

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

## **SORL1 Polymorphismen und Liquormarker der Alzheimer Krankheit**

Christine Gabriele Heinrike Westerteicher

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

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. R. G. Perneczky
2. Univ.- Prof. Dr. J. Förstl

Diese Dissertation wurde am 11.12.2013 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.09.2014  
angenommen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**SORL1 genetic variants and cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease.**

Guo LH, Westerteicher C, Wang XH, Kratzer M, Tsolakidou A, Jiang M, Grimmer T, Laws SM, Alexopoulos P, Bujo H, Kurz A, Perneczky R.

Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2012 Sep;262(6):529-34.

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1	<b>Epidemiologie und gesellschaftliche Bedeutung der Demenzen</b>	<b>5</b>
1.2	<b>Demenz bei Alzheimer Krankheit</b>	<b>6</b>
1.2.1	Pathogenese der Alzheimer Krankheit	8
1.2.2	Liquorparameter	11
1.3	<b>Mild Cognitive Impairment</b>	<b>12</b>
1.4	<b>Einflüsse des Sortilin-related-Receptor SORL1 auf die Pathogenese der Alzheimer Krankheit</b>	<b>13</b>
1.4.1	Die SORL1-Rezeptorstruktur	15
1.4.2	Lokalisation und Prozessierung von SORL1	17
1.4.3	SORL1 und der Transport des Amyloid-Precursor-Proteins	18
1.4.4	Sekretasen als Interaktionspartner von SORL1	20
1.5	<b>Das SORL1-Gen und seine Varianten</b>	<b>20</b>
1.5.1	SORL1-SNPs der 5'-Region	22
1.5.2	SORL1-SNPs der 3'-Region	23
1.6	<b>Fragestellung</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
2.1	<b>Studienteilnehmer</b>	<b>25</b>
2.1.1	Probengewinnung	26
2.2	<b>Labormethoden</b>	<b>26</b>
2.2.1.1	DNA-Isolierung	26
2.2.1.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	28
2.2.2	Genotypisierung der SORL1-SNPs	29
2.2.2.1	SORL1-SNP-Assays	29

---

2.2.2.2	TaqMan-Real-Time-Polymerasekettenreaktion	30
2.2.3	Genotypisierung des Apolipoprotein E	32
2.2.4	$\beta$ -Amyloid <sub>(1-42)</sub> - und tau-Protein-Liquorkonzentration	33
2.2.5	sAPP $\alpha$ - und sAPP $\beta$ -Liquorkonzentration	33
2.2.6	SORL1-Liquorkonzentration	34
2.2.7	BACE1-Aktivität	35
<b>2.3</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Struktur der Studienkollektive</b>	<b>38</b>
3.1.1	Häufigkeit der Allele, Geno- und Haplotypen	39
3.1.2	sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ und BACE1-Aktivität	40
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse für SORL1-SNPs der 5'-Region</b>	<b>40</b>
3.2.1	SORL1-Protein und die SNPs 8, 9 und 10	40
3.2.2	SORL1-Protein und der Haplotyp 8-9-10	41
3.2.3	tau-Protein und der SNP 4	42
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse für SORL1-SNPs der 3'-Region</b>	<b>44</b>
3.3.1	$\beta$ -Amyloid <sub>(1-42)</sub> und die SNPs 22 und 23	44
3.3.2	$\beta$ -Amyloid <sub>(1-42)</sub> und die Haplotypen 19-21-23 und 22-23-24	45
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>sAPP<math>\alpha</math>, sAPP<math>\beta</math> und BACE1-Aktivität</b>	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>Analyse von SORL1-SNPs der 5'-Region</b>	<b>49</b>
4.2.1	SORL1-Protein und die SNPs 8, 9, 10, sowie der Haplotyp 8-9-10	49
4.2.2	tau-Protein und der SNP 4	53
4.2.3	rs11600875	54
<b>4.3</b>	<b>Analyse von SORL1-SNPs der 3'-Region</b>	<b>55</b>
4.3.1	$\beta$ -Amyloid <sub>(1-42)</sub> und die SNPs 22 und 23 sowie die Haplotypen 19-21-23 und 22-23-24	55

---

4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	58
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	LITERATURVERZEICHNIS	62
7	DANKSAGUNG	78
8	LEBENS LAUF	79
9	ANHANG	80

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und gesellschaftliche Bedeutung der Demenzen

Seit der Veröffentlichung des Fallberichts zu Auguste D. durch Alois Alzheimer 1907 (Alzheimer, 1907) hat sich die Alzheimer Erkrankung zu einer gesellschaftlich und gesundheitspolitisch relevanten Thematik jenseits der medizinischen Fachwelt entwickelt.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht 2012 von 35,6 Mio. an Demenzen erkrankten Menschen weltweit aus und berichtet von 7,7 Mio. Neuerkrankten jährlich (WHO, 2012). Mit einem Anteil von ca. 60-70 % ist die Alzheimer Demenz der verbreitetste Vertreter der dementiellen Erkrankungen (Fratiglioni et al., 2000).

Legt man die Prognosen zum globalen Bevölkerungswachstum der Vereinten Nationen zugrunde, wird ein Anstieg auf 114 Mio. bis zum Jahr 2050 erwartet (Wimo et al., 2003). Unter Berücksichtigung aktueller Daten ist möglicherweise mit einem geringeren Anstieg der Prävalenz zu rechnen (Matthews et al., 2013).

Die beschriebene Zunahme der Demenzpatienten erklärt sich unter anderem durch die stetig wachsende Zahl der über 60-Jährigen im Zuge des demographischen Wandels. Die weltweite Wachstumsrate der älteren Bevölkerung beträgt 2,6 % pro Jahr, während sie für die Gesamtpopulation bei 1,2 % pro Jahr liegt (UN, 2009). In der Altersgruppe der 65-85-Jährigen verdoppelt sich die Prävalenz der Demenzen beinahe in Fünfjahres-Schritten (Ferri et al., 2005).

Die genannte Entwicklung der Krankheitszahlen lässt sich auf Deutschland übertragen. In der Bundesrepublik litten 2002 ca. 1 Mio. Patienten an

Demenz und es wird eine Verdopplung bis 2050 prognostiziert (Bickel, 2002). Durch den zunehmenden Verlust von kognitiven Fähigkeiten und Alltagskompetenzen sind Demenzpatienten im Verlauf ihrer Erkrankung auf pflegerische Unterstützung angewiesen. Die Demenzen gehören damit zu den wichtigsten Prädiktoren für die Einweisung in eine Pflegeeinrichtung (Aguero-Torres et al., 2001). In der Gruppe, der über 75-Jährigen vergehen durchschnittlich nur 2,9 Jahre zwischen Erstdiagnose und Übertritt in ein Pflegeheim (Luck et al., 2008). Die Kürze der genannten Zeitspanne ist eher einer späten Diagnosestellung, als einer raschen Progredienz der Erkrankungen zuzuschreiben.

Mit der zunehmenden Pflegebedürftigkeit in fortgeschrittenen Krankheitsstadien steigen die indirekten sowie die direkten Kosten z.B. durch die genannte Institutionalisierung der Demenzpatienten (Jonsson and Wimo, 2009). Diese beliefen sich Schätzungen nach 2009 auf 422 Mrd. US-Dollar weltweit, das entspricht einer Zunahme von 34 % seit 2005 (Wimo et al., 2010). Eine wachsende finanzielle Belastung zeichnet sich auch für das Gesundheitssystem in Deutschland ab. Die Krankheitskosten für Demenzen sind laut den Daten des Statistischen Bundesamtes von 7,1 Mrd. 2002 auf 9,4 Mrd. Euro 2008 gestiegen (Destatis, 2010).

Aus medizinischer Sicht ist ein vertieftes Verständnis der Ätiologie und Pathomechanismen der Demenzen die wichtigste Voraussetzung, um die skizzierte Entwicklung durch eine verbesserte Diagnostik und langfristig durch die Bereitstellung von Therapieoptionen beeinflussen zu können.

## **1.2 Demenz bei Alzheimer Krankheit**

Bei Vorliegen einer Demenz ausgelöst durch die Alzheimer Krankheit (AK) lassen sich zwei Varianten unterscheiden, die sporadische und die seltenere, familiäre Form.

Die familiären Alzheimer Erkrankungen werden autosomal-dominant vererbt und machen ca. 5% der Fälle aus (Minati et al., 2009). Sie gehen vielfach mit einem frühen Erkrankungsbeginn einher (Selkoe, 2001). Die genetische Grundlage für ihre Entstehung bilden Mutationen innerhalb des Amyloid-Precursor-Protein-Gens auf Chromosom 21 oder des Präsenilin-1-Gens auf Chromosom 14 bzw. des Präsenilin-2-Gens auf Chromosom 1 (Selkoe, 2001).

Für die sporadische Alzheimer Erkrankung wird eine multifaktorielle Ätiologie angenommen, wobei dem  $\epsilon$ 4-Allel des Apolipoprotein E-Gens auf Chromosom 19 eine wichtige Rolle als genetischem Risikofaktor zukommt (Serretti et al., 2007). Das  $\epsilon$ 4-Allel trägt nicht in gleichem Ausmaß wie Mutationen, die den familiären AK-Formen zugrunde liegen zur individuellen Krankheitsentstehung bei. Im Bezug auf die populationsbezogene Risikoerhöhung ist es jedoch relevanter. Das  $\epsilon$ 4-Allel führt zu einer dosisabhängigen Risikosteigerung, das  $\epsilon$ 2-Allel hingegen hat einen protektiven Effekt (Corder et al., 1998). Die APO E-Genotypisierung wird gegenwärtig nicht für die Routinediagnostik empfohlen, da sich aus den risikobehafteten Allel-Konstellationen keine hinreichende Voraussetzung für die Krankheitsentwicklung ableiten lässt (Hort et al., 2010).

Für die klinische Diagnosestellung der Alzheimer Demenz sind die ICD-10-, DSM-IV- und die NINCDS-ADRDA-Kriterien weit verbreitet und etabliert (Minati et al., 2009). Eine klinisch wahrscheinliche Alzheimer Erkrankung gemäß den Kriterien des National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) und der Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA) zeichnet sich vor allem durch eine progressive Verschlechterung des Gedächtnisses und Defiziten in zwei oder mehr kognitiven Domänen aus (McKhann et al., 1984).

Darüber hinaus wird ein Erkrankungsbeginn im Alter von 40 bis 90 Jahren erwartet mit ansteigender Häufigkeit nach dem 65. Lebensjahr. Störungen

des Bewusstseins sowie andere Differentialdiagnosen, die die Defizite erklären könnten, müssen ausgeschlossen werden (McKhann et al., 1984). Die ICD-10-Klassifikation der Weltgesundheitsbehörde beinhaltet ergänzend ein Zeitkriterium von 6 Monaten, um ein Demenzsyndrom klinisch sichern zu können (Dilling, 2010). Das Diagnosemanual DSM-IV der American Psychiatric Association berücksichtigt zudem das Vorliegen von signifikanten Beeinträchtigungen der sozialen und beruflichen Leistungsfähigkeit (Saß, 2003). Eine definitive Sicherung der Diagnose ist nur anhand von neuropathologischen Befunden post mortem möglich (McKhann et al., 1984). Hierfür erfolgen eine semiquantitative Auswertung der Häufigkeit von extrazellulären  $\beta$ -Amyloid-Plaques und eine topographische Einteilung gemäß der Braak und Braak Stadien (Hyman and Trojanowski, 1997). Die kortikale Atrophie mit Erweiterung besonders der lateralen Ventrikel und Volumenminderung des Hippocampus ist ein wichtiges, aber nicht ausreichend spezifisches Korrelat für die Diagnose der Alzheimer Erkrankung (Mott and Hulette, 2005).

### 1.2.1 Pathogenese der Alzheimer Krankheit

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese bildet eine wichtige Grundlage für die Erklärung pathogener Prozesse der Alzheimer Krankheit (AK). Das Modell spannt einen Bogen von der Entstehung der Amyloid-Plaques zur Bildung von Neurofibrillen bis hin zum Zelluntergang der Neuronen begleitet von fortschreitendem Neurotransmittermangel (Selkoe, 2001).

Der Hypothese entsprechend ist die Amyloid-Akkumulation ein primärer Auslöser für weitere pathogene Schritte (Hardy and Selkoe, 2002). Sie geht auf die Beobachtung zurück, dass Patienten mit Trisomie 21 durch die erhöhte Expression des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) in frühem Lebensalter AK-typische neuropathologische Veränderungen aufweisen und stützt sich auf Untersuchungen zu familiären AK-Formen (Selkoe, 2001).

Den seltenen familiären Formen der Alzheimer Krankheit liegt eine  $\beta$ -Amyloid-Überproduktion zugrunde, für die sporadische AK wird hingegen eine verminderte Clearance des  $\beta$ -Amyloids, angenommen (Mawuenyega et al., 2010).

Es wird vermutet, dass das Amyloid-Precursor-Protein (APP) eine wichtige Rolle bei der Bildung synaptischer Verbindungen und bei neuronalen Migrations- und Wachstumsvorgängen spielt (De Strooper and Annaert, 2000, Zhou et al., 2011). Das Typ-1-Transmembranprotein APP wird auch unter physiologischen Bedingungen von Proteasen, den sogenannten  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Sekretasen gespalten (De Strooper and Annaert, 2000).

Die Prozessierung durch die  $\alpha$ -Sekretase erfolgt innerhalb des  $\beta$ -Amyloid-Abschnitts, siehe Abbildung 1. Als Spaltprodukt entsteht lösliches sAPP $\alpha$ , das möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Neurogenese hat (Zhou et al., 2011). Bei der anschließenden Spaltung des membranständigen Segments durch die  $\gamma$ -Sekretase werden das ungefährliche Fragment p3 und die intrazelluläre C83-Domäne freigegeben (Minati et al., 2009).

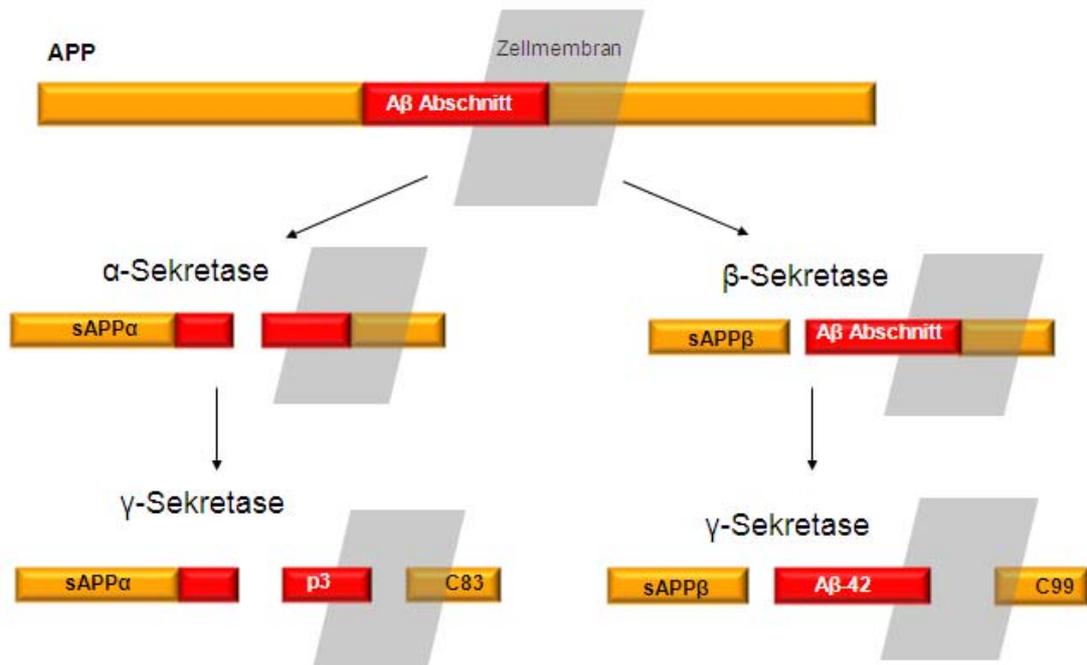


Abbildung 1: Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins;  
(modifiziert nach Figure 2, (Minati et al., 2009))

Für die amyloidogene Prozessierung wird APP internalisiert, anschließend spaltet die  $\beta$ -Sekretase in endosomalen Kompartimenten lösliches sAPP $\beta$  vom Vorläuferprotein ab (Pastorino and Lu, 2006, Selkoe, 2001). Das Beta-site-APP-cleaving-Enzym BACE1, die wichtigste neuronale  $\beta$ -Sekretase, ist in sauren Zellorganellen enzymatisch aktiv (Stockley and O'Neill, 2008, Vassar et al., 1999).

Die  $\gamma$ -Sekretase, ein Enzym-Komplex mit den Bestandteilen Präsenilin 1 und 2, trennt das leicht oligomerisierende  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> als Spaltprodukt von C99 ab (Pastorino and Lu, 2006).

Vor der Plaquebildung geht von den löslichen  $\beta$ -Amyloid-Oligomeren vermutlich eine erhöhte neurotoxische Wirkung aus, die die Entstehung der

Neurofibrillen begünstigt und bereits zu einer Synapsendysfunktion führen kann (Hardy and Selkoe, 2002, Jin et al., 2011).

Zwischen der kognitiven Beeinträchtigung der Patienten und dem Ausmaß ihrer kortikalen  $\beta$ -Amyloid-Plaquerablagerungen lässt sich keine eindeutige Korrelation zeigen (Hardy and Selkoe, 2002). Diffus verteilte  $\beta$ -Amyloid-Plaques können auch bei neurologisch unauffälligen älteren Menschen auftreten (Selkoe, 2000). Protektive Faktoren, wie eine hohe kognitive Reserve, können zudem zu interindividuellen Unterschieden in der Widerstandsfähigkeit gegenüber Alzheimer-typischen neuropathologischen Veränderungen führen (Perneckzy et al., 2010).

Eine Imbalance der  $\beta$ -Amyloid-Bilanz wie sie bei AK-Patienten auftritt, löst neben der Plaquerformation eine Entzündungsantwort des umgebenden Gewebes aus an der Mikrogliazellen und Astrozyten beteiligt sind (Selkoe, 2001). Im Verlauf entstehen Neurofibrillen aus hyperphosphoryliertem tau-Protein, abgelagert in paarig helikalen Filamenten. Die Aggregation des Mikrotubuli assoziierten tau-Proteins, beeinträchtigt die Stabilität des Zytoskeletts irreversibel; ein Phänomen das nicht nur der Alzheimer Erkrankung, sondern auch anderen Tauopathien zugrunde liegt (Hardy et al., 1998, Pastorino and Lu, 2006).

### 1.2.2 Liquorparameter

Anhand der Bestimmung von Biomarkern im Liquor lassen sich charakteristische neuropathologische Prozesse der Alzheimer Krankheit abbilden, ein klinisch aussagekräftiger Marker sollte eine Sensitivität von mindestens 85 % und eine Spezifität von mindestens 75 % aufweisen (Hampel et al., 2008).

Die Kombination aus den Liquorparametern  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> und tau-Protein erfüllt die genannten Kriterien, um AK-Patienten von gesunden Kontrollprobanden zu unterscheiden (Hulstaert et al., 1999).

Die verminderten Liquorkonzentrationen von  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> werden in Teilen der Ablagerung in unlöslichen Plaques zugeschrieben; die erhöhten tau-Konzentrationen sind auf die fortschreitende Neurodegeneration zurückzuführen (Blennow and Hampel, 2003).

Im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit sind eine gesteigerte Enzymaktivität und Konzentration der  $\beta$ -Sekretase BACE1 im Liquor nachweisbar, deren ergänzende Bestimmung hilfreich für die Identifikation früher Erkrankungsstadien sein könnte (Zetterberg et al., 2008, Hampel et al., 2010). Es gibt Hinweise auf eine signifikante Assoziation erhöhter Liquorkonzentrationen von sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  mit der Alzheimer Krankheit, sowie auf eine positive Korrelation der beiden Spaltprodukte mit der BACE1-Aktivität (Zetterberg et al., 2008, Lewczuk et al., 2010).

Es wird kontrovers diskutiert, inwieweit BACE1, sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  als Biomarker dazu beitragen können, die Früherkennung zu verbessern und die diagnostische Trennschärfe zu Demenzen anderer Ätiologie zu erhöhen (Pernecky et al., 2011, Rosen et al., 2012, Zetterberg et al., 2010).

### **1.3 Mild Cognitive Impairment**

Die Diagnose Mild Cognitive Impairment (MCI) versucht Patienten in einem Grenzbereich zwischen altersentsprechenden kognitiven Defiziten und einer beginnenden Demenz, z.B. vom Alzheimer-Typ, zu erfassen (Petersen et al., 1999). In der Altersgruppe der über 65jährigen liegt die MCI-Prävalenz in epidemiologischen Untersuchungen bei 3 – 19 % (Gauthier et al., 2006).

Legt man die MCI-Kriterien von Petersen et al. zugrunde, beträgt die Inzidenz bei Patienten  $\geq 75$  Jahren 8 von 1000 Personen pro Jahr (Busse et al., 2003). Die Ursachen für die kognitive Beeinträchtigung können vielgestaltig sein. Neben einer beginnenden dementiellen Entwicklung im Rahmen der Alzheimer Krankheit kommen unter anderem auch vaskuläre oder metabolische Erkrankungen in Betracht (Winblad et al., 2004).

Patienten, bei denen die Gedächtnisstörung im Vordergrund der Symptomatik steht, sind besonders gefährdet, im Verlauf ein Demenzsyndrom zu entwickeln (Ganguli et al., 2011). Innerhalb eines Jahres entwickeln ca. 10 – 17 % der Betroffenen Symptome, die den klinischen Diagnosekriterien einer Demenz vom Alzheimer-Typ entsprechen (Petersen et al., 1999, Guo et al., 2012). Bei der Mehrheit der MCI-Patienten bleibt die Symptomatik innerhalb eines Jahres stabil oder es tritt sogar eine Besserung ein (Ganguli et al., 2011). Neuropathologischen Befunde autopsierter MCI-Patienten hingegen ergaben vielfach Hinweise auf eine beginnende Alzheimer Erkrankung (Morris et al., 2001).

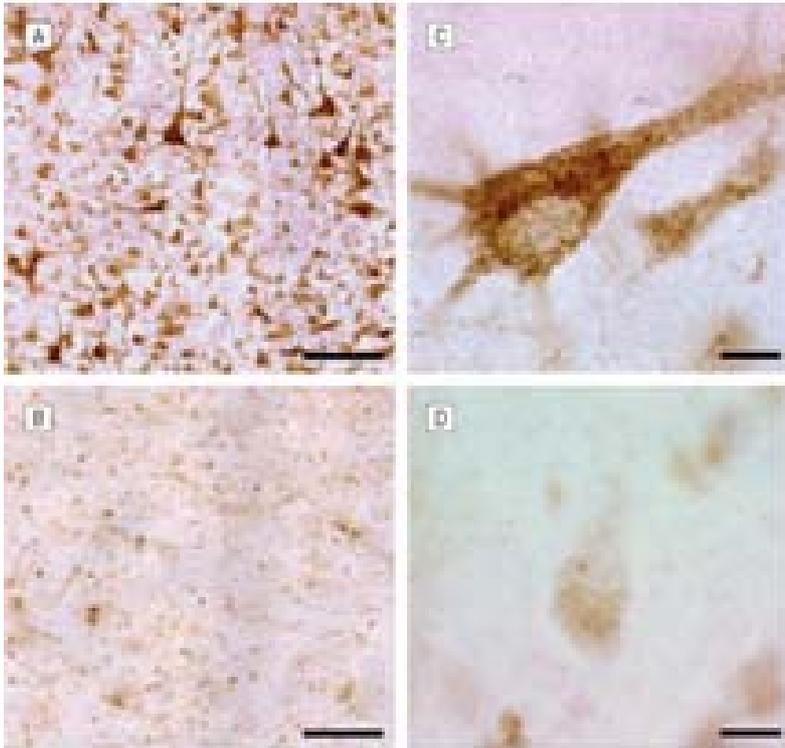
Die Genauigkeit, mit der mögliche AK-Patienten identifiziert werden, kann durch die Bestimmung des tau-Proteins und von  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> im Liquor erhöht werden (Mattsson et al., 2009). Die aktuelle Studienlage deutet daraufhin, dass Patientenkollektive mit Mild Cognitive Impairment ein wichtiger Baustein für das Verständnis der präsymptomatischen Pathogenese der Alzheimer Erkrankung sein können.

## **1.4 Einflüsse des Sortilin-related-Receptor SORL1 auf die Pathogenese der Alzheimer Krankheit**

Im Folgenden wird die Abkürzung SORL1 für Sortilin-related-Receptor verwendet. Ebenfalls gebräuchlich sind die synonymen Bezeichnungen SORLA für „Sorting-Protein-related-Receptor with A-type Repeats“ und LR11 für „Lipoprotein-Receptor 11“.

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Pathogenese der Alzheimer Krankheit und einer verminderten Expression des SORL1-Rezeptors zeigten sich in der post mortem Immunhistochemie von Pyramidenzellen des Frontallappens (Scherzer et al., 2004), siehe Abbildung 2. In den Pyramidenzellen des frontalen Kortex und des Hippocampus ist

SORL1 bei AK-Patienten signifikant reduziert; in unspezifischen Regionen wie z.B. dem Cerebellum unterscheidet sich das Expressionsmuster nicht von dem der Kontrollen (Offe et al., 2006).



**Abbildung 2: Immunhistochemische Färbung von SORL1 im frontalen Kortex gesunder Kontrollen (A), (B) bei AD-Patienten; Pyramidenzelle eines Kontrollprobanden (C), stark verminderte zytoplasmatische SORL1-Färbung in Pyramidenzelle eines AD-Patienten (D); (Ausschnitt aus Figure 2, (Scherzer et al., 2004), mit freundlicher Genehmigung der Autoren)**

Ergänzend dazu ist der okzipitale Pol mit der primären Sehrinde in fortgeschrittenen Krankheitsstadien von einer SORL1-Reduktion betroffen (Zhao et al., 2007).

Patienten, die an der selteneren familiären Alzheimer Krankheit leiden, weisen eine ähnliche zerebrale SORL1-Intensität wie gesundes Gewebe auf (Dodson et al., 2006). Dies unterstreicht die kennzeichnende Rolle des Rezeptorverlusts für die Entwicklung der sporadischen Alzheimer Krankheit

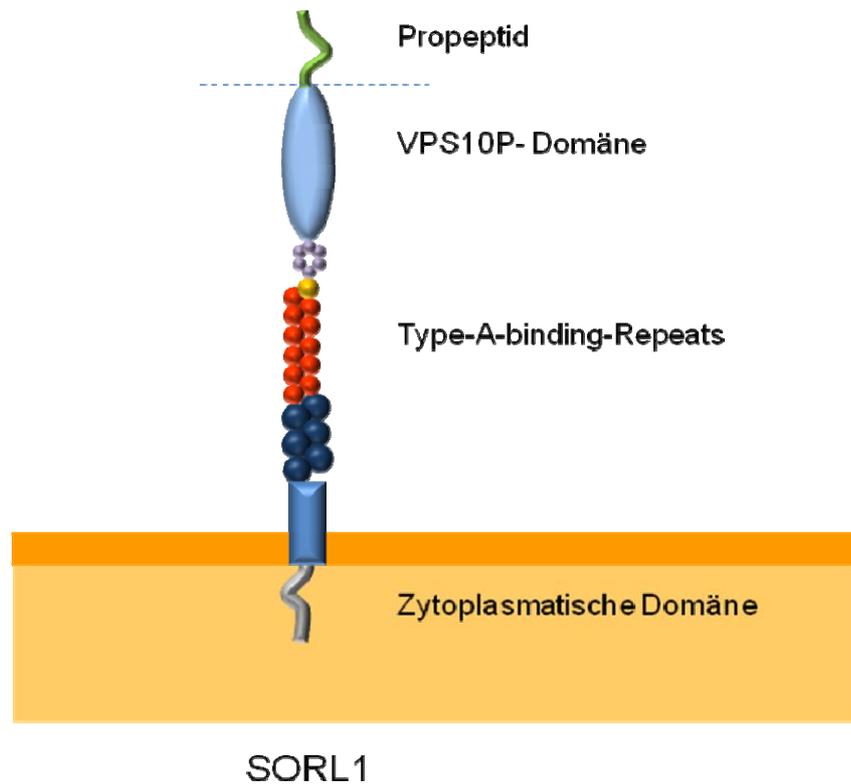
und deutet darauf hin, dass es sich nicht um einen konsekutiven Schritt der Amyloid-Akkumulation handelt (Dodson et al., 2006).

Im AK-Mausmodell führt die SORL1-Defizienz sogar zu einer Beschleunigung der Amyloid-Ablagerung in frühen Erkrankungsstadien (Dodson et al., 2008).

Bisher liegen wenige Daten zur SORL1-Rezeptor-Expression bei Patienten mit Mild Cognitive Impairment vor. MCI-Patienten in der Religious Orders Study der Rush University, die eine reduzierte SORL1-Expression im frontalen Kortex aufwiesen, waren zu Lebzeiten stärker kognitiv eingeschränkt als MCI-Teilnehmer mit unverändertem Expressionsmuster (Sager et al., 2007).

#### 1.4.1 Die SORL1-Rezeptorstruktur

SORL1 ist ein 250kDa schweres Typ-1-Transmembranprotein, das sich aus 7 verschiedenen Domänen zusammensetzt (Yamazaki et al., 1996). Das Protein gehört in der Klasse der Säugetiere, neben Sortilin, sowie SORCS-1, -2 und -3, zu den fünf Repräsentanten der VPS10P-Domain-Receptor-Gruppe (Willnow et al., 2008).



**Abbildung 3: SORL1-Rezeptorstruktur;**  
(modifiziert nach Figure 1 (Willnow et al., 2008) und Figure 1 (Hermey, 2009))

Der namensgebende Rezeptor VPS10P, Vacuolar-protein-sorting-10-Protein, ist in Hefen an intrazellulären Transportvorgängen vom Golgi-Apparat zur Vakuole, einem Lysosomen-Äquivalent, beteiligt (Marcusson et al., 1994).

Die weiteren Bestandteile des SORL1-Komplexes weisen hohe Ähnlichkeit mit der Struktur eines Low-density-Lipoprotein-/LDL-Rezeptors auf (Yamazaki et al., 1996). Die 11 sogenannten Type-A-binding-Repeats sind Cystein-reiche Regionen, die den LDL-Rezeptoren zur Liganden-Bindung dienen, siehe Abbildung 3 (Jacobsen et al., 1996, Bajari et al., 2005).

Apolipoprotein-E-haltige Lipoproteine sind wichtige SORL1-Liganden (Yamazaki et al., 1996). HDL (High-density-Lipoprotein) und VLDL (Very-low-density-Lipoprotein) binden ebenfalls an die beschriebene Type-A-binding-

Repeats-Region für eine SORL1-vermittelte Endozytose (Yamazaki et al., 1996, Taira et al., 2001).

#### 1.4.2 Lokalisation und Prozessierung von SORL1

Der SORL1-Rezeptorkomplex wird unter anderem von Neuronen und Gliazellen des Zentralnervensystems exprimiert (Yamazaki et al., 1996, Scherzer et al., 2004). Reichlich SORL1-Protein ist im Hippocampus in den CA1-CA3 Pyramidenzell-Regionen des Ammonshorns, in den Granularzellen des Gyrus dentatus und in den Purkinjezellen des Cerebellums nachweisbar (Motoi et al., 1999).

Auf zellulärer Ebene ist SORL1 vor allem in paranukleären Kompartimenten, im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und nur zu 10 % an der Zellmembranoberfläche lokalisiert (Jacobsen et al., 2001).

SORL1 wird als Propeptid synthetisiert. Die Aktivierung der VPS10P-Domäne erfolgt durch enzymatische Abspaltung eines Propeptid-Rests mittels Furin im TGN (Jacobsen et al., 2001). Es wird vermutet, dass Receptor-associated-Proteins (RAP) die Type-A-binding-Repeats vor einer vorzeitigen Liganden-Bindung schützen und zusammen mit der Propeptid-Sequenz als Chaperone einer Fehlfaltung des Proteins entgegenwirken (Willnow, 1998, Jacobsen et al., 2001).

Das membranständige SORL1-Peptid kann extrazellulär durch die Metalloprotease TACE (Tumor-necrosis-factor- $\alpha$ -converting-Enzyme) gespalten werden (Hermey et al., 2006, Hampe et al., 2000). Interessanterweise führt eine verminderte SORL1-Spaltung bei Inhibierung der Metalloproteasen zu einer reduzierten Zellproliferation, die genauen Funktionswege sind noch unklar (Hampe et al., 2000).

In einem dritten Prozessierungsschritt wird das verbleibende intrazelluläre SORL1-Transmembransegment durch die  $\gamma$ -Sekretase enzymatisch geteilt (Bohm et al., 2006, Nyborg et al., 2006). Die entstandenen Spaltprodukte

beeinflussen möglicherweise über Feedback-Mechanismen die nukleäre SORL1-Transkription (Bohm et al., 2006).

#### 1.4.3 SORL1 und der Transport des Amyloid-Precursor-Proteins

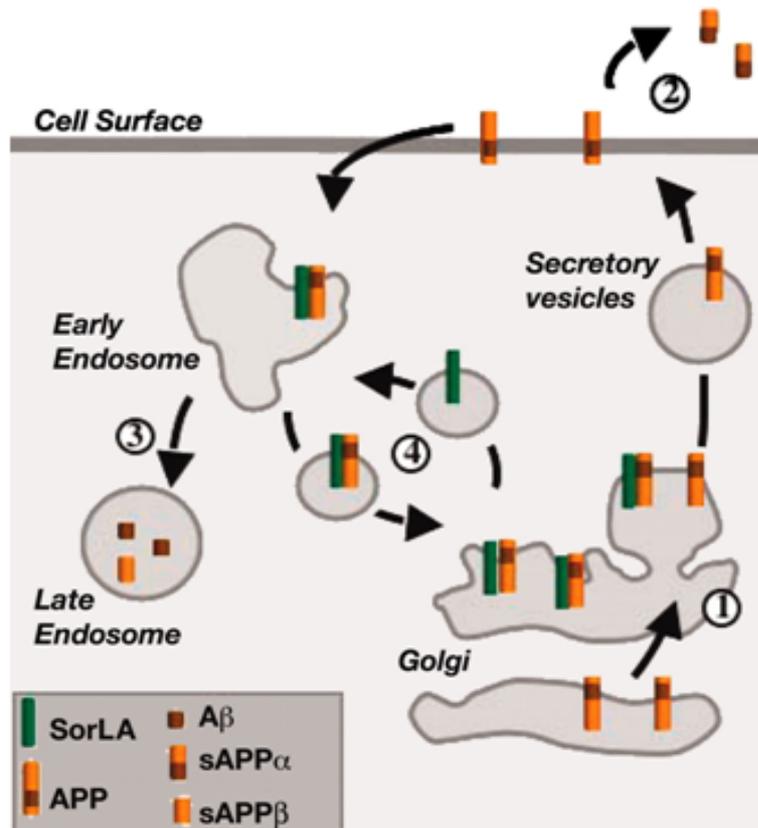
SORL1 ist ähnlich, wie der strukturell verwandte Rezeptor in Hefen, am intrazellulären Protein-Transport beteiligt. Die Cytoplasma-Domäne, siehe Abbildung 3, des SORL1-Peptids bindet an Adaptermoleküle, so genannte GGAs des Golgi-Apparats und vermittelt Transporte zwischen Endosomen, Lysosomen und TGN (Jacobsen et al., 2002).

Die Beobachtung, dass SORL1 und das Amyloid-Precursor-Protein häufig gemeinsam in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert sind, legte den Verdacht einer Interaktion nahe (Andersen et al., 2005, Offe et al., 2006).

SORL1 bindet APP in 1:1-Komplexen (Andersen et al., 2006). Diese zirkulieren zwischen dem TGN und den frühen Endosomen, wodurch weniger APP den amyloidogenen Abbauprozessen in den späten Endosomen zugeführt wird, siehe Abbildung 4 (Andersen et al., 2006, Andersen et al., 2005).

In Zellreihen mit erhöhter SORL1-Expimierung lassen sich verminderte Konzentrationen der Sekretasenprodukte sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$  und  $\beta$ -Amyloid nachweisen (Andersen et al., 2005).

### Proposed role for sorLA in APP processing.



Andersen O M et al. PNAS 2005;102:13461-13466

Abbildung 4: SORL1-vermittelter Transport von APP zwischen dem TGN (1) und den frühen Endosomen (4); bei SORL1-Verlust wird mehr APP dem nicht-amyloidogenen (2), und dem amyloidogenen Prozessierungsweg (3) zugeführt; (Fig. 6 (Andersen et al., 2005), mit freundlicher Genehmigung der Autoren)

Der Einfluss auf die Prozessierung von APP lässt sich als negative Korrelation zwischen SORL1-Expression und extrazellulärer  $\beta$ -Amyloid-Konzentration ausdrücken (Offe et al., 2006).

Die Hauptfunktion liegt höchstwahrscheinlich in der Protektion von APP auf intrazellulären Transportwegen. Eine erhöhte Wiederaufnahme von membranständigem APP durch den SORL1-Rezeptor ließ sich nicht bestätigen (Spoelgen et al., 2006).

#### 1.4.4 Sekretasen als Interaktionspartner von SORL1

Es wird vermutet, dass SORL1 direkt mit der  $\beta$ -Sekretase BACE1 interagiert, da es Anhaltspunkte für eine Komplexbildung von SORL1 mit BACE1 gibt (Spoelgen et al., 2006). Diese könnte zu einer verminderten amyloidogenen Prozessierung beitragen und würde BACE1 und APP zu konkurrierenden SORL1-Liganden machen (Spoelgen et al., 2006).

SORL1 und BACE1 nutzen beide das intrazelluläre Adaptermolekül GGA1 auf ihren Transportwegen; möglicherweise gelangt BACE1 bei niedriger SORL1-Expression leichter in angesäuerte Kompartimente, die die APP-Spaltung begünstigen (Herskowitz et al., 2012).

Darüber hinaus kann das SORL1-Peptid in einem dritten Prozessierungsschritt, wie weiter oben beschrieben, selbst durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten werden. Es wird diskutiert, welche Bedeutung SORL1 als fraglich kompetitives Substrat zu sAPP $\beta$  zukommt (Bohm et al., 2006).

Die Metalloprotease TACE gehört zur ADAM-Protein-Familie und ist an Spaltungsvorgängen von SORL1 beteiligt. Sie erfüllt die funktionellen Voraussetzungen einer  $\alpha$ -Sekretase und kann APP spalten (Allinson et al., 2003). Eine Beeinflussung der  $\alpha$ -Sekretase durch SORL1 oder ihrer Oligomerisierung von APP konnte bisher nicht festgestellt werden (Lao et al., 2012).

### 1.5 Das SORL1-Gen und seine Varianten

Auf dem längeren Arm von Chromosom 11 kodiert die Region 11q23.2-24.2 für den SORL1-Komplex (Jacobsen et al., 1996).



Abbildung 5: Lokalisation des SORL1-Gen auf Chromosom 11; (modifiziert nach Figure 3C (Jacobsen et al., 1996))

Rogaeva et al. stellten in einer Assoziationsstudie erstmals einen signifikanten Zusammenhang zwischen Einzelnukleotidpolymorphismen, so genannten SNPs, innerhalb des SORL1-Gens und der Alzheimer Krankheit her (Rogaeva et al., 2007). SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) sind einzelne, veränderte Basenpaare in der DNA-Sequenz und bilden die größte Gruppe genetischer Varianten (Wang et al., 1998).

Die Nummerierung 1 - 29 der SORL1-SNPs geht auf die initiale Publikation von Rogaeva et al. zurück und ist international gebräuchlich. Die genannte Studie untersuchte die Ausprägung und Assoziation einzelner Allele und von Haplotypen bestehend aus 3-SNP-Kombinationen.

Am 5'- und am 3'-Ende des Gens liegt jeweils ein Cluster von SNPs, das replizierbar mit der Alzheimer Erkrankung assoziiert ist (Rogaeva et al., 2007, Lee et al., 2007, Lee et al., 2008a). Kopplungsanalysen zufolge sind die SNP-Regionen am 5'-und am 3'-Ende unabhängig voneinander, innerhalb der Cluster hingegen besteht ein Linkage Disequilibrium (Bettens et al., 2008, Kimura et al., 2009, Reynolds et al., 2010).

Der Vergleich von Patientenkollektiven unterschiedlicher Ethnien lässt vermuten, dass das SORL1-Gen eine hohe, allelische Heterogenität aufweist (Rogaeva et al., 2007, Pritchard and Cox, 2002, Tan et al., 2009, Bettens et al., 2008). Die Auswahl von Probanden mit möglichst ähnlicher, genetischer Herkunft kann die Vergleichbarkeit erhöhen (Lee et al., 2007).

Die Bedeutung der SNPs für die Expression von SORL1 ist weitgehend ungeklärt. Die Mehrzahl der untersuchten SNPs liegt in Intron-Abschnitten und reguliert möglicherweise die Zell-spezifische Transkription (Rogaeva et al., 2007, Bettens et al., 2008). Eine veränderte posttranskriptionale Modifikation der mRNA durch Intron-Varianten wäre denkbar. Es gibt erste Anhaltspunkte, dass veränderte SNPs der 5'-Region mit SORL1-Splicing-Varianten in Verbindung stehen (Rogaeva et al., 2007, Gear et al., 2009, McCarthy et al., 2012). Die direkte Vermittlung regulativer Effekte auf die

SORL1-mRNA durch SNPs in Exon-Bereichen wie z.B. SNP 19 (Exon 25), 22 (Exon 27) und 23 (Exon 34), ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung (Pant et al., 2006, Bettens et al., 2008, Caglayan et al., 2012).

Auf der Grundlage der im Jahr 2010 verfügbaren Publikationen wurden, wie im Folgenden beschrieben, 11 SORL1-SNPs für die Genotypisierung ausgewählt. Berücksichtigt wurden SNPs, die in Fall-Kontroll-Studien replizierbar mit der Alzheimer Krankheit assoziiert waren. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Münchner Patientenkollektive sind Case-only-Gruppen aus Patienten mit diagnostiziertem Mild Cognitive Impairment oder einer klinisch wahrscheinlichen Demenz vom Alzheimer-Typ, die eine möglichst robuste Assoziation der SNPs voraussetzen.

### 1.5.1 SORL1-SNPs der 5'-Region

Als vielfach replizierte SORL1-Marker der 5'-Region wurden die SNPs 4, 8, 9 und 10 genotypisiert. Neben der Analyse einzelner SNPs erfolgte die Rekonstruktion des Haplotypen 8-9-10.

Rogaeva et al. belegten mit mehreren unabhängigen Datensätzen eine signifikante Assoziation zwischen Varianten der SNPs 8, 9, 10 sowie des Haplotypen 8-9-10 mit der Alzheimer Krankheit (Rogaeva et al., 2007). Daten, die autoptisch diagnostizierte AK-Patienten berücksichtigen, bestätigen die Ergebnisse für die SNPs 8, 9 und den genannten Haplotypen (Lee et al., 2008a). In einem japanischen Kollektiv ließen sich die Befunde für SNP 8 ebenfalls replizieren (Lee et al., 2008b, Shibata et al., 2008).

Im Hinblick auf eine möglichst hohe genetische Übereinstimmung mit den zu untersuchenden Münchner Patienten sind Studienergebnisse aus rein europäischen Stichproben besonders aufschlussreich. In einer belgischen Untersuchung mit 550 Alzheimer Patienten mit spätem Erkrankungsbeginn und 637 gesunden Kontrollen gehörten die SNPs 8, 9 und 10 zu den

signifikanten Markern der 5'-Region (Bettens et al., 2008). Ergänzend hierzu belegte eine italienische Fall-Kontroll-Studie die Assoziation mit dem Haplotypen 8-9-10 und wies bei Patientinnen ohne APO- $\epsilon$ 4-Trägerstatus eine erhöhte Assoziation mit SNP 10 nach (Cellini et al., 2009).

Für SNP 4 zeigte sich eine signifikante Zunahme des Alzheimer Erkrankungsrisikos insbesondere bei Patienten kaukasischer Herkunft (Rogaeva et al., 2007). In einer amerikanischen Fall-Kontroll-Kohorte war von sechs analysierten SNPs des SORL1-5'-Endes nur SNP 4 in Verbindung mit einem positiven APO- $\epsilon$ 4-Trägerstatus signifikant mit der Alzheimer Krankheit assoziiert (Minster et al., 2008).

Bei Cellini et al. hingegen ließ sich eine signifikante Assoziation mit SNP 4 nur für weibliche Patienten ohne APO- $\epsilon$ 4-Nachweis replizieren (Cellini et al., 2009).

Ergänzend hierzu wurde SNP rs11600875 berücksichtigt. Hinweise für eine mögliche Assoziation mit AK-relevanten Biomarkern hatten sich in einer vorab durchgeführten Testanalyse innerhalb unserer Patientendatenbank ergeben.

### 1.5.2 SORL1-SNPs der 3'-Region

Für die Genotypisierung wurden die SNPs 19, 21, 22, 23, 24 und 25 als wichtige Marker des 3'-Endes von SORL1 berücksichtigt. Diese SNP-Kombination ermöglichte zudem die Auswertung der relevanten Haplotypen 19-21-23, 22-23-24 und 23-24-25.

Rogaeva et al. belegten in mehreren Patientenkollektiven eine signifikante Assoziation der SNPs 19 und 23-25, sowie der Haplotypen 22-23-24 und 23-24-25 mit dem Alzheimer-Erkrankungsrisiko (Rogaeva et al., 2007). Das Translational Genomics Research Institute (TGen) der Mayo-Klinik (Rochester, Minnesota, USA) verfügt über eine Datenbank, die über 600

autopsierte AK-Patienten enthält und wies ebenfalls eine signifikante Assoziation mit der Region zwischen SNP 21-25 nach (Meng et al., 2007). Die Resultate für den Haplotypen 23-24-25 konnten in Fall-Kontroll-Studien mit Probanden nord-europäischer und amerikanischer Herkunft bestätigt werden (Lee et al., 2007, Lee et al., 2008a). Signifikante Ergebnisse für die SNPs 19, 23, 24 und 25 sind in verschiedenen, unabhängigen Datensätzen repliziert worden (Kimura et al., 2009, Li et al., 2008, Tan et al., 2009). Kölsch et al. zeigten erstmals einen Zusammenhang zwischen SORL1-Varianten des 3'Endes und einem Liquorparameter auf (Kolsch et al., 2008). In einem Studienkollektiv aus 153 deutschen AK-Patienten konnte der Nachweis erbracht werden, dass SNP 21 und der Haplotyp 19-21-23 signifikant mit veränderten  $\beta$ -Amyloid<sub>42</sub>-Liquorkonzentrationen assoziiert sind (Kolsch et al., 2008).

## **1.6 Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit ist es, in zwei Case-only-Kollektiven aus 44 AK- und 61 MCI-Patienten die Assoziation zwischen 11 SORL1-Risiko-SNPs und relevanten AK-Biomarkern zu untersuchen.

Mit Hilfe der Liquorkonzentration des tau-Proteins, von  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>, sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , des SORL1-Proteins und der Enzymaktivität von BACE1 soll die funktionelle Bedeutung der SORL1-SNP-Varianten für die Pathogenese der sporadischen Alzheimer Krankheit näher beleuchtet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienteilnehmer

Das Studienkollektiv entstammt der Patientendatenbank des Zentrums für Kognitive Störungen der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar.

In mehreren Auswahlritten wurden aus der oben genannten Datenbank Studienteilnehmer kaukasischer Herkunft mit asservierten Liquoraliquots, verfügbaren DNA-Proben aus Vollblut sowie mit aktenanamnestisch vollständigen Patientendaten eingeschlossen. Die Auswahlkriterien ergaben ein Patientenkollektiv von 44 Patienten mit klinisch wahrscheinlicher Alzheimer Krankheit (AK) und 61 Patienten mit Mild Cognitive Impairment (MCI).

Die Patienten wurden über die wissenschaftliche Nutzung der erhobenen Daten und die Freiwilligkeit ihrer Teilnahme aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung, gemäß der Deklaration von Helsinki 1975, liegt von allen Studienteilnehmern vor.

Die Diagnose einer klinisch wahrscheinlichen Demenz vom Alzheimer-Typ wurde gemäß den NINCDS-ADRDA-Kriterien des National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke und der Alzheimer's Disease and Related Disorders Association gestellt (McKhann et al., 1984).

Diese weisen für die Alzheimer Krankheit eine Sensitivität von 95 % bei einer Spezifität von 79 % auf (Lopez et al., 1999). Die Kriterien basieren auf eigen- und fremdanamnestischen Daten, neuropsychologischen Testergebnissen, klinischen Verlaufsuntersuchungen sowie auf einer durch laborchemische und bildgebende Verfahren gestützten Ausschlussdiagnostik. Die Diagnosestellung bei Patienten mit einer leichten

kognitiven Störung, einem Mild Cognitive Impairment (MCI), beruhte auf den revidierten Konsensus-Kriterien nach Stockholm, 2003 (Winblad et al., 2004).

### 2.1.1 Probengewinnung

Die venöse Blutentnahme von zweimal 9ml mit EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zur Isolierung der Patienten-DNA sowie die Lumbalpunktion zwischen LWK 3/4, oder LWK 4/5 erfolgten im Rahmen der Routinediagnostik.

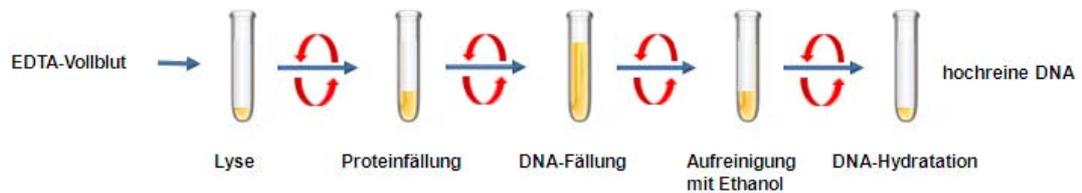
Von 16 der 44 Patienten mit Alzheimer Erkrankung und von 34 der 61 Patienten mit MCI lagen keine DNA-Proben aus Vollblut vor. Diese Patienten wurden schriftlich um eine erneute Blutentnahme gebeten.

Die Liquorproben (5-8ml) wurden 10min bei 3148g zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der gewonnene Überstand wurde aliquotiert und in Polypropylenröhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

## 2.2 Labormethoden

### 2.2.1.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung der Patienten-DNA aus EDTA-Vollblut wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll für das Gentra Puregene Blood Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Reaktionsschritte sind in Abbildung 6 grafisch dargestellt.



**Abbildung 6: Reaktionsschritte der DNA-Isolierung;**  
(modifiziert nach Gentra Puregene Handbook 04/2010, S.11, Qiagen, Hilden, Deutschland)

Im ersten Schritt wurde der Überstand aus lysierten Erythrozyten nach Zentrifugation verworfen. Die aus den übrigen Blutzellen nach Lyse freigewordene DNA wurde durch einen beigefügten Stabilisator vor DNasen geschützt. Eine 41,6%-ige Ammoniumacetatlösung diente der Fällung von verunreinigenden Proteinen und wurde als Substitut für die vom Hersteller genannte Protein Precipitation Solution (Qiagen, Hilden, Deutschland) eingesetzt. Die im Protokoll genannte Mengenangabe sowie der Versuchsablauf blieben unverändert. Das durch alkoholische Fällung gewonnene DNA-Präzipitat wurde mit 70%igem Ethanol aufgereinigt und bis zur Weiterverwendung in 300µl DNA-Hydratation Solution (Qiagen, Hilden, Deutschland) gelöst bei 4° C gelagert.

Tabelle 1: Chemikalien zur DNA-Isolierung

Chemikalien	Hersteller
RBC-Lysis-Puffer	Apotheke des Klinikums rechts der Isar der TU München
Cell Lysis Solution	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ammoniumacetatlösung 41,6%	Apotheke des Klinikums rechts der Isar der TU München
Isopropanol 100%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70%	Ethanol absolut (Merck, Darmstadt, Deutschland) Aqua B. Braun (B.Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland)
DNA Hydration Solution	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 2.2.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (NanoDrop Technologies by Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Die Messungen wurden mit je 1µl der unverdünnten DNA-Proben sowie nach 1:50 Verdünnung durchgeführt. Für die Berechnung der DNA-Konzentration (ng/µl) nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wird die Extinktion bei 260nm ermittelt.

<b>E= εdc</b>	<b>E= Extinktion</b>
	<b>ε=Extinktionskoeffizient</b>
	<b>ε dsDNA = 50ng-cm/µl</b>
	<b>d= Schichtdicke (1cm)</b>
	<b>c= Konzentration (ng/µl)</b>

Das Verhältnis der Extinktionswerte von 260nm zu 280nm gibt die Reinheit der Proben an. Für die doppelsträngige DNA wurden Werte zwischen 1,7 und 2,0 angenommen.

## 2.2.2 Genotypisierung der SORL1-SNPs

### 2.2.2.1 SORL1-SNP-Assays

Die 11 interessierenden SNPs innerhalb des SORL1-Gens wurden mit TaqMan-SNP-Genotyping-Assays der Firma Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) genotypisiert.

**Tabelle 2: Überblick über genotypisierte SORL1-SNPs**

<b>SNP-Nr.</b>	<b>dbSNP ID-Nr.</b>	<b>Assay ID-Nr.</b>
SNP 4	rs661057	C_638485_10
SNP 8	rs668387	C_638456_10
SNP 9	rs689021	C_1379954_10
SNP 10	rs641120	C_1379945_10
SNP 19	rs2070045	C_25634796_10
SNP 21	SORL1-18ex26	Custom Assay
SNP 22	rs1699102	C_8799430_10
SNP 23	rs3824968	C_25473831_10
SNP 24	rs2282649	C_15957099_10
SNP 25	rs1010159	C_1379899_1_
	rs11600875	Custom Assay

Für die SNPs rs7359277 und rs11600875 war das Design eines Custom-TaqMan-Assays durch den Hersteller erforderlich, da kommerzielle Assays nicht zur Verfügung standen. Mit dem online zugänglichen Basic Local Alignment Search Tool BLAST (Altschul et al., 1990) des National Center for

Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (NLM, Bethesda, USA) wurden die Nukleotidsequenzen angrenzend an die SNPs rs7359277 und rs11600875 auf Überschneidungen mit Sequenzen anderer gespeicherter Gene der BLAST-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) überprüft. Zudem wurde die Region um die beiden SNPs jeweils mit dem RepeatMasker-Programm (<http://www.repeatmasker.org/>) des Institute for Systems Biology (Seattle, USA) auf repetitive DNA-Sequenzen abgeglichen. Die für die SNPs rs7359277 und rs11600875 als spezifisch hervorgegangenen DNA-Sequenzen wurden dem Hersteller für die Erstellung der Custom Assays übermittelt.

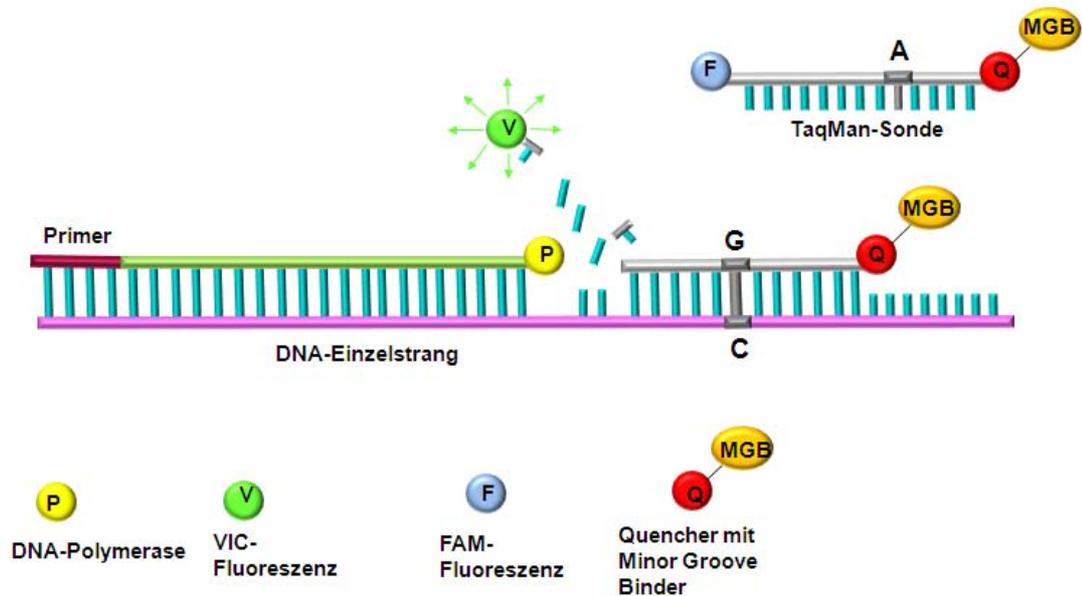
In Tabelle 2 sind die untersuchten SNPs, so vorhanden, mit der Nummerierung in arabischen Zahlen nach Rogaeva et al. (Rogaeva et al., 2007), mit der jeweiligen Identifikationsnummer aus der öffentlichen Online-Datenbank Single Nucleotide Polymorphism Database / dbSNP (Sherry et al., 2001) und mit der Assay-Identifikationsnummer des Herstellers aufgelistet.

#### **2.2.2.2 TaqMan-Real-Time-Polymerasekettenreaktion**

Die Genotypisierung der SORL1-SNPs mit den oben genannten TaqMan-SNP-Genotyping-Assays erfolgte mit Hilfe einer Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR). Die den SNP umgebende DNA-Sequenz wurde durch Real-Time-PCR amplifiziert bei gleichzeitiger Fluoreszenzmessung eines Allel-spezifischen Farbstoffs.

Die Assays enthalten Primer sowie zu den SNP-Sequenzen komplementäre Oligonukleotid-Sonden, so genannte TaqMan-Sonden. Diese weisen am 5'-Ende zur Markierung der beiden Allele die Fluoreszenzfarbstoffe VIC oder FAM auf. Ein Quencher am 3'-Ende unterdrückt vorläufig die Fluoreszenzsignale. Während der DNA-Synthese spaltet die Polymerase des TaqMan-Genotyping-Master-Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)

den Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende der Sonde ab, siehe Abbildung 7. Das Fluoreszenzsignal wird durch die entstandene Entfernung vom Quencher messbar.



**Abbildung 7: Freiwerden des VIC-Fluoreszenzfarbstoffs der passenden TaqMan-Sonde nach Abspaltung durch DNA-Polymerase;**  
(modifiziert nach TaqMan Genotyping Master Mix Protocol 02/2007, Part Number 437 1131 Rev. A, S.7, Figure 1, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)

Die Konzentration der verwendeten DNA-Proben betrug nach Verdünnung mit dH<sub>2</sub>O 2,2ng/μl; es wurden je 9μl/Well in 96-Well-Platten vorgehalten. Die DNA-Proben wurden mit einem Reaktionsansatz bestehend aus 10μl des TaqMan-Master-Mix(10X) und 1μl des TaqMan-SNP-Genotyping-Assay-Mix(20X) versetzt, siehe Tabelle 3.

Tabelle 3: Reaktionskomponenten für TaqMan-Real-Time-PCR

Reaktionskomponenten	Volumen in µl/ Well
DNA 2,2ng/µl	9
TaqMan-Master-Mix 10X	10
TaqMan-SNP-Genotyping-Assay-Mix 20X	1
Total	20

Die Real-Time-PCR der präparierten 96-Well-Platten wurde gemäß des Herstellerprotokolls in einem StepOnePlus-Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), wie in Tabelle 4 beschrieben, durchgeführt und mit der zugehörigen StepOne-Software v2.1. (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) ausgewertet.

Tabelle 4: Real-Time-PCR-Protokoll

	Polymerase- Aktivierung	Denaturierung	Annealing/ Extension
Temperatur	95°C	92°	60°
Zyklen	1	40	40
Zeit	10min	15sec	1min

### 2.2.3 Genotypisierung des Apolipoprotein E

Die Isolierung der DNA aus Vollblut wurde wie in 2.2.1.1 erläutert vorgenommen. Der Bestimmung des Genotypen von Apolipoprotein E (APOE) lag ein etabliertes Standardprotokoll (Wenham et al., 1991) zugrunde.

Mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde ein 218 Basenpaare langes DNA-Segment amplifiziert. Das PCR-Produkt umfasst die beiden polymorphen Restriktionsstellen des APOE-Gens. Die durch

Restriktionsendonuklease-Verdau mit den Enzymen Hae II und Afl III entstandenen Fragmente wurden nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid den Genotypen ( $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ) zugeordnet. Für die statistische Bearbeitung wurden die Genotypen als Nicht-APOE- $\epsilon 4$ -Träger oder APOE- $\epsilon 4$ -Träger bei Vorhandensein mindestens eines  $\epsilon 4$ -Allels kodiert.

#### 2.2.4 $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>- und tau-Protein-Liquorkonzentration

Die Liquorkonzentrationen des  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Peptids und des tau-Proteins wurden mit kommerziellen Sandwich-Enzyme-linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) bestimmt. Die verwendeten ELISA-Kits „Innotest  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>“ und „Innotest h tau“ des Herstellers Innogenetics (Gent, Belgien) sind für die Routinediagnostik etabliert (Hulstaert et al., 1999). Der monoklonale Antikörper 21F12 des genannten Kits bindet an die Aminosäuren 33-42 am C-terminalen Ende des  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Peptids (Johnson-Wood et al., 1997). Am N-Terminus dient der biotinylierte Antikörper 3D6 als Detektor. Äquivalent dazu wird das tau-Protein durch den monoklonalen Antikörper AT120 gebunden (Vandermeeren et al., 1993) und mittels der Bindung an die biotinylierten Antikörper HT7 und BT2 detektiert.

Nach Zugabe von Horseradish-Peroxidase(HRP)-markiertem Streptavidin sowie Substrat werden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Farbumschlag photometrisch quantifizierbar und können anhand der Standardkurve des Assays ausgewertet werden. Die Messung bei einer Wellenlänge von 450nm erfolgte mit dem FLUOstar Omega Reader (BMG Labtech, Offenburg, Deutschland).

#### 2.2.5 sAPP $\alpha$ - und sAPP $\beta$ -Liquorkonzentration

Die sAPP $\alpha$ - und sAPP $\beta$ -Liquorkonzentrationen wurden mit kommerziellen Sandwich-ELISA-Kits („sAPP-alpha high sensitive“ bzw. „sAPP-beta wild

type high sensitive”) der Firma Immuno-Biological Laboratories Co.Ltd. (Gunma, Japan) gemäß der Herstellerangaben ermittelt (Alexopoulos et al., 2012). In der Festphase des sAPP $\alpha$ -Assays liegt der IgG-Maus-Antikörper 2B3 zur Bindung des humanen sAPP $\alpha$  vor.

Die Beschichtung mit dem Antikörper sAPPbeta-Wild-Type-Rabbit-IgG-Affinity-Purify dient der Detektion von humanem Wildtyp-sAPP $\beta$ .

Der HRP-markierte Antikörper Anti-Human-APP(R101A4)-Mouse-IgG-MoAb-Fab-Affinity-Purify sowie das Chromogen TMB (Tetramethylbenzidin) werden in beiden Kits eingesetzt. Den Standardkurven der Assays liegen Verdünnungen mit rekombinantem, humanem sAPP $\alpha$  oder sAPP $\beta$  zugrunde. Die photometrische (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) Auswertung erfolgte bei 450nm.

#### 2.2.6 SORL1-Liquorkonzentration

Die Liquorkonzentrationsmessung des SORL1-Proteins fand in Zusammenarbeit mit dem „Department of Genome Research and Clinical Application“ sowie dem „Department of Clinical Cell Biology“ der Medizinischen Fakultät, der Universität Chiba (Chiba, Japan) und der Firma Sekisui Medical Co Ltd. (Ryugasaki, Japan) statt.

Von jedem Studienteilnehmer wurden zwei anonymisierte 50 $\mu$ l Liquoraliquots auf Trockeneis an das „Department of Genome Research and Clinical Application“ in Chiba verschickt. Ein von Matsuo et al. etabliertes Sandwich-ELISA-Protokoll für lösliches SORL1-Protein im Serum und Liquor diente der Konzentrationsbestimmung (Matsuo et al., 2009).

Lösliches SORL1 wird durch den monoklonalen Maus-Antikörper M3 und den biotinylierten, monoklonalen Ratten-Antikörper R14 gebunden. Nach der Reaktion mit HRP-markiertem Streptavidin erfolgt die Extinktionsmessung bei 450nm. Die Standardkurve besteht aus verdünntem, aufgereinigtem Rabbit-SORL1 in Konzentrationen 0-4,0 $\mu$ g/l.

### 2.2.7 BACE1-Aktivität

Die Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase BACE1 im Liquor wurde mit dem kommerziellen „TruPoint Beta-Secretase Assay Kit<sup>384</sup>“ der Firma Perkin Elmer Inc.(Turkur, Finnland) entsprechend der Herstellervorgaben bestimmt (Holsinger et al., 2004, Grimmer et al., 2012).

Das zehn Aminosäuren umfassende Substrat für BACE1 mit der Sequenz „CEVNLDAEFK“ enthält die schwedische Mutation, K670N/M671L, des  $\beta$ -Amyloid-Precursor-Proteins ( $\beta$ -APP) (Mullan et al., 1992).

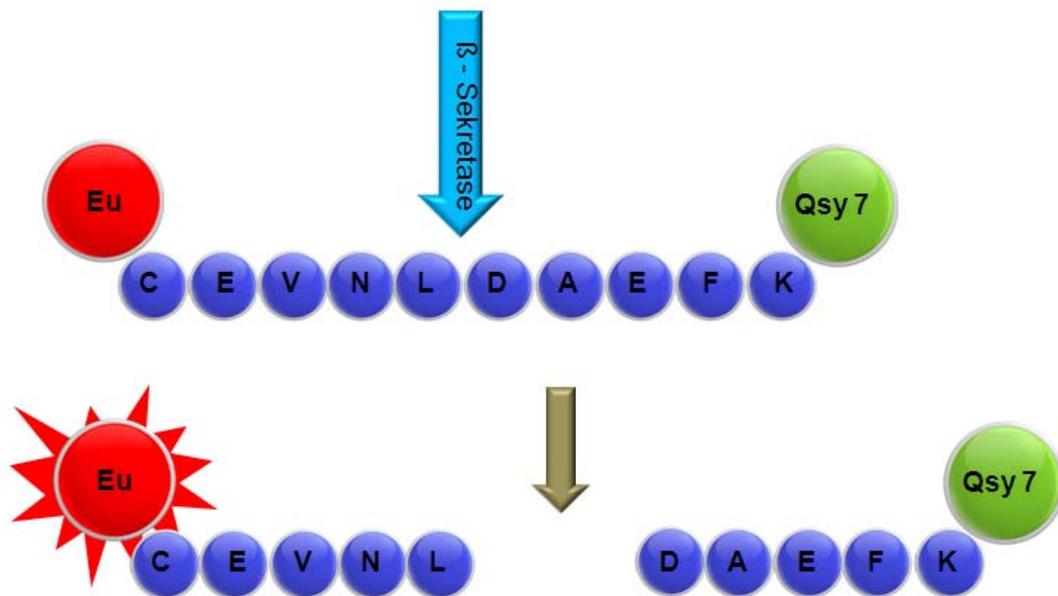


Abbildung 8: Spaltung des Substrats durch BACE1; (modifiziert nach TruPoint Beta-Secretase Assay Kit<sup>384</sup>, AD0097P-1(en), S.1, Perkin Elmer Inc., Turkur, Finnland)

Das Fluoreszenzsignal des Europium-Chelat (Eu) wird durch die räumliche Nähe zum Europium-Fluoreszenz-Quencher (QSY 7) am anderen Ende des Substrats unterdrückt, siehe Abbildung 8. Nach enzymatischer Spaltung des Substrats durch BACE1 wird das Europium-Signal in einer zeitaufgelösten

Fluoreszenzmessung erfasst. Die Anregungswellenlänge beträgt 320nm, die Emissionswellenlänge 615nm.

Für die Reaktion wurden 10µl Liquor, 2µl Dimethylsulfoxid und 15µl verdünntes Substrat (1:150) in schwarzen 96-Well-Platten (Perkin Elmer Inc., Turku, Finnland) vorgelegt. Für jede Patientenprobe wurden 4 Reaktionsansätze pipettiert. Die Messung (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) erfolgte direkt nach Zugabe des Liquors bei 37°C. Innerhalb von 30min erreicht die Messkurve ein Plateau, der gemessene Maximalwert in diesem Zeitfenster wurde als BACE1-Aktivität angenommen.

## **2.3 Statistische Auswertung**

Um Unterschiede zwischen AK- und MCI-Kollektiv feststellen zu können, wurden Patientenmerkmale, die einer Normalverteilung unterliegen, mittels t-Test verglichen. Der Vergleich der binären Merkmale, Geschlecht und APO-ε4-Trägerstatus, erfolgte mit einem Chi<sup>2</sup>-Test. Der APOE-Genotyp wurde in dieser Studie durchgängig als Alternativmerkmal „Träger“ oder „Nicht-Träger“ kodiert. Bei Vorliegen mindestens eines ε4-Alleles wurde für den Patienten der Status „Träger“ angenommen.

Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Softwarepakets Predictive Analytics Software (PASW) in der Version v18 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Für die statistischen Tests wurden Allel-, Genotyp- und Haplotyp-Varianten, die innerhalb beider Patientenkollektive in einer Häufigkeit von >5% auftraten, herangezogen.

Inwieweit Allele und Genotypen der einzelnen SNPs in einem statistisch signifikanten Zusammenhang zu den Liquorkonzentrationen der Biomarker oder zur Enzymaktivität von BACE1 stehen, wurde durch Kovarianzanalysen/ANCOVAs, ebenfalls in PASW v18, ermittelt. Kontrolliert wurde für die Kovariablen Alter, Geschlecht und APO-ε4-Trägerstatus.

Die Auswertung der erhobenen Daten zu den Haplotypen innerhalb des SORL1-Gens erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Department of Medical Microbiology der Universität von Utrecht, Niederlande.

Der Einfluss der Haplotyp-Kombinationen auf die erhobenen Biomarker wurde in multivariaten Regressionsanalysen unter der Berücksichtigung der Merkmale Alter, Geschlecht und APOE-ε4-Allele-Trägerstatus quantifiziert.

Die Ergebnisse wurden mit dem Haplo.stats Softwarepaket (Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester, USA) in der freien Programmiersprache R Version 2.1 (<http://www.r-project.org>) berechnet.

Das Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Struktur der Studienkollektive

In Tabelle 5 ist eine Übersicht der erhobenen Merkmale beider Patientenkollektive zu sehen. Im Hinblick auf die Geschlechterverteilung, die Dauer der Schulausbildung und die Erstmanifestation der Symptomatik weisen die Kollektive eine hohe Übereinstimmung auf. Die Patienten mit Alzheimer Krankheit (AK) erreichten in der neuropsychologischen Testung durchschnittlich einen MMST-Punktwert von 23 Punkten. Die Gruppe der Patienten mit Mild Cognitive Impairment (MCI) erzielten mit 27 Punkten im Mittel ein signifikant besseres Ergebnis. Die gemittelten Konzentrationen der Liquorparameter  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> und tau-Protein unterscheiden sich zwischen den Kollektiven signifikant voneinander. Das AK-Kollektiv bildet mit den genannten Biomarkern die, für die Alzheimer Erkrankung, zu erwartende Konstellation aus erhöhten tau-Protein- und erniedrigten  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> - Liquorkonzentrationen ab.

**Tabelle 5: Übersicht über Struktur des AK- und MCI- Patientenkollektivs, \*signifikant für  $p < 0,05$ , Standardabweichung für Mittelwerte in Klammern angegeben**

	<b>AK-Patienten n= 44</b>	<b>MCI-Patienten n=61</b>	<b>p-Wert</b>
Geschlechterverteilung Männer : Frauen	23 : 21	35 : 26	0,81
Schulbesuch in Jahren	13 (2,9)	13 (2,7)	0,91
Alter bei Symptombeginn in Jahren	63 (8,8)	63 (8,8)	0,62
Alter bei Lumbalpunktion in Jahren	66 (9,6)	65 (8,7)	0,44
Mini-Mental-Status-Test Punktwert	23 (3,1)	27 (1,9)	<0,001*
APOE- $\epsilon$ 4-Träger Anzahl n; %	26; 59,1%	27; 44,3%	0,55
$\beta$ -Amyloid <sub>(1-42)</sub> in ng/l	551,8 (233,52)	771,1 (350,84)	<0,001*
tau-Protein in ng/l	627,8 (384,24)	383,9 (255,87)	<0,001*
sAPP $\alpha$ in ng/ml	287,1 (159,21)	332,2 (166,75)	0,17
sAPP $\beta$ in ng/ml	897,0 (402,65)	1047,2 (493,75)	0,10
BACE1 in FU/ $\mu$ l FU: Fluoreszenz Units	8333,06 (2585,76)	9381,67 (3239,94)	0,08
SORL1 in $\mu$ g/l	11,9 (4,69)	11,9 (4,28)	0,95

### 3.1.1 Häufigkeit der Allele, Geno- und Haplotypen

Für die 11 interessierenden SORL1-SNPs sind die Häufigkeiten der Allele und Genotypen innerhalb der beiden Patientengruppen in Übersichtstabelle 1 angegeben, siehe Anhang. Die Verteilung der Haplotypen 8-9-10, 19-21-23, 22-23-24 und 23-24-25 ist in Übersichtstabelle 2 im Anhang zusammengefasst. Es wurden nur genetische Varianten, die in einer Häufigkeit > 5% auftreten, berücksichtigt.

### 3.1.2 sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ und BACE1-Aktivität

Für die SORL1-SNPs sowie die untersuchten Haplotypen ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge mit der Trägerschaft des APOE- $\epsilon$ 4-Allels, den Liquorkonzentrationen von sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  oder der BACE1-Aktivität im Liquor.

## 3.2 Ergebnisse für SORL1-SNPs der 5'-Region

### 3.2.1 SORL1-Protein und die SNPs 8, 9 und 10

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der SORL1-Protein-Liquorkonzentration und den SNPs 8,9 und 10 am 5'-Ende des SORL1-Gens stellte sich bei Patienten des MCI-Kollektivs (n=61) heraus.

Die homozygoten Träger mit den Genotypen TT in SNP 8, AA in SNP 9, sowie CC in SNP 10 weisen signifikant ( $p < 0,04$ ) erhöhte SORL1-Protein-Konzentrationen auf, siehe Tabelle 6. Es handelt sich um Patienten mit einer Homozygotie für das Minor-Allel.

Tabelle 6: Korrelation von Genotypen in SNP 8, 9 und 10 mit SORL1-Liquorkonzentrationen, \*signifikant für  $p < 0,05$

SNP-Nr	Genotyp	AK-Patienten			MCI-Patienten		
		n	SORL1 in $\mu\text{g/l}$ (SD)	p-Wert	n	SORL1 in $\mu\text{g/l}$ (SD)	p-Wert
SNP 8	TT	7 15,9%	12,53 (4,82)	0,42	6 9,8%	15,08 (4,27)	0,04*
	CT	22 50,0%	10,95 (3,45)	0,24	26 42,6%	12,14 (4,62)	0,72
	CC	15 34,1%	13,14 (7,34)	0,52	29 47,5%	10,97 (3,67)	0,12
SNP 9	AA	7 15,9%	13,14 (7,34)	0,42	6 9,8%	15,08 (4,27)	0,04*
	AG	22 50%	10,95 (3,45)	0,23	26 42,6%	12,14 (4,62)	0,72
	GG	15 34,1%	12,53 (4,82)	0,52	29 47,5%	10,97 (3,67)	0,12
SNP 10	CC	8 18,2%	13,66 (6,45)	0,22	6 9,8%	15,8 (4,27)	0,04*
	CT	21 47,7%	10,64 (3,21)	0,12	26 42,6%	12,4 (4,62)	0,72
	TT	15 34,1%	12,53 (4,82)	0,52	29 47,5%	10,97 (3,67)	0,12

### 3.2.2 SORL1-Protein und der Haplotyp 8-9-10

Innerhalb des Kollektivs mit Mild Cognitive Impairment ergab die Analyse der Haplotypen eine signifikante Korrelation von CGT bestehend aus den SNPs 8-9-10 mit erniedrigten SORL1-Proteinkonzentrationen im Liquor, siehe Abbildung 9.

Dieser Haplotyp liegt bei 22,5 % der untersuchten MCI-Patienten vor.

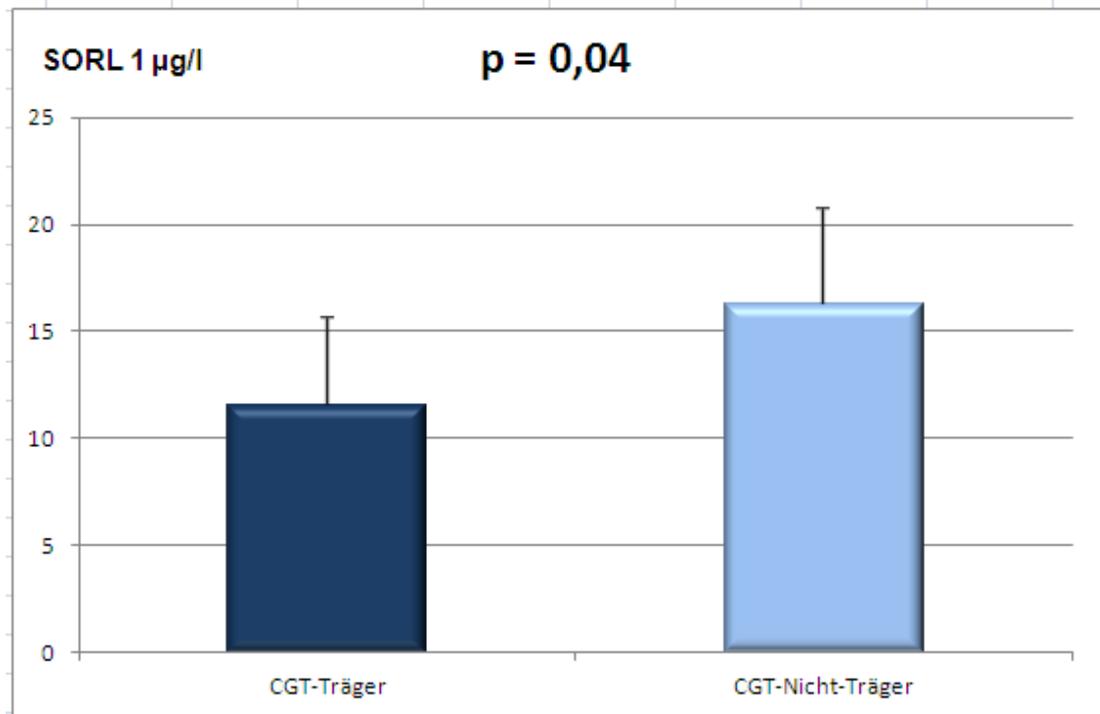


Abbildung 9: Verminderte SORL1-Liquorkonzentration bei CGT-Trägern des 8-9-10 SORL1-Haplotypen im MCI-Kollektiv

### 3.2.3 tau-Protein und der SNP 4

Die Genotypisierung von SNP 4 ergab bei 15,9 % der Studienpatienten mit diagnostizierter Alzheimer Krankheit (n=44) eine Homozygotie für das C-Allel, in Abbildung 10 rot dargestellt.

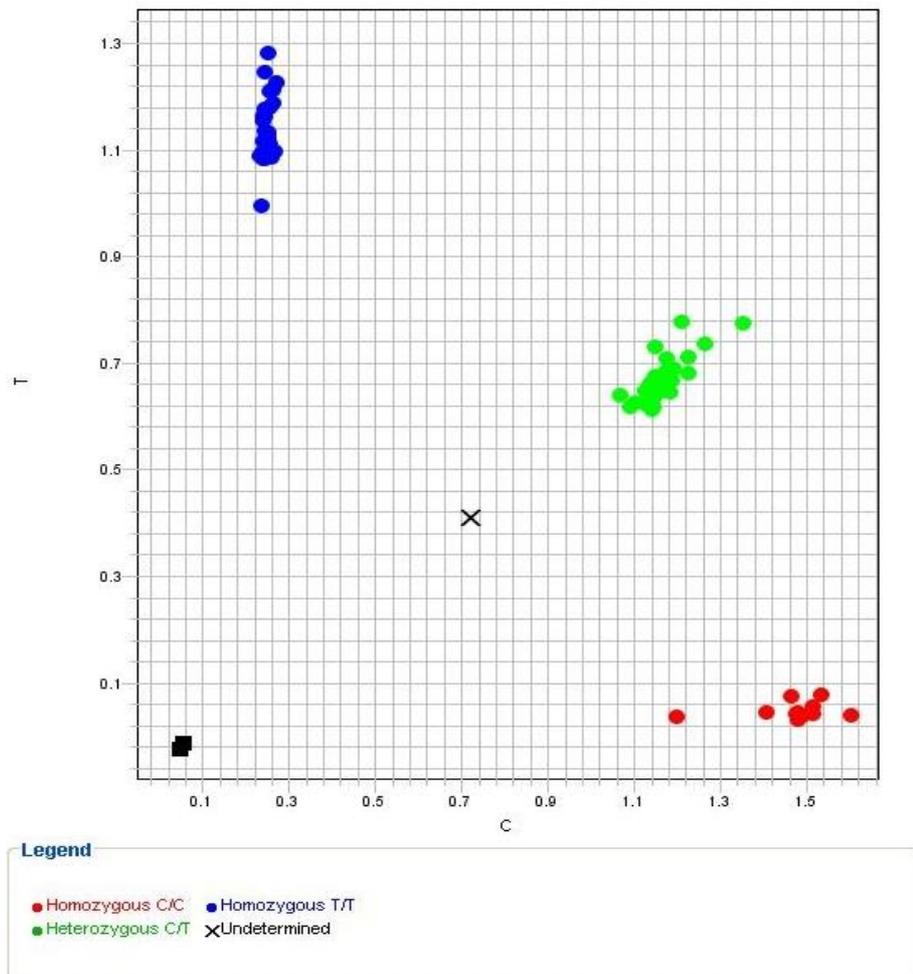


Abbildung 10: Allelverteilung des SNP4 (rs661057) im AK-Kollektiv (n=44) nach TaqMan-Genotypisierung

Ein signifikanter Zusammenhang ( $p < 0,003$ ) mit erhöhten tau-Protein-Liquorkonzentrationen konnte für die homozygoten CC-Genotyp-Träger des AK-Kollektivs festgestellt werden, siehe Tabelle 7.

Tabelle 7: Korrelation von SNP4 Genotypen mit tau-Liquorkonzentrationen, \*signifikant für  $p < 0,05$ 

SNP 4	AK-Patienten			MCI-Patienten		
	n	tau in ng/l (SD)	p-Wert	n	tau in ng/l (SD)	p-Wert
CC	7 15,9%	917,3 (654,76)	0,03*	7 11,5%	503 (393,70)	0,19
CT	19 43,2%	625,9 (348,23)	0,98	29 47,5%	353,2 (235,27)	0,38
TT	18 40,9%	517,1 (215,07)	0,11	25 41,0%	386 (234,62)	0,96

### 3.3 Ergebnisse für SORL1-SNPs der 3'-Region

#### 3.3.1 $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> und die SNPs 22 und 23

Die Analyse von Allel-Varianten der SNPs am 3'-Ende des SORL1-Gens ergibt eine signifikante Assoziation zwischen verminderten  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Liquorkonzentrationen und SNP 22, sowie SNP 23 bei Patienten mit diagnostizierter Alzheimer Krankheit (n=44).

In der Gruppe der AK-Patienten tragen 63,3 % ein T-Allel in SNP 22, bei diesen Probanden werden signifikant ( $p < 0,04$ ) niedrigere  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> – Liquorkonzentrationen gemessen. Ebenso verhält es sich für die Träger des T-Allels (62,3%) in SNP 23 des selben Kollektivs, siehe Tabelle 8.

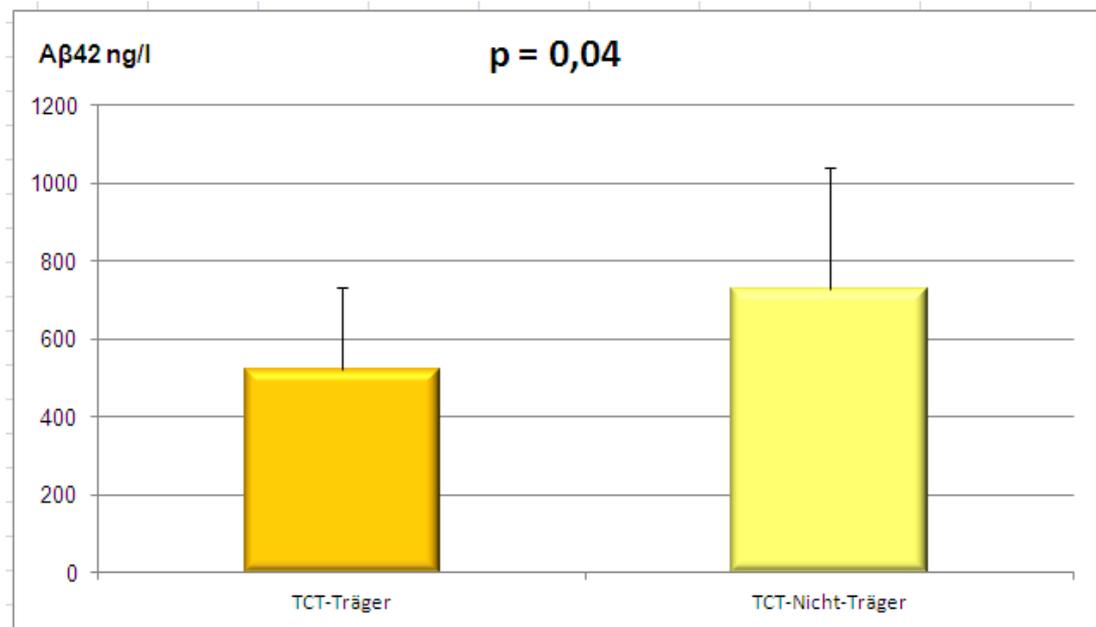
**Tabelle 8: Korrelation von Allelen in SNP 22 und 23 mit  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> – Liquorkonzentrationen, \* signifikant für  $p < 0,05$**

SNP-Nr	Allel	AK-Patienten			MCI-Patienten		
		n	A $\beta$ 42 in ng/l (SD)	p-Wert	n	A $\beta$ 42 in ng/l (SD)	p-Wert
SNP 22	C	22 36,7%	563,05 (224,67)	0,99	36 39,6%	767,14 (355,79)	0,9
	T	<b>38</b> <b>36,3%</b>	<b>523,71</b> <b>(210,47)</b>	<b>0,04*</b>	55 60,4%	755,44 (337,47)	0,29
SNP 23	A	23 37,7%	586,74 (230,52)	0,45	34 37,8%	761,09 (358,84)	0,8
	T	<b>38</b> <b>62,3%</b>	<b>523,71</b> <b>(210,47)</b>	<b>0,04*</b>	56 62,2%	749,82 (337,01)	0,11

### 3.3.2 $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> und die Haplotypen 19-21-23 und 22-23-24

Für zwei SNP-Haplotypen der 3'-Region des SORL1-Gens bestehend aus 19-21-23 und 22-23-24 kann ein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,04$ ) mit verminderten  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Liquorkonzentrationen im AK-Kollektiv ( $n=44$ ) ermittelt werden. Unter den genannten Patienten findet sich der TCT-Haplotyp für die SNPs 19-21-23 in einer Häufigkeit von 36,9 %.

In Abbildung 11 ist die für TCT-Träger signifikant reduzierte, gemittelte  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Liquorkonzentration graphisch dargestellt.



**Abbildung 11: Verminderte  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Liquorkonzentration bei TCT-Trägern des 19-21-23 SORL1-Haplotypen im AK-Kollektiv**

Für die SNPs 22-23-24 weist der TTC-Haplotyp ebenfalls eine signifikante Korrelation mit einer verminderten  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Liquorkonzentration auf, siehe Abbildung 12. Der TTC-Haplotyp liegt innerhalb des AK-Kollektivs bei 24,7 % der Patienten vor.

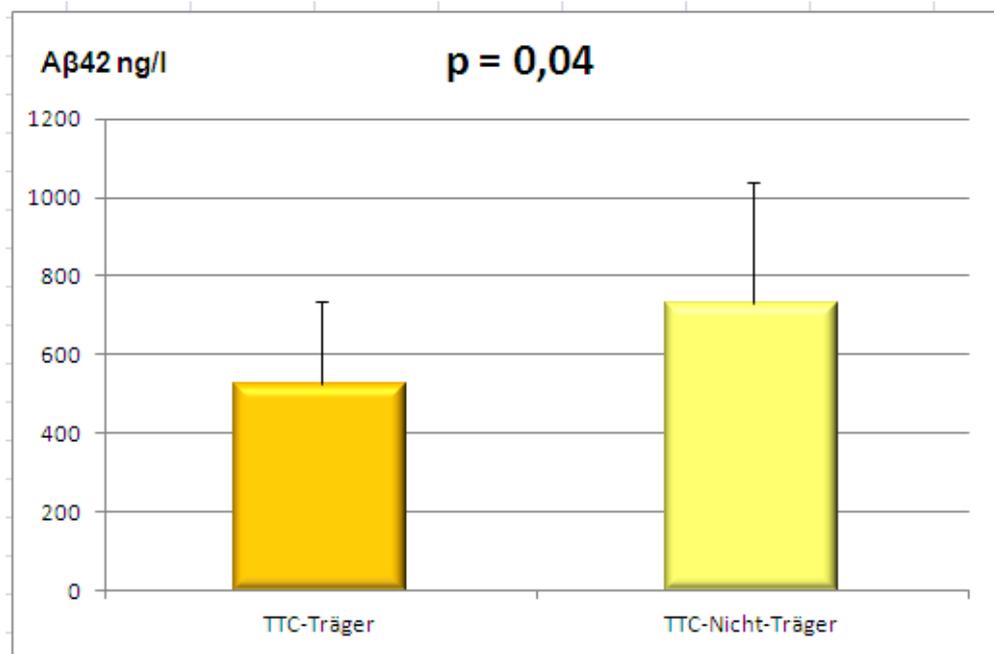


Abbildung 12: Verminderte  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Liquorkonzentration bei TTC-Trägern des 22-23-24 SORL1-Haplotypen im AK-Kollektiv

## 4 Diskussion

In zwei Studienkollektiven, bestehend aus 44 Patienten mit diagnostizierter Alzheimer Krankheit (AK) sowie 61 Patienten mit Mild Cognitive Impairment (MCI), sollen mögliche Assoziationen zwischen 11 ausgewählten SORL1-Risiko-SNPs und relevanten AK-Biomarkern aufgezeigt werden.

Im folgenden werden die Einflüsse von Varianten der genotypisierten SORL1-SNPs und Haplotypen auf die Liquorkonzentration des tau-Proteins, von  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>, sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , des SORL1-Proteins und der Enzymaktivität von BACE1 näher beleuchtet.

### 4.1 sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ und BACE1-Aktivität

Die SORL1-SNPs und -Haplotypen zeigen in beiden Patientenkollektiven keine signifikante Assoziation zu den Liquorkonzentrationen von sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  sowie der gemessenen Enzymaktivität von BACE1.

Da man vermutet, dass eine verminderte Expression des SORL1-Rezeptors bei AK- und MCI-Patienten zu einer gesteigerten Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins führt, könnten Risiko-SNPs mit Veränderungen der sAPPs im Liquor in Verbindung stehen. Effekte durch eine verringerte SORL1-Expression beeinflussen möglicherweise die Liquorkonzentrationen beider Parameter, da diese stark miteinander korrelieren (Lewczuk et al., 2010). Im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit sind sowohl erhöhte, als auch unveränderte oder erniedrigte Liquorwerte der sAPPs beschrieben (Lewczuk et al., 2010, Zetterberg et al., 2010, Perneczky et al., 2011, Ma et al., 2009, Olsson et al., 2003, Van Nostrand et al., 1992).

Ma et al. stellten im Liquor von AK-Patienten eine signifikante Assoziation zwischen verminderten Konzentrationen von sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  mit einer verringerten Expression des SORL1-Rezeptors fest (Ma et al., 2009). Die

fehlende Korrelation mit SORL1-SNPs in der vorliegenden Arbeit steht in Einklang mit der gegenwärtig noch unklaren Bedeutung von sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  als AK-Biomarker.

Bei AK- und besonders bei MCI-Patienten wurde vielfach repliziert eine erhöhte Aktivität und Konzentration der  $\beta$ -Sekretase BACE1 im Liquor nachgewiesen (Holsinger et al., 2006, Zetterberg et al., 2008, Zhong et al., 2007). Es gibt mehrere Hinweise, die für eine komplexe Interaktion zwischen SORL1, BACE1 und APP sprechen (wie in 1.4.4 beschrieben), möglicherweise auch unabhängig von den analysierten SORL1-SNPs.

Aktuelle Daten deuten auf eine positive Korrelation der BACE1-Aktivität mit den Konzentrationen des SORL1-Rezeptors im Liquor von AK-Patienten hin (Tsolakidou et al., 2012).

Erhöhte Konzentrationen des tau-Proteins können im Rahmen der AK-Pathogenese mit einer gesteigerten Enzymaktivität von BACE1 assoziiert sein (Zetterberg et al., 2008). Die Analyse der 11 ausgewählten SORL1-SNPs zeigt eine signifikante Korrelation des tau-Proteins mit SNP 4. Die Struktur eines Fall-Kontroll-Kollektivs ist möglicherweise geeigneter, um Effekte der SNPs auf die BACE1-Aktivität zu identifizieren. Darüber hinaus sind weitere Untersuchungen erforderlich, die die funktionellen Zusammenhänge von BACE1 und SORL1 beleuchten.

## **4.2 Analyse von SORL1-SNPs der 5'-Region**

### **4.2.1 SORL1-Protein und die SNPs 8, 9, 10, sowie der Haplotyp 8-9-10**

Innerhalb des MCI-Patientenkollektivs (n=61) zeigt sich bei homozygoten Trägern der Minor-Allele für die SNPs 8 (TT), 9 (AA) und 10 (CC) eine

signifikante Erhöhung des SORL1-Proteins im Liquor. Die Auswertung der Haplotyp-Konstellation 8-9-10 ergibt eine signifikante Assoziation der Variante CGT mit verminderten SORL1-Konzentrationen.

Rogaeva et al. stellten bei Patienten nordeuropäischer Herkunft initial einen signifikanten Zusammenhang der Allele C, G, C für die SNPs 8, 9, 10 und des Haplotypen CGC mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Alzheimer Erkrankung fest.

Die AK-Assoziation der bei Rogaeva et al. genannten Risiko-Allele und des Haplotypen wurde für Patienten kaukasischer Abstammung in einer Meta-Analyse unter Berücksichtigung von 14 unabhängigen Studien bestätigt (Reitz et al., 2011).

Entgegen der Häufigkeitsverteilung der vorliegenden Arbeit war in den genannten Publikationen das C-Allel für SNP 10 die häufiger ausgeprägte Variante und trug zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko bei (Rogaeva et al., 2007, Reitz et al., 2011).

Aufgrund der Stichprobengröße und der gewählten Case-only-Struktur des MCI-Kollektivs treten möglicherweise andere Frequenzen eines Allels auf, als sie in Fall-Kontroll-Studien zu erwarten sind.

Der Vergleich von Datensätzen aus verschiedenen Populationen zeigte ethnische Unterschiede der SNPs in der Risiko-Assoziation der Allele (Rogaeva et al., 2007). Die nachgewiesene Assoziation des CC-Genotyps mit einer fraglich protektiven Erhöhung der SORL1-Konzentration könnte so zu erklären sein. In einer Fall-Kontroll-Studie mit Patienten deutscher Herkunft, die Vergleichswerte im Hinblick auf einen ähnlichen genetischen Hintergrund bereitstellen könnten, ließen sich die signifikanten Ergebnisse für die SNPs 8,9 und 10 nicht replizieren (Feulner et al., 2009).

Die Daten einer belgischen Fall-Kontroll-Studie weisen nur für die homozygoten Träger der beschriebenen Risiko-Allele in SNP 8, 9 und 10 einen signifikanten Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit nach; ein

signifikant vermindertes Risiko lag bei heterozygoten Trägern der risikobehafteten Varianten vor (Bettens et al., 2008).

Es ist denkbar, dass bei den untersuchten MCI-Patienten die homozygote Trägerschaft des Minor-Allels einen protektiven Effekt in Form einer erhöhten SORL1-Liquorkonzentration hervorruft. Wie beschrieben, begünstigt der SORL1-Rezeptor die Zirkulation des Amyloid-Precursor-Proteins innerhalb intrazellulärer Kompartimente und vermindert hierdurch die amyloidogene Prozessierung (Andersen et al., 2005).

Von einem Mild Cognitive Impairment können Patienten betroffen sein, deren Symptome auf einen heterogenen Pool an Erkrankungen zurückgehen und die daher nicht zu einer Demenz vom Alzheimer-Typ konvertieren. Verlaufsuntersuchungen bei MCI zeigen, dass bei manchen Erkrankten die Beschwerden remittieren oder über längere Zeit stabil bleiben (Ganguli et al., 2011). Das Auftreten protektiver SNP-Varianten ist bei diesen Patienten vorstellbar.

Welche Auswirkungen die verringerte intrazelluläre Exprimierung des SORL1-Rezeptors bei AK- oder MCI-Patienten auf die Liquorkonzentration des Proteins hat, ist gegenwärtig noch wenig untersucht und unsicher.

In ventrikulärem Nervenwasser autopsierter AK-Patienten und in Liquorpunktaten von leicht- bis mittelgradig Betroffenen wurden signifikant verminderte Konzentrationen des SORL1-Proteins gemessen (Ma et al., 2009). Möglicherweise spricht eine erhöhte SORL1-Konzentration im Liquor für eine intrazellulär ebenfalls erhöhte Konzentration des Rezeptors bei den beschriebenen MCI-Probanden mit Homozygotie für das Minor-Allel.

In einer japanischen Studie hingegen trat eine erhöhte Liquorkonzentration des SORL1-Proteins bei diagnostizierter Alzheimer Krankheit auf. Die Autoren wiesen jedoch daraufhin, dass innerhalb des autopsierten japanischen Kollektivs kein Unterschied zwischen der SORL1-Konzentration

im cerebralen Gewebe von Kontrollen und Patienten festzustellen war (Ikeuchi et al., 2010).

Innerhalb des AK-Kollektivs (n=44) ist eine Replikation der signifikanten Resultate für SNP 8, 9 und 10 nicht möglich. In mehreren Studien mit Patienten kaukasischer Herkunft gelang es nicht eine Assoziation dieser SNPs mit der Alzheimer Erkrankung zu belegen (Liu et al., 2007, Li et al., 2008, Minster et al., 2008, Laumet et al., 2010). Anhaltspunkte für eine Verbindung der SNPs 8, 9 und 10 zu den AK kennzeichnenden Liquorveränderungen von tau-Protein und  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> konnten bisher nicht erbracht werden (Kauwe et al., 2010, Reynolds et al., 2010).

Da die genannten SNPs in Intron-Bereichen des SORL1-Gens liegen, ist ihr Einfluss auf die Transkription des Rezeptors und damit auf die AK-Pathogenese vermutlich komplexen regulativen Mechanismen unterworfen. Hierfür spricht, dass in Proben des temporalen Kortex von autopsierten, gesunden Probanden eine signifikante Assoziation zwischen zwei SNPs (rs7945931, rs229825) der 5'-Region und der mRNA-Konzentration von SORL1 identifiziert wurde (McCarthy et al., 2012).

Die untersuchten genetischen Varianten von McCarthy et al. hatten keinen Einfluss auf die SORL1-mRNA in Proben des frontalen Kortex (McCarthy et al., 2012).

Regional spezifische Veränderungen der cerebralen SORL1-Exprimierung im Rahmen der Alzheimer Krankheit lassen sich im Liquor möglicherweise schwer erfassen. Dieser Aspekt ist auch beim Analogieschluss von einer verminderten neuronalen SORL1-Konzentration in AK-spezifischen Regionen, auf den verminderten Nachweis des Rezeptors im Liquor von AK-Patienten, wie weiter oben beschrieben, zu beachten.

Die erhobenen Daten unterstreichen die Bedeutung der SNPs 8, 9 und 10 als wichtige Repräsentanten der 5'-Region des Gens für die Expression des SORL1-Rezeptors. Besonders aufschlussreich könnte eine weiterführende Analyse der SNPs in Mild Cognitive Impairment-Kollektiven sein, um Effekte dieser Region, die das Fortschreiten einer dementiellen Entwicklung begünstigen oder behindern, zu erfassen.

#### 4.2.2 tau-Protein und der SNP 4

Bei homozygoten Trägern des Minor-Allels (CC) in SNP 4 ist im AK-Studienkollektiv (n=44) eine signifikante Erhöhung der Liquorkonzentration des tau-Proteins messbar. Erhöhte tau-Werte im Liquor sind unter anderem bei der Alzheimer Krankheit ein charakteristisches, aber unspezifisches Merkmal der fortschreitenden Neurodegeneration.

Vorangegangene Publikationen wiesen eine signifikante Assoziation der Alzheimer Erkrankung mit dem Vorliegen mindestens eines T-Allels nach (Cellini et al., 2009, Rogaeva et al., 2007). In anderen kaukasischen Patientenkollektiven zeigten sich nur schwach oder nicht signifikante Resultate für SNP 4 (Minster et al., 2008, Feulner et al., 2009, Bettens et al., 2008, Lee et al., 2007).

Bisher liegen nur wenige Daten zu den SORL1-SNPs in Verbindung mit AK-Liquorparametern vor. Aktuelle Ergebnisse einer finnischen Fall-Kontroll-Studie ergaben einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhten p-tau-Liquorkonzentrationen und auftreten des G-Allels in SORL1-SNP rs73595277 (Elias-Sonnenschein et al., 2013).

Die von Kauwe et al. erhobenen Daten zu SNP 4 und  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Liquorkonzentrationen ergaben, wie in der vorliegenden Arbeit, keine signifikanten Resultate (Kauwe et al., 2010).

Bei autopsierten AK-Patienten mit TC-Genotyp in SNP 4 stellten Gear et al. eine verminderte Expression des SORL1-Rezeptors fest. Ergänzend hierzu

ging die Heterozygotie mit höheren Braak und Braak Stadien einher (Gear et al., 2009). Die Braak und Braak-Stadien klassifizieren das Ausmaß cerebraler Neurofibrillen bestehend aus aggregiertem tau-Protein.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu beleuchten durch welche Mechanismen SNP 4 (Intron 1) zu pathologischen Prozessen beiträgt, die der tau-Erhöhung zugrunde liegen.

#### 4.2.3 rs11600875

Sowohl im AK- als auch im MCI-Kollektiv kann keine signifikante Assoziation des SNPs rs11600875 mit den untersuchten Liquorparametern festgestellt werden.

Der SORL1-SNP rs11600875 liegt in Intron 3 des Gens. In Proben des frontalen Kortex von Gesunden korrelierten die Genotypen TT und TC mit einer erhöhten mRNA-Konzentration der SORL1-Splicing-Variante delta-2-SORL1 (McCarthy et al., 2012). In der mRNA von delta-2-SORL1 ist Exon 2 nicht enthalten. Der Verlust von Exon 2 führt zu einer Veränderung der VPS10P-Domäne des SORL1-Proteins, deren funktionelle Bedeutung für die Interaktion mit dem Amyloid-Precursor-Protein noch unklar ist (McCarthy et al., 2012). Die cerebrale Expression von delta-2-SORL1 scheint, im Vergleich zu gesunden Kontrollen, bei AK-Patienten mit verminderter Gesamt-SORL1-Konzentration unverändert zu sein (Gear et al., 2009).

In beiden hier untersuchten Patientenkollektiven liegt der TT-Genotyp, der im Verdacht steht die posttranskriptionale Modifikation zu beeinflussen, in einer Häufigkeit <5% vor und kann somit für die statistische Auswertung nicht berücksichtigt werden. Um Effekte durch das Minor-Allel (T) von SNP rs11600875 erfassen zu können, sind möglicherweise größere Stichproben erforderlich. Zusätzlich zur Bestimmung der Gesamt-SORL1-Proteinkonzentration könnte zukünftig die spezifische Identifikation von delta-2-SORL1 im Liquor hilfreich sein.

## 4.3 Analyse von SORL1-SNPs der 3'-Region

### 4.3.1 $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> und die SNPs 22 und 23 sowie die Haplotypen 19-21-23 und 22-23-24

Eine signifikante Assoziation mit verminderten  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Liquorkonzentrationen liegt innerhalb des AK-Kollektivs (n=44) bei Trägern des T-Allels in SNP 22 und 23 vor.

In der Haplotypenanalyse gehen erniedrigte Werte des genannten Biomarkers mit der Variante TCT für 19-21-23 und der Variante TTC für 22-23-24 einher.

Bestehende Ergebnisse für den Haplotypen 23-24-25 deuten auf unterschiedliche Ausprägungen abhängig von der Herkunft der untersuchten Population hin und können in der vorliegenden Arbeit nicht repliziert werden (Rogaeva et al., 2007, Lee et al., 2008a, Lee et al., 2007). Effekte durch die fraglich erkrankungsassoziierten Kombinationen TTC und ATC dieses Haplotypen sind möglicherweise nicht nachweisbar, da sie in beiden Kollektiven nur in einer Häufigkeit von 10-13% vorkommen.

Die Ergebnisse einer Fall-Kontroll-Studie, die auf ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung der Alzheimer Krankheit bei Trägern des T-Allels in SNP22 hindeuteten, werden durch die nachgewiesene Assoziation desselben Allels mit reduzierten  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Konzentrationen bestätigt (Tan et al., 2009).

Aktuelle Daten von Caglayan et al. stellen bei AK-Patienten hingegen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Homozygotie für das Minor-Allel (C) und verminderten cerebralen Konzentrationen des SORL1-Rezeptors fest. Durch die Lage von SNP22 in Exon 27 des SORL1-Gens besteht die Möglichkeit, dass Risiko-Allele die Struktur, Stabilität und Translation der mRNA beeinflussen (Caglayan et al., 2012).

Bemerkenswert im Hinblick auf die erwähnte Wirkung der SNPs in Exon-Abschnitten des Gens ist, dass das T-Allel von SNP 23 (Exon 34) ebenfalls mit einer erniedrigten  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Konzentration einhergeht. Der Zusammenhang des Risiko-Allels T mit der Alzheimer Krankheit ist in mehreren Datensätzen für Patienten kaukasischer Herkunft und in einer japanischen Fall-Kontroll-Studie bestätigt (Rogaeva et al., 2007, Kimura et al., 2009). Eine hohe ethnische Heterogenität der Resultate ist auch für SNP 23 zu erwarten. Tan et al. wiesen bei Patienten chinesischer Abstammung für das A-Allel eine erhöhtes AK-Risiko nach (Tan et al., 2009). In einer schottischen Geburtskohorte erzielten Träger des A-Allels im Alter von 70 Jahren signifikant niedrigere Punktwerte bei der Testung des räumlichen Lernens (Houlihan et al., 2009).

Darüber hinaus existieren bisher nur wenige Daten, die eine Verbindung zwischen SORL1-SNPs und Befunden klinischer Testinstrumente oder bildgebender Verfahren herstellen (Seshadri et al., 2007). Cuenco et al. analysierten SORL1-SNPs im Hinblick auf AK-typische Veränderungen im Schädel-MRT (K et al., 2008). Die 3'-Region des Gens zwischen SNP 21-26 sowie Varianten der Haplotypen 22-23-24 und 23-24-25 waren in der genannten Publikation mit cerebraler und besonders mit hippocampaler Atrophie assoziiert (K et al., 2008).

Bei der Auswertung der Allele und Genotypen von SNP 19, 21, 24 und 25 sind keine statistisch robusten Korrelationen mit den genannten Liquorparametern erkennbar. In anderen AK-Studienkollektiven, die Effekte auf  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> und / oder tau-Protein im Liquor beleuchteten, zeigten sich in Verbindung mit den SNPs 19, 24 und 25 auch keine signifikanten Konzentrationsunterschiede (Kolsch et al., 2009, Kauwe et al., 2010, Reynolds et al., 2010).

Aktuelle Daten weisen auf ein verändertes Leseraster der SORL1-mRNA bei homozygoten Trägern des G-Allels in SNP 19 (Exon 25) hin, das zu einer Beeinträchtigung der Expression des Rezeptors führen könnte (Caglayan et al., 2012). Möglicherweise ist es den Stichprobengrößen in beiden Kollektiven geschuldet, dass der GG-Genotyp nur bei >5% der Untersuchten vertreten ist und somit in der vorliegenden Arbeit nicht für die statistische Auswertung herangezogen werden konnte.

In zwei Fall-Kontroll-Studien mit Teilnehmern kaukasischer Herkunft ist die signifikante AK-Assoziation der SNPs 19, 24, 25, wie bei Rogaeva et al. beschrieben, ebenfalls nicht repliziert worden (Li et al., 2008, Minster et al., 2008, Rogaeva et al., 2007).

Die Evaluation der Haplotypvarianten TCT für 19-21-23 und TTC für 22-23-24 innerhalb des AK-Kollektivs (n=44) brachte eine signifikante Assoziation mit verminderten  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Liquorkonzentrationen hervor.

Kölsch et al. wiesen in einer deutschen Multicenter-Studie erstmals einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Haplotyp 19-21-23 (TGA) sowie dem G-Allel in SNP 21 und erniedrigten  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Konzentrationen nach (Kolsch et al., 2008). Ergänzend dazu trug die Variante TGA zu einem erhöhten AK-Risiko und einem früheren Erkrankungsbeginn bei (Kolsch et al., 2009). Diese Variante ist innerhalb des AK-Kollektivs (n=44) nur bei 3% der Patienten zu finden.

Die AK-Assoziation für die Kombination CTT des Haplotyps 22-23-24 wurden von Rogaeva et al. in mehreren Datensätzen repliziert und trug zu einer verminderten Expression von SORL1 in Lymphoblasten der Träger bei (Rogaeva et al., 2007).

## 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegenden Daten tragen dazu bei genetische Varianten des SORL1-Gens in einen Kontext AK-relevanter Liquorparameter zu stellen. Sie stützen die Vermutung, dass der SORL1-Rezeptor eine funktionell bedeutsame Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit spielt.

Die Ergebnisse innerhalb des MCI-Studienkollektivs stellen eine Verbindung zwischen SNPs der 5'-Region des Gens und Liquorkonzentrationserhöhungen des SORL1-Proteins her. Verlaufsuntersuchungen zur SORL1-Liquorkonzentration bei Probanden mit Mild Cognitive Impairment könnten dazu beitragen Hinweise auf die fragliche Schrittmacherfunktion des SORL1-Proteins in frühen Stadien der Alzheimer Erkrankung zu gewinnen. Zudem ließen sich die Bedeutung einzelner SNP- und Haplotyp-Varianten, sowie ihre fraglich protektiven Eigenschaften in Längsschnitterhebungen genauer beurteilen.

In der vorliegenden Arbeit kann für manche interessierenden SORL1-Varianten keine statistisch aussagekräftige Häufigkeit erzielt werden. Die Analyse größerer MCI- und AK-Kollektive wäre erforderlich, um diese repräsentativ abbilden und ihre Einflüsse beurteilen zu können.

Wie erwähnt, gibt es Anhaltspunkte, dass SNPs der 5'-Region das Splicing der SORL1-mRNA im Bereich von Exon 2 modifizieren. Gegenstand zukünftiger Untersuchungen könnte die Identifikation veränderter Formen des SORL1-Rezeptors in Liquorproben von Risiko-SNP-Trägern sein.

Gegenwärtig ist weitgehend unklar durch welche Mechanismen AK-assoziierte SNPs die Transkription beeinflussen und welchen Anteil Splicing-Varianten an einer veränderten SORL1-Expression und einer damit möglicherweise verbundenen, gesteigerten Amyloidogenese haben.

Vor diesem Hintergrund ist die Assoziation von SORL1-SNPs und Haplotypen mit AK-typischen tau- und  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-

Liquorkonzentrationsänderungen zur indirekten Darstellung der Einflüsse einzelner genetischer Varianten weiterhin bedeutsam.

Die vorliegenden Daten zu SNP 4 zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhten tau-Werten im Liquor und einer Homozygotie für das C-Allel innerhalb des Kollektivs mit diagnostizierter Alzheimer Krankheit. Ergänzend dazu und anknüpfend an die genannten Resultate von Gear et al., die eine Verbindung zwischen dem TC-Genotyp und höheren Braak und Braak Stadien ergaben (Gear et al., 2009), ist vor allem SNP 4 in Zusammenschau mit neuropathologischen gesicherten AK-Befunden zukünftig interessant. Bei der Bewertung der Ergebnisse aus beiden hier zugrunde liegenden Studienkollektiven ist zu beachten, dass eine endgültige Diagnosesicherung der Alzheimer Erkrankung nur post mortem erbracht werden kann.

Die ermittelte Assoziation der SNPs 22 und 23, sowie der Haplotypen 19-21-23 und 22-23-24 mit  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> bei Patienten mit diagnostizierter Alzheimer Krankheit stärkt die bestehende Literatur zu Zusammenhängen der 3'-Region des SORL1-Gens mit Liquorparametern. Die aktuellen Ergebnisse sowie die Datenlage sprechen für eine hohe Variabilität der risikoassoziierten Allele, Geno- und Haplotypen der SORL1-SNPs, die ihre Replikation vor allem in kleineren Patientenstichproben erschwert. Weitere Vergleichswerte zu Patienten kaukasischer Herkunft werden erforderlich sein, um die Aussagekraft einzelner hier untersuchter, genetischer Varianten besser beurteilen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Bei der Entstehung der sporadischen Alzheimer Krankheit spielt vermutlich der neuronale Verlust des Sortilin-related-Receptors SORL1 eine maßgebliche Rolle. Die Funktion von SORL1 besteht höchstwahrscheinlich in der Protektion des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) auf intrazellulären Transportwegen. Einzelne genetische Varianten sogenannte SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) innerhalb des SORL1-Gens weisen eine Assoziation mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko auf.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es Einflüsse von 11 risikoassoziierten SORL1-SNPs auf die Konzentrationen des tau-Proteins, von  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>, sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , des SORL1-Proteins sowie der Enzymaktivität von BACE1 im Liquor zu untersuchen. Die erhobenen Daten stammen aus zwei Studienkollektiven, bestehend aus 44 Patienten mit klinisch wahrscheinlicher Alzheimer Krankheit und 61 Patienten mit Mild Cognitive Impairment.

Unter Berücksichtigung der bestehenden Literatur wurden repräsentativ für die 5'-Region des Gens die SNPs 4, 8, 9, 10 und ergänzend dazu SNP rs11600875 ausgewählt, sowie die innerhalb der 3'-Region lokalisierten SNPs 19, 21, 22, 23, 24 und 25.

Die Genotypisierung der Patienten-DNA erfolgte mit Hilfe von Taqman-Assays der Firma Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) in einem Real-Time-PCR-Verfahren.

Bei den Studienteilnehmern mit Mild Cognitive Impairment zeigt sich bei homozygoten Trägern des Minor-Allels der SNPs 8, 9 und 10 eine signifikant erhöhte SORL1-Konzentration im Liquor. MCI-Patienten, die die Variante CGT des Haplotypen SNP 8-9-10 tragen, weisen eine verminderte SORL1-Liquorkonzentration auf.

Eine Assoziation zwischen einer erhöhten tau-Konzentration und einer Homozygotie für das C-Allel in SNP 4 besteht innerhalb des Alzheimerkollektivs. Verminderte  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Liquorkonzentrationen liegen bei Trägern des T-Allels in SNP 22 und 23 des AK-Kollektivs vor. Die Haplotypen TCT für SNP 19-21-23 und TTC für SNP 22-23-24 korrelieren ebenfalls mit niedrigeren  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Konzentrationen im Liquor.

Eine Assoziation der untersuchten SORL1-SNPs und Haplotypen mit dem APOE- $\epsilon$ 4-Allel, den Liquorkonzentrationen von sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$ , oder der BACE1-Aktivität im Liquor kann in beiden Studienkollektiven nicht festgestellt werden. Die vorliegenden Daten tragen dazu bei SORL1-SNPs in einen Kontext AK-relevanter Biomarker zu stellen und unterstreichen die funktionelle Bedeutung des SORL1-Rezeptors für die Pathogenese der Alzheimer Krankheit. Die Ergebnisse sprechen für eine weiterführende Analyse von SORL1-SNPs, sowie der SORL1-Liquorkonzentration bei Patienten mit Mild Cognitive Impairment, um deren Einflüsse in frühen Erkrankungsstadien erfassen zu können. Ergänzend sind genetische Untersuchungen erforderlich, um Effekte einzelner SORL1-SNPs auf die Expression des Rezeptors näher zu beleuchten.

---

## 6 Literaturverzeichnis

- AGUERO-TORRES, H., VON STRAUSS, E., VIITANEN, M., WINBLAD, B. & FRATIGLIONI, L. 2001. Institutionalization in the elderly: the role of chronic diseases and dementia. Cross-sectional and longitudinal data from a population-based study. *J Clin Epidemiol*, 54, 795-801.
- ALEXOPOULOS, P., TSOLAKIDOU, A., ROSELLI, F., ARNOLD, A., GRIMMER, T., WESTERTEICHER, C., LEANTE, M. R., FORSTL, H., LIVREA, P., KURZ, A. & PERNECZKY, R. 2012. Clinical and neurobiological correlates of soluble amyloid precursor proteins in the cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement*, 8, 304-11.
- ALLINSON, T. M., PARKIN, E. T., TURNER, A. J. & HOOPER, N. M. 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, 74, 342-52.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10.
- ALZHEIMER, A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, 64, 146-148.
- ANDERSEN, O. M., REICHE, J., SCHMIDT, V., GOTTHARDT, M., SPOELGEN, R., BEHLKE, J., VON ARNIM, C. A., BREIDERHOFF, T., JANSEN, P., WU, X., BALES, K. R., CAPPAL, R., MASTERS, C. L., GLIEMANN, J., MUFSON, E. J., HYMAN, B. T., PAUL, S. M., NYKJAER, A. & WILLNOW, T. E. 2005. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13461-6.
- ANDERSEN, O. M., SCHMIDT, V., SPOELGEN, R., GLIEMANN, J., BEHLKE, J., GALATIS, D., MCKINSTRY, W. J., PARKER, M. W., MASTERS, C. L., HYMAN, B. T., CAPPAL, R. & WILLNOW, T. E. 2006. Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11. *Biochemistry*, 45, 2618-28.

- 
- BAJARI, T. M., STRASSER, V., NIMPF, J. & SCHNEIDER, W. J. 2005. LDL receptor family: isolation, production, and ligand binding analysis. *Methods*, 36, 109-16.
- BETTENS, K., BROUWERS, N., ENGELBORGHES, S., DE DEYN, P. P., VAN BROECKHOVEN, C. & SLEEGERS, K. 2008. SORL1 is genetically associated with increased risk for late-onset Alzheimer disease in the Belgian population. *Hum Mutat*, 29, 769-70.
- BICKEL, H. 2002. Stand der Epidemiologie. In: HALLAUER, J., KURZ, A. (ed.) *Weißbuch Demenz: Versorgungssituation relevanter Demenzerkrankungen in Deutschland* Stuttgart: Thieme.
- BLENNOW, K. & HAMPEL, H. 2003. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 2, 605-13.
- BOHM, C., SEIBEL, N. M., HENKEL, B., STEINER, H., HAASS, C. & HAMPE, W. 2006. SorLA signaling by regulated intramembrane proteolysis. *J Biol Chem*, 281, 14547-53.
- BUSSE, A., BISCHKOPF, J., RIEDEL-HELLER, S. G. & ANGERMEYER, M. C. 2003. Mild cognitive impairment: prevalence and incidence according to different diagnostic criteria. Results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+). *Br J Psychiatry*, 182, 449-54.
- CAGLAYAN, S., BAUERFEIND, A., SCHMIDT, V., CARLO, A. S., PRABAKARAN, T., HUBNER, N. & WILLNOW, T. E. 2012. Identification of Alzheimer disease risk genotype that predicts efficiency of SORL1 expression in the brain. *Arch Neurol*, 69, 373-9.
- CELLINI, E., TEDDE, A., BAGNOLI, S., PRADELLA, S., PIACENTINI, S., SORBI, S. & NACMIAS, B. 2009. Implication of sex and SORL1 variants in italian patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 66, 1260-6.
- CORDER, E. H., LANNFELT, L., BOGDANOVIC, N., FRATIGLIONI, L. & MORI, H. 1998. The role of APOE polymorphisms in late-onset dementias. *Cell Mol Life Sci*, 54, 928-34.

- 
- DE STROOPER, B. & ANNAERT, W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*, 113 ( Pt 11), 1857-70.
- DESTATIS 2010. Hohe Kosten durch Demenz und Depressionen. *Pressemitteilung Nr. 280*. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt.
- DILLING, H. 2010. *Taschenführer zur ICD-10-Klassifikation psychischer Störungen*, Bern, Huber.
- DODSON, S. E., ANDERSEN, O. M., KARMALI, V., FRITZ, J. J., CHENG, D., PENG, J., LEVEY, A. I., WILLNOW, T. E. & LAH, J. J. 2008. Loss of LR11/SORLA enhances early pathology in a mouse model of amyloidosis: evidence for a proximal role in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 28, 12877-86.
- DODSON, S. E., GEARING, M., LIPPA, C. F., MONTINE, T. J., LEVEY, A. I. & LAH, J. J. 2006. LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 866-72.
- ELIAS-SONNENSCHNEIN, L. S., HELISALMI, S., NATUNEN, T., HALL, A., PAAJANEN, T., HERUKKA, S. K., LAITINEN, M., REMES, A. M., KOIVISTO, A. M., MATTILA, K. M., LEHTIMAKI, T., VERHEY, F. R., VISSER, P. J., SOININEN, H. & HILTUNEN, M. 2013. Genetic loci associated with Alzheimer's disease and cerebrospinal fluid biomarkers in a Finnish case-control cohort. *PLoS One*, 8, e59676.
- FERRI, C. P., PRINCE, M., BRAYNE, C., BRODATY, H., FRATIGLIONI, L., GANGULI, M., HALL, K., HASEGAWA, K., HENDRIE, H., HUANG, Y., JORM, A., MATHERS, C., MENEZES, P. R., RIMMER, E. & SCAZUFCA, M. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366, 2112-7.
- FEULNER, T. M., LAWS, S. M., FRIEDRICH, P., WAGENPFEIL, S., WURST, S. H., RIEHLE, C., KUHN, K. A., KRAWCZAK, M., SCHREIBER, S., NIKOLAUS, S., FORSTL, H., KURZ, A. & RIEMENSCHNEIDER, M. 2009. Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study. *Mol Psychiatry*.
- FRATIGLIONI, L., LAUNER, L. J., ANDERSEN, K., BRETELER, M. M., COPELAND, J. R., DARTIGUES, J. F., LOBO, A., MARTINEZ-LAGE, J., SOININEN, H. & HOFMAN, A.

- 
2000. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*, 54, S10-5.
- GANGULI, M., SNITZ, B. E., SAXTON, J. A., CHANG, C. C., LEE, C. W., VANDER BILT, J., HUGHES, T. F., LOEWENSTEIN, D. A., UNVERZAGT, F. W. & PETERSEN, R. C. 2011. Outcomes of mild cognitive impairment by definition: a population study. *Arch Neurol*, 68, 761-7.
- GAUTHIER, S., REISBERG, B., ZAUDIG, M., PETERSEN, R. C., RITCHIE, K., BROICH, K., BELLEVILLE, S., BRODATY, H., BENNETT, D., CHERTKOW, H., CUMMINGS, J. L., DE LEON, M., FELDMAN, H., GANGULI, M., HAMPEL, H., SCHELTENS, P., TIERNEY, M. C., WHITEHOUSE, P. & WINBLAD, B. 2006. Mild cognitive impairment. *Lancet*, 367, 1262-70.
- GREAR, K. E., LING, I. F., SIMPSON, J. F., FURMAN, J. L., SIMMONS, C. R., PETERSON, S. L., SCHMITT, F. A., MARKESBERY, W. R., LIU, Q., CROOK, J. E., YOUNKIN, S. G., BU, G. & ESTUS, S. 2009. Expression of SORL1 and a novel SORL1 splice variant in normal and Alzheimers disease brain. *Mol Neurodegener*, 4, 46.
- GRIMMER, T., ALEXOPOULOS, P., TSOLAKIDOU, A., GUO, L. H., HENRIKSEN, G., YOUSEFI, B. H., FORSTL, H., SORG, C., KURZ, A., DRZEZGA, A. & PERNECZKY, R. 2012. Cerebrospinal fluid BACE1 activity and brain amyloid load in Alzheimer's disease. *ScientificWorldJournal*, 2012, 712048.
- GUO, L. H., ALEXOPOULOS, P., EISELE, T., WAGENPFEIL, S., KURZ, A. & PERNECZKY, R. 2012. The National Institute on Aging-Alzheimer's Association research criteria for mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: predicting the outcome. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*.
- HAMPE, W., RIEDEL, I. B., LINTZEL, J., BADER, C. O., FRANKE, I. & SCHALLER, H. C. 2000. Ectodomain shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator. *J Cell Sci*, 113 Pt 24, 4475-85.
- HAMPEL, H., BURGER, K., TEIPEL, S. J., BOKDE, A. L., ZETTERBERG, H. & BLENNOW, K. 2008. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 4, 38-48.

- 
- HAMPEL, H., SHEN, Y., WALSH, D. M., AISEN, P., SHAW, L. M., ZETTERBERG, H., TROJANOWSKI, J. Q. & BLENNOW, K. 2010. Biological markers of amyloid beta-related mechanisms in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 223, 334-46.
- HARDY, J., DUFF, K., HARDY, K. G., PEREZ-TUR, J. & HUTTON, M. 1998. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci*, 1, 355-8.
- HARDY, J. & SELKOE, D. J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297, 353-6.
- HERMEY, G. 2009. The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2677-89.
- HERMEY, G., SJOGAARD, S. S., PETERSEN, C. M., NYKJAER, A. & GLIEMANN, J. 2006. Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *Biochem J*, 395, 285-93.
- HERSKOWITZ, J. H., OFFE, K., DESHPANDE, A., KAHN, R. A., LEVEY, A. I. & LAH, J. J. 2012. GGA1-mediated endocytic traffic of LR11/SorLA alters APP intracellular distribution and amyloid-beta production. *Mol Biol Cell*, 23, 2645-57.
- HOLSINGER, R. M., LEE, J. S., BOYD, A., MASTERS, C. L. & COLLINS, S. J. 2006. CSF BACE1 activity is increased in CJD and Alzheimer disease versus [corrected] other dementias. *Neurology*, 67, 710-2.
- HOLSINGER, R. M., MCLEAN, C. A., COLLINS, S. J., MASTERS, C. L. & EVIN, G. 2004. Increased beta-Secretase activity in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease subjects. *Ann Neurol*, 55, 898-9.
- HORT, J., O'BRIEN, J. T., GAINOTTI, G., PIRTTILA, T., POPESCU, B. O., REKTOROVA, I., SORBI, S. & SCHELTENS, P. 2010. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 17, 1236-48.
- HOULIHAN, L. M., HARRIS, S. E., LUCIANO, M., GOW, A. J., STARR, J. M., VISSCHER, P. M. & DEARY, I. J. 2009. Replication study of candidate genes for cognitive abilities: the Lothian Birth Cohort 1936. *Genes Brain Behav*, 8, 238-47.

- 
- HULSTAERT, F., BLENNOW, K., IVANOIU, A., SCHOONDERWALDT, H. C., RIEMENSCHNEIDER, M., DE DEYN, P. P., BANCHER, C., CRAS, P., WILTFANG, J., MEHTA, P. D., IQBAL, K., POTTEL, H., VANMECHELEN, E. & VANDERSTICHELE, H. 1999. Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology*, 52, 1555-62.
- HYMAN, B. T. & TROJANOWSKI, J. Q. 1997. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56, 1095-7.
- IKEUCHI, T., HIRAYAMA, S., MIIDA, T., FUKAMACHI, I., TOKUTAKE, T., EBINUMA, H., TAKUBO, K., KANEKO, H., KASUGA, K., KAKITA, A., TAKAHASHI, H., BUJO, H., SAITO, Y. & NISHIZAWA, M. 2010. Increased levels of soluble LR11 in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 30, 28-32.
- JACOBSEN, L., MADSEN, P., JACOBSEN, C., NIELSEN, M. S., GLIEMANN, J. & PETERSEN, C. M. 2001. Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem*, 276, 22788-96.
- JACOBSEN, L., MADSEN, P., MOESTRUP, S. K., LUND, A. H., TOMMERUP, N., NYKJAER, A., SOTTRUP-JENSEN, L., GLIEMANN, J. & PETERSEN, C. M. 1996. Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the alpha2-macroglobulin receptor-associated protein. *J Biol Chem*, 271, 31379-83.
- JACOBSEN, L., MADSEN, P., NIELSEN, M. S., GERAERTS, W. P., GLIEMANN, J., SMIT, A. B. & PETERSEN, C. M. 2002. The sorLA cytoplasmic domain interacts with GGA1 and -2 and defines minimum requirements for GGA binding. *FEBS Lett*, 511, 155-8.
- JIN, M., SHEPARDSON, N., YANG, T., CHEN, G., WALSH, D. & SELKOE, D. J. 2011. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 5819-24.

- 
- JOHNSON-WOOD, K., LEE, M., MOTTER, R., HU, K., GORDON, G., BARBOUR, R., KHAN, K., GORDON, M., TAN, H., GAMES, D., LIEBERBURG, I., SCHENK, D., SEUBERT, P. & MCCONLOGUE, L. 1997. Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1550-5.
- JONSSON, L. & WIMO, A. 2009. The cost of dementia in Europe: a review of the evidence, and methodological considerations. *Pharmacoeconomics*, 27, 391-403.
- K, T. C., LUNETTA, K. L., BALDWIN, C. T., MCKEE, A. C., GUO, J., CUPPLES, L. A., GREEN, R. C., ST GEORGE-HYSLOP, P. H., CHUI, H., DECARLI, C. & FARRER, L. A. 2008. Association of distinct variants in SORL1 with cerebrovascular and neurodegenerative changes related to Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 65, 1640-8.
- KAUWE, J. S., CRUCHAGA, C., BERTELSEN, S., MAYO, K., LATU, W., NOWOTNY, P., HINRICHS, A. L., FAGAN, A. M., HOLTZMAN, D. M. & GOATE, A. M. 2010. Validating predicted biological effects of Alzheimer's disease associated SNPs using CSF biomarker levels. *J Alzheimers Dis*, 21, 833-42.
- KIMURA, R., YAMAMOTO, M., MORIHARA, T., AKATSU, H., KUDO, T., KAMINO, K. & TAKEDA, M. 2009. SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease in a Japanese population. *Neurosci Lett*, 461, 177-80.
- KOLSCH, H., JESSEN, F., WILTFANG, J., LEWCZUK, P., DICHGANS, M., KORNHUBER, J., FROLICH, L., HEUSER, I., PETERS, O., SCHULZ, J. B., SCHWAB, S. G. & MAIER, W. 2008. Influence of SORL1 gene variants: association with CSF amyloid-beta products in probable Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 440, 68-71.
- KOLSCH, H., JESSEN, F., WILTFANG, J., LEWCZUK, P., DICHGANS, M., TEIPEL, S. J., KORNHUBER, J., FROLICH, L., HEUSER, I., PETERS, O., WIESE, B., KADUSZKIEWICZ, H., VAN DEN BUSSCHE, H., HULL, M., KURZ, A., RUTHER, E., HENN, F. A. & MAIER, W. 2009. Association of SORL1 gene variants with Alzheimer's disease. *Brain Res*, 1264, 1-6.
- LAO, A., SCHMIDT, V., SCHMITZ, Y., WILLNOW, T. E. & WOLKENHAUER, O. 2012. Multi-compartmental modeling of SORL1's influence on amyloidogenic processing in Alzheimer's disease. *BMC Syst Biol*, 6, 74.

- 
- LAUMET, G., CHOURAKI, V., BOLEY, B. G., LEGRY, V., HEATH, S., ZELENKA, D., FIEVET, N., HANNEQUIN, D., DELEPINE, M., PASQUIER, F., HANON, O., BRICE, A., EPELBAUM, J., BERRI, C., DARTIGUES, J. F., TZOURIO, C., CAMPION, D., LATHROP, M., BERTRAM, L., AMOUYEL, P. & LAMBERT, J. C. 2010. Systematic Analysis of Candidate Genes for Alzheimer's Disease in a French, Genome-Wide Association Study. *J Alzheimers Dis*.
- LEE, J. H., CHENG, R., HONIG, L. S., VONSATTEL, J. P., CLARK, L. & MAYEUX, R. 2008a. Association between genetic variants in SORL1 and autopsy-confirmed Alzheimer disease. *Neurology*, 70, 887-9.
- LEE, J. H., CHENG, R., SCHUPF, N., MANLY, J., LANTIGUA, R., STERN, Y., ROGAEVA, E., WAKUTANI, Y., FARRER, L., ST GEORGE-HYSLOP, P. & MAYEUX, R. 2007. The association between genetic variants in SORL1 and Alzheimer disease in an urban, multiethnic, community-based cohort. *Arch Neurol*, 64, 501-6.
- LEE, J. H., SHIBATA, N., CHENG, R. & MAYEUX, R. 2008b. Possible association between SORL1 and Alzheimer disease? Reanalysing the data of Shibata et al. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 26, 482.
- LEWCZUK, P., KAMROWSKI-KRUCK, H., PETERS, O., HEUSER, I., JESSEN, F., POPP, J., BURGER, K., HAMPEL, H., FROLICH, L., WOLF, S., PRINZ, B., JAHN, H., LUCKHAUS, C., PERNECZKY, R., HULL, M., SCHRODER, J., KESSLER, H., PANTEL, J., GERTZ, H. J., KLAFKI, H. W., KOLSCH, H., REULBACH, U., ESSELMANN, H., MALER, J. M., BIBL, M., KORNHUBER, J. & WILTFANG, J. 2010. Soluble amyloid precursor proteins in the cerebrospinal fluid as novel potential biomarkers of Alzheimer's disease: a multicenter study. *Mol Psychiatry*, 15, 138-45.
- LI, Y., ROWLAND, C., CATANESE, J., MORRIS, J., LOVESTONE, S., O'DONOVAN, M. C., GOATE, A., OWEN, M., WILLIAMS, J. & GRUPE, A. 2008. SORL1 variants and risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 29, 293-6.
- 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. &

- 
- VAN DUIJN, C. M. 2007. A genomewide screen for late-onset Alzheimer disease in a genetically isolated Dutch population. *Am J Hum Genet*, 81, 17-31.
- LOPEZ, O. L., LITVAN, I., CATT, K. E., STOWE, R., KLUNK, W., KAUFER, D. I., BECKER, J. T. & DEKOSKY, S. T. 1999. Accuracy of four clinical diagnostic criteria for the diagnosis of neurodegenerative dementias. *Neurology*, 53, 1292-9.
- LUCK, T., LUPPA, M., WEBER, S., MATSCHINGER, H., GLAESMER, H., KONIG, H. H., ANGERMEYER, M. C. & RIEDEL-HELLER, S. G. 2008. Time until institutionalization in incident dementia cases--results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA 75+). *Neuroepidemiology*, 31, 100-8.
- MA, Q. L., GALASKO, D. R., RINGMAN, J. M., VINTERS, H. V., EDLAND, S. D., POMAKIAN, J., UBEDA, O. J., ROSARIO, E. R., TETER, B., FRAUTSCHY, S. A. & COLE, G. M. 2009. Reduction of SorLA/LR11, a sorting protein limiting beta-amyloid production, in Alzheimer disease cerebrospinal fluid. *Arch Neurol*, 66, 448-57.
- MARCUSSON, E. G., HORAZDOVSKY, B. F., CEREGHINO, J. L., GHARAKHANIAN, E. & EMR, S. D. 1994. The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell*, 77, 579-86.
- MATSUO, M., EBINUMA, H., FUKAMACHI, I., JIANG, M., BUJO, H. & SAITO, Y. 2009. Development of an immunoassay for the quantification of soluble LR11, a circulating marker of atherosclerosis. *Clin Chem*, 55, 1801-8.
- MATTHEWS, F. E., ARTHUR, A., BARNES, L. E., BOND, J., JAGGER, C., ROBINSON, L. & BRAYNE, C. 2013. A two-decade comparison of prevalence of dementia in individuals aged 65 years and older from three geographical areas of England: results of the Cognitive Function and Ageing Study I and II. *Lancet*.
- MATTSSON, N., ZETTERBERG, H., HANSSON, O., ANDREASEN, N., PARNETTI, L., JONSSON, M., HERUKKA, S. K., VAN DER FLIER, W. M., BLANKENSTEIN, M. A., EWERS, M., RICH, K., KAISER, E., VERBEEK, M., TSOLAKI, M., MULUGETA, E., ROSEN, E., AARSLAND, D., VISSER, P. J., SCHRODER, J., MARCUSSON, J., DE LEON, M., HAMPEL, H., SCHELTENS, P., PIRTILA, T., WALLIN, A., JONHAGEN, M. E., MINTHON, L., WINBLAD, B. & BLENNOW, K. 2009. CSF biomarkers and

- 
- incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA*, 302, 385-93.
- MAWUENYEGA, K. G., SIGURDSON, W., OVOD, V., MUNSELL, L., KASTEN, T., MORRIS, J. C., YARASHESKI, K. E. & BATEMAN, R. J. 2010. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, 330, 1774.
- MCCARTHY, J. J., SAITH, S., LINNERTZ, C., BURKE, J. R., HULETTE, C. M., WELSH-BOHMER, K. A. & CHIBA-FALEK, O. 2012. The Alzheimer's associated 5' region of the SORL1 gene cis regulates SORL1 transcripts expression. *Neurobiol Aging*, 33, 1485 e1-8.
- MCKHANN, G., DRACHMAN, D., FOLSTEIN, M., KATZMAN, R., PRICE, D. & STADLAN, E. M. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34, 939-44.
- MENG, Y., LEE, J. H., CHENG, R., ST GEORGE-HYSLOP, P., MAYEUX, R. & FARRER, L. A. 2007. Association between SORL1 and Alzheimer's disease in a genome-wide study. *Neuroreport*, 18, 1761-4.
- MINATI, L., EDGINTON, T., BRUZZONE, M. G. & GIACCONE, G. 2009. Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 24, 95-121.
- MINSTER, R. L., DEKOSKY, S. T. & KAMBOH, M. I. 2008. No association of SORL1 SNPs with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 440, 190-2.
- MORRIS, J. C., STORANDT, M., MILLER, J. P., MCKEEL, D. W., PRICE, J. L., RUBIN, E. H. & BERG, L. 2001. Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 58, 397-405.
- MOTOI, Y., AIZAWA, T., HAGA, S., NAKAMURA, S., NAMBA, Y. & IKEDA, K. 1999. Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Res*, 833, 209-15.

- 
- MOTT, R. T. & HULETTE, C. M. 2005. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am*, 15, 755-65, ix.
- MULLAN, M., CRAWFORD, F., AXELMAN, K., HOULDEN, H., LILIUS, L., WINBLAD, B. & LANNFELT, L. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*, 1, 345-7.
- NYBORG, A. C., LADD, T. B., ZWIZINSKI, C. W., LAH, J. J. & GOLDE, T. E. 2006. Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Mol Neurodegener*, 1, 3.
- OFFE, K., DODSON, S. E., SHOEMAKER, J. T., FRITZ, J. J., GEARING, M., LEVEY, A. I. & LAH, J. J. 2006. The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci*, 26, 1596-603.
- OLSSON, A., HOGLUND, K., SJOGREN, M., ANDREASEN, N., MINTHON, L., LANNFELT, L., BUERGER, K., MOLLER, H. J., HAMPEL, H., DAVIDSSON, P. & BLENNOW, K. 2003. Measurement of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Exp Neurol*, 183, 74-80.
- PANT, P. V., TAO, H., BEILHARZ, E. J., BALLINGER, D. G., COX, D. R. & FRAZER, K. A. 2006. Analysis of allelic differential expression in human white blood cells. *Genome Res*, 16, 331-9.
- PASTORINO, L. & LU, K. P. 2006. Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*, 545, 29-38.
- PERNECZKY, R., TSOLAKIDOU, A., ARNOLD, A., DIEHL-SCHMID, J., GRIMMER, T., FORSTL, H., KURZ, A. & ALEXOPOULOS, P. 2011. CSF soluble amyloid precursor proteins in the diagnosis of incipient Alzheimer disease. *Neurology*, 77, 35-8.
- PERNECZKY, R., WAGENPFEIL, S., LUNETTA, K. L., CUPPLES, L. A., GREEN, R. C., DECARLI, C., FARRER, L. A. & KURZ, A. 2010. Head circumference, atrophy, and cognition: implications for brain reserve in Alzheimer disease. *Neurology*, 75, 137-42.

- 
- PETERSEN, R. C., SMITH, G. E., WARING, S. C., IVNIK, R. J., TANGALOS, E. G. & KOKMEN, E. 1999. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*, 56, 303-8.
- PRITCHARD, J. K. & COX, N. J. 2002. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum Mol Genet*, 11, 2417-23.
- REITZ, C., CHENG, R., ROGAEVA, E., LEE, J. H., TOKUHIRO, S., ZOU, F., BETTENS, K., SLEEGERS, K., TAN, E. K., KIMURA, R., SHIBATA, N., ARAI, H., KAMBOH, M. I., PRINCE, J. A., MAIER, W., RIEMENSCHNEIDER, M., OWEN, M., HAROLD, D., HOLLINGWORTH, P., CELLINI, E., SORBI, S., NACMIAS, B., TAKEDA, M., PERICAK-VANCE, M. A., HAINES, J. L., YOUNKIN, S., WILLIAMS, J., VAN BROECKHOVEN, C., FARRER, L. A., ST GEORGE-HYSLOP, P. H. & MAYEUX, R. 2011. Meta-analysis of the association between variants in SORL1 and Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 68, 99-106.
- REYNOLDS, C. A., HONG, M. G., ERIKSSON, U. K., BLENNOW, K., JOHANSSON, B., MALMBERG, B., BERG, S., GATZ, M., PEDERSEN, N. L., BENNET, A. M. & PRINCE, J. A. 2010. Sequence variation in SORL1 and dementia risk in Swedes. *Neurogenetics*, 11, 139-42.
- ROGAEVA, E., MENG, Y., LEE, J. H., GU, Y., KAWARAI, T., ZOU, F., KATAYAMA, T., BALDWIN, C. T., CHENG, R., HASEGAWA, H., CHEN, F., SHIBATA, N., LUNETTA, K. L., PARDOSSI-PIQUARD, R., BOHM, C., WAKUTANI, Y., CUPPLES, L. A., CUENCO, K. T., GREEN, R. C., PINESSI, L., RAINERO, I., SORBI, S., BRUNI, A., DUARA, R., FRIEDLAND, R. P., INZELBERG, R., HAMPE, W., BUJO, H., SONG, Y. Q., ANDERSEN, O. M., WILLNOW, T. E., GRAFF-RADFORD, N., PETERSEN, R. C., DICKSON, D., DER, S. D., FRASER, P. E., SCHMITT-ULMS, G., YOUNKIN, S., MAYEUX, R., FARRER, L. A. & ST GEORGE-HYSLOP, P. 2007. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, 39, 168-77.
- ROSEN, C., ANDREASSON, U., MATTSSON, N., MARCUSSON, J., MINTHON, L., ANDREASEN, N., BLENNOW, K. & ZETTERBERG, H. 2012. Cerebrospinal fluid profiles of amyloid beta-related biomarkers in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 14, 65-73.

- 
- SAGER, K. L., WUU, J., LEURGANS, S. E., REES, H. D., GEARING, M., MUFSON, E. J., LEVEY, A. I. & LAH, J. J. 2007. Neuronal LR11/sorLA expression is reduced in mild cognitive impairment. *Ann Neurol*, 62, 640-7.
- SAß, H. 2003. *Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen: Textrevision; DSM-IV-TR*, Göttingen, Hogrefe.
- SCHERZER, C. R., OFFE, K., GEARING, M., REES, H. D., FANG, G., HEILMAN, C. J., SCHALLER, C., BUJO, H., LEVEY, A. I. & LAH, J. J. 2004. Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 61, 1200-5.
- SELKOE, D. J. 2000. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci*, 924, 17-25.
- SELKOE, D. J. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 81, 741-66.
- SERRETTI, A., OLGATI, P. & DE RONCHI, D. 2007. Genetics of Alzheimer's disease. A rapidly evolving field. *J Alzheimers Dis*, 12, 73-92.
- SESHADRI, S., DESTEFANO, A. L., AU, R., MASSARO, J. M., BEISER, A. S., KELLY-HAYES, M., KASE, C. S., D'AGOSTINO, R. B., SR., DECARLI, C., ATWOOD, L. D. & WOLF, P. A. 2007. Genetic correlates of brain aging on MRI and cognitive test measures: a genome-wide association and linkage analysis in the Framingham Study. *BMC Med Genet*, 8 Suppl 1, S15.
- SHERRY, S. T., WARD, M. H., KHOLODOV, M., BAKER, J., PHAN, L., SMIGIELSKI, E. M. & SIROTKIN, K. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29, 308-11.
- SHIBATA, N., OHNUMA, T., BABA, H., HIGASHI, S., NISHIOKA, K. & ARAI, H. 2008. Genetic association between SORL1 polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 26, 161-4.
- SPOELGEN, R., VON ARNIM, C. A., THOMAS, A. V., PELTAN, I. D., KOKER, M., DENG, A., IRIZARRY, M. C., ANDERSEN, O. M., WILLNOW, T. E. & HYMAN, B. T. 2006.

- 
- Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme. *J Neurosci*, 26, 418-28.
- STOCKLEY, J. H. & O'NEILL, C. 2008. Understanding BACE1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3265-89.
- TAIRA, K., BUJO, H., HIRAYAMA, S., YAMAZAKI, H., KANAKI, T., TAKAHASHI, K., ISHII, I., MIIDA, T., SCHNEIDER, W. J. & SAITO, Y. 2001. LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of ApoE-rich lipoproteins in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 1501-6.
- TAN, E. K., LEE, J., CHEN, C. P., TEO, Y. Y., ZHAO, Y. & LEE, W. L. 2009. SORL1 haplotypes modulate risk of Alzheimer's disease in Chinese. *Neurobiol Aging*, 30, 1048-51.
- TSOLAKIDOU, A., ALEXOPOULOS, P., GUO, L. H., GRIMMER, T., WESTERTEICHER, C., KRATZER, M., JIANG, M., BUJO, H., ROSELLI, F., LEANTE, M. R., LIVREA, P., KURZ, A. & PERNECZKY, R. 2012. beta-Site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 activity is related to cerebrospinal fluid concentrations of sortilin-related receptor with A-type repeats, soluble amyloid precursor protein, and tau. *Alzheimers Dement*.
- UN, D. 2009. World Population Ageing 2009. New York.
- VAN NOSTRAND, W. E., WAGNER, S. L., SHANKLE, W. R., FARROW, J. S., DICK, M., ROZEMULLER, J. M., KUIPER, M. A., WOLTERS, E. C., ZIMMERMAN, J., COTMAN, C. W. & ET AL. 1992. Decreased levels of soluble amyloid beta-protein precursor in cerebrospinal fluid of live Alzheimer disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2551-5.
- VANDERMEEREN, M., MERCKEN, M., VANMECHELEN, E., SIX, J., VAN DE VOORDE, A., MARTIN, J. J. & CRAS, P. 1993. Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem*, 61, 1828-34.

- 
- VASSAR, R., BENNETT, B. D., BABU-KHAN, S., KAHN, S., MENDIAZ, E. A., DENIS, P., TELOW, D. B., ROSS, S., AMARANTE, P., LOELOFF, R., LUO, Y., FISHER, S., FULLER, J., EDENSON, S., LILE, J., JAROSINSKI, M. A., BIERE, A. L., CURRAN, E., BURGESS, T., LOUIS, J. C., COLLINS, F., TREANOR, J., ROGERS, G. & CITRON, M. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286, 735-41.
- WANG, D. G., FAN, J. B., SIAO, C. J., BERNO, A., YOUNG, P., SAPOLSKY, R., GHANDOUR, G., PERKINS, N., WINCHESTER, E., SPENCER, J., KRUGLYAK, L., STEIN, L., HSIE, L., TOPALOGLOU, T., HUBBELL, E., ROBINSON, E., MITTMANN, M., MORRIS, M. S., SHEN, N., KILBURN, D., RIOUX, J., NUSBAUM, C., ROZEN, S., HUDSON, T. J., LIPSHUTZ, R., CHEE, M. & LANDER, E. S. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280, 1077-82.
- WENHAM, P. R., PRICE, W. H. & BLANDELL, G. 1991. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet*, 337, 1158-9.
- WHO 2012. Dementia. *Fact sheet N°362*. April 2012 ed.: World Health Organization.
- WILLNOW, T. E. 1998. Receptor-associated protein (RAP): a specialized chaperone for endocytic receptors. *Biol Chem*, 379, 1025-31.
- WILLNOW, T. E., PETERSEN, C. M. & NYKJAER, A. 2008. VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci*, 9, 899-909.
- WIMO, A., WINBLAD, B., AGUERO-TORRES, H. & VON STRAUSS, E. 2003. The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 17, 63-7.
- WIMO, A., WINBLAD, B. & JONSSON, L. 2010. The worldwide societal costs of dementia: Estimates for 2009. *Alzheimers Dement*, 6, 98-103.
- WINBLAD, B., PALMER, K., KIVIPELTO, M., JELIC, V., FRATIGLIONI, L., WAHLUND, L. O., NORDBERG, A., BACKMAN, L., ALBERT, M., ALMKVIST, O., ARAI, H., BASUN, H., BLENNOW, K., DE LEON, M., DECARLI, C., ERKINJUNTTI, T., GIACOBINI, E., GRAFF, C., HARDY, J., JACK, C., JORM, A., RITCHIE, K., VAN

- 
- DUIJN, C., VISSER, P. & PETERSEN, R. C. 2004. Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J Intern Med*, 256, 240-6.
- YAMAZAKI, H., BUJO, H., KUSUNOKI, J., SEIMIYA, K., KANAKI, T., MORISAKI, N., SCHNEIDER, W. J. & SAITO, Y. 1996. Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem*, 271, 24761-8.
- ZETTERBERG, H., ANDREASSON, U., HANSSON, O., WU, G., SANKARANARAYANAN, S., ANDERSSON, M. E., BUCHHAVE, P., LONDOS, E., UMEK, R. M., MINTHON, L., SIMON, A. J. & BLENNOW, K. 2008. Elevated cerebrospinal fluid BACE1 activity in incipient Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 65, 1102-7.
- ZETTERBERG, H., BLENNOW, K. & HANSE, E. 2010. Amyloid beta and APP as biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 45, 23-9.
- ZHAO, Y., CUI, J. G. & LUKIW, W. J. 2007. Reduction of sortilin-1 in Alzheimer hippocampus and in cytokine-stressed human brain cells. *Neuroreport*, 18, 1187-91.
- ZHONG, Z., EWERS, M., TEIPEL, S., BURGER, K., WALLIN, A., BLENNOW, K., HE, P., MCALLISTER, C., HAMPEL, H. & SHEN, Y. 2007. Levels of beta-secretase (BACE1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment. *Arch Gen Psychiatry*, 64, 718-26.
- ZHOU, Z. D., CHAN, C. H., MA, Q. H., XU, X. H., XIAO, Z. C. & TAN, E. K. 2011. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr*, 5, 280-92.

---

## 7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar, für diese Möglichkeit danke ich Herrn Professor Dr. Hans Förstl als Direktor dieser Klinik.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Robert Perneczky für die Vergabe des Themas und die hervorragende Betreuung, die sich in zahlreichen konstruktiven Anregungen, stets reichlich bemessener Zeit für offene Fragen und einer motivierenden, begeisternden Arbeitsatmosphäre niederschlug.

Bei Frau Dr. Lianghao Guo bedanke ich mich sehr für ihre kompetente Unterstützung, sowie für Rat und Tat bei der Durchführung meiner Arbeit.

An Herrn Dr. Panos Alexopoulos geht ein großes Dankeschön für seine Hilfsbereitschaft und viele wertvolle Ratschläge.

Bei Frau Tamara Eisele möchte ich mich für ihre Geduld bei der Beantwortung vieler technischer Fragen bedanken.

Ganz herzlich danke ich auch Frau Dipl. Psych. Christine Welzel und meiner Mitdotorandin Martina Kratzer für die gute Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir mit ihrer Unterstützung, ihrem Interesse, ihrem Humor und ihrem Optimismus mein Studium und so vieles darüber hinaus ermöglicht und vereinfacht haben.

---

## 8 Lebenslauf

## 9 Anhang

Übersichtstabelle 1: SORL1 SNPs Allel- und Genotypverteilung

SNP	Database Nr.	Polymorph.	Allel	Alle Patienten		AK		MCI		Genotyp	Alle Patienten		AK		MCI	
				n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%
SNP4	rs661057	C/T	C	62	40.5	26	41.3	36	40.0	TT	43	41.0	18	40.9	25	41.0
			T	91	59.5	37	58.7	54	60.0	CT	48	45.7	19	43.2	29	47.5
											CC	14	13.3	7	15.9	7
SNP8	rs668387	T/C	C	92	60.1	37	56.1	55	63.2	CC	44	41.9	15	34.1	29	47.5
			T	61	39.9	29	43.9	32	36.8	CT	48	45.7	22	50.0	26	42.6
											TT	13	12.4	7	15.9	6
SNP9	rs689021	A/G	A	61	39.9	29	43.9	55	63.2	GG	44	41.9	15	34.1	29	47.5
			G	92	60.1	37	56.1	32	36.8	AG	48	45.7	22	50.0	26	42.6
											AA	13	12.4	7	15.9	6
SNP10	rs641120	C/T	C	61	40.1	29	44.6	55	63.2	TT	44	41.9	15	34.1	29	47.5
			T	91	59.9	36	55.4	32	36.8	CT	47	44.8	21	47.7	26	42.6
											CC	14	13.3	8	18.2	6
SNP19	rs2070045	G/T	G	45	31.0	18	30.0	27	31.8	TT	60	57.1	26	59.1	34	55.7
			T	100	69.0	42	70.0	58	68.2	GT	40	38.1	16	36.4	24	39.3
											GG	5	4.8	2	4.5	3
SNP21	rs18ex26	G/C	C	104	92.0	44	88.0	60	95.2	CC	96	91.4	38	86.4	58	95.1

			G	9	8.0	6	12.0	3	4.8	CG	8	7.6	6	13.6	2	3.3
										GG	1	1.0	0	0	1	1.6
<b>SNP22</b>	rs1699102	C/T	C	58	38.4	22	36.7	36	39.6	TT	47	44.8	22	50	25	41.0
			T	93	61.60	38	63.3	55	60.4	CT	46	43.8	16	36.4	30	49.2
										CC	12	11.4	6	13.6	6	9.8
<b>SNP23</b>	rs3824968	A/T	A	57	37.7	23	37.7	34	37.8	TT	48	45.7	21	47.7	27	44.3
			T	94	62.2	38	62.3	56	62.2	AT	46	43.8	17	38.6	29	47.5
										AA	11	10.5	6	13.6	5	8.2
<b>SNP24</b>	rs22822649	T/C	C	98	64.9	40	64.5	58	65.2	CC	52	49.5	22	50.0	30	49.2
			T	53	35.1	22	35.5	31	34.8	CT	46	43.8	18	40.9	28	45.9
										TT	7	6.7	4	9.1	3	4.9
<b>SNP25</b>	rs1010159	C/T	C	60	39.2	25	40.3	35	38.5	TT	45	42.9	19	43.2	26	42.6
			T	93	60.8	37	59.7	56	61.5	CT	48	45.7	18	40.9	30	49.2
										CC	12	11.4	7	15.9	5	8.2
	<b>rs11600875</b>	T/C	C	104	81.2	43	78.2	61	83.6	CC	81	77.1	32	72.7	49	80.3
			T	24	18.7	12	21.8	12	16.4	CT	23	21.9	11	25	12	19.7
										TT	1	1	1	2.3	0	0

**Übersichtstabelle 2: SORL1-Haplotypverteilung**

SNP	Haplotyp	Alle Patienten		AK		MCI	
		n	%	n	%	n	%
<b>8</b>	CAC	48	11.0	22	11.3	26	10.7
<b>9</b>	TGT	47	10.8	21	10.8	26	10.7
<b>10</b>	CAT	47	10.8	21	10.8	26	10.7
	TGC	48	11.0	22	11.3	26	10.7
	CGC	48	11.0	22	11.3	26	10.7
	TAT	47	10.8	21	10.8	26	10.7
	CGT	91	20.8	36	18.6	55	22.5
	TAC	61	14.0	29	14.9	32	13.1
<b>19</b>	GCA	44	18.3	18	17.5	26	19.0
<b>21</b>	TGT	9	3.8	6	5.8	3	2.2
<b>23</b>	GCT	36	15.0	13	12.6	23	16.8
	TGA	3	1.3	3	2.9	0	0.0
	GGA	2	0.8	2	1.9	0	0.0
	TCT	92	38.3	38	36.9	54	39.4
	GGT	2	0.8	2	1.9	0	0.0
	TCA	52	21.7	21	20.4	31	22.6
<b>22</b>	CAC	47	11.5	17	11.0	30	11.8
<b>23</b>	TTT	42	10.3	16	10.4	26	10.2
<b>24</b>	CAT	51	12.5	20	13.0	31	12.2
	TTC	93	22.9	38	24.7	55	21.7
	CTC	47	11.5	16	10.4	31	12.2
	TAT	42	10.3	16	10.4	26	10.2
	CTT	40	9.8	14	9.1	26	10.2
	TAC	45	11.1	17	11.0	28	11.0
<b>23</b>	ACC	49	11.8	19	11.9	30	11.8

---

<b>24</b>	TTT	41	9.9	15	9.4	26	10.2
<b>25</b>	ACT	45	10.9	16	10.1	29	11.4
	TTC	42	10.1	16	10.1	26	10.2
	ATC	53	12.8	22	13.8	31	12.2
	TCT	93	22.5	37	23.3	56	22.0
	ATT	41	9.9	15	9.4	26	10.2
	TCC	49	11.8	19	11.9	30	11.8

---

---