

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Experimentelle Genetik

Identifikation und funktionelle Charakterisierung genetischer Risikofaktoren der Alzheimer Krankheit

Lidija Konta

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. J. Adamski
2. Univ.-Prof. Dr. H.-R. Fries
3. Priv.-Doz. Dr. M. Riemenschneider

Die Dissertation wurde am 02.06.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.12.2008 angenommen.

Danksagung

Hier ist der Platz, all jenen Personen ein herzliches Dankeschön zu sagen, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützten und zu dieser Dissertation beitrugen.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Jerzy Adamski, vom ganzen Herzen für seine hervorragende Betreuung, seine wertvollen Anregungen sowie seine Diskussionsbereitschaft bedanken. Durch seine wissenschaftliche wie auch freundliche Unterstützung gab er mir immer wieder Rückhalt und Kraft um auch in schwierigen Phasen durchzuhalten.

Herrn PD Dr. Matthias Riemenschneider danke ich für das interessante Thema, die Betreuung und die Korrektur.

Für die Bereitschaft und die Übernahme als zweiter Prüfer für diese Arbeit bedanke ich mich auch bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Hans-Rudolf Fries.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn PD Dr. Thomas Illig für seine Betreuung und die Zeit, die er sich nahm, um verschiedene wissenschaftliche Probleme zu besprechen, sowie seine sehr guten Anregungspunkte zur Arbeit. Vor allem bedanke ich mich für seine konstruktive Kritik zu meinem Manuskript.

Herrn Dr. Simon M Laws danke ich für seine wissenschaftliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Henning Gohlke für seine Diskussionsbereitschaft, seine große Unterstützung im Labor und die fachliche Korrektur meines Manuskriptes.

Für die Aufklärung statistischer Fragen bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Jakob Müller.

Ferner gilt mein Dank Frau Petra Belcredi, die mir wertvolle Informationen über die Probandenauswahl überließ.

Für ein ausgesprochen angenehmes Arbeitsklima, sowie die konstruktive und produktive Zusammenarbeit möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Arbeitskollegen sowie guten Freunden Frau Patricia Friedrich, Frau Kerstin Eckart, Frau Nina Berberich und Herrn Dr. Simon M Laws ganz herzlich bedanken. Dank Euch habe ich schwierige Situationen leichter gemeistert und kann mich nur noch an die schönen Seiten des Doktorantenlebens erinnern.

Für die Hilfsbereitschaft in jeder Lebenslage bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Joachim Heinrich und Frau Dr. Astrid Ritter-Heinrich. Überaus dankbar bin ich, dass sie mir neue Horizonte geöffnet haben.

Meinen Eltern Dražana und Milojko Maljković, Schwester Sanja Jakovac und Oma Marija bin ich sehr dankbar, dass sie immer an mich glaubten und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Jungs- meinem Mann Davor und unserem Sohn Philip- die mir durch ihre Liebe, Unterstützung und Geduld die Augen für die wirklich wichtigen Sachen im Leben geöffnet haben.

Ebenso sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich erwähnt sind, aber zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG I

SUMMARY II

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... III

1. EINLEITUNG 1

1.1. Alzheimer Krankheit: Definition und Einteilung 1

 1.1.1. Histopathologische Marker 2

1.2. Risikofaktoren für die Alzheimer Krankheit 6

 1.2.1. Lebensstil- und umweltabhängige Risikofaktoren 7

 1.2.2. Genetische Risikofaktoren 8

1.3. Genomweite Suchen nach genetischen Risikofaktoren..... 8

1.4. Kandidatengene für Alzheimer Krankheit 10

 1.4.1. Kandidatengene auf dem Chromosom 10 10

 1.4.1.1. Plasminogen activator, urinary (PLAU, uPA) 10

 1.4.1.2. Calcium/Calmodulin regulierte Kinase II (CaMK2)..... 12

 1.4.1.3. Vinculin (VCL) 15

 1.4.1.4. AP3M1 16

 1.4.2. Kandidatengen auf dem Chromosom 12 17

 1.4.2.1. ST8SIA1 (GD3) 17

1.5. Zielsetzung 20

2. METHODEN 21

2.1. Phänotypisierung der Probanden 21

 2.1.1. Die neuropsychologischen Tests 21

 2.1.1.1. Mini Mental Status Examination Test (MMST) 22

 2.1.1.2. Telephone Interview for cognitive Status-modified (TICS-M) Test 23

2.2. Auswahl der SNPs 23

2.3. Die Isolation der Nukleinsäuren 24

 2.3.1. DNA-Isolation 24

 2.3.2. RNA-Isolation 24

2.4. Konzentrationsbestimmung genomischer DNA- und RNA-Lösungen 25

2.5. Test der DNA und RNA auf Degradation 26

2.6. Plattenbelegung 26

2.7. DNA- und RNA-Elektrophorese	27
2.8. Polymerase-Kettenreaktion / Polymerase Chain Reaction (PCR).....	27
2.9. Homogenous Mass Extension (hME) Reaktion	30
2.10. SNP-Genotypisierung mittels Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) Time of Flight (TOF) Massenspektrometrie (MS).....	34
2.11. SNP-Genotypisierung mit Restriktionsendonukleasen.....	39
2.12. Sequenzierung der PCR Produkte.....	39
2.13. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	40
2.14. Aufreinigung der RT-PCR-Produkte.....	42
2.15. Kongorot-Färbung	42
2.16. Statistische Auswertung.....	43
2.16.1. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE)	43
2.16.2. Der allelische Test und Genotypentest.....	43
2.16.3. Haplotypberechnung und Linkage Disequilibrium Struktur	44
2.16.4. Zwei- und Dreilocushaplotypenanalyse	44
2.16.5. Two-sided Mann-Whitney U Test.....	44
3. MATERIAL	45
3.1. Geräte und Chemikalien.....	45
3.1.1. Geräte	45
3.1.2. Reagenzien, Lösungen, Puffer und Kits	47
3.1.3. Enzyme	49
3.1.4. Oligonukleotide	49
3.2. Software.....	50
3.2.1. Pipettierrobotiksoftware	50
3.2.2. MALDI TOF MS Software	50
3.2.3. Software für Primerdesign und Bestimmung der PCR-Bedingungen.....	50
3.2.4. Software für die Analyse genomischer DNA-Sequenzen	50
3.2.5. Sequenzierungssoftware	51
3.2.6. Datenbanken	51
3.2.7. Statistische Programme	52
4. PROBANDEN.....	53
4.1. Probandenauswahl und Einschlußkriterien	53
4.2. Alzheimer Studien	53
4.2.1. Initiale Fall-Kontroll-Studie aus München.....	53
4.2.2. Fall-Kontroll-Studien für die Replikation	54
4.2.3. Geschwisterpaar Studie	54

5. ERGEBNISSE	56
5.1. Analyse der SNPs auf dem Chromosom 10	56
5.1.1. Genotypisierung der SNPs auf dem Chromosom 10	56
5.1.1.1. <i>PLAU</i>	60
5.1.1.1.1. Überprüfung der Assoziationsergebnisse in unabhängigen Studien	66
5.1.1.1.2. Sequenzierung des Exons 6 mit der anschließenden Genotypisierung	69
5.1.1.2. <i>CaMK2G</i>	70
5.1.1.2.1. Überprüfung der Assoziationsergebnisse in den unabhängigen Studien	77
5.1.1.3. <i>VCL</i> und <i>AP3MI</i>	81
5.1.2. Funktionelle Analyse der signifikanten Ergebnisse auf dem Chromosom 10	87
5.2. Analyse der SNPs auf dem Chromosom 12	91
5.2.1. Genotypisierung der SNPs im <i>ST8SIA1</i>	91
5.2.1.1. Überprüfung der Assoziationsergebnisse in unabhängigen Studien	101
5.2.1.2. Sequenzierung des Exons 2	104
5.2.2. Funktionelle Analyse der signifikanten Ergebnisse auf dem Chromosom 12	105
6. DISKUSSION	107
6.1. Vor- und Nachteile der ausgewählten Studiendesigns.....	107
6.2. Zusammenfassung und Diskussion der Hauptergebnisse	110
6.2.1. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse auf dem Chromosom 10.....	110
6.2.2. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse auf dem Chromosom 12.....	114
6.3. Ausblick.....	117
7. ANHANG	118
7.1. Diagnostische Kriterien für das Demenz-Syndrom	118
7.1.1. ICD (International classification of diseases and related health problems) 10 Kriterien	118
7.1.2. DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)	119
7.1.3. NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association) Kriterien	119
7.1.4. CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease) Kriterien .	121
7.2. Ergebnisse der Dreilocusplotypenanalyse	122
7.2.1. Ergebnisse der Dreilocusplotypenanalyse für <i>PLAU</i>	122
7.2.2. Ergebnisse der Dreilocusplotypenanalyse für <i>CaMK2G</i>	123
7.2.3. Ergebnisse der Dreilocusplotypenanalyse für <i>VCL</i> und <i>AP3MI</i>	125
7.2.4. Ergebnisse der Dreilocusplotypenanalyse für <i>ST8SIA1</i>	126
7.3. Verwendete Primer	129
7.3.1. Verwendete Primer für die Genotypisierung	129
7.3.1.1. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen <i>KIAA0913,NDST2/CaMK2G</i> Region	129
7.3.1.2. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im <i>CaMK2G</i>	129

7.3.1.3. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen <i>CaMK2G/PLAU</i> Region.....	130
7.3.1.4. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im <i>PLAU</i>	130
7.3.1.5. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen <i>PLAU/VCL</i> Region	131
7.3.1.6. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im <i>VCL</i>	131
7.3.1.7. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im <i>AP3M1</i>	132
7.3.1.8. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im <i>ST8SIA1</i>	132
7.3.2. Verwendete Primer für die Sequenzierung	134
7.3.2.1. Verwendete Primer für die Sequenzierung des Exons 6 im <i>PLAU</i>	134
7.3.2.2. Verwendete Primer für die Sequenzierung des Exons 2 im <i>ST8SIA1</i>	134
7.3.2. Verwendete Primer für die RT-PCR	134
7.4. Abbildungsverzeichnis	135
7.5. Tabellenverzeichnis	138
7.6. Publikationsliste	142
7.7. Literaturverzeichnis.....	143

Zusammenfassung

Die Alzheimer Krankheit ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung in den westlichen Industrieländern und zeigt eine steigende Prävalenz mit zunehmendem Alter (Bassiony MM et al., 2004; Bondy SC et al., 1998; Potyk D, 2005). Die histopathologischen Merkmale dieser Erkrankung sind die A β -Plaques und neurofibrilläre Tangles, sowie Neuronenverlust im Hirn der Betroffenen. Zahlreiche epidemiologische Studien weisen auf die Wichtigkeit genetischer Faktoren hin, die zusammen mit Umwelt-, bzw. Lebensstilfaktoren einen Beitrag zur Alzheimer Krankheit leisten. Während Punktmutationen in drei Genen (*PS1*, *PS2* und *APP*) die autosomal-dominante Form der Erkrankung schon vor dem 60. Lebensjahr auslösen, erhöht das APOE ϵ 4 Allel die Wahrscheinlichkeit mit zunehmendem Alter an Alzheimer zu erkranken. Weiterhin wurden in zahlreichen genetisch-epidemiologischen Studien signifikante Loci auf den chromosomalen Regionen 10q22-24 und 12p13-q13 identifiziert.

In dieser Arbeit wurde eine Feinkartierung von Kandidatengenen in den zuvor genannten Kopplungsregionen durchgeführt. Die ausgewählten SNPs wurden anhand eines Fall-Kontroll Kollektives aus München genotypisiert und anschließend auf eine Assoziation mit der Alzheimer Krankheit getestet. Auf dem Chromosom 10 wurden SNPs aus vier Genen (*CaMK2G*, *PLAU*, *VCL* und *AP3M1*) ausgewählt und anschließend mittels Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight (MALDI TOF MS) genotypisiert. Die statistische Auswertung der Genotypisierungsdaten ergab mehrere signifikante Ergebnisse für die Gene *PLAU* ($p < 0,05-0,001$) und *CaMK2G* ($p < 0,05-0,002$). Den stärksten Assoziationshinweis auf dem Chromosom 10 lieferte der funktionelle (P141L) *PLAU* SNP rs2227564 [C/T] im Exon 6 ($p = 0,02$; EOAD $p = 0,001$). Als Risikoallel wurde hier das Minor Allel T bestätigt. Dieses Ergebnis wurde in drei weiteren unabhängigen Fall-Kontroll Studien aus Deutschland, Italien und Australien, sowie in einem diskordanten Geschwisterpaarkollektiv aus Deutschland erfolgreich repliziert. *PLAU* kodiert für das Protein PLA α , eine Serin-Protease die durch die Bindung an ihren Rezeptor PLA α R die Plasminogenkaskade aktiviert und damit den Abbau des aggregierten A β Proteins induziert. Nachfolgend wurde eine Auswirkung des Minor Alleles T auf die Erhöhung der Plaqueanzahl in *post mortem* isoliertem humanen Hirngewebe von Alzheimer Patienten untersucht. In diesem Zusammenhang konnte ein signifikanter Einfluss des Risikoallels T im *PLAU* SNP rs2227564 auf eine verstärkte A β -Ablagerung gezeigt werden ($p = 0,007$).

Das funktionelle Kandidatengen *ST8SIA1* (Chromosom 12) wurde genotypisiert und anschließend auf eine Assoziation mit der Alzheimer Krankheit in einer Fall-Kontroll Studie aus München getestet. *ST8SIA1* kodiert für das Protein Gangliosid GD3 Synthase. Dieses Enzym initiiert die Synthese des Disialogangliosides GD3 und ermöglicht damit die Entstehung der komplexen Ganglioside. In der AD-Pathogenese sind die Ganglioside als die stärksten natürlichen Aktivatoren der Amyloidproduktion diskutiert. Die statistische Analyse zeigte mehrere signifikante Ergebnisse. Signifikant assoziierte SNPs ($p < 0,05-0,002$) lagen in intronischen Bereichen, die Mehrheit war jedoch um Exon 2 konzentriert. Im *ST8SIA1* konnte kein funktioneller SNP gefunden werden. Weitere Analysen des Hirngewebes von Alzheimer Patienten und ihren gesunden Kontrollen zeigten eine Präsenz der Spleißvariante ohne Exon 3 (EU041716). Ein direkter Einfluss der signifikant assoziierten SNPs auf den Regulationsmechanismus des alternativen Spleißens konnte allerdings nicht bestätigt werden.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass das T Allel im *PLAU* SNP rs2227564 ein starker Risikofaktor für die Ausprägung von der Alzheimer Krankheit ist. Auch die *ST8SIA1*-Genotypisierungsdaten deuten auf eine Assoziation mit der Alzheimer Krankheit hin. Jedoch müssen hier durch die Genotypisierung der benachbarten Gene die LD-Blockgrenzen aufgeklärt werden. Auch die Analyse der Transkription, bzw. ihrer Expression von EU041716 mRNA bedarf einer weiteren Aufklärung.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is a genetically complex neurodegenerative disorder which causes a progressive decline of cognitive abilities. The prevalence of AD increases with advanced age. The most important neuropathological hallmarks found in the brains of individuals with AD are the presence of extracellular precipitations of beta-amyloid (A β) peptide, in form of amyloid plaques, and intracellular neurofibrillary tangles. Currently, four genes are known to be associated with AD with mutations in three of these genes (*PS1*, *PS2* and *APP*) causing an autosomal dominant, early-onset familial form of AD (EOAD). The fourth gene, *APOE*, increases the risk of the more common late-onset familial (LOAD) and sporadic forms of AD. Additionally, a number of linkage studies have defined susceptibility regions for AD, two of which are located on chromosomal regions 10q22-24 and 12p13-q13.

Five candidates within these regions were identified and detailed whole gene analyses, in one case-control study from Germany, were undertaken using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight (MALDI TOF MS). These genes were *CaMK2G*, *PLAU*, *VCL* and *AP3MI* located within the chromosomal linkage region at position 10q22-24 and *ST8SIA1*, located within the chromosomal linkage region at position 12p11.2-12p12.1. Statistical analysis of SNP alleles located at 10q22-q24, in the screening case-control sample, indicated evidence of an allelic association with AD for several markers located within *PLAU* ($p < 0,05-0,001$) and *CaMK2G* ($p < 0,05-0,002$). The strongest risk associated with AD was conferred by the minor allele of a functional marker within Exon 6 of *PLAU* (rs2227564 [C/T], P141L; $p = 0,02$). A more detailed analysis according to age of onset revealed stronger allelic association ($p = 0,001$) in the EOAD group. These results were successfully replicated in three independent case-control studies from Germany, Italy and Australia and additionally in one discordant sib-pair sample from Germany. The *PLAU* gene encodes a urokinase-type plasminogen activator, which converts plasminogen to plasmin. Additionally, this serine protease is capable of degrading aggregated and non-aggregated forms of A β . Furthermore, brain samples from histopathologically confirmed AD subjects were utilised to determine the functional impact of identified AD associated SNP. It was hypothesised that the presence of the risk allele rs2227564-T, may induce increased cerebral plaque load. Indeed, higher plaque counts in the temporal cortices were observed in carriers of the T allele compared to patients lacking this allele ($p = 0,007$).

ST8SIA1's involvement in catalysing the formation of GD3 ganglioside, the first step in the synthesis of complex gangliosides, also makes it a functional candidate. Gangliosides

have been reported to interact with A β resulting in conformational changes in the A β secondary structure (β -sheets). The association of β -sheets have been implicated in the formation of protein aggregates and fibrils observed in many human diseases, including AD. Statistical analysis of *ST8SIA1* SNPs showed significant association with AD for several intronic markers in the region surrounding Exon 2 ($p < 0,05-0,002$). These findings were successfully replicated in one independent case-control study. Further, it was investigated whether significant intronic SNPs had an impact on the generation of alternative splicing variants using human brain samples from healthy controls and individuals with AD. As a result of this analysis, one additional splicing product, lacking the entire exon 3, was identified (EU041716).

The results presented herein provide strong evidence that *PLAU* and *ST8SIA1* are involved in the development of AD. The minor allele (T) of the *PLAU* SNP rs2227564 is a plausible pathogenic mutation that may act by altering the processing of A β proteins, which in turn leads to increased A β plaque load. However, further functional experiments need to be undertaken to show this definitively. Statistical analysis of SNPs located in the intronic regions surrounding exon 2 of *ST8SIA1* showed one association with AD. However, it is necessary to screen surrounding genes and to define the LD blocks within this region. Furthermore, analysis of the identified novel EU041716 transcript and its expression is required so as to determine its relevance to AD.

Abkürzungsverzeichnis

A β	Beta Amyloid
AD	Alzheimer's disease, Alzheimer Krankheit
ADRDA	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
APP	Amyloid Prekursor Proteins
APOE	Apolipoprotein E
AP3M1	Adaptor-Related Protein Complex 3, MU-1 Subunit
b	Base
CaMK2G	Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Gamma
cCT	Craniale Computertomographie
cDNA	complementary DNA
CERAD	Consortium to Establish a Registry of Alzheimer's Disease
Chr.	Chromosom
cMRT	Craniale Magnetresonanztomographie
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EOAD	Early Onset Alzheimer's disease
hME	Homogenous Mass Extension
ICD	International Classification of Disease
LD	Linkage Disequilibrium
LOAD	Late Onset Alzheimer's disease
M	Molar
MALDI TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MS	Massenspektrometrie
NFT	Neurofibrilläre Tangles
NINCDS	National Institute of Neurological an Communicative Disorders and Stroke

PCR	Polymerase Chain Reaction
PHF	Paired Helical Filaments
PLAU	Plasminogen activator, Urinary
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RT - PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SF	Straight Filament
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST8SIA1	Alpha-2,8-Sialyltransferase I
S-TDT	Sib Transmissions-Disequilibrium-Tests
VCL	Vinculin

1. Einleitung

Demenzerkrankungen gehören zu den häufigsten psychiatrischen Störungen im Alter (Jellinger K et al., 1990). Nach der traditionellen Definition ist die Demenz (lat. „de“= ohne, „mens“= Verstand) eine sekundäre, fortschreitende Verschlechterung einer zuvor größeren geistigen Leistungsfähigkeit (Rösler N et al., 2002). Demenz wird nicht als spezifisches Syndrom, sondern vielmehr als ein Oberbegriff für multiple kognitive Defizite des Gehirns betrachtet, die durch degenerative, vaskuläre und traumabedingte Funktionsstörungen entstehen (Letenneur L et al., 2004).

Die Prävalenz der Demenzerkrankungen steigt im fortgeschrittenen Alter massiv an (Bassiony MM et al., 2004; Bondy SC et al., 1998; Potyk D, 2005). Um das sechzigste Lebensjahr spielen mittelschwere bis schwere Demenzen mit einer Prävalenz von 1% (Rösler N et al., 2002) in den Industrienationen noch eine vergleichsweise geringe Rolle. Auch in der Altersgruppe der 70- bis 74- Jährigen sind etwa 3% betroffen, aber bei den über 80-Jährigen steigt der Anteil der Betroffenen bereits auf 20% an (Rösler N et al., 2002; Letenneur L et al., 2004). Die Prävalenz erreicht bei den 95- bis 99-Jährigen sogar 45 Prozent (Teri L et al., 1997). In Deutschland sind etwa 1 Million Menschen an einer Demenz erkrankt (Förstl H et al., 2000; Bickel H, 2001). Rund 700.000 davon leiden an der häufigsten Form der Demenz, an der Alzheimer Krankheit (Alzheimer's disease, AD) (Bickel H, 2001; Bickel H, 2000).

Wegen der starken Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen und enormen volkswirtschaftlichen Kosten für Pflege und Therapie (Letenneur L et al., 2004), ist die Aufklärung des Krankheitsverlaufs und die Entwicklung effektiver Behandlungsmethoden von großer Bedeutung.

1.1. Alzheimer Krankheit: Definition und Einteilung

Die Krankheit, die Alois Alzheimer 1906 auf einem Kongress in Tübingen erstmals beschrieb, ist durch einen schleichenden Beginn und einen progredienten Krankheitsverlauf charakterisiert, bei dem es zu Störungen (Gedächtnis, Urteilsfähigkeit, Denkvermögen, Sprache, Lernen etc.), Verhaltensproblemen (Enthemmung, Affektflachheit, Euphorie, niedriger Frustrationstoleranz, emotionaler Labilität, Reizbarkeit, Aggressivität, verändertes sexuelles Verhalten) und zu einem zunehmenden Verlust von Alltagskompetenzen kommt (Förstl H et al., 2000). Zusätzlich können unspezifische akzessorische Symptome

(Depression, Angst, Sinnestäuschungen, wahnähnliche Phänomene etc.) auftreten. Jedoch kann die AD individuell sehr unterschiedlich verlaufen und folgt nicht immer der groben Einteilung in Stadien. Die Diagnosekriterien sind in der zehnten Ausgabe der „International Classification of Disease“ (ICD 10), sowie in der vierten Ausgabe des „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders“ (DSM IV) der American Psychiatric Association festgelegt. Ein weiterer Entwurf wurde in einer Zusammenarbeit zwischen den Arbeitsgruppen des „National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke“ (NINCDS) und der „Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association“ (ADRDA) vorgelegt. Diagnosekriterien sind im Kapitel 7.1. aufgelistet.

Es werden zwei Formen der AD unterschieden – die sporadische Form, die in 75% der Fälle vorkommt und die familiäre Form (FAD; ca. 25% aller Fälle). Abhängig vom Alter der Betroffenen bei Ausbruch der Krankheit ist die familiäre Form weiter in zwei Subformen unterteilt: late-onset AD (LOAD) und early-onset AD (EOAD). LOAD tritt nach dem 65. Lebensjahr auf und wurde bei der Mehrheit der FAD-Fälle nachgewiesen (Rademakers R et al., 2003). Die Anzahl der Patienten die an der selteneren EOAD leiden, beträgt ca. 5% (Kowalska A et al., 2004).

Der Schweregrad der Krankheit lässt sich durch die Fähigkeit zur selbständigen Lebensführung definieren. Bei einem leichten Schweregrad ist unabhängiges Leben möglich, jedoch können komplizierte tägliche Aktivitäten nicht mehr ausgeführt werden. Im mittelgradigen Stadium treten deutliche Beeinträchtigungen beim unabhängigen Leben auf und der Betroffene ist auf fremde Hilfe angewiesen. Bei einer schweren Demenz ist ein selbständiges Leben unmöglich.

1.1.1. Histopathologische Marker

Als wichtigste histopathologische Merkmale im Gehirn der AD-Patienten werden neuritische Plaques und neurofibrilläre Bündel (so genannte "Tangles") diskutiert (Abb. 1.1.). Bei den neuritischen Plaques handelt es sich um extrazelluläre Amyloid β ($A\beta$) Ablagerungen (Verdile G et al., 2004). Die neurofibrillären Tangles sind intrazelluläre, abnorme (gestreckte oder schraubenförmig spiralisierte) Filamente, die primär aus einer hyperphosphorylierten (Gomes-Ramos A et al., 2004; Garcia T et al., 2004; Dickson DW et al., 2004) und hyperglykosylierten (Gong CX et al., 2004) Form des Proteins Tau bestehen. Zusammen mit entzündlichen Vorgängen im Gehirn tragen diese histopathologische Merkmale zum Neuronenuntergang bei.

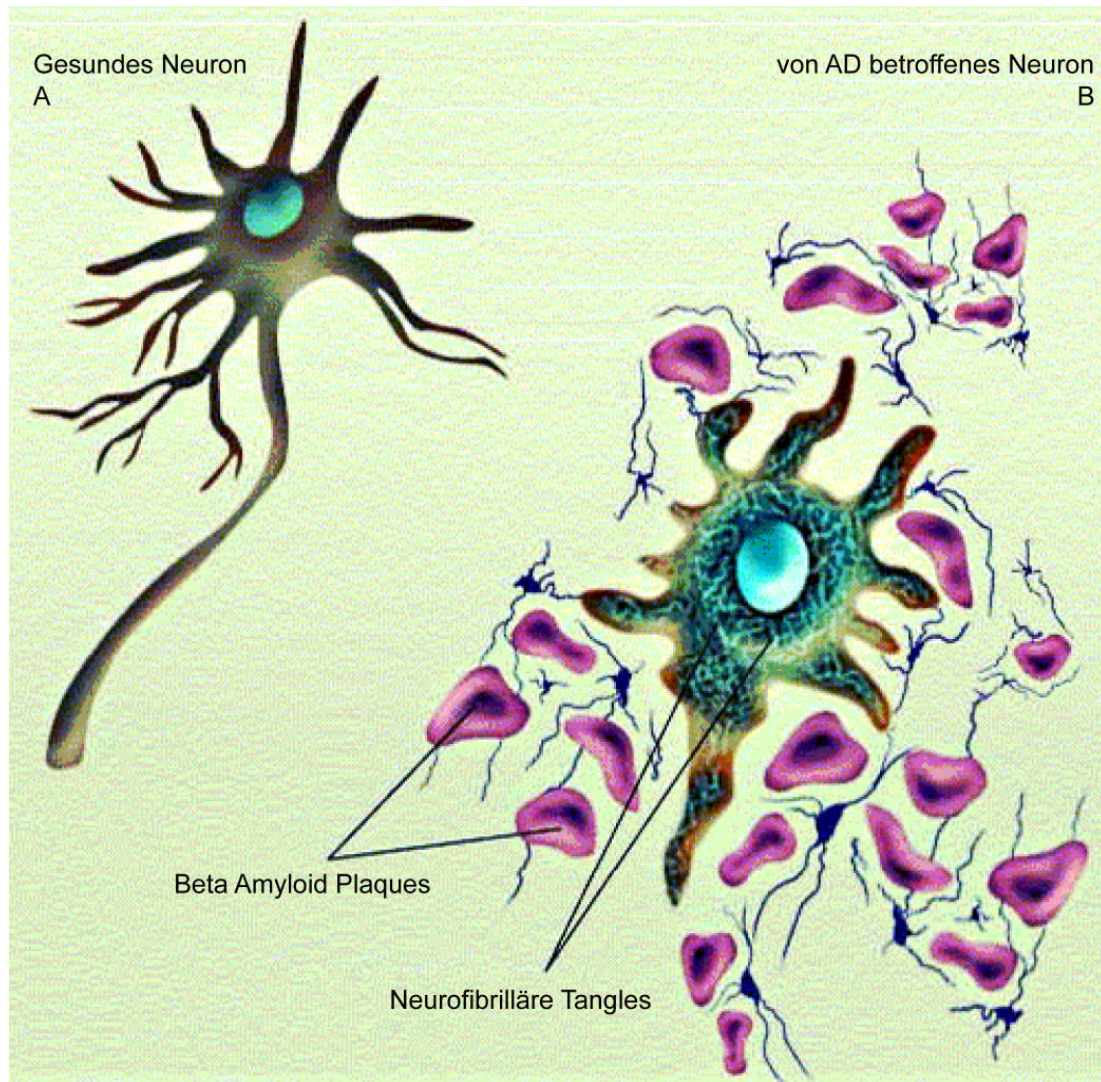


Abb. 1.1.: Vereinfachte Darstellung des gesunden (A) und von AD betroffenen (B) Neurons: Kommunikation zwischen den Neurozellen im an AD betroffenen Gehirn wird durch die A β -Plaques (lila dargestellte kugelförmige Ablagerungen außerhalb der Zelle) und neurofibrilläre Tangles (bläulich dargestellte intrazelluläre Filamente) gestört. Die pathologischen Ablagerungen führen zur Neurodegeneration, was den Zelltod und Hirnatrophie zur Folge hat (Verdile G et al., 2004; Gomes-Ramos A et al., 2004; Garcia T et al., 2004).

Nach der weit akzeptierten „Beta-Amyloid-Theorie“ ist das A β Protein das Schlüsselmolekül in der AD-Pathogenese (Verdile G et al., 2004; Sennvik K et al., 2004; Hardy J und Selkoe DJ, 2002). A β entsteht im so genannten amyloiden Weg durch die proteolytische Spaltung des Amyloid Precursor Proteins (APP), eines großen transmembranischen Glykoproteins (Abb. 1.2.) (Cribbs DH et al., 2004; Verdile G et al., 2004). Im ersten Schritt unterliegt das APP der Spaltung durch die β -Sekretase (BACE1, β -site cleaving enzyme). Dadurch werden eine lösliche Form des APPs (APPs β) und APP C-Terminal Fragment β freigesetzt (APP-CTF β) (Verdile G et al., 2004). Die enzymatische Aktivität der γ -Sekretase führt schließlich zur Spaltung des APP-CTF β Moleküls und

Freisetzung von A β Protein (Sennvik K et al., 2004). Bei der γ -Sekretase handelt es sich um einen Komplex, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit und drei Kofaktoren - Nicastrin (NCSTN), Anterior Pharynx Defective 1 (APH1A und APH1B) und Presenilin Enhancer (PEN2) (Verdile G et al., 2004). Die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase ist Presenilin 1 (PS1) oder Presenilin 2 (PS2). Die variierende Länge des A β -Proteins entsteht durch die unterschiedlichen γ -Sekretasen-Schnittstellen (Qi-Takahara Y et al., 2005).

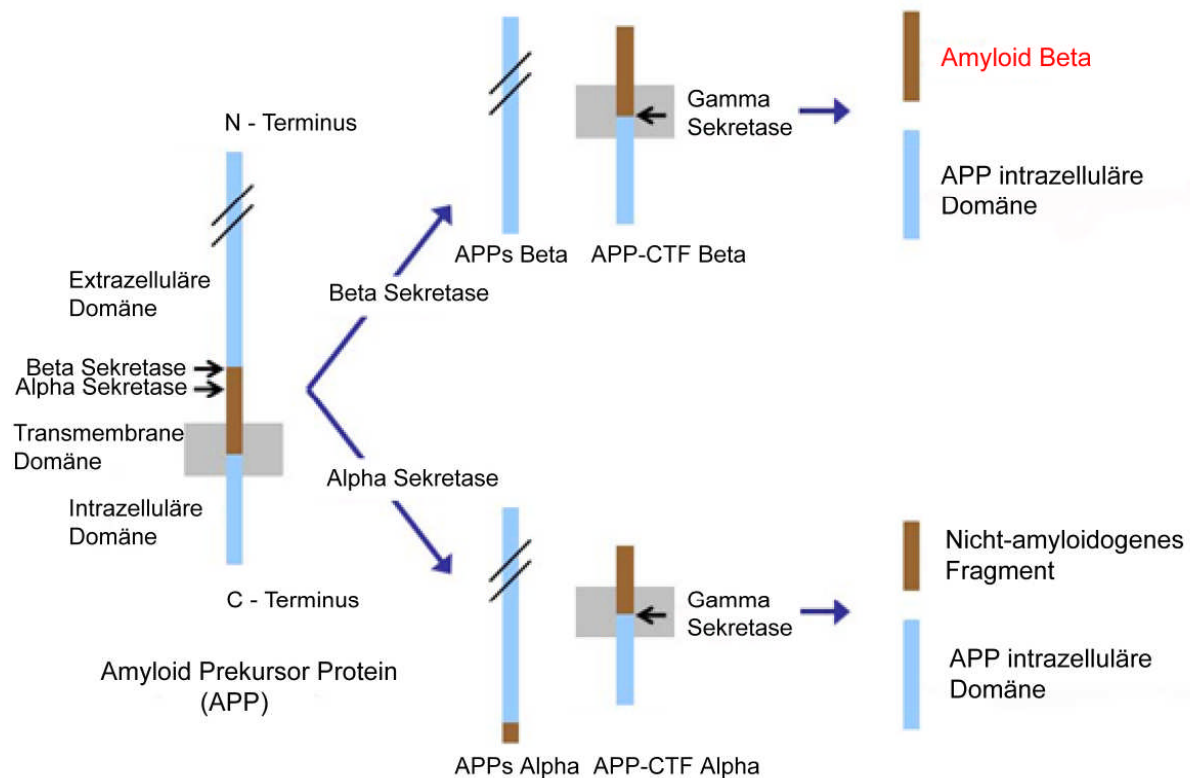


Abb. 1.2.: Zwei Möglichkeiten der proteolytischen Spaltung des APP: Der oben beschriebene amyloide Weg führt durch die β - und γ - Sekretaseaktivität zur A β Freisetzung und ermöglicht damit die Plaquesenstehung. Der nicht-amyloide (physiologische) Weg ist durch die enzymatische Aktivität der α -Sekretase charakterisiert, die das APP mitten in der A β Protein-Sequenz schneidet (Postina R et al., 2004) und dadurch die lösliche carboxyl-truncated Form des APPs (APPs α) und APP C-Terminal Fragment α (APP-CTF α) freisetzt. In dem nächsten Schritt wird APP-CTF α durch die γ -Sekretase gespalten und ein nicht-amyloides Fragment freigesetzt. Als α -Sekretase-Kandidatengene wurden *ADAM 10*, *ADAM 17* und *MDC9* diskutiert (Postina R et al., 2004; Verdile G. et al, 2004). Der nicht-amyloide Weg ist auch durch die Phosphorylierung mittels Protein Kinase C (PKC) möglich (Verdile G et al., 2004). (Modifiziert nach Zheng H et Koo EH, 2006).

Die Länge des A β -Proteins ist für dessen Aggregationsverhalten von besonderer Wichtigkeit, da mit zunehmender Länge die Selbstaggregation des Proteins und somit die Amyloidizität zunimmt. Lösliche A β Proteine sind 39 bis 40 Aminosäurereste lang und

können auch bei gesunden Individuen im Blutplasma und Liquor nachgewiesen werden. Diese Form ist erst an der späteren Krankheitsphase beteiligt (Verdile G et al., 2004). Proteine der Länge 41-43 Aminosäurereste (A β 41-43) sind hingegen unlöslich und interagieren aufgrund ihrer β -Faltblattstruktur mit sich selbst, bzw. aggregieren sofort. Im geringeren Maß sind diese Proteine auch bei gesunden Individuen präsent. Sie bilden miteinander nicht bzw. nur schwer lösliche Oligomere, so genannte neuritische Plaques. Die neuritischen Plaques sind durch einen dichten Amyloidkern gekennzeichnet und können eine Größe von bis zu 0,2 mm erreichen. Neben dem A β treten in den Plaques Apolipoprotein (APO) E und J, α 1-Antichymotrypsin und Proteoglycane auf (Dickson DW, 1997). Bilden sich verstärkt Plaques zwischen den Neurozellen, können diese nicht mehr kommunizieren. Amyloid lagert sich nicht ausschließlich in Form der Plaques ab, sondern bei fast allen Alzheimer-Patienten auch perivaskulär (kongophile Angiopathie, zerebro-vaskuläre Amyloidose) (Förstl H et al., 2000; Davis J, Wagner MR et al., 2003). In diesem Fall kommt es zu einer verminderten Sauerstoff- und Energieversorgung betroffener Gehirnbereiche, die mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium Hirnblutungen und Schlaganfälle verursachen können (Davis J, Wagner MR et al., 2003; Melchor JP et al., 2003). Durch die pathologische A β Ablagerung entsteht ein räumlich begrenzter Entzündungsbereich, was die Ablagerung weiterer Proteine begünstigt (Combs CK et al., 2001).

Das zweite histopathologische AD-Merkmal sind die Alzheimer-Fibrillen, bzw. neurofibrilläre Tangles (NFT). Diese bestehen meistens aus nicht ausgebreiteten, paarigen Filamenten (Paired Helical Filaments; PHF). Seltener findet man NFTs, die aus PHF und SF (straight filament), oder nur aus SF, zusammengesetzt sind. Sowohl die PHF, als auch die SF stören die vitale Funktion der Neuronen (Garcia T et al., 2004; Rissman RA et al., 2004). Obwohl sich die NFTs innerhalb der neuronalen Zellen bilden, können auch extrazelluläre Tangles gefunden werden. Diese bleiben scheinbar als Reste nach dem Zelltod zurück (Lovestone S, 1997). Der Hauptbestandteil der NFTs ist das hyperphosphorylierte und hyperglykosilierte Protein Tau (Rissman RA et al., 2004; Garcia T et al., 2004; Gong CX et al., 2004). Zur Hyperphosphorylierung des Taus kommt es durch die gestörte Balance zwischen Kinasen und Phosphatasen (Rissman RA et al., 2004). Durch eine übermäßige Phosphorylierung löst sich dieses Protein von Tubulin im Mikrotubuli ab und damit wird die Zytoskelettstabilisierung (Hartmann AP et al., 2004; Lovestone S et al., 1999), sowie den axonalen Transport (Garcia T et al., 2004) verhindert. Freigesetztes hyperphosphoryliertes Tau aggregiert wegen seiner niedrigen Löslichkeit und bildet die NFTs, bzw. PHFs. Tau wird teilweise auch nach der NFTs-Bildung phosphoryliert (Lovestone S et al., 1997). Diese

pathologischen Veränderungen tragen zum Zelltod bei. Neben Phospho-Tau, findet man in NFTs auch Ubiquitin (Rissman RA et al., 2004) und APOE. Diese werden in der Hülle der NFTs abgelagert. Erhöhte Phospho-Tau-Spiegel und NFTs werden auch bei Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Frontallappendemenz, vaskulärer Demenz, Creutzfeld-Jakob-Erkrankung, HIV-Demenz, Normaldruck-Hydrozephalus, Meningoenzephalitis, Lewy-Body-Erkrankung und kortikobasaler Degeneration) nachgewiesen (Buee L et al., 2000). Demzufolge ist Phospho-Tau als spezifischer diagnostischer AD - Marker nicht geeignet, sondern nur im Zusammenhang mit anderen Markern von diagnostischer Bedeutung (Sergeant N et al., 2005).

Sowohl extra-, als auch intrazelluläre pathologische Ablagerungen führen zum Verlust der Hirnsubstanz (Hirnatrophie) und ihre Dichte korreliert stark mit dem Schweregrad der Krankheit (Bauer J et al., 1995). Im Vergleich zu gleichaltrigen Gesunden ist das Gehirngewicht von Alzheimer-Patienten wesentlich geringer, wobei die Hirnbereiche aber nicht gleichermaßen betroffen sind. Insbesondere tritt ein Abbau der Großhirnrinde auf, hauptsächlich jedoch die der Parietal-, Temporal- und Frontal- Lappen sowie der Hippocampusformation (Pantel J et al., 2004; Smith AD et Jobst KA, 1996; Nagy Z et al., 1999; De Leon MJ et al., 1997). Durch das Absterben der Neuronen wird der Materialtransport in die gesunden Zellen gehemmt und Signalübertragung durch Neurotransmitter vermindert. Der Mangel an Acetylcholin ist die deutlichste, aber nicht die einzige Neurotransmitterveränderung bei AD. Er führt zu den Gedächtnis-, Konzentrations- und Aufmerksamkeitsstörungen (Grossberg GT, 2005). In geringerem Maß sind auch die Konzentrationen von Glutamat, Noradrenalin, Serotonin und mehreren Neuropeptiden reduziert (Whitehouse PJ, 1987).

1.2. Risikofaktoren für die Alzheimer Krankheit

AD ist eine komplexe, also multifaktorielle Krankheit; d.h. sie ist sowohl von lebensstil-, bzw. umweltabhängigen als auch von genetischen Determinanten beeinflusst. Der am häufigsten diskutierte Risikofaktor für AD ist das Lebensalter, mit dem die Prävalenz exponentiell ansteigt (Bassiony MM et al., 2004). Schätzungen zufolge sind in den westlichen Ländern ca. 20% der Bevölkerung über 80 Jahren davon betroffen (Rösler N et al., 2002; Letenneur L et al., 2004).

Nach Geschlechtern aufgeschlüsselt liegt die Prävalenz für die LOAD Subform bei Frauen höher als bei Männern (Colucci M et al., 2006). Gründe dafür sind der gesunkene

Östrogenlevel, bzw. Östrogenmangel während und nach der Menopause (Candore G et al., 2007; Balistreri CR et al., 2006) und eine durchschnittlich längere Lebensdauer der Frauen (Corder EH et al., 2004).

1.2.1. Lebensstil- und umweltabhängige Risikofaktoren

Als wichtige Krankheitsauslöser wurden Schädel-Hirn-Traumata, Hypercholesterinämie, sowie psychische Erkrankungen diskutiert (Reid PC et al., 2007; Grossman H et al., 2006). Auch komplexe, systemische Krankheiten wie Diabetes mellitus (Xu WL et al., 2004; Gasparini L et al., 2002) und Hyperinsulinaemia (Luchsinger JA et al., 2004) wurden in mehreren Studien als starke AD-Risikofaktoren nachgewiesen. Weiterhin zeigten Itzhaki RF und Mitarbeiter (2004), dass Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) bei APOE4-Trägern einen Beitrag zur Entwicklung von AD leistet.

Der Ausbildungsgrad (Colucci M et al., 2006; Karp A et al., 2003) wurde oft in Alzheimer Studien diskutiert, da größere kognitive Reserven und eine lebenslange geistige Aktivität anscheinend das Auftreten einer Demenz zu verzögern scheinen (Smyth KA et al., 2004; Qiu C et al., 2003; Stern Y et al., 1994).

In vielen Studien wurde die Assoziation zwischen Rauchen und AD untersucht. Im Gegenteil zu einigen wenigen Fall-Kontroll-Studien, in denen Rauchen als Schutzfaktor bestätigt wurde (Hellström-Lindahl E et al., 2003; van Duijn CM et al., 1991), ist in den meisten Kohortenstudien allerdings ein negativer Einfluss festgestellt worden (Juan D et al., 2004; Ott A et al., 2004).

Der Einfluss von Alkoholkonsum wurde ebenfalls in zahlreichen Studien untersucht. Eine geringe Alkoholdosis schützt offensichtlich vor AD (Letteneur L et al., 2003; Ruitenbergh A et al., Truelsen T et al., 2002), wohingegen häufiger Alkoholkonsum das Erkrankungsrisiko erhöht (Luchsinger JA et al., 2004).

Als Auslöser der Plaques- und Tangles- Ablagerung werden auch redox-aktive Metallionen, vor allem Aluminium (Becaria A et al., 2002), Kupfer (Rottkamp CA et al., 2000; Perry G et al., 2002) und Eisen (Rottkamp CA et al., 2000; Perry G et al., 2002) diskutiert.

Obgleich die oben genannten lebensstil- und umweltabhängigen Risikofaktoren für den Ausbruch von AD konsistent nachgewiesen werden konnten, ist die daraus ableitbare Erkrankungsvorhersage nicht sehr hoch.

1.2.2. Genetische Risikofaktoren

Die steigende Prävalenz von AD ist in erster Linie auf die zunehmende Lebenserwartung zurückzuführen. Obwohl der Lebensstil und die Umweltbedingungen die Lebensqualität und damit die Entwicklung und den Verlauf der Krankheit beeinflussen, ist die Wahrscheinlichkeit an AD zu erkranken nicht nur mit diesen Faktoren erklärbar. Wahrscheinlicher ist, dass AD aufgrund einer Interaktion verschiedener genetischen Faktoren mit unterschiedlichen Umweltfaktoren auftritt (Huang W et al., 2004).

Einen starken Hinweis auf den Einfluss von Erbfaktoren liefern zahlreiche genetisch-epidemiologische Studien. Autosomal-dominante Mutationen in *Presenilin 1 (PS1)* auf dem Chromosom 14, *Presenilin 2 (PS2)* auf dem Chromosom 1 und *Amyloid Precursor Protein (APP)* auf dem Chromosom 21 führen zu einer erhöhten Freisetzung von A β 42 (Ozturk A et al., 2007) und einem früheren Beginn der Symptome der Alzheimer Krankheit (Rebeck GW et al., 2006, Kowalska A et al., 2004; Zekanowski C et al., 2004). Die Mutationen in den oben genannten Genen sind für die meisten EOAD-Fälle verantwortlich. Insgesamt gibt es nur einige hundert Familien weltweit, die diese Mutationen tragen.

Der einzige bisher bestätigte genetische Risikofaktor an LOAD zu erkranken, ist das ϵ 4 Allel des *APOE* Gens (Zekanowski C et al., 2004; Rademakers R et al., 2003). Das *APOE* Gen liegt auf Chromosom 19 und kommt in drei allelischen Varianten vor. Diese werden als ϵ 2, ϵ 3 und ϵ 4 bezeichnet (Mahley RW et Rall SC Jr., 2000). Die Vererbung von einem bzw. zwei ϵ 4 Allelen erhöht in dosisabhängiger Weise das Risiko, an die Alzheimer Krankheit zu erkranken und vermindert zudem das Erkrankungsalter (Age of Onset) (Olarte L et al., 2006). Das ϵ 4 Allel führt bei Heterozygotie zu einem dreifachen, bzw. bei Homozygotie zu einem 10fachen Erkrankungsrisiko (Förstl H et al., 2000). Heterozygote Patienten mit einer Kopie des ϵ 4 Allels, erkranken durchschnittlich 4 Jahre früher und homozygote Patienten mit zwei Kopien des Risikoallels 6-8 Jahre früher als Patienten, bei denen das ϵ 4 Allel nicht vorhanden ist (Daw EW et al., 2000).

1.3. Genomweite Suchen nach genetischen Risikofaktoren

Erste Informationen über krankheitsbezogene chromosomale Regionen liefern genomweite Kopplungs- und Assoziationsstudien. Vorteil solcher genomweiten Analysen ist,

dass hierfür vorab keine hypothetischen Annahmen bezüglich der Pathophysiologie der Erkrankung nötig sind.

In Kopplungsanalysen werden genetische Marker, die über das gesamte Genom regelmäßig verteilt sind, innerhalb betroffener Familien bestimmt und genotypisiert. Als Marker dienen hier Mikrosatelliten. Anschließend wird die gemeinsame Vererbung der Markerallele in Familien untersucht. Ein gehäuftes gemeinsames Auftreten der Krankheit und Markerallele weist auf eine Kopplung hin. Dieser Ansatz ermöglicht die Identifizierung chromosomaler Regionen (so genannte Kopplungsregionen), welche mit der Krankheit zusammen vererbt werden. Im nächsten Schritt, der so genannten Feinkartierung, werden die in der Kopplungsregion lokalisierten und im Hinblick auf eine wahrscheinliche Krankheitsbeteiligung ausgesuchten Gene analysiert (de la Chapelle et al., 1998; Bleck O et al., 2001). Diese werden als positionelle Kandidatengene bezeichnet. Bei komplexen Erkrankungen mit spätem Beginn können häufig die Eltern nicht mehr am Markerlocus typisiert werden. Aus diesem Grund wird hier die Kopplungsanalyse bei Geschwisterpaaren durchgeführt. Die ersten signifikanten Kopplungsbefunde bei EOAD-Familien wurden in chromosomweiten Studien für die chromosomalen Regionen Ch1q31-42 (Levy-Lahad E et al., 1995), Ch14q24.3 (Cruts M et al, 1995; Nechiporuk A et al., 1993) und Ch21q21 (Goate AM et al, 1989) berichtet. Genomweite Kopplungsstudien für LOAD wiesen auf mehreren chromosomalen Regionen (Chromosomen: 1, 3, 5, 6, 9, 10, 12, 19, 21 und x) hin (Myers A. et al., 2002; Lee HJ et al., 2006). Die höchsten LOD (logarithm of the odds) -Scores, als Maß der Wahrscheinlichkeit der Kopplung von bestimmten Markern und dem Auftreten der Krankheit, sind für Chromosomen 9, 10, 12 und 19 erzielt worden (Myers A et al., 2002; Kehoe P et al., 1999; Pericak-Vance MA et al., 1998; Blacker D et al., 2003).

Die aktuellste genetische Untersuchungsmethode stellen die genomweiten Assoziationsstudien dar. Hierfür werden ca. 500000 SNP Marker bei einer sehr großen Anzahl von Probanden (>1000) parallel auf einem Microarray-Chip genotypisiert und anschließend auf eine Assoziation mit der Krankheit getestet. Genomweite Assoziationsstudien werden in einem dreistufigen Design durchgeführt. In der ersten Phase (Screeningphase) werden die ausgewählten SNPs analysiert und die Genotypisierungsdaten statistisch ausgewertet. Signifikant assoziierte SNPs werden anschließend in unabhängigen Kohorten genotypisiert und validiert (zweite Phase). In der dritten Phase wird die Feinkartierung durchgeführt (Pearson JV et al., 2007). In bisher durchgeführten genomweiten Assoziationsanalysen wurde APOE Locus auf Chromosom 19 als der wichtigste genetische Risikofaktor für LOAD bestätigt (Li H et al., 2008; Coon KD et al., 2007; Reiman A et al.,

2007). Eine Assoziation mit AD wurde u.a. auch für die Marker auf den Chromosomen 9 und 10 nachgewiesen (Li H et al, 2008, Gruppe A et al. 2007). Hier wurden *GOLPH2*, *EBF3* und *SORCSI* als positionelle Kandidatengene identifiziert. Genomweite Assoziationsstudien für EOAD wurden bisher nicht durchgeführt.

1.4. Kandidatengene für Alzheimer Krankheit

Nachdem die genomweiten Studien auf eine Kopplung zwischen AD und den chromosomalen Regionen 10q22-q24 (Myers A et al., 2002; Liu F et al., 2007; Blacker D et al., 2003) und 12p13-q13 (Scott WK et al., 2000), bzw. 12p (Mayeux R et al., 2002) hingewiesen haben, wurden die dort lokalisierten Kandidatenge genauer untersucht. Bevorzugt analysiert wurden die Gene, deren Veränderungen nach heutigem Verständnis neuropathologische Prozesse und somit AD auslösen oder deren Verlauf beeinflussen können.

1.4.1. Kandidatengene auf dem Chromosom 10

Die in der chromosomalen Region 10q22-q24 lokalisierten positionellen und funktionellen Kandidatengene *IDE* (Björk BF et al., 2007), *CTNNA3* (Bertram L et al., 2007), *PLAU* (Finckh U et al., 2003), *CHAT* (Ozturk A et al., 2006) und *LRRTM3* (Majercak J et al., 2006), *TNFRSF6* (Feuk L et al., 2003; Su JH et al., 2003) etc. wurden in mehreren AD-Studien diskutiert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Assoziationsstudien wurden auf das *PLAU* und dessen benachbarten Gene fokussiert.

1.4.1.1. Plasminogen activator, urinary (PLAU, uPA)

Der Urokinase-type Plasmin Aktivator (PLAU, uPA) (Gen: *PLAU*, *uPA*) ist eine Serinprotease, die in einer Vielzahl maligner und normaler Zellen als einkettiges und enzymatisch inaktives Protein pro-PLAU exprimiert wird (Selkoe DJ, 2001; Schmitt M et al., 1991). Durch die proteolytische Spaltung wird diese inaktive Form zum zweikettigen, enzymatisch aktiven PLAU gespalten (Tucker HM et al., 2000). Die Umwandlung in PLAU ermöglichen u.a. Plasmin, Trypsin, Kallikrein und Kathepsin (Schmitt M et al., 1991, Alfano D et al., 2005). Das freigesetzte PLAU bindet sich an seinen Rezeptor PLAUR auf der

Zelloberfläche und aktiviert damit die Spaltung des Plasminogens (Abb. 1.3.), eines inaktiven Vorläufers des Plasmins (Davis J et al., 2003). Die Aktivität des PLAU/PLAUR Systems wird durch seine Inhibitoren PAI1 und PAI2 gesteuert (Tucker HM et al., 2000). Die entstehende Serinprotease Plasmin hat ein sehr breites Aktivitätsspektrum. Sie baut direkt oder indirekt über Matrixmetalloproteasen und Elastase die meisten extrazellulären Matrixproteine ab (Alfano D et al., 2005; Garcia-Touchard A et al., 2005). Damit werden sowohl verschiedene physiologischen Wachstums- und Modifikationsprozesse, als auch Metastasierung der Tumorzellen ermöglicht (Reuning U et al., 2003; Zhu M et al., 2007). Plasmin wurde als erste bei AD-Patienten relevante physiologische Protease identifiziert, die aggregiertes A β abbaut (Finckh U et al., 2003). *In vivo* und *in vitro* wurde nachgewiesen, dass das aggregierte A β die Expression von PLAU induziert (Tucker HM et al., 2000). Dieses aktiviert wiederum die Plasminogenkaskade und inhibiert damit die, durch das A β verursachte, Neurotoxizität (Tucker HM et al., 2000). Bei AD-Patienten wurde eine signifikant erhöhte PLAU Expression nachgewiesen (Alonso DF et al., 1996). Auch die Inhibitoren des PLAU/PLAUR Systems sind bei diesen Patienten verstärkt exprimiert (Melchor JP et al., 2003; Akiyama H et al. 1993).

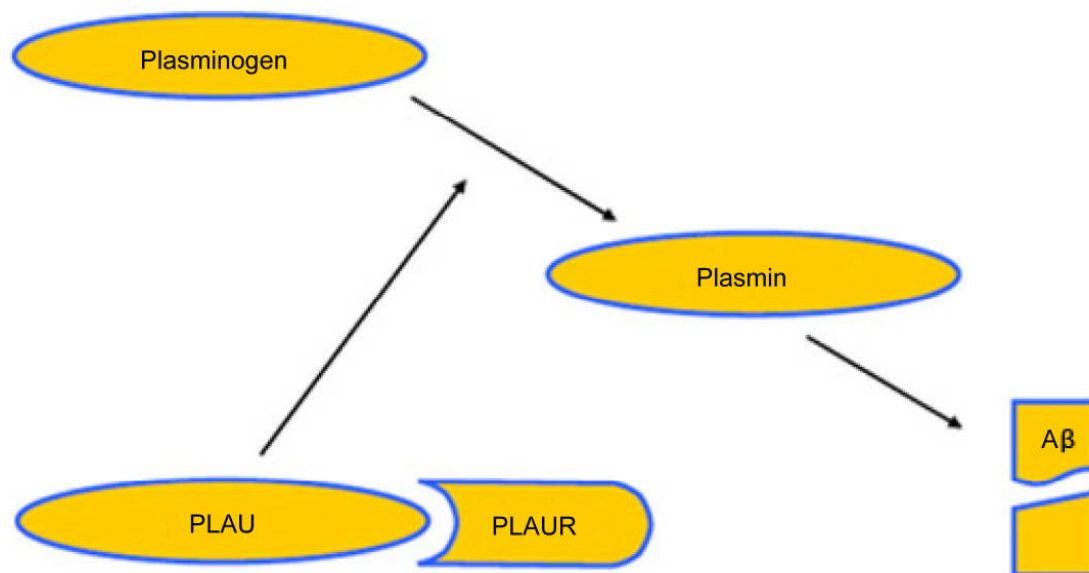


Abb. 1.3.: Vereinfachte Darstellung der A β Degradation: Durch die Bindung des PLAU Proteins an seinen Rezeptor PLAUR wird die Spaltung des Plasminogens aktiviert. Dabei entsteht die Serinprotease Plasmin, welche in der Degradation der A β -Plaques aktiv involviert ist.

Neben seiner proteolytischen Aktivität, aktiviert das PLAU/PLAUR System die mitotischen Signalwege der Zelle (Zhang G et al., 2004). Außerdem werden durch PLAU mehrere Wachstumsfaktoren aktiviert und freigesetzt (Alfano D et al., 2005).

1.4.1.2. Calcium/Calmodulin regulierte Kinase II (CaMK2)

Calcium/Calmodulin regulierte Kinase II (CaMK2) gehört neben der Calcium/Calmodulin regulierte Kinase I und IV zur Serin-Threonin Kinasen-Familie. Serin-Threonin Kinasen übertragen das γ -Phosphat eines Adenosin- oder Guanosintriphosphats auf die Hydroxyl-Gruppe der Seitenketten von Serinen und Threoninen. Zusammen mit Phosphatasen regulieren diese die Synthese, bzw. die Freisetzung von Neurotransmittern und damit die Kommunikation der Zellen untereinander, die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der prä- und postsynaptischen Proteinen, die Aktivität der Ionkanälen, den Auf-, bzw. Abbau und die Stabilität des Zytoskeletts, die Gentranskription, Zellproliferation und den Stoffwechsel (Hunter T, 1995; Alto N et al., 2002; Shimazaki A et al., 2006; Harris JK, De Lorenzo RJ, 1987). CaMK2 ist eine dominante Kinase im mammalian Hirn (Fujishiro Domai H, 2006). Diese kommt am häufigsten im Hippocampus vor und ist ein Bestandteil sowohl präsynaptischer, als auch postsynaptischer Neuronen. Die höchste Konzentration der CaMK2 ist in post synaptic density (PSD), einem Proteinkomplex in der Postsynapse (Hudmon A et al., 2002; Petersen JD et al., 2003) nachgewiesen worden. Hier reguliert sie die synaptische Funktion und Plastizität und übernimmt die primäre Rolle bei der Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP), einer Basis für das Gedächtnis und Lernvorgänge (Hudmon A et al., 2002).

CaMK2 wird durch einen transienten Ca^{2+} -Einstrom in das Neuron aktiviert (Abb. 1.4.). Dieser erfolgt primär über NMDA Rezeptoren, die durch die Bindung mit präsynaptisch freigesetztem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat und gleichzeitige partielle Depolarisation durch die AMPA Rezeptoren geöffnet werden (Montgomery JM et al., 2005; Hayer A et Bhalla US, 2005). Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration löst eine Signaltransduktionskaskade aus, die zur LTP Induktion führt (Shen K et al., 2000; Lisman J, 2003; Glazewski S et al., 2000). Der erste intrazelluläre Rezeptor der Ca^{2+} Ionen ist Calmodulin (CaM). Dieser wird durch die Bindung von vier Ca-Ionen in einen aktiven Zustand versetzt. Der Komplex $\text{Ca}^{2+} / \text{CaM}$ interagiert u.a. mit CaMK2* (Colbran RJ et al., 1988), was zu einer reversiblen Autophosphorylierung der Kinase am Threoninrest (Thr286, bzw. Thr287 – abhängig vom CaMK2 Isomer) führt. Aufgrund einer kontinuierlichen

Autophosphorylierung kann CaMK2 nach Reduzierung der Ca^{2+} Konzentration auf Basalniveau ihre Aktivität unabhängig vom Ca^{2+} /CaM Komplex behalten (Glazewski S et al., 2000). Während der starken synaptischen Aktivität transloziert CaMK2 vom Zytoplasma zum PSD und bindet an NMDA Rezeptoren (Lisman J, 2003). Im PSD wurden mehrere Proteine, u.a. NMDA- und AMPA- Rezeptoren identifiziert, die durch diese Kinase phosphoryliert werden (Shen K et al., 2000). Die Phosphorylierung des AMPA Rezeptors erhöht damit ihre Sensitivität gegenüber Glutamat. Dieses ermöglicht einen starken Na^+ -Einstrom und einen schwachen K^+ -Ausstrom, der zu einer starken und schnellen Depolarisation der Zelle führt. So wird die Zelle für den ankommenden Impuls sensibler, was wiederum einen Einstrom der Ca^{2+} -Ionen durch die NMDA Rezeptoren zur Folge hat (Fitzsimonds RM et Poo MM, 1998; Goda Y et Stevens CF, 1996). Gleichzeitig fördert CaMK2 den Transport der zusätzlichen AMPA Rezeptoren aus Vesikeln und ihre Insertion in die Zellmembran (Hayer A et Bhalla US, 2005). Eine Bindung der CaMK2 an die NR2B Untereinheit der NMDA Rezeptoren resultiert in einer Verringerung ihrer Empfindlichkeit (Sessoms-Sikes S et al., 2004; Colbran JR, 2004).

Der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und die daraus folgende CaMK2 Aktivität sind essentiell für verschiedene komplexe molekulare Veränderungen, die zur Langzeitpotenzierung der synaptischen Übertragung führen (Huang EP, 1998).

* CaMK2 ist ein Holoenzym, zusammengesetzt aus 12 funktionellen Untereinheiten, die zwei Clusters formen (Gaertner T et al., 2004). Jede Untereinheit besitzt je eine katalytische, eine regulatorische und eine assoziative Domäne. Die Bindung des Ca^{2+} / CaM Komplexes an das CaMK2 führt zu einer Autophosphorylierung des Threoninrestes (Thr287 / Thr287). Darüber hinaus wird CaMK2 in einen partiell aktiven, von dem Ca^{2+} / CaM Komplex unabhängigen Zustand, versetzt. Die aktivierten Monomere innerhalb eines Holoenzym phosphorylieren die benachbarten Untereinheiten, so dass bei diesen die Affinität zum Ca^{2+} / CaM Komplex steigt. Durch die Autophosphorylierung und Ca^{2+} / CaM Aktivierung wird die volle Aktivität der Kinase erreicht (Rosenberg OS et al., 2005).

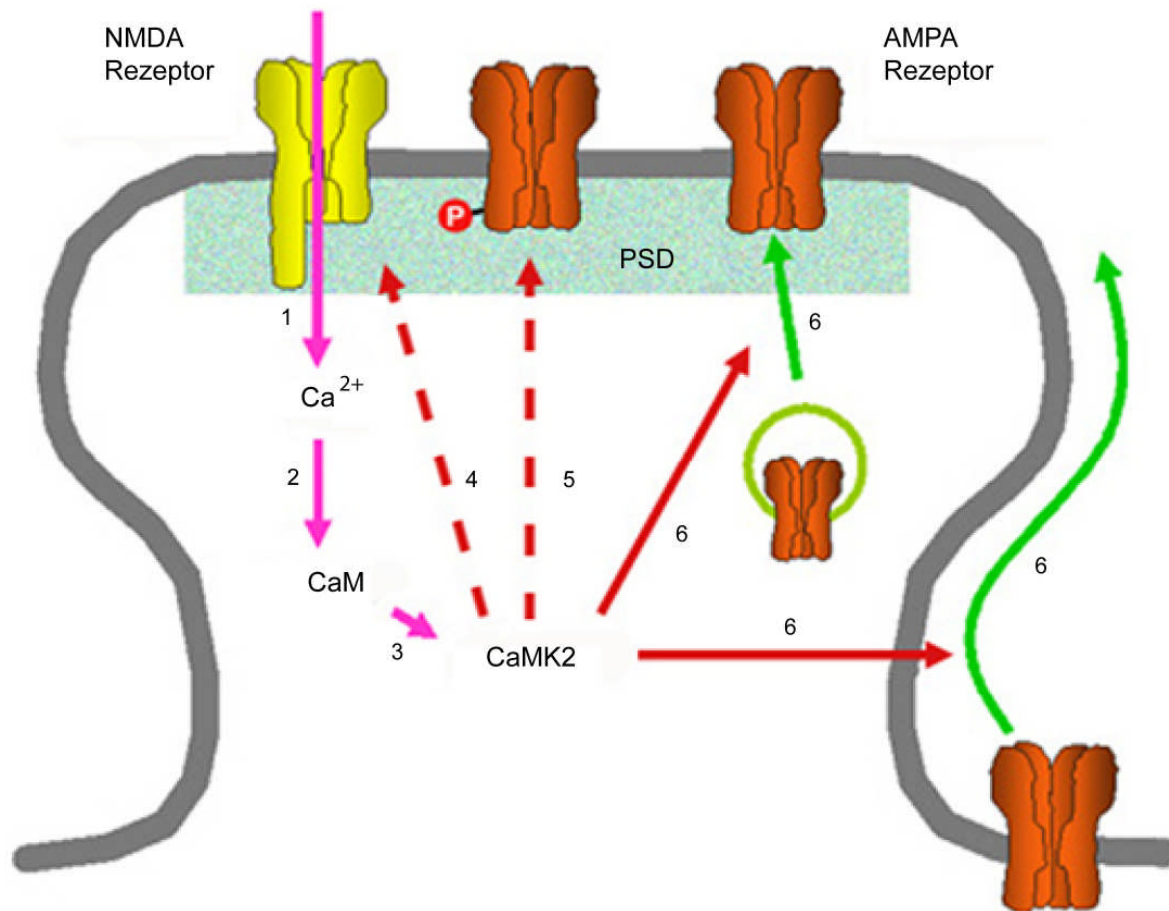


Abb. 1.4.: Aktivität der CaMK2 während der Langzeitpotenzierung in Post Synaptic Density (PSD): Durch die Bindung des Glutamats an den NMDA Rezeptor löst sich Mg^{2+} von seiner Bindungsstelle innerhalb des NMDA-Rezeptors und ermöglicht damit den Ca^{2+} Einstrom (1) in die postsynaptische Zelle. Ca^{2+} ist ein intrazellulärer Botenstoff, der Calcium-bindendes regulatorisches Protein Calmodulin (CaM) aktiviert (2). CaM, geladen mit vier Ca^{2+} Ionen, bindet an CaMK2 (3). Dieses führt zur Autophosphorylierung der Kinase, was zur Folge eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivität hat. Auf diese Weise aktivierte CaMK2 phosphoryliert weiterhin NMDA (4), bzw. AMPA (5) Rezeptoren und ermöglicht den Einbau der AMPA Rezeptoren in die Membrane des postsynaptischen Neurons (6). Somit spielt die CaMK2 die zentrale Rolle bei der Depolarisierung der postsynaptischen Membrane und stellt das Schlüsselmolekül in der Langzeitpotenzierung dar (Modifiziert nach Tomita S et al., 2005; Malenka RC et Nicoll RA, 1999).

Eine Dysregulation der Ca-Homöostase stellt eine der wichtigsten Veränderungen bei der Alzheimer Krankheit dar. Im Vergleich zu gesunden Probanden wurde bei AD-Betroffenen eine signifikant niedrigere intrazelluläre Ca-Konzentration nachgewiesen (Ripova D et al., 2003). Auch bei der Tau-Phosphorylierung spielt CaMK2 eine entscheidende Rolle. Tau kann von verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden (Hong M et al., 1997; Munoz-Montano JR et al., 1997), jedoch nur die Phosphorylierung durch CaMK2 zeigt eine AD-spezifische Veränderung der neurofibrillären Tangles in der elektrophoretischen Beweglichkeit (Steiner B et al., 1990).

CaMK2 ist in vier Isoformen, bezeichnet als α (Gen: *CaMK2 α*), β (Gen: *CaMK2 β*), γ (Gen: *CaMK2 γ*) und δ (Gen: *CaMK2 δ*), vorhanden. Diese sind durch vier eng verwandte Gene kodiert. Weitere insgesamt 24 Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen jedes dieser Gene (Shimazaki A et al., 2006; Hook SS and Means AR, 2001). Hinsichtlich ihrer Lokalisation gibt es deutliche Unterschiede zwischen den genannten CaMK2 Isoformen. Die Distribution der α und β Isoformen ist auf die neuronalen Zellen begrenzt, CaMK2 γ und δ sind dagegen ubiquitär präsent (Shimazaki A et al., 2006; Gaertner TR et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die durchgeführten Assoziationsstudien auf *CaMK2 γ* fokussiert. Dieses Gen liegt in der Kopplungsregion auf dem Chr. 10 (Myers A et al., 2002; Morgan AR et al., 2007), in unmittelbarer Nähe vom *PLAU*.

1.4.1.3. Vinculin (VCL)

Vinculin (Gen: *VCL*), ein ubiquitäres Strukturprotein (Vasile VC et al., 2006), besteht aus einem N-terminalen Kopf und einem flexiblen C-terminalen Schwanz, die über eine Prolin-reiche Region verbunden sind (Ziegler WH et al., 2006). Seine Molekularstruktur ermöglicht ihm eine Interaktion mit zahlreichen regulatorischen und strukturellen Proteinen, negativ geladenen Phospholipiden, sowie eine intramolekulare Kopf-Schwanz Interaktion (Gilmore AP et Burrige K, 1996; Bakolitsa C et al., 2004; Chandrasekar I et al., 2005). Zusammen mit seinen Liganden Talin, α -Actinin und α -Catenin verankert Vinculin die Filamente des Actinzytoskeletts an die Zellmembran, bzw. an die Transmembranproteine Integrine und Cadherine (Izard T et al., 2004; Zemljic-Harpf AE et al., 2004). Diese vermitteln die Interaktion mit den Proteinen der extrazellulären Matrix, sowie die Bindung an Gegenrezeptoren der benachbarten Zellen (Ziegler WH et al., 2006). Die Beteiligung an der Zell-Zell, bzw. Zell-Matrix Adhäsion weist auf eine wichtige Rolle des Vinculins bei der Embryogenese, Zelldifferentiation, Zellproliferation und Zellmotilität hin (Palovuori R et Eskelinen S, 2000). In neuen Studien wurde auch deren Beitrag bei der Apoptose diskutiert (Ziegler WH et al., 2006).

Auf die Bedeutung des Vinculins für das Zentrale Nervensystem (ZNS) weisen Studien mit Tiermodellen hin. Bei Vinculin-knockout-Mäusen wurde ein Defekt bei der Neuronalentwicklung beobachtet, was zu einem Fehlschließen des Neuronalrohrs führte und damit eine letale Auswirkung auf die Embryonalentwicklung zur Folge hatte (Xu W et al., 1998). Vermutlich liegen diesen pathologischen Veränderungen das verminderte Axonal-Wachstum und daraus folgende veränderte Motilität und Adhesivität zu Grunde (Varnum-

Finney B et Reichardt LF, 1994). Im Gehirn von älteren Menschen und Patienten, die an neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer Krankheit leiden, wurde Vinculin als ein Bestandteil der Hirano Körperchen nachgewiesen (Galloway PG et al., 1987). Neben Vinculin enthalten diese stabähnlichen- seltener eiförmigen- intrazelluläre Ablagerungen auch Actin, α -Actinin, Tropomyosin, APP und Microtubuli-assoziierte Proteine (MAPs) (Maciver SK et Harrington CR, 1995). Aus der Struktur der Hirano Körperchen lässt sich vermuten, dass diese als ein pathologisches Produkt der abnormalen Organisation des Zytoskeletts entstehen (Galloway PG et al., 1987). Hirano Körperchen wurden auch im peripheren Nervensystem, sowie in Muskeln identifiziert (Maselli A et al., 2003).

1.4.1.4. AP3M1

Das mittelgroße Adaptin AP3 μ A (Gen: *AP3M1*) bildet zusammen mit zwei großen Adaptinen AP3 β A, AP δ und einem kleinen Adaptin AP3 σ den ubiquitär exprimierten heterotetrameren Adaptor Protein Komplex 3 A (AP3A) (Peden AA et al., 2002; Blumstein J et al, 2001; Nakatsu F et Ohno H, 2003). AP3A ist assoziiert mit clathrinbeschichteten Vesikeln (Clathrin-coated vesicles, CCVs) und vermittelt die Sortierung der integralen Membranproteine, sowie ihren Transport aus dem Trans-Golgi-Netz (TGN) zu den Lysosomen, bzw. Lysosomen-verwandten Organellen (Lysosomal-related organells, LROs) (Dell'Angelica E et al., 1998; Theos AC et al., 2005; Nakatsu F et Ohno H, 2003). Dem AP3 μ A Adaptin wurde eine essentielle Funktion bei der Erkennung des Sortierungssignals beim Proteintransport zugesprochen (Nakatsu F et Ohno H, 2003).

Mutationen in adaptinkodierenden Genen führen zur Fehlsortierung der betroffenen Membranproteine und damit zu einer Beeinträchtigung der Funktion der Zielkompartimente. Beim Menschen wurde das AP3 β A-kodierende Gen am häufigsten untersucht. Mutationen in diesem Gen verursachen das Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2, eine Krankheit die durch eine verminderte Vesikelbildung, bzw. die Störung des vesikulären Transports, Fehlpigmentierung, Thrombozytenaggregationsstörung mit einer Blutungsneigung und rekurrenten Infektionen gekennzeichnet ist (Huizing M et Gahl WA, 2002). Änderungen in der AP3A Struktur, die aufgrund von Mutationen in dem *AP3M1* Gen entstehen könnten, sind noch nicht völlig aufgeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde *AP3M1* ausschließlich aufgrund seiner Lokalisation in einer Kopplungsregion ausgewählt und anschließend auf eine Assoziation mit AD getestet.

1.4.2. Kandidatengen auf dem Chromosom 12

Auf dem Chromosom 12 wurde eine 140 kb-breite Region von 12p13 bis 12q13 mit zahlreichen Genen mit AD in Verbindung gebracht (Schellenberg GD et al., 2000; Li Y et al., 2004, Rogaeva E et al., 1998). Die am häufigsten diskutierten Gene in dieser Region sind *LRP1* (Bian L et al., 2005), *GAPD* (Li Y et al., 2004; Lin PI et al., 2006), *A2M* (Blacker D et al., 1998), *FLJ20436* (Lin PI et al., 2006), *CP2* (Bertram L et al., 2005) und *OLR1* (Shi J et al., 2006; D'Introno A et al., 2005). Die Ergebnisse der Assoziationsstudien für die Gene *LRP1* und *A2M* waren jedoch nicht konsistent (Scott WK et al., 1998; Bertram L et al., 2000; Forero DA et al., 2006; Prince JA et al., 2001; Bian L et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Einzelbasenpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) im Gen *ST8SIA1* auf eine Assoziation mit dem AD Phänotyp getestet. Sein Produkt, das Enzym Gangliosid GD3 Synthase, vermittelt die Gangliosidsynthese und damit spielt eine wichtige Rolle für die Erhaltung der Neurozellmembranen.

1.4.2.1. ST8SIA1 (GD3)

Gangliosid GD3 Synthase (Gen: *ST8SIA1*; *GD3*) vermittelt die Übertragung der Sialinsäure auf das Monosialoganglioside GM3 und initiiert damit die Entstehung des Disialogangliosides GD3 (Melchiorri D et al., 2002; Malisan F et Testi R, 2002). GD3 ist die erste Vorstufe in der Synthese der komplexen Ganglioside der b- und c-Serie (Abb. 1.5) (Yu RK et al., 2004).

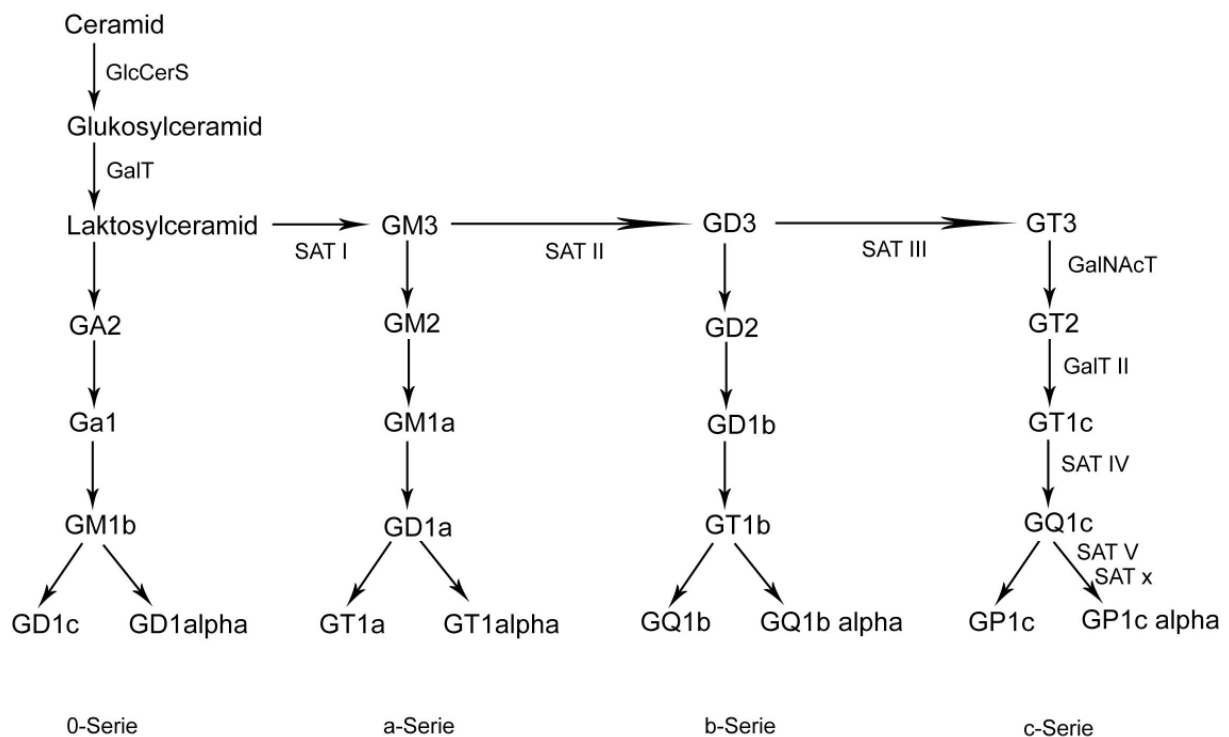


Abb. 1.5.: Der Biosyntheseweg der komplexen Ganglioside. Ganglioside sind Glykolipide deren strukturelles Grundgerüst aus einem Ceramidkörper (besteht aus Aminodialkohol Sphingosin und zwei Fettsäuren) und einem Oligosaccharid gebildet ist. Die Oligosaccharidkette enthält Glucose, Galactose, N-Acetylgalactosamin und Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure). Ihre Biosynthese fängt auf der zytosolischen Seite, wo die Übertragung des Glukoserestes auf Ceramid durch das Enzym Glukosylceramid-Synthase (GlcCerS) katalysiert wird, an. Alle weiteren Schritte werden durch die Enzyme Galaktosylceramid-Transferasen (GalT), Sialyltransferasen (SAT) und N-Acetylgalaktosamin-Transferase (GalNAcT) katalysiert und erfolgen im Lumen des Golgi-Apparates. (Modifiziert nach Malisan F et Testi R, 2002).

Ganglioside, sialylierte Glykolipide, kommen in der äußeren Schicht der Plasmamembranen eukaryontischer Zellen vor und übernehmen eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, Erkennung der Zellen untereinander, zellulären Interaktion, sowie bei Wachstums-, Differenzierungs-, Reparatur-, transmembranären Signaltransduktionsprozessen und der Apoptose (Hakomori S 1990; Okada M et al., 2001; Malisan F et Testi R, 2002). Die höchste Konzentration an Gangliosiden findet man im ZNS (Higashi H, 2007), besonders in der grauen Substanz des Gehirns. Hier gibt es eine Vielzahl verschiedener Ganglioside, deren Zusammensetzung während der Entwicklung variiert (Yu RK et al., 2004; Furukawa K et al., 2003). Ihre Bedeutung für die Funktion und den Erhalt des ZNS wurde bei den Gangliosid-defizienten Mäusen nachgewiesen. Obwohl die Plasmamembranstruktur bei genetisch

modifizierten Mäusen auf keine grobe morphologische Anomalie hindeutet, entwickeln diese neurodegenerative Störungen mit letalen Folgen (Hara-Yokoyama M, 2006).

Während der embryonalen Entwicklung ist GD3, insbesondere in Neuroprogenitorzellen, stark exprimiert. Seine Konzentration sinkt wesentlich im Endstadium der neuronalen Entwicklung und ist in post-mitotischen Neuronen gering (Copani A et al., 2002). Die Konzentration dieses Gangliosides ist ebenso in anderen entwickelten Geweben niedrig. Eine erhöhte GD3-Konzentration deutet auf diverse pathologische Prozesse wie z.B. Apoptose, Atherosclerose und verschiedene Karzinome hin (Hamamura K et al., 2005; Malisan F et Testi R, 2002; Melchiorri D et al., 2002). Auch die neurodegenerativen Störungen gehen mit Veränderungen des Gangliosidmusters einher. Bezogen auf AD sind Ganglioside die stärksten natürlichen Aktivatoren der Amyloidplaqueproduktion. Es wurde nachgewiesen, dass die Ganglioside konformative Veränderungen (α Helix \rightarrow β Sheet) in A β -Moleküle verursachen und dadurch die Entstehung der Amyloidplaque ermöglichen (Ariga T. et al., 2001). Bei AD-Patienten wurde im frontalen und parietalen Kortex eine erhöhte Konzentration der GD3 Ganglioside gefunden (Kalanj et al., 1991; Brooksbank BW et McGovern J, 1989).

Mutationen im *ST8SIA1*, die in der Über-/Unterexpression des GD3 Gangliosides, bzw. der höheren Gangliosiden der b- und c- Serie, resultieren könnten und damit evtl. Auswirkung auf das klinische AD- Erscheinungsbild hätten, sind bis heute nicht völlig aufgeklärt.

1.5. Zielsetzung

Die Alzheimer Krankheit ist die häufigste Demenzursache im fortgeschrittenen Alter. Mit steigender Prävalenz stellt diese Krankheit in den Industrieländern heute die vierthäufigste Todesursache vor. Zahlreiche Studien belegen, dass neben den externen Krankheitsauslösern (Umweltbedingungen und Lebensstil) auch die genetische Prädisposition zur Krankheitsentwicklung beitragen. In mehreren genomweiten Studien konnten u.a. Kopplungsregionen auf den Chromosomen 10 und 12 identifiziert werden (Myers A et al., 2002; Liu F et al., 2007; Scott WK et al., 2000).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Kandidatengene in den oben genannten Kopplungsregionen zu identifizieren, diese funktionell zu charakterisieren und somit einen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Grundlagen der AD Pathogenese zu leisten. Dementsprechend fokussierte sich die Auswahl der Kandidatengene auf diejenigen Gene, deren Veränderungen die Ausbildung von Krankheitsmerkmalen beeinflussen könnten. Weiteres Auswahlkriterium für die Kandidatengene war ihre chromosomale Lokalisation.

Für die ausgewählten Kandidatengene wird in öffentlichen Datenbanken nach bekannten SNPs gesucht. Diese werden anschließend mittels MALDI TOF MS in einer Fall-Kontroll Studie aus München genotypisiert und auf eine Assoziation mit AD getestet. Nachfolgend wird mittels Sequenzierungsmethode in den Assoziationsregionen nach bisher unbekanntem Polymorphismen gesucht. Die positiven Assoziationssignale werden in weiteren unabhängigen Fall-Kontroll-, sowie in einer Geschwisterpaarstudie überprüft. Die stärksten Assoziationssignale sind in dazu geeigneten funktionellen Studien zu testen.

2. Methoden

2.1. Phänotypisierung der Probanden

Alle Probanden wurden ausführlichen psychiatrischen, neurologischen, neuropsychologischen und klinischen Untersuchungen unterzogen. Diese umfassten die Prüfung der kognitiven Leistungen mittels standardisierter neuropsychologischer Tests, die Eigen- und Fremdanamnese durch eine Bezugsperson, kraniale Bildgebung (cCT oder cMRT), die Erhebung des neurologischen Befundes und ein Routinelaborprogramm (inklusive Bestimmung der Konzentration von Vitamin B12, Folsäure, Schilddrüsenparametern, der Lyme-Serologie und TPHA, etc.). Zur Diagnose einer Demenz wurden die Kriterien der ICD-10 (s. Kapitel 7.1.1.) herangezogen. Eine mögliche, bzw. wahrscheinliche AD wurde anhand der Kriterien vom National Institute of Neurological and Communicative disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorder Association (NINCDS-ADRDA) klinisch diagnostiziert (s. Kapitel 7.1.3.).

In der Kontrollgruppe befanden sich kognitiv gesunde Probanden. Diese wurden hinsichtlich Alter, Geschlecht, Ethnizität und geographischer Lage der AD-Gruppe angepasst.

2.1.1. Die neuropsychologischen Tests

Standardisierte neuropsychologische Tests stellen die differenzierteste Ebene der Befunderhebung dar. Für diese liegen Normwerte für eine Bevölkerungsstichprobe vor, so dass das Testergebnis eines potentiellen Patienten jenem von gesunden Personen gleichen Alters, Geschlechts und Bildungsniveaus gegenüber gestellt werden kann. Von den für die neuropsychologische Demenzdiagnostik speziell entwickelten Testbatterien ist besonders diejenige des Consortium for the Establishment of a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) hervorzuheben, meist als CERAD-NP bezeichnet. Mit ihr liegt ein international akzeptiertes Untersuchungsinstrument vor, das hinreichend einfach und zeitökonomisch ist (die Durchführung dauert ca. 30 bis 45 Minuten), um in der klinischen Praxis sowie in Forschungsstudien eine einheitliche Falldefinition zu gewährleisten. Die CERAD-NP besteht aus acht Untertests (Verbale Flüssigkeit, Modifizierter Boston Naming Test, Mini Mental Status Examination Test, Wortliste Gedächtnis, Konstruktive Praxis, Wortliste Abrufen, Wiedererkennen, Konstruktive Praxis Abrufen) und zielt auf die Erfassung von

Hirnleistungsstörungen, die bei der AD im Vordergrund stehen (Störungen des Gedächtnisses, der Sprache, der konstruktiven Praxis und der Orientierung).

Für die Diagnosestellung im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Probanden, wurden mittels Mini Mental Status Examination (MMSE) und Telephone Interview for Cognitive Status-modified (TICS-M) Tests analysiert.

2.1.1.1. Mini Mental Status Examination Test (MMST)

Mini Mental Status Examination Test (MMST) (Folstein MF et al., 1975) ist der verbreitetste Screening-Test zur Erfassung kognitiver Störungen. Er dient der Ergänzung der neuropsychologischen Untersuchungen und kann nicht alleine für die Diagnosestellung verschiedener Demenz-Formen herangezogen werden. MMSE enthält 30 Items, die in fünf Kategorien (Merkfähigkeit, Erinnerungsfähigkeit, Orientierung, Aufmerksamkeit und Sprache) eingeteilt sind. Jedoch ist es mit diesem Test nicht möglich die komplexen kognitiven Funktionen zu testen.

Die Auswertung des Tests erfolgt als einfache Addition der vergebenen Punkte. Kognitiv gesunde Personen erreichen Ergebnisse zwischen 24 und 30 Punkten. Bei den Patienten mit kognitiver Einschränkung werden 20 bis 23 Punkte erzielt. Bei weniger als 20 Punkten wird eine Demenz angenommen. Unter 10 Punkten spricht man von einer schweren Demenz. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass eine Abhängigkeit zwischen den erzielten Punkten und dem Bildungsstand der Testperson besteht. Bei den Probanden mit höherer Intelligenz, bzw. gut Ausgebildeten werden geringe kognitive Einschränkungen oft nicht erkannt. Bei diesen besteht bereits ab 28 Punkten der Verdacht auf eine kognitive Störung. Andererseits kommt der MMSE Test bei Personen mit mangelnder Ausbildung häufig zum falsch positiven Ergebnis (de Jager CA et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Kontrollpersonen, die weniger als 28 Punkte erzielt haben, aus der Studie ausgeschlossen (Riemenschneider M et al., 2006).

Wegen der leichten praktischen Durchführung (der Test dauert ca. 10 Minuten) wird der MMSE in vielen standardisierten Testbatterien und großen epidemiologischen Studien eingesetzt.

2.1.1.2. Telephone Interview for cognitive Status-modified (TICS-M) Test

Der Telephone Interview for cognitive Status (TICS) Test (Brandt J et al., 1988) stellt eine telefonische Version des MMST Tests dar und korreliert stark mit der schriftlichen Fragebogenversion (Jarvenpaa T et al., 2002; Jorm AF et Kortens AE, 1988). Bei der Testung der kognitiv gesunden Geschwister im Rahmen der Geschwisterpaar Studie aus München wurde eine modifizierte Version des TICS Tests (TICS-M) angewendet (persönliche Mitteilung Frau Petra Belcredi). TICS-M enthält die Fragen aus dem originalen TICS in den Bereichen Orientierung, Konzentration, Gedächtnis, Rechnen, Aufmerksamkeit, Sprache und konzeptionelles Denken. Zusätzlich zum sofortigen Abruf einer Wortliste enthält TICS-M auch einen verzögerten Abruf. Bei diesem Test werden auch das verbale Verständnis und die Praxis getestet.

Der TICS-M Test besteht aus 21 Items und dauert ca. 6 bis 8 Minuten. Bei der Auswertung wurde die Dauer der Ausbildung berücksichtigt und das Gesamtergebnis dementsprechend korrigiert. Die maximale Punktzahl beträgt 50 Punkte, wobei ein höherer Punktwert einer besseren Leistung entspricht.

2.2. Auswahl der SNPs

Der Einfluss genetischer Risikofaktoren auf die Krankheitsentwicklung wurde mittels SNP-Assoziationsanalyse getestet. Als SNP werden Variationen von einzelnen Basenpaaren in einem DNA-Strang bezeichnet, die etwa alle 200 bp und zumeist in biallelischer Form vorkommen (Rostoks N et al., 2005). Für die effiziente Durchführung einer Assoziationsstudie ist die Auswahl der SNPs entscheidend. Vorrangig wurden SNPs innerhalb kodierender/exonischer Bereiche, der Promotor- Bereiche und TFBS (Transcription Factor Binding Sites, Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen) ausgewählt. Bei der Auswahl wurden SNPs die einen Aminosäureaustausch (Missense Mutationen) hervorrufen bevorzugt. Weiterhin wurden auch intronische SNPs untersucht, da diese einen Einfluss auf transkriptionelle Aktivität oder auf das alternative Spleißen der pre-mRNA haben können. Mit einem durchschnittlichen Abstand von 50-300 bp zwischen ausgewählten exonischen, bzw. 1-5 kb zwischen intronischen SNPs wurden die Kandidatengene komplett abgedeckt.

Einen aktuellen methodischen Fortschritt bei der SNP-Auswahl stellt die LD-Mapping-Analyse dar. Innerhalb der LD-Blöcken (LD = linkage disequilibrium) liegen die SNPs in

einem starken Kopplungs-Ungleichgewicht vor. Daher genügt es hier, nur wenige der vorhandenen SNPs in jedem Block zu selektieren und anschließend zu analysieren, um den Hauptinformationsgehalt der häufig vorkommenden Haplotypen zu beschreiben. Diese SNPs werden als „haplotype-tagging SNPs“ (ht-SNPs) bezeichnet und ermöglichen die Anzahl der zu genotypisierenden Einzelbasenpolymorphismen bei der systematischen Erforschung des Genoms zu reduzieren.

Für die durchgeführte Assoziationsanalyse im Rahmen dieser Arbeit wurden die biallelischen SNPs aus öffentlichen Datenbanken (s. Kapitel 3.2.6.) ausgewählt, mittels MALDI TOF MS genotypisiert und anschließend auf eine Assoziation mit AD untersucht. Bei der SNP-Auswahl wurde darauf geachtet, dass diese in kaukasischen Bevölkerungsgruppen validiert waren und eine Minorallelfrequenz von mindestens 5% lieferten.

2.3. Die Isolation der Nukleinsäuren

2.3.1. DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte aus Vollblut mit dem Puregene Genomic DNA-Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, USA). Durch selektive Lyse und anschließende Zentrifugation wurden die zellkernlosen Erythrozyten von den restlichen Zellen mit intakten Nuklei abgetrennt. Später konnte die Lyse der kernhaltigen Zellen unter Zugabe eines DNA-Stabilisators durchgeführt werden. Des Weiteren wurden Proteine durch eine Salzfällung entfernt. Die Präzipitation der im Überstand gelösten genomischen DNA erfolgte im Anschluss durch Zugabe von 100 % Isopropanol. Die gefällte DNA wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet in 1-2 ml TE-Puffer über Nacht gelöst. Mit dieser Methode konnte aus 9-10 ml Vollblut durchschnittlich 300-400 µg genomische DNA isoliert werden, deren Aufbewahrung als Stammlösung bei 4°C in einzelnen Tubes erfolgte.

2.3.2. RNA-Isolation

Im Gegensatz zur DNA ist die RNA sehr instabil. Daher ist es bei der RNA-Isolation sehr wichtig, die stabilen RNasen möglich schnell zu trennen. Im Rahmen dieser Arbeit

wurde die RNA-Isolation aus dem Hirngewebe mittels RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D) durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Gehirngewebe in QIAzol Lysis Reagent homogenisiert. Dieses enthält Guanidiniumthiocyanat (GTC) und Phenol. Durch die Wirkung von GTC werden die Zellen lysiert und die RNA gelöst. Eine hohe GTC-Konzentration ermöglicht die selektive Präzipitation der zellulären Proteine, während die RNA gelöst bleibt. Gleichzeitig inaktiviert Phenol die RNasen. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Gemisch in drei Phasen auf. Die RNA ist in der oberen farblosen wässrigen Phase enthalten und die genomische DNA in der unteren rötlichen organischen Phase. Die denaturierten Proteine bilden eine unlösliche Interphase. Die in der wässrigen Phase enthaltene RNA wird durch die Zugabe von Isopropanol gefällt und auf die Membrane der Mini Spin Column gebunden. Durch anschließendes Waschen mit 75%-igem Ethanol werden Salz- und Isopropanolreste entfernt. Isolierte RNA wurde in Nuclease-freiem Wasser gelöst und in einzelnen Tubes bei -80°C aufbewahrt.

2.4. Konzentrationsbestimmung genomischer DNA- und RNA-Lösungen

Die Konzentration einer im Wasser gelösten DNA-Probe kann aufgrund der Absorption von Nukleinsäuren bei $\lambda=260\text{nm}$ berechnet werden. Die Präparationsartefakte, die aus der Isolierung genomischer DNA stammen, haben ebenfalls das Absorptionsmaximum bei $\lambda=260\text{nm}$. Die Messwerte werden vor allem durch einzelsträngige (ss) DNA und RNA sowie einzelne Nukleotide beeinflusst und Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger (ds) DNA verfälscht. Um die Reinheit der DNA zu berechnen, soll die Probe auch bei $\lambda=280\text{nm}$ im Photometer gemessen werden. Die Bildung eines Quotienten aus den Extinktionen bei $\lambda=260\text{nm}$ und $\lambda=280\text{nm}$ dient der Reinheitsbestimmung der Probe. Reine DNA weist einen A_{260}/A_{280} Quotienten von 1,8 auf. Ein Wert unter 1,8 spricht für eine Verunreinigung mit Proteinen und Werte über 2,0 deuten auf eine Kontamination mit RNA hin (Lottspeich F und Zorbas H, 1998).

Auch die Reinheit der RNA wird photometrisch bei $\lambda=260\text{nm}$ und $\lambda=280\text{nm}$ bestimmt. Ein Verhältnis von 2,0 spricht für eine reine RNA-Isolierung (Lottspeich F und Zorbas H, 1998).

2.5. Test der DNA und RNA auf Degradation

Bevor mit der Genotypisierung angefangen werden konnte, wurde die DNA auf mögliche Degradation untersucht. Dazu wurde von jeder Probe 1 µl der unverdünnten, in 1xTE-Puffer gelösten DNA auf ein 0,8%iges Gel aufgetragen. War eine einzige starke Kompressionsbande nach der Ethidiumbromidfärbung sichtbar, galt die DNA als nicht degradiert. Hier wurde ein 10000-500 bp Marker verwendet (Bio-Rad Lab. GmbH, München, D).

Die Qualität der RNA wurde auf einem 1,2%igen denaturierenden Gel getestet. Um die hydrolytische Aktivität der RNasen zu vermeiden, wurde dieses mit DEPC-Wasser angefertigt. Als Denaturierungsmittel wurde Formaldehyd verwendet. Die Aldehydgruppen des Formaldehyds bilden mit den Aminogruppen der Nukleotidbasen Schiff'sche Basen. Dadurch wurde die Bildung der intra- und intermolekularen H-Brücken verhindert und die RNA bleibt linear. Auf einem derartigen Gel ergibt die intakte Gesamt-RNA scharfe, deutliche 28S- und 18S-rRNA-Banden. Die 28S-rRNA-Banden (5.1 kb bei menschlicher RNA) sind in etwa doppelt so intensiv wie die 18S-rRNA-Banden (1.9 kb bei menschlicher RNA). Die schwächere Fluoreszenz zwischen den Banden und unterhalb der kleineren Bande ist auf die mRNA zurückzuführen. Als Längenstandard wurde ein Marker 10000–500 bp verwendet (Bio-Rad Lab. GmbH, München, D).

2.6. Plattenbelegung

Die DNA, die weiter mittels MALDI TOF MS genotypisiert wurde, wurde auf 100 ng/µl verdünnt und auf die Wells der 96er-Mikrotiterplatten pipettiert. Für die Herstellung der 384er-Mikrotiterplatten wurde die DNA auf 3,33 ng/µl verdünnt. Die DNA aus vier 96er-Mikrotiterplatten wurde auf eine 384er-Mikrotiterplatte mit der Hilfe des Tecan Pipettierroboters (Tecan AG, Crailsheim, D) übertragen.

Um die Genotypisierungsqualität zu testen, wurden auf jede 384er-Mikrotiterplatte mindestens je 10 DNAs doppelt aufgetragen. Diese wurden anschließend ausgewertet und miteinander verglichen.

2.7. DNA- und RNA-Elektrophorese

Im elektrischen Feld wandern die Nukleinsäuren, auf Grund der negativen Ladung der Phosphodiestergruppe, zur Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Molekülmasse. Je nach der Größe der zu untersuchenden DNA- und RNA-Fragmente wurden 0,8-3%ige Gele aus Agarose angefertigt. Die Agarose wird in Elektrophoresepuffer (1x TBE Puffer) aufgenommen und dann durch Erhitzen in die Lösung gebracht. Dazu wird Ethidiumbromid zugegeben. Dieser interkaliert in AT-reiche Sequenzen der Nukleinsäuren und macht diese unter UV-Licht (302nm) sichtbar.

2.8. Polymerase-Kettenreaktion / Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki RK et al., 1988) wurde Mitte der 80er Jahre von Dr. Kary B. Mullis entwickelt. Mit dieser Methode lässt sich eine hohe Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-, bzw. cDNA-Sequenz herstellen. Bei der PCR wird die DNA enzymatisch *in vitro* vervielfältigt. In einer PCR gibt es drei Hauptschritte (Denaturierung, Hybridisierung und Elongation), die 30 bis 45 Mal wiederholt werden.

Die Reaktion beginnt mit der thermischen Denaturierung (95°C) der dsDNA, wobei die komplementären DNA-Stränge getrennt werden. Nach der Denaturierung wird das Reaktionsgemisch abgekühlt. Beim Absinken der Temperatur können sich an den nun einzelsträngigen DNA-Matrizen im Überschuss zugegebene Primer (Oligonukleotide) anlagern. Die Primersequenzen sind so gewählt, dass sich sowohl der zum Gegenstrang komplementäre „Sense“-Primer als auch der zum Sinnstrang komplementäre „Antisense“-Primer an den jeweiligen DNA-Abschnitt anlagern können. Auf diese Weise ausgewählte Oligonukleotide nennt man antiparallele Primer. Somit wird an jedem DNA-Strang je ein Primer gebunden, d.h. die 3'OH-Enden der Primer werden für die anschließende DNA-Synthese bereitgestellt und dienen als Anfangsprodukte für die DNA-Synthese.

Nach der Zugabe von DNA-Polymerase in Gegenwart aller vier dNTPs findet eine Primer-Verlängerungsreaktion *in vitro* statt. Für die Verlängerung wird die Taq-DNA-Polymerase benutzt, ein Enzym das aus dem extrem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Das Reaktionsoptimum dieses Enzymes liegt bei 72°C. Da diese Polymerase auch bei einer Temperatur oberhalb von 90°C nicht inaktiviert wird, ist es

möglich, die PCR in einem periodisch heiz- und kühlbaren Metallblock ohne Unterbrechung zyklisch durchzuführen.

Nach dem ersten Zyklus liegen insgesamt zwei partiell doppelsträngige DNA-Stränge vor. Durch einfache Wiederholung dieses Prozesses entstehen vier Kopien der beiden ursprünglichen DNA-Stränge. Ab dem zweiten Zyklus steigt die Anzahl der replizierten Stücke exponentiell an.

Die Amplifikation wurde mit PCR-Geräten von der Firmen MJ Research (Boston, USA) und Applied Biosystems (CA, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Zeit:	Temperatur:	Schritt:
15 min	95°C	Initiale Denaturierung
20 s	95°C	Denaturierung
30 s	X°C	Annealing
1 min	72°C	Elongation
3 min	72°C	Finale Elongation
Permanent	4°C	Kühlung

Tab. 2.1.: Standardtemperaturprofil für die PCR: Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation wurden 45 Mal wiederholt (45 Zyklen). Die Annealing Temperatur wurde für jeden Assay angepasst und lag zwischen 56°C und 60°C.

Menge:	Substanz:	Konzentration:
12,3 µl	H ₂ O	
2,0 µl	10x PCR Puffer	
2,0 µl	dNTP-Mix	Je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
1,0 µl	Primermix (forward und reverse)	10 µM
1,2 µl	MgCl ₂	25 mM
0,5 µl	Taq Polymerase	1 U/µl
1,0 µl	DNA	1 ng/µl

Tab. 2.2.: Standard PCR Ansatz für 20µl.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels PCR Methode die genomischen Bereiche, in denen sich die SNPs befinden, amplifiziert. Um eine möglichst hohe PCR-Effizienz zu

erzielen, wurden die Primer so gewählt, dass 80 bis 120 bp lange PCR-Amplifikate entstehen. Die verwendeten „Sense“- und „Antisense“- Primer, die für MALDI TOF MS verwendet wurden, weisen neben dem sequenzspezifischen Bereich jeweils ein zusätzliches Motiv von zehn Basen auf. Dieses Motiv, der so genannte „Tag“, erfüllt in diesem Zusammenhang mehrere Aufgaben. Zum einen verläuft die Amplifikationsreaktion gleichmäßiger, wenn mehrere PC-Reaktionen in einem Reaktionsgefäß stattfinden; zum anderen ist es notwendig, die Masse dieser Primer mit Hilfe des „Tags“ soweit zu erhöhen, dass sie die sich anschließende MALDI TOF MS Analyse nicht stören. Da bei der Homogenous Mass Extension (hME) Methode die überschüssigen, in der PCR unverbrauchten Primer nicht entfernt werden, liegen sie letztendlich nicht im Massebereich der Primer-Extensionsprodukte.

Die PC-Reaktionen, die innerhalb der MALDI TOF MS Genotypisierungsmethode durchgeführt wurden, erfolgten in einem Reaktionsvolumen von 6 µl in einer 384er Mikrotiterplatte, in der sich die vorgelegte, eingetrocknete DNA befand. Angesetzter Mastermix wurde mit Hilfe der Pipettierstation Genesis Workstation der Fa. Tecan (Crailsheim, D) in die einzelnen Wells pipettiert. Der Mastermix wurde nach folgender Vorschrift zusammenpipettiert:

Menge:	Substanz:	Konzentration:
4,34 µl	H ₂ O	
0,6 µl	10x Puffer mit Gelatine	
0,6 µl	dNTPs	Je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
0,1 µl	Primer forward	10 pmol/µl
0,1 µl	Primer reverse	10 pmol/µl
0,24 µl	MgCl ₂	25 mM
0,02 µl	Taq	1 U/µl

Tab. 2.3.: PCR Ansatz für ein Gesamtvolumen von 6µl und 5µl eingetrockneter DNA (1ng/µl eingetrocknet).

Alle eingesetzten Primer und die Längen der einzelnen PCR-Fragmente sind im Anhang aufgeführt (s. Kapitel 7.2.).

2.9. Homogenous Mass Extension (hME) Reaktion

Die Homogenous Mass Extension (hME)-Reaktion ist eine universelle Methode, die für die Detektion der verschiedenen Allele eines SNP in zuvor amplifizierter DNA benutzt wird. Vor der hME-Reaktion wird die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)-Reaktion durchgeführt. Durch die Zugabe dieses Enzymes werden die überschüssigen dNTPs aus der PCR gespalten. Ein derartiges Vorgehen ist notwendig, da durch die freien Nukleotide andere als die vorher bestimmten Primer- Extensionsprodukte entstünden, wodurch Probleme bei der korrekten SNP-Detektion aufträten. Für die SAP-Reaktion wurde der Mastermix nach folgender Vorschrift zusammenpipettiert:

Volumen für Single-Reaktion:	Substanz:	Konzentration:
1,53 µl	H ₂ O	
0,17 µl	HME-Puffer	
0,3 µl	SAP	1 U/µl
6,0 µl	PCR-Produkt	

Tab. 2.4.: Ansatz für die SAP-Reaktion (2 µl pro Well).

und unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Zeit:	Temperatur:	Schritt:
20 min	37°C	Inkubation
10 min	85°C	Inaktivierung der SAP
permanent	8°C	Kühlung

Tab. 2.5.: Reaktionsbedingungen für die SAP-Reaktion.

Anschließend erfolgte die Homogenous Mass Extension (hME) Reaktion. Um diesen Schritt durchzuführen wird ein hME-Reaktionsmix (Primer, Enzyme, Puffer, dNTPs, ddNTPs) zugegeben. Extension-Primer werden so entworfen, dass sie genau eine Base vor dem zu analysierenden SNP enden. Um die Primer spezifisch zu verlängern, wird ein geeigneter Stopmix (der drei ddNTPs und ein dNTP enthält) zugegeben. Durch den Einbau

eines ddNTP wird die Verlängerungsreaktion beendet. So entstehen die Extensionsprodukte, die sich je nach vorhandenem Allel in Länge und Masse unterscheiden.

hME Reaktion wurde nach unten aufgelisteten Vorschrift und Bedingungen durchgeführt:

Volumen pro Reaktion:	Substanz:	Konzentration:
1,728 µl	H ₂ O	
0,2 µl	Stopmix	Je 2 mM pro ddNTP/dNTP
0,054 µl	Extensionsprimer	100 pmol/µl
0,018 µl	Thermosequenzase	32 U/µl
8,0 µl	PCR-Produkt (+SAP-Mix)	

Tab. 2.6.: Ansatz für die hME-Reaktion (2 µl pro Well).

Zeit:	Temperatur:	Schritt:
2 min	94°C	Initiale Denaturierung
5 s	94°C	Denaturierung
5 s	52°C	Hybridisierung
5 s	72°C	Elongation
permanent	8°C	Kühlung

Tab. 2.7.: Reaktionsbedingungen für die hME-Reaktion. Die Anzahl der Reaktionszyklen betrug 40.

Alle erforderlichen Pipettierschritte erfolgten auf der Pipettierstation Multimek96 Automated Channelpipettor (Beckmann Coulter; Fullerton, USA) unter Verwendung programmierter Standardabläufe (Sequenom, Hamburg, D). Das für die SAP- und hME-Reaktionen erforderliche Thermocycling wurde auf den PCR Cyclern der Firmen MJ Research und AB Gene unter Standardbedingungen (Manual Processing Procedure for the MassARRAY II System, Sequenom Hamburg, D) durchgeführt.

Nach der Verlängerungsreaktion wurde ein Ionenaustauschharz (Spectro-CLEAN, Sequenom, Hamburg, D) zugefügt, um die Anlagerung von Kationen zu vermeiden. Nukleinsäuren zeigen eine hohe Affinität zu Alkali- und Erdalkalitionen. Diese Kationen stören die MALDI TOF MS-Messung, da separate Signale entstehen, die den eigentlichen Molekülen vor- bzw. nachgelagert sind und so zu einer Reduktion des

Signalrauschverhältnisses führen. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Standardprotokoll der Fa. Sequenom (Manual Processing Procedure for the MassARRAY II System, Sequenom Hamburg, D).

Die hME-Produkte wurden zunächst mittels eines Nanoliterspotters auf einen 384 spot Siliziumchip übertragen, der mit einer kristallinen Matrix (3-Hydroxypicolinsäure) beladen ist. Zusätzlich zu den 384 Matrixspots, auf welche die Proben übertragen werden, befinden sich auf dem Chip zehn weitere Matrixspots, die mit einem Kalibrant (Sequenom Hamburg, D) beschickt werden. Der verwendete Kalibrant besteht aus einer Mischung von drei Oligonukleotiden bekannter Masse und dient der Kalibrierung des Analysesystems.

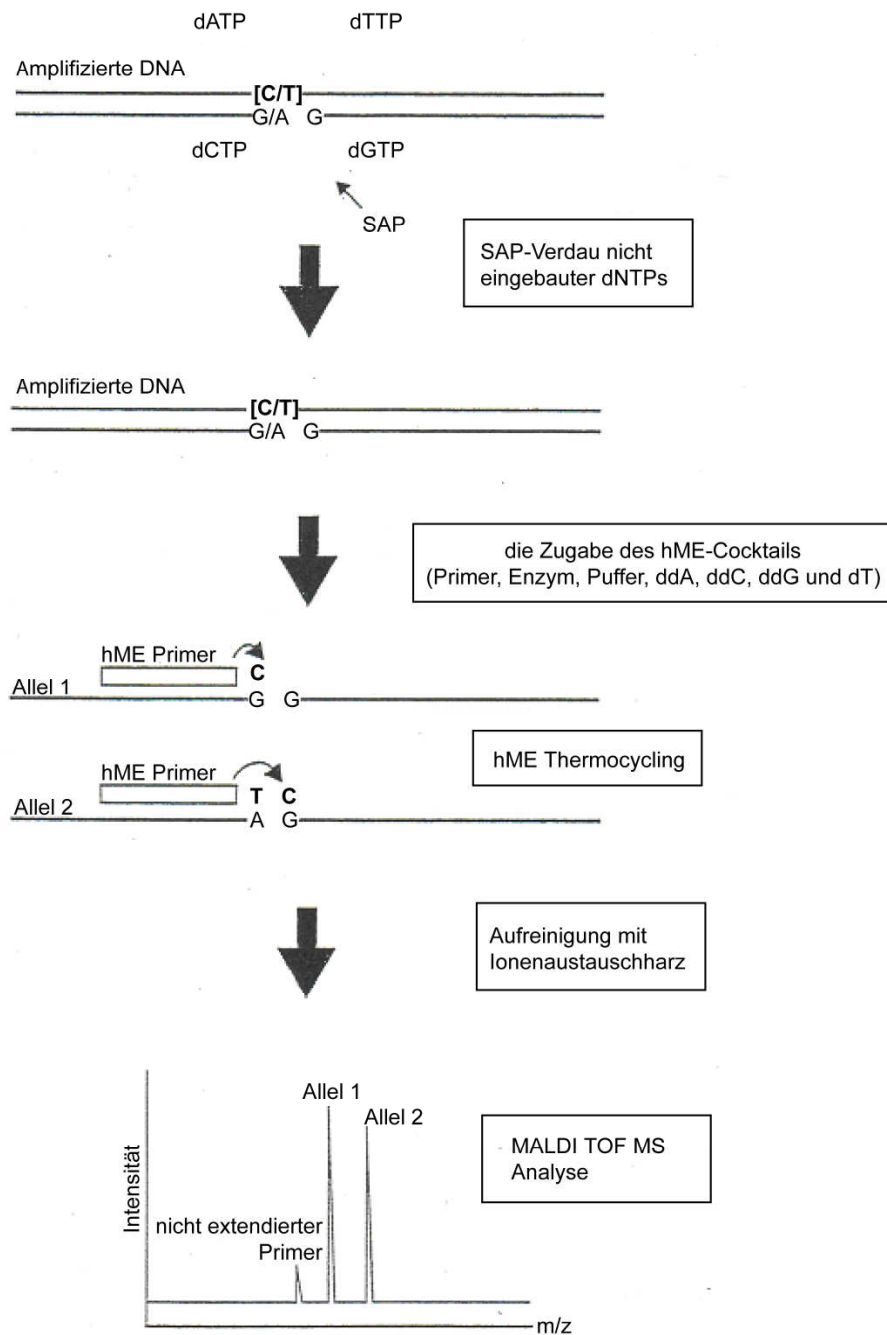


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung der Mass ExtensionTM Reaktion. Diese Methode basiert auf der Sangermethode, bei der ein Kettenabbruch durch Didesoxynukleotide erzeugt wird. Je nach vorkommendem Allel entstehen Produkte, die sich in Länge und Masse unterscheiden. Diese Unterschiede werden im Anschluss durch MALDI TOF Massenspektrometrie Analyse sichtbar gemacht (SEQUENOM, hME, SpectroPREPTM User's Guide, Version 1, February, 2001).

2.10. SNP-Genotypisierung mittels Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) Time of Flight (TOF) Massenspektrometrie (MS)

Die MALDI TOF MS ist eine Analysemethode zur Ermittlung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Die MALDI TOF MS-Analyse wurde von Hillenkamp und Karas 1987 entwickelt. Früher wurde diese Methode zur Massenbestimmung größerer Molekülen (bzw. Peptide und Proteine) benutzt. Aktuell wird sie auch in der SNP-Analyse eingesetzt.

Für die Probenpräparation wurden verschiedene Techniken entwickelt, die alle den Einbau der Analytmoleküle in das Kristallgitter der Matrix gewährleisten sollen (Karas M et Hillenkamp F, 1988; Kirpekar F et al., 1998). Eine geeignete Matrix ist die 3-Hydroxy-Picolin-Säure. Das ist eine aromatische, carboxylhaltige Säure, die ihr Proton an die negativen Oligonukleotide der Probe in einer Kristallgitterstruktur abgibt und so den Ionisationsprozess ermöglicht. Die Matrixsubstanz absorbiert auch die eingestrahlte Laserenergie und schützt, aufgrund des 100- bis 1000fachen Überschusses, die Analytmoleküle vor der Zersetzung. Zusätzlich soll die Matrix eine photolytische Beschädigung des Analyten und die Interaktion der Analytenmoleküle untereinander, sowie zwischen den Analyten und dem Probenträger, verhindern (Hillenkamp F et al., 1991). Zusammen mit dem Analyt bildet die Matrix einen so genannten MALDI-plum.

Bei der MALDI TOF MS wird die Probe für wenige Nanosekunden mit kurzweiligem Laserlicht bestrahlt. Das führt zu einer lokalen Auflösung der Festkörperoberfläche. Die absorbierte Energie wird an die, in der Matrix eingebetteten, Probenmoleküle weitergegeben, wodurch diese desorbiert und ionisiert werden. Demzufolge treten die Analytmoleküle in die Gasphase über. Der ganze Prozess findet im Vakuum statt (Gut IG, 2001; Hillenkamp F et al., 1991).

Eine negative Elektrode, die sich in geringem Abstand gegenüber der Probe befindet, erzeugt ein elektrostatisches Feld. Positive Probenionen werden von der Probenoberfläche in die Richtung des Analysators beschleunigt. Für die MALDI-Untersuchungen wird ein Flugzeitmassenspektrometer als Analysator benutzt. Die Massenbestimmung erfolgt über die genaue Messung der Zeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Probe bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Ionen mit unterschiedlichen Massen werden, bei gleicher kinetischer Energie, in der Beschleunigungsstrecke auf unterschiedliche Geschwindigkeit gebracht. Bei konstanter Beschleunigungsspannung und Flugstrecke lässt sich durch Messung der Flugzeit der Ionen deren Masse bestimmen (Griffin TJ et Smith LM, 2000). Die Kalibrierung erfolgt

über Referenzsubstanzen mit bekannten Massen. Typische Flugzeiten bei der MALDI TOF MS liegen zwischen wenigen bis einigen 100 Mikrosekunden und die Driftstrecken sind 1-4 m lang (Abb. 2.2.).

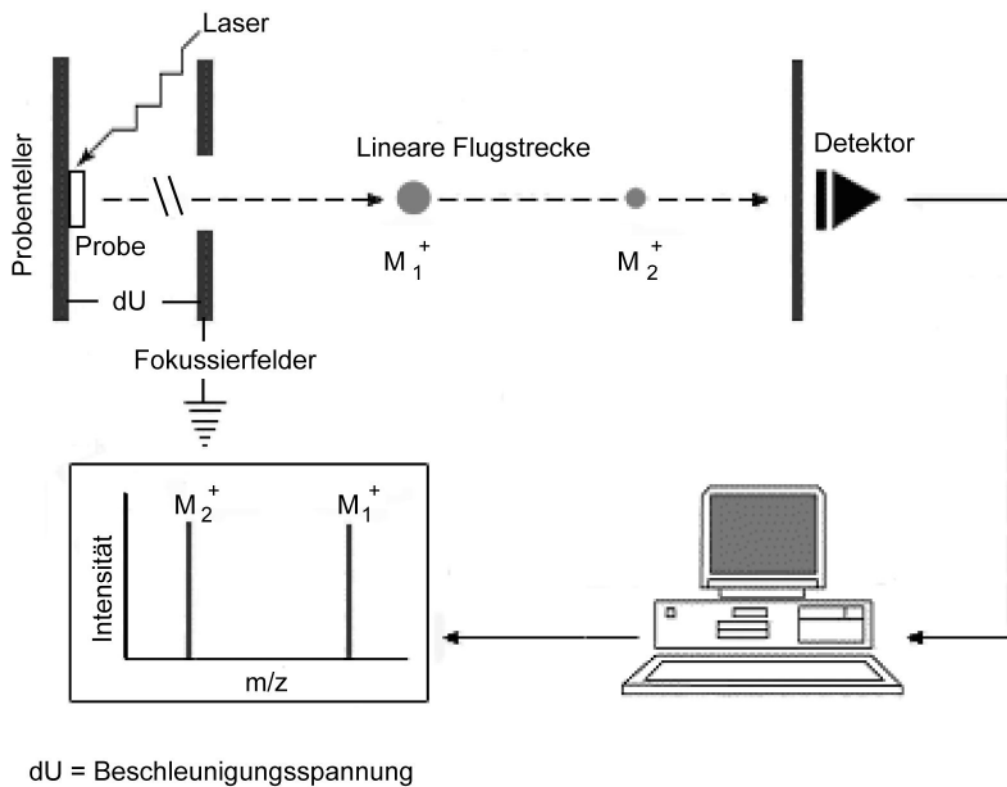


Abb. 2.2.: Schematische Darstellung des Prinzips der MALDI TOF Massenspektrometrie nach Griffin TJ et al. Durch das Verdampfen der Matrix mit Hilfe des Lasers wird das Oligonukleotid beschleunigt und bewegt sich im feldfreien Flugrohr mit einer masse- und ladungsabhängigen Geschwindigkeit auf einen Detektorschirm zu. Hier wurden die Abtrennung und die Detektion von zwei Oligonukleotiden M_1 und M_2 mit verschiedenen Massen dargestellt.

Aufgrund der Entwicklung des MALDI TOF Massenspektrometers ist es möglich, DNA-Fragmente in einer Größenordnung von 1000 bis 9000 Da, d.h. 3-30 Basen, mit einer Genauigkeit von 0,1 % bis 0,01 % zu bestimmen, womit sich ein Massenbereich erschließt, in dem eine SNP-Analyse mittels Primer-Extensionsprodukten durchgeführt werden kann. Die passenden Reaktionsbedingungen und Primer wurden mit der SpectroDesigner Software (s. Kapitel 3.2.2.) berechnet und die jeweiligen Allele der ausgewählten SNPs mit Hilfe von MALDI TOF MS (Abb. 2.3.) analysiert.

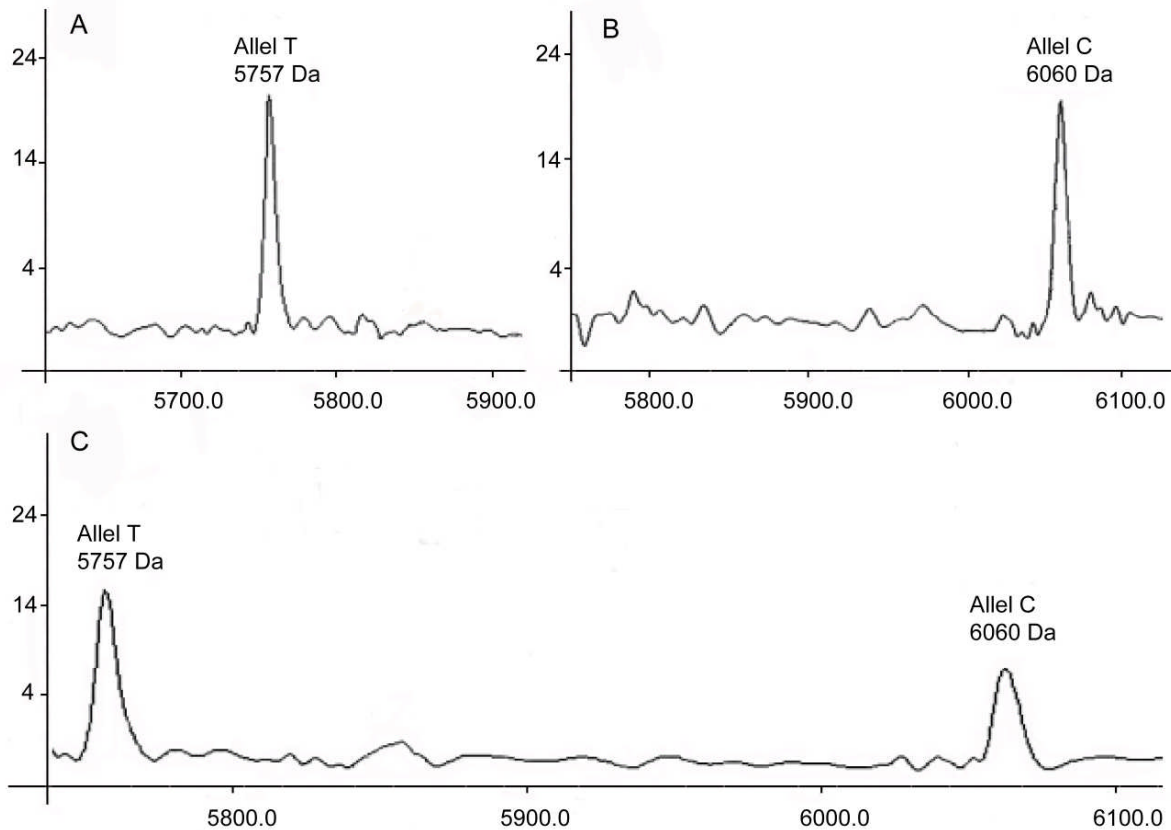


Abb. 2.3.: MALDI TOF MS Analyse der Primer-Extensions-Reaktion des SNPs rs4746154 [C/T] aus dem *CaMK2G* Gen. A: zeigt den homozygoten Zustand des Allels T; B: zeigt den homozygoten Zustand des Allels C und C: zeigt den heterozygoten Zustand. X Achse stellt die Masse dar und die Y Achse die Intensität.

Die Genotypisierung wurde gleichzeitig für mehrere SNPs (Multiplex Reaktion) in einem 384-Well Format nach einem optimierten Protokoll durchgeführt. Dazu wurden die Primer mit Hilfe der SpectroDesigner Software so aufgebaut, dass sich Produkte nach der Masse unterscheiden (Abb. 2.4.). Damit wurden Überschneidungen verschiedener allelspezifischen Produkten mit gleicher Masse im Massenspektrometer vermieden. Ein weiteres Problem ist die mögliche schwache Signalintensität einzelnen Produkte. Um die Signale deutlich erkennen und interpretieren zu können, müssen diese stärker als das Grundrauschen des Spektrums sein. Deswegen wurde vor jeder Multiplexreaktion eine Primeroptimierung mittels MALDI TOF MS durchgeführt. Ziel dieses Schrittes war festzustellen, wie stark sich die Signalintensität der verwendeten Primer untereinander unterscheidet (Abb. 2.5.). Die Menge des Primers mit dem stärksten Signal wurde, wie im Standardprotokoll angegeben, beibehalten. Von den Primern mit niedrigerer Intensität wurde entsprechend dem Verhältnis der Signalintensitäten mehr Primer eingesetzt. Auf dieser Weise wurden ähnlich starke Signale für die verschiedenen Produkten erhalten.

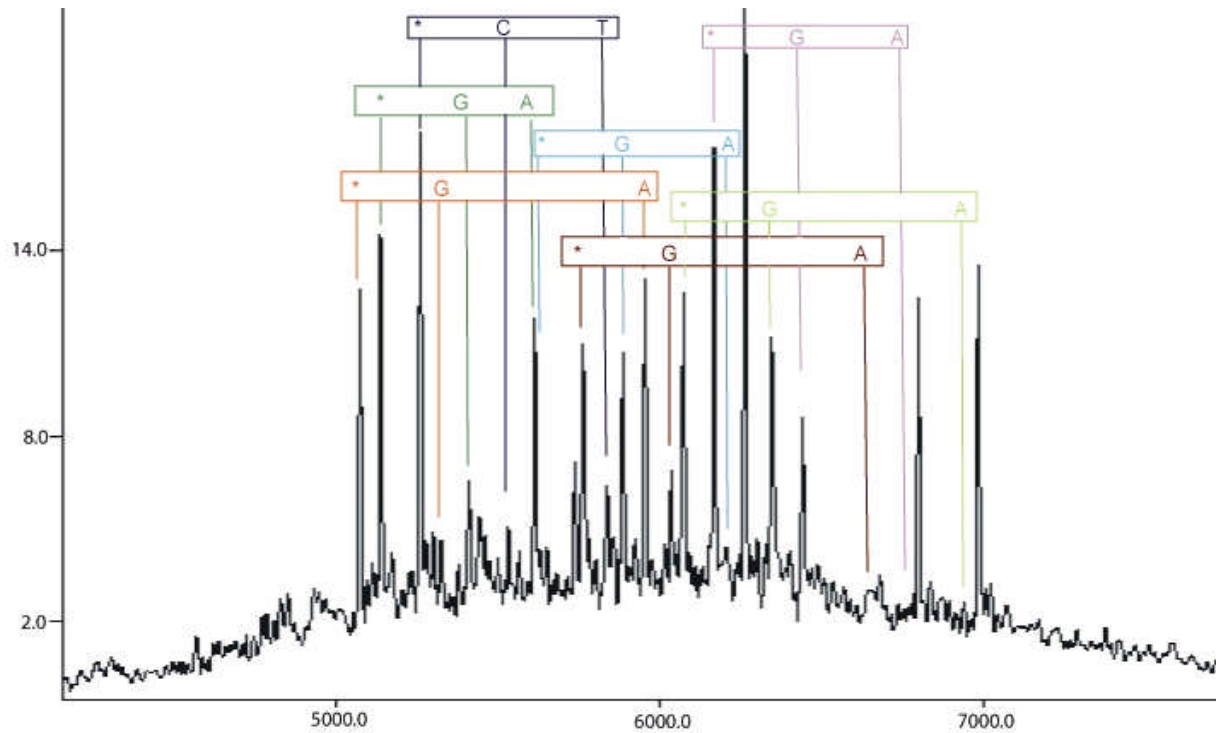


Abb. 2.4.: MALDI TOF MS Analyse einer Multiplexreaktion von sieben genotypisierten biallelischen SNPs: Das Massenspektrum zeigt die Analyse der Primer-Extensionsreaktion für die SNPs rs7905574 [G/A] (rot markiert), rs2271271 [G/A] (grün markiert), rs2193179 [C/T] (dunkel blau markiert), rs11000020 [G/A] (hell blau markiert), rs7899959 [G/A] (dunkel rot markiert), rs10762483 [G/A] (hell grün markiert) und rs3809202 [G/A] (rosa markiert). Durch ein Sternchen wird der Massenbereich markiert, in dem die jeweiligen nicht extendierten Primer detektiert wurden. X Achse stellt die Masse dar und die Y Achse die Intensität des Signals.

2.11. SNP-Genotypisierung mit Restriktionsendonukleasen

Zur SNP Genotypisierung bei kleiner Probandenanzahl wurden Typ II Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese Enzyme schneiden die amplifizierte DNA Sequenz in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen. Die Reaktion wird an spezifischen, unmethylierten, meist 4–8 bp langen Erkennungsstellen durchgeführt. Die Restriktionsenzyme werden so ausgewählt, dass durch den SNP eine Schnittstelle für dieses Enzym neu entsteht oder verloren geht. Abhängig von dem vorhandenen Allel ergeben sich DNA Sequenzen unterschiedlicher Länge, die mittels Gelelektrophorese detektierbar sind (Lottspeich F und Zorbas H, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Enzyme AluI, RsaI, AleI, MslI, AflIII und HaeII verwendet.

2.12. Sequenzierung der PCR Produkte

Um unbekannte genomische Variationen insbesondere SNPs zu identifizieren, wurden PCR-Produkte von 96 zufällig ausgewählten Patienten und 80 Kontrollen der Alzheimerstudie sequenziert. Die Sequenzierungen erfolgten auf dem Kapillarsequenziergerät ABI Prism 3100 Genetic Analyser der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt, D). Hier wurde die Sanger Sequenziermethode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) angewendet (Sanger F et al., 1977). Nach der PCR wurden die gereinigten PCR-Amplifikate mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt, D) nach folgendem Standardprotokoll sequenziert:

Menge:	Substanz:	Konzentration:
2 µl	aufgereinigtes PCR-Template	
1 µl	BigDye™ Kit	
1 µl	Sequenzierprimer	(5pmol/µl)
1 µl	5xPuffer	

Tab. 2.8.: Standardprotokoll für die Sequenzierungsreaktion.

Das Thermocycling fand auf dem PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cycler der Fa. MJ Research (Boston, USA) nach folgendem Temperaturprofil statt:

Zeit:	Temperatur:	Schritt:
10 s	95°C	Initiale Denaturierung
10 s	94°C	Denaturierung
15 s	50°C	Annealing 30 Zyklen
4 min	60°C	Extension insgesamt
Permanent	4°C	Kühlung

Tab. 2.9.: Temperaturbedingungen für die Sequenzierungsreaktion.

Die Aufreinigung der Sequenzierprodukte wurde mittels Montagekits™ der Firma Millipore (München, D) durchgeführt. Die aufgereinigten Sequenzierprodukte wurden in 25 µl Millipore-Puffer aufgenommen und in spezielle Mikrotiterplatten (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) überführt. Anschließend wurde der Sequenzierer mit diesen Platten beschickt. Die Auftrennung der Sequenzierprodukte fand unter Standardbedingungen statt.

2.13. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Durch die RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) lässt sich die Menge und Art der Gentranskription und damit auch der Genexpression bestimmter Gene nachweisen. Da die eukaryotische mRNA nach ihrer Transkription bereits modifiziert und gespleißt ist, kann aus cDNA die Aminosäuresequenz eines Proteins abgeleitet werden. Die cDNA ermöglicht auch Informationen, ob dass dazugehörige Gen in verschiedenen Isoformen exprimiert wird, d.h. die mRNA alternativ gespleißt wird.

Als erstes wird die RNA spezifisch revers transkribiert. Das eingesetzte Enzym Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, ermöglicht die Umschreibung der mRNA in eine ihr komplementäre einzelsträngige DNA (cDNA) (Tab. 2.10. und 2.11.). Zur Initiation der cDNA Synthese wird Poly-(dT) Primer verwendet. Diese binden an die Polyadenylierungssequenz und werden für die Umschreibung von mRNA eingesetzt, während rRNA aufgrund des Fehlens eines Poly-(A) Schwanzes nicht revers transkribiert wird (Malhotra K et al., 1988; Ando T et al., 1997).

Menge:	Substanz:	Konzentration:
6 µl	RNase free H ₂ O	
5 µl	RNA	je 1-2 µg pro Ansatz
1 µl	Poly-(dT) Primer	0,5 µg/µl
4 µl	5x Reaction Puffer	250mM Tris-Hcl, 250mM MgCl ₂ , 50mM DTT
1 µl	RNase Inhibitor	20 U/µl
2 µl	dNTP-Mix	10mM von jedem dNTP
5 µl	RevertAid H ⁻ Reverse Transkriptase	200 U/µl

Tab. 2.10.: Ansatz für die cDNA Synthese.

Zeit:	Temperatur:	Schritt:
5 min	70°C	Denaturierung
5 min	37°C	Inkubation
60 min	42°C	Reverse Transkription
10 min	70°C	Inaktivierung des Enzymes

Tab. 2.11.: Temperaturbedingungen für die cDNA Synthese (Fermantas GmbH, St. Leon-Rot, D).

Im Anschluss wird aus der cDNA mittels PCR spezifisch die gewünschte Sequenz amplifiziert. Dafür wurden die Gen-spezifischen Primer und DNA Polymerase benötigt. Die Produkte werden anschließend auf dem Agarosegel detektiert. Falls die mRNA alternativ gespleißt wird, werden auf dem Gel unterschiedlich große Produkte sichtbar.

Teilweise wurde RT PCR nach dem optimierten Protokoll mittels One Step Kit von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) durchgeführt (Tab. 2.12.). Für diese Reaktion wurden genspezifische Primer benötigt (10 µM).

Zeit:	Temperatur:	Schritt:
30 min	55°C	cDNA Synthese
2 min	94°C	Inaktivierung des RT-Enzymes, Aktivierung der DNA Polymerase, Denaturierung der cDNA
15 s	94°C	Denaturierung
30 s	54-60°C	Annealing
1 min	68°C	Elongation
5 min	68°C	Finale Elongation

Tab. 2.12.: Temperaturbedingungen für die One-Step RT-PCR.

2.14. Aufreinigung der RT-PCR-Produkte

RT-PCR Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gelextraction-Kit NucleoSpin® Extract II von der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG aufgereinigt. Der Kit wurde nach der Herstellerangabe eingesetzt. Das Prinzip dieser Reinigung beruht auf einer Bindung der DNA an eine Silikagel-Membran. Die DNA wurde anschließend im Puffer gelöst und sequenziert (s. Kapitel 2.12.).

2.15. Kongorot-Färbung

A β -Proteinablagerungen in Plaques und Gefäßen lassen sich durch die Kongorotfärbung (Puchtler H et al., 1965) nachweisen. Die immunologisch nachweisbaren fibrillären A β -Komponenten zeigen eine spezifische Rotfärbung, die im polarisierten Licht grün-gelblich aufleuchtet.

Die Plaques wurden anschließend bei hundertfacher Vergrößerung ausgezählt, nach den CERAD (Consortium to Establish a Registry of Alzheimer's Disease) Kriterien (Mirra SS et al., 1991) in die Gruppe A, B oder C (s. Kapitel 7.1.4.) eingeteilt und mit den Genotypisierungsdaten verglichen (persönliche Mitteilung Frau Dr. Frauke Neff).

2.16. Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen für die Gene *CaMK2G*, *VCL*, *AP3MI* und *ST8SIA1* wurden von der Autorin dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Simon M Laws und Herrn PD Dr. Jakob Müller durchgeführt. Die statistische Auswertung für das *PLAU* Gen wurde von Herrn PD Dr. Stefan Wagenpfeil und Frau Prof. Dr. Heike Bickeböller vorgenommen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.16.1. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE)

Um Genotypisierungsfehler ausschließen zu können, wurde die Kontrollgruppe für jeden SNP mit dem χ^2 Test auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) getestet. In der weiteren statistischen Auswertung wurden nur diejenigen SNPs betrachtet, deren Genotypverteilungen keine signifikante Abweichung vom HWE ($p > 0,05$) gezeigt haben. Der Test auf HWE wurde nur für die SNPs mit ausreichender Genotypisierungseffizienz ($\geq 95\%$) durchgeführt.

2.16.2. Der allelische Test und Genotypentest

Die Assoziation zwischen Allel-, bzw. Genotypverteilung jedes SNPs und AD-Phänotyp wurde mittels Logistischer Regression getestet. Dazu wurden Geschlecht und Erkrankungsalter (Age of Onset) als Kovariaten einbezogen. Der allelische Test wurde mit SPSS durchgeführt und für den Genotypentest wurde STATA verwendet. Die Korrektur für multiples Testen wurde unter Verwendung vom Bonferroni-Test durchgeführt.

Die Genotypisierungsergebnisse der Geschwisterpaarstudie für das *PLAU* Gen wurden mittels Sib Transmission / Disequilibrium Test (S-TDT) (Spielman RS et Ewens WJ, 1998) auf eine Assoziation mit AD getestet. S-TDT ist eine modifizierte Version des Transmission / Disequilibrium Tests (TDT) (Spielman RS et al., 1993). Durch den TDT wird überprüft, ob heterozygote Eltern ein mit der Erkrankung assoziiertes Allel signifikant häufiger an ihre erkrankten Kinder weitergeben, als nach den Mendelschen Regeln zu erwarten ist, wenn keine Kopplung bzw. Assoziation besteht. Bei Krankheiten mit spätem Krankheitsbeginn tritt das Probleme fehlender Information der Eltern auf. In diesem Fall wurde der S-TDT angewendet. Es wird verglichen, ob erkrankte Geschwister überzufällig häufig ein spezifisches Markerallel

besitzen als nicht erkrankte Geschwister. Statistische Auswertung der Genotypisierungsdaten der Geschwisterpaarstudie für das Gen *ST8SIA1* wurde mittels Family-Based Association Test (FBAT) durchgeführt. Die FBAT-Methode wurde als eine Verallgemeinerung des TDT für Kernfamilien mit erkrankten und gesunden Geschwistern, Mehrgenerationenfamilien sowie quantitative und qualitative Phänotypen so konstruiert, dass die Robustheit gegenüber Populationsstratifikation erhalten blieb.

2.16.3. Haplotypberechnung und Linkage Disequilibrium Struktur

Die Haplotypschatzung und die Haplotypenanalyse wurden mittels im Haploview (Barrett JC et al., 2005) implementierten EM Algorithmus durchgeführt. Mittels dieses Programmes wurden die Frequenzen der Haplotypkombinationen berechnet und die Assoziationen mit AD getestet. Die Korrektur für multiples Testen wurde unter Verwendung vom Bonferroni-Test durchgeführt.

Als Maß für paarweises Linkage Disequilibrium (LD) zwischen jedem möglichen Paar von SNP Loci wurden Lewontin's disequilibrium Koeffizient D' und der quadrierte Korrelationskoeffizient r^2 berechnet und mit dem Softwarepaket Haploview dargestellt.

2.16.4. Zwei- und Dreilocushaplotypenanalyse

Die Zwei- bzw. Dreilocushaplotypenanalyse erfolgte mit dem Softwarepaket Haploview für je zwei bzw. drei benachbarte SNPs. Für jede Haplotypkombination wurden die Frequenzen berechnet und anschließend einen Assoziationstest durchgeführt.

2.16.5. Two-sided Mann-Whitney U Test

Die Unterschiede in der Plaqueanzahl wurden für die An-, bzw. Abwesenheit des Risikoallels T im *PLAU* SNP rs2227564 mittels two-sided Mann-Whitney U Test analysiert. Dieser Test ist ein Homogenitätstest. Er dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier unabhängiger Stichproben A und B. Der Test funktioniert einseitig oder zweiseitig. Beim einseitigen Test wird geprüft, ob $A > B$ bzw. $A < B$ ist, beim zweiseitigen Test wird geprüft, ob $A = B$ ist.

3. Material

3.1. Geräte und Chemikalien

3.1.1. Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Geräte, die in der Tabelle 3.1. aufgelistet sind, eingesetzt.

Material:	Typ und Hersteller:
Pipetten	Eppendorf Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, D) Gilson Pipetten (Gilson Company Inc, Lewis Center, USA) Brand Pipetten (Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D)
Tischzentrifuge	Zentrifuge 5415 D (Eppendorf AG, Hamburg, D)
Vortexer	MS2 Minishaker (IKA-Works, Wilmington, USA)
Gelelektrophoreseapparatur	Power Pack PL (Biometra GmbH, Göttingen, D) Power Pac 3000 (Bio-Rad Lab. GmbH, München, D) Sunrise™, horizontal Gel Electrophoresis Apparatus (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, D) Sub cell Model 192 (Bio-Rad Lab. GmbH, München, D)
Gel-Dokumentationssystem	UVT-40M Transilluminator (Herolab, Wiesloch, D) Mighty Bright UV™ Transilluminator (Hoefer Inc., San Francisco, CA, USA) E.A.S.Y 429 K Kamera (Herolab, Wiesloch, D) Hoefer's PhotoMan (Hoefer Inc., CA, USA)
Kühlzentrifuge (für Platten)	Sigma 4K15C (Sigma laborzentrifugen, Osterode, D) Rotanda 46RS (Hettich, Darmstadt, D) Zentrifuge 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, D)
Mikrowelle	Siemens 32L (Siemens, München, D)
Photometer	Ultrospec 3100 pro (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) Smart Spec™ (Bio-Rad Lab. GmbH, München, D)
Reinstwasseranlage	UltraClear UV (SG Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH, Barsbüttel, D) Millipore RiOs™ 8 (Millipore, Billerica, Mass., USA)

Massenspektrometer	Autoflex (Bruker Franzen Analytik GmbH, Bremen, D)
Blockthermostat	Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, D) BT 130-2 (HLC Haep Labor Consult, Bovenden, D)
Spotter	SpectroPoint™ Nanoliter Pipetting System (SEQUENOM GmbH, San Diego, CA, USA)
PCR Cycler	PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler (MJ-Research, Boston, USA) Gene Amp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) Primus 96 Plus (MWG-Biotech AG, Ebersberg, D)
Pipettierroboter	Genesis RSP 150 Work Station (Tecan AG, Crailsheim, D) Multimek 96 Automated 96-Channel Pipettor (Beckman Coulter, Fullerton, USA) Temo (Tecan AG, Crailsheim, D) Miniprep 75 (Tecan AG, Crailsheim, D)
DNA-Sequenzierer	ABI-Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
Waage	BL 610 (Sartorius AG, Göttingen, D) BP 121 S (Sartorius AG, Göttingen, D)
Eismaschine	AF 30 (Scotsman, Mailand, I)
Schüttler	Taumelschüttler Unitwist 3D (UniEquip Laborgeräte + Vertriebs GmbH, München, D) ROTO-Shake Genie (Scientific Industries, Inc Bohemia, USA) Rocky (Fröbel GmbH, Lindau, D)
Homogenisator	Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D) T8.01 Netzgerät (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D)

Tab. 3.1.: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller.

3.1.2. Reagenzien, Lösungen, Puffer und Kits

In der Tabelle 3.2. sind die Materialien, deren Hersteller, sowie der Verwendungszweck aufgelistet.

Material:	Methode:	Hersteller:
Puregene DNA Isolation Kit	DNA Isolation	Gentra, Mineapolis, USA
TE Puffer [(Hydroxylmethyl)Aminomethan- Ethylendiaminotetraacetyl-Säure]	DNA Verdünnung	Gentra, Mineapolis, USA
Isopropanol	DNA und RNA Isolation	Sigma-Aldrich, Osterode, D
Ammoniumacetatlösung	DNA Isolation	Apotheke der KRI der TUM
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	RNA Isolation	Qiagen GmbH, Hilden, D
10x PCR Puffer	PCR	Qiagen GmbH, Hilden, D
25mM MgCl ₂	PCR	Qiagen GmbH, Hilden, D
dNTPs	PCR	Paqlab, Erlangen, D
NucleoSpin® Extract II Kit	Aufreinigung der PCR-Produkte	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
One Step RT PCR Kit	RT PCR	Invitrogen, Karlsruhe, D
Agarose Ultra Pure	Gelelektrophorese	Paqlab, Erlangen, D
TBE Laufpuffer (Tris-Borat-Puffer)	Gelelektrophorese	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Gelelektrophorese	Bio-Rad Lab. GmbH, München, D
DNA Ladepuffer für Agarosegele	Gelelektrophorese	Bio-Rad Lab. GmbH, München, D
Längstandard für DNA Agarosegel	Gelelektrophorese	Bio-Rad Lab. GmbH, München, D
RNA Ladepuffer für Agarosegele	Gelelektrophorese	Sigma-Aldrich, Osterode, D
MOPS Puffer	Gelelektrophorese	Sigma-Aldrich, Osterode, D
Formaldehyd	Gelelektrophorese	Sigma-Aldrich, Osterode, D
hME Puffer	hME	Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA
MassEXTEND™ Nucleotide Tri-Mix Pack	hME	Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA

Spectro CLEAN Aufreinigungs-kit	Aufreinigung der hME-Produkte	Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA
Kalibrant	Spotten	Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA
5x Puffer	Sequenzierung	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI PRISM® BigDye™ Terminator Sequencing Kit	Sequenzierung	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
LiChrosolv	Sequenzierung	Merck KGaA, Darmstadt, D
HPLC grade	Sequenzierung	Merck KGaA, Darmstadt, D
Montagne Aufreinigungs-kit	Sequenzierung	Millipore, Billerica, Mass., USA
Paraffin		Waldeck GmbH & Co KG, Münster, D
Essigsäure		Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol		Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhypochlorid		Sigma-Aldrich, Osterode, D
Natrium Hydroxid		Merck KGaA, Darmstadt, D
Natrium Acetate		Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz		Merck KGaA, Darmstadt, D

Tab. 3.2.: Liste der verwendeten Materialien, deren Hersteller und der eingesetzten Methoden.

3.1.3. Enzyme

In der vorliegenden Arbeit verwendete Enzyme, sowie deren Hersteller sind in der Tabelle 3.3. dargestellt.

Material:	Hersteller:
HotStar Taq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, D
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA
Thermosequenase	Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA
AmpliTaq DNA	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
AleI	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA
AluI	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA
MslI	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA
RsaI	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA
RevertAid H ⁻ Reverse Transkriptase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
SuperScript™ II Reverse Transkriptase/ Platinum® Taq Mix	Invitrogen, Karlsruhe, D

Tab. 3.3.: Liste der verwendeten Enzyme und deren Hersteller.

3.1.4. Oligonukleotide

PCR- und Sequenzier-Primer wurden von Metabion GmbH (Martinsried, D), Invitrogen (Karlsruhe, D) und MWG-Biotech AG (Ebersberg, D) synthetisiert. Diese wurden HPLC-gereinigt und MALDI TOF MS dokumentiert. Alle PCR-Primer, die für MALDI TOF MS benutzt wurden, wurden mit einem hME-Tag (5'-ACGTTGGATG-3') versehen. Eine Liste mit den verwendeten Primern befindet sich im Anhang (s. Kapitel 7.2.).

3.2. Software

3.2.1. Pipettierrobotiksoftware

- Gemini 3.5 (Visual Basic Programme), Tecan, Crailsheim, D
- Bioworks, Beckmann Coulter, Fullerton, USA

3.2.2. MALDI TOF MS Software

- SpectroTyper RT™, Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA
- MassARRAY Typer, Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA
- SpectroREADER, Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA
- Pintool Software, Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA, RoboDesign USA
- SpectroDesigner™ 2.1, Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA
- SpectroImporter Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA

3.2.3. Software für Primerdesign und Bestimmung der PCR-Bedingungen

- VectorNTI Suite 6.0, VectorNTI Suite 7.0 und VectorNTI Advance 9.0
- SpectroDesigner™ , Sequenom GmbH, San Diego, CA, USA
- FastPCR © v. 4.0
- NCBI BLAST (<http://130.14.29.110/BLAST/>)
- Human BLAT Search (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>)

3.2.4. Software für die Analyse genomischer DNA-Sequenzen

- VectorNTI Suite 6.0, VectorNTI Suite 7.0 und VectorNTI Advance 9.0
- NEBcutter V 2.0, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

3.2.5. Sequenzierungssoftware

- VectorNTI Suite 6.0, VectorNTI Suite 7.0 und VectorNTI Advance 9.0
- DNA Sequencing Analysis Software™ Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Version 3.6.1
- 3100 Data Collection Software™ Version Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

3.2.6. Datenbanken

- National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- enSEMBL (<http://www.ensembl.org>)
- CHIP Bioinformatics Tools (<http://www.snpper.chip.org/>)
- Celera (<http://www.celeradiscoverysystem.com/>)
- HapMap (<http://www.hapmap.org/>)
- NeoRef TAMAL (<http://neoref.ils.unc.edu/tamal/>)
- UCSC Genome Bioinformatics (<http://www.genome.ucsc.edu/>)
- Gene Regulation Biobase (<http://www.gene-regulation.com/>)
- NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>)
- Alternative Splicing Annotation Project (ASAP)
(<http://www.bioinformatics.ucla.edu/ASAP/>)
- ProSplicer (<http://www.prosplicer.mbc.nctu.edu.tw/>)
- SpliceInfo (<http://spliceinfo.mbc.nctu.edu.tw/>)
- ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>)
- European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>)
- Alzheimer Research Forum (<http://www.alzforum.org/>)

3.2.7. Statistische Programme

- Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), Version 10.0
- Haploview, Version 3.32
- STATA
- SimHap Beta Release, Version 2.1 B
- Haplo Stats, Version 1.2.1

4. Probanden

4.1. Probandenauswahl und Einschlusskriterien

Die in dieser Arbeit untersuchten Probanden wurden in Universitätskliniken in Deutschland, Italien, Schweden und Australien rekrutiert und phänotypisiert.

Bei der Probandenauswahl waren die folgenden Einschlusskriterien von Bedeutung:

1. Aus ethischen und juristischen Gründen muss für jeden Proband eine schriftliche Einverständniserklärung vorliegen. Bei den betroffenen Probanden wurde diese von ihren Betreuern unterschrieben.
2. In der Münchener Probandengruppe sind nur deutschstämmige Probanden eingeschlossen. Dadurch wurde für mögliche ethnische Unterschiede des Genotyps und des Phänotyps per Studiendesign kontrolliert.
3. Phänotypisierung auf der Grundlage der Kriterien, die in Kapitel 2.1. beschrieben wurden.

Nachfolgend wird die Probandenauswahl für die einzelnen Substudien beschrieben.

4.2. Alzheimer Studien

4.2.1. Initiale Fall-Kontroll-Studie aus München

Die Probanden für die Münchner Studiengruppe wurden in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der TUM, Klinikum rechts der Isar rekrutiert. Die Diagnose wurde nach den vorher genannten Kriterien festgestellt. Zu Beginn dieser Arbeit lag die DNA von insgesamt 679 Probanden (422 AD Patienten und 257 Kontrollen) vor und wurde zur Genotypisierung des *PLAU* Gens benutzt. Im weiteren Verlauf der Studie wurde die DNA von 24 zusätzlichen Probanden (18 AD Patienten und 6 Kontrollen) zur Verfügung gestellt und für die Genotypisierung der restlichen Gene (*CaMK2G*, *VCL*, *AP3M1* und *ST8SIA1*) verwendet.

4.2.2. Fall-Kontroll-Studien für die Replikation

Die aus dem Münchner Kollektiv identifizierten signifikanten Assoziationsergebnisse wurden in vier zusätzlichen Fall-Kontrollstudien repliziert. Für die Replikation der *PLAU* Ergebnissen wurden Probanden aus Bonn (Deutschland), Brescia (Italien) und Perth (Australien) genotypisiert und statistisch ausgewertet.

Über die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Friedrich Wilhelms Universität in Bonn wurden 282 Probanden (109 AD Patienten und 173 Kontrollen) rekrutiert, anschließend deren DNA extrahiert und im GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg bei München genotypisiert.

Die Alzheimer-Studie aus Brescia (Italien) umfasste insgesamt 219 Probanden, davon 120 AD Fälle und 99 Kontrollen. Diese wurden in der Neurologischen Klinik der Universität Brescia rekrutiert und phänotypisiert.

In der Zusammenarbeit mit Sir James McCusker Alzheimer's Disease Research Unit, Hollywood Private Hospital in Perth (Australien) und School of Psychiatry and Clinical Neurosciences, University of Western Australia in Perth wurde die DNA von 557 weiteren Probanden (219 AD Patienten und 338 Kontrollen) für die *PLAU*- Replikation zur Verfügung gestellt. Die Anzahl der genotypisierten Probanden bei den restlichen Genen wurde auf 539 reduziert (davon 224 AD Patienten und 315 Kontrollen). Grund hierfür war unzureichende DNA Menge.

Weitere 882 Probanden (252 an AD erkrankte Patienten und 630 Kontrollen) wurden in die Replikation der signifikanten Ergebnisse von zwei Genen (*CaMK2G* und *ST8SIA1*) einbezogen. Diese Probanden wurden im Karolinska Institut in Stockholm (Schweden) rekrutiert und phänotypisiert.

4.2.3. Geschwisterpaar Studie

Die Probanden für die Geschwisterpaarstudie wurden in Zusammenarbeit mit 21 Kliniken (s. Tab. 4.1.) in Bayern rekrutiert und phänotypisiert. Zusätzlich wurden Probanden durch die Presse aufgerufen, sich an der Studie zu beteiligen. Die Auswahl der Geschwisterpaare erfolgte anhand mindestens eines erkrankten Geschwisters, bei dem AD nach NINCDS-ADRDA Kriterien diagnostiziert wurde.

In der Replikationsanalyse wurden 287 Familien mit insgesamt 745 Probanden (davon 301 AD Patienten und 444 gesunde Geschwister) erfasst.

1.	Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der TUM, Klinikum rechts der Isar
2.	Psychiatrische Klinik, Agatharied
3.	Bezirkskrankenhaus Ansbach, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
4.	Psychiatrische Klinik, Bezirkskrankenhaus Augsburg
5.	Neurologische Klinik, Bad Aibling
6.	Bezirkskrankenhaus Bayreuth, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
7.	Klinik für Psychiatrie, Bezirkskrankenhaus Gabersee
8.	Bezirkskrankenhaus Günzburg, Fachkrankenhaus für Psychiatrie
9.	Psychiatrische Klinik am Klinikum Ingolstadt
10.	Bezirkskrankenhaus Kaufbeuren, Fachkrankenhaus für Psychiatrie
11.	Bezirkskrankenhaus Landshut, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
12.	Bezirkskrankenhaus Lohr am Main, Krankenhaus für Psychiatrie und Psychotherapie
13.	Psychiatrische Klinik, Bezirksklinikum Mainkofen
14.	Neurologische Klinik, Städt. Krankenhaus Bogenhausen in München
15.	Abteilung für Akutgeriatrie, Krankenhaus Neuperlach in München
16.	Klinik und Poliklinik für Psychiatrie der Universität Regensburg
17.	Bezirkskrankenhaus Taufkirchen
18.	Universitätsklinikum Ulm, Poliklinik für Neurologie
19.	Bezirkskrankenhaus Schloss Werneck
20.	Bezirkskrankenhaus Haar in München
21.	Universitätsklinik Freiburg

Tab. 4.1.: Die beteiligten Kliniken an der Geschwisterpaarstudie.

5. Ergebnisse

5.1. Analyse der SNPs auf dem Chromosom 10

5.1.1. Genotypisierung der SNPs auf dem Chromosom 10

In dieser Arbeit wurden 93 SNPs in dem ca. 362 kb großen chromosomalen Bereich 10q22-10q23 auf eine Assoziation mit AD getestet (Abb. 5.1., Tab. 5.1.). Die Analyse wurde in zwei Schritten durchgeführt. Nachdem die erste statistische Analyse, die 36 *PLAU*-SNPs umfasste, auf eine starke Assoziation zwischen dem funktionellen SNP rs2227564 im Exon 6 und AD hinwies, wurden auch die SNPs in den benachbarten Genen *CaMK2G*, *VCL* und *AP3M1* analysiert. Ziel war es, die LD-Blockgrenzen zu bestimmen und eventuelle neue kausale SNPs zu finden. Der Abstand zwischen den genotypisierten exonischen SNPs betrug ca. 200 Basen, bzw. ca. 2 bis 10 kb zwischen den intronischen SNPs (s. Abb. 5.1. und Tab. 5.1.).

Ch10: 75224547 - 75586867

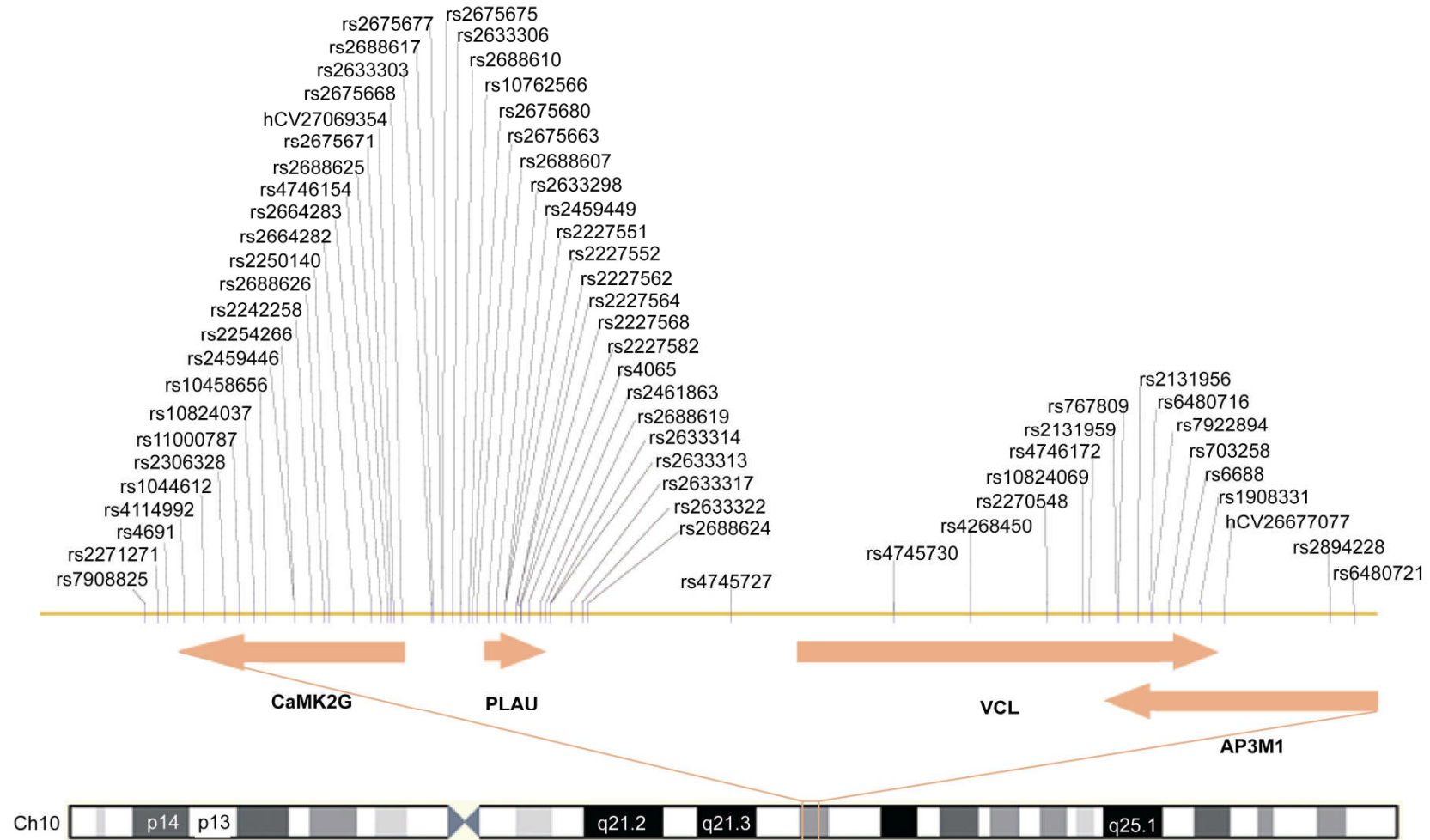


Abb. 5.1.: Schematische Darstellung der genotypisierten Region auf dem Chromosom 10. Hier werden nur polymorphe SNPs dargestellt.

Gen	SNP ID NCBI	SNP ID Celera	Position build 123	Position im Gen	Typ
<i>CaMK2G</i>	rs7908825		75224547	3' UTR	G/C
	rs2271271		75228873	3' UTR	A/G
	rs4691		75231922	3' UTR	T/C
	rs4114992		75236835	3' UTR	A/G
	rs1044612	hCV7464706	75242917	Exon 21	C/T
	rs2306328	hCV3114927	75249516	Intron 17	T/C
	rs11000787	hCV3114928	75254389	Intron 15	C/T
	rs10824037	hCV11640055	75258884	Intron 14	G/A
	rs10458656	hCV3114929	75262668	Intron 14	A/G
	rs2459446	hCV3114937	75271602	Intron 12	C/T
	rs2254266	hCV11640060	75271694	Intron 12	T/C
	rs2242258	hCV16273470	75277174	I9 - E10 boundary	T/C
	rs2688626	hCV1547760	75281096	Intron 5	A/G
	rs2250140	hCV16054232	75282887	I4 – E4 boundary	C/T
	rs2664282	hCV16269462	75290763	Intron 2	C/T
	rs2664283	hCV16269463	75296379	Intron 2	C/T
	rs4746154	hCV28026538	75299402	Intron 2	G/A
	rs2688625	hCV16054242	75301554	Intron 2	C/T
	rs2675671	hCV27069353	75302766	Exon 2	T/C
		hCV27069354	75303245	Intron 1	T/C
rs2675668		75306154	Promotor	A/G	
	rs2633303		75315888	Intergenische Region	T/G
	rs2688617		75316153	Intergenische Region	T/A
	rs2675677		75318255	Intergenische Region	A/C
	rs2675675		75319054	Intergenische Region	A/G
	rs2633306		75322453	Intergenische Region	C/A
	rs2688611		75323378	Intergenische Region	T/G
	rs2688610		75324937	Intergenische Region	A/G
	rs10762566		75327866	Intergenische Region	G/A
	rs2675680		75328870	Intergenische Region	C/T
	rs2675663		75330276	Intergenische Region	G/T
<i>PLAU</i>	rs2688607		75333742	Promotor	G/A
	rs2633298		75336345	Promotor	G/C
	rs2459449	hCV16240074	75339019	Promotor	C/T
	rs2227551	hCV16273464	75339196	Promotor	T/G
	rs2227552	hCV3155396	75339325	Promotor	T/C
	rs2227579	hCV15956025	75341295	Exon 2	C/T
	rs2227580	hCV15956024	75341362	Exon2, Coding Seq	G/T
	rs1916340	hCV11458603	75341404	I2/E3 boundary	G/T
	rs2227581	hCV25473009	75341881	I3/E4 boundary	G/A
	rs2227557	hCV15955960	75342236	Intron 4	C/T
	rs2227561	hCV26165615	75342591	I4 - E5 boundary	G/A
	rs2227562	hCV15962130	75342967	I5 - E6 boundary	G/A
	rs2227564	hCV26165616	75343107	Exon6, Coding Seq	C/T
	rs1050120		75343484	Exon7, Coding Seq	C/G
	rs2227567	hCV26165618	75343754	Exon8, Coding Seq	A/C

	rs2227568	hCV26165619	75343885	Exon8, Coding Seq	C/T
	rs2227582	hCV15956015	75344258	Intron 8	T/C
		hCV3155394	75344555	Exon 9	G/A
	rs1050122		75345124	Exon10, Coding Seq	G/A
	rs3805118	hCV27491394	75346226	Exon11, Coding Seq	G/T
	rs4065	hCV3155393	75346470	Exon 11	T/C
	rs2461863		75350242	3'UTR	T/C
	rs2688619		75352182	3'UTR	G/A
	rs2633314		75353596	3'UTR	T/C
	rs2633313		75353871	3'UTR	T/C
	rs2633317		75360274	Intergenische Region	G/A
	rs2633322		75363938	Intergenische Region	C/T
	rs2633323		75364832	Intergenische Region	A/G
	rs2688624		75365730	Intergenische Region	G/T
	rs7098545		75375433	Intergenische Region	A/G
	rs7072422		75381839	Intergenische Region	G/A
	rs4007235		75388554	Intergenische Region	T/A
	rs4745727		75411463	Intergenische Region	A/G
VCL	rs7914216		75426186	Promotor	G/A
	rs11814544	hCV473025	75435723	Intron 1	C/G
	rs7075862		75453139	Intron 1	A/G
	rs4745730	hCV377375	75463378	Intron 1	C/T
	rs4268450	hCV48406	75488081	Intron 2	A/T
	rs7894127	hCV28957060	75499530	Intron 2	G/A
		hCV16171062	75504652	Exon 6	T/C
	rs2270548	hCV15957824	75512158	I6 - E7 boundary	G/A
	rs1908339	hCV11476782	75513106	I7 – E8 boundary	A/T
	rs10824069	hCV2025438	75523802	Intron 10	T/C
	rs7904077		75524224	Exon 11	C/T
	rs4746172		75525848	Intron 12	T/C
	rs2131959	hCV2025443	75534378	Intron 15	C/G
rs767809	hCV8726778	75535071	Exon 16	A/G	
VCL/AP3MI	rs2131956	hCV25473551	75541741	Intron 18 / 3'UTR	G/C
		hCV2025446	75542757	Intron 18/ 3'UTR	C/T
	rs1874148	hCV11476998	75544421	Intron 19 / 3'UTR	A/G
	rs6480716	hCV28954212	75545800	Intron 20 / 3'UTR	G/A
	rs7922894	hCV2025452	75546015	Intron 20 / 3'UTR	T/C
	rs703258	hCV2025454	75549517	Exon 21 / 3'UTR	A/T
	rs6688	hCV2025461	75551682	3'UTR / Exon 10	A/G
	rs1908331	hCV11477009	75555823	3'UTR / I8-E8 bound	G/A
	rs2270549	hCV15957872	75555885	3'UTR / I8-E8 bound	C/G
AP3MI		hCV26677077	75559909	Intron 5	G/A
		hCV25936664	75563640	Intron 5	G/A
	rs6480720	hCV29196795	75575618	Intron 1 / Prom ADK	G/A
	rs3829129	hCV27523068	75580567	Exon 1	G/A
	rs2894228		75582637	Promotor	C/T
	rs6480721		75586867	Promotor	A/G

Tab. 5.1: Ausgewählte SNPs auf dem Chromosom 10. Monomorphe SNPs sind grau markiert. SNPs rs2227579, rs2633323 und rs2688611 wurden keine ausreichende Genotypisierungseffizienz erzielt und deshalb wurden sie aus den sich anschließenden statistischen Tests ausgeschlossen.

5.1.1.1. *PLAU*

Das *PLAU* Gen befindet sich in der Region 10q24 und erstreckt sich über einen ca. 6,5 kb-großen Bereich. Es besteht aus 11 Exons und wird in die Richtung des Telomers transkribiert. *PLAU* ist an der Prozessierung des Plasmins beteiligt und damit für den Abbau des A β zuständig. Demzufolge wurde *PLAU* als ein funktionelles Kandidatengen für AD diskutiert. Nach mehreren Datenbankrecherchen wurden 36 SNPs ausgewählt, von denen 23 SNPs im Münchner Kollektiv als polymorph bestätigt wurden und eine ausreichende Genotypisierungseffizienz (GE) erzielten (Abb. 5.2., Tab. 5.2.). Abweichungen vom HWE waren nicht festzustellen, so dass kein Hinweis auf mögliche Genotypisierungsfehler vorliegt. Der anschließende allelische Test wies auf eine Assoziation zwischen mehreren SNPs und AD hin. Das stärkste Assoziationssignal war für den exonischen SNP rs2227564 zu finden ($p=0,02$). Eine detaillierte Analyse nach dem Erkrankungsalter (Age of Onset) zeigte bei den Patienten mit EOAD einen steigenden p-Wert von 0,001. Jedoch war keine Signifikanz bei Patienten mit LOAD nachweisbar ($p=0,517$). Das Risikoallel für den SNP rs2227564 war das Minor Allel T. Weitere signifikante p-Werte wurden bei den SNPs rs2227562 im Intron 5 ($p=0,019$) und rs2227568 im Exon 8 ($p=0,033$) nachgewiesen. Im Gegensatz zum SNP rs2227564, zeigten die SNPs rs2227562 und rs2227568 in den detaillierteren Analysen nur bei den Patienten mit LOAD signifikante p-Werte ($p=0,04$ für der SNP rs2227562 und $p=0,05$ für den SNP rs2227568). Zudem wurden bei beiden SNPs Major Allele (G bzw. C) als Risikoallele bestätigt. Diese Allele zeigten eine Risikovariante mit einer Frequenz von ca. 86% bzw. eine seltene Schutzvariante mit einer Frequenz von ca. 14%. In der 3'UTR Region zeigten drei SNPs (rs2461863, rs2688619 und rs2633313) eine Assoziation mit AD. Diese war bei den LOAD Probanden deutlicher ausgeprägt und wurde durch das Major Allel verursacht.

Die Ergebnisse des allelischen Tests für alle genotypisierten SNPs im Münchner Kollektiv sind in der Tabelle 5.2. dargestellt.

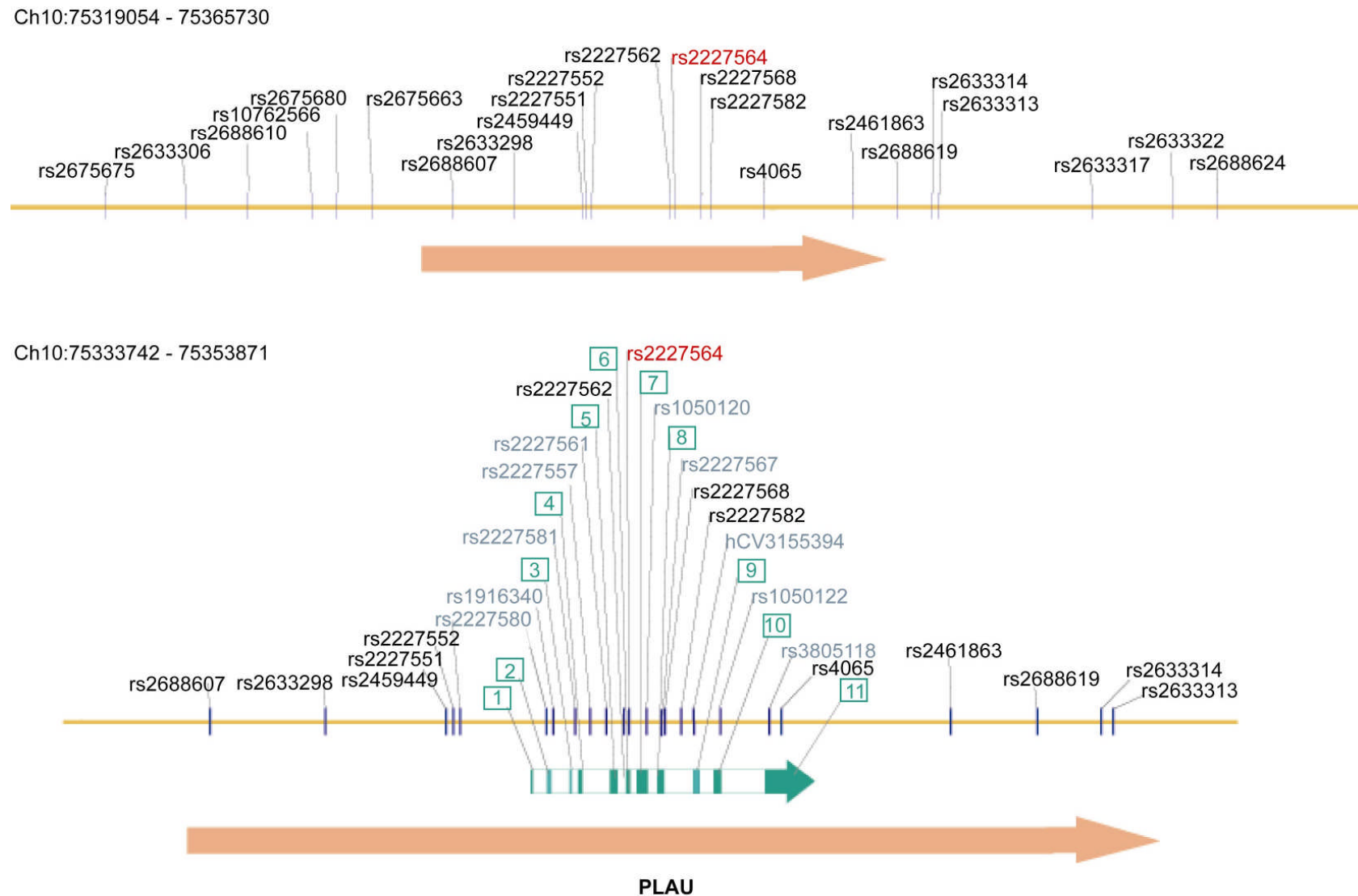


Abb. 5.2.: Schematische Darstellung des *PLAU* Gens. Auf der Abbildung sind die Exons mit grünen Balken dargestellt. Der signifikante SNP rs2227564 wurde rot markiert, restliche polymorphe SNPs schwarz und die monomorphen SNPs grau.

SNP ID	Minor Allel v (Ko./Fälle)	GE (%)	HWE	p-Wert für das gesamte Kollektiv	p-Wert für EOAD	p-Wert für LOAD
rs2675675	0,251 / 0,234	95,8	0,101	0,490	0,947	0,366
rs2633306	0,255 / 0,251	97,1	0,232	0,879	0,670	0,728
rs2688610	0,480 / 0,409	95,4	0,571	0,012 (A); 1,34 [1,07-1,67]	0,492	0,013 (A); 1,51 [1,1-2,1]
rs10762566	0,248 / 0,235	98,7	0,128	0,574	0,937	0,503
rs2675680	0,471 / 0,411	95,7	0,433	0,032 (C); 1,27 [1,02-1,59]	0,968	0,01 (C); 1,5 [1,1-2,0]
rs2675663	0,480 / 0,426	95,7	0,493	0,042 (G); 1,26 [1,01-1,57]	0,905	0,009 (G); 1,5 [1,1-2,0]
rs2688607	0,247 / 0,236	98,1	0,128	0,6402	0,808	0,596
rs2633298	0,271 / 0,277	97,4	0,075	0,8159	0,474	0,998
rs2459449	0,278 / 0,264	96,6	0,072	0,5708	0,901	0,394
rs2227551	0,268 / 0,265	94,1	0,083	0,9021	0,759	0,739
rs2227552	0,289 / 0,271	90,7	0,054	0,698	0,698	0,481
rs2227562	0,184 / 0,136	97,6	0,851	0,019 (G); 1,47 [1,09-1,98]	0,072	0,042 (G); 1,5 [1,01-2,2]
rs2227564	0,218 / 0,282	91,5	0,133	0,020 (T); 1,37 [1,05-1,78]	0,001 (T); 1,91 [1,3-2,8]	0,517
rs2227568	0,174 / 0,124	95,3	0,196	0,033 (C); 1,37 [1,03-1,84]	0,173	0,05 (C); 1,47 [1,09-2,1]
rs2227582	0,010 / 0,012	95,3	1,0	0,7139	0,914	0,678
rs4065	0,438 / 0,401	92,8	0,532	0,1883	0,912	0,115
rs2461863	0,444 / 0,380	97,7	1,0	0,018 (T); 1,31 [1,04-1,65]	0,647	0,007 (T); 1,6 [1,2-2,24]
rs2688619	0,469 / 0,407	90,7	0,764	0,034 (G); 1,28 [1,02-1,61]	0,813	0,008 (G); 1,54 [1,1-2,14]
rs2633314	0,455 / 0,405	98,1	0,845	0,068	0,403	0,09
rs2633313	0,451 / 0,397	98,0	0,912	0,049 (T); 1,26 [1,01-1,58]	0,659	0,029 (T); 1,42 [1,03-1,95]
rs2633317	0,441 / 0,387	95,8	0,333	0,053	0,375	0,028 (G); 1,41 [1,04-1,9]
rs2633322	0,258 / 0,243	98,6	0,769	0,526	0,156	0,323
rs2688624	0,262 / 0,216	90,1	0,809	0,061	0,739	0,011 (G); 1,59 [1,1-2,23]

Tab. 5.2.: Ergebnisse des Allelischen Tests (Logistische Regression mit Kovariaten Erkrankungsalter (Age of Onset) und Geschlecht) für das *PLAU* Gen. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. OR mit 95% CI wurde für signifikante SNPs dargestellt. Ergebnisse, die nach der Korrektur für multiples Testen eine statistisch signifikante Assoziation mit AD zeigten, wurden kursiv dargestellt.

Das globale Signifikanzniveau für alle statistischen Tests wurde auf $\alpha=5\%$ festgelegt. Aufgrund der vorliegenden multiplen Testproblematik wurde eine Bonferroni-Adjustierung des globalen Signifikanzniveaus vorgenommen, d.h., das globale Signifikanzniveau wurde durch die Anzahl der durchgeführten statistischen Tests des multiplen Modells dividiert. Dies resultierte in einem lokalen Signifikanzniveau $\alpha^*=0,05/23=0,0022$; d.h., Risikofaktoren mit einem p-Wert von $p\leq 0,0022$ konnten als statistisch signifikante Testergebnisse interpretiert werden. In diesem Zusammenhang blieb der p-Wert von 0,001 für den SNP rs2227564 in der EOAD-Supgruppe auch nach der Korrektur auf dem 5% Niveau signifikant erhalten.

In der genotypisierten Region wurden 5 LD-Blöcke identifiziert (Abb. 5.3.) und in diesen anschließend die Haplotypen geschätzt (Tab. 5.3.). Die signifikanten Marker rs2227562 und rs2227568 befinden sich in den Blöcken 3, bzw. 4. Der funktionelle SNP rs2227564 liegt in einer „Break Point“ Region zwischen den oben genannten Blöcken und zeigt keine Korrelation mit den benachbarten SNPs (der paarweise Vergleich mit rs2227562: $r^2=0,036$, $D'=0,73$ und rs2227568: $r^2=0,025$; $D'=0,63$).

Innerhalb des Blocks 3 wurden drei Haplotypen geschätzt. Der am meisten vorkommende Haplotyp zeigt keine Assoziation mit AD ($p=0,054$). Jedoch wies der seltenste Haplotyp (Frequenz von 18,1% bei den Kontrollen und 13,4% bei den Fällen) auf eine Assoziation mit AD hin ($p=0,017$). Im Block 4 wurden vier Haplotypen berechnet. Der Haplotyp 4.3 mit der Frequenz von 16,8% bei den Kontrollen, bzw. 12% bei den Fällen zeigte einen signifikanten p-Wert von 0,014. Nach einer Korrektur für multiples Testen waren diese Assoziationen jedoch nicht mehr signifikant.

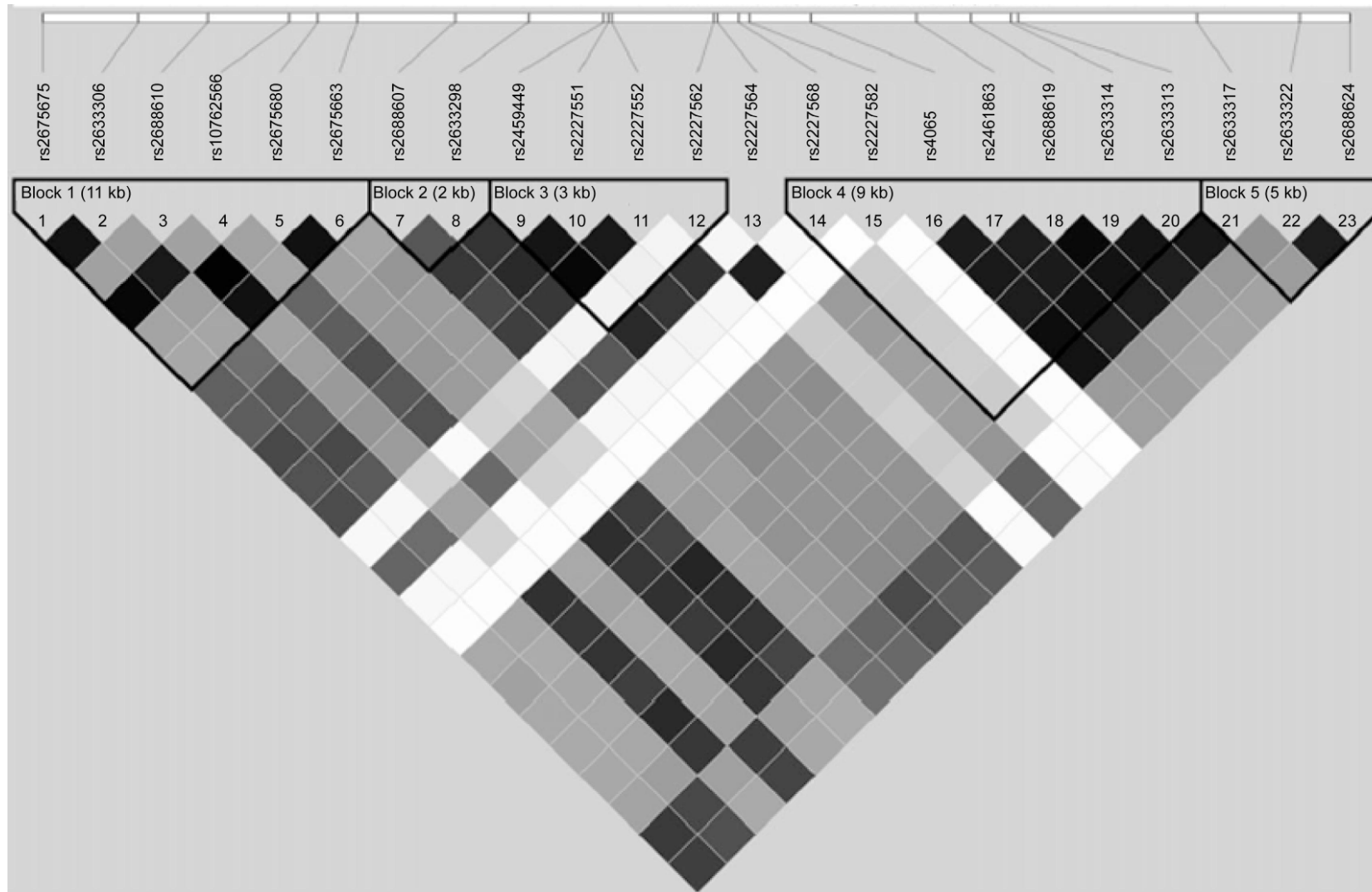


Abb. 5.3.: LD-Struktur im *PLAU*. Quadrierte Korrelationskoeffizienten sind für jedes Paar von SNP Loci mittels Softwarepaket Haploview berechnet und farbkodiert dargestellt: schwarz, hoher r^2 Wert; weiß, niedriger r^2 Wert. Haplotyp-Blöcke, bezeichnet durch die hohe D' Werte, sind zugefügt.

Block	Haplotyp ID	Sequenz	Frequenz (Kontrollen/Fälle)	p-Wert
1	1.1	ACAGCG	0,516 / 0,572	0,0441 (0,7938)
	1.2	GAGATT	0,244 / 0,236	0,7227
	1.3	ACGGTT	0,217 / 0,162	0,0124 (0,2232)
	1.4	ACAGCT	0,008 / 0,014	0,2884
2	2.1	GG	0,717 / 0,711	0,8356
	2.2	AC	0,236 / 0,230	0,7922
	2.3	GC	0,037 / 0,052	0,1975
3	3.1	CTTG	0,537 / 0,590	0,0538
	3.2	TGCG	0,268 / 0,255	0,5938
	3.3	CTTA	0,181 / 0,134	0,0171 (0,3078)
4	4.1	CTTTGTT	0,526 / 0,572	0,0953
	4.2	CTCCACC	0,270 / 0,260	0,6679
	4.3	TTCCACC	0,168 / 0,120	0,0139 (0,2502)
	4.4	CCTTGTT	0,010 / 0,012	0,7208
5	5.1	GCG	0,558 / 0,604	0,0920
	5.2	ATT	0,249 / 0,229	0,3883
	5.3	ACG	0,180 / 0,147	0,1009
	5.4	ATG	0,009 / 0,017	0,2083

Tab. 5.3.: Haplotypberechnung für *PLAU*. Adjustierte p-Werte nach Bonferroni: siehe Werte in Klammer.

Die anschließende Dreilocushaplotypenanalyse brachte verstärkt Hinweise auf eine Assoziation in zwei Regionen (Abb. 5.4.). Die stärksten Assoziationssignale zeigten sich in der „Break Point“ Region für die Haplotypen 11.3 (Marker: rs2227552, rs2227562 und rs2227564; $p=0,0061$), 11.4 ($p=0,0007$), 12.3 (Marker: rs2227562, rs2227564, rs2227568; $p=0,0039$) und 13.3 (Marker: rs2227564, rs2227568, rs2227582; $p=0,0039$). Haplotyp 11.4 kommt in 0,7% der Fälle bzw. in 3% der Kontrollen vor und liegt damit unter 5%. Aus diesem Grund wurde er bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse (Abb. 5.4.) ausgeschlossen.

Der zweite Hinweis auf Assoziation wurde in der intergenischen (*CaMK2G/PLAU*) Region für die Haplotypen 1.3 (Marker: rs2675675, rs2633306, rs2688610; $p=0,0036$) und 2.3 (Marker: rs2633306, rs2688610, rs10762566; $p=0,0047$) identifiziert. Ausführliche Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse befinden sich im Anhang (Tab. 7.2.).

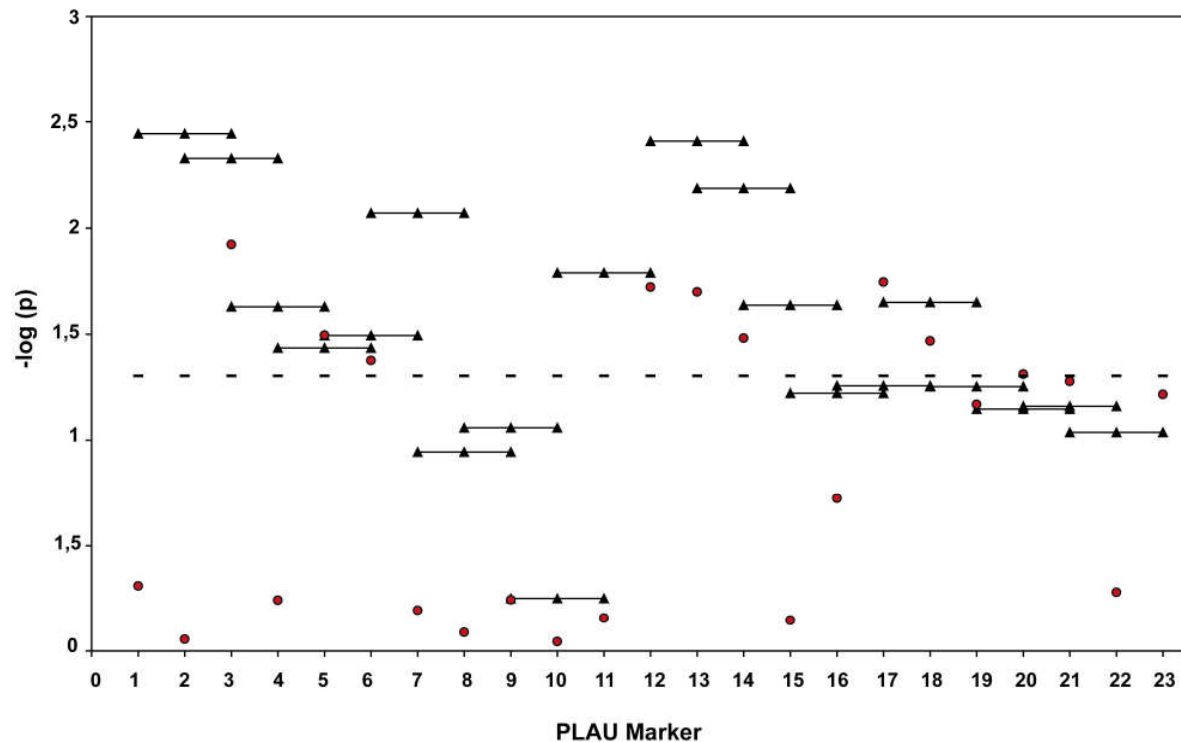


Abb. 5.4.: Drei-Locusanalyse von SNPs im *PLAU*.

Die Ergebnisse der Einzelmarker-, bzw. Dreilocushaplotypenanalyse wurden in dem folgenden Genotypentest bestätigt. Für den funktionellen *PLAU* SNP rs2227564 wurde ein signifikanter p-Wert von 0,02 erzielt.

5.1.1.1.1. Überprüfung der Assoziationsergebnisse in unabhängigen Studien

Zur Bestätigung der Assoziationsergebnisse wurden die signifikant assoziierten SNPs in unabhängigen Studien reanalysiert. Im Rahmen dieser Arbeit stand die DNA aus drei unabhängigen Fall-Kontroll Studien (aus Deutschland, Italien und Australien) und einer diskordanten Geschwisterpaarstudie aus Deutschland zur Verfügung.

Die Replikation des SNPs rs2227564 in allen vier zusätzlichen Studien bestätigte die Ergebnisse aus dem Münchner Kollektiv (Tab. 5.4.). Wegen der eingeschränkten Probandenanzahl wurden signifikante Werte in den Studien aus Bonn und Brescia nur bezüglich der gesamten Stichprobe erzielt ($p=0,005$ für das Kollektiv aus Bonn, bzw. $p=0,004$ für das Kollektiv aus Brescia).

In der australischen Studie war die Signifikanz ähnlich wie in der Münchner Studie, bei jüngeren Patienten signifikant erhöht ($p=0,009$ für das gesamte Kollektiv und $p=0,001$ für die Patienten unter 80 Jahren). Aufgrund der relativ kleinen Anzahl der EOAD Patienten,

wurde dieses Kollektiv nicht auf EOAD und LOAD, sondern in zwei gleich große Subgruppen unterteilt. Die erste Subgruppe umfasste die Probanden im Alter von max. 80 Jahren und die zweite Subgruppe die Probanden im Alter über 80 Jahre.

Auch bei den erkrankten Probanden aus der Geschwisterpaarstudie wurde ein signifikanter Überschuss des Risikoallels mittels S-TDT Test nachgewiesen ($p=0,001$).

Kollektiv	N	Alter	Allelfrequenz (%)			Genotypen (%), p-Wert und Odds ratio [95% CI]				
			C	T	p-Wert	CC	CT	p-Wert	TT	p-Wert
München										
AD	422	69,1 ± 9,4	0,72	0,28	0,022	0,51	0,42	0,247	0,06	0,069
EOAD	140	59,4 ± 5,6	0,70	0,30	0,001	0,47	0,46	0,023 ; OR=1,7 [1,1-2,6]	0,07	0,029 ; OR=3,0 [1,1-8,0]
Kontrollen	257	68,8 ± 13,1	0,78	0,22		0,59	0,38		0,03	
Bonn										
AD	109	74,8 ± 6,4	0,76	0,24	0,005	0,59	0,34	0,02 ; OR=1,9 [1,1-3,3]	0,07	0,026 ; OR=3,7 [1,1-11,9]
Kontrollen	173	75,1 ± 8,6	0,85	0,15		0,73	0,24		0,03	
Brescia										
AD	120	67,3 ± 8,5	0,79	0,21	0,004	0,64	0,30	0,002 ; OR=3,2 [1,5-6,9]	0,06	0,059 ; OR=8,7 [0,9-82]
Kontrollen	99	64,6 ± 7,2	0,92	0,08		0,86	0,13		0,01	
Perth										
AD	219	74,3 ± 10,7	0,72	0,28	0,009	0,53	0,39	0,01	0,08	0,08
AD ≥ 80 J	104	84,2 ± 3,7	0,78	0,22	n.s.	0,63	0,32	n.s.	0,05	n.s.
AD ≤ 80	115	65,7 ± 9,5	0,67	0,33	0,001	0,45	0,42	0,001 ; OR=2,4 [1,4-4,2]	0,13	0,01 ; OR=2,9 [1,3-7,1]
Kontrollen	338	77,1 ± 10,6	0,81	0,19		0,66	0,29		0,05	
Dis. SIBs										
AD	251	67,1 ± 8,8	0,72	0,28	0,001	0,49	0,44		0,08	
Kontrollen	371	64,8 ± 11,5	0,81	0,19		0,68	0,28		0,04	

Tab. 5.4.: Replikationsergebnisse für *PLAU* SNP rs2227564 aus unabhängigen Studien (n.s. = nicht signifikant).

5.1.1.1.2. Sequenzierung des Exons 6 mit der anschließenden Genotypisierung

Der funktionelle SNP rs2227564 (C/T Leu → Pro), der eine starke Assoziation mit AD zeigte ist im Exon 6 lokalisiert. Um die weiteren kausalen SNPs, die eventuell zum Auslösen oder zum progradienten Verlauf der Krankheit beisteuern, identifizieren zu können, wurde das Exon 6 sequenziert. Mittels PCR Primer wurde die 262 bp-lange Region amplifiziert und danach von beiden Seiten sequenziert. Insgesamt wurden PCR Produkte von 160 Probanden aus dem Münchner Kollektiv (80 Alzheimer Patienten und 80 Kontrollen) sequenziert. Die Chromatogramme wurden anschließend mittels Sequenzanalysesoftwarepakets von VNTI (AlignX und ContigExpress) analysiert und ausgewertet. Dabei wurde eine seltene funktionelle DNA Variation (C/T His → Tyr) identifiziert. Diese liegt auch im Exon 6, 23 bp von dem SNP rs2227564 in die Richtung 3' UTR entfernt (Abb. 5.5.). Die anschließende Genotypisierung dieser Variation in den Kohorten aus München und Australien sowie im Geschwisterpaar Kollektiv zeigte keine Assoziation mit AD.

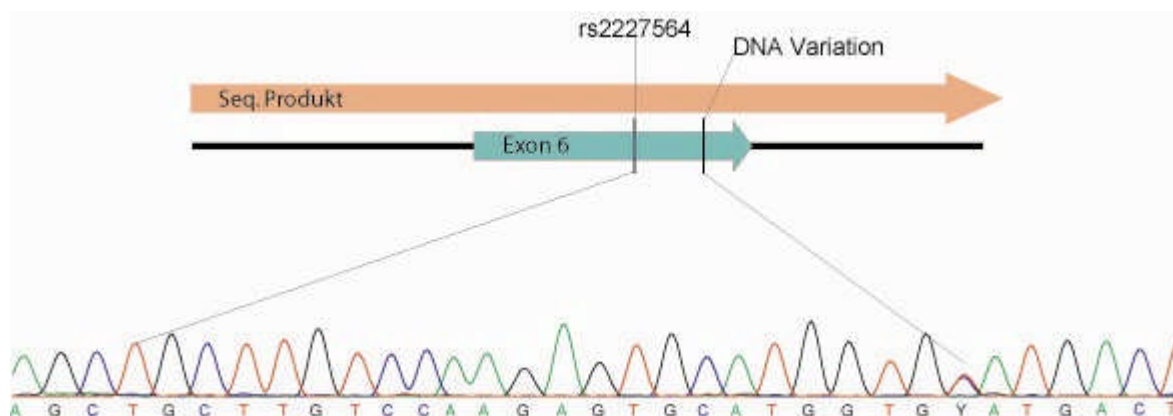


Abb. 5.5.: Sequenzierung des Exons 6 im *PLAU*. Zusätzliche funktionelle DNA Variation (C/T His → Tyr) im Exon 6 wurde identifiziert.

5.1.1.2. *CaMK2G*

CaMK2G (Abb. 5.6.) umfasst einen 62 kb-großen Bereich auf dem Ch10q22, zwischen 75,24 und 75,30 Mb. Dieses Gen besteht aus 21 Exons und wird in Richtung Zentromer transkribiert. Alle ausgewählten SNPs (Tab. 5.1.) wurden im Münchner Kollektiv als polymorph bestätigt und erzielten ausreichende Genotypisierungseffizienz. Nach der Auswertung der Genotypisierungsergebnissen war keine signifikante Abweichung vom HWE festzustellen. Die stärkste Signifikanz bei dem anschließenden allelischen Test wurde für die SNPs rs4746154 im Intron 2 ($p=0,005$) und rs10458656 im Intron 14 ($p=0,002$) nachgewiesen. Die Ergebnisse für die weiteren 8 signifikanten SNPs (rs4114992, rs2459446, rs2254266, rs2250140, rs2664282, rs2688625, rs2675671 und rs2675668) sind in der Tabelle 5.5. dargestellt. Bei allen signifikanten SNPs wurde das Major Allel als Risikoallel bestätigt. Eine detaillierte Analyse im Hinblick auf Erkrankungsalter (Age of Onset) wies auf eine Signifikanz für den SNP rs10458656 bei der EOAD Subgruppe ($p=0,01$) hin. Die restlichen SNPs zeigten weder bei EOAD noch bei LOAD eine Assoziation mit AD.

Ch10: 75224547 - 75318255

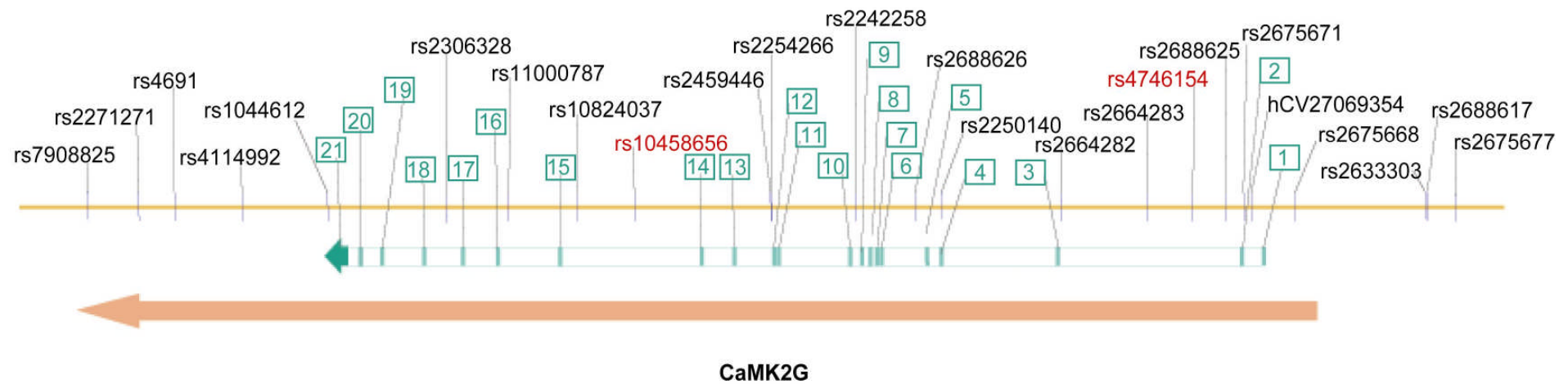


Abb. 5.6.: Schematische Darstellung des *CaMK2G* Gens. Auf der Abbildung sind die Exons mit grünen Balken dargestellt. Die rot markierten SNPs zeigen die stärksten Assoziationssignale.

SNP ID	Minor Allel v (Ko./Fälle)	GE (%)	HWE	p-Wert für das gesamte Kollektiv	p-Wert für EOAD	p-Wert für LOAD
rs7908825	0,406 / 0,391	99,3	1,0	0,472	0,764	0,932
rs2271271	0,257 / 0,269	98,1	1,0	0,845	0,355	0,938
rs4691	0,244 / 0,259	98,1	0,636	0,748	0,580	0,597
rs4114992	0,161 / 0,118	95,6	0,629	0,028 (A); 1,44 [1,04-1,98]	0,100	0,272
rs1044612	0,031 / 0,021	93,3	1,0	0,423	0,613	0,838
rs2306328	0,414 / 0,373	93,0	0,196	0,094	0,685	0,247
rs11000787	0,259 / 0,265	97,0	0,852	0,968	0,833	0,686
rs10824037	0,249 / 0,208	92,7	0,161	0,104	0,411	0,412
rs10458656	0,248 / 0,176	95,0	0,305	0,002 (A); 1,53 [1,17-2,02]	0,010 (A); 1,77 [1,15-2,72]	0,176
rs2459446	0,469 / 0,408	96,4	0,509	0,015 (C); 1,32 [1,06-1,66]	0,417	0,150
rs2254266	0,215 / 0,165	92,5	0,887	0,034 (T); 1,37 [1,02-1,83]	0,343	0,182
rs2242258	0,238 / 0,244	96,3	0,309	0,868	0,532	0,908
rs2688626	0,236 / 0,240	97,3	0,208	0,767	0,852	0,783
rs2250140	0,472 / 0,413	95,3	0,210	0,019 (C); 1,31 [1,05-1,65]	0,417	0,240
rs2664282	0,470 / 0,410	95,1	0,058	0,018 (C); 1,32 [1,05-1,66]	0,360	0,193
rs2664283	0,052 / 0,049	98,1	1,0	0,621	0,455	0,267
rs4746154	0,236 / 0,170	94,3	0,680	0,005 (G); 1,5 [1,13-1,99]	0,092	0,069
rs2688625	0,476 / 0,417	97,8	0,316	0,018 (C); 1,31 [1,05-1,64]	0,243	0,322
rs2675671	0,472 / 0,415	95,3	0,539	0,020 (T); 1,31 [1,04-1,65]	0,233	0,293
hCV27069354	0,047 / 0,057	96,4	0,842	0,546	0,645	0,947
rs2675668	0,478 / 0,419	98,3	0,187	0,017 (A); 1,32 [1,05-1,65]	0,229	0,303
rs2633303	0,246 / 0,232	89,4	0,443	0,392	0,543	0,393
rs2688617	0,247 / 0,238	87,1	0,157	0,515	0,463	0,517
rs2675677	0,247 / 0,255	95,8	0,094	0,966	0,303	0,877

Tab. 5.5.: Ergebnisse des Allelischen Tests (Logistische Regression mit Kovariaten Erkrankungsalter (Age of Onset) und Geschlecht) für das *CaMK2G* Gen. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. OR mit 95% CI wurde für signifikante SNPs dargestellt. Ergebnisse, die nach der Korrektur für multiples Testen eine statistisch signifikante Assoziation mit AD zeigten, wurden kursiv dargestellt.

Anschließend wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert. Dieser Test zeigte, dass auf dem 5% Niveau nur diejenigen Ergebnisse signifikant waren, die ein lokales Signifikanzniveau von $p \leq 0,0021$ ($0,05/24=0,0021$) aufwiesen.

Für die analysierten SNPs wurden 4 LD-Blöcke identifiziert (Abb. 5.7.). Zwei SNPs, die bei dem allelischen Test starke Assoziation mit AD zeigten (rs10458656 und rs4746154), liegen in den Blöcken 2 bzw. 3 (SNP rs10458656: der paarweise Vergleich mit rs10824037 $r^2=0,652$, $D'=0,85$; SNP rs4746154 befindet sich in einem starken LD mit benachbarten SNPs und zeigt einen hohen Lewontin's disequilibrium Koeffizient von $>0,99$). Weiterhin wurden innerhalb der LD-Blöcke die Haplotypen geschätzt (Tab. 5.6.). Die häufigsten Haplotypen in den Blöcken 1 und 3 zeigten keine signifikante Werte ($p=0,2433$ für den Haplotyp 1.1 und $p=0,1307$ für den Haplotyp 3.1). In beiden Blöcken wurde je ein signifikanter p-Wert berechnet. Der Haplotyp 1.3 im ersten Block (Frequenz von 15,7% bei den Kontrollen und 11,8% bei den Fällen) zeigte einen knapp signifikanten p-Wert von 0,0431. Im Block 2 wurden für die Haplotypen 2.1 (71,7% bei den Kontrollen und 78,1% bei den Fällen) und 2.2 (21,4% bei den Kontrollen und 15,6% bei den Fällen) signifikante p-Werte von 0,0072 bzw. 0,0068 erzielt. Die stärkste Signifikanz wurde bei dem Haplotyp 3.3 nachgewiesen ($p=0,0017$). Dieser kommt bei 22,4% der Kontrollen und in 15,6% der Fälle vor und bleibt als einziger nach einer Korrektur für multiples Testen auf dem 5% Niveau signifikant erhalten. In dem vierten Block zeigten die Haplotypen 4.1 (51,4% bei den Kontrollen und 57% bei den Fällen) und 4.3 (23,3% bei den Kontrollen und 17,2% bei den Fällen) signifikante p-Werte ($p=0,0422$ für den Haplotyp 4.1, bzw. $p=0,0057$ für den Haplotyp 4.3).

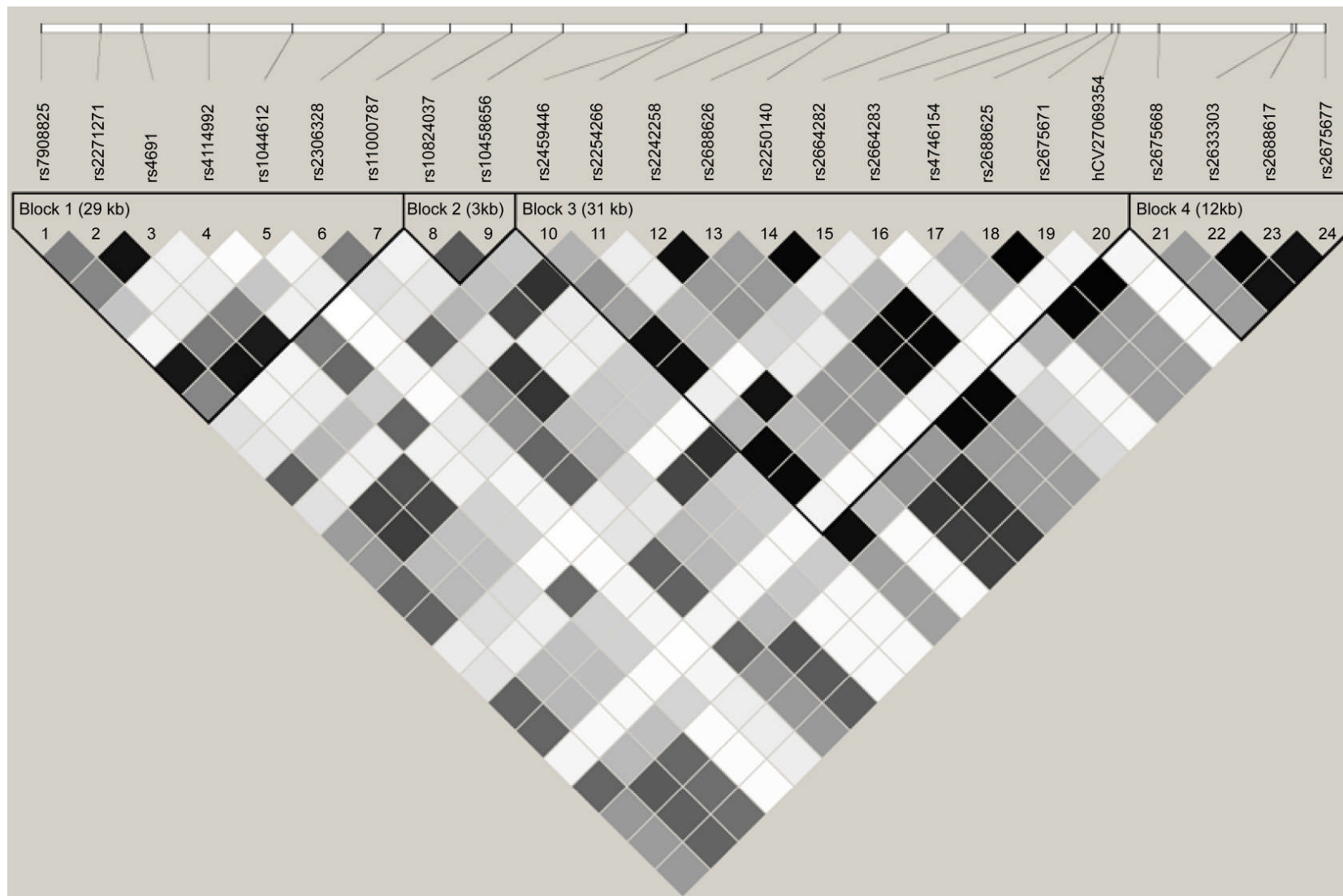


Abb. 5.7.: LD-Struktur im *CaMK2G*. Quadrierte Korrelationskoeffizientenwerte sind für jedes Paar von SNP Loci mittels Softwarepaket Haploview berechnet und farbkodiert dargestellt: schwarz, hoher r^2 Wert; weiß, niedriger r^2 Wert. Haplotyp-Blöcke, bezeichnet durch die hohe D' Werte, sind zugefügt.

Block	Haplotyp ID	Sequenz	Frequenz (Kontrollen/Fälle)	p-Wert
1	1.1	GATACTC	0,567 / 0,599	0,2433
	1.2	CGCACCT	0,192 / 0,223	0,1645
	1.3	CATGCCC	0,157 / 0,118	0,0431 (0,6896)
	1.4	CGCATCT	0,030 / 0,021	0,2911
2	2.1	GA	0,781 / 0,717	0,0072 (0,1152)
	2.2	AG	0,214 / 0,156	0,0068 (0,1088)
	2.3	AA	0,038 / 0,043	0,6422
	2.4	GG	0,031 / 0,020	0,1719
3	3.1	CTTACCCGCTT	0,477 / 0,519	0,1307
	3.2	TTCGTTCTGTCT	0,187 / 0,180	0,7573
	3.3	TCTATTCATCT	0,224 / 0,156	0,0017 (0,0272)
	3.4	CTTACCCGCTC	0,046 / 0,057	0,3654
	3.5	TTCGTTTGTCT	0,049 / 0,050	0,9433
4	4.1	ATTA	0,514 / 0,570	0,0422 (0,6752)
	4.2	GGAC	0,240 / 0,237	0,8802
	4.3	GTTA	0,233 / 0,172	0,0057 (0,0912)

Tab. 5.6.: Haplotypberechnung für *CaMK2G*. Adjustierte p-Werte nach Bonferroni: siehe Werte in Klammer.

Ähnlich wie die Einzellocusanalyse, zeigte auch die Dreilocushaplotypenanalyse starke Assoziationssignale in zwei Regionen (Abb. 5.8.). Die ausgeprägteste Assoziation zeigte der Haplotyp 16.3 (Marker: rs2664283, rs4746154, rs2688625) mit einer Frequenz von 18,8%. Hier wurde ein signifikanter p-Wert von 0,0025 erzielt. Auch die Haplotypen 15.3 (Marker: rs2664282, rs2664283, rs4746154) und 17.3 (Marker: rs4746154, rs2688625, rs2675671) erreichten signifikante p-Werte von 0,0054, bzw. 0,003. Der zweite Assoziationshinweis wurde für die Haplotypen 8.3 (Marker: rs10824037, rs10458656, rs2459446; p=0,0053), 9.3 (Marker: rs10458656, rs2459446, rs2254266; p=0,0039) und 10.3 (Marker: rs2459446, rs2254266, rs2242258; p=0,0045) nachgewiesen. Die detaillierten Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse befinden sich im Anhang (Tab. 7.3.).

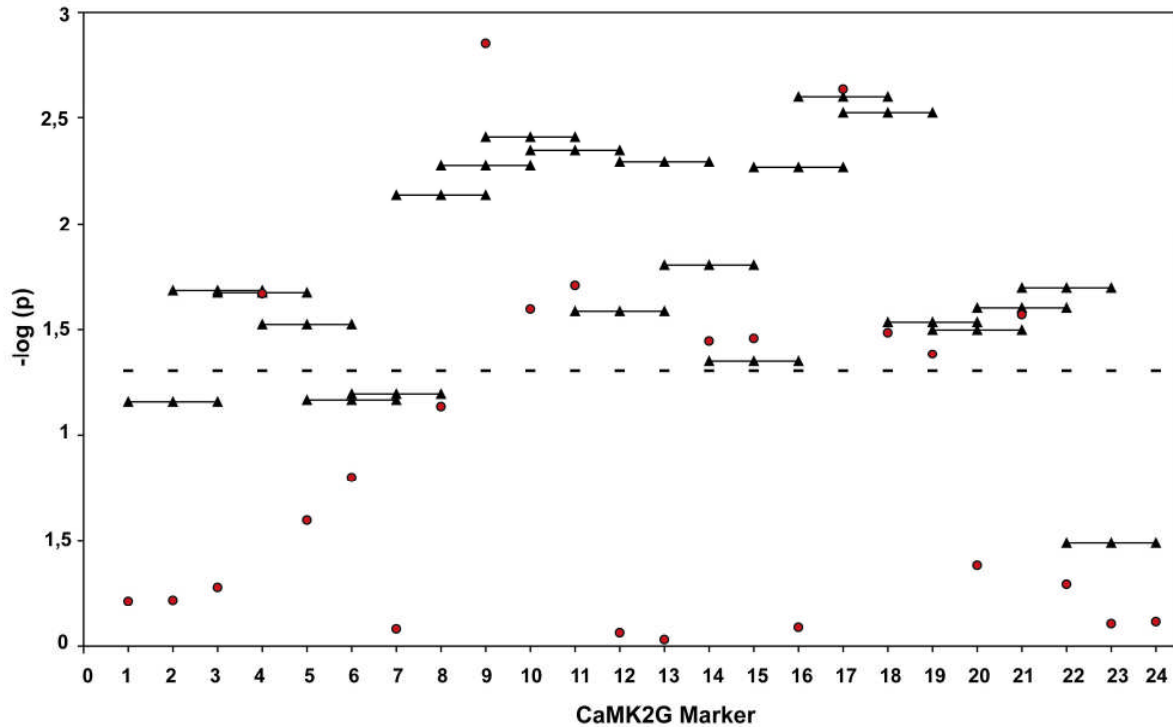


Abb. 5.8. Drei-Locusanalyse von SNPs im *CaMK2G*.

Die anschließende statistische Analyse der Genotypen hat die Ergebnisse des allelischen Tests bestätigt (Tab. 5.7.). Die stärkste Assoziation wurde für die SNPs rs10458656 und rs4746154 nachgewiesen ($p=0,002$ und $p=0,005$ im Additiven Modell). SNP rs10458656 blieb auch nach der Unterteilung nach dem Erkrankungsalter (Age of Onset) in der EOAD-Subgruppe signifikant ($p=0,011$ im Additiven Modell). Nach einer Korrektur für multiples Testen konnte nur noch ein p -Wert von 0,002 für den SNP rs10458656 als statistisch signifikantes Testergebnis interpretiert werden.

SNP ID	gesamtes Kollektiv		EOAD		LOAD	
	Add.	Rez. / Dom.	Add.	Rez. / Dom.	Add.	Rez. / Dom.
rs7908825	0,471	0,525 / 0,596	0,765	0,715 / 0,913	0,932	0,916 / 0,766
rs2271271	0,843	0,793 / 0,971	0,358	0,648 / 0,178	0,937	0,786 / 0,729
rs4691	0,744	0,930 / 0,515	0,580	0,917 / 0,111	0,588	0,566 / 0,856
rs4114992	0,031	0,012 / 0,844	0,111	0,023 / 0,251	0,273	0,302 / 0,538
rs1044612	0,433	0,318 / 0,999	0,627	0,416 / 0,999	0,836	0,836 / *
rs2306328	0,102	0,277 / 0,091	0,697	0,810 / 0,668	0,249	0,438 / 0,245
rs11000787	0,967	0,976 / 0,968	0,832	0,911 / 0,446	0,679	0,600 / 0,976
rs10824037	0,087	0,120 / 0,285	0,398	0,391 / 0,735	0,378	0,428 / 0,570
rs10458656	0,002	0,002 / 0,207	0,011	0,004 / 0,648	0,162	0,224 / 0,296
rs2459446	0,016	0,118 / 0,014	0,426	0,802 / 0,083	0,140	0,213 / 0,256
rs2254266	0,037	0,055 / 0,176	0,364	0,382 / 0,591	0,177	0,259 / 0,249
rs2242258	0,862	0,946 / 0,739	0,496	0,462 / 0,959	0,906	0,903 / 0,965
rs2688626	0,758	0,681 / 0,902	0,839	0,772 / 0,821	0,780	0,994 / 0,497
rs2250140	0,024	0,075 / 0,049	0,433	0,846 / 0,103	0,250	0,187 / 0,598
rs2664282	0,022	0,222 / 0,007	0,375	0,780 / 0,053	0,198	0,366 / 0,221
rs2664283	0,622	0,664 / 0,660	0,441	0,441 / *	0,275	0,323 / 0,435
rs4746154	0,005	0,004 / 0,254	0,100	0,072 / 0,636	0,065	0,077 / 0,338
rs2688625	0,019	0,160 / 0,011	0,252	0,818 / 0,022	0,314	0,349 / 0,495
rs2675671	0,021	0,091 / 0,034	0,244	0,972 / 0,033	0,286	0,208 / 0,671
hCV27069354	0,540	0,414 / 0,999	0,636	0,636 / *	0,947	0,638 / 0,784
rs2675668	0,020	0,136 / 0,015	0,242	0,850 / 0,022	0,304	0,315 / 0,509
rs2633303	0,386	0,274 / 0,908	0,524	0,477 / 0,952	0,394	0,183 / 0,596
rs2688617	0,504	0,294 / 0,565	0,428	0,427 / 0,780	0,516	0,182 / 0,308
rs2675677	0,964	0,796 / 0,631	0,256	0,260 / 0,684	0,876	0,471 / 0,299

* Kein Dominantes Modell (kein Homozygot).

Tab. 5.7.: Ergebnisse des Genotypentests für *CaMK2G*. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. Für jeden SNP wurden drei statistische Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Ergebnisse, die nach der Korrektur für multiples Testen eine statistisch signifikante Assoziation mit AD zeigten, wurden kursiv dargestellt.

5.1.1.2.1. Überprüfung der Assoziationsergebnisse in den unabhängigen Studien

Die statistische Analyse für zehn SNPs im Münchner Kollektiv zeigte eine Assoziation mit AD. Sechs von denen (rs4114992, rs10458656, rs4746154, rs2688625, rs2675671 und rs2675668) wurden in einer Fall-Kontroll Studie aus Schweden reanalysiert. Signifikante Werte wurden für vier SNPs (rs4746154, rs2688625, rs2675671 und rs2675668) erzielt. Der SNP mit der stärksten Assoziation im Münchner Kollektiv (rs10458656) konnte im schwedischen Kollektiv nicht repliziert werden. Detaillierte Auswertungen der analysierten SNPs sind in den Tabellen 5.8. a-f dargestellt.

Kollektiv	N	Alter	Allelfreq. (%)		p-Wert (Allel. Test)			p-Wert (Genotyp Test)		
			A	G	GeKo	EOAD	LOAD	gesamtes Kollektiv	EOAD	LOAD
München										
AD	440	72,41 ± 9,58	0,873	0,127	0,028	0,100	0,272	0,031 / 0,012 / 0,844	0,111 / 0,023 / 0,251	0,273 / 0,302 / 0,538
Kontrollen	263	66,12 ± 12,7	0,858	0,142						
Stockholm										
AD	252	67,87 ± 6,06	0,859	0,141	0,779	0,086	0,228	0,785 / 0,749 / 0,662	0,096 / 0,266 / 0,131	0,241 / 0,207 / 0,375
Kontrollen	630	73,14 ± 8,88	0,855	0,145						

Tab. 5.8.a: Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs4114992 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

Kollektiv	N	Alter	Allelfreq. (%)		p-Wert (Allel. Test)			p-Wert (Genotyp Test)		
			A	G	GeKo	EOAD	LOAD	gesamtes Kollektiv	EOAD	LOAD
München										
AD	440	72,41 ± 9,58	0,811	0,189	0,002	0,010	0,176	0,002 / 0,002 / 0,207	0,011 / 0,004 / 0,648	0,162 / 0,224 / 0,296
Kontrollen	263	66,12 ± 12,7	0,779	0,221						
Stockholm										
AD	252	67,87 ± 6,06	0,826	0,174	0,388	0,118	0,748	0,405 / 0,995 / 0,311	0,134 / 0,408 / 0,144	0,758 / 0,651 / 0,866
Kontrollen	630	73,14 ± 8,88	0,802	0,198						

Tab. 5.8.b: Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs10458656 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

Kollektiv	N	Alter	Allelfreq. (%)		p-Wert (Allel. Test)			p-Wert (Genotyp Test)		
			G	A	GeKo	EOAD	LOAD	gesamtes Kollektiv	EOAD	LOAD
München										
AD	440	72,41 ± 9,58	0,822	0,178	0,005	0,092	0,069	0,005 / 0,004 / 0,254	0,100 / 0,072 / 0,636	0,065 / 0,077 / 0,338
Kontrollen	263	66,12 ± 12,7	0,786	0,214						
Stockholm										
AD	252	67,87 ± 6,06	0,835	0,165	0,204	0,035	0,882	0,222 / 0,549 / 0,078	0,044 / 0,716 / 0,021	0,886 / 0,422 / 0,589
Kontrollen	630	73,14 ± 8,88	0,806	0,194						

Tab. 5.8.c: Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs4746154 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

Kollektiv	N	Alter	Allelfreq. (%)		p-Wert (Allel. Test)			p-Wert (Genotyp Test)		
			C	T	GeKo	EOAD	LOAD	gesamtes Kollektiv	EOAD	LOAD
München										
AD	440	72,41 ± 9,58	0,580	0,420	0,018	0,243	0,322	0,019 / 0,160 / 0,011	0,252 / 0,818 / 0,022	0,314 / 0,349 / 0,495
Kontrollen	263	66,12 ± 12,7	0,539	0,461						
Stockholm										
AD	252	67,87 ± 6,06	0,520	0,480	0,668	0,342	0,897	0,680 / 0,065 / 0,014	0,375 / 0,576 / 0,043	0,899 / 0,041 / 0,078
Kontrollen	630	73,14 ± 8,88	0,513	0,487						

Tab. 5.8.d: Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs2688625 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

Kollektiv	N	Alter	Allelfreq. (%)		p-Wert (Allel. Test)			p-Wert (Genotyp Test)		
			T	C	GeKo	EOAD	LOAD	gesamtes Kollektiv	EOAD	LOAD
München										
AD	440	72,41 ± 9,58	0,680	0,320	0,020	0,233	0,293	0,021 / 0,091 / 0,034	0,244 / 0,973 / 0,033	0,286 / 0,208 / 0,671
Kontrollen	263	66,12 ± 12,7	0,541	0,459						
Stockholm										
AD	252	67,87 ± 6,06	0,546	0,454	0,093	0,169	0,317	0,108 / 0,135 / *	0,191 / 0,705 / 0,013	0,337 / 0,102 / 0,002
Kontrollen	630	73,14 ± 8,88	0,506	0,494						

Tab. 5.8.e: Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs2675671 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

Kollektiv	N	Alter	Allelfreq.		p-Wert (Allel. Test)			p-Wert (Genotyp Test)		
			A	G	GeKo	EOAD	LOAD	gesamtes Kollektiv	EOAD	LOAD
München										
AD	440	72,41 ± 9,58	0,582	0,418	0,017	0,229	0,303	0,020 / 0,136 / 0,015	0,242 / 0,850 / 0,022	0,304 / 0,315 / 0,509
Kontrollen	263	66,12 ± 12,7	0,532	0,468						
Stockholm										
AD	252	67,87 ± 6,06	0,494	0,506	0,532	0,201	0,111	0,545 / 0,019 / 0,187	0,221 / 0,870 / 0,032	0,120 / 0,004 / 0,753
Kontrollen	630	73,14 ± 8,88	0,512	0,488						

Tab. 5.8.f: Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs2675668 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

5.1.1.3. *VCL* und *AP3MI*

VCL ist ca. 80 kb von *PLAU* Richtung Telomere entfernt. Das Gen erstreckt sich etwa über einen 122 kb-großen Bereich, zwischen 75,43 und 75,55 Mb. Es besteht aus 21 Exons und wird in Richtung des Telomers transkribiert. In einem Bereich von ca. 14 kb überlappen sich *VCL* und das benachbarte *AP3MI*. Dieses umfasst die ca. 29 kb große chromosomale Region (75,55 – 75,58 Mb), setzt sich aus 10 Exons zusammen und wird in entgegengesetzter Richtung zum *VCL* transkribiert (Abb. 5.9.).

Aus den öffentlichen Datenbanken wurden 29 SNPs innerhalb dieser Gene und 4 SNPs im intergenischen Bereich Richtung *PLAU* ausgewählt und genotypisiert. 20 davon wurden im Münchener Kollektiv als polymorph bestätigt. Für vier SNPs (rs11814544, rs2270548, rs1908339 und hCV25936664) wurde eine starke Abweichung vom HWE festgestellt. Demzufolge wurden diese SNPs aus weiteren statistischen Auswertungen ausgeschlossen.

Die analysierten SNPs zeigten keine Unterschiede zwischen den Allelfrequenzen der untersuchten Patienten und deren Kontrollen (Tab. 5.9.). In der genotypisierten Region wurde ein LD-Block identifiziert (Abb. 5.10.) und eine Haplotypanalyse durchgeführt. Diese zeigte zwei signifikante p-Werte ($p=0,01$ für 1.5 und $p=0,017$ für 1.6) (Tab. 5.10.). Nach einer Korrektur für multiples Testen waren diese Assoziationen jedoch nicht mehr signifikant.

Ch10: 75411463 - 75586867

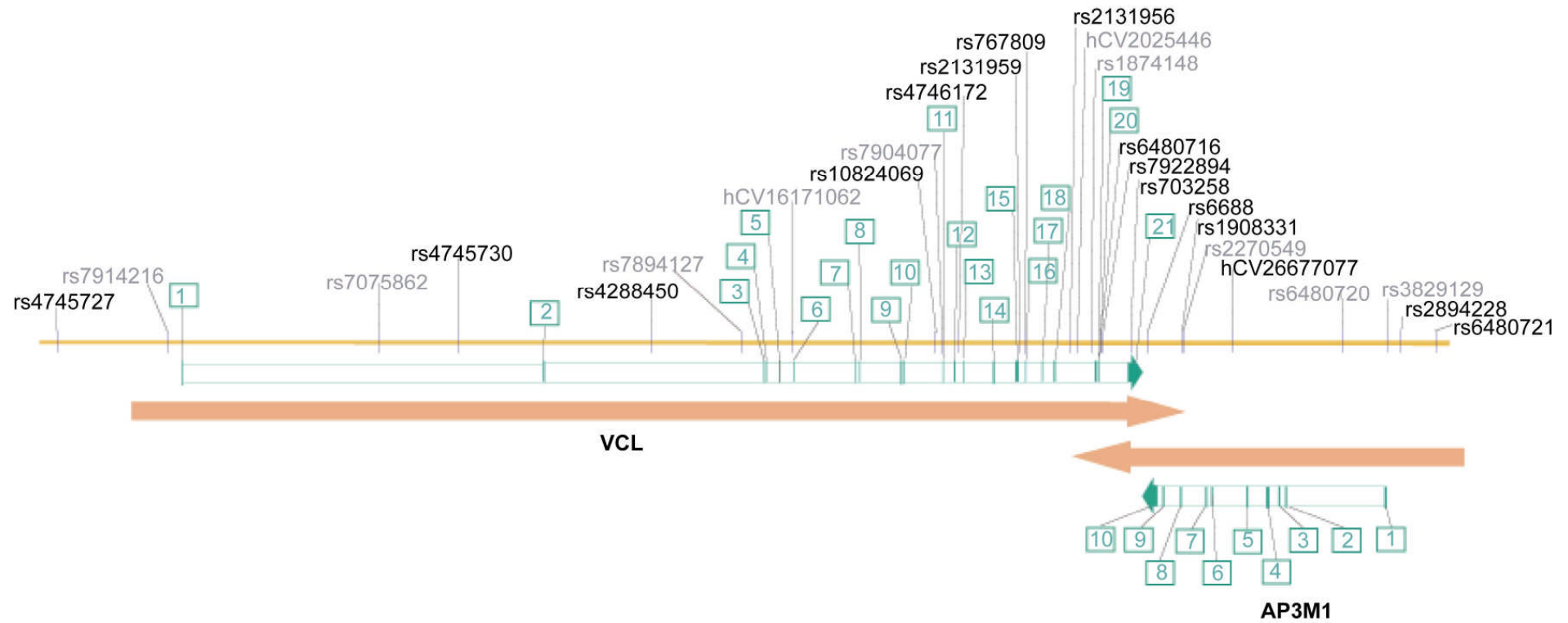


Abb. 5.9.: Schematische Darstellung der *VCL* und *AP3M1* Gene. Exonische Bereiche sind grün dargestellt, polymorphe SNPs schwarz und monomorphe grau. SNPs die eine HWE Abweichung zeigten sind hier nicht dargestellt.

SNP ID	Minor Allel v (Ko./Fälle)	GE (%)	HWE	p-Wert für das gesamte Kollektiv	p-Wert für EOAD	p-Wert für LOAD
rs4745727	0,252 / 0,276	96,8	0,805	0,329	0,671	0,313
rs11814544	0,483 / 0,472	91,7	0,0			
rs4745730	0,150 / 0,161	95,0	0,285	0,606	0,552	0,349
rs4268450	0,375 / 0,358	96,0	0,097	0,533	0,933	0,740
rs2270548	0,372 / 0,347	92,7	0,042			
rs1908339	0,494 / 0,497	88,1	0,005			
rs10824069	0,242 / 0,224	94,1	0,759	0,483	0,890	0,604
rs4746172	0,250 / 0,225	97,7	0,413	0,278	0,638	0,470
rs2131959	0,253 / 0,232	98,4	0,368	0,388	0,632	0,685
rs767809	0,425 / 0,398	97,3	0,856	0,244	0,593	0,485
rs2131956	0,264 / 0,241	94,0	0,334	0,346	0,370	0,794
rs6480716	0,400 / 0,362	95,8	0,715	0,128	0,175	0,621
rs7922894	0,399 / 0,372	97,7	0,492	0,258	0,281	0,775
rs703258	0,249 / 0,227	96,7	0,485	0,354	0,361	0,886
rs6688	0,258 / 0,231	93,4	0,639	0,258	0,751	0,449
rs1908331	0,154 / 0,143	90,7	0,650	0,506	0,499	0,789
hCV26677077	0,423 / 0,395	96,7	0,251	0,294	0,545	0,607
hCV25936664	0,500 / 0,500	98,4	0,0			
rs2894228	0,385 / 0,347	88,4	1,0	0,167	0,084	0,928
rs6480721	0,246 / 0,213	97,1	0,785	0,168	0,434	0,477

Tab. 5.9.: Ergebnisse des Allelischen Tests (Logistische Regression mit Kovariaten Erkrankungsalter (Age of Onset) und Geschlecht) für die *VCL* und *AP3MI* Gene. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt.

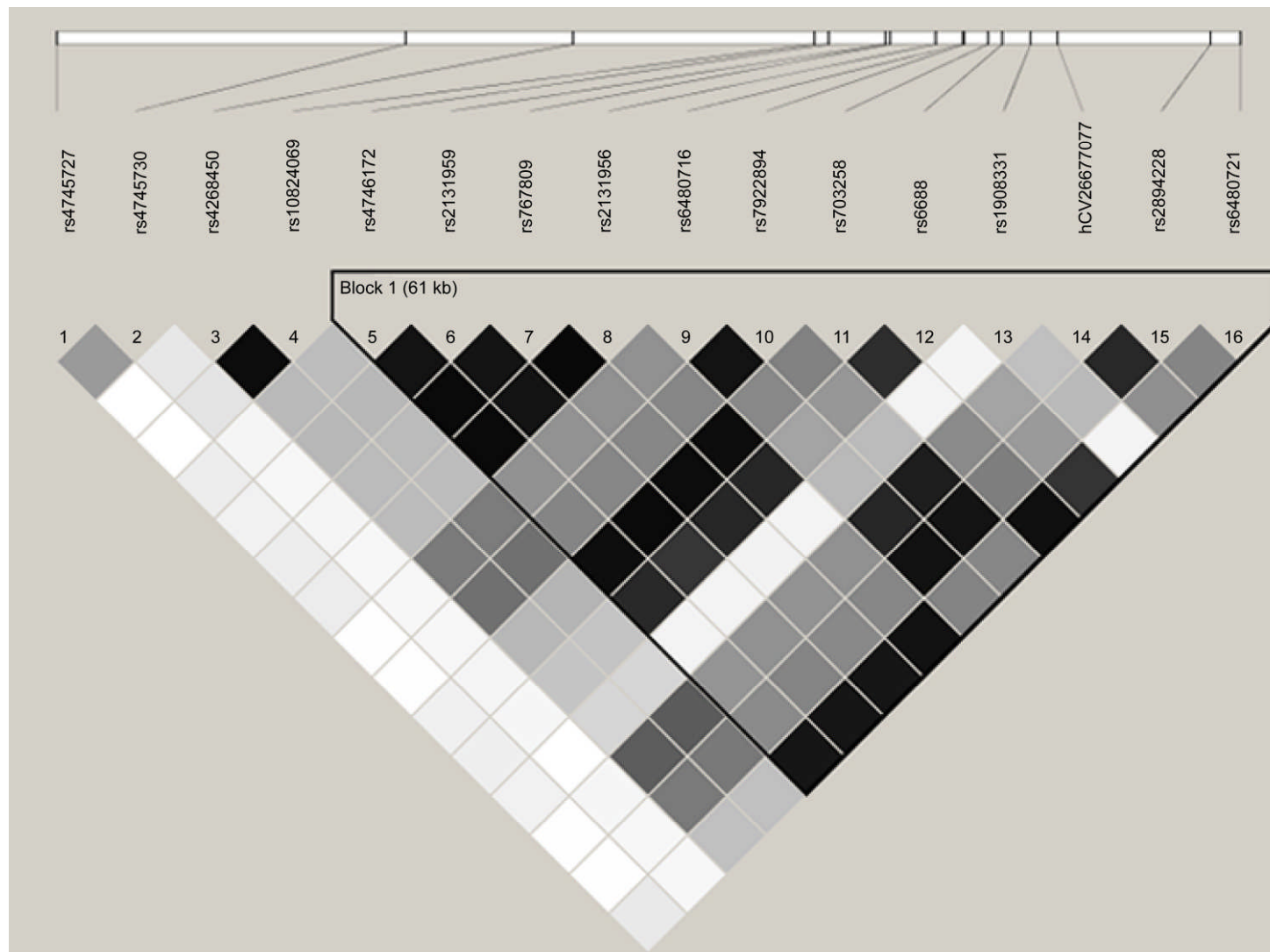


Abb. 5.10.: LD-Struktur in *VCL* und *AP3MI*. Quadrierte Korrelationskoeffizientenwerte sind für jedes Paar von SNP Loci mittels Softwarepaket Haploview berechnet und farbkodiert dargestellt: schwarz, hoher r^2 Wert; weiß, niedriger r^2 Wert. Haplotyp-Blöcke, bezeichnet durch die hohe D' Werte, sind zugefügt.

Block	Haplotyp ID	Sequenz	Frequenz (Kontrollen/Fälle)	p-Wert
1	1.1	TTCGGTAAGGCA	0,566 / 0,573	0,9865
	1.2	CCGCACTGGATG	0,231 / 0,187	0,0682
	1.3	TTCGACAAAATA	0,142 / 0,135	0,7481
	1.4	TTCGGTAAGACA	0,016 / 0,025	0,5184
	1.5	CCGCACTAGATG	0,003 / 0,020	0,0102 (0,0612)
	1.6	TTCGGTAGGGCA	0,003 / 0,018	0,0173 (0,1038)

Tab. 5.10.: Haplotypberechnung für *VCL* und *AP3M1*. Adjustierte p-Werte nach Bonferroni: siehe Werte in Klammer.

Entsprechend der Einzellocusanalyse wurden auch in der Dreilocushaplotypenanalyse keine signifikanten p-Werte bei den Haplotypen, die mit einer Frequenz von $\geq 5\%$ vorkommen, erzielt (Abb. 5.11.). Detaillierte Ergebnisse sind im Anhang (Tab. 7.4.) aufgelistet.

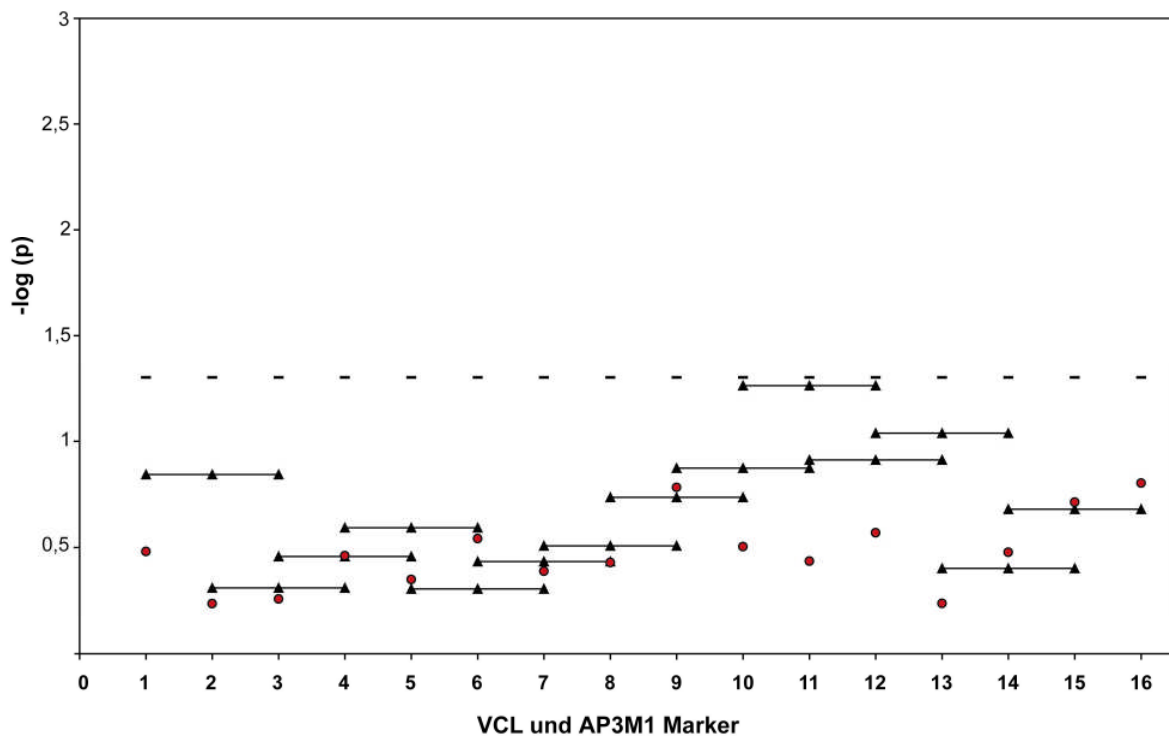


Abb. 5.11. Drei-Locusanalyse von SNPs in *VCL* und *AP3M1*.

Der anschließende Genotypentest zeigte bei dem Additiven Modell keine signifikanten p-Werte. Im Dominanten Modell für Major Allel wiesen vier SNPs (rs6480716, rs7922894, hCV26677077 und rs2894228) auf eine Assoziation mit AD hin ($p=0,018$, $p=0,040$, $p=0,006$ und $p=0,044$) (Tab. 5.11.). Nach einer Bonferroni-Korrektur für multiples Testen konnte

jedoch kein lokales Signifikanzniveau von 0,0031 ($0,05/16=0,0031$) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind daher statistisch als nicht signifikant zu interpretieren.

SNP ID	gesamtes Kollektiv		EOAD		LOAD	
	Add.	Rez. / Dom.	Add.	Rez. / Dom.	Add.	Rez. / Dom.
rs4745727	0,343	0,788 / 0,087	0,684	0,918 / 0,278	0,322	0,536 / 0,228
rs4745730	0,605	0,917 / 0,167	0,537	0,579 / 0,674	0,360	0,655 / 0,134
rs4268450	0,539	0,743 / 0,091	0,933	0,560 / 0,311	0,747	0,829 / 0,353
rs10824069	0,485	0,357 / 0,881	0,890	0,554 / 0,389	0,607	0,610 / 0,803
rs4746172	0,271	0,208 / 0,893	0,632	0,376 / 0,489	0,465	0,492 / 0,671
rs2131959	0,403	0,242 / 0,738	0,822	0,509 / 0,394	0,655	0,608 / 0,982
rs767809	0,236	0,836 / 0,051	0,576	0,690 / 0,600	0,486	0,774 / 0,101
rs2131956	0,344	0,317 / 0,742	0,358	0,227 / 0,835	0,789	0,841 / 0,789
rs6480716	0,123	0,630 / 0,018	0,157	0,478 / 0,073	0,624	0,868 / 0,242
rs7922894	0,278	0,963 / 0,040	0,241	0,505 / 0,173	0,780	0,612 / 0,227
rs703258	0,347	0,303 / 0,825	0,345	0,233 / 0,843	0,886	0,898 / 0,921
rs6688	0,252	0,221 / 0,724	0,750	0,532 / 0,635	0,438	0,502 / 0,562
rs1908331	0,507	0,381 / 0,694	0,490	0,561 / 0,536	0,791	0,594 / 0,533
hCV26677077	0,283	0,571 / 0,006	0,530	0,856 / 0,154	0,605	0,482 / 0,062
rs2894228	0,160	0,568 / 0,044	0,068	0,191 / 0,080	0,929	0,674 / 0,449
rs6480721	0,161	0,228 / 0,284	0,429	0,350 / 0,969	0,467	0,644 / 0,340

Tab. 5.11.: Ergebnisse des Genotypentests für *VCL* und *AP3MI*. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. Für jeden SNP wurden drei statistische Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel.

5.1.2. Funktionelle Analyse der signifikanten Ergebnisse auf dem Chromosom 10

Das Ziel der funktionellen Analyse ist die Überprüfung der signifikanten Genotypisierungsergebnisse. In diesem Zusammenhang wurde der exonische *PLAU* SNP rs2227564, der zu einem Aminosäureaustausch führt, funktionell analysiert. Ein weiterer Grund zur Auswahl dieses SNPs war seine Lokalisierung in einer „Break Point“ Region (Abb. 5.3.), bzw. eine fehlende Korrelation mit den benachbarten SNPs. Im Vergleich zu den anderen signifikanten SNPs war bei dem SNP rs2227564 das Minor Allel als Risikoallel bestätigt.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Minor Allel T des funktionellen *PLAU* SNPs rs2227564 eine Auswirkung auf die Erhöhung der Plaqueanzahl hat. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden 33 an LOAD verstorbene Probanden genotypisiert und anschließend der Einfluss des Risikoallels auf die Plaqueanzahl in dem Medial Temporal Gyrus getestet. Die Diagnose der verstorbenen Patienten wurde klinisch und histopathologisch bestätigt. Die analysierten Hirnsamples sind in der Tabelle 5.12. dargestellt.

Aufgrund des bekannten Einflusses des *APOE* ϵ 4 Allels auf die Plaquepathologie, wurden in dem ersten Analyseschritt *APOE* ϵ 4 Träger ausgeschlossen. Die histopathologische Analyse zeigte eine signifikant höhere Plaqueanzahl ($p=0,007$) bei den *PLAU* T Allel-Trägern ($60,3\pm 16,9$; $N=6$) im Vergleich zu den Probanden, bei denen dieses Allel nicht vorhanden war ($26,3\pm 8,8$; $N=9$) (Tab. 5.12., Abb. 5.12. und Abb. 5.13.). Im Anschluss wurde im gesamten Kollektiv ($N = 33$) der Einfluss sowohl des *APOE* ϵ 4, als auch des *PLAU* T Allels auf die Plaqueanzahl im Hirn untersucht. Die Lineare Regressionsanalyse zeigte einen signifikanten p-Wert für das *APOE* ϵ 4 Allel ($p=0,0069$). Ein unabhängiger Effekt des *PLAU* T Allels im SNP rs2227564 auf die Plaqueanzahl wurde ebenfalls nachgewiesen ($p=0,015$). Bei der statistischen Analyse wurden das Alter und das Geschlecht als Kovariaten herangezogen. Diese trugen nicht zur erhöhten Plaqueanzahl bei.

Gruppen	N	Geschlecht M : F	Todesalter	Dauer der Krankheit (Jahr)	Plaquantzahl
rs2227564 T-Allel - APOE ε4 Allel -	9	3 : 6	79,3 ± 9,5	7,4 ± 2,9	26,3 ± 8,8
rs2227564 T-Allel + APOE ε4 Allel -	6	2 : 4	80,2 ± 7,6	7,5 ± 3,2	60,3 ± 16,9
rs2227564 T-Allel - APOE ε4 Allel +	13	3 : 10	78,1 ± 7,2	7,7 ± 3,5	59,8 ± 38,8
rs2227564 T-Allel + APOE ε4 Allel +	5	3 : 2	78,5 ± 9,2	7,1 ± 3,6	79,2 ± 26,8

Tab. 5.12.: Die Plaquantzahl in den analysierten Hirnsamples. Die analysierten Hirnsamples wurden abhängig von der An- (+) bzw. Abwesenheit (-) des *APOE* ε4 Allels und des *PLAU* rs2227564 T Allels in vier Gruppen unterteilt. Neben der Plaquantzahl wurden hier für jede Gruppe Anzahl der analysierten Hirne, sowie die Geschlechtsverteilung, das Todesalter und die Dauer der Krankheit angegeben. Die Genotypisierung der Hirnsamples erfolgte mittels Restriktionsenzymen.

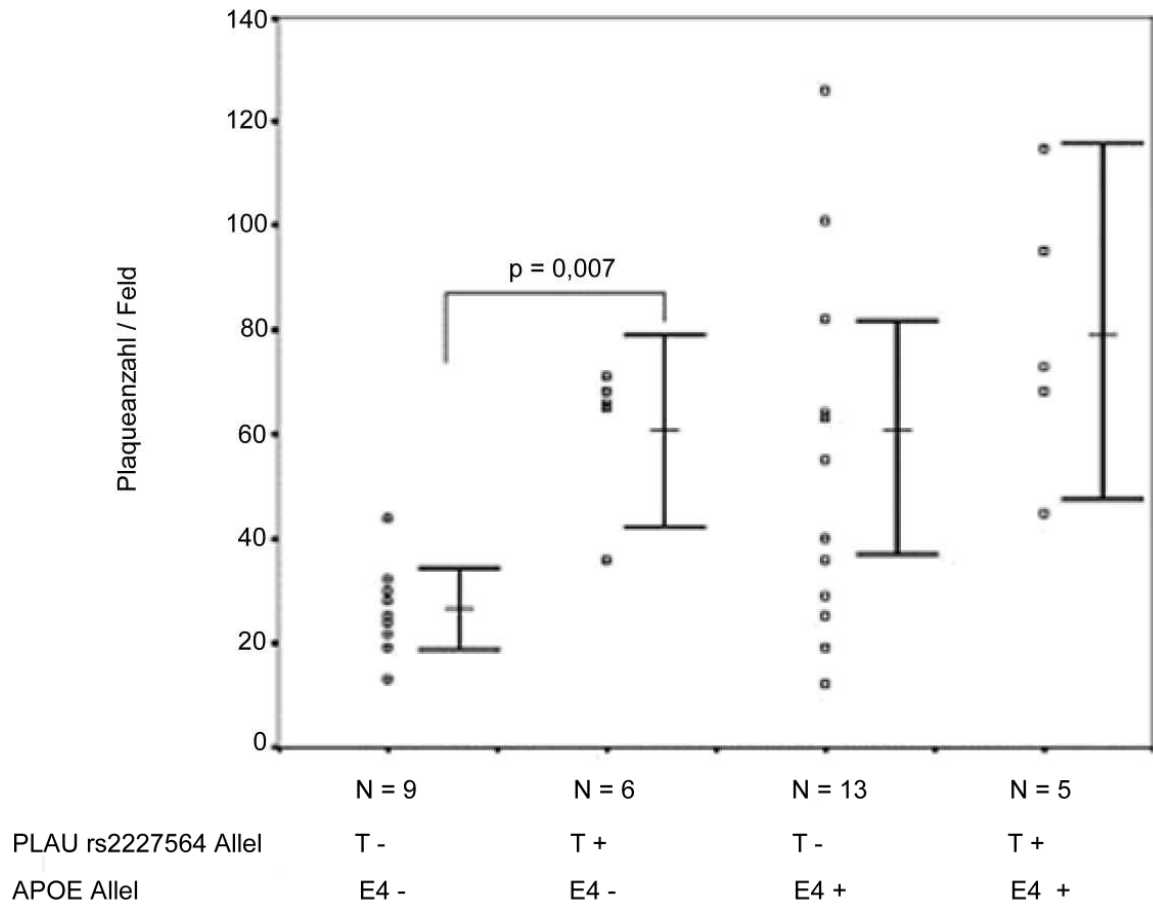


Abb. 5.12.: Die Streuung der Plaqueanzahl im Medial Temporal Gyrus (mit arithmetischem Mittel und 95% CI). Gruppierung mit der Probandenzahl nach der An- (+) bzw. Abwesenheit (-) des *PLAU* rs2227564 T Allels und des *APOE* ϵ 4 Allels. Für die statistische Auswertung wurde Two-sided Mann-Whitney U Test angewendet.

Die Analyse der Plaqueanzahl im Hirngewebe wurde von Frau Dr. Frauke Neff von dem Pathologischen Institut des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt.

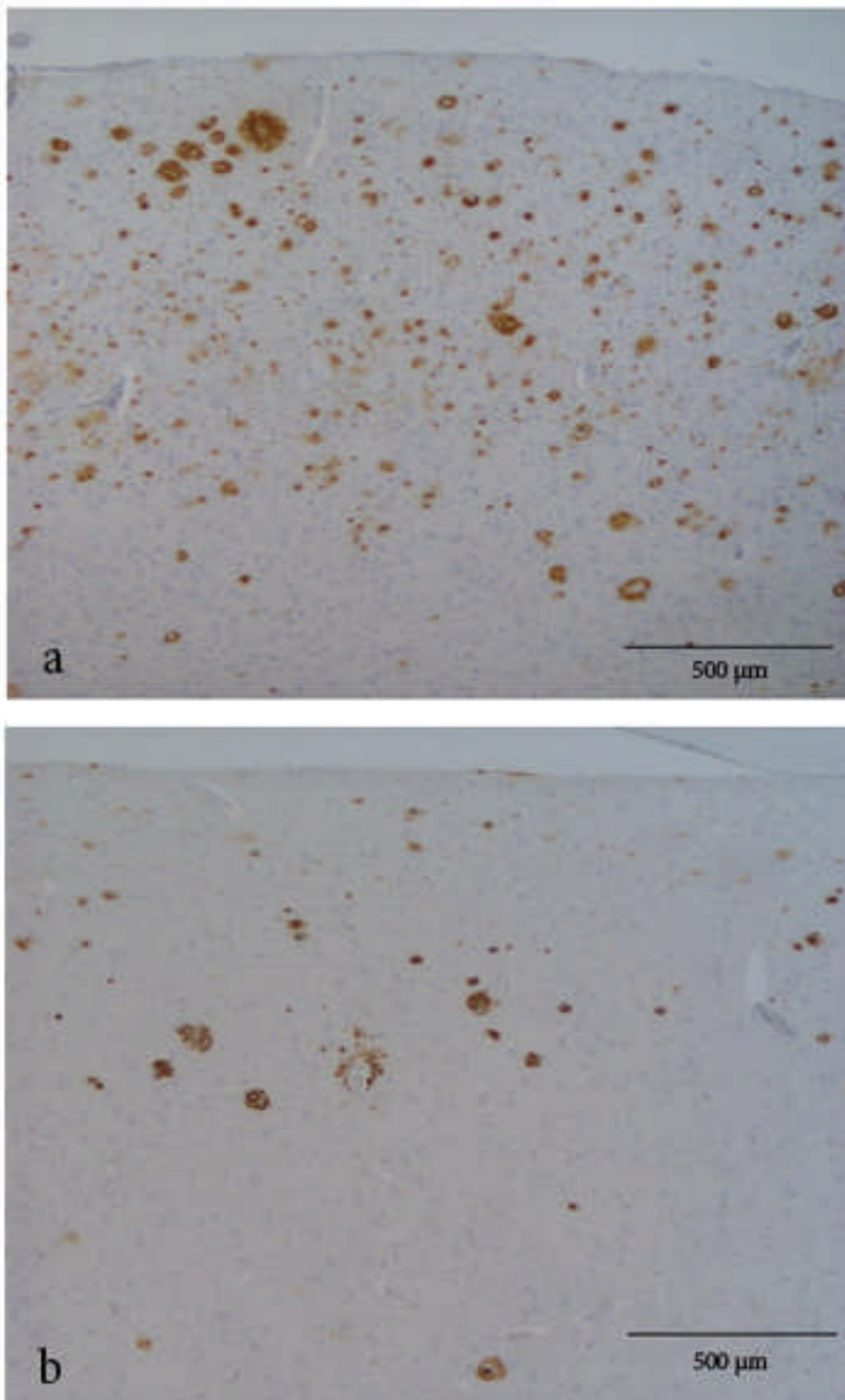


Abb. 5.13.: Der Vergleich der Plaqueanzahl bei zwei Probanden mit (a) und ohne (b) rs2227564 T Allel. *APOE* ϵ 4 Allel war bei diesen nicht vorhanden. Bei der immunohistochemischen Methode wurden Monoclonal β -Amyloid Antikörper (DAKO; 6F/3D; 1:100) und Peroxidase / DAB verwendet. (Balken = 500 μ m).

5.2. Analyse der SNPs auf dem Chromosom 12

5.2.1. Genotypisierung der SNPs im *ST8SIA1*

Auf dem Chromosom 12 wurden SNPs in der Region 12p11.2-12p12.1, zwischen 22,24 und 22,38 Mb genotypisiert. Alle genotypisierten SNPs sind im *ST8SIA1* (Abb. 5.14.) lokalisiert. Dieses Gen besteht aus 5 Exons und wird in Richtung des Zentromers transkribiert. Bis zum Beginn dieser Arbeit war keine Assoziationsstudie zwischen diesem Gen und AD bekannt. Allerdings wurde die Region 12p11-12p12 in Verbindung mit AD gebracht (Kehoe P et al., 1999; Myers A et al., 2000; Scott WK et al., 2000; Mayeux R et al., 2002).

Insgesamt wurden 45 SNPs bei 703 Probanden (263 Kontrollen und 440 Erkrankten) genotypisiert. Die Lokalisierung der ausgewählten SNPs ist in der Tabelle 5.13. angegeben.

Gen	SNP ID NCBI	SNP ID Celera	Position build 123	Position im Gen	Typ
<i>ST8SIA1</i>	rs2418054		22242244	3' UTR	G/T
		hCV25604142	22245918	Exon 5	C/A
	rs704219	hCV3289064	22246188	Exon 5	G/A
	rs10841974	hCV3289065	22247448	Intron 4	A/C
		hCV3289058	22251425	Intron 4	A/T
	rs2216228	hCV2780084	22257102	Intron 4	T/C
	rs2300717	hCV2780088	22262066	Intron 4	A/C
	rs2300718	hCV2780091	22264976	Intron 4	G/A
	rs2300719	hCV2780092	22265115	Intron 4	G/A
		hCV2780093	22265391	Intron 4	C/T
	rs1558793	hCV7560693	22279810	Intron 4	T/C
	rs10459079	hCV3289049	22287524	Intron 4	C/T
	rs12815085	hCV2780118	22290125	Intron 4	G/T
	rs4762896	hCV2780120	22293178	I 4/ E 4 bound.	C/T
	rs2300726	hCV2780121	22294381	Intron 3	C/T
	rs2017107	hCV2402546	22296376	Intron 3	G/A
	rs11612801	hCV3289047	22299004	Intron 3	C/G
	rs12811237	hCV3289011	22301444	Intron 2	G/C
	rs12310364	hCV3289013	22303348	Intron 2	T/C
	rs2193177	hCV3289023	22313945	Intron 2	A/T
	rs1019332	hCV3289028	22323787	Intron 2	A/C
	rs2012722		22326661	Intron 2	G/T
	rs11834129	hCV3289036	22328342	Intron 2	C/T
	rs3782524	hCV9839904	22329252	Intron 2	A/C
	rs4762901	hCV9839913	22329691	Intron 2	A/G
		hCV2780146	22331053	Intron 2	A/G
		hCV2780147	22331205	Intron 2	A/G
rs2287166	hCV16181603	22331548	E 2/ I 1 bound.	A/T	

rs2072542	hCV15871136	22331582	E 2/ I 1 bound.	A/G
rs12099876	hCV11353417	22331741	Intron 1	G/A
rs11610434	hCV3289037	22331955	Intron 1	A/G
rs11614453	hCV3289038	22331965	Intron 1	C/T
rs11832631	hCV3289039	22332856	Intron 1	T/C
rs2160536	hCV2780149	22338261	Intron 1	T/C
rs1861606	hCV2780152	22340684	Intron 1	G/A
rs2193179		22348228	Intron 1	C/T
rs7295402		22351686	Intron 1	T/C
rs10492283		22358767	Intron 1	C/G
rs1012675		22364082	Intron 1	C/T
rs2728827	hCV3289045	22367311	Intron 1	A/G
	hCV12102189	22371548	Intron 1	C/A
rs7970824	hCV12102192	22373705	Intron 1	G/A
rs3803101	hCV27485951	22378575	Exon 1	G/T
	hCV26766547	22378888	Exon 1	C/A
rs3809202		22380417	Promotor	G/A

Tab. 5.13.: Die ausgewählten SNPs auf dem Ch12. Die monomorphen SNPs im Münchner Kollektiv sind grau markiert.

Die SNPs rs2300717, rs2287166 und rs2193179 zeigten eine Abweichung vom HWE und demzufolge wurden diese aus den weiteren statistischen Analysen ausgeschlossen. Eine Abweichung von HWE könnte auf eine fehlerhafte Genotypisierung oder Populationssubstruktur hinweisen. Die durchgeführte Analyse der Allelverteilung zeigte signifikante p-Werte für 11 SNPs. Die stärksten Assoziationshinweise auf AD wurden für die SNPs rs2300719 und rs1861606 ($p=0,004$) nachgewiesen. Der SNP rs2300719 war nur bei der EOAD Subgruppe signifikant ($p=0,002$). Bei allen signifikanten SNPs, mit der Ausnahme von dem SNP rs2300719 war das Minor Allel das Risikoallel. Nach einer Korrektur für multiples Testen konnte für keinen SNP ein lokales Signifikanzniveau von $p \leq 0,0013$ ($0,05/39=0,0013$) nachgewiesen werden. Demzufolge konnten die vorher signifikanten Abweichungen von der Nullhypothese nicht bestätigt werden. Einzelne Ergebnisse des allelischen Tests sind in der Tabelle 5.14. dargestellt.

Abb. 5.15. stellt die LD-Blöcke im *ST8SIA1* dar. Alle signifikanten SNPs liegen innerhalb der chromosomalen Regionen mit niedrigen Rekombinationsraten. Die stark signifikanten intronischen SNPs rs2300719 und rs1861606 befinden sich in den Blöcken 1 (der paarweise Vergleich mit rs2300718: $r^2=0,801$, $D'=0,93$) bzw. 6 (der paarweise Vergleich mit rs2160536: $r^2=0,198$, $D'=0,87$ und rs7295402: $r^2=0,890$; $D'=0,95$). Restliche signifikant assoziierte SNPs sind in den Blöcken 1, 3, 4, 5 und 6 zu finden. Die folgende Haplotypanalyse zeigte signifikante p-Werte in dem ersten und sechsten LD-Block ($p=0,0323$ für 1.7 und

p=0,0154 für 6.3). Jedoch konnten diese Befunde nach einer Bonferroni-Adjustierung für multiples Testen nicht als statistisch signifikante Assoziationsergebnisse bestätigt werden. Die Frequenzen bei den Kontrollen und Erkrankten für die beiden Haplotypen betragen 0,018/0,006, bzw. 0,187/0,249 (Tab. 5.15.).

Ch12: 22242244 - 22380417

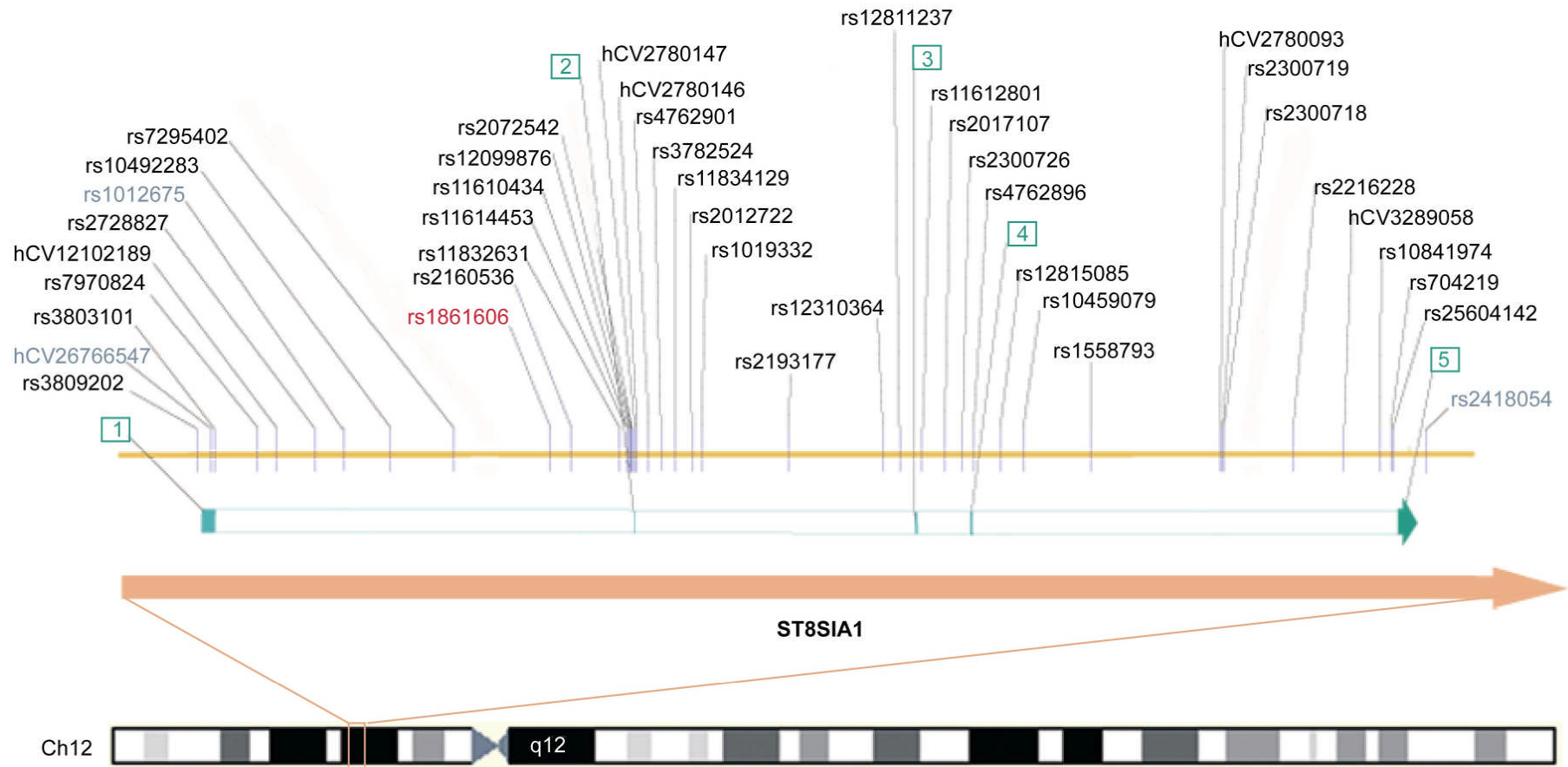


Abb. 5.14.: Schematische Darstellung des *ST8SIA1* Gens. Grüne Boxen stellen exonische Bereiche dar. Die polymorphen SNPs wurden schwarz und rot markiert, wobei der rote eine starke Signifikanz zeigte. Grau markierte SNPs waren monomorph. SNPs, die eine HWE Abweichung zeigten, sind hier nicht dargestellt.

SNP ID	Minor Allel v (Ko./Fälle)	GE (%)	HWE	p-Wert für das gesamte Kollektiv	p-Wert für EOAD	p-Wert für LOAD
hCV25604142	0,006 / 0,002	98,6	1,0	0,353	0,752	0,268
rs704219	0,184 / 0,182	92,9	1,0	0,975	0,377	0,458
rs10841974	0,375 / 0,383	98,1	0,296	0,617	0,727	0,541
hCV3289058	0,125 / 0,165	92,5	0,986	0,028 (T); 1,46 [1,04-2,04]	0,048 (T); 1,67 [1,01-2,76]	0,217
rs2216228	0,179 / 0,167	96,6	0,532	0,242	0,750	0,135
rs2300717	0,437 / 0,440	98,3	0,038			
rs2300718	0,234 / 0,225	96,0	0,741	0,761	0,059	0,278
rs2300719	0,245 / 0,210	92,0	0,138	0,138	0,002 (G); 2,04 [1,3- 3,19]	0,471
hCV2780093	0,137 / 0,171	98,1	1,0	0,059	0,090	0,460
rs1558793	0,365 / 0,360	100	0,673	0,755	0,511	0,847
rs10459079	0,404 / 0,432	95,7	0,945	0,155	0,639	0,265
rs12815085	0,162 / 0,189	97,6	1,0	0,095	0,117	0,678
rs4762896	0,247 / 0,216	90,2	0,475	0,103	0,495	0,242
rs2300726	0,449 / 0,415	97,7	0,112	0,257	0,510	0,643
rs2017107	0,461 / 0,421	91,5	0,606	0,153	0,459	0,424
rs11612801	0,194 / 0,221	99,4	0,378	0,121	0,102	0,963
rs12811237	0,183 / 0,219	95,3	0,439	0,061	0,080	0,697
rs12310364	0,435 / 0,403	95,0	0,862	0,234	0,777	0,367
rs2193177	0,079 / 0,107	93,4	1,0	0,037 (T); 1,55 [1,03-2,34]	0,049 (T); 1,87 [1-3,5]	0,407
rs1019332	0,185 / 0,230	98,9	1,0	0,017 (C); 1,40 [1,06-1,85]	0,049 (C); 1,52 [1-2,31]	0,263
rs2012722	0,489 / 0,460	98,4	0,681	0,305	0,761	0,429
rs11834129	0,335 / 0,308	98,3	0,861	0,170	0,510	0,217
rs3782524	0,189 / 0,238	98,9	0,88	0,010 (C); 1,44 [1,09-1,9]	0,024 (C); 1,6 [1,07-2,41]	0,250
rs4762901	0,457 / 0,429	91,6	0,574	0,350	0,265	0,914
hCV2780146	0,133 / 0,157	90,5	0,725	0,133	0,075	0,957
hCV2780147	0,124 / 0,152	96,6	0,446	0,060	0,016 (G); 1,85 [1,12-6,05]	0,947
rs2287166	0,357 / 0,315	91,7	0,026			
rs2072542	0,462 / 0,454	95,0	0,946	0,818	0,588	0,283

rs12099876	0,126 / 0,156	94,2	0,402	0,062	0,018 (A); 1,84 [1,11-3,03]	0,795
rs11610434	0,118 / 0,143	93,9	1,0	0,105	0,044 (G); 1,72 [1,02-2,92]	0,742
rs11614453	0,125 / 0,157	98,9	0,820	0,038 (T); 1,41 [1,02-1,96]	0,030 (T); 1,74 [1,05-2,86]	0,721
rs11832631	0,022 / 0,021	94,9	0,211	0,891	0,216	0,289
rs2160536	0,445 / 0,429	99,7	0,586	0,561	0,601	0,890
rs1861606	0,213 / 0,278	92,9	0,832	0,004 (A); 1,49 [1,14-1,96]	0,071	0,042 (A); 1,49 [1,01-2,2]
rs2193179	0,484 / 0,455	95,2	0,022			
rs7295402	0,232 / 0,274	93,0	0,599	0,042 (C); 1,32 [1-1,72]	0,168	0,188
rs10492283	0,393 / 0,412	95,4	0,691	0,405	0,489	0,825
rs2728827	0,492 / 0,479	91,2	1,0	0,710	0,627	1,000
hCV12102189	0,358 / 0,382	97,2	0,994	0,359	0,376	0,761
rs7970824	0,496 / 0,488	97,4	0,198	0,833	0,792	0,899
rs3803101	0,240 / 0,222	100	0,619	0,659	0,738	0,386
rs3809202	0,042 / 0,039	97,4	0,707	0,659	0,738	0,386

Tab. 5.14.: Ergebnisse des Allelischen Tests (Logistische Regression mit Kovariaten Erkrankungsalter (Age of Onset) und Geschlecht) für das *ST8SIA1* Gen. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. OR mit 95% CI wurde für signifikante SNPs dargestellt.

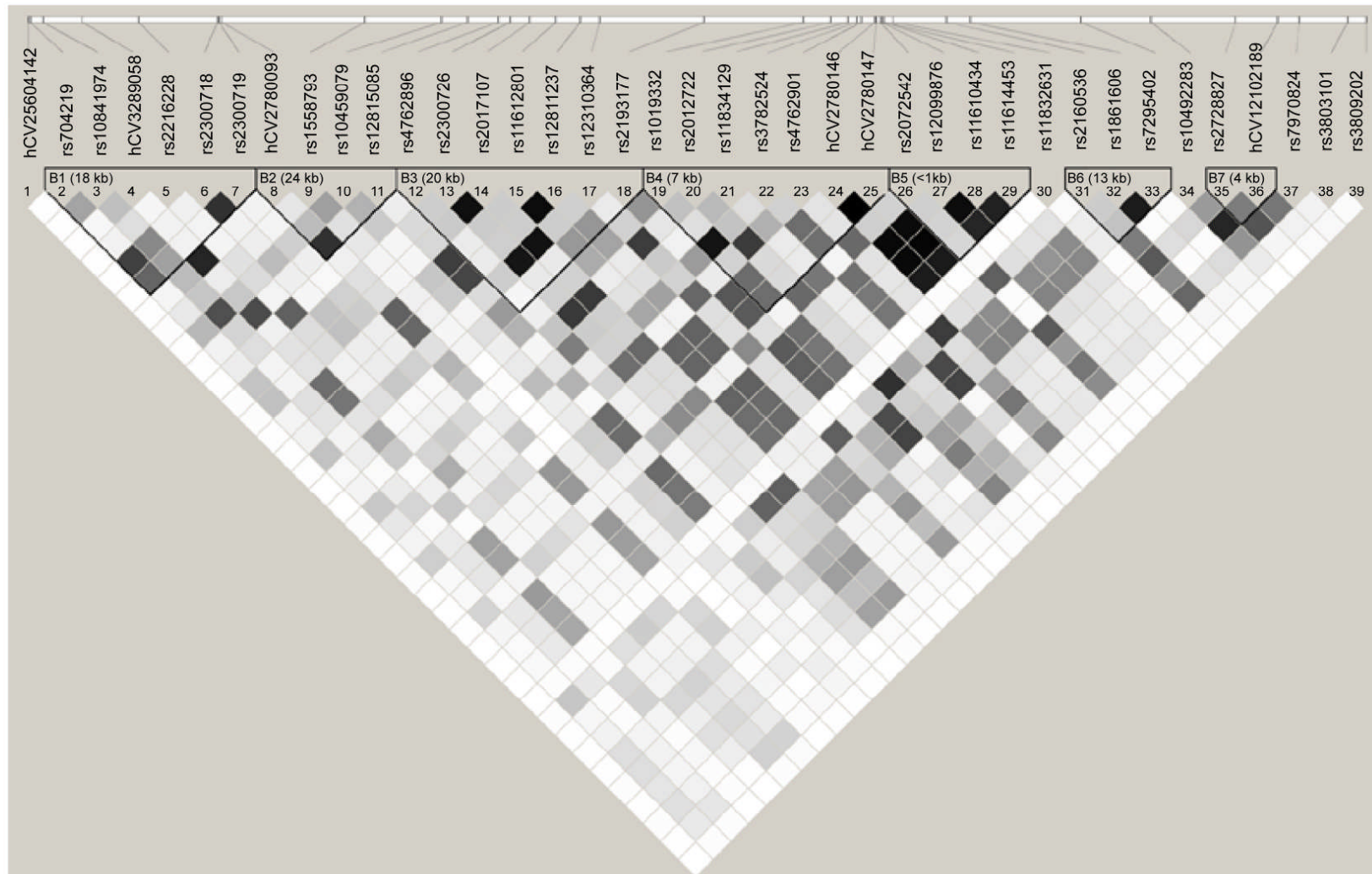


Abb. 5.15.: LD-Struktur im *ST8SIA1*. Quadrierte Korrelationskoeffizienten sind für jedes Paar von SNP Loci mittels Softwarepaket Haploview berechnet und farbkodiert dargestellt: schwarz, hoher r^2 Wert; weiß, niedriger r^2 Wert. Haplotyp-Blöcke, bezeichnet durch die hohe D' Werte, sind zugefügt.

Block	Haplotyp ID	Sequenz	Frequenz (Kontrollen/Fälle)	p-Wert
1	1.1	GAATGG	0,400 / 0,416	0,6913
	1.2	GAACGG	0,178 / 0,167	0,4891
	1.3	ACATAA	0,173 / 0,164	0,7637
	1.4	GCTTGG	0,121 / 0,151	0,1149
	1.5	GCATAA	0,049 / 0,032	0,1246
	1.6	ACATAG	0,010 / 0,014	0,4100
	1.7	GAATGA	0,018 / 0,006	0,0323 (1)
2	2.1	CCCG	0,354 / 0,354	0,9977
	2.2	CTTG	0,232 / 0,232	0,9720
	2.3	CTCG	0,240 / 0,220	0,3795
	2.4	TTTT	0,131 / 0,164	0,0852
	2.5	CTTT	0,029 / 0,024	0,5682
3	3.1	CTACGCA	0,427 / 0,391	0,1792
	3.2	TCGCGTA	0,234 / 0,215	0,3941
	3.3	CCGCGTA	0,117 / 0,131	0,4672
	3.4	CCGGCTA	0,094 / 0,110	0,3358
	3.5	CCGGCTT	0,083 / 0,108	0,1318
4	4.1	ATCAGAA	0,434 / 0,389	0,2122
	4.2	AGTAAAA	0,299 / 0,272	0,2736
	4.3	CGCCAGG	0,123 / 0,138	0,4343
	4.4	CGCCAAA	0,054 / 0,078	0,0841
	4.5	ATTAAAA	0,030 / 0,027	0,7649
	4.6	ATCAAAA	0,019 / 0,023	0,6634
	4.7	AGCAAAA	0,020 / 0,020	0,9976
5	5.1	AGAC	0,529 / 0,518	0,9053
	5.2	GGAC	0,328 / 0,297	0,1729
	5.3	GAGT	0,109 / 0,142	0,2052
6	6.1	CGT	0,430 / 0,407	0,3842
	6.2	TGT	0,323 / 0,290	0,1432
	6.3	TAC	0,187 / 0,249	0,0154 (0,5236)
	6.4	TGC	0,015 / 0,010	0,1078
7	7.1	GC	0,489 / 0,466	0,4356
	7.2	AA	0,355 / 0,373	0,5235
	7.3	AC	0,153 / 0,151	0,9297

Tab. 5.15.: Haplotypberechnung für *ST8SIA1*. Adjustierte p-Werte nach Bonferroni: siehe Werte in Klammer.

Die Ergebnisse der durchgeführten Dreilocushaplotypenanalyse sind in der Abbildung 5.16. dargestellt. Das stärkste Assoziationssignal wurde für den Haplotyp 30.3 (Marker: rs11832631, rs2160536, rs1861606; Frequenz=21.8%) nachgewiesen. Hier wurde ein p-Wert von 0,008 erzielt. Detaillierte Ergebnisse sind im Anhang (Tab. 7.5.) dargestellt.

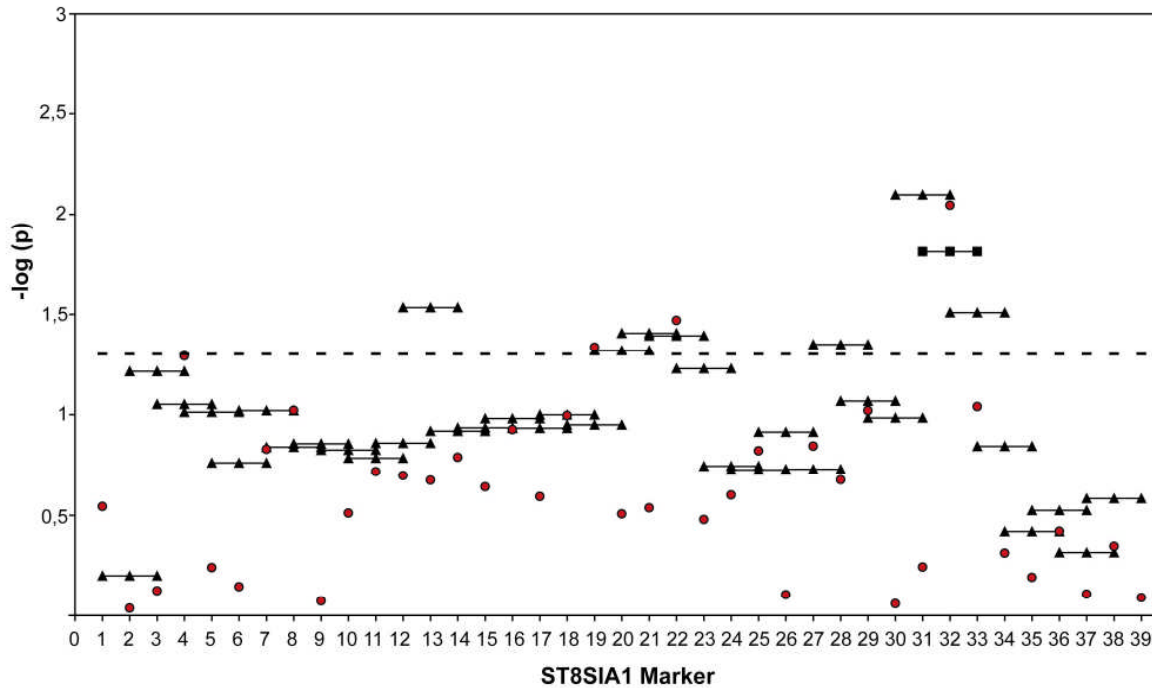


Abb. 5.16. Drei-Locusanalyse von SNPs im *ST8SIA1*.

Die folgende statistische Analyse der Genotypen wies für den SNP rs1861606 die stärkste Assoziation mit AD aus ($p=0,006$ im Additiven Modell). In der detaillierten Analyse nach dem Erkrankungsalter (Age of Onset), wurde in der EOAD Subgruppe SNP rs2300719 als starker Assoziationsmarker bestätigt ($p=0,003$ im Additiven Modell). Weitere signifikante Werte waren zu finden für die folgenden SNPs: hCV3289058, rs2193177, rs1019332, rs3782524, hCV2780147, rs12099876, rs11614453 und rs7295402. Nach einer Korrektur für multiples Testen waren diese Assoziationen jedoch nicht mehr signifikant. Detaillierte Ergebnisse sind in der Tabelle 5.16. dargestellt.

SNP ID	gesamtes Kollektiv		EOAD		LOAD	
	Add.	Rez. / Dom.	Add.	Rez. / Dom.	Add.	Rez. / Dom.
hCV25604142	0,244	0,244 / -*	0,894	0,894 / -*	0,205	0,205 / -*
rs704219	0,975	0,859 / 0,730	0,389	0,244 / 0,724	0,459	0,395 / 0,962
rs10841974	0,602	0,566 / 0,839	0,710	0,450 / 0,710	0,532	0,211 / 0,569
hCV3289058	0,032	0,051 / 0,155	0,052	0,053 / 0,371	0,231	0,366 / 0,215
rs2216228	0,349	0,253 / 0,826	0,747	0,699 / 0,912	0,268	0,157 / 0,759
rs2300718	0,759	0,722 / 0,979	0,056	0,067 / 0,305	0,275	0,270 / 0,631
rs2300719	0,153	0,283 / 0,151	0,003	0,007 / 0,043	0,444	0,377 / 0,883
hCV2780093	0,058	0,055 / 0,502	0,092	0,103 / 0,393	0,453	0,418 / 0,950
rs1558793	0,754	0,891 / 0,407	0,518	0,668 / 0,497	0,846	0,613 / 0,722
rs10459079	0,144	0,054 / 0,803	0,640	0,845 / 0,541	0,242	0,042 / 0,622
rs12815085	0,092	0,076 / 0,661	0,117	0,228 / 0,123	0,672	0,423 / 0,328
rs4762896	0,116	0,096 / 0,533	0,504	0,478 / 0,813	0,265	0,228 / 0,661
rs2300726	0,236	0,203 / 0,576	0,465	0,464 / 0,702	0,644	0,382 / 0,818
rs2017107	0,155	0,088 / 0,602	0,431	0,432 / 0,662	0,447	0,172 / 0,834
rs11612801	0,113	0,179 / 0,201	0,098	0,184 / 0,143	0,962	0,985 / 0,836
rs12811237	0,060	0,134 / 0,085	0,078	0,196 / 0,070	0,694	0,800 / 0,602
rs12310364	0,231	0,267 / 0,418	0,764	0,972 / 0,544	0,383	0,231 / 0,888
rs2193177	0,039	0,058 / 0,210	0,057	0,068 / 0,313	0,403	0,494 / 0,999
rs1019332	0,021	0,060 / 0,041	0,050	0,069 / 0,210	0,289	0,478 / 0,212
rs2012722	0,300	0,298 / 0,530	0,753	0,635 / 0,990	0,433	0,431 / 0,628
rs11834129	0,163	0,389 / 0,106	0,504	0,608 / 0,542	0,207	0,595 / 0,064
rs3782524	0,015	0,058 / 0,020	0,028	0,047 / 0,118	0,283	0,542 / 0,146
rs4762901	0,377	0,128 / 0,869	0,273	0,282 / 0,489	0,920	0,452 / 0,511
hCV2780146	0,141	0,290 / 0,092	0,079	0,208 / 0,064	0,958	0,819 / 0,646
hCV2780147	0,065	0,174 / 0,046	0,019	0,094 / 0,999	0,948	0,874 / 0,804
rs2072542	0,816	0,933 / 0,621	0,581	0,557 / 0,769	0,285	0,380 / 0,385
rs12099876	0,071	0,260 / 0,021	0,023	0,150 / 0,999	0,800	0,643 / 0,641
rs11610434	0,117	0,243 / 0,091	0,053	0,139 / 0,062	0,750	0,598 / 0,673
rs11614453	0,042	0,102 / 0,062	0,036	0,129 / 0,036	0,724	0,799 / 0,670
rs11832631	0,894	0,917 / 0,999	0,258	0,330 / 0,999	0,284	0,284 / *
rs2160536	0,553	0,556 / 0,724	0,587	0,734 / 0,575	0,889	0,712 / 0,852
rs1861606	0,006	0,039 / 0,008	0,082	0,130 / 0,174	0,061	0,184 / 0,048
rs7295402	0,046	0,161 / 0,035	0,168	0,344 / 0,132	0,200	0,347 / 0,194
rs10492283	0,396	0,460 / 0,530	0,489	0,479 / 0,700	0,820	0,963 / 0,619
rs2728827	0,718	0,309 / 0,649	0,620	0,917 / 0,483	1,000	0,288 / 0,262
hCV12102189	0,348	0,194 / 0,992	0,372	0,171 / 0,838	0,753	0,742 / 0,882
rs7970824	0,826	0,728 / 0,999	0,773	0,873 / 0,531	0,898	0,534 / 0,667
rs3803101	0,390	0,120 / 0,341	0,454	0,317 / 0,852	0,491	0,162 / 0,329
rs3809202	0,664	0,703 / 0,706	0,748	0,571 / 0,999	0,389	0,537 / 0,999

* Kein dominantes Modell (kein Homozygot).

Tab. 5.16.: Ergebnisse des Genotypentests für *ST8S1A1*. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. Für jeden SNP wurden drei statistische Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel.

5.2.1.1. Überprüfung der Assoziationsergebnisse in unabhängigen Studien

Vier SNPs (rs2300719, rs3782524, rs12099876 und rs1861606), die im Münchener Kollektiv die stärksten Assoziationen mit AD zeigten, wurden anschließend in drei unabhängigen Studien (aus Schweden, Australien und im Geschwisterpaar-Kollektiv aus Deutschland) reanalysiert. Die ausgewählten SNPs erzielten ausreichende Genotypisierungseffizienz (92-97%) und zeigten keine Abweichung vom HWE. Zwei SNPs, rs2300719 und rs12099876 (Tab. 5.17. a und c) zeigten in dem schwedischen Kollektiv starke Assoziationssignale. Für den SNP rs1861606 war es möglich eine schwache Assoziation zu detektieren. Bei den australischen Probanden wurde nur der SNP rs12099876 genotypisiert. Jedoch konnte hier eine Assoziation nicht bestätigt werden. In der Tabelle 5.17. a – d sind die detaillierten Replikationsergebnisse angegeben.

In der Geschwisterpaarstudie standen insgesamt 287 Familien (301 Erkrankten und 444 gesunde Geschwister) für die Genotypisierung zur Verfügung. Das durchschnittliche Alter der Probanden betrug $72,0 \pm 9,06$ Jahre bei Erkrankten, bzw. $68,4 \pm 10,1$ Jahre bei deren Kontrollen. Die statistischen Tests konnten nur bei den Familien durchgeführt werden, wo es Unterschied in der Allele-, bzw. Genotypen- Verteilung zwischen Erkrankten und ihren gesunden Geschwistern gab. Letztendlich war die Anzahl der informativen Familien klein (60 bis 108). Bei diesen Familien zeigten die getesteten SNPs keine Assoziation mit AD.

Kollektiv	N	Alter	Allelfreq. (%)		p-Wert (Allelic Test)			p-Wert (Genotyp Test)		
			G	A	GeKo	EOAD	LOAD	gesamtes Kollektiv	EOAD	LOAD
München										
AD	440	72,41 ± 9,58	0,790	0,210	0,138	0,002	0,471	0,153 / 0,283 / 0,151	0,003 / 0,007 / 0,043	0,444 / 0,377 / 0,883
Kontrollen	263	66,12 ± 12,7	0,755	0,245						
Stockholm										
AD	252	67,87 ± 6,06	0,704	0,296	0,004	0,004	0,272	0,005 / 0,024 / 0,017	0,004 / 0,024 / 0,015	0,292 / 0,275 / 0,445
Kontrollen	630	73,14 ± 8,88	0,770	0,230						

Tab. 5.17.a: Replikationsergebnisse für *ST8SIA1* SNP rs2300719 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

Kollektiv	N	Alter	Allelfreq. (%)		p-Wert (Allelic Test)			p-Wert (Genotyp Test)		
			A	C	GeKo	EOAD	LOAD	gesamtes Kollektiv	EOAD	LOAD
München										
AD	440	72,41 ± 9,58	0,762	0,238	0,010	0,024	0,250	0,015 / 0,058 / 0,020	0,028 / 0,047 / 0,118	0,283 / 0,542 / 0,146
Kontrollen	263	66,12 ± 12,7	0,811	0,189						
Stockholm										
AD	252	67,87 ± 6,06	0,788	0,212	0,733	0,632	0,252	0,732 / 0,256 / 0,367	0,628 / 0,773 / 0,496	0,253 / 0,175 / 0,046
Kontrollen	630	73,14 ± 8,88	0,777	0,223						

* bei Aussies konnte nicht geplext werden.

Tab. 5.17.b: Replikationsergebnisse für *ST8SIA1* SNP rs3782524 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

Kollektiv	N	Alter	Allelfreq. (%)		p-Wert (Allelic Test)			p-Wert (Genotyp Test)		
			G	A	GeKo	EOAD	LOAD	gesamtes Kollektiv	EOAD	LOAD
München										
AD	440	72,41 ± 9,58	0,845	0,155	0,062	0,018	0,795	0,071 / 0,260 / 0,021	0,023 / 0,150 / 0,999	0,800 / 0,643 / 0,641
Kontrollen	263	66,12 ± 12,7	0,874	0,126						
Stockholm										
AD	252	67,87 ± 6,06	0,909	0,091	0,009	0,703	0,006	0,010 / 0,863 / 0,004	0,710 / 0,718 / 0,764	0,005 / 0,341 / 0,001
Kontrollen	630	73,14 ± 8,88	0,856	0,144						
Perth										
AD	224	77,32 ± 10,9	0,836	0,164	0,630	0,733	0,967	0,637 / 0,713 / 0,639	0,830 / 0,708 / 0,728	0,982 / 0,820 / 0,537
Kontrollen	315	76,93 ± 12,7	0,820	0,180						

Tab. 5.17.c: Replikationsergebnisse für *ST8SIA1* SNP rs12099876 aus der schwedischen und australischen Studien. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

Kollektiv	N	Alter	Allelfreq. (%)		p-Wert (Allelic Test)			p-Wert (Genotyp Test)		
			G	A	GeKo	EOAD	LOAD	gesamtes Kollektiv	EOAD	LOAD
München										
AD	440	72,41 ± 9,58	0,720	0,280	0,004	0,071	0,042	0,006 / 0,039 / 0,008	0,082 / 0,130 / 0,174	0,061 / 0,184 / 0,048
Kontrollen	263	66,12 ± 12,7	0,787	0,213						
Stockholm										
AD	252	67,87 ± 6,06	0,713	0,287	0,188	0,276	0,944	0,174 / 0,044 / 0,513	0,306 / 0,930 / 0,187	0,944 / 0,102 / 0,454
Kontrollen	630	73,14 ± 8,88	0,746	0,254						

Tab. 5.17.d: Replikationsergebnisse für *ST8SIA1* SNP rs1861606 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

5.2.1.2. Sequenzierung des Exons 2

Die statistische Analyse der genotypisierten SNPs in *ST8SIA1* zeigte mehrere signifikante Ergebnisse zu intronischen SNPs um das Exon 2. Jedoch konnte keine funktionelle Mutation identifiziert werden. Um eine kausale Mutation, die an der Krankheitsentwicklung beteiligt sein könnte, zu identifizieren, wurde das Exon 2 (144 bp) mit den benachbarten Regionen (insg. 313 bp) mittels PCR amplifiziert und anschließend von beiden Seiten sequenziert (Abb. 5.17.). Die PCR Primer wurden so entworfen, dass mindestens je 40 bp der jeweiligen intronischen Sequenzen amplifiziert und sequenziert wurden. So wurde vermieden die SNPs innerhalb der Exon-Intron-Grenzen zu übersehen. Die Auswertung der Chromatogrammen ist im Kapitel 5.1.1.1.2. beschrieben.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit DNA von insg. 171 Probanden aus dem Münchner Kollektiv (davon 96 AD-Patienten und 75 Kontrollen) durchgeführt. Zwei SNPs aus den Datenbanken (rs2287166 und rs2072542) wurden als bialellisch bestätigt und zwei (rs7956389 und rs7956659) waren bei den untersuchten Probanden monomorph. Es wurden jedoch keine neuen SNPs entdeckt.

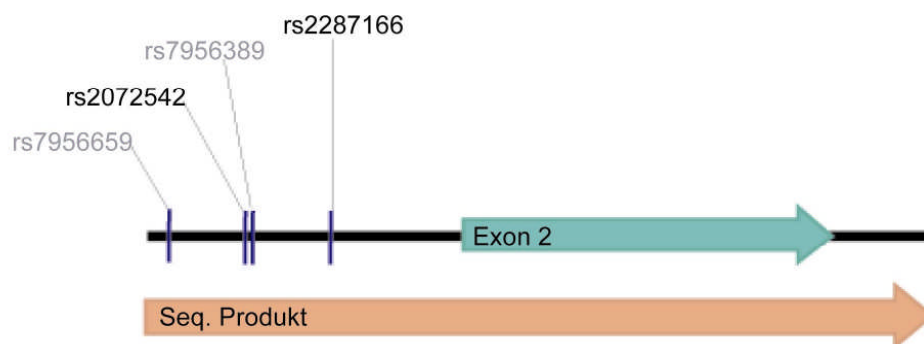


Abb. 5.17.: Sequenzierte Region auf dem Chromosom 12. Rote Box markiert das Sequenzierungsprodukt und die grüne Box das Exon 2.

5.2.2. Funktionelle Analyse der signifikanten Ergebnisse auf dem Chromosom 12

Auf dem Chromosom 12 wiesen mehrere intronische SNPs um das Exon 2 im *ST8SIA1* auf eine Assoziation mit AD hin. In die funktionelle Analyse wurden zwei replizierbare SNPs mit dem stärksten Assoziationssignal einbezogen (rs12099876 und rs1861606). Bei den beiden SNPs wurde das Minor Allel als Risikoallel bestätigt. Es wurde vermutet, dass die Risikoallele der signifikanten *ST8SIA1*-Marker die Entstehung der verschiedenen Spleißvarianten beeinflussen können. Um diese Hypothese zu testen wurden die Hirnsamples (von Frontal und Inferior Temporal Gyrus) von 11 AD Patienten und 8 Kontrollen analysiert und miteinander verglichen.

In dem ersten Schritt wurde die DNA aus dem Hirngewebe isoliert und die ausgewählten SNPs unter Anwendung von Restriktionsenzymen genotypisiert. Nachfolgend wurde die RNA aus dem Hirngewebe isoliert, die cDNA produziert und mittels spezifischen PCR Primer amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so entworfen, dass sich die entstehenden PCR Produkte miteinander überlappten. Mit drei verschiedenen Produkten (Exon 1- Exon 4 [Produkt 1], Exon 1- Exon 3 [Produkt 2] und Exon 2 – Exon 5 [Produkt 3]) wurde das ganze Gen abgedeckt (Abb. 5.18.).

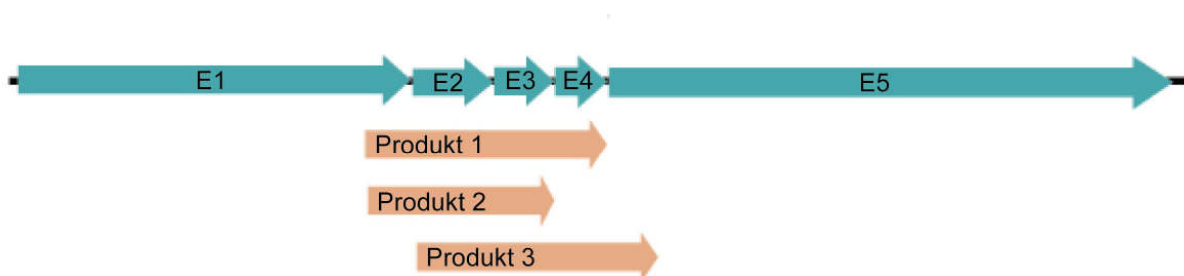


Abb. 5.18.: Die Amplifizierungsprodukte der *ST8SIA1* cDNA. Exonische Bereiche sind mit grünen und drei erwartete Amplifikate mit roten Balken dargestellt.

Die anschließende Analyse der PCR Produkte wies nicht auf eine Spleißvariante in der das Exon 2 beeinträchtigt wäre. Jedoch wurde bei der Amplifizierung der Produkten 1 und 3 je ein zusätzliches Fragment bei allen Probanden erzeugt (Abb. 5.19.). Beide Fragmente waren je ca. 110 Basen kürzer als die erwarteten Produkte. Die Auswahl der alternativen Spleißstellen ist von komplexen Regulationsmechanismen abhängig. Demzufolge ist eine präzise Vorhersage über den Ein- oder Ausschluss eines Exons nur durch die Sequenzierung möglich. Durch die anschließende Sequenzierung von beiden Seiten wurde bestätigt, dass das

Exon 3 in dieser Spleißvariante nicht vorhanden war. Die Analyse der Chromatogrammen ergab eine hundertprozentige Sequenzübereinstimmung, womit die erhaltenen Ergebnisse als zuverlässig anzusehen sind. Die neue Spleißvariante ist bei der GenBank unter EU041716 angemeldet.

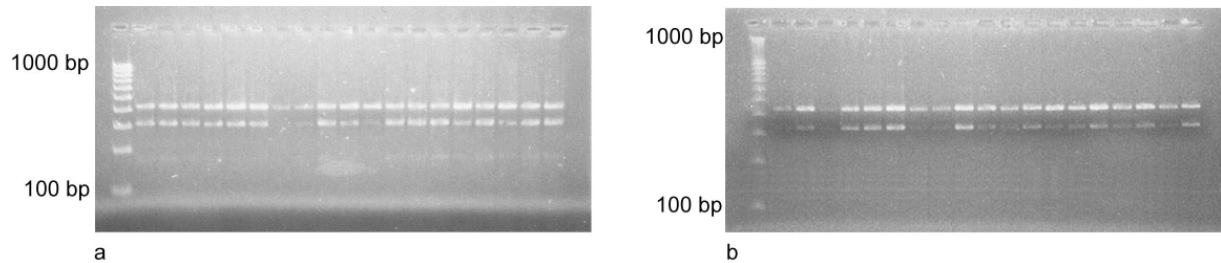


Abb. 5.19.: Die Gelelektrophorese der PCR Produkten: a) Das erwartete Produkt bei 440 bp (Exon 1- Exon 4) und ein zusätzliches Produkt bei ca. 330 bp und b) Das erwartete Produkt bei 440 bp (Exon 2- Exon 5) und ein zusätzliches Produkt bei ca. 330 bp.

6. Diskussion

Komplexe Erkrankungen wie Alzheimer Krankheit sind kausal nicht nur auf einen Mechanismus zurückzuführen, sondern resultieren aus einem Zusammenspiel verschiedener genetischer und umweltbedingter, bzw. lebensstilabhängiger Risikofaktoren (Brown RC et al., 2005). Mutationen in den Genen *PS1*, *PS2* und *APP* verursachen die verstärkte Produktion des A β 42 und führen somit zu seiner Ablagerung in Form von Amyloidplaques, eines der wichtigsten Merkmale der AD (Ozturk A et al., 2007). Ein weiteres starkes Indiz für eine Assoziation mit AD bilden die zahlreichen Studien in denen das Allel ϵ 4 im *APOE* Gen als der stärkste Riskofaktor für LOAD, bzw. sporadische Form der AD nachgewiesen wurde (Rebeck GW et al., 2006).

Es ist anzunehmen, dass neben den oben genannten genetischen Risikofaktoren viele weitere Gene, bzw. ihre Mutationen einen Beitrag zur Entwicklung und zum Verlauf der Alzheimer Erkrankung leisten. In mehreren genomweiten Studien wurde eine Kopplung der chromosomalen Regionen 10q22-24 und 12p13-q13 mit dem AD Phänotyp bei Kaukasiern nachgewiesen (Myers A et al., 2002; Liu F et al., 2007; Scott WK et al., 2000). In dieser Arbeit wurden insbesondere die SNPs von Kandidatengenen in den oben genannten Quantitativen Trait Loci (QTL) auf eine Assoziation mit AD getestet und anschließend Kandidatengene funktionell charakterisiert.

Im Folgenden werden Qualität der Daten, Studiendesign, die erzielten Ergebnisse der Assoziations- und der funktionellen Analyse, sowie ihre Relevanz für die Alzheimer Krankheit diskutiert.

6.1. Vor- und Nachteile der ausgewählten Studiendesigns

Durch Assoziationsstudien können krankheitsrelevante Gene identifiziert werden. Hierfür bieten sich zwei Ansätze an: das Fall-Kontroll- und das familienbasierte Studiendesign. Der häufigste Studientyp in der Epidemiologie ist die Fall-Kontroll Studie mit unabhängigen und unverwandten Stichproben (Lewis CM, 2002). Vorliegend wurde eine Fall-Kontroll-Studie in einer deutschen Population durchgeführt, deren Assoziationsergebnisse als Ausgangsbasis für die weiteren Analysen dienen. Um mögliche fehlerhafte Assoziationsergebnisse, die in einer Fall-Kontroll-Studie vorkommen können, auszuschließen, wurden die signifikanten Ergebnisse in weiteren unabhängigen Fall-Kontroll-

Studien, sowie in einer Geschwisterpaarstudie getestet. Beide Ansätze haben Vor- und Nachteile.

Mittels einer Fall-Kontroll-Studie werden genetische Marker (SNPs) identifiziert, die signifikante Unterschiede bzgl. der Allel-; bzw. Genotypfrequenz zwischen betroffenen Individuen (Fällen) und unabhängigen gesunden Kontrollen liefern (Lewis CM, 2002). Um die gleiche Information zu erreichen, werden in einem Geschwisterpaaransatz die gesunden Geschwister der betroffenen Individuen als Kontrollgruppe einbezogen (Whittemore AS et Tu IP, 2000). Zur Untersuchung der Krankheiten die eine lange Latenzzeit haben, sowie zur Aufklärung der Ursache von akuten Krankheitsausbrüchen sind Fall-Kontroll-Studien ein wichtiges Instrument. Im Vergleich zu den Geschwisterpaarstudien sind diese nicht allzu aufwendig und daher kostengünstig. So ist es möglich, in einer relativ kurzen Zeit eine umfangreiche Stichprobe zu untersuchen. Auf die Auswahl geeigneter Kontrollen ist dabei stets zu achten. Um sicher zu stellen, dass Fälle und Kontrollen hinsichtlich der wichtigsten Faktoren (gleiche Bevölkerungsgruppe, Alter, Geschlecht, sozioökonomischer Status etc.) vergleichbar sind, müssen beide Gruppen „gematched“ werden (Lewis CM, 2002). Dadurch werden Strukturunterschiede in den „matching Variablen“ aufgehoben, Stratifizierungsprobleme sind jedoch nicht vollständig auszuschließen. Unter Stratifikation versteht man, wenn Fälle und Kontrollen aufgrund von Populationsstrukturen eine Diversität hinsichtlich der Allelfrequenzen verschiedener Marker aufweisen, die nicht auf die Krankheit zurückzuführen sind. Dies kann oft zu fehlerhaften Assoziationsergebnissen führen, die sich später durch unabhängige Experimente nicht bestätigen lassen (Schork NJ et al., 2001). Die Stratifikationseffekte können durch die Genotypisierung adäquater Mengen der „genomic control“ (GC) Marker minimiert werden (Devlin B et al., 2000). Voraussetzung für die Auswahl der GC Marker ist, dass diese mit den analysierten Marker nicht gekoppelt sind und keine Assoziation mit dem untersuchten Phänotyp zeigen. Der Informationsgewinn aus Fall-Kontroll-Studien hat allerdings auch Nachteile. Hier kann nur ein Outcome untersucht werden (Lewis CM, 2002). Des Weiteren können aus einem Fall-Kontrollansatz z.B keine Prävalenz- und Inzidenz- Schätzungen ermittelt werden, da das Fall / Kontrolle Verhältnis durch die Anzahl der Personen, die in der Studie eingeschlossen werden, bestimmt wird und nicht durch die Häufigkeit der Fälle in der Bevölkerung. Die Hauptquellen zur Einteilung von „Fällen“ und „Kontrollen“ sind Krankenakten und Interviews mit Patienten und ihren Angehörigen. Eine unterschiedliche Erinnerungsfähigkeit von Fällen und Kontrollen kann zu einer Verzerrung führen. Diese wird als Recall Bias bezeichnet (Brown RC et al., 2005). Eine weitere Form der Informationsbias kann in diejenigen Studien auftreten wo nicht die

Betroffenen, sondern ihre Familienmitglieder, bzw. Betreuern über die Krankheitsanamnese befragt werden. Ihnen können oft keine detaillierten Informationen über die Exposition, Umweltbedingungen und Lebensstil vorliegen, woraus eine Verzerrung resultieren kann (Ersatz-Interview Bias).

Ein wichtiger Vorteil des Geschwisterpaaransatzes ist der gemeinsame genetische Hintergrund der Teilnehmer. Die statistische Analyse der Genotypen wird mittels Sib Transmissions-Disequilibrium Test (S-TDT) und Family-Based Association Test (FBAT) durchgeführt (s. Kapitel 2.16.2.). Hierfür werden die Genotypen der betroffenen Personen direkt mit denen ihrer gesunden Geschwister verglichen. Somit werden die Verzerrungen, die durch stratifizierte Populationen entstehen können, vermieden. Im Gegenteil zur Fall-Kontroll Studie ist die Durchführung dieses Studientypes zeitaufwendig, da mindestens zwei Familienmitglieder – ein erkranktes und mindestens ein gesundes Geschwistermitglied – rekrutiert werden müssen. In der Praxis stellt die ausführliche Dokumentation der verwandtschaftlichen Beziehungen der Studienteilnehmer ein weiteres Problem dar. Da in die statistische Assoziationsanalyse nur diejenigen Geschwister mit nachgewiesenen Allelfrequenzunterschieden einbezogen werden können, resultiert dieses oft in einer niedrigen Power (Whittemore AS et Tu IP, 2000). Dagegen kann in der Fall-Kontroll-Studie jede Information über Allelfrequenz verwendet werden.

Als Basis der vorliegenden Arbeit wurde ein Fall-Kontrolldesign benutzt. Dadurch war es möglich eine große Anzahl von Probanden in die Studie einzubeziehen, womit eine große Power erreicht wurde. Dagegen war die Rekrutierung von informativen Geschwisterpaaren wegen des späten Erkrankungsalters (Age of Onset) bei der AD erschwert. Um evtl. auftretende Stratifikationsprobleme auszuschließen, wurden die signifikanten Assoziationsergebnisse aus dem Münchner Kollektiv in fünf weiteren kaukasischen Samples getestet - in vier unabhängigen Fall-Kontrollstudien aus Deutschland, Italien, Schweden und Australien und einer Geschwisterpaarstudie aus Deutschland. In dem australischen Kollektiv wurden ausschließlich die Probanden europäischer Abstammung einbezogen (persönliche Mitteilung Herr Dr. Simon M Laws).

6.2. Zusammenfassung und Diskussion der Hauptergebnisse

Die Genotypisierungsdaten für einzelne Gene wurden mittels entsprechenden statistischen Tests (s. Kapitel 2.16.) ausgewertet und die signifikanten Assoziationsergebnisse nach der Bonferroni-Methode korrigiert. Mit diesem Verfahren wird das α -Fehler-Niveau für jeden einzelnen Test soweit herabgesetzt, dass der kumulierte Fehler 0,05 beträgt. Der Nachteil solcher Alpha-Adjustierungen ist, dass die Power der Tests, d.h. die Wahrscheinlichkeit einen tatsächlich vorhandenen Unterschied aufzudecken, beim multiplen Test mit der Anzahl der zu testenden Hypothesen abnimmt. Demzufolge können hier nur hochsignifikante Ergebnisse zur Ablehnung der Nullhypothese führen.

Die entscheidende Voraussetzung für den Nachweis einer wahren Assoziation zwischen jeweiligen Polymorphismen und Phänotyp bei komplexen Erkrankungen ist die Replikation der statistisch signifikanten Ergebnisse in unabhängigen Studien.

In der vorliegenden Arbeit zeigten mehrere SNPs eine statistisch signifikante Assoziation, die nach der Korrektur für multiples Testen nicht mehr signifikant war. Jedoch konnte hier die Validität der signifikanten Befunde aus dem Screening Sample durch die erfolgreiche Replikation in unabhängigen Kohorten bestätigt werden.

6.2.1. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse auf dem Chromosom 10

In der Linkage Region für AD auf dem Chromosom 10 befinden sich mehrere positionelle Kandidatengene. Die durchgeführten Analysen in der vorliegenden Arbeit wurden auf den funktionellen Kandidat *PLAU* fokussiert, mit dem Ziel seine Rolle in der Entstehung und dem Verlauf der Alzheimer Krankheit aufzuklären. Um die LD-Blöcke zu definieren, sowie evtl. weitere Assoziationssignale zu identifizieren, wurden auch die benachbarten Gene in die Analyse einbezogen. Die Genotypisierung wurde im Rahmen einer großen Fall-Kontroll-Studie aus München durchgeführt und die Genotypisierungsdaten bezüglich dem gesamten Kollektiv, bzw. der EOAD- und LOAD- Subgruppe statistisch ausgewertet. Für AD ist es von besonderer Bedeutung die genetischen Faktoren zu identifizieren, die zu einem frühen Krankheitsausbruch führen. Die statistische Analyse für die EOAD Subgruppe lieferte neben einem relativ schwachen Assoziationssignal für den intronischen SNP rs10458656 im *CaMK2G* (s. Tab. 5.5.) einen starken Assoziationshinweis für den funktionellen exonischen *PLAU* SNP rs2227564 (s. Tab. 5.2.). Als AD-Risikofaktor

wurde hier das Minor Allel T bestätigt. Um evtl. weitere kausale SNPs im Exon 6 zu identifizieren, wurde das ganze Exon sequenziert. Hierbei wurde eine seltene DNA-Variation (s. Kapitel 5.1.1.1.2.) nachgewiesen, die jedoch keine Assoziation mit der AD zeigte. Weiterhin ist unwahrscheinlich, dass ein zum SNP rs2227564 entfernter SNP diese Assoziation auslöst, da der SNP rs2227564 in einer LD-„Breakpoint“ Region liegt und mit anderen SNPs nicht korreliert ist (s. Abb. 5.3.). Anhand der vorliegenden Assoziationsergebnisse wurde eine Hypothese aufgestellt, dass das Minor Allel T im *PLAU* SNP rs2227564 einen Beitrag zur Ausprägung von der Alzheimer Krankheit leistet. Diese Hypothese wurde durch die Replikation der signifikanten Assoziationsergebnisse in unabhängigen Fall-Kontroll-Studien und einer Geschwisterpaarstudie untermauert (s. Tab. 5.4.). Weiterhin wurde angenommen, dass der SNP rs2227564 einen Einfluss auf den A β -Katabolismus hat. Hierfür wurde eine Analyse der Hirnsamples von AD-Patienten durchgeführt, wobei für die rs2227564 T-Allel-Träger eine signifikant höhere Anzahl der A β -Plaques im Vergleich zu den Nicht-Trägern nachgewiesen wurde. Dieser Effekt war unabhängig vom *APOE* ϵ 4 Allel (s. Kapitel 5.1.2.). Aus der Datenanalyse der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen lässt sich schließen, dass *PLAU* einen Beitrag zur Ausprägung von Alzheimer Phänotyp leistet.

Die Assoziation zwischen dem *PLAU* SNP rs2227564 und dem Alzheimer Phänotyp wurde auch in sieben weiteren Studien diskutiert. Minor Allel T im SNP rs2227564 wurde von Ertekin-Taner N und Mitarbeitern (2005), sowie von Pesaresi M und Mitarbeitern (2007) als AD-Risikofaktor bestätigt. Im Gegensatz dazu zeigten Finckh U und Mitarbeiter (2003) seinen protektiven Effekt auf die Entwicklung dieser komplexen Krankheit. Das gleiche Assoziationsmuster wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die beiden benachbarten SNPs rs2227562 und rs2227568 nachgewiesen. In zwei Fall-Kontroll-Studien aus der Schweiz und Griechenland war eine Assoziation zwischen dem funktionellen *PLAU* SNP und Alzheimer Krankheit nicht festzustellen (Papassotiropoulos A et al., 2005). Ähnliche Befunde lieferten drei weiteren Studien (Ozturk A et al., 2007, Bagnoli S et al., 2005; Myers AJ et al., 2004). Um die Ergebnisse aus den oben genannten Studien quantitativ zu einem Ergebnis zusammenzufassen, und die Aussagekraft gegenüber von Einzelstudien zu erhöhen, sollte hier eine Meta-Analyse (Crowther MA et Cook DJ, 2007) durchgeführt werden. Eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen in den durchgeführten Studien deutet im Wesentlichen auf die Heterogenität der genetisch komplexen Krankheiten hin. Die publizierten Daten stammen aus verschiedenen Populationen, in denen Unterschiede bezüglich Allelfrequenz und Korrelationsstruktur zwischen den genetischen Markern nachgewiesen wurden. Die

untersuchten Populationen sind auch verschiedenen Umweltbedingungen ausgesetzt. Das kann zu unterschiedlichen Effekten auf die Ausprägung einer komplexen Krankheit wie AD resultieren.

Hinsichtlich der Korrelationsstruktur wurden deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Populationen publiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein LD-„Break Point“ im *PLAU* Exon 6 identifiziert. Jedoch konnte dieser Befund in den amerikanischen Studien nicht bestätigt werden (Ertekin-Taner N et al., 2005; Myers AJ et al., 2004). Solche Unterschiede in der LD Struktur zwischen verschiedenen Populationen sind zu erwarten und ermöglichen oft die Region mit dem Assoziationssignal einzuschränken (Mueller JC, Lohmussaar E et al., 2005). Weiterhin deutet die schwache Korrelation zwischen den signifikanten Markern (SNP rs2227562, SNPrs2227564 und SNP rs2227568) und die hohen r^2 Werte zwischen den nicht benachbarten Markern auf einen langen und unabhängigen Mutationsverlauf der einzelnen Marker hin. Neuere Mutationsereignisse können in verschiedenen Populationen variieren, was in unterschiedlichen populationsabhängigen Korrelationsstrukturen resultiert und damit eine Replikation der Assoziationsergebnisse erschwert.

Ein weiterer Diskussionspunkt bei der Durchführung der epidemiologischen Studien stellt die ausreichende Samplegröße, sowie adäquates Studiendesign dar. In der Studie von Papassotiropoulos A und Mitarbeitern (2005), sowie Finckh U und Mitarbeitern (2003) wurden die Studiengruppen mit einer relativ kleinen Probandenanzahl analysiert (98 Probanden aus der Schweiz, 124 Probanden aus Italien, bzw. 270 Probanden aus Griechenland). Ein weiterer Schwachpunkt der beiden Studien war das Studiendesign. Hier wurden die Fall-Kotroll-Ansätze mit dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund und einer deutlich unterschiedlichen Genotypedistribution „gepoolt“.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudien ist das Durchschnittsalter der Stichprobe. Dieser Faktor wird oft unterschätzt, was zu einer Diskrepanz der Ergebnisse zwischen den Studien führen kann. Die Bedeutung der genetischen Risikofaktoren für das Ausbruchalter der Krankheit wurde in zahlreichen Assoziationsstudien für den AD-Risikofaktor *APOE* $\epsilon 4$ berichtet (Bickeböller H et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde ein ähnliches Phänomen für das *PLAU* Risikoallel nachgewiesen. Die statistische Auswertung des gesamten Kollektivs aus München und Perth wies auf eine schwache Assoziation zwischen dem *PLAU* SNP rs2227564 und AD hin. Jedoch zeigte die detaillierte Analyse für die EOAD, bzw. LOAD Subgruppe eine steigende Assoziation bei den jüngeren Probanden, wobei bei den älteren Probanden keine Assoziation festzustellen

war. Damit lassen sich auch die negativen Assoziationsergebnisse in Studien mit LOAD Patienten (Myers AJ et al., 2004; Ozturk A et al., 2007) erklären.

Die funktionelle Beteiligung des *PLAU* Gens an der AD wurde in mehreren Studien diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine höhere A β -Plaquekonzentration bei den Risikoallelträgern nachgewiesen. Ertekin-Taner N und Mitarbeiter (2005) berichteten über einen signifikant höheren A β 42 Plasmaspiegel bei den T-Allel-Trägern. Weiterhin zeigten sie eine hohe A β Konzentration bei *PLAU* defizienten Mäusen. Daraus lässt sich vermuten, dass der Funktionsverlust des *PLAU* Gens den erhöhten A β Plasmaspiegel verursacht. Einen weiteren Nachweis für die funktionelle Beteiligung von *PLAU* lieferte die Studie von Krezowski J, Knudson D und Mitarbeitern (2004). Hier wurden die Folgen der APP-Überexpression auf das Todesalter bei transgenen Mäusemodellen untersucht. Dabei wurde eine Region auf dem Maus-Chromosom 14 identifiziert, welche dem letalen Effekt von APP entgegenwirkt und u.a. mit dem menschlichen Gen *PLAU* auf dem Chromosom 10 homolog ist. In der Studie von Papassotiropoulos und Mitarbeitern (2005) wurde auch die Auswirkung des funktionellen *PLAU* SNPs auf krankheitsrelevante Merkmale untersucht. Jedoch wurde in dieser Studie weder ein Effekt auf die signifikant erhöhte Plaqueanzahl im Temporallappen, noch eine erhöhte A β 42 Konzentration in der Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit und im Plasma nachgewiesen. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Grund dafür die Verwendung des Hirnsamples von Individuen ohne nachgewiesene neurodegenerativen Störungen resultiert.

Die vorliegenden Ergebnisse der Assoziations-, bzw. funktionellen Analyse sprechen dafür, dass *PLAU* bzw. sein Genprodukt PLAUE einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung dieser komplexen Krankheit leistet.

Obwohl auch das dem *PLAU* benachbarte Gen *CaMK2G* mehrere replizierbare Assoziationssignale zeigte (s. Kapitel 5.1.1.2.), wurden diese in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt. Der Grund dafür lag in ihrer Lokalisation in intronischen Bereichen, wodurch sich keine Nachweise über Proteinfunktion ableiten liessen.

6.2.2. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse auf dem Chromosom 12

Auswirkung der Mutationen im *ST8SIA1* auf die Ausprägung der AD wurde bislang noch nicht aufgeklärt. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Analyse der Genotypisierungsdaten spricht dafür, dass *ST8SIA1* bzw. sein Genprodukt Gangliosid GD3 Synthase einen Beitrag zur Entwicklung der komplexen Gen-Umweltbeziehungen leistet, die in dem Phänotyp Alzheimer Krankheit resultieren. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, bzw. EOAD und LOAD Subgruppen durchgeführt. Die Auswertung der Daten der EOAD Subgruppe wies auf eine Assoziation zwischen AD und einer Reihe von stark korrelierten SNPs um das Exon 2 hin (s. Tab. 5.15., Tab. 5.18. und Abb. 5.11.). Jedoch konnte hier kein funktioneller SNP identifiziert werden. Im weiteren Verlauf der Alzheimer Studie ist es wichtig die LD-Blockgrenzen auf der untersuchten chromosomalen Region zu bestimmen und die SNPs in den benachbarten Genen auf eine Assoziation mit AD zu testen. Die nachfolgende Replikationsanalyse zeigte keine konsistenten Ergebnisse (s. Kapitel 5.2.1.1.). In der schwedischen Studie wurden die signifikanten Ergebnisse für drei SNPs (rs2300719, rs12099876 und rs1861606) detektiert und somit die Resultate der deutschen Studie bestätigt. In der australischen Studie gelang es nur den SNPs rs12099876 in einen Multiplexansatz zu integrieren und mit der ausreichenden Genotypisierungseffizienz zu genotypisieren. Jedoch wurde hier keine Assoziation mit AD nachgewiesen. Der mögliche Grund dafür liegt in der Alterstruktur des untersuchten Samples. Das Durchschnittsalter der Probanden beträgt 70 Jahren in der deutschen Studie, bzw. 71 in der schwedischen Studie. In der australischen Stichprobe lag der Mittelwert bei 77 Jahren. Weiterhin zeigte die EOAD Subgruppe mit insgesamt 79 Probanden zu niedrige Power. Dies erklärt keine positive Replikation für das Assoziationssignal innerhalb der EOAD Subgruppe. Das Problem mit der niedrigen Power war auch in der Geschwisterpaarstudie der Fall. Hier war die Anzahl der informativen Familien (60 bis 108) niedrig was in einer negativen Replikation resultierte.

Aufgrund der Konzentration der Assoziationssignale um das Exon 2 und die negativen Resequenzierungsergebnisse (s. Kapitel 5.2.1.2.) wurde die Hypothese aufgestellt, dass die signifikanten intronischen SNPs den Spleißprozess beeinflussen und damit die Krankheitsentwicklung, bzw. ihren Verlauf verändern. Das alternative Spleißen ist ein Mechanismus, der bei 40 bis 60% der menschlichen Gene vorkommt und unter anderem die Synthese von mehreren hundert tausend Proteinen aus 25000 bis 40000 Genen ermöglicht (Harrison PM et al., 2002; Stoilov P et al., 2002). Die Vielfalt an Proteinisoformen resultiert oft in unterschiedlichen Proteinfunktionen, bzw. zellspezifischer, entwicklungspezifischer

oder krankheitsspezifischer Expression (Thanaraj T et al., 2004). Fehlregulation des alternativen Spleißens kann auf Proteinebene zu erheblichen Konsequenzen führen und ist in neueren Studien als Ursache der verschiedenen Krankheiten diskutiert (Philips AV et Cooper TA, 2000; Stoilov P et al., 2002). Man vermutet, dass etwa 15% aller menschlichen Krankheiten durch Fehlspleißern verursacht werden (Yoshida R et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss der Risikoallele der signifikant assoziierten SNPs im Intron 1 und Intron 2 auf die Entstehung der neuen Spleißvarianten bestätigt werden (s. Kapitel 5.2.2.). Jedoch lieferten die Vergleichsanalysen der Sequenzierungsdaten von RT-PCR Produkten einen klaren Nachweis für eine neue Spleißvariante in der das gesamte Exon 3 fehlt (Abb. 6.1.).

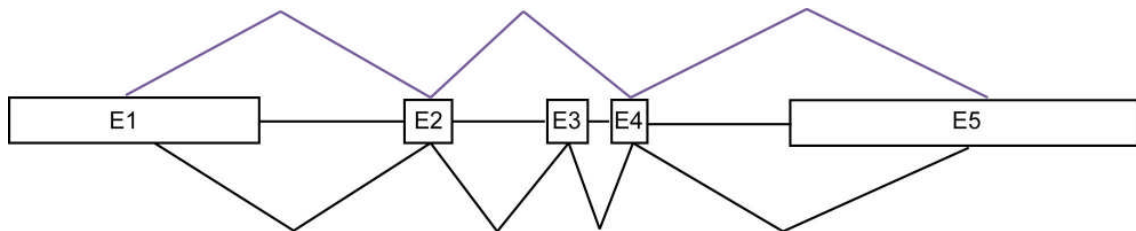


Abb. 6.1.: Das alternative Spleißen des *ST8SIA1* Genes. Die schwarzen Linien stellen das Transkript aller Exons dar, die blauen Linien stellen die alternative Spleißversion ohne Exon 3 (EU041716) dar.

In einem weiteren Schritt ist es notwendig den kausalen Hintergrund für den Spleißprozess zu identifizieren. Durch die Translation der Spleißvariante ohne Exon 3 entstehen mehrere Stoppkodons, was in einem Transkript mit 135 Aminosäuren resultiert (Abb. 6.2.).

a)

MSPCGRARRQTSRGAMAVLAWKFPRLPMPGASALCVVLCWLYIFPVYRLPNEKEIVQGVLQQGTA
 WRRNQTAARAFRKQMEDCCDPAHLFAMTKMNSPMGKSMWYDGEFLYSFTIDNSTYSLFPQATPFQLP
 LKKCAVVGNGGILKKSGCGRQIDEANFVMRCNLPPLSSEYTKDVGSKSQLVTANPSIIRQRFQNLWSR
 KTFVDNMKIYNHSYIYMPAFSMKTGTEPSLRVYYTSLDVGANQTVLFANPNFLRSIGKFWKSRGIHAKR
 LSTGLFLVSAALGLCEEVAIYGFWPFSVNMHEQPISHHYDNLVLPFSGFHAMPEEFLQLWYLHKIGALR
 MQLDPCEDTSLQPTS

b)

MSPCGRARRQTSRGAMAVLAWKFPRLPMPGASALCVVLCWLYIFPVYRLPNEKEIVQGVLQQGTA
 WRRNQTAARAFRKQMEDCCDPAHLFAMTKMNSPMGKSMWYDGEFLYSFTIDNSTYSLFPQM~~QSPSFV~~
~~K*IH*GCWIKSVSDS*SQHNSAKVSEPSVVQKDICGQHENL*PQLHLHACLfyEDRNRAIFEGLLYTVR~~
~~CWCQSNSAVCQPQLSA*HWKVLEK*RNPCQAPVHRTFSGERSSGSL*RGGHLWLLALLCEYA*AAHQ~~
~~PLL*QRLTLFWLPCHARGISPTLVSS*NRCTENAAGPM*RYLTPAHFLX~~

Abb. 6.2.: Transkript des ganzen *ST8SIA1* Gens (a) und der alternativ gespleißten Variante (b). Durch die Translation der *ST8SIA1* mRNA entsteht Protein GD3 Synthase mit 356 Aminosäurenresten (a). Durch das Rausspleißen von Exon 3 wird die mRNA in ein kürzeres Produkt (135 Aminosäurenresten) transkribiert (b). Die Veränderung, die durch das alternative Spleißen entsteht, ist hier blau markiert. Stopp Kodons sind mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

Ob die alternativ gespleißte mRNA Variante *in vivo* tatsächlich translatiert wird, kann nur über Proteinanalysen nachgewiesen werden. Folgend soll getestet werden, ob es in den Hirnen von AD Patienten im Vergleich zu den Kontrollhirnen zu einer signifikant unterschiedlichen Expression des kürzeren Proteins kommt.

6.3. Ausblick

Die in dieser Arbeit vorliegenden Assoziationsergebnisse und ihre positive Replikation in unabhängigen Studien sprechen für eine Beteiligung der ausgewählten Kandidatengene auf den Chromosomen 10 und 12 an der Ausprägung der Alzheimer Krankheit. Jedoch können diese Erkenntnisse nur als erste Indizien im Hinblick auf die Funktion der identifizierten Kandidatengene angesehen werden. Um die Assoziationsergebnisse zu untermauern, sind entsprechende funktionelle Analysen erforderlich.

Das minor Allel T des *PLAU* SNPs rs2227564 wurde in mehreren Assoziationsstudien als AD-Risikofaktor diskutiert. Seine positive Auswirkung auf die Entstehung der A β -Plaques wurde durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte histopathologische Analyse bestätigt. Folglich könnte in einem nächsten Schritt das benachbarte Kandidatengen *CaMK2G* funktionell charakterisiert werden, da die Auswertung der Genotypisierungsdaten auf eine replizierbare Assoziation zwischen mehreren intronischen SNPs und AD hingewiesen hat.

Auf dem Chromosom 12 wurde eine breite Region in Verbindung mit Alzheimer Krankheit gebracht. In dieser Studie zeigte das Kandidatengen *ST8SIA1* eine Assoziation zwischen intronischen SNPs um das Exon 2 und AD-Phänotyp. Die Befunde waren auch in einer unabhängigen Studie replizierbar. Die Analyse der RNA aus dem menschlichen Hirn wies auf die Präsenz einer kürzeren mRNA hin. Um aufzuklären, ob diese *in vivo* translatiert wird, ist es notwendig diese Erkenntnisse weiter zu verfolgen und auf Proteinebene zu untersuchen. Hierfür bietet es sich an mittels Real Time PCR die Konzentration des entstehenden Proteins zu messen und diese bei den Betroffenen und ihren gesunden Kontrollen zu vergleichen. Weiterhin ist es wichtig die SNPs in dem *ST8SIA1* benachbarten Genen zu genotypisieren und auf eine Assoziation mit AD zu testen. Zunächst sollten die signifikanten SNPs in weiteren Fall-Kontroll-, bzw. Familienstudien und in unterschiedlichen ethnischen Populationen auf eine Assoziation mit AD getestet werden. Durch die Assoziationsanalyse der SNPs in den benachbarten Genen sollten die LD-Blockgrenzen bestimmt und die krankheitsrelevante Region auf dem Chromosom 12 präziser definiert werden.

7. Anhang

7.1. Diagnostische Kriterien für das Demenz-Syndrom

7.1.1. ICD (International classification of diseases and related health problems) 10

Kriterien

Psychopathologie:

- Abnahme des Gedächtnisses, besonders beim Lernen neuer Information, in schweren Fällen auch beim Erinnern früher gelernter Information
- zusätzlich erforderliche Beeinträchtigungen:
 1. Abnahme anderer kognitiver Fähigkeiten (Urteilsfähigkeit, Denkvermögen), beider Nachgewiesen durch Fremdanamnese sowie neuropsychologische Untersuchung oder quantifizierte kognitive Verfahren
 2. Verminderung oder Affektkontrolle des Antriebs oder des Sozialverhaltens
- Diagnose wird gestützt durch Vorliegen von Aphasie, Apraxie oder Agnosie

Alltagsrelevanz:

Beeinträchtigung der täglichen Aktivitäten sowohl durch Störung des Gedächtnisses, als auch durch die Störung anderer kognitiver Fähigkeiten

Dauer:

Störungen des Gedächtnisses und anderer kognitiver Fähigkeiten sollen mindestens 6 Monate vorhanden sein

Ausschlusskriterium:

Keine Bewusstseinsstörung

Ausschluss anderer Hirnerkrankungen (z.B. HIV-Infektion, vaskuläre Hirnerkrankungen, Parkinson Krankheit, Chorea Huntington, Normaldruckhydrozephalus), systemischer Erkrankungen (z.B. Hypothyreose, Vitamin-B12 oder Folsäuremangel, Hyperkalzämie) und Alkohol- oder Drogenmissbrauch

7.1.2. DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)

Psychopathologie:

- Gedächtnisstörungen (beim Lernen neuer Information oder beim Erinnern früher gelernter Information)
- zusätzlich erforderliche Beeinträchtigungen:
mindestens eines von: Aphasie, Apraxie, Agnosie, Störung exekutiver Fähigkeiten (Planen, Organisieren, Ordnen, Abstrahieren)

Alltagsrelevanz:

Die kognitiven Störungen verursachen eine deutliche Störung im sozialen oder beruflichen Bereich und stellen eine deutliche Minderung gegenüber dem früheren Funktionsniveau dar

Dauer:

keine Festlegung

Ausschlusskriterium:

Die Defizite treten nicht nur während eines Delirs auf

7.1.3. NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association) Kriterien

Mögliche AD

- Demenzsyndrom ohne neurologische, psychiatrische oder systemische Krankheiten, die eine Demenz verursachen könnten; auch bei unterschiedlichem Beginn und klinischen Verlauf
- zusätzlich vorhandene systemische oder cerebrale Erkrankung, die eine Demenz verursachen könnte, aber nicht als Ursache angenommen wird
- Vorliegen eines umschriebenen, progressiven, schweren kognitiven Defizits, für das keine andere Erklärung gefunden wird

Wahrscheinliche AD

- klinische Untersuchung und Dokumentation einer Demenz mittels MMSE, Blessed Dementia Scale oder anderer Tests
- Defizite in mindestens zwei kognitiven Funktionen
- fortschreitender Abbau von Gedächtnis und anderen kognitiven Funktionen
- keine Bewusstseinsstörung
- Krankheitsbeginn zwischen dem 40. und 90. Lebensjahr, meist jedoch nach dem 65
- Fehlen von systemischen oder anderen das Gehirn betreffenden Krankheiten, die den progressiven Verlust von Gedächtnis und Kognition erklären könnten

Mit der Diagnose vereinbare Merkmale:

- Plateaus im Fortschreiten der Krankheit
- assoziierte Symptome wie Depression, Schlaflosigkeit, Inkontinenz, Wahnvorstellungen, Sinnestäuschungen, Halluzinationen, übermäßige verbale, emotionale oder körperliche Reaktionen und sexuelle Störungen, fortschreitende Störung der Sprache
- andere neurologische Auffälligkeiten einschließlich motorischer Symptome wie erhöhter Muskeltonus, Myoklonien und Gangstörungen
- epileptische Anfälle
- normaler Liquor, altersentsprechendes normale CT und EEG

Ausschlusskriterien:

- plötzlicher Krankheitsbeginn
- fokale Befunde bei der körperlichen neurologischen Untersuchung (z.B. Hemisyndrom, Gesichtsdefekt, Koordinationsstörungen im Frühstadium)
- epileptische Anfälle oder Gangstörungen zu Beginn oder im Frühstadium

Definitive AD

- Vorliegen der klinischen Kriterien für wahrscheinliche AD
- histopathologischer Befund der Biopsie oder Autopsie typisch für AD

7.1.4. CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) Kriterien

Normal im Hinblick auf AD und andere dementielle Prozesse

- keine Demenzanamnese, keine histologischen Hinweise auf AD und keine anderen neuropathologischen Läsionen, die eine Demenz verursachen könnten
- ein „A“ altersbezogener Plaquescore und keine Demenzanamnese
- Demenzanamnese ohne neuropathologische Veränderungen, die eine Demenz verursachen könnten

Mögliche AD

- ein „A“ altersbezogener Plaquescore, Demenzanamnese und An- oder Abwesenheit von anderen neuropathologischen Läsionen, die eine Demenz verursachen könnten
- ein „B“ oder „C“ altersbezogener Plaquescore, aber keine klinische Demenzmanifestationen

Wahrscheinliche AD

- ein „B“ altersbezogener Plaquescore, Demenzanamnese und An- oder Abwesenheit von anderen neuropathologischen Läsionen, die eine Demenz verursachen könnten

Definitive AD

- ein „C“ altersbezogener Plaquescore, Demenzanamnese und An- oder Abwesenheit von anderen neuropathologischen Läsionen, die eine Demenz verursachen könnten

Altersbezogener Plaquescore / Semiquantitative Bestimmung der maximalen Dichte der neuritischen Plaques bei hundertfacher Vergrößerung:

Todesalter	Häufigkeit der neuritischen Plaques			
	Keine Plaques	Spärlich	Mäßig häufig	Häufig
< 50	0	C	C	C
50 – 75	0	B	C	C
> 75	0	A	B	C

Tab. 7.1: AD Diagnostik nach CERAD Kriterien: Die Dichte neuritischer Plaques wird als gering, mäßig oder hoch bewertet. Diese Dichte wird in einen altersbezogenen Plaquescore konvertiert und als CERAD 0, A, B oder C angegeben. (0 = kein histologischer Hinweis auf AD, A = unsichere hist. Hinweise auf AD, B = hist. Hinweise auf AD und C = klarer Hinweis auf AD).

7.2. Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse

7.2.1. Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *PLAU*

Window	Marker	Haplotyp ID	Sequenz	Frequenz (Kontrollen/Fälle)	p-Wert
1	1,2,3	1.1	ACA	0,556	0,0196
		1.2	GAG	0,242	0,7064
		1.3	ACG	0,202	0,0036
2	2,3,4	2.1	CAG	0,560	0,0189
		2.2	AGA	0,239	0,7866
		2.3	CGG	0,190	0,0047
		2.4	AGG	0,011	0,6217
3	3,4,5	3.1	AGC	0,556	0,0235
		3.2	GAT	0,241	0,6307
		3.3	GGT	0,200	0,0346
4	4,5,6	4.1	GCG	0,547	0,0577
		4.2	ATT	0,240	0,6115
		4.3	GTT	0,200	0,0367
		4.4	GCT	0,013	0,3852
5	5,6,7	5.1	CGG	0,548	0,0561
		5.2	TTA	0,241	0,6321
		5.3	TTG	0,199	0,0321
		5.4	CTG	0,013	0,3823
6	6,7,8	6.1	GGG	0,545	0,0777
		6.2	TAC	0,233	0,7858
		6.3	TGG	0,169	0,0085
		6.4	TGC	0,042	0,2044
7	7,8,9	7.1	GGC	0,709	0,6285
		7.2	ACT	0,232	0,7435
		7.3	GCT	0,025	0,6231
		7.4	GCC	0,020	0,1137
8	8,9,10	8.1	GCT	0,710	0,6830
		8.2	CTG	0,253	0,9053
		8.3	CCT	0,015	0,0875
9	9,10,11	9.1	CTT	0,720	0,8167
		9.2	TGC	0,261	0,5620
10	10,11,12	10.1	TTG	0,565	0,0425
		10.2	GCG	0,261	0,5020
		10.3	TTA	0,158	0,0163
11	11,12,13	11.1	TGT	0,571	0,0837
		11.2	CGT	0,246	0,4558
		11.3	TAC	0,152	0,0061
		11.4	CGC	0,019	0,0007
12	12,13,14	12.1	GCC	0,593	0,8764
		12.2	GTC	0,245	0,0674
		12.3	ACT	0,140	0,0039
		12.4	ATT	0,010	0,4183
13	13,14,15	13.1	CCT	0,597	0,9929
		13.2	TCT	0,242	0,0581
		13.3	CTT	0,136	0,0065
		13.4	TTT	0,014	0,6271
		13.5	CCC	0,011	0,7341
14	14,15,16	14.1	CTT	0,567	0,2190
		14.2	CTC	0,273	0,6433
		14.3	TTC	0,145	0,0231
		14.4	CCT	0,011	0,7252

15	15,16,17	15.1	TTT	0,558	0,0799
		15.2	TCC	0,409	0,0602
		15.3	TCT	0,016	0,1897
		15.4	CTT	0,011	0,7096
16	16,17,18	16.1	TTG	0,559	0,0627
		16.2	CCA	0,409	0,0556
		16.3	CTA	0,011	0,1830
		16.4	TTA	0,010	0,7987
17	17,18,19	17.1	TGT	0,563	0,0689
		17.2	CAC	0,411	0,0224
		17.3	TAC	0,019	0,1510
18	18,19,20	18.1	GTT	0,562	0,0822
		18.2	ACC	0,418	0,0560
		18.3	ACT	0,014	0,6113
19	19,20,21	19.1	TTG	0,559	0,1057
		19.2	CCA	0,409	0,0714
		19.3	CTG	0,012	0,4608
		19.4	CCG	0,011	0,9938
20	20,21,22	20.1	TGC	0,572	0,0972
		20.2	CAT	0,490	0,6048
		20.3	CAC	0,162	0,0694
		20.4	CGC	0,013	0,9272
21	21,22,23	21.1	GCG	0,581	0,0920
		21.2	ATT	0,239	0,3883
		21.3	ACG	0,164	0,1009
		21.4	ATG	0,013	0,2083

Tab. 7.2.: Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *PLAU*.

7.2.2. Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *CaMK2G*

Window	Marker	Haplotyp ID	Sequenz	Frequenz	p-Wert
1	1,2,3	1.1	GAT	0,593	0,4042
		1.2	CGC	0,248	0,4001
		1.3	CAT	0,137	0,0698
		1.4	CGT	0,012	0,8961
2	2,3,4	2.1	ATA	0,597	0,2549
		2.2	GCA	0,256	0,6535
		2.3	ATG	0,134	0,0207
		2.4	GTA	0,012	0,9491
3	3,4,5	3.1	TAC	0,610	0,2929
		3.2	CAC	0,231	0,2988
		3.3	TGC	0,134	0,0212
		3.4	CAT	0,025	0,2846
4	4,5,6	4.1	ACT	0,603	0,0866
		4.2	ACC	0,238	0,8288
		4.3	GCC	0,132	0,0299
		4.4	ATC	0,025	0,2512
5	5,6,7	5.1	CTC	0,601	0,2228
		5.2	CCT	0,233	0,53
		5.3	CCC	0,137	0,0685
		5.4	TCT	0,025	0,2975
6	6,7,8	6.1	TCG	0,529	0,0616
		6.2	CTG	0,240	0,8082
		6.3	CCA	0,130	0,0641
		6.4	TCA	0,072	0,296
		6.5	CTA	0,018	0,9826

7	7,8,9	7.1	CGA	0,510	0,0263
		7.2	TGA	0,247	0,9299
		7.3	CAG	0,178	0,0073
		7.4	CAA	0,025	0,8769
		7.5	CGG	0,024	0,1788
		7.6	TAA	0,016	0,6305
8	8,9,10	8.1	GAC	0,522	0,0213
		8.2	GAT	0,236	0,9854
		8.3	AGT	0,177	0,0053
		8.4	AAC	0,026	0,5553
		8.5	GGC	0,019	0,1994
		8.6	AAT	0,014	0,9815
9	9,10,11	9.1	ACT	0,548	0,0113
		9.2	ATT	0,242	0,9753
		9.3	GTC	0,178	0,0039
		9.4	GCT	0,021	0,2949
10	10,11,12	10.1	CTT	0,568	0,0324
		10.2	TTC	0,240	0,9318
		10.3	TCT	0,187	0,0045
11	11,12,13	11.1	TTA	0,569	0,1863
		11.2	TCG	0,236	1,0
		11.3	CTA	0,183	0,0259
12	12,13,14	12.1	TAC	0,560	0,0717
		12.2	CGT	0,233	0,8424
		12.3	TAT	0,193	0,0051
13	13,14,15	13.1	ACC	0,558	0,0628
		13.2	GTT	0,232	0,9129
		13.3	ATT	0,199	0,0157
14	14,15,16	14.1	CCC	0,561	0,045
		14.2	TTC	0,381	0,0574
		14.3	TTT	0,050	0,8594
15	15,16,17	15.1	CCG	0,565	0,0272
		15.2	TCG	0,195	0,8509
		15.3	TCA	0,186	0,0054
		15.4	TTG	0,050	0,8662
16	16,17,18	16.1	CGC	0,561	0,0242
		16.2	CGT	0,201	0,8027
		16.3	CAT	0,188	0,0025
		16.4	TGT	0,049	0,8965
17	17,18,19	17.1	GCT	0,561	0,0456
		17.2	GTC	0,248	0,8458
		17.3	ATC	0,188	0,0030
18	18,19,20	18.1	CTT	0,510	0,1005
		18.2	TCT	0,434	0,0292
		18.3	CTC	0,052	0,4279
19	19,20,21	19.1	TTA	0,510	0,1005
		19.2	CTG	0,433	0,0318
		19.3	TCA	0,050	0,3457
20	20,21,22	20.1	TAT	0,509	0,0791
		20.2	TGG	0,236	0,6696
		20.3	TGT	0,199	0,025
		20.4	CAT	0,050	0,3469
21	21,22,23	21.1	ATT	0,556	0,0288
		21.2	GGA	0,235	0,709
		21.3	GTT	0,199	0,0201
22	22,23,24	22.1	TTA	0,742	0,924
		22.2	GAC	0,240	0,9456
		22.3	TTC	0,011	0,3239

Tab. 7.3.: Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *CaMK2G*

7.2.3. Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *VCL* und *AP3M1*

Window	Marker	Haplotyp ID	Sequenz	Frequenz	p-Wert
1	1,2,3	1.1	ACA	0,449	0,545
		1.2	ACT	0,269	0,1434
		1.3	GTA	0,140	0,3358
		1.4	GCT	0,093	0,3693
		1.5	GCA	0,031	0,2098
		1.6	ATA	0,015	0,5691
2	2,3,4	2.1	CAG	0,483	0,7858
		2.2	CTA	0,353	0,4893
		2.3	TAG	0,152	0,5664
3	3,4,5	3.1	AGT	0,591	0,5457
		3.2	TAC	0,186	0,3489
		3.3	TAT	0,168	0,9103
		3.4	AGC	0,044	0,7746
4	4,5,6	4.1	GTT	0,594	0,6299
		4.2	ACC	0,185	0,2558
		4.3	ATT	0,164	0,7719
		4.4	GCC	0,043	0,7788
5	5,6,7	5.1	TTC	0,752	0,4943
		5.2	CCG	0,228	0,4952
6	6,7,8	6.1	TCG	0,752	0,5522
		6.2	CGC	0,228	0,3683
7	7,8,9	7.1	CGG	0,607	0,3209
		7.2	GCA	0,224	0,3109
		7.3	CGA	0,149	0,613
		7.4	GCG	0,013	0,412
8	8,9,10	8.1	GGT	0,605	0,3372
		8.2	CAC	0,228	0,1841
		8.3	GAC	0,145	0,8813
9	9,10,11	9.1	GTA	0,608	0,3192
		9.2	ACT	0,228	0,1338
		9.3	ACA	0,144	0,9802
10	10,11,12	10.1	TAA	0,598	0,9276
		10.2	CTG	0,220	0,0546
		10.3	CAA	0,143	0,9933
		10.4	TAG	0,016	0,0162
		10.5	CTA	0,014	0,0176
11	11,12,13	11.1	AAG	0,600	0,6776
		11.2	TGG	0,221	0,1224
		11.3	AAA	0,143	0,6441
		11.4	AGG	0,019	0,0188
		11.5	TAG	0,014	0,0108
12	12,13,14	12.1	AGG	0,578	0,8802
		12.2	GGA	0,221	0,0916
		12.3	AAA	0,143	0,978
		12.4	AGA	0,038	0,1131
		12.5	GGG	0,017	0,0167
13	13,14,15	13.1	GGC	0,591	0,4135
		13.2	GAT	0,224	0,3963
		13.3	AAT	0,143	0,5977
		13.4	GAC	0,035	0,4965
14	14,15,16	14.1	GCA	0,592	0,4454
		14.2	ATG	0,223	0,2092
		14.3	ATA	0,144	0,9394
		14.4	ACA	0,035	0,372

Tab. 7.4.: Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *VCL* und *AP3M1*.

7.2.4. Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *ST8SIA1*

Window	Marker	Haplotyp ID	Sequenz	Frequenz	p-Wert
1	1,2,3	1.1	CGA	0,614	0,9177
		1.2	CGC	0,197	0,6344
		1.3	CAC	0,181	0,9053
2	2,3,4	2.1	GAA	0,610	0,7369
		2.2	ACA	0,178	0,98
		2.3	GCT	0,141	0,0707
		2.4	GCA	0,052	0,0609
3	3,4,5	3.1	AAT	0,441	0,8934
		3.2	CAT	0,235	0,2776
		3.3	AAC	0,173	0,5305
		3.4	CTT	0,144	0,0888
4	4,5,6	4.1	ATG	0,451	0,6968
		4.2	ATA	0,226	0,6773
		4.3	ACG	0,169	0,5033
		4.4	TTG	0,149	0,097
5	5,6,7	5.1	TGG	0,587	0,1729
		5.2	TAA	0,208	0,4097
		5.3	CGG	0,167	0,5539
		5.4	TAG	0,022	0,4687
		5.5	TGA	0,011	0,0287
6	6,7,8	6.1	GGC	0,601	0,794
		6.2	AAC	0,208	0,3626
		6.3	GGT	0,155	0,0953
		6.4	AGC	0,021	0,4311
		6.5	GAC	0,012	0,0431
7	7,8,9	7.1	GCC	0,326	0,6982
		7.2	GCT	0,295	0,5962
		7.3	ACT	0,188	0,586
		7.4	GTT	0,154	0,1443
		7.5	ACC	0,033	0,0734
8	8,9,10	8.1	CCC	0,354	0,9157
		8.2	CTT	0,255	0,794
		8.3	CTC	0,227	0,431
		8.4	TTT	0,156	0,139
9	9,10,11	9.1	CCG	0,355	0,9937
		9.2	TTG	0,233	0,8243
		9.3	TCG	0,227	0,3544
		9.4	TTT	0,177	0,1495
10	10,11,12	10.1	CGC	0,354	0,9475
		10.2	TGC	0,239	0,973
		10.3	CGT	0,227	0,2095
		10.4	TTC	0,177	0,1638
11	11,12,13	11.1	GCT	0,418	0,3153
		11.2	GTC	0,226	0,3567
		11.3	TCC	0,173	0,1382
		11.4	GCC	0,171	0,1749
12	12,13,14	12.1	CTA	0,418	0,1457
		12.2	CCG	0,339	0,0292
		12.3	TCG	0,220	0,3306
		12.4	CCA	0,011	0,3096
13	13,14,15	13.1	TAC	0,425	0,1203
		13.2	CGC	0,351	0,8086
		13.3	CGG	0,208	0,2042
14	14,15,16	14.1	ACG	0,434	0,141

		14.2	GCG	0,353	0,7119
		14.3	GGC	0,204	0,1158
15	15,16,17	15.1	CGC	0,418	0,2325
		15.2	CGT	0,369	0,944
		15.3	GCT	0,205	0,1043
16	16,17,18	16.1	GCA	0,417	0,245
		16.2	GTA	0,376	0,8179
		16.3	CTA	0,106	0,4969
		16.4	CTT	0,098	0,1164
17	17,18,19	17.1	CAA	0,413	0,2213
		17.2	TAA	0,374	0,6575
		17.3	TAC	0,109	0,347
		17.4	TTC	0,100	0,1
18	18,19,20	18.1	AAT	0,471	0,2802
		18.2	AAG	0,316	0,5644
		18.3	ACG	0,113	0,2987
		18.4	TCG	0,101	0,112
19	19,20,21	19.1	ATC	0,438	0,295
		19.2	AGT	0,290	0,4186
		19.3	CGC	0,212	0,048
		19.4	ATT	0,032	0,7097
		19.5	AGC	0,028	0,3835
20	20,21,22	20.1	TCA	0,438	0,3245
		20.2	GTA	0,290	0,51
		20.3	GCC	0,213	0,0393
		20.4	TTA	0,030	0,5578
		20.5	GCA	0,023	0,9053
21	21,22,23	21.1	CAG	0,416	0,2459
		21.2	TAA	0,310	0,2447
		21.3	CCA	0,207	0,0405
		21.4	CAA	0,045	0,5908
		21.5	CCG	0,011	0,4311
		21.6	TAG	0,010	0,2448
22	22,23,24	22.1	AGA	0,426	0,3114
		22.2	AAA	0,350	0,3978
		22.3	CAG	0,138	0,2596
		22.4	CAA	0,071	0,059
23	23,24,25	23.1	GAA	0,434	0,2638
		23.2	AAA	0,420	0,96
		23.3	AGG	0,139	0,1795
24	24,25,26	24.1	AAA	0,537	0,8901
		24.2	AAG	0,317	0,202
		24.3	GGG	0,143	0,1875
25	25,26,27	25.1	AAG	0,537	0,9509
		25.2	AGG	0,316	0,1534
		25.3	GGA	0,141	0,1218
26	26,27,28	26.1	AGA	0,538	0,9027
		26.2	GGA	0,316	0,1862
		26.3	GAG	0,140	0,1868
27	27,28,29	27.1	GAC	0,843	0,0448
		27.2	AGT	0,135	0,1886
28	28,29,30	28.1	ACT	0,828	0,0855
		28.2	GTT	0,135	0,1291
		28.3	ACC	0,020	0,947
29	29,30,31	29.1	CTC	0,429	0,5072
		29.2	CTT	0,406	0,5962
		29.3	TTT	0,138	0,1036
		29.4	CCT	0,020	0,9774
30	30,31,32	30.1	TCG	0,421	0,4285

		30.2	TTG	0,325	0,089
		30.3	TTA	0,218	0,0080
		30.4	CTA	0,022	0,9696
		30.5	TCA	0,014	0,4077
31	31,32,33	31.1	CGT	0,421	0,3842
		31.2	TGT	0,313	0,1432
		31.3	TAC	0,237	0,0154
		31.4	TGC	0,010	0,1078
32	32,33,34	32.1	GTC	0,461	0,0905
		32.2	GTG	0,273	0,5696
		32.3	ACC	0,123	0,2999
		32.4	ACG	0,121	0,031
33	33,34,35	33.1	TCG	0,424	0,285
		33.2	TGA	0,248	0,7584
		33.3	CGA	0,116	0,5931
		33.4	CCA	0,106	0,143
		33.5	TCA	0,048	0,2591
		33.6	TGG	0,022	0,1653
		33.7	CCG	0,019	0,9161
		33.8	CGG	0,018	0,4967
34	34,35,36	34.1	CGC	0,443	0,3814
		34.2	GAA	0,362	0,646
		34.3	CAC	0,150	0,9402
		34.4	GGC	0,032	0,7933
35	35,36,37	35.1	GCA	0,440	0,5938
		35.2	AAG	0,359	0,4998
		35.3	ACG	0,109	0,6265
		35.4	ACA	0,044	0,3807
		35.5	GCG	0,034	0,2991
36	36,37,38	36.1	CAG	0,331	0,8136
		36.2	AGG	0,328	0,4845
		36.3	CAT	0,154	0,8599
		36.4	CGG	0,107	0,5711
		36.5	AGT	0,037	0,429
		36.6	CGT	0,035	0,0049
37	37,38,39	37.1	GGG	0,432	0,4291
		37.2	AGG	0,298	0,96
		37.3	ATG	0,157	0,9405
		37.4	GTG	0,071	0,2606
		37.4	AGA	0,036	0,734

Tab.7.5.: Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *ST8SIA1*

7.3. Verwendete Primer

7.3.1. Verwendete Primer für die Genotypisierung

7.3.1.1. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen *KIAA0913,NDST2/CaMK2G* Region

SNP ID	1st Primer	2nd Primer	xt Primer	SM	AMP (bp)
rs2271271	ACGTTGGATGTGTTTGAGGTTGCTCACCAG	ACGTTGGATGACAGCTTGTAGCCCCTCAC	CCTGCAGTTTGCTCATA	ACG	106
rs4691	ACGTTGGATGTGCTGCGGATGAAGAGGGAA	ACGTTGGATGTTGACCCATCATCTTGGGAG	AGGGGAATGTATTAGTCCA	ACT	119
rs7908825	ACGTTGGATGCCAACTAGTGCTTAAGAC	ACGTTGGATGCAAAGCGCTGCGATTACAAG	GCACACATTTTGCCCT	ACT	111

Tab. 7.6.: Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen *KIAA0913, NDST2/CaMK2G* Region.

7.3.1.2. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *CaMK2G*

SNP ID	1st Primer	2nd Primer	xt Primer	SM	AMP (bp)
rs10824037	ACGTTGGATGCCCTGAAAATGCCTTCTAAAG	ACGTTGGATGGGGCTGTTTCAGGTAAACAC	TGCTCCTGCCCTCAAGC	ACT	99
hCV27069354	ACGTTGGATGAGACCCTGCCCTTCTCTCAG	ACGTTGGATGGGGAGATTTCTCTTTCAGGG	TTCCTTCCCGACCTTCA	ACT	110
rs11000787	ACGTTGGATGTCTGCCTTCCCTAGTTCCTG	ACGTTGGATGAAGAGGGAGAGGTGATGTTG	GCGGACCCTCATAACCAC	ACT	115
rs10458656	ACGTTGGATGTGGAGACAATTTGAAAAGCC	ACGTTGGATGATTCTGTCTCTGCGACAGCCT	TGGGACTATAGGTACGC	ACT	110
rs1044612	ACGTTGGATGGTTTTGAGGGAAACCAAGGC	ACGTTGGATGTTCCATTCCAGGAGGAAGAG	GGAGGAAGAGATCTATAACCCTAA	ACT	113
rs2242258	ACGTTGGATGTTGGTGGAGCTTCATACCCTG	ACGTTGGATGTAGGTACCACAGAGTATCCC	GGAGTTGAGTTGAAGACAGA	ACT	97
rs2250140	ACGTTGGATGCTGACTCAAAATGAAGGCTC	ACGTTGGATGATCCTTTCCTCGGACAAAAG	GAGAGCCTGTTTAGGCC	ACG	107
rs2254266	ACGTTGGATGTGCTGAGAGTCTTCAGAGAG	ACGTTGGATGAGAAGTCCCAAGGAGTAGC	AAGGAGTAGCCTGCCCA	ACT	105
rs2306328	ACGTTGGATGTGAGCGAGCAAGCCAGACAG	ACGTTGGATGATGTCGTCCAGTGTCCACAG	CCCCTTGCCCCGGCTCT	ACT	116
rs2459446	ACGTTGGATGCATCTCTCTTTTCTTCCCCC	ACGTTGGATGTCTCTGAAGACTCTCAGCAC	AGCCATTCTAGGATCTTGGAG	ACT	101
rs2664282	ACGTTGGATGGCCATGACTTGCTGCATTAC	ACGTTGGATGTTCTCCTTGTGGTCACTTG	ACTAAGTATGCATTTGTGATGAT	ACG	116
rs2664283	ACGTTGGATGGACTCTCCCAAGTTCCAATC	ACGTTGGATGGTTTAGGGTTCATAGGCACAG	CAGACCTGCAAAAATACCCTTT	ACT	100
rs2675668	ACGTTGGATGAGCTTGGGAGGCTGGGACAC	ACGTTGGATGTTGATTACAGCAGGACGCCC	CTCTGCCAGAGGAGGGG	ACT	119
rs2675671	ACGTTGGATGTCAAGACAGGGAACACTCAC	ACGTTGGATGTGAAGAAAACCTCCACGCAG	AGCAAAAATCATCAATACCAAGAA	ACT	106
rs2688625	ACGTTGGATGTTCTGGGACCTGTTTAGCAG	ACGTTGGATGGGATGGGAGTCAGCAATTAG	CAGCAATTAGTGCCCTAC	ACG	113
rs2688626	ACGTTGGATGTCCAAGTGGAGACCGTTCC	ACGTTGGATGAAGAGCCAAGGCGGGAAAGG	AGGCAGGCTGAACAGGC	ACT	142
rs4114992	ACGTTGGATGTATACCCTACTCCTTTGGC	ACGTTGGATGTCTTCAACTTGTCTGCCAG	CAGTGAAGGGACAGGTCAA	ACT	98
rs4746154	ACGTTGGATGCTATACTTCTGCATGGGCAG	ACGTTGGATGTGTGTATGTGGCTGGCATA	GCATACGTCAGGCACTTC	ACT	80

Tab. 7.7.: Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *CaMK2G*.

7.3.1.3. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen *CaMK2G/PLAU* Region

SNP ID	1st Primer	2nd Primer	xt Primer	SM	AMP (bp)
rs10762566	ACGTTGGATGGTGAACATATGATCATGCCAC	ACGTTGGATGTCCATATCCCACCAGTGCC	TACTCTGTACCCCAAGCC	ACT	119
rs2633303	ACGTTGGATGTTTAAACGGGTCTGTCCGTTG	ACGTTGGATGTGAAAGCATTCAAGATGGC	TCAAGATGGCACCACCA	CGT	103
rs2633306	ACGTTGGATGTGTCAATGTCACCTCCTCAG	ACGTTGGATGGTACAGCAGAGGGACATAAC	AGGAGCGGATGAAGTGGAA	ACT	100
rs2675663	ACGTTGGATGTCTGGCTTGATTAGGGAAGG	ACGTTGGATGAAGTGCACACTTCTAGCTGC	TCTGACCTCACTCTAGTTGAAC	ACT	120
rs2675675	ACGTTGGATGGATGAGTGTCTGCTAGAGC	ACGTTGGATGGCCAAGGCCTGATTCAAATG	TTGCAGCAGGGAGCCAC	ACT	98
rs2675677	ACGTTGGATGATTATAGCCTCTGGCTCCTG	ACGTTGGATGGCATTGGGTTTCAGAGCAAC	TGGGTTTCAGAGCAACTTGTC	ACT	100
rs2675680	ACGTTGGATGTATTGCTCTGGCTACAACCC	ACGTTGGATGTCTTGGAGACCTAAACCCAG	GACCTAAACCCAGATATGA	ACT	103
rs2688610	ACGTTGGATGTGGAGTCTGCTACGGATAG	ACGTTGGATGATGAGGTGCATACACATGGC	GAGACAGAGAAGGCAATTATGAA	ACT	125
rs2688611	ACGTTGGATGCTACACAGTCTACTGTACC	ACGTTGGATGGGTTTTTGGGTCAGGATAGG	TCCAAACTGGGAGGTGC	CGT	100
rs2688617	ACGTTGGATGTCTGGAGCTCATTCCATGTC	ACGTTGGATGCCACAGTCCATTATTGGTG	CCATTATTGGTGCCTCCAGCT	CGT	100

Tab. 7.8.: Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen *CaMK2G/PLAU* Region.

7.3.1.4. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *PLAU*

SNP ID	1st Primer	2nd Primer	xt Primer	SM	AMP (bp)
hCV3155394	ACGTTGGATGAGATGGTCTGTATAGTCCGG	ACGTTGGATGATCTTTCTCCTCTGACCCTC	CAGCCTTGCTGAAGATCC	ACT	119
rs1050120	ACGTTGGATGCGTACATGAAGCAGTGTGTG	ACGTTGGATGCTCTGTACCTACGTGTGTG	TGTGTGGAGGCAGCCTCAT	ACT	97
rs1050122	ACGTTGGATGCCTGGCAGGAATCTGTTTTT	ACGTTGGATGACTACTACGGCTCTGAAGTC	TGAAGTCACCACAAAATGCT	ACT	95
rs1916340	ACGTTGGATGGAGCGACTCCAAAGTGAGTG	ACGTTGGATGTCCCCTGGTGTGATCAGAG	TGATCAGAGGTCCCTGGGCA	ACT	92
rs2227551	ACGTTGGATGAGAGACTTCTGTGCTTGCTG	ACGTTGGATGTAGCAAGGTTGGCTCTGAAG	TGGCTCTGAAGCCTATAGCATC	ACT	106
rs2227552	ACGTTGGATGAAGGTAGGAAGGAGGAAGGC	ACGTTGGATGACTTGTACTTTCCCCAGCAG	TCCCCAGCAGGCAGCTGGCA	ACG	102
rs2227557	ACGTTGGATGCCACCTCACATTTGTGTGGC	ACGTTGGATGCATCTTCATCCCTATGTGAC	ACACACACACACGCTCA	ACG	95
rs2227561	ACGTTGGATGAGATCACACCACTGCACTCC	ACGTTGGATGGAGAAAGAGAAGAACATTCC	GGAGTCTTGCTCTGTGCG	ACG	113
rs2227562	ACGTTGGATGTTGTTACCATCCCCTTCTCC	ACGTTGGATGTCCCCTCAGGGAAGACTCAA	GGGAAGACTCAACCAGAGGC	ACG	100
rs2227564	ACGTTGGATGTTTCTGTGTTGCCAGGAACC	ACGTTGGATGTCATGCACCATGCACTCTTG	TGCACTCTTGGACAAGC	ACT	116
rs2227567	ACGTTGGATGGGACTAAGCTGTTTGTATGGG	ACGTTGGATGTTGGAGTTAAGCCTTGAGCG	ACGATGTAGTCTCTCTTCT	ACT	115
rs2227568	ACGTTGGATGTCCTACACAAGGACTACAGC	ACGTTGGATGATTATGGCCACAGTAGTCGC	TCCCCTCACCAATGTC	ACT	106
rs2227580	ACGTTGGATGTTCTCCTTCCCTTTCAGAGC	ACGTTGGATGATCAGTCAAAGCAAGAGCGC	CACTCACTTTGGAGTCGCTCA	CGT	151
rs2227581	ACGTTGGATGGAGCGACTCCAAAGTGAGTG	ACGTTGGATGTCCCCTGGTGTGATCAGAG	GATCAGAGGTCTTGGGCA	ACT	92
rs2227582	ACGTTGGATGACACCTTCTTTGTGGGATG	ACGTTGGATGGAGGTAGTTAGGCTGGAATC	AGGCTGGAATCCATCCC	ACT	112
rs2459449	ACGTTGGATGATCTGGAGTCATGAGAGCTG	ACGTTGGATGCTCCAGGTTAGTTATCAGG	TAGTTATCAGGAAATCCCAGGG	ACT	100
rs2461863	ACGTTGGATGGAGACTGCCTCCTATTAGTG	ACGTTGGATGACAGAGCGATACTCCATCTC	AAAAAGCACAGTGCTTGATC	ACT	116
rs2633298	ACGTTGGATGAAAGTGCTGGGATTACAGGC	ACGTTGGATGTTTCTTTGTCCCTCCCTGAC	TCCCTGACCCAAACCCA	ACT	129

rs2633313	ACGTTGGATGAAGTGGAGAGAGGCTGATGG	ACGTTGGATGATTCTCAGCAGCAGGCACTG	ATGCTGTCTGAGATCCTCTC	ACG	116
rs2633314	ACGTTGGATGCTGGTGAAGTCAATGACGAC	ACGTTGGATGCGCCTACAATGCCTTTCTTC	TGTGTGATTTGAATGTCCAG	ACT	121
rs2688607	ACGTTGGATGGTCACTTGGCTTGAAGTTG	ACGTTGGATGTAACAGACTGACACGCTGTC	AAAAAATCAGATTTCTAGGCCCC	ACT	143
rs2688619	ACGTTGGATGTAGGCCTCCCACAGTATTAG	ACGTTGGATGTAAGAGGAGTTGCTGAGGTG	GGAGTTGCTGAGGTGTTTTTT	ACT	110
rs3805118	ACGTTGGATGAGAAGTGTGAGACTCTCGTG	ACGTTGGATGCTTTGACTGGAATTGTGAGC	AATTGTGAGCTGGGGCC	ACT	101
rs4065	ACGTTGGATGAAGAGACTGGGAAGATAGGC	ACGTTGGATGGCCTGAGGGTAAAGCTATTG	TGAGGGTAAAGCTATTGTCGTTG	ACT	104

Tab. 7.9.: Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *PLAU*.

7.3.1.5. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen *PLAU/VCL* Region

SNP ID	1st Primer	2nd Primer	xt Primer	SM	AMP (bp)
rs2633317	ACGTTGGATGTAGCATACTGTCACTCACC	ACGTTGGATGCAGCACAGTGACTAGAGTTC	AGCTAAAACAGGATTTTAAATGTT	ACT	140
rs2633322	ACGTTGGATGCTTACTGCTTCCCTTGGAAAC	ACGTTGGATGGCTTCATCTTCCACACACC	CTCCACACACCCTTCCA	ACT	100
rs2633323	ACGTTGGATGGCCCTCTACAACCTTATTCTC	ACGTTGGATGACTGGCATCTCATAGGTAAC	TAGGTAACATACTCTACAAT	ACT	116
rs2688624	ACGTTGGATGTCTGCTCTTCTCACAAGTCC	ACGTTGGATGCCACCTAATGTCTCTCTTG	CCTAATGTCCTCTTTGATGCAGG	CGT	98
rs4007235	ACGTTGGATGTTCCACTGTGCCTCAGAATC	ACGTTGGATGTTGTGCTCAGAGCAAGAAGG	AGGAAGGTCAGAGGAGT	CGT	98
rs4745727	ACGTTGGATGACCTAATTAAGCCAAAGGG	ACGTTGGATGTTGTTGAGCTCTGAGTCC	CAGAGAATACCCTGAACCAC	ACG	118
rs7072422	ACGTTGGATGCAGTACACAGGCATAACCTC	ACGTTGGATGCACCATTCTGAGAAACCTAA	GAGAAACCTAAAAAAAAAATCCC	ACG	118
rs7098545	ACGTTGGATGCAGCGAAAAACAAACCTTCC	ACGTTGGATGGAATAAAGCAGGCTGCTGG	AGCAGTGGCAACCCGCTTGG	ACT	96

Tab. 7.10.: Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen *PLAU/VCL* Region.

7.3.1.6. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *VCL*

SNP ID	1st Primer	2nd Primer	xt Primer	SM	AMP (bp)
hCV16171062	ACGTTGGATGCGTGTGTTACAACCTCACCTC	ACGTTGGATGCTCCACTAAGAACACGTACC	ACCTTGCTGGCCAGGC	ACT	87
hCV2025438	ACGTTGGATGTGAGCTCCGCTAACCAAATG	ACGTTGGATGACATTCAGATTATTTGTCC	GTTTGCATCAGTAAAGCTCA	ACT	108
hCV2025446	ACGTTGGATGCATACCCCTTGCTTCTTGAC	ACGTTGGATGGGAAGGGTGTAAACATCTCAG	AATTGAGGCCGGAGAGAAC	ACT	100
rs11814544	ACGTTGGATGATCTCTTGAATCTGGGAGGC	ACGTTGGATGACAGAGTCTCGCTGTTTAC	ATTGCACGATCTCAGCT	ACT	105
rs1874148	ACGTTGGATGGAAATGGATTGTAAGTACC	ACGTTGGATGCTGGCACAGAAAAGGCACTC	AATAAGCAGCAGAATTCCAC	ACG	99
rs1908331	ACGTTGGATGGAGGAATGGAGGGAAAGGTT	ACGTTGGATGAAGCACAGCACAGTATGCTC	GATACGAACTTTAGTTTTAAACAA	ACT	101
rs1908339	ACGTTGGATGCTCACCAGCATCCCCTAAAA	ACGTTGGATGGACTTGTAAGTATCCTCTC	ATGAATGTGTCAACAATGTAG	CGT	105
rs2131956	ACGTTGGATGAGCTCAGGTTTCGTAATCGTC	ACGTTGGATGTGTTGAGCTGAGGCAGATG	GCGGCCGATGCTGCTGG	ACT	101
rs2131959	ACGTTGGATGGTCTGAAGAGAGGTAACAGG	ACGTTGGATGTAGTGCTCAAGATGAGCC	GCGGAGGATTCCAATAACC	ACT	101
rs2270548	ACGTTGGATGGCAAAAAGTTGAGATACCATG	ACGTTGGATGGTAGGACTGACTACCTTAGC	GTAACCTCTCTGTCTTAC	ACT	104
rs2270549	ACGTTGGATGCATTCTCCCAACAAATCAC	ACGTTGGATGATCCAGTCACCAAGGTACAG	CACTTCAAATCAAGAGTGA	ACT	104
rs4268450	ACGTTGGATGTGTCGTCGTAGCCTTGTGTTG	ACGTTGGATGTTTACATACCAGATCCCTG	TTGCAGAGCCACAAAC	CGT	106
rs4745730	ACGTTGGATGTGAAATCACGACCCAACACC	ACGTTGGATGTTCCAGCTTTTTTACCAGC	ACCAGCTTGTCTTCCA	ACG	91

rs4746172	ACGTTGGATGCAGATGATATGTGGATAGAGC	ACGTTGGATGGTGTTTTCCAAATTCCACTC	CCACTCAGTCAAGAGCCCTTT	ACG	86
rs6480716	ACGTTGGATGGGGGTACATAGTTTGTGG	ACGTTGGATGACCTAATACAGTGCTTCACC	CCCATGTGTGATGAGCC	ACG	94
rs6688	ACGTTGGATGTGGACTGTCCAGTTCTCCTC	ACGTTGGATGAAATTGCTAGAGGGAAGGAG	AGGGAAGGAGCTCCTGGC	ACT	104
rs703258	ACGTTGGATGTTGGTCTTTACACTCAGGC	ACGTTGGATGCAAATATGCTGAGGGCCTTG	CCTTGAAAATAATCATCCTCATT	CGT	96
rs7075862	ACGTTGGATGTGGCTATGCCATAAAGCCTC	ACGTTGGATGCATTGTGTGAACATCATAGAG	TCATAGAGTATACTTACACAAACC	ACG	102
rs767809	ACGTTGGATGTGTGAAAGCTGCCTCTGATG	ACGTTGGATGGGAAATGTTTCCAGCCACAG	TTTGCATCCATCACCAT	ACG	102
rs7894127	ACGTTGGATGCACCAAGTATTGAGTTTGCC	ACGTTGGATGGGTTATTTTCAACTCTGTGG	TTTCAACTCTGTGGGGATGA	ACT	109
rs7904077	ACGTTGGATGAAGATTGAGCAAGCACAGCG	ACGTTGGATGGAGGTTATAGTGCACCTGCTG	GCACTGCTGCCCTTACC	ACT	105
rs7914216	ACGTTGGATGAGGTTCAAGCAAGTCTCCTG	ACGTTGGATGCCCGTCTCAACTAAAAATAC	GCCAGGTGTGGTGGCAGG	ACG	120
rs7922894	ACGTTGGATGTAAGGCGCCATTCTTCTTG	ACGTTGGATGGAGGATTAGGGTGAGAGTTG	GTTGTTGGATTAGAATATGGTA	ACT	100

Tab. 7.11.: Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *VCL*.

7.3.1.7. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *AP3M1*

SNP ID	1st Primer	2nd Primer	xt Primer	SM	AMP (bp)
hCV25936664	ACGTTGGATGCAAGGCAGGCGGAACATGAG	ACGTTGGATGCAGAGTTTCACCATGTTGGC	TGTTGGCCAGGCTGGTCTC	ACT	82
hCV26677077	ACGTTGGATGATTACTTGAGCCCAGGAGTG	ACGTTGGATGGACAGAGTCTTGCTCTGTTG	TGCAGTTGTATGATCATAGCTC	ACT	104
rs2894228	ACGTTGGATGGTGGTGAGAGCATTCTTAG	ACGTTGGATGACTTCATGTCTACAGGTGGC	GTGGCACTAAATTCATATTGT	ACT	96
rs3829129	ACGTTGGATGAATTTCTGGGCACTCCAGC	ACGTTGGATGTGTGCCAGTCAGTGATTCCG	CCGGATCCTCTCCTACC	ACT	116
rs6480720	ACGTTGGATGGCAATGCATTTACAATAGTC	ACGTTGGATGCCTTCTGTGCCCTCCATCATA	AAGGAATACATTTTTGTTTTTAGA	ACG	116
rs6480721	ACGTTGGATGGAAACCACAGTTCTGACTC	ACGTTGGATGAAAAGCTGTGGACCTGGAG	GTGGACCTGGAGTGAAGAT	ACT	97

* Oligos für die Genotypisierung der SNPs, die sowohl im *VCL*, als auch im *AP3M1* liegen, befinden sich in der Tabelle 7.7..

Tab. 7.12.: Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *AP3M1*

7.3.1.8. Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *ST8SIA1*

SNP ID	1st Primer	2nd Primer	xt Primer	SM	AMP (bp)
hCV12102189	ACGTTGGATGTACCACTTGCATATGTGGGC	ACGTTGGATGCTAAGGGACAGCTCTTTGAG	GGAAGGATCTTTGATTTGGT	ACT	99
hCV25604142	ACGTTGGATGCGTTGTCATAGTAGTGGTGG	ACGTTGGATGTGAAGAGGTGGCCATCTATG	GGCCCTTCTCTGTGAATAT	ACT	103
hCV26766547	ACGTTGGATGTTTCCAAGGACTTGGTGCGG	ACGTTGGATGTCTAAACATGTGGCCCGTG	GCCGCCAGGCAACCCCC	CGT	173
hCV2780093	ACGTTGGATGTACCTTGCCACCAGCAATA	ACGTTGGATGTCCATCTGTCTCCACTCATC	GATGTAAATTGGAAAGTTAGG	ACT	110
hCV2780146	ACGTTGGATGCCTATGAGACTGAAGGAAGC	ACGTTGGATGTCTCATGGTCATTCCACAG	ATTCCACAGCCAACCTC	ACT	109
hCV2780147	ACGTTGGATGGCCTTACTCATCAGATTGAC	ACGTTGGATGCCTTGCATCAAAACACTGTG	TGATTTATTCACACACACAG	ACT	128
hCV3289058	ACGTTGGATGCTGCATGGAAGGGCTTTATG	ACGTTGGATGTATTACAGGAATTGATAGCC	TTGATAGCCTGTCCACA	CGT	89
rs1012675	ACGTTGGATGTAGAATCACTCTTCACTGCC	ACGTTGGATGCTAGGAGGTGTGTTGATCTG	CTTCTAAGCAAGAAGAAAA	ACT	103

rs1019332	ACGTTGGATGGAGACTGGGAACTTGAAGTC	ACGTTGGATGGCTGCTAGTATGCAGAATGC	TGGAGCTATACCCAGAGATCCG	ACT	114
rs10459079	ACGTTGGATGTTTCCACTGCACATCTCTGC	ACGTTGGATGGTCTTCTCTCAAAGCTGTGC	AGCTGTGCAAATCCAAGACATC	ACT	120
rs10492283	ACGTTGGATGACTGGCTCAATTAGCAGAAAG	ACGTTGGATGACACTACTTGGGTCTCTTG	CCTCTTGCTCTATATCATGGAAT	ACT	96
rs10841974	ACGTTGGATGAGAGAAGGGTAGAGAGAGAG	ACGTTGGATGTATAACCCAAGATGGGCAGC	TTGCAAGGCCCTAATCTAG	ACT	115
rs11610434	ACGTTGGATGAGTGCCTCTCTTTAGGGTC	ACGTTGGATGCAGTGAAAAGAGACTTCCAG	CAGCAAGCTGTATGGCA	ACT	90
rs11612801	ACGTTGGATGTTGAAATTTACCCCTGCTCC	ACGTTGGATGGTAGCAAGTGGGATCTGAAG	AGTGAGTGGGAAAACGG	ACT	100
rs11614453	ACGTTGGATGCAGTGAAAAGAGACTTCCAG	ACGTTGGATGGGGAGTGCACCTCTTTAGG	CTCTCTTTAGGGTCACTCT	ACT	93
rs11832631	ACGTTGGATGTCTTCGTTGGCTTTGCCTTC	ACGTTGGATGTTTCTTCCCAGCTCTTCTC	TCTCTTCTGCTCTTCTTTCC	ACT	115
rs11834129	ACGTTGGATGCCATTATAGGACCTGTTGCC	ACGTTGGATGTGTCGTTGGTACAAAAGATGC	ATGCAGTGTAAAGAAGGGA	ACT	97
rs12099876	ACGTTGGATGGCGTGACTAGACTATTTTAC	ACGTTGGATGCTTTTGCATATCTCACCTG	ATATCTCACCTGAATCTGAA	ACG	123
rs12310364	ACGTTGGATGTTCTTTCTCTCTTCTAGCAG	ACGTTGGATGACTGTTTTACCGTGTCTAC	TTTTACCGTGTCTACAGAAACC	ACT	110
rs12811237	ACGTTGGATGTGCTTTCAGAGAGGAACTGC	ACGTTGGATGATCATGCCACTGTACTCCAG	CAGCCTGGGTGACTAAG	ACT	112
rs12815085	ACGTTGGATGGCTTCCAGATAAGAAGGTGG	ACGTTGGATGAGTGTGTAGGATGAGGGATG	TCCCTGGGCACACCACCC	CGT	117
rs1558793	ACGTTGGATGTTTGTGCCCCAGCTTAACTG	ACGTTGGATGGAGGCTCTTGGCATATATGG	TCTTGCCATATATGGAATTGG	ACG	114
rs1861606	ACGTTGGATGAGAGGGATACTTTGCTGTGG	ACGTTGGATGCATTTTCTTAACCAGCCCC	CACCCTCTCACTCTT	ACT	98
rs2012722	ACGTTGGATGACAGAAGAGGAAAGCTGGAC	ACGTTGGATGTCTTGCAAGTACAGATGCC	CATGCCCCATGTGACTCA	ACT	101
rs2017107	ACGTTGGATGCAGCACTAGAAGATGTGTTG	ACGTTGGATGAAGTGTCTTCTAGGACTAGG	GTGTCTTCTAGGACTAGGATATAA	ACG	99
rs2072542	ACGTTGGATGGTCTAATCACCTGGAGAG	ACGTTGGATGCACCTGTCTATCCCACAGAG	ATCCCACAGAGATGTGCC	ACT	100
rs2160536	ACGTTGGATGCCCTGACTTAAAGAAATCTG	ACGTTGGATGGCCACTCTTGTCTTAGATC	GTGGGCCATCAGCCA	ACT	142
rs2193177	ACGTTGGATGCAGCCCACTGTATTCTCTTC	ACGTTGGATGGACTCCTTTTATGTGAGGTG	TTTTATGTGAGGTGTTTTACA	CGT	100
rs2193179	ACGTTGGATGTGGCAGAACCCTTAGCTATG	ACGTTGGATGGCCACCTTTTTGCTAGTCAG	AAGAGCAATGGCTGTGCG	ACG	102
rs2216228	ACGTTGGATGTCCATAACTGCTCACTGCTC	ACGTTGGATGTACAGGAGCAATTGAGAAAG	AATCTTGTGACTTCTGGTTAT	ACT	95
rs2287166	ACGTTGGATGCACATCTCTGTGGGAATGAC	ACGTTGGATGGAGAGAAAACAGAGAGAGAG	GGTTAAATGAGGAGCAG	CGT	101
rs2300717	ACGTTGGATGAGCATTATCTCCAAGGACAC	ACGTTGGATGATGCACAGACATACCAAGGC	GGCTAGGAAGTGGTTTCTAT	ACT	91
rs2300718	ACGTTGGATGAAGGACAAGCTCAGATCAAC	ACGTTGGATGCAGGATCCTCACGAAATAG	TCCTTATGCTGTCTCCA	ACT	91
rs2300719	ACGTTGGATGAAAAAGGGCTGAAGGCAGAG	ACGTTGGATGGCTGACAACCAGAACTCAAG	TGCTGTCCCAGTAATCC	ACT	104
rs2300726	ACGTTGGATGCTTGGCCACCATGTCTTATG	ACGTTGGATGGCAGAAAAGCCATGGGATTTG	ATGGGATTTGAATTCGCAGTGGTC	ACT	95
rs2418054	ACGTTGGATGCAAAGATCATGAAGGTAGGTG	ACGTTGGATGGTGTCTGTGAGTCATTGTCC	TACTTTTCTTAATTATGGAATGAC	ACT	119
rs2728827	ACGTTGGATGCATTTGGGATTGCAGAGACC	ACGTTGGATGGCTGTACTGTAATGGAGCTG	AACCATGAAAAATAAAAGCAC	ACT	118
rs3782524	ACGTTGGATGCCTTATCTCTTCTCATGCC	ACGTTGGATGGGTTAAGCAAGCCAATCCAC	AGCAAGCCAATCCACAGGATA	ACT	99
rs3803101	ACGTTGGATGAATCCTTGCGCTGACCTTTG	ACGTTGGATGCACACACACCTTTGGTTCTC	CAAACGCACGCACGCTTCTTC	ACT	102
rs3809202	ACGTTGGATGGTAACCAGCCAACCTCTCTTC	ACGTTGGATGTTATCCAAGCCCAGGCAAG	CCCAGGCAAGTAGGAAAAGC	ACG	99
rs4762896	ACGTTGGATGAGTTAGTGACAGCTAATCCC	ACGTTGGATGCACTGCCTTTGAATGCTAAG	CTTGAGAAGACTTCATCTTCGTT	ACG	132
rs4762901	ACGTTGGATGTTAGTATCTTGAGGCTGAGG	ACGTTGGATGTCTGTACCTTGCTAAACCC	CCTCACCAATACAATTCT	ACT	86
rs704219	ACGTTGGATGTTCAGAACCTTCTGTGGTCC	ACGTTGGATGGGCAGGCATGTAGATGTAAC	GTAGATGTAAGTGTGGTTATA	ACT	100
rs7295402	ACGTTGGATGCCTGTCTTACGCTAATGTCC	ACGTTGGATGTGCCCTTTCCCATCTGTTAG	GACTGGAGATGAAACAG	ACT	95
rs7970824	ACGTTGGATGGTAGTTTGGGAAAAAGAGGG	ACGTTGGATGCCAGTAAGGGTTAGTGATTG	ACATAACTGTAGCATATTTTCTT	ACT	160

Tab. 7.13.: Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *ST8SIA1*

7.3.2. Verwendete Primer für die Sequenzierung

7.3.2.1. Verwendete Primer für die Sequenzierung des Exons 6 im *PLAU*

Gen: <i>PLAU</i>	1st Primer	2nd Primer	AMP (bp)
Exon 6	AAGTGCGGCCTCTGGTTGAGT	CTCCTGTGATGGAATAAGGGGACAT	92

Tab. 7.14.: Verwendete Primer für die Sequenzierung des Exons 6 im *PLAU*.

7.3.2.2. Verwendete Primer für die Sequenzierung des Exons 2 im *ST8SIA1*

Gen: <i>ST8SIA1</i>	1st Primer	2nd Primer	AMP (bp)
Exon 2	AAGAAACCATACTGAAGGCAACCAA	ACCCTGGAGATGCTATGCTTCTCT	314

Tab. 7.15.: Verwendete Primer für die Sequenzierung des Exons 2 im *ST8SIA1*.

7.3.2. Verwendete Primer für die RT-PCR

Gen: <i>ST8SIA1</i>	1st Primer	2nd Primer	AMP (bp)_1	AMP (bp) mit Intron/ Introns
Produkt 1 (E1-E4)	GCCGAATTATGCTGGGATTAGCTGTC	TACCGGCTGCCCAACGAGAAAAG	436	> 5000
Produkt 2 (E1-E3)	TTGACGGCCACAGCCACTCTTC	TACCGGCTGCCCAACGAGAAAAG	321	> 5000
Produkt 3 (E2-E5)	TGTCTTCATAGAAAAGGCAGGCATG	AAACAAATGGAAGACTGCTGCGAC	444	> 5000

AMP (bp)_1 = Amplifikat ohne Introns

AMP (bp) mit Intron/ Introns = Amplifikat mit mindestens einem Intron

Tab. 7.16.: Verwendete Primer für die RT-PCR

7.4. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1.:** Vereinfachte Darstellung des gesunden (A) und von AD betroffenen (B) Neurons: Kommunikation zwischen den Neurozellen im an AD betroffenen Gehirn wird durch die A β -Plaques (lila dargestellte kugelförmige Ablagerungen außerhalb der Zelle) und neurofibrilläre Tangles (bläulich dargestellte intrazelluläre Filamente) gestört. Die pathologischen Ablagerungen führen zur Neurodegeneration, was den Zelltod und Hirnatrophie zur Folge hat (Verdile G et al., 2004; Gomes-Ramos A et al., 2004; Garcia T et al., 2004).
- Abbildung 1.2.:** Zwei Möglichkeiten der proteolytischen Spaltung des APP: Der oben beschriebene amyloidogene Weg führt durch die β - und γ - Sekretaseaktivität zur A β Freisetzung und damit ermöglicht die Plaquesenstehung. Der nicht-amyloidogene (physiologische) Weg ist charakterisiert durch die enzymatische Aktivität der α -Sekretase, die das APP mitten in der A β Protein-Sequenz schneidet (Postina R et al., 2004) und dadurch die lösliche carboxyl-truncated Form des APPs (APPs α) und APP C-Terminal Fragment α (APP-CTF α) freisetzt. In dem nächsten Schritt wird APP-CTF α durch die γ -Sekretase gespalten und ein nicht-amyloidogenes Fragment freigesetzt. Als α -Sekretase-Kandidatengene wurden *ADAM 10*, *ADAM 17* und *MDC9* diskutiert (Postina R et al., 2004; Verdile G. et al, 2004). Der nicht-amyloidogene Weg ist auch durch die Phosphorylierung mittels Protein Kinase C (PKC) möglich (Verdile G et al., 2004). (Modifiziert nach Zheng H et Koo EH, 2006).
- Abbildung 1.3.:** Vereinfachte Darstellung der A β Degradation: Durch die Bindung des PLAUI Proteins an seinen Rezeptor PLAUIR wird die Spaltung des Plasminogens aktiviert. Dabei entsteht die Serinprotease Plasmin, welche in der Degradation der A β -Plaques aktiv involviert ist.
- Abbildung 1.4.:** Aktivität der CaMK2 während der Langzeitpotentierung in Post Synaptic Density (PSD): Durch die Bindung des Glutamats an den NMDA Rezeptor löst sich Mg²⁺ von seiner Bindungsstelle innerhalb des NMDA-Rezeptor und ermöglicht damit den Ca²⁺ Einstrom (1) in die postsynaptische Zelle. Ca²⁺ ist ein intrazellulärer Botenstoff, der Calcium-bindendes regulatorisches Protein Calmodulin (CaM) aktiviert (2). CaM, geladen mit vier Ca²⁺ Ionen, bindet an CaMK2 (3). Dieses führt zur Autophosphorylierung der Kinase, was zur Folge eine Ca²⁺-unabhängige Aktivität hat. Auf diese Weise aktivierte CaMK2 phosphoryliert weiterhin NMDA (4), bzw. AMPA (5) Rezeptoren und ermöglicht den Einbau der AMPA Rezeptoren in die Membrane des postsynaptischen Neurons (6). Somit spielt die CaMK2 die zentrale Rolle bei der Depolarisierung der postsynaptischen Membrane und stellt das Schlüsselmolekül in der Langzeitpotenzierung dar (Modifiziert nach Tomita S et al., 2005; Malenka RC et Nicoll RA, 1999).
- Abbildung 1.5.:** Der Biosyntheseweg der komplexen Ganglioside. Ganglioside sind Glykolipide deren strukturelles Grundgerüst aus einem Ceramidkörper (besteht aus Aminodialkohol Sphingosin und zwei Fettsäuren) und einem Oligosaccharid gebildet ist. Die Oligosaccharidkette enthält Glucose, Galactose, N-Acetylgalactosamin und Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure). Ihre Biosynthese fängt auf der zytosolischen Seite, wo die Übertragung des Glukoserestes auf Ceramid durch das Enzym Glukosylceramid-Synthase (GlcCerS) katalysiert wird, an. Alle

weiteren Schritte werden durch die Enzyme Galaktosylceramid-Transferasen (GalT), Sialyltransferasen (SAT) und *N*-Acetylgalaktosamin-Transferase (GalNAcT) katalysiert und erfolgen im Lumen des Golgi-Apparates. (Modifiziert nach Malisan F et Testi R, 2002).

Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung der Mass ExtensionTM Reaktion. Diese Methode basiert auf der Sangermethode, bei der ein Kettenabbruch durch Didesoxynukleotide erzeugt wird. Je nach vorkommendem Allel entstehen Produkte, die sich in Länge und Masse unterscheiden. Diese Unterschiede werden im Anschluss durch MALDI TOF Massenspektrometrie Analyse sichtbar gemacht (SEQUENOM, hME, SpectroPREPTM User's Guide, Version 1, February, 2001).

Abbildung 2.2.: Schematische Darstellung des Prinzips der MALDI TOF Massenspektrometrie nach Griffin TJ et al. Durch das Verdampfen der Matrix mit Hilfe des Lasers wird das Oligonukleotid beschleunigt und bewegt sich im feldfreien Flugrohr mit einer masse- und ladungsabhängigen Geschwindigkeit auf einen Detektorschirm zu. Hier wurden die Abtrennung und die Detektion von zwei Oligonukleotiden M_1 und M_2 mit verschiedenen Massen dargestellt.

Abbildung 2.3.: MALDI TOF MS Analyse der Primer-Extensions-Reaktion des SNPs rs4746154 [C/T] aus dem *CaMK2G* Gen. A: zeigt den homozygoten Zustand des Allels T; B: zeigt den homozygoten Zustand des Allels C und C: zeigt den heterozygoten Zustand. X Achse stellt die Masse dar und die Y Achse die Intensität.

Abbildung 2.4.: MALDI TOF MS Analyse einer Multiplexreaktion von sieben genotypisierten biallelischen SNPs: Das Massenspektrum zeigt die Analyse der Primer-Extensionsreaktion für die SNPs rs7905574 [G/A] (rot markiert), rs2271271 [G/A] (grün markiert), rs2193179 [C/T] (dunkel blau markiert), rs11000020 [G/A] (hell blau markiert), rs7899959 [G/A] (dunkel rot markiert), rs10762483 [G/A] (hell grün markiert) und rs3809202 [G/A] (rosa markiert). Durch ein Sternchen wird der Massenbereich markiert, in dem die jeweiligen nicht extendierten Primer detektiert wurden. X Achse stellt die Masse dar und die Y Achse die Intensität des Signals.

Abbildung 2.5.: MALDI TOF MS Analyse der Extensionsprimer für *PSAP* rs1811087, *CaMK2G* rs7908825, *PSAP* rs7912803, *CaMK2G* rs10824045, *PSAP* rs2854987, *ST8SIA1* rs7970051, *ST8SIA1* rs1012675, *PSAP* rs4747207, *PSAP* rs2854986, *ST8SIA1* rs10492283, *PSAP* rs16913438. Verwendet wurden gleiche Mengen jedes Primers. Auf der X Achse ist die Masse eingegeben und auf der Y Achse die Intensität des Signals.

Abbildung 5.1.: Schematische Darstellung der genotypisierten Region auf dem Chromosom 10. Hier werden nur polymorphe SNPs dargestellt.

Abbildung 5.2.: Schematische Darstellung des *PLAU* Gens. Auf der Abbildung sind die Exons mit grünen Balken dargestellt. Der signifikante SNP rs2227564 wurde rot markiert, restliche polymorphe SNPs schwarz und die monomorphen SNPs grau.

Abbildung 5.3.: LD-Struktur im *PLAU*. Quadrierte Korrelationskoeffizientenwerte sind für jedes Paar von SNP Loci mittels Softwarepaket Haploview berechnet und farbkodiert dargestellt: schwarz, hoher r^2 Wert; weiß, niedriger r^2 Wert. Haplotyp-Blöcke, bezeichnet durch die hohe D' Werte, sind zugefügt.

Abbildung 5.4.: Drei-Locusanalyse von SNPs im *PLAU*.

Abbildung 5.5.: Sequenzierung des Exons 6 im *PLAU*. Zusätzliche funktionelle DNA Variation (C/T His → Tyr) im Exon 6 wurde identifiziert.

- Abbildung 5.6.:** Schematische Darstellung des *CaMK2G* Gens. Auf der Abbildung sind die Exons mit grünen Balken dargestellt. Die rot markierten SNPs zeigten die stärksten Assoziationssignale.
- Abbildung 5.7.:** LD-Struktur im *CaMK2G*. Quadrierte Korrelationskoeffizientwerte sind für jedes Paar von SNP Loci mittels Softwarepaket Haploview berechnet und farbkodiert dargestellt: schwarz, hoher r^2 Wert; weiß, niedriger r^2 Wert. Haplotyp-Blöcke, bezeichnet durch die hohe D' Werte, sind zugefügt.
- Abbildung 5.8.:** Drei-Locusanalyse von SNPs im *CaMK2G*.
- Abbildung 5.9.:** Schematische Darstellung der *VCL* und *AP3MI* Gene. Exonische Bereiche sind grün dargestellt, polymorphe SNPs schwarz und monomorphe grau. SNPs die eine HWE Abweichung zeigten sind hier nicht dargestellt.
- Abbildung 5.10.:** LD-Struktur in *VCL* und *AP3MI*. Quadrierte Korrelationskoeffizientwerte sind für jedes Paar von SNP Loci mittels Softwarepaket Haploview berechnet und farbkodiert dargestellt: schwarz, hoher r^2 Wert; weiß, niedriger r^2 Wert. Haplotyp-Blöcke, bezeichnet durch die hohe D' Werte, sind zugefügt.
- Abbildung 5.11.:** Drei-Locusanalyse von SNPs im *VCL* und *AP3MI*.
- Abbildung 5.12.** Die Streuung der Plaqueanzahl im Medial Temporal Gyrus (mit arithmetischem Mittel und 95% CI). Gruppierung mit der Probandenanzahl nach der An- (+) bzw. Abwesenheit (-) des *PLAU* rs2227564 T Allels und des *APOE* $\epsilon 4$ Allels. Für die statistische Auswertung wurde Two-sided Mann-Whitney U Test angewendet.
- Abbildung 5.13.:** Der Vergleich der Plaqueanzahl bei zwei Probanden mit (a) und ohne (b) rs2227564 T Allel. *APOE* $\epsilon 4$ Allel war bei diesen nicht vorhanden. Bei der immunohistochemischen Methode wurden Monoclonal β -Amyloid Antikörper (DAKO; 6F/3D; 1:100) und Peroxidase / DAB verwendet. (Balken = 500 μ m).
- Abbildung 5.14.:** Schematische Darstellung des *ST8SIA1* Gens. Grüne Boxen stellen exonische Bereiche dar. Die polymorphen SNPs wurden schwarz und rot markiert, wobei die roten eine starke Signifikanz zeigten. Grau markierte SNPs waren monomorph. SNPs, die eine HWE Abweichung zeigten, sind hier nicht dargestellt.
- Abbildung 5.15.:** LD-Struktur im *ST8SIA1*. Quadrierte Korrelationskoeffizientwerte sind für jedes Paar von SNP Loci mittels Softwarepaket Haploview berechnet und farbkodiert dargestellt: schwarz, hoher r^2 Wert; weiß, niedriger r^2 Wert. Haplotyp-Blöcke, bezeichnet durch die hohe D' Werte, sind zugefügt.
- Abbildung 5.16.:** Drei-Locusanalyse von SNPs im *ST8SIA1*.
- Abbildung 5.17.:** Sequenzierte Region auf dem Chromosom 12. Rote Box markiert das Sequenzierungsprodukt und die grüne Box das Exon 2.
- Abbildung 5.18.:** Die Amplifizierungsprodukte der *ST8SIA1* cDNA. Exonische Bereiche sind mit grünen und drei erwartete amplifikate mit roten Balken dargestellt.
- Abbildung 5.19.:** Die Gelelektrophorese der PCR Produkten: a) Das erwartete Produkt bei 440 bp (Exon 1- Exon 4) und ein zusätzliches Produkt bei ca. 330 bp und b) Das erwartete Produkt bei 440 bp (Exon 2- Exon 5) und ein zusätzliches Produkt bei ca. 330 bp.

Abbildung 6.1.: Das alternative Spleißen des *ST8SIA1* Genes. Die schwarzen Linien stellen das Transkript aller Exons dar, die blauen Linien stellen die alternative Spleißversion ohne Exon 3 (EU041716) dar.

Abbildung 6.2.: Transkript des ganzen *ST8SIA1* Gens (a) und der alternativ gespleißten Variante (b). Durch die Translation der *ST8SIA1* mRNA entsteht Protein GD3 Synthase mit 356 Aminosäurenresten (a). Durch das Rausspleißen von Exon 3 wird die mRNA in ein kürzeres Produkt (135 Aminosäurenresten) transkribiert (b). Die Veränderung, die durch das alternative Spleißen entsteht, ist hier blau markiert. Stopp Kodons sind mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

7.5. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 2.1.:** Standardtemperaturprofil für die PCR: Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation wurden 45 Mal wiederholt (45 Zyklen). Annealing Temperatur wurde für jeden Assay angepasst und lag zwischen 56°C und 60°C.
- Tabelle 2.2.:** Standard PCR Ansatz für 20µl.
- Tabelle 2.3.:** PCR Ansatz für ein Gesamtvolumen von 6µl und 5µl eingetrockneter DNA (1ng/µl eingetrocknet).
- Tabelle 2.4.:** Ansatz für die SAP-Reaktion (2 µl pro Well).
- Tabelle 2.5.:** Reaktionsbedingungen für die SAP-Reaktion.
- Tabelle 2.6.:** Ansatz für die hME-Reaktion (2 µl pro Well).
- Tabelle 2.7.:** Reaktionsbedingungen für die hME-Reaktion. Die Anzahl der Reaktionszyklen betrug 40.
- Tabelle 2.8.:** Standardprotokoll für die Sequenzierungsreaktion.
- Tabelle 2.9.:** Temperaturbedingungen für die Sequenzierungsreaktion.
- Tabelle 2.10.:** Ansatz für die cDNA Synthese.
- Tabelle 2.11.:** Temperaturbedingungen für die cDNA Synthese (Fermantas GmbH, St. Leon-Rot, D).
- Tabelle 2.12.:** Temperaturbedingungen für die One-Step RT-PCR.
- Tabelle 3.1.:** Liste der verwendeten Geräte und deren Herstellern.
- Tabelle 3.2.:** Liste der verwendeten Materialien, deren Herstellern und der eingesetzten Methoden.
- Tabelle 3.3.:** Liste der verwendeten Enzyme und deren Herstellern.
- Tabelle 4.1.:** Die beteiligten Kliniken an der Geschwisterpaarstudie.
- Tabelle 5.1.:** Ausgewählte SNPs auf dem Ch10. Monomorphe SNPs sind grau markiert. SNPs rs2227579, rs2633323 und rs2688611 wurden keine ausreichende Genotypisierungseffizienz erzielt und deshalb wurden sie aus den sich anschließenden statistischen Tests ausgeschlossen.
- Tabelle 5.2.:** Ergebnisse des Allelischen Tests (Logistische Regression mit Kovariaten Erkrankungsalter (Age of Onset) und Geschlecht) für das *PLAU* Gen. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. OR mit 95% CI wurde für signifikante SNPs dargestellt. Ergebnisse, die nach der Korrektur für multiples Testen eine statistisch signifikante Assoziation mit AD zeigten, wurden kursiv dargestellt.

- Tabelle 5.3.:** Haplotypberechnung für *PLAU*. Adjustierte p-Werte nach Bonferroni: siehe Werte in Klammer.
- Tabelle 5.4.:** Replikationsergebnisse für *PLAU* SNP rs2227564 aus unabhängigen Studien (n.s. = nicht signifikant).
- Tabelle 5.5.:** Ergebnisse des Allelischen Tests (Logistische Regression mit Kovariaten Erkrankungsalter (Age of Onset) und Geschlecht) für das *CaMK2G* Gen. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. OR mit 95% CI wurde für signifikante SNPs dargestellt. Ergebnisse, die nach der Korrektur für multiples Testen eine statistisch signifikante Assoziation mit AD zeigten, wurden kursiv dargestellt.
- Tabelle 5.6.:** Haplotypberechnung für *CaMK2G*. Adjustierte p-Werte nach Bonferroni: siehe Werte in Klammer.
- Tabelle 5.7.:** Ergebnisse des Genotypentests für *CaMK2G*. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. Für jeden SNP wurden drei statistische Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Ergebnisse, die nach der Korrektur für multiples Testen eine signifikante Assoziation mit AD aufweisen, wurden kursiv dargestellt.
- Tabelle 5.8.a:** Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs4114992 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).
- Tabelle 5.8.b:** Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs10458656 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).
- Tabelle 5.8.c:** Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs4746154 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).
- Tabelle 5.8.d:** Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs2688625 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).
- Tabelle 5.8.e:** Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs2675671 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).
- Tabelle 5.8.f:** Replikationsergebnisse für *CaMK2G* SNP rs2675668 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

- Tabelle 5.9.:** Ergebnisse des Allelischen Tests (Logistische Regression mit Kovariaten Erkrankungsalter (Age of Onset) und Geschlecht) für die *VCL* und *AP3MI* Gene. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt.
- Tabelle 5.10.:** Haplotypberechnung für *VCL* und *AP3MI*. Adjustierte p-Werte nach Bonferroni: siehe Werte in Klammer.
- Tabelle 5.11.:** Ergebnisse des Genotyptests für *VCL* und *AP3MI*. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. Für jeden SNP wurden drei statistische Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel.
- Tabelle 5.12.:** Die Plaqueanzahl in den analysierten Hirnsamples. Die analysierten Hirnsamples wurden abhängig von der An- (+) bzw. Abwesenheit (-) des *APOE* $\epsilon 4$ Allels und des *PLAU* rs2227564 T Allels in vier Gruppen unterteilt. Neben der Plaqueanzahl wurden hier für jede Gruppe Anzahl der analysierten Hirne, sowie die Geschlechtsverteilung, das Todesalter und die Dauer der Krankheit angegeben. Die Genotypisierung der Hirnsamples erfolgte mittels Restriktionsenzymen.
- Tabelle 5.13.:** Die ausgewählten SNPs auf dem Ch12. Die monomorphen SNPs im Münchner Kollektiv sind grau markiert.
- Tabelle 5.14.:** Ergebnisse des Allelischen Tests (Logistische Regression mit Kovariaten Erkrankungsalter (Age of Onset) und Geschlecht) für das *ST8SIA1* Gen. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. OR mit 95% CI wurde für signifikante SNPs dargestellt.
- Tabelle 5.15.:** Haplotypberechnung für *ST8SIA1*. Adjustierte p-Werte nach Bonferroni: siehe Werte in Klammer.
- Tabelle 5.16.:** Ergebnisse des Genotyptests für *ST8SIA1*. Die statistische Analyse wurde für das gesamte Kollektiv, EOAD- und LOAD- Subgruppen durchgeführt. Für jeden SNP wurden drei statistische Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel.
- Tabelle 5.17.a:** Replikationsergebnisse für *ST8SIA1* SNP rs2300719 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).
- Tabelle 5.17.b:** Replikationsergebnisse für *ST8SIA1* SNP rs3782524 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).
- Tabelle 5.17.c:** Replikationsergebnisse für *ST8SIA1* SNP rs12099876 aus der schwedischen und australischen Studien. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).

- Tabelle 5.17.d:** Replikationsergebnisse für *ST8SIA1* SNP rs1861606 aus der schwedischen Studie. Bei der statistischen Auswertung der Genotypen wurden drei Modelle durchgeführt: Additives Modell, Rezessives Modell für Major Allel und Dominantes Modell für Major Allel. Einzelne Werte sind durch Querstriche getrennt. (GeKo = gesamtes Kollektiv).
- Tabelle 7.1:** AD Diagnostik nach CERAD Kriterien: Die Dichte neuritischer Plaques wird als gering, mäßig oder hoch bewertet. Diese Dichte wird in einen altersbezogenen Plaquescore konvertiert und als CERAD 0, A, B oder C angegeben. (0 = kein histologischer Hinweis auf AD, A = unsichere hist. Hinweise auf DA, B = hist. Hinweise auf DA und C = klarer Hinweis auf DA).
- Tabelle 7.2.:** Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *PLAU*.
- Tabelle 7.3.:** Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *CaMK2G*.
- Tabelle 7.4.:** Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *VCL* und *AP3M1*.
- Tabelle 7.5.:** Ergebnisse der Dreilocushaplotypenanalyse für *ST8SIA1*.
- Tabelle 7.6.:** Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen *KIAA0913*, *NDST2/CaMK2G* Region.
- Tabelle 7.7.:** Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *CaMK2G*.
- Tabelle 7.8.:** Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen *CaMK2G/PLAU* Region.
- Tabelle 7.9.:** Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *PLAU*.
- Tabelle 7.10.:** Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs in der intergenischen *PLAU/VCL* Region.
- Tabelle 7.11.:** Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *VCL*.
- Tabelle 7.12.:** Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *AP3M1*
- Tabelle 7.13.:** Verwendete Primer für die Genotypisierung der SNPs im *ST8SIA1*
- Tabelle 7.14.:** Verwendete Primer für die Sequenzierung des Exons 6 im *PLAU*.
- Tabelle 7.15.:** Verwendete Primer für die Sequenzierung des Exons 2 im *ST8SIA1*.
- Tabelle 7.16.:** Verwendete Primer für die RT-PCR

7.6. Publikationsliste

1. Schumacher A, Friedrich P, Diehl J, Ibach B, Schoepfer-Wendels A, Mueller JC, Konta L, Laws SM, Kurz A, Foerstl H, Riemenschneider M. No association of common VCP variants with sporadic frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging*, 2007.
2. Riemenschneider M, Schoepfer-Wendels A, Friedrich P, Konta L, Laws SM, Mueller JC, Kurz A, Forstl H. No association of vacuolar protein sorting 26 polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2007. 28(6): 883-884.
3. Mueller JC, Riemenschneider M, Schoepfer-Wendels A, Gohlke H, Konta L, Friedrich P, Illig T, Laws SM, Forstl H, Kurz A. Weak independent association signals between IDE polymorphisms, Alzheimer's disease and cognitive measures. *Neurobiol Aging*, 2007. 28(5): 727-34.
4. Riemenschneider M, Konta L, Friedrich P, Schwarz S, Taddei K, Neff F, Padovani A, Kolsch H, Laws SM, Klopp N, Bickeboller H, Wagenpfeil S, Mueller JC, Rosenberger A, Diehl-Schmid J, Archetti S, Lautenschlager N, Borroni B, Muller U, Illig T, Heun R, Egensperger R, Schlegel J, Forstl H, Martins RN, Kurz A. A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 2006. 15(16): 2446-2256.
5. Gohlke H, Illig T, Klopp N, Wagenpfeil S, Konta L, Laws SM, Kurz A, Riemenschneider M. Association study between the D10S1423 microsatellite marker and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2006. 27(5): p. 776 e1-776 e3.

7.7. Literaturverzeichnis

1. Adam G. and Matus A., Role of actin in the organisation of brain postsynaptic densities. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996. 43(1-2): p. 246-50.
2. Akiyama H., Ikeda K., Kondo H., Kato M., and McGeer P.L., Microglia express the type 2 plasminogen activator inhibitor in the brain of control subjects and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 1993. 164(1-2): p. 233-5.
3. Alfano D., Franco P., Vocca I., Gambi N., Pisa V., Mancini A., Caputi M., Carriero M.V., Iaccarino I., and Stoppelli M.P., The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost*, 2005. 93(2): p. 205-11.
4. Alonso D.F., Farias E.F., Famulari A.L., Dominguez R.O., Kohan S., and de Lustig E.S., Excessive urokinase-type plasminogen activator activity in the euglobulin fraction of patients with Alzheimer-type dementia. *J Neurol Sci*, 1996. 139(1): p. 83-8.
5. Altmuller J., Palmer L.J., Fischer G., Scherb H., and Wjst M., Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet*, 2001. 69(5): p. 936-50.
6. Alto N., Carlisle Michel J.J., Dodge K.L., Langeberg L.K., and Scott J.D., Intracellular targeting of protein kinases and phosphatases. *Diabetes*, 2002. 51 Suppl 3: p. S385-8.
7. Anderton B.H., Alzheimer's disease: clues from flies and worms. *Curr Biol*, 1999. 9(3): p. R106-9.
8. Ando T., Monroe S.S., Noel J.S., and Glass R.I., A one-tube method of reverse transcription-PCR to efficiently amplify a 3-kilobase region from the RNA polymerase gene to the poly(A) tail of small round-structured viruses (Norwalk-like viruses). *J Clin Microbiol*, 1997. 35(3): p. 570-7.
9. Ariga T., Kobayashi K., Hasegawa A., Kiso M., Ishida H., and Miyatake T., Characterization of high-affinity binding between gangliosides and amyloid beta-protein. *Arch Biochem Biophys*, 2001. 388(2): p. 225-30.
10. Armstrong J., Boada M., Rey M.J., Vidal N., and Ferrer I., Familial Alzheimer disease associated with A713T mutation in APP. *Neurosci Lett*, 2004. 370(2-3): p. 241-3.
11. Bagnoli S., Tedde A., Cellini E., Rotondi M., Nacmias B., and Sorbi S., The urokinase-plasminogen activator (PLAU) gene is not associated with late onset Alzheimer's disease. *Neurogenetics*, 2005. 6(1): p. 53-4.
12. Bakolitsa C., Cohen D.M., Bankston L.A., Bobkov A.A., Cadwell G.W., Jennings L., Critchley D.R., Craig S.W., and Liddington R.C., Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature*, 2004. 430(6999): p. 583-6.
13. Balistreri C.R., Grimaldi M.P., Vasto S., Listi F., Chiappelli M., Licastro F., Lio D., Caruso C., and Candore G., Association between the polymorphism of CCR5 and Alzheimer's disease: results of a study performed on male and female patients from Northern Italy. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. 1089: p. 454-61.
14. Barrett J.C., Fry B., Maller J., and Daly M.J., Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 2005. 21(2): p. 263-5.
15. Barrow C.J. and Zagorski M.G., Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science*, 1991. 253(5016): p. 179-82.

16. Bassiony M.M., Rosenblatt A., Baker A., Steinberg M., Steele C.D., Sheppard J.M., and Lyketsos C.G., Falls and age in patients with Alzheimer's disease. *J Nerv Ment Dis*, 2004. 192(8): p. 570-2.
17. Bauer J., Hull M., and Berger M., [Pathogenetic factors of Alzheimer disease]. *Z Gerontol Geriatr*, 1995. 28(3): p. 155.
18. Becaria A., Campbell A., and Bondy S.C., Aluminum as a toxicant. *Toxicol Ind Health*, 2002. 18(7): p. 309-20.
19. Bertram L., Blacker D., Mullin K., Keeney D., Jones J., Basu S., Yhu S., McInnis M.G., Go R.C., Vekrellis K., Selkoe D.J., Saunders A.J., and Tanzi R.E., Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science*, 2000. 290(5500): p. 2302-3.
20. Bertram L., Mullin K., Parkinson M., Hsiao M., Moscarillo T.J., Wagner S.L., Becker K.D., Velicelebi G., Blacker D., and Tanzi R.E., Is alpha-T catenin (VR22) an Alzheimer's disease risk gene? *J Med Genet*, 2007. 44(1): p. e63.
21. Bertram L., Parkinson M., McQueen M.B., Mullin K., Hsiao M., Menon R., Moscarillo T.J., Blacker D., and Tanzi R.E., Further evidence for LBP-1c/CP2/LSF association in Alzheimer's disease families. *J Med Genet*, 2005. 42(11): p. 857-62.
22. Bertram L. and Tanzi R.E., The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol Res*, 2004. 50(4): p. 385-96.
23. Bian L., Yang J.D., Guo T.W., Duan Y., Qin W., Sun Y., Feng G.Y., and He L., Association study of the A2M and LRP1 Genes with Alzheimer disease in the Han Chinese. *Biol Psychiatry*, 2005. 58(9): p. 731-7.
24. Bickeböllner H., Campion D., Brice A., Amouyel P., Hannequin D., Didierjean O., Penet C., Martin C., Perez-Tur J., Michon A., Dubois B., Ledoze F., Thomas-Anterion C., Pasquier F., Puel M., Demonet J.F., Moreaud O., Babron M.C., Meulien D., Guez D., Chartier-Harlin M.C., Frebourg T., Agid Y., Martinez M., and Clerget-Darpoux F., Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *Am J Hum Genet*, 1997. 60(2): p. 439-46.
25. Bickel H., [Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs]. *Z Gerontol Geriatr*, 2001. 34(2): p. 108-15.
26. Bickel H., [Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany]. *Gesundheitswesen*, 2000. 62(4): p. 211-8.
27. Bjork B.F., Katzov H., Kehoe P., Fratiglioni L., Winblad B., Prince J.A., and Graff C., Positive association between risk for late-onset Alzheimer disease and genetic variation in IDE. *Neurobiol Aging*, 2007. 28(9): p. 1374-80.
28. Blacker D., Bertram L., Saunders A.J., Moscarillo T.J., Albert M.S., Wiener H., Perry R.T., Collins J.S., Harrell L.E., Go R.C., Mahoney A., Beaty T., Fallin M.D., Avramopoulos D., Chase G.A., Folstein M.F., McInnis M.G., Bassett S.S., Doheny K.J., Pugh E.W., and Tanzi R.E., Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Hum Mol Genet*, 2003. 12(1): p. 23-32.
29. Blacker D., Wilcox M.A., Laird N.M., Rodes L., Horvath S.M., Go R.C., Perry R., Watson B., Jr., Bassett S.S., McInnis M.G., Albert M.S., Hyman B.T., and Tanzi R.E., Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, 1998. 19(4): p. 357-60.
30. Bleck O., McGrath J.A., and South A.P., Searching for candidate genes in the new millennium. *Clin Exp Dermatol*, 2001. 26(3): p. 279-83.

31. Blumstein J., Faundez V., Nakatsu F., Saito T., Ohno H., and Kelly R.B., The neuronal form of adaptor protein-3 is required for synaptic vesicle formation from endosomes. *J Neurosci*, 2001. 21(20): p. 8034-42.
32. Bondy S.C., Guo-Ross S.X., and Truong A.T., Promotion of transition metal-induced reactive oxygen species formation by beta-amyloid. *Brain Res*, 1998. 799(1): p. 91-6.
33. Braak E., Braak H., and Mandelkow E.M., A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1994. 87(6): p. 554-67.
34. Braak H. and Braak E., Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*, 1998. 53: p. 127-40.
35. Brandt J, Spencer M, Folstein M, The Telephone Interview for Cognitive Status. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 1988. 1:111-117.
36. Brocke L., Chiang L.W., Wagner P.D., and Schulman H., Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II. *J Biol Chem*, 1999. 274(32): p. 22713-22.
37. Brookes A.J. and Prince J.A., Genetic association analysis: lessons from the study of Alzheimers disease. *Mutat Res*, 2005. 573(1-2): p. 152-9.
38. Brooksbank B.W. and McGovern J., Gangliosides in the brain in adult Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Mol Chem Neuropathol*, 1989. 11(3): p. 143-56.
39. Brown R.C., Lockwood A.H., and Sonawane B.R., Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect*, 2005. 113(9): p. 1250-6.
40. Buee L., Bussiere T., Buee-Scherrer V., Delacourte A., and Hof P.R., Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000. 33(1): p. 95-130.
41. Bui J.D., Calbo S., Hayden-Martinez K., Kane L.P., Gardner P., and Hedrick S.M., A role for CaMKII in T cell memory. *Cell*, 2000. 100(4): p. 457-67.
42. Burkhardt M.S., Foster J.K., Laws S.M., Baker L.D., Craft S., Gandy S.E., Stuckey B.G., Clarnette R., Nolan D., Hewson-Bower B., and Martins R.N., Oestrogen replacement therapy may improve memory functioning in the absence of APOE epsilon4. *J Alzheimers Dis*, 2004. 6(3): p. 221-8.
43. Butterfield D.A., Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*, 2002. 36(12): p. 1307-13.
44. Butterfield D.A. and Bush A.I., Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42): involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity properties of this peptide. *Neurobiol Aging*, 2004. 25(5): p. 563-8.
45. Candore G., Balistreri C.R., Grimaldi M.P., Vasto S., Listi F., Chiappelli M., Licastro F., Lio D., and Caruso C., Age-related inflammatory diseases: role of genetics and gender in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. 1089: p. 472-86.
46. Caran N., Johnson L.D., Jenkins K.J., and Tombes R.M., Cytosolic targeting domains of gamma and delta calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, 2001. 276(45): p. 42514-9.
47. Cartegni L., Chew S.L., and Krainer A.R., Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*, 2002. 3(4): p. 285-98.

48. Cartegni L., Wang J., Zhu Z., Zhang M.Q., and Krainer A.R., ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(13): p. 3568-71.
49. Cavazzin C., Bonvicini C., Nocera A., Racchi M., Kasahara J., Tardito D., Gennarelli M., Govoni S., Racagni G., and Popoli M., Expression and phosphorylation of delta-CaM kinase II in cultured Alzheimer fibroblasts. *Neurobiol Aging*, 2004. 25(9): p. 1187-96.
50. Chandrasekar I., Stradal T.E., Holt M.R., Entschladen F., Jockusch B.M., and Ziegler W.H., Vinculin acts as a sensor in lipid regulation of adhesion-site turnover. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 7): p. 1461-72.
51. Colbran R.J., Protein phosphatases and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci*, 2004. 24(39): p. 8404-9.
52. Colbran R.J., Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*, 2004. 378(Pt 1): p. 1-16.
53. Colbran R.J., Regulation and role of brain calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neurochem Int*, 1992. 21(4): p. 469-97.
54. Colbran R.J., Fong Y.L., Schworer C.M., and Soderling T.R., Regulatory interactions of the calmodulin-binding, inhibitory, and autophosphorylation domains of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, 1988. 263(34): p. 18145-51.
55. Colucci M., Cammarata S., Assini A., Croce R., Clerici F., Novello C., Mazzella L., Dagnino N., Mariani C., and Tanganelli P., The number of pregnancies is a risk factor for Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 2006. 13(12): p. 1374-7.
56. Combs C.K., Bates P., Karlo J.C., and Landreth D.E., Regulation of beta-amyloid stimulated proinflammatory responses by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Neurochem Int*, 2001. 31(5-6): p. 449-57.
57. Coon K.D., Myers A.J., Craig D.W., Webster J.A., Pearson J.V., Lince D.H., Zismann V.L., Beach T.G., Leung D., Bryden L., Halperin R.F., Marlowe L., Kaleem M., Walker D.G., Ravid R., Heward C.B., Rogers J., Papassotiropoulos A., Reiman E.M., Hardy J., Stephan D.A., A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*, 2007. 68(4): p. 613-8.
58. Cooper T.A., Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods*, 2005. 37(4): p. 331-40.
59. Copani A., Melchiorri D., Caricasole A., Martini F., Sale P., Carnevale R., Gradini R., Sortino M.A., Lenti L., De Maria R., and Nicoletti F., Beta-amyloid-induced synthesis of the ganglioside GD3 is a requisite for cell cycle reactivation and apoptosis in neurons. *J Neurosci*, 2002. 22(10): p. 3963-8.
60. Corder E.H., Ghebremedhin E., Taylor M.G., Thal D.R., Ohm T.G., and Braak H., The biphasic relationship between regional brain senile plaque and neurofibrillary tangle distributions: modification by age, sex, and APOE polymorphism. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1019: p. 24-8.
61. Cribbs D.H., Poon W.W., Rissman R.A., and Blurton-Jones M., Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 2004. 165(2): p. 353-5.
62. Crowther M.A., Cook D.J., Trials and tribulations of systematic reviews and meta-analyses. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2007. 2007: p. 493-7.

63. Cruts M., Backhovens H., Wang S.Y., Van Gassen G., Theuns J., De Jonghe C.D., Wehnert A., De Voecht J., De Winter G., Cras P., Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum Mol Genet*, 1995. (12): p. 2363-71.
64. D'Alcantara P., Schiffmann S.N., and Swillens S., Bidirectional synaptic plasticity as a consequence of interdependent Ca²⁺-controlled phosphorylation and dephosphorylation pathways. *Eur J Neurosci*, 2003. 17(12): p. 2521-8.
65. Davis J., Wagner M.R., Zhang W., Xu F., and Van Nostrand W.E., Amyloid beta-protein stimulates the expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in human cerebrovascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2003. 278(21): p. 19054-61.
66. Daw E.W., Payami H., Nemens E.J., Nochlin D., Bird T.D., Schellenberg G.D., and Wijsman E.M., The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*, 2000. 66(1): p. 196-204.
67. De Jager C.A., Hogervorst E., Combrinck M., and Budge M.M., Sensitivity and specificity of neuropsychological tests for mild cognitive impairment, vascular cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Psychol Med*, 2003. 33(6): p. 1039-50.
68. de la Chapelle A. and Wright F.A., Linkage disequilibrium mapping in isolated populations: the example of Finland revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(21): p. 12416-23.
69. De Leon M.J., George A.E., Golomb J., Tarshish C., Convit A., Kluger A., De Santi S., McRae T., Ferris S.H., Reisberg B., Ince C., Rusinek H., Bobinski M., Quinn B., Miller D.C., and Wisniewski H.M., Frequency of hippocampal formation atrophy in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 1997. 18(1): p. 1-11.
70. Dell'Angelica E.C., Klumperman J., Stoorvogel W., and Bonifacino J.S., Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science*, 1998. 280(5362): p. 431-4.
71. Devlin B., Roeder K., and Wasserman L., Genomic control for association studies: a semiparametric test to detect excess-haplotype sharing. *Biostatistics*, 2000. 1(4): p. 369-87
72. Dickson D.W., Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J Clin Invest*, 2004. 114(1): p. 23-7.
73. Dickson D.W., The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997. 56(4): p. 321-39.
74. D'Introno A., Solfrizzi V., Colacicco A.M., Capurso C., Torres F., Capurso S.A., Capurso A., and Panza F., Polymorphisms in the oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene and risk of Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2005. 60(3): p. 280-4.
75. Dodart J.C., Mathis C., and Ungerer A., The beta-amyloid precursor protein and its derivatives: from biology to learning and memory processes. *Rev Neurosci*, 2000. 11(2-3): p. 75-93.
76. Dosemeci A., Tao-Cheng J.H., Vinade L., Winters C.A., Pozzo-Miller L., and Reese T.S., Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(18): p. 10428-32.
77. Ertekin-Taner N., Allen M., Fadale D., Scanlin L., Younkin L., Petersen R.C., Graff-Radford N., and Younkin S.G., Genetic variants in a haplotype block spanning IDE are significantly associated with plasma Aβ₄₂ levels and risk for Alzheimer disease. *Hum Mutat*, 2004. 23(4): p. 334-42.
78. Ertekin-Taner N., Graff-Radford N., Younkin L.H., Eckman C., Baker M., Adamson J., Ronald J., Blangero J., Hutton M., and Younkin S.G., Linkage of plasma Aβ₄₂ to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science*, 2000. 290(5500): p. 2303-4.

79. Ertekin-Taner N., Ronald J., Feuk L., Prince J., Tucker M., Younkin L., Hella M., Jain S., Hackett A., Scanlin L., Kelly J., Kihiko-Ehman M., Neltner M., Hersh L., Kindy M., Markesbery W., Hutton M., de Andrade M., Petersen R.C., Graff-Radford N., Estus S., Brookes A.J., and Younkin S.G., Elevated amyloid beta protein (A β 42) and late onset Alzheimer's disease are associated with single nucleotide polymorphisms in the urokinase-type plasminogen activator gene. *Hum Mol Genet*, 2005. 14(3): p. 447-60.
80. Feuk L., Prince J.A., Blennow K., and Brookes A.J., Further evidence for role of a promoter variant in the TNFRSF6 gene in Alzheimer disease. *Hum Mutat*, 2003. 21(1): p. 53-60.
81. Finch C.E. and Morgan T.E., Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: a position paper. *Curr Alzheimer Res*, 2007. 4(2): p. 185-9.
82. Finckh U., van Hadeln K., Muller-Thomsen T., Alberici A., Binetti G., Hock C., Nitsch R.M., Stoppe G., Reiss J., and Gal A., Association of late-onset Alzheimer disease with a genotype of PLAU, the gene encoding urokinase-type plasminogen activator on chromosome 10q22.2. *Neurogenetics*, 2003. 4(4): p. 213-7.
83. Fitzsimonds R.M. and Poo M.M., Retrograde signaling in the development and modification of synapses. *Physiol Rev*, 1998. 78(1): p. 143-70.
84. Folstein M.F., Folstein S.E., and McHugh P.R., "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 1975. 12(3): p. 189-98.
85. Foerstl H., *Demenzen in Theorie und Praxis*. Springer Verlag, 2001.
86. Forero D.A., Arboleda G., Yunis J.J., Pardo R., and Arboleda H., Association study of polymorphisms in LRP1, tau and 5-HTT genes and Alzheimer's disease in a sample of Colombian patients. *J Neural Transm*, 2006. 113(9): p. 1253-62.
87. Fraser P.E., Yu G., Levesque L., Nishimura M., Yang D.S., Mount H.T., Westaway D., and St George-Hyslop P.H., Presenilin function: connections to Alzheimer's disease and signal transduction. *Biochem Soc Symp*, 2001(67): p. 89-100.
88. Fuentealba R.A., Farias G., Scheu J., Bronfman M., Marzolo M.P., and Inestrosa N.C., Signal transduction during amyloid-beta-peptide neurotoxicity: role in Alzheimer disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004. 47(1-3): p. 275-89.
89. Fujishiro Donai H., [Study on the regulation of synaptic function by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II]. *Yakugaku Zasshi*, 2006. 126(5): p. 337-42.
90. Furukawa K., Horie M., Okutomi K., Sugano S., and Furukawa K., Isolation and functional analysis of the melanoma specific promoter region of human GD3 synthase gene. *Biochim Biophys Acta*, 2003. 1627(2-3): p. 71-8.
91. Gaertner T.R., Kolodziej S.J., Wang D., Kobayashi R., Koomen J.M., Stoops J.K., and Waxham M.N., Comparative analyses of the three-dimensional structures and enzymatic properties of alpha, beta, gamma and delta isoforms of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, 2004. 279(13): p. 12484-94.
92. Galloway P.G., Perry G., and Gambetti P., Hirano body filaments contain actin and actin-associated proteins. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1987. 46(2): p. 185-99.
93. Garcia T. and Jay D., [Phosphorylation of tau and Alzheimer's disease]. *Gac Med Mex*, 2004. 140(3): p. 329-33.

94. Garcia-Touchard A., Henry T.D., Sangiorgi G., Spagnoli L.G., Mauriello A., Conover C., and Schwartz R.S., Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(6): p. 1119-27.
95. Gasparini L., Netzer W.J., Greengard P., and Xu H., Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci*, 2002. 23(6): p. 288-93.
96. Gatz M., Svedberg P., Pedersen N.L., Mortimer J.A., Berg S., and Johansson B., Education and the risk of Alzheimer's disease: findings from the study of dementia in Swedish twins. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, 2001. 56(5): p. P292-300.
97. Gilmore A.P. and Burridge K., Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature*, 1996. 381(6582): p. 531-5.
98. Glazewski S., Giese K.P., Silva A., and Fox K., The role of alpha-CaMKII autophosphorylation in neocortical experience-dependent plasticity. *Nat Neurosci*, 2000. 3(9): p. 911-8.
99. Goate A.M., Haynes A.R., Owen M.J., Farrall M., James L.A., Lai L.Y., Mullan M.J., Roques P., Rossor M.N., Williamson R., Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet*, 1989. 1(8634): p. 352-5.
100. Goda Y. and Stevens C.F., Synaptic plasticity: the basis of particular types of learning. *Curr Biol*, 1996. 6(4): p. 375-8.
101. Goldstein D.B. and Weale M.E., Population genomics: linkage disequilibrium holds the key. *Curr Biol*, 2001. 11(14): p. R576-9.
102. Gomez-Ramos A., Smith M.A., Perry G., and Avila J., Tau phosphorylation and assembly. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2004. 64(1): p. 33-9.
103. Gong C.X., Liu F., Grundke-Iqbal I., and Iqbal K., Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 2005. 112(6): p. 813-38.
104. Griffin T.J. and Smith L.M., Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol*, 2000. 18(2): p. 77-84.
105. Grossberg G.T., Effect of rivastigmine in the treatment of behavioral disturbances associated with dementia: review of neuropsychiatric impairment in Alzheimer's disease. *Curr Med Res Opin*, 2005. 21(10): p. 1631-9.
106. Grossman H., Bergmann C., and Parker S., Dementia: a brief review. *Mt Sinai J Med*, 2006. 73(7): p. 985-92.
107. Grundke-Iqbal I., Rolkova G., Konstekova E., and Iqbal K., Biological markers in Alzheimer's disease. *Bratisl Lek Listy*, 2006. 107(9-10): p. 359-65.
108. Grupe A., Abraham R., Li Y., Rowland C., Hollingworth P., Morgan A., Jehu L., Segurado R., Stone D., Schadt E., Karnoub M., Nowotny P., Tacey K., Catanese J., Sninsky J., Brayne C., Rubinsztein D., Gill M., Lawlor B., Lovestone S., Holmans P., O'Donovan M., Morris J.C., Thal L., Goate A., Owen M.J., Williams J., Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants. *Hum Mol Genet*, 2007. 16(8): p. 865-73.

109. Grupe A., Li Y., Rowland C., Nowotny P., Hinrichs A.L., Smemo S., Kauwe J.S., Maxwell T.J., Cherny S., Doil L., Tacey K., van Luchene R., Myers A., Wavrant-De Vrieze F., Kaleem M., Hollingworth P., Jehu L., Foy C., Archer N., Hamilton G., Holmans P., Morris C.M., Catanese J., Sninsky J., White T.J., Powell J., Hardy J., O'Donovan M., Lovestone S., Jones L., Morris J.C., Thal L., Owen M., Williams J., and Goate A., A scan of chromosome 10 identifies a novel locus showing strong association with late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*, 2006. 78(1): p. 78-88.
110. Gut I.G., Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat*, 2001. 17(6): p. 475-92.
111. Hakomori S., Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem*, 1990. 265(31): p. 18713-6.
112. Hamamura K., Furukawa K., Hayashi T., Hattori T., Nakano J., Nakashima H., Okuda T., Mizutani H., Hattori H., Ueda M., Urano T., Lloyd K.O., and Furukawa K., Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(31): p. 11041-6.
113. Hara-Yokoyama M., Gangliosides potentially inhibit extracellular nucleotide metabolism. *Curr Med Chem*, 2006. 13(19): p. 2233-9.
114. Hardy J. and Selkoe D.J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002. 297(5580): p. 353-6.
115. Harris J.K. and DeLorenzo R.J., Calcium and neuronal cytoskeletal proteins: alterations with aging. *Neurobiol Aging*, 1987. 8(4): p. 359-61.
116. Harrison P.M., Kumar A., Lang N., Snyder M., and Gerstein M., A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(5): p. 1083-90.
117. Hartmann A.P., Almeida S.M., Livramento J.A., Nitrini R., Takahashi D., and Caramelli P., Hyperphosphorylated tau protein in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and other dementias: preliminary findings. *Arq Neuropsiquiatr*, 2004. 62(3B): p. 751-5.
118. Harwood D.G., Barker W.W., Ownby R.L., St George-Hyslop P., Mullan M., and Duara R., Apolipoprotein E polymorphism and age of onset for Alzheimer's disease in a bi-ethnic sample. *Int Psychogeriatr*, 2004. 16(3): p. 317-26.
119. Hayer A. and Bhalla U.S., Molecular switches at the synapse emerge from receptor and kinase traffic. *PLoS Comput Biol*, 2005. 1(2): p. 137-54.
120. Hellstrom-Lindahl E., Mousavi M., Ravid R., and Nordberg A., Reduced levels of Abeta 40 and Abeta 42 in brains of smoking controls and Alzheimer's patients. *Neurobiol Dis*, 2004. 15(2): p. 351-60.
121. Helmer C., Letenneur L., Rouch I., Richard-Harston S., Barberger-Gateau P., Fabrigoule C., Orgogozo J.M., and Dartigues J.F., Occupation during life and risk of dementia in French elderly community residents. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2001. 71(3): p. 303-9.
122. Higashi H., [Regulation of neuronal cell function by glyco-signals]. *Yakugaku Zasshi*, 2007. 127(4): p. 563-70.
123. Hillenkamp F., Karas M., Beavis R.C., and Chait B.T., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem*, 1991. 63(24): p. 1193A-1203A.
124. Hong M., Chen D.C., Klein P.S., and Lee V.M., Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*, 1997. 272(40): p. 25326-32.

125. Hook S.S. and Means A.R., Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. 41: p. 471-505.
126. Huang E.P., Synaptic plasticity: going through phases with LTP. *Curr Biol*, 1998. 8(10): p. R350-2.
127. Huang H.D., Horng J.T., Lee C.C., and Liu B.J., ProSplicer: a database of putative alternative splicing information derived from protein, mRNA and expressed sequence tag sequence data. *Genome Biol*, 2003. 4(4): p. R29.
128. Huang H.D., Horng J.T., Lin F.M., Chang Y.C., and Huang C.C., SpliceInfo: an information repository for mRNA alternative splicing in human genome. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(Database issue): p. D80-5.
129. Huang W., Qiu C., von Strauss E., Winblad B., and Fratiglioni L., APOE genotype, family history of dementia, and Alzheimer disease risk: a 6-year follow-up study. *Arch Neurol*, 2004. 61(12): p. 1930-4.
130. Huang W., Qiu C., Winblad B., and Fratiglioni L., Alcohol consumption and incidence of dementia in a community sample aged 75 years and older. *J Clin Epidemiol*, 2002. 55(10): p. 959-64.
131. Huang X., Moir R.D., Tanzi R.E., Bush A.I., and Rogers J.T., Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1012: p. 153-63.
132. Huang Y.H., Chen Y.T., Lai J.J., Yang S.T., and Yang U.C., PALS db: Putative Alternative Splicing database. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(1): p. 186-90.
133. Hudmon A. and Schulman H., Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*, 2002. 364(Pt 3): p. 593-611.
134. Huizing M. and Gahl W.A., Disorders of vesicles of lysosomal lineage: the Hermansky-Pudlak syndromes. *Curr Mol Med*, 2002. 2(5): p. 451-67.
135. Hunter T., Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 1995. 80(2): p. 225-36.
136. Irizarry M.C., Deng A., Lleo A., Berezovska O., Von Arnim C.A., Martin-Rehrmann M., Manelli A., LaDu M.J., Hyman B.T., and Rebeck G.W., Apolipoprotein E modulates gamma-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. *J Neurochem*, 2004. 90(5): p. 1132-43.
137. Itzhaki R., Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E and Alzheimer' disease. *Herpes*, 2004. 11 Suppl 2: p. 77A-82A.
138. Itzhaki R.F., Dobson C.B., Shipley S.J., and Wozniak M.A., The role of viruses and of APOE in dementia. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1019: p. 15-8.
139. Iwata N., Higuchi M., and Saido T.C., Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*, 2005.
140. Izard T., Evans G., Borgon R.A., Rush C.L., Bricogne G., and Bois P.R., Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. *Nature*, 2004. 427(6970): p. 171-5.
141. Jarvenpaa T., Rinne J.O., Raiha I., Koskenvuo M., Lopponen M., Hinkka S., and Kaprio J., Characteristics of two telephone screens for cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2002. 13(3): p. 149-55.
142. Jellinger K., Danielczyk W., Fischer P., and Gabriel E., Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly. *J Neurol Sci*, 1990. 95(3): p. 239-58.
143. Johnson G.V. and Stoothoff W.H., Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 24): p. 5721-9.

144. Jorm A.F. and Korten A.E., Assessment of cognitive decline in the elderly by informant interview. *Br J Psychiatry*, 1988. 152: p. 209-13.
145. Juan D., Zhou D.H., Li J., Wang J.Y., Gao C., and Chen M., A 2-year follow-up study of cigarette smoking and risk of dementia. *Eur J Neurol*, 2004. 11(4): p. 277-82.
146. Kalanj S., Kracun I., Rosner H., and Cosovic C., Regional distribution of brain gangliosides in Alzheimer's disease. *Neurol Croat*, 1991. 40(4): p. 269-81.
147. Karas M. and Hillenkamp F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 1988. 60(20): p. 2299-301.
148. Karp A., Kareholt I., Qiu C., Bellander T., Winblad B., and Fratiglioni L., Relation of education and occupation-based socioeconomic status to incident Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol*, 2004. 159(2): p. 175-83.
149. Kehoe P., Wavrant-De Vrieze F., Crook R., Wu W.S., Holmans P., Fenton I., Spurlock G., Norton N., Williams H., Williams N., Lovestone S., Perez-Tur J., Hutton M., Chartier-Harlin M.C., Shears S., Roehl K., Booth J., Van Voorst W., Ramic D., Williams J., Goate A., Hardy J., and Owen M.J., A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 1999. 8(2): p. 237-45.
150. Kihara T. and Shimohama S., Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2004. 64(1): p. 99-105.
151. Kirk B.W., Feinsod M., Favis R., Kliman R.M., and Barany F., Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(15): p. 3295-311.
152. Kirpekar F., Nordhoff E., Larsen L.K., Kristiansen K., Roepstorff P., and Hillenkamp F., DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*, 1998. 26(11): p. 2554-9.
153. Kowalska A., Pruchnik-Wolinska D., Florczak J., Modestowicz R., Szczech J., Kozubski W., Rossa G., and Wender M., Genetic study of familial cases of Alzheimer's disease. *Acta Biochim Pol*, 2004. 51(1): p. 245-52.
154. Kowalska A., Pruchnik-Wolinska D., Florczak J., Szczech J., Kozubski W., Rossa G., and Wender M., Amyloid precursor protein gene analysis in familial Alzheimer's disease cases: a lack of mutations in exons 16 and 17. *Folia Neuropathol*, 2004. 42(1): p. 1-7.
155. Kracun I., Kalanj S., Cosovic C., and Talan-Hranilovic J., Brain gangliosides in Alzheimer's disease. *J Hirnforsch*, 1990. 31(6): p. 789-93.
156. Kracun I., Kalanj S., Talan-Hranilovic J., and Cosovic C., Cortical distribution of gangliosides in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 1992. 20(3): p. 433-8.
157. Krezowski J., Knudson D., Ebeling C., Pitstick R., Giri R.K., Schenk D., Westaway D., Younkin L., Younkin S.G., Ashe K.H., and Carlson G.A., Identification of loci determining susceptibility to the lethal effects of amyloid precursor protein transgene overexpression. *Hum Mol Genet*, 2004. 13(18): p. 1989-97.
158. Kruglyak L. and Nickerson D.A., Variation in the spice of life. *Nat Genet*, 2001. 27(3): p. 234-6.
159. Ksiezak-Reding H., Liu W.K., and Yen S.H., Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res*, 1992. 597(2): p. 209-19.
160. Kurz A., Riemenschneider M., Drzezga A., and Lautenschlager N., The role of biological markers in the early and differential diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*, 2002(62): p. 127-33.

161. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J.P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann N., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J.C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Shownkeen R., Sims S., Waterston R.H., Wilson R.K., Hillier L.W., McPherson J.D., Marra M.A., Mardis E.R., Fulton L.A., Chinwalla A.T., Pepin K.H., Gish W.R., Chissoe S.L., Wendl M.C., Delehaunty K.D., Miner T.L., Delehaunty A., Kramer J.B., Cook L.L., Fulton R.S., Johnson D.L., Minx P.J., Clifton S.W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J.F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R.A., Muzny D.M., Scherer S.E., Bouck J.B., Sodergren E.J., Worley K.C., Rives C.M., Gorrell J.H., Metzker M.L., Naylor S.L., Kucherlapati R.S., Nelson D.L., Weinstock G.M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D.R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H.M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R.W., Federspiel N.A., Abola A.P., Proctor M.J., Myers R.M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D.R., Olson M.V., Kaul R., Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G.A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B.A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W.R., de la Bastide M., Dedhia N., Blocker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J.A., Bateman A., Batzoglou S., Birney E., Bork P., Brown D.G., Burge C.B., Cerutti L., Chen H.C., Church D., Clamp M., Copley R.R., Doerks T., Eddy S.R., Eichler E.E., Furey T.S., Galagan J., Gilbert J.G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L.S., Jones T.A., Kasif S., Kasprzyk A., Kennedy S., Kent W.J., Kitts P., Koonin E.V., Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T.M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J.V., Mulder N., Pollara V.J., Ponting C.P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A.F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y.I., Wolfe K.H., Yang S.P., Yeh R.F., Collins F., Guyer M.S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K.A., Patrinos A., Morgan M.J., de Jong P., Catanese J.J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S. and Chen Y.J., Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001. 409(6822): p. 860-921.
162. Laws S.M., Hone E., Gandy S., and Martins R.N., Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *J Neurochem*, 2003. 84(6): p. 1215-36.
163. Lee C., Atanelov L., Modrek B., and Xing Y., ASAP: the Alternative Splicing Annotation Project. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(1): p. 101-5.

164. Lee J.H., Cheng R., Santana V., Williamson J., Lantigua R., Medrano M., Arriaga A., Stern Y., Tycko B., Rogaeva E., Wakutani Y., Kawarai T., St George-Hyslop P., and Mayeux R., Expanded genomewide scan implicates a novel locus at 3q28 among Caribbean hispanics with familial Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 2006. 63(11): p. 1591-8.
165. Letenneur L., Larrieu S., and Barberger-Gateau P., Alcohol and tobacco consumption as risk factors of dementia: a review of epidemiological studies. *Biomed Pharmacother*, 2004. 58(2): p. 95-9.
166. Levy-Lahad E., Wijsman E.M., Nemens E., Anderson L., Goddard K.A., Weber J.L., Bird T.D., Schellenberg G.D., A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*, 1995. 269(5226): p. 970-3.
167. Lewis C.M., Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform*, 2002. 3(2): p. 146-53.
168. Li H., Wetten S., Li L., St Jean P.L., Upmanyu R., Surh L., Hosford D., Barnes M.R., Briley J.D., Borrie M., Coletta N., Delisle R., Dhalla D., Ehm M.G., Feldman H.H., Fornazzari L., Gauthier S., Goodgame N., Guzman D., Hammond S., Hollingworth P., Hsiung G.Y., Johnson J., Kelly D.D., Keren R., Kertesz A., King K.S., Lovestone S., Loy-English I., Matthews P.M., Owen M.J., Plumpton M., Pryse-Phillips W., Prinjha R.K., Richardson J.C., Saunders A., Slater A.J., St George-Hyslop P.H., Stinnett S.W., Swartz J.E., Taylor R.L., Wherrett J., Williams J., Yarnall D.P., Gibson R.A., Irizarry M.C., Middleton L.T., Roses A.D., Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 2008. 65(1): p. 45-53.
169. Li Y., Nowotny P., Holmans P., Smemo S., Kauwe J.S., Hinrichs A.L., Tacey K., Doil L., van Luchene R., Garcia V., Rowland C., Schrodi S., Leong D., Gogic G., Chan J., Cravchik A., Ross D., Lau K., Kwok S., Chang S.Y., Catanese J., Sninsky J., White T.J., Hardy J., Powell J., Lovestone S., Morris J.C., Thal L., Owen M., Williams J., Goate A., and Grupe A., Association of late-onset Alzheimer's disease with genetic variation in multiple members of the GAPD gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(44): p. 15688-93.
170. Liang X., Schnetz-Boutaud N., Kenealy S.J., Jiang L., Bartlett J., Lynch B., Gaskell P.C., Gwirtsman H., McFarland L., Bembe M.L., Bronson P., Gilbert J.R., Martin E.R., Pericak-Vance M.A., and Haines J.L., Covariate analysis of late-onset Alzheimer disease refines the chromosome 12 locus. *Mol Psychiatry*, 2006. 11(3): p. 280-5.
171. Lin K.F., Chang R.C., Suen K.C., So K.F., and Hugon J., Modulation of calcium/calmodulin kinase-II provides partial neuroprotection against beta-amyloid peptide toxicity. *Eur J Neurosci*, 2004. 19(8): p. 2047-55.
172. Lin P.I., Martin E.R., Bronson P.G., Browning-Large C., Small G.W., Schmechel D.E., Welsh-Bohmer K.A., Haines J.L., Gilbert J.R., Pericak-Vance M.A., Exploring the association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and Alzheimer disease. *Neurology*, 2006. 67(1): p. 64-8.
173. Lin P.I., Martin E.R., Browning-Large C.A., Schmechel D.E., Welsh-Bohmer K.A., Doraiswamy P.M., Gilbert J.R., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Parsing the genetic heterogeneity of chromosome 12q susceptibility genes for Alzheimer disease by family-based association analysis. *Neurogenetics*, 2006. 7(3): p. 157-65

174. Lindsay J., Laurin D., Verreault R., Hebert R., Helliwell B., Hill G.B., and McDowell I., Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol*, 2002. 156(5): p. 445-53.
175. Lisman J., Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2003. 358(1432): p. 829-42.
176. Lisman J., Schulman H., and Cline H., The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*, 2002. 3(3): p. 175-90.
177. Liu F., Arias-Vasquez A., Sleegers K., Aulchenko Y.S., Kayser M., Sanchez-Juan P., Feng B.J., Bertoli-Avella A.M., van Swieten J., Axenovich T.I., Heutink P., van Broeckhoven C., Oostra B.A., and van Duijn C.M., A genomewide screen for late-onset Alzheimer disease in a genetically isolated Dutch population. *Am J Hum Genet*, 2007. 81(1): p. 17-31.
178. Long J.R., Zhao L.J., Liu P.Y., Lu Y., Dvornyk V., Shen H., Liu Y.J., Zhang Y.Y., Xiong D.H., Xiao P., and Deng H.W., Patterns of linkage disequilibrium and haplotype distribution in disease candidate genes. *BMC Genet*, 2004. 5(1): p. 11.
179. Lottspeich F und Zorbas H, *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1998.
180. Lovestone S. and Reynolds C.H., The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience*, 1997. 78(2): p. 309-24.
181. Luchsinger J.A. and Mayeux R., Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 2004. 3(10): p. 579-87.
182. Luchsinger J.A., Tang M.X., Shea S., and Mayeux R., Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology*, 2004. 63(7): p. 1187-92.
183. Maciver S.K. and Harrington C.R., Two actin binding proteins, actin depolymerizing factor and cofilin, are associated with Hirano bodies. *Neuroreport*, 1995. 6(15): p. 1985-8.
184. Mahley R.W., Rall S.C. Jr., Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2000. 1: p. 507-37.
185. Majercak J., Ray W.J., Espeseth A., Simon A., Shi X.P., Wolffe C., Getty K., Marine S., Stec E., Ferrer M., Strulovici B., Bartz S., Gates A., Xu M., Huang Q., Ma L., Shughrue P., Burchard J., Colussi D., Pietrak B., Kahana J., Behr D., Rosahl T., Shearman M., Hazuda D., Sachs A.B., Koblan K.S., Seabrook G.R., and Stone D.J., LRRTM3 promotes processing of amyloid-precursor protein by BACE1 and is a positional candidate gene for late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(47): p. 17967-72.
186. Malenka R.C. and Nicoll R.A., Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*, 1999. 285(5435): p. 1870-4.
187. Malhotra K., Foltz L., Mahoney W.C., and Schueler P.A., Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 1998. 26(3): p. 854-6.
188. Malisan F. and Testi R., GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1585(2-3): p. 179-87.
189. Maselli A., Furukawa R., Thomson S.A., Davis R.C., and Fehcheimer M., Formation of Hirano bodies induced by expression of an actin cross-linking protein with a gain-of-function mutation. *Eukaryot Cell*, 2003. 2(4): p. 778-87.

190. Mayeux R., Lee J.H., Romas S.N., Mayo D., Santana V., Williamson J., Ciappa A., Rondon H.Z., Estevez P., Lantigua R., Medrano M., Torres M., Stern Y., Tycko B., Knowles J.A., Chromosome-12 mapping of late-onset Alzheimer disease among Caribbean Hispanics. *Am J Hum Genet*, 2002. 70(1): p. 237-43.
191. Means A.R., Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol Endocrinol*, 2000. 14(1): p. 4-13.
192. Melchiorri D., Martini F., Lococo E., Gradini R., Barletta E., De Maria R., Caricasole A., Nicoletti F., and Lenti L., An early increase in the disialoganglioside GD3 contributes to the development of neuronal apoptosis in culture. *Cell Death Differ*, 2002. 9(6): p. 609-15.
193. Melchor J.P., Pawlak R., and Strickland S., The tissue plasminogen activator-plasminogen proteolytic cascade accelerates amyloid-beta (Abeta) degradation and inhibits Abeta-induced neurodegeneration. *J Neurosci*, 2003. 23(26): p. 8867-71.
194. Mirra S.S., Heyman A., McKeel D., Sumi S.M., Crain B.J., Brownlee L.M., Vogel F.S., Hughes J.P., van Belle G., and Berg L., The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*, 1991. 41(4): p. 479-86.
195. Miyamoto E., Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci*, 2006. 100(5): p. 433-42.
196. Modrek B., Resch A., Grasso C., and Lee C., Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(13): p. 2850-9.
197. Montgomery J.M., Selcher J.C., Hanson J.E., and Madison D.V., Dynamin-dependent NMDAR endocytosis during LTD and its dependence on synaptic state. *BMC Neurosci*, 2005. 6: p. 48.
198. Morgan A.R., Turic D., Jehu L., Hamilton G., Hollingworth P., Moskva V., Jones L., Lovestone S., Brayne C., Rubinsztein D.C., Lawlor B., Gill M., O'Donovan M.C., Owen M.J., and Williams J., Association studies of 23 positional/functional candidate genes on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007. 144(6): p. 762-70.
199. Mudher A. and Lovestone S., Alzheimer's disease-do taoists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci*, 2002. 25(1): p. 22-6.
200. Mueller J.C., Lohmussaar E., Magi R., Remm M., Bettecken T., Lichtner P., Biskup S., Illig T., Pfeufer A., Luedemann J., Schreiber S., Pramstaller P., Pichler I., Romeo G., Gaddi A., Testa A., Wichmann H.E., Metspalu A., and Meitinger T., Linkage disequilibrium patterns and tagSNP transferability among European populations. *Am J Hum Genet*, 2005. 76(3): p. 387-98.
201. Munoz-Montano J.R., Moreno F.J., Avila J., and Diaz-Nido J., Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett*, 1997. 411(2-3): p. 183-8.
202. Myers A., Holmans P., Marshall H., Kwon J., Meyer D., Ramic D., Shears S., Booth J., DeVrieze F.W., Crook R., Hamshere M., Abraham R., Tunstall N., Rice F., Carty S., Lillystone S., Kehoe P., Rudrasingham V., Jones L., Lovestone S., Perez-Tur J., Williams J., Owen M.J., Hardy J., and Goate A.M., Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science*, 2000. 290(5500): p. 2304-5.

203. Myers A., Wavrant De-Vrieze F., Holmans P., Hamshere M., Crook R., Compton D., Marshall H., Meyer D., Shears S., Booth J., Ramic D., Knowles H., Morris J.C., Williams N., Norton N., Abraham R., Kehoe P., Williams H., Rudrasingham V., Rice F., Giles P., Tunstall N., Jones L., Lovestone S., Williams J., Owen M.J., Hardy J., and Goate A., Full genome screen for Alzheimer disease: stage II analysis. *Am J Med Genet*, 2002. 114(2): p. 235-44.
204. Myers A.J., Marshall H., Holmans P., Compton D., Crook R.J., Mander A.P., Nowotny P., Smemo S., Dunstan M., Jehu L., Wang J.C., Hamshere M., Morris J.C., Norton J., Chakraventy S., Tunstall N., Lovestone S., Petersen R., O'Donovan M., Jones L., Williams J., Owen M.J., Hardy J., and Goate A., Variation in the urokinase-plasminogen activator gene does not explain the chromosome 10 linkage signal for late onset AD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2004. 124(1): p. 29-37.
205. Nagy Z., Esiri M.M., Jobst K.A., Morris J.H., King E.M., McDonald B., Litchfield S., Smith A., Barnetson L., and Smith A.D., Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia*, 1995. 6(1): p. 21-31.
206. Nagy Z., Hindley N.J., Braak H., Braak E., Yilmazer-Hanke D.M., Schultz C., Barnetson L., King E.M., Jobst K.A., and Smith A.D., The progression of Alzheimer's disease from limbic regions to the neocortex: clinical, radiological and pathological relationships. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 1999. 10(2): p. 115-20.
207. Nakatsu F. and Ohno H., Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct*, 2003. 28(5): p. 419-29.
208. Naslund J., Haroutunian V., Mohs R., Davis K.L., Davies P., Greengard P., and Buxbaum J.D., Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *Jama*, 2000. 283(12): p. 1571-7.
209. Neale B.M. and Sham P.C., The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet*, 2004. 75(3): p. 353-62.
210. Nechiporuk A., Fain P., Kort E., Nee L.E., Frommelt E., Polinsky R.J., Korenberg J.R., Pulst S.M., Linkage of familial Alzheimer disease to chromosome 14 in two large early-onset pedigrees: effects of marker allele frequencies on lod scores. *Am J Med Genet*, 1993. 48(1): p. 63-6.
211. Nordberg A., Neuroreceptor changes in Alzheimer disease. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1992. 4(4): p. 303-28.
212. Nyholt D.R., A simple correction for multiple testing for SNPs in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet*, 2004. 74(4): p. 765-769.
213. Okada M., Itoh M., Haraguchi M., Okajima T., Inoue M., Oishi H., Matsuda Y., Iwamoto T., Kawano T., Fukumoto S., Miyazaki H., Furukawa K., Aizawa S., and Furukawa K., b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. *J Biol Chem*, 2002. 277(3): p. 1633-6.
214. Olarte L., Schupf N., Lee J.H., Tang M.X., Santana V., Williamson J., Maramreddy P., Tycko B., and Mayeux R., Apolipoprotein E epsilon4 and age at onset of sporadic and familial Alzheimer disease in Caribbean Hispanics. *Arch Neurol*, 2006. 63(11): p. 1586-90.

215. Orgogozo J.M., Dartigues J.F., Lafont S., Letenneur L., Commenges D., Salamon R., Renaud S., and Breteler M.B., Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev Neurol (Paris)*, 1997. 153(3): p. 185-92.
216. Ott A., Andersen K., Dewey M.E., Letenneur L., Brayne C., Copeland J.R., Dartigues J.F., Kragh-Sorensen P., Lobo A., Martinez-Lage J.M., Stijnen T., Hofman A., and Launer L.J., Effect of smoking on global cognitive function in nondemented elderly. *Neurology*, 2004. 62(6): p. 920-4.
217. Ott A., Slioter A.J., Hofman A., van Harskamp F., Witteman J.C., Van Broeckhoven C., van Duijn C.M., and Breteler M.M., Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet*, 1998. 351(9119): p. 1840-3.
218. Ozturk A., Minster R.L., DeKosky S.T., and Kamboh M.I., Association of tagSNPs in the urokinase-plasminogen activator (PLAU) gene with Alzheimer's disease and associated quantitative traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007. 144(1): p. 79-82.
219. Palovuori R. and Eskelinen S., Role of vinculin in the maintenance of cell-cell contacts in kidney epithelial MDBK cells. *Eur J Cell Biol*, 2000. 79(12): p. 961-74.
220. Pantel J., Schonknecht P., Essig M., and Schroder J., [Neuropsychological correlates of cerebral atrophy in Alzheimer's dementia]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2004. 72(4): p. 192-203.
221. Papassotiropoulos A., Tsolaki M., Wollmer M.A., Molyva D., Thal D.R., Huynh K.D., Tracy J., Staehelin H.B., Monsch A.U., Nitsch R.M., and Hock C., No association of a non-synonymous PLAU polymorphism with Alzheimer's disease and disease-related traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005. 132(1): p. 21-3.
222. Peden A.A., Rudge R.E., Lui W.W., and Robinson M.S., Assembly and function of AP-3 complexes in cells expressing mutant subunits. *J Cell Biol*, 2002. 156(2): p. 327-36.
223. Perez M., Cuadros R., Benitez M.J., and Jimenez J.S., Interaction of Alzheimer's disease amyloid beta peptide fragment 25-35 with tau protein, and with a tau peptide containing the microtubule binding domain. *J Alzheimers Dis*, 2004. 6(5): p. 461-7.
224. Pericak-Vance M.A., Bass M.L., Yamaoka L.H., Gaskell P.C., Scott W.K., Terwedow H.A., Menold M.M., Conneally P.M., Small G.W., Saunders A.M., Roses A.D., and Haines J.L., Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 1998. 19(1 Suppl): p. S39-42.
225. Pericak-Vance M.A., Grubber J., Bailey L.R., Hedges D., West S., Santoro L., Kemmerer B., Hall J.L., Saunders A.M., Roses A.D., Small G.W., Scott W.K., Conneally P.M., Vance J.M., and Haines J.L., Identification of novel genes in late-onset Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 2000. 35(9-10): p. 1343-52.
226. Perry G., Sayre L.M., Atwood C.S., Castellani R.J., Cash A.D., Rottkamp C.A., and Smith M.A., The role of iron and copper in the aetiology of neurodegenerative disorders: therapeutic implications. *CNS Drugs*, 2002. 16(5): p. 339-52.
227. Persechini A. and Cronk B., The relationship between the free concentrations of Ca²⁺ and Ca²⁺-calmodulin in intact cells. *J Biol Chem*, 1999. 274(11): p. 6827-30.
228. Pertea M., Lin X., and Salzberg S.L., GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(5): p. 1185-90.

-
229. Pesaresi M., Batelli S., Prato F., Polito L., Lovati C., Scarpini E., Quadri P., Mariani C., Albani D., Forloni G., The urokinase-type plasminogen activator polymorphism PLAU_1 is a risk factor for APOE-epsilon4 non-carriers in the Italian Alzheimer's disease population and does not affect the plasma A-beta(1-42) level. *Neurobiol Dis*, 2007. 25(3): p.609-13.
230. Petersen J.D., Chen X., Vinade L., Dosemeci A., Lisman J.E., and Reese T.S., Distribution of postsynaptic density (PSD)-95 and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II at the PSD. *J Neurosci*, 2003. 23(35): p. 11270-8.
231. Philips A.V. and Cooper T.A., RNA processing and human disease. *Cell Mol Life Sci*, 2000. 57(2): p. 235-49.
232. Postina R., Schroeder A., Dewachter I., Bohl J., Schmitt U., Kojro E., Prinzen C., Endres K., Hiemke C., Blessing M., Flamez P., Dequenne A., Godaux E., van Leuven F., and Fahrenholz F., A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*, 2004. 113(10): p. 1456-64.
233. Potyk D., Treatments for Alzheimer disease. *South Med J*, 2005. 98(6): p. 628-35.
234. Prince J.A., Feuk L., Sawyer S.L., Gottfries J., Ricksten A., Nagga K., Bogdanovic N., Blennow K., and Brookes A.J., Lack of replication of association findings in complex disease: an analysis of 15 polymorphisms in prior candidate genes for sporadic Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet*, 2001. 9(6): p. 437-44.
235. Puchtler H., Sweat F., Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem*, 1965. 13(8): p. 693-4.
236. Qi-Takahara Y., Morishima-Kawashima M., Tanimura Y., Dolios G., Hirotsu N., Horikoshi Y., Kametani F., Maeda M., Saido T.C., Wang R., and Ihara Y., Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci*, 2005. 25(2): p. 436-45.
237. Qiu C., Karp A., von Strauss E., Winblad B., Fratiglioni L., and Bellander T., Lifetime principal occupation and risk of Alzheimer's disease in the Kungsholmen project. *Am J Ind Med*, 2003. 43(2): p. 204-11.
238. Rademakers R., Cruts M., and Van Broeckhoven C., Genetics of early-onset Alzheimer dementia. *ScientificWorldJournal*, 2003. 3: p. 497-519.
239. Ravaglia G., Forti P., Maioli F., Sacchetti L., Mariani E., Nativio V., Talerico T., Vettori C., and Macini P.L., Education, occupation, and prevalence of dementia: findings from the Conselice study. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2002. 14(2): p. 90-100.
240. Rebeck G.W., LaDu M.J., Estus S., Bu G., and Weeber E.J., The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS. *Mol Neurodegener*, 2006. 1: p. 15.
241. Reid P.C., Urano Y., Kodama T., and Hamakubo T., Alzheimer's Disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J Cell Mol Med*, 2007. 11(3): p. 383-92.

242. Reiman E.M., Webster J.A., Myers A.J., Hardy J., Dunckley T., Zismann V.L., Josphipura K.D., Pearson J.V., Hu-Lince D., Huentelman M.J., Craig D.W., Coon K.D., Liang W.S., Herbert R.H., Beach T., Rohrer K.C., Zhao A.S., Leung D., Bryden L., Marlowe L., Kaleem M., Mastroeni D., Grover A., Heward C.B., Ravid R., Rogers J., Hutton M.L., Melquist S., Petersen R.C., Alexander G.E., Caselli R.J., Kukull W., Papassotiropoulos A., Stephan D.A., GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron*, 2007. 54(5): p. 713-20.
243. Reuning U., Magdolen V., Hapke S., and Schmitt M., Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins. *Biol Chem*, 2003. 384(8): p. 1119-31.
244. Riemenschneider M., Konta L., Friedrich P., Schwarz S., Taddei K., Neff F., Padovani A., Kolsch H., Laws S.M., Klopp N., Bickeboller H., Wagenpfeil S., Mueller J.C., Rosenberger A., Diehl-Schmid J., Archetti S., Lautenschlager N., Borroni B., Muller U., Illig T., Heun R., Egensperger R., Schlegel J., Forstl H., Martins R.N., and Kurz A., A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 2006. 15(16): p. 2446-56.
245. Ripova D., Platilova V., Strunecka A., Jirak R., and Hoschl C., Alterations in calcium homeostasis as biological marker for mild Alzheimer's disease? *Physiol Res*, 2004. 53(4): p. 449-52.
246. Rissman R.A., Poon W.W., Blurton-Jones M., Oddo S., Torp R., Vitek M.P., LaFerla F.M., Rohn T.T., and Cotman C.W., Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest*, 2004. 114(1): p. 121-30.
247. Riudavets M.A., Rubio A., Cox C., Rudow G., Fowler D., and Troncoso J.C., The prevalence of Alzheimer neuropathologic lesions is similar in blacks and whites. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006. 65(12): p. 1143-8.
248. Robert M. and Mathuranath P.S., Tau and tauopathies. *Neurol India*, 2007. 55(1): p. 11-6.
249. Rogaeva E., Premkumar S., Song Y., Sorbi S., Brindle N., Paterson A., Duara R., Levesque G., Yu G., Nishimura M., Ikeda M., O'Toole C., Kawarai T., Jorge R., Vilarino D., Bruni A.C., Farrer L.A., and St George-Hyslop P.H., Evidence for an Alzheimer disease susceptibility locus on chromosome 12 and for further locus heterogeneity. *Jama*, 1998. 280(7): p. 614-8.
250. Rosenberg O.S., Deindl S., Sung R.J., Nairn A.C., and Kuriyan J., Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell*, 2005. 123(5): p. 849-60.
251. Rosler N., Wichart I., and Jellinger K.A., CSF Abeta40 and Abeta42: Natural course and clinical usefulness. *J Alzheimers Dis*, 2001. 3(6): p. 599-600.
252. Rostoks N., Mudie S., Cardle L., Russell J., Ramsay L., Booth A., Svensson J.T., Wanamaker S.I., Walia H., Rodriguez E.M., Hedley P.E., Liu H., Morris J., Close T.J., Marshall D.F., Waugh R., Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol Genet Genomics*, 2005. 274(5): p. 515-27.
253. Rottkamp C.A., Raina A.K., Zhu X., Gaier E., Bush A.I., Atwood C.S., Chevion M., Perry G., and Smith M.A., Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity. *Free Radic Biol Med*, 2001. 30(4): p. 447-50.
254. Ruitenbergh A., van Swieten J.C., Witteman J.C., Mehta K.M., van Duijn C.M., Hofman A., and Breteler M.M., Alcohol consumption and risk of dementia: the Rotterdam Study. *Lancet*, 2002. 359(9303): p. 281-6.

255. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., and Erlich H.A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988. 239(4839): p. 487-91.
256. Sainudiin R., Clark A.G., and Durrett R.T., Simple models of genomic variation in human SNP density. *BMC Genomics*, 2007. 8: p. 146.
257. Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(12): p. 5463-7.
258. Schellenberg G.D., D'Souza I., and Poorkaj P., The genetics of Alzheimer's disease. *Curr Psychiatry Rep*, 2000. 2(2): p. 158-64.
259. Schmitt M., Goretzki L., Janicke F., Calvete J., Eulitz M., Kobayashi H., Chucholowski N., and Graeff H., Biological and clinical relevance of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in breast cancer. *Biomed Biochim Acta*, 1991. 50(4-6): p. 731-41.
260. Schork N.J., Fallin D., Thiel B., Xu X., Broeckel U., Jacob H.J., and Cohen D., The future of genetic case-control studies. *Adv Genet*, 2001. 42: p. 191-212.
261. Schworer C.M., Colbran R.J., Keefer J.R., and Soderling T.R., Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Identification of a regulatory autophosphorylation site adjacent to the inhibitory and calmodulin-binding domains. *J Biol Chem*, 1988. 263(27): p. 13486-9.
262. Scott W.K., Grubber J.M., Conneally P.M., Small G.W., Hulette C.M., Rosenberg C.K., Saunders A.M., Roses A.D., Haines J.L., and Pericak-Vance M.A., Fine mapping of the chromosome 12 late-onset Alzheimer disease locus: potential genetic and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet*, 2000. 66(3): p. 922-32.
263. Selkoe D.J., Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron*, 2001. 32(2): p. 177-80.
264. Selkoe D.J., Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 2001. 81(2): p. 741-66.
265. Sengupta A., Kabat J., Novak M., Wu Q., Grundke-Iqbal I., and Iqbal K., Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys*, 1998. 357(2): p. 299-309.
266. Sennvik K., Bogdanovic N., Volkman I., Fastbom J., and Benedikz E., Beta-secretase-cleaved amyloid precursor protein in Alzheimer brain: a morphologic study. *J Cell Mol Med*, 2004. 8(1): p. 127-34.
267. Sergeant N., Delacourte A., Buée L., Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1739(2-3): p. 179-97.
268. Sessoms-Sikes S., Honse Y., Lovinger D.M., and Colbran R.J., CaMKIIalpha enhances the desensitization of NR2B-containing NMDA receptors by an autophosphorylation-dependent mechanism. *Mol Cell Neurosci*, 2005. 29(1): p. 139-47.
269. Shen K., Teruel M.N., Connor J.H., Shenolikar S., and Meyer T., Molecular memory by reversible translocation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Nat Neurosci*, 2000. 3(9): p. 881-6.
270. Shen K., Teruel M.N., Subramanian K., and Meyer T., CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines. *Neuron*, 1998. 21(3): p. 593-606.
271. Shi J., Tian J., Pritchard A., Lendon C., Lambert J.C., Iwatsubo T., and Mann D.M., A 3'-UTR polymorphism in the oxidized LDL receptor 1 gene increases Abeta40 load as cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 2006. 111(1): p. 15-20.

272. Shimazaki A., Wright M.O., Elliot K., Salter D.M., and Millward-Sadler S.J., Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human articular chondrocytes. *Biorheology*, 2006. 43(3-4): p. 223-33.
273. Singer H.A., Bencoster H.A., and Schworer C.M., Novel Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II gamma-subunit variants expressed in vascular smooth muscle, brain, and cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 1997. 272(14): p. 9393-400.
274. Smith A.D. and Jobst K.A., Use of structural imaging to study the progression of Alzheimer's disease. *Br Med Bull*, 1996. 52(3): p. 575-86.
275. Smith M.A., Drew K.L., Nunomura A., Takeda A., Hirai K., Zhu X., Atwood C.S., Raina A.K., Rottkamp C.A., Sayre L.M., Friedland R.P., and Perry G., Amyloid-beta, tau alterations and mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease: the chickens or the eggs? *Neurochem Int*, 2002. 40(6): p. 527-31.
276. Smyth K.A., Fritsch T., Cook T.B., McClendon M.J., Santillan C.E., and Friedland R.P., Worker functions and traits associated with occupations and the development of AD. *Neurology*, 2004. 63(3): p. 498-503.
277. Spielman R.S. and Ewens W.J., A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet*, 1998. 62(2): p. 450-8.
278. Spielman R.S., McGinnis R.E., and Ewens W.J., Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*, 1993. 52(3): p. 506-16.
279. St George-Hyslop P.H., Haines J.L., Farrer L.A., Polinsky R., Van Broeckhoven C., Goate A., McLachlan D.R., Orr H., Bruni A.C., Sorbi S., Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder. FAD Collaborative Study Group. *Nature*, 1990. 347(6289): p. 194-7.
280. Steiner B., Mandelkow E.M., Biernat J., Gustke N., Meyer H.E., Schmidt B., Mieskes G., Soling H.D., Drechsel D., Kirschner M.W., and et al., Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca²⁺(+)-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *Embo J*, 1990. 9(11): p. 3539-44.
281. Stern Y., Gurland B., Tatemichi T.K., Tang M.X., Wilder D., and Mayeux R., Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *Jama*, 1994. 271(13): p. 1004-10.
282. Stoilov P., Meshorer E., Gencheva M., Glick D., Soreq H., and Stamm S., Defects in pre-mRNA processing as causes of and predisposition to diseases. *DNA Cell Biol*, 2002. 21(11): p. 803-18.
283. Strack S., Choi S., Lovinger D.M., and Colbran R.J., Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. *J Biol Chem*, 1997. 272(21): p. 13467-70.
284. Su J.H., Anderson A.J., Cribbs D.H., Tu C., Tong L., Kesslack P., and Cotman C.W., Fas and Fas ligand are associated with neuritic degeneration in the AD brain and participate in beta-amyloid-induced neuronal death. *Neurobiol Dis*, 2003. 12(3): p. 182-93.
285. Takashima A., Honda T., Yasutake K., Michel G., Murayama O., Murayama M., Ishiguro K., and Yamaguchi H., Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res*, 1998. 31(4): p. 317-23.

-
286. Tandon A. and Fraser P., The presenilins. *Genome Biol*, 2002. 3(11): p. reviews3014.
287. Tang M.X., Stern Y., Marder K., Bell K., Gurland B., Lantigua R., Andrews H., Feng L., Tycko B., and Mayeux R., The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics. *Jama*, 1998. 279(10): p. 751-5.
288. Teri L., McCurry S.M., and Logsdon R.G., Memory, thinking, and aging. What we know about what we know. *West J Med*, 1997. 167(4): p. 269-75.
289. Thanaraj T.A., Stamm S., Clark F., Riethoven J.J., Le Texier V., and Muilu J., ASD: the Alternative Splicing Database. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(Database issue): p. D64-9.
290. Theos A.C., Tenza D., Martina J.A., Hurbain I., Peden A.A., Sviderskaya E.V., Stewart A., Robinson M.S., Bennett D.C., Cutler D.F., Bonifacino J.S., Marks M.S., and Raposo G., Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(11): p. 5356-72.
291. Tiraboschi P., Hansen L.A., Thal L.J., and Corey-Bloom J., The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology*, 2004. 62(11): p. 1984-9.
292. Tomita S., Stein V., Stocker T.J., Nicoll R.A., and Brecht D.S., Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs. *Neuron*, 2005. 45(2): p. 269-77.
293. Truelsen T., Thudium D., and Gronbaek M., Amount and type of alcohol and risk of dementia: the Copenhagen City Heart Study. *Neurology*, 2002. 59(9): p. 1313-9.
294. Tseng H.C., Lu Q., Henderson E., and Graves D.J., Phosphorylated tau can promote tubulin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(17): p. 9503-8.
295. Tucker H.M., Kihiko M., Caldwell J.N., Wright S., Kawarabayashi T., Price D., Walker D., Scheff S., McGillis J.P., Rydel R.E., and Estus S., The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci*, 2000. 20(11): p. 3937-46.
296. Tucker H.M., Kihiko-Ehmann M., and Estus S., Urokinase-type plasminogen activator inhibits amyloid-beta neurotoxicity and fibrillogenesis via plasminogen. *J Neurosci Res*, 2002. 70(2): p. 249-55.
297. Tucker H.M., Kihiko-Ehmann M., Wright S., Rydel R.E., and Estus S., Tissue plasminogen activator requires plasminogen to modulate amyloid-beta neurotoxicity and deposition. *J Neurochem*, 2000. 75(5): p. 2172-7.
298. Tzvetkov M.V., Becker C., Kulle B., Nurnberg P., Brockmoller J., and Wojnowski L., Genome-wide single-nucleotide polymorphism arrays demonstrate high fidelity of multiple displacement-based whole-genome amplification. *Electrophoresis*, 2005. 26(3): p. 710-5.
299. van Duijn C.M., Hendriks L., Farrer L.A., Backhovens H., Cruts M., Wehnert A., Hofman A., and Van Broeckhoven C., A population-based study of familial Alzheimer disease: linkage to chromosomes 14, 19, and 21. *Am J Hum Genet*, 1994. 55(4): p. 714-27.
300. van Duijn C.M. and Hofman A., Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease. *Bmj*, 1991. 302(6791): p. 1491-4.
301. Varnum-Finney B. and Reichardt L.F., Vinculin-deficient PC12 cell lines extend unstable lamellipodia and filopodia and have a reduced rate of neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 1994. 127(4): p. 1071-84.
302. Vasile V.C., Ommen S.R., Edwards W.D., and Ackerman M.J., A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 345(3): p. 998-1003.

303. Verdile G., Fuller S., Atwood C.S., Laws S.M., Gandy S.E., and Martins R.N., The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacol Res*, 2004. 50(4): p. 397-409.
304. Whitehouse P.J., Neurotransmitter receptor alterations in Alzheimer disease: a review. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1987. 1(1): p. 9-18.
305. Whittemore A.S. and Tu I.P., Detection of disease genes by use of family data. I. Likelihood-based theory. *Am J Hum Genet*, 2000. 66(4): p. 1328-40.
306. Wjst M., Target SNP selection in complex disease association studies. *BMC Bioinformatics*, 2004. 5: p. 92.
307. Xu W., Baribault H., and Adamson E.D., Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development*, 1998. 125(2): p. 327-37.
308. Xu W.L., Qiu C.X., Wahlin A., Winblad B., and Fratiglioni L., Diabetes mellitus and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study. *Neurology*, 2004. 63(7): p. 1181-6.
309. Yamamoto H., Hiragami Y., Murayama M., Ishizuka K., Kawahara M., and Takashima A., Phosphorylation of tau at serine 416 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in neuronal soma in brain. *J Neurochem*, 2005. 94(5): p. 1438-47.
310. Yamamoto H., Yamauchi E., Taniguchi H., Ono T., and Miyamoto E., Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in its tubulin binding sites. *Arch Biochem Biophys*, 2002. 408(2): p. 255-62.
311. Yoshida R., Numata K., Imoto S., Nagasaki M., Doi A., Ueno K., and Miyano S., A statistical framework for genome-wide discovery of biomarker splice variations with GeneChip Human Exon 1.0 ST Arrays. *Genome Inform*, 2006. 17(1): p. 88-99.
312. Yoshimura Y., Ichinose T., and Yamauchi T., Phosphorylation of tau protein to sites found in Alzheimer's disease brain is catalyzed by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II as demonstrated tandem mass spectrometry. *Neurosci Lett*, 2003. 353(3): p. 185-8.
313. Yu R.K., Bieberich E., Xia T., and Zeng G., Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *J Lipid Res*, 2004. 45(5): p. 783-93.
314. Zekanowski C., Religa D., Graff C., Filipek S., and Kuznicki J., Genetic aspects of Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2004. 64(1): p. 19-31.
315. Zemljic-Harpf A.E., Ponrartana S., Avalos R.T., Jordan M.C., Roos K.P., Dalton N.D., Phan V.Q., Adamson E.D., and Ross R.S., Heterozygous inactivation of the vinculin gene predisposes to stress-induced cardiomyopathy. *Am J Pathol*, 2004. 165(3): p. 1033-44.
316. Zhabotinsky A.M., Bistability in the Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase-phosphatase system. *Biophys J*, 2000. 79(5): p. 2211-21.
317. Zhang G., Cai X., Lopez-Guisa J.M., Collins S.J., and Eddy A.A., Mitogenic signaling of urokinase receptor-deficient kidney fibroblasts: actions of an alternative urokinase receptor and LDL receptor-related protein. *J Am Soc Nephrol*, 2004. 15(8): p. 2090-102.
318. Zhao D., Watson J.B., and Xie C.W., Amyloid beta prevents activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and AMPA receptor phosphorylation during hippocampal long-term potentiation. *J Neurophysiol*, 2004. 92(5): p. 2853-8.

319. Zheng H. and Koo E.H., The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*, 2006. 1: p. 5.
320. Zhu M., Gokhale V.M., Szabo L., Munoz R.M., Baek H., Bashyam S., Hurley L.H., Von Hoff D.D., and Han H., Identification of a novel inhibitor of urokinase-type plasminogen activator. *Mol Cancer Ther*, 2007. 6(4): p. 1348-56.
321. Ziegler W.H., Liddington R.C., and Critchley D.R., The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol*, 2006. 16(9): p. 453-60.