

**Die genetische und funktionelle Bedeutung des High Temperature
Requirement A1 Proteins (HtrA1) und eines HtrA1-Single Nucleotide
Polymorphismus für Morbus Alzheimer**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geografie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Anca Laura Tirniceriu

aus Iasi / Rumänien

April, 2008

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. R. Egensperger
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Ehrmann
3. Gutachter: Prof. Dr. R. Küppers

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. D. Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2008

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	3
II.	Abkürzungsverzeichnis	7
III.	Abbildungsverzeichnis	8
IV.	Tabellenverzeichnis	9
1.	Einleitung	10
1.1.	Die neuropathologische Diagnose des Morbus Alzheimer	10
1.2.	Das Amyloid Precursor Protein (APP)	12
1.2.1.	Die physiologische Funktion des APP	12
1.2.2.	Amyloidogene und nicht-amyloidogene APP-Prozessierung	14
1.3.	Amyloid β Protein (A β)	15
1.4.	Die intrazelluläre Domäne des APP (AICD)	17
1.5.	Genetik des Morbus Alzheimer	18
1.5.1.	Dominant vererbte Gendefekte bei Morbus Alzheimer mit frühem Erkrankungsbeginn (EOAD)	19
1.5.2.	Morbus Alzheimer mit spätem Erkrankungsbeginn (LOAD)	20
1.5.3.	Apolipoprotein E (APOE)	21
1.5.4.	Weitere Suszeptibilitätsgene	22
1.6.	High Temperature Requirement Protein A1 (HtrA1)	24
1.7.	Zielsetzung der Arbeit	27
2.	Material und Methoden	29
2.1.	Materialien	29
2.1.1.	Verwendete Geräte	29
2.1.2.	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.3.	Zellkulturmaterial und Zellkulturzusätze	30
2.1.4.	Zelllinien	30
2.1.5.	Oligonukleotide	31
2.1.6.	Lösungen, Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten	32
2.1.7.	Enzyme	33

2.1.8.	Antikörper	33
2.1.9.	Verwendete Kits	33
2.1.10.	Verwendete Software	34
2.2.	Methoden	34
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1.1.	DNA-Arbeitstechniken	34
2.2.1.1.1.	DNA-Isolierung aus gefrorenem Hirngewebe	34
2.2.1.1.2.	DNA-Isolierung aus Formalin-fixiertem Hirngewebe	34
2.2.1.1.3.	DNA-Konzentrationsbestimmung	35
2.2.1.1.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.1.5.	DNA-Agarosegelelektrophorese	37
2.2.1.1.6.	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	38
2.2.1.1.7.	Sequenzanalyse der PCR-Produkte	38
2.2.1.1.8.	Real-Time PCR	40
2.2.1.2.	RNA-Arbeitstechniken	42
2.2.1.2.1.	Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA Synthese	42
2.2.1.2.2.	RNA-Konzentrationsbestimmung	42
2.2.1.2.3.	RNA-Qualitätskontrolle	42
2.2.2.	Zellbiologische Techniken	43
2.2.2.1.	Humane Zelllinien	43
2.2.2.2.	Subkultivierung von adhärent wachsenden Zellen	43
2.2.2.3.	Bestimmung der Zellzahl	44
2.2.2.4.	Langzeitaufbewahrung der Zellen	44
2.2.2.5.	Auftauen von tiefgefrorenen Zellen	44
2.2.3.	<i>In situ</i> Nachweis und Quantifizierung der Plaques und neurofibrillären Tangles	45
2.2.4.	Statistische Auswertung	45
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Der <i>HtrA1</i> Promoter SNP rs11200638 modifiziert das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer mit spätem Erkrankungsbeginn (LOAD)	47

3.2.	Der <i>HtrA1</i> Promoter SNP rs11200638 hat keinen Effekt auf das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer mit frühem Erkrankungsbeginn (EOAD)	51
3.3.	Der <i>HtrA1</i> Promoter SNP rs11200638 ist nicht mit dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken assoziiert	52
3.4.	Die Effekte des <i>HtrA1</i> Promoter SNP rs11200638 und des <i>APOE</i> -Genotyps auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer	53
3.4.1.	Der <i>APOE</i> -Genotyp ist in unserem Kollektiv mit dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken assoziiert und modifiziert das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer	54
3.4.2.	Der <i>HtrA1</i> Promoter SNP rs11200638 und der <i>APOE</i> -Genotyp besitzen additive Effekte auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer	54
3.4.3.	Der <i>HtrA1</i> Promoter SNP rs11200638 und der <i>APOE</i> -Genotyp besitzen in der Kaplan-Meier Darstellung additive Effekte auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer	56
3.4.4.	Der <i>HtrA1</i> Promoter SNP rs11200638 und der <i>APOE</i> -Genotyp modifizieren das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer unabhängig voneinander	57
3.5.	Untersuchung der pathologischen Charakteristika von Morbus Alzheimer in Abhängigkeit des <i>HtrA1</i> -Genotyps	58
3.6.	Vergleichende Analyse der <i>HtrA1</i> -RNA-Expression in Hirngewebe von Alzheimer Patienten und Kontrollen	60
3.7.	Die <i>HtrA1</i> -Expression ist in AICD-überexprimierenden Neuroblastom-Zellen erhöht	61
4.	Diskussion	63
4.1.	Relevanz des <i>HtrA1</i> Promoter SNP rs11200638 für das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer	63
4.2.	<i>HtrA1</i> und <i>APOE</i> modifizieren das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer mit additiven und unabhängigen Effekten	65

4.3.	Der <i>HtrA1</i> Promoter SNP rs11200638 ist nicht mit dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken assoziiert	66
4.4.	Der <i>HtrA1</i> Promoter SNP rs11200638 modifiziert die charakteristischen pathologischen Veränderungen bei Morbus Alzheimer	67
4.5.	Die <i>HtrA1</i> -RNA-Expression ist in Hirngewebe von Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöht	69
4.6.	Ist <i>HtrA1</i> ein AICD-abhängig reguliertes Gen?	71
4.7.	Ausblick	73
5.	Zusammenfassung	75
6.	Literaturverzeichnis	76
7.	Anhang	90
7.1.	Danksagung	90
7.2.	Lebenslauf	92
8.	Eidesstattliche Erklärung	94

II. Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Aβ	Amyloid β Protein
AD	Alzheimer's Disease
AICD	Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain
AMD	Age-Related Macular Degeneration
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	β APP Cleaving Enzyme
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOAD	Early Onset Alzheimer's Disease
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FE65	Amyloid Precursor Protein-Binding, Family B, Member 1
g	Erdanziehungskraft
GSTO	Glutathione-S-Transferase Omega
h	Stunde
HtrA1	High Temperature Requirement Protein A1
IDE	Insulin Degrading Enzyme
LOAD	Late Onset Alzheimer's Disease
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
NEP	Neprilysin
NFT	Neurofibrillary Tangles
nm	Nanometer
PBS	Phosphat Buffer Saline

PHF	Paired Helical Filaments
PLAU	Plasminogen Activator Urokinase
PS	Presenilin
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RPMI	Roslind Park Memorial Institute
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Tau	Mikrotubuli assoziiertes Protein Tau
TIP60	Tat Interacting Protein 60 kDa
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
ZNS	Zentrales Nervensystem

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die histopathologischen Merkmale der Alzheimer-Krankheit	11
Abb. 2: APP als Adapterprotein beim anterograden axonalen Transport	13
Abb. 3: Amyloidogene und nicht-amyloidogene Prozessierung von APP	14
Abb. 4: Das High Temperature Requirement Protein A1 (HtrA1)	24
Abb. 5: Veränderungen in der Netzhaut bei altersbedingten Makuladegeneration (AMD)	25
Abb. 6: Restriktionsverdau der <i>HtrA1</i> und <i>APOE</i> PCR-Fragmente	48
Abb. 7: Der <i>HtrA</i> -Genotyp modifiziert das Erkrankungsalter bei LOAD	50
Abb. 8: Kaplan-Meier Kurven zur Darstellung des Effektes der <i>HtrA1</i> -Genotypen auf das Erkrankungsalter	51
Abb. 9: <i>HtrA1</i> -Genotypverteilung bei LOAD, EOAD und Kontrollindividuen	53
Abb. 10: Der Einfluss des <i>HtrA1</i> - und des <i>APOE</i> -Genotyps auf das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer	55
Abb. 11: <i>HtrA1</i> - und <i>APOE</i> -Genotyp haben additive Effekte auf das Erkrankungsalter bei LOAD	56

Abb. 12: Der Einfluss des <i>HtrA1</i> -Genotyps auf die Zahl neuritischer Plaques im frontalen Kortex von Alzheimer Patienten	58
Abb. 13: Der Einfluss des <i>HtrA1</i> -Genotyps auf die Zahl neurofibrillärer Tangles im frontalen Kortex von Alzheimer Patienten	59
Abb. 14: HtrA1-RNA-Expression in Hirngewebe von Alzheimer Patienten und Kontroll-Fällen	60
Abb. 15: HtrA1-Expression in AICD-überexprimierenden Neuroblastom-Zellen	62

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Monogen vererbte Gendefekte	20
Tabelle 2: Berechnung der Genotypfrequenzen nach Hardy-Weinberg Gleichgewicht im LOAD Datensatz	48
Tabelle 3: Das Erkrankungsalter für sporadische LOAD Fälle im Exploratorischen, Bestätigungs- und Gesamt-Datensatz	49
Tabelle 4: Das Erkrankungsalter für EOAD im Exploratorischen, Bestätigungs- und Gesamt-Datensatz	52

1. Einleitung

Die Demenz ist ein Defizit in kognitiven, emotionalen und sozialen Fähigkeiten, die zu einer Beeinträchtigung von sozialen Funktionen führt und fast immer, aber nicht ausschließlich mit einer diagnostizierbaren Erkrankung des Gehirns einhergeht. Die am häufigsten auftretende Form der Demenz ist die Alzheimer Krankheit (Alzheimer's Disease, AD). Bei der Alzheimer-Krankheit handelt es sich um eine irreversible, progressive Erkrankung des Gehirns, die langsam das Gedächtnis und die kognitiven Fähigkeiten zerstört; weiterhin treten bei den betroffenen Patienten eine Reihe von Verhaltens- und Persönlichkeitsveränderungen auf. Häufig können Angstzustände oder depressive Zustände eintreten. Die Demenz betrifft 5% bis 20% der 65-80jährigen und ist derzeit nach Herzerkrankungen, Malignomen und Apoplexie die vierthäufigste Todesursache in den Industrieländern (Van Broeckhoven, 1994). In Deutschland leiden aktuell mehr als 900.000 Menschen unter einer Demenzerkrankung, 650.000 davon unter AD. Pro Jahr werden etwa 200.000 neue Demenzerkrankungen diagnostiziert, davon sind ca. 120.000 Demenzen vom Alzheimerstyp. Im Jahr 2006 waren weltweit etwa 26,6 Millionen Menschen von der AD betroffen.

1.1. Die neuropathologische Diagnose des Morbus Alzheimer

1906 wurde die Alzheimer-Krankheit erstmals durch den Arzt Alois Alzheimer an der Patientin Auguste Deter diagnostiziert und als Erkrankung organischen, nicht psychischen Ursprungs beschrieben (Alzheimer, 1907). Die charakteristischen morphologischen Befunde der AD sind Neuronenverlust, kortikale Atrophie, neuritische oder senile Plaques, neurofibrilläre Bündel (Neurofibrillary Tangles, NTF), Neuropilfäden und die mit AD assoziierte Amyloidangiopathie. Die für die neuropathologische Diagnose relevanten histopathologischen Veränderungen sind die senilen Plaques (Abb. 1A) und die NFTs (Abb.1B) im Gehirn der Patienten.

Die Plaques bestehen vorwiegend aus Amyloid β Protein ($A\beta$) und in unterschiedlichem Ausmaß aus degenerierten Axonen und Dendriten. Aufgrund dieser qualitativen Unterschiede wird auch zwischen neuritischen und diffusen Plaques unterschieden.

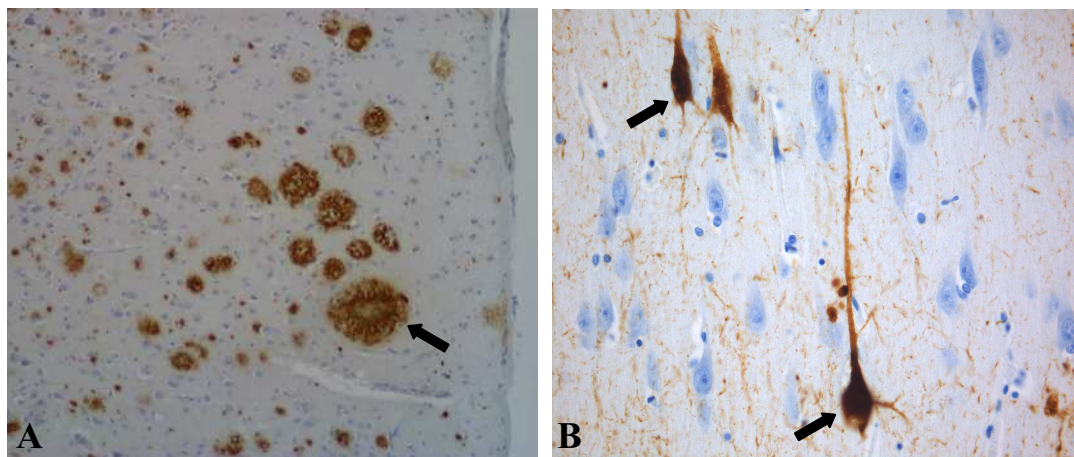


Abb. 1: Die histopathologischen Merkmale der Alzheimer-Krankheit. A: Extrazelluläre Ablagerungen von A β Peptid im Gehirn von Alzheimer Patienten. Die immunhistologische Färbung mit anti-A β Antikörper zeigt senile Plaques (Pfeil). **B:** Intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (NFTs, Pfeil) detektiert mit einem Antikörper gegen Tau-Protein.

Anfangs wird A β in amorpher, locker organisierter Form als so genannte diffuse Plaques abgelagert (Rozemuller, et al., 1989). Die diffusen Plaques zeigen keinen veränderten Neuriten und einen geringeren Kondensationsgrad der Ablagerungen im extrazellulären Raum. Über die Zeit kondensieren diese Plaques, bilden eine Amyloid-ähnliche Struktur aus, beinhalten Neuronen, Astrozyten oder Mikroglia, somit entwickeln sich zu klassischen senilen Plaques, den so genannten neuritischen Plaques. Die neuritischen Plaques beinhalten einen dichten A β -Kern umgeben von einer diffusen A β -Masse in einem Netz von dystrophen Neuriten und aktivierten Gliazellen (Perry and Perry, 1985). Die Anzahl oder Dichte der senilen Plaques korreliert wenig mit dem Ausmaß der neuronalen Zelluntergänge oder dem Grad der Demenz. Plaques sind im Neokortex weit verbreitet, die höchste Dichte erreichen sie häufig im entorhinalen Kortex; einige Plaques lassen sich auch in Basalganglien und manchmal im Kortex des Cerebellums finden.

Die NFTs liegen innerhalb der Perikarya mittelgroßer oder großer Neurone (Abb. 1B). Die Fibrillen füllen einen Teil des Cytoplasmas aus und bestehen aus 10 nm dicken helikalen Filamenten (Paired Helical Filaments, PHF) (Kidd, 1963), die aufgrund einer abnormalen Phosphorylierung des Proteins Tau entstehen (Brion, et al., 1985; Delacourte and Defossez, 1986). Im Gegensatz zu der relativ unsystematischen Verteilung der Amyloid Plaques korreliert die Neurofibrillen-Pathologie mit dem Ausmaß der Demenz (Braak and Braak, 1991).

1.2. Das Amyloid Precursor Protein (APP)

A β ist ein Spaltprodukt, das nach Proteolyse des Amyloid-Vorläuferproteins (Amyloid Precursor Protein, APP) entsteht. APP ist ein Typ-1 Transmembranprotein, das ein Mitglied einer evolutionär konservierten Proteinfamilie ist, zu der auch die Homologen Amyloid Precursor Like Proteine 1 und 2 (APLP1 und APLP2) gehören (Slunt, et al., 1994; Wasco, et al., 1992). Das *APP* Gen befindet sich auf Chromosom 21 (Kang, et al., 1987; Tanzi, et al., 1987) in der Region 21q21 (St George-Hyslop, et al., 1987). Es wurden mindestens drei Isoformen des APPs identifiziert, die 695, 751 oder 770 Aminosäuren lang sind (Yoshikai, et al., 1990) und die nach alternativem Spleißen der Gentranskripte entstehen. Die Isoformen APP₇₅₁ und APP₇₇₀ enthalten einen 56-Aminosäuren langen Abschnitt, der eine große Homologie zur Kunitz-Familie der Serin-Proteaseinhibitoren (KPI) aufweist (Moir, et al., 1998). APP ist ein integrales Membranglykoprotein, das eine große extracytoplasmatische Domäne, eine Transmembranregion und eine kurze cytoplasmatische Domäne enthält (Abb. 3). APP befindet sich in der Zelle in oder in der Nähe der Plasmamembran der Zellkörper und der proximalen Dendriten. Dieses Protein wird sowohl im Gehirn in Neuronen, Perizyten, Endothelzellen, Epithel und Astrozyten, als auch in peripheren Geweben, wie Muskel, Epithelzellen, Nieren, Lunge und Leber exprimiert (Tanzi, et al., 1987). Die pathologischen Merkmale des Morbus Alzheimer in Form von Amyloid Plaques und Amyloidangiopathie sind hingegen nur im Gehirn zu finden.

Im Hirngewebe entspricht die am meisten exprimierte mRNA dem APP₆₉₅, mit einer ca. 10-fach höheren Expression als die von APP₇₅₁ oder APP₇₇₀ (Sisodia, et al., 1993), welche hauptsächlich in den peripheren Gewebe zu finden sind (Selkoe, 1994).

1.2.1. Die physiologische Funktion des APP

Die physiologische Bedeutung des APP scheint vielseitig zu sein, da das Protein in vielen Zellen nachgewiesen werden kann, während dessen Aufspaltung zu A β auf das Gehirn beschränkt ist. Es ist bekannt, dass APP bei der Regulation der Blutgerinnung, der zellulären Immunreaktion, der Zellproliferation und –adhäsion mitwirkt (Selkoe, 1991a).

Obwohl die genaue Funktion von APP in Neuronen noch nicht geklärt ist, haben *in vitro* Studien gezeigt, dass APP an der Synaptogenese und synaptischen Plastizität beteiligt ist

(Breen, et al., 1991; Milward, et al., 1992; Schubert, et al., 1989). Zudem führt die Deletion des *APP* Gens in der Maus zu Lern- und Gedächtnis-Störungen (Dawson, et al., 1999). Die exakten Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen sind weitgehend unbekannt. Jedoch wird vermutet, dass für eine normale APP Funktion ein Gleichgewicht zwischen APP und einem anderen Faktor nötig ist. Dieser Faktor könnte Fe65 sein, ein cytosolischer Adapter, der den subzellulären Transport und die proteolitische Prozessierung von APP reguliert (Guenette, et al., 1999; Sabo, et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass APP im Komplex mit Fe65 die Zellmotilität in transfizierten Zellen regulieren kann (Sabo, et al., 2001). Fe65 interagiert simultan mit APP und Mena (Sabo, et al., 2001), einem Protein das für die normale neuronale Entwicklung benötigt wird (Gertler, et al., 1990). Vermutlich reguliert der APP-Fe65 Komplex die Wachstumskegelmotilität durch seine Interaktion mit Mena.

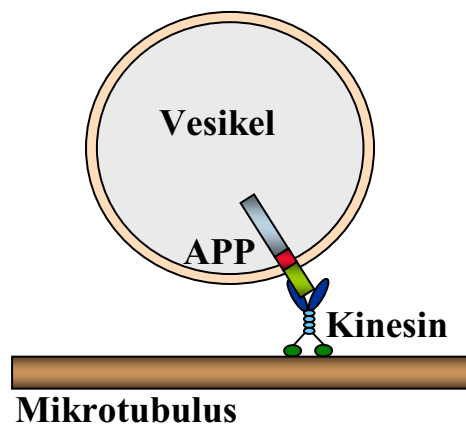


Abb. 2: APP als Adapterprotein beim anterograden axonalen Transport. Durch seine intrazelluläre Domäne kann das in der Vesikelmembran verankerte APP an das Motorprotein Kinesin binden und dadurch den Transport des Vesikels entlang des Mikrotubulus vermitteln.

APP wird außerdem eine physiologische Funktion beim axonalen Transport in Neuronen zugeschrieben. Das Protein wird über den schnellen anterograden axonalen Transport zu den Synapsen transportiert (Koo, et al., 1990). Dabei fungiert APP vermutlich als Bindeglied zwischen dem Motorprotein Kinesin (KIF5) und Transportvesikeln (Abb. 2) (Kamal, et al., 2001). Die Bindung an die leichte Kette des Kinesin erfolgt direkt (Kamal, et al., 2000) oder durch Adaptorproteine wie z.B. Jip-1 (Matsuda, et al., 2003; Matsuda, et al., 2001; Scheinfeld, et al., 2002). APP kann dadurch als Frachtrezeptor wirken und ist für den Transport von Vesikeln und die darin enthaltenen Proteine notwendig (Gunawardena and Goldstein, 2001).

1.2.2. Amyloidogene und nicht-amyloidogene APP-Prozessierung

Die proteolytische Prozessierung von APP lässt sich in zwei Wege einteilen, deren Produkte neuroprotektive oder neurotoxische Funktion haben.

Die nicht-amyloidogene Prozessierung beruht auf der Aktivität der α -Sekretase, die die extrazelluläre Domäne von APP zwischen der 16ten und der 17ten Aminosäure der A β Region spaltet (Abb. 3). Die α -Sekretase Aktivität wird durch die Mitglieder der ADAM Proteinfamilie geleitet: ADAM 9, ADAM 10 und ADAM17 (Tumor Nekrosis Faktor- α Converting Enzyme, TACE) (Buxbaum, et al., 1998; Lammich, et al., 1999).

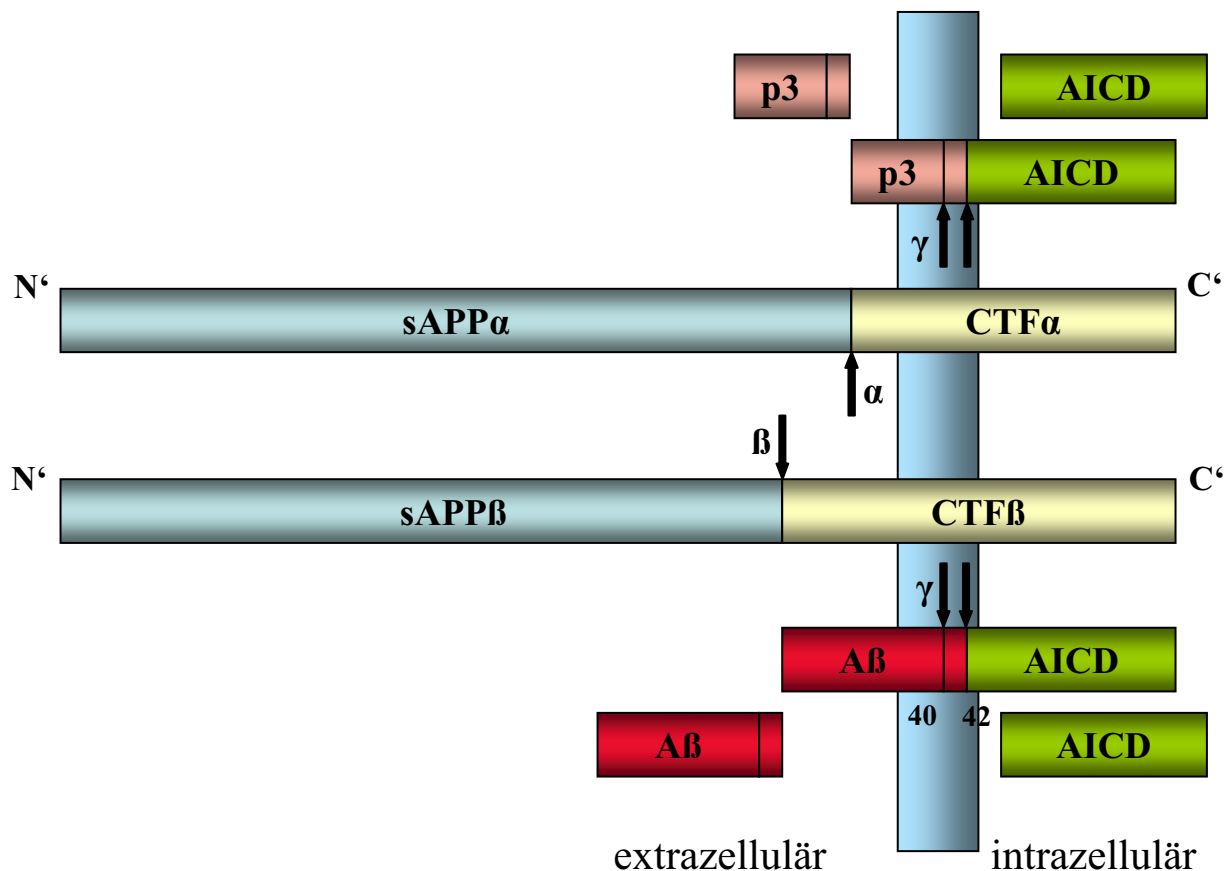


Abb 3: Amyloidogene und nicht-amyloidogene Prozessierung von APP. Nach der proteolytischen Spaltung des APP durch die α -Sekretase entstehen zwei Fragmente, sAPP α und CTF α , die nicht amyloidogen sind. Ist die Aktivität der α -Sekretase vermindert, wird APP alternativ durch die β -Sekretase gespalten, wobei sAPP β und CTF β entstehen. Das CTF β wird anschließend von der γ -Sekretase prozessiert und es entsteht A β sowie die intrazelluläre Domäne des APP (AICD).

Diese Prozessierung führt zur Freisetzung einer löslichen sekretierten N-terminalen Ectodomäne, sAPP α (Weidemann, et al., 1989), der eine neuroprotektive Funktion zugesprochen wird (Guo, et al., 1998; Turner, et al., 2003) und eines in der Membran verankerten C-terminalen Fragments (CTF α) (De Strooper and Annaert, 2000; Selkoe,

1991b). Weiterhin wird das CTF α durch die γ -Sekretase in der Transmembranregion gespalten, wobei ein p3-Fragment und die APP Intrazelluläre Domäne (AICD) entstehen (Selkoe, 1991a).

Im Gegensatz zu der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung ist der amyloidogene Weg von zentraler Bedeutung für Morbus Alzheimer, da er unmittelbar zur Entstehung von Amyloidplaques beiträgt. Diese Spaltung setzt sich aus zwei sukzessiven Schritten zusammen (Abb.3). APP unterliegt zuerst der Spaltung durch die β -Sekretase (β APP Cleaving Enzyme, BACE), eine Membran-gebundene Aspartylprotease (De Strooper and Annaert, 2000; Esler and Wolfe, 2001). BACE ist ein stabiles, monomerisches Protein, welches nach der Glykosylierung im ER zum Golgi Apparat und zum endosomalen System transportiert wird (Huse, et al., 2000). Infolge der β -Sekretase Prozessierung entstehen eine sekretierte Ectodomäne (sAPP β) und ein in der Membran verankertes 10-kDa C-terminales APP Fragment (CTF β), welches als Substrat für die γ -Sekretase dient. Die γ -Sekretase ist ein hochmolekularer Komplex, der verantwortlich ist für die Proteolyse von APP, Notch1, ErbB-4 und E-cadherin (Ebinu and Yankner, 2002; Marambaud, et al., 2002). Dieser Proteinkomplex entsteht durch die Interaktion zwischen Presenilin 1 (PS1), Presenilin 2 (PS2) (De Strooper and Annaert, 2000; Octave, et al., 2000), Nicastrin (Yu, et al., 2000), APH1 α / APH1 β (Goutte, et al., 2002) und Presenilin Enhancer 2 (PEN2) (Francis, et al., 2002). Die γ -Sekretase Spaltung des CTF β erfolgt an Val₆₃₆ oder Ala₆₃₈, so dass entweder A β ₄₀ oder A β ₄₂ und das zugehörige intrazelluläre Fragment (AICD₅₉ oder AICD₅₇) entstehen.

Preseniline sind integrale Membranproteine mit acht Transmembrandomänen und einer hydrophilen Schleife zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7 (Doan, et al., 1996; Li and Greenwald, 1998). Preseniline sind im Zellkörper im ER, Golgi Apparat (De Strooper, et al., 1997; Kovacs, et al., 1996), Endosomen (Lah and Levey, 2000), in der Kernmembran und an den synaptischen Endungen der Neuronen im ZNS lokalisiert (Busciglio, et al., 1997; Cook, et al., 1996; Doan, et al., 1996; Moussaoui, et al., 1996).

1.3. Amyloid β Protein (A β)

Das nach amyloidogener APP-Prozessierung entstehende A β ist in der extrazellulären Matrix lokalisiert und kann dort zunächst zu Protofibrillen mit einem Durchmesser von bis zu 5 nm und einer Länge von 200 nm aggregieren, um so den Kern eines

Amyloidplaques zu bilden. Das in den Plaques enthaltene A β weist in der Regel eine Länge von 42 oder 43 Aminosäuren auf. Das A β_{40} hingegen wird vermutlich normal sezerniert und nur in geringen Mengen in Plaques abgelagert. Die zusätzlichen zwei Aminosäuren zwischen A β_{40} und A β_{42} vermindern die Löslichkeit des Peptids, steigern seine Aggregationsfähigkeit (Jarrett, et al., 1993) und somit sein neurotoxisches Potenzial.

Das A β Peptid spielt eine wichtige Rolle bei neuronalen Funktionsstörungen, da es für Neurone *in vivo* (Geula, et al., 1998; Kowall, et al., 1991) und *in vitro* (Howlett, et al., 1995; Yankner, et al., 1989) toxisch ist. Die neurotoxischen Effekte wurden überwiegend mit aggregiertem oder fibrillärem A β beobachtet. Die genauen Mechanismen, wie A β seine Effekte ausübt, sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Untersuchungen haben gezeigt, dass A β Apoptose induziert (Youssef, et al., 2007), eine aktivierende Wirkung auf Kalziumkanäle besitzt (Demuro, et al., 2005; Pearson and Peers, 2006), Kaliumkanäle inaktiviert (Etcheberrigaray, et al., 1994) und die Protein Kinase C inhibiert (Favit, et al., 1998; Lee, et al., 2004). Zudem aktiviert A β Astrozyten und Mikroglia und bewirkt dadurch eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Stepanichev, et al., 2003). Die physiologische Menge von A β im Gehirn ergibt sich aus dem Gleichgewicht zwischen der Entstehung und dem Abbau von A β . Die pathologische Ablagerung von A β in Plaques ist im Gehirn von Alzheimer Patienten mit frühem Erkrankungsbeginn (früher als 65 Jahre) das Ergebnis einer exzessiven A β Produktion. Im Gegensatz dazu ist der genaue Mechanismus, der die A β Akkumulation bei Alzheimer Fällen mit spätem Erkrankungsbeginn (ab 65 Jahre) bewirkt, noch nicht geklärt. Es wird spekuliert, dass die Ursache dafür ein gestörter A β Abbau ist. Der A β Abbau erfolgt auf mindestens drei Wegen: extrazelluläre Proteolyse durch Enzyme (Selkoe, 2001), Transport über die Blut-Hirn-Schranke (Zlokovic, 2004) und Rezeptor-vermittelte Endozytose (Zlokovic, 2004). Für die Degradierung des A β sind mehrere proteolytische Enzyme verantwortlich: das Insulin Degrading Enzym (IDE) (Farris, et al., 2004; Qiu, et al., 1998), Endothelin Converting Enzym (ECE) (Eckman, et al., 2001), das Plasmin System (Tucker, et al., 2000) und Neprilysin (NEP) (Carson and Turner, 2002; Iwata, et al., 2001). IDE degradiert hauptsächlich lösliches, monomeres, intrazelluläres A β (Morelli, et al., 2003; Sudoh, et al., 2002), während Plasmin aggregiertes A β prozessieren kann (Tucker, et al., 2000). NEP spielt eine wichtige Rolle beim Abbau von A β_{42} und ist in niedrigeren Mengen in den Hirnregionen zu finden, die von der Alzheimer Pathologie betroffen sind (Yasojima, et al., 2001). Erst in den letzten Jahren wurde dem bei der γ -Sekretase

Spaltung des APP entstehenden AICD zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass AICD₅₉ durch weitere Aktivität der γ -Sekretase zu AICD₅₀ prozessiert werden kann (Sastre, et al., 2001; Yu, et al., 2001). Dies ist jedoch Bestandteil aktueller Forschung und wird durch die Tatsache erschwert, dass AICD zum einen sehr klein und damit schwer nachweisbar ist und zum anderen auch schnell abgebaut wird (Nunan, et al., 2003).

1.4. Die intrazelluläre Domäne des APP (AICD)

Die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) besitzt drei entscheidende Bindungsdomänen, die bei der Sekretion, Endozytose (₆₅₃YTSL₆₅₆) und Transaktivierung (₆₆₇VTPEER₆₇₂, ₆₈₂YENPTY₆₈₇) eine Rolle spielen. Es wird angenommen, dass AICD normalerweise einer sehr schnellen zellulären Degradation unterworfen ist. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es durch die Bindung an das Adapterprotein FE65 stabilisiert wird und sich so der schnellen Degradation entziehen kann (Kimberly, et al., 2001). FE65 (auch Amyloid beta Precursor Binding Protein) ist ein 97 kDa großes Protein, das am C-Terminus zwei Phosphotyrosin-Bindedomänen (PTB) und am N-Terminus eine WW Domäne besitzt. Die PTB2 Domäne kann AICD binden, die PTB1 Domäne bindet LRP (LDL-Receptor Related Protein) (Trommsdorff, et al., 1998). Die WW Domäne kann Prolin-reiche Liganden wie Mena oder die nukleäre Tyrosin Kinase c-Abl binden (Ermekova, et al., 1997; Zambrano, et al., 2001) und ist essentiell für die Transaktivierung.

Die Funktion der AICD ist noch nicht hinreichend geklärt. Zahlreiche Studien jedoch führten schließlich zur Hypothese, dass AICD an der differentiellen Genregulation beteiligt ist. Infolge der APP Prozessierung durch den γ -Sekretase Komplex entsteht im Cytoplasma AICD, an dem das Adapterprotein FE65 über seine PTB2 Domäne bereits gebunden hatte oder infolge der Spaltung bindet. Der AICD-FE65 Komplex kann nun in den Zellkern translozieren (Kimberly, et al., 2001); dort kann das Tat Interacting Protein 60 (TIP60) an die noch freie PTB1 Domäne von FE65 binden, so dass ein trimerer Komplex aus AICD, FE65 und TIP60 entsteht. TIP60 besitzt Histon Acetyltransferase-Aktivität (Yamamoto and Horikoshi, 1997). Durch diese Bindung an TIP60 wird es dem AICD abhängigen Transkriptionskomplex ermöglicht, die Histone 3 und 4 zu acetylieren. Die Histone verlieren infolge der Acetylierung ihre positiven Ladungen, und Proteine

haben so einen leichteren Zugang zur DNA (Kim, et al., 2004). Über diesen Mechanismus könnte der Komplex aus AICD-FE65-TIP60 (sowie eventuell weitere noch nicht identifizierte Proteine) in der Lage sein, an spezifische Promotoren zu binden und so das Genexpressionsmuster der Zelle zu verändern.

Der Mechanismus der AICD abhängigen differentiellen Genregulation, und die Identifikation potentieller AICD Zielgene sind Bestandteile aktueller Forschung. Nur wenige Studien lieferten bisher Vorschläge für potentiell AICD-abhängig regulierte Kandidatengene, wie Kai1 (Baek, et al., 2002), GSK3 β (Kim, et al., 2003) sowie Sarko- und Endoplasmatische Calcium Transporter (SERCA2B).

1.5. Genetik des Morbus Alzheimer

Während vor einer Dekade die neurodegenerative Erkrankungen, wie die Alzheimersche Krankheit, noch zu den pathogenetisch schlecht verstandenen Krankheiten zählten, führte nicht zuletzt die Entdeckung von drei autosomal dominanten Gendefekten (Amyloid Precursor Protein (APP), Presenilin 1, Presenilin 2) sowie einem genetischen Risikofaktor (Apolipoprotein E) zu einem besseren Verständnis pathogenetischer Kaskaden, die den neuropathologischen Veränderungen bei Morbus Alzheimer zugrunde liegen. Obwohl alle bisher bekannten Gendefekte gemeinsame Merkmale, wie etwa die vermehrte Bildung des Amyloid β , besitzen, ist inzwischen klar, dass es sich bei Morbus Alzheimer um ein multifaktorielles Syndrom, dem genetisch komplexe und heterogene Erkrankungen zugrunde liegen, und nicht um eine einheitliche Krankheit handelt. Nachdem sich diese pathogenetische Heterogenität derzeit weder durch klinische noch durch neuropathologische Untersuchungen nachweisen lässt, kann der Einblick in molekulare Mechanismen und die Definition der Erkrankung auf molekularer Ebene zur Entwicklung neuer und der Heterogenität Rechnung tragender Konzepte für die Prävention und Therapie beitragen.

1.5.1. Dominant vererbte Gendefekte bei Morbus Alzheimer mit frühem Erkrankungsbeginn (EOAD)

Durch genetische Kopplungsuntersuchungen wurden in den letzten Jahren drei Gene identifiziert, deren Mutationen die Krankheitsursache für familiäre Alzheimer-Fälle mit frühem Erkrankungsbeginn (vor dem 65. Lebensjahr) sind (Tabelle 1). Bei dem ersten dieser Gene handelt es sich um das *Amyloid Vorläufer Protein (APP)* Gen, das auf Chromosom 21 lokalisiert ist (Goate, et al., 1991; Heston, et al., 1991; St George-Hyslop, et al., 1987). Die Vermutung, dass auf Chromosom 21 ein "Alzheimer-Gen" liegt, hatte man schon länger, denn Patienten, die an Trisomie 21 leiden und ein überzähliges Chromosom 21 besitzen, entwickeln fast ausnahmslos ab dem vierzigsten Lebensjahr Alzheimersche Veränderungen im Gehirn. Zudem ist der Hauptbestandteil der Alzheimerschen Plaques, das A β , ein proteolytisches Abbauprodukt des APP. Derzeit sind sechs verschiedene Mutationen des *APP* Gens bekannt, die jeweils zu einem Aminosäureaustausch im Bereich der für die Amyloidpathogenese relevanten Sekretaseschnittstellen führen. Die Untersuchung zahlreicher Alzheimerfamilien zeigte jedoch, dass Mutationen des *APP* Gens weltweit bei nicht mehr als 20 Familien für die Krankheit verantwortlich sind.

Etwa 50% der Familien mit autosomal dominantem Erbgang weisen vielmehr genetische Koppelung mit einem Genort auf Chromosom 14 auf (Schellenberg, et al., 1992). Durch positionelles Klonieren konnte das zweite, heute als *Presenilin 1 (PS1)* bezeichnete Gen identifiziert werden (Sherrington, et al., 1995). Etwa 1-2% aller Alzheimer Fälle weltweit dürften auf Mutationen im *PS1* Gen zurückzuführen sein. Die Mutationen des *PS1* sind im gesamten kodierenden Abschnitt des Gens zu finden. Beinahe alle *PS1* Mutationen weisen eine vollständige Penetranz auf und das mittlere Manifestationsalter beträgt 45 Jahre mit einer Variation zwischen 29 und 56 Jahren. Das Erkrankungsalter korreliert in einzelnen Familien sehr stark und es liegt ein systematischer Zusammenhang zwischen dem mittleren Erkrankungsbeginn und der spezifischen Region im *PS1* Gen vor.

Das dritte isolierte "familiäre" Alzheimer-Gen liegt auf Chromosom 1 und kodiert für *Presenilin 2 (PS2)*. Es wurde aufgrund seiner 67%igen Homologie mit *PS1* identifiziert (Barinaga, 1995).

Tabelle 1: Monogen vererbte Gendefekte

Gen	Chromosom	Erkrankungsalter (Jahre)	Anteil an Alzheimer-Fällen insgesamt
<i>APP</i>	21	39-67	<0,5%
<i>PS1</i>	14	29-56	1-2%
<i>PS2</i>	1	40-85	<0,1%

Für die genetische Diagnostik ist von Bedeutung, dass 70% der *PS1*- und *PS2*-Mutationen nur in einer einzigen Familie oder bei einem Patienten auftreten und gleichsam genetisch "private" Mutationen sind (Tanzi, et al., 1996). Dadurch bleiben neue Patienten oder neue Familien bei einer Suche nach bekannten Mutationen mit hoher Wahrscheinlichkeit unerkannt. Eine prädiktive genetische Diagnostik des familiären Morbus Alzheimer mit frühem Erkrankungsbeginn ist wegen dieser "privaten" Mutationen sowie derzeit fehlender Behandlungsmöglichkeiten mit großen Problemen behaftet (Propping, et al., 1994).

1.5.2. Morbus Alzheimer mit spätem Erkrankungsbeginn (LOAD)

Die überwiegende Mehrzahl aller Alzheimer Fälle treten nach dem 65. Lebensjahr auf (Late Onset Alzheimer's Disease, LOAD) und weisen kein eindeutiges Vererbungsmuster auf. Zwar tritt eine gewisse familiäre Häufung auf, die jedoch keinem klassischen Mendelschen Erbgang folgt. Im Gegensatz zu dominant vererbten Gendefekten, die eine Krankheit determinieren, modifiziert sich bei diesen Fällen das Risiko zu erkranken durch die Akkumulation von genetischen und/oder umweltbedingten Suszeptibilitätsfaktoren (Bertram, et al., 2007), die verdeutlichen, dass es sich bei Morbus Alzheimer um eine komplexe und genetisch heterogene Erkrankung handelt. Die Suszeptibilitätsfaktoren können dabei sowohl einen pathogenen Effekt besitzen, als auch schützend wirken. Für die sporadischen Alzheimer Fälle konnte 1993 mit dem *Apolipoprotein E* ϵ 4-Allel erstmals ein genetischer Risikofaktor gefunden werden (Corder, et al., 1993; Saunders, et al., 1993b; Strittmatter, et al., 1993), der zwar das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken erhöht, aber entgegen den autosomal dominant vererbten Gendefekten nicht

deterministisch wirkt.

1.5.3. Apolipoprotein E (APOE)

Mit Hilfe von Linkage-Untersuchungen (Pericak-Vance, et al., 1991) sowie Assoziationsuntersuchungen (Saunders, et al., 1993b) wurde sowohl für die sporadischen als auch für die familiären Spätformen des Morbus Alzheimer ein Zusammenhang des Krankheitsphänotyps mit dem *Apolipoprotein E (APOE)* Gen beschrieben (Saunders, et al., 1993a; Saunders, et al., 1993b; Strittmatter, et al., 1993). Das *APOE* Gen auf Chromosom 19 hat drei Allele ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) (Zannis, et al., 1981), die drei unterschiedliche Isoformen kodieren. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Häufigkeit des *APOE* $\epsilon 4$ -Allels bei Alzheimer Patienten im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrollgruppen etwa um das dreifache erhöht ist, und die Zahl der $\epsilon 4$ -Allele den Erkrankungsbeginn (Age-at-Onset, AAO) nach einem Gen-Dosis Muster beeinflusst (Blacker, et al., 1997; Corder, et al., 1993; Katzman, 1994; Mayeux, et al., 1993; Rebeck, et al., 1993; Saunders, et al., 1993a; Slioter, et al., 1998; Strittmatter, et al., 1993; Yu, et al., 1994; Zubenko, et al., 1994). Individuen mit zwei Kopien des *APOE* $\epsilon 4$ -Allels (2% einer kaukasischen Population) haben ein 50-90%iges Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken, während Individuen mit einem *APOE* $\epsilon 4$ -Allel (15% einer kaukasischen Population) ein 45%iges Risiko haben, die Krankheit zu entwickeln (Corder, et al., 1993). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Träger des *APOE* $\epsilon 2$ -Allels ein geringeres Risiko haben, an Morbus Alzheimer zu erkranken und dass die Krankheit bei diesen Menschen später auftritt (Corder, et al., 1994; Lipka, et al., 1997).

APOE ist ein polymorphes Protein mit einem Molekulargewicht von 34 kDa und drei Isoformen: APOE2, APOE3 und APOE4 (Mahley, 1988). APOE wird im Hirngewebe vor allem von Astrozyten synthetisiert und sezerniert (Pitas, et al., 1987), in geringerem Ausmaß auch von Neuronen (Bao, et al., 1996; Diedrich, et al., 1991). APOE ist Bestandteil mehrerer Plasma-Lipoproteine, ist in den Lipoproteintransport involviert und hat bei der Hirnentwicklung und Regeneration nach peripheren Nervenverletzungen spezifische Funktionen (Mahley, 1988; Poirier, 1994; Uchihara, et al., 1995). APOE hat isoformspezifische Effekte auf das Neuritenwachstum, wobei APOE3 das Wachstum stimuliert und APOE4 es inhibiert (Handelmann, et al., 1992; Nathan, et al., 1994; Weidemann, et al., 1989; Yu, et al., 2001; Zubenko, et al., 1994). *In vivo* wird APOE mit den neuritischen Plaques und den Neurofibrillen assoziiert (Dickson, et al., 1995; Namba,

et al., 1991; Poduri, et al., 1994; Strittmatter, et al., 1993; Wisniewski and Frangione, 1992). APOE scheint auch isoformspezifische A β -Bindung zu entfalten, wobei unter bestimmten Bedingungen APOE4 schneller und effektiver A β bindet als APOE3. Allerdings bindet leicht lipidiertes APOE3 an A β Peptid mit einer 20-fach höheren Affinität als APOE4. Diese stärkere Bindung von APOE3 könnte die Löslichkeit des APOE4-A β Komplexes begünstigen und so die Umwandlung von A β in die neurotoxische Form verhindern (LaDu, et al., 1995). Dem APOE2 und dem APOE3 wird dagegen eine schützende Wirkung zugeschrieben. Sie sollen die normale Phosphorylierung des Proteins Tau gewährleisten und dadurch die Bildung der Alzheimerschen Neurofibrillen verhindern (Strittmatter et al., 1994).

Obwohl die Kenntnis der Pathophysiologie des APOE für das Verständnis der Ätiologie der AD sehr wichtig ist, stellt die Genetik des APOE doch nur einen Teilaspekt der Erkrankung dar. Es können auch Individuen an Morbus Alzheimer erkranken, die nicht Träger des *APOE* ϵ 4-Allels sind, und umgekehrt entwickeln einige ϵ 4-Genträger zeitlebens keine nachweisbare AD Symptomatik. Der *APOE*-Genotyp stellt daher weder eine notwendige noch eine hinreichende Bedingung für die Entstehung der AD dar und das *APOE* ϵ 4-Allel ist nur zu ca. 50% an der genetischen Prädisposition für LOAD beteiligt (Pericak-Vance and Haines, 1995). Folglich müssen weitere genetische Faktoren und/oder Umwelteinflüsse existieren, die das Erkrankungsrisiko für AD modifizieren.

1.5.4. Weitere Suszeptibilitätsgene

Auf der Suche nach weiteren genetischen Risikofaktoren für sporadische Alzheimer-Fälle werden im Wesentlichen zwei Strategien angewendet. Zum einen untersucht man "Kandidatengene", die in der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit eine potentielle Rolle spielen. So wurden eine ganze Reihe weiterer Suszeptibilitätsgene für Morbus Alzheimer beschrieben, deren weitere Untersuchung bisher jedoch zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen führte. Mit Hilfe dieser Strategie konnte bisher kein Suszeptibilitätsgen gefunden werden, das wie das *Apolipoprotein E* Gen in verschiedenen ethnischen Gruppen das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken deutlich modifiziert.

Bei der zweiten Strategie versucht man zunächst mit Hilfe von Kopplungsuntersuchungen die chromosomale Lokalisation eines Genortes möglichst eng einzugrenzen, um dann nach möglichen Kandidaten in dieser Region zu suchen. Auf diese Weise konnten mögliche

Genorte für sporadische Formen des Morbus Alzheimer unter anderem auf Chromosomen 9, 10 und 12 nachgewiesen werden (Blacker, et al., 2003; Kehoe, et al., 1999; Myers, et al., 2002; Pericak-Vance, et al., 1997). Mittels Linkage-Disequilibrium Analyse wurde eine breite Region auf Chromosom 10 zwischen 10q21 und 10q25 beschrieben, die mit dem Risiko für AD (Bertram, et al., 2000; Myers, et al., 2000) oder mit dem Plasmalevel von A β ₄₂ (Ertekin-Taner, et al., 2000) assoziiert ist. Innerhalb dieser Linkageregion befinden sich mehrere funktionelle Kandidatengene, wie z.B. *Insulin Degrading Enzyme (IDE)* (Kurochkin and Goto, 1994; Qiu, et al., 1998), *Urokinase-Type Plasminogen Activator (PLAU)* (Tucker, et al., 2000), *α -3 Catenin (VR22)* (Janssens, et al., 2001), *Glutathione-S-Transferase Omega 1 (GSTO1)* (Li, et al., 2003), *Glutathione-S-Transferase Omega 2 (GSTO2)* (Li, et al., 2003), *Protease Serine 11 (PRSS11)* (Li, et al., 2003), *Choline Acetyltransferase (CHAT)* (Ozturk, et al., 2006), *Cholesterol 25-Hydroxylase (CH25H)* (Papassotiropoulos, et al., 2005) und *Dynamin Binding Protein (DNMBP)* (Kuwano, et al., 2006). Für alle diese Gene sind jedoch widersprüchliche Ergebnisse beschrieben.

Bisher wurde bei genetischen Untersuchungen überwiegend nach Suszeptibilitätsgenen gesucht, während dem Erkrankungsalter wenig Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Jedoch sind Kenntnisse über Faktoren, die den Erkrankungsbeginn beeinflussen, sehr wichtig. Ein Hinauszögern des Erkrankungsalters des Morbus Alzheimer um 5 Jahre würde die Prävalenz halbieren. Das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer scheint auch genetisch kontrolliert zu sein und auf Chromosom 10 befindet sich ein Linkagepeak für den Erkrankungsbeginn, mit mehreren Genloci, die für die Kontrolle des Erkrankungsalters verantwortlich sein könnten (Li, et al., 2002). In dieser Region sind mehrere Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) der Gene *GSTO1*, *GSTO2* und *PRSS11 (HtrA1)* lokalisiert, die das Erkrankungsalter der familiären Alzheimer Fällen modifizieren sollen (Li, et al., 2003; Li, et al., 2006). Andere Studien zeigen jedoch, dass die von Li et al. (Li, et al., 2003) beschriebenen SNPs der Gene *GSTO1*, *GSTO2* und *PRSS11* nicht relevant für den Erkrankungsbeginn bei sporadischen Alzheimer Fällen sind (Kolsch, et al., 2004; Ozturk, et al., 2005). Diese widersprüchlichen Ergebnisse zeigen, dass weitere SNPs in diesen Regionen untersucht werden müssen.

1.6. High Temperature Requirement Protein A1 (HtrA1)

Auf Chromosom 10q26 in der Linkageregion für das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer befindet sich das Gen *PRSS11*, das die Serinprotease HtrA1 (High Temperature Requirement Protein A1, L56) kodiert. HtrA1 gehört zu der HtrA Proteinfamilie, mit oligomerischen, ATP-unabhängigen Serinproteasen (Swamy, et al., 1983), die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Proteinqualität, bei Stresserkennung, Zellwachstum und Entzündung spielen (Clausen, et al., 2002). Sie haben mit den bakteriellen HtrA Proteinen (DegP) gemeinsame Charakteristika (Clausen, et al., 2002), wie die hoch konservierte Trypsin-Like Serine Protease Domäne und mindestens eine PDZ Domäne am C-Terminus (Abb. 4).

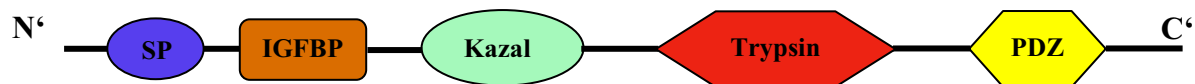


Abb.4: Das High Temperature Requirement Protein A1 (HtrA1). Am N-Terminus enthält HtrA1 ein Signalpeptid (SP) und eine Insulin Growth Factor Binding Protein (IGFBP) Domäne. Am C-Terminus sind eine Trypsin-Like Serine Protease Domäne und eine PDZ Domäne zu finden.

Die PDZ Domäne vermittelt Protein-Protein Interaktionen und ist an der Erkennung und Degradierung der partiell gefalteten oder falsch gefalteten Proteine beteiligt. Ein wichtiges Merkmal der HtrA Proteine ist, dass sie bei niedrigeren Temperaturen als Chaperone und bei hohen Temperaturen als Serinprotease fungieren und diese Aktivität reversibel in kürzester Zeit umgeschaltet werden kann (Kim and Kim, 2002; Spiess, et al., 1999).

Die HtrA Proteinfamilie besitzt vier humane Mitglieder: HtrA1 (Hu, et al., 1998; Zumbunn and Trueb, 1996), HtrA2 (Faccio, et al., 2000; Gray, et al., 2000), HtrA3 (Nie, et al., 2003) und HtrA4 (Clausen, et al., 2002). Ursprünglich wurde HtrA1 als herunterreguliertes Gen in SV40-transformierten Fibroblasten identifiziert (Zumbunn and Trueb, 1996) und ist in Tumoren hochgradig herunterreguliert (Baldi, et al., 2002; Chien, et al., 2004; Shridhar, et al., 2002). Das Protein wird ubiquitär in normalem Gewebe exprimiert und sezerniert. HtrA1 besitzt zusätzlich zu den innerhalb der HtrA Familie konservierten Domänen ein Signal Peptid (SP), eine Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Domäne und ein Serinprotease-Inhibitormotiv vom Kazal-Typ (Abb. 4). Funktionell ist HtrA1 an der Pathologie mehrerer Krankheiten beteiligt. So hat HtrA1 als

Suppressorgen protektive Wirkung auf Tumorzellwachstum und -Proliferation (Baldi, et al., 2002; Chien, et al., 2004; Nie, et al., 2003; Shridhar, et al., 2002). Andererseits ist HtrA1 in Skelettmuskulatur bei Duchennescher Muskeldystrophie (Bakay, et al., 2002) und in Knorpelgewebe osteoarthritischer Gelenke hochreguliert (Hu, et al., 1998). Zudem hat HtrA1 eine proteolytische Funktion bei der Degradierung von extrazellulären Matrixproteinen (Grau, et al., 2006), von APP und APP Fragmenten, wie CTF β und A β (Grau, et al., 2005). Die Kolokalisation von HtrA1 mit Amyloidplaques bei Morbus Alzheimer (Grau, et al., 2005) und seine APP- und A β - abbauende Funktion lassen eine Rolle von HtrA1 auch bei Morbus Alzheimer vermuten.

Die Bildung von unlöslichen extrazellulären Ablagerungen von aggregiertem A β ist ein wesentliches Merkmal des Morbus Alzheimer. Ähnliche extrazelluläre Ablagerungen sind bei Patienten zu finden, die an altersbedingter Makuladegeneration (Age-related Macular Degeneration, AMD) erkrankt sind. Diese Ablagerungen, die sogenannten Drusen (Abb. 5), sind unter der Basalmembran des Netzhautepithels und in der Bruchschens Membran lokalisiert.

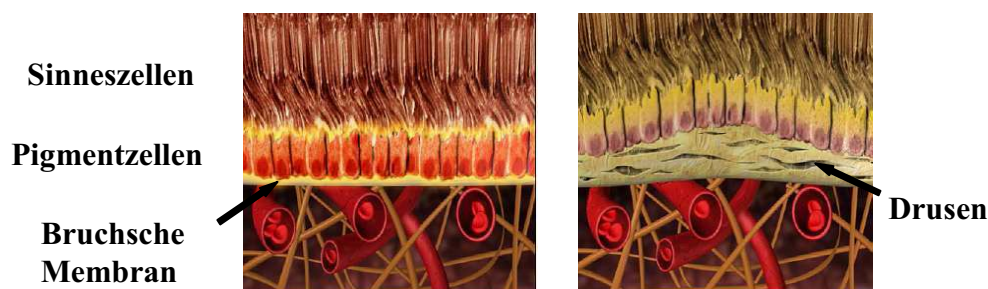


Abb. 5: Veränderungen in der Netzhaut bei altersbedingter Makuladegeneration (AMD). In der Bruchschens Membran bilden sich Drusen, die u.a. APP und A β Peptid enthalten (Quelle: <http://www.acto.de/media/pdf/AMD-Patientensymposium%20acto.swf>).

Neue Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Drusen der AMD und die Plaques bei Morbus Alzheimer gemeinsame pathologische Merkmale besitzen. So beinhalten die Amyloidplaques ein breites Spektrum an Lipiden und Proteinen, die auch in den Drusen zu finden sind. Dazu zählen Vitronectin, APP, APOE und A β . Zudem befinden sich ähnliche Entzündungsmediatoren und Immunfaktoren sowohl in den Drusen, als auch in den Plaques. Dies deutet auf vergleichbare Entzündungswege bei Morbus Alzheimer und AMD hin (Hageman, et al., 2001; Johnson, et al., 2002; Johnson, et al., 2001). Ähnlich wie Morbus Alzheimer, ist AMD eine altersbedingte Krankheit, die unter dem Einfluss von genetischen und exogenen Faktoren steht. Assoziationsstudien haben einen Locus auf

Chromosom 10q26 für AMD identifiziert (Maller, et al., 2006; Rivera, et al., 2005), auf dem sich u.a. ein SNP in der Promoterregion des *HtrA1* Gens befindet. Dieser SNP, rs11200638, wurde als Risikofaktor für AMD beschrieben (Dewan, et al., 2006; Yang, et al., 2006).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Der genetische Hintergrund der Alzheimer Krankheit ist komplex, wobei mehrere Gene und Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Das bisher einzige bestätigte Suszeptibilitätsgen für Morbus Alzheimer ist das $\epsilon 4$ -Allel des *Apolipoprotein E* Gens (*APOE*). Der wesentliche Bestandteil der senilen Plaques ist das Amyloid β Peptid ($A\beta$), das auch in den vesikulären Komponenten bei Age-Related Macula Degeneration (AMD) zu finden ist. Vor kurzem ist der Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) rs11200638 in der Promoterregion des *HtrA1* Gens als Risikofaktor für AMD beschrieben worden. Aufgrund der gemeinsamen pathologischen Charakteristika von Morbus Alzheimer und AMD könnte die Ätiologie dieser zwei Krankheiten von gemeinsamen genetischen Faktoren beeinflusst werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Assoziation zwischen dem SNP rs11200638, der in der Promoterregion des *HtrA1* Gens liegt, und dem Erkrankungsalter bzw. dem Risiko für Morbus Alzheimer zu untersuchen. Zunächst wird dieser SNP in einer Kohorte von Morbus Alzheimer Patienten und Kontrollen analysiert, bei denen Informationen über Erkrankungsbeginn bzw. Alter vorhanden ist. Der rs11200638-Genotyp wird mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bestimmt. Des Weiteren wird der Einfluss des *HtrA1* Promoter SNP auf den Erkrankungsbeginn des Morbus Alzheimer in Zusammenhang mit *APOE* statistisch analysiert.

Um der Frage nachzugehen, ob *HtrA1* auch eine funktionelle Bedeutung für Morbus Alzheimer besitzt, wird zunächst der Einfluss des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 auf neuropathologische Charakteristika des Morbus Alzheimer untersucht. Die Zahl der senilen Plaques und neurofibrillären Tangles wird an humanem Autopsiegewebe von Alzheimer Patienten bestimmt und statistisch in Zusammenhang mit dem *HtrA1* SNP rs11200638 analysiert und für *APOE* korrigiert.

Die funktionelle Bedeutung von *HtrA1* für Morbus Alzheimer wird weiter auf RNA Ebene analysiert. Mittels Real-Time PCR wird die *HtrA1*-RNA-Expression in humanem Autopsiehirngewebe von Alzheimer Patienten und Kontrollen bestimmt.

In Zellkulturexperimenten wird ein möglicher Regulationsmechanismus von HtrA1 untersucht. In Reporterstudien wurde gezeigt, dass AICD transaktivierendes Potential besitzt. Da AICD bei der Abspaltung von APP gleichzeitig mit A β entsteht, wird hier analysiert, ob die AICD-Überexpression in Neuroblastom-Zellen die Expression von HtrA1 beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammer Mupid exU	Advance, Japan
Gel Dokumentationssystem BioDocAnalyse	Biometra GmbH, Göttingen
Ultra-Turrax T8	IKA Labortechnik, Staufen
7500 Fast Real-Time	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermocycler Primus	MWG-Biotech, Ebersberg
Thermomixer HLC	Haep Labor Consult, Borenden
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturmikroskop Olympus IX 50	Olympus, Hamburg
Zellkulturzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zellkulturinkubator HeraCell	Heraeus, Hanau
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach
Sequenzierautomat 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, USA
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator T65	HP Labortechnik, Oberschleißheim

2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Analysenqualität (pro analysi) von den Firmen Merck (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Lieferanten spezieller Chemikalien, Biochemikalien und Materialien sind in der folgenden Tabelle zu finden.

Chemikalien/ Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-well Platten für Real-Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Sybr Green	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq PCR Master Mix	Qiagen, Hilden

2.1.3. Zellkulturmaterial und Zellkulturzusätze

RPMI1640 Medium	PAA, Cölbe
Trypsin-EDTA	PAA, Cölbe
Streptomycin und Penicillin	PAA, Cölbe
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Doxycycline	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Solon, Ohio

2.1.4. Zelllinien

SHEP-SF: humane Neuroblastom-Zelllinie

2.1.5. Oligonukleotide

Abkürzung	Sequenz
Primer für PCR humaner Proben	
HtrA111_s	ATG CCA CCC ACA ACA ACT TT
HtrA111_as	CGC GTC CTT CAA ACT AAT GG
HtrA112_s	CGG ATG CAC CAA AGA TTC TCC
HtrA112_as	TTC GCG TCC TTC AAA CTA ATG G
HtrA1k1_s	GAC GTG TGA AGG ATT CTA TTC GAA
HtrA1k1_as	GCA CGC GGG ACC CTG
HtrA1k2_s	GCA TGC CAC CCA CAA CAA
HtrA1k2_as	GCG TTG CGG CAC CG
APOE12_s	CTG GGC GCG GAC ATG GAG
APOE12_as	GCA GGT GGG AGG CGA GGC
APOE34_s	GGC CAG AGC ACC GAG GAG
APOE34_as	GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A
Primer für Real-Time PCR humaner Proben	
HtrA1rt_s	CGC ATG CCA CCC ACA ACA A
HtrA1rt_as	CGC ACG CGG GAC CCT G
GAPDH_s	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC
GAPDH_as	CAT ACC AGG AAA TGA GCT TGA CAA
AICD50_s	TCC ATT CAT CAT GGT GTG GT
AICD50_as	TGC ATC TGC TCA AAC TTG

2.1.6. Lösungen, Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Lösung	Zusammensetzung, Hersteller
TBE-Puffer 0,5x	44,5 mM Tris-HCl pH 8,2 44,5 mM Borsäure 1 mM EDTA
DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysepuffer (Gewebe)	100 mM Tris-HCl, pH 8,5 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,2% SDS
DNA-Fällungsreagenz	10 µl 3 M Natriumacetat 250 µl EtOH 80 µl H ₂ O
10x MOPS-Puffer	20 mM MOPS 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA pH 7 mit NaOH einstellen
RNA-Agarosegel (1%)	1 g Agarose 74 ml H ₂ O 10 ml MOPS-Puffer (10x) nach Aufkochen auf ca. 60°C abkühlen lassen 16 ml Formaldehyd (37%)
RNA-Laufpuffer	100 ml MOPS-Puffer (10x) 100 ml Formaldehyd (37%) 800 ml H ₂ O
RNA-Probenpuffer	50% Formamid 6,5% Formaldehyd 1x MOPS-Puffer

2.1.7. Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Eag</i> I	New England Biolabs, Frankfurt Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Hha</i> I	New England Biolabs, Frankfurt Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Kpn</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Eco52</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.8. Antikörper

Antikörper	Antigen	Hersteller	Verdünnung
6F/3D	A β	Dako	1:1000
AT8	Tau	Innogenetics	1:2000

2.1.9. Verwendete Kits

Kit	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
innuPREP DNA Mini Kit	Analytik Jena, Jena
cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.1.10. Verwendete Software

Software	Hersteller
Primer Express	Applied Biosystems, Darmstadt
7500 ABI Real Time	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequencher	GenCode, USA
SAS 9.1	SAS Institut, USA
SPSS 14.0.1	SPSS Inc, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. DNA-Arbeitstechniken

2.2.1.1.1. DNA-Isolierung aus gefrorenem Hirngewebe

15 mg gefrorenes Hirngewebe wurde mit 500 µl Lysepuffer und 25 µl Proteinase K versetzt und für mehrere Stunden bei 56°C schüttelnd inkubiert. Das Lysat wurde mit 350 µl Isopropanol gut gemischt und anschließend bei 20 000 x g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DANN-enhaltende Pellet mit 1 ml EtOH gewaschen und weitere 10 min bei 20 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 200 µl Puffer AL resuspendiert und weiter nach Herstellerangaben mit dem DNA Mini Kit (Qiagen) isoliert.

2.2.1.1.2. DNA-Isolierung aus Formalin-fixiertem Hirngewebe

Das in Paraffin eingebettetes Material wurde in ca. 5 µm dicke Scheiben geschnitten, mit 1200 µl Xylol versetzt und 15 min bei 56°C schüttelnd inkubiert. Das gelöste Paraffin wurde durch Zentrifugieren für 5 min bei 20 000 x g entfernt. Um ggf. noch vorhandenes Paraffin zu entfernen, wurde das Gewebe erneut mit 1200 µl Xylol für 10 min bei 56°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (20 000 x g, 5 min). Das Gewebe wurde 2x mit

1000 μl EtOH (100%) gewaschen (5 min, 20 000 x g). Das Pellet wurde getrocknet (10 min bei 50°C), mit 400 μl Lyse-Puffer TLS und Proteinase K versetzt oder mit 180 μl Puffer ATL und Proteinase K versetzt, resuspendiert und weiter mit dem innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena) bzw. DNA Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.1.1.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Proben wurden photometrisch bei 260 und 280 nm vermessen. Eine optische Dichte $\text{OD}_{260}=1,0$ entspricht einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, das Aufschluss über die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure gibt, sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.1.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde für die Amplifikation der HtrA1- und APOE-Fragmente eingesetzt, die weiter mit RFLP analysiert wurden. Als Template wurde 50 ng DNA eingesetzt, die Zyklenzahl und Annealing- Temperaturen wurden an die verwendeten Primer angepasst und optimiert.

Für die HtrA1-PCR mit der DNA, die aus Leukozyten gewonnen wurde, wurde folgender Ansatz verwendet:

1 μl DNA (50 ng/ μl)

3 μl Buffer (10x)

250 μM dNTPs

600 nM sense Primer (HtrA111_s oder HtrA112_s)

600 nM antisense Primer (HtrA111_as oder HtrA112_as)

1 U Taq Polymerase

5% DMSO

ad 30 μl H_2O

oder

1 µl DNA (50 ng/µl)
600 nM sense Primer (HtrA111_s oder HtrA112_s)
600 nM antisense Primer (HtrA111_as oder HtrA112_as)
15 µl Taq PCR Master Mix
ad 30 µl H₂O

Für die PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Initiale Inkubation: 95°C für 5 min
2. Denaturierung: 94°C für 30 sec
3. Annealing: 52°C für 30 sec
4. Elongation: 72°C für 45 sec
5. Wiederholung der Schritte 2-4 für 35 Zyklen

Für die HtrA1-PCR mit DNA, die aus Formalin-fixiertem Material isoliert wurde, wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µl DNA (50 ng/µl)
600 nM sense Primer (HtrA1k1_s oder HtrA1k2_s)
600 nM antisense Primer (HtrA1k1_as oder HtrA1k2_as)
20 µl Taq PCR Master Mix
ad 40 µl H₂O

Für die PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Initiale Inkubation: 95°C für 5 min
2. Denaturierung: 95°C für 30 sec
3. Annealing: 70-1°C für 30 sec
4. Elongation: 72°C für 40 sec
5. Wiederholung der Schritte 2-4 für 15 Zyklen
6. Denaturierung: 95°C für 30 sec
7. Annealing: 55°C für 30 sec
8. Elongation: 70°C für 30 sec
9. Wiederholung der Schritte 6-8 für 30 Zyklen
10. 72°C für 10 min

Für die Amplifikation von APOE-Fragmenten wurden zwei PCR mit unterschiedlichen Primer durchgeführt, die mittels RFLP zur Unterscheidung der APOE ε2, ε3 oder ε4 führen. Folgender Ansatz wurde verwendet:

1 μ l DNA (50 ng/ μ l)
600 nM sense Primer (APOE12_s oder APOE34_s)
600 nM antisense Primer (APOE12_as oder APOE34_as)
20 μ l Taq PCR Master Mix
ad 40 μ l H₂O

Für die APOE12-PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Initiale Inkubation: 94°C für 5 min
2. Denaturierung: 94°C für 30 sec
3. Annealing: 58°C für 30 sec
4. Elongation: 72°C für 90 sec
5. Wiederholung der Schritte 2-4 für 35 Zyklen
6. 72°C für 10 min

Für die APOE34-PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Initiale Inkubation: 94°C für 5 min
2. Denaturierung: 94°C für 30 sec
3. Annealing: 60°C für 30 sec
4. Elongation: 72°C für 90 sec
5. Wiederholung der Schritte 2-4 für 35 Zyklen
6. 72°C für 10 min

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.1.1.5. DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch für analytische Zwecke aufgetrennt. Dazu wurde 1,5%-, 3%- oder 5%-ige Agarose-Lösung in TBE Puffer (0,5 x) angesetzt, in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht (2-3 min) und in eine abgedichtete Horizontalkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Aufzutragende Proben wurden mit 6x Auftragspuffer versetzt und schließlich bei 10-15 V/cm für 20-30 min aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (1 μ g/ml Ethidiumbromid in H₂O) für 30 min gefärbt und unter UV-Licht analysiert.

2.2.1.1.6. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Die unterschiedlichen Genotypen der *HtrA1* oder *APOE* Gene wurden mittels RFLP untersucht, indem die amplifizierte DNA-Fragmente mit einem Restriktionsenzym (*Eag* I oder *Eco52* I für *HtrA1*, *Hha* I für *APOE*) verdaut wurden, das nur eines der beiden Allele schneidet.

Folgende Ansätze wurden verwendet:

HtrA1-Verdau	APOE-Verdau
10 µl PCR-Produkt	10 µl PCR-Produkt
5 U Enzym <i>Eag</i> I oder <i>Eco52</i> I	5 U Enzym <i>Hha</i> I
2 µl Puffer 3	2 µl Puffer 4 (10 x)
	2 µl BSA (10x)
7,5 µl H ₂ O	5,5 µl H ₂ O

Der Verdau erfolgte bei 37°C für mindestens 1-3 h und wurde bei 65°C für 20 min abgestoppt. Die Restriktionsfragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anhand der Fragmentgrößen konnten die vom Enzym geschnittenen, bzw. nicht geschnittenen Fragmente identifiziert werden.

2.2.1.1.7. Sequenzanalyse der PCR-Produkte

Die Sequenzanalyse des PCR-Amplifikats diente hier zur Genotypbestimmung des SNP rs11200638, der durch RFLP-Analyse nicht möglich war. Zu Beginn wurde das PCR-Produkt aufgereinigt, um die im Reaktionsansatz enthaltenen Komponenten wie die Taq-Polymerase, die dNTPs, den Puffer und die Primer zu entfernen. Im Anschluss daran fand ein Cycle Sequencing statt. Bei dieser Methode handelt es sich um die Didesoxymethode nach Sanger (Sanger, et al., 1977), auch als Kettenabbruch-Synthese bezeichnet. Ausgehend von einem kurzen Abschnitt bekannter Sequenz, dem Primer, wird durch die DNA-Polymerase einer der beiden komplementären DNA-Stränge verlängert. Anders als bei der PCR wird nur ein Primer eingesetzt, so dass die DNA nur linear amplifiziert wird. Zunächst wird die DNA-Doppelhelix durch Erwärmung denaturiert, woraufhin Einzelstränge für das weitere Vorgehen zur Verfügung stehen.

Hier werden mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) eingesetzt. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. Diese "Kettenabbruch-ddNTPs" besitzen keine 3'-Hydroxygruppe: Werden sie in den neu synthetisierten Strang eingebaut, ist eine DNA-Verlängerung durch eine DNA-Polymerase nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-C Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte wurden anschließend mit Ethanol ausgefällt, dann mittels Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe von Laserlicht zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigten dadurch Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und konnten so von einem Detektor erkannt werden. Die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erschienen, gab direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit den Daten von GenBank (National Center of Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) verglichen.

Aufreinigung: Das PCR-Produkt wurde mittels MinElute[®] PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt konnte für das Cycle Sequencing eingesetzt werden.

Cycle Sequencing: Für die Cycle-Sequenzreaktion wurde das Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems verwendet. Da die Reaktion mit einem Primer abläuft, wurde für eine Probe zwei Ansätze erstellt: ein Ansatz enthielt den sense- und ein Ansatz den antisense-Primer aus der PCR. Dieser enthielt folgende Komponenten:

10,8 µl	H ₂ O
2,0 µl	Sequenzier-Mix
3,0 µl	5x Puffer
1,0 µl	PCR-Produkt (aufgereinigt)
1,0 µl	Primer (1 pmol/µl)

Das Programm für das Cycle-Sequencing:

1. 96°C 1°C/sec
2. 96°C für 10 sec
3. 50°C 1°C/sec
4. 50°C für 5 sec
5. 60°C 1°C/sec
6. 60°C für 2 min
7. Wiederholung der Schritte 1-6 für 25 Zyklen

Produktfällung durch Ethanol: Die entstandenen Kettenabbruchprodukte wurden mit 340 µl Fällungsreagenz versetzt. Nach anschließendem Vortexen wurde die Probe 15 min im Dunkeln inkubiert. Nachdem der Ansatz für 30 min bei 20000 x g zentrifugiert wurde, wurde zum Waschen des Pellets 400 µl EtOH (70%) hinzugegeben. Nach Zentrifugation (15 min, 20000 x g) wurde der Überstand abgesaugt und der Ansatz für 10 min bei 37°C mit geöffnetem Deckel inkubiert, damit das restliche EtOH verdunsten kann.

Sequenzanalyse: Für die Analyse der Sequenzen wurde die Probe mit 20 µl HiDi™ Formamid (Applied Biosystems, Darmstadt) versetzt, vorsichtig gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung komplett in das Sequenziergefäß (ohne Luftblasen) überführt, in den Sequenzierautomaten (Applied Biosystems, Darmstadt) gestellt und der Lauf gestartet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Sequencher und die sich daraus ergebende Sequenzen wurden mit den Daten von GenBank verglichen (NM_002775).

2.2.1.1.8. Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde zur quantitativen Analyse von HtrA1 und AICD genutzt. Als Referenzgen diente das „house-keeping“ Gen GAPDH. Alle Analysen wurden mit Sybr Green (Applied Biosystems, Darmstadt) als Fluorophor durchgeführt. Da diese Methode sehr sensitiv ist, wurde die eingesetzte cDNA 1:2 bis 1:4 mit H₂O verdünnt. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 μ l cDNA
- 4,5 μ M Primer sense
- 4,5 μ M Primer antisense
- 7,5 μ l Sybr Green Master-Mix (2x)
- 4,5 μ l H₂O

Die Reaktionsbedingungen waren:

1. Initiale Inkubation: 50°C für 2 min
2. Enzymaktivierung: 95°C für 10 min
3. Denaturierung: 95°C für 15 sec
4. Annealing und Elongation: 60°C für 60 sec
5. Wiederholung Schritte 3 und 4 für 40 Zyklen

Die Real-Time PCR Analysen wurden stets als Triplikate durchgeführt.

Die Auswertung der Real-Time PCR Daten erfolgte nach der $\Delta\Delta$ Ct Methode. Zunächst wurde für jede Analyse eine Basislinie festgelegt, durch die das Grundrauschen der Analyse minimiert wird. Daraufhin wurde ein Schwellenwert der Fluoreszenzintensität festgelegt, bei dem die Analyse durchgeführt werden sollte. Der Schwellenwert wurde so definiert, dass alle Proben der Analyse in der exponentiellen Phase der Amplifikation ausgewertet werden konnten. In der exponentiellen Phase ist die PCR nicht durch Mangel an Matrize, Primer oder Enzym limitiert. Dann wurde für jede Probe der dem Schwellenwert zugehörige Ct Wert bestimmt und mit dem Ct Wert der GAPDH Analyse verrechnet (Δ Ct = Ct_{Gen} - Ct_{GAPDH}). Dies wurde in Analogie für die Kontrolle berechnet, bzw. für die nicht-induzierten Zellklone. Aus den so erhaltenen beiden dCt Werten wurde die Differenz gerechnet (z.B. $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct_{Kontrolle} - Δ Ct_{AD}). Der $\Delta\Delta$ Ct Wert in Potenz zur Basis 2 ergab schließlich den Regulationsfaktor. Bei einer Hochregulation des Gens ist dieser bei der angegebenen Berechnung >1, ist das Gen herunterreguliert, ist der Regulationsfaktor <1.

2.2.1.2. RNA-Arbeitstechniken

2.2.1.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA Synthese

15 mg Gewebe aus dem frontalen Kortex wurden in 350 μ l RLT Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) auf Eis mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen wurden $3 \cdot 10^6$ Zellen in 350 μ l RLT Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) resuspendiert und mehrmals mit der Pipette lysiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus Kortex oder kultivierten Zellen mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

Isolierte RNA wurde mit dem cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben, wobei 1 μ g (cerebrales Gewebe) bzw. 250 ng (Zelllinien) Gesamt-RNA eingesetzt wurde.

2.2.1.2.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Proben wurden photometrisch bei 260 und 280 nm vermessen. Eine optische Dichte $OD_{260}=1,0$ entspricht einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} , welches Aufschluss über die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure gibt, sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.1.2.3. RNA-Qualitätskontrolle

Einzelsträngige RNA kann Sekundärstrukturen ausbilden, die zu unberechenbaren Änderungen des Laufverhaltens im elektrischen Feld führen können. Um das zu verhindern, wurde die RNA unter denaturierenden Bedingungen im RNA-Agarosegel aufgetrennt. Die RNA-Probe wurde mit 2,5x RNA-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 60°C denaturiert. Anschließend wurde die Probe mit Auftragspuffer markiert, auf das RNA-Agarosegel aufgetragen und für ca. 1h bei 100 V getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (1 μ g/ml Ethidiumbromid in H₂O) für 30 min gefärbt und unter UV-Licht analysiert.

2.2.2. Zellbiologische Techniken

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C unter 5% CO₂ Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Das Kulturmedium RPMI1640 wurde mit 10% Kälberserum, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin versetzt. Das Serum wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56°C inaktiviert.

2.2.2.1. Humane Zelllinien

Für die Untersuchungen der HtrA1-Expression in Abhängigkeit von AICD wurde die humane SHEP-SF Zelllinie verwendet. Die Zellen wurden ca. jeden 3.-4. Tag 1:4 subkultiviert.

2.2.2.2. Subkultivierung von adhärent wachsenden Zellen

Für die Subkultivierung von adhärent wachsenden Zellen wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA für 2-3 min bei 37°C inkubiert. Sobald sich die Zellen von der Kulturschale gelöst hatten, wurden sie in frischem Medium aufgenommen, in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Ein Aliquot dieser Lösung oder eine definierte zuvor bestimmte Zellzahl wurde subkultiviert.

Für die Induktion von AICD wurden stabil transfizierte SHEP-SF nach einem Waschprotokoll behandelt. Die sich im reprimierten Zustand befindende Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, trypsiniert und auf zwei Kulturschalen in Medium mit und ohne Doxyzyklin umgesetzt. Nach 3h wurde erneut mit PBS gewaschen. Sowohl nach 24h, als auch nach 48h wurden die Zellen erneut 2x mit PBS gewaschen. 48h nach der Induktion wurden die Zellen in entsprechendes frisches Medium (mit und ohne Doxyzyklin) umgesetzt. Nach 72h wurden die Zellen in 12h Zeitabständen für die RNA-Isolierung geerntet: die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, trypsiniert und für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet bei -80°C aufbewahrt oder in entsprechenden Puffer für die RNA-Extraktion aufgenommen.

2.2.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde aus einer Zellsuspension ein Aliquot (10 μ l) entnommen, auf die Zählkammer überführt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml errechnet sich aus der Anzahl der Zellen eines Großquadrats (16 Kleinquadrate, was 1 ml entspricht) multipliziert mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor. Für jede Zellzahlbestimmung wurden vier Großquadrate ausgezählt.

2.2.2.4. Langzeitaufbewahrung der Zellen

In Gegenwart von DMSO wurden die verwendeten Zellen eingefroren und über längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert. Zellsuspensionen wurden dazu pelletiert, in ihrem Wachstumsmedium mit 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox bei -80°C eingefroren. Das Isopropanol bewirkt ein langsames Herunterkühlen der Zellsuspension (ca. 1°C pro min). Nach einem Tag bei -80°C wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt.

2.2.2.5. Auftauen von tiefgefrorenen Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml Röhrchen, in welches zuvor frisches Medium vorgelegt wurde, überführt. Die Suspension wurde 5 min bei $500 \times g$ pelletiert und anschließend das DMSO-haltige Medium abgesaugt. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und anschließend in einer Kulturflasche im Brutschrank inkubiert.

2.2.3. *In situ* Nachweis und Quantifizierung der Plaques und neurofibrillären Tangles

Der Nachweis der Plaques und NFTs wurde an immunhistochemisch gefärbten Paraffinschnitten des frontalen und temporalen Kortex durchgeführt. Die Plaques wurden mittels A β und die NFTs durch Tau-Färbung detektiert. Die Tau-positiven Plaques wurden als neuritische Plaques definiert und konnten von den diffusen Plaques unterschieden werden, bei denen kein Tau-Einschluss nachweisbar war. Die Quantifizierung erfolgte durch die Zählung der Plaques bzw. der NFTs per mm² in acht Gesichtsfelder von stark betroffenen Regionen; die ermittelten Zahlen wurden weiter statistisch evaluiert.

2.2.4. Statistische Auswertung

Morbus Alzheimer Fälle und Kontrollen wurden zuerst auf Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht (Hardy-Weinberg Equilibrium) getestet (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa.pl>).

Das Erkrankungsalter wurde als 95% Konfidenzintervall (95% Confidence Interval, CI) dargestellt. Die Mittelwerte der Erkrankungsalter wurden mittels Student's Test verglichen; im Fall von mehreren Gruppen wurde zuerst nach Bonferroni-Holm korrigiert. Für die Analyse des Einflusses der *HtrA1*- und *APOE*-Genotypen auf das Erkrankungsalter wurde ein lineares Model für Erkrankungsalter mit Geschlecht, *HtrA1*-Genotyp, *APOE*-Genotyp und die Interaktion zwischen *HtrA1* und *APOE* als Parametern gerechnet.

Das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken wurde zwischen der Alzheimer- und der Kontrollgruppe mittels logistischer Regression Analyse ausgewertet. Die Ergebnisse der logistischen Regression sind als Odds Ratio (OR) oder 95% CI angegeben.

Die „AD-freie“ Zeit (die Zeit ohne Erkrankung) in den Alzheimer- und Kontrollgruppen wurde durch die Kaplan-Meier Analyse mit Adjustierung für das Alter geschätzt und als mediane „AD-freie“ Zeit mit 95% CI dargestellt. Weiter wurde die „AD-freie“ Zeit mittels Cox Regression gerechnet, wobei die Interaktion zwischen dem *HtrA1* rs11200638 A-Allel und dem *APOE* ϵ 4-Allel als Faktor in die Analyse miteinbezogen wurde. Die Ergebnisse dieser Cox-Regression wurden als Hazard Ratio (HR) und 95% CI angegeben.

Alle Hypothesen wurden anhand eines exploratorischen Datensatzes (LOAD, n=218, EOAD, n=115) aufgestellt und in einem Bestätigungsdatensatz (LOAD, n=237, EOAD, n=97) bestätigt. Die Hypothesen wurden zudem in dem Gesamtdatensatz (LOAD, n=455, EOAD, n=212) verifiziert.

Die Plaquezahl wurde abhängig von dem Vorhandensein des *HtrA1* A-Allels durch den zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test analysiert. Die Zahlen der Alzheimer-assoziierten pathologischen Veränderungen, neuritischen Plaques und NFTs, wurden weiter logarithmisch transformiert und mittels logistischer Regression mit *HtrA1* A-Allel, *APOE* ε4-Allel, Alter und Geschlecht als Kovariaten evaluiert.

Die Unterschiede der *HtrA1*-RNA-Expression zwischen den Alzheimer- und Kontrollgruppen wurden mit dem Student's T-Test verglichen.

Alle statistischen Auswertungen wurden mit den Programmen SAS oder SPSS durchgeführt.

3. Ergebnisse

Mehrere Linkage-Untersuchungen haben eine Region auf Chromosom 10 identifiziert, die mit dem Risiko und dem Erkrankungsbeginn des Morbus Alzheimer assoziiert ist (Bertram, et al., 2000; Li, et al., 2002). Daher wird vermutet, dass in dieser Region Gene lokalisiert sind, die sowohl das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken (Bertram, et al., 2000; Myers, et al., 2000), als auch das Erkrankungsalter (Li, et al., 2002) modifizieren. In der für Morbus Alzheimer relevanten Region 10q21-10q26 befindet sich das Gen *HtrA1*. Interessanterweise befindet sich in der Promoterregion des *HtrA1* Gens ein SNP (rs11200638), welcher mit dem Risiko an altersbedingter Makuladegeneration (AMD) zu erkranken assoziiert ist (Dewan, et al., 2006; Yang, et al., 2006). Aufgrund gemeinsamer pathologischer Charakteristika von Morbus Alzheimer und AMD (Hageman, et al., 2001; Johnson, et al., 2002; Johnson, et al., 2001; Luibl, et al., 2006) wird in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, ob der SNP rs11200638 in der Promoterregion des *HtrA1* Gens mit dem Erkrankungsrisiko und dem Erkrankungsalter bei Morbus Alzheimer oder mit pathologischen Alzheimer-Veränderungen assoziiert ist. Da *APOE* der bisher einzige bestätigte Risikofaktor für Morbus Alzheimer ist (Saunders, et al., 1993a; Strittmatter, et al., 1993), der auch den Erkrankungsbeginn modifiziert (Corder, et al., 1993), wurde der *APOE*-Genotyp in die Analysen miteinbezogen, um Interaktionen zu kontrollieren.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit konzentrieren sich auf sporadische LOAD Fälle (Erkrankungsalter ≥ 65 Jahre), die die Mehrheit der betroffenen Patienten repräsentieren. Zudem sind bei sporadischen Alzheimer Fällen, anders als bei familiären Fällen, die genetischen Einflüsse komplex, da mehrere Gene gleiche Effekte besitzen können.

3.1. Der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 modifiziert das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer mit spätem Erkrankungsbeginn (LOAD)

Mittels RFLP-Analyse wurden die *HtrA1*- (Abb. 6A) und *APOE*-Genotypen (Abb. 6B und Abb. 6C) an 667 Alzheimer Patienten und 161 Kontrollen bestimmt. Von allen Fällen waren Informationen zu Erkrankungsalter, Untersuchungsalter und Geschlecht vorhanden. Zunächst wurde untersucht, ob der *HtrA1*-Genotyp das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer modifiziert.

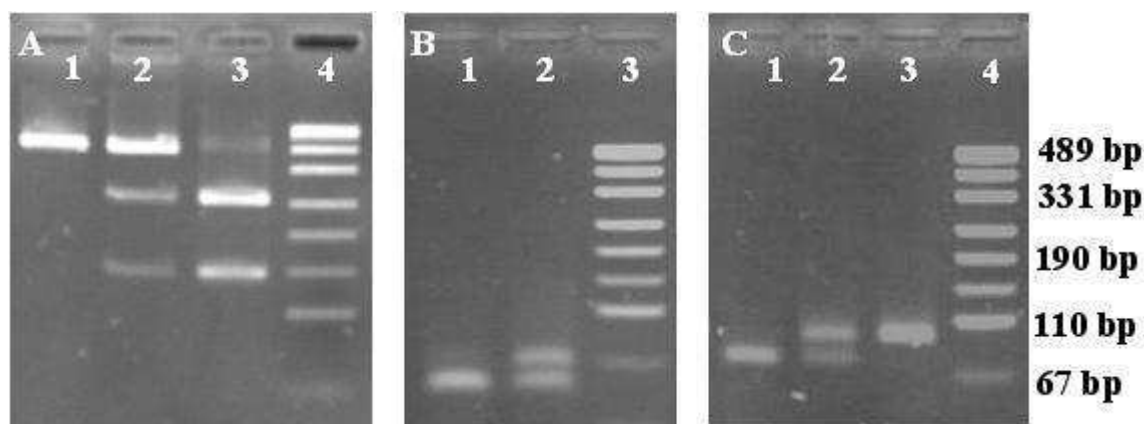


Abb. 6: Restriktionsverdau der *HtrA1* und *APOE* PCR-Fragmente. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EagI* und *HhaI* verdaut und die entstandenen Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt. **A.** Differenzierung der *HtrA1*-Genotypen; Spur 1: *HtrA1*-AA (385 bp), Spur 2: *HtrA1*-AG (385 bp, 246 bp, 139 bp), Spur 3: *HtrA1*-GG (246 bp, 139 bp), Spur 4: Marker. **B.** Diskriminierung zwischen *APOE* ϵ 2- und *APOE* ϵ 3-Allel; Spur 1: *APOE* ϵ 3/ ϵ 3 (48 bp), Spur 2: *APOE* ϵ 2/ ϵ 3 (72 bp, 48 bp), Spur 3: Marker. **C.** Differenzierung der *APOE* ϵ 3- und *APOE* ϵ 4-Allele; Spur 1: *APOE* ϵ 4/ ϵ 4 (72 bp), Spur 2: *APOE* ϵ 3/ ϵ 4 (91 bp, 72 bp), Spur 3: *APOE* ϵ 3/ ϵ 3 (91 bp), Spur 4: Marker.

Als Grundvoraussetzung wurde geprüft, ob sich die Genotypfrequenzen von *HtrA1* in der erwarteten binomischen Häufigkeit des Hardy-Weinberg Gleichgewicht befinden. Dabei zeigte sich, dass sich die Genotypverteilung des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 im Hardy-Weinberg Gleichgewicht befindet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Berechnung der Genotypfrequenzen nach Hardy-Weinberg Gleichgewicht im LOAD Datensatz

		Tatsächliche Verteilung		Erwartete Verteilung (Prozent)	Abweichung	Chi-Quadrat
		Anzahl	Prozent			
<i>HtrA1</i> -Genotyp	GG	301	0,662	0,67	0.012	0.211
	AG	143	0,314	0,30		
	AA	11	0,024	0,03		

Danach wurde der Einfluss des SNP rs11200638 auf den Erkrankungsbeginn bei LOAD Fällen untersucht. In dem exploratorischen Datensatz (n=218) zeigte sich, dass Patienten mit mindestens einem *HtrA1*-A Allel ein signifikant früheres Erkrankungsalter (um 3 Jahre) als Patienten mit *HtrA1*-GG Genotyp aufweisen ($p < 0,0002$) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Das Erkrankungsalter für sporadische LOAD Fälle im Exploratorischen, Bestätigungs- und Gesamt-Datensatz. Das Erkrankungsalter ist als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

	<i>HtrA1</i> -Genotyp	n	Erkrankungsalter	p-Wert
Exploratorischer Datensatz	GG	138	74,5 ± 6,1	<0,0002
	AG/AA	80	71,5 ± 4,5	
Bestätigungs-Datensatz	GG	163	74,4 ± 5,3	<0,001
	AG/AA	74	72,0 ± 5,3	
Gesamt-Datensatz	GG	301	74,4 ± 5,6	<0,0001
	AG/AA	154	71,7 ± 4,9	

Ein gleichartiger Effekt des *HtrA1*-Genotyps auf das Erkrankungsalter war im Bestätigungsdatensatz (n=237) zu erkennen (Tabelle 3); Träger des *HtrA1*-AG/AA Genotyps erkrankten 2,4 Jahre früher als Träger des *HtrA1*-GG Genotyps (p<0,001). Die Kumulation der zwei Datensätze zu einem gesamten LOAD Kollektiv (n=455) bestätigt den im exploratorischen Datensatz beobachteten Effekt, dass Träger des *HtrA1*-AG/AA Genotyps signifikant früher erkrankten als Patienten mit dem *HtrA1*-GG Genotyp (2,7 Jahre) (p<0,0001) (Tabelle 3, Abb. 7). Die Frage, ob die Modifizierung des Erkrankungsalters durch den *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 einem Gen-Dosis Effekt unterliegt, konnte aufgrund der geringen Anzahl von *HtrA1*-AA Trägern (n=11) nicht geklärt werden.

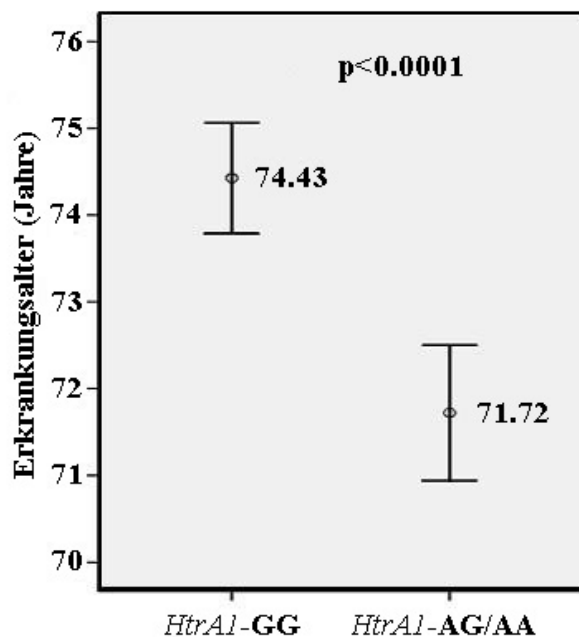


Abb. 7: Der *HtrA1*-Genotyp modifiziert das Erkrankungsalter bei LOAD. Die Unterschiede des Erkrankungsalters, die dem *HtrA1*-A Allel zugeordnet sind, wurden mit Hilfe des Student's T-Test untersucht. Das Erkrankungsalter ist als Mittelwert mit 95% CI dargestellt.

Als nächstes wurde mit Hilfe eines Kaplan-Meier Modells abgeschätzt, welchen Einfluss der *HtrA1*-Genotyp auf die Zeit bis zum Erkrankungsbeginn besitzt. Eine Zensur der „AD-freien“ Zeit (Jahre ohne Erkrankung) erfolgte mit Kontrollindividuen, die in Bezug auf Alter und Geschlecht den AD Patienten glichen. In dem gesamten LOAD Kollektiv ist das geschätzte Erkrankungsalter von *HtrA1*-AG/AA Patienten signifikant niedriger als das der *HtrA1*-GG Träger ($p < 0,0001$) (Abb. 8). Die Median-Analyse zeigte, dass 50% der *HtrA1*-AG/AA Patienten vor dem 73. Lebensjahr an AD erkranken (95% CI: 71,8-74,2), während 50% der *HtrA1*-GG Patienten vor dem 75. Lebensjahr AD entwickeln (95% CI: 74,3-75,7).

Umgekehrt sind z.B. bis zum Alter von 75 Jahren 44% der *HtrA1*-GG Patienten an Morbus Alzheimer erkrankt, während 61% der *HtrA1*-AG/AA Träger bis zu diesem Alter erkrankt sind.

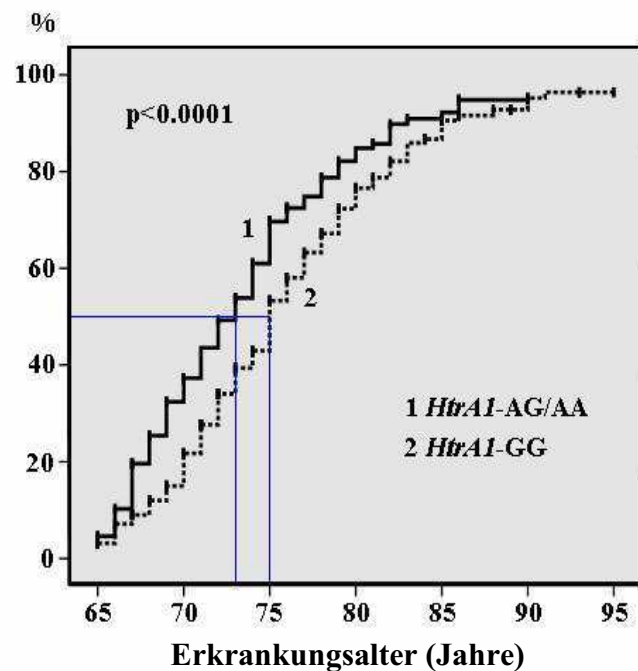


Abb. 8: Kaplan-Meier Kurven zur Darstellung des Effektes der *HtrA1*-Genotypen auf das Erkrankungsalter. Die geschätzte Zeit bis zum Erkrankungsbeginn ist für Kontrollindividuen zensiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der *HtrA1* SNP rs11200638 das Erkrankungsalter von sporadischem Morbus Alzheimer mit spätem Erkrankungsbeginn signifikant modifiziert.

3.2. Der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 hat keinen Effekt auf das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer mit frühem Erkrankungsbeginn (EOAD)

Da üblicherweise bei genetischen Studien die untersuchten Alzheimer Patienten in LOAD und EOAD eingeteilt werden, wurde als nächstes der Einfluss des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 auf das Erkrankungsalter bei EOAD untersucht. Die Abgrenzung zwischen LOAD und EOAD wurde in unserem Kollektiv bei 65 Jahren gesetzt (EOAD < 65 Jahre), da auch der Einfluss des *APOE* ϵ 4-Allel auf das Erkrankungsalter und auf das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken nur bei LOAD relevant ist.

In dem exploratorischen Datensatz (n=115) weisen die *HtrA1*-AG/AA Träger mit $57,1 \pm 5,3$ Jahren ein Erkrankungsalter auf, das sich nicht signifikant von dem der *HtrA1*-GG Patienten ($57,9 \pm 4,6$ Jahre) unterscheidet ($p=0,40$) (Tabelle 4). Ebenso war kein signifikanter Unterschied zwischen dem Erkrankungsalter der *HtrA1*-AG/AA und *HtrA1*-

GG Individuen in dem Bestätigungsdatensatz (n=97) festzustellen (p=0,60). Auch in dem gesamten Datensatz zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Erkrankungsalter der Patienten mit *HtrA1*-AG/AA Genotyp ($57,8 \pm 4,8$ Jahre) und dem der *HtrA1*-GG Träger ($58,3 \pm 4,5$) (p=0,39).

Tabelle 4: Das Erkrankungsalter für EOAD im Exploratorischen, Bestätigungs- und Gesamt-Datensatz. Das Erkrankungsalter ist als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

	<i>HtrA1</i> -Genotyp	n	Erkrankungsalter	p-Wert
Exploratorischer Datensatz	GG	79	$57,9 \pm 4,6$	0,40
	AG/AA	36	$57,1 \pm 5,3$	
Bestätigungs-Datensatz	GG	60	$58,9 \pm 4,4$	0,60
	AG/AA	37	$58,4 \pm 4,2$	
Gesamt-Datensatz	GG	139	$58,3 \pm 4,5$	0,39
	AG/AA	73	$57,8 \pm 4,8$	

3.3. Der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 ist nicht mit dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken assoziiert

In zahlreichen Linkage-Untersuchungen wird eine Assoziation der Region 10q21-10q25 mit dem Risiko für Morbus Alzheimer (Bertram, et al., 2000; Myers, et al., 2000) beschrieben. Der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 liegt in unmittelbarer Nähe dieser Region auf dem chromosomalen Abschnitt 10q26. Daher wurde zunächst untersucht, ob auch der SNP rs11200638 mit dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken assoziiert ist. Die Verteilung der *HtrA1*-Genotypen wurde bei AD Patienten und geschlechts- und altersgleichen Kontrollindividuen in Bezug auf den *HtrA1*-Genotyp verglichen. Auch hier wurde zwischen LOAD und EOAD unterschieden (Abb. 9).

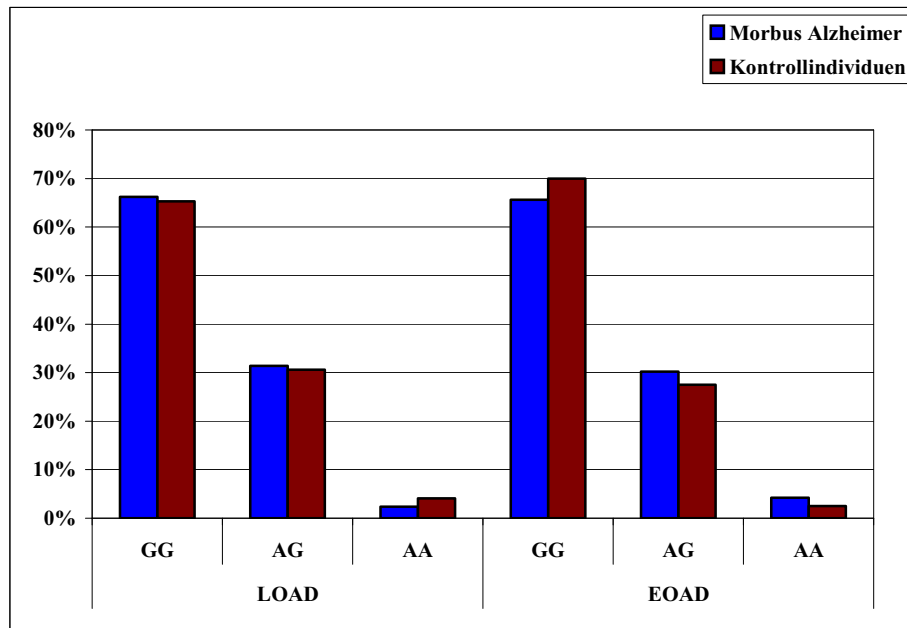


Abb. 9: *HtrA1*-Genotypverteilung bei LOAD, EOAD und Kontrollindividuen.

In dem LOAD Kollektiv zeigte sich, dass der *HtrA1* SNP rs11200638 das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken nicht beeinflusst ($p=0,57$); die Genotypverteilung zwischen Alzheimer Patienten und Kontrollindividuen unterscheidet sich nicht (Abb. 9). Auch die EOAD Fälle zeigen im Vergleich zu Alters- und Geschlechts-angeglichenen Kontrollindividuen ($n=40$) keinen signifikanten Unterschied der *HtrA1*-Genotypverteilung ($p=0,95$) (Abb. 9).

Der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 ist weder bei LOAD noch bei EOAD mit dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken assoziiert.

3.4. Die Effekte des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 und des *APOE*-Genotyps auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer

Wie bereits erwähnt, ist *APOE* bisher das einzige Gen, das als Risikofaktor für Morbus Alzheimer in zahlreichen Studien bestätigt werden konnte und zudem das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer modifiziert. Daher müssen alle weiteren genetischen Faktoren auch in Abhängigkeit des *APOE*-Status untersucht werden. Um zu verhindern, dass unsere Ergebnisse auf dem „*APOE*-Hintergrund“ beruhen, wurde der *APOE* Genotyp in die statistischen Auswertungen einbezogen.

3.4.1. Der *APOE*-Genotyp ist in unserem Kollektiv mit dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken assoziiert und modifiziert das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer

Zunächst wurde geprüft, ob die in der Literatur beschriebenen Effekte des *APOE*-Genotyps bei Morbus Alzheimer auch in unserem Kollektiv bestätigt werden können.

Da das *APOE* ϵ 2-Allel auf das Erkrankungsalter keinen wesentlichen Einfluss hat (Corder, et al., 1994), wurden für die statistischen Auswertungen *APOE* ϵ 2 und *APOE* ϵ 3 zusammen betrachtet. Als *APOE*-Status wurde zwischen *APOE* ϵ 4-negativ und *APOE* ϵ 4-positiv unterschieden, wobei *APOE* ϵ 4-negative Patienten *APOE* ϵ 2- und/oder *APOE* ϵ 3-Träger sind und die *APOE* ϵ 4-positiven Individuen mindestens ein *APOE* ϵ 4-Allel besitzen.

Im LOAD Datensatz weisen die *APOE* ϵ 4-positiven Alzheimer Patienten ein signifikant niedriges Erkrankungsalter für Morbus Alzheimer (72,6 Jahre, 95% CI: 72,0-73,2; $p < 0,0001$) verglichen zu den *APOE* ϵ 4-negativen Patienten (74,7 Jahre, 95% CI: 73,9-75,6; $p < 0,0001$) auf. Zudem ist das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken bei *APOE* ϵ 4-Trägern signifikant erhöht (Odds Ratio (OR): 5,7; 95% CI: 3,5-9,2; $p < 0,0001$). Diese Ergebnisse bestätigen, dass das in dieser Arbeit untersuchte Alzheimer-Kollektiv den in der Literatur beschriebenen Daten entspricht (Strittmatter and Roses, 1995).

3.4.2. Der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 und der *APOE*-Genotyp besitzen additive Effekte auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer

Da die Wirkung des *HtrA1*- und des *APOE*-Genotyps auf das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer bisher in getrennten Analysen untersucht wurde, ergab sich die Fragestellung, ob die zwei genetischen Faktoren additive Effekte auf das Erkrankungsalter besitzen. Um die Effekte der zwei Gene auf das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer zu untersuchen, wurden die Veränderungen des Erkrankungsalters abhängig von *HtrA1*- und *APOE*-Genotyp in dem LOAD Datensatz analysiert. Hierfür wurde der LOAD Datensatz in *APOE* ϵ 4-negative und *APOE* ϵ 4-positive Individuen stratifiziert. Unter den *APOE* ϵ 4-negativen Patienten weisen die *HtrA1*-AG/AA Träger (n=65) ein 3,1 Jahre früheres Erkrankungsalter im Vergleich zu den *HtrA1*-GG Trägern (n=122) auf ($p=0,002$) (Abb. 10). Auch in der Gruppe der *APOE* ϵ 4-positiven Individuen

zeigen die Patienten mit *HtrA1*-AG/AA Genotyp (n=89) mit 2,4 Jahren ein signifikant früheres Erkrankungsalter als die *HtrA1*-GG Träger (n=173) (p=0,001).

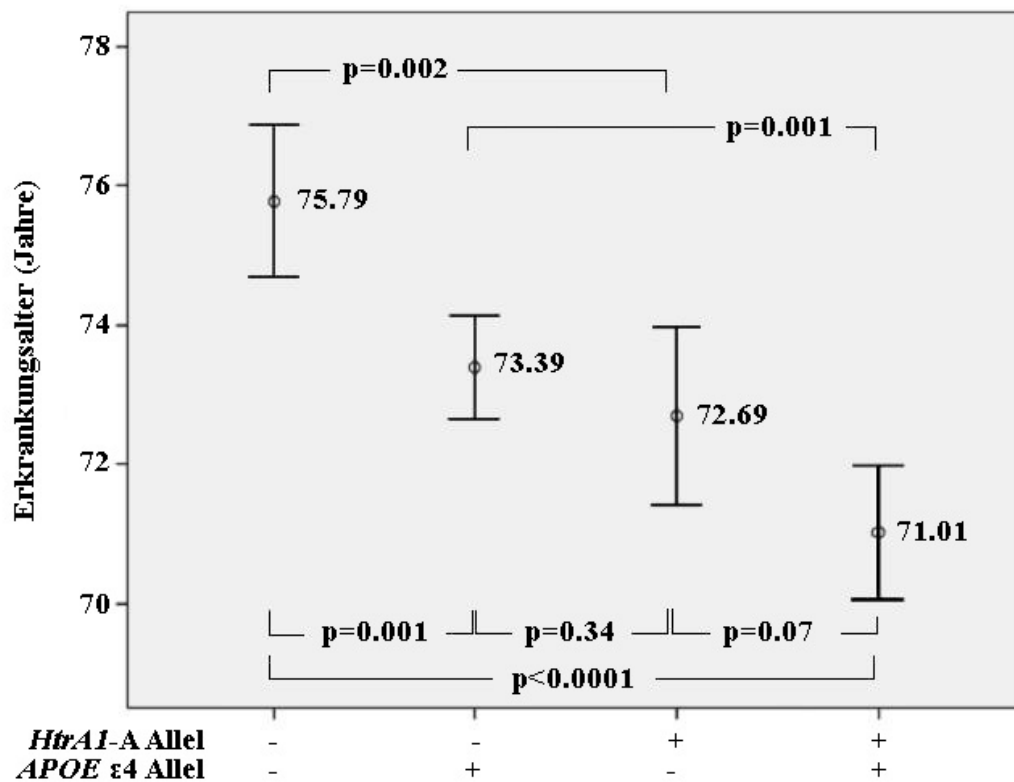


Abb. 10: Der Einfluss des *HtrA1*- und des *APOE*-Genotyps auf das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer. Dargestellt sind die Mittelwerte des Erkrankungsalters mit 95% CI. Die Mittelwerte der vier Gruppen wurden mittels Student's-T-Test verglichen; aufgrund multipler Testung wurden die p-Werte nach Bonferroni-Holm adjustiert.

Wird der Datensatz nach *HtrA1*-Status stratifiziert, bestätigen sich die *APOE* Effekte auf den Erkrankungsbeginn: bei den *HtrA1*-GG Patienten ist das Erkrankungsalter der *APOE* ε4-positiven Träger 2,4 Jahre niedriger als bei den *APOE* ε4-negativen Individuen (p=0,001). Bei Patienten mit *HtrA1*-AG/AA genotypischem Hintergrund zeigt das Vorhandensein eines *APOE* ε4-Allels keinen signifikanten Effekt auf das Erkrankungsalter (p=0,07). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der *HtrA1*-Genotyp unabhängig von *APOE* das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer modifiziert.

3.4.3. Der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 und der *APOE*-Genotyp besitzen in der Kaplan-Meier Darstellung additive Effekte auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer

Mittels Kaplan-Meier Analyse wurde die „AD-freie“ Zeit (Jahre bis zur Erkrankung) bei LOAD ermittelt, wobei Kontrollindividuen in die Analyse miteinbezogen wurden. 50% der Patienten mit genotypischer Kombination *HtrA1*-AG/AA + *APOE* ϵ 4-positiv erkranken vor dem 71. Lebensjahr (95% CI: 69,8-72,2) an Morbus Alzheimer, während 50% der Patienten mit der genotypischen Kombination *HtrA1*-AG/AA + *APOE* ϵ 4-negativ oder *HtrA1*-GG + *APOE* ϵ 4-positiv vor dem 74. Lebensjahr erkranken (95% CI: 73,2-74,8); den spätesten Erkrankungsbeginn mit 78 Jahren zeigen Patienten mit der Kombination *HtrA1*-GG + *APOE* ϵ 4-negativ (95% CI: 76,3-79,7) (Abb. 11).

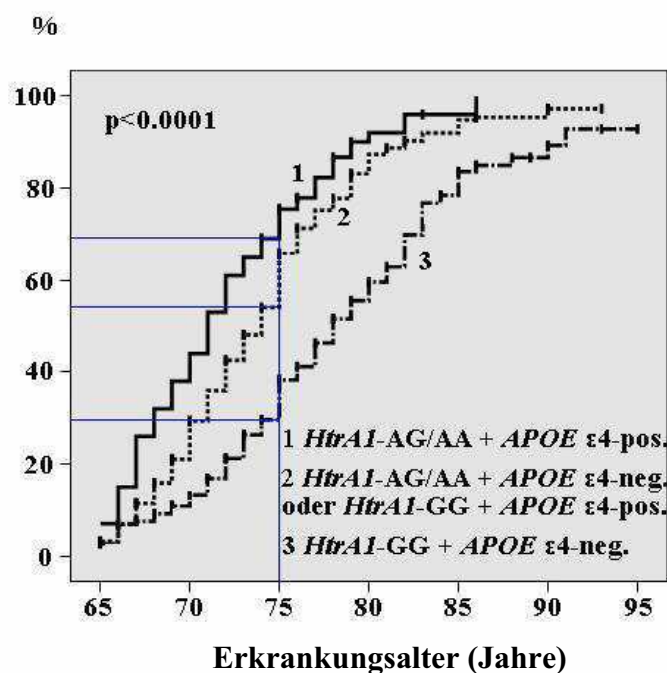


Abb. 11: *HtrA1*- und *APOE*-Genotyp haben additive Effekte auf das Erkrankungsalter bei LOAD. Die Kaplan-Meier Darstellung zeigt die kumulativen Effekte der *HtrA1*- und *APOE*-Genotypen auf den Erkrankungsbeginn.

Andersherum betrachtet zeigte sich, dass bei 75 jährigen Patienten nur 30% die Genotypkombination *HtrA1*-GG + *APOE* ε4-negativ besitzen; hingegen sind 54% der Patienten mit der Genotypkombination *HtrA1*-AG/AA + *APOE* ε4-negativ erkrankt. Der stärkste Effekt ist bei den Individuen mit *HtrA1*-AG/AA + *APOE* ε4-positiv genotypischer Kombination zu beobachten, von denen 69% bis 75 Jahren an Morbus Alzheimer erkrankt sind. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die *HtrA1*- und *APOE*-Genotypen additive Effekte auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer besitzen.

3.4.4. Der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 und der *APOE*-Genotyp modifizieren das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer unabhängig voneinander

Für eine weitere Untersuchung der Effekte von *HtrA1*- und *APOE*-Genotypen auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer wurde ein lineares Model verwendet, in dem neben *HtrA1*, *APOE* und Geschlecht, auch die Interaktion zwischen den zwei Genotypen berücksichtigt wurde. Hiermit konnte gezeigt werden, dass sowohl *HtrA1* ($p < 0,0001$) als auch *APOE* ($p < 0,0001$), aber nicht deren Interaktion ($p = 0,55$), das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer signifikant modifizieren.

Anschließend wurde untersucht, ob die unabhängigen Variablen *HtrA1*, *APOE* und die Interaktion dieser zwei Genotypen den Erkrankungsbeginn des Morbus Alzheimer beeinflussen, wenn Kontrollindividuen in die Analyse miteinbezogen werden. Die Cox Regression zeigte, dass *HtrA1* (Hazard Ratio HR 1,6; 95% CI: 1,2-2,1; $p = 0,005$) und *APOE* (HR 2,1; 95% CI: 1,6-2,6; $p < 0,0001$) einen signifikanten Einfluss auf den Erkrankungsbeginn haben; wieder hat die Interaktion zwischen *HtrA1* und *APOE* keinen signifikanten Effekt auf das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer (HR 0,9; 95% CI: 0,6-1,3; $p = 0,44$).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse von 3.4.2., 3.4.3. und 3.4.4. dass der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 und der *APOE*-Genotyp einen voneinander unabhängigen Einfluss auf das Erkrankungsalter besitzen und deren Effekte sich addieren (Abb.10, Abb.11).

3.5. Untersuchung der pathologischen Charakteristika von Morbus Alzheimer in Abhängigkeit des *HtrA1*-Genotyps

Um die funktionelle Bedeutung des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 bei Morbus Alzheimer zu untersuchen, wurde sein Einfluss auf die neuropathologischen Charakteristika des Morbus Alzheimer analysiert. Mittels immunhistochemischer Färbungen für A β und Tau im frontalen und temporalen Kortex von 30 LOAD Patienten wurden diffuse Plaques, neuritische Plaques und neurofibrilläre Tangles quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Computer-basierten Image-Analyse.

Die Zahl der neuritischen Plaques ist im frontalen Hirngewebe von *HtrA1*-AG Individuen (11,3; 95% CI: 6,5-16,1; n=13) im Vergleich zu *HtrA1*-GG Patienten (4,1; 95% CI: 2,5-5,6; n=17) signifikant erhöht ($p=0,001$) (Abb.12). Auch im temporalen Kortex weisen die *HtrA1*-AG Patienten eine signifikant erhöhte Anzahl der neuritischen Plaques (13,7; 95% CI: 8,4-19,1) im Vergleich zu den *HtrA1*-GG Trägern (5,8; 95% CI: 3,2-8,5) ($p=0,001$) auf.

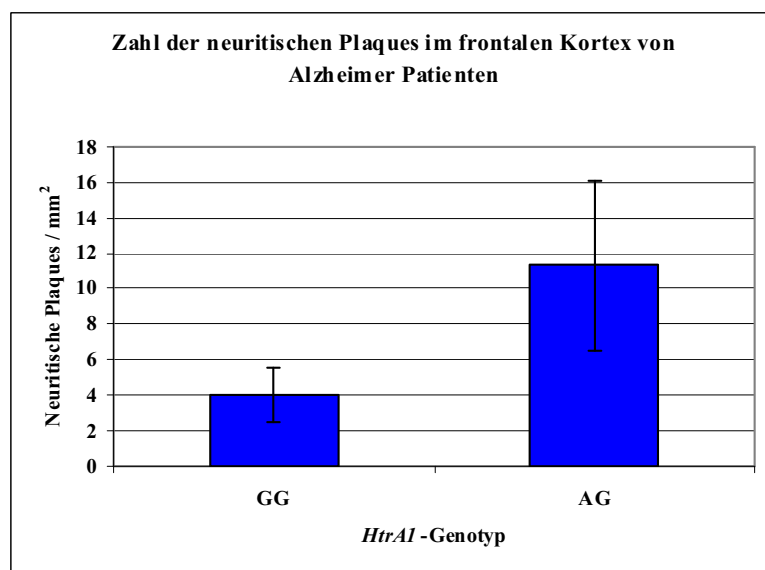


Abb. 12: Der Einfluss des *HtrA1*-Genotyps auf die Zahl neuritischer Plaques im frontalen Kortex von Alzheimer Patienten. Die Anzahl der neuritischen Plaques wurde mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test verglichen und als Mittelwerte mit 95% CI dargestellt.

Zudem ist die Zahl der NFT-enhaltenden Neurone im frontalen Kortex bei Patienten mit *HtrA1*-AG Genotyp (17,4; 95% CI: 13,2-21,5) signifikant höher als bei Individuen mit *HtrA1*-GG Genotyp (11,4; 95%CI: 8,6-14,2) ($p=0,009$) (Abb. 13). Auch im temporalen Kortex haben die *HtrA1*-AG Träger eine erhöhte Zahl NFT-enhaltender Neurone (23,9; 95% CI: 14,7-33,2) verglichen zu *HtrA1*-GG Patienten (14,7; 95% CI: 12,2-17,1)

($p=0,04$). Die Quantifizierung diffuser Plaques zeigte, dass der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 keinen signifikanten Effekt auf die Zahl diffuser Plaques besitzt (frontal, $p=0,77$; temporal, $p=0,98$).

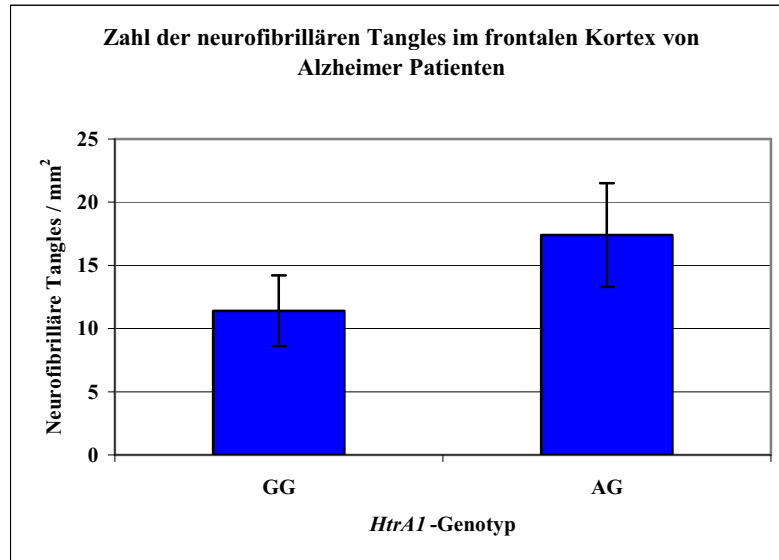


Abb. 13: Der Einfluss des *HtrA1*-Genotyps auf die Zahl neurofibrillärer Tangles im frontalen Kortex von Alzheimer Patienten. Die Anzahl neuritischer Plaques wurde mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test verglichen und als Mittelwerte mit 95% CI dargestellt.

Da *APOE* nicht nur das Risiko und das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer, sondern auch die Plauepathologie modifiziert, wurde des Weiteren der Effekt des *HtrA1*-Genotyps auf die Zahl der neuritischen Plaques und der neurofibrillären Tangles in Abhängigkeit des *APOE*-Status untersucht.

Mittels linearer Regression wurde unter Einschluss von *HtrA1*, *APOE*, Alter und Geschlecht gezeigt, dass der *HtrA1*-Genotyp einen signifikanten Einfluss auf die Zahl der neuritischen Plaques im frontalen ($p=0,004$) und temporalen ($p=0,002$) Kortex besitzt. Auch der *APOE* $\epsilon 4$ -Status beeinflusst die Zahl der neuritischen Plaques (frontal: $p=0,02$; temporal: $p=0,002$).

Hiermit konnte gezeigt werden, dass der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 die Zahl neuritischer Plaques und NFTs im frontalen und temporalen Kortex von Alzheimer Patienten signifikant modifiziert. Dagegen hat der *HtrA1*-Genotyp, anders als der *APOE*-Genotyp, keinen signifikanten Einfluss auf die Zahl diffuser Plaques.

3.6. Vergleichende Analyse der HtrA1-RNA-Expression in Hirngewebe von Alzheimer Patienten und Kontrollen

Um die funktionelle Rolle von HtrA1 bei Morbus Alzheimer weiter zu untersuchen, wurde die HtrA1-RNA-Expression in nativer grauer Hirnsubstanz von Alzheimer Patienten und Kontrollen untersucht. RNA wurde aus dem frontalen Kortex von Alzheimer Fällen und Kontrollen isoliert. Das Ausmaß der RNA-Degradation infolge unterschiedlicher post-mortem Zeiten wurde mittels Formaldehyd-Gelelektrophorese beurteilt. Nur Proben, die keine oder niedrige Degradation aufwiesen wurden in cDNA umgeschrieben und mittels Real-Time PCR analysiert (AD: n=8, Kontrollen: n=10). Die Mittelwerte der ermittelten $\Delta\Delta C_t$ -Werte jeder Gruppe (AD bzw. Kontrollen) wurden nach der Methode von Livak und Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001) miteinander verglichen. Die Expression von HtrA1-RNA war in Alzheimer Gehirnen im Vergleich zu Kontrollen 2,4-fach erhöht ($p=0,001$) (Abb. 14).

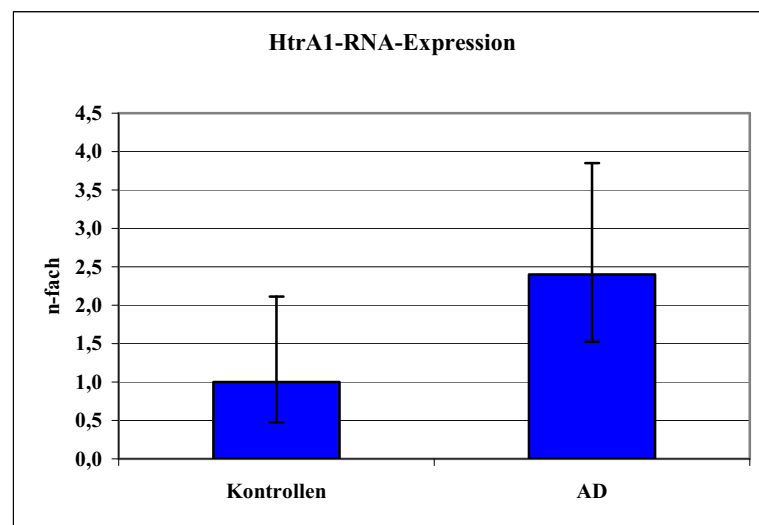


Abb. 14: HtrA1-RNA-Expression in Hirngewebe von Alzheimer Patienten und Kontroll-Fällen. Die RNA-Expression wurde mittels Real-Time PCR im frontalen Kortex untersucht und nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode berechnet. Dargestellt ist der Regulationsfaktor (bei Kontrollen =1) und die Standardabweichung.

3.7. Die HtrA1-Expression ist in AICD-überexprimierenden Neuroblastom-Zellen erhöht

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne des APP eine Rolle bei der Genregulation spielen kann (Cao and Sudhof, 2001; Lahiri, et al., 2002). Allerdings ist noch weitgehend unklar, welche Gene durch den AICD-Fe65-Tip60 Komplex reguliert werden. Da AICD gleichzeitig mit A β während der proteolytischen Spaltung von APP entsteht, ist anzunehmen, dass eine erhöhte A β -Produktion auch einen erhöhten AICD-Spiegel bewirkt. Somit könnte AICD an der Regulation von Genen beteiligt sein, die am Abbau von überschüssigem A β -Peptid beteiligt sind.

Um die Frage zu untersuchen, ob AICD die HtrA1-Expression modifiziert, wurden AICD-überexprimierende Neuroblastom-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Dafür wurden etablierte induzierbare SHEP-SF Zellen verwendet (Muller, et al., 2007). Nach dem Waschen der Zellen und Kultivierung in Doxyzyklin-freiem Medium beginnen diese Zellen das ektopisch inserierte pAICD-EGFP zu exprimieren. Von induzierten und zugehörigen nicht-induzierten Zellen wurde in Zeitabständen von 12h die RNA isoliert und anschließend cDNA hergestellt. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression von AICD und HtrA1 ermittelt (Abb. 15). Die Expression von HtrA1 steigt mit der Expression von AICD und erreicht das höchste Niveau nach 84h (3,18-fach). Zu diesem Zeitpunkt wird auch AICD am höchsten exprimiert (34,6-fach). Nach 84h fällt die Expression von AICD und HtrA1 in ähnlichem Muster ab.

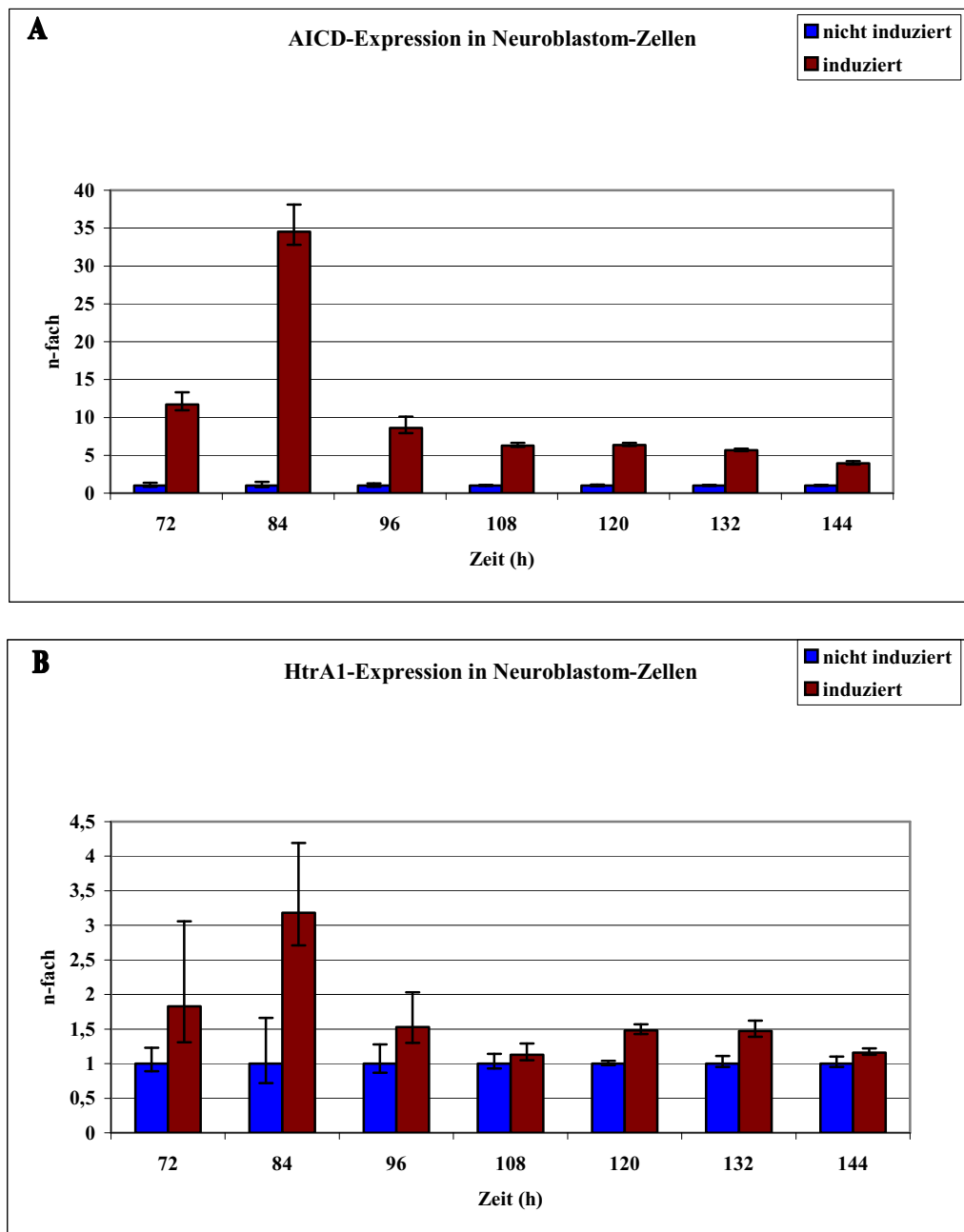


Abb. 15: HtrA1-Expression in AICD-überexprimierenden Neuroblastom-Zellen. Real-Time PCR Analyse der HtrA1- und AICD-RNA in Neuroblastom-Zellen (SHEP-SF). Die Expression von AICD (**A**) und HtrA1 (**B**) wurde nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode berechnet (Regulationsfaktor: bei nicht-induzierten Zellen =1, Standardabweichung).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HtrA1 eines der AICD-abhängig regulierten Gene ist; ob die HtrA1-Expression direkt von AICD induziert wird oder ob noch andere Gene zwischengeschaltet sind, lässt sich in dem vorliegenden Experiment nicht klären.

4. Diskussion

4.1. Relevanz des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 für das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer ist eine Krankheit, dessen Hauptrisikofaktor das Alter ist. Im Zentrum zahlreicher Untersuchungen zur Genetik des Morbus Alzheimer stand bisher das Erkrankungsrisiko (Egensperger, et al., 1997; Kamboh, et al., 1995; Li, et al., 2007; Pericak-Vance, et al., 1991; Strittmatter, et al., 1993), während dem Erkrankungsalter wenig Aufmerksamkeit gewidmet wurde (Bertram, et al., 2000; Li, et al., 2007; Li, et al., 2003; Li, et al., 2002). Ein Hinauszögern des Erkrankungsbeginns des Morbus Alzheimer wäre von sozialem und wirtschaftlichem Interesse, da eine Verschiebung des Erkrankungsbeginns um 5 Jahre letztlich die Prävalenz halbieren würde.

Zwei genetische Studien haben eine Linkage-Region auf Chromosom 10 (10q21-10q25) identifiziert, die mit dem Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer assoziiert ist (Bertram, et al., 2000; Li, et al., 2002). In dieser Region befindet sich unter anderem das *HtrA1* Gen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 mit dem Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer assoziiert ist; Individuen mit dem *HtrA1*-AG/AA Genotyp erkranken im Durchschnitt 2,7 Jahre früher an Morbus Alzheimer als *HtrA1*-GG Träger. Die Tatsache, dass der *HtrA1*-AG/AA Genotyp in einer kaukasischen Population mit 30% repräsentiert ist, unterstreicht die Bedeutung des SNP rs11200638 für die Ätiologie des Morbus Alzheimer.

Da *HtrA1* in der Linkage-Region für das Erkrankungsalter lokalisiert ist, wurde auch in früheren Studien untersucht, ob Polymorphismen dieses Gens das Erkrankungsalter modifizieren können. In einer Studie (Li, et al., 2003) wurden mehrere SNPs im *HtrA1* Gen untersucht, die möglicherweise einen Effekt auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer besitzen. Zwei SNPs, rs2268349 und rs2250511, befanden sich in starkem Linkage-Disequilibrium und zudem zeigte der SNP rs2293871 einen signifikanten Effekt in einem orthogonalen Modell, der sich in einem anderen statistischen Modell jedoch nicht bestätigte. Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass keiner der genannten SNPs das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer relevant modifiziert (Li, et al., 2003). Anders als in der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen von Li et al. (Li, et al., 2003) an Alzheimer Fällen mit familiärem Hintergrund durchgeführt und der Datensatz wurde nicht in EOAD und LOAD stratifiziert (das Erkrankungsalter lag

zwischen 40 und 97 Jahren). Eine weitere Studie (Ozturk, et al., 2005) konnte keinen signifikanten Effekt des SNP rs2293871 auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer feststellen. Im Gegensatz zu Li et al. (Li, et al., 2003) wurde bei Ozturk et al. (Ozturk, et al., 2005) die untersuchte Gruppe in EOAD und LOAD stratifiziert, wobei der LOAD Datensatz Patienten mit Erkrankungsalter ≥ 60 Jahre umfasste. In der vorliegenden Arbeit wurde die Abgrenzung zwischen EOAD und LOAD bei 65 Jahren gewählt (EOAD < 65 Jahre, LOAD ≥ 65 Jahre), da der *APOE*-Status erst nach dem 65. Lebensjahr das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer deutlich modifiziert (Strittmatter and Roses, 1995) und klassischerweise AD ab 65 Jahre als LOAD eingestuft wird (Bertram, et al., 2007). Da die Effekte des SNP rs2293871 auf den Erkrankungsbeginn von Morbus Alzheimer umstritten sind, ist dieser SNP möglicherweise weiter entfernt von einem tatsächlich funktionellen SNP. Im Gegensatz dazu hat der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 einen signifikanten Effekt auf das Erkrankungsalter in unseren Datensätzen; hierfür wären zwei Erklärungen plausibel: entweder ist der SNP rs11200638 relativ nah an einem noch nicht identifizierten, für die Veränderungen des Erkrankungsalters verantwortlichen SNP lokalisiert, oder der SNP rs11200638 ist tatsächlich der funktionelle SNP in der chromosomalen Region 10q25-10q26.

Die Funktionalität des SNP rs11200638 wurde schon in früheren Studien getestet. Es wurde gezeigt, dass in humanen cervikalen Karzinomzellen (HeLa) zwei Transkriptionsfaktoren, das Adaptor-Related Protein Complex 2 α (AP2 α) und der Serum Response Factor (SRF) im Bereich des *HtrA1* Promoter SNPs rs11200638 binden (Dewan, et al., 2006). Zudem zeigte sich in einem Luziferase-Assay, dass der *HtrA1*-AA Genotyp eine tendenziell höhere Luziferase-Expression als der *HtrA1*-GG Genotyp induziert (Dewan, et al., 2006). Dies impliziert, dass der SNP rs11200638 funktionell relevant ist.

HtrA1 ist nicht das einzige Gen, welches in der Linkage-Region für den Erkrankungsbeginn lokalisiert ist. Auch *GSTO1* und *GSTO2* zählen zu den Kandidatengenen dieser Region. Mehrere SNPs dieser Gene wurden daraufhin getestet, ob sie das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer modifizieren. In einem Studiendesign mit Alzheimer Fällen, die einen familiären Hintergrund haben, bewirken zwei SNPs der Gene *GSTO1* (rs4925) bzw. *GSTO2* (rs2297235) eine signifikante Veränderung des Erkrankungsalters (Li, et al., 2003; Li, et al., 2006). Werden diese SNPs in einem anderen Studiendesign mit LOAD Fällen untersucht, ist dagegen kein signifikanter Effekt auf den Erkrankungsbeginn feststellbar (Ozturk, et al., 2005). Ähnlich wie im Fall des *HtrA1* SNP

rs2293871 ist es denkbar, dass die widersprüchlichen Ergebnisse auf den unterschiedlichen Studiendesigns beruhen.

Ein anderes funktionelles Kandidatengen, das den Erkrankungsbeginn modifizieren kann, ist das *Plasminogen Activator Urokinase Gen (PLAU)*, welches nicht in der Linkage-Region für das Erkrankungsalter, sondern unter einem Linkage-Peak für das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken auf Chromosom 10 lokalisiert ist (Kamboh, 2004). In einer Studie von Ozturk et al. konnten zwei *PLAU* Polymorphismen beschrieben werden (rs2227571 und rs4065), die ein signifikant früheres Erkrankungsalter (um 1 Jahr) bei sporadischen LOAD Fällen bewirken (Ozturk, et al., 2007). Der Effekt der zwei *PLAU* SNPs auf das Erkrankungsalter in der Studie von Ozturk et al. (Ozturk, et al., 2007) ist kleiner als der Effekt des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 in unserer Analyse; ein Grund dafür könnte die Lokalisierung des rs2227571 bzw. rs4065 auf Chromosom 10 sein, da diese zwei SNPs weiter entfernt von der Linkage-Region für das Erkrankungsalter sind und möglicherweise deren Einfluss auf das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer nicht direkt ist.

Nachdem *APOE* derzeit das einzige in zahlreichen Studien bestätigte Gen ist, welches eine Veränderung des Erkrankungsalters des Morbus Alzheimer bewirkt (Corder, et al., 1994; Corder, et al., 1993; Farrer, et al., 1997), ist zu fordern, dass bei genetischen Studien zum Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer der *APOE*-Status berücksichtigt wird.

4.2. *HtrA1* und *APOE* modifizieren das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer mit additiven und unabhängigen Effekten

Da *APOE* das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer bekanntermaßen modifiziert (Corder, et al., 1994; Corder, et al., 1993) wurde des Weiteren untersucht, ob der Effekt des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer durch den *APOE*-Status beeinflusst wird. Nach der Stratifizierung des untersuchten Datensatzes nach Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein des *APOE* ϵ 4-Allels blieb der Einfluss des SNP rs11200638 auf das Erkrankungsalter signifikant. Sowohl bei *APOE* ϵ 4-negativen als auch bei *APOE* ϵ 4-positiven Alzheimer Patienten bewirkte das *HtrA1* A-Allel einen über 2 Jahre früheren Erkrankungsbeginn des Morbus Alzheimer. Der Einfluss beider Gene auf das Erkrankungsalter addiert sich, indem Individuen mit

rezessiven Allelen in beiden Loci um 4,8 Jahre früher als Träger der dominanten Allele des *HtrA1*- und des *APOE* Gens erkranken. Zudem wurde sowohl in einem linearen Modell als auch in der Cox-Regression gezeigt, dass die *HtrA*- und *APOE*-Genotypen sich gegenseitig nicht beeinflussen; die einzelnen Effekte bleiben signifikant, unabhängig vom Vorhandensein des anderen Genotyps. Zudem besitzt die Interaktion zwischen den zwei Genotypen keinen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer. Aufgrund der Tatsache, dass der *HtrA1*-Genotyp einen vom *APOE*-Genotyp unabhängigen Effekt auf den Erkrankungsbeginn von Morbus Alzheimer besitzt, kann *HtrA1* neben *APOE* als zweiter prädiktiver Indikator des Erkrankungsbeginns von Morbus Alzheimer bezeichnet werden.

Derzeit existieren nur wenige Studien, die den genetischen Einfluss auf das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer untersucht haben (Kolsch, et al., 2004; Li, et al., 2003; Li, et al., 2002; Li, et al., 2006; Ozturk, et al., 2005; Ozturk, et al., 2007). Da *APOE* als modifizierender Faktor für das Erkrankungsalter in zahlreichen Untersuchungen bestätigt wurde, müssen die Effekte neuer Gene in Abhängigkeit des *APOE*-Status getestet werden. In dieser Hinsicht wurde in der Region 10q21-10q25 nur das Gen *GSTO1* untersucht. Von Li et al. (Li, et al., 2003) wurde in einem Monks-Kaplan Modell gezeigt, dass *GSTO1* das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer unabhängig vom *APOE*-Status modifiziert; ob die Effekte dieser zwei Faktoren additiv sind, wurde in dieser Studie jedoch nicht untersucht.

4.3. Der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 ist nicht mit dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken assoziiert

Um die genetische Bedeutung des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 für Morbus Alzheimer näher zu untersuchen, wurde untersucht, ob dieser SNP mit dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken assoziiert ist. In dem hier untersuchten LOAD Datensatz wies der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638, anders als *APOE*, keine Assoziation mit dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken auf. Dies deutet darauf hin, dass *HtrA1* offensichtlich kein ursächlicher Faktor für Morbus Alzheimer ist, aber durch seinen Effekt auf den Erkrankungsbeginn den Verlauf der Krankheit beschleunigen kann. Vermutlich modifiziert *HtrA1* die Krankheit nicht primär, sondern kommt erst zur

Wirkung, wenn die Krankheit durch andere pathogenetische Mechanismen angestoßen wurde.

Bisher konzentrieren sich die meisten genetischen Studien darauf, Risikofaktoren für Morbus Alzheimer zu untersuchen. Jedoch ist das *APOE* Gen nach wie vor der einzige genetische Risikofaktor, der etabliert ist. Zu den kontrovers diskutierten Genen, die das Erkrankungsrisiko für Morbus Alzheimer erhöhen, zählt u.a. das *Insulin Degrading Enzyme (IDE)*, welches auf der chromosomalen Region 10q23 lokalisiert ist. Diese Region ist mit erhöhten A β ₄₂ Mengen im Plasma und mit dem Erkrankungsrisiko für Morbus Alzheimer assoziiert (Ertekin-Taner et al., 2004). Da IDE A β degradieren kann (Qiu, et al., 1998), besitzt IDE eine besondere pathogenetische Relevanz für den Verlauf der Krankheit. Auch *PLAU* repräsentiert ein Kandidatengen, das auf Chromosom 10 lokalisiert ist und A β -degradierende Funktion besitzt. Ein SNP rs2227564 des *PLAU* Gens wurde in zwei unabhängigen Studien als relevant für das Erkrankungsrisiko für Morbus Alzheimer beschrieben (Finckh, et al., 2003; Riemenschneider, et al., 2006), während eine neue Studie diesen Zusammenhang nicht bestätigen konnte (Ozturk, et al., 2007).

Diese Ergebnisse heben die Komplexität des Morbus Alzheimer hervor; selbst wenn die Kenntnisse über Risikofaktoren wichtige Hinweise über die Krankheit liefern, ist die Bedeutung des Erkrankungsbeginns nicht zu vernachlässigen.

4.4. Der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 modifiziert die charakteristischen pathologischen Veränderungen bei Morbus Alzheimer

Nachdem der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 das Erkrankungsalter und damit den Verlauf des Morbus Alzheimer modifiziert, stellte sich die Frage, ob der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 von funktioneller Bedeutung ist und die pathologischen Charakteristika des Morbus Alzheimer beeinflusst. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, da HtrA1 am Abbau von A β beteiligt ist, mit A β Plaques im Gehirn von Alzheimer Patienten kolokalisiert (Grau, et al., 2005) und deshalb der A β -Abbau HtrA1-abhängig sein könnte. Um der Frage nachzugehen, ob der neuropathologische Phänotyp durch den *HtrA1*-Genotyp beeinflusst wird, wurde bei 30 Alzheimer-Fällen eine Quantifizierung neuritischer Plaques, diffuser Plaques und neurofibrillärer Tangles durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl neuritischer Plaques und neurofibrillärer

Tangles im cerebralen Kortex der Patienten mit dem *HtrA1*-AG Genotyp im Vergleich zu den *HtrA1*-GG Trägern signifikant erhöht war. Nachdem der *APOE*-Genotyp auch die neuropathologischen Charakteristika des Morbus Alzheimer beeinflusst (Schmechel, et al., 1993), wurde überprüft, ob der Einfluss des *HtrA1*-Genotyps auf diese Merkmale bestehen bleibt, wenn der *APOE*-Status in die Analyse miteinbezogen wird. Mit Hilfe der linearen Regression wurde gezeigt, dass *HtrA1* und *APOE* ähnliche Effekte auf die neuritischen Plaques und die neurofibrillären Tangles in zwei untersuchten kortikalen Arealen (frontal und temporal) aufweisen. Somit zeigen unsere Befunde zur Genotyp-Phänotyp-Assoziation bei Morbus Alzheimer, dass der *HtrA1*-Genotyp diagnostisch relevante neuropathologische Charakteristika beeinflusst, während er keinen signifikanten Effekt auf die Zahl der diffusen Plaques besitzt. Dies weist darauf hin, dass der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 an der Entstehung der neuritischen Pathologie beteiligt ist.

Es wird angenommen, dass die Ablagerung von A β in Plaques einem dynamischen Prozess unterliegt, bei dem A β einerseits abgelagert und zum anderen wieder abgebaut wird (Hauw et al., 1988; Hyman et al., 1993). Bei den monogenen EOAD Fällen ist bekannt, dass eine erhöhte A β -Produktion zur abnormalen A β -Ablagerung führt (Scheuner, et al., 1996). Im Gegensatz dazu ist der Mechanismus der Plaquebildung bei sporadischen LOAD Fällen noch ungeklärt; vermutlich erfolgt die erhöhte Ablagerung durch unzureichenden A β -Abbau über längere Zeit, wodurch das Gleichgewicht zwischen A β -Bildung und -Abbau gestört wird. Bei der Bildung von A β -Plaques ist die Beteiligung so genannter Chaperone von Bedeutung (Wisniewski and Frangione, 1992). Diese Proteine, zu denen auch APOE gehört, begünstigen die Bildung von β -gefaltetem Amyloid (Golabek, et al., 1996), das wesentlicher Bestandteil neuritischer Plaques ist (Berr, et al., 1994). Außer aggregiertem A β beinhalten neuritische Plaques Ablagerungen hyperphosphorylierten Tau-Proteins. Da degradiertes APOE4, welches die Lipid-Bindungsregion enthält, im Hirngewebe von Mäusen eine erhöhte Tau-Hyperphosphorylierung bewirkt (Harris et al., 2003), wäre es vorstellbar, dass solche APOE4-Fragmente auch im Gehirn von Alzheimer Patienten die Umwandlung diffuser Plaques in neuritischen Plaques begünstigen. Interessanterweise kann *HtrA1* sowohl aggregiertes A β (Grau, et al., 2005) als auch APOE abbauen (persönliche Mitteilung Annette Schubert, Universität Duisburg-Essen), so dass *HtrA1* über mehrere Mechanismen an der Pathogenese von Morbus Alzheimer beteiligt sein könnte. Initial könnte die Bildung der Plaques durch die Chaperon-Funktion des Proteins APOE4 begünstigt sein und zudem durch die proteolytische Aktivität von *HtrA1* vermehrt

degradiertes APOE4 entstehen. Durch beide Mechanismen würde durch vermehrte Hyperphosphorylierung von Tau die Entstehung neuritischer Plaques begünstigt. Andererseits könnte HtrA1 das APOE4 Protein vor der Lipid-Bindungsregion proteolysieren und somit die Bildung der APOE4-Fragmente hemmen, mit der Konsequenz, dass weniger hyperphosphoryliertes Tau entsteht. Dadurch wäre HtrA1 Bestandteil eines Mechanismus, welcher der Entstehung neuritischer Plaques entgegen wirken würde.

Aus den Beobachtungen, dass der *HtrA1*-Genotyp die neuropathologischen Charakteristika des Morbus Alzheimer modifiziert, vermutet man weitere funktionelle Implikationen von HtrA1 für diese Krankheit.

4.5. Die HtrA1-RNA-Expression ist in Hirngewebe von Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöht

Um die funktionelle Bedeutung von HtrA1 bei Morbus Alzheimer näher zu untersuchen, wurde die HtrA1-RNA-Expression bei Alzheimer Patienten und Kontrollen quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Expression von HtrA1-RNA bei Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöht ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen einer anderen Studie, die mittels Affimetrix Gene Chip Analyse zeigte, dass die HtrA1-RNA-Expression im Gehirn von Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollen herunterreguliert ist (Li, et al., 2003). In der Studie von Li et al. (Li, et al., 2003) wurden jedoch lediglich 2 Kontrollen und 6 AD Fälle in die Untersuchung eingeschlossen. Unsere Ergebnisse basieren auf 10 Kontrollen und 8 AD Fällen.

Da HtrA1 APP prozessieren kann (Grau, et al., 2005), könnte HtrA1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von A β -Plaques zukommen. Es wäre vorstellbar, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression dieser Protease und der Menge des abzubauenen A β besteht. Der Abbau überschüssigen β -Amyloids aus dem Gehirn kann durch mehrere Mechanismen erfolgen; durch Sezernierung in das Blut über die Blut-Hirn-Schranke (Zlokovic, 2004), durch Mediatoren-vermittelte Endozytose (Zlokovic, 2004) oder über Degradierung durch proteolytische Enzyme (Selkoe, 2001). Mehrere Proteasen wie Insulin Degrading Enzyme (IDE)(Qiu, et al., 1998; Sudoh, et al., 2002), das Plasmin-System (PLAU) (Riemenschneider, et al., 2006; Tucker, et al., 2000), Nepriylisin (Hama,

et al., 2004; Iwata, et al., 2001) und seit kurzer Zeit HtrA1 (Grau, et al., 2005) sind für ihre A β -degradierende Funktion bekannt. IDE kann lösliches, monomeres und intrazelluläres A β_{40} abbauen (Farris, et al., 2003; Morelli, et al., 2003; Qiu, et al., 1998; Sudoh, et al., 2002), während PLA α aggregiertes A β degradieren kann (Tucker, et al., 2000). Neprilysin spielt eine entscheidende Rolle beim Abbau von A β_{42} (Iwata, et al., 2000) und interessanterweise ist dieses Enzym in Hirnregionen lokalisiert, die besonders vulnerabel für Morbus Alzheimer sind (Yasojima, et al., 2001). Offensichtlich üben diese Enzyme ihre A β -abbauende Aktivität in unterschiedlichen Stadien der Krankheit aus. Während IDE und Neprilysin (Yan, et al., 2006) eher eine Funktion in frühen Stadien der Entwicklung des Morbus Alzheimer besitzen, ist PLA α an der Degradierung von extrazellulärem oder bereits aggregiertem A β beteiligt. Eine neue Studie hat gezeigt, dass die *ex vivo* Zufuhr von Neprilysin in einem Alzheimer Mausmodell A β Ablagerungen vermindert (Hemming, et al., 2007). Da die Expression (Yasojima, et al., 2001) und die Aktivität (Miners, et al., 2006) von Neprilysin in Hirngewebe von Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollen herunterreguliert ist, könnte ein niedriger Neprilysin-Spiegel für den unzureichenden A β -Abbau und die konsekutiv erhöhte A β -Ablagerung mitverantwortlich sein.

Nachdem auch HtrA1 aggregiertes A β abbauen kann (Grau, et al., 2005) und HtrA1 in Hirngewebe von Alzheimer Patienten sowohl auf RNA-Ebene (vorliegende Ergebnisse) als auch auf Protein-Ebene (persönliche Mitteilung Annette Schubert, Universität Duisburg-Essen) im Vergleich zu Kontrollen erhöht ist, lässt sich vermuten, dass HtrA1 in späteren Stadien der Krankheit aktiviert wird und bereits abgelagertes A β proteolysiert. Analog könnten überschüssige A β Mengen, die auf physiologischem Wege nicht mehr abgebaut werden können, als diffuse Plaques akkumulieren und bei der Umwandlung zu neuritischen Plaques zusätzliche Signalwege aktivieren, die eine erhöhte HtrA1-Expression induzieren. Da der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 die Zahl der neuritischen Plaques und der neurofibrillären Tangles modifiziert, wäre es nahe liegend zu vermuten, dass die HtrA1-Expression abhängig vom *HtrA1*-Genotyp reguliert wird; niedrigere HtrA1 Proteinmengen würden eine langsamere A β -Degradation bewirken und somit wäre eine Entstehung neuritischer Plaques bei Patienten mit dem *HtrA1*-AG Genotyp begünstigt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Hypothese untersucht, ob der *HtrA1*-Genotyp die HtrA1-RNA-Expression modifiziert. Aufgrund der niedrigen Anzahl der Individuen mit dem *HtrA1*-Genotyp war jedoch nur ein Trend erkennbar; Kontrollindividuen mit *HtrA1*-AG Genotyp wiesen im Gehirn eine niedrigere HtrA1-

RNA-Expression auf als *HtrA1*-GG Träger. Anders als in der vorliegenden Arbeit zeigte eine Studie von Yang et al. (Yang, et al., 2006), dass die HtrA1-RNA- und Protein-Expression in retinalem Pigment Epithel bei Trägern des *HtrA1* AA-Genotyps verglichen zu *HtrA1*-GG Trägern signifikant erhöht war (Yang, et al., 2006). Die unterschiedlichen Tendenzen können darauf beruhen, dass die Anzahl der bei Yang et al. (Yang, et al., 2006) untersuchten Individuen gering war (*HtrA1*-GG: n=3; *HtrA1*-AA: n=4); zudem waren die Individuen mit *HtrA1*-AA Genotyp an altersbedingter Makuladegeneration erkrankt, während die drei *HtrA1*-GG Träger Kontrollpersonen waren. Für eine korrekte Analyse des Zusammenhanges zwischen *HtrA1*-Genotyp und HtrA1-RNA-Expression sollten Kontrollen und Patienten mit gleichem pathologischen Hintergrund untersucht werden, da bei diesen Krankheiten Mechanismen aktiviert werden könnten, welche die Aggregation von A β und/oder den Abbau von aggregiertem A β erzielen.

4.6. Ist *HtrA1* ein AICD-abhängig reguliertes Gen?

Das Amyloid Precursor Protein ist bei sporadischen und familiären Formen des Morbus Alzheimer von zentraler pathophysiologischer Bedeutung, da infolge amyloidogener APP-Prozessierung toxisches A β entsteht (Hartley, et al., 1999). Der nach amyloidogener APP-Prozessierung ebenfalls entstehenden intrazellulären Domäne des APP (AICD) wurde hingegen erst in letzter Zeit Aufmerksamkeit geschenkt (Cao and Sudhof, 2001). AICD kann entweder über das Proteasom oder IDE sehr schnell abgebaut werden oder in den Zellkern translozieren und die Genexpression regulieren (Kimberly, et al., 2001; Lahiri, et al., 2002). Geht man davon aus, dass AICD bei erhöhter A β Produktion vermehrt entsteht, so könnte das transaktivierende Potential von AICD von entscheidender pathophysiologischer Bedeutung für AD sein, da durch AICD das Genexpressionsmuster der Zelle verändert werden könnte.

Deshalb haben wir in einem Zellkulturmodell untersucht, ob AICD die RNA-Expression von HtrA1 modifiziert. In Neuroblastom-Zellen, die AICD stabil überexprimieren, wurde ein Anstieg der HtrA1-RNA-Expression beobachtet, der mit der RNA-Expression von AICD einherging. Dies führte zu der Vermutung, dass HtrA1 ein direkt oder indirekt AICD-abhängig reguliertes Gen ist. Interessanterweise ist auch die Nephilysin-Expression und -Aktivität in AICD-überexprimierenden Zellen erhöht (Pardossi-Piquard, et al., 2005). Da AICD in Zellkulturmodellen die Expression von zwei verschiedenen A β -

abbauenden Proteasen erhöht, wäre es vorstellbar, dass die AICD-Aktivität einen regulatorischen Mechanismus der Zelle darstellt, um toxisches A β -Peptid abzubauen. Da in unserem Zellkulturmodell die HtrA1- und die AICD-Expression einem ähnlichen chronologischen Muster folgen, ist eine direkte Induktion der HtrA1-Expression durch AICD vorstellbar.

4.7. Ausblick

Als zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 das Erkrankungsalter von Alzheimer Patienten deutscher Herkunft unabhängig vom *APOE*-Status modifiziert. Nach kürzlich formulierten Konsensuskriterien sind Ergebnisse einer Assoziationsstudie durch Replikationsstudien zu bestätigen (Chanock, et al., 2007). Dementsprechend sollte unsere Studie sowohl nach einem möglichst ähnlichen Studiendesign, als auch an Fällen mit anderem ethnischen Hintergrund repliziert werden (Chanock, et al., 2007). Sollten unsere Ergebnisse bestätigt werden, würde dies die Bedeutung des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 für Morbus Alzheimer bestärken. Darüber hinaus ist nach weiteren funktionellen Loci im *HtrA1* Gen zu suchen, die sich in starkem Linkage-Disequilibrium mit dem SNP rs11200638 finden, das Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer modifizieren und dadurch relevant sein könnten.

Als wichtige Folgerung dieser Arbeit ist für zukünftige Arbeiten zum Erkrankungsalter des Morbus Alzheimer zu fordern, dass der *APOE*-Status berücksichtigt wird.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 die Zahl neuritischer Plaques und neurofibrillärer Tangles in Hirngewebe von Alzheimer Patienten modifiziert. Um den Zusammenhang zwischen *HtrA1* Genstatus und Alzheimerscher Pathologie experimentell zu untersuchen, sollte ein Tiermodell durch Kreuzung von *HtrA1*-Knockout Mäusen mit APP-transgenen Mäusen generiert werden. Mit Hilfe dieses Tiermodells ließe sich die Hypothese untersuchen, ob *HtrA1* die A β Spiegel und A β Ablagerungen beeinflusst. Als weiterer Schritt könnte ein Tiermodell entwickelt werden, bei dem APP-transgene Mäuse mit Mäusen gekreuzt werden, die unterschiedliche Genotypen des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 besitzen. Damit könnte man herausfinden, ob der *HtrA1* SNP funktionell relevant ist und ähnlich wie bei Alzheimer Patienten die Plaque Pathologie modifiziert.

Als weitere Frage ergibt sich aus der vorliegenden Arbeit, ob der *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 die *HtrA1*-Expression modifiziert. Um diese Frage zu beantworten, sollten in neuronalen Zellen die drei Genotypen des *HtrA1* Promoter SNP rs11200638 durch Vektoren eingebracht und anschließend die *HtrA1*-Expression auf Protein- und RNA-Ebene quantifiziert werden.

Das A β -abbauende Potential von *HtrA1* sollte näher untersucht werden, indem die A β -Mengen in neuronalen Zellen mit herunterregulierter und/oder hochregulierter *HtrA1*-

Expression quantifiziert werden. *In vivo* könnte die A β -degradierende Wirkung von HtrA1 mit Hilfe einer Kreuzung aus APP-transgenen Mäusen und HtrA1-Knockout bzw. HtrA1-Wildtyp Mäusen untersucht werden. Anhand solcher Analysen sollten sich Aussagen über die Degradation von A β durch HtrA1 treffen lassen.

Zudem wäre es interessant zu untersuchen, durch welche Mechanismen die Expression von HtrA1 reguliert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HtrA1-Expression in AICD-überexprimierenden Zellen erhöht ist. In weiteren Experimenten könnte man analysieren, ob die HtrA1-Expression bei Fehlen von AICD herunterreguliert wird. Diese Hypothese könnte einerseits in einem Zellkultursystem analysiert werden, in dem die AICD-Bildung z.B. durch γ -Sekretase-Inhibitoren blockiert wird. Andererseits kann AICD durch eine Mutation der Bindungsstelle für Fe65 funktionell inaktiviert werden. Mit Hilfe beider Ansätze könnte man untermauern, dass AICD die HtrA1-Expression modifizieren kann.

5. Zusammenfassung

Morbus Alzheimer ist ein multifaktorielles Syndrom, dem genetisch heterogene Erkrankungen zugrunde liegen. Während bei etwa 5% der Erkrankten autosomal-dominant vererbte Gendefekte ursächlich sind, wird für 95% ein komplexes Vererbungsmuster angenommen. Neben dem mittlerweile als Suszeptibilitätsgen für Morbus Alzheimer etablierten Apolipoprotein E Gen wurde mit Hilfe von Kopplungsuntersuchungen eine Region auf Chromosom 10q26 identifiziert, die das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer modifiziert. Das *HtrA1* Gen liegt in diesem chromosomalen Abschnitt von Chromosom 10. Kürzlich wurde gezeigt, dass es sich bei dem funktionellen Single Nucleotide Polymorphism (SNP) rs11200638 in der *HtrA1* Promotorregion um einen genetischen Risikofaktor für altersbedingte Makuladegeneration, eine Erkrankung, die pathophysiologische Gemeinsamkeiten mit Morbus Alzheimer aufweist, handelt. Ziel dieser Arbeit war es, die Assoziation zwischen dem SNP rs11200638 und dem Erkrankungsalter von Alzheimer Patienten sowie die funktionelle Bedeutung von HtrA1 für Morbus Alzheimer zu untersuchen.

Die Analyse des SNP rs11200638 an 455 Alzheimer Patienten zeigte eine deutliche Modifikation des Erkrankungsbeginns. Individuen mit dem *HtrA1*-AG/AA Genotyp erkranken durchschnittlich 2,7 Jahre früher an Morbus Alzheimer als *HtrA1*-GG Träger. Zudem sind der Effekt des *HtrA1* SNP rs11200638 und der etablierte Effekt des *APOE* Genotyps auf das Erkrankungsalter additiv und unabhängig voneinander. Die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen werden durch funktionelle Daten gestützt. Im Gehirn von Alzheimer Patienten mit *HtrA1* A-Allel ist die Anzahl neuritischer Plaques und neurofibrillärer Tangles signifikant höher als bei *HtrA1*-GG Trägern; auch dieser Einfluss des SNP rs11200638 ist unabhängig vom *APOE*-Status. Zudem zeigt sich in humanem Autopsiegewebe von Alzheimer Patienten eine signifikant erhöhte HtrA1-RNA-Expression im Vergleich zu altersgleichen Kontrollen. Zellkulturexperimente lassen vermuten, dass die HtrA1-Expression über ein Spaltprodukt des Amyloid Precursor Proteins reguliert werden kann.

Unsere Ergebnisse sowie bisherige Daten, die zeigen, dass HtrA1 A β abbauen kann und mit Alzheimerschen Plaques kolokalisiert, unterstützen die Hypothese, dass HtrA1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer spielt. Möglicherweise ist HtrA1 eine weitere A β -abbauende Protease, die sich als potentiell Ziel einer therapeutischen Intervention bei Morbus Alzheimer eignen könnte.

6. Literaturverzeichnis

- Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG. 2002. Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110(1):55-67.
- Bakay M, Zhao P, Chen J, Hoffman EP. 2002. A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1:S125-41.
- Baldi A, De Luca A, Morini M, Battista T, Felsani A, Baldi F, Catricala C, Amantea A, Noonan DM, Albini A and others. 2002. The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene* 21(43):6684-8.
- Bao F, Arai H, Matsushita S, Higuchi S, Sasaki H. 1996. Expression of apolipoprotein E in normal and diverse neurodegenerative disease brain. *Neuroreport* 7(11):1733-9.
- Barinaga M. 1995. New Alzheimer's gene found. *Science* 268(5219):1845-6.
- Berr C, Hauw JJ, Delaere P, Duyckaerts C, Amouyel P. 1994. Apolipoprotein E allele epsilon 4 is linked to increased deposition of the amyloid beta-peptide (A-beta) in cases with or without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 178(2):221-4.
- Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, Yhu S, McInnis MG, Go RC, Vekrellis K and others. 2000. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* 290(5500):2302-3.
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39(1):17-23.
- Blacker D, Bertram L, Saunders AJ, Moscarillo TJ, Albert MS, Wiener H, Perry RT, Collins JS, Harrell LE, Go RC and others. 2003. Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Hum Mol Genet* 12(1):23-32.
- Blacker D, Haines JL, Rodes L, Terwedow H, Go RC, Harrell LE, Perry RT, Bassett SS, Chase G, Meyers D and others. 1997. ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. *Neurology* 48(1):139-47.
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82(4):239-59.
- Breen KC, Bruce M, Anderton BH. 1991. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J Neurosci Res* 28(1):90-100.
- Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J. 1985. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol* 17(1):89-96.
- Busciglio J, Hartmann H, Lorenzo A, Wong C, Baumann K, Sommer B, Staufenbiel M, Yankner BA. 1997. Neuronal localization of presenilin-1 and association with amyloid plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17(13):5101-7.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA. 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273(43):27765-7.

- Cao X, Sudhof TC. 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293(5527):115-20.
- Carson JA, Turner AJ. 2002. Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J Neurochem* 81(1):1-8.
- Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G, Hirschhorn JN, Abecasis G, Altshuler D, Bailey-Wilson JE and others. 2007. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 447(7145):655-60.
- Chien J, Staub J, Hu SI, Erickson-Johnson MR, Couch FJ, Smith DI, Crowl RM, Kaufmann SH, Shridhar V. 2004. A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene* 23(8):1636-44.
- Clausen T, Southan C, Ehrmann M. 2002. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* 10(3):443-55.
- Cook DG, Sung JC, Golde TE, Felsenstein KM, Wojczyk BS, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Lee VM, Doms RW. 1996. Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(17):9223-8.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Jr., Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE and others. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7(2):180-4.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261(5123):921-3.
- Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY and others. 1999. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90(1):1-13.
- De Strooper B, Annaert W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113 (Pt 11):1857-70.
- De Strooper B, Beullens M, Contreras B, Levesque L, Craessaerts K, Cordell B, Moechars D, Bollen M, Fraser P, George-Hyslop PS and others. 1997. Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem* 272(6):3590-8.
- Delacourte A, Defossez A. 1986. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 76(2-3):173-86.
- Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG. 2005. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280(17):17294-300.
- Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, Tam PO, Chan WM, Lam DS, Snyder M and others. 2006. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 314(5801):989-92.

- Dickson DW, Crystal HA, Bevona C, Honer W, Vincent I, Davies P. 1995. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol Aging* 16(3):285-98; discussion 298-304.
- Diedrich JF, Minnigan H, Carp RI, Whitaker JN, Race R, Frey W, 2nd, Haase AT. 1991. Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol* 65(9):4759-68.
- Doan A, Thinakaran G, Borchelt DR, Slunt HH, Ratovitsky T, Podlisny M, Selkoe DJ, Seeger M, Gandy SE, Price DL and others. 1996. Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 17(5):1023-30.
- Ebinu JO, Yankner BA. 2002. A RIP tide in neuronal signal transduction. *Neuron* 34(4):499-502.
- Eckman EA, Reed DK, Eckman CB. 2001. Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* 276(27):24540-8.
- Egensperger R, Kosel S, Schnopp NM, Mehraein P, Graeber MB. 1997. Association of the mitochondrial tRNA(A4336G) mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23(4):315-21.
- Ermekova KS, Zambrano N, Linn H, Minopoli G, Gertler F, Russo T, Sudol M. 1997. The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled. *J Biol Chem* 272(52):32869-77.
- Ertekin-Taner N, Graff-Radford N, Younkin LH, Eckman C, Baker M, Adamson J, Ronald J, Blangero J, Hutton M, Younkin SG. 2000. Linkage of plasma Abeta42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science* 290(5500):2303-4.
- Esler WP, Wolfe MS. 2001. A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science* 293(5534):1449-54.
- Etcheberrigaray R, Ito E, Kim CS, Alkon DL. 1994. Soluble beta-amyloid induction of Alzheimer's phenotype for human fibroblast K⁺ channels. *Science* 264(5156):276-9.
- Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV, Zervos AS. 2000. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem* 275(4):2581-8.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama* 278(16):1349-56.
- Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. 2003. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7):4162-7.
- Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ. 2004. Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme

- that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol* 164(4):1425-34.
- Favit A, Grimaldi M, Nelson TJ, Alkon DL. 1998. Alzheimer's-specific effects of soluble beta-amyloid on protein kinase C-alpha and -gamma degradation in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10):5562-7.
- Finckh U, van Hadeln K, Muller-Thomsen T, Alberici A, Binetti G, Hock C, Nitsch RM, Stoppe G, Reiss J, Gal A. 2003. Association of late-onset Alzheimer disease with a genotype of PLA2, the gene encoding urokinase-type plasminogen activator on chromosome 10q22.2. *Neurogenetics* 4(4):213-7.
- Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC and others. 2002. *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3(1):85-97.
- Gertler FB, Doctor JS, Hoffmann FM. 1990. Genetic suppression of mutations in the *Drosophila* *abl* proto-oncogene homolog. *Science* 248(4957):857-60.
- Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA. 1998. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* 4(7):827-31.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L and others. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349(6311):704-6.
- Golabek AA, Soto C, Vogel T, Wisniewski T. 1996. The interaction between apolipoprotein E and Alzheimer's amyloid beta-peptide is dependent on beta-peptide conformation. *J Biol Chem* 271(18):10602-6.
- Goutte C, Tsunozaki M, Hale VA, Priess JR. 2002. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2):775-9.
- Grau S, Baldi A, Bussani R, Tian X, Stefanescu R, Przybylski M, Richards P, Jones SA, Shridhar V, Clausen T and others. 2005. Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(17):6021-6.
- Grau S, Richards PJ, Kerr B, Hughes C, Caterson B, Williams AS, Junker U, Jones SA, Clausen T, Ehrmann M. 2006. The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J Biol Chem* 281(10):6124-9.
- Gray CW, Ward RV, Karran E, Turconi S, Rowles A, Viglienghi D, Southan C, Barton A, Fantom KG, West A and others. 2000. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem* 267(18):5699-710.
- Guenette SY, Chen J, Ferland A, Haass C, Capell A, Tanzi RE. 1999. hFE65L influences amyloid precursor protein maturation and secretion. *J Neurochem* 73(3):985-93.
- Gunawardena S, Goldstein LS. 2001. Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* 32(3):389-401.

- Guo Q, Robinson N, Mattson MP. 1998. Secreted beta-amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF-kappaB and stabilization of calcium homeostasis. *J Biol Chem* 273(20):12341-51.
- Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. 2001. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 20(6):705-32.
- Hama E, Shirotani K, Iwata N, Saido TC. 2004. Effects of neprilysin chimeric proteins targeted to subcellular compartments on amyloid beta peptide clearance in primary neurons. *J Biol Chem* 279(29):30259-64.
- Handelmann GE, Boyles JK, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. 1992. Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res* 33(11):1677-88.
- Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ. 1999. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* 19(20):8876-84.
- Hemming ML, Patterson M, Reske-Nielsen C, Lin L, Isacson O, Selkoe DJ. 2007. Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an Abeta-degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease. *PLoS Med* 4(8):e262.
- Heston LL, Orr HT, Rich SS, White JA. 1991. Linkage of an Alzheimer disease susceptibility locus to markers on human chromosome 21. *Am J Med Genet* 40(4):449-53.
- Howlett DR, Jennings KH, Lee DC, Clark MS, Brown F, Wetzel R, Wood SJ, Camilleri P, Roberts GW. 1995. Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration* 4(1):23-32.
- Hu SI, Carozza M, Klein M, Nantermet P, Luk D, Crowl RM. 1998. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 273(51):34406-12.
- Huse JT, Pijak DS, Leslie GJ, Lee VM, Doms RW. 2000. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* 275(43):33729-37.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC. 2001. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292(5521):1550-2.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y and others. 2000. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 6(2):143-50.
- Janssens B, Goossens S, Staes K, Gilbert B, van Hengel J, Colpaert C, Bruyneel E, Mareel M, van Roy F. 2001. alphaT-catenin: a novel tissue-specific beta-catenin-binding protein mediating strong cell-cell adhesion. *J Cell Sci* 114(Pt 17):3177-88.

- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. 1993. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32(18):4693-7.
- Johnson LV, Leitner WP, Rivest AJ, Staples MK, Radeke MJ, Anderson DH. 2002. The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18):11830-5.
- Johnson LV, Leitner WP, Staples MK, Anderson DH. 2001. Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res* 73(6):887-96.
- Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS. 2001. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414(6864):643-8.
- Kamal A, Stokin GB, Yang Z, Xia CH, Goldstein LS. 2000. Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28(2):449-59.
- Kamboh MI. 2004. Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Ann Hum Genet* 68(Pt 4):381-404.
- Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. 1995. APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha 1-antichymotrypsin polymorphism. *Nat Genet* 10(4):486-8.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325(6106):733-6.
- Katzman R. 1994. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 4(5):703-7.
- Kehoe P, Wavrant-De Vrieze F, Crook R, Wu WS, Holmans P, Fenton I, Spurlock G, Norton N, Williams H, Williams N and others. 1999. A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 8(2):237-45.
- Kidd M. 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192-3.
- Kim DY, Kim KK. 2002. Crystallization and preliminary X-ray studies of the protease domain of the heat-shock protein HtrA from *Thermotoga maritima*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58(Pt 1):170-2.
- Kim HS, Kim EM, Kim NJ, Chang KA, Choi Y, Ahn KW, Lee JH, Kim S, Park CH, Suh YH. 2004. Inhibition of histone deacetylation enhances the neurotoxicity induced by the C-terminal fragments of amyloid precursor protein. *J Neurosci Res* 75(1):117-24.
- Kim JW, Lee JE, Kim MJ, Cho EG, Cho SG, Choi EJ. 2003. Glycogen synthase kinase 3 beta is a natural activator of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase 1 (MEKK1). *J Biol Chem* 278(16):13995-4001.
- Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ. 2001. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276(43):40288-92.

- Kolsch H, Linnebank M, Lutjohann D, Jessen F, Wullner U, Harbrecht U, Thelen KM, Kreis M, Hentschel F, Schulz A and others. 2004. Polymorphisms in glutathione S-transferase omega-1 and AD, vascular dementia, and stroke. *Neurology* 63(12):2255-60.
- Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL. 1990. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4):1561-5.
- Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM and others. 1996. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* 2(2):224-9.
- Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA. 1991. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16):7247-51.
- Kurochkin IV, Goto S. 1994. Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* 345(1):33-7.
- Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H and others. 2006. Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 15(13):2170-82.
- LaDu MJ, Pederson TM, Frail DE, Reardon CA, Getz GS, Falduto MT. 1995. Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. *J Biol Chem* 270(16):9039-42.
- Lah JJ, Levey AI. 2000. Endogenous presenilin-1 targets to endocytic rather than biosynthetic compartments. *Mol Cell Neurosci* 16(2):111-26.
- Lahiri DK, Kotwal GJ, Farlow MR, Sima A, Kupsky W, Sarkar FH, Sambamurti K. 2002. The role of the carboxyl-terminal fragments of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 973:334-9.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7):3922-7.
- Lee W, Boo JH, Jung MW, Park SD, Kim YH, Kim SU, Mook-Jung I. 2004. Amyloid beta peptide directly inhibits PKC activation. *Mol Cell Neurosci* 26(2):222-31.
- Li H, Wetten S, Li L, St Jean PL, Upmanyu R, Surh L, Hosford D, Barnes MR, Briley JD, Borrie M and others. 2007. Candidate Single-Nucleotide Polymorphisms From a Genomewide Association Study of Alzheimer Disease. *Arch Neurol*.
- Li X, Greenwald I. 1998. Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human presenilins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12):7109-14.
- Li YJ, Oliveira SA, Xu P, Martin ER, Stenger JE, Scherzer CR, Hauser MA, Scott WK, Small GW, Nance MA and others. 2003. Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. *Hum Mol Genet* 12(24):3259-67.

- Li YJ, Scott WK, Hedges DJ, Zhang F, Gaskell PC, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R and others. 2002. Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled. *Am J Hum Genet* 70(4):985-93.
- Li YJ, Scott WK, Zhang L, Lin PI, Oliveira SA, Skelly T, Doraiswamy MP, Welsh-Bohmer KA, Martin ER, Haines JL and others. 2006. Revealing the role of glutathione S-transferase omega in age-at-onset of Alzheimer and Parkinson diseases. *Neurobiol Aging* 27(8):1087-93.
- Lippa CF, Smith TW, Saunders AM, Hulette C, Pulaski-Salo D, Roses AD. 1997. Apolipoprotein E-epsilon 2 and Alzheimer's disease: genotype influences pathologic phenotype. *Neurology* 48(2):515-9.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-8.
- Luibl V, Isas JM, Kaye R, Glabe CG, Langen R, Chen J. 2006. Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers. *J Clin Invest* 116(2):378-85.
- Mahley RW. 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240(4852):622-30.
- Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, Seddon JM. 2006. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38(9):1055-9.
- Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z and others. 2002. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo J* 21(8):1948-56.
- Matsuda S, Matsuda Y, D'Adamio L. 2003. Amyloid beta protein precursor (AbetaPP), but not AbetaPP-like protein 2, is bridged to the kinesin light chain by the scaffold protein JNK-interacting protein 1. *J Biol Chem* 278(40):38601-6.
- Matsuda S, Yasukawa T, Homma Y, Ito Y, Niikura T, Hiraki T, Hirai S, Ohno S, Kita Y, Kawasumi M and others. 2001. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNK. *J Neurosci* 21(17):6597-607.
- Mayeux R, Stern Y, Ottman R, Tatemichi TK, Tang MX, Maestre G, Ngai C, Tycko B, Ginsberg H. 1993. The apolipoprotein epsilon 4 allele in patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 34(5):752-4.
- Milward EA, Papadopoulos R, Fuller SJ, Moir RD, Small D, Beyreuther K, Masters CL. 1992. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 9(1):129-37.
- Miners JS, Van Helmond Z, Chalmers K, Wilcock G, Love S, Kehoe PG. 2006. Decreased expression and activity of neprilysin in Alzheimer disease are associated with cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(10):1012-21.
- Moir RD, Lynch T, Bush AI, Whyte S, Henry A, Portbury S, Multhaup G, Small DH, Tanzi RE, Beyreuther K and others. 1998. Relative increase in Alzheimer's disease of soluble forms of cerebral Abeta amyloid protein precursor containing the Kunitz protease inhibitory domain. *J Biol Chem* 273(9):5013-9.

- Morelli L, Llovera R, Gonzalez SA, Affranchino JL, Prelli F, Frangione B, Ghiso J, Castano EM. 2003. Differential degradation of amyloid beta genetic variants associated with hereditary dementia or stroke by insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem* 278(26):23221-6.
- Moussaoui S, Czech C, Pradier L, Blanchard V, Bonici B, Gohin M, Imperato A, Revah F. 1996. Immunohistochemical analysis of presenilin-1 expression in the mouse brain. *FEBS Lett* 383(3):219-22.
- Muller T, Concannon CG, Ward MW, Walsh CM, Tirniceriu AL, Tribl F, Kogel D, Prehn JH, Egensperger R. 2007. Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Mol Biol Cell* 18(1):201-10.
- Myers A, Holmans P, Marshall H, Kwon J, Meyer D, Ramic D, Shears S, Booth J, DeVrieze FW, Crook R and others. 2000. Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science* 290(5500):2304-5.
- Myers A, Wavrant De-Vrieze F, Holmans P, Hamshere M, Crook R, Compton D, Marshall H, Meyer D, Shears S, Booth J and others. 2002. Full genome screen for Alzheimer disease: stage II analysis. *Am J Med Genet* 114(2):235-44.
- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. 1991. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* 541(1):163-6.
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. 1994. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264(5160):850-2.
- Nie GY, Hampton A, Li Y, Findlay JK, Salamonsen LA. 2003. Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2. *Biochem J* 371(Pt 1):39-48.
- Nunan J, Williamson NA, Hill AF, Sernee MF, Masters CL, Small DH. 2003. Proteasome-mediated degradation of the C-terminus of the Alzheimer's disease beta-amyloid protein precursor: effect of C-terminal truncation on production of beta-amyloid protein. *J Neurosci Res* 74(3):378-85.
- Octave JN, Essalmani R, Tasiaux B, Menager J, Czech C, Mercken L. 2000. The role of presenilin-1 in the gamma-secretase cleavage of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275(3):1525-8.
- Ozturk A, DeKosky ST, Kamboh MI. 2006. Genetic variation in the choline acetyltransferase (CHAT) gene may be associated with the risk of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27(10):1440-4.
- Ozturk A, Desai PP, Minster RL, Dekosky ST, Kamboh MI. 2005. Three SNPs in the GSTO1, GSTO2 and PRSS11 genes on chromosome 10 are not associated with age-at-onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26(8):1161-5.
- Ozturk A, Minster RL, DeKosky ST, Kamboh MI. 2007. Association of tagSNPs in the urokinase-plasminogen activator (PLAU) gene with Alzheimer's disease and associated quantitative traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144(1):79-82.

- Papassotiropoulos A, Lambert JC, Wavrant-De Vrieze F, Wollmer MA, von der Kammer H, Streffer JR, Maddalena A, Huynh KD, Wolleb S, Lutjohann D and others. 2005. Cholesterol 25-hydroxylase on chromosome 10q is a susceptibility gene for sporadic Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 2(5):233-41.
- Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Muller U and others. 2005. Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46(4):541-54.
- Pearson HA, Peers C. 2006. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol* 575(Pt 1):5-10.
- Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK, Terwedow HA, Menold MM, Conneally PM, Small GW, Vance JM and others. 1997. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *Jama* 278(15):1237-41.
- Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Jr., Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA and others. 1991. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 48(6):1034-50.
- Pericak-Vance MA, Haines JL. 1995. Genetic susceptibility to Alzheimer disease. *Trends Genet* 11(12):504-8.
- Perry EK, Perry RH. 1985. A review of neuropathological and neurochemical correlates of Alzheimer's disease. *Dan Med Bull* 32 Suppl 1:27-34.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. 1987. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917(1):148-61.
- Poduri A, Gearing M, Rebeck GW, Mirra SS, Tigges J, Hyman BT. 1994. Apolipoprotein E4 and beta amyloid in senile plaques and cerebral blood vessels of aged rhesus monkeys. *Am J Pathol* 144(6):1183-7.
- Poirier J. 1994. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17(12):525-30.
- Propping P, Nothen MM, Korner J, Rietschel M, Maier W. 1994. [Genetic association in psychiatric diseases. Concepts and findings]. *Nervenarzt* 65(11):725-40.
- Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. 1998. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273(49):32730-8.
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. 1993. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11(4):575-80.
- Riemenschneider M, Konta L, Friedrich P, Schwarz S, Taddei K, Neff F, Padovani A, Kolsch H, Laws SM, Klopp N and others. 2006. A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 15(16):2446-56.
- Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, Weber BH. 2005. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-

- related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet* 14(21):3227-36.
- Rozemuller JM, Eikelenboom P, Stam FC, Beyreuther K, Masters CL. 1989. A4 protein in Alzheimer's disease: primary and secondary cellular events in extracellular amyloid deposition. *J Neuropathol Exp Neurol* 48(6):674-91.
- Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P. 2001. The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* 153(7):1403-14.
- Sabo SL, Lanier LM, Ikin AF, Khorkova O, Sahasrabudhe S, Greengard P, Buxbaum JD. 1999. Regulation of beta-amyloid secretion by FE65, an amyloid protein precursor-binding protein. *J Biol Chem* 274(12):7952-7.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463-7.
- Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condrón MM, Teplow DB, Haass C. 2001. Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2(9):835-41.
- Saunders AM, Schmechel K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring MG, Szymanski MH, McCown N and others. 1993a. Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet* 342(8873):710-1.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ and others. 1993b. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43(8):1467-72.
- Scheinfeld MH, Roncarati R, Vito P, Lopez PA, Abdallah M, D'Adamio L. 2002. Jun NH2-terminal kinase (JNK) interacting protein 1 (JIP1) binds the cytoplasmic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* 277(5):3767-75.
- Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME and others. 1992. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258(5082):668-71.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W and others. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2(8):864-70.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. 1993. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20):9649-53.
- Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G. 1989. The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3(6):689-94.
- Selkoe DJ. 1991a. Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Sci Am* 265(5):68-71, 74-6, 78.

- Selkoe DJ. 1991b. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6(4):487-98.
- Selkoe DJ. 1994. Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 4(5):708-16.
- Selkoe DJ. 2001. Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20):11039-41.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K and others. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375(6534):754-60.
- Shridhar V, Sen A, Chien J, Staub J, Avula R, Kovats S, Lee J, Lillie J, Smith DI. 2002. Identification of underexpressed genes in early- and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization. *Cancer Res* 62(1):262-70.
- Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, Perry G, Price DL. 1993. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci* 13(7):3136-42.
- Slooter AJ, de Knijff P, Hofman A, Cruts M, Breteler MM, Van Broeckhoven C, Havekes LM, van Duijn CM. 1998. Serum apolipoprotein E level is not increased in Alzheimer's disease: the Rotterdam study. *Neurosci Lett* 248(1):21-4.
- Slunt HH, Thinakaran G, Von Koch C, Lo AC, Tanzi RE, Sisodia SS. 1994. Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* 269(4):2637-44.
- Spiess C, Beil A, Ehrmann M. 1999. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97(3):339-47.
- St George-Hyslop P, Polinsky R, Haines J, Nee L, Tanzi R, Conneally P, Growdon J, Myers R, Pollen D, Drachman D and others. 1987. Search for the familial Alzheimer's disease gene. *J Neural Transm Suppl* 24:13-21.
- Stepanichev MY, Zdobnova IM, Yakovlev AA, Onufriev MV, Lazareva NA, Zarubenko, II, Gulyaeva NV. 2003. Effects of tumor necrosis factor-alpha central administration on hippocampal damage in rat induced by amyloid beta-peptide (25-35). *J Neurosci Res* 71(1):110-20.
- Strittmatter WJ, Roses AD. 1995. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11):4725-7.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5):1977-81.
- Sudoh S, Frosch MP, Wolf BA. 2002. Differential effects of proteases involved in intracellular degradation of amyloid beta-protein between detergent-soluble and -insoluble pools in CHO-695 cells. *Biochemistry* 41(4):1091-9.
- Swamy KH, Chung CH, Goldberg AL. 1983. Isolation and characterization of protease do from *Escherichia coli*, a large serine protease containing multiple subunits. *Arch Biochem Biophys* 224(2):543-54.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL. 1987. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235(4791):880-4.

- Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, Wasco W. 1996. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 3(3):159-68.
- Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J. 1998. Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 273(50):33556-60.
- Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, Wright S, Kawarabayashi T, Price D, Walker D, Scheff S, McGillis JP, Rydel RE and others. 2000. The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci* 20(11):3937-46.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70(1):1-32.
- Uchihara T, Duyckaerts C, He Y, Kobayashi K, Seilhean D, Amouyel P, Hauw JJ. 1995. ApoE immunoreactivity and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 195(1):5-8.
- Van Broeckhoven C. 1994. Genes in early onset Alzheimer's disease: implications for AD research. *Neurobiol Aging* 15 Suppl 2:S149-53.
- Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F. 1992. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22):10758-62.
- Weidemann A, Konig G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57(1):115-26.
- Wisniewski T, Frangione B. 1992. Molecular biology of Alzheimer's amyloid--Dutch variant. *Mol Neurobiol* 6(1):75-86.
- Yamamoto T, Horikoshi M. 1997. Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J Biol Chem* 272(49):30595-8.
- Yan P, Hu X, Song H, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, Xiao Q, Hsu FF, Turk JW, Xu J and others. 2006. Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem* 281(34):24566-74.
- Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, Chen H, Zhao Y, Pearson E, Li X and others. 2006. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 314(5801):992-3.
- Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL. 1989. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 245(4916):417-20.
- Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. 2001. Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* 297(2):97-100.
- Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. 1990. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87(2):257-63.
- Youssef I, Florent-Bechard S, Malaplate-Armand C, Koziel V, Bihain B, Olivier JL, Leininger-Muller B, Kriem B, Oster T, Pillot T. 2007. N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol Aging*.

-
- Yu C, Kim SH, Ikeuchi T, Xu H, Gasparini L, Wang R, Sisodia SS. 2001. Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma-secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains. *J Biol Chem* 276(47):43756-60.
- Yu CE, Payami H, Olson JM, Boehnke M, Wijsman EM, Orr HT, Kukull WA, Goddard KA, Nemens E, White JA and others. 1994. The apolipoprotein E/CI/CII gene cluster and late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 54(4):631-42.
- Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T and others. 2000. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407(6800):48-54.
- Zambrano N, Bruni P, Minopoli G, Mosca R, Molino D, Russo C, Schettini G, Sudol M, Russo T. 2001. The beta-amyloid precursor protein APP is tyrosine-phosphorylated in cells expressing a constitutively active form of the Abl protooncogene. *J Biol Chem* 276(23):19787-92.
- Zannis VI, Breslow JL, SanGiacomo TR, Aden DP, Knowles BB. 1981. Characterization of the major apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines. *Biochemistry* 20(25):7089-96.
- Zlokovic BV. 2004. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 89(4):807-11.
- Zubenko GS, Stiffler S, Stabler S, Kopp U, Hughes HB, Cohen BM, Moossy J. 1994. Association of the apolipoprotein E epsilon 4 allele with clinical subtypes of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Am J Med Genet* 54(3):199-205.
- Zumbrunn J, Trueb B. 1996. Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett* 398(2-3):187-92.

7. Anhang

7.1. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn PD Dr. R. Egensperger für seine Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit und für die Übernahme des Gutachtens danken. Sein Engagement, die kritischen und fordernden Anmerkungen haben es mir ermöglicht, diese Arbeit zu Ende zu führen. Ich bedanke mich für die sehr freundliche Aufnahme in der „Ag Eg“, für die fachlichen und privaten Ratschläge, Ermutigungen und sein Vertrauen. Vielen Dank!

Herrn Prof. Dr. M. Ehrmann möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die interessanten fachlichen Gespräche danken.

Herrn Prof. Dr. H. Esche danke ich für die Übernahme des Drittgutachtens.

Herrn Prof. Dr. K.W. Schmid danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können und für die entspannten Weihnachtsfeiern und Sommerfeste.

Bei Herrn Dr. K. Worm möchte ich mich für seine Geduld, mit der er alle meine Fragen beantwortete und für die lustigen und freundlichen Gespräche bedanken. Bei Frau PD Dr. A. Kindler-Röhrborn und Herrn Dr. B. Kölsch bedanke ich mich für deren Unterstützung bei meiner Arbeit. Bei allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Pathologie und Neuropathologie bedanke ich mich für die schöne Zeit im Institut, unter anderem für das Abstoppen der Gelelektrophorese.

Ein ganz besonderer Dank gilt Nadine Matzner und Suzan Schwertheim, mit denen ich eine sehr schöne Zeit im und außerhalb des Labors hatte. Die Gespräche auf dem Flur, an bestimmten bevorzugten Plätzen werde ich nie vergessen. Meine tägliche Dosis von Schokolade und die Frage „Darf ich das Radio ausschalten?“ werde ich bestimmt vermissen, Suzan! Bei Nadine bedanke ich mich ganz besonders dafür, dass sie mich täglich zum Lachen gebracht hat, selbst wenn die PCR einfach nicht funktionieren wollte, und für ihre Geduld bei der Korrektur grammatikalischer Fehler. Ich hoffe, dass die daraus entstandene Freundschaft auch ohne PCR über die Zeit bestehen bleiben wird.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie am Universitätsklinikum Münster für die schöne und sportliche Zeit in der Fahrradfreundlichen Stadt. Besonders danke ich Dr. Thorsten Müller und Susanne Peetz-Dienhardt für die warme Aufnahme in die „Ag Eg“, fachliche Unterstützung und Einführung in das Leben als Forscher. Thorsten danke ich für seine anregenden Diskussionen und für das freundschaftliche Verhältnis. Susanne danke ich ganz besonders, dass ich den Frust aus dem Labor auf ihrem Bauernhof vergessen und ausspannen konnte. Auch bei Heide Vogel bedanke ich mich für die freundschaftlichen Gespräche beim Laufen entlang des Dortmund-Ems-Kanals oder um den Aasee.

Mein besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mir das Studium in Deutschland ermöglicht haben und mich immer dabei unterstützt haben, wo sie nur konnten. Bei meinem Freund Andrei bedanke ich mich für seine Geduld und sein Verständnis, die er in dieser Zeit gezeigt hat. Seine Aufmunterungen waren mir eine große Stütze.

7.2. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Anca Laura Tirniceriu
 Geburtsdatum: 18. Juni 1979
 Geburtsort: Iasi, Rumänien
 Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang:

09/1985 – 07/1993 Grundschule Miron Costin, Iasi
 09/1993 – 06/1997 Gymnasium Colegiul National, Iasi
 07/1997 Abitur

Universitäre Ausbildung:

10/1997 – 09/1999 Studium Diplom-Biologie an der A.I. Cuza Universität, Iasi
 10/1999 – 05/2001 Technische Universität Braunschweig, Erasmus- Sokrates Stipendium
 05/2001 Deutsche Sprachprüfung für den Hochschulzugang ausländischer Studienbewerber an der TU Braunschweig
 05/2001 – 07/2002 Hauptstudium an der TU Braunschweig, Fachrichtung Biologie
 08/2002 – 10/2002 Diplomhauptprüfungen
 11/2002 – 07/2003 Diplomarbeit am Zoologischen Institut, Arbeitsgruppe Zellbiologie
 Titel der Arbeit: „Modulation of the microfilament system by the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP“
 09/2003 – 31.12.2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Neuropathologie, Westfälische-Wilhelms Universität Münster; Leiter der Arbeitsgruppe: PD. Dr. R. Egensperger

seit 01/2006 Promotion am Institut für Pathologie und Neuropathologie,
Bereich Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen unter
der Einleitung von PD. Dr. R. Egensperger

Studienbegleitende Tätigkeiten:

10/2000 – 06/2001 Durchführung und Auswertung von Experimenten im
Rahmen eines Forschungsprojekts: „Einfluss von
Pflanzenschutzmitteln auf Testorganismen im Wasser“ am
Zoologischen Institut der TU Braunschweig, Arbeitsgruppe
Limnologie und an der Biologischen Bundesanstalt für
Land- und Forstwirtschaft (BBA)

10/2001 – 08/2003 Wissenschaftliche Hilfskraft am Leichtweiß-Institut für
Wasserbau, Abteilung Abfallwirtschaft der TU
Braunschweig: Bestimmung physikalisch-chemischer
Grundparameter

Wissenschaftlichen Veröffentlichungen:

1. Müller T, Concannon CG, Ward MW, Walsh CM, Tirniceriu AL, Tribl F, Kögel D, Prehn JH, Egensperger R. *Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD)*. Mol Biol Cell. 2007 Jan; 18(1):201-10. Epub 2006 Nov 8.
2. Tirniceriu AL, Riemenschneider M, Schubert A, Lehmann N, Schröder I, Müller T, Paulus W, Kurz A, Jöckel K-H, Ehrmann M, Egensperger R. *A functional HtrA1 promoter polymorphism modifies age-at-onset of Alzheimer's disease*. Submittiert

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die genetische und funktionelle Bedeutung des High Temperature Requirement A1 Proteins (HtrA1) und eines HtrA1-Promoter Single Nucleotide Polymorphismus für Morbus Alzheimer“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Anca Laura Tirniceriu befürworte.

Essen, den 10.05.2008

PD. Dr. R. Egensperger

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 10.05.2008

A. Tirniceriu

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 10.05.2008

A. Tirniceriu