen in der Intergenregion 266 bp (rs76692773) bzw. 141 bp (rs71352238) vor dem 5'-Ende von TOMM40 (NCBI, 2020a, 2020b). Im APOE-Gen liegt ein nominal signifikanter SNP im Intron und ein nominal signifikanter SNP (rs1081106) liegt 4.211 bp vor 5' APOC1. 17 der nominal signifikanten SNPs liegen in Introns des 5' zu TOMM40 gelegenen NECTIN2-Gens, ein SNP in Exon 7 als *synonymous* Variante und ein SNP in Exon 9 im Bereich der 3'-UTR. Ein weiterer SNP liegt im Intron des Gens APOC1.

Ergebnisse

**Tabelle 7** Mit TMT-A und/oder TMT-B nominal signifikant assoziierte SNPs und deren Lokalisation  $\pm 20$  kb um das TOMM40-Gen

SNP	Abb. 1	Position	Lage	A1	A2	TMT-A Index (C)	TMT-B Index (C)
rs11671274	1	45376317	NECTIN2 (0)	C	G	rs1064725 (3)	<b>rs11671274</b> (4)
rs11672399	2	45377098	NECTIN2 (0)	A	C	rs73052307 (4)	rs11671274 (4)
rs393584	3	45377334	NECTIN2 (0)	A	G	rs2075642 (5)	<b>rs393584</b> (3)
rs2075642	4	45377467	NECTIN2 (0)	A	G	rs2075642 (5)	rs393584 (3)
rs387976	5	45379060	NECTIN2 (0)	C	A	rs2075642 (5)	rs393584 (3)
rs369599	6	45379336	NECTIN2 (0)	T	C	rs34278513 (6)	rs393584 (3)
rs370705	7	45379638	NECTIN2 (0)	T	C	rs34278513 (6)	rs393584 (3)
rs385982	8	45379682	NECTIN2 (0)	C	A	rs34278513 (6)	rs393584 (3)
rs73050293	9	45379746	NECTIN2 (0)	G	A	rs76692773 (2)	rs76692773 (2)
rs11667640	10	45379791	NECTIN2 (0)	T	C	rs1064725 (3)	rs11671274 (4)
rs419925	11	45380126	NECTIN2 (0)	C	G	rs34278513 (6)	rs393584 (3)
rs421812	12	45380545	NECTIN2 (0)	T	G	rs34278513 (6)	rs393584 (3)
rs147636938	13	45386634	NECTIN2 (0)	T	C	rs147636938 (9)	rs116881820 (8)
rs12972156	14	45387459	NECTIN2 (0)	G	C	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs12972970	15	45387596	NECTIN2 (0)	A	G	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs34342646	16	45388130	NECTIN2 (0)	A	G	<b>rs34342646</b> (1)	rs769449 (1)
rs283813	17	45389174	NECTIN2 (0)	A	T	rs147636938 (9)	rs283809 (6)
rs283814	18	45389224	NECTIN2 (0)	A	G	rs283814 (8)	rs141739979 (10)
rs6857	19	45392254	NECTIN2 (0)	T	C	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs76692773	20	45394211	TOMM40 (266)	T	C	<b>rs76692773</b> (2)	<b>rs76692773</b> (2)
rs71352238	21	45394336	TOMM40 (141)	C	T	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs2075650	22	45395619	TOMM40 (0)	G	A	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs34095326	23	45395844	TOMM40 (0)	A	G	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs34404554	24	45395909	TOMM40 (0)	G	C	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs11556505	25	45396144	TOMM40 (0)	T	C	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs157584	26	45396899	TOMM40 (0)	T	C	rs34342646 (1)	<b>rs157584</b> (5)
rs157585	27	45397512	TOMM40 (0)	C	A	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs157588	28	45398264	TOMM40 (0)	T	C	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs157590	29	45398716	TOMM40 (0)	C	A	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs1160985	30	45403412	TOMM40 (0)	T	C	rs76692773 (2)	rs76692773 (2)
rs760136	31	45403858	TOMM40 (0)	G	A	rs76692773 (2)	rs76692773 (2)
rs741780	32	45404431	TOMM40 (0)	C	T	rs76692773 (2)	rs76692773 (2)
rs1038025	33	45404972	TOMM40 (0)	C	T	rs76692773 (2)	rs76692773 (2)
rs1038026	34	45405062	TOMM40 (0)	G	A	rs76692773 (2)	rs76692773 (2)
rs7259620	35	45407788	APOE (1.251)	A	G	rs76692773 (2)	rs76692773 (2)
rs405509	36	45408836	APOE (203)	G	T	rs34342646 (1)	rs769449 (1)
rs769449	37	45410002	APOE (0)	A	G	rs34342646 (1)	<b>rs769449</b> (1)
rs1081106	38	45413366	APOC1 (4.211)	C	T	rs76692773 (2)	rs76692773 (2)
rs5117	39	45418790	APOC1 (0)	C	T	rs34342646 (1)	rs769449 (1)

Abb. 1 = Nummer in Abbildung 1; Zahl in Klammern = Entfernung in Basenpaaren zum nächsten Gen z. B. APOE (203) = 203 bp vor APOE; es wurde *build* GRCh37 verwendet, A1 = minores Allel, A2 = majores Allel, C = *clump*, fett gedruckt = für den Test nominal signifikanter Index-SNP



**Abbildung 1** Untersuchte SNPs der TOMM40-Genregion  $\pm 20$  kb

Darstellung der untersuchten Genregion auf Chromosom 19q19.32: die Gene NECTIN2, TOMM40, APOE und APOC1 mit den SNPs von 5' nach 3'. Tabelle 7 zeigt, welche Zahl welchem SNP zugeordnet ist. Exons sind als Blöcke, Introns als verbindende Linien dazwischen (im Gen bunt; in der Inter-Gen-Region schwarz) dargestellt. Als Quelle diente der *Variation Viewer* (NCBI - Variation viewer).



### 3.3 Assoziation von SNPs der TOMM40-Region mit den Ergebnissen des TMT

Zunächst wurde untersucht, ob SNPs der betrachteten Genregion nominal signifikant mit Ergebnissen des TMT der gesamten Screeningstichprobe assoziiert sind. Von diesen SNPs wurden lediglich die LD-unabhängigen Index-SNPs beschrieben. Sie wurden im Anschluss für die Kovariable APOE  $\epsilon$ 4-Allel korrigiert, um zu prüfen, ob der beobachtete Effekt vom Gen TOMM40 bzw. NECTIN2 ausgeht oder vom benachbarten APOE  $\epsilon$ 4-Allel dominiert ist. Anschließend wurde geschaut, wie sich die Index-SNPs in den nach Geschlechtern getrennten Untergruppen verhalten, um geschlechtsspezifische Effekte der Variationen zu betrachten. Zuletzt erfolgte die Replikation derjenigen SNPs, welche sich in der Screeningstichprobe entweder in der Gesamtgruppe, in der APOE- $\epsilon$ 4-Analyse oder in den Untergruppen der Geschlechter signifikant assoziiert gezeigt hatten. Dabei ergaben sich 6 signifikant assoziierte SNPs, davon 2 Proxy-SNPs (rs72654437 für rs76692773 ( $r^2 = 0,280125$ ,  $D' = 0,942164$ ) und rs11667640 für rs11671274 ( $r^2 = 0,631398$ ,  $D' = 0,801734$ )). Die Richtung der beobachteten Assoziation wurde bei der Replikationsuntersuchung beachtet und war für Screeningstichprobe und Replikationsstichprobe gleich.

#### 3.3.1 Ergebnisse im Trail Making Test-A

Bezogen auf die Screeningstichprobe konnten in 2 LD-unabhängigen Regionen (*clumps*) nominal signifikante Assoziationen zu den Ergebnissen des TMT-A festgestellt werden (Tabelle 8). Dabei zeigte das seltenere Allel rs34342646-A eine Assoziation zu schlechterer ( $B = 0,2603$ ) und das seltenere Allel rs76692773-T eine Assoziation zu besserer Leistung ( $B = -0,2043$ ). Nach Korrektur für die Kovariable des APOE  $\epsilon$ 4-Allels zeigte sich bei keinem Polymorphismus eine nominal signifikante Assoziation zum TMT-A (rs34342646:  $p = 0,1566$ ; rs76692773:  $p = 0,1887$ ).

**Tabelle 8** Darstellung der Index-SNPs in LD-unabhängigen Regionen mit nominal signifikanten Assoziationen mit dem TMT-A

Index-SNP	Clump	A1	FRQ	Lokalisation	B	P	SE
rs34342646	1	A	0,1409	NECTIN2 (0)	0,2603	0,0041	0,0903
rs76692773	2	T	0,1192	TOMM40 (266)	-0,2043	0,0465	0,1024

SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*, A1 = Effekttallel (i. d. R. minores Allel), FRQ = Allelfrequenz des Effekttallels, B = Regressionskoeffizient, P = p-Wert, SE = Standardfehler

In der Replikationsstichprobe konnte für diese beiden Variationen keine signifikante Assoziation zu den Ergebnissen des TMT-A beobachtet werden.

### 3.3.2 Ergebnisse der Frauen im Trail Making Test-A

Bei nach Geschlechtern getrennter Analyse der Ergebnisse zeigten die weiblichen Probanden eine nominal signifikante Assoziation des Index-SNPs rs34342646 ( $p = 0,0469$ ) zu den TMT-A-Ergebnissen. Dabei zeigte das seltenere Allel A eine Assoziation zu schlechterer Testleistung ( $B = 0,2545$ ). Nach Korrektur für die Kovariable des APOE  $\epsilon 4$ -Allels zeigte dieser Index-SNP keine signifikante Assoziation ( $p = 0,467$ ).

### 3.3.3 Ergebnisse der Männer im Trail Making Test-A

Die männlichen Probanden zeigten für die Index-SNPs der Gesamtstichprobe keine nominal signifikante Assoziation zu den Ergebnissen des TMT-A. In der Replikation der Ergebnisse konnte jedoch in der Männergruppe ein Trend zu einer signifikanten Assoziation ( $p = 0,095$ ) für den Index-SNP rs76692773 über einen Proxy-SNP (rs72654437;  $r^2 = 0,280125$ ,  $D' = 0,942164$ ) festgestellt werden. Dabei zeigte das seltenere Allel rs72654437-A eine Assoziation zu besseren Testleistungen.

### 3.3.4 Ergebnisse im Trail Making Test-B

Von den 113 untersuchten Polymorphismen zeigten die Index SNPs der 5 LD-unabhängigen Regionen eine nominal signifikante Assoziation zu Ergebnissen des TMT-B (rs769449, rs76692773, rs393584, rs11671274 und rs157584). Dies zeigt Tabelle 9. Die selteneren Allele rs769449-A und rs393584-A zeigten eine Assoziation zu schlechterer Leistung, die selteneren Allele rs76692773-T, rs11671274-G und rs157584-C eine Assoziation zu besserer Leistung im TMT-B.

Zwei der Index-SNPs blieben auch nach Korrektur für multiples Testen noch signifikant: rs769449 ( $p = 0,0001$ ) und rs76692773 ( $p = 0,0006$ ).

Nach Korrektur für die Kovariable des APOE  $\epsilon 4$ -Allels waren die 4 Index-SNPs rs769449, rs76692773, rs393584 und rs11671274 nominal signifikant mit dem TMT-B assoziiert (Tabelle 10).

**Tabelle 9** Darstellung der SNPs in LD-unabhängigen Regionen mit nominal signifikanten Assoziationen mit dem TMT-B

Index-SNP	Clump	A1	FRQ	Lokalisation	B	P	SE
rs769449	1	A	0,1079	APOE (0)	0,3942	0,0001	0,1012
rs76692773	2	T	0,1192	TOMM40 (266)	-0,3486	0,0006	0,101
rs393584	3	A	0,3379	NECTIN2 (0)	0,1690	0,0122	0,0672
rs11671274	4	C	0,9406	NECTIN2 (0)	0,2948	0,0203	0,1267
rs157584	5	T	0,5138	TOMM40 (0)	0,1392	0,0233	0,0612

SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*, A1 = Effektallel (i. d. R. minores Allel), FRQ = Allelfrequenz des Effektallels, B = Regressionskoeffizient, P = p-Wert, SE = Standardfehler

**Tabelle 10** Darstellung der SNPs in LD-unabhängigen Regionen mit nominal signifikanten Assoziationen mit dem TMT-B mit APOE-Korrektur

Index-SNP	Clump	A1	FRQ	Lokalisation	B APOE	P APOE	SE
rs769449	1	A	0,1094	APOE (0)	0,3521	0,0507	0,1797
rs76692773	2	T	0,1188	TOMM40 (266)	-0,3210	0,0044	0,1123
rs393584	3	A	0,3422	NECTIN2 (0)	0,1731	0,0175	0,0726
rs11671274	4	C	0,9454	NECTIN2 (0)	0,3440	0,0174	0,1441

SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*, A1 = Effektallel, FRQ = Allelfrequenz des Effektallels, B = Regressionskoeffizient, P = p-Wert, SE = Standardfehler, B APOE = Regressionskoeffizient unter Berücksichtigung des APOE, P APOE = p-Wert unter Berücksichtigung des APOE

Der SNP rs769449 zeigte in der Replikationsstichprobe ebenfalls eine nominal signifikante Assoziation ( $p = 0,03$ ) zu den Ergebnissen des TMT-B. Dabei zeigte das seltenere Allel A genau wie in der Screeningstichprobe eine Assoziation zu schlechterer Leistung, sodass für Screening- und Replikationsstichprobe gilt: je mehr A minor, desto schlechter die Testleistung im TMT-B.

### 3.3.5 Ergebnisse der Frauen im Trail Making Test-B

Bei den Frauen waren 3 der Index-SNPs nominal signifikant mit den Ergebnissen des TMT-B assoziiert, wie Tabelle 11 zeigt. Dabei zeigte das seltenere Allel rs769449-A eine Assoziation zu schlechterer Testleistung, die selteneren Allele rs76692773-T und rs157584-T eine Assoziation zu besserer Testleistung im TMT-B. Es muss beachtet werden, dass in der Frauengruppe rs157584-T das seltenere Allel ist, dies ist in der Gesamtstichprobe und im CEU-Abgleich das häufigere Allel.

Die Korrektur auf die Kovariable des APOE  $\epsilon$ 4-Allels überstanden die Assoziationen dieser Index-SNPs nicht.

## Ergebnisse

**Tabelle 11** Darstellung der SNPs in LD-unabhängigen Regionen mit nominal signifikanten Assoziationen mit dem TMT-B in der Gruppe der Frauen

Index-SNP	Clump	A1	FRQ	Lokalisation	B Frauen	P Frauen	SE
rs769449	1	A	0,1021	APOE (0)	0,3861	0,0107	0,1503
rs76692773	2	T	0,1225	TOMM40 (266)	-0,2970	0,0415	0,1450
rs157584	5	T	0,4889	TOMM40 (0)	0,2322	0,0070	0,0854

SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*, A1 = Effektallel (i. d. R. minores Allel), FRQ = Allelfrequenz des Effektallels, B = Regressionskoeffizient, P = p-Wert, SE = Standardfehler

Für den SNP rs769449 zeigte sich in der Replikationsstichprobe bei der Frauengruppe ein Trend ( $p = 0,0534$ ) zu einer nominal signifikanten Assoziation. Dabei zeigte genau wie in der Screeningstichprobe das seltenere Allel rs769449-A eine Assoziation zu schlechterer Testleistung ( $B = 0,518$ ).

### 3.3.6 Ergebnisse der Männer im Trail Making Test-B

Bei den männlichen Probanden waren 3 Index-SNPs nominal signifikant mit Ergebnissen des TMT-B assoziiert (Tabelle 12). Dabei zeigten sich die selteneren Allele rs769449-A (wie in der Gesamt- und Frauengruppe) und rs393584-A (wie in der Gesamtgruppe) assoziiert mit schlechterer Testleistung. Das seltenere Allel rs76692773-T zeigte sich (ebenfalls wie in der Gesamtstichprobe und der Frauengruppe) mit besserer Testleistung assoziiert.

Nach Korrektur für die Kovariable des APOE  $\epsilon$ 4-Allels zeigte sich der Index-SNP rs393584 noch immer nominal signifikant mit den Ergebnissen des TMT-B assoziiert ( $p = 0,009$ ).

In der Replikationsstichprobe zeigte sich für die männlichen Probanden keine signifikante Assoziation der SNPs mit den Ergebnissen des TMT-B.

**Tabelle 12** Darstellung der SNPs in LD-unabhängigen Regionen mit nominal signifikanten Assoziationen mit dem TMT-B in der Gruppe der Männer

Index-SNP	Clump	A1	FRQ	Lokalisation	B Männer	P Männer	SE
rs769449	1	A	0,1140	APOE (0)	0,3612	0,0083	0,1359
rs76692773	2	T	0,1158	TOMM40 (266)	-0,3563	0,0119	0,1407
rs393584	3	A	0,3431	NECTIN2 (0)	0,2358	0,0101	0,0910

SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*, A1 = Effektallel (i. d. R. minores Allel), FRQ = Allelfrequenz des Effektallels, B = Regressionskoeffizient, P = p-Wert, SE = Standardfehler

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde die Assoziation von 113 Polymorphismen der TOMM40-APOE-Genregion ( $\pm 20$  kb von TOMM40) zu den Ergebnissen des Trail Making Tests untersucht, den eine erste Screeningstichprobe aus 558 gesunden Probanden erzielte. Anschließend wurden die signifikanten Assoziationen anhand einer Replikationsstichprobe mit 617 Probanden überprüft.

Es zeigten sich insgesamt 39 SNPs nominal signifikant mit den Ergebnissen des TMT-A und/oder TMT-B assoziiert. 2 LD-unabhängige Index-SNPs (rs34342646 und rs76692773) waren nominal signifikant mit den Ergebnissen des TMT-A assoziiert. Nach Korrektur für die Kovariable des APOE  $\epsilon 4$ -Allels zeigte sich in der Screening-Gesamtstichprobe keine nominal signifikante Assoziation zu den TMT-A-Ergebnissen. In der Replikationsstichprobe der Männer zeigte sich für den SNP rs76692773 über den Proxy-SNP rs72654437 ein Trend von  $p = 0,095$ .

Im TMT-B gab es in der Screening-Gesamtstichprobe 5 nominal signifikant assoziierte Index-SNPs. Zwei SNPs in 2 LD-unabhängigen Regionen hielten multiplem Testen stand und zeigten die besten p-Werte: für TOMM40 rs76692773 ( $p = 0,0006$ ) und für APOE rs769449 ( $p = 0,0001$ ). Nach Korrektur für die Kovariable des APOE  $\epsilon 4$ -Allels zeigten sich 4 Index-SNPs nominal signifikant assoziiert. Die Replikationsstichprobe zeigte für den SNP rs769449 für die Gesamtstichprobe eine nominal signifikante Assoziation ( $p = 0,03$ ) und für die Frauengruppe einen Trend ( $p = 0,0534$ ).

### 4.2 Einflussmöglichkeiten der untersuchten Polymorphismen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Polymorphismen der Genregion um TOMM40 und APOE und der kognitiven Leistungsfähigkeit an gesunden Probanden mittels des TMT getestet. Dabei zeigte sich die TOMM40-APOE-Genregion mit kognitiver Leistungsfähigkeit assoziiert. Noch ungeklärt bleibt, wie die SNPs der TOMM40-APOE-Genregion auf die Kognition Einfluss nehmen könnten.

Im Folgenden werden diejenigen SNPs diskutiert, die sowohl in der vorliegenden Arbeit, als auch in weiteren Studien untersucht wurden. Dabei handelt es sich nicht zwingend um die Index-SNPs, sondern zum Teil um SNPs des gleichen *clumps*.

#### 4.2.1 Polymorphismen des Gens TOMM40

Das Gen TOMM40 wurde mehrfach als mit der LOAD assoziiert gefunden (Jiao et al., 2015; Bao et al., 2016). Es kodiert für das Protein TOMM40, welches Hauptbestandteil der Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM) ist (Shiota et al., 2015). Eine den Effekt des TOMM40 auf Kognition und LOAD betreffende These, ist die Mitochondrien-Kaskaden-Hypothese (Swerdlow und Khan, 2004). Genetische Polymorphismen im TOMM40-Gen könnten Strukturveränderungen der TOM verursachen, welche zu einer Akkumulation von APP führen und so das Membranpotential, sowie die ATP-Produktion beeinträchtigen (Anandatheerthavarada et al., 2003). Besonders die sensiblen Neuronen könnten so Schaden nehmen und die Kognition könnte beeinträchtigt werden (Cha et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Index-SNP rs76692773 mit den Ergebnissen des TMT-A und des TMT-B nominal signifikant assoziiert, dabei zeigte das seltenere T-Allel eine Assoziation zu besserer Testleistung in beiden Untertests. Diese Assoziation hielt multiplem Testen stand ( $p = 0,0006$ ). Dieser  $p$ -Wert zeigt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit tatsächlich ein Zusammenhang zwischen rs76692773 und dem kognitiven Endophänotypen besteht. In der Replikation der Ergebnisse konnte zumindest ein Trend zu einer nominal signifikanten Assoziation zu den TMT-A-Ergebnissen in der Subgruppe der Männer festgestellt werden. Dabei wurde für rs76692773 der im LD liegende Proxy-SNP rs72654437 ( $D_{\text{prime}} = 0,9422$ ) verwendet. Der hohe  $D_{\text{prime}}$ -Wert von 0,9422 spricht dafür, dass dieser Proxy-SNP sehr nah am Index-SNP liegt und ihre Assoziationen somit vergleichbar sind. Die Assoziation zu den Ergebnissen des TMT-B zeigte sich in der Screeningstichprobe auch nach Korrektur für die Kovariable APOE  $\epsilon 4$ -Allel noch signifikant, sodass rs76692773 auch unabhängig von APOE kognitive Leistungen beeinflussen könnte. Du et al. (2019) beschrieben, dass es Hinweise gibt, dass rs76692773 einen Risikolocus für die LOAD darstellt.

Ein in vielen Studien zur Lebensdauer, sowie zur LOAD auftauchender SNP ist rs2075650. Dieser war in der vorliegenden Arbeit mit besserer Leistung in beiden Untertests assoziiert (Allel A, *clump 1*, vertreten durch Index-SNP rs34342646 in TMT-A und rs769449 in TMT-B). In einer Studie der *Women's Health Initiative* fanden Shadyab et al. (2017), dass die Variation rs2075650-A bei kaukasischen Frauen signifikant mit langer Lebensdauer, definiert als ein Überleben bis zum 90. Lebensjahr, assoziiert war. Auch Yashin et al. (2018) konnten für Männer und Frauen für die Variation rs2075650-A eine signifikante Assoziation zu langer Lebensdauer feststellen. Davies et al. (2014) untersuchten in ihrer GWAS die Assoziation zwischen dem APOE-Locus (inklusive TOMM40) und nicht pathologischem kognitiven Altern. Dabei wurde eine genomweit signifikante Assoziation des SNPs rs2075650 zu kognitivem Altern bei gesunden Probanden

## Diskussion

festgestellt, wobei das G-Allel mit kognitivem Abbau assoziiert wurde. In der Metaanalyse von Huang et al. (2016) wurde eine Assoziation von rs2075650 mit der LOAD festgestellt. Weiterhin wurde das G-Allel als das Hoch-Risiko-Allel identifiziert (studienweite OR von 2,79) und die These aufgestellt, dass das A-Allel mit niedrigerem Alzheimer-Risiko assoziiert ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Studie von Cruchaga et al. (2013), welche eine signifikante Assoziation von rs2075650 zu Tau und p-Tau im Liquor feststellten, die bekannte Biomarker für die LOAD sind. Dabei zeigte sich das G-Allel als das Risikoallel. Potkin et al. (2009) stellten eine Assoziation von rs2075650-G zu reduziertem Volumen (Atrophie) des Hippocampus fest. Wie genau der SNP rs2075650 Einfluss auf die Atrophie dieser Hirnregionen nimmt und damit einen Teil der Neurodegeneration der LOAD bedingt, ist bislang nicht geklärt. Insgesamt sind die pathologischen Mechanismen, welche zur LOAD führen, bis dato nicht vollständig verstanden. Ausgehend von den Ergebnissen der genannten Studien und denen der vorliegenden Arbeit könnte das Allel A des SNPs rs2075650 als ein protektives Allel und das G-Allel als ein Risiko-Allel für kognitive Leistungsfähigkeit und evtl. für die LOAD betrachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Studien sind kritisch zu betrachten und eher als Hinweise zu werten, da die Stichprobengrößen teilweise zu gering waren und deskriptive Studien keine funktionellen Zusammenhänge erklären. Weiterhin können Effektallele je nach Stichprobenauswahl aufgrund von Selektionseffekten in verschiedene Richtungen weisen oder in einem LD zur eigentlich funktionellen Variante stehen. Dies muss bei der Interpretation solcher Studien beachtet werden.

Bei dem exonischen SNP rs11556505 (*clump 1*, vertreten durch Index-SNP rs34342646 in TMT-A und rs769449 in TMT-B) handelt es sich um eine sog. *missense variant*. Der Basenaustausch sorgt für die Kodierung einer anderen Aminosäure (Leucin statt Phenylalanin) (NCBI, 2020c). Es lässt sich nicht eindeutig beschreiben, welche Auswirkung dieser Aminosäureaustausch hat. Arpawong et al. (2017) beschrieben, dass kognitiv gesunde Erwachsene, die das APOE-ε4 Allel sowie rs11556505-T aufwiesen, eine Assoziation zwischen erniedrigtem Hippocampusvolumen und verminderter Merkfähigkeit zeigten. Der Polymorphismus rs11556505-T war auch in der vorliegenden Arbeit nominal signifikant mit schlechteren Ergebnissen im TMT-A und -B assoziiert. In der Studie von Jiao et al. (2015) wurde die Variation rs11556505-T hingegen als protektiv eingestuft. Die abweichenden Ergebnisse, welche denen der vorliegenden Studie widersprechen, könnten dadurch zu erklären sein, dass es sich bei der von Jiao et al. (2015) untersuchten Stichprobe ausschließlich um Chinesen handelt, welche andere Allelfrequenzen aufweisen als Kaukasier.

Mutationen in Exons können nicht nur durch Deletion einer Base und Verschiebungen des Protein-Leserahmens, sondern auch durch Beeinflussung des Spleißvorgangs, zu unterschiedlichen Genprodukten führen und somit in verschiedenen Krankheiten resultieren. Weiterhin können exonische, also funktionale SNPs die Sekundärstruktur der mRNA beeinflussen, was sich wiederum auf die Genexpression auswirken kann. Einen Überblick bietet der Reviewartikel von Abramowicz et al. (2019). Mise et al. (2017) untersuchten den Zusammenhang von TOMM40 und kognitivem Abbau und fanden diesen assoziiert mit einer geringeren mRNA-Expression von TOMM40 bei LOAD-Patienten. So könnten Variationen von TOMM40 durch eine veränderte Genexpression Einfluss auf die Kognition nehmen.

### 4.2.2 Polymorphismen des Gens Nectin2

Das Gen NECTIN2 kodiert für ein Membranglykoprotein, welches eine Rolle in Zell-Zell-Verbindungen und als Eintrittspforte für Virusvarianten spielt (Molfetta et al., 2019). Porcellini et al. (2010) postulierten die Hypothese, dass die Gene TOMM40, NECTIN2 und APOE unter Umständen für eine individuelle Prädisposition des Gehirns gegenüber viralen Infektionen verantwortlich sein könnten. So erklärten sie sich die Zunahme spontaner LOAD-Neuerkrankungen durch Virusinfektionen des Gehirns bedingt. Der exonische SNP rs6857 könnte, basierend auf dieser Hypothese, eventuell über die Herunterregulierung der NECTIN2-Expression auf die Funktion des Proteins als Viruseintrittspforte Einfluss nehmen.

Die Variation rs6857-T (*clump 1*, vertreten durch rs34342646 in TMT-A und rs769449 in TMT-B) war in der vorliegenden Arbeit mit schlechteren Ergebnissen in beiden Untertests assoziiert. Eine Mutation innerhalb eines Exons kann zu einem anderen Proteinprodukt führen. Der SNP rs6857 ist eine Variation der 3'-UTR von NECTIN2. Dort sorgt er für eine Bindungsstelle für miRNA. Han et al. (2017) beobachteten, dass die betreffende miRNA die Genexpression von NECTIN2 herunterreguliert und dass das T-Allel des SNPs rs6857 ebenfalls mit einem niedrigeren Spiegel an NECTIN2 assoziiert ist. Die Autoren stellten anhand ihrer Ergebnisse die These auf, dass rs6857-T eine Risiko-Variation für LOAD sein könnte, indem sie die Expression des Gens NECTIN2 mittels miRNA herunterreguliert. So könnte die Variation rs6857-T über bislang nicht vollständig verstandene pathologische Mechanismen, Einfluss auf die Kognition bzw. die LOAD nehmen. Neben der Assoziation zur LOAD stellten Ferrari et al. (2017) eine Assoziation der Variation rs6857-T zur Frontotemporalen Demenz fest. Da beide demenziellen Erkrankungen gleichzeitig vorliegen können, ist jedoch nicht eindeutig geklärt, für welche Erkrankung der SNP einen Risiko-SNP darstellt.



## Diskussion

31 der in dieser Arbeit nominal signifikant assoziierten Polymorphismen liegen innerhalb nicht für Proteine kodierender Regionen (z. B. Introns), 5 in Intergenregionen. Intronsische SNPs könnten einen indirekten Einfluss auf die Genexpression des TOMM40-Gens (bzw. der Gene APOE, NECTIN2, APOC1) haben, indem sie zum Beispiel zu alternativem Spleißen führen bzw. das Spleißen beeinflussen. Eine Fehlfunktion des Spleißens, bei der die Elemente des Spleißvorgangs beeinträchtigt werden, kann die Genexpression eines oder sogar mehrerer Gene beeinflussen und wurde mit diversen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht (Chiara et al., 2020).

Auch der Index-SNP rs34342646 liegt innerhalb eines Introns (NECTIN2). In der vorliegenden Arbeit zeigte er eine nominal signifikante Assoziation zu den Ergebnissen des TMT-A. Das Allel A zeigte hierbei eine Assoziation zu schlechteren Ergebnissen. In ihrer GWAS konnten Cruchaga et al. (2013) für diesen SNP eine genomweite Assoziation zu den LOAD-Biomarkern Tau und p-Tau im Liquor feststellen. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei rs34342646 um eine funktionelle Variante handelt oder ob der SNP mit einer funktionellen Variante im LD liegt. Besonders die SNPs des Gens APOE hatten in der Studie von Cruchaga et al. (2013) aussagekräftige Assoziationen zu den Biomarker-Spiegeln gezeigt. Da die gesamte Genregion in starkem LD liegt, sind die Effekte gegebenenfalls nicht unabhängig voneinander zu betrachten. Weitere Studien sind vonnöten, um diese Frage zu beantworten.

Introns können weiterhin epigenetische Mechanismen wie die DNA-Methylierung beeinflussen (Davies et al., 2014; Chiara et al., 2020). Dabei werden bestimmte Cytosin- und Guanin- (CpG) Dinukleotide methyliert, welche dann, wenn sie in der Promotorregion eines Gens liegen, die Expression dieses Gens inaktivieren (sogenanntes *Silencing*). Shao et al. (2018) und Fransquet, Lacaze et al. (2020) fanden heraus, dass zwischen LOAD-Patienten und kognitiv Gesunden signifikante Unterschiede bezüglich der DNA-Methylierung der TOMM40-APOE-Region bestanden. Liu et al. (2018) zeigten, dass die Methylierungsgrade der TOMM40-APOE-Region mit verzögertem Abruf von Gedächtnisinhalten bei gesundem kognitiven Altern assoziiert waren. Die Autoren vermuten, dass besonders epigenetische Mechanismen die kognitive Leistung beeinflussen könnten. Der in der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen des TMT-B nominal signifikant assoziierte SNP rs11672399 (vertreten durch rs73052307 *clump 4* in TMT-A und rs11671274 *clump 4* in TMT-B) liegt innerhalb eines Introns des Gens NECTIN2. Variation rs11672399-A zeigte eine Assoziation zu besserer Leistung, welche die Korrektur nach APOE überstand. Szymczak et al. (2020) konnten anhand einer Studie an Hochbetagten einen Zusammenhang des SNPs mit der Lebensdauer feststellen, wobei die Variation rs11672399-A mit längerer Lebensdauer assoziiert war. Diese Assoziation scheint den Autoren zufolge durch

## Diskussion

epigenetische Prozesse, insbesondere DNA-Methylierung bedingt zu sein. Die damit einhergehende Beeinflussung der Genexpression bestimmter Gene könnte eine Erklärung für die Langlebigkeit gewisser Menschen bieten, sowie für die Abwesenheit altersbedingter Erkrankungen in dieser speziellen Stichprobe. Unklar bleibt, ob die Assoziation unabhängig von den Einflüssen der Gene APOE und TOMM40 ist, da diese Genregion insgesamt mit langer Lebensdauer assoziiert zu sein scheint (Sebastiani et al., 2017).

Weiterhin könnten Polymorphismen innerhalb nicht-kodierender Abschnitte der DNA, d. h. innerhalb von Introns oder Intergenregionen, die Transkription beeinflussen, indem sie die Bindungsaffinität zu Transkriptionsfaktoren verändern (Ketharnathan et al., 2018) oder innerhalb regulatorischer DNA-Bereiche liegen, welche für die Ausprägung bestimmter Phänotypen mit entscheidend sind (Maurano et al., 2012).

### 4.2.3. Polymorphismen des Gens APOE

In der unmittelbaren Nachbarschaft des Gens TOMM40 liegt das Gen APOE, welches das am besten untersuchte Gen mit einer signifikanten Assoziation zur LOAD ist (Corder et al., 1993; Yu et al., 2017b). APOE kodiert für das Apolipoprotein E, welches in den Fettstoffwechsel involviert ist (Übersicht in Marais, 2019). Die verschiedenen Allele des Apolipoprotein E zeigen unterschiedliche Assoziationen zur LOAD (Saddiki et al., 2020). Das starke LD der Tomm40-APOE-Region erschwert jedoch die Interpretation der Assoziationen der einzelnen SNPs.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich das Allel A des Index-SNPs rs769449 im Gen APOE in beiden Untertests mit schlechterer Leistung assoziiert. Die Assoziation zu den Testergebnissen des TMT-B zeigte sich sowohl für die Screeninggesamtstichprobe ( $p = 0,0001$ ) und für die Gruppe der Männer der Screeningstichprobe ( $p = 0,0083$ ), als auch für die Replikationsgesamtstichprobe ( $p = 0,0307$ ) signifikant. Für die Replikationsstichprobe der Frauen wurde immerhin ein Trend ( $p = 0,0534$ ) beobachtet. In anderen Studien wurden ähnliche Zusammenhänge beobachtet. Arpawong et al. (2017) fanden den SNP rs769449 mit dem verbalen Gedächtnis assoziiert, wobei die Variation rs769449-A mit verzögertem Kurz- und Langzeitgedächtnis assoziiert wurde. Sebastiani et al. (2017) stellten eine Assoziation zwischen rs769449 und langem Leben fest. Träger der Variation rs769449-A zeigten eine frühere Sterblichkeit, wobei die Homozygoten früher starben als die Heterozygoten und diese wiederum signifikant vor den Nicht-Trägern des Allels A (Genotyp GG). Sie stellten außerdem fest, dass die nicht mit längerem Leben assoziierte Variation rs769449-A (als Genotyp AA) signifikant häufig

## Diskussion

gleichzeitig mit Homozygotie für das  $\epsilon 4$ -Allel von APOE einherging. Eine Kopplung der beiden Variationen würde eine Assoziation mit kürzerem Leben aufgrund beispielsweise neurodegenerativer Prozesse erklären. Cruchaga et al. (2013) fanden den SNP zudem als genomweit signifikant mit den für die LOAD typischen Biomarkern Tau und p-Tau assoziiert. Dies spricht dafür, dass es sich bei rs769449 um eine funktionelle Variante handeln könnte. Die Assoziation zeigte sich unabhängig von Amyloid  $\beta$ , sodass APOE einen Einfluss auf die neurodegenerativen Prozesse der Tau-Pathologie haben könnte, ohne an A $\beta$  gekoppelt zu sein.

Eine die 31 intronischen SNPs der vorliegenden Arbeit betreffende Hypothese wäre, dass diese durch alternatives Spleißen oder Gen-*Silencing* das Genprodukt derart beeinflussen, dass eine Fehlfunktion der TOMM40-Pore resultieren und dies eine Akkumulation des APP verursachen könnte. Diese Akkumulation, vermuten Roses et al. (2016), könnte sich auf den Grad der Krankheitsausprägung auswirken. Demgegenüber beschrieben Zeitlow et al. (2017), dass eine erhöhte Expression des TOMM40-Proteins einen positiven Effekt auf die Mitochondrien hatte und zudem eine gewisse Resistenz gegenüber zugefügtem Amyloid  $\beta$  bot.

Obwohl genomweite Assoziationsstudien bisher zahlreiche Suszeptibilitätsgene identifizieren konnten, bleiben die genauen molekularen Mechanismen der sporadisch auftretenden LOAD sowie die Quelle der Mitochondrienschäden noch ungeklärt. Bislang gibt es kaum klinische Konsequenzen der Erkenntnisse, da die beobachteten Effekte zu gering sind. Weiterhin ist unklar, welche Zellen genau die komplexe Erkrankung verursachen. Die Suszeptilitätsloci liegen zudem meist in nicht-kodierenden Abschnitten der DNA und häufiger vorkommende Variationen könnten auch durch das hohe LD gehäuft gemeinsam auftreten. Zusammengefasst haben dies Cano-Gamez et al. (2020) in ihrem Review-Artikel. Ein Hoffnungsträger in der Erforschung der LOAD ist die relativ neue technische Möglichkeit der künstlichen Intelligenz, mit deren Hilfe weitaus größere Mengen an Daten ausgewertet werden können als bisher. In Zukunft könnte diese Technik helfen, die momentan noch bestehenden Wissenslücken um die genaue Pathogenese der LOAD zu füllen (Mishra und Li, 2020).

Wichtig für die Interpretation und Vergleichbarkeit der o. g. Studien ist, auf die Stichprobengrößen und die Ethnien zu achten. So besteht beispielsweise die Stichprobe von Potkin et al. (2009) aus verschiedenen Ethnien und die von Takei et al. (2009) ausschließlich aus Japanern. Andere Ethnien können andere Allelfrequenzen aufweisen, sodass die Ergebnisse dieser Studien nur eingeschränkt auf Kaukasier übertragen werden können.

### 4.3 TOMM40 und APOE – Eine Genregion mit starkem Kopplungsungleichgewicht

Die TOMM40-APOE-Genregion ist bereits seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung, da sie im Verdacht steht, mit kognitivem Altern (Davies et al., 2014) und der spät ausbrechenden Alzheimer-Form (LOAD) in Verbindung zu stehen (Roses et al., 2010; Yu et al., 2017a). Das Problem bei der Betrachtung dieser Genregion mittels genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) ist jedoch das Kopplungsungleichgewicht (LD) zwischen den Polymorphismen. So liegt die Region um TOMM40 in einem starken LD mit dem Gen APOE (Yu et al., 2017b). Es wäre falsch, die im LD liegenden Polymorphismen mit ihren Assoziationen zu Endophänotypen bzw. Erkrankungen als voneinander unabhängig zu interpretieren. Unklar ist bislang, ob die Effekte der Polymorphismen von TOMM40 und APOE in jedem Fall als gekoppelt zu betrachten sind oder nur unter gewissen Umständen. Um die Assoziationen dennoch voneinander möglichst getrennt zu beurteilen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse „geclumpt“ und nur die LD-unabhängigen Regionen betrachtet. Trotzdem muss das starke Kopplungsungleichgewicht zwischen APOE und TOMM40 diskutiert werden.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten SNPs zeigten zum Teil von APOE abhängige Assoziationen zu den Ergebnissen des TMT. So überstand beispielsweise der mit besseren Leistungen im TMT assoziierte SNP rs2075650-A (*clump* 1, vertreten durch Index-SNP rs34342646 in TMT-A und rs769449 in TMT-B) die Korrektur für die Kovariable des APOE  $\epsilon$ 4-Allels nicht. Auch Yu et al. (2007) beobachteten, dass die Assoziation von TOMM40 zur LOAD nach Korrektur für das APOE  $\epsilon$ 4-Allel nicht länger signifikant war. Die Kopplung an APOE könnte durch die Tatsache begründet sein, dass rs2075650 mit dem SNP rs429358, der für das APOE  $\epsilon$ 4-Allel ausschlaggebend ist, im LD liegt (Harold et al., 2009).

Zhou et al. (2019) beobachteten, dass Probanden mit LOAD ein stärkeres LD zwischen Risikovariationen der Gene TOMM40, APOE und APOC1 aufwiesen als gesunde Probanden, sodass in der LOAD diese Risikovariationen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit gemeinsam auftreten könnten. So könnte im Umkehrschluss gefolgert werden, dass kognitiv gesunde Patienten ein weniger starkes LD dieser Region aufweisen als an LOAD erkrankte. Dies ist jedoch bislang nicht gezeigt worden. Zu beachten ist außerdem die Ethnie der Studie von Zhou et al. (2019). Da es sich ausschließlich um chinesische Probanden mit anderen Allelfrequenzen handelt, dürfen die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf kaukasische Probanden übertragen werden.

Wie eng TOMM40 und APOE zusammenhängen, verdeutlicht auch der Polymorphismus rs10524523 (abgekürzt = '523) des Gens TOMM40, der zwar in der vorliegenden Studie nicht

untersucht wurde, in der Alzheimerforschung jedoch eine besondere Rolle einnimmt. Je nach APOE-TOMM40'523-Haplotyp zeigten sich unterschiedliche Ausbruchsalter der LOAD (Roses et al., 2010). Die Untersuchung der TOMM40'523 Poly-T-Wiederholungen und seiner Kopplung an das APOE-Gen könnte dazu beitragen, den Effekt des TOMM40-Gens losgelöst von dem des APOE-Gens zu betrachten, was bisher aufgrund des hohen LD nicht unbedingt möglich war. Auch die Analyse von Haplotypen der TOMM40-APOE-Genregion wird derzeit genutzt, um von APOE  $\epsilon$ 4-Allel unabhängige Polymorphismen zu finden. So gelang es Zhou et al. (2019) anhand dieser Methode, von APOE  $\epsilon$ 4 unabhängige Haplotypen der Gene NECTIN2 und APOC1 (welche in der TOMM40-Region liegen) zu identifizieren, die eine Assoziation zur LOAD zeigten. In einer anderen Studie stieg bei APOE  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3-Trägern die Wahrscheinlichkeit für den Ausbruch der LOAD deutlich, wenn gleichzeitig das Risiko-Allel A des SNPs rs2075650 (TOMM40) vorhanden war (Soyal et al., 2020), sodass die Assoziation zur LOAD nicht vom APOE- $\epsilon$ 4-Allel, sondern vom TOMM40-SNP ausging.

Das Zusammenspiel von APOE und TOMM40 sowie ihr Einfluss auf die Mitochondrienschädigung und das Alter bei Ausbruch der LOAD werden derzeit genauer untersucht. Dies war jedoch nicht Teil der vorliegenden Studie. Es wurde lediglich auf die starke Kopplung von APOE und TOMM40 sowie der benachbarten Gene, verwiesen, da bislang nicht eindeutig geklärt ist, ob Assoziationen von SNPs des Gens TOMM40 alleinstehend betrachtet werden können.

#### **4.4 Exekutivfunktionen als Endophänotypen**

In der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung des TMT die Exekutivfunktionen (u. a. Aufgabenwechsel) sowie die Verarbeitungsgeschwindigkeit der Probanden untersucht. Die Leistungen im TMT, also die Zeit in Sekunden, die die Probanden zum Beenden des Tests benötigten, wurden als kognitive Endophänotypen gewertet.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, erfüllen Exekutivfunktionen die meisten der Kriterien für Endophänotypen, welche von Gottesman und Gould (2003) aufgestellt wurden. So treten sie in der Bevölkerung gemeinsam mit der Erkrankung auf (Collette et al., 1999; McKhann et al., 2011; Clark et al., 2012), sind vererbbar (Friedman et al., 2008; 2016; Mez et al., 2016) und bei nicht-betroffenen Angehörigen in höherem Maß nachweisbar als in der Allgemeinbevölkerung (Hazlett et al., 2015).

Die Untertests des TMT spiegeln dabei geringfügig unterschiedliche kognitive Fähigkeiten wider. Teil A gibt vor allem Aufschluss über die Geschwindigkeit der visuellen Suche bzw. die

## Diskussion

Wahrnehmungsgeschwindigkeit, während Teil B besonders die Exekutivfunktion widerspiegelt, zwischen Aufgaben hin und her zu wechseln (Sánchez-Cubillo et al., 2009). Die Untertests korrelieren miteinander, wie die Studie nach Friedman et al. (2008) zeigt. Cornelis et al. (2019) stellten fest, dass der TMT gut zur Evaluation der Alltagstauglichkeit geeignet ist. Anhand des TMT die Exekutivfunktionen zu untersuchen, stellt somit eine gute Möglichkeit dar, die höheren kognitiven Funktionen der Teilnehmer zu beurteilen sowie ggf. ihre (zukünftige) Alltagsbewältigung grob einzuschätzen.

Die LOAD, mit welcher das Gen TOMM40 bereits mehrfach assoziiert wurde, zeigt neben amnestischen Defiziten auch gestörte Exekutivfunktionen. So stellten Collette et al. (1999) fest, dass Menschen mit LOAD signifikant schlechter als Menschen mit unbeeinträchtigter Kognition in Tests abschnitten, die verschiedene Exekutivfunktionen untersuchten. Neben der Demenz und der Alltagsbeeinträchtigung wurden Probleme der exekutiven Funktionen zu den Diagnosekriterien der AD ergänzt (McKhann et al., 1984; 2011). Der TMT findet sich daher im CERAD wieder, welches das derzeitige Standard Diagnosewerkzeug für die LOAD darstellt (memory clinic, 2009). Auch in der Phase des MCI wurden bereits gestörte Exekutivfunktionen beobachtet, welche aufgrund einer verbleibenden kognitiven Reserve und neuronalen Plastizität jedoch kompensiert werden konnten (Brandt et al., 2009; Belleville et al., 2011).

Clark et al. (2012) zeigten anhand des TMT-B und anderer Tests, dass besonders die Exekutivfunktionen Unterdrückung und Wechseln zwischen verschiedenen Aufgaben einen generellen kognitiven Abbau bei älteren nicht dementen Menschen vorhersagen können. Auch Blacker et al. (2007) kamen zu dem Ergebnis, dass der kognitive Abbau der Probanden signifikant mit schlechteren Ergebnissen in Tests wie dem TMT-B assoziiert war. Somit könnte der TMT, der die Exekutivfunktionen untersucht, einen Hinweis auf einen zukünftigen geistigen Abbau liefern, wobei hierzu Langzeitstudien vonnöten wären.

Ziel der Nutzung des TMT in der vorliegenden Arbeit war es, Exekutivfunktionen als Endophänotypen für die generelle kognitive Leistungsfähigkeit gesunder Probanden zu erfassen. Es sollte anhand dieser Endophänotypen untersucht werden, ob genetische Variationen der TOMM40-APOE-Genregion Einfluss auf die Kognition Gesunder haben. Ob die Assoziation der TOMM40-APOE-Genregion zu den TMT-Testergebnissen auch bei LOAD-Erkrankten besteht, wurde nicht untersucht. Durch die strengen Ein- und Ausschlusskriterien wurden Personen mit dementiellen Auffälligkeiten nicht in die Studie aufgenommen. Es kann allerdings nicht sicher ausgeschlossen werden, dass sich einige der Probanden in der präklinischen Phase der LOAD befanden.

Kognitive Endophänotypen wurden in der aktuellen Forschung vielfach genutzt, um genetische Variationen der LOAD zu untersuchen, wobei sich vor allem auf das APOE-Gen konzentriert wurde (Davies et al., 2014; Lyall et al., 2019). Verglichen mit den traditionellen Fall-Kontroll-Studien waren bisher jedoch die Stichprobenzahlen zu gering, um aussagekräftige Ergebnisse zu erlangen. So berechneten De Jager et al. (2012), dass mindestens 7.000 bis 12.000 Probanden notwendig wären, um aussagekräftige Ergebnisse zur Assoziation zwischen genetischen Polymorphismen und der Rate kognitiven Abbaus zu erhalten. Diese Stichprobenzahl wurde in der vorliegenden Studie nicht erreicht, was bei der Auswertung der Ergebnisse beachtet werden sollte.

### **4.4.1 Präklinische AD versus kognitiver Phänotyp**

Beim Betrachten der Effekte der TOMM40-APOE-Genregion auf die Kognition, insbesondere bei an LOAD Erkrankten, ist es eine Herausforderung, die folgende Frage zu beantworten: Übt der Genotyp einen direkten Einfluss auf den kognitiven Phänotyp aus - indem er beispielsweise die Mitochondrienfunktion beeinflusst - oder ist die Assoziation zu schlechterer kognitiver Leistung dadurch zu erklären, dass sich die Probanden bereits in der präklinischen Phase der AD befinden? Auch O'Donoghue et al. (2018) diskutieren in ihrem Reviewartikel, dass trotz vielfacher Assoziation des  $\epsilon 4$ -Allels mit der LOAD nicht differenziert werden kann, ob die kognitiven Einschränkungen auf der Tatsache gründen, dass die Probanden sich in einer Prodromalphase der LOAD befinden (Prodromalhypothese) oder ob der Genotyp (das  $\epsilon 4$ -Allel) einen direkten Einfluss auf den kognitiven Phänotypen hat (Phänotyphypothese). Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann diese Frage nicht beantwortet werden.

Ein Ansatz der Differenzierung der Effekte von APOE und TOMM40 auf die Kognition bietet die Betrachtung des Polymorphismus rs10524523, der zwar in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurde, in der Alzheimerforschung jedoch eine besondere Rolle einnimmt. Je nach APOE-TOMM40'523-Haplotyp zeigten sich unterschiedliche Ausbruchsalter der LOAD (Roses et al., 2010) und ein unterschiedlich starker kognitiver Abbau (Yu et al., 2017a). Die Untersuchung des TOMM40'523-Poly-T-Wiederholungen und seiner Kopplung an das APOE-Gen könnte dazu beitragen, den Effekt des TOMM40-Gens losgelöst von dem des APOE-Gens zu betrachten, was bisher aufgrund des hohen LD nicht unbedingt möglich war.

Weitere Studien mit spezifischerer Betrachtung der APOE-unabhängigen TOMM40-Effekte sind vonnöten, um die Effekte der Genregion um TOMM40 auf die Kognition genau zu verstehen.

#### 4.5 Vergleich der Geschlechter

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich zwischen den Geschlechtern teilweise Unterschiede in der Signifikanz der Assoziationen zu den TMT-Ergebnissen. Zwar waren beispielweise die Index-SNPs rs769449 und rs76692773 sowohl bei den Frauen als auch bei den Männern nominal signifikant mit den Ergebnissen des TMT-B assoziiert. Der Index-SNP rs157584 jedoch war nur bei den Frauen und der Index-SNP rs293584 nur bei den Männern nominal signifikant mit den TMT-B-Ergebnissen assoziiert. Im TMT-A zeigten nur die Frauen eine nominal signifikante Assoziation zum Index-SNP rs34342646, die Männer zeigten keine Signifikanz für die Index-SNPs.

Ursache dafür könnte natürlich eine Verzerrung der Ergebnisse durch das gesetzte Signifikanzniveau oder eine nicht ausreichende statistische Power der Untergruppen sein. Allerdings konnten auch andere Studien in der TOMM40-APOE-Genregion Unterschiede zwischen den Geschlechtern nachweisen. So zeigten die genomweit signifikant mit kognitivem Altern assoziierten Variationen rs769449-A (Index-SNP), rs2075650-G und rs11556505-T (beide *clump 1*, vertreten durch rs34342646 in TMT-A und rs769449 in TMT-B) in der Studie von Davies et al. (2014) bei weiblichen Probanden eine signifikante Assoziation zu kognitivem Altern, bei männlichen Probanden hingegen nicht. In der vorliegenden Arbeit zeigte rs769449-A bei Männern und Frauen hingegen die jeweils gleiche Assoziation zu schlechterer Testleistung im TMT-B.

Worin könnten Geschlechterunterschiede begründet sein? Die Autoren Ratnu et al. (2017) vermuten in ihrem Übersichtsartikel, dass unterschiedliche epigenetische Mechanismen, ebenso wie genomische Prägung die Genexpression beeinflussen und somit zu geschlechtsspezifisch unterschiedlichem Verhalten, Suszeptibilität gegenüber Erkrankungen und Ansprechen auf Therapien führen könnten. Des Weiteren beschreiben Mosconi et al. (2017), dass Frauen ein generell höheres Risiko für die LOAD haben als Männer, was mit hormonellen Veränderungen der Menopause zusammenhängen könnte. Claxton et al. (2013) zeigten zudem, dass sich an MCI bzw. LOAD erkrankte Frauen und Männer stark in ihrem Therapieansprechen unterscheiden. Auf eine Therapie mit intranasalem Insulin hatten APOE  $\epsilon$ 4-negative Männer eine Verbesserung und APOE  $\epsilon$ 4-negative Frauen eine Verschlechterung ihrer kognitiven Leistungen gezeigt (Claxton et al., 2013).

Welche Ursachen genau der Tatsache zugrundeliegen, dass in der vorliegenden Arbeit Frauen und Männer unterschiedliche Assoziationen zu den TMT-Ergebnissen zeigten ist unbekannt. Es könnte möglich sein, dass es genetische Unterschiede zwischen den Geschlechtern gibt, welche sich auf die Assoziation bestimmter Polymorphismen zu kognitiven Endophänotypen, wie den Ergebnissen des TMT-B, auswirken. Dies sollte bei der Erforschung möglicher Ursachen und



Therapieansätze für die Alzheimer-Behandlung beachtet werden. Außerdem sollten die Effekte noch einmal in wesentlich größeren Stichproben untersucht werden, um statistische Fehler auszuschließen.

### **4.6 Diskussion der Methoden**

#### **4.6.1 Auswahl der Probanden**

Bei den ausgewählten Probanden der Screeningstichprobe handelte es sich um 558 gesunde erwachsene Probanden der Allgemeinbevölkerung, bei den Probanden der Replikationsstichprobe um 617 gesunde Personen höheren Alters. Um eine homogene Stichprobenzusammensetzung zu ermöglichen, wurde bei der Auswahl der Probanden ein standardisiertes Schema eingehalten und es erfolgte der Ausschluss relevanter psychiatrischer Vorerkrankungen. Bei der Screeningstichprobe wurde dies durch eine telefonische Befragung, mittels eines semi-strukturierten Interviews, anhand dessen Probanden mit psychiatrisch erkrankten Verwandten ersten Grades ausgeschlossen wurden, sowie durch ein ausführliches Assessment mit dem SCID I und II (First et al., 1997a; First et al., 1997b) erreicht. Bei der Replikationsstichprobe wurde das MINI (Mini International Neuropsychiatric Interview) (Ackenheil et al., 1999) genutzt, welches psychiatrische Störungen auf Grundlage des DSM-IV und des ICD 10 erfasst. Die Teilnahme war freiwillig und nur möglich für Probanden mit voller Einwilligungs-, sowie Testfähigkeit. Ausgeschlossen wurden Probanden mit kognitiver Beeinträchtigung; bei der Screeningstichprobe anhand des Mini Mental Status Score (Folstein et al., 1975), bei der Replikationsstichprobe anhand des CERAD-Plus (Memory Clinic, 2009) und des WAIS-IV (Petermann, 2012). Abschließend erhielten alle Teilnehmer eine neurologische Untersuchung, um manifeste Beeinträchtigungen des zentralen Nervensystems auszuschließen. Bei der ausgewählten Stichprobe handelte es sich ausschließlich um Europäer (Kaukasier), wodurch eine genetisch einheitliche Stichprobe ausgewählt wurde, deren Ergebnisse untereinander vergleichbar sind. Um dies zu versichern, wurde auf Populationsstratifikation überprüft und Ausreißer wurden ausgeschlossen. Die Allelfrequenzen der vorliegenden Screeningstichprobe wurden unter Verwendung der NCBI-Webseite (NCBI, 2021c) mit denen der CEU-Stichprobe des „1000 Genomes“-Projekts (Auton et al., 2015) verglichen. Dabei handelt es sich um Stichproben des „1000 Genomes“-Projektes aus Utah (USA), die nord- und westeuropäische Vorfahren haben. Beim Vergleich der Allelfrequenzen zeigte sich durchschnittlich eine deutliche Übereinstimmung. Lediglich 9 der insgesamt 39 nominal signifikanten SNPs wichen stärker als 15 % von der Allelfrequenz der CEU-Stichprobe ab. Dies spricht, trotz der verhältnismäßig geringen Stichprobengröße von 558 Screeningprobanden, für

die Validität der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung und für die Vergleichbarkeit mit anderen kaukasischen Stichproben.

#### **4.6.2 Trail Making Test**

Der Trail Making Test wurde in der vorliegenden Studie genutzt, weil er sich zur Erfassung der allgemeinen kognitiven Funktion gut eignet. Der Hauptfokus des TMT liegt dabei auf der Verarbeitungsgeschwindigkeit und dem kognitiven Leistungsvermögen, welches durch alternierende Targets getestet wird (Reitan, 1992). Anhand des TMT als valides Instrument wurden die kognitiven Leistungen der Probanden erfasst, um sie mit den SNPs der untersuchten TOMM40-APOE-Genregion zu assoziieren. Die normierte Testdurchführung sorgte für Objektivität und Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Die Testleiter wurden geschult, entsprechend dem Original-Manual vorzugehen und zeitraubende Erläuterungen zu unterlassen. Es erfolgte kein Ausschluss von Probanden anhand der im Manual vorgeschlagenen Cut-Off-Werte, weil die kognitive Leistung im Kontinuum betrachtet werden sollte und auch schlechtere Ergebnisse für die vorliegende Studie relevant waren. Für noch präzisere Testergebnisse könnte es nützlich sein, zusätzlich zum Zeitscore die Fehler zu notieren. So erarbeiteten Correia et al. (2015) eine Formel, die die Anzahl und Art der Fehler sowie die zeitliche Effizienz einbezieht, um zwischen guter, etwas zu langsamer und sehr schlechter Leistung unterscheiden zu können. Dies ist jedoch im Original-Manual nicht vorgesehen und in der vorliegenden Studie daher nicht erfolgt.

Zur spezifischeren Testung exekutiver Einzelfunktionen und noch präziseren Definition kognitiver Endophänotypen könnten andere Instrumente angewendet werden als der TMT, welcher die kognitive Gesamtleistung misst. Schubert et al. (2019) nutzten z. B. mathematische Kognitionsmodelle und chronometrische Analysen der neuronalen Verarbeitung, um die einzelnen Phasen der Informationsverarbeitung, insbesondere der Verarbeitungsgeschwindigkeit zu erfassen. Sie schlagen vor, dass sich mit dieser Methode komplexe kognitive Prozesse in ihre Einzelprozesse auftrennen lassen. In der vorliegenden Studie lag der Fokus auf der kognitiven Gesamtleistung in Assoziation zum TOMM40-Gen, Einzelfunktionen wurden nicht untersucht. Weiterhin wurde der TMT ausgewählt, da er valide sowie schnell und einfach durchführbar ist.

#### 4.6.3. Qualitätskontrolle der Daten

Es erfolgte eine strenge Qualitätskontrolle der Genotypisierungsdaten. Über Testung von Markersets wurden Probanden, welche die Schwellenwerte für MAF, SNP *call rate*, Probanden *call rate* und HWE nicht erreichten, ausgeschlossen. Ebenso ausgeschlossen wurden Probanden, welche unbekannte Verwandtschaft oder Populationsstratifikation aufwiesen oder von der Heterozygotenfrequenz abwichen. Dasselbe galt für Probanden mit nicht übereinstimmenden Duplikaten oder Geschlechtern sowie abweichender Ethnizität. Diese Qualitätskontrolle sorgte für valide Genotyp- und Phänotypdaten für die Assoziationsanalyse. Es wurde für Bildungsgrad, Alter, Geschlecht und die Kovariable des APOE  $\epsilon$ 4-Allels mittels linearer Regression adjustiert. Um LD-unabhängige Regionen zu erhalten, wurde jeweils für die Ergebnisse des TMT-A und des TMT-B „geclumpt“.

Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt. Um zu prüfen, ob die Ergebnisse multiplem Testen standhielten, wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert für die 2 kognitiven Tests berechnet:  $p < 0,0025$ . Die Ergebnisse nach Bonferroni zu korrigieren, um falsch-positive Resultate auszuschließen, ist für GWAS in der Regel zu konservativ (Zhang und Liu, 2011). Es schließt zu viele richtig-positive Ergebnisse aus. Dennoch überstanden 2 SNPs (rs769449 und rs76692773) der vorliegenden Arbeit das konservative Signifikanzniveau nach Bonferroni und blieben somit auch nach multiplem Testen signifikant mit den Ergebnissen des TMT-B assoziiert. Weiterhin wurden die signifikanten Ergebnisse an einer Replikationsstichprobe aus gesunden Probanden überprüft, was die Aussagekraft der Ergebnisse zusätzlich steigert.

#### 4.7 Fazit

Der Ursachenforschung der Alzheimer-Demenz ist in den letzten Jahrzehnten enorme Bedeutung zugekommen, da mit steigender Lebenserwartung auch die Zahl der Betroffenen stetig wächst. Eine Vielzahl genomweiter Assoziationsstudien hat sich mit der genetischen Komponente dieser komplexen Erkrankung beschäftigt. Dabei wurde die „*Translocase of outer mitochondrial membrane 40*“ (TOMM40)-Apolipoprotein E (APOE)-Genregion mehrfach als mit der spät beginnenden Alzheimer-Demenz sowie kognitiver Leistungsfähigkeit assoziiert.

Im Rahmen dieser Studie wurde an einer Screeningstichprobe von gesunden Probanden die kognitive Leistungsfähigkeit mit Hilfe des Trail-Making-Tests (TMT) gemessen. Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die untersuchten genetischen Variationen der TOMM40-APOE-Genregion mit kognitiver Leistung gesunder Erwachsener assoziiert werden konnten. Die

## Diskussion

Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen dagegen, dass TOMM40 spezifisch für die Late-onset Alzheimer-Demenz ist, da sich die Assoziationen bei gesunden Probanden gezeigt haben. Natürlich ist nicht auszuschließen, dass diese Probanden in der Zukunft noch an LOAD erkranken, andererseits wurden nur Probanden mit negativer LOAD-Familienanamnese eingeschlossen, was die Wahrscheinlichkeit für ein späteres Auftreten einer eigenen LOAD stark verkleinert. Somit ist es möglich, dass der gefundene Zusammenhang zwischen der TOMM40-Region und Kognition gemessen mittels TMT auf einen neurobiologisch generelleren Mechanismus zurückzuführen ist, der sich nicht nur auf die LOAD begrenzt. Inwiefern diese Ergebnisse jedoch auf die Late-onset Alzheimer-Demenz übertragbar sind und ob solch ein genereller neurobiologischer Zusammenhang zwischen der Genregion und Kognition besteht, muss in zukünftigen Studien geprüft werden.

## Literaturverzeichnis

- Abraham, R., Moskvina, V., Sims, R., Hollingworth, P., Morgan, A., Georgieva, L., Dowzell, K., Cichon, S., Hillmer, A. M., O'Donovan, M. C., Williams, J., Owen, M. J. und Kirov, G.: A genome-wide association study for late-onset Alzheimer's disease using DNA pooling. *BMC medical genomics* 1, 2008, 44. DOI: 10.1186/1755-8794-1-44.
- Abramowicz, A. und Gos, M.: Splicing mutations in human genetic disorders: Examples, detection, and confirmation. *Journal of applied genetics* 60 (2), 2019, 231. DOI: 10.1007/s13353-018-0444-7.
- Ackenheil, M., Stotz, G., Dietz-Bauer, R. und Vossen, A.: Deutsche Fassung des Mini-International Neuropsychiatric Interview, München, 1999.
- Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Robin, M.-A. und Avadhani, N. G.: Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *The Journal of cell biology* 161 (1), 2003, 41–54. DOI: 10.1083/jcb.200207030.
- applied biosystems®: TaqMan® SNP genotyping assays: TaqMan® predesigned SNP genotyping assays, TaqMan® custom SNP genotyping assays, and TaqMan® drug metabolism enzyme genotyping assays, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 USA, 2014.
- Armstrong, R. A.: Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia neuropathologica* 57 (2), 2019, 87–105. DOI: 10.5114/fn.2019.85929.
- Arnold M., Raffler J., Pfeufer A., Suhre K. und and Kastenmüller G.: SNIIPA: an interactive, genetic variant-centered annotation browser. *Bioinformatics*, 2014.
- Arpawong, T. E., Pendleton, N., Mekli, K., McArdle, J. J., Gatz, M., Armoskus, C., Knowles, J. A. und Prescott, C. A.: Genetic variants specific to aging-related verbal memory: Insights from GWASs in a population-based cohort. *PLoS one* 12 (8), 2017, 1-27. DOI: 10.1371/journal.pone.0182448.
- Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., Korbel, J. O., Marchini, J. L., McCarthy, S., McVean, G. A. und Abecasis, G. R.: A global reference for human genetic variation. *Nature* 526 (7571), 2015, 68–74. DOI: 10.1038/nature15393.
- Bao, J., Wang, X. und Mao, Z.: Associations between genetic variants in 19p13 and 19q13 regions and susceptibility to Alzheimer Disease: A meta-analysis. *Medical Science Monitor* 22, 2016, 234–243. DOI: 10.12659/MSM.895622.
- Barnes, J., Bartlett, J. W., Wolk, D. A., van der Flier, W. M. und Frost, C.: Disease course varies according to age and symptom length in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease JAD* 64 (2), 2018, 631–642. DOI: 10.3233/JAD-170841.
- Bausewein, T., Mills, D. J., Langer, J. D., Nitschke, B., Nussberger, S. und Kühlbrandt, W.: Cryo-EM structure of the TOM core complex from *Neurospora crassa*. *Cell* 170 (4), 2017, 693–700. DOI: 10.1016/j.cell.2017.07.012.
- Belleville, S., Clément, F., Mellah, S., Gilbert, B., Fontaine, F. und Gauthier, S.: Training-related brain plasticity in subjects at risk of developing Alzheimer's disease. *Brain a journal of neurology*, 2011, 1623–1634. DOI: 10.1093/brain/awr037.
- Bintener, C., Miller, O. und Georges, J.: Dementia in Europe Yearbook 2019: Estimating the prevalence of dementia in Europe, 2019.
- Blacker, D., Lee, H., Muzikansky, A., Martin, E. C., Tanzi, R., McArdle, J. J., Moss, M. und Albert, M.: Neuropsychological measures in normal individuals that predict subsequent cognitive decline. *Archives of neurology* 64 (6), 2007, 862–871. DOI: 10.1001/archneur.64.6.862.

- Bramon, E., Pirinen, M., Strange, A., Lin, K., Freeman, C., Bellenguez, C., Su, Z., Band, G., Pearson, R., Vukcevic, D., Langford, C., Deloukas, P., Hunt, S., Gray, E., Dronov, S., Potter, S. C., Tashakkori-Ghanbaria, A., Edkins, S., Bumpstead, S. J., Arranz, M. J., Bakker, S., Bender, S., Bruggeman, R., Cahn, W., Chandler, D., Collier, D. A., Crespo-Facorro, B., Dazzan, P., Haan, L. de, Di Forti, M., Dragović, M., Giegling, I., Hall, J., Iyegbe, C., Jablensky, A., Kahn, R. S., Kalaydjieva, L., Kravariti, E., Lawrie, S., Linszen, D. H., Mata, I., McDonald, C., McIntosh, A., Myin-Germeys, I., Ophoff, R. A., Pariante, C. M., Paunio, T., Picchioni, M., Ripke, S., Rujescu, D., Sauer, H., Shaikh, M., Sussmann, J., Suvisaari, J., Tosato, S., Touloupoulou, T., van Os, J., Walshe, M., Weisbrod, M., Whalley, H., Wiersma, D., Blackwell, J. M., Brown, M. A., Casas, J. P., Corvin, A., Duncanson, A., Jankowski, J. A. Z., Markus, H. S., Mathew, C. G., Palmer, C. N. A., Plomin, R., Rautanen, A., Sawcer, S. J., Trembath, R. C., Wood, N. W., Barroso, I., Peltonen, L., Lewis, C. M., Murray, R. M., Donnelly, P., Powell, J. und Spencer, C. C. A.: A genome-wide association analysis of a broad psychosis phenotype identifies three loci for further investigation. *Biological psychiatry* 75 (5), 2014, 386–397. DOI: 10.1016/j.biopsych.2013.03.033.
- Brandt, J., Aretouli, E., Neijstrom, E., Samek, J., Manning, K., Albert, M. S. und Bandeen-Roche, K.: Selectivity of executive function deficits in mild cognitive impairment. *Neuropsychology* 23 (5), 2009, 607–618. DOI: 10.1037/a0015851.
- Brown, R. E.: Hebb and Cattell: The Genesis of the Theory of Fluid and Crystallized Intelligence. *Frontiers in human neuroscience* 10, 2016, 606. DOI: 10.3389/fnhum.2016.00606.
- Cano-Gamez, E. und Trynka, G.: From GWAS to Function: Using Functional Genomics to Identify the Mechanisms Underlying Complex Diseases. *Frontiers in genetics* 11, 2020, 424. DOI: 10.3389/fgene.2020.00424.
- Cha, M.-Y., Han, S.-H., Son, S. M., Hong, H.-S., Choi, Y.-J., Byun, J. und Mook-Jung, I.: Mitochondria-specific accumulation of amyloid  $\beta$  induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. *PloS one* 7 (4), 2012, 1-11. DOI: 10.1371/journal.pone.0034929.
- Chang, C. C., Chow, C. C., Tellier, L. C., Vattikuti, S., Purcell, S. M. und Lee, J. J.: Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience* 4, 2015, 7. DOI: 10.1186/s13742-015-0047-8.
- Chiara, M., Primon, I., Tarantini, L., Agnelli, L., Brancaleoni, V., Granata, F., Bollati, V. und Di Pierro, E.: Targeted resequencing of FECH locus reveals that a novel deep intronic pathogenic variant and eQTLs may cause erythropoietic protoporphyria (EPP) through a methylation-dependent mechanism. *Genetics in medicine official journal of the American College of Medical Genetics* 22 (1), 2020, 35–43. DOI: 10.1038/s41436-019-0584-0.
- Clark, L. R., Racine, A. M., Kosciak, R. L., Okonkwo, O. C., Engelman, C. D., Carlsson, C. M., Asthana, S., Bendlin, B. B., Chappell, R., Nicholas, C. R., Rowley, H. A., Oh, J. M., Hermann, B. P., Sager, M. A., Christian, B. T. und Johnson, S. C.: Beta-amyloid and cognitive decline in late middle age: Findings from the Wisconsin Registry for Alzheimer's Prevention study. *Alzheimer's & dementia the journal of the Alzheimer's Association* 12, 2016, 805–814. DOI: 10.1016/j.jalz.2015.12.009.
- Clark, L. R., Schiehser, D. M., Weissberger, G. H., Salmon, D. P., Delis, D. C. und Bondi, M. W.: Specific measures of executive function predict cognitive decline in older adults. *Journal of the International Neuropsychological Society JINS* 18 (1), 2012, 118–127. DOI: 10.1017/S1355617711001524.
- Claxton, A., Baker, L. D., Wilkinson, C. W., Trittschuh, E. H., Chapman, D., Watson, G. S., Cholerton, B., Plymate, S. R., Arbuckle, M. und Craft, S.: Sex and ApoE genotype differences in treatment response to two doses of intranasal insulin in adults with mild cognitive

- impairment or Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 35 (4), 2013, 789–797. DOI: 10.3233/JAD-122308.
- Collette, F., van der Linden, M. und Salmon, E.: Executive Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Cortex* 35, 1999, 57–72. DOI: 10.1016/S0010-9452(08)70785-8.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Rimmler, J. B., Locke, P. A., Conneally, P. M., Schmechel, K. E., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L. und Pericak-Vance, M. A.: Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature genetics* 7 (7 // 2), 1994, 180–184. DOI: 10.1038/ng0694-180.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L. und Pericak-Vance, M. A.: Gene dose of Apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261 (261 // 5123), 1993, 921–923. DOI: 10.1126/science.8346443.
- Cornelis, E., Gorus, E., van Schelvergem, N. und Vriendt, P. de: The relationship between basic, instrumental, and advanced activities of daily living and executive functioning in geriatric patients with neurocognitive disorders. *International journal of geriatric psychiatry* 34 (6), 2019, 889–899. DOI: 10.1002/gps.5087.
- Correia, S., Ahern, D. C., Rabinowitz, A. R., Farrer, T. J., Smith Watts, A. K., Salloway, S., Malloy, P. F. und Deoni, S. C. L.: Lowering the Floor on Trail Making Test Part B: Psychometric Evidence for a New Scoring Metric. *Archives of clinical neuropsychology the official journal of the National Academy of Neuropsychologists* 30, 2015, 643–656. DOI: 10.1093/arclin/acv040.
- Crane, P. K., Trittschuh, E., Mukherjee, S., Saykin, A. J., Sanders, R. E., Larson, E. B., McCurry, S. M., McCormick, W., Bowen, J. D., Grabowski, T., Moore, M., Bauman, J., Gross, A. L., Keene, C. D., Bird, T. D., Gibbons, L. E. und Mez, J.: Incidence of cognitively defined late-onset Alzheimer's dementia subgroups from a prospective cohort study. *Alzheimer's & dementia the journal of the Alzheimer's Association* 13 (12), 2017, 1307–1316. DOI: 10.1016/j.jalz.2017.04.011.
- Cruchaga, C., Kauwe, J. S. K., Harari, O., Jin, S. C., Cai, Y., Karch, C. M., Benitez, B. A., Jeng, A. T., Skorupa, T., Carrell, D., Bertelsen, S., Bailey, M., McKean, D., Shulman, J. M., De Jager, P. L., Chibnik, L., Bennett, D. A., Arnold, S. E., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Williams, J., van Deerlin, V. M., Lee, V. M.-Y., Shaw, L. M., Trojanowski, J. Q., Haines, J. L., Mayeux, R., Pericak-Vance, M. A., Farrer, L. A., Schellenberg, G. D., Peskind, E. R., Galasko, D., Fagan, A. M., Holtzman, D. M., Morris, J. C. und Goate, A. M.: GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for Alzheimer's disease. *Neuron* 78, 2013, 256–268. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.02.026.
- Cummings, J. L., Tong, G. und Ballard, C.: Treatment combinations for Alzheimer's Disease: Current and future pharmacotherapy options. *Journal of Alzheimer's disease JAD* 67 (3), 2019, 779–794. DOI: 10.3233/JAD-180766.
- Davies, G., Harris, S. E., Reynolds, C. A., Payton, A., Knight, H. M., Liewald, D. C., Lopez, L. M., Luciano, M., Gow, A. J., Corley, J., Henderson, R., Murray, C., Pattie, A., Fox, H. C., Redmond, P., Lutz, M. W., Chiba-Falek, O., Linnertz, C., Saith, S., Haggarty, P., McNeill, G., Ke, X., Ollier, W., Horan, M., Roses, A. D., Ponting, C. P., Porteous, D. J., Tenesa, A., Pickles, A., Starr, J. M., Whalley, L. J., Pedersen, N. L., Pendleton, N., Visscher, P. M. und Deary, I. J.: A genome-wide association study implicates the APOE locus in nonpathological cognitive ageing. *Molecular psychiatry* 19, 2014, 76–87. DOI: 10.1038/mp.2012.159.
- Davis, M., O'Connell, T., Johnson, S., Cline, S., Merikle, E., Martenyi, F. und Simpson, K. N.: Estimating Alzheimer's disease progression rates from normal cognition through mild

- cognitive impairment and stages of dementia. *Current Alzheimer research*, 2018, E-pub ahead of print. DOI: 10.2174/1567205015666180119092427.
- De Jager, P. L., Shulman, J. M., Chibnik, L. B., Keenan, B. T., Raj, T., Wilson, R. S., Yu, L., Leurgans, S. E., Tran, D., Aubin, C., Anderson, C. D., Biffi, A., Corneveaux, J. J., Huentelman, M. J., Rosand, J., Daly, M. J., Myers, A. J., Reiman, E. M., Bennett, D. A. und Evans, D. A.: A genome-wide scan for common variants affecting the rate of age-related cognitive decline. *Neurobiology of aging* 33 (5), 2012, 1-26. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.033.
- Delaneau, O., Marchini, J. und Zagury, J.-F.: A linear complexity phasing method for thousands of genomes. *Nature methods* 9 (2), 2012, 179–181. DOI: 10.1038/nmeth.1785.
- Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.: Demenz im jüngeren Lebensalter: Selbsthilfe Demenz, 2020a.
- Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.: Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen: Selbsthilfe Demenz. Informationsblatt 1, 2020b.
- Dolci, G. A. M., Damanti, S., Scortichini, V., Galli, A., Rossi, P. D., Abbate, C., Arosio, B., Mari, D., Arighi, A., Fumagalli, G. G., Scarpini, E., Inglese, S. und Marcucci, M.: Alzheimer's disease diagnosis discrepancy between clinical, neuroimaging, and cerebrospinal fluid biomarkers criteria in an Italian cohort of geriatric outpatients: A retrospective cross-sectional study. *Frontiers in medicine* 4, 2017, 1–10. DOI: 10.3389/fmed.2017.00203.
- Drago A., Giegling I., Schäfer M., Hartmann A. M., Konte B., Friedl M., Serretti A. und Rujescu D.: Genome-wide association study supports the role of the immunological system and of the neurodevelopmental processes in response to haloperidol treatment. *Pharmacogenetics and genomics* 24 (6), 2014, 314–319.
- Du, L., Liu, K., Zhu, L., Yao, X., Risacher, S. L., Guo, L., Saykin, A. J. und Shen, L.: Identifying progressive imaging genetic patterns via multi-task sparse canonical correlation analysis: a longitudinal study of the ADNI cohort. *Bioinformatics (Oxford, England)* 35 (14), 2019, i474-i483. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz320.
- Emsaki, G., NeshatDoost, H. T., Tavakoli, M. und Barekatin, M.: Memory specificity training can improve working and prospective memory in amnesic mild cognitive impairment. *Dementia & neuropsychologia* 11 (3), 2017, 255–261. DOI: 10.1590/1980-57642016dn11-030007.
- Ertekin-Taner, N., De Jager, P. L., Yu, L. und Bennett, D. A.: Alternative approaches in gene discovery and characterization in Alzheimer's Disease. *Current genetic medicine reports* (1), 2013, 39–51. DOI: 10.1007/s40142-013-0007-5.
- Esler, W. P. und Wolfe, M. S.: A portrait of Alzheimer secretases: new features and familiar faces. *Science (New York, N.Y.)* 293 (5534), 2001, 1449–1454. DOI: 10.1126/science.1064638.
- Fernández-Cabello, S., Kronbichler, M., van Dijk, K. R. A., Goodman, J. A., Spreng, R. N. und Schmitz, T. W.: Basal forebrain volume reliably predicts the cortical spread of Alzheimer's degeneration. *Brain a journal of neurology* 143 (3), 2020, 993–1009. DOI: 10.1093/brain/awaa012.
- Ferrari, R., Wang, Y., Vandrovцова, J., Guelfi, S., Witeolar, A., Karch, C. M., Schork, A. J., Fan, C. C., Brewer, J. B., Momeni, P., Schellenberg, G. D., Dillon, W. P., Sugrue, L. P., Hess, C. P., Yokoyama, J. S., Bonham, L. W., Rabinovici, G. D., Miller, B. L., Andreassen, O. A., Dale, A. M., Hardy, J. und Desikan, R. S.: Genetic architecture of sporadic frontotemporal dementia and overlap with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 88 (2), 2017, 152–164. DOI: 10.1136/jnnp-2016-314411.
- Fine, E. M., Delis, D. C., Wetter, S. R., Jacobson, M. W., Jak, A. J., McDonald, C. R., Braga, J. C., Thal, L. J., Salmon, D. P. und Bondi, M. W.: Cognitive discrepancies versus APOE genotype



- as predictors of cognitive decline in normal-functioning elderly individuals: A longitudinal study. *The American journal of geriatric psychiatry official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 16 (5), 2008, 366–374. DOI: 10.1097/JGP.0b013e3181629957.
- First, M. B., Spitzer, R. L., Gibbon, M. und Williams, J. B.: *Structured clinical interview for DSM-IV AXIS I disorders: SCID-I*. Biometrics Research Department, New York, 1997a.
- First, M. B., Williams, J. B. und Gibbon, M.: *User's guide for the structured clinical interview for DSM-IV axis II personality disorders: SCID-II*. American Psychiatric Publ, Arlington, Va, 1997b.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E. und McHugh, P. R.: Mini-mental state. *Journal of Psychiatric Research* 12 (3), 1975, 189–198. DOI: 10.1016/0022-3956(75)90026-6.
- Fransquet, P. D., Lacaze, P., Saffery, R., Phung, J., Parker, E., Shah, R. C., Murray, A., Woods, R. L. und Ryan, J.: DNA methylation analysis of candidate genes associated with dementia in peripheral blood. *Epigenomics* 12 (23), 2020, 2109–2123. DOI: 10.2217/epi-2020-0236.
- Friedman, N. P., Miyake, A., Altamirano, L. J., Corley, R. P., Young, S. E., Rhea, S. A. und Hewitt, J. K.: Stability and change in executive function abilities from late adolescence to early adulthood: A longitudinal twin study. *Developmental psychology* 52 (2), 2016, 326–340. DOI: 10.1037/dev0000075.
- Friedman, N. P., Miyake, A., Young, S. E., Defries, J. C., Corley, R. P. und Hewitt, J. K.: Individual differences in executive functions are almost entirely genetic in origin. *Journal of experimental psychology: General* 137 (2), 2008, 201–225. DOI: 10.1037/0096-3445.137.2.201.
- Fuior, E.V., Gafencu, A.V.: Apolipoprotein C1: Ist Pleiotropic effects in lipid metabolism and beyond. *Int J Mol Sci.* 26;20(23), 2019, 5939.doi: 10.3390/ijms20235939. PMID: 311779116; PMCID: PMC6928722.
- Galfalvy, H., Haghighi, F., Hodgkinson, C., Goldman, D., Oquendo, M. A., Burke, A., Huang, Y.-Y., Giegling, I., Rujescu, D., Bureau, A., Turecki, G. und Mann, J. J.: A genome-wide association study of suicidal behavior. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 168 (7), 2015, 557–563. DOI: 10.1002/ajmg.b.32330.
- Gershon, E. S. und Goldin, L. R.: Clinical methods in psychiatric genetics.: I. Robustness of genetic marker investigative strategies. *Acta psychiatrica Scandinavica* 74 (2), 1986, 113–118. DOI: 10.1111/j.1600-0447.1986.tb10594.x.
- Gilsoul, J., Simon, J., Hogge, M. und Collette, F.: Do attentional capacities and processing speed mediate the effect of age on executive functioning? *Neuropsychology, development, and cognition. Section B, Aging, neuropsychology and cognition* 26 (2), 2019, 282–317. DOI: 10.1080/13825585.2018.1432746.
- Gordon, B. A., Blazey, T., Benzinger, T. L. S. und Head, D.: Effects of aging and Alzheimer's disease along the longitudinal axis of the hippocampus. *Journal of Alzheimer's disease JAD* 37 (1), 2013, 41–50. DOI: 10.3233/JAD-130011.
- Gottesman, I. I. und Gould, T. D.: The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American Journal of Psychiatry* 160 (4), 2003, 636–645. DOI: 10.1176/appi.ajp.160.4.636.
- Gottschalk, W. K., Lutz, M. W., He, Y. T., Saunders, A. M., Burns, D. K., Roses, A. D. und Chiba-Falek, O.: The broad impact of TOM40 on neurodegenerative diseases in aging. *Journal of Parkinsons Disease and Alzheimer's Disease* 1 (1), 2014, 1–25. DOI: 10.13188/2376-922X.1000003.

- Grupe, A., Abraham, R., Li, Y., Rowland, C., Hollingworth, P., Morgan, A., Jehu, L., Segurado, R., Stone, D., Schadt, E., Karnoub, M., Nowotny, P., Tacey, K., Catanese, J., Sninsky, J., Brayne, C., Rubinsztein, D., Gill, M., Lawlor, B., Lovestone, S., Holmans, P., O'Donovan, M., Morris, J. C., Thal, L., Goate, A., Owen, M. J. und Williams, J.: Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants. *Human molecular genetics* 16 (8), 2007, 865–873. DOI: 10.1093/hmg/ddm031.
- Han, Z., Huang, H., Gao, Y. und Huang, Q.: Functional annotation of Alzheimer's disease associated loci revealed by GWASs. *PloS one* 12 (6), 2017, 1-14. DOI: 10.1371/journal.pone.0179677.
- Hardy, J. und Allsop, D.: Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences* 12 (10), 1991, 383–388.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskva, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A. R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Brayne, C., Rubinsztein, D. C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Morgan, K., Brown, K. S., Passmore, P. A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Holmes, C., Mann, D., Smith, A. D., Love, S., Kehoe, P. G., 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., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frölich, L., Hampel, H., Hüll, M., Rujescu, D., Goate, A. M., Kauwe, J. S. K., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J. C., Mayo, K., Sleegers, K., Bettens, K., Engelborghs, S., Deyn, P. P. de, van Broeckhoven, C., Livingston, G., Bass, N. J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Al-Chalabi, A., Shaw, C. E., Tsolaki, M., Singleton, A. B., Guerreiro, R., Mühleisen, T. W., Nöthen, M. M., Moebus, S., Jöckel, K.-H., Klopp, N., Wichmann, H.-E., Carrasquillo, M. M., Pankratz, V. S., Younkin, S. G., Holmans, P. A., O'Donovan, M., Owen, M. J. und Williams, J.: Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics* 41 (10), 2009, 1088–1093. DOI: 10.1038/ng.440.
- Hazlett, K. E., Figueroa, C. M. und Nielson, K. A.: Executive functioning and risk for Alzheimer's disease in the cognitively intact: Family history predicts Wisconsin Card Sorting Test performance. *Neuropsychology* 29 (4), 2015, 582–591. DOI: 10.1037/neu0000181.
- Howie, B., Marchini, J. und Stephens, M.: Genotype imputation with thousands of genomes. *G3 (Bethesda, Md.)* 1 (6), 2011, 457–470. DOI: 10.1534/g3.111.001198.
- Howie, B. N., Donnelly, P. und Marchini, J.: A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS genetics* 5 (6), 2009, 1-15. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000529.
- Huang, H., Zhao, J., Xu, B., Ma, X., Dai, Q., Li, T., Xue, F. und Chen, B.: The TOMM40 gene rs2075650 polymorphism contributes to Alzheimer's disease in Caucasian and Asian populations. *Neuroscience Letters* (628), 2016, 142–146. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.05.050.
- Ilic, K., Mlinac-Jerkovic, K., Jovanov-Milosevic, N., Simic, G., Habek, N., Bogdanovic, N. und Kalanj-Bognar, S.: Hippocampal expression of cell-adhesion glycoprotein neuroplastin is altered in Alzheimer's disease. *Journal of cellular and molecular medicine* 23 (2), 2019, 1602–1607. DOI: 10.1111/jcmm.13998.
- Janssen, J. C., Beck, J. A., Campbell, T. A., Dickinson, A., Fox, N. C., Harvey, R. J., Houlden, H., Rossor, M. N. und Collinge, J.: Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. *Neurology* 60 (2), 2003, 235–239. DOI: 10.1212/01.wnl.0000042088.22694.e3.

- Jarmolowicz, A. I., Chen, H.-Y. und Panegyres, P. K.: The patterns of inheritance in early-onset dementia: Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 30 (3), 2015, 299–306. DOI: 10.1177/1533317514545825.
- Jiao, B., Liu, X., Zhou, L., Wang, M. H., Zhou, Y., Xiao, T., Zhang, W., Sun, R., Waye, M. M. Y., Tang, B. und Shen, L.: Polygenic analysis of late-onset Alzheimer's disease from mainland China. *PloS one* 10 (12), 2015, 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0144898.
- Johnson, S. C., La Rue, A., Hermann, B. P., Xu, G., Kosciak, R. L., Jonaitis, E. M., Bendlin, B. B., Hogan, K. J., Roses, A. D., Saunders, A. M., Lutz, M. W., Asthana, S., Green, R. C. und Sager, M. A.: The effect of TOMM40 poly-T length on gray matter volume and cognition in middle-aged persons with APOE  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotype. *Alzheimer's & dementia the journal of the Alzheimer's Association* 7 (4), 2011, 456–465. DOI: 10.1016/j.jalz.2010.11.012.
- Ketharnathan, S., Leask, M., Boocock, J., Phipps-Green, A. J., Antony, J., O'Sullivan, J. M., Merriman, T. R. und Horsfield, J. A.: A non-coding genetic variant maximally associated with serum urate levels is functionally linked to HNF4A-dependent PDZK1 expression. *Human Molecular Genetics* 27 (22), 2018, 3964–3973. DOI: 10.1093/hmg/ddy295.
- Klinger-König, J., Hertel, J., van der Auwera, S., Frenzel, S., Pfeiffer, L., Waldenberger, M., Golchert, J., Teumer, A., Nauck, M., Homuth, G., Völzke, H. und Grabe, H. J.: Methylation of the FKBP5 gene in association with FKBP5 genotypes, childhood maltreatment and depression. *Neuropsychopharmacology official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 44 (5), 2019, 930–938. DOI: 10.1038/s41386-019-0319-6.
- Krollner, B. und Krollner, D. M.: ICD-Code: Demenz bei Alzheimer-Krankheit. ICD-10-GM-2021. Online im Internet: [http://www.icd-code.de/icd/code/F00.-\\*.html](http://www.icd-code.de/icd/code/F00.-*.html) in der Version vom 20.12.2021.
- Kukull, W. A., Higdon, R., Bowen, J. D., McCormick, W. C., Teri, L., Schellenberg, G. D., van Belle, G., Jolley, L. und Larson, E. B.: Dementia and Alzheimer Disease Incidence: A Prospective Cohort Study. *Archives of Neurology* 59, 2002, 1737–1746.
- Kvello-Alme, M., Bråthen, G., White, L. R. und Sando, S. B.: The prevalence and subtypes of young onset dementia in central norway: A Population-Based Study. *Journal of Alzheimer's disease JAD* 69 (2), 2019, 479–487. DOI: 10.3233/JAD-181223.
- La Joie, R., Visani, A. V., Baker, S. L., Brown, J. A., Bourakova, V., Cha, J., Chaudhary, K., Edwards, L., Iaccarino, L., Janabi, M., Lesman-Segev, O. H., Miller, Z. A., Perry, D. C., O'Neil, J. P., Pham, J., Rojas, J. C., Rosen, H. J., Seeley, W. W., Tsai, R. M., Miller, B. L., Jagust, W. J. und Rabinovici, G. D.: Prospective longitudinal atrophy in Alzheimer's disease correlates with the intensity and topography of baseline tau-PET. *Science translational medicine* 12 (524), 2020. DOI: 10.1126/scitranslmed.aau5732.
- Lencz, T., Knowles, E., Davies, G., Guha, S., Liewald, D. C., Starr, J. M., Djurovic, S., Melle, I., Sundet, K., Christoforou, A., Reinvang, I., Mukherjee, S., DeRosse, P., Lundervold, A., Steen, V. M., John, M., Espeseth, T., Rääkkönen, K., Widen, E., Palotie, A., Eriksson, J. G., Giegling, I., Konte, B., Ikeda, M., Roussos, P., Giakoumaki, S., Burdick, K. E., Payton, A., Ollier, W., Horan, M., Donohoe, G., Morris, D., Corvin, A., Gill, M., Pendleton, N., Iwata, N., Darvasi, A., Bitsios, P., Rujescu, D., Lahti, J., Hellard, S. L., Keller, M. C., Andreassen, O. A., Deary, I. J., Glahn, D. C. und Malhotra, A. K.: Molecular genetic evidence for overlap between general cognitive ability and risk for schizophrenia: A report from the cognitive genomics consortium (cogent). *Molecular psychiatry* 19 (2), 2014, 168–174. DOI: 10.1038/mp.2013.166.

- Liu, J., Zhao, W., Ware, E. B., Turner, S. T., Mosley, T. H. und Smith, J. A.: DNA methylation in the APOE genomic region is associated with cognitive function in African Americans. *BMC medical genomics* 11 (1), 2018, 1–13. DOI: 10.1186/s12920-018-0363-9.
- Lyall, D. M., Celis-Morales, C., Lyall, L. M., Graham, C., Graham, N., Mackay, D. F., Strawbridge, R. J., Ward, J., Gill, J. M. R., Sattar, N., Cavanagh, J., Smith, D. J. und Pell, J. P.: Assessing for interaction between APOE  $\epsilon$ 4, sex, and lifestyle on cognitive abilities. *Neurology* 92 (23), 2019, 1-15. DOI: 10.1212/WNL.0000000000007551.
- Ma, X.-Y., Yu, J.-T., Wang, W., Wang, H.-F., Liu, Q.-Y., Zhang, W. und Tan, L.: Association of TOMM40 polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population. *Neuromolecular medicine* 15 (2), 2013, 279–287. DOI: 10.1007/s12017-012-8217-7.
- MacPherson, S. E., Cox, S. R., Dickie, D. A., Karama, S., Starr, J. M., Evans, A. C., Bastin, M. E., Wardlaw, J. M. und Deary, I. J.: Processing speed and the relationship between Trail Making Test-B performance, cortical thinning and white matter microstructure in older adults. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior* 95, 2017, 92–103. DOI: 10.1016/j.cortex.2017.07.021.
- Marais, AD.: Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* 51(2), 2019, 165-176.doi:10.1016/j.pathol.2018.11.002. Epub 2018 Dec 28. PMID: 30598326.
- Marioni, R. E., Harris, S. E., Zhang, Q., McRae, A. F., Hagenaars, S. P., Hill, W. D., Davies, G., Ritchie, C. W., Gale, C. R., Starr, J. M., Goate, A. M., Porteous, D. J., Yang, J., Evans, K. L., Deary, I. J., Wray, N. R. und Visscher, P. M.: GWAS on family history of Alzheimer's disease. *Translational psychiatry* 8 (1), 2018, 99. DOI: 10.1038/s41398-018-0150-6.
- Martin, J. S., Halvorsen, M., Davis-Neulander, L., Ritz, J., Gopinath, C., Bearegard, A. und Laederach, A.: Structural effects of linkage disequilibrium on the transcriptome. *RNA (New York, N.Y.)* 18 (1), 2012, 77–87. DOI: 10.1261/rna.029900.111.
- Maurano, M. T., Humbert, R., Rynes, E., Thurman, R. E., Haugen, E., Wang, H., Reynolds, A. P., Sandstrom, R., Qu, H., Brody, J., Shafer, A., Neri, F., Lee, K., Kutayavin, T., Stehling-Sun, S., Johnson, A. K., Canfield, T. K., Giste, E., Diegel, M., Bates, D., Hansen, R. S., Neph, S., Sabo, P. J., Heimfeld, S., Raubitschek, A., Ziegler, S., Cotsapas, C., Sotoodehnia, N., Glass, I., Sunyaev, S. R., Kaul, R. und Stamatoyannopoulos, J. A.: Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science (New York, N.Y.)* 337 (6099), 2012, 1190–1195. DOI: 10.1126/science.1222794.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. und Stadlan, E. M.: Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34 (7), 1984, 939–945. DOI: 10.1212/WNL.34.7.939.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S. und Phelps, C. H.: The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia the journal of the Alzheimer's Association* 7 (3), 2011, 263–269. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- Mehder, R. H., Bennett, B. M. und Andrew, R. D.: Morphometric Analysis of Hippocampal and Neocortical Pyramidal Neurons in a Mouse Model of Late Onset Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease JAD* 74 (4), 2020, 1069–1083. DOI: 10.3233/JAD-191067.

- Memory Clinic: Die Neurologische Testbatterie: CERAD PLUS. Online im Internet:  
<https://www.memoryclinic.ch/de/main-navigation/neuropsychologen/cerad-plus/> in der Version vom 17.01.2022.
- Mez, J., Mukherjee, S., Thornton, T., Fardo, D. W., Trittschuh, E., Sutti, S., Sherva, R., Kauwe, J. S., Naj, A. C., Beecham, G. W., Gross, A., Saykin, A. J., Green, R. C. und Crane, P. K.: The executive prominent/memory prominent spectrum in Alzheimer's disease is highly heritable. *Neurobiology of aging* 41, 2016, 115–121. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.015.
- Mise, A., Yoshino, Y., Yamazaki, K., Ozaki, Y., Sao, T., Yoshida, T., Mori, T., Mori, Y., Ochi, S., Iga, J.-I. und Ueno, S.-I.: TOMM40 and APOE Gene Expression and Cognitive Decline in Japanese Alzheimer's Disease Subjects. *Journal of Alzheimer's disease JAD* 60 (3), 2017, 1107–1117. DOI: 10.3233/JAD-170361.
- Mishra, R. und Li, B.: The application of artificial intelligence in the genetic study of Alzheimer's Disease. *Aging and Disease* 11 (6), 2020, 1567–1584. DOI: 10.14336/AD.2020.0312.
- Miyake, A., Friedman, N. P., Emerson, M. J., Witzki, A. H., Howerter, A. und Wager, T. D.: The unity and diversity of executive functions and their contributions to complex "Frontal Lobe" tasks: A latent variable analysis. *Cognitive psychology* 41, 2000, 49–100. DOI: 10.1006/cogp.1999.0734.
- Molfetta, R., Milito, N.D., Zitti, B., Lecce, M., Fionda, C., Cippitelli, M., Santoni, A., Paolini, R.: The ubiquitin-proteasome pathway regulates Nectin2/CD112 expression and impairs NK cell recognition and killing. *Eur. J. Immunol.*, 49, 2019, 873-883.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201847848>.
- Morris, J. K., Vidoni, E. D., Johnson, D. K., van Sciver, A., Mahnken, J. D., Honea, R. A., Wilkins, H. M., Brooks, W. M., Billinger, S. A., Swerdlow, R. H. und Burns, J. M.: Aerobic exercise for Alzheimer's disease: A randomized controlled pilot trial. *PLoS one* 12 (2), 2017, 1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0170547.
- Mosconi, L., Berti, V., Quinn, C., McHugh, P., Petrongolo, G., Varsavsky, I., Osorio, R. S., Pupi, A., Vallabhajosula, S., Isaacson, R. S., Leon, M. J. de und Brinton, R. D.: Sex differences in Alzheimer risk: Brain imaging of endocrine vs chronologic aging. *Neurology* 89 (13), 2017, 1382–1390. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004425.
- NCBI 2020b: dbSNP: rs71352238. Online im Internet:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs71352238> in der Version vom 24.02.2021.
- NCBI 2021c: dbSNP: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/RefSNP\\_about/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/RefSNP_about/) in der Version vom 24.02.2021.
- NCBI 2020a: dbSNP: rs76692773 in der Version vom 16.01.2022.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs76692773>
- NCBI 2020c: dbSNP (rs11556505): rs11556505. Online im Internet:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11556505> in der Version vom 24.02.2021.
- NCBI 2021a: APOE: Apolipoprotein E. Homo sapiens. Online im Internet:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/348> in der Version vom 10.02.2021.
- NCBI 2021b: tomm40: Translocase of outer mitochondrial membrane 40 [homo sapiens (human)]. Online im Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10452> in der Version vom 10.02.2021.
- NCBI 2022a: NECTIN2: nectin cell adhesion molecule 2. homo sapiens. Online im Internet:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5819> in der Version vom 16.01.2022.
- NCBI 2022b: APOC1: apolipoprotein C1. Online im Internet:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/341> in der Version vom 16.01.2022.

NCBI -Variation viewer. Online im Internet:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q=CFH> in der Version vom 02.03.2021.

Need, A. C., Ge, D., Weale, M. E., Maia, J., Feng, S., Heinzen, E. L., Shianna, K. V., Yoon, W., Kasperaviciute, D., Gennarelli, M., Strittmatter, W. J., Bonvicini, C., Rossi, G., Jayathilake, K., Cola, P. A., McEvoy, J. P., Keefe, R. S. E., Fisher, E. M. C., St Jean, P. L., Giegling, I., Hartmann, A. M., Möller, H.-J., Ruppert, A., Fraser, G., Crombie, C., Middleton, L. T., St Clair, D., Roses, A. D., Muglia, P., Francks, C., Rujescu, D., Meltzer, H. Y. und Goldstein, D. B.: A genome-wide investigation of snps and cnvs in schizophrenia. *PLoS genetics* 5 (2), 2009, 1-19. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000373.

Nolan, J. M., Mulcahy, R., Power, R., Moran, R. und Howard, A. N.: Nutritional intervention to prevent Alzheimer's Disease: Potential benefits of xanthophyll carotenoids and omega-3 fatty acids combined. *Journal of Alzheimer's Disease* 64 (2), 2018, 367–378. DOI: 10.3233/JAD-180160.

O'Donoghue, M. C., Murphy, S. E., Zamboni, G., Nobre, A. C. und Mackay, C. E.: APOE genotype and cognition in healthy individuals at risk of Alzheimer's disease: A review. *Cortex* 104, 2018, 103–123. DOI: 10.1016/j.cortex.2018.03.025.

Petermann, F.: Wechsler Adult Intelligence Scale-fourth edition (WAIS-IV): Grundlagen, Testauswertung und Interpretation. Online im Internet: <https://www.testzentrale.de/shop/wechsler-adult-intelligence-scale-fourth-edition.html> in der Version vom 17.01.2022.

Podewils, L. J., Guallar, E., Kuller, L. H., Fried, L. P., Lopez, O. L., Carlson, M. und Lyketsos, C. G.: Physical activity, APOE genotype, and dementia risk: findings from the Cardiovascular Health Cognition Study. *American journal of epidemiology* 161 (7), 2005, 639–651. DOI: 10.1093/aje/kwi092.

Porcellini, E., Carbone, I., Ianni, M. und Licastro, F.: Alzheimer's disease gene signature says: beware of brain viral infections. *Immunity & ageing I & A* 7, 2010, 1–5. DOI: 10.1186/1742-4933-7-16.

Potkin, S. G., Guffanti, G., Lakatos, A., Turner, J. A., Kruggel, F., Fallon, J. H., Saykin, A. J., Orro, A., Lupoli, S., Salvi, E., Weiner, M. und Macciardi, F.: Hippocampal atrophy as a quantitative trait in a genome-wide association study identifying novel susceptibility genes for Alzheimer's disease. *PloS one* 4 (8), 2009, 1-15. DOI: 10.1371/journal.pone.0006501.

Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A. und Reich, D.: Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature genetics* 38 (8), 2006, 904–909. DOI: 10.1038/ng1847.

Priebe, L., Degenhardt, F., Strohmaier, J., Breuer, R., Herms, S., Witt, S. H., Hoffmann, P., Kulbida, R., Mattheisen, M., Moebus, S., Meyer-Lindenberg, A., Walter, H., Mössner, R., Nenadic, I., Sauer, H., Rujescu, D., Maier, W., Rietschel, M., Nöthen, M. M. und Cichon, S.: Copy number variants in German patients with schizophrenia. *PloS one* 8 (7), 2013, 1-5. DOI: 10.1371/journal.pone.0064035.

Qiagen: QIAamp: DNA blood midi/maxi handbook, Hilden, 2005.

Qiagen: What is the composition of buffer AE? Online im Internet: <https://www.qiagen.com/at/resources/faq?id=c484a4ad-6f46-4cb5-96f3-875b72f41512&lang=en> in der Version vom 24.02.2021.

Rabinovici, G. D.: Late-onset Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis, Minn.)* 25 (1), 2019, 14–33. DOI: 10.1212/CON.0000000000000700.

Racine, A. M., Kosciak, R. L., Nicholas, C. R., Clark, L. R., Okonkwo, O. C., Oh, J. M., Hillmer, A. T., Murali, D., Barnhart, T. E., Betthausen, T. J., Gallagher, C. L., Rowley, H. A., Dowling, N. M., Asthana, S., Bendlin, B. B., Blennow, K., Zetterberg, H., Carlsson, C. M., Christian, B. T. und

- Johnson, S. C.: Cerebrospinal fluid ratios with A $\beta$ 42 predict preclinical brain  $\beta$ -amyloid accumulation. *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)* 2, 2016, 27–38. DOI: 10.1016/j.dadm.2015.11.006.
- Rall, S. C., Weisgraber, K. H. und Mahley, R. W.: Human apolipoprotein E.: The complete amino acid sequence. *The Journal of biological chemistry* 257 (8), 1982, 4171–4178.
- Ratnu, V. S., Emami, M. R. und Bredy, T. W.: Genetic and epigenetic factors underlying sex differences in the regulation of gene expression in the brain. *Journal of neuroscience research* 95 (1-2), 2017, 301–310. DOI: 10.1002/jnr.23886.
- Reitan, R. M.: Trail Making Test: Manual for Administration and Scoring, 1992, 1–9.
- Reitan, R. M. und Wolfson, D.: The Halstead–Reitan neuropsychological test battery: Therapy and clinical interpretation, Tucson, Arizona, 1985.
- Rhodijs-Meester, H. F. M., Lienes, H., Koene, T., Lemstra, A. W., Teunissen, C. E., Barkhof, F., Scheltens, P., van Gils, M., Lötjönen, J. und van der Flier, W. M.: Disease-related determinants are associated with mortality in dementia due to Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy* 10 (1), 2018, 1–10. DOI: 10.1186/s13195-018-0348-0.
- Rice, J. P., Reich, T., Bucholz, K. K., Neuman, R. J., Fishman, R., Rochberg, N., Hesselbrock, V. M., Nurnberger, J. I., Schuckit, M. A. und Begleiter, H.: Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19 (4), 1995, 1018–1023. DOI: 10.1111/j.1530-0277.1995.tb00983.x.
- Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., Walters, J. T., Farh, K. H. und Holmans, P. A. et. al.: Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511 (7510), 2014, 421–427. DOI: 10.1038/nature13595.
- Ritter, A. R., Leger, G. C., Miller, J. B. und Banks, S. J.: Neuropsychological Testing in Pathologically Verified Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia: How Well Do the Uniform Data Set Measures Differentiate Between Diseases? *Alzheimer disease and associated disorders* 31 (3), 2017, 187–191. DOI: 10.1097/WAD.000000000000181.
- Rosenberg, A., Ngandu, T., Rusanen, M., Antikainen, R., Bäckman, L., Havulinna, S., Hänninen, T., Laatikainen, T., Lehtisalo, J., Levälähti, E., Lindström, J., Paajanen, T., Peltonen, M., Soininen, H., Stigsdotter-Neely, A., Strandberg, T., Tuomilehto, J., Solomon, A. und Kivipelto, M.: Multidomain lifestyle intervention benefits a large elderly population at risk for cognitive decline and dementia regardless of baseline characteristics: The FINGER trial. *Alzheimer's & dementia the journal of the Alzheimer's Association* 14 (3), 2018, 263–270. DOI: 10.1016/j.jalz.2017.09.006.
- Roses, A., Sundseth, S., Saunders, A., Gottschalk, W., Burns, D. und Lutz, M.: Understanding the genetics of APOE and TOMM40 and role of mitochondrial structure and function in clinical pharmacology of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia the journal of the Alzheimer's Association* 12 (6), 2016, 687–694. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.03.015.
- Roses, A. D., Lutz, M. W., Amrine-Madsen, H., Saunders, A. M., Crenshaw, D. G., Sundseth, S. S., Huentelman, M. J., Welsh-Bohmer, K. A. und Reiman, E. M.: A TOMM40 variable-length polymorphism predicts the age of late-onset Alzheimer's disease. *The pharmacogenomics journal* 10 (5), 2010, 375–384. DOI: 10.1038/tpj.2009.69.
- Roses, A. D., Lutz, M. W., Saunders, A. M., Goldgaber, D., Saul, R., Sundseth, S. S., Akkari, P. A., Roses, S. M., Gottschalk, W. K., Whitfield, K. E., Vostrov, A. A., Hauser, M. A., Allingham, R. R., Burns, D. K., Chiba-Falek, O. und Welsh-Bohmer, K. A.: African-American TOMM40'523-APOE haplotypes are admixture of West African and Caucasian alleles. *Alzheimer's & dementia the journal of the Alzheimer's Association* 10 (6), 2014, 592-601. DOI: 10.1016/j.jalz.2014.06.009.

- Saddiki, H., Fayosse, A., Cognat, E., Sabia, S., Engelborghs, S., Wallon, D., Alexopoulos, P., Blennow, K., Zetterberg, H., Parnetti, L., Zerr, I., Hermann, P., Gabelle, A., Boada, M., Orellana, A., Rojas, I. de, Lillamand, M., Bjerke, M., van Broeckhoven, C., Farotti, L., Salvadori, N., Diehl-Schmid, J., Grimmer, T., Hourregue, C., Dugravot, A., Nicolas, G., Laplanche, J.-L., Lehmann, S., Bouaziz-Amar, E., Hugon, J., Tzourio, C., Singh-Manoux, A., Paquet, C. und Dumurgier, J.: Age and the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: A cerebrospinal fluid biomarker-based case-control study. *PLoS medicine* 17 (8), 2020, 1-41. DOI: 10.1371/journal.pmed.1003289.
- Sánchez-Cubillo, I., Periañez, J. A., Adrover-Roig, D., Rodríguez-Sánchez, J. M., Ríos-Lago, M., Tirapu, J. und Barceló, F.: Construct validity of the Trail Making Test: Role of task-switching, working memory, inhibition/interference control, and visuomotor abilities. *Journal of the International Neuropsychological Society JINS* 15, 2009, 438–450. DOI: 10.1017/S1355617709090626.
- Schubert, A.-L., Hagemann, D., Löffler, C. und Frischkorn, G. T.: Disentangling the effects of processing speed on the association between age differences and fluid intelligence. *Journal of Intelligence* 8 (1), 2019. DOI: 10.3390/jintelligence8010001.
- Sebastiani, P., Gurinovich, A., Bae, H., Andersen, S., Malovini, A., Atzmon, G., Villa, F., Kraja, A. T., Ben-Avraham, D., Barzilai, N., Puca, A. und Perls, T. T.: Four genome-wide association studies identify new extreme longevity variants. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 72 (11), 2017, 1453–1464. DOI: 10.1093/gerona/glx027.
- Sekijima, Y., Ikeda, S., Tokuda, T., Satoh, S., Hidaka, H., Hidaka, E., Ishikawa, M. und Yanagisawa, N.: Prevalence of dementia of Alzheimer type and apolipoprotein E phenotypes in aged patients with Down's syndrome. *European neurology* 39 (4), 1998, 234–237. DOI: 10.1159/000007940.
- Shadyab, A. H., Kooperberg, C., Reiner, A. P., Jain, S., Manson, J. E., Hohensee, C., Macera, C. A., Shaffer, R. A., Gallo, L. C. und LaCroix, A. Z.: Replication of genome-wide association study findings of longevity in White, African American, and Hispanic women: The women's health initiative. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 72 (10), 2017, 1401–1406. DOI: 10.1093/gerona/glw198.
- Shao, Y., Shaw, M., Todd, K., Khrestian, M., D'Aleo, G., Barnard, P. J., Zahratka, J., Pillai, J., Yu, C.-E., Keene, C. D., Leverenz, J. B. und Bekris, L. M.: DNA methylation of TOMM40-APOE-APOC2 in Alzheimer's disease. *Journal of human genetics* 63 (4), 2018, 459–471. DOI: 10.1038/s10038-017-0393-8.
- Shiota, T., Imai, K., Qiu, J., Hewitt, V. L., Tan, K., Shen, H.-H., Sakiyama, N., Fukasawa, Y., Hayat, S., Kamiya, M., Elofsson, A., Tomii, K., Horton, P., Wiedemann, N., Pfanner, N., Lithgow, T. und Endo, T.: Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science*, 2015, 1544–1548. DOI: 10.1126/science.aac6428.
- SNPEdia: APOE. Online im Internet: <https://www.snpedia.com/index.php/APOE> in der Version vom 23.01.2022.
- Sobol, N. A., Dall, C. H., Høgh, P., Hoffmann, K., Frederiksen, K. S., Vogel, A., Siersma, V., Waldemar, G., Hasselbalch, S. G. und Beyer, N.: Change in fitness and the relation to change in cognition and neuropsychiatric symptoms after aerobic exercise in patients with mild Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 65 (1), 2018, 137–145. DOI: 10.3233/JAD-180253.
- Souza, M. B. R., Araújo, G. S., Costa, I. G. und Oliveira, J. R. M.: Combined genome-wide CSF A $\beta$ -42's associations and simple network properties highlight new risk factors for



- Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* 58 (1), 2016, 120–128. DOI: 10.1007/s12031-015-0667-6.
- Soyal, S. M., Kwik, M., Kalev, O., Lenz, S., Zara, G., Strasser, P., Patsch, W. und Weis, S.: A TOMM40/APOE allele encoding APOE-E3 predicts high likelihood of late-onset Alzheimer's disease in autopsy cases. *Molecular genetics & genomic medicine* 8 (8), 2020, e1317. DOI: 10.1002/mgg3.1317.
- Stankov, L.: Aging, attention, and intelligence. *Psychology and aging* 3 (1), 1988, 59–74. DOI: 10.1037//0882-7974.3.1.59.
- Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., Pietiläinen, O. P. H., Ingason, A., Steinberg, S., Fossdal, R., Sigurdsson, E., Sigmundsson, T., Buizer-Voskamp, J. E., Hansen, T., Jakobsen, K. D., Muglia, P., Francks, C., Matthews, P. M., Gylfason, A., Halldorsson, B. V., Gudbjartsson, D., Thorgeirsson, T. E., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Bjornsson, A., Mattiasdottir, S., Blondal, T., Haraldsson, M., Magnúsdóttir, B. B., Giegling, I., Möller, H.-J., Hartmann, A., Shianna, K. V., Ge, D., Need, A. C., Crombie, C., Fraser, G., Walker, N., Lonnqvist, J., Suvisaari, J., Tuulio-Henriksson, A., Paunio, T., Touloupoulou, T., Bramon, E., Di Forti, M., Murray, R., Ruggeri, M., Vassos, E., Tosato, S., Walshe, M., Li, T., Vasilescu, C., Mühleisen, T. W., Wang, A. G., Ullum, H., Djurovic, S., Melle, I., Olesen, J., Kiemeneý, L. A., Franke, B., Sabatti, C., Freimer, N. B., Gulcher, J. R., Thorsteinsdóttir, U., Kong, A., Andreassen, O. A., Ophoff, R. A., Georgi, A., Rietschel, M., Werge, T., Petursson, H., Goldstein, D. B., Nöthen, M. M., Peltonen, L., Collier, D. A., St Clair, D. und Stefansson, K.: Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 455 (7210), 2008, 232–236. DOI: 10.1038/nature07229.
- Summers, M. J. und Saunders, N. L. J.: Neuropsychological measures predict decline to Alzheimer's dementia from mild cognitive impairment. *Neuropsychology* 26 (4), 2012, 498–508. DOI: 10.1037/a0028576.
- Swerdlow, R. H.: Mitochondria and mitochondrial cascades in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease JAD* 62 (3), 2018, 1403–1416. DOI: 10.3233/JAD-170585.
- Swerdlow, R. H. und Khan, S. M.: A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Medical hypotheses* 63 (1), 2004, 8–20. DOI: 10.1016/j.mehy.2003.12.045.
- Szymczak, S., Dose, J., Torres, G. G., Heinsen, F.-A., Venkatesh, G., Datlinger, P., Nygaard, M., Mengel-From, J., Flachsbart, F., Klapper, W., Christensen, K., Lieb, W., Schreiber, S., Häslér, R., Bock, C., Franke, A. und Nebel, A.: DNA methylation QTL analysis identifies new regulators of human longevity. *Human Molecular Genetics* 29 (7), 2020, 1154–1167. DOI: 10.1093/hmg/ddaa033.
- Takei, N., Miyashita, A., Tsukie, T., Arai, H., Asada, T., Imagawa, M., Shoji, M., Higuchi, S., Urakami, K., Kimura, H., Kakita, A., Takahashi, H., Tsuji, S., Kanazawa, I., Ihara, Y., Odani, S. und Kuwano, R.: Genetic association study on in and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese. *Genomics* 93 (5), 2009, 441–448. DOI: 10.1016/j.ygeno.2009.01.003.
- Taylor, R. D., McHale, B. J. und Nargang, F. E.: Characterization of *Neurospora crassa* Tom40-deficient mutants and effect of specific mutations on Tom40 assembly. *The Journal of biological chemistry* 278 (2), 2003, 765–775. DOI: 10.1074/jbc.M208083200.
- Trimmer, P. A., Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Keeney, P., Bennett, J. P., Miller, S. W., Davis, R. E. und Parker, W. D.: Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines. *Experimental neurology* 162 (1), 2000, 37–50. DOI: 10.1006/exnr.2000.7333.

- U. S. National Library of Medicine: What are single nucleotide polymorphisms (SNPs)? Online im Internet: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp> in der Version vom 16.01.2022.
- van Maanen, E. T. S., van Steeg, T. S., Ahsman, M., Michener, M. S., Savage, M. J., Kennedy, M. E., Kleijn, H. J., Stone, J. A. und Danhof, M.: Extending a systems model of the APP pathway: Separation of  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase sequential cleavage steps of APP. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2018, 1–42. DOI: 10.1124/jpet.117.244699.
- Villemagne, V. L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K. A., Salvado, O., Szoek, C., Macaulay, S. L., Martins, R., Maruff, P., Ames, D., Rowe, C. C. und Masters, C. L.: Amyloid  $\beta$  deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: A prospective cohort study. *The Lancet Neurology* 12 (4), 2013, 357–367. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70044-9.
- War Department, Adjutant Generals Office: Army individual tests battery: Manual of directions and scoring, Washington, D.C., 1944.
- Wei, M., Shi, J., Li, T., Ni, J., Zhang, X., Li, Y., Kang, S., Ma, F., Xie, H., Qin, B., Fan, D., Zhang, L., Wang, Y. und Tian, J.: Diagnostic accuracy of the chinese version of the Trail-Making Test for screening cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2017. DOI: 10.1111/jgs.15135.
- WHO: Dementia: Key facts. Online im Internet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> in der Version vom 13.01.2022.
- Wingo, T. S., Lah, J. J., Levey, A. I. und Cutler, D. J.: Autosomal recessive causes likely in early-onset Alzheimer disease. *Archives of neurology* 69 (1), 2012, 59–64. DOI: 10.1001/archneurol.2011.221.
- Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C.-C. und Bu, G.: Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Pathobiology and targeting strategies. *Nature reviews. Neurology* 15 (9), 2019, 501–518. DOI: 10.1038/s41582-019-0228-7.
- Yashin, A. I., Arbeev, K. G., Wu, D., Arbeeva, L. S., Bagley, O., Stallard, E., Am Kulminski, Akushevich, I., Fang, F., Wojczynski, M. K., Christensen, K., Newman, A. B., Boudreau, R. M., Province, M. A., Thielke, S., Perls, T. T., An, P., Elo, I. und Ukraintseva, S. V.: Genetics of human longevity from incomplete data: New findings from the long life family study. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 73 (11), 2018, 1472–1481. DOI: 10.1093/gerona/gly057.
- Yu, C.-E., Seltman, H., Peskind, E. R., Galloway, N., Zhou, P. X., Rosenthal, E., Wijsman, E. M., Tsuang, D. W., Devlin, B. und Schellenberg, G. D.: Comprehensive analysis of APOE and selected proximate markers for late-onset Alzheimer Disease: Pattern of linkage disequilibrium and disease/marker association. *Genomics* 89 (6), 2007, 655–665. DOI: 10.1016/j.ygeno.2007.02.002.
- Yu, L., Lutz, M. W., Wilson, R. S., Burns, D. K., Roses, A. D., Saunders, A. M., Gaiteri, C., De Jager, P. L., Barnes, L. L. und Bennett, D. A.: TOMM40 '523 variant and cognitive decline in older persons with APOE $\epsilon$ 3/3 genotype. *American Academy of Neurology* 88 (7), 2017a, 661–668. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003614.
- Yu, L., Lutz, M. W., Wilson, R. S., Burns, D. K., Roses, A. D., Saunders, A. M., Yang, J., Gaiteri, C., De Jager, P. L., Barnes, L. L. und Bennett, D. A.: APOE  $\epsilon$ 4-TOMM40 '523 haplotypes and the risk of Alzheimer's disease in older caucasian and african americans. *PloS one* 12 (7), 2017b, 1-14. DOI: 10.1371/journal.pone.0180356.
- Zeh, R. M.: Neurological and molecular biological characterisation of the mutant mouse line Tom40: Neurologische und molekularbiologische Charakterisierung der mutanten Mauslinie Tom40. *Dissertationsschrift, München*, 2013.

## Literaturverzeichnis

- Zeitlow, K., Charlambous, L., Ng, I., Gagrani, S., Mihovilovic, M., Luo, S., Rock, D. L., Saunders, A., Roses, A. D. und Gottschalk, W. K.: The biological foundation of the genetic association of TOMM40 with late-onset Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* (11), 2017, 2973–2986. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.07.031.
- Zhang, Y. und Liu, J. S.: Fast and accurate approximation to significance tests in genome-wide association studies. *Journal of the American Statistical Association* 106 (495), 2011, 846–857. DOI: 10.1198/jasa.2011.ap10657.
- Zhou, X., Chen, Y., Mok, K. Y., Kwok, T. C. Y., Mok, V. C. T., Guo, Q., Ip, F. C., Chen, Y., Mullapudi, N., Giusti-Rodríguez, P., Sullivan, P. F., Hardy, J., Fu, A. K. Y., Li, Y. und Ip, N. Y.: Non-coding variability at the APOE locus contributes to the Alzheimer's risk. *Nature communications* 10 (1), 2019, 1–16. DOI: 10.1038/s41467-019-10945-z.

Danksagung

## **Danksagung**

Ich möchte mich zunächst bei Frau PD Dr. rer. biol. hum. Ina Giegling für die gute Betreuung bedanken und dafür, dass sie es mir ermöglichte, mich während meiner Doktorandenzeit in einige spannende Gebiete psychologischer Testungen einzuarbeiten.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dr. Annette Hartmann für die Beantwortung all meiner Fragen zu genetischen Fragestellungen und nicht zuletzt für die Betreuung des hilfreichen Journal Clubs, der es mir ermöglichte, mich bereits frühzeitig in wissenschaftliche Paper einzulesen.

Großer Dank an Frau Prof. Dr. Gabi Koller und Frau PD Dr. Susanne Karch für die Übernahme der Betreuung.

Frau Dr. Bente Flier danke ich herzlich für die motivierenden Worte und ihre Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Frau Bettina Konte und Herrn Dr. Stephan Maul für die freundschaftliche Betreuung, die geduldige Beantwortung all meiner Fragen zu Inhalt und Aufbau der Arbeit und für das Korrekturlesen.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die es mir ermöglichten, mir für die Fertigstellung dieser Arbeit zwei Freisemester zu nehmen und meinem Mann für seine immerwährende Unterstützung.

## Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

Buttler, Pia

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:  
**Zusammenhang zwischen genetischen Variationen der  
TOMM40-APOE-Genregion und Kognition**

.....  
selbständig 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.

Berlin, 18.09.2023

Pia Buttler

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand