

Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. Förstl)

**Der Apolipoprotein E Polymorphismus und sein Einfluß
auf die Entstehung psychiatrischer Krankheiten**

Patrick Thilmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Förstl
2. apl. Prof. Dr. A. Kurz

Die Dissertation wurde am 28.11.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 10.01.2001 angenommen.

1. Einleitung

Das Apolipoprotein E (Apo-E) spielt eine wichtige Rolle beim Lipidmetabolismus und beim Lipidtransport. Zudem soll das Apo-E einen Einfluß auf die Neurodegeneration und Regeneration haben und wird mit dem Auftreten einer Alzheimer Demenz in Zusammenhang gebracht.

Es handelt sich um ein auf dem langen Arm des Chromosoms 19 gelegenes Lipoprotein-Gen (Olaisen et al. 1982). Apo-E besteht aus 299 Aminosäuren, das Apo-E-Gen ist 3597 Nukleotide lang und beinhaltet 4 Exons und 3 Introns. Das Molekulargewicht beträgt 34145 (Weisgraber 1994). Die Synthese erfolgt überwiegend in der Leber. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß das Apo-E auch in zahlreichen anderen Geweben gebildet wird (Blue et al. 1983). Darunter ist das Gehirn der Ort mit der zweitgrößten Konzentration von mRNA des Apo-E (Elshourbagy et al. 1985). Im Gehirn wird das Apo-E von Astrozyten produziert (Pitas et al. 1987). Apo-E ist Hauptbestandteil der Apolipoproteine im Liquor, wohingegen das Apolipoprotein B (Apo-B) und die Low density Lipoproteins (LDL) fehlen (Roheim et al. 1979).

Bei gelelektrophoretischen Untersuchungen fielen 3 verschiedene Bandenmuster auf, aufgrund derer ein 3 Allelmodell postuliert wurde (Zannis und Breslow 1981). Das Apo-E 4 ist das basischste, das Apo-E 2 das sauerste Isoprotein (Zannis et al. 1982). Die verschiedenen isoelektrischen Punkte in der Gelelektrophorese kennzeichnen die 3 Isoformen. Die Bezeichnung als Apolipoprotein Allel $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ wurde 1982 eingeführt (Zannis et al. 1982). Die komplette Aminosäuresequenz wurde im Jahre 1981 bestimmt (Rall et al. 1981). In dieser Untersuchung wurde auch die molekularbiologische Erklärung des Apo-E Polymorphismus herausgefunden. An den Aminosäurestellen 112 und 158 fand sich ein Aminosäuretausch. Bei dem häufigsten Allel dem Apolipoprotein $\epsilon 3$, das als Urform angenommen wird, findet sich an Stelle 112 Cystein, an Stelle 158 Arginin. An beiden Positionen findet sich beim Allel $\epsilon 2$ Cystein und beim Allel $\epsilon 4$ Arginin (Rall et al. 1981) (siehe Abbildung 1 und Punkt 2.2.5.1). Dieser Aminosäureaustausch ist verantwortlich für die o.g. verschiedenen Ladungen der Allele.

Den o.g. Untersuchungen zufolge existieren 6 verschiedene Geno- bzw. Phänotypen. 3 homozygote $\epsilon 2$, $\epsilon 2$ (E2/2), $\epsilon 3$, $\epsilon 3$ (E3/3) und $\epsilon 4$, $\epsilon 4$ (E4/4), sowie 3 heterozygote $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ (E2/3), $\epsilon 2$, $\epsilon 4$ (E2/4) und $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ (E3/4).

Die Möglichkeit der Differenzierung dieser 6 Phänotypen mittels Restriktionsenzymen wurde von Hixson und Vernier (1990) veröffentlicht.

Abbildung 1

Die DNA- /Aminosäuresequenz der 3 Allele des Apolipoprotein E

E2/3/4 DNA: Primer 43-GAG CTG CAG GCG GCG CAG GCC CGG CTG GGC GCG

Protein: Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala

Aminosäurenposition:

E2:

E4:

E3 GAC ATG GAG GAC GTG TGC GGC CGC CTG GTG CAG TAC CGC GGC GAG

E3:: Asp Met Glu Asp Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu

E2:

E4:

112

T

C

TGC

Cys

Cys

Arg

E3: GTG CAG GCC ATG CTC GGC CAG AGC ACC GAG GAG CTG CGG GTG CGC

E3: Val Gln Ala Met Leu Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg

E3: CTC GCC TCC CAC CTG CGC AAG CTG CGT AAG CGG CTC CTC CGC GAT

E3: Leu Ala Ser His Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp

Aminosäurenposition:

E2:

E4:

E3: GCC GAT GAC CTG CAG AAG CGC CTG GCA-Primer41

E3: Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg Leu Ala

E2:

E4:

158

T

C

CGC

Arg

Cys

Arg

Abbildung 1 zeigt die DNA der 3 Apolipoprotein E Allele mit dem Aminosäureaustausch an Position 112 und 158

Der Lipidmetabolismus, der Lipidtransport, sowie die Verteilung von Fetten in Gewebe und Zellen ist die am besten untersuchte Funktion des Apolipoprotein. Es besitzt die Fähigkeit Lipide zu binden und die Pseudomicellenstruktur von Lipoproteinen zu stabilisieren (Weisgraber 1994). Das Apo-E wird in very low density lipoproteins (VLDL) gebunden um Triglyzeride von der Leber in peripheres Gewebe zu transportieren. Es ist ebenso Teil der

high density lipoproteins (HDL), die am Cholesterintransport zwischen Zellen teilnehmen (Mahley 1988). Eine wichtige Fähigkeit des Apo-E ist, an LDL-Rezeptoren in extra- und intrahepatischem Gewebe zu binden. Zusätzlich vermittelt das Apo-E die Bindung von Chylomikronen an hepatischem Gewebe. Das Apo-E dient als Bindeglied zwischen den Lipidpartikeln und den Rezeptoren. Die für die Bindung an LDL-Rezeptoren wichtigen Aminosäuren liegen zwischen den Aminosäurepositionen 140-160 des Apo-E (Mahley 1988). Veränderungen der Aminosäuresequenz wie beim Apo-E $\epsilon 2$ (Arginin \rightarrow Cystein) vermindert die Bindungsfähigkeit des Apo-E an die Rezeptoren (Innerarity 1984).

Im Gehirn konnten ebenfalls Apo-E bindende LDL-Rezeptoren nachgewiesen werden (Pitas et al. 1987).

Als weitere Funktion wird vermutet, daß das Apo-E eine bedeutende Rolle bei der Degeneration bzw. der Regeneration von Nerven spielt. Dies wird hauptsächlich in Verbindung mit der Funktion des Apo-E beim Lipidtransport gesehen. Bei Nervenverletzungen wird das Apo-E von Makrophagen produziert (Mahley 1988). Bei der Regeneration des Nerven werden LDL-Rezeptoren an den Neuriten exprimiert. Es wird angenommen, daß die LDL-Rezeptoren Apo-E binden um die zur Remyelinisierung notwendigen Lipide aufzunehmen.

Eine weitere mögliche Wirkung des Apo-E auf die Nervenregeneration wird in einer direkt stimulierenden Wirkung auf das Axonwachstum gesehen. Es wurde nachgewiesen, daß der Alleltyp $\epsilon 3$ des Apo-E das Aussprossen von Neuriten positiv beeinflusst, wohingegen der Alleltyp $\epsilon 4$ keinen begünstigenden Effekt hat (Holtzmann 1995). Bestimmte Isoformen des Apo-E würden so als neurotroper Faktor wirken (Mahley 1988).

In dieser Arbeit werden die Patienten einer psychiatrischen Klinik auf ihren Apo-E Genotyp/Phänotyp hin untersucht. Die Diagnosen wurden entsprechend den unter 2.1.2 bis 2.1.4 genannten Kriterien gestellt. Die Patienten konnten in folgende Diagnosegruppen unterteilt werden: Demenz vom Alzheimer Typ, vaskuläre Demenz, Schizophrenien, Neurosen, Alkoholpsychosen, affektive Psychosen, Minderbegabung und Alkoholabhängigkeit.

Die größte Gruppe an Erkrankten stellen die Patienten mit einer Alzheimer Demenz dar.

Bei der Alzheimer Demenz handelt es sich um einen, erstmals von Aloys Alzheimer beschriebenen, dementiellen hirngeweblichen Prozeß. Er beschrieb am Beispiel einer mit 51 Jahren erkrankten Patientin des Klinikums Frankfurt „einen eigenartigen schweren

Erkrankungsprozeß der Hirnrinde“ (Alzheimer 1907). An dieser Patientin beobachtete Alzheimer Kurzzeitgedächtnis-, Sprach- und Orientierungsstörungen, sowie Verhaltensauffälligkeiten. Weitere typische Symptome einer Alzheimer Demenz sind der Verlust des abstrakten Denkens, Apraxien, amnestische Aphasien und andere neuropsychologische Defizite. Außerdem begleiten nichtkognitive Symptome wie Depressionen und Passivität die Erkrankung. Die Alzheimer Demenz stellt die häufigste Ursache einer dementiellen Entwicklung in der Bevölkerung dar (Tomlinson 1977, Ott 1995). Es wird eine präsenile Form mit einem Erkrankungsbeginn bis zum 65 Lebensjahr, sowie eine senile Form der Alzheimer Demenz unterschieden. Die senile Form tritt häufiger sporadisch auf, ohne daß sich hier Hinweise auf eine genetische Ursache finden. Bei der präsenilen Form finden sich häufig Verwandte 1. und 2. Grades. Dies spricht sehr für eine genetische Ursache. Bezüglich der Klinik zeigen sich zwischen den beiden Formen keine Unterschiede. Histologisches Korrelat beider Formen sind die bereits von Alzheimer beschriebenen neurofibrillären Bündel und die kortikalen Plaques. Die primär in den Neuriten gelegenen Neurofibrillenbündel stellen sich als paired-helical filaments dar. Bestandteil dieser paired-helical filaments ist die phosphorylierte Form des Tau-Proteins. Das β A4-Protein konnte 1985 als das in den kortikalen Plaques abgelagerte Material nachgewiesen werden (Masters et al. 1985). Dieses β A4-Protein stellte sich als Teilstück eines auf dem Chromosom 21 gelegenen β -Amyloid-Precursor-Proteins dar.

Es ergaben sich Hinweise darauf, daß die Ablagerung von β -Amyloid, sowie die Bildung neurofibrillärer Bündel in Zusammenhang mit dem Allel Typ ϵ 4 des Apo-E stehen soll (Nagy et al. 1995).

Die Vermutung eines Alzheimer assoziierten Gens auf dem Chromosom 19 wurde erstmals von Pericak-Vance et al. (1991) geäußert. Diese stellten über Linkage-Analysen einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Alzheimer Demenz und dem langen Arm des Chromosoms 19 her. Hier handelte sich um Patienten, die an der senilen Form der Alzheimer Demenz erkrankt sind.

Ein direkter Zusammenhang des Apo-E mit dem Auftreten einer Alzheimer Demenz wurde erstmals im Jahre 1993 von Corder und Mitarbeitern hergestellt (Corder et al 1993). In dieser Untersuchung stellten diese bei Patienten mit einer Alzheimer Demenz gehäuft das Auftreten des Apo-E ϵ 4 Allels fest. Hierbei erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit an einer Alzheimer Demenz zu erkranken mit der Zahl der Apo-E ϵ 4 Allele. Auch bezüglich des Erkrankungsalters zeigte sich eine Abhängigkeit von der Zahl der ϵ 4 Allele. Abhängig von

der Zahl der $\epsilon 4$ Allele zeigte sich ein 9 Jahre (bei heterozygoten $\epsilon 4$ Allel Trägern) bis zu 16 Jahre (bei homozygoten Trägern des $\epsilon 4$ Allels) früherer Erkrankungsbeginn verglichen mit einer Kontrollgruppe mit Patienten, die kein Apo-E $\epsilon 4$ Allel besaßen. Diese Daten beziehen sich auf die senile Form der Alzheimer Erkrankung. Frühformen und familiäre Erkrankungen wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Dieser Sachverhalt konnte in zahlreichen Replikationsstudien in verschiedenen Bevölkerungsgruppen bestätigt werden. So konnte dieser Zusammenhang z. B. bei spanischen (Adroer et al. 1995), deutschen (Förstl et al. 1994), chinesischen (Hong et al. 1996) und finnischen (Kuusisto et al. 1994) Patienten nachgewiesen werden.

Die Spezifität dieses möglichen Risikofaktors für das Auftreten einer Alzheimer Demenz ist bisher jedoch wenig untersucht. Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen Krankheiten die mit einer dementiellen Entwicklung einhergehen bzw. einhergehen können wie z.B. der Jakob-Creutzfeldt Erkrankung, dem Down-Syndrom (Saunders et al. 1993), oder dem Morbus Parkinson (Marder et al. 1994) und der Häufigkeit des Apo-E $\epsilon 4$ herstellen.

In beschränktem Umfang liegen Daten zu der Assoziation zwischen dem Allel Typ $\epsilon 4$ und cerebralen Gefäßerkrankungen vor. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden eine ähnliche Korrelation zwischen dem Apo-E $\epsilon 4$ und dem Auftreten einer vaskulären Demenz. In diesen Untersuchungen wurde ein vermehrtes Auftreten des Apo-E $\epsilon 4$ Allels bei Patienten mit cerebralen Insulten (Pedro-Botet et al. 1994, Shimano et al. 1989) und Patienten mit einer vaskulären Demenz (Frisoni et al. 1994) beobachtet.

Die pathophysiologische Bedeutung des Apolipoprotein $\epsilon 4$ bei der Entstehung einer Alzheimer Demenz ist derzeit noch unklar. Es existieren bezüglich der biochemischen Zusammenhänge verschiedene Erklärungsansätze, die in Kapitel 4 erörtert werden.

Um zu differenzieren ob es sich bei dem Apo-E um ein für die Entstehung einer Alzheimer Demenz spezifisches Protein handelt, oder dieses allgemein das Auftreten hirnerkrankungen begünstigt, sollen folgende Hypothesen in dieser Arbeit untersucht werden:

- 1) Die Trägerrate des Apolipoprotein E $\epsilon 4$ Allels ist bei Patienten, die an einer Alzheimer Demenz erkrankt sind im Vergleich zu einer nicht dementen Kontrollgruppe erhöht.

- 2) In der Patientengruppe der an einer vaskulären Demenz erkrankten ist die Frequenz des Apolipoprotein E $\epsilon 4$ ebenfalls erhöht.
- 3) Bei den anderen psychiatrischen Erkrankungen findet sich im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv keine Abweichung der Allelhäufigkeiten des Apolipoprotein E.

2. Material und Methodik

2.1 Klinisch-diagnostische Methoden

2.1.1 Patienten- und Probandenkollektiv:

Die Patienten dieser Studie stammen aus dem sächsischen Landeskrankenhaus für Psychiatrie und Neurologie in Großschweidnitz. Dieses Patientenkollektiv wurde anhand der unten genannten Richtlinien acht verschiedenen Diagnosegruppen zugeordnet.

Das Patientenkollektiv umfaßt eine Zahl von 299 Patienten.

Als Kontrollgruppe wurden 56 gesunde Probanden, Angestellte des sächsischen Landeskrankenhauses Großschweidnitz, auf ihren Apolipoprotein E Typ hin untersucht.

Dies erfolgt um eine regionale Variabilität der Häufigkeit der Apolipoprotein E Frequenzen auszuschließen. Der Altersdurchschnitt entspricht aus diesem Grund nicht dem des Patientenkollektivs.

2.1.2. Diagnosenstellung nach ICD-9

Die Diagnosen wurden unter Zuhilfenahme der Kriterien der 9ten Revision der International classification of diseases (ICD-9) gestellt. (WHO)

2.1.2.1 Alzheimer Demenz

Dieser fordert zur Diagnosestellung einer präsenilen oder senilen Demenz, d.h. einer Demenz vom Alzheimer Typ (ICD 290.0-3) den Ausschluß bzw. die Erfüllung folgender Kriterien: Primär muß der Ausschluß anderer degenerativer Hirnerkrankungen, wie z.B. eines Hydrocephalus malresorptivus oder einer Pick'schen Atrophie erfolgen. Des weiteren müssen vorübergehende Psychosen und nicht einzuordnende dementielle Erkrankungen ausgeschlossen werden.

2.1.2.2 Vaskuläre Demenz

Der Diagnosegruppe einer vaskulären Demenz wurde ein Patient dann zugeordnet, wenn die Demenz aufgrund degenerativer Erkrankungen der kleinen und großen Hirnarterien mit

konsekutiver Hirnschädigung verursacht wurde und neurologische Symptome auftraten, die durch diese Erkrankung verursacht wurden.

2.1.2.3 Alkoholpsychosen

Die Diagnose einer Alkoholpsychose (ICD291.x) wurde gestellt, wenn bei dem Patienten ein langjähriger Alkoholkonsum besteht oder bestand und dieser in ursächlichem Zusammenhang mit der Psychose steht.

2.1.2.4 Schizophrene Psychosen

Schizophrene Psychosen (ICD 295.x) wurden diagnostiziert, wenn charakteristische Störungen des Denkens, der Wahrnehmung, des Bewußtseins, der Persönlichkeit, des Verhaltens sowie der Stimmung vorhanden waren. Die intellektuellen Fähigkeiten bleiben hierbei typischerweise erhalten.

Ausgeschlossen werden müssen passagere Psychosen z.B. im Rahmen von Medikamenten- nebenwirkungen.

2.1.2.5 Affektive Psychosen

Unter affektiven Psychosen wurden Krankheiten zusammengefaßt, die mit einer depressiven und manischen Symptomatik mit ausgeprägter Affektstörung einhergehen. Hierunter fallen sowohl mono- als auch bipolare Verläufe.

2.1.2.6 Neurosen

Die Diagnose einer Neurose wurde gestellt, wenn für die Symptomatik keine organische Grunderkrankung eruiert werden konnte. Hierbei können beispielsweise Angststörungen, depressive Verstimmungen und Zwangshandlungen auftreten.

2.1.2.7 Minderbegabung

„Schwachsinn“ wurde diagnostiziert, wenn eine nicht sekundär degenerative Minderbegabung mit einem Intelligenzquotienten unter 85 psychometrisch festgestellt wurde. Hierunter subsumieren sich die Begriffe Debilität, Imbezilität und Idiotie.

Die Diagnosestellung erfolgte immer unter Ausschluß anderer das Krankheitsbild auslösender Faktoren.

2.1.3 Zusätzliche Kriterien zur Diagnosestellung einer Alzheimer Demenz

2.1.3.1 NINCDS-ADRDA Kriterien

Des Weiteren wurden zur Diagnose einer Alzheimer Demenz die von dem National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) und der Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA) 1984 erstellten Kriterien berücksichtigt (Mc Khann et al. 1984). Diese Kriterien umfassen die klinische Beurteilung und quantitative Dokumentation mittels verschiedener Testverfahren, wie z. B. durch den Mini-Mental-Status-Test (Folstein et al. 1975), der Blessed-Dementia-Scale (Blessed et al. 1968) und ähnlicher Tests. Als weitere Erfüllungskriterien gelten ein Erkrankungsbeginn zwischen dem 40 und 90 Lebensjahr, die progrediente Verschlechterung des Gedächtnisses, zudem das Fehlen einer Bewußtseinstörung. Eine andere eine dementielle Entwicklung mit sich bringende Erkrankung muß durch die Durchführung von Laboruntersuchungen sowie durch eine cerebrale Bildgebung ausgeschlossen werden.

Abhängig von der Erfüllung der von der oben genannten Arbeitsgruppe erstellten Kriterien, erfolgte die Unterteilung in eine „wahrscheinliche“ oder „mögliche“ Form eines Morbus Alzheimer.

Die Diagnose eines „sicheren“ Morbus Alzheimer setzt die Diagnosestellung anhand klinischer Methoden sowie die typischen histopathologischen Veränderungen post mortem voraus.

In dieser Studie wurden die Bereiche Kognition, Fremdanamnese, und Schwere der Erkrankung mittels MMSE, Blessed-Demenz-Skala und Clinical-Dementia-Rating (CDR) (Berg et al. 1984) untersucht.

2.1.3.2 Mini-Mental Status Test

Zur Beurteilung der Schwere der Demenz wurden die Patienten mittels des Mini-Mental-Status-Tests (Folstein et al. 1975) beurteilt. Mit diesem Test werden die zeitliche und situative Orientierung, Merkfähigkeit und Frischgedächtnis, Rechenfähigkeit, Sprache und Raumsinn geprüft. Gedächtnisgesunde sollten bei diesem Test 30 Punkte erreichen. Bei physiologischer Gedächtnisstörung im Alter werden noch 24 oder mehr Punkte erreicht. Eine geringere

Punkteanzahl ist verdächtig aber nicht beweisend für eine Demenz. Dieser zur psychometrischen Einschätzung dienende Test eignet sich gut als Screeninguntersuchung und als Verlaufskontrolle einer Gedächtnisleistungsstörung.

2.1.3.3 Blessed-Demenz-Skala

Zur klinischen Beurteilung des Schweregrades der Demenz wurde zusätzlich die Blessed-Demenz-Skala (Blessed et al. 1968) herangezogen. In dieser Untersuchung werden Änderungen in der Ausführung täglicher Tätigkeiten und Gewohnheiten beurteilt, als auch Persönlichkeitsveränderungen und Interessenverlust, Konzentrationsstörungen und das Gedächtnis. Die notwendige Information erhält man durch Befragung von Personen, die mit dem Patienten in häufigem Kontakt stehen und dadurch fähig sind sein Verhalten richtig zu beurteilen. Die Gedächtnisleistung und das Konzentrationsvermögen werden durch Untertests beurteilt. Im Gegensatz zum Mini-Mental-Status-Test erfolgt hier also zusätzlich eine fremdanamnestische Einschätzung des Schweregrades der Demenz.

2.1.3.4 Clinical-Dementia-Rating

Zur weiteren objektiven Beurteilung der Demenz wird die korrigierte Version, des Clinical-Dementia-Rating (Berg et al. 1984) verwandt. Hier erfolgt eine rein fremdanamnestische Einschätzung des Schweregrades. Beurteilt werden die Qualitäten Gedächtnis und Orientierung, sowie die Bereiche Urteilsfähigkeit und Problembewältigung, Geschäftsfähigkeit, Heim und Hobbys sowie Körperpflege. Das Ausmaß der Hirnleistungsschwäche wird folgendermaßen bewertet: CDR 0: keine, CDR 0,5: fragliche oder unsichere, CDR 1: leichte, CDR 2: mäßiggradige CDR 3: schwere kognitive Leistungseinbuße.

2.1.4 Methoden zur Differenzierung zwischen einer Alzheimer Demenz und einer vaskulären Demenz

Die Differenzierung zwischen einer degenerativen und einer vaskulären Demenz erweist sich klinisch am schwierigsten. Daher wurden zusätzlich die Ischämieskala nach Hachinsky als Diagnosekriterium herangezogen, sowie eine craniale Computertomographie durchgeführt.

2.1.4.1 Ischämieskala nach Hachinski

Die von Hachinski et al. 1975 erstellte Ischämieskala dient zur Differenzierung vaskulärer von degenerativen Demenzen. Zur Unterscheidung der beiden Demenzformen werden folgende Punkte herangezogen: Abrupter Beginn, stufenweise Verschlechterung, fluktuierender Verlauf, nächtliche Verwirrheitszustände, relatives Erhaltenbleiben der Persönlichkeit, Depression, Affektinkontinenz, Hypertonie oder Schlaganfälle in der Anamnese, Nachweis einer assoziierten Atherosklerose, neurologische Herdsymptome oder neurologische Herdzeichen.

Für jeden positiven Befund werden ein bzw. zwei Punkte addiert. Eine Summe von über 7 Punkten wird als Hinweis auf eine vaskuläre Ursache des dementiellen Syndroms gewertet.

2.1.4.2 Craniale Computertomographie

Als apparative Zusatzdiagnostik wurde eine Computertomographie des Kopfes durchgeführt. Hiermit sollen eventuell vorhandene gefäßbedingte Veränderungen der Hirnsubstanz nachgewiesen werden. Vorhandene strukturelle Läsionen die durch eine Mikro- oder Makroangiopathie verursacht sind sprechen gegen die Diagnose einer degenerativen Demenz und sind ein wichtiger Hinweis für eine vaskuläre Genese des dementiellen Syndroms. Typische morphologische Veränderungen für eine vaskuläre Demenz sind Teilinfarkte hirnversorgender Gefäße, sowie lakunäre Läsionen. Letztere stellen sich als subkortikal gelegene scharf begrenzte kleine hypodense Strukturen dar. Größere Lakunen sind im Marklager, Stammganglien und im Hirnstamm lokalisiert. Des weiteren findet sich bei langjähriger arterieller Hypertonie das Bild einer Leukenzephalopathie. Diese wird durch ausgedehnte „spongiose“ Demyelinisierungen des Marklagers hervorgerufen. Als Ursachen für makro- und mikroangiopathische Veränderungen können u. a. eine arterielle Hypertonie, ein Diabetes mellitus, ein Nikotinabusus, eine Hyperlipidämie und rezidivierende thrombotische Verschlüsse der hirnversorgenden Arterien sein. Diese Risikofaktoren gehen häufig mit den in der Ischämieskala von Hachinski et al. genannten Symptomen einher.

Bei der Alzheimer Demenz findet sich eine diffuse Hirnatrophie, mit besonderer Ausprägung des temporoparietal gelagerten Cortex. Es läßt sich eine innere und äußere Atrophie des Hirnparenchyms nachweisen. Hierbei kommt es zu einer Erweiterung der Seiten- und des dritten Ventrikels (De Carli et al. 1990). Diese Veränderungen sind jedoch nicht für eine Alzheimer Demenz spezifisch, und können somit nicht als einziges Diagnosekriterium

herangezogen werden. Die Durchführung einer Computertomographie dient somit zur Abgrenzung von anderen Krankheitsprozessen wie z.B. einer vaskulären Demenz und eines Hydrocephalus malresorptivus, die im höheren Lebensalter ebenfalls häufig Ursache einer Demenz sein können.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Gewinnung genomischer DNA aus Heparinblut

2.2.1.1. Herstellung der Reagenzien

QIAGEN Protease:

Die als Trockensubstanz vorliegende QIAGEN Protease wird in 1.4 ml destilliertem Wasser durch gründliches Mischen gelöst.

Puffer AL:

40 µl Puffer AL2 werden 5 Minuten bei 70 ° Celsius im Wasserbad erhitzt. Zum erwärmten Puffer AL2 fügt man 160 µl Puffer AL1 hinzu. Das ganze wird gut gemischt.

Puffer AW:

Zum Konzentrat werden 42 ml Ethanol zugegeben.

2.2.1.2 Isolieren von DNA mittels Anion-Austausch Chromatographie

Für die unter 2.2.4 durchgeführte PCR und die Sequenzreaktion benötigt man eine sehr reine DNA. Um diese zu gewinnen hat sich die Anionen-Austausch Chromatographie bewährt. Diese wurde früher zur Proteinreinigung genutzt und jetzt übertragen zur selektiven Separation von Nukleinsäuren. Das Prinzip der Anionen-Austausch Chromatographie ist, daß negativ geladene Nukleinsäuren an eine positiv geladene Matrix binden (in Puffern deren pH fast neutral ist). Hierzu werden in Säulen eingelassene mit positiven Gruppen beladene Silikan-Membranen verwandt, die die DNA aus der Lösung binden. Dabei ist die Ladedichte der Membran, die Bindung und Elution der DNA beeinflußt, sehr stark vom pH-Wert des

Puffers abhängig. Verunreinigungen wie RNA, Proteine und Metabolite werden durch Waschen der Membranen mit Puffern mit mittlerem Salzgehalt entfernt. Die DNA wird schließlich durch destilliertes Wasser aus der Silikan-Membran eluiert.

Die zur PCR benötigte genomische DNA wird aus Lymphozyten gewonnen. Hierzu wird der QIA amp blood kit verwandt. Man hält sich an die im Protokoll des Handbuchs durchgeführten Schritte und Konzentrationen der einzelnen Lösungen und Puffer (Handbook QIAamp® Blood Kit February 1995).

In einem ersten Schritt werden 200µl Blut aus einer Vollblutprobe in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Um die Lymphozyten zu lysieren pipettiert man 25 µl Qiagen Protease dazu. Zu diesem Ansatz wird 200 µl Puffer AL gegeben. Das Ganze wird gut vortexiert. Das Blut-Protease-Puffer Gemisch wird im Wasserbad für 10 Minuten bei 70° Celsius inkubiert. Dabei geht die in den Lymphozyten enthaltene DNA in Lösung, um im nächsten Schritt an die positiv geladenen Membranen zu adsorbieren. Danach werden 210 µl Ethanol zugegeben und das ganze erneut vortexiert. Säulen mit Silikan Membranen werden in Röhrchen gestellt und die Lösung in die Säulen gefüllt. Die Lösung wird 1 Minute bei 6500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Bei diesem Reaktionsschritt wird die aus den Lymphozyten herausgelöste DNA an die Silikan Membran adsorbiert. Der Inhalt der Röhrchen wird verworfen und die Säulen in neue Röhrchen gestellt. Um die DNA von Verunreinigungen zu trennen werden die Säulen bei 6500 Upm mit 500 µl Puffer AW gewaschen. Der filtrierte Puffer wird verworfen und der Vorgang mit einem neuen Röhrchen wiederholt. Allerdings wird zum Abschluß nochmals 2 Minuten bei 13200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert um Reste des Ethanols aus der Membran zu entfernen. Abschließend wird die DNA mit auf 70°C erhitztem H₂O dest. aus der Membran bei 6500 Upm eluiert. Das Eluat kann direkt weiterverwandt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren werden.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Photometer

Dieses Verfahren findet Verwendung zur Bestimmung der Konzentration der genomischen DNA aus Punkt 2.2.1.2 sowie der Konzentration der unter Punkt 2.2.3 gefällten Oligonukleotide. Die Konzentration der in der Lösung enthaltenen DNA wird durch eine optische Dichtemessung bestimmt. Hierzu wird die Absorption der Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Referenzwert wird die Absorption von H₂O dest. bei gleicher Wellenlänge bestimmt. Für einzelsträngige DNA entspricht ein Absorptionswert von 1 (E₂₆₀)

einer Konzentration von 40 µg/l. Für Doppelstrang-DNA entspricht der Absorptionswert 1 einer Konzentration von 50µg Nukleinsäuren pro Liter Flüssigkeit. Zur Reinheitsbestimmung kann man zusätzlich den Quotient aus den Absorptionswerten bei 260nm und 280 nm bestimmen. Dieser sollte bei Werten zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Bei Verunreinigungen ist der Quotient >2.

2.2.3 Ethanolfällung der Oligonukleotide

Die zur Ethanolfällung hergestellten Oligonukleotide (90µl) werden in ein Eppendorf Gefäß gegeben. Das Röhrchen mit 60µl H₂O dest. nachgespült und dies ebenfalls ins Eppendorf-Gefäß gegeben. Man fügt 15µl Natriumacetat (3 M, pH 5.2) hinzu und vortexiert das Gemisch. Dann pipettiert man 450µl Ethanol (100%) dazu. Das Ganze wird 20 Minuten bei -80°C inkubiert. Die gefällten Oligonukleotide werden durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 13000 Upm sedimentiert. Der Alkohol wird abgezogen und das Präzipitat mit 500µl 70% Ethanol gewaschen um überschüssiges Salz zu entfernen. Danach wird erneut bei 13000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten bei 4° Celsius zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, und das Gemisch zum Trocknen in einer Vacuumzentrifuge (Speed-Vac) 5 Minuten zentrifugiert. Das Präzipitat wird in 200µl destilliertem Wasser aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide in der Lösung erfolgt eine optische Dichtemessung (siehe 2.2.2).

2.2.4 Die Polymerase-Kettenreaktion

2.2.4.1 Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein biochemisches Verfahren, mit dem man kleinste Mengen genetischen Materials in großen Mengen in vitro herstellen kann. Hierzu geht man von einem beliebigen Stück doppelsträngiger DNA aus, das eine zu untersuchende Sequenz, in diesem Fall die Sequenz des Apolipoprotein E, enthält. Dieser Abschnitt dient als Matrize für die Vervielfältigungsreaktion. Die Polymerase-Kettenreaktion läuft in 3 sich wiederholenden Schritten ab. Zuerst wird die Doppelstrang DNA bei hohen Temperaturen denaturiert. Dadurch können sich in einem zweiten Schritt synthetische Oligonukleotide an die Einzelstränge hybridisieren. Jetzt werden durch eine zugegebene DNA Polymerase die

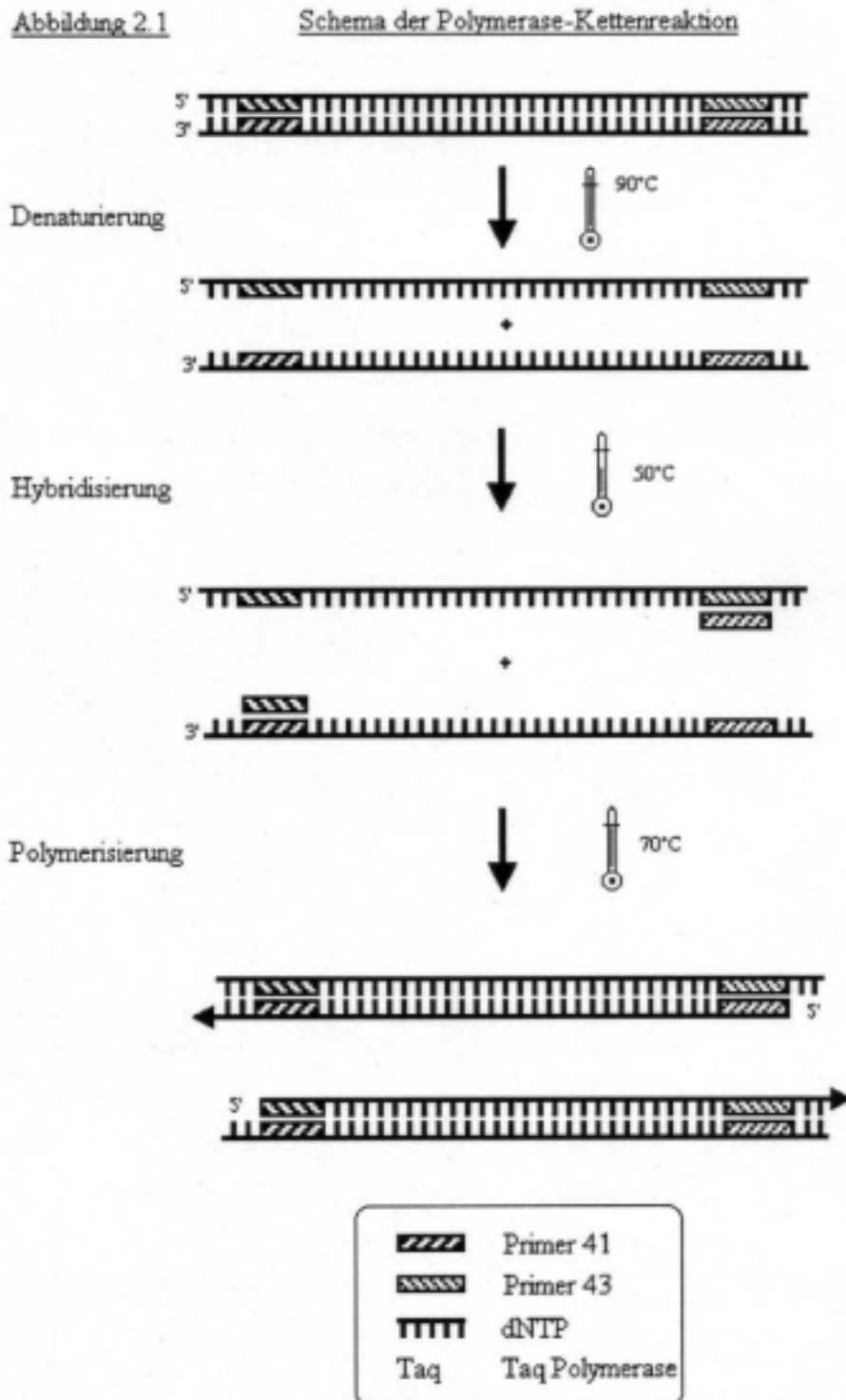
Einzelstränge komplementär ergänzt. Die Oligonukleotide wirken in diesem Schritt als Primer. Die neuen und alten Stränge werden durch Erwärmen getrennt, und die Reaktion kann erneut ablaufen.

Die erstmalige Denaturierung der doppelsträngigen DNA findet bei 95° Celsius für eine Dauer von fünf Minuten statt. Danach laufen 34 Zyklen der PCR (Polymerase chain reaction) ab. 3 verschiedenen Temperaturen werden pro Zyklus durchlaufen. Bei einer Temperatur von 60° Celsius hybridisieren Oligonukleotide an die einzeln vorliegenden DNA-Stränge. Für diese Reaktion ist es wichtig, daß die Basenfolge der Enden der Sequenz in einer bestimmten Länge bekannt sind, damit man korrespondierende Oligonukleotide synthetisieren kann die an die Enden hybridisieren und so die eigentliche Vervielfältigungsreaktion einleiten können. (Mullis 1987) Diese dienen somit als Primer. Zur Amplifikation des Apolipoprotein E Genabschnitts werden zwei Oligonukleotide aApo E41 (5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACACTGC CA-3') (nach Wenham 1991) und sApo E43 (5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3') (Hixson und Vernier 1990 bzw. Emi 1988) mit einer Länge von 31 beziehungsweise 25 Basenpaaren gewählt. Hierbei ist es wichtig, daß das 3'-Ende der Oligonukleotide mit dem Ende der Sequenz übereinstimmt, da sonst die Amplifikation unterbleiben kann (Linz 1990). Eine Basenfehlpaarung am 5'-Ende hat keinen nachteiligen Einfluß auf die Reaktion. Der Grund hierfür liegt in der fehlenden 3'-5' Exonuklease Aktivität der verwendeten Taq-Polymerase. Der Primer aApo E41 hat eine komplementäre Sequenz zu der des Apolipoprotein E von 22 Basenpaaren am 3'-Ende. Am 5'-Ende liegt eine Sequenz von 9 Basenpaaren vor, die nicht komplementär ist. Das Oligonukleotid sApo E43 hat am 3'-Ende 18 komplementäre Basenpaare und 7 nicht komplementäre Basenpaare am 5'-Ende.

Nachdem sich die Oligonukleotide an die Einzelstrang DNA angelagert haben kann im zweiten Schritt die eigentliche Verlängerung der Kette stattfinden. Dies geschieht in Gegenwart einer DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 70° Celsius. Die hier verwendete Taq-Polymerase wurde aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert (Chien et al. 1976) (Life Technologies). Sie hat den Vorteil hitzestabil zu sein, so daß sie auch bei hohen Temperaturen ihre Aktivität beibehält und dadurch nicht bei jedem Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion neu hinzugesetzt werden muß.

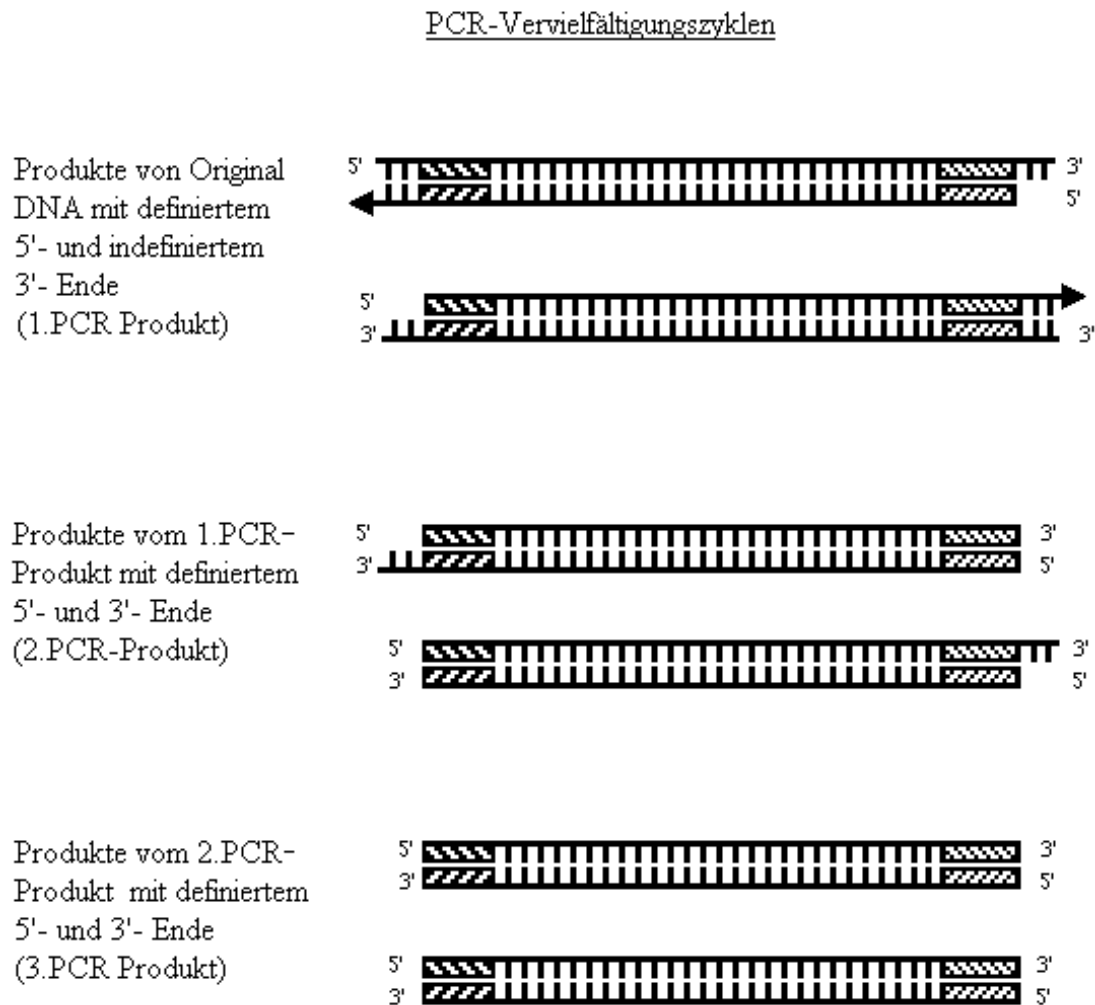
Die im zweiten Schritt neusynthetisierten Doppelstränge werden im letzten Schritt der PCR bei 95° Celsius erneut getrennt und können im nächsten PCR Zyklus als Matrize für den folgenden Amplifikationsschritt dienen.

Im ersten und jedem darauffolgenden Schritt wird als Kopie der Ursprungs-DNA eine Kette mit definiertem 5'-Ende und undefiniertem 3'-Ende hergestellt. Die Länge dieser Stränge ist abhängig von der Dauer der Verlängerungsreaktion. Die Zeit muß mindestens so lang sein, daß die Reaktion so weit abläuft, daß die Enden über die Ansatzstelle des zweiten Primers hinausragen. Die Anzahl dieser Ketten wird bei jedem Zyklus linear zunehmen. Ab dem zweiten Zyklus werden die eigentlich interessierenden DNA-Stränge mit definiertem 5'-und



3'-Ende hergestellt, nämlich wenn die Produkte des ersten Vervielfältigungsreaktion als Matrizen dienen. Die Längen dieser Ketten ist durch die Lage der 5' Enden der beiden Primer bestimmt. Die Anzahl der Ketten mit terminiertem 3'-und 5'-Ende nehmen ab dem 2. Zyklus exponentiell zu (Mullis 1990) (siehe Abbildung 2.2).

Abbildung 2.2



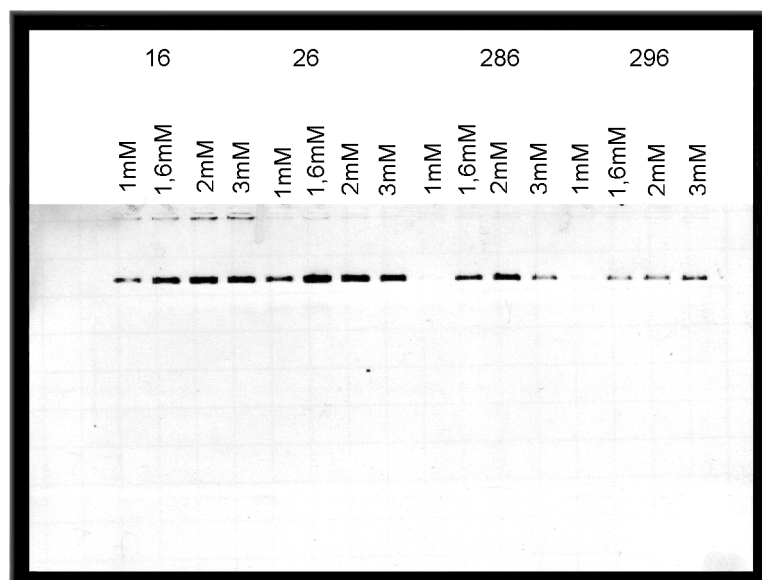
In Abbildung 2.1 werden die Einzelschritte der Polymerase-Kettenreaktion dargestellt. Diese laufen zyklisch ab. Im ersten Schritt werden Kopien der Original DNA mit definiertem 5'-Ende und indefiniertem 3'-Ende hergestellt.

Die Kopien der Original DNA-Stränge erfahren eine lineare Vervielfachung. Ebenso die Kopien der ersten Vervielfältigungsreaktion. Die Kopien von Strängen mit beiderseits terminierten Enden (Produkte des 3. Zyklus) zeigen ein exponentielles Wachstum.

2.2.4.2 Optimierungsansätze für PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine sehr empfindliche Reaktion was Schwankungen und Veränderungen der Konzentrationen der verwendeten Substanzen betrifft. Da die Ausbeute an amplifizierter DNA nach vorbeschriebener Methode (Wenham et al. 1991) für eine deutliche Identifizierung der Banden in der Gelelektrophorese nicht ausreichte, wurden die Konzentrationen einiger wichtiger Parameter der PCR-Reaktion verändert. Ein entscheidender Parameter der PCR Reaktion ist die Konzentration der Ionen (Linz 1990). Als Cofaktor der Taq-Polymerase spielen die Magnesium Ionen eine entscheidende Rolle. In einem ersten Schritt wurde deshalb die MgCl₂ Konzentration variiert. Vier verschiedene Lösungen mit einer Ionen Konzentration von 1mM(0,6µl), 1,6mM(1µl), 2mM(1,2µl), und 3mM(1,8µl) wurden angesetzt. Die übrigen Parameter wurden in den Mengen dNTP 0,5 µl, Primer 41 und 43 je 1,5 µl, 10x PCR Puffer und Dimethylsulfoxid je 3µl, und Taq-Polymerase 0,2µl zugesetzt. Das ganze wurde mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25µl aufgefüllt.

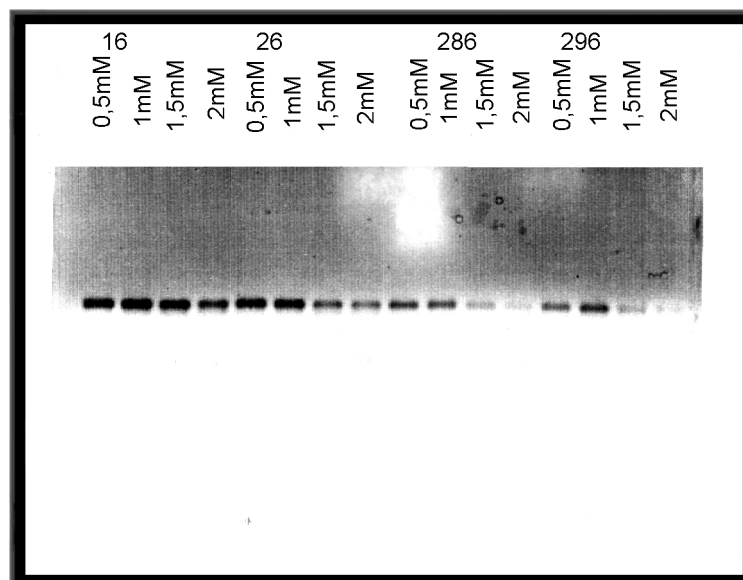
Abbildung 2.3



Die stärkste Bande in der Gelelektrophorese zeigt sich bei einer Konzentration von 2mM MgCl₂.

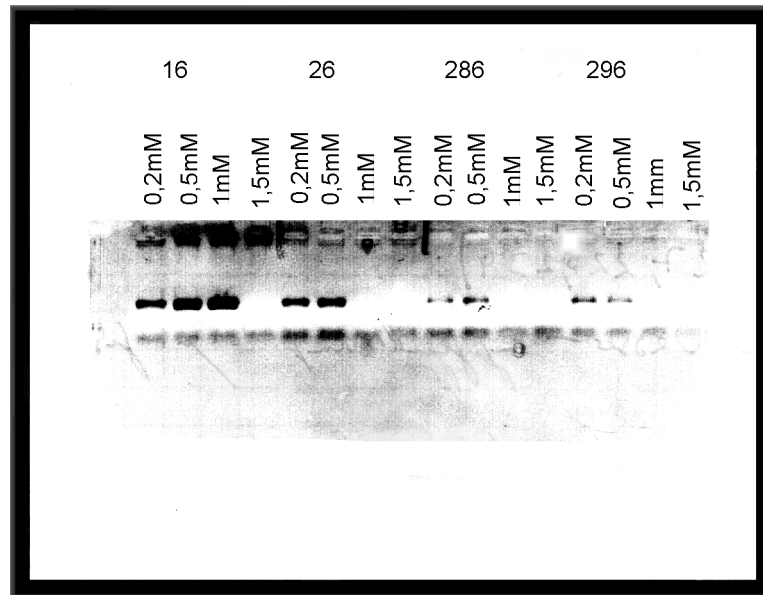
Als nächster Parameter wurde die Konzentration der zugegebenen Primer variiert. Bei zu hohen Primerkonzentrationen kann es zur Selbsthybridisierung kommen, wodurch die eigentliche Amplifikationsreaktion unterbleiben kann (Linz 1990). Die Menge der Oligonukleotide wurde niedrig, entsprechend den Konzentrationen 0,5 pmol, 1 pmol, 1,5 pmol und 2 pmol zwischen 1,5 und 6µl gewählt.

Abbildung 2.4



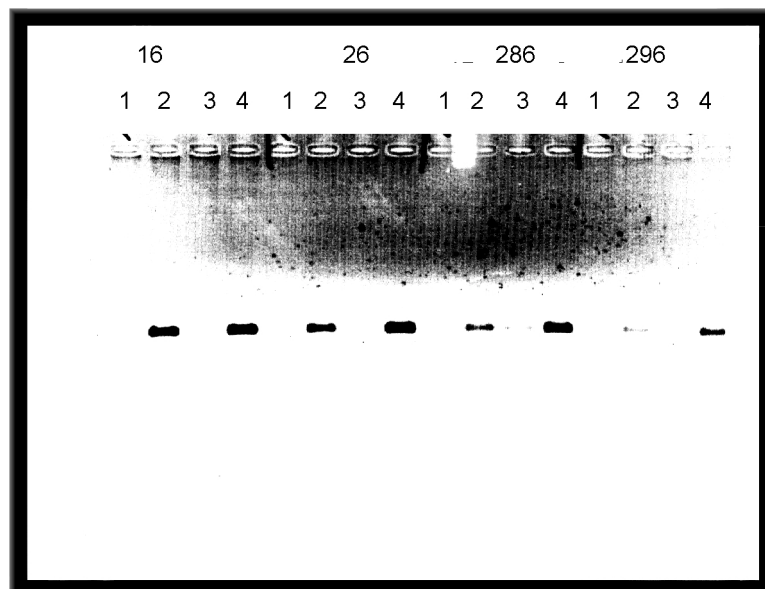
Bei diesem Ansatz zeigten sich die besten Ergebnisse bei niedrigen Primerkonzentrationen von 1 µmol.

Ein letzter wichtiger Parameter der PCR Reaktion sind die Desoxynukleosidtriphosphate. Ihre Konzentration wurde zwischen 0,2 mM, 0,5 mM, 1mM, und 1,5mM variiert. Die übrigen Parameter wurden entsprechend den oben veränderten bzw. den unter 2.2.4.2 genannten Konzentrationen zugegeben.

Abbildung Nr.2.5

Bei diesem Ansatz kann man die kräftigsten Banden bei Konzentrationen von 0,5 μ mol dNTP beobachten.

Zur Kontrolle der variierten Parameter wird ein Probelgel gegossen und jeweils 2 Proben mit variierten Parametern (2 und 4) und 2 Proben (1 und 3) mit den ursprüngliche Konzentrationen aufgetragen.

Abbildung 2.6

2.2.4.3 Ansatz der PCR für die Apolipoprotein E Typisierung

Die in den o.g. Optimierungsansätzen ermittelten Konzentrationen der für die PCR notwendigen Bestandteile, werden für die Apolipoprotein E Typisierung verwandt.

Folgende Konzentrationen wurden bestimmt:

Primer 41 :	3 µl (≅1mM)
Primer 43 :	3 µl (≅1mM)
MgCl:	1,2 µl (≅2mM)
Taq Polymerase:	0,2 µl
dNTP:	1,5 µl (≅0,5mM)
PCR Buffer:	3 µl
H2O dest.:	10,3 µl
Dimethylsulfoxid	<u>3 µl</u>
Gesamtvolumen eines Ansatzes:	25,2 µl

Um die Konzentrationen des Ansatzes genauer zuzufügen wird ein Mastermix für 32 Proben gemischt und davon jeweils 25µl zu der DNA Probe gegeben.

2.2.5 Restriktionsverdau

2.2.5.1 Prinzip des Restriktionsverdaus:

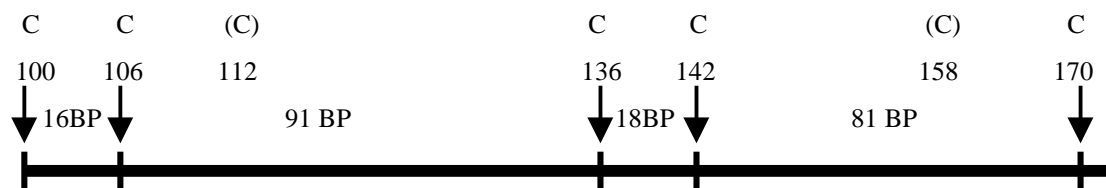
Ein einfaches Verfahren zur Typisierung der verschiedenen Apolipoprotein E Formen ist der Verdau mit Restriktionsenzymen. Hierbei werden die amplifizierte DNA Produkte durch Restriktionsenzyme, die eine bestimmte Basensequenz erkennen und an diesen Stellen die DNA Stränge schneiden in kleinere Fragmente geteilt. In diesem Ansatz wird das Enzym CfoI (Wenham et al. 1991) zum Restriktionsverdau eingesetzt. Dadurch, daß die 3 Apolipoprotein E Genotypen verschiedene Schnittstellen aufweisen werden sie in Fragmente unterschiedlicher Basenlänge geteilt. Die Kombination der Längen der DNA-Stücke ist für den jeweiligen Genotyp charakteristisch (Hixson und Vernier1990). Das Enzym CfoI erkennt die Basenfolge GCGC und schneidet nach der dritten Base. Variable Schnittstellen in der Apolipoprotein E Genomsequenz liegen an den Positionen 112 und 158 der Aminosäuresequenz. Beim Apolipoprotein E ε2 liegen weder an der Stelle 112 (GTGC) noch an der Position 158 (GTGC) Schnittstellen für das Restriktionsenzym CfoI. Beide Sequenzen codieren Cystein als Aminosäure. Das Apolipoprotein E ε3 bietet an der Aminosäurenposition

158 mit der Basenfolge GCGC eine zusätzlichen Angriffspunkt für das Enzym CfoI. Hier findet sich durch die veränderte Basenfolge Arginin in der Aminosäuresequenz. Die zusätzliche Schnittstelle führt dazu, daß statt einem 81 Basenpaaren langen DNA Stück wie im Apo E $\epsilon 2$ zwei Fragmente mit 48 und 33 Basenpaaren vorliegen. Der Typ $\epsilon 4$ des Apolipoprotein E hat eine weitere Schnittstelle an Position 112 mit der Basenpaarfolge GCGC. Das Apolipoprotein E $\epsilon 4$ codiert an dieser Stelle Arginin statt Cystein. Aus der zusätzlichen Schnittstelle resultiert ein, in der später durchgeführten Gelelektrophorese für den Typ $\epsilon 4$ charakteristisches, 72 Basenpaare langes Fragment.

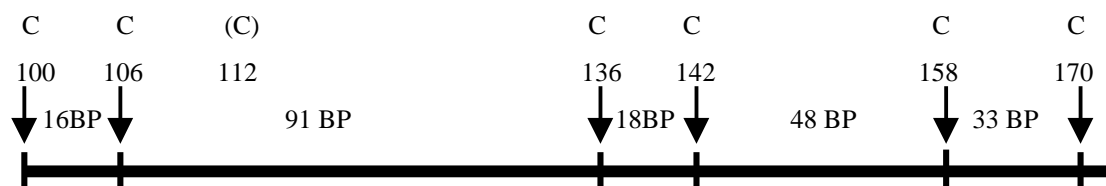
Abbildung 2.7 zeigt die verschiedenen Schnittstellen der 3 Apolipoprotein E Allele. Hieraus resultieren die in der Gelelektrophorese für den jeweiligen Alleltyp typischen Bandenmuster. (siehe Abbildung 3.1)

Abbildung 2.7

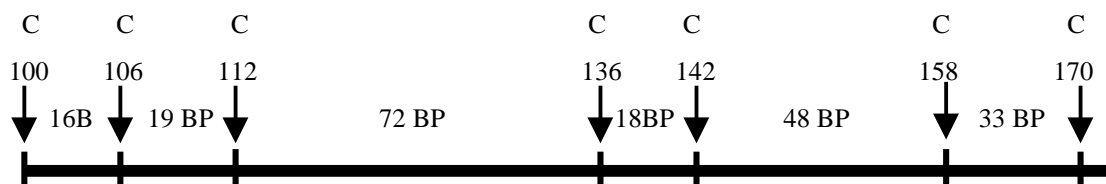
Schnittmuster des Apolipoprotein $\epsilon 2$



Schnittmuster des Apolipoprotein $\epsilon 3$



Schnittmuster des Apolipoprotein $\epsilon 4$



(C= cut, BP = Basenpaare, die Zahlen markieren die Aminosäurenstelle)

2.2.5.2 Ansatz für den Restriktionsverdau:

Für den Restriktionsverdau werden 15µl der PCR Lösung mit jeweils 2µl Wasser, 2µl Puffer L und 1µl CfoI-Enzym versetzt. Zur exakteren Dosierung mischt man einen Master-Mix für 30 Proben, d.h. 60µl Wasser, 60µl Puffer und 30 µl Enzym CfoI. Davon pipettiert man dann jeweils 5µl in jede Probe auf ein Gesamtvolumen von 20 µl. Der Ansatz wird für 90 Minuten in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37° Celsius verdaut. Nach 1,5 Stunden werden die Proben aus dem Wasserbad genommen und die Reaktion durch Zugabe von 5µl eines Stopppuffers, der die Wirksamkeit des Enzyms unterbindet beendet.

2.2.6 Gießen der Agarose-Gele

2.2.6.1 Gießen eines 4% Metaphor-Gels

Zur Gelelektrophorese wird eine für kleine DNA-Fragmente geeignete Agarose verwendet. (MetaPhor™ Agarose von Biozym) Zur Trennung von DNA Fragmenten mit einer Länge zwischen 40 und 130 Basenpaaren eignet sich am besten eine Konzentration von 4% MetaPhor™ Agarose bei Verwendung von TBE Puffer. In einen Glaskolben werden 120 ml TBE Puffer gegeben, mit 4,8 Gramm MetaPhor™ Agarose gemischt und gewogen. Zum besseren Lösen fügt man 100 ml destilliertes Wasser hinzu. Damit die Agarose in Lösung geht wird das Gemisch in einer Mikrowelle erhitzt. Um ein Überkochen zu verhindern muß man die Mischung wiederholt umrühren. Nachdem sich das Pulver vollständig gelöst hat gibt man um das Ausgangsgewicht zu erreichen die entsprechende Menge Wasser hinzu. Um die DNA Fragmente in der Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar zu machen gibt man 6µl Ethidiumbromid dazu. Man läßt die Mischung etwas abkühlen und gießt sie dann in einen Gelschlitten mit einer Länge von 15cm und einer Breite von 12cm. Das Gel hat eine Dicke von ungefähr 0,6 cm. In den Gelschlitten hängt man zwei Käbme mit jeweils 16 Zacken die die Taschen für die Applikation der Proben in der Elektrophorese bilden. Zum Auspolymerisieren stellt man das Gel eine halbe Stunde in einen Kühlraum.

2.2.6.2 Gießen eines 1,5 % Ultrapure-Gels

Zum Nachweis von nicht fragmentierter DNA bzw. zum Isolieren von DNA für die Sequenzreaktion wird ein 1,5% Ultrapure Agarosegel gegossen. Hierzu werden ~0,5 g 1,5%

Ultrapure Agarose, sowie 35 ml TBE Puffer gemischt und erhitzt. Durch Kochen verdunstetes Wasser wird vor dem Gießen ersetzt. Das Gel wird in einen ca. 6x8cm großen Schlitten gegossen und kann bei 150 Volt Spannung in einer mit TBE Puffer gefüllten Kammer laufen gelassen werden.

2.2.6.3 Gelelektrophorese der Metaphor-Agarose-Gele

Für die Gelelektrophorese hängt man den Schlitten in eine Kammer. Die Kammer füllt man mit TBE Puffer wobei der Puffer das Gel bedecken muß. In die Taschen werden die Proben des Restriktionsverdau pipettiert. In die erste Tasche gibt man einen Marker mit definierten DNA Banden, um die Längen der Banden zu unterscheiden. Das Gel läßt man bei einer Spannung von 90 Volt laufen. Die DNA Fragmente wandern vom Minuspol zum Pluspol. Die DNA Fragmente binden an das im Gel enthaltene Ethidiumbromid, und die Banden können so unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Nach ungefähr 1,5 Stunden sind die Banden so weit voneinander getrennt, daß sie sich voneinander abgrenzen lassen man den jeweiligen Apolipoprotein E Typ ablesen kann.

2.2.7 Das Sequenzieren genomischer DNA

Zwei Blutproben (Probennummern 222 und 294) zeigten in der Gelelektrophorese nach dem Restriktionsverdau ein verändertes Schnittmuster mit einer zusätzlichen DNA-Bande oberhalb des 91 basenpaarlangen Fragmentes des Apolipoprotein E Typs ε2(siehe Abbildung 3.2). Die Ursache für dieses längere DNA -Fragment muß eine veränderte Basenfolge der DNA-Sequenz sein, so daß das Restriktionsenzym Cfo I an einer vorher bestehenden Schnittstelle nicht mehr schneidet. Um diese veränderte Basenfolge nachzuweisen wird das entsprechende DNA-Fragment sequenziert.

2.2.7.1 Prinzip der Sequenzreaktion

Die hier beschriebene Sequenzreaktion ist eine Abwandlung der von Sanger et al. beschriebenen DNA-Sequenzreaktion mittels Didesoxy-DNA-Analoga (Sanger et al. 1977). Dieses Prinzip beruht auf einer kontrollierten Unterbrechung eines enzymatischen Replikationsvorgangs durch 2',3'-Didesoxynukleotidphosphate. Ähnlich der oben

beschriebenen Polymerase-Kettenreaktion wird die zu untersuchende DNA in sich wiederholenden Schritten repliziert. In diesem Versuchsansatz wird jedoch nicht ein Didesoxyribonukleotidtriphosphat, sondern ein Oligonukleotide mit ^{32}P radioaktiv markiert. Somit liegt die radioaktiv markierte Substanz nicht am 3' sondern am 5'-Ende, was aber auf den Reaktionsablauf keinen Einfluß hat. Zur Addition des ^{32}P wird eine Polynukleotid-Kinase verwendet (Maxam et Gilbert 1980). Zudem wird als Polymerase, wie in der oben beschriebenen PCR, die thermostabile Taq-Polymerase verwendet. Diese verbessert die Spezifität, Sensitivität, die Menge und Länge der zu amplifizierenden Produkte (Innis et al. 1988).

Die Primer in diesem Versuchsansatz werden wie unter 2.2.7.3 beschrieben radioaktiv markiert. Sie lagern sich im nächsten Schritt an die zuvor bei 95° Celsius denaturierte DNA an. Danach findet mittels einer DNA Sequencing Grade Taq bei 70° Celsius die Verlängerung der DNA Stränge statt. Die Reaktionsdauer beträgt jeweils 30 Sekunden. Insgesamt laufen 30 Zyklen ab. In jeden Ansatz wird ein anderes 2',3'-Didesoxynukleotidphosphat (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) gegeben. Wird bei dem Replikationsvorgang ein 2',3'-Didesoxynukleotid eingebaut kann die Kette aufgrund des Fehlens des 3'-Hydroxylendes nicht verlängert werden. Am 3'-Ende wird somit keine Phosphodiesterbindung geknüpft, die für die Kettenverlängerung notwendig wäre. Die Basensequenz erstreckt sich somit von dem radioaktiv markierten Primer am 5'-Ende zum 2,3,-Didesoxynukleotid am 3'-Ende der Kette. Bei vier Ansätzen mit den Didesoxynukleotiden ATP, GTP, CTP, TTP entstehen verschieden lange DNA- Fragmente mit dem jeweiligen Didesoxynukleotid am Ende. Diese vier Ansätze mit Abbruchfragmenten werden dann auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Von dem davon angefertigten Autoradiogramm kann man dann die Basensequenz des DNA Fragments ablesen.

2.2.7.2 Isolieren der DNA

Um die DNA für die Sequenzreaktion von anderen Verunreinigungen aus dem Ansatz zu trennen gießt man ein 1,5% Ultrapure Agarose-Gel (siehe 2.2.6.2) und gibt die DNA der zwei interessierenden Proben Nr. 222 und 294 und zwei Kontrollproben in die Taschen des Gels. Man läßt das Gel bei 120 Volt einige Zeit laufen bis sich die Banden der DNA Fragmente deutlich von den übrigen Produkten abgrenzen läßt. Die Banden werden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden werden in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und abgewogen. Zu 100 mg Gel werden

entsprechend 300µl Puffer OX1 gegeben. Die Gel-Puffer Mischung wird bei 50° Celsius 10 Minuten inkubiert. Das Gemisch wird in eine Säule mit Silikanmembran gegeben, die Säule in eine Tube gestellt und 60 Sekunden zentrifugiert. Das Eluat wird weggeschüttet. Um Verunreinigungen zu entfernen gibt man 50µl Puffer PE dazu und wiederholt den Vorgang. Das Eluat wird erneut verworfen. Es wird nochmals zentrifugiert um Reste des Puffers zu entfernen. Zur Lösung der DNA aus der Silikanmembran gibt man 50µl destilliertes Wasser hinzu und zentrifugiert 1 Minute. Die in Wasser gelöste gereinigte DNA wird in einem Eppendorfgesäß aufgefangen.

2.2.7.3 Radioaktives Markieren der Primer

Für die Sequenzreaktion werden die in der PCR-Reaktion verwandten Primer Nummer 41 und 43 verwandt. Diese Oligonukleotide werden mit γ -32 Phosphor-markiertem Adenosintriphosphat radioaktiv markiert. Das geschieht unter Verwendung einer T4-Polynukleotidkinase, die für das Anlagern des markierten ATPs notwendig ist (Maxam et Gilbert 1980). Für jeden Primer setzt man ein Reaktionsgemisch an. Je Ansatz wird je 10 pmol (1 µl) Primer, 10 pmol (1,5 µl) γ -markiertes ATP, 10 Units (1µl) T4-Polynukleotidkinase und 2µl 10-fach T4-Polynukleotidkinase-Puffer hinzugefügt. Der Ansatz wird mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Die Reaktion läßt man bei einer Temperatur von 37 Grad Celsius 30 Minuten lang ablaufen. Die Polynukleotidkinase wird danach bei einer Temperatur von 95° Celsius 2 Minuten denaturiert. Im Anschluß kühlt man das Gemisch auf eine Temperatur von 4° Celsius. Die an einem Ende markierten Primer können bei -20° Celsius gelagert werden oder können direkt ohne weitere Reinigungsschritte wiederverwandt werden.

2.2.7.4 Ansatz für das Sequenzieren der DNA Proben 222 und 294

Zum Sequenzieren werden für die interessierenden Proben jeweils zwei Ansätze und zur Kontrolle zwei Ansätze mit Proben mit dem Apolipoprotein-Typ ε3/3 und ε3/4 gerichtet. Dann werden 24 Röhrchen für 6 Proben mit jeweils 2µl eines ddNTP-Gemisch, das ein jeweils verschiedenes Didesoxynukleotid (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) sowie ein Gemisch aller vier Basen enthält, vobereitet. Für jede Probe wird ein Master-Mix mit je 9,5ml

der jeweiligen DNA dazu 5 μ l Sequencing Buffer und 1,5 μ l des 25 Basenpaare langen radioaktiv markierten Oligonukleotids (Primer 43) gegeben.

Von den 16 μ l Master-Mix werden jeweils 4 μ l in die oben vorbereiteten PCR-Röhrchen hinzugegeben. Zum Starten der Reaktion wird 1 μ l Sequencing Grade Taq-Polymerase gegeben, und darauf 20 μ l PCR-Mineralöl pipettiert.

Danach läuft die Sequenzreaktion wie unter Punkt 2.2.7.1 beschrieben in sich wiederholenden Schritten ab. Am Ende der Verlängerungsreaktion wird dem Gemisch jeweils 3 μ l Sequencing Stop Lösung zugefügt um den Ablauf zu beenden.

2.2.7.5 Gießen eines Acrylamidgels

Zuerst werden die zwei zum Gießen des Sequenzgels notwendigen 20 mal 40 cm großen Glasplatten mit destilliertem Wasser und Alkohol gereinigt. Zum besseren Ablösen des Gels nach der Elektrophorese wird eine der beiden Platten mit Repel-Silane (Silikonlösung) behandelt. Eine Glasplatte hat zum Einbringen des Kamms und somit der Proben eine ca. 16 x 2 cm große Aussparung.

Das Gel wird aus 24g Harnstoff, 5 ml TBE Puffer 7,5 ml Accugel 40 (40% Bisacrylamidlösung) und etwas Wasser hergestellt. Die Zutaten werden unter Rühren erhitzt. Danach werden sie abfiltriert und auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Dieser Mischung werden 250 μ l APS-Lösung und 25 μ l Temed zugefügt. Die präparierten Glasplatten werden durch dünnes wasserfestes Klebeband an den Seiten und am Boden versiegelt, aufeinander gelegt und das Gel in den Zwischenraum gegossen.

Am oberen Ende des Gels wird ein Kamm eingefügt der die Taschen für die zu applizierenden Proben bildet. Das Gel läßt man vor der Gelelektrophorese ungefähr eine Stunde trocknen (Sanger F et al. 1978).

2.2.7.6 Gelelektrophorese

Das Gel wird senkrecht in eine mit TBE Puffer gefüllte Kammer gestellt und die Proben in die Taschen gegeben. Das Gel wird bei 60 Watt und 2000 Volt Spannung laufen gelassen.

2.2.7.7 Aufbringen und Entwicklung des Röntgenfilms

Das Gel wird nach der Elektrophorese auf einen Röntgenfilm aufgelegt und bei -70° Celsius gelagert. Die mit P^{32} -radioaktiv markierten DNA-Fragmente auf dem Gel geben die Strahlung auf den Röntgenfilm ab.

2.2.7.8 Ablesen der Basensequenz

Der Röntgenfilm wird entwickelt und auf dem Autoradiogramm kann die Basensequenz der sechs Proben abgelesen werden. (siehe Abbildung 3.3)

2.2.8 Material

2.2.8.1 Kits

QIAamp Blood Kit	-Quiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	-Quiagen, Hilden
QIAgen Sequencing Kit	-Quiagen, Hilden

2.2.8.2 Lösungen

APS	-Riedel-de Haen, Seelze
Repel-Silane	-Pharmacia Biotech, Freiburg
Temed	-Life Technologies, Eggenstein

2.2.8.3 Puffer

TBE Puffer	
DNA Gel Ladepuffer	
10x Puffer B	-Serva, Heidelberg
10x PCR	-Life Technologies
AL1 Puffer	-Qiagen, Hilden
AL2	-Qiagen, Hilden

AL	-Qiagen, Hilden
AW	-Qiagen, Hilden
QX1	-Qiagen, Hilden
PE	-Qiagen, Hilden
10x T4 Polynukleotidkinasepuffer	-Serva, Heidelberg
5x Sequencing Puffer	-Serva, Heidelberg
DNA Sequencing stop solution	-Serva, Heidelberg

2.2.8.4 Enzyme

Taq Polymerase	-Life Technologies
Cfo I	-Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG, Heidelberg
T4-Polynukleotidkinase	-Serva, Heidelberg
Proteinase	-Qiagen GmbH, Hilden
Sequencing grade Taq DNA Polymerase	-Serva, Heidelberg

2.2.8.5 Nukleotide

Sequenzieren: d/ddNTPs	-Serva, Heidelberg
PCR: Ultrapure dNTP Set	-Pharmacia Biotech-Freiburg

2.2.8.6 Oligonukleotide :

Die Oligonukleotide wurden hergestellt von Dr Frank und Mitarbeitern (ZMBH, Heidelberg)

aApoE 41: ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACACTGCCA

sApoE 43: TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA

2.2.8.7 Agarose und Gellösungen

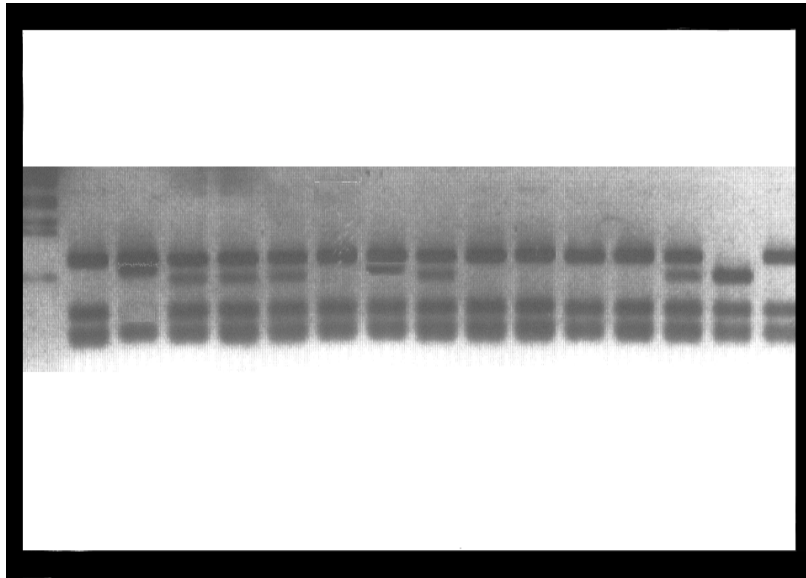
MetaPhor Agarose	-Biozym, Oldendorf
UltraPURE Agarose	-Life Technologies, Eggenstein
Accugel 40 40%Bisacrylamidlösung	-National Diagnostic, Atlanta Georgia

2.2.8.8 Chemikalische Grundsubstanzen

Borsäure	-Riedel-de Haen, Seelze
Bromphenolblau	-Serva, Heidelberg
DMSO	-Sigma Chemie, Deideshofen
EDTA	-Carl Roth GmbH Karlsruhe
Ethanol absolut 100%	-Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	-Sigma Chemie, Deideshofen
Glycin	-Carl Roth, Karlsruhe
Harnstoff	-Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	-Life Technologies, Eggenstein
Natrium Acetat	-Riedel-de Haen, Seelze
Tris-Base	-Sigma, Deideshofen

3. Ergebnisse

Abbildung 3.1



Die Abbildung 3.1. zeigt ein Photo eines Metaphorgels nach der wie unter 2.2.6 beschrieben Gelelektrophorese. Anhand der verschiedenen Bandenmuster lassen sich die 6 möglichen Allelkombinationen des Apolipoprotein E ablesen.

Das erste Bandenmuster zeigt die häufigste Allelkombination $\epsilon 3/3$ des Apolipoprotein E. Hier zeigen sich ein 91 und ein 48 Basenpaare langes Fragment (siehe auch Abbildung 2.7). Die Allelkombination $\epsilon 4/4$ (vorletztes Bandenmuster), die wie die Allelkombination $\epsilon 3/4$ (drittes Bandenmuster) besonders häufig bei der Alzheimer Demenz sowie bei der vaskulären Demenz vorkommt, zeigt durch eine zusätzliche Schnittstelle ein 72 und 48 Basenpaare langes Fragment. Die Allelkombination $\epsilon 3/4$ zeigt dementsprechend ein 91, 72 und 48 Basenpaare langes Fragment.

Anhand der verschiedenen Bandenmuster wurde der jedem Patienten eigene Alleltyp bestimmt und die Allelfrequenzen und Häufigkeit der Phänotypen nach Diagnosegruppen getrennt berechnet.

3.1 Ergebnisse der verschiedenen Krankheitsgruppen

3.1.1 Alzheimer Demenz

Tabelle 3.1:

Patientenzahl	w/m	Alter+/- Stabw	CDR+/- Stabw	Blessed+/-Stabw	MMSE+/-Stabw
69	60/9	70,2+/-11,8	1,7 +/-1,0	11,3 +/- 9,2	15,4 +/- 8,5

Die Tabelle 3.1 zeigt die Gesamtzahl der Patienten, das Geschlechterverhältnis, das Durchschnittsalter, den durchschnittlichen Wert des Clinical Dementia Ratings, des Blessed scores und des Mini Mental State Test, jeweils mit Standardabweichung.

Tabelle 3.2

Phänotypen	Häufigkeit	Prozentsatz	Allelfrequenzen	
Apo E 2/2	2	2,9%	Apo E2	0,094
Apo E 2/3	8	11,6%		
Apo E 2/4	1	1,4%	Apo E3	0,768
Apo E 3/3	42	60,9%		
Apo E 3/4	14	20,3%	Apo E4	0,138
Apo E 4/4	2	2,9%		

Die Gruppe der an einer Alzheimer Demenz Erkrankten umfaßt 69 Patienten mit einem Verhältnis weiblich zu männlich 60/9.

In Tabelle 3.2 fällt der geringe Prozentsatz der Phänotypen Apo E 3/4 und Apo E 4/4 auf (insgesamt 23,2 Prozent). Die Allelfrequenz des Allels ε4 beträgt ebenfalls nur 13,8 Prozent. Die Apo E ε4 Allelfrequenz zeigt verglichen mit den anderen Krankheitsgruppen und einem gesunden Kollektiv somit keine Signifikanz.

3.1.2 Vaskuläre Demenz

Tabelle 3.3

Patientenzahl	w/m	Alter+/- Stabw	CDR+/- Stabw	Blessed+/-Stabw	MMSE+/-Stabw
19	17/2	72,0 +/- 12,8	1,44 +/- 0,7	11,1 +/-7,5	18,6 +/- 6,9

Tabelle 3.4

Phänotypen	Häufigkeit	Prozentsatz	Allelfrequenzen	
Apo E 2/2	0	0 %	Apo E2	0,053
Apo E 2/3	2	10,5 %		
Apo E 2/4	0	0 %	Apo E3	0,684
Apo E 3/3	9	47,4 %		
Apo E 3/4	6	31,6 %	Apo E4	0,263
Apo E 4/4	2	10,5 %		

Die Gruppe der an einer vaskulären Demenz erkrankten umfaßt nur 19 Patienten (Tabelle 3.3). Dennoch ist die hohe Zahl an Apo E 3/4- und Apo E 4/4- Trägern auffallend. Eine Signifikanz errechnet sich jedoch auch bei den Apo E ε4 Allelfrequenzen nicht (siehe Punkt 3.4.2.2). Die Ergebnisse der 3 zur Demenzdiagnostik verwendeten Tests zeigen der Alzheimer Demenz ähnliche Resultate (siehe Tabelle 3.1 und 3.3)

3.1.3 Alkoholpsychosen

Tabelle 3.5

Patientenzahl	w/m	Alter+/- Stabw	CDR+/- Stabw	Blessed+/-Stabw	MMSE+/-Stabw
31	12/19	48,8 +/- 7,9	1,1 +/- 0,7	7,5 +/- 6,2	21,9 +/- 5,7

Tabelle 3.6

Phänotypen	Häufigkeit	Prozentsatz	Allelfrequenzen	
Apo E 2/2	0	0 %	Apo E2	0,081
Apo E 2/3	5	16,1 %		
Apo E 2/4	0	0 %	Apo E3	0,839
Apo E 3/3	21	67,7 %		
Apo E 3/4	5	16,1 %	Apo E4	0,081
Apo E 4/4	0	0 %		

Die Gruppe der Patienten mit Alkoholpsychosen zeigt neben den dementiellen Erkrankungen und den Minderbegabungen die schlechtesten Werte bezüglich der psychometrischen Tests. Eine Signifikanz bezüglich der Allelfrequenzen oder Apo E Phänotypen findet sich hier nicht.

3.1.4 Schizophrenien

Tabelle 3.7

Patientenzahl	w/m	Alter+/- Stabw	CDR+/- Stabw	Blessed+/-Stabw	MMSE+/-Stabw
64	41/23	45 +/- 15,6	0,4 +/-0,6	3,0 +/- 4,5	24 +/- 5

Tabelle 3.8

Phänotypen	Häufigkeit	Prozentsatz	Allelfrequenzen	
Apo E 2/2	0	0 %	Apo E2	0,078
Apo E 2/3	10	15,6 %		
Apo E 2/4	0	0 %	Apo E3	0,813
Apo E 3/3	40	62,5 %		
Apo E 3/4	14	21,9 %	Apo E4	0,109
Apo E 4/4	0	0 %		

Demenzverdächtig sind die durchschnittlich erbrachten Ergebnisse im MMSE bei den Patienten, die an einer Schizophrenie erkrankt sind. Jedoch zeigten sich normale Werte bei der Blessed Dementia Scale und dem Clinical Dementia Rating. Die Apo E Allel Frequenzen zeigen keinen Unterschied im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv (siehe Punkt 3.4.2.4).

3.1.5 Affektive Psychosen

Tabelle 3.9

Patientenzahl	w/m	Alter+/- Stabw	CDR+/- Stabw	Blessed+/-Stabw	MMSE+/-Stabw
24	20/4	53,1 +/- 11,8	0,16 +/- 0,3	3 +/- 4,4	26,8 +/-1,8

Tabelle 3.10

Phänotypen	Häufigkeit	Prozentsatz	Allelfrequenzen	
Apo E 2/2	1	4 %	Apo E2	0,63
Apo E 2/3	1	4 %		
Apo E 2/4	0	0 %	Apo E3	0,813
Apo E 3/3	17	71 %		
Apo E 3/4	4	17 %	Apo E4	0,125
Apo E 4/4	1	4 %		

Die Patientengruppe der affektiven Psychosen zeigt im Vergleich mit einem das Krankheitsbild betreffende nicht demente Patientengruppe keine auffälligen Unterschiede bezüglich des Demenzgrades und der Apo E Verteilung.

3.1.6 Neurosen

Tabelle 3.11

Patientenzahl	w/m	Alter+/- Stabw	CDR+/- Stabw	Blessed+/-Stabw	MMSE+/-Stabw
20	19/1	37,95 +/- 12,98	0,1+/- 0,2	0,85+/- 1,35	27,65+/-2,28

Tabelle 3.12

Phänotypen	Häufigkeit	Prozentsatz	Allelfrequenzen	
Apo E 2/2	0	0 %	Apo E2	0,05
Apo E 2/3	2	10 %		
Apo E 2/4	0	0 %	Apo E3	0,9
Apo E 3/3	16	80 %		
Apo E 3/4	2	10 %		
Apo E 4/4	0	0 %	Apo E4	0,05

Bei den an einer Neurose erkrankten Patienten können erwartungsgemäß anhand der psychometrischen Tests keine Defizite festgestellt werden.

Die Apo E Verteilung zeigt von der gesunden Kontrollgruppe wenig abweichende Werte.

3.1.7 Alkoholabhängigkeit

Tabelle 3.13

Patientenzahl	w/m	Alter+/- Stabw	CDR+/- Stabw	Blessed+/-Stabw	MMSE+/-Stabw
24	20/4	53,1 +/- 11,8	0,04 +/- 0,2	1,16+/- 2,17	27,08 +/-3,22

Tabelle 3.14

Phänotypen	Häufigkeit	Prozentsatz	Allelfrequenzen	
Apo E 2/2	0	0%	Apo E2	0,063
Apo E 2/3	1	4,2 %		
Apo E 2/4	2	8,3 %	Apo E3	0,667
Apo E 3/3	12	50 %		
Apo E 3/4	7	29,2 %		
Apo E 4/4	2	8,3 %	Apo E4	0,271

Bei den Patienten mit einer Alkoholabhängigkeit fällt eine erhöhte Apo E4 Allelfrequenz auf. Aufgrund der niedrigen Patientenzahl errechnet sich hierfür jedoch keine signifikante Abweichung von der gesunden Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse der psychometrischen Tests befinden sich im Normbereich.

3.1.8 Minderbegabung

Tabelle 3.15

Patientenzahl	w/m	Alter+/- Stabw	CDR+/- Stabw	Blessed+/-Stabw	MMSE+/-Stabw
47	26/21	40,21 +/- 14,52	1,6 +/- 1,25	9,57 +/- 9,18	13 +/-8,45

Tabelle 3.16

Phänotypen	Häufigkeit	Prozentsatz	Allelfrequenzen	
Apo E 2/2	0	0%	Apo E2	0,106
Apo E 2/3	9	19,1 %		
Apo E 2/4	1	2,1 %	Apo E3	0,755
Apo E 3/3	25	53,2 %		
Apo E 3/4	12	25,5 %		
Apo E 4/4	0	0 %	Apo E4	0,138

Die Patienten dieser Patientengruppe zeigen keine Auffälligkeiten bezüglich der Apo E Phänotypen und der Allelfrequenzen. Die Ergebnisse der psychometrischen Tests ergaben den dementiellen Erkrankungen vergleichbare Resultate (siehe Tabelle 3.1 und 3.3).

3.2 Vergleich der 8 Patientengruppen untereinander

Tabelle 3.17

Diagnosen	Alzheimer Demenz	Vaskuläre Demenz	Alkoholpsychosen	Schizophrenie	Affektive Psychosen	Neurosen	Alkoholabhängigkeit	Minderbegabung	Insgesamt	Kontrollgruppe
ICD-9	290.x	290.4	291.x	295.x	296.x	300.x	303	317/318		
Patientenzahl	69	19	31	64	24	20	24	47	298	66
w/m	60/9	17/2	12/19	41/23	20/4	19/1	4/20	26/21	199/99	51/5
Alter +/-StAb	70,2+/-11,8	72,0+/-12,8	48,8+/-7,9	45+/-15,6	53,1+/-11,8	37,9+/-12,9	40,1+/-10,5	40,2+/-14,5	52+/-18,0	33,4 +/- 9,9
CDR+/-StAb	1,7+/-1,0	1,44+/-0,7	1,1+/-0,8	0,4+/-0,6	0,16+/-0,3	0,1+/-0,2	0,04+/-0,2	1,6+/-1,3	0,9+/-1,0	
Blessed+/-StAb	11,3+/-9,2	11,1+/-7,5	7,5+/-6,2	3,0+/-4,4	1,6+/-1,8	0,8+/-1,35	1,1+/-2,2	9,5+/-9,1	6,5+/-7,9	
MMSE+/-StAb	15,4+/-8,5	18,6+/-6,9	21,9+/-5,7	23,9+/-4,9	26,8+/-1,8	27,6+/-2,2	27,1+/-3,2	13,0+/-8,4	20,4+/-8,3	
Allelfrequenzen:										
Apo E-2	0,094	0,053	0,081	0,078	0,063	0,05	0,063	0,106	0,081	0,076
Apo E-3	0,768	0,684	0,839	0,813	0,813	0,9	0,667	0,755	0,782	0,780
Apo E-4	0,138	0,263	0,081	0,109	0,125	0,05	0,271	0,138	0,138	0,144
Phänotypen										
Apo E 2/2	2	0	0	0	1	0	0	0	3	0
Apo E 2/3	8	2	5	10	1	2	1	9	38	10
Apo E 2/4	1	0	0	0	0	0	2	1	4	0
Apo E 3/3	42	9	21	40	17	16	12	25	182	40
Apo E 3/4	14	6	5	14	4	2	7	12	64	13
Apo E 4/4	2	2	0	0	1	0	2	0	7	3

Die Übersichtstabelle 3.17 zeigt die Ergebnisse der Apolipoprotein E Typisierung aller Patientengruppen. Diese ist unterteilt in Phänotypen und die Allelfrequenzen. Zudem sind zum Vergleich Patientenzahl der Gruppen, Geschlechterverhältnis, Alter, sowie die Ergebnisse der Demenztests CDR, Blessed-score und MMSE aufgeführt. Zusammenfassend ist das Ergebnis aller 8 Patientengruppen dargestellt. Die Kontrollgruppe wurde auf ihren Apo E Typ hin untersucht um eine regionale Variabilität in der Apo E Genverteilung auszuschließen.

In dieser Tabelle fällt auf, daß sich nur bei der vaskulär bedingten Demenz und bei den Patienten mit einer Alkoholabhängigkeit eine erhöhte Apo E 4 Trägerrate findet. Anhand der unten aufgeführten statistischen Tests läßt sich aber keine Signifikanz diesbezüglich berechnen. Die 6 weiteren Patientengruppen zeigen keine Unterschiede bezüglich der Verteilung der Apo E Frequenzen untereinander und bezogen auf die Kontrollgruppe.

Bei den psychometrischen Untersuchungen zur Einschätzung des Schweregrades des neuropsychologischen Defizits finden sich ähnliche Werte bei den dementiellen Erkrankungen und der Minderbegabung in allen 3 Tests.

3.3 Vergleich dementielle Erkrankungen- übrige psychische Erkrankungen

Tabelle 3.18

Diagnosen	Alzheimer Demenz	Vaskuläre Demenz	Andere psych. Erkr.	Insgesamt	Kontrollgruppe
ICD-9	290.x	290.4	291-317	290-317	
Patientenzahl	69	19	210	298	56
w/m	60/9	17/2	122/78	199/99	51/5
Alter +/-StAb	70,2+/-11,0	72,0+/-12,8	44,2 +/-14	52+/-18,0	33,4 +/-9,9
CDR+/-StAb	1,7+/-1,0	1,44+/-0,7	0,7 +/-1	0,9+/-1,0	
Blessed+/-StAb	11,3+/-9,2	11,1+/-7,5	4,6 +/- 6,6	6,5+/-7,9	
MMSE+/-StAb	15,4+/-8,5	18,6+/-6,9	22,2 +/- 7,6	20,4+/-8,3	
Allelfrequenzen:					
Apo E-2	0,094	0,053	0,079	0,081	0,089
Apo E-3	0,768	0,684	0,795	0,782	0,768
Apo E-4	0,138	0,263	0,126	0,138	0,143
Phänotypen:					
Apo E 2/2	2(2,9%)	0(0%)	1(0,4%)	3(1%)	0 (0%)
Apo E 2/3	8(11,6%)	2(10,5%)	28(13,3%)	38(12,7%)	10 (17,8%)
Apo E 2/4	1(1,4%)	0(0%)	3(1,4%)	4(1,3%)	0 (0%)
Apo E 3/3	42(60,9%)	9(47,4%)	131(62,3%)	182(61%)	32 (57,1%)
Apo E 3/4	14(20,3%)	6(31,6%)	44(20,9%)	64(21,4%)	12 (21,4%)
Apo E 4/4	2(2,9)	2(10,5%)	3(1,4%)	7(2,3%)	2 (3,5%)

Die Tabelle 3.18 zeigt in Spalte 2 und 3 die Ergebnisse der Apo E Typisierung der dementiellen Erkrankungen. Diesen werden die Diagnosegruppen 291.x-317 als Vergleichsgruppe gegenübergestellt. Zum Vergleich sind ebenfalls die Meßdaten aller Patientengruppen, sowie die Daten der Kontrollgruppe aufgeführt.

3.4 Statistische Auswertung der erhobenen Daten

In dieser Arbeit soll untersucht werden ob sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der verschiedenen Apo E Phänotypen zwischen den 8 Diagnosegruppen findet.

Hierzu werden die oben aufgeführten Ergebnisse nach Fishers exaktem Test und nach dem Chi²-Test verglichen. Fishers exakter Test prüft, ob die beiden Beobachtungsgruppen die gleiche Verteilung besitzen. Hierzu wird aus der Verteilung der ersten Beobachtungseinheit die bei Konkordanz zu erwartende Verteilung der zweiten Beobachtungseinheit berechnet. Diese Verteilung wird mit den Ergebnissen der Untersuchung verglichen. Bei einem berechneten $p < 0,05$ ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Beobachtungseinheiten nachweisbar. In dieser Arbeit werden die Verteilungen der Phänotypen in den verschiedenen Diagnosegruppen jeweils mit der Verteilung in der Kontrollgruppe verglichen.

Der Chi²-Test dient zur Analyse von Häufigkeitsunterschieden, bezüglich der Ausprägung eines oder mehrerer Merkmale. Er wird hier eingesetzt um die Häufigkeit des Merkmals Apo E ε4 zwischen den Patientengruppen und der Kontrollgruppe zu vergleichen. Der unter 3.4.2.1. angegebene Chi²-Wert (Freiheitsgrad 1 und Alpha-Fehler von 5%) ist für alle unter 3.4 genannten Gruppen gültig. Der Freiheitsgrad errechnet sich aus der Spaltenanzahl und Zeilenanzahl (Spaltenzahl-1 x Zeilenzahl-1), in diesem Falle eines Vierfeldertests. Der "kritische" Chi²-Wert wird aus einer Tabelle anhand der genannten Kriterien abgelesen.

3.4.1 Statistische Auswertung der Apo E Phänotypen und der Frequenz des Apo E ε4 Allels

3.4.2.1 Vergleich Alzheimer Demenz – Kontrollgruppe

Ergebnis nach Fishers exaktem Test nicht signifikant ($p = 0,756$)

Bei einem Alpha-Fehler von 5% und einem Freiheitsgrad von 1 ist $\text{Chi}^2_{1;0,95} = 3,841$

Der anhand einer Vierfeldertafel errechnete Prüfgröße beträgt: $\text{Chi}^2 = 0,006$.

Sie liegt innerhalb des Intervalls $[0, X^2_{1;1-\text{Alpha}}]$. Somit wird die Nullhypothese (es findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Häufigkeiten) verworfen.

3.4.2.2 Vergleich Vaskuläre Demenz – Kontrollgruppe

Das nach Fishers exaktem Test berechnete Ergebnis ist nicht signifikant ($p= 0,405$).

Anhand des Chi²-Tests errechnet sich eine Prüfgröße von 0,7, und somit findet sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Apo E ε4 Verteilung.

3.4.2.3 Vergleich Alkoholpsychosen – Kontrollgruppe

Das Ergebnis nach Fishers exaktem Test ist nicht signifikant ($p= 0,742$).

Der Chi²-Wert beträgt 0,63, und liegt hiermit im Intervall $[0, X^2_{1;1-\text{Alpha}}]$ (siehe 3.4.2.1).

3.4.2.4 Vergleich Schizophrenie – Kontrollgruppe

Nach Fishers exaktem Test berechnet sich ein nicht signifikant Ergebnis ($p= 0,574$).

Die errechnete Prüfgröße beträgt 0,26. Es läßt sich kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen feststellen.

3.4.2.5 Vergleich Affektive Psychosen – Kontrollgruppe

Das Ergebnis nach Fishers exaktem Test ist nicht signifikant ($p= 0,220$)

Die Prüfgröße Chi²=0,04. Nach beiden Test findet sich keine signifikante Abweichung zwischen den beiden Gruppen.

3.4.2.6 Vergleich Neurosen – Kontrollgruppe

Das nach Fishers exaktem Test berechnete Ergebnis ist nicht signifikant ($p= 0,409$).

Die berechnete Prüfgröße Chi² ist 1,1. Ein signifikanter Unterschied läßt sich hieraus nicht ableiten.

3.4.2.7 Vergleich Alkoholabhängigkeit – Kontrollgruppe

Das Ergebnis nach Fishers exaktem Test ist schwach signifikant ($p= 0,079$)

Eine schwache Signifikanz berechnet sich für ein $p<0,1$.

Die errechnete Prüfgröße hat den Wert 2,5. Der Wert liegt somit außerhalb des Intervalls $[0, X^2_{1;1-\text{Alpha}}]$. Nach dem Chi²-Test ergibt sich auch für einen Alphafehler von 10 keine Signifikanz. Chi² beträgt hier, wiederum bei einem Freiheitsgrad von 1, 2,7.

3.4.2.8 Vergleich Minderbegabung – Kontrollgruppe

Das Ergebnis nach Fishers exaktem Test zeigt keine Signifikanz ($p= 0,684$).

Nach dem Chi²-Test berechnet sich auch bei den Patienten mit einer Minderbegabung keine signifikante Abweichung der Apo E ϵ 4 Allelhäufigkeit von der Kontrollgruppe. Der berechnete Wert für Chi beträgt 0,004.

3.4.3 Zusammenfassung der Statistik

Nach den statistischen Berechnungen findet sich lediglich eine schwache Signifikanz zwischen den Ergebnissen der Patientengruppe mit Alkoholabhängigkeit und der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ergibt sich jedoch nur in der Berechnung nach Fishers exaktem Test bezüglich der Verteilung der Phänotypen des Apo E. Bei der Berechnung einer signifikanten Abweichung bezüglich der Allelfrequenzen des Apo E ϵ 4 findet sich hier kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Zwischen den übrigen Patientengruppen und der Kontrollgruppe insbesondere zwischen den Gruppen der Alzheimer Demenz und der vaskulären Demenz und der Kontrollgruppe findet sich weder in den Berechnungen bezüglich der Verteilung der Phänotypen, noch bezüglich der Allelfrequenzen signifikante Abweichungen.

3.5 Auffinden einer Mutation im Apolipoprotein E Gen

Abbildung 3.2 zeigt ein zur Typisierung der Apolipoprotein E Allele gegossenes Gel nach Elektrophorese. Oberhalb der 91 Basenpaar langen Bande des Apo E Allels ϵ 2 und ϵ 3 (siehe Abbildung 2.7) finden sich bei der Probe Nr. 222 und Nr. 294 eine zusätzliche Bande. Die Basenpaarlänge dieser Bande ist größer 91 Basenpaare (BP). Das längere Fragment muß Folge der Wegfall einer Schnittstelle sein, an der das Enzym Cfo I im Restriktionsverdau

angreift. Der Wegfall der Schnittstelle liegt in der Veränderung der Basenfolge im Apolipoprotein E Gen. Zur Detektion der veränderten Basenfolge wurde das Apo E Gen sequenziert (siehe 2.8).

Abbildung 3.2

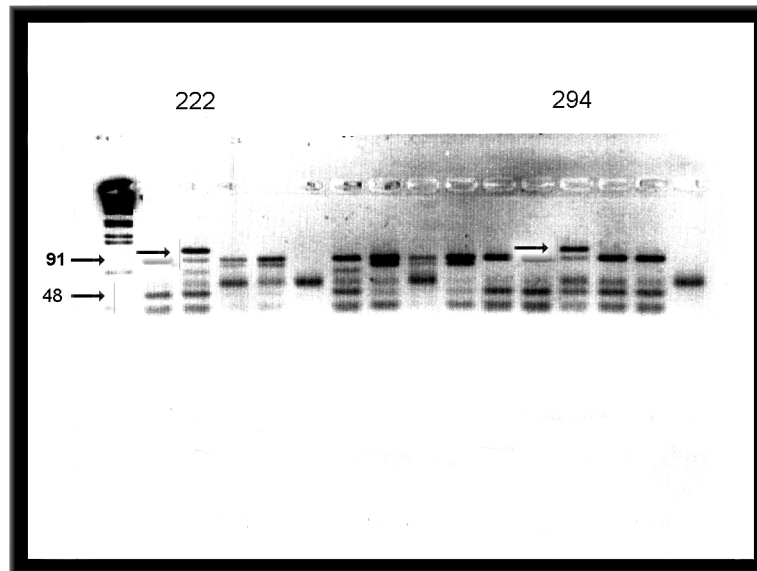
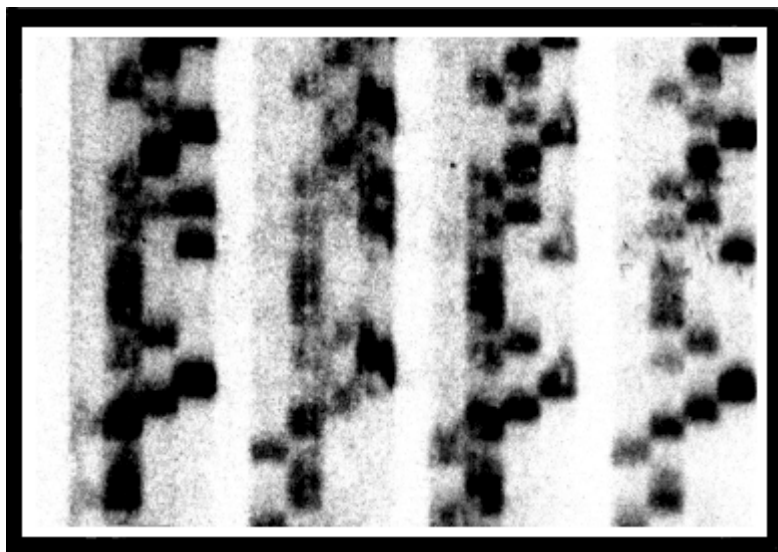


Abbildung 3.3 zeigt eine Vergrößerung des Photos des Röntgenfilms des Sequenzgels (siehe 2.2.7.6). 6 Proben (2 Kontrollen mit dem Apo E Typ $\epsilon 3/3$ und je 2 mal die Probennummern 222 und 294) wurden sequenziert. Die ersten beiden Bandenmuster der Sequenzreaktion zeigen die Proben 222 und 294. Die Bandenmuster 3 und 4 die Kontrollproben. Die Basenfolge der mit Phosphor radioaktiv markierten Basen lautet von links nach rechts: A-G-C-T. Das Sequenzgel wird von unten nach oben vom 5' zum 3' Ende abgelesen. Die Basensequenz der Kontrollproben im abgebildeten Abschnitt (Base 506-529) lautet: AGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCT. (Schnittstelle Triplet 136 Abbildung 2.7) Bei den Probe 222 und 294 ist an der Schnittstelle des Enzyms Cfo I an der Stelle 520 die Base Arginin durch die Base Cytosin ersetzt worden. Da dieselben Abschnitte beider Chromosomen 19 sequenziert wurden zeigen sich auf dem Photo des Sequenzgels beide Basen auf derselben Höhe. Durch die Mutation resultiert der Wegfall der Schnittstelle im Restriktionsverdau und somit ein längeres Basenfragment (91+18 BP), welches in der Gelelektrophorese oberhalb der 91 BP langen Bande sichtbar wird.

Abbildung 3.3



4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird der mögliche Zusammenhang zwischen dem Apolipoprotein E Polymorphismus und dem Auftreten psychiatrischer Erkrankungen untersucht. Es wurden 8 verschiedene Erkrankungen auf ihren Apo-E Typ hin analysiert. Insbesondere werden hierbei die dementiellen Erkrankungen näher betrachtet. Bei der Alzheimer Krankheit wurde in bisher veröffentlichten Arbeiten eine erhöhte Trägerrate des Apo E $\epsilon 4$ Allels beschrieben (Stritttmatter et al.1993). Dieser positive Zusammenhang konnte auch bei Patienten, die an einer vaskulären Demenz erkrankt sind nachgewiesen werden (Frisoni et al. 1994).

Zu Patienten mit nicht dementiellen psychiatrischen Erkrankungen liegen bisher nur wenig Daten vor. In den publizierten Arbeiten ließ sich bisher keine Assoziation zwischen dem Auftreten psychischer Erkrankungen und einer bestimmten Isoform des Apo E nachweisen.

Anhand dieser Kenntnisse wurden die in der Einleitung genannten Hypothesen formuliert.

Es wurde erwartet, daß sich in dieser Arbeit der positive Zusammenhang zwischen dem Apo E $\epsilon 4$ Allel und den dementiellen Erkrankungen bestätigt, und daß zwischen den übrigen psychiatrischen Erkrankungen und dem Apo E Polymorphismus kein Zusammenhang besteht.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit waren:

Das in der bisherigen Literatur beschriebene gehäufte Auftreten des Allels $\epsilon 4$ des Apo E bei Patienten mit einer Alzheimer Demenz konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Untersuchung fand sich lediglich eine Apo E $\epsilon 4$ Trägerrate von 13,8%. Dies entspricht ungefähr der Häufigkeit der Kontrollgruppe dieser Studie. Hier fand sich eine Trägerrate von 14,3%. In der internationalen Literatur wird in der kaukasischen Normalbevölkerung eine Trägerrate des Apo E $\epsilon 4$ Allels von ca. 12-14% genannt (Utermann et al. 1984, Weisgraber et al. 1994). Es findet sich also in dieser Studie keine z.B. durch eine regionale Variabilität bedingte Abweichung der Verteilung der Apo E Isoformen. Eine solche Abweichung in der Kontrollgruppe könnte ein differierendes Ergebnis in der Gruppe der dementiellen Erkrankungen erklären. Auch bei den Frequenzen der Allele $\epsilon 2$ und $\epsilon 3$ fanden sich in dieser Studie keine Auffälligkeiten. Hier ergab sich eine Trägerrate von 9,4 bzw. 76,8 Prozent. Auch bei den Phänotypen zeigte sich keine erhöhte Häufigkeit der Typen Apo E 3/4 und Apo E 4/4 bei den Patienten mit einer Alzheimer Demenz. Die Häufigkeiten entsprachen hier denen der gesunden Kontrollgruppe. Zum Vergleich wurden die psychiatrischen Erkrankungen (ICD 291-317) zu einer Gruppe zusammengefaßt. Die Ergebnisse dieser Gruppe zeigten vergleichend mit der Kontrollgruppe und mit der Patientengruppe der

Alzheimer Demenz keine signifikante Abweichung bezüglich der Verteilung der Apo E Phänotypen. Die Frequenz des $\epsilon 4$ Allels, gemittelt über die 6 übrigen Diagnosegruppen, betrug ebenfalls nur 13,8 Prozent.

Man kann aus diesen Ergebnissen somit keine signifikante Erhöhung des $\epsilon 4$ Allels oder der Apo E3/4 und Apo E4/4 Phänotypen bei der Alzheimer Demenz errechnen (siehe Punkt 3.4.2.1).

Die Ergebnisse bezüglich der Alzheimer Demenz sind vergleichend in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1

	Alzheimer Demenz	Andere Psych. Erkr.	Kontrollgruppe
Allel $\epsilon 2$	9,4%	7,9%	8,9%
Allel $\epsilon 3$	76,8%	79,5%	76,8%
Allel $\epsilon 4$	13,8%	12,6%	14,3%
Apo E 2/2	2,9%	0,4%	0%
Apo E2/3	11,6%	13,3%	17,8%
Apo E2/4	1,4%	1,4%	0%
Apo E3/3	60,9%	62,3%	57,1%
Apo E3/4	20,3%	20,9%	21,4%
Apo E4/4	2,9%	1,4%	3,5%

Dieses Ergebnis widerspricht den oben bereits erwähnten Publikationen, die ein vermehrtes Auftreten des $\epsilon 4$ Allels bei der Alzheimer Demenz beschreiben. Vergleichend soll hier das Ergebnis der vorliegenden Studie mit Replikationsstudien des von Corder et al. beschriebenen Zusammenhangs dargestellt werden (siehe Tabelle 4.2).

Die drei unten dargestellten Vergleichsstudien zeigen alle eine signifikant höhere Allelfrequenz des Apo E $\epsilon 4$ Allels bzw. eine signifikant erhöhte Häufigkeit der Phänotypen E3/4 und E4/4 bei Patienten, die an einer Alzheimer Demenz erkrankt sind, verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe der Studie (hier nicht aufgeführt). Die Apo E $\epsilon 4$ Frequenzen variieren in den Vergleichsstudien zwischen 24 Prozent und 41 Prozent. Im Gegensatz dazu

Tabelle 4.2

	Eigene Studie	Förstl et al. 1994	Brousseau et al.1994	Poirer 1993
Allel $\epsilon 2$	9,4 %	4%	1%	3%
Allel $\epsilon 3$	76,8%	58%	75%	59%
Allel $\epsilon 4$	13,8%	41%	24%	38%
Apo E 2/2	2,9%	0%	0%	0%
Apo E2/3	11,6%	6%	2,8%	3%
Apo E2/4	1,4%	2%	0%	2%
Apo E3/3	60,9%	36%	55,5%	33%
Apo E3/4	20,3%	38%	36,1%	48%
Apo E4/4	2,9%	19%	5,6%	13%

stehen die 13,8 Prozent in der vorliegenden Studie. Die Studie von Brousseau et al. zeigt eine relativ niedrige Häufigkeit des Allels $\epsilon 4$ im Vergleich zu den anderen beiden Studien. Es zeigt sich aber auch hier eine deutliche Differenz verglichen zu den Ergebnissen dieser Arbeit.

Die Ergebnisse der eigenen Studie stehen somit im Widerspruch zu den bisher veröffentlichten Arbeiten, die die Korrelation des Apolipoprotein E Polymorphismus und der Alzheimer Demenz untersuchten.

Auch die Überrepresentation des Apo E $\epsilon 4$ Allels bei Patienten mit einer vaskulär bedingten Demenz konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Shimano et al. konnten bei Patienten mit einer Multiinfarkt Demenz eine doppelt so hohe Frequenz des Apo E $\epsilon 4$ Allels finden wie in der Kontrollgruppe (Shimano et al. 1989). In dieser Arbeit findet sich zwar eine Frequenz von 26,3 %, die damit sogar höher liegt als bei den Patienten mit einer Alzheimer Demenz, sie zeigt aber aufgrund der zu kleinen Patientenzahl vergleichend mit der Kontrollgruppe keine Signifikanz (siehe Punkt 3.4.2.2).

Kontrastiv soll auch hier das Ergebnis der eigenen Studie mit einer Vergleichsstudie, sowie der Kontrollgruppe dargestellt werden (siehe Tabelle 4.3).

In der vorliegenden Arbeit findet sich sogar eine höhere Frequenz, als in der Studie von Kálmán et al. In dieser Studie errechnete sich im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgrund der

Tabelle 4.3

	Eigene Arbeit	Kálmán et al. 1998.	Kontrollgruppe
Allel $\epsilon 2$	5,3%	5%	8,9%
Allel $\epsilon 3$	68,4%	76%	76,8%
Allel $\epsilon 4$	26,3%	19%	14,3%
Apo E 2/2	0%	0%	0%
Apo E2/3	10,5%	3%	17,8%
Apo E2/4	0%	6%	0%
Apo E3/3	47,4%	62%	57,1%
Apo E3/4	31,6%	26%	21,4%
Apo E4/4	10,5%	3%	3,5%

größeren Fallzahl (79 Kontrollen bzw. 34 Patienten) eine signifikant höherer Frequenz des Apo E $\epsilon 4$ Allels.

Die Allelfrequenzen der Isoformen des Apo E und die Häufigkeiten der Phänotypen der Patienten mit Alkoholpsychosen, Schizophrenie, Neurosen, Alkoholabhängigkeit und affektiven Psychosen wichen erwartungsgemäß nicht von denen der Kontrollgruppe ab. Lediglich bei den Patienten mit einer Minderbegabung fand sich nach Fisher's exaktem Test eine schwache Korrelation mit dem Alleltyp 4 des Apo E. Im Chi²-Test errechnete sich diese schwache Signifikanz nicht.

Dieses Ergebnis korreliert somit mit den bisher veröffentlichten Studien, in denen kein Zusammenhang mit dem Polymorphismus des Apo E nachgewiesen werden konnte.

Im weiteren sollen die möglichen Ursachen der abweichenden Ergebnisse erörtert werden.

Es stellt sich hier die Frage, ob der Zusammenhang zwischen dem Apo E $\epsilon 4$ Allel und dem Auftreten einer Alzheimer Demenz durch einen direkten Einfluß des Apo E $\epsilon 4$ Allels auf die biochemischen Vorgänge bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit hat, oder ob es sich um indirekte Einflüsse handelt, die das Auftreten eines dementiellen Prozesses begünstigen.

Als neuropathologisches Korrelat der Alzheimer Demenz findet sich in den Gehirnen von Alzheimer Patienten extrazellulär gelegene senile Plaques und intrazellulär lokalisierte Faserbündel, sogenannte Neurofibrillen (Alzheimer 1907). Das Ausmaß zwischen der neurofibrillären Degeneration und dem Grad der Demenz zeigt eine statistische Korrelation (Braak et Braak 1991, Mc Kee 1991). Die neurofibrilläre Degeneration ist jedoch die Folge, nicht die Ursache der Nervenzelluntergänge. Deren Vorkommen ist nicht auf die Demenz vom Alzheimer Typ beschränkt, sondern findet sich auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen (Wisniewski et al. 1979). Im Gegensatz zu der Assoziation zwischen der Ablagerung von senilen Plaques und dem Apo E ϵ 4 Allel, finden sich zwischen den Phänotypen ApoE3/3, E3/4 und E4/4 keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der in verschiedenen kortikalen Regionen abgelagerten neurofibrillären Bündel. Es findet sich jedoch ein positiver Zusammenhang zwischen der Zahl der Neurofibrillen und der Dauer der Erkrankung (Schmechel et al. 1993, Gomez-Isla et al. 1996). Die Neurofibrillen sollen zum Teil aus Komplexen phosphorylierten Tau-Proteins bestehen. Die Aufgabe des Tau-Proteins besteht wahrscheinlich in der Stabilisierung der Mikrotubuli. Diese sind für den Transport innerhalb des Neurons verantwortlich. Es wird diskutiert, ob das Apo E ϵ 3 Allel durch eine Bindung an das Tau-Protein dieses vor einer übermäßigen Phosphorylierung, wie sie bei der Alzheimer Demenz auftritt schützt, während das Apo E ϵ 4 Allel durch eine verminderte Bindung diesen Prozeß verstärkt (Strittmatter et al. 1994). Dieser Vermutung widerspricht die o.g. Beobachtung, daß die Zahl der neurofibrillären Bündel keine Abhängigkeit vom Apo E Typ hat. Trotz dieser Diskussion scheint es sich bei den neurofibrillären Bündeln nicht um eine Alzheimer spezifische Veränderung zu handeln, sondern um einen gemeinsamen Endpunkt neurodegenerativer Erkrankungen. Ein sicherer Zusammenhang zum Apo E Polymorphismus konnte nicht nachgewiesen werden. Daher soll im Weiteren nicht näher auf diesen eingegangen werden.

Bei den senilen Plaques handelt es sich um extrazellulär gelegene, diffus in der Hirnrinde verteilte Ablagerungen. Aus diesen konnte der Proteaseinhibitor Alpha1-Antichymotrypsin, (Probst et al. 1987), das LDL-„related“-Protein (LRP), das Apolipoprotein E (Rebeck et al. 1993), das Amyloid Precursor Protein (APP) (Tagliavini et al. 1988), sowie das β -Amyloid isoliert werden. Das β -Amyloid-Peptid hat am C-terminalen Ende eine variable Länge von 39-42 Aminosäuren und wird aufgrund seiner β -Faltblattstruktur und seines Molekulargewichts von etwa 4 kD als β A4 bezeichnet (Glennner et Wong 1984, Masters et al. 1984). Als Vorläuferprotein des β -Amyloids konnte das Amyloid Precursor Protein (APP) identifiziert werden (Kang et al. 1987). Der Genlocus des APP konnte auf dem langen

Arm des Chromosom 21 nachgewiesen werden (Zabel et al.1987). Das APP ist ein Protein, das teilweise in der Membran liegt und ein C-terminales extrazelluläres und ein N-terminales cytoplasmatisches Ende aufweist. Das Spaltprodukt des APP, das β -Amyloid, liegt mit einem kleineren Teil innerhalb der Membran. Der größere Bereich liegt extrazellulär. Es werden verschiedene Wege diskutiert, die zur Spaltung des Amyloid Precursor Proteins, und somit zur Sekretion des β -Amyloids führen. Drei als Alpha-, Beta- und Gammasekretase bezeichnete Enzyme zeigen verschiedene Angriffspunkte am APP, so daß daraus unterschiedliche Spaltungsprodukte resultieren. Die Alpha Sekretase spaltet innerhalb der Sequenz des β -Amyloids, so daß es bei diesem Vorgang nicht zur Bildung des filamentbildenden Proteins kommt. Die Beta-Sekretase spaltet das APP intraluminal, jenseits der β -Amyloid Sequenz. Hier wird dieses Protein nicht gespalten. Die Gamma-Sekretase spaltet das APP innerhalb der Membran am N-terminalen Ende und induziert so die Bildung des β -Amyloids bei Spaltung am C-terminalen Ende durch die Beta-Sekretase (Haass et Selkoe 1998).

Bei der Ablagerung des β -Amyloids handelt es sich um den entscheidenden pathophysiologischen Prozeß bei der Entstehung der Alzheimer Demenz (Wisniewski et al. 1993). Die pathophysiologische Bedeutung des APP wurde durch die Entdeckung von Mutationen im β APP-Gen, die familiäre Formen der Alzheimer Demenz verursachen, bekräftigt (Goate et al. 1991).

Aus diesen Gründen wurde nach dem möglichen Einfluß des Apolipoprotein E und dessen Isoformen $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ auf das Vorläuferprotein APP und die Entstehung der β -Amyloid-Plaques gesucht. Dies könnte auf verschiedenen Wegen erfolgen. Primär zeigt das Apo E4 keinen protektiven Effekt auf die Ablagerung von β -Amyloid. Es kann die Ablagerung von β -Amyloid nicht unterdrücken (Evans et al. 1995). Gegenteilig konnte sogar eine erhöhte Ablagerung von β -Amyloid bzw. eine erhöhte Anzahl von Plaques im cerebralen Cortex beim Vorliegen des Apo E4 Allels nachgewiesen werden (Schmechel et al.1993, Olichney et al. 1996, Rebeck et al. 1993). Des weiteren fanden sich Hinweise, daß das Apolipoprotein E einen direkten Einfluß auf die Ablagerung von β -Amyloid nimmt. In mikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, daß im Gehirn von mit transgenen Mäusen gekreuzten Apo E knockout-Mäusen (Apo E^{-/-}; PDAPP^{+/+}) im Hippocampus und im Neocortex sich eine signifikante Reduktion von β -Amyloidablagerung vergleichend mit Apo E homozygoten Mäusen (Apo E^{+/+}, PDAPP^{+/+}) fand. Im Cortex bzw. Hippokampus von Apo E knockout Mäusen fanden sich nur 11,75 respektive 37,9 Prozent der Ablagerungen vergleichend mit Apo E Positiven homozygoten Mäusen. Dieser Effekt fand sich auch in verminderter

Ausprägung bei Apo E hemizygoten Mäusen (Apo E^{+/-};PDAPP^{+/+}). Bei PDAPP^{-/-} Mäusen konnten keine A β -immunreaktive oder durch Thioflavin S nachweisbare Ablagerungen gefunden werden (Bales et al. 1997). Die Läsionen im Hippokampus zeigten insgesamt eine größere Ausdehnung als die Ablagerungen im Neocortex. Diese Beobachtung bekräftigt die Vermutung einer direkten Wirkung des Apo E Polymorphismus auf die pathophysiologischen Vorgänge bei der Entstehung einer Demenz vom Alzheimer Typ. Des weiteren wird dadurch die Bedeutung des APP als Vorläufer des β -Amyloids betont. Dies erklärt jedoch nicht die Apo E Isoform abhängige Erhöhung des relativen Risikos, an einer Alzheimer Demenz zu erkranken. Möglicherweise begründet sich diese Abhängigkeit in einer unterschiedlichen Ausprägung des Effekts der verschiedenen Apo E Isoformen, auf die β -Amyloidablagerung einzuwirken. Der Nachweis der ausgeprägten Ablagerungen im Hippokampus deckt sich mit den Beobachtungen beim Menschen. Hier konnte ein vermindertes Volumen des Hippokampus bei Patienten mit einer Alzheimer Demenz nachgewiesen werden. Diese Beobachtung zeigte zudem eine Abhängigkeit vom Apo E Typ. Verglichen mit dem Apo E Typ ϵ 3/3 fand sich eine signifikante Volumenminderung des Hippokampus und des Mandelkerns bei Patienten mit dem Apo E Phänotyp 4/4 von 54 bzw. 37 Prozent (Lehtovirta et al. 1995). Dieser Befund bestätigte sich auch für den Phänotyp ϵ 3/4. Das Ausmaß der Volumenminderung war hier jedoch nicht so ausgeprägt. Kernspintomographisch konnte auch bei nichtdementen Zwillingen nachgewiesen werden, daß die Größe des Hippokampus eine Abhängigkeit vom Apo E Phänotyp zeigt. Bei Träger des Apo E ϵ 4 Allels wurde ein signifikant kleineres Hippokampusvolumen beschrieben (Plassman et al. 1997).

Eine Apo E Isoform abhängige Wirkung der Polymerisation des β A4 in Amyloidfilamente wurde von Potter und Mitarbeitern beschrieben. Diese konnten eine zehn bis zwanzigfach erhöhte Filamentbildung bei Vorliegen des Apo E nachweisen. Das Allel ϵ 4 zeigte hierbei die höchste, das Allel ϵ 2 die geringste katalytische Aktivität (Ma et al. 1994). Diese Wirkung zeigte sich besonders bei der 42 Aminosäuren lange Form des β -Amyloids, die als vorherrschende Form in den Amyloidplaques gefunden wird (Roher et al. 1993). Diese Arbeit unterstützt die Vermutung, daß das Apo E direkt biochemische Mechanismen beeinflusst, welche die Entstehung seniler Plaques begünstigen, und somit auf die Entwicklung einer Demenz vom Alzheimer Typ einwirken. Insbesondere ist hier der Einfluß auf die 42 Aminosäuren lange Form des β -Amyloids von wichtiger pathophysiologischer Bedeutung.

Die Beobachtung der geringen stimulativen Wirkung des Apo E2 auf die Amyloidfilamentbildung unterstützt die epidemiologisch bereits gestellte Vermutung eines protektiven Effekts des Allels ϵ 2 auf die Entwicklung einer Alzheimer Demenz (Corder et al.

1994; West et al. 1994). Die Allelform $\epsilon 2$ zeigt eine Reduzierung der Amyloidablagerungen im Cortex im Vergleich zu den anderen Isoformen (Nagy et al. 1995). In der vorliegenden Studie fanden sich vergleichsweise hohe Allelfrequenzen des Allels $\epsilon 2$, sowie eine hohe Prozentzahl der Phänotypen E2/2 und E2/3. Die bisher veröffentlichten Studien bestätigten dagegen den Trend der niedrigen Allelfrequenzen des Apo E2 bei der Alzheimer Demenz (siehe Tabellen 4.2 und 4.4).

Tabelle 4.4

	Eigene Studie	Corder et al. 1994	West et al.1994
Allel $\epsilon 2$	9,4 %	1,3%	2,7%
Allel $\epsilon 3$	76,8%	46,6%	62,5%
Allel $\epsilon 4$	13,8%	52%	34,9%

Außer den genannten Einflußmechanismen wird eine direkte Wirkung des Apolipoprotein E auf das Nervenzellwachstum diskutiert. Es konnte gezeigt werden, daß das Apo E $\epsilon 3$ Allel das Auswachsen von Neuriten verstärkt. Das Apo E $\epsilon 4$ Allel zeigte hier einen gegenteiligen Effekt. Es verminderte das Aussprossen von Neuriten an Nervenzellen. Dieser Effekt war in der Gegenwart von beta-VLDL nachweisbar (Nathan et al.1994). Dieser Zusammenhang konnte von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt werden. Diese konnte ebenfalls die Vermutung untermauern, daß das Apo E $\epsilon 3$ Allel einen positiven Einfluß auf das Nervenwachstum hat, wohingegen das Apo E $\epsilon 4$ Allel das Nervenwachstum vermindert. Ein Unterschied auf das Nervenwachstum zwischen den Allelen Apo E $\epsilon 2$ und $\epsilon 3$ konnte nicht beobachtet werden. Es konnte hierbei zusätzlich gezeigt werden, daß das Nervenwachstum beider Allelformen bei Vorhandensein eines Antikörpers gegen das Low-density-Rezeptor related Protein (LRP) komplett unterdrückt werden kann (Holtzman et al. 1995). Dies deutet darauf hin, daß das Neuritenwachstum Apo E Isoform-spezifisch beeinflusst wird, und dieser Effekt im zentralen Nervensystem von Rezeptor-vermittelten-Bindungen abhängig ist. Bei einer Nervenschädigung wird Apolipoprotein E von Makrophagen produziert. Apo E wird nach einer Nervenschädigung in einer sehr viel größeren Menge gefunden, als in gesunden Nerven. Von den geschädigten Nervenzellen werden hohe Konzentrationen an LDL-Rezeptoren exprimiert, welche durch die Apo E Bindung die für die Nervenregeneration wichtigen Lipide

aufnehmen. Die Lipide und hier besonders das Cholesterin wird für die Membransynthese verwendet. Somit scheint es, daß die wichtigste Aufgabe des Apo E bei einer Nervenschädigung im Lipidtransport besteht. Interessanterweise findet sich nach einer Nervenschädigung ein vermindertes Aussprossen von Neuriten unter Anwesenheit von Apo E4. Die reparativen Vorgänge scheinen bei Präsenz der Allelform $\epsilon 4$ beeinträchtigt zu werden. Diese Tatsache könnte erklären, warum Patienten, die Träger des Allels $\epsilon 4$ sind und einen Schlaganfall oder ein Schädelhirntrauma erleiden, eine schlechtere Heilung erfahren, als Patienten ohne dieses Allel (Nicoll et al. 1996).

Der Einfluß der verschiedenen Apolipoprotein E Allele auf die Entwicklung einer Alzheimer Demenz läßt vermuten, daß diese sich auf den klinischen Verlauf auswirken. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten aber keinen Nachweis erbringen, daß die Ergebnisse psychometrischer Tests abhängig vom Apo E Polymorphismus sind. Auch Bewertungskriterien, welche die Fähigkeit der Verrichtungen alltäglicher Dinge beurteilen, konnten keine Korrelation der Ergebnisse mit dem Apo E Allel bei der Erstuntersuchung feststellen. Der kognitive Abbau im Verlauf der Krankheit unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den sechs verschiedenen Apo E Phänotypen (Growdon et al. 1996, Asada et al. 1996, Kurz et al. 1996, Basun et al. 1995).

Somit scheint es, daß durch den Einfluß des Apo E $\epsilon 4$ Allels auf die Pathogenese der Alzheimer Demenz zwar das Erkrankungsalter negativ vom Apo E Phänotyp beeinflusst wird, der klinische Verlauf der Alzheimer Demenz hingegen unabhängig vom Apo E $\epsilon 4$ Allel ist.

Bezüglich vaskulär bedingter dementieller Erkrankungen, konnte ein ähnlicher Zusammenhang wie er zwischen der Alzheimer Demenz und dem Apo E Polymorphismus beschrieben wurde nachgewiesen werden. Auch hier fand sich bei Patienten mit einer vaskulären Demenz in den meisten Studien eine erhöhte Apo E Trägerrate. (Frisoni et al. 1994, Chapman et al. 1998, Kálmán et al. 1998). In diesen Studien betragen die Allelfrequenzen des Allels $\epsilon 4$ zwischen 19 und 26 Prozent. Eine Metaanalyse bei 926 Patienten bestätigte den Befund einer erhöhten Apo E $\epsilon 4$ Trägerrate. In dieser Arbeit fand sich eine durchschnittliche Apo E $\epsilon 4$ Frequenz von 27 Prozent (Mc Carron et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit fand sich bei 19 Patienten eine Prävalenz des Apo E $\epsilon 4$ von 26,3% in der Gruppe der vaskulären Demenzen. Es errechnete sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe jedoch keine Signifikanz, was gegebenenfalls auf die geringe Patientenzahl zurückzuführen ist.

Eingangs wurde bereits die eigene Arbeit mit den Ergebnissen der ungarischen Arbeitsgruppe von Kálmán et al. verglichen. (siehe Tabelle 4.3)

Ursache für die Entstehung einer vaskulären Demenzerkrankung sind makroangiopathisch bedingte cerebrale Schädigungen, als auch mikroangiopathische Veränderungen an den Gefäßen. Eine cerebrale Mikroangiopathie wird unter anderem bedingt durch die kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie. Der arterielle Bluthochdruck, sowie der Diabetes mellitus sind signifikant negative Vorhersagekriterien kognitiver Funktionen nicht-dementer Personen. (Martinez-Lage et al. 1996).

Hachinski et al. konnten nachweisen, daß erhöhte LDL-Cholesterin- sowie Triglyzeridspiegel einen signifikanten unabhängigen Risikofaktor für das Erleiden eines Schlaganfalls darstellen (Hachinski et al. 1996). Das konsekutive Risiko, nach einem Schlaganfall ein dementielles Syndrom zu entwickeln, ist deutlich erhöht (Kokmen et al. 1996, Tatemichi et al. 1993).

Ursache für das häufigere Auftreten des Allels $\epsilon 4$ bei vaskulären Erkrankungen könnte somit in der Rolle des Apo E beim Lipidtransport begründet sein. Die Phänotypen E3/4 und E4/4 bedingen verglichen mit dem Phänotyp E3/3 erhöhte Cholesterinspiegel (Shimano et al. 1989, Czech et al. 1993, Utermann et al. 1984). Zudem wurde bei den Phänotypen Apo E 2/2, 2/3, 3/4 und 2/4 signifikant höhere Triglyzeridspiegel gemessen als bei Patienten mit dem Apo E Phänotyp E 3/3 (Dallongeville et al. 1992). Da es sich bei der Hyperlipidämie, wie bereits dargestellt, um einen wichtigen Risikofaktor cerebraler Insulte und der Entstehung einer cerebralen Mikroangiopathie handelt, könnte eine hirnschädigende Wirkung des Apo E $\epsilon 4$ Allels auf diesem Wege erfolgen. In einer italienischen Studie konnte bei Überlebenden eines ischämischen Insultes verglichen mit gesunden Kontrollprobanden eine erhöhte Apo E $\epsilon 4$ Allelfrequenz gefunden werden (Maraglione et al. 1998). Die These einer negativen Auswirkung des Apo E $\epsilon 4$ auf das vaskuläre System wird von der Beobachtung unterstützt, daß die Prävalenz vaskulärer Erkrankungen in einer Patientengruppe, die Träger des Apo E $\epsilon 4$ Allels waren höher ist (DeCarli et al. 1999). Zudem findet sich bei Patienten, die an einer coronaren Herzkrankheit leiden eine signifikant höherer Anzahl an homozygoten für das $\epsilon 4$ Allel (Bockxmeer et Marmotte 1992). Ein protektiver Effekt auf die Entstehung cerebrovaskulärer Erkrankungen hingegen wurde für den Phänotyp Apo E 3/3 beschrieben (Couderc et al. 1993).

Berücksichtigt werden muß, daß die Ätiologie einer vaskulären Demenz unterschiedlich sein kann. Diese kann durch Gefäßverschlüsse größerer Hirngefäßäste mit konsekutiven Teilinfarkten bei embolischen Ereignissen bedingt sein, oder aus ischämischen Schädigungen durch eine cerebrale Mikroangiopathie resultieren. Insofern müßte bei den Studien unterschieden werden, ob es sich um eine Multiinfarktdemenz, z.B. auf dem Boden

rezidiverender kardioembolischer Insulte handelt, oder das dementielle Syndrom durch eine vaskuläre Leukenzepalopathie verursacht wird, die durch eine Hypercholesterinämie mit beeinflußt werden kann. Auf die Vernachlässigung dieser Unterscheidung kann zurückgeführt werden, daß in wenigen Studien keine positive Korrelation zwischen dem Apo E ϵ 4 und einer vaskulären Demenz gefunden wurde (Kawamata et al. 1994).

Unabhängig von der Ätiologie der Erkrankung ist die Funktion des Apo E bei der Neuroregeneration dieses Krankheitsbildes von wichtiger Bedeutung. Durch die gefäßbedingten Schädigungen sind bei diesen Patienten ständig reparative Vorgänge im Gange. Hierbei wurde bei Patienten, welche einen cerebralen Insult erlitten, eine schlechtere Besserungstendenz bei Vorhandensein des Apo E ϵ 4 Allels beobachtet (Slooter et al. 1997). Dies kann auf die schlechten reparativen Funktionen des Apo E ϵ 4 zurückzuführen sein, die sich auch bei Patienten mit einer Alzheimer Demenz oder einem Schädel-Hirn Trauma fanden. Bei Patienten mit einer vaskulären Demenz konnte eine doppelt so hohe relative Frequenz des Apo E ϵ 4 Allels gefunden werden (Shimano et al. 1989). Diese Ergebnisse zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine deutliche Signifikanz. Diese Untersuchungen wurden bereits durchgeführt, bevor der positive Zusammenhang zwischen dem Apo E Polymorphismus und der Alzheimer Demenz entdeckt wurde. Neuropathologisch findet sich bei vielen Patienten, die an einer vaskulären Demenz erkranken, neben den vaskulären Läsionen auch pathologische Veränderungen wie sie bei der Alzheimer Demenz vorhanden sind. Das neuropathologische Bild rein vaskulärer Schädigungen findet sich sehr selten (Hulette et al. 1997). Insofern muß davon ausgegangen werden, daß auch bei der vaskulären Demenz die pathophysiologischen Mechanismen, welche Einfluß auf die Entwicklung eines dementiellen Syndroms bei der Alzheimer Erkrankung haben, auch bei diesem Krankheitsbild eine Rolle spielen. Die gefäßbedingten Veränderungen könnten hier einen additiv schädigenden Effekt besitzen. Anzumerken ist, daß die Diagnosestellung einer vaskulären Demenz allein anhand klinischer Kriterien schwierig ist. Die Kriterien zur Diagnosestellung einer Demenz wurde an dem Krankheitsbild der Alzheimer Demenz ausgerichtet. Insbesondere sind die Kurzzeitgedächtnisstörungen sowie die kognitiven Defizite, welche die Aktivitäten des täglichen Lebens beeinflussen von wichtiger diagnostischer Bedeutung. Die Diagnosestellung richtet sich somit weniger nach den kognitiven Defiziten, als nach dem klinischen Verlauf der Erkrankung, dem Vorliegen fokal neurologischer Defizite, sowie dem Vorhandensein von Risikofaktoren. Aber auch bei den durch eine Autopsie bestätigten vaskulären Demenzen können in der Krankheitsgeschichte vaskuläre Ereignisse fehlen (Bowler et Hachinski 1996). Insofern ist zur Diagnosestellung

immer die Durchführung einer cerebralen Bildgebung erforderlich. Aus den genannten Punkten geht hervor, daß das Apolipoprotein E auf verschiedene Wege die Entwicklung einer vaskulären Demenz beeinflussen kann. Über die bekannten Pathomechanismen, die teilweise auch bei der Entstehung der Alzheimer Demenz eine Rolle spielen, und zusätzlich über die Auswirkung auf das vaskuläre System, was unabhängig davon zusätzlich zu einer cerebralen Schädigung führen kann.

Bei den dementielle Erkrankungen scheint es nachvollziehbar, daß die Pathogenese der Entwicklung einer Demenz und deren Abhängigkeit vom Apo E Polymorphismus teilweise ähnlich ist, und so ein Zusammenhang zwischen den Beobachtungen in Ätiologie, Klinik und neuropathologischen Veränderungen besteht.

Anders verhält sich das bei den übrigen in dieser Arbeit untersuchten psychiatrischen Erkrankungen. Hier ist bisher kein Zusammenhang der untersuchten Krankheitsbilder und dem Apo E Polymorphismus beschrieben worden. Bis auf die oben genannten Pathomechanismen sind keine weiteren Einflüsse des Apo E auf cerebrale Funktionen bekannt. Bei den Schizophrenien und den affektiven Psychosen handelt es sich um Erkrankungen, deren Ätiologie auf ein Imbalance von Neurotransmittern zurückzuführen ist. Da es sich bei beiden Erkrankungen aber, abgesehen von reaktiven Depressionen und schizophrenen Psychosen, die durch einen Medikamentenmißbrauch bedingt sind, um organische Erkrankungen handelt, wäre ein Einfluß des Apo E Polymorphismus denkbar. Neurobiologisch kann man bei der Schizophrenie bisher weder Beginn, Verlauf noch die Symptomatik erklären. Heutzutage wird vermutet, daß bei der Schizophrenie eine Überaktivität bestimmter dopaminerger Neurone im zentralen Nervensystem vorliegt, und dies die Erkrankung bedingt. Die Dopamin Hypothese stützt sich vor allem auf den Wirkmechanismus antipsychotisch wirkender Pharmaka. Dabei wird heute die Dopaminrezeptorblockade für den antipsychotischen Effekt der Neuroleptika verantwortlich gemacht. Eine Wirkung der Apo E Allele auf dopaminerge Neurone oder deren Rezeptoren wurde bisher nicht beschrieben. Weder ist bisher ein Zusammenhang einer Unterfunktion, wie sie beim Morbus Parkinson vorkommt, noch einer Überaktivität wie sie bei der schizophrenen Psychose vermutet wird, und dem Apo E beschrieben (Zhu et al. 1996). Die Allelfrequenzen des Apo E ϵ_2 , ϵ_3 und ϵ_4 Allels betragen in der vorliegenden Studie 7,8, 81,3 und 10,9 Prozent. Sie zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Abweichung (siehe auch Punkt 3.4.2.4 und Tabelle 3.8). Insofern stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den

Veröffentlichungen, die den Zusammenhang zwischen dem Apo E Polymorphismus und der Schizophrenie untersuchten, überein.

Zu den affektiven Psychosen gehören sowohl das depressive als auch das manische Krankheitsbild. Bei diesen Erkrankungen wird eine Störung des Katecholamin- und Serotoninstoffwechsels vermutet. Auch hier ist bisher kein Zusammenhang zwischen diesen Neurotransmittern und dem Apolipoprotein E beschrieben worden. Bei Patienten, die an einer Alzheimer Demenz erkrankten, wird in der Literatur ein Prozentsatz zwischen 8 und 34 Prozent der Erkrankungen angegeben, die mit einer depressiven Symptomatik einhergehen (Eisdorfer et al. 1992). Insofern wäre ein Einfluß des Apolipoprotein E auf dieses Krankheitsbild denkbar. Es ist allerdings unklar, ob das depressive Syndrom bei den beiden Erkrankungen durch dieselben Pathomechanismen ausgelöst wird. Die in Tabelle 3.10 dargestellten Frequenzen der 3 Allel, sowie die Häufigkeit der Phänotypen weichen nur geringfügig von den Werten der Kontrollgruppe ab. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht (siehe Punkt 3.4.2.5) Die untersuchten Häufigkeiten entsprechen somit dem erwarteten Ergebnis.

Bei den Neurosen handelt es sich um eine Erkrankung des Nervensystems ohne nachweisbare organische Ursache. Die Erkrankung geht mit funktionellen Erlebnisstörungen einher. Es besteht ein fließender Übergang zwischen neurotischen Merkmalen Gesunder und neurotischen Störungen von Krankheits- und Behandlungswert. Eine organische Ursache dieser Erkrankung wird per definitionem ausgeschlossen. Der Einfluß eines genetischen Risikofaktors ist für diese Erkrankung daher sehr unwahrscheinlich. Die Untersuchungen der Phänotypen ergab keine signifikante Abweichung der Ergebnisse von denen gesunder Probanden (siehe Tabelle 3.12 und Punkt 3.4.2.6).

Bei den Alkoholpsychosen handelt es sich um Psychosen, die durch einen chronischen Alkoholismus verursacht werden. Diese treten in verschiedenen Formen auf. Als Alkoholhalluzinose im Rahmen eines Delirium tremens, als Wernicke Encephalopathie und als Korsakow Syndrom. Beim Delirium tremens handelt es sich um einen passageren Zustand mit Unruhe, wahnhaften Störungen, sowie vegetativen Begleiterscheinungen. Die Wernicke Encephalopathie ist eine noch reversible alkoholtoxische Störung mit neurologischen Ausfällen wie Blicklähmung, Ataxie und einem dementiellen Prozeß. Beim Korsakow Syndrom handelt es sich um eine amnestische Psychose mit Kurzzeitgedächtnisstörungen, Konfabulationen und fehlender Orientierung. Pathologisch anatomisch finden sich hier Axon- und Neuronenuntergänge, sowie kleinere Hämorrhagien in den Corpora mamillaria und den paraventriculären Thalamusregionen. Die Erkrankung wird durch einen Thiaminmangel

bedingt. Die strukturellen Läsionen zeigen nicht dieselbe Lokalisation, wie sie bei der Alzheimer Demenz gefunden wird. Ein Zusammenhang zwischen dem Apolipoprotein E und dem Stoffwechsel von Vitaminen ist nicht bekannt. Ebenso ist eine Interaktion zwischen dem Apo E und Alkohol bisher nicht beschrieben. Einen Einfluß auf die Klinik und die Prävalenz wurden nicht beschrieben. Denkbar wäre ein schlechterer Verlauf der Erkrankung bei Patienten die Träger des Allels $\epsilon 4$ sind. Durch die gestörten reparativen Funktionen dieses Allels, wie sie bei den degenerativen Erkrankungen vermutet werden, könnten die organischen Schädigungen eine schlechtere Regeneration erfahren als bei Trägern des $\epsilon 3$ Allels. In der vorliegenden Arbeit ließ sich jedoch keine erhöhte Apo E $\epsilon 4$ Allelfrequenz unter den Patienten mit einer Alkoholpsychose nachweisen (siehe Tabelle 3.14 und Punkt 3.4.2.7). Für die Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit sind keine genetischen Risikofaktoren bekannt. Ein Einfluß des Apolipoprotein E auf die Erkrankung ist nicht zu vermuten. Die Frequenzen der Allele und Phänotypen zeigte keine Abweichung von den Werten der Kontrollgruppe. Die eingangs aufgestellte Hypothese konnte für diese Krankheit bestätigt werden.

Zur Diagnosestellung einer Minderbegabung werden Intelligentsquotienten von unter 84 Punkten per definitionem vorausgesetzt. Ein Einfluß des Apo E auf die mnestischen Funktionen, bzw. den klinischen Verlauf konnte auch bei Patienten mit einer Alzheimer Demenz nicht gefunden werden. Die Ursachen für eine Minderbegabung sind mannigfaltig, ein gemeinsames pathophysiologische Korrelat ist nicht bekannt. Ein Einfluß des Apolipoproteine E auf diese Diagnose ist aus diesem Grunde unwahrscheinlich. Dieser Vermutung entsprechend zeigten sich die Allelfrequenzen und Häufigkeiten der Phänotypen der Patienten mit der Diagnose einer Minderbegabung im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden nicht abweichend (siehe Tabelle 3.16)

In der Elektrophorese fanden sich zwei Proben, die ein von dem bekannten Apo E Polymorphismus abweichendes Bandenmuster aufwiesen. Dies ist auf eine veränderte Schnittstelle des Restriktionsenzym Cfo I zurückzuführen. Es fand sich oberhalb der 91 Basenpaar langen Bande eine weitere, bezüglich der Länge atypische Bande. In der durchgeführten Sequenzreaktion fand sich ein Basenaustausch an der Stelle 520 des Apolipoprotein E. Die Sequenz an der Schnittstelle änderte sich dadurch von 'GTG'CGC'CTC zu der Sequenz 'GTG'TGC'CTC. Die Sequenz TGC codiert die Aminosäure Cystein. Dadurch resultierte ein Aminosäurenaustausch am Triplet 136 von Arginin zu Cystein. Diese Mutation führt bei den Patienten zu einer Hyperlipoproteinämie

vom Typ III nach Friederickson (Walden et al. 1994). Die Hyperlipoproteinämie ist charakterisiert durch eine Erhöhung einer sehr Cholesterin und Apo E reichen VLDL (very low density lipoproteins) und der Chylomikronen. Bei Patienten, bei denen diese Mutation gefunden wurde lag eine Minderbegabung bzw. eine schizophrene Psychose vor. Als Krankheitsbilder, die durch eine Mutation im Apolipoprotein E Gen verursacht werden sind bisher nur Hyperlipidämien bekannt. Ein Einfluß auf psychiatrische Erkrankungen ist nicht beschrieben worden. Es handelt sich bei den Mutationen somit um Zufallsbefunde ohne nachweisbaren pathogenetischen Zusammenhang mit den bei den Patienten vorliegenden Krankheitsbildern.

Die hier dargestellten Ergebnisse und Überlegungen widersprechen scheinbar den bisher bekannten Zusammenhängen zwischen dem Apo E Polymorphismus und dessen Einfluß auf die Entwicklung der untersuchten dementiellen Erkrankungen. Die bisher veröffentlichten Studien zeigten eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Allel $\epsilon 4$ des Apo E und der Alzheimer Demenz und der vaskulären Demenz. Des weiteren wurde ein Einfluß des Apo E $\epsilon 4$ Allels auf die Entwicklung der Lewy Körperchen Demenz beschrieben (Benjamin et al. 1994). Bei der Lewy Körperchen Demenz konnte, wie bei der Alzheimer Demenz, eine vermehrte Ablagerung von senilen Plaques bei Vorhandensein des Allels $\epsilon 4$ nachgewiesen werden (Olichney et al. 1996). Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß es sich bei dem Allel $\epsilon 4$ des Apo E um einen Risikofaktor handelt, der eine negative Wirkung auf die Entwicklung langsam fortschreitender dementieller Erkrankungen hat. Möglicherweise sind hier ähnliche pathophysiologische Mechanismen für die Neurodegeneration verantwortlich. Eine Korrelation von sich relativ rasch entwickelnden dementiellen Krankheiten und dem Apo E Polymorphismus konnte nicht nachgewiesen werden Bei der innerhalb von Monaten bis wenigen Jahre verlaufenden Jacob Creutzfeld Erkrankung, die neben Verhaltensauffälligkeiten mit einem schweren dementiellen Syndrom einhergeht, konnten keine Auswirkungen des Apo E Polymorphismus auf Prävalenz und Inzidenz beschrieben werden (Nakagawa et al. 1995, Saunders 1993). Auch bei den familiären Formen der Alzheimer Erkrankungen zeigte das $\epsilon 4$ Allel des Apo E keinen Einfluß auf Erkrankungsalter oder Prävalenz (van Broeckhovens et al. 1994). Diese werden durch Mutationen im Präsenil-1 und 2 Gen, auf den Chromosomen 1 und 14, (genannt PS-1 und PS-2) und durch eine Mutation auf dem Chromosom 21 innerhalb der APP Sequenz bedingt. Die Erkrankungen werden autosomal dominant vererbt. Diese Mutationen sollen direkt die pathophysiologischen Mechanismen der Ablagerung von β -Amyloid beeinflussen und somit auf die Entstehung von senilen Plaques wirken. Diese pathophysiologischen Vorgänge scheinen somit weitgehend

unabhängig vom Apo E Phänotyp abzulaufen. Insgesamt hat das Apo E ϵ 4 Allel auf die Entstehung rasch progredienter dementieller Syndrome nicht denselben Einfluß wie bei den langsam entstehenden sporadischen Alzheimer Demenzen.

Die Entdeckung des Zusammenhangs zwischen dem Apo E ϵ 4 Allel und den dementiellen Erkrankungen ist deshalb von so wichtiger Bedeutung, da bisher kein Risikofaktor der Alzheimer Demenz bekannt war. Es ergab sich somit die Möglichkeit, die physiologischen Funktionen des Apo E zu untersuchen, und somit dessen mögliche pathophysiologische Wirkung auf die Entstehung einer Alzheimer Demenz zu erforschen, und somit auch die Mechanismen zu ergründen, die die Alzheimer Erkrankung bedingen. Würden diese pathologischen Mechanismen aufgeklärt, wäre somit eine medikamentöse Therapie denkbar. Bisher stützt sich die medikamentöse Behandlung auf die Tatsache der Neurotransmitterimbalance. Durch die Degeneration des Nucleus basalis Meynert kommt es als Folge zu einem Mangel an Acetylcholin im zentralen Nervensystem. Die bisher eingesetzten Acetylcholinesterasehemmer wie Rivastigmin und Donepezil sollen dieses Ungleichgewicht beheben und so einen positiven, verzögernden Einfluß auf die Progredienz haben. Würde sich ein direkter Einfluß des Allels ϵ 4 auf die pathophysiologisch bedeutsamen Mechanismen der Alzheimer Demenz nachweisen lassen, wäre dies ein zweiter Ansatzpunkt einer medikamentösen Therapie. Über diesen ließe sich möglicherweise das Erkrankungsalter positiv beeinflussen. Bisher konnte nachgewiesen werden, daß das cholinerge Defizit bei Trägern des Apo E ϵ 4 Allels stärker ausgeprägt ist (Soininen et al. 1995). Des weiteren konnte gezeigt werden, daß Apo E ϵ 4 Allelträger ein schlechteres Ansprechen auf eine Therapie mit Acetylcholinesterasehemmern zeigen (Poirier et al. 1995). Dieser Zusammenhang könnte von Bedeutung sein, da sich anhand der Bestimmung des Apo E Phänotyps ein möglicher Therapieeffekt einschätzen ließe.

Zudem erscheint die Entdeckung eines Risikofaktors für die Entstehung einer Alzheimer Demenz auch deshalb so interessant, da die sichere Diagnosestellung dieser Erkrankung bisher nur post mortem anhand neuropathologischer Kriterien möglich war. Man erhoffte sich, einen Risikofaktor gefunden zu haben, der Wahrscheinlichkeitsaussagen bezüglich des persönlichen Risikos, an einer Alzheimer Demenz zu erkranken, ermöglicht. So könnte eine frühestmögliche Therapie erfolgen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, sowie die in der veröffentlichten Literatur dargestellten Korrelationen zeigen aber, daß die Bestimmung des Apo E Phänotyps sich nicht für eine Risikoabschätzung eignet. Im Gegenteil, es wurde sogar ausdrücklich davon abgeraten, diesen als Risikomarker heranzuziehen. (American College of Medical

Genetics/American Society of Human Genetics Working Group on Apo E and Alzheimer's disease 1995). In den in dieser Studie herausgearbeiteten Ergebnissen ließ sich keine Korrelation zwischen dem Apo E Polymorphismus und der Alzheimer Demenz nachweisen. Auch in einer schwedischen und afrikanischen Studie wurde keine Assoziation zwischen diesem Risikofaktor und der sporadischen Form der Alzheimer Demenz beschrieben (Lannfeldt et. al. 1994. Osuntokun et al. 1995). Auch diese Arbeiten widersprechen dem bekannten Zusammenhang nicht, zeigen jedoch deutlich, daß das Apo E ϵ 4 Allel keine notwendige Bedingung für die Entstehung einer Demenz vom Alzheimer Typ ist. Zudem fand sich, daß Apo E ϵ 4 homozygote nicht zwingenderweise an einer Alzheimer Demenz erkranken müssen. Weitere Arbeiten belegen, daß Apo E ϵ 4 Allelträger ein hohes Lebensalter erreichen können, ohne an stärkeren kognitiven Funktionseinschränkungen zu leiden als Träger der Apo E ϵ 3 Allels. (Rebeck et al. 1994). Diese Aussagen lassen vermuten, daß die Wirkung des Apo E ϵ 4 Allels entweder als Einzelfaktor nicht die pathophysiologisch ausschlaggebende Bedeutung zu haben scheint, oder daß das Apo E mit anderen unbekanntem Faktoren interagiert, die dessen Einfluß interindividuell verändern. Diese Einflußgrößen könnten einen genetischen Ursprung haben, und somit unabhängig von äußeren Faktoren wirken. Es könnten aber auch unbekannte Umweltfaktoren auf die pathophysiologischen Vorgänge einwirken und diese variieren. Durch die Entdeckung eines Risikofaktors für die Entstehung einer Alzheimer Demenz wurde intensiv nach weiteren möglichen Einflußgrößen geforscht. Als weiterer potentieller Risikofaktor konnte insbesondere das Antichymotrypsin Alpha nachgewiesen werden. Auch dieses Enzym soll einen negativen Einfluß auf die Entstehung der sporadischen Form der Demenz vom Alzheimer Typ haben. Es bindet an das β A4-Protein, wodurch es die Entstehung von Plaques begünstigen könnte (Ma et al. 1994). Des weiteren konnte nachgewiesen werden, daß im Gegenzug zum Abfall der Acetylcholinesterase das Enzym Butyrylcholinesterase seine Aktivität im Verlauf der Alzheimer Erkrankung steigert. Dieses Enzym wurde, wie das Antichymotrypsin und das Apo E, in den senilen Plaques der Alzheimer Patienten gefunden (Lehmann et al. 2000). Es wird sogar eine synergistische Wirkung zwischen dem Apo E und der Butyrylcholinesterase diskutiert (Lehmann et al. 1997, Wiebusch et al. 1999).

Die in jüngster Zeit untersuchten Interaktionen der o.g. Risikofaktoren zeigt, daß es sich bei der Alzheimer Erkrankung um ein multifaktorielles Krankheitsbild handelt, dessen pathophysiologische Vorgänge, besonders der sporadischen Formen noch größtenteils unbekannt sind. Die abgehandelten Überlegungen erläutern die mögliche Wirkung des für die Alzheimer Demenz anerkannten Risikofaktors Apo E auf die biochemischen Abläufe bei

dieser degenerativen Demenz. Sie zeigen aber auch, daß es sich beim Apolipoprotein E und dessen Isoformen zwar um einen Risikofaktor handelt, dieser als Diagnosemarker jedoch ungeeignet ist und dieser in der klinischen Praxis somit nicht den anfänglich vermuteten Stellenwert hat. Durch die Entdeckung des Apo E ϵ 4 Allels als Risikofaktor konnten aber pathophysiologische Mechanismen ergründet werden, die bis dahin noch unbekannt waren. Dadurch wurde ein tieferer Einblick in die Pathogenese der Alzheimer Demenz möglich. Daß Patienten trotz Fehlen des Allels ϵ 4 an einer Alzheimer Demenz erkranken, sowie die Tatsache, daß sich dieser Effekt in unterschiedlichen Patientenkollektiven in verschieden starker Ausprägung findet zeigt, daß noch weitere unbekannte Einflußgrößen existieren, die eine unterschiedliche Wirkung auf die Krankheitsentwicklung haben. Welche dieser hier dargelegten, oder auch noch unbekanntem Mechanismen die entscheidende Rolle spielt, und inwiefern diese als Therapieansätze dienen können, bleibt Aufgabe weiterführender Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluß des Apolipoprotein E Polymorphismus auf die Entwicklung acht verschiedener psychiatrischer Erkrankungen untersucht. Besondere Beachtung fand hierbei die Assoziation des Apo E mit den dementiellen Erkrankungen. Erstmals wurde 1993 von dem Einfluß der verschiedenen Apo E Phänotypen auf die Entwicklung der Alzheimer Demenz berichtet. Dieser Zusammenhang konnte in zahlreichen Replikationsstudien verifiziert werden. Jedoch zeigte sich in diesen Arbeiten die unterschiedliche Bedeutung dieses Risikofaktors auf die Entstehung primär bzw. sekundär degenerativer Demenzen. Die genaue pathogenetische Bedeutung dieses Risikofaktors ist jedoch noch nicht bekannt. Daher schien es von Interesse, ob es sich bei dem Apo E Polymorphismus um einen spezifischen Risikofaktor für Demenzerkrankungen handelt, oder ob das Apo E einen unspezifischen Effekt auf das Gehirn und somit auf die Entstehung anderer psychiatrischer Erkrankungen besitzt. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit außer den Demenzerkrankungen sechs weitere psychiatrische Krankheitsgruppen auf ihren Apo E Typ hin untersucht. Bei den dementiellen Krankheiten erwartete man, die bekannte Assoziation bestätigen zu können. Bei den übrigen psychiatrischen Erkrankungen wurde eine negative Korrelation angenommen. In den Ergebnissen dieser Arbeit konnten für keine der acht untersuchten Krankheitsgruppen ein positiver Zusammenhang mit dem Apo E nachgewiesen werden. In der Diskussion wurde erläutert, warum sich der bekannte positive Zusammenhang zwischen den dementiellen Erkrankungen nicht fand und warum sich der fehlende Einfluß des Apo E auf andere nicht dementielle Erkrankungen bestätigen ließ. Zur Zeit sind die biochemischen Abläufe über die das Apo E seinen Einfluß auf Pathogenese der Demenzerkrankungen ausübt noch weitgehend unverstanden. Gegenteilig zeigt sich, daß besonders bei den familiären Formen der Alzheimer Demenz andere Faktoren eine entscheidende Rolle spielen. Die vorliegende Arbeit, sowie die Studien, die keinen Zusammenhang fanden, oder Arbeiten die nachwiesen, daß der Effekt des Apo E in verschiedenen Patientenkollektiven eine unterschiedlich starke Ausprägung hat, verstärken die Vermutung, daß es sich bei der Alzheimer Demenz um ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen handelt, dessen genaue Pathogenese noch weiter erforscht werden muß, und dessen Interaktion der unterschiedlichen bisher bekannten Risikofaktoren noch größtenteils ungeklärt sind. Um diese Frage genauer zu klären bedarf es weiterer Studien, die die biochemischen Vorgänge bei der Alzheimer Demenz genau untersuchen.

6. Literatur

1. Adroer R, Santacruz P, Blesa R, Lopez-Pusa S, Ascaso C and Oliva R Apolipoprotein E4 allele frequency in spanish Alzheimer and control cases Neuroscience letters **189**, 182-186 (1995)
2. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN und Murtagh FR. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allg Zeitschr f Psychiatr **64**,146-148 (1907)
3. American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Working Group on ApoE and Alzheimer disease. Statement on use of apolipoprotein e testing for Alzheimer disease. JAMA **274**, 22-29 (1995)
4. Asada T, Kariya T, Yamagata Z, Kinoshita T, Asaka A. Apo E ε4 allele and cognitive decline in patients with Alzheimer's Disease. Neurology **47**, 603 (1996)
5. Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β-peptide deposition. Nat Genet, **17**;263-264 (1997)
6. BasunH, Grut M, Winblad B and Lannfelt L. Apolipoprotein ε4 allele and Disease progression in patients with late-onset Alzheimer's Disease. Neuroscience letters **183**, 32-34 (1995)
7. Benjamin R, Leake A, Edwardson JA, McKeith IG, Ince PG, Perry RH, Morris CM. Apolipoprotein E genes in Lewy body and Parkinson`s Disease. Letters to the editor. The Lancet **343**, 1565 (994)
8. Berg L. Clinical dementia rating. Brit J Psych **145**, 339 (1984)
9. Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cecerebral grey matter of elderly subjects. Brit J Psychiat **114**, 797-811 (1968)
10. Blue ML, Williams DL, Zucker S, Khan SA, Blum CB. Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland and liver. Proc Natl Acad Sci **80**,283-287 (1983)
11. Bockxmeer van F. M. and Mamotte C.D.S. Apolipoprotein E4 homozygosity in young men with coronary heart Disease. The Lancet **340**, 879-880 (1992)
12. Bowler J, Hachinski VC. History of the concept of vascular dementia: two opposing views on current definitions and criteria for vascular dementia. In: ProhovnikI, Wade J, Knezevic S, Tatemichi T, Erkinjuntti T (eds) Vascular dementia: current concepts. Wiley, Chichester, pp 1-24 (1996)

13. Braak H, Braak E. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol.* **3**; 213-216 (1991)
14. Van Broeckhoven C, Backhovens H, Cruts M, Martin JJ, Crook R, Houlden H, Hardy J. APOE genotype does not modulate the age of onset in families with chromosome 14 encoded Alzheimer's Disease. *Neuroscience letters* **169**, 179-180 (1994)
15. Brousseau T, Legrain S, Berr C, Gourlet V, Vidal O, Amouyel P. Confirmation of the ϵ 4 allele of the apolipoprotein E gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's Disease. *Neurology* **44**, 342-344 (1994)
16. Chapman J, Wang N, Treves TA, Korczyn AD, Bornstein NM. ACE MTHFR, Factor V Leiden, and Apo E polymorphisms in patients with vascular and Alzheimer's dementia. *Stroke* **29**; 1401-1404 (1998)
17. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriology* **127**, 1550-1557 (1976)
18. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the risk of Alzheimer's Disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923 (1993)
19. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmader KE, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Protective effect of apolipoprotein E Type 2 allele for late onset Alzheimer Disease. *Nature Genetics* **7**, 180-184 (1994)
20. Couderc R, Mahieux F, Bailleul S, Fenelon G, Mary R, Fermanian J. Prevalence of apolipoprotein E phenotypes in ischemic cerebrovascular Disease. *Stroke* **24**, 661-664 (1993)
21. Czech C, Förstl H, Hentschel F, Monning U, Besthorn C, Geiger-Kabisch C, Sattel H, Masters C, Beyreuther K. Apolipoprotein E-4 gene dose in clinically diagnosed Alzheimer's Disease: prevalence, plasma cholesterol levels and cerebrovascular change. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **243**, 291-292 (1993)
22. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apo E phenotype: a meta-analysis. *J Lip Res* **33**, 447-454 (1992)
23. DeCarli C, Kaye JA, Horwitz B, Rapoport SI. Critical analysis of the use of computer-assisted transverse axial tomography to study human brain in aging and dementia of the Alzheimer type. *Neurology* **40**, 872-883 (1990)

24. DeCarli C, Reed T, Miller BL, Wolf PA, Swan GE, Carmelli D. Impact of apolipoprotein E epsilon 4 and vascular disease on brain morphology in men from the NHLBI twin study *Stroke* **30**;1548-1553 (1999)
25. Eisendorfer C, Cohen D, Paveza GJ, Ashford JW, Luchins DJ, Gorelick PB, Hirschman RS, Freels SA, Levy PS, Semla TP, et al. An empirical evaluation of the Global Deterioration Scale for Staging Alzheimer's disease. *Am J Psy* **149**,190-194 (1992)
26. Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci* **82**, 203-207 (1985)
27. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics* **3**, 373-379 (1988)
28. Evans KC, Berger EP, Cho CG, Weisgraber KH, Lansbury PT Jr. Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: Implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer Disease. *Proc Natl. Acad. Sci* **92**, 763-767 (1995)
29. Förstl H, Czech C, Sattel H, Geiger-Kabisch C, Besthorn C, Kreger S, Monning U, Hartmann T, Masters C, Beyreuther K. Apolipoprotein E und Alzheimer-Demenz. *Nervenarzt* **65**, 780-786 (1994)
30. Folstein M.F. and Folstein SE. Mini-mental state. *J Psychiat Res* **12**, 189-198 (1975)
31. Frisoni GB, Bianchetti A, Govoni S, Trabucchi M, Calabresi L, Franceschini G. Association of Apolipoprotein E E 4 with vascular dementia. *J Am Med Ass* **271**, 1317 (1994)
32. Glenner G.G. and Wong C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **16**;885-890 (1984)
33. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's Disease. *Nature* **349**, 704-706 (1991)
34. Gomez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD, Growdon JH, Locascio JJ, Perls TT, Lipsitz LA, Hyman BT. Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E ε4 in Alzheimer's Disease. **39**, 62-70 (1996)

35. Growdon JH, Locascio JJ, Corkin S, Gomez-Isla T, Hyman BT. Apolipoprotein E genotype does not influence rates of cognitive decline in Alzheimer's Disease. *Neurology* **47**, 444-448 (1996)
36. Haass C. and Selkoe D. J. Alzheimer's disease. A technical KO of amyloid-beta peptide. *Nature*. **22**; 339-340 (1998)
37. Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, Du Boulay GH, McAllister VL, Marshall J, Russell RW, Symon L.. C. et al. Cerebral blood flow in dementia. *Arch Neurol* **32**,632-637 (1975)
38. Hachinski V, Graffagnino C, Beaudry M, Bernier G, Buck C, Donner A, Spence JD, Doig G, Wolfe BM. Lipids and stroke: a paradox resolved. *Arch Neurol*. **4**; 303-308 (1996)
39. Hixson JE, Vernier D. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *J Lip Res* **31**,545-548 (1990)
40. Holtzman DM, Pitas RE, Kilbridge J, Nathan B, Mahley RW, Bu G, Schwartz AL. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system derived neuronal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 9480-9484 (1995)
41. Hong CJ, Liu TY, Liu HC, Wang SJ, Fuh JL, Chi CW, Lee KY, Sim CB. $\epsilon 4$ allele of apolipoprotein E increases risk of Alzheimer's Disease in a chinese population. *Neurology* **46**,1749-1751 (1996)
42. Hulette C, Nochlin D, McKeel D, Morris JC, Mirra SS, Sumi SM, Heyman A. Clinical-neuropathologic findings in multi-infarct dementia: a report of six autopsied cases. *Neurology* **48**; 668-672 (1997)
43. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Rall SC Jr, Mahley RW. Normalization of receptor binding of apolipoprotein E2. Evidence for modulation of the binding sites conformation. *J Biol Chem* **259**, 7261-7267 (1984)
44. Innis MS, Myambo KB, Gelfand DH, Brown MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 9436-9440 (1988)
45. Kalman J, Juhasz A, Csaszar A, Kanka A, Rimanoczy A, Janka Z, Rasko I.. Increased apolipoprotein E4 allele frequency is associated with vascular dementia in the Hungarian population. *Acta Neurol Scand* **98**; 166-168 (1998)
46. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987 Feb 19-25;325(6106):733-6.

47. Kawamata J, Tanaka S, Shimohama S, Ueda K, Kimura J. Apolipoprotein E polymorphism in Japanese patients with Alzheimer's Disease or vascular dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **57**, 1414-1416 (1994)
48. Kokmen E, Whisnant JP, O'Fallon WM, Chu CP, Beard CM. Dementia after ischemic stroke: a population based study in Rochester, Minnesota (1960-1984) *Neurology* **46**; 154-159 (1996)
49. Kurz A, Egensperger R, Haupt M, Lautenschlager N, Romero B, Graeber MB, Muller U. Apolipoprotein E $\epsilon 4$ allele, cognitive decline, and deterioration of everyday performance in Alzheimer's Disease. *Neurology* **47**, 440-443 (1996)
50. Kuusisto J, Koivisto K, Kervinen K, Mykkanen L, Helkala EL, Vanhanen M, Hanninen T, Pyorala K, Kesaniemi YA, Riekkinen P, et al. Association of apolipoprotein E phenotypes with late-onset Alzheimer's Disease: Population based study. *BMJ* **309**, 636-638 (1994)
51. Lannfelt L, Lilius L, Nastase M, Viitanen M, Fratiglioni L, Eggertsen G, Berglund L, Angelin B, Linder J, Winblad B, et al. Lack of association between apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ and sporadic Alzheimer's Disease. *Neuroscience letters* **169**, 175-178 (1994)
52. Lehmann DJ Johnston C, Smith AD. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* **11**, 1933-1936 (1997)
53. Lehmann DJ Nagy Z, Litchfeld S, Borja MC, Smith AD. Association of butyrylcholinesterase K variant with cholinesterase-positive neuritic plaques in the temporal cortex in late-onset Alzheimer's disease. *Hum Genet.* **4**, 447-52 (2000)
54. Lehtovirta M, Laakso MP, Soininen H, Helisalmi S, Mannermaa A, Helkala EL, Partanen K, Ryyanen M, Vainio P, Hartikainen P, et al. Volumes of hippocampus, amygdala and frontal lobe in Alzheimer patients with different apolipoprotein E genotypes. *Neuroscience* **67**, 65-72 (1995)
55. Linz U. Die Polymerase-Kettenreaktion, Ein Überblick. *Naturwissenschaften* **77**, 515-530 (1990)
56. Ma J, Yee A, Brewer HB, Das S, Potter H. Amyloid-associated proteins alpha1-antitrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta- protein into filaments. *Nature* **372**, 92-94 (1994)
57. Mahley R. W., Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**, 622-630 (1988)

58. Marder K, Maestre G, Cote L, Mejia H, Alfaro B, Halim A, Tang M, Tycko B, Mayeux R. The apolipoprotein $\epsilon 4$ allele in Parkinson's Disease with and without dementia. *Neurology* **44**, 1330-1331 (1994)
59. Margaglione M, Seripa D, Gravina C, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, Merla G, Papa S, Postiglione A, Di Minno G, Fazio VM. Prevalence of apolipoprotein E alleles in healthy subjects and survivors of ischemic stroke. *Stroke* **29**; 399-403 (1998)
60. Martinez-Lage P, Manubens JM, Martinez-Lage JM. Vascular risk factors and cognitive performance in a non-demented elderly population. *Neurology (Suppl)* 1:A:289 (1996)
61. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down Syndrome. *Proc Natl Acad Sci* **82**, 4245-9 (1985)
62. Maxam A. M. and Gilbert W. Sequencing end labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in enzymology* **65**, 499-559 (1980)
63. McCarron MO, DeLong D, Alberts MJ. ApoE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease- a meta analysis. *Neurology* **53**; 1308-1311 (1999)
64. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**, 939-944 (1984)
65. McKee AC, Kosik KS, Kowall NW. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2;156-65 (1991)
66. Mullis K. B., Faloona F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzym* **155**, 335-350 (1987)
67. Mullis K. B. Eine Nachfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum der Wissenschaft.* Juni 60-67 (1990)
68. Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA, Johnston C, Litchfield S, Sim E, Smith AD. Influence of the apolipoprotein E Genotype on amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's Disease. *Neuroscience* **69**, 757-761 (1995)
69. Nakagawa Y, Kitamoto T, Furukawa H, Ogomori K, Tateishi J. Allelic variation of apolipoprotein E in Japanese sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease patients. *Neuroscience letters* **187**, 209-211 (1995)
70. Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* **264**, 850-852 (1994)

71. Nicoll J. S., Roberts G.W. and Graham D. I. Amyloid beta-protein, apoe genotype and head injury. *Ann NY Acad Sci* **777**;271-275 (1996)
72. Olaisen B, Teisberg P, Gedde-Dahl T Jr. The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. *Hum Genet*, **62**, 233-236 (1982)
73. Olichney JM, Hansen LA, Galasko D, Saitoh T, Hofstetter CR, Katzman R, Thal LJ. The apolipoprotein E ϵ 4 allele is associated with increased neuritic plaques and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's Disease and Lewy body variant. *Neurology* **47**,190-196 (1996)
74. Osuntokun BO, Sahota A, Ogunniyi AO, Gureje O, Baiyewu O, Adeyinka A, Oluwole SO, Komolafe O, Hall KS, Unverzagt FW, Hui SL, Yang M, Hendrie, Ms and HC. Lack of association between Apolipoprotein E ϵ 4 and Alzheimer's Disease in elderly nigerians. *Annals of Neurology* **38**, 463-465 (1995)
75. Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, Hofman A. Prevalence of Alzheimer's Disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ* **310**, 970-973(1995)
76. Pedro-Botet J, Senti M, Rubies-Prat J. Apolipoprotein E polymorphism and ischemic cerebrovascular Disease. Letters to the editor. *Stroke* **25**, 521 (1994)
77. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA. Linkage studies in familial Alzheimer Disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* **48**, 1034-1050 (1991)
78. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E- containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **917**,148-161 (1987)
79. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoprotein in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, E (LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* **262** 14352-60 (1987)
80. Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Bigler ED, Johnson SC, Anderson CV, Helms MJ, Saunders AM, Breitner JC. Apolipoprotein E ϵ 4 allele and hippocampal volume in twins with normal cognition. *Neurology* **48**, 985-989 (1997)
81. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's Disease. *The Lancet* **342**, 697-699(1993)

82. Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM, Gauthier S. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer Disease. *Proc Nat Acad Sci* **92**, 12260-12264 (1995)
83. Probst A, Brunnschweiler H, Lautenschlager C, Ulrich J. A special type of senile plaque, possibly a initial stage. *Acta Neuropath* **74**, 133-141 (1987)
84. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* **257**, 4171-4178 (1982)
85. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's Disease: Allelic variation and receptor interactions. *Neuron* **11**, 575-580 (1993)
86. Rebeck GW, Perls TT, West HL, Sohdi P, Lipsitz LA, Hyman BT. Reduced apolipoprotein epsilon 4 allele frequency in the oldest old Alzheimer's patients and cognitively normal individuals. *Neurology*. **44**; 1513-6 (1994)
87. Roheim PS, Carey M, Forte T, Vega GL. Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci*, **76**; 4646-4649 (1979)
88. Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ. Protein beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* **22**, 10836-10840 (1993)
89. Saunders AM, Schmechel K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring MG, Szymanski MH, McCown N, Dole KC, Schmechel DE, Strittmatter WJ, Pericak-Vance MA, Roses AD. Apolipoprotein E ϵ 4 allele distributions in late onset Alzheimer's Disease and in other amyloid-forming diseases. *The Lancet* **342**, 710-711 (1993)
90. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci* **74**, 5463-5467 (1977)
91. Sanger F, Coulson AR. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Letters* **87**, 107-110 (1978)
92. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid β -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's Disease. *Proc Natl Acad Sci* **90**, 9649-9653 (1993)

93. Shimano H, Ishibahi S, Murase T, Gotohda T, Yamada N, Takaku F, Ohtomo E. Plasma apolipoproteins in patients with multi-infarct dementia. *Atherosclerosis* **79**, 257-260 (1989)
94. Slooter AJ, Tang MX, van Duijn CM, Stern Y, Ott A, Bell K, Breteler MM, Van Broeckhoven C, Tatemichi TK, Tycko B, Hofman A, Mayeux R. Apolipoprotein E epsilon4 and the risk of dementia with stroke. A population-based investigation. *JAMA* **10**; 818-821 (1997)
95. Soininen H, Kosunen O, Helisalmi S, Mannermaa A, Paljarvi L, Talasniemi S, Ryyanen M, Riekkinen P Sr. A severe loss of acetyltransferase in frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein ε4 allele. *Neuroscience letters* **187**, 79-82 (1995)
96. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: High-avidity binding to β-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's Disease. *Proc Natl Acad Sci* **90**, 1977-1981 (1993)
97. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau. Implications for Alzheimer Disease. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 11183-11186 (1994)
98. Tagliavini F, Giaccone G, Frangione B, Bugiani O. Pre-amyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosci Lett.* **11**; 191-196 (1988).
99. Tatemichi TK, Desmond DW, Paik M, Figueroa M, Gropen Ti, Stern Y, Sano M, Remien R, Williams JB, Mohr JP. Clinical determinants of dementia related to stroke. *Ann Neurol* **33**, 568-575 (1993)
100. Tomlinson BE. The pathology of dementia. *Contemp Neurol Ser.* **15**; 113-153 (1977)
101. Utermann G, Kindermann I, Kaffarnik H, Steinmet A. Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Human Genetics* **65**, 232-236 (1984)
102. Walden CC, Huff MW, Leiter LA, Connelly PW, Hegele RA. Detection of a new apolipoprotein E mutation in type III hyperlipidemia using deoxyribonucleic acid restriction isotyping. *J Clin Endo Met* **78**, 699-704 (1994)
103. Weisgraber KH. Apolipoprotein E: Structure-function relationships. *Adv Prot Chem* **45**, 249-302 (1994)
104. Wenham PR, Price WH, Blundell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *The Lancet* **337**, 1158-1159 (1991)

105. West HL, Rebeck W, Hyman BT. Frequency of the apolipoprotein E ϵ 2 allele is diminished in sporadic Alzheimer Disease. *Neuroscience letters* **175**, 46-48 (1994)
106. Wiebusch H., Poirier J, Sevigny S, Schappert K. Further evidence for a synergistic association between APOE ϵ 4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's disease. *Hum Genet.* **2**, 158-63 (1999)
107. Wisniewski K, Jervis GA, Moretz RC, Wisniewski HM. Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia. *Ann Neurol.* **3**;288-94 (1979)
108. Wisniewski T, Golabek A, Matsubara E, Ghiso J, Frangione B. Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun.* **30**;192(2):359-65 (1993)
109. Zannis VI et Breslow JL. Human very low density lipoprotein apolipoprotein e isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochem* **20**, 1033-1041 (1981)
110. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, Schonfeld G, Hazzard WR, Blum C. Proposed nomenclature of apoE isoforms, ApoE genotypes, and phenotypes. *J Lip Res* **23**, 911-914 (1982)
111. Zhu S, Nothen MM, Uhlhaas S, Rietschel M, Korner J, Lanczik M, Fimmers, Propping P. et al. Apolipoprotein E genotype distribution in schizophrenia. *Psychiatr Genet* **2**, 75-79 (1996)