

Aus dem Bereich Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Identifizierung von Morbus Alzheimer Kandidatengeneten auf Basis der Einzelnukleotid- Polymorphismus Genotypisierung

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2012



UKS

Universitätsklinikum des Saarlandes
und Medizinische Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von: Thomas M. Feulner
geb. am: 03.03.1981 in Bonn

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Riemenschneider

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Tobias Hartmann

2.

1 Inhalt

1	<u>INHALT.....</u>	<u>IV</u>
2	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>- 1 -</u>
2.1	SUMMARY.....	- 3 -
3	<u>EINLEITUNG</u>	<u>- 4 -</u>
3.1	DIE ALZHEIMER KRANKHEIT	- 4 -
3.2	RISIKOFAKTOREN DER ALZHEIMER KRANKHEIT	- 5 -
3.3	EINZELNUKLEOTID-POLYMORPHISMUS	- 7 -
3.4	DAS HAPMAP UND DAS 1000 GENOM PROJEKT	- 8 -
3.5	GENOMWEITE KOPPLUNGS- UND ASSOZIATIONS-STUDIEN	- 9 -
3.6	QUANTITATIVE MARKER (ENDOPHÄNOTYPEN).....	- 12 -
4	<u>MATERIAL UND METHODIK.....</u>	<u>- 15 -</u>
4.1	MATERIAL.....	- 15 -
4.1.1	DNA	- 15 -
4.1.2	PATIENT / KONTROLL - KOHORTEN	- 15 -
4.1.2.1	KOLLEKTIV DER INITIALEN GWAS	- 15 -
4.1.2.2	KOLLEKTIV DES KANDIDATENGENANSATZES FÜR <i>TACR2</i>	- 15 -
4.1.2.3	KOLLEKTIV DER ERWEITERTEN GWAS	- 16 -
4.1.2.4	KOLLEKTIVE INTERNATIONALER KONSORTIEN.....	- 17 -
4.1.2.5	KOLLEKTIVE ZUR VALIDIERUNG MITTELS SEQUENOM	- 17 -
4.1.2.5.1	MÜNCHEN-KOLLEKTIV (<i>AB₄₂</i>).....	- 17 -
4.1.2.5.2	SCHWEDEN-KOLLEKTIV (<i>AB₄₂</i>).....	- 18 -
4.1.2.6	ZUSAMMENFASSUNG DER KOLLEKTIVE.....	- 18 -
4.1.3	PRIMER.....	- 19 -
4.1.4	GERÄTE.....	- 19 -
4.1.5	PUFFER, LÖSUNGEN, ENZYME, REAGENZIEN UND REAKTIONSKITS.....	- 20 -
4.1.5.1	DNA ISOLIERUNG	- 20 -
4.1.5.2	PUFFER, LÖSUNGEN, ENZYME UND REAGENZIEN	- 20 -
4.1.5.3	REAKTIONSKITS	- 21 -
4.1.5.4	SOFTWARE, DATENBANKEN	- 21 -
4.2	METHODIK	- 22 -
4.2.1	ISOLIERUNG UND AUFBEREITUNG GENOMISCHER DNA	- 22 -
4.2.2	GENOMWEITE AMPLIFIKATION (<i>WHOLE GENOME AMPLIFICATION</i>).....	- 22 -
4.2.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG UND ÜBERPRÜFUNG DER REINHEIT DER ISOLIERTEN DNA	- 23 -
4.2.4	ERHEBUNG KLINISCHER DATEN (ENDOPHÄNOTYPEN)	- 24 -
4.2.5	PRINZIP DER POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	- 25 -
4.2.6	AGAROSEGELELEKTROPHORESE DER PCR-PRODUKTE	- 26 -
4.2.7	GENOTYPISIERUNG	- 27 -
4.2.7.1	APOLIPOPOTEINE	- 27 -
4.2.7.2	ILLUMINA GENOTYPISIERUNG.....	- 29 -
4.2.7.3	SEQUENOM GENOTYPISIERUNG	- 31 -
4.2.8	STATISTIK	- 37 -
4.2.8.1	STATISTISCHE BEGRIFFE	- 38 -
4.2.8.1.1	ODDS RATIO (OR)	- 38 -

Inhalt

4.2.8.1.2	BONFERRONI KORREKTUR.....	- 38 -
4.2.8.1.3	HARDY WEINBERG	- 39 -
4.2.8.1.4	KOPPLUNGSUNGLEICHGEWICHT	- 40 -
4.2.8.1.5	ABSCHÄTZUNG VON HAPLOTYPFREQUENZEN	- 41 -
4.2.8.2	FALL/KONTROLL-STUDIEN.....	- 43 -
4.2.8.3	QUALITÄTSKONTROLLE UND ANALYSE DER ERWEITERTEN GWAS.....	- 43 -
4.2.8.4	IMPUTATION.....	- 45 -
4.2.8.5	SLIDING WINDOW	- 45 -
4.2.8.6	META-ANALYSE	- 46 -
5	<u>ERGEBNISSE</u>	- 47 -
5.1	INITIALE GWAS	- 47 -
5.1.1	ALZGENE	- 47 -
5.1.2	AUFBAU DER STUDIE	- 47 -
5.1.3	ANALYSE DER 11 KANDIDATENGENE	- 48 -
5.1.3.1	APOE	- 48 -
5.1.3.2	GAB2	- 48 -
5.1.3.3	CHRNA2	- 50 -
5.1.3.4	CH25H	- 52 -
5.1.3.5	PGBD1	- 54 -
5.1.3.6	LMNA.....	- 56 -
5.1.3.7	CST3	- 58 -
5.1.3.8	PCK1.....	- 60 -
5.1.3.9	ACE.....	- 62 -
5.1.3.10	MAPT	- 64 -
5.1.3.11	SORL1	- 66 -
5.2	TACHYKININ REZEPTOR 2 ALS KANDIDATENGEN	- 69 -
5.3	ERWEITERTE GWAS	- 72 -
5.3.1	FALL/KONTROLL-ANSATZ IN INTERNATIONALEN KONSORTIEN	- 74 -
5.3.2	QUANTITATIVE MARKER ANALYSEN	- 80 -
5.3.2.1	<i>CR1 (COMPLEMENT RECEPTOR 1)</i>	- 81 -
5.3.2.2	<i>MS4A CLUSTER (MEMBRANE-SPANNING 4-DOMAINS, SUBFAMILY A)</i>	- 84 -
5.3.2.3	<i>SORL1 (SORTILIN-RELATED RECEPTOR 1)</i>	- 84 -
5.3.2.4	<i>ARID5B (AT-RICH INTERACTION DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 5B)</i>	- 86 -
5.3.2.5	<i>BIN1 (BRIDGING INTEGRATOR 1)</i>	- 87 -
5.3.2.6	<i>GOLM1 (GOLGI MEMBRANE PROTEIN 1)</i>	- 88 -
5.3.2.7	<i>CD2AP (CD2-ASSOCIATED PROTEIN)</i>	- 89 -
5.3.2.8	ÜBRIGE REGIONEN	- 90 -
5.3.3	VALIDIERUNG DES <i>LINGO1</i> LOCUS MIT AB ₄₂ ALS QUANTITATIVER MARKER	- 91 -
6	<u>DISKUSSION</u>	- 95 -
6.1	VALIDIERUNG DER TOP 11 GENE VON ALZGENE	- 95 -
6.2	KANDIDATENGENANSATZ FÜR TACR2	- 100 -
6.3	FALL/KONTROLL ANSATZ IN INTERNATIONALEN KONSORTIEN	- 101 -
6.4	KANDIDATENGENANALYSE – QUANTITATIVE MARKER	- 103 -
6.5	LINGO1 LOCUS	- 106 -
6.6	FAZIT	- 107 -
7	<u>ANHANG</u>	CIX
7.1	LITERATURVERZEICHNIS	CIX

Inhalt

7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	CXXV
7.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	CXXVII
7.4	TABELLENVERZEICHNIS	CXXVIII
7.5	WEBLINKVERZEICHNIS	CXXIX
7.6	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT.....	CXXX
7.7	KOOPERATIONEN.....	CXXXI
7.8	ERGÄNZENDE ERGEBNISSE DER KANDIDATENGENANALYSE (5.1.3)	CXXXIII
7.9	ERGEBNISSE DER INTERNATIONALEN META-STUDIE	CXXXVII
7.10	ZUSÄTZLICHE ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN MARKER ANALYSEN	CXL
8	<u>DANK.....</u>	<u>CXLIX</u>
9	<u>PUBLIKATIONEN.....</u>	<u>CL</u>
9.1	PUBLIKATIONEN	CL
9.2	POSTER.....	CLI
10	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>CLIII</u>

2 Zusammenfassung

Die Alzheimer Krankheit ist, in der nicht familiären Form, eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, bei der viele Gene, die jeweils nur einen kleinen Beitrag zur Entwicklung der Krankheit haben, eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss diverser Risikoloci untersucht, die zum einen in Fall/Kontroll Ansätzen analysiert wurden und zum andern wurde der Einfluss von klinisch erhobenen Parametern und neuropsychologischen Testergebnissen in einem reinen Patientenkollektiv analysiert.

Genotypisiert wurden Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs), die den größten Teil der genetischen Variabilität beim Menschen darstellen. Technisch erfolgte die Genotypisierung zum einen, mit Hilfe einer Illumina (Fluoreszenz basiert) *bead* Chip Plattform und zum anderen durch eine Sequenom (MALDI-TOF-MS) Plattform.

Zuerst wurden Daten aus einer initialen genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) auf, bis dato, gefundene Risikoloci untersucht. Hierbei wurden insgesamt 11 Gene und deren direkte Nachbarschaft untersucht, die in vorherigen Studien den stärksten Einfluss zeigten. Dazu gehörten: *APOE*, *GAB2*, *CHRNA2*, *CH25H*, *PGBD1*, *LMNA*, *CST3*, *PCK1*, *ACE*, *MAPT* und *SORL1*. Außer für die Gene *GAB2* und *ACE* konnten nominell signifikante Assoziation mit der Alzheimer Krankheit gezeigt werden. Den stärksten Einfluss zeigte ein SNP in dem Gen *TOMM40*, das ein direkter Nachbar des *APOE* Gens ist (Feulner et al., 2010).

Das *TACR2* Gen wurde in einem Kandidatengenansatz genauer untersucht, allerdings konnte hier keine Assoziation nachgewiesen werden (Feulner et al., 2011). Des Weiteren konnte der *LINGO1* Locus, der in der „Erweiterten GWAS“ Assoziation mit dem Endophänotyp A β ₄₂ im Liquor zeigte, in einem unabhängigen Alzheimer Kollektiv nicht repliziert werden.

Danach folgte eine Analyse unserer GWAS Daten in einer großen Meta-Analyse, mit anderen verfügbaren GWAS Datensätzen eines internationalen Konsortiums. Hierbei wurden neue Risikoloci identifiziert (Hollingworth et al., 2011). Um diese neuen Loci im Weiteren funktionell zu charakterisieren, wurden Varianten (SNPs) dieser Loci mit verfügbaren endophänotypischen Daten korreliert. Hierbei zeigten vor allem die Loci *CRI*, *SORL1*, *ARID5B*, *BINI*, *GOLM1*, *CD2AP* und das *MS4A* Gen Cluster Assoziationen zu unterschiedlichen Endophänotypen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit halfen, Risikogene zu validieren oder zu verwerfen und neue Risikoloci hervorbrachte. Besonders die neu identifizierten Loci und deren funktionelle Charakterisierung durch Assoziation mit Endophänotypen werden nützlich, für das weitere Verstehen der Pathomechanismen der

Zusammenfassung

Alzheimer Krankheit, sein. Allerdings bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um vor allem die eigentlichen funktionellen Varianten und deren pathologische Auswirkungen genauer zu charakterisieren und identifizieren.

2.1 Summary

„Identification of Morbus Alzheimer candidate genes based on genotyping of single-nucleotide-polymorphisms“

Alzheimer's disease (AD) is a complex multifactorial disease, at which multiple genes are involved, each with low impact to develop the disease. In this thesis the impact of some candidate genes has been investigated, using case/control approaches. Moreover, the impact on clinical parameters and neuropsychological tests in a case-cohort was investigated.

The cohorts were genotyped for single-nucleotide-polymorphisms (SNPs), which account for most of the human genetic variability. Technically, the genotyping was performed with either an Illumina (fluorescence-based) bead-chip, or with a Sequenom(MALDI-TOF-MS) platform. First, data from our initial genomewide association study (GWAS) were analysed, according to known risk loci. Here, in total 11 genes and their direct genetic proximity, that showed strong association signals in previous studies, were investigated. These include: *APOE*, *GAB2*, *CHRNA2*, *CH25H*, *PGBD1*, *LMNA*, *CST3*, *PCK1*, *ACE*, *MAPT* and *SORL1*. Except for the genes *GAB2* and *ACE* we observed nominal significant associations with AD. Remarkable, the strongest impact was found for a SNP located at the *TOMM40* gene, that is in high linkage disequilibrium to *APOE* gene (Feulner et al., 2010).

The *TACR2* gene was more precisely investigated in a candidate gene approach, where we could not find association (Feulner et al., 2011). Further, the *LINGO1* locus, which showed association with the endophenotype A β ₄₂ (in liquor) in the enlarged GWAS, could not be validated in independent Alzheimer cohorts.

We next combined our GWAS data in a large meta-analysis with other available GWAS datasets from an international consortium (Hollingworth et al., 2011), which lead to the identification of new risk loci. In order to further annotate these risk loci functionally, we correlated variations within these loci with available endophenotype data. Here, especially the loci *CRI*, *SORL1*, *ARID5B*, *BINI*, *GOLM1*, *CD2AP* and the *MS4A* gene cluster showed association to several endophenotypes.

In summary, the data presented in this thesis helped to validate or reject previous risk genes, and to identify new ones. Especially the newly identified GWAS hits and their functional characterization via association with endophenotypes will be useful in further understanding the pathology of the disease. However, further investigations are necessary for a detailed functional characterization of variants and their pathological impact.

3 Einleitung

3.1 Die Alzheimer Krankheit

Die Alzheimer Krankheit wurde das erste Mal von Alois Alzheimer auf einer Tagung, im Jahr 1906, in Tübingen beschrieben (Alzheimer, 1907). Charakteristisch für die Erkrankung sind ein schleichender Beginn und ein progredienter Verlauf der Krankheit. Es treten kognitive Beeinträchtigungen auf, die das Gedächtnis, Urteilsvermögen, räumliches und zeitliches Orientierungsvermögen, Sprache und Lernen betreffen können. Verhaltensauffälligkeiten wie Enthemmung, Euphorie, ein niedriges Maß an Frustrationstoleranz, emotionale Instabilität, leichte Reizbarkeit, Aggressivität, verändertes Sexualverhalten, sowie eine zunehmende Einschränkung der Aktivität des täglichen Lebens, gehören oft zum Erscheinungsbild der Alzheimer Krankheit (Förstl, 2000). Es kann zusätzlich zu Begleiterscheinungen wie Depressionen, Angstgefühlen, Sinnestäuschungen, Wahnvorstellungen, usw. kommen. Die Identifizierung der frühen Symptome, zur Abgrenzung von anderen Demenzarten, die teilweise ähnliche Symptome in anderer Reihenfolge und Stärke zeigen, ist entscheidend. Die üblichen Diagnose-Kriterien sind in der zehnten Ausgabe des *International Classification of Disease* (ICD 10) und in der vierten Ausgabe von *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM IV) der Amerikanischen Gesellschaft für Psychiatrie beschrieben. Ein spezielles Diagnose-Konzept wurde aus einer Kollaboration von Arbeitsgruppen des *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* (NINCDS) und der *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRD) vorgestellt (McKhann et al. 1984; McKhann et al. 2011).

Die wichtigsten histopathologischen Marker im Gehirn von Alzheimer Patienten sind senile Plaques (sog. „plaques“) und fibrilläre Ablagerungen (sog. „tangles“). Plaques bestehen hauptsächlich aus extrazellulärem Beta-amyloid-Peptid (A β) (Pro et al. 1980; Tanzi et al. 1987; Verdile et al. 2004). Tangles sind intrazelluläre, abnormale, gedrehte oder gestreckte, Filamente, die hauptsächlich aus einer hyper-phosphorylierten (García & Jay 2004; Gómez-Ramos et al. 2004; Tanzi, St George-Hyslop et al. 1987) und hyper-glykosylierten (Gong, Liu, Grundke-Iqbal, & Iqbal, 2005) Form des Tau-Proteins bestehen. Zusammen mit entzündlichen Vorgängen im Gehirn könnten diese histopathologischen Marker zu der Degeneration von Neuronen beitragen.

Zurzeit werden weltweit etwa 26 Millionen Alzheimerfälle geschätzt (van Es & van den Berg 2009), davon, nach Bundesministerium für Familie, Senioren, Frauen und Jugend (BMFSFJ),

ca. 1 200 000 in Deutschland (Oktober 2010), meist wird die Krankheit ab einem Alter von 65 Jahren diagnostiziert. In Anbetracht der globalen demographischen Bevölkerungsentwicklung, ist für die Zukunft ein deutlicher Anstieg von Alzheimer Fällen zu erwarten. Im Jahr 2020 werden, laut BMFSFJ, ca. 1 400 000 Menschen an Alzheimer in Deutschland erkrankt sein, 2050 sollen es sogar 2 Millionen Menschen sein (Prognose von Oktober 2010).

Nur etwa 1% der Erkrankten leiden an einer familiären Form von Alzheimer, die autosomal dominant durch Mutationen in drei Genen vererbt wird: *APP* (*amyloid beta (A4) precursor protein*) (Goate et al. 1991), *PSEN1* (presenilin 1) (Sherrington et al., 1995) und *PSEN2* (presenilin 2) (Levy-Lahad, Wasco, et al., 1995). Die weit verbreitetere Form ist die sporadische *late-onset* Alzheimer Erkrankung (LOAD), für die bisher nur das $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoprotein E (*APOE*), als stark assoziiertes Risikogen identifiziert werden konnte (Corder et al. 1993), wohingegen das $\epsilon 2$ -Allel als protektiv gilt (Corder et al. 1994). Spätere genetische Assoziationsstudien haben bestätigt, dass *APOE* einer der Hauptrisikofaktoren der Alzheimer Erkrankung ist und einen Einfluss von bis zu 50% des genetischen Risikos ausmacht (Ashford & Mortimer, 2002; Waring & Rosenberg, 2008). In den letzten Jahren wurde klar, dass es wohl keinen weiteren einzelnen genetischen Risikolocus gibt, der einen vergleichbar hohen Einfluss, wie den des *APOE* $\epsilon 4$ -Allels, hat. Daher wurden umfangreiche genomweite Assoziationsstudien (GWAS) durchgeführt, die in der Lage sind auch kleinere mit der Krankheit assoziierte Effekte zu finden.

3.2 Risikofaktoren der Alzheimer Krankheit

Da die Alzheimer Krankheit eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung ist, wird sie von mehreren Faktoren beeinflusst. Neben genetischen Risikofaktoren spielen auch Umwelteinflüsse und Lebensstil eine Rolle, die zum Ausbrechen der Krankheit führen können. Der einflussreichste Risikofaktor ist das Alter, durch das die Prävalenz exponentiell ansteigt. Nach Schätzungen sind ca. 20% der über Achtzigjährigen, die in Industrieländern leben, von der Krankheit betroffen (Letenneur et al. 2004). Dadurch, dass Frauen eine durchschnittlich höhere Lebenserwartung als Männer haben, tritt die Krankheit auch häufiger bei Frauen auf (Corder et al. 2004).

Neben dem unvermeidbaren Altern und genetischer Disposition sind Risikofaktoren wie ein aufgetretenes Schädel-Hirn-Trauma oder erhöhte Cholesterinwerte bekannt (Grossman, Bergmann, & Parker, 2006; Reid, Urano, Kodama, & Hamakubo, 2007). Auch komplexe

Erkrankungen, wie *Diabetes mellitus* (Gasparini et al. 2002; I. Kim et al. 2010; Xu et al. 2004) und Hyperinsulinismus (Luchsinger, Tang, Shea, et al. 2004) konnten durch mehrere Studien mit Alzheimer in Verbindung gebracht werden. Einen zeitlich verzögerten Ausbruch der Krankheit kann bei Menschen, die sich bis ins hohe Alter geistig fit halten (Colucci et al., 2006; Karp et al., 2004), und/oder ein hohes Bildungsniveau haben (Qiu et al. 2003; Smyth et al. 2004; Stern et al. 1994), beobachtet werden. Widersprüchliche Ergebnisse gibt es zu dem Einfluss von Nikotin auf die Alzheimer Krankheit, wenige Studien haben einen protektiven Einfluss gezeigt (Hellström-Lindahl et al. 2004; van Duijn & Hofman 1991), die meisten aber zeigen einen negativen Einfluss des Rauchens in Verbindung mit der Alzheimer Erkrankung (Juan et al., 2004; Ott et al., 2004, 1998). Der Konsum von Alkohol wurde ebenfalls in diversen Studien untersucht, mit dem Ergebnis, dass geringe Mengen Alkohol einen potentiell protektiven Effekt zeigten (Luc Letenneur, 2004; Ruitenberg et al., 2002; Truelsen, Thudium, & Grønbaek, 2002), wohingegen regelmäßiger und übermäßiger Alkoholkonsum das Risiko erhöht, an Alzheimer zu erkranken (Luchsinger, Tang, Siddiqui, et al. 2004). Auch aktive Metallionen vor allem Aluminium (Becaria, Campbell, & Bondy, 2002), Kupfer, aber auch Eisenionen (Perry et al. 2002; Rottkamp et al. 2001), stehen in Verdacht ein potenzieller Auslöser für die Bildung von Plaques und Tangels zu sein. All diese Faktoren können nach Ausbruch der Krankheit ziemlich genau bestimmt werden, allerdings kann der Zeitpunkt des Ausbruchs und der Verlauf der Krankheit durch Kenntnis dieser Faktoren nicht festgelegt werden. Allein durch die beschriebenen Umweltfaktoren und den Lebensstil kann die Krankheit folglich nicht komplett erklärt werden, viel wahrscheinlicher scheint ein Zusammenspiel dieser Faktoren mit genetischen Risikofaktoren zu sein.

Da Mutationen in den drei bekannten Genen *PSEN1*, *PSEN2* und *APP* ausschließlich bei der familiären Form (EOAD *early onset Alzheimer Disease*) der Alzheimer Krankheit auftreten, muss es für die sporadisch auftretende Form (LOAD *late onset Alzheimer Disease*) andere genetische Risikoloci geben. Neben dem $\epsilon 4$ -Allel des *ApolipoproteinE* Gens, welches risikoerhöhend wirkt und dem $\epsilon 2$ -Allel, das eine protektive Wirkung hat, sind zahlreiche andere Loci, meist durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) entdeckt worden (Feulner et al. 2010; Harold et al. 2009; Lambert et al. 2009; Naj et al. 2011; Hollingworth et al. 2011). Einen Überblick über die aktuellen Risikoloci findet man in der Datenbank „www.alzgene.org“ (Bertram, McQueen, Mullin, Blacker, & Tanzi, 2007), in der auch zahlreiche Meta-Analysen zu den einzelnen Loci veröffentlicht sind. Da lange Zeit kein Risikolocus gefunden wurde, der einen vergleichbar starken Einfluss, wie der des $\epsilon 4$ -Alles, des *APOE* Gens aufweist, haben Forschungsgruppen kooperiert und ihre Daten in

Metastudien analysiert, um auch Gene mit kleineren Einflüssen zu identifizieren. Dabei werden oft mehrere tausend Alzheimer-Fälle mit mehreren tausend gesunden Kontrollen verglichen (Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009). Neue Risikoloci wie die Gene *CLU*, *PICALM*, *CRI* und *BINI* wurden so identifiziert. In einer nächsten Stufe, einer sogenannten Mega-Meta-Analyse wurden mehrere zehntausend Fälle und Kontrollen aus mehreren internationalen Konsortien, unter anderem auch Patienten, die durch unsere Arbeitsgruppe rekrutiert und genotypisiert wurden, analysiert. Als Ergebnis konnten neue Risikoloci identifiziert werden, dazu gehören die Loci um die Gene: *ABCA7*, *CD33*, *CD2AP*, *EPHA1* und das *MS4A* Gencluster (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011).

3.3 Einzelnukleotid-Polymorphismus

Einzelnukleotid-Polymorphismus, (*single nucleotide polymorphism*) SNP genannt, ist die häufigste Form der genetischen Variation beim Menschen. Sie stellen ca. 90% aller genetischen Varianten im menschlichen Genom dar (Collins et al. 1998). SNPs treten nicht gleich verteilt auf, sondern nur ungleichmäßig stark an bestimmten Regionen. Zwei Drittel aller SNPs bestehen aus dem Austausch von Cytosin mit Thymin.

SNPs werden im Allgemeinen als „erfolgreiche“ Punktmutationen bezeichnet, d.h. als genetische Veränderungen, die sich zu einem gewissen Grad ($\geq 1\%$) im Genpool einer Population durchgesetzt haben, so ist es möglich eine spontane Mutation von einem SNP zu unterscheiden. Als die ersten Sequenzen des 'Humanen Genomprojekts' veröffentlicht wurden, begannen zahlreiche Forschungsgruppen mit der Untersuchung und Kartierung zahlreicher SNPs (Lander et al. 2001). Da nur 3-5% der menschlichen DNA-Sequenz für Proteine kodierend sind, liegen die meisten SNPs im nichtkodierenden Bereich der DNA. Aber gerade SNPs, die in kodierenden Bereichen liegen, könnten zu einem Aminosäureaustausch bei der Proteinbiosynthese führen und damit eventuell zu einer veränderten Tertiärstruktur des Proteins führen. Dies könnte zu Beeinträchtigungen der Proteinfunktion führen.

Die wissenschaftliche Bedeutung der SNPs liegt auch im häufigen Auftreten (ca. alle 100-300 Basen), außerdem sind sie sehr schnell und einfach zu bestimmen. Deswegen werden zurzeit viele SNPs genotypisiert, welche auf eine Prädisposition für eine Krankheit schließen lassen könnten. Solche SNPs spielen nicht nur in der Diagnose von Krankheiten eine bedeutende Rolle, sondern auch in der pränatalen Diagnostik. Sie werden unter anderem auch bei der Identifikation von Individuen und bei Verwandtschaftsdiagnosen, sowie in der Forschung zur Medikamentenverträglichkeit genutzt.

3.4 Das HapMap und das 1000 Genom Projekt

Das Internationale HapMap Projekt ist eine Kollaboration von wissenschaftlichen Forschungszentren mit dem Ziel eine Haplotypkarte des menschlichen Genoms zu erstellen, welche die häufigsten genetischen Variationen beschreibt.

Ein Haplotyp ist eine Kombination von SNPs bestimmter Ausprägung. Je kleiner die physikalische Distanz zwischen zwei SNPs ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie nicht durch Rekombinationsereignisse voneinander entkoppelt werden. Es ist daher häufig möglich durch Genotypisierung eines SNP auch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit den Genotyp eines benachbarten SNP zu schätzen.

Die Daten des HapMap Projekts werden Wissenschaftlern in der ganzen Welt frei zugänglich gemacht und dienen zur Klärung der Einflüsse genetischer Varianten, z.B. auf die Gesundheit, Verträglichkeit von Medikamenten und Umwelteinflüsse. Das Projekt wird von akademischen Zentren, gemeinnütziger biomedizinischer Forscherinstituten, sowie privaten Unternehmen aus Kanada, Japan, China, Nigeria, den USA und Großbritannien getragen. Offiziell startete es im Jahr 2002 und wurde in drei Phasen eingeteilt. Die Ergebnisse der Phase I wurden am 27. Oktober 2005 veröffentlicht (International-HapMap-Consortium, 2005), in der zweiten Phase wurden erneut 3,1 Millionen SNPs bei allen 270 Individuen genotypisiert (International-HapMap-Consortium et al., 2007). Im Februar 2009 wurde eine dritte Phase veröffentlicht, in der zusätzliche 1031 Individuen genotypisiert wurden. Die HapMap soll durch die Identifizierung weitaus kleinerer Mengen spezieller Markierungs-SNPs (sog. *tagging*SNPs, siehe auch Kapitel 3.5), mit denen ein Großteil der genetischen Variationsmuster extrahiert werden kann, nahezu die gesamte genetische Variation darlegen. Die meisten verbreiteten Haplotypen treten in allen menschlichen Völkern auf, jedoch nicht in gleicher Häufigkeit. Aus diesem Grunde ist zur Identifizierung der Markierungs-SNPs die Datenerhebung aus mehreren ethnischen Gruppen notwendig. Pilotprojekte fanden eine hinreichende Streuung der Haplotyp-häufigkeiten in Proben aus Nigeria (Yoruba), Japan, China und den Vereinigten Staaten, um eine Beschränkung der HapMap-Untersuchungen auf diese Bevölkerungsgruppen zu rechtfertigen.

Eine deutlich größere Datendichte wird zurzeit durch das 1000 Genom Projekt erzeugt, bei dem nicht nur SNPs untersucht werden, sondern mindestens 1000 Genome vollständig sequenziert werden sollen.

Das 1000 Genom Projekt startete im Januar 2008, als ein internationales Forschungsprojekt, zur Erstellung der zu der Zeit detailliertesten Karte menschlicher genetischer Variationen.

Innerhalb der ersten drei Jahre sollten 1000 anonyme Teilnehmer unterschiedlicher Ethnizität mit modernsten Sequenzieretechniken, die immer schneller und günstiger geworden sind, analysiert werden. Im Jahre 2010 wurde die Pilotphase des Projekts abgeschlossen und erste Sequenzen öffentlich zur Verfügung gestellt (1000-Genomes-Project-Consortium, 2010) (www.1000genomes.org/).

Da es zwei Arten genetischer Varianz gibt, die zum einen aus seltenen genetischen Veränderungen, die einen starken Einfluss auf die Entwicklung einer Krankheit haben (wie z.B. bei der Huntington Krankheit), und zum anderen häufigere Varianten, die einen weniger starken Effekt auf die Entwicklung einer meist komplexen Erkrankung haben (wie AD oder Diabetes), ist das 1000 Genom Projekt gegründet worden, um diese Wissenslücke zwischen den beiden Arten zu schließen. Ein Ziel des Projekts ist die Aufklärung von mehr als 95% der genetischen Varianten mit Allelfrequenzen des seltenen Allels (MAF, *minor allele frequency*) von 1% über das Genom und 0,1-0,5% in Genen. Auch Populationsfrequenzen, Haplotyp- und LD-Strukturen sollen genauer als im HapMap Projekt charakterisiert werden. Daraus folgt, dass die menschliche Referenz-Sequenz deutlich genauer wird.

3.5 Genomweite Kopplungs- und Assoziations-Studien

Kopplungsuntersuchungen ermöglichen es, ohne jegliche Hypothesen, über die Pathophysiologie einer Erkrankung innerhalb des Genoms nach dem oder den ursächlichen Genort(en) zu suchen.

Das Prinzip beruht darauf, dass geeignete Stammbäume, im Hinblick auf die gemeinsame Vererbung (Ko-Segregation), eines „genetischen Markers“ und eines bestimmten Krankheitsphänotyps untersucht werden. Unter einem „genetischen Marker“ versteht man einen genetischen Polymorphismus, dessen chromosomale Lokalisation bekannt ist. Werden der Marker und der Krankheitsphänotyp überzufällig häufig gemeinsam vererbt, so liegt eine Kopplung vor. Je geringer die physikalische Distanz zwischen dem Krankheitsgen und dem genetischen Marker ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch Rekombinationsereignisse in der Meiose (*crossing over*) getrennt werden. Aus einem positiven Kopplungsbefund lassen sich also Rückschlüsse auf die chromosomale Lage eines krankheitsverursachenden Gens ziehen, es sind jedoch keinerlei Aussagen über das Krankheitsgen selbst möglich. Als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung dient der LOD (*logarithm of the odds*)-score. Als LOD-score wird der dekadische Logarithmus der

Wahrscheinlichkeit für das, in der Stichprobe beobachtete, gemeinsame Auftreten von Markergenotypen und Krankheitsphänotypen unter der Annahme einer bestimmten Rekombinationswahrscheinlichkeit ($\Theta < 0,5$), geteilt durch die entsprechende Wahrscheinlichkeit unter der Annahme freier Rekombination ($\Theta = 0,5$), bezeichnet. Bei monogenen Erkrankungen gilt ein LOD-score ≥ 3 (d.h., die Hypothese, dass eine Kopplung vorliegt, ist 1000mal wahrscheinlicher als die Hypothese, dass keine Kopplung vorliegt) als hinreichender Nachweis einer Kopplung zwischen Marker und Krankheitsgen; ein LOD-score < -2 schließt hingegen eine Kopplung aus. Im nächsten Schritt kann mittels Positionsklonierung das krankheitsverursachende Gen identifiziert werden. Auf diese Weise wurden seit den 80er Jahren eine Vielzahl monogen vererbter Erkrankungen aufgeklärt. Die Aussagekraft der LOD-score-Methode ist am größten, wenn bestimmte Parameter der Erkrankung (wie z. B. Erbgang, Frequenz des Krankheitsgens in der Bevölkerung etc.) zweifelsfrei spezifiziert werden können, was bei monogenen Erkrankungen in der Regel kein Problem darstellt.

Auch bei genetisch komplexen Erkrankungen, wie z. B. Morbus Alzheimer, wurden Kopplungsuntersuchungen durchgeführt. Die ersten signifikanten Kopplungsbefunde in EOAD-Familien wurden auf den chromosomalen Regionen 1q31-42 (Levy-Lahad, Wijsman, et al., 1995), 3q23 (Liu et al. 2007), 14q24.3 (Cruts et al., 1995; Nechiporuk et al., 1993) und 21q21 (Goate et al. 1989) gefunden. Genomweite Kopplungsuntersuchungen für die sporadische (LOAD) Form der Alzheimer Erkrankung fanden einige chromosomale Regionen auf den Chromosomen 1, 3, 5, 6, 9, 10, 12, 19, 21, und X mit hohen LOD-scores (Lee et al. 2006; Myers et al. 2000). Die höchsten LOD-scores wurden auf den Chromosomen 9, 10, 12, und 19 gefunden (Blacker et al. 2003; Kehoe et al. 1999; Myers et al. 2002; Pericak-Vance et al. 1998).

Die Probleme des Einsatzes parametrischer Kopplungsuntersuchungen bestehen zum Teil in der genetischen Heterogenität, oder in der Methodik, da bei der Anwendung der LOD-score-Methode bei komplexen Krankheiten, Annahmen über den Erbgang (dominant oder rezessiv), die Allelfrequenz, die Penetranz und die Phänotypieraten gemacht werden müssen, diese Parameter jedoch meist nicht bekannt sind. Bei unrealistischen Annahmen verliert die LOD-score-Methode drastisch an Aussagekraft. Dennoch wurde das $\epsilon 4$ -Allel des *APOE* Gens (Poirier et al., 1993) durch eine parametrische Kopplungsanalyse erfolgreich identifiziert.

Eine Modifikation der klassischen Kopplungsanalyse stellen die nicht-parametrischen Kopplungsuntersuchungen dar, auch als „*allele sharing*“ Methode bezeichnet. Es wird untersucht, ob erkrankte Geschwister (sog. *affected sib-pairs*) oder erkrankte Verwandte (sog. *affected pedigree-members*) häufiger, als aufgrund der Vererbung erwartet, in ihren

Markerallelen übereinstimmen. Dabei wird zwischen Allelen, deren gemeinsame Abstammung bei Betroffenen aufgrund der Vererbung zweifelsfrei nachvollziehbar ist (*identical by descent* – IBD) und Allelen, deren gemeinsame Abstammung und damit Identität nicht genau nachvollzogen werden kann (*identical by state* – IBS), unterschieden. Bei Genotypisierung der Eltern ist meistens (bei genügend großer Informativität des genetischen Markers) die aussagekräftigere IBD-Bestimmung möglich. Der Vorteil der nicht-parametrischen Kopplungsmethoden liegt darin, dass eine Spezifikation (und evtl. Missspezifikation) von Parametern nicht nötig ist.

Im Gegensatz zu den Kopplungsuntersuchungen erfordern die Assoziationsuntersuchungen eine Hypothese bezüglich der Pathophysiologie der Erkrankung. In der Regel werden gezielt Kandidatengene auf ihren Beitrag an der Krankheitsentstehung hin untersucht.

Unter einer „Assoziation“ versteht man das überzufällig häufige Auftreten eines Markers, wie z. B. einer bestimmten DNA-Sequenzvariante in einem Patientenkollektiv, verglichen mit einem Kollektiv gesunder Kontrollpersonen (Fall/Kontroll-Studien). Der Grad der Assoziation von Allel und Krankheit wird als relatives Risiko ausgedrückt. Das relative Risiko trifft eine Aussage darüber, wie viel Mal wahrscheinlicher eine bestimmte Krankheit bei Trägern des Risikofaktors auftritt als bei Personen, die diesen Risikofaktor nicht tragen (siehe 4.2.8.1.1).

Ist ein bestimmtes Allel mit einer Krankheit assoziiert, so sind prinzipiell zwei Möglichkeiten zu unterscheiden:

- 1) Das assoziierte Allel trägt selbst funktionell durch eine Veränderung der Aminosäuresequenz des Genproduktes oder durch eine veränderte Genexpression zum Krankheitsgeschehen bei.
- 2) Das untersuchte Allel ist nicht unmittelbar funktionell wirksam, liegt aber in sehr enger räumlicher Nähe zu einem, am Krankheitsgeschehen beteiligten, Genort und es besteht ein Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) zwischen den Varianten an den beiden benachbarten Genorten. Ein Kopplungsungleichgewicht entsteht, wenn bei einer Person eine Mutation auftritt und sich zumindest ein großer Teil von Trägern der Mutation in späteren Generationen von dieser Person herleiten lässt (Gründereffekt).

Das Kopplungsungleichgewicht bleibt in der Evolution jedoch nur dann erhalten, wenn nicht wiederholt die gleiche Mutation bei unabhängigen Personen aufgetreten ist, wenn den Trägern der Mutation kein Selektionsnachteil entstanden ist und wenn keine häufigen Rekombinationen

zwischen den beiden Genorten stattgefunden haben. Untersuchungen zum Organisationsprinzip des menschlichen Genoms haben Hinweise auf eine Blockstruktur des menschlichen Genoms geliefert, bei der sich ausgedehnte Blöcke, in denen nahezu keine Rekombinationsereignisse stattfinden, mit so genannten *hotspots* der Rekombination abwechseln (International-HapMap-Consortium, 2005). Der Ausprägungsgrad eines Kopplungsungleichgewichtes und die Distanz, über die es sich erstreckt, variieren zwischen verschiedenen genomischen Regionen. Bei der europäischen Population erstreckt sich ein Kopplungsungleichgewicht durchschnittlich über Distanzen von ungefähr 10-30kb (Ardlie, Kruglyak, & Seielstad, 2002). Je nach genomischer Region kann sich ein Kopplungsungleichgewicht aber auch über sehr viel größere Distanzen erstrecken (Abecasis et al. 2001; Cardon & Bell 2001; Kruglyak 1999; Reich et al. 2001). Durch Kenntnis der Blockstruktur ist es daher möglich, Genotypen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, ohne diese direkt genotypisiert zu haben.

Die zurzeit am häufigsten durchgeführten genetischen Untersuchungen sind Chip-basierte genomweite Assoziationsstudien, mit denen es möglich ist, eine große Anzahl von Individuen an mehreren hunderttausend SNPs zu genotypisieren. In den allermeisten GWAS, die bis heute durchgeführt wurden, konnte der *APOE* Locus als einer der einflussreichsten genetischen Risikofaktoren für LOAD bestätigt werden (Abraham et al. 2008; Beecham et al. 2009; Bertram et al. 2008; Carrasquillo et al. 2009; Coon et al. 2007; Feulner et al. 2010; Grupe et al. 2007; Potkin et al. 2009; Reiman et al. 2007).

3.6 Quantitative Marker (Endophänotypen)

Quantitative Marker haben sich, vor allem bei komplexen neuropsychiatrischen Erkrankungen, als wichtiges Konzept erwiesen. Ein quantitativer Marker kann neurophysiologisch, biochemisch, endokrinologisch, neuroanatomisch, kognitiv oder neuropsychologisch sein (Gottesman & Gould 2003). Da gerade bei psychiatrischen Erkrankungen eine genaue Diagnose nur anhand der Symptome schwer zu erheben ist, werden quantitative Marker auch diagnostisch eingesetzt und dienen daher zur genetischen Untermauerung der Krankheitssyndrome.

Idealerweise ist ein quantitativer Marker monogenetischen Ursprungs, doch meist liegt ein polygenetischer Ursprung vor. Zur Identifizierung nützlicher quantitativer Marker gibt es Kriterien die einen quantitativen Marker definieren (Gershon & Goldin, 1986):

- 1.) Der quantitative Marker ist in der Bevölkerung mit der Krankheit assoziiert.

- 2.) Der quantitative Marker ist erblich.
- 3.) Der quantitative Marker ist primär krankheitsstatusunabhängig, d.h. er ist detektierbar, unabhängig ob die Krankheit bereits ausgebrochen ist oder nicht.
- 4.) Innerhalb von Familien werden quantitative Marker und Krankheit gemeinsam vererbt.
- 5.) Ein quantitativer Marker in betroffenen Familienmitgliedern ist in nichtbetroffenen Familienmitgliedern höher/niedriger als in der Allgemeinbevölkerung (Leboyer et al., 1998).

Als biochemische Marker werden in der Alzheimer-Diagnostik neuronale Proteine in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis fluid*, CSF) bestimmt. Dazu gehören die Proteine Tau, phospho-Tau und die β -Amyloid Peptide. Diese Marker bieten bereits im Prä-Demenz-Stadium hohe diagnostische Sensitivität und Spezifität (Buch et al., 1998; Riemenschneider, Buch, Schmolke, Kurz, & Guder, 1997; Riemenschneider et al., 2003). Als genetische Marker werden meist Varianten in dem *Apolipoprotein E* Gen untersucht. Diese Marker geben allerdings nur ein Indiz auf ein Risiko die Alzheimer Krankheit zu entwickeln und werden keinesfalls diagnostisch eingesetzt.

Zur neuropsychologischen Untersuchung von Patienten mit Verdacht auf Demenz kommt häufig die CERAD-NP (*Consortium to Establish a Register for Alzheimer's Disease-Neuropsychological Battery*) Test-Batterie zum Einsatz. Diese schnelle aber doch differenziertere Erfassung kognitiver Defizite entwickelte sich zum Standard. Zu den sieben Untertests gehören:

- 1.) *Mini-Mental State Examination* (MMSE)
- 2.) Wortflüssigkeit
- 3.) *Modified Boston Naming Test* (MBNT)
- 4.) konstruktive Praxis
- 5.) Lernen einer Wortliste
- 6.) Wiedergeben einer Wortliste
- 7.) Wiedererkennen einer Wortliste

Diese sieben Untertests lassen sich in die Kategorien

- Orientierung
- Sprache
- Konstruktive Praxis

- Gedächtnis

zusammenfassen (Satzger et al., 2001). Testmaterial in deutscher Sprache sowie Hilfe zur Auswertung, kann von folgendem Webserver abgerufen werden.

Weblink 1:

http://www.memoryclinic.ch/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=11&Itemid=16

Auch Blutparameter werden als quantitative Marker herangezogen, so sind beispielsweise Lipidspiegel wie LDL (*Low-density lipoprotein*), VLDL (*Very low-density lipoprotein*), HDL (*High-density lipoprotein*), Triglyceride und Cholesterin von Bedeutung. Auch Ferritin und Eisen, sowie Vitamin B9 und B12 werden häufig untersucht.

4 Material und Methodik

4.1 Material

4.1.1 DNA

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurde genomische DNA aus Vollblut isoliert.

4.1.2 Patient / Kontroll - Kohorten

4.1.2.1 Kollektiv der initialen GWAS

Unsere „Initiale GWAS“ wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt und bestand aus 491 kaukasischen AD-Patienten und 479 kaukasischen gesunden Kontrollen. Die Fälle setzten sich aus 278 Frauen und 213 Männern, mit einem Durchschnittsalter von 72,2 Jahren, zusammen. Alle Patienten wurden an der ambulanten Station der Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, rekrutiert. Die populationsbasierte Kontrollgruppe wurde von der PopGen Biobank des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel rekrutiert und bestand aus 222 Frauen und 257 Männern mit einem Durchschnittsalter von 39,5 Jahren (Krawczak et al. 2006). Für die Alzheimer-Fälle wurden die diagnostischen Kriterien des NINCDS-ADRDA verwendet (G. McKhann et al., 1984) (siehe Kapitel 3.1). Nachdem eine Einverständniserklärung der Individuen eingeholt war, wurden Blutproben genommen und DNA wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben extrahiert. Kognitive Fähigkeiten wurden durch neuropsychologische Tests bestimmt, dazu gehören z.B. die CERAD-NP Testbatterie oder der MMSE-Test, die unter Kapitel 3.6 näher beschrieben sind.

4.1.2.2 Kollektiv des Kandidatengenansatzes für *TACR2*

Patienten, die an der Alzheimer Krankheit leiden (n=479) wurden an der Gedächtnisambulanz der Technischen Universität München am Klinikum rechts der Isar rekrutiert. Die Diagnostik erfolgte nach den aktuellen Kriterien (McKhann et al. 1984). Das Patientenkollektiv hatte ein Verhältnis von Männern zu Frauen von 0,68 und einen durchschnittlichen Krankheitsbeginn von

69,1 ± 9,1 (Standardabweichung) Jahren. Die Information zum Krankheitsbeginn wurde meist von Verwandten des Patienten berichtet.

Die Kontrollgruppe (n=322) stimmte in Alter, Geschlecht, geographischer Herkunft und Ethnizität mit dem Fallkollektiv überein und bestand aus kognitiv gesunden älteren Menschen (66,7 ± 12,0 Jahre). Die Rekrutierung erfolgte ebenfalls an der Gedächtnisambulanz der TU-München. Der kognitive Zustand von Individuen in der Kontrollgruppe wurde durch MMSE-Tests (Folstein et al. 1975) ermittelt. Individuen, die weniger als 28 Punkte erreichten, wurden aus der Studie ausgeschlossen (3.6). Nachdem die Ethikkommission der TU-München die Studie genehmigt hatte und die Individuen ihr Einverständnis in die Studie gegeben hatten, wurde ihnen Blut abgenommen und wie in 4.2.1 beschrieben weiter prozessiert.

4.1.2.3 Kollektiv der erweiterten GWAS

Im Rahmen der „Erweiterten GWAS“ wurden 236 zusätzliche Alzheimer Fälle genotypisiert. 105 davon waren männlich und die restlichen 131 Fälle waren weiblich, mit einem durchschnittlichen Alter von 73,3 ± 8,8 Jahren. Alle Patienten wurden an der ambulanten Station der Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München rekrutiert. Die Patienten wurden nach NINCDS-ADRDA (McKhann et al. 1984) Kriterien klassifiziert. Die kognitiven Fähigkeiten wurden durch neuropsychologische Standardtests, nach der *Cambridge Cognitive Examination* (Roth et al., 1986) oder nach den CERAD-NP-Test Batterie (Welsh et al., 1994), ermittelt. Zusammen mit dem initialen GWAS Kollektiv wurden insgesamt, nach der Qualitätskontrolle (QC), 709 Patienten mit AD in die Studie eingebunden. Das durchschnittliche Alter lag bei 72,8 ± 12,0 Jahren, 311 Individuen waren männlich und 398 weiblich. Die deskriptive Statistik zu den quantitativen Markern der 709 Individuen ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Zu den 479 kaukasischen gesunden Kontrollen (4.1.2.1) der PopGen Biobank in Kiel (Krawczak et al. 2006), kam noch ein Kontrollkollektiv (KORA) aus der Region Augsburg hinzu (Wichmann, Gieger, & Illig, 2005). Dieses Kollektiv bestand aus 482 kaukasischen, neurologisch gesunden Kontrollen mit einem durchschnittlichen Alter von 56,0 ± 7,2 Jahren. Die Verteilung von Männern und Frauen lag bei 244 zu 238 Individuen. Damit bestand das Gesamtkontrollkollektiv (PopGen und KORA) nach QC aus 961 Individuen mit einem Durchschnittsalter von 47,9 ± 13,4 Jahren.

Tabelle 1: Quantitative Marker

Dargestellt sind alle quantitativen Marker die uns für das Fallkollektiv (n=709) zu Verfügung standen.

Quantitatives Merkmal	Fallzahl	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum
CERAD Wortflüssigkeit	438	10,73	5,64	10	0	38
CERAD Boston Naming Test	440	11,33	3,08	12	0	18
CERAD Wortliste (WL) lernen	433	10,1	4,84	10	0	27
CERAD Visuokonstruktion	423	8,53	2,5	9	0	14
CERAD WL Abruf	428	1,75	1,88	1	0	9
CERAD WL Wiedererkennen-Ja	394	7,31	2,81	8	0	16
CERAD WL Wiedererkennen-Nein	393	8,06	2,54	9	0	10
CERAD Visuokonstruktion Abruf	394	2,81	3,17	2	0	14
TAU [pg/ml CSF]	110	666,28	442,52	530	115	2512
A β ₄₂ [pg/ml CSF]	109	525,05	236,22	470	75	1563
Cholesterin [mg/dl Blut]	105	237,48	42,81	227	151	365
Ferritin [μ g/l Blut]	242	158,43	154,27	121	0,5	1025
Eisen Fe [μ g/dl Blut]	293	104,68	35,6	102	20	210
Folsäure [ng/ml Blut]	489	9,11	5,48	7,5	1,5	79
HDL [mg/dl Blut]	67	64,64	20,33	62	31	129
LDL [mg/dl Blut]	67	145,82	31,83	144	68	235
Transferrin [mg/dl Blut]	246	263,43	48,28	258,5	62	468
Triglyceride [mg/dl Blut]	101	129,51	66,46	111	41	422
VLDL [mg/dl Blut]	62	21,21	11,69	20	5	68
Vitamin B12 [ng/l Blut]	490	427,69	323,47	346	65	2000
Hämoglobin [g/dl Blut]	493	14,42	2,36	14,3	1	45,5

4.1.2.4 Kollektive internationaler Konsortien

Alle Kollektive, die in der Meta-Analyse der GERAD+ (*Genetic and Environmental Risk in Alzheimer's Disease Consortium* +) Studie in einem internationalen europäischem Konsortium, untersucht wurden, sind bei (Hollingworth et al., 2011) genauer beschrieben. Dazu gehören GERAD1, EADI1, ADNI, TGEN, GERAD2, deCODE, EADI2, Mayo2, CHARGE und unser Kollektiv der „Erweiterten GWAS“, im Folgenden AD-IG GWAS (*Alzheimer's Disease Integrated Genome research Network GWAS*) genannt. Alle Kollektive zusammen umfassten 19870 AD-Fälle und 39846 Kontrollen. Die Studie des internationalen amerikanischen Konsortiums ADGC (*Alzheimer's Disease Genetic Consortium*) umfasste ebenfalls verschiedene Kollektive, die bei (Naj et al., 2011) näher beschrieben sind.

4.1.2.5 Kollektive zur Validierung mittels Sequenom

4.1.2.5.1 München-Kollektiv (A β ₄₂)

Die Individuen aus München wurden am Klinikum rechts der Isar, der TU-München rekrutiert. Insgesamt waren 94 Individuen, zu denen A β ₄₂-Messwerte im Liquor vorhanden

waren, eingeschlossen. 57 der 94 Individuen waren Männer mit einem durchschnittlichem Alter von 62,1 Jahren (SD = 11,2 Jahre) und 36 waren Frauen mit einem Durchschnittsalter von 64,7 (SD = 8,6 Jahre). Bei einer Person war das Geschlecht nicht dokumentiert, diese Person wurde aus der Analyse ausgeschlossen. Der durchschnittliche A β ₄₂-Wert der 93 Individuen liegt bei 829,6pg/ml Liquor (SD = 317,7pg/ml).

4.1.2.5.2 Schweden-Kollektiv (A β ₄₂)

Das Kollektiv, das uns aus dem Sahlgrenska Universitätsklinikum der Universität Göteborg in Schweden zur Verfügung stand, umfasste insgesamt 274 Individuen zu denen A β ₄₂-Messwerte aus dem Liquor vorlagen. 182 davon waren Frauen mit einem durchschnittlichem Alter von 75,4 Jahren (SD = 6,1 Jahre), dementsprechend waren 92 Individuen männlich, mit einem durchschnittlichem Alter von 73,4 (SD = 6,4 Jahre) enthalten. Der durchschnittliche A β ₄₂-Messwert für männliche und weibliche Individuen betrug 412,2pg/ml (SD = 96,4pg/ml) im Liquor.

4.1.2.6 Zusammenfassung der Kollektive

Tabelle 2: Zusammenfassung der Kollektive

Das Durchschnittsalter bezieht sich bei Fällen immer auf den Beginn der Krankheit und bei Kontrollen auf das Alter am Tag der Blutabnahme.

Studie	Männer	Frauen	Gesamt	Durchschnittsalter	Rekrutiert	Fall / Kontroll	Bemerkung
„Initiale GWAS“	213	278	491	72,2	TU-München	Fälle	
„Initiale GWAS“	257	222	479	39,5	Kiel	Kontrollen	PopGen
TACR2	153	326	479	69,1	TU-München	Fälle	
TACR2	103	219	322	66,7	TU-München	Kontrollen	
„Erweiterte GWAS“	105	131	236	73,3	TU-München	Fälle	zusätzlich zu der initialen GWAS
„Erweiterte GWAS“	311	398	709	72,8	TU-München	Fälle	gesamt nach QC
„Erweiterte GWAS“	257	222	479	39,5	Kiel	Kontrollen	PopGen
„Erweiterte GWAS“	244	238	482	56,0	Regensburg	Kontrollen	KORA
„Erweiterte GWAS“	501	460	961	47,9	Kiel/Regensburg	Kontrollen	PopGen und KORA gesamt nach QC
internationales Konsortium			39846			Kontrollen	Naj et al. 2011
internationales Konsortium			19870			Fälle	Naj et al. 2011
München Kollektiv (A β ₄₂)	57	36	93	63,4	TU-München	Fälle	
Schweden Kollektiv (A β ₄₂)	92	182	274	74,4	Göteborg	Fälle	

4.1.3 Primer

Für die Genotypisierungen mit Hilfe der Sequenom Plattform werden drei Primer benötigt, je ein *forward* und *reverse* Primer und ein Extensionprimer. Diese Oligomere wurden von der Firma Invitrogen (Regensburg, Deutschland) synthetisiert.

4.1.4 Geräte

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte

Elektrophoresekammern	Sub-Cell® GT, Bio-Rad Lab. GmbH, München, Deutschland
	Sub-Cell® 192, Bio-Rad Lab. GmbH, München, Deutschland
	Mini-Sub®GT, Bio-Rad Lab. GmbH, München, Deutschland
Magnetrührer	MSH basic, Yellow line, München, Deutschland
Massenspektrometer	Autoflex, Sequenom Inc., San Diego, CA, USA
Mikrowelle	Microwave 800, Severin, Sundern, Deutschland
Multipipetten	Multipipette / Transferpipette, Brand, Wertheim, Deutschland
Photometer	Infinite M200 NanoQuant, Tecan, Männedorf, Schweiz
Pipettierroboter	PlateMate® 2x2, Matrix, Thermo Fisher Scientific, Hudson, NH, USA
	MiniPrep75, 8 Kanal, Tecan, Männedorf, Schweiz
Spannungsgeräte	PowerPac™HV, Bio-Rad Lab. GmbH, München, Deutschland
	PowerPac™ Basic, Bio-Rad Lab. GmbH, München, Deutschland
Reinstwasser System	Milli-Q Advantage, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
	Milli-Q Q-Pod®, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Schüttler	Auto-Shake Genie, Scientific Industries, NY, USA
	Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spotter	MassARRAY™ Nanodispenser R, RoboDesign, Sequenom™, San Diego, CA, USA
Thermocycler	GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Life Technologies, San Diego, CA, USA
UV-Transilluminator	BioView, Biostep®, Billerica, MA, USA
Vortexer	Vortex-Genie2, Scientific Industries, NY, USA
Waage	Adventurer™, OHAUS, NJ, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

4.1.5 Puffer, Lösungen, Enzyme, Reagenzien und Reaktionskits

4.1.5.1 DNA Isolierung

Tabelle 4: Auflistung der Lösungen zur DNA-Isolierung

Lösung	Substanz	Menge/Anteil
RBC-Lysis Lösung:	Ammoniumchlorid	8,29g
	EDTA (E-5134)	0,034g
	Kaliumhydrogencarbonat	1,00g
	Wasser für Injektionszwecke	1000ml
	pH eingestellt mit NaOH auf	7,4
	autoklavieren	121°C für 15min bei 2bar
	Lagerung bei	4°C
SE-Puffer nach Maniatis, autoklaviert	NaCl	75mM ► 4,39g
	Na ₂ EDTA	25mM ► 8,41g
	pH (NaOH)	8,0 ► auf 1l
SDS (20%), steril filtriert (0,2µm)	SDS	20mg
	MilliQ H ₂ O	100ml
TE-Puffer, autoklaviert	Tris/HCl (pH 8,0)	10mM
	EDTA	1mM
Saturiertes NaCl, 6M, autoklaviert	NaCl	87,5g
	MilliQ H ₂ O	250ml

4.1.5.2 Puffer, Lösungen, Enzyme und Reagenzien

Tabelle 5: Auflistung sonstiger Puffer, Lösungen, Enzyme und Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Bezeichnung
Afilll	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	Afilll
Agarose	Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Agarose for routine
Blaumarker		Xylencyanol 0,05%
		Bromphenolblau 0,05%
		Saccharose 40%
DNTPs	Peqlab, Erlangen, Deutschland	100mM
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	99,8% unvergellt
GelRed	Biotium, Köln, Deutschland	GelRed
HaeII	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	HaeII
Isopropanol	VWR, Darmstadt, Deutschland	99,8% AnalaR NORMAPUR
Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	pUC19 DNA/MspI (Hpall)
MgCl ₂	Qiagen, Hilden, Deutschland	25mM
MoSieve-Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland	MoSieve-Agarose MS-500
Natriumhypochloritlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland	12% Cl
PCR Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland	10x incl. 15mM MgCl ₂
PicoGreen	Invitrogen Molecular Probes, Paisley, UK	Quant-iT™ PicoGreen®
Premix J	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	MasterAmp 2X PCR PreMix J
Proteinkinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland	Proteinkinase-K-solution
Reinigungslösung Roboter	LVL, Crailsheim, Deutschland	Setup Clean 500ml
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland	SDS 20%
Taq	Qiagen, Hilden, Deutschland	Hot Star Taq
TE-Puffer	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	Tris-EDTA-Puffer
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	TBE-Rotiphorese® 10x

4.1.5.3 Reaktionskits

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Reaktionskits

Anwendung	Hersteller	Bezeichnung
Genomweite Amplifikation	GE Healthcare, München, Deutschland	Genomiphi V2 DNA Amplification Kit
Genotypisierung	Sequenom, Hamburg, Deutschland	iPlex Gold
Genotypisierung	Illumina, San Diego, CA, USA	550K BeadChip 610K quad BeadChip
A β ₄₂ - Tau-Proteinbestimmung	Innogenetics, Zwijndrecht, Belgien	ELISA INNOTEST® β -AMYLOID(1-42) ELISA INNOTEST® PHOSPHO-TAU(181P)

4.1.5.4 Software, Datenbanken

Tabelle 7: Verwendete Software und Datenbanken

Art	Name	Internetadresse
Software	Microsoft Excel 2003 / 2007	
Software	Microsoft Word 2003	
Software	Microsoft PowerPoint 2003	
Software	Sequenom Typer 3.4	
Software	Sequenom Assay Designer 3.1	
Software	Illumina BeadStudio	
Software	ActivePerl 5.10.0	
Software	EditPlus3	
Software	SPSS 16.0	
Software	Haploview 4.2	http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview
Software	r-Gui	http://www.r-project.org/
Software	Mendeley Version 1.1.2	http://www.mendeley.com/
Software	PLINK	http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/
Software (Online)	Sequenom "rs Sequence Retriever"	https://www.mysequenom.com/Tools
Software (Online)	Sequenom "ProxSNP"	https://www.mysequenom.com/Tools
Software (Online)	Sequenom "PreXTEND"	https://www.mysequenom.com/Tools
Datenbank (Online)	snpper	http://snpper.chip.org/
Datenbank (Online)	1000 Genome	http://www.1000genomes.org/
Datenbank (Online)	NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Datenbank (Online)	HapMap	http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/
Datenbank (Online)	UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
Datenbank (Online)	Galaxy	http://main.g2.bx.psu.edu/
Software (online)	LocusZoom Version 1.1	http://csg.sph.umich.edu/locuszoom/

4.2 Methodik

4.2.1 Isolierung und Aufbereitung genomischer DNA

Es wurden 20ml peripheres EDTA-Vollblut mit 30ml RBC (*Red-Blood-Cell*) -Lysis Lösung 10min bei RT inkubiert und dabei mehrmals invertiert. Dann wurde die Lösung bei 2000 Umdrehungen pro Minute für 10min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde wieder mit 30ml RBC-Lysis Lösung resuspendiert und für 10min bei RT inkubiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet mit 5ml SE-Puffer (nach Maniatis), 25µl Proteinase K (10mg/ml) und 250µl SDS (20%) gelöst und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5ml SE-Puffer zugegeben und für 5-10min bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Nachdem 3ml saturiertes NaCl (ca. 6M) zugegeben wurde, wurde für mindestens 20s auf höchster Stufe gevortext und bei 2500g für 10min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein mit 10ml Isopropanol gefülltes Reaktionsröhrchen (50ml) überführt, behutsam geschwenkt bis die DNA ausfällt und für 10min bei 2000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10ml 70 prozentigem p.a. EtOH mehrmals gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 2000g für 10min (RT) wurde der Überstand vorsichtig verworfen und der restliche Ethanol bei RT verdampfen gelassen. Das Pellet wurde, je nach Größe, mit 200-700µl 1xTE rekonstituiert.

4.2.2 Genomweite Amplifikation (*Whole genome amplification*)

Bei einem Einsatz von ca. 10ng genomischer DNA konnte man durch diese Methode eine Ausbeute von 4-7µg erreichen. Die durchschnittliche Produktlänge der Amplifikate lag bei ca. 10kb.

Es wurden 9µl Proben-Puffer mit 1µl (10ng/µl) der zu amplifizierenden genomischen DNA gemischt. Dann wurde bei 95°C für 3min die DNA denaturiert und auf 4°C abgekühlt. Zu jeder Reaktion wurde dann ein Mix aus 9µl Reaktionspuffer und 1µl Enzymmix hinzugegeben und für 2h bei 30°C zur Amplifikation inkubiert wurde. Zum Schluss wurde das Enzym „Phi29 DNA Polymerase“ für 10min bei 65°C inaktiviert. In Abbildung 1 ist der schematische Reaktionsablauf dargestellt.

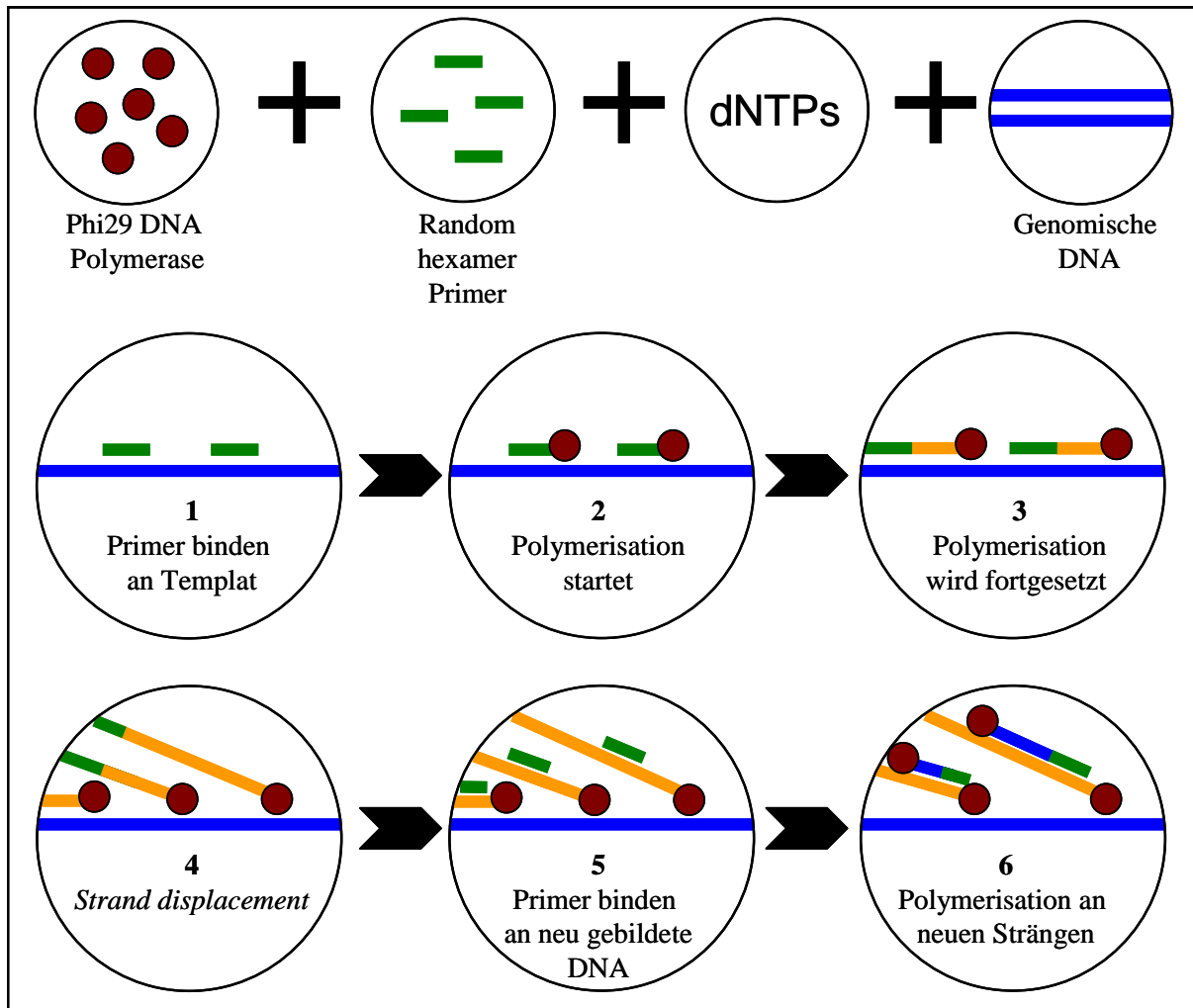


Abbildung 1: Schematischer Ablauf der DNA Amplifizierung mittels „GenomiPhiDNA Amplification Kit“

Genomweite Amplifikation durch isothermales Ablösen der Stränge. Die DNA wird kurz durch Hitze denaturiert und dann in dem Probenpuffer, der zufällige Hexamer-Primer beinhaltet die unspezifisch an die DNA binden, gekühlt. Der Master-Mix der aus DNA-Polymerase, zusätzlichen Zufallshexameren, Nukleotiden, Salzen und Puffer besteht wird zugegeben und die isothermale Amplifikation kann bei 30°C für 1,5h ablaufen. Nach der Amplifikation wird das Enzym, DNA-Polymerase, 10min bei 65°C Hitzeinaktiviert.

4.2.3 Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Reinheit der isolierten DNA

Die Konzentrationen der DNAs wurden photometrisch mittels Infinite® 200 PRO NanoQuant (Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Mit Hilfe der NanoQuant Platte war es möglich schon bei Volumina von 2µl DNA Konzentrationen von 1ng/µl zu bestimmen. In dem Mikrotiterplatten Photometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) wurde die Absorption bei 260nm bestimmt, wobei der gemessene optische Dichte (OD) Wert von 1 einer Konzentration von 50ng/µl doppelsträngiger DNA (dsDNA) entspricht. Um Verunreinigungen von Proteinen auszuschließen wurde auch die Absorption bei 280nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge

absorbieren Proteine aufgrund der aromatischen Aminosäurereste. Das Verhältnis der OD₂₆₀ zur OD₂₈₀ zeigte also an wie stark eine DNA-Lösung durch Reste von Proteinen verunreinigt war. Ein Verhältnis von 1,8 sprach für eine reine DNA Lösung wobei eine mit Proteinen verunreinigte Lösung einen deutlich niedrigeren Wert zeigte und für weitere Analysen ausgeschlossen wurde.

Da bei der photometrischen Messung Verunreinigungen mit z.B. RNA oder ssDNA (*single-strand-DNA*, einzelstrang DNA) nicht detektiert werden konnten, wurden fluoreszenz-basierte Messungen mittel Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kit (Invitrogen, Molecular Probes, Paisley, UK) durchgeführt. Da der PicoGreen Farbstoff hochselektiv nur an dsDNA bindet, wurden weder ssDNA noch RNA gemessen. Hierbei war es möglich dsDNA Konzentrationen ab 250pg/ml zu bestimmen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Aus der mitgelieferten λ -DNA wurde eine Verdünnungsreihe für die Standardkurve erstellt. Sowohl die Standards als auch die zu messenden Proben wurden nach Protokoll mit PicoGreen® Lösung gemischt und 5min bei RT dunkel inkubiert. Bei der anschließenden Messung in einem Tecan Infinite® 200 PRO mit Fluoreszenz Modul wurden die Proben und die Standards bei 480nm angeregt und die Emission wurde bei 520nm gemessen. Anhand der Regressionskurve der λ -DNA Standards, konnte die Konzentration der einzelnen Proben bestimmt werden.

4.2.4 Erhebung klinischer Daten (Endophänotypen)

Serum und EDTA Plasma Proben wurden aus der Vene des Patienten entnommen und die routinemäßige Blutdiagnostik im Zentrallabor des Klinikums rechts der Isar in München durchgeführt. Es wurden Daten zu Zellanzahl, Vitamin B12, Folsäure, Schilddrüsenhormon sowie Fettparameter erhoben (Bucolo & David, 1973; Warnick, Benderson, & Albers, 1982; Wiebe & Bernert, 1984).

CSF (5-8 ml) wurde durch Lumbalpunktion entnommen und in sterilen Polypropylenröhrchen aufgefangen. Die Röhrchen wurden verschlossen und vorsichtig gemixt um Gradienteneffekte zu verhindern. Das native CSF wurde für 10min bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und bis zur weiteren Prozessierung bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der A β ₄₂- und Tau-Proteinkonzentrationen wurde ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) in Doppelbestimmungen durchgeführt (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgien). Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

Die neuropsychologische Test-Batterie (CERAD-NP) wurde an der Psychiatrischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU-München durchgeführt. Die standardisierten Tests wurden bereits anderweitig beschrieben (Morris et al. 1989; Mirra et al. 1991).

4.2.5 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* [PCR]) ist ein In-vitro-Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Abschnitten, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden (Mullis & Faloona, 1987). Es handelt sich bei der PCR um einen zyklischen Vorgang, bei dem der vorliegende DNA-Abschnitt (*template*) exponentiell vermehrt wird. Es sind Amplifikationen um den Faktor 10^6 bis 10^7 möglich.

Die PCR besteht aus mehreren Zyklen mit den folgenden drei Schritten:

1. Denaturierung
2. Annealing
3. Elongation

Im ersten Schritt wurde der zu amplifizierende doppelsträngige DNA-Abschnitt durch Hitze-Denaturierung in ssDNA überführt. Die DNA Einzelstränge dienten als Matrize für die Synthese neuer, komplementärer DNA-Stränge. Die als Startermoleküle verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Primer) lagern sich im zweiten Schritt an die ssDNA an. Primer sind kurze DNA-Fragmente, die den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt flankieren. Die Elongation der Primer erfolgte durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Die Polymerase verlängert Oligonukleotide, die einem DNA-Abschnitt angelagert sind, durch den Anbau von zu der vorliegenden DNA-Matrize komplementären Nukleotiden. Die Synthese erfolgte immer in $5' \rightarrow 3'$ -Richtung, ausgehend von den $3'$ -OH-Enden des Primernukleotids. Als Bausteine dienten hier die vier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs).

Jeder Durchlauf führte zu einer exponentiellen Vermehrung der PCR-Produkte, da sowohl die original DNA-Matrize, als auch die bereits synthetisierten Kopien, amplifiziert wurden. Der beschriebene Syntheszyklus wird gewöhnlich 30–40mal wiederholt, wodurch eine Anreicherung der, von den synthetischen Oligonukleotiden flankierten, Matrizen-DNA auf etwa 10^6 bis 10^7 DNA-Moleküle ermöglicht wird. Neben den oben beschriebenen Komponenten beinhaltet ein PCR-Ansatz noch $MgCl_2$ und PCR-Puffer.

4.2.6 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte

Das Prinzip der Agarosegelelektrophorese beruht auf der Bewegung geladener Moleküle innerhalb eines elektrischen Feldes. Hauptladungsträger von Nukleinsäuren sind die negativ geladenen Phosphatgruppen; Molekulargewicht und Gesamtladung sind somit proportional zueinander. Die Agarose bildet nach der Polymerisierung eine netzwerkartige Struktur aus und wirkt und somit wie ein molekulares Sieb. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle im Agarosegel ist abhängig von dem Molekulargewicht der DNA-Fragmente, von der anliegenden Spannung und von der Agarosekonzentration. Während zwischen anliegender Spannung und der Wanderungsgeschwindigkeit ein proportionaler Zusammenhang besteht, ist dieser für das Molekulargewicht und die Agarosekonzentration umgekehrt proportional. Zur Herstellung eines 3% Agarosegels wurden 2.4g Agarose mit 80ml 1xTBE gemischt und bis zur vollständigen Lösung der Agarose gekocht. Unter ständigem Rühren kühlte die Lösung auf ca. 50°C ab. Dann wurde die Agarose/TBE Lösung in den Gelträger blasenfrei gegossen und mit Kämmen versehen, um die Taschen für die Proben zu erzeugen. Bevor es in eine mit 1xTBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt wurde, wurden die Kämmen entfernt. Das Gel sollte nun vollständig mit Puffer bedeckt sein.

Je 1µl des PCR-Produktes wurden mit 3µl Ladepuffer und 1µl einer 1:100 Verdünnung GelRed (Biotium, Köln, Deutschland) vermischt und in die Gelkammern eingefüllt. Zusätzlich wurde eine Kammer mit einer Mischung aus 6µl Längenstandard und 6µl 1:100 GelRed befüllt. Die anliegende Spannung beträgt 110V für etwa 30 Minuten, dann wird das Gel auf einen UV-Transilluminator (BioView, Biostep®, Billerica, MA, USA) gelegt, wodurch das GelRed, das an die DNA Fragmente gebunden hat, fluoresziert. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde mit einer handelsüblichen digitalen Kamera dokumentiert. Das 3% Agarosegel eignet sich besonders zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente im Bereich von 100bp. Im Rahmen der weiter unten dargestellten Multiplex-PCR wurden mehrere DNA-Fragmente im Bereich von 80 bis 120bp amplifiziert. Daher war eine genaue Größenbestimmung und Unterscheidung der Fragmentlängen nicht möglich. Die Agarosegelelektrophorese diente in dieser Studie lediglich einer prinzipiellen Erfolgskontrolle der PCR, ohne Auskunft über einzelne Fragmente zu geben.

4.2.7 Genotypisierung

4.2.7.1 ApolipoproteinE

Wegen der besonderen Rolle des Apolipoprotein E als Risikolocus wurde standardmäßig bei allen DNA Proben der *APOE*-Haplotyp bestimmt. Zuerst wurde durch eine Standard-PCR ein 218bp langes Fragment amplifiziert (Tabelle 8), das PCR Protokoll ist in Tabelle 9 dargestellt. Für die anschließende Restriktion der PCR Produkte wurden 2,5 bzw. 5 *units* der Restriktionsenzyme *AflIII* bzw. *HaeII* eingesetzt und für 24h bei 37°C inkubiert. Die Produkte der Restriktion wurden dann in einem 4% MoSieve™-Agarose MS-500 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) aufgetrennt.

Tabelle 8: Reagenzien der PCR zur *APOE*-Genotypisierung

Reagenz	c (Final) in 25 µl	Volumen [µl]
Wasser 18,2MΩ		10
Premix J (Biozym)		12.5
Primer forward 5'-GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A-3'	0.5pmol	0.5
Primer reverse 5'-TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA-3'	0.5pmol	0.5
Enzym-Mix	1.25U	0.5
DNA	100ng	1
Gesamt		25

Tabelle 9: Thermocycler Programm zur Amplifizierung

Zur Amplifizierung eines 218bp langen Fragments, welches die SNPs zur Charakterisierung des *APOE* Haplotyp enthält.

94°C für 5min	
94°C für 30s	35 Zyklen
T(55°C) für 30s	
75°C für 30s	
72°C für 7min	
4°C ∞	

Die häufigste Form ist der ε3 Haplotyp, der weder protektiv noch Risiko steigernd wirkt. Hierbei kodiert das Triplet TGC für die Aminosäure Cys¹¹² und das Triplet CGC für Arg¹⁵⁸. In dem ε2 Haplotyp ist das erste C des CGC Triplets durch ein T ersetzt. Dieses TGC Triplet kodiert dann anstelle der Aminosäure Arg an Position 158 für die Aminosäure Cys¹⁵⁸. Der ε4 Haplotyp zeigt anstatt des T (in dem TGC Triplet das für Cys¹¹² kodiert) ein C, das Triplet besteht also aus CGC und kodiert anstelle von Cys¹¹² die Aminosäure Arg¹¹². Die drei *APOE* Allele können demnach sechs Haplotypen haben, drei homozygote ε4/ε4, ε3/ε3 und ε2/ε2, sowie die drei heterozygoten Möglichkeiten ε3/ε4, ε2/ε3 und ε2/ε4. Durch Verdau eines 218bp

langen amplifizierten Fragments mit Hilfe der Restriktionsenzyme *AflIII* und *HaeII* entstehen je nach *APOE* Haplotyp unterschiedliche Fragmente (Abbildung 2), die gelelektrophoretisch aufgetrennt und bestimmt werden können (Abbildung 2).

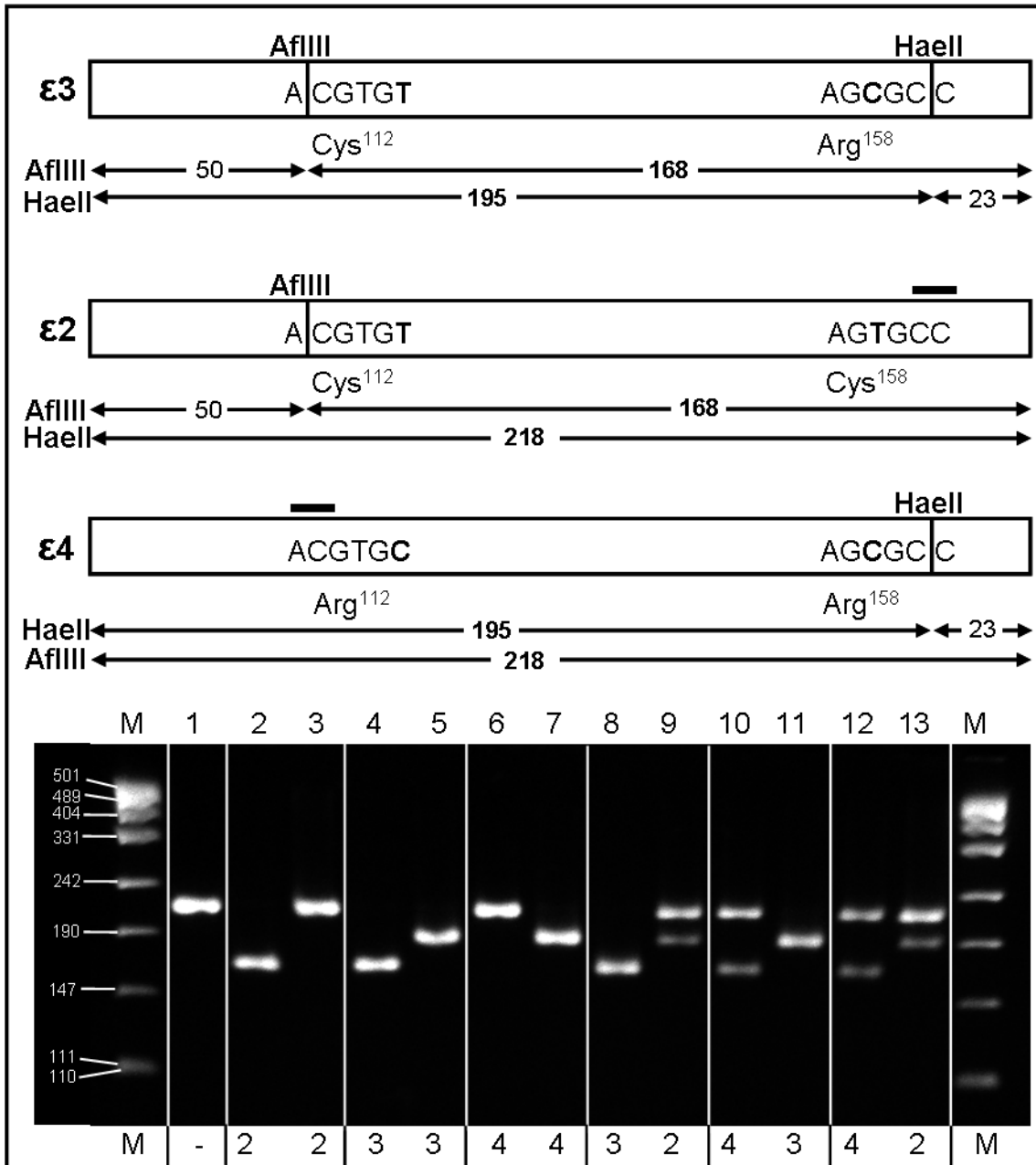


Abbildung 2: Schematische Darstellung und Gelelektrophorese der *APOE* Genotypisierung

APOE Genotypisierung durch Restriktion eines 218-bp langen amplifizierten Fragmentes mit *AflIII* und *HaeII*. In den Boxen sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme dargestellt. Die vertikalen Linien zeigen die genaue Position des Schnittes und die dick gedruckten Basen Abkürzungen (T,C) zeigen ob für die AS Cys oder Arg kodiert wird. Die Größe der jeweiligen Fragmente ist zwischen den Pfeilen angegeben. Durch waagerechte Balken sind die fehlenden Restriktions-Erkennungssequenzen markiert. Die gelelektrophoretische Trennung aller Fragmente in einem 4 prozentigen MoSieve Gel ist im unteren Bereich gezeigt. Lauflinie 1 zeigt das amplifizierte und ungeschnittene 218bp Fragment. Die Lauflinien 2-13 zeigen die Haplotypen $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 2$, $\epsilon 4/\epsilon 3$ und $\epsilon 4/\epsilon 2$. Wobei in den geraden Lauflinien immer mit *AflIII* und in den ungeraden, außer 1, immer mit *HaeII* geschnitten wurde. Der Marker M ist *pUC19* DNA mit *HpaII* geschnitten.

4.2.7.2 Illumina Genotypisierung

Für die „Initiale GWAS“ (Kapitel 5.1) wurde der Sentrix HumanHap550 Genotypisierungs-BeadChip der Firma Illumina verwendet, wohingegen für die „Erweiterte GWAS“ (Kapitel 5.3) der 610QuadV3 BeadChip benutzt wurde. Die beiden BeadChip-Varianten unterscheiden sich in der Anzahl der SNPs die untersucht werden können. Bei dem HumanHap550 können über 550 000 SNPs bestimmt werden, bei dem 610QuadV3 sind es über 610 000 SNPs. Die beiden Chiptypen basieren auf der sogenannten „Infinium“ Technik von Illumina und werden daher technisch gleich bearbeitet. Im Folgenden wird die Prozessierung dieser Chips beschrieben.

Zu Beginn des Infinium Assays (Illumina, San Diego, CA, USA) wurden die DNA Proben zur Vorbereitung der Amplifikation hitzedenaturiert um die beiden komplementären Stränge voneinander zu trennen (Abbildung 3A). Die denaturierte DNA wurde über Nacht isotherm amplifiziert, wodurch eine große Menge genomweit amplifizierte DNA entstand (Abbildung 3B). Die amplifizierten Produkte wurden durch kontrollierte enzymatische Prozesse fragmentiert (Abbildung 3C). Durch sogenannte „end-point“ Fragmentierung wurde verhindert, dass die Fragmente zu klein wurden. Nach einer Isopropanol Präzipitation wurde die DNA bei 4°C zentrifugiert (Abbildung 3D) und in Hybridisierungspuffer resuspendiert (Abbildung 3E). Die Proben wurden dann auf die BeadChips geladen und über Nacht in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Die amplifizierten und fragmentierten DNA Proben binden an Locus-spezifische 50mere (kovalent gebunden an einen von über 500 000 Bead Typen) während der Hybridisierung. Ein Bead Typ entspricht einem Allel pro SNP-Locus (Abbildung 3F). In einem Waschschriff wurden unhybridisierte DNA Fragmente entfernt (Abbildung 3G). Es folgte eine Einzelbasen-Verlängerung der auf dem BeadChip gebundenen Oligonukleotide bei der die gebundene DNA als Vorlage zur komplementären Basenpaarung diente. Mit Cy3 und Cy5 markierte dNTPs wurden zur Kettenverlängerung eingebaut (Abbildung 3H). Der Scanner nahm dann ein Bild von dem BeadChip in sehr hoher Auflösung auf, auf dem die unterschiedlichen Emittierungen der beiden Cyanine detektiert wurden. Cy3 wird bei 550nm angeregt und emittiert bei 570nm, wohingegen Cy5 bei 649nm angeregt wird und bei 670nm emittiert (Abbildung 3I).

Die weiter Verarbeitung der Rohdaten sowie die Qualitätskontrolle wird in dem Kapitel Statistik (4.2.8) näher erläutert.

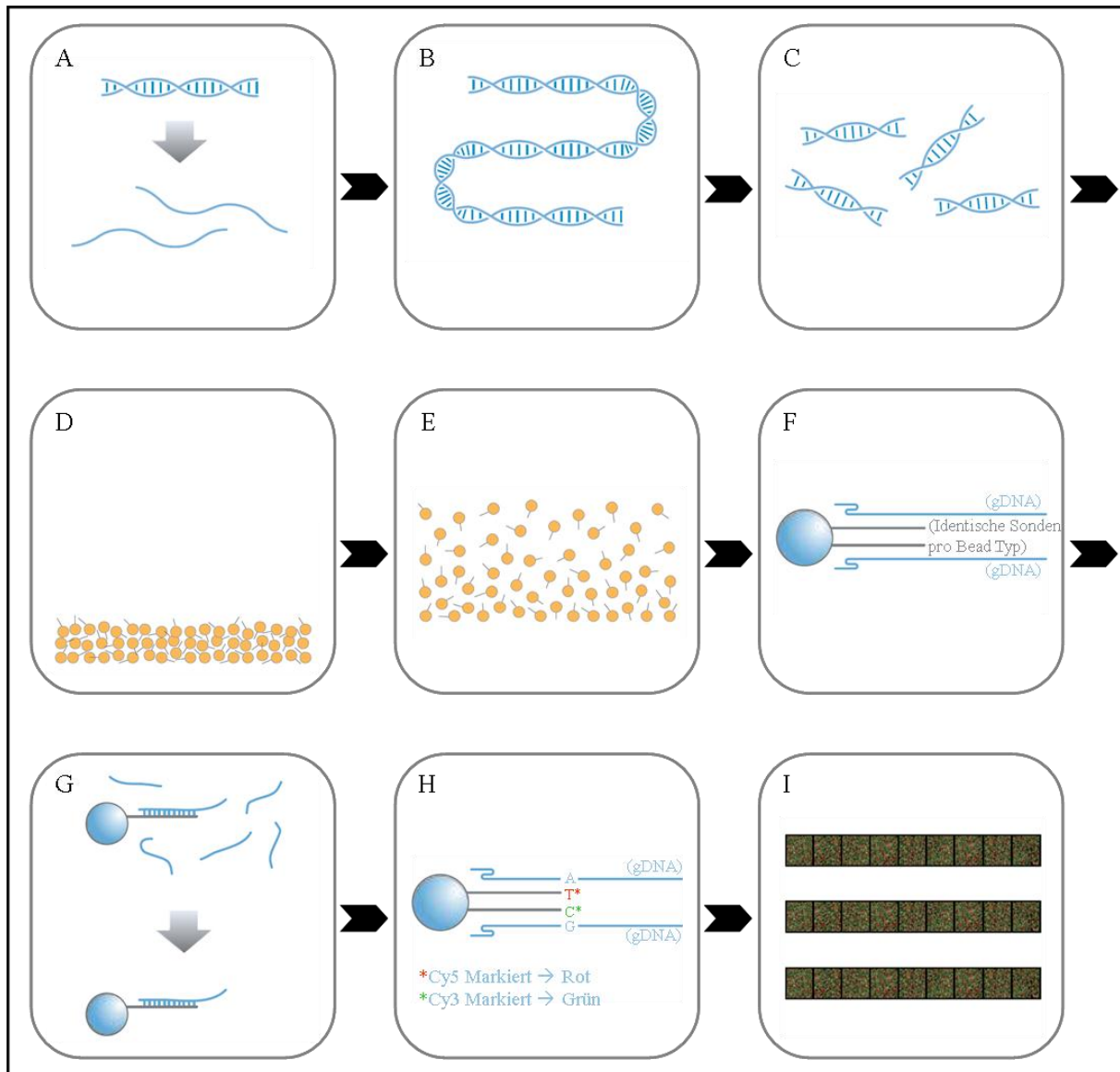


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Illumina Infinium Assays

(A) Denaturierung der genomischen DNA, (B) Inkubation der DNA zum Amplifizieren, (C) Fragmentierung der DNA, (D) Präzipitation, (E) Resuspension, (F) Hybridisierung an BeadChip, (G) Waschen des BeadChips, (H) Kettenverlängerung mit fluorochrommarkierten dNTPs, (I) Scannen der BeadChips (Abbildung nach Illumina, verändert)

4.2.7.3 Sequenom Genotypisierung

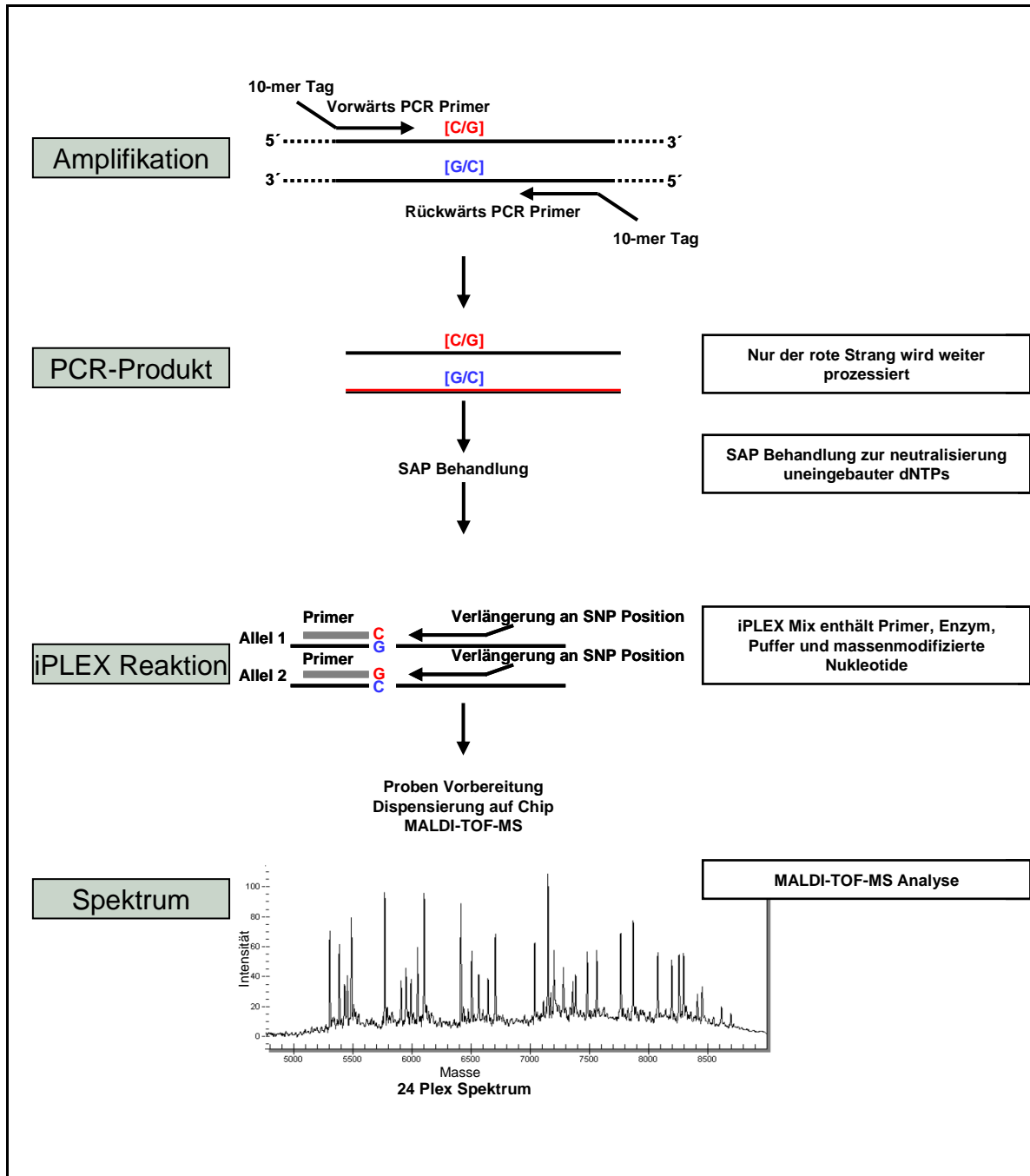


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der iPlex Reaktion

Die iPlex Reaktion startet mit einer Standard PCR zur Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments durch geeignete Vorwärts und Rückwärts-Primer. Der PCR Ansatz wird mit dem Enzym SAP dephosphoryliert, damit ungebundene dNTPs inaktiviert werden. Es schließt sich die Extensionsreaktion (Primerverlängerung) an, bei der spezielle Primer, die exakt eine Base neben dem SNP binden, verwendet werden. Es folgt eine Kettenverlängerung um eine Base und anschließende Abbruchreaktion nach Sanger. Die Probe kann nun, nach weiteren Reinigungsschritten, durch ein MALDI-TOF-MS analysiert werden (Quelle: Sequenom, verändert)

Material und Methodik

Besonders wichtig für die Hochdurchsatzgenotypisierung ist die Qualität der genomischen DNA. Diese wurde hinsichtlich Menge und Degradation überprüft (4.2.3), sowie einer Standard-PCR-Reaktion unterzogen. Die genauen Mischungsverhältnisse der einzelnen Reagenzien der PCR-Reaktion sind in Tabelle 10 dargestellt. Das Thermocycler Programm der PCR-Reaktion mit 45 Zyklen wird in Tabelle 11 gezeigt.

Tabelle 10: Reagenzien der Standard PCR-Reaktion für den iPlex Assay

Reagenz	c (Final) in 5 µl	Volumen [µl]
Wasser		2,575
Puffer (10x) (15mM MgCl)	1,25* (1,25mM MgCl)	0,625
MgCl (25mM)	2,25mM	0,450
dNTP (10mM)	500µM	0,250
Primer mix (je 500nM)	Je 100nM	1,000
HotStarTaq (5U/µl)	0,5 U/Reaktion	0,100
DNA liegt vor: ~20ng (Eingetrocknet)		0,000
Gesamt		5,000

Tabelle 11: Thermocycler Protokoll der PCR-Reaktion

94°C für 15 min	45 Zyklen
94°C für 20 s	
T(56°C) für 30 s	
72°C für 1 min	
72°C für 3 min	
12°C ∞	

Eine weitere Qualitätsmaßnahme war die Integration von je einem Prozent Negativ- und Positiv-Kontrollen. Im Durchschnitt wurden 5% der Proben doppelt genotypisiert und dadurch die Konsistenz des Assays untersucht.

Die zwei Roboter wurden für die Verdünnung und Normalisierung der DNA (gleichmäßige Einstellung der DNA Konzentrationen), die Verteilung der genomischen DNA von den 96 „well“ DNA Lagerplatten auf 384 „well“ PCR-Platten sowie zur Verteilung der PCR-Mixe auf luftgetrocknete DNA (ca. 20ng) verwendet. Die PCR wurde in GeneAmp PCR System der Firma Applied Biosystems (San Diego, CA, USA) durchgeführt. Standardmäßig wurden vier Proben einer 384er Platte auf einem 3%igen Agarosegel überprüft, davon waren zwei Proben Negativkontrollen und zwei Proben Positivkontrollen.

Nach der PCR-Reaktion werden nicht eingebaute Nukleotide der Reaktion mit dem Enzym SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) dephosphoryliert um den späteren Einbau dieser Nukleotide in der Extensionreaktion zu verhindern. Tabelle 12 zeigt beispielhaft den

Material und Methodik

Reaktionsansatz, der anschließend zu den zuvor amplifizierten PCR-Produkten zugegeben und für 30min bei 37°C im Thermocycler inkubiert wurde. Dann wurde das SAP Enzym bei 85°C für weitere 5min hitzeinaktiviert.

Tabelle 12: Reagenzien und deren Anteile in der SAP Reaktion

Reagenz	Volumen 1 rxn [μ l]
Wasser	1,53
SAP Puffer	0,17
SAP Enzym	0,3
Gesamt	2

Danach wurde eine Primer-Extensionsreaktion angeschlossen. Hierzu wurde ein weiterer Primer (Extensionsprimer) so „designed“, dass er unmittelbar vor dem zu untersuchenden SNP an das PCR-Produkt bindet. Die Reaktion selbst wurde mit vier Didesoxynukleotiden (können nach deren Einbau von dem Enzym „iPlex-Enzym“ nicht verlängert werden, klassische Abbruchreaktion nach Sanger) durchgeführt. Durch die Wahl des beschriebenen Reaktionsmixes konnte jeder Extensionsprimer um genau eine Base verlängert werden, die komplementär zu der Base des zu untersuchenden SNP war. Es entstanden somit allelspezifisch unterschiedliche DNA Fragmente. Tabelle 13 gibt das Mischungsverhältnis der iPlex Extensionreaktion an und in Tabelle 14 ist das Thermocycler Programm der Extensionreaktion gezeigt.

Tabelle 13: Reagenzien der Extensionreaktion

Reagenz	Volumen / Reaktion [μ l]
Wasser	0,755
iPlex Puffer	0,2
iPlex Term mix	0,2
Primer mix	0,804
Enzym	0,041
Gesamt	2

Tabelle 14: Thermocycler Protokoll der Extensionreaktion

94° C für 30 s	
94° C für 5 s	
T(52°C) für 5 s	5 Zyklen
80° C für 5 s	
40 Zyklen	
72° C für 3 min	
12° C ∞	

Das Pipettieren der SAP- und der Primerextension -Reaktion wurde mittels Roboter der Firma Matrix im Post-PCR Bereich durchgeführt und die Reaktion in PCR-Maschinen durchgeführt. Zur anschließenden Probenaufbereitung wurde ein Ionenaustauscherharz (Clean Resin™, Sequenom, Hamburg, D) zugegeben, um störende Kationen zu entfernen. Da Nukleinsäuren eine hohe Affinität zu Alkali- und Erdalkaliumionen zeigen. Ohne diese Reinigung würden zusätzliche Signale auftreten, die den eigentlichen Molekül-ionsignalen nachgelagert wären. Dies würde die anschließende MALDI-TOF-MS-Messung (*Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization–Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry*) empfindlich stören. Dann wurde die Reaktionslösung mit 16µl ddH₂O, welchen einen Widerstand von mindestens 18,2MΩ hatte, verdünnt.

Schließlich wurden 15–25nl des Analytengemisches mit Hilfe des MassARRAY™ Nanodispenser der Firma. Sequenom/RoboDesign (San Diego,CA,USA) auf Siliziumchips transferiert.

Die Siliziumchips waren auf 384 Positionen mit einer Matrix (3-Hydroxypicolinsäure, 3-HPA) beschichtet. Diese war für die nachfolgende Analyse in der MALDI-TOF-MS zwingend erforderlich. Auf jeder Position könnte die DNA einer Person analysiert werden. Ein Siliziumchip kann bei einem 36-fachen Plex für nahezu 14000 Genotypen, bei 384 zu analysierenden DNA Proben, verwendet werden.

Zusätzlich zu den 384 Proben wurden Kalibranten aufgetragen, die aus einer Mischung von Oligonukleotiden bekannter Masse bestanden und zur Kalibrierung des Analysesystems dienen. Nach dem Beladen der Chips mit den Analyten wurden bis zu zehn Chips auf einen Probenträger übertragen und durch eine Vakuumschleuse in das Massenspektrometer eingeführt. Die zu untersuchende Probe wurde bei der matrixunterstützten Laser Desorption/Ionisation (MALDI Technik) mit einem 100–1000 fachen Überschuss an 3-HPA Matrix versetzt, dadurch kokristallisiert und schließlich im Hochvakuum des Massenspektrometers einem intensiven Laserpuls von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt (Abbildung 5). Aufgabe der Matrix war es, die zugeführte Laserenergie zu absorbieren und damit die Ionisierung der Analytmoleküle zu unterstützen. Außerdem soll die Matrix eine photolytische Beschädigung der Analyten verhindern, sowie einer Interaktion der Probenmoleküle untereinander entgegenwirken.

Während des Vorgangs der Desorption/Ionisation werden hauptsächlich einfach geladene Molekülionen erzeugt, die in die Gasphase übertreten. Diese Ionen werden dann in einem elektrischen Feld auf das gleiche Potential beschleunigt (Abbildung 5) und erreichen, nach Verlassen der Ionenquelle, eine feldfreie Driftstrecke, das sogenannte Flugrohr, in dem sie

abhängig vom Masse-/Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt werden. Ionen mit hohen m/z -Werten wandern langsam durch das Flugrohr und treffen somit später am Detektor auf, als Ionen mit niedrigen m/z -Werten. Dieses Flugzeit-Massen-Spektrometer, das eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen im Detektor durchführen kann, nennt man *Time of Flight* (TOF)-Analysator.

Die, in der Extensionsreaktion erzeugten, DNA Fragmente können ihrer Flugzeit entsprechend der Größe nach unterschieden und von einer Software (Typer3.4, Sequenom, San Diego, CA, USA) einem individuellen Genotyp zugeordnet werden. Bei einem G/C SNP können folgende drei Genotypen auftreten: GG, GC und CC. Aufgrund der Weiterentwicklung der MALDI-TOF-MS ist es möglich, DNA-Fragmente einer Größenordnung von 1-9 kDa, d.h. ca. 3–30 Basen zu bestimmen, womit sich ein Massenbereich erschließt, in dem eine SNP-Analyse mittels Primer-Extensionsprodukten durchgeführt werden kann. Da die SNP-Analysen im Multiplex ablaufen (bis zu 40 PCR- und Extensions-Reaktionen in einem Gefäß), ist diese Technologie für einen hohen Durchsatz geeignet.

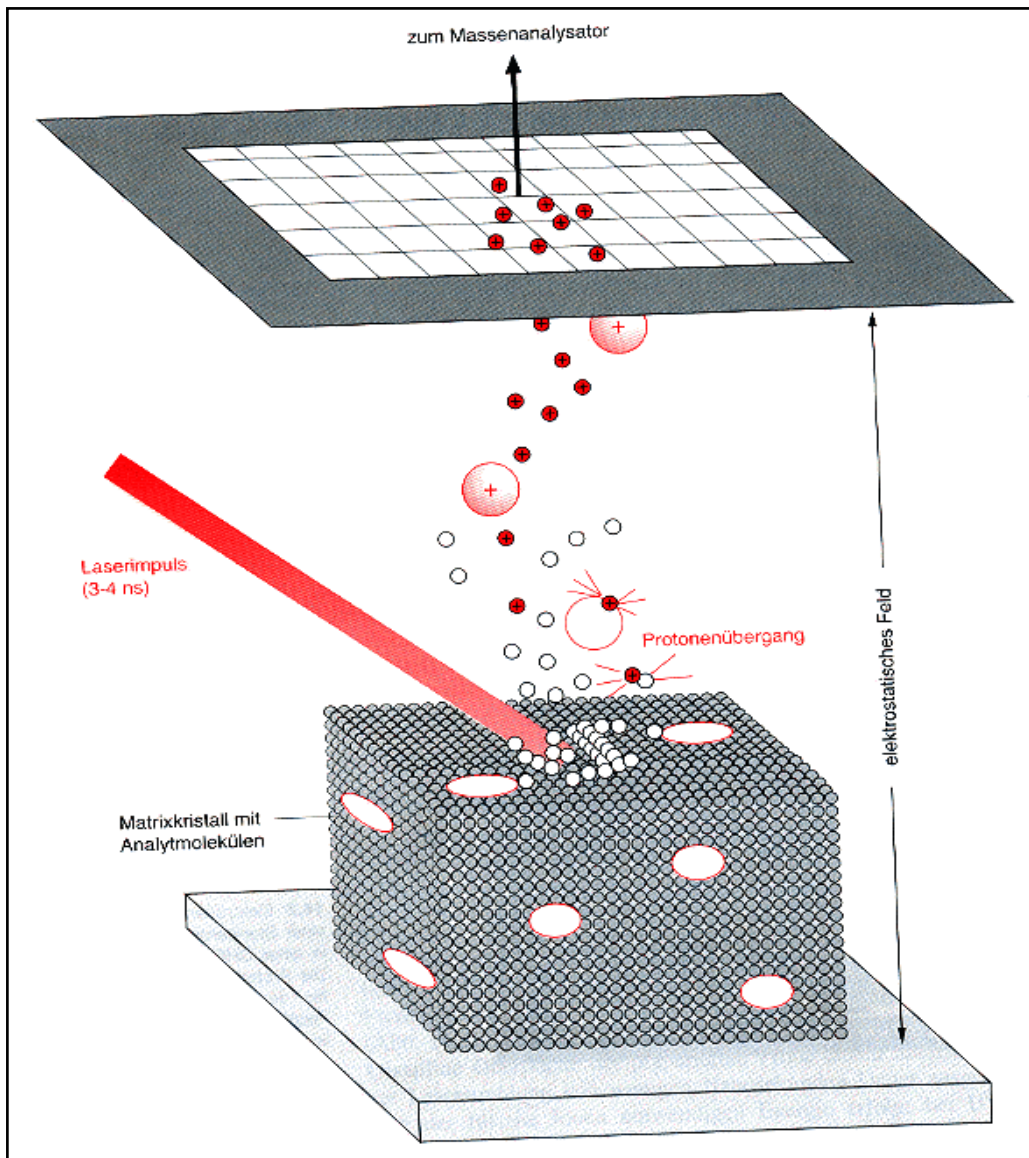


Abbildung 5: MALDI-TOF Messung

Durch einen Laserimpuls von ca. 3-4 ns werden Matrixkristalle mit Analytmolekülen angeregt und durch ein elektrisches Feld, das sich in einem Hochvakuum befindet zu dem Detektor geleitet. Der Detektor misst das Masse zu Ladung Verhältnis der angeregten Ionen (Quelle: Sequenom, San Diego, CA, USA)

Die möglichen Spektren der Detektion des Massenspektrometers sind beispielhaft in Abbildung 6 A-D gezeigt. Die Peaks des Primer und der Extentionsprodukte haben genau bekannte Massen, in Abbildung 6A ist nur der detektierte Primerpeak des Markers rs9374640 dargestellt. Bei gebildeten Produkten werden weitere Peaks detektiert. Abbildung 6B zeigt die Detektion eines heterozygoten SNP für diesen Marker und in Abbildung 6C-D sind Genotypen für den Marker rs9374640 gezeigt, die homozygot für das Allel A, bzw. homozygot für das Allel G sind.

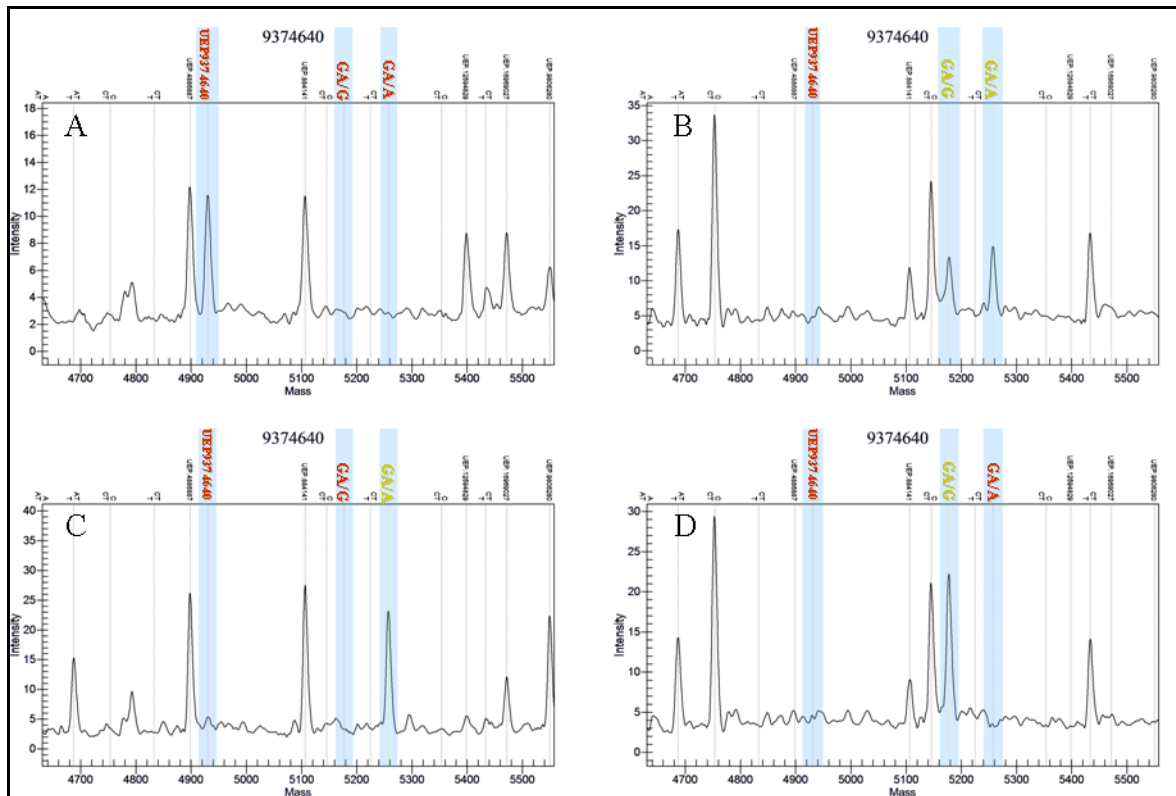


Abbildung 6 A-D: Darstellung der möglichen MALDI-TOF-MS Spektren

A) Durch UEP9374640 (*unextended* primer) gekennzeichnet, erkennt man den unverlängerten Extensionsprimer, der in diesem Fall kein Produkt ergibt, da eine negative Kontrolle ohne DNA analysiert wurde. In B) ist der Extensionsprimer vollständig in die Produkte verlängert worden und daher konnte sowohl das A als auch das G Allel detektiert werden. Daher liegt dieser SNP bei der Untersuchten Person als heterozygot vor. C) bzw. D) zeigen den homozygoten Fall für G/G bzw. A/A.

4.2.8 Statistik

4.2.8.1 Statistische Begriffe

4.2.8.1.1 Odds Ratio (OR)

Da Fall/Kontroll Studien in der genetischen Epidemiologie nicht mehr die Anteile aus der Grundgesamtheit vollständig repräsentieren, können die relativen Risiken in diesem Design nicht direkt geschätzt werden. Daher wird das *odds ratio* (OR) betrachtet. *Odds* sind definiert als Wahrscheinlichkeit für Ergebnis X geteilt durch die Wahrscheinlichkeit für das Nichtauftreten von X. Das OR vergleicht die Quote des Expositionsfaktors unter den Erkrankten mit der unter den nicht Erkrankten (Bickeböller & Fischer, 2007).

Tabelle 15: Allgemeine Berechnung des Odds Ratios

Anzahl Individuen	mit Risikofaktor	ohne Risikofaktor
erkrankt	a	b
nicht erkrankt	c	d

$$OR = \frac{a/c}{b/d}$$

Um das OR beurteilen zu können, wurde das zugehörige Konfidenzintervall (CI) angegeben. Das CI ist der Wertebereich, der mit einer vorgegebenen Vertrauenswahrscheinlichkeit ($1 - \alpha$) die wahre OR enthält. Enthält das CI den Wert 1, ist das Ergebnis nicht signifikant. Da wie üblich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ gewählt wurde, werden 95% CI angegeben.

4.2.8.1.2 Bonferroni Korrektur

Multiplres Testen liegt dann vor, wenn in einer Stichprobe mehrere Hypothesen getestet werden. Der Fehler 1. Art ist zwischen einem einzelnen Test und dem, der gesamten Studie, zu unterscheiden. Die Wahrscheinlichkeit, dass man mindestens einen Test als fälschlicherweise signifikant findet, steigt mit der Anzahl der durchgeführten Tests. Die Bonferroni Korrektur ist eine Möglichkeit um das Ansteigen dieses multiplen Fehlers zu kontrollieren und besteht darin, für k Tests, jeweils das Signifikanzniveau α/k zu wählen. Dies sollte nur angewendet werden, wenn die Tests voneinander abhängig sind, ansonsten verliert man statistische Power (Westfall & Young, 1993). Im Falle des 550k Illumina BeadChips, der ca. 550 000 SNPs untersucht, würde das Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ auf ein Niveau für genomweite Signifikanz von $0,05/550\ 000 = 9,09 \cdot 10^{-8}$ sinken.

4.2.8.1.3 Hardy Weinberg

Es kann eine einfache Beziehung zwischen der Häufigkeit eines Gens und der eines Genotyps geben. Würde man eine beliebige Person aus der Bevölkerung herausgreifen, repräsentiert diese Person einen willkürlichen Genotyp aus einem Genpool. Die Wahrscheinlichkeit für den Genotyp A_1A_1 beträgt p^2 für A_1A_2 ist sie $2pq$ und für A_2A_2 ist die Wahrscheinlichkeit q^2 (Tabelle 16)

Tabelle 16: Genotypverteilungen

Genotyphäufigkeiten im Gleichgewicht für die Allelhäufigkeiten p (A_1) und q (A_2) nach Hardy-Weinberg. Für einen autosomalen und einen X-Chromosomalen Locus

	autosomaler Locus			X-Chromosomaler Locus				
				Männer		Frauen		
Genotyp	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	A_1	A_2	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
Häufigkeit	p^2	$2pq$	q^2	p	q	p^2	$2pq$	q^2

Diese Berechnungen gelten nur, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- Diploide Individuen
- Sexuelle Fortpflanzung
- Nicht überlappende Generationen
- Zufällige Paarung (Panmixie)
- Nahezu unendliche Populationsgröße
- Keine Migration, Mutation und Selektion

Es sollte Panmixie und in keinem Fall z.B. Inzucht vorliegen, denn bei Kindern mit blutsverwandten Eltern ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie bei einigen Allelen homozygot sind stark erhöht. Dementsprechend ist die Wahrscheinlichkeit für heterozygote Allele seltener. Daher findet man auch seltene rezessive Krankheiten, vermehrt bei Kindern blutsverwandter Eltern.

In weiteren Fortpflanzungsrunden, nach obiger Tabelle, mit zufälligen Paarungen, ändern sich diese Genotypfrequenzen nicht mehr (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, HWE).

Der Anteil der Heterozygoten ist am höchsten, wenn die Allelfrequenzen bei 0,5 liegen:

$$f(A_1A_1) = 0,5^2 = 0,25$$

$$f(A_1A_2) = 2 \times 0,5 \times 0,5 = 0,50$$

$$f(A_2A_2) = 0,5^2 = 0,25$$

Sind A_1 und A_2 die einzigen Allele an diesem Locus, so gilt für deren Häufigkeiten $p + q = 1$.

Abweichungen vom HWE in beobachteten Genotyp-Häufigkeiten innerhalb einer Gruppe von Probanden, können entweder durch Genotypisierungsfehler, unerwartete Verwandtschaftsbeziehungen, aufgrund einer unerkannten Vermischung genetisch divergenter Subpopulationen, oder durch Assoziation eines Genotyps mit dem untersuchten Phänotyp zu Stande kommen.

Beobachtete, und nach dem HWE erwartete Genotyp-Häufigkeiten können, mit Hilfe eines χ^2 -Tests, miteinander verglichen werden, um eventuelle Abweichungen festzustellen.

4.2.8.1.4 Kopplungsungleichgewicht

Ein Kopplungsungleichgewicht ($LD = \text{linkage disequilibrium}$) beschreibt die Verknüpfung eines bestimmten Marker-Allels mit einem anderen Marker oder einer Krankheit in einer Population. LD liegt dann vor, wenn in der betrachteten Population bestimmte Allele dieser Marker häufiger auf einem Chromosom gemeinsam zu finden sind, als dies, unter der Annahme von freier Rekombination (Kopplungsgleichgewicht), zu vermuten wäre. Rekombination trennt nur selten zwei Loci, die auf einem Chromosom dicht nebeneinander liegen. Allel-Gruppen, die in einem sehr kurzen Abschnitt eines Chromosoms liegen, werden daher gewöhnlich gemeinsam über viele Generationen hinweg weitergegeben. Einen solchen Block von Allelen bezeichnet man als Haplotyp. Das Maß $|D'|$ (*Deprime*) gibt an, ob eine beobachtete Anzahl an Haplotypen allein auf eine aufeinander folgende Entstehung von Polymorphismen durch Mutationen zurückgeführt werden kann ($|D'| = 1$), oder ob Rekombinationsereignisse zur Erklärung zusätzlicher Haplotypen angenommen werden müssen ($|D'| < 1$) (Abbildung 7). Der Wert 0 steht dann für freie Rekombination. Soll hingegen beurteilt werden, wie sicher, anhand des Auftretens eines bestimmten Allels an einem Markerort, der Zustand an einem anderen Marker-Locus vorhergesagt werden kann, so ist die Größe r^2 aussagekräftig (Nothnagel 2004). Sind für ein biallelisches Marker-Paar nur zwei Haplotypen zu beobachten, so befinden sich die beiden Loci in einem perfekten Kopplungsungleichgewicht ($r^2 = 1$).

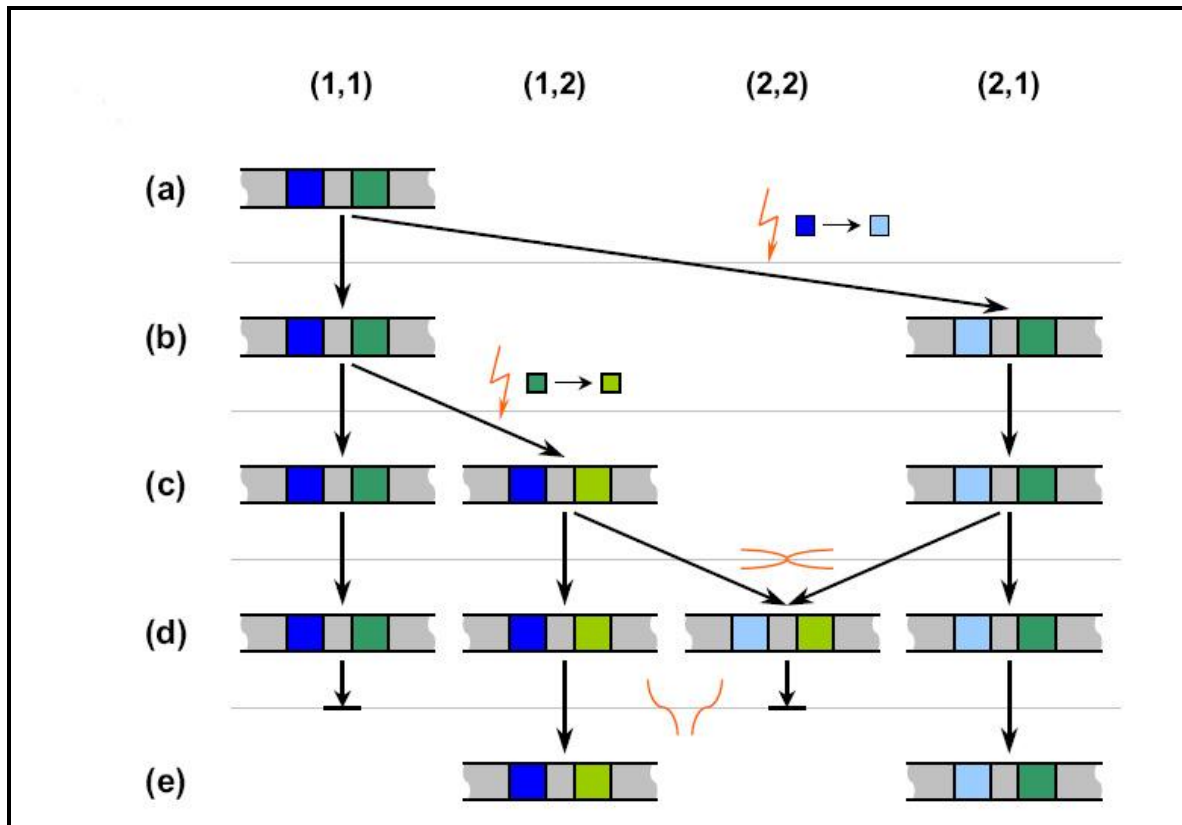


Abbildung 7: Schematisches Beispiel von LD zwischen zwei SNPs

(a) Nukleotidsequenz ohne Variation in zwei benachbarten Loci (blau und dunkelgrün). (b) Eine Mutation des blauen Nukleotids lässt einen neuen SNP in der Population entstehen. Das LD kann durch die fehlende Variante im zweiten Nukleotid nicht bestimmt werden. (c) Ein zweiter SNP entsteht, während einer Mutation auf dem grünen Locus. LD ist demnach zunächst vollständig ($|D'| = 1, r^2 < 1$). (d) Der vierte Haplotyp (2,2) entsteht durch eine Rekombination zwischen den Haplotypen (1,2) und (2,1) ($|D'| < 1, r^2 < 1$). Eine Mutation mit demselben Ergebnis ist extrem unwahrscheinlich. Wiederholte Rekombination mit geringerem LD zwischen den SNPs, Mischung und genetischer Drift verstärken es. (e) Nur zwei von vier komplementäre Haplotypen sind als Folge von genetischem Drift in der Population übrig ($|D'| = r^2 = 1$).

(Abbildung nach (Nothnagel 2004)).

4.2.8.1.5 Abschätzung von Haplotypfrequenzen

Haplotypen und deren Frequenzen können sehr genau durch direktes Sequenzieren ermittelt werden. Diese Methode ist momentan aber noch zu zeitaufwendig und vor allem zu kostenintensiv, wird aber in naher Zukunft die Methode der Wahl sein. Bis dahin werden Haplotypen und deren Frequenzen durch Genotypisierungsdaten abgeschätzt. Hierzu wird eine Vier-Felder-Tafel zur Berechnung herangezogen.

Tabelle 17: Vier-Felder-Tafel zur Abschätzung von Haplotypfrequenzen

	1	2	Σ
1	p_{11}	p_{12}	$p_{1\cdot}$
2	p_{21}	p_{22}	$p_{2\cdot}$
Σ	$p_{\cdot 1}$	$p_{\cdot 2}$	1

Die Ermittlung der D' - sowie der r^2 -Werte erfolgt nach untenstehender Gleichung.

$$D' = \begin{cases} \frac{D}{\min(p_{1\cdot}p_{\cdot 1}, p_{2\cdot}p_{\cdot 2})} : D > 0 \\ \frac{D}{\min(p_{1\cdot}p_{\cdot 1}, p_{2\cdot}p_{\cdot 2})} : D < 0 \end{cases}, r^2 = \frac{D^2}{p_{1\cdot}p_{2\cdot}p_{\cdot 1}p_{\cdot 2}}$$

Als Ausgangsdaten, zur Bestimmung des Kopplungsungleichgewichts eines biallelischen Marker-Paares, sind die Häufigkeiten von Genotypen beider Loci nötig. Diese Haplotyp-Frequenzen können dann zur Berechnung von $|D'|$ und r^2 eingesetzt werden. Beide Werte des Kopplungsungleichgewichts, r^2 und $|D'|$, können Zahlen zwischen 0 und 1 annehmen, wobei der Wert 0 für freie Rekombination steht.

Hat $|D'|$ einen Wert von 1, so wird von vollständigem LD, während bei einem r^2 Wert von 1, von einem perfekten LD gesprochen wird (Abbildung 7).

Diese Größen sind nützlich um das paarweise LD zu bestimmen, sie können allerdings nicht mehr als zwei Loci betrachten, folglich ist eine Assoziationssimulation zwischen Allelen von mehr als zwei Loci nicht möglich. D' ist ± 1 wenn mindestens ein Haplotyp fehlt. Fehlende Haplotypen sind eher bei seltenen SNP Allelen als bei häufigen SNPs ein Problem. Für kleine bis mittlere Kohortengrößen kann die Abschätzung von $|D'|$ eine beachtliche Aufwärtstendenz ergeben (Teare, Dunning, Durocher, Rennart, & Easton, 2002; Terwilliger, Haghghi, Hiekkalinna, & Göring, 2002).

$|D'|$ ist vielmehr ein Indikator für fehlende Haplotypen, vielleicht infolge von ausgebliebenen Rekombinationsereignissen, als eine zuverlässige Messung des LD. Abbildung 7 zeigt ein Beispiel zur Veranschaulichung. Die Stärke des LD zwischen einem Krankheitslocus und einem genetischen Marker, ermittelt durch r , ist indirekt proportional zu der Power, mit der eine Assoziation zu finden ist (Teare et al., 2002).

4.2.8.2 Fall/Kontroll-Studien

In Fall/Kontroll-Studien wird geprüft, ob ein genetisches Merkmal mit einem Phänotyp assoziiert ist, das heißt, ob es bei Betroffenen signifikant häufiger auftritt als bei Nicht-Betroffenen (Gambaro, Anglani, & D'Angelo, 2000).

Zur Entscheidung, ob ein genetisches Merkmal ein Risikofaktor ist, wurden übliche statistische Verfahren angewandt. Dabei wurde untersucht, ob die Unterschiede zweier Stichproben durch zufallsbedingte Streuung zu erklären waren (Nullhypothese, H_0) oder, ob tatsächlich ein Effekt vorlag (Alternativhypothese, H_1). Mit dem χ^2 -Test wurde aus den Beobachtungsdaten die jeweilige Testgröße errechnet und der zugehörige p-Wert ermittelt. Der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, mit der sich die vorliegenden Ergebnisse zufällig ergeben könnten, d.h. der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese H_0 (keine Assoziation) ablehnt. Wenn diese Wahrscheinlichkeit gering ist, kleiner als das zuvor vereinbarte Signifikanzniveau α , wird H_0 verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet. Meist, so auch in der vorliegenden Arbeit, setzt man $\alpha = 0.05$. Außerdem wurden *Odds Ratios* (OR) mit Konfidenz-Intervallen (CI) berechnet. Im vorliegenden Fall eines Fall/Kontroll-Vergleichs, zu Risiko-Genotypen bei der Alzheimer Krankheit, wurde mit der Software, Haploview4.1, χ^2 -Tests sowie die Haplotypverteilung bestimmt. Eine logistische Regression auf einzelnen Polymorphismen und abhängig vom Krankheitsstatus, Alter und Geschlecht jeweils von Kontrollen und Fällen wurde mit SPSS berechnet. Dabei wurden ORs und die dazugehörigen 95% CI sowie die p-Werte ermittelt.

4.2.8.3 Qualitätskontrolle und Analyse der erweiterten GWAS

Bei der Qualitätskontrolle der erweiterten GWAS wurden 18 Individuen, die eine kleinere Genotypisierungsrate als 80% zeigten, ausgeschlossen. Alle anderen Individuen, die dieses Qualitätskriterium erfüllten, wurden auf mögliche falsche Geschlechtseinteilung getestet (Genotypisierungsrate des Y-Chromosoms). Hierbei wurden 17 weitere Individuen aus dem Datensatz entfernt, die nach der Genotypisierung ein anderes Geschlecht zeigten, als nach der Probenannotierung zu erwarten war. Genomweiter Durchschnitt der *identity-by-state* (IBS) Beobachtungen wurden für jedes Individuen Paar berechnet. Ein Individuum jeden Paares mit einem berechneten IBS $>0,985$ wurde ausgeschlossen. Dieser Wert spricht für identische Individuen oder monozygotische Zwillinge. Als folge dessen wurden 21 weitere Individuen aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Das Ergebnis der IBS Matrix wurde für einen

klassischen Ansatz zur Multidimensionalen Skalierung (MDS) herangezogen. Nachdem die ersten vier Dimensionen gegeneinander graphisch aufgetragen wurden, konnte nur ein Cluster beobachtet werden, daher musste dieser Datensatz nicht gegen Populations-Stratifikations-Effekte korrigiert werden. Des Weiteren wurden SNPs mit einer *minor allele frequency* (MAF) von $< 0,01$, einer Genotypisierungsrate $< 0,08$ oder einem zweiseitigem Hardy-Weinberg p-Wert $< 1 \times 10^{-3}$ ausgeschlossen. Nach diesen Qualitätskriterien waren 971 Kontrollen und 709 Alzheimer Patienten, sowie 521 102 SNPs in die Analyse eingebunden.

Die SNPs wurden auf Assoziation für Fälle gegen Kontrollen, mit Hilfe eines χ^2 -Test, berechnet. Für die verfügbaren endophänotypischen Daten wurde eine lineare Regression verwendet, hierbei waren nur AD-Fälle eingeschlossen. Es wurde ein additives, dominantes und rezessives Model (Tabelle 18) mit Alter, Geschlecht und SNP als Kovariaten berechnet, da Alter und Geschlecht einen Einfluss hat und in den untersuchten Gruppen ungleich verteilt war. Dieser Effekt wurde somit herausgerechnet. Alter ist bekanntlich der größte Risikofaktor für AD, da Frauen im Durchschnitt älter als Männer werden, wurde der Datensatz durch die Verwendung der Kovariaten für diese Effekte korrigiert. Die Genotypen wurden, wie in Tabelle 19 gezeigt, umkodiert. Für die diagnostischen Parameter wie TAU, LDL, VLDL, Cholesterin, Triglyzeride, Vitamin B12 und A-beta wurde der natürliche Logarithmus auf die Werte angewandt, damit die Werte einer Normalverteilung entsprechen. Diese Berechnungen wurden mit dem Programm PLINK (Purcell et al., 2007) sowie R, Version 2.13.0, durchgeführt.

Tabelle 18: Einteilung der statistischen Modelle

(a=seltene Allel, A=häufiges Allel)

Statistischer Test	Berechnung
Allelisch	a gegen A
Genotypisch	aa gegen Aa gegen AA
Dominant	(Aa, aa) gegen AA
Rezessiv	aa gegen (AA, Aa)
Additiv	aa gegen AA und 2x Aa gegen AA

Tabelle 19: Kodierung der Genotypen

Minor Allel	Additiv	Dominant	rezessiv
2*minor	2	1	1
1*minor	1	1	0
0*minor	0	0	0

Weblink 2: pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/

Weblink 3: r-project.org/

4.2.8.4 Imputation

Um die Dichte der Marker weiter zu erhöhen und dadurch potentielle neue Assoziationen zu finden, wurde eine Imputation durchgeführt. Hierbei schätzt man, unter Zuhilfenahme von bekannten Kopplungsungleichgewichten aus genotypisierten oder sequenzierten Datensätzen, die Ausprägung von SNPs ab, die nicht selbst genotypisiert wurden. Es wurden zwei Datensätze als Referenz herangezogen, zum einen aus dem 1000 Genom Projekt (NCBI build 36 Feb.2009) und zum anderen von HapMap (NCBI build 36 release #2). Von beiden Datensätzen wurden nur europäische Individuen (CEU) verwendet, damit die Analysen nicht durch Populationsunterschiede beeinflusst werden konnte. Für die anschließende Imputation wurde das Programm „Impute2“ verwendet (Howie, Donnelly, & Marchini, 2009).

Weblink 4: mathgen.stats.ox.ac.uk/impute/impute_v2.html

Alle imputierten Regionen wurden einzeln berechnet. Durch die, in „Impute2“ implementierte, Funktion des Strang-Abgleichs konnte unser Datensatz mit den beiden Referenzdatensätzen abgeglichen werden. Bei einem angewandten Grenzwert 90% Imputierungsrate pro SNP haben wir eine Übereinstimmung von 99% erreicht und dabei 90% der möglichen SNPs imputiert. Zur Datentransformierung in PLINK Format wurde für jeden SNP bei jedem Individuum der Genotyp mit der höchsten Wahrscheinlichkeit ausgewählt. War diese unter 90%, wurde dieser Genotyp auf fehlend gesetzt.

4.2.8.5 Sliding Window

Für Haplotypanalysen wurden neben den Blockdefinitionen von (Gabriel et al., 2002) auch ein zwei und drei Marker *sliding window* gewählt, um Haplotypblöcke zu berechnen. Bei diesem Verfahren schiebt man den erzeugten zwei bzw. drei Marker-Haplotyp immer um einen Marker weiter, so erhält man alle Kombinationsmöglichkeiten benachbarter Marker. Zur Haplotyp Berechnung in PLINK wurden die Standard-Blockdefinitionen, wie sie in Haploview implementiert sind, verwendet.

Weblink 5: <http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>

4.2.8.6 Meta-Analyse

Eine Meta-Analyse ist eine Zusammenfassung von inhaltlich homogenen Primärstudien, in denen, in der Regel, kleinere Kohorten untersucht werden. Durch eine gemeinsame Analyse mehrerer Primärstudien ist daher eine verlässlichere Aussage über mögliche Effekte, aufgrund der erhöhten Fallzahl, möglich.

Für die in Kapitel 5.1.1 vorgestellten Meta-Studien wurden Primärstudien herangezogen, bei denen SNPs eine Allelfrequenz von $>1\%$ in Kontrollen zeigten und in mindestens vier Individuen auftraten. ORs und 95% CI wurden aus den Allelverteilungen der veröffentlichten Primärstudien berechnet. Die Zusammenfassung der ORs und deren 95% CI erfolgten nach dem „Zufalls-Effekt-Model“, beschrieben von DerSimonian und Laird (DerSimonian & Laird 1986). Studien wurden ausgeschlossen, bei denen eine Abweichung im Hardy-Weinberg Gleichgewicht, in dem Kontroll-Kollektiv, von $p < 0,001$ festgestellt wurde. Individuen die in mehreren Studien eingeschlossen waren, wurden nur einmal für die Meta-Analyse berücksichtigt.

5 Ergebnisse

5.1 Initiale GWAS

5.1.1 AlzGene

Auf der Internetseite:

Weblink 6: <http://www.alzgene.org/>

(Bertram et al., 2007) findet man eine Zusammenfassung von Meta-Analysen zu Risikoloci der Alzheimer Krankheit. Die Meta-Analysen sind nach dem jeweiligen Effekt auf die Krankheit gegliedert. Diese Liste der Top Loci beinhaltet nur Gene, die wenigstens einen nominell signifikanten OR-Wert, in der Meta-Analyse, zeigten. Durch die kontinuierliche Aktualisierung der Meta-Analysen kann sich die Liste, der am stärksten mit AD assoziierten Kandidatengene, ändern. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die Version vom 7. Mai 2008, dem Zeitpunkt, als die Analyse der hier vorgestellten Daten stattfand.

5.1.2 Aufbau der Studie

Die Beschreibung des initialen GWAS Kollektives ist unter Kapitel 4.1.2 zu finden. Eine Beschreibung der Prozessierung der DNA-Proben findet man unter Kapitel 4.2.7.2.

Nachdem eine genomweite Berechnung von Fällen gegen Kontrollen durchgeführt wurde, konnten, außer dem APOE Locus, keine weiteren Regionen mit genomweiter Signifikanz bestimmt werden. Die genomweiten Daten dieser initialen Fall/Kontroll GWAS (Berechnung: Sebastian Wurst) werden in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben. Es wurde sich im Folgenden auf die Validierung der zum damaligen Zeitpunkt (Mai 2008) als wichtigste Risikoloci geltenden Regionen konzentriert.

Zum Vergleich unserer Daten mit den, zu der Zeit der Studie, aktuellen und am stärksten mit AD assoziierten Gene, wurden die Top 10 Gene, die auf AlzGene gelistet waren, ausgewählt (*APOE*, *GAB2*, *CHRNA2*, *CH25H*, *PGBD1*, *LMNA*, *CST3*, *PCK1*, *ACE*, *MAPT*). Zusätzlich wurde das zu der Zeit interessante Gen *SORL1* ausgewählt, welches auch in der Analyse anderer Gruppen Assoziation zu Alzheimer zeigte (Rogaeva et al. 2007; Lee et al. 2007).

Die SNP-Auswahl für eine vergleichende SNP Analyse zwischen den GWAS Daten und den Top 10 Genen, die auf AlzGene verfügbar waren, wurde folgendermaßen durchgeführt: Alle SNPs die auf dem HumanHap550 BeadChip vertreten sind und weniger als 25kb *upstream*

oder *downstream* eines Gens von Interesse liegen, wurden identifiziert und in die Analyse eingebunden. Eine Genotypisierungsrate von 99,5% wurde für alle ausgewählten SNPs berechnet und kein SNP wurde von der Analyse ausgeschlossen. War ein SNP sowohl in der AlzGene Meta-Analyse als auch auf dem HumanHap550 BeadChip vorhanden, wurde ein direkter Vergleich der entsprechenden p-Werte gemacht. Wenn dieser direkte Vergleich nicht möglich war, weil der SNP nicht auf dem BeadChip vorhanden war, wurden die beiden flankierenden SNPs des BeadChips ausgewählt. Für die benachbarten SNPs wurde dann ein zwei-Marker-Haplotyp generiert, wodurch es möglich ist D' und r^2 zu bestimmen und im Fall von hohem LD die Berechnung einer Haplotyp basierten Statistik um eine mögliche Krankheitsassoziation mit dem eingeschlossenen AlzGene SNP festzustellen. Die folgenden p-Werte sind nicht für multiples Testen korrigiert, da jeder SNP aus der Top10 Liste von AlzGene einer unabhängigen Hypothese zur Validierung folgt. Zu den untersuchten Genen findet man in Tabelle 34, im Anhang, eine Liste mit allen SNPs. Nach der genotypischen Berechnung durch eine lineare Regression wurden p-Werte für die Modelle additiv, dominant und rezessiv kalkuliert und durch die Indizes ^A, ^D bzw. ^R gekennzeichnet.

5.1.3 Analyse der 11 Kandidatengene

5.1.3.1 APOE

Das stärkste Signal in der GWAS wurde für zwei intronische SNPs (rs157580 und rs2075650) in dem Gen *TOMM40* (*Translocase of outer mitochondrial membrane 40*) mit p-Werten kleiner 10^{-40} gefunden. Das *TOMM40* Gen liegt in hohem LD zu dem *APOE* Gen (*Apolipoprotein E*), für das auch zwei SNPs (rs8106922 und rs405509) im Promotor mit p-Werten kleiner 10^{-6} gefunden wurden. Da dieser Locus bei nahezu allen genetischen Studien im Alzheimer Bereich gefunden wird, dient er als Positiv-Kontrolle dafür, dass der gewählte Ansatz in der Lage ist, AD relevante Signale zu detektieren.

5.1.3.2 GAB2

In einer früheren GWAS wurden einige SNPs in dem *GAB2* Gen (*GRB2-Associated binding protein 2*) gefunden, die das Risiko in Kombination mit dem *APOE*- $\epsilon 4$ Haplotyp beeinträchtigen könnten (Reiman et al., 2007). In unserer Studie wurden insgesamt 27 SNPs

analysiert, 23 in dem Gen selbst und 4 in der Region $\pm 25\text{kb}$ um das Gen *GAB2* (Abbildung 8, Tabelle 34). Für 10 SNPs waren in der AlzGene Datenbank zu diesem Gen Metastudien Daten berechnet worden, allerdings wurde in unserer Studie von diesen 10 lediglich der SNP rs4945261 genotypisiert. Wir konnten diesen SNP nicht, wie in der Meta-Analyse von AlzGene, als mit AD assoziiert identifizieren. Das gleiche galt für die 9 übrigen AlzGene SNPs, die mit Hilfe eines zwei-Marker-Haplotyp analysiert wurden und keine nominell signifikanten p-Werte hervor brachten. Ebenso konnten keine signifikanten Assoziationen mit einem der Marker unserer GWAS gefunden werden. Eine Haplotypanalyse brachte ein schwaches signifikantes Signal ($p=0,0374$), für ein Haplotyp der das gesamte Gen einbindet, hervor (Abbildung 9).

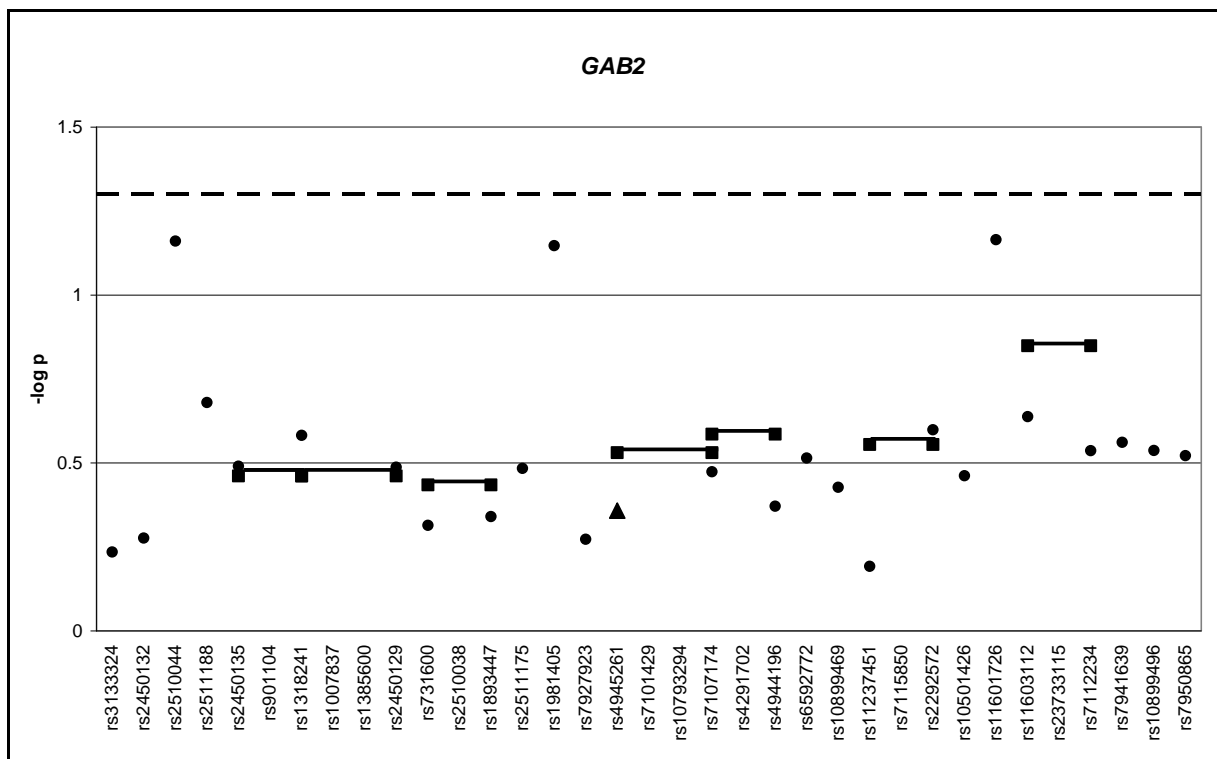


Abbildung 8: Graphische Darstellung der p-Werte des *GAB2* Locus

Angegeben sind die $-\log p$ -Werte für die SNPs in der Region des *GAB2* Gens. Punkte repräsentieren $-\log p$ -Werte von SNPs die in der GWAS genotypisiert wurden und nicht in der AlzGene Datenbank gelistet sind. Dreiecke markieren $-\log p$ -Werte von SNPs die auf AlzGene vorhanden sind. Linien, die Vierecke verbinden, zeigen den $-\log p$ -Wert des zwei-Marker-Haplotyp berechnet mit Haploview. Die gepunktete Linie bei einem $-\log p$ -Wert von etwa 1,3 gibt den Schwellwert für nominelle Signifikanz an, der bei $p=0,05$ liegt.

Ergebnisse

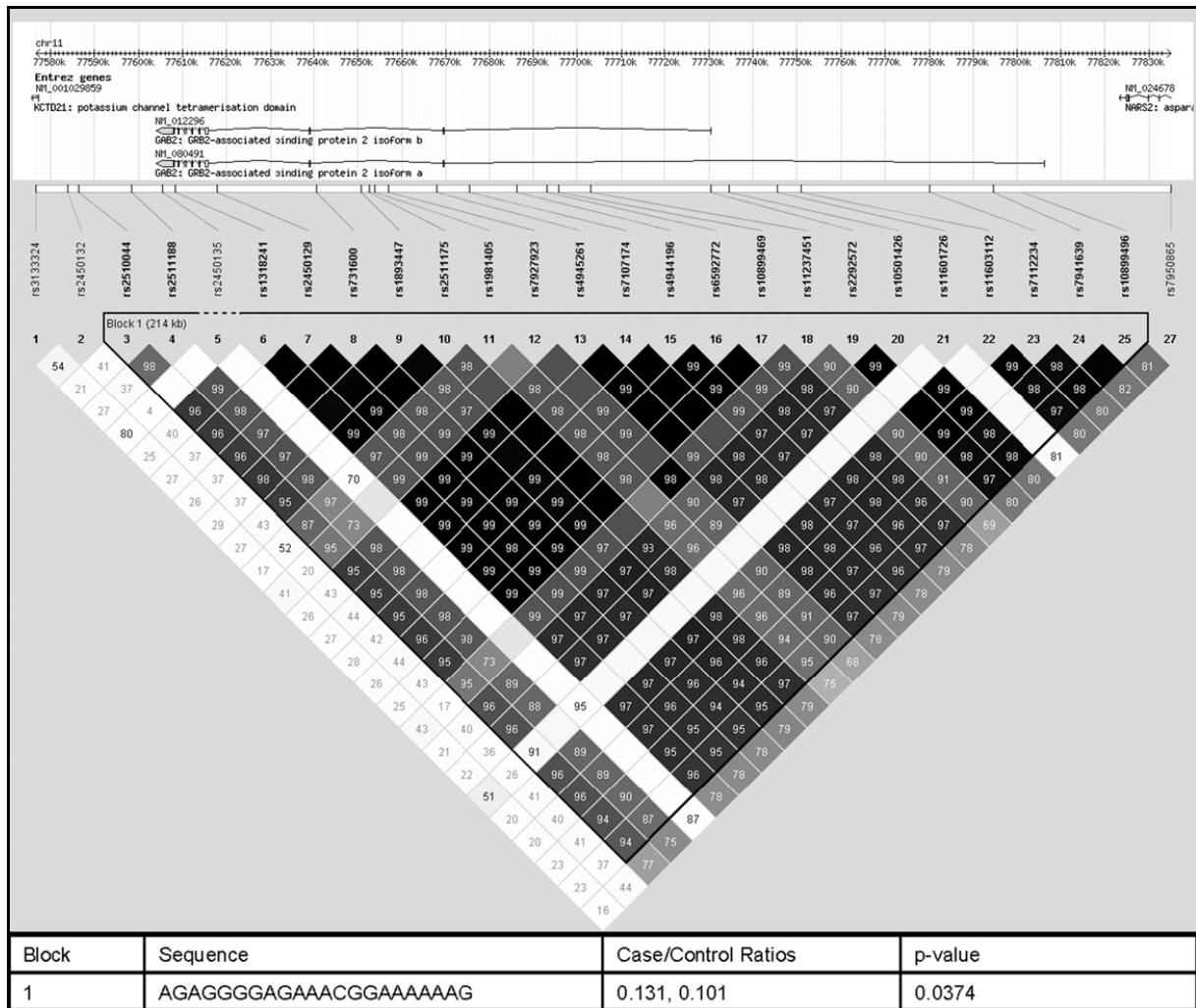


Abbildung 9: LD und Haplotyp Struktur des GAB2 Locus

Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Eine Kombination mit einem p-Wert von 0,0374 und einer Frequenz von über 13,1% für Fälle, sowie 10,1% für Kontrollen ist in der Tabelle angegeben. Die Haplotypblöcke wurden nach den Definitionen von (Gabriel et al., 2002) erstellt und durch Haploview 4.1 erzeugt.

5.1.3.3 CHRN2

Das stärkste, zuvor mit AD assoziierte, Signal des Gens *CHRN2* (*neuronal nicotinic acetylcholine receptor β 2-subunit*) war der SNP rs4845378 (Cook et al. 2004). Zugleich war dieser SNP auch der einzige, der in der Meta-Analyse auf AlzGene für dieses Gen geführt wurde. Vier SNPs aus unserer GWAS lagen in dem *CHRN2* Gen, sowie weitere 12 SNPs lagen in dem Bereich von 25kb *up-* bzw. *downstream* (Tabelle 34) und damit teilweise in den Genen *TDR10* (*tudor domain containing 10*), *UBE2Q1* (*ubiquitin-conjugating enzyme E2Q*) und *ADAR* (*adenosine deaminase RNA-specific*). Für den SNP rs4845378 war kein direkter

Ergebnisse

Vergleich möglich, daher wurde ein zwei-Marker-Haplotyp aus den flankierenden SNPs rs4845652 und rs3811450 gebildet. Es konnte keine nominell signifikante Assoziation mit AD durch diesen Block und unserer GWAS gefunden werden (Abbildung 10). Ebenso zeigten keine der vier SNPs, die in dem Gen *CHRNA2* liegen, Assoziation mit AD. Allerdings wurden für vier andere SNPs, die in der Umgebung von *CHRNA2* liegen, nominell signifikante p-Werte berechnet. Diese vier sind, der intronische rs7556449 ($p^R=0,0211$) SNP, ein funktioneller Polymorphismus (rs3811448 $p^R=0,0107$) in *TDRD10*, ein weiterer intronischer SNP (rs7543174 $p^R=0,0310$) in *UBE2Q1* und ein intronischer SNP (rs9427097 $p^R=0,0289$) in dem Gen *ADAR*. Eine Haplotypanalyse der gesamten Region lieferte keine signifikanten Assoziationssignale in den zwei Blöcken, wie in Abbildung 11 zu sehen ist.

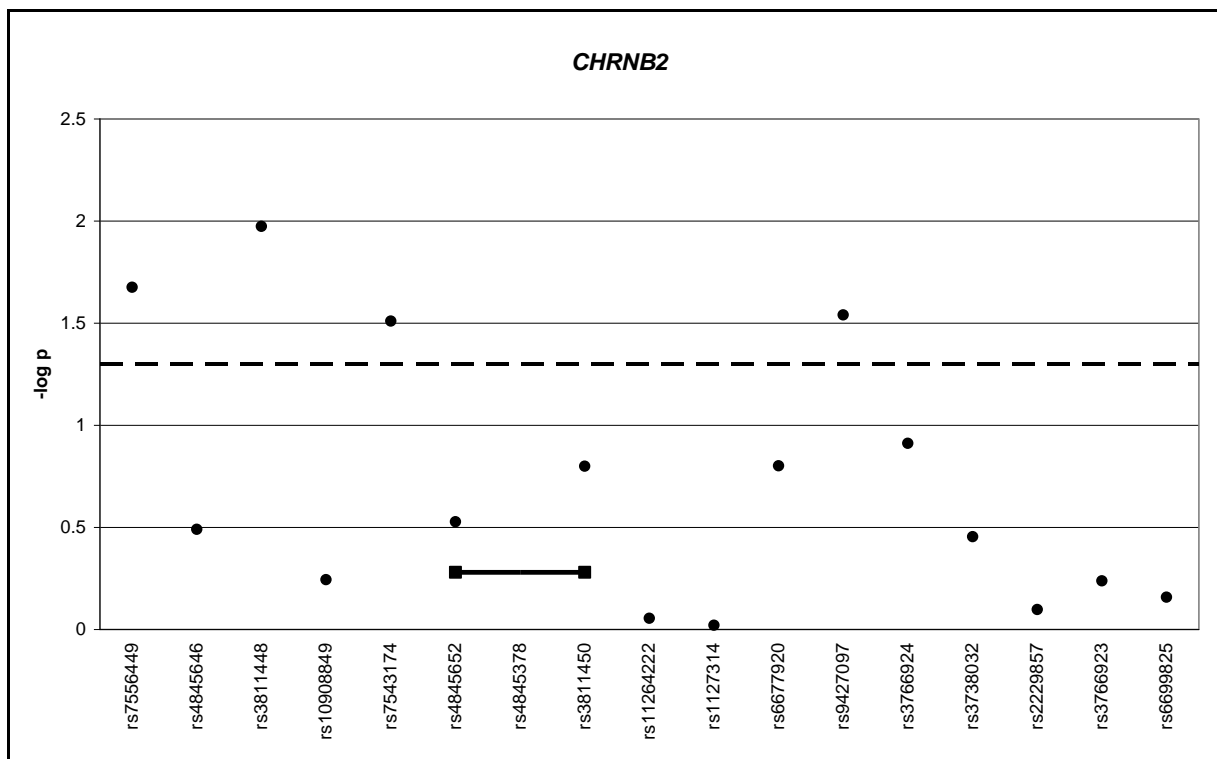


Abbildung 10: Graphische Darstellung der p-Werte des *CHRNA2* Locus

Angegeben sind die $-\log p$ -Werte für die SNPs in der Region des *CHRNA2* Gens. Punkte repräsentieren $-\log p$ -Werte von SNPs die in der GWAS genotypisiert wurden und nicht in der AlzGene Datenbank gelistet sind. Linien, die Vierecke verbinden, zeigen den $-\log p$ -Wert des zwei-Marker-Haplotyp berechnet mit Haploview. Die gepunktete Linie bei einem $-\log p$ -Wert von etwa 1,3 gibt den Schwellwert für nominelle Signifikanz an, der bei $p=0,05$ liegt.

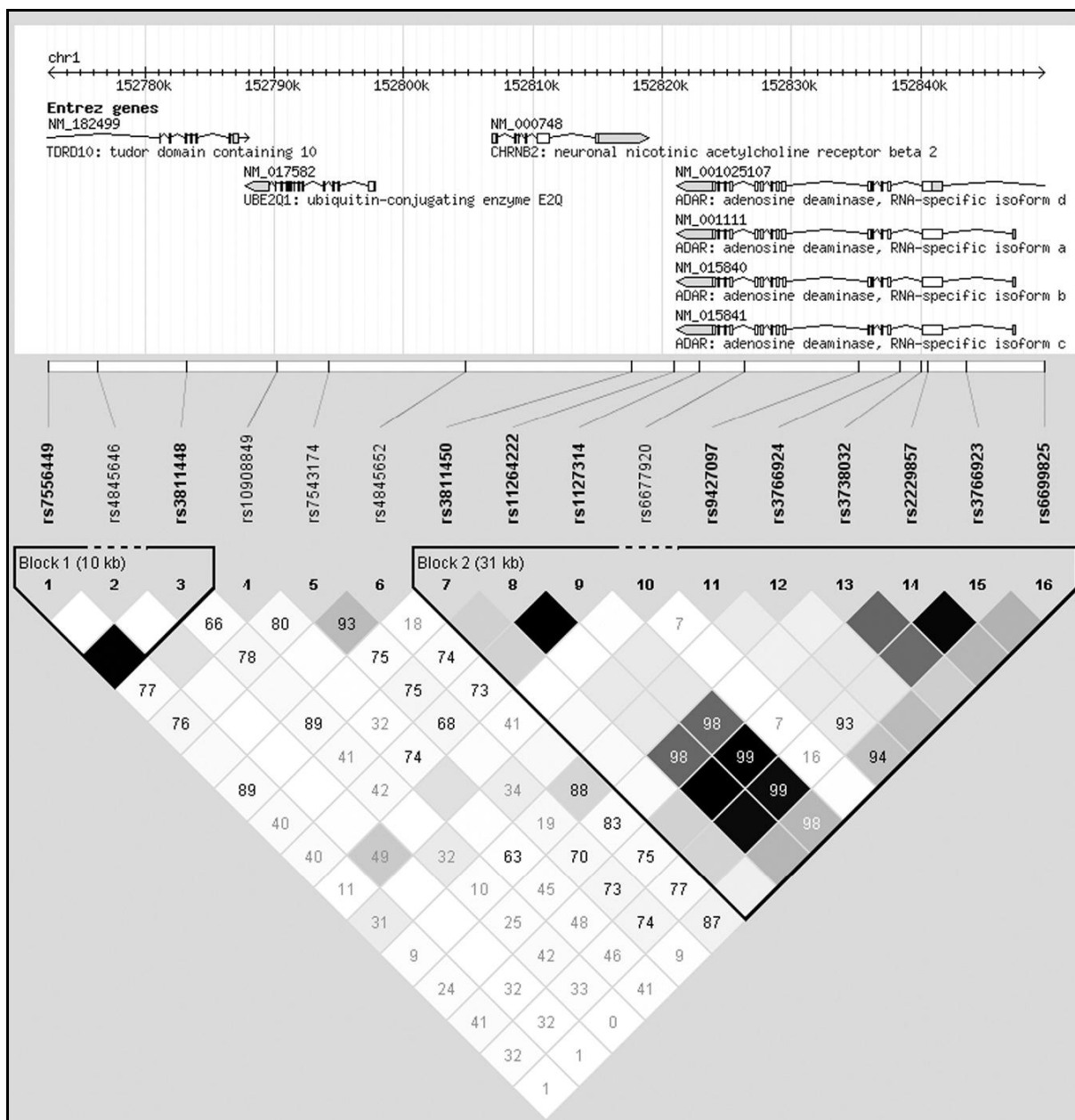


Abbildung 11: LD und Haplotyp Struktur des *CHRN2* Locus

Haplotyp-Block-Struktur des *CHRN2* Gens. Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Nach der Haplotyp-Block Definition (Gabriel et al., 2002) konnte mit Hilfe von Haploview 4.1 keine nominell signifikante Kombination von Markern innerhalb eines Blockes berechnet werden.

5.1.3.4 CH25H

Der SNP rs13500 wurde in einer Meta-Studie für *CH25H* (*cholesterol-25-hydroxylase*) auf AlzGene veröffentlicht (Papassotiropoulos et al. 2005) und zeigte Assoziation zu AD. In unserer GWAS wurden fünf SNPs in dem Gen und 25 zusätzliche in der direkten Nachbarschaft von *CH25H* ($\pm 25\text{kb}$) analysiert (Tabelle 34). Einige der benachbarten SNPs

Ergebnisse

lagen in dem Gen *LIPA* (*lipase A precursor*). Es war kein direkter Vergleich des SNPs rs13500 möglich, da dieser Marker nicht auf dem von uns verwendeten BeadChip vertreten war. Daher wurde ein zwei-Marker-Haplotyp kreiert, der durch die Marker rs4933497 und rs1131706 definiert war (Abbildung 12). Für diesen Haplotyp konnte jedoch keine nominell signifikante Assoziation mit AD gezeigt werden. Allerdings wurde für die SNPs rs17117126, (*downstream* von *CH25H*) und rs12780342 (Intron 8 von *LIPA*) eine starke Assoziation beobachtet. Aus der Berechnung in einem rezessiven Model für den ersten Marker ($p^R=0,0199$, OR=5,13, 95%CI: 1,12-23,52) und einem dominanten Model für den zweiten Marker ($p^D=0,0377$, OR=1,36, 95%CI: 1,01-1,82). Bei der Haplotyp Analyse nach den Blockdefinitionen von (Gabriel et al., 2002) konnte ein schwaches Signal, in einem zwei-Marker-Haplotyp (rs7922269 und rs6586175), identifiziert werden (Abbildung 13 Block 3).

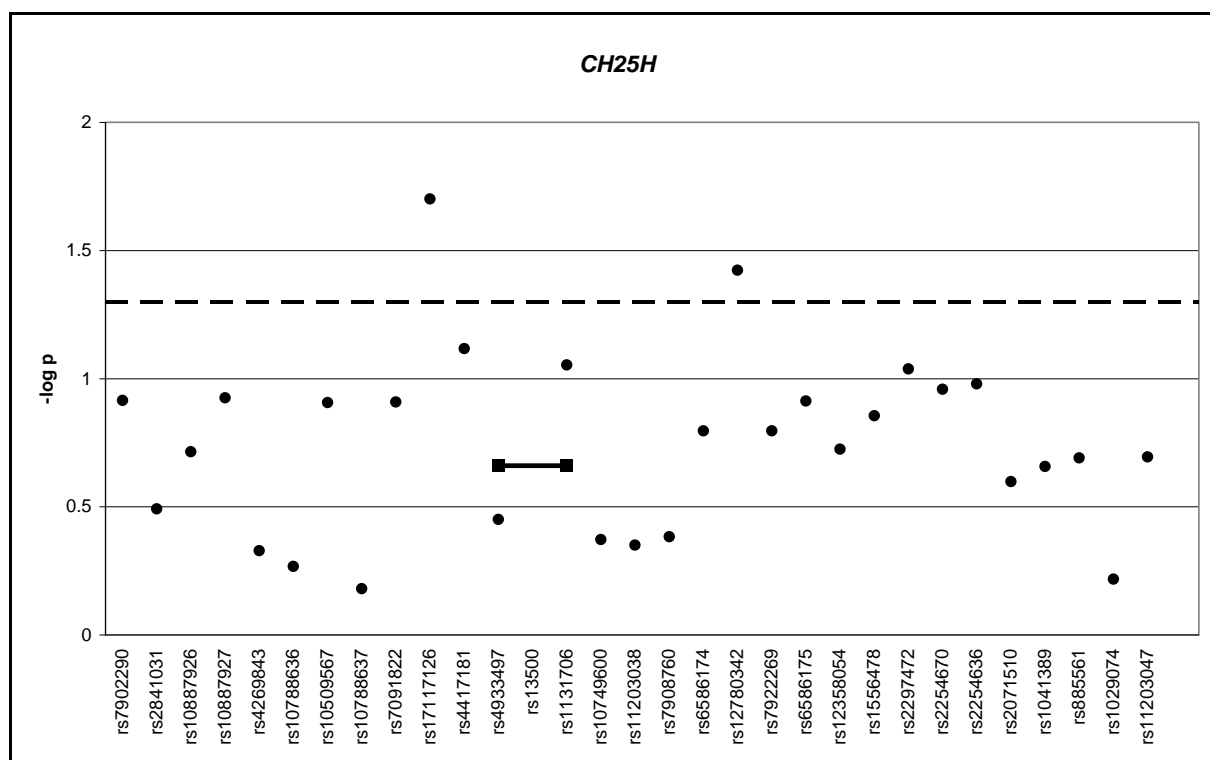


Abbildung 12: Graphische Darstellung der p-Werte des *CH25H* Locus

Angegeben sind die $-\log p$ -Werte für die SNPs in der Region des *CH25H* Gens. Punkte repräsentieren $-\log p$ -Werte von SNPs die in der GWAS genotypisiert wurden und nicht in der AlzGene Datenbank gelistet sind. Linien, die Vierecke verbinden, zeigen den $-\log p$ -Wert des zwei-Marker-Haplotyp berechnet mit Haploview. Die gepunktete Linie bei einem $-\log p$ -Wert von etwa 1,3 gibt den Schwellwert für nominelle Signifikanz an, der bei $p=0,05$ liegt.

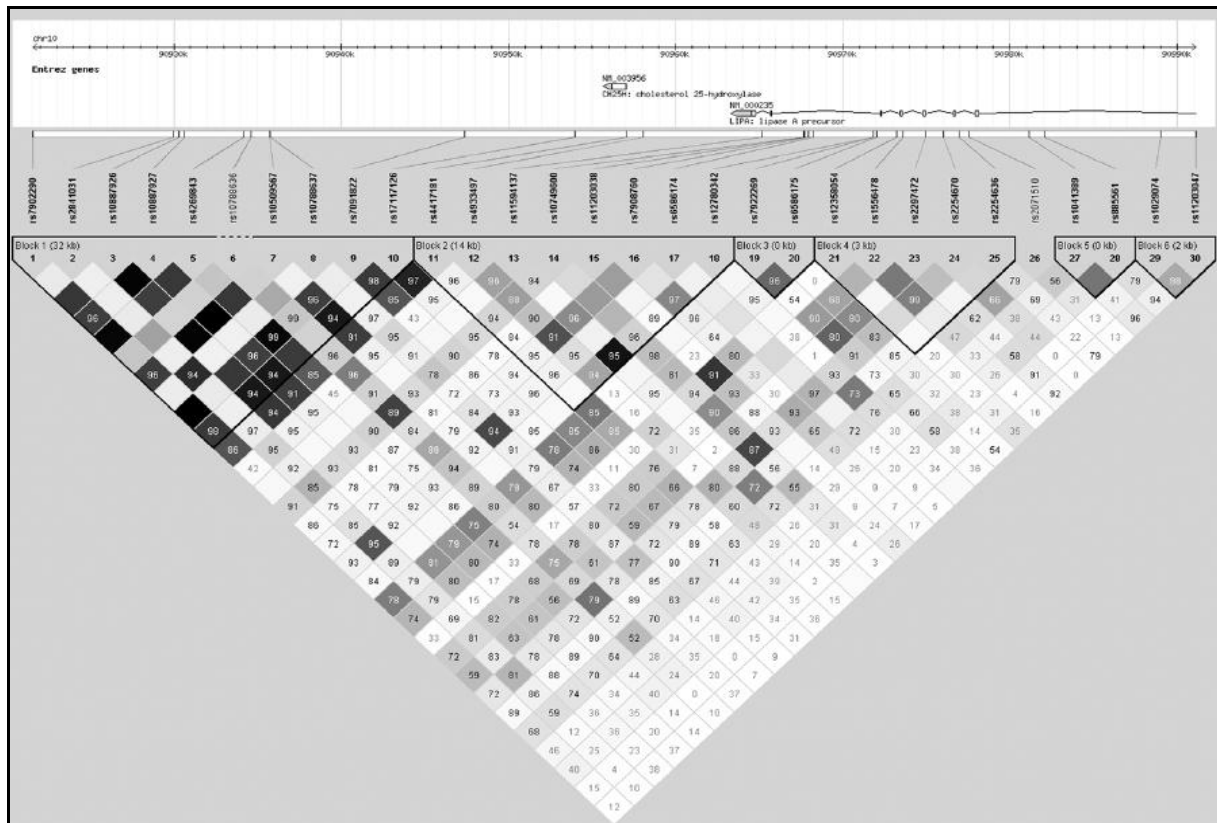


Abbildung 13: LD und Haplotyp Struktur des *CH25H* Locus

Haplotyp-Block-Struktur des *CH25H* Gens. Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Nach der Haplotyp-Block Definition (Gabriel et al., 2002) konnte mit Hilfe von Haploview 4.1 keine nominell signifikante Kombination von Markern innerhalb eines Blockes berechnet werden.

5.1.3.5 PGBD1

In einer früheren GWAS mit fünf LOAD Fall/Kontroll Kollektiven (Grupe et al., 2007) wurde der SNP rs3800324 in Exon 5 des *PGBD1* Gene (*piggyBac transposable element derived 1*) mit AD assoziiert gefunden. In unserer GWAS wurden 10 SNPs, die direkt in dem Gen liegen, analysiert. Zusätzliche 19 SNPs in einer direkten Nachbarschaft von ± 25 kb um *PGBD1* wurden ebenfalls untersucht (Tabelle 34). Für rs3800324 wurden keine Assoziation beobachtet (Abbildung 14), allerdings zeigte der SNP rs9461448, der nur 960bp *upstream* von rs3800324 in Intron 4 liegt Assoziation in einem dominanten Modell mit AD ($p^D=0,0193$, OR=1,61, 95%CI: 1,03-2,49). Auch die SNPs rs17312661 und rs7772827 *downstream* von *PGBD1* in dem Gen *ZNF323* (*zinc-finger protein 323*) zeigten Assoziation mit AD ($p^D=0,008$, OR=0,71, 95%CI: 0,53-0,94; $p^D=0,029$ OR=0,76, 95%CI: 0,59-0,98). Zwei Haplotypblöcke *up-* und *downstream* von *PGBD1* zeigten Assoziation zu AD. Das stärkste Signal wurde in einem Block des *ZNF323* Gens beobachtet (Abbildung 15).

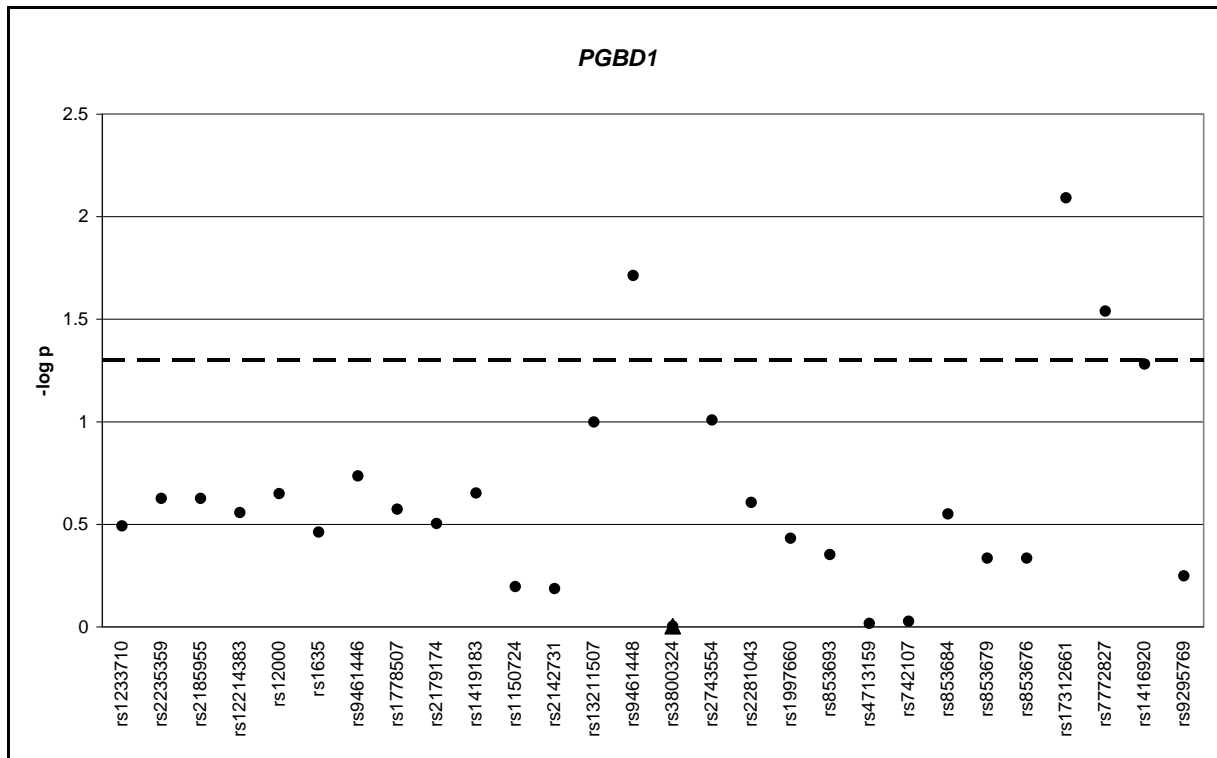


Abbildung 14: Graphische Darstellung der p-Werte des *PGBD1* Locus

Angegeben sind die $-\log p$ -Werte für die SNPs in der Region des *PGBD1* Gens. Punkte repräsentieren $-\log p$ -Werte von SNPs die in der GWAS genotypisiert wurden und nicht in der AlzGene Datenbank gelistet sind. Dreiecke markieren $-\log p$ -Werte von SNPs die auf AlzGene vorhanden sind. Die gepunktete Linie bei einem $-\log p$ -Wert von etwa 1,3 gibt den Schwellwert für nominelle Signifikanz an, der bei $p=0,05$ liegt.

Ergebnisse

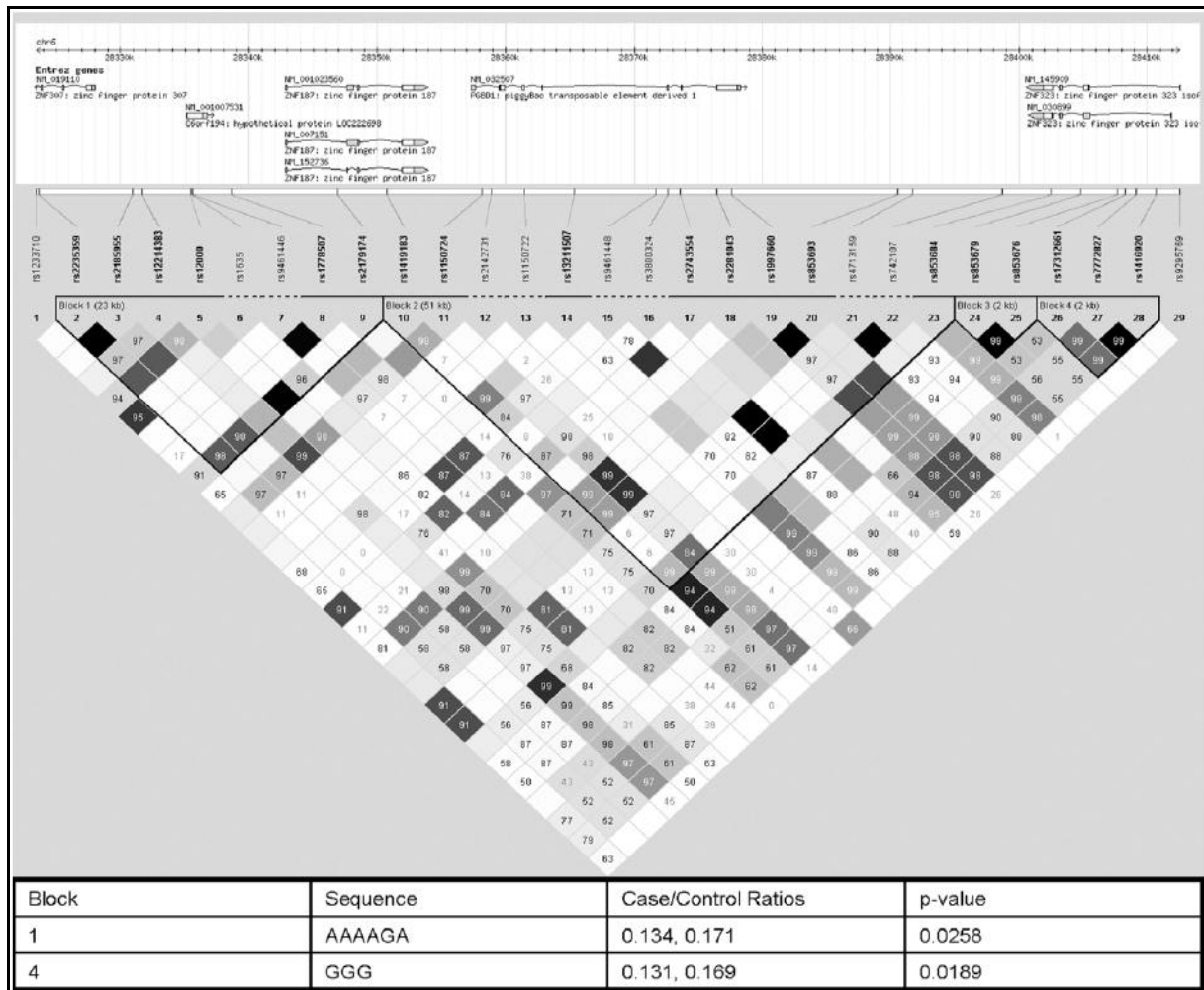


Abbildung 15: LD und Haplotyp Struktur des *PGBD1* Locus

Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Zwei Kombinationen mit p-Werten kleiner 0,05, sowie die Frequenzen von Fällen und Kontrollen sind unter der Abbildung aufgeführt. Die Haplotypblöcke wurden nach den Definitionen von (Gabriel et al., 2002) erstellt und durch Haploview 4.1 erzeugt.

5.1.3.6 LMNA

Von den elf, in dieser Studie untersuchten Genen, konnte für das *LMNA* (*lamin A/C protein*) Gen das zweit stärkste Signal identifiziert werden und zwar für den SNP rs9919256, der in einer intergenischen Region die ca. 20kb *upstream* des Gens liegt, mit einem p-Wert von 0,00029 für das dominante Model (Abbildung 16). Für die SNPs rs11578696 (*upstream*), rs915179 (Promotor), rs12128066 (*downstream*) und rs12401573 (*downstream*) konnten ebenfalls p-Werte $< 0,05$ berechnet werden (Abbildung 16, Tabelle 34), allerdings lag nur der SNP rs915179 in dem *LMNA* Gen. Insgesamt wurden 14 SNPs in dem *LMNA* Locus genotypisiert und analysiert. Die stärkste zuvor publizierte Assoziation mit AD war der

Ergebnisse

Marker rs505058 (Grupe et al., 2007), der in unserer GWAS nicht genotypisiert wurde, daher wurde einen zwei-Marker-Haplotyp mit den flankierenden Markern zu rs505058 gebildet (rs2485664 und rs1468772). Bei einem D' Wert von 1, also vollständigem LD, konnte keine Assoziation zu AD nachgewiesen werden (Abbildung 16). Für die in Haploview 4.1 erstellten Haplotypblöcke, konnte für den ersten Block, der den signifikanten Promotor SNP rs915179 und vier zusätzliche SNPs enthielt, Assoziation mit AD gezeigt werden. Vier von den Sechs unterschiedlichen Haplotypkombinationen zeigen p-Werte $<0,05$. Der kleinste p-Wert von 0,0006 wurde für die Kombination GAAAG (Frequenz Fälle/Kontrollen 0,199/0,140) berechnet. Abbildung 17 zeigt die Verteilung der Blöcke und alle signifikanten Markerkombinationen des ersten Blocks.

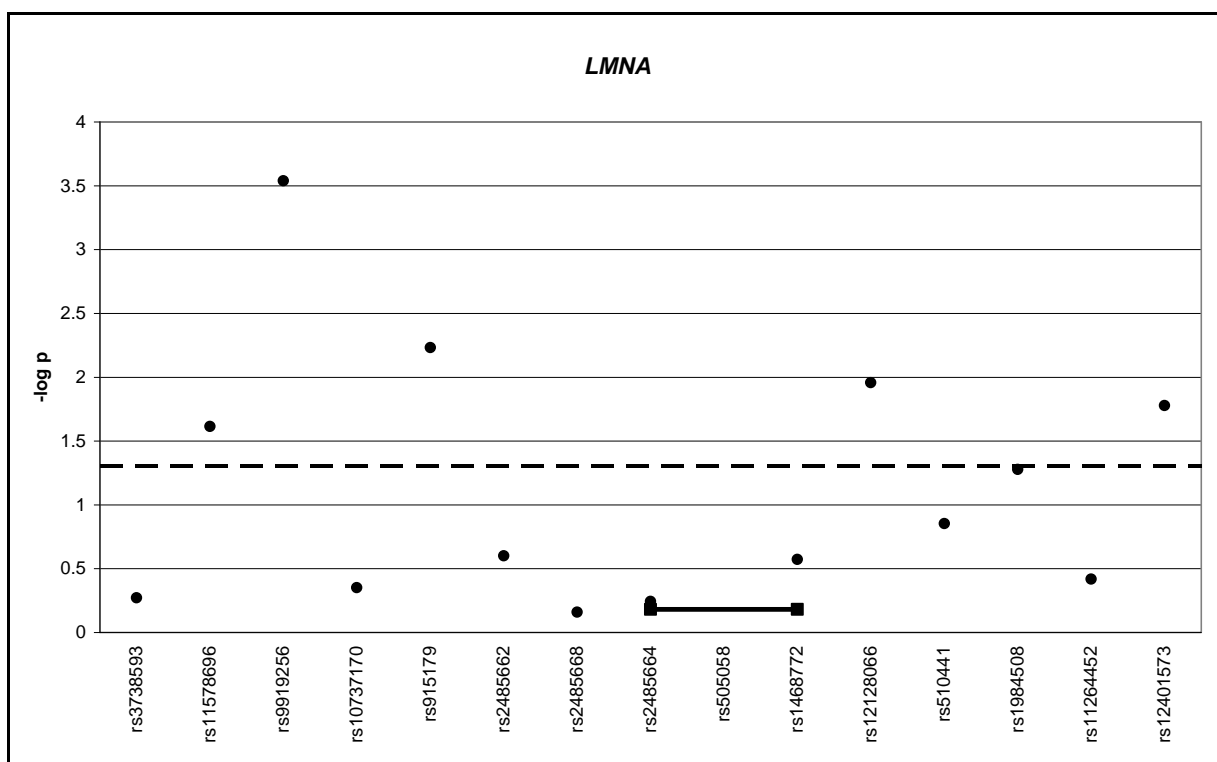


Abbildung 16: Graphische Darstellung der p-Werte des *LMNA* Locus

Angegeben sind die $-\log p$ -Werte für die SNPs in der Region des *LMNA* Gens. Punkte repräsentieren $-\log p$ -Werte von SNPs die in der GWAS genotypisiert wurden und nicht in der AlzGene Datenbank gelistet sind. Linien, die Vierecke verbinden, zeigen den $-\log p$ -Wert des zwei-Marker-Haplotyp berechnet mit Haploview. Die gepunktete Linie bei einem $-\log p$ -Wert von etwa 1,3 gibt den Schwellwert für nominelle Signifikanz an, der bei $p=0,05$ liegt.

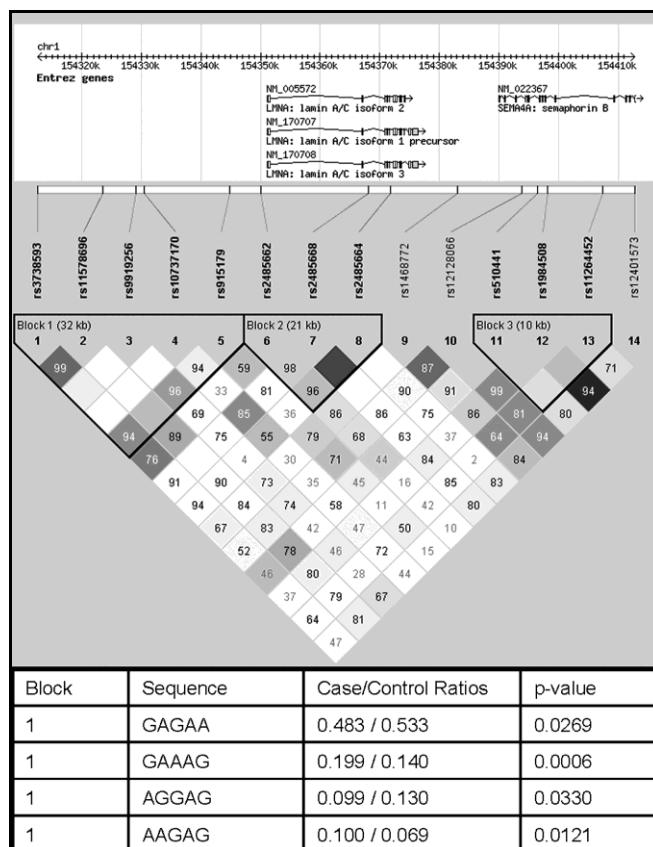


Abbildung 17: LD und Haplotyp Struktur des *LMNA* Locus

Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Vier Kombinationen mit p-Werten kleiner 0,05, sowie die Frequenzen von Fallen und Kontrollen sind unter der Abbildung aufgeführt. Die Haplotypblöcke wurden nach den Definitionen von (Gabriel et al., 2002) erstellt und durch Haploview 4.1 erzeugt.

5.1.3.7 CST3

Einige Studien hatten bereits den Einfluss von *CST3* (*cystatin C*) auf AD untersucht (Cathcart, Huang, Lanham, Corder, & Poduslo, 2005; Dodel et al., 2002; Finckh et al., 2000). Zwei SNPs in diesem Gen wurden auf der AlzGene Seite präsentiert, dies waren die SNPs rs1064039 und rs5030707. Insgesamt wurden 16 SNPs, in unserer GWAS, in der *CST3* Region analysiert, vier davon lagen in dem Gen selbst (Tabelle 34). Ein direkter Vergleich war in diesem Fall nicht möglich und es wurde ein zwei-Marker-Haplotyp zwischen den SNPs rs2424577 und rs2145231 ($D'=0,95$) gespannt, der beide, zuvor als assoziiert gefundenen SNPs, abdeckte (Abbildung 18). Die einzige nominell signifikante Einzelmarker-

Ergebnisse

Analyse wurde für rs16985615 ($p^R=0,0319$) beobachtet, ca. 15kb *upstream* von *CST3*. Die Haplotyp Analyse von allen 16 SNPs brachte keine krankheitsbezogene Assoziation hervor (Abbildung 19).

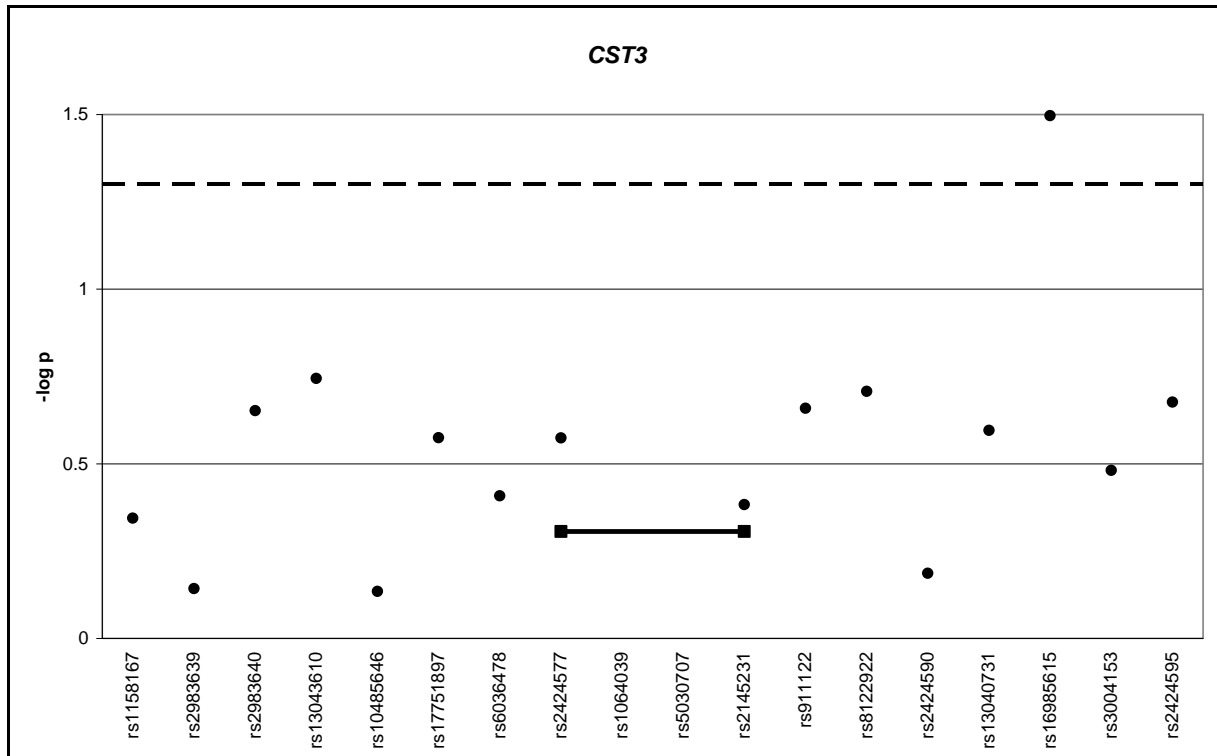


Abbildung 18: Graphische Darstellung der p-Werte des *CST3* Locus

Angegeben sind die $-\log p$ -Werte für die SNPs in der Region des *CST3* Gens. Punkte repräsentieren $-\log p$ -Werte von SNPs die in der GWAS genotypisiert wurden und nicht in der AlzGene Datenbank gelistet sind. Linien, die Vierecke verbinden, zeigen den $-\log p$ -Wert des zwei-Marker-Haplotyp berechnet mit Haploview. Die gepunktete Linie bei einem $-\log p$ -Wert von etwa 1,3 gibt den Schwellwert für nominelle Signifikanz an, der bei $p=0,05$ liegt.

Ergebnisse

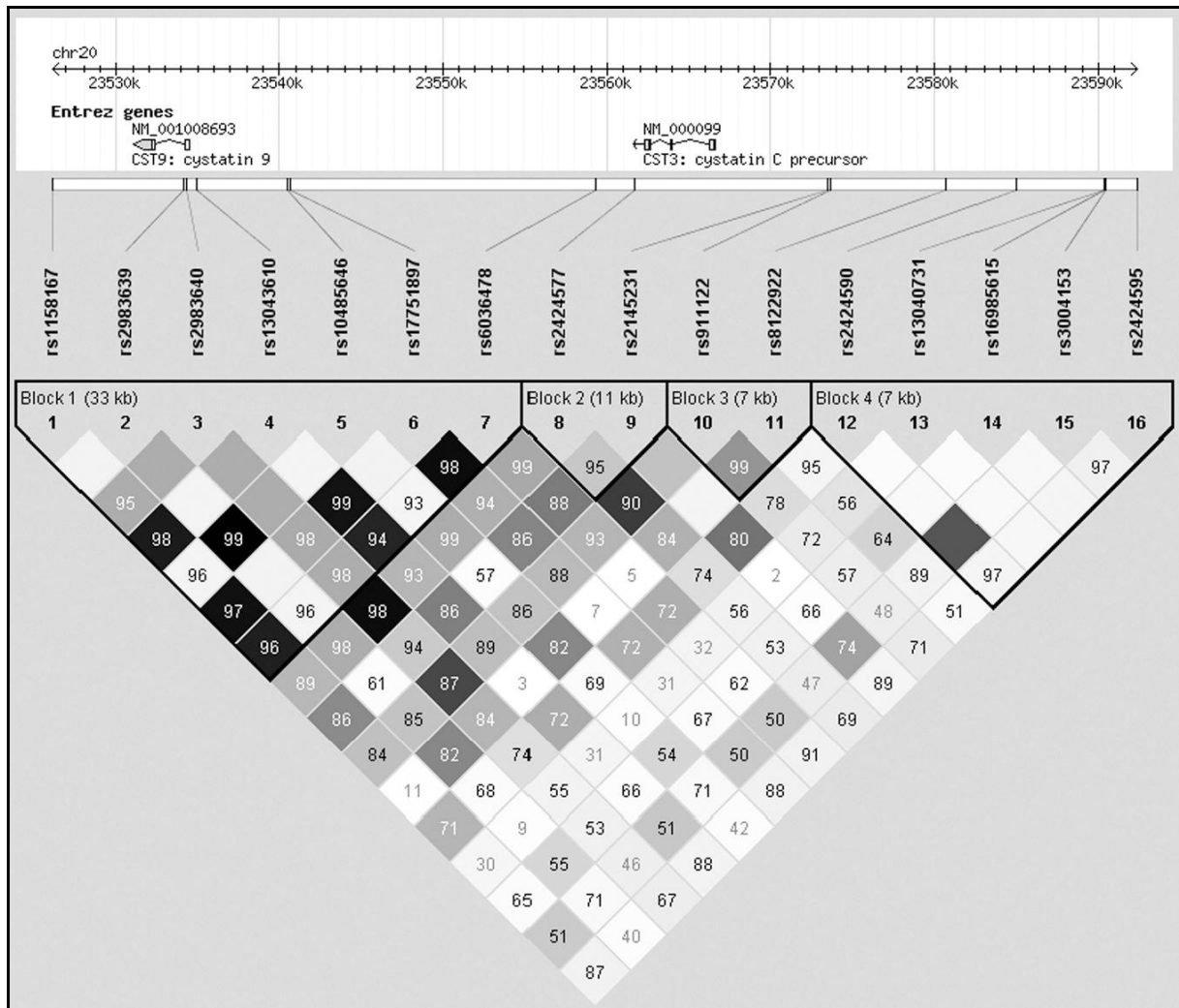


Abbildung 19: LD und Haplotyp Struktur des *CST3* Locus

Haplotyp-Block-Struktur des *CST3* Gens. Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Nach der Haplotyp-Block Definition (Gabriel et al., 2002) konnte mit Hilfe von Haploview 4.1 keine nominell signifikante Kombination von Markern innerhalb eines Blockes berechnet werden.

5.1.3.8 PCK1

Ein einzelner SNP, rs8192708, wurde initial durch eine andere GWAS als signifikant zu AD, in dem Gen *PCK1* (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*), gefunden (Grupe et al., 2007). Die hier vorliegende Studie beinhaltete insgesamt 34 SNPs in der *PCK1* Region (Tabelle 34), 10 davon in dem Gen, dazu gehörte auch der SNP rs8192708, der demnach direkt verglichen werden konnte. Für diesen Marker konnte keine nominell signifikante Assoziation zu AD festgestellt werden, aber es konnte der SNP rs17411904, der in Promotor Bereich lag, mit einem p-Wert von 0,00331 für das dominante Model identifiziert werden (Abbildung 20). Des Weiteren konnten drei Kombinationen in drei unterschiedlichen Haplotypblöcken kalkuliert

Ergebnisse

werden, die nominelle Signifikanz mit AD zeigten (Abbildung 21). Der Block 3, der den SNP rs8192708 beinhaltet, konnte nicht als signifikant berechnet werden.

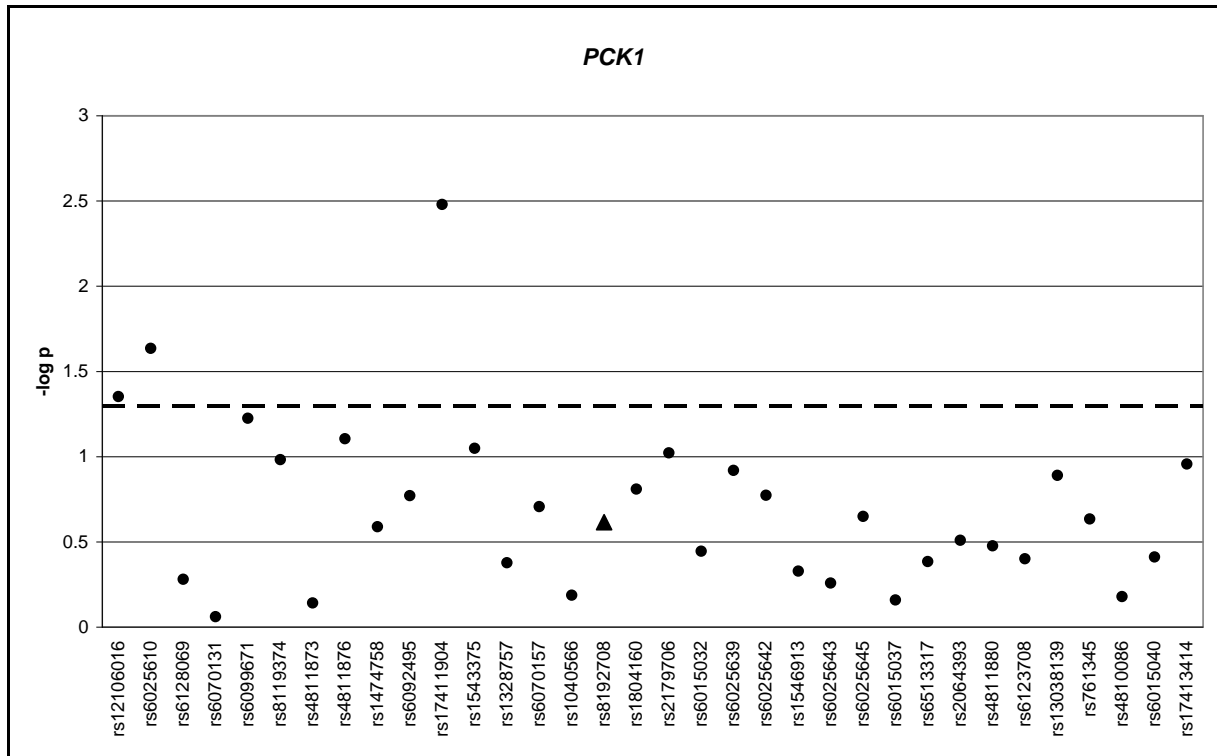


Abbildung 20: Graphische Darstellung der p-Werte des *PCK1* Locus

Angegeben sind die $-\log p$ -Werte für die SNPs in der Region des *PCK1* Gens. Punkte repräsentieren $-\log p$ -Werte von SNPs die in der GWAS genotypisiert wurden und nicht in der AlzGene Datenbank gelistet sind. Dreiecke markieren $-\log p$ -Werte von SNPs die auf AlzGene vorhanden sind. Die gepunktete Linie bei einem $-\log p$ -Wert von etwa 1,3 gibt den Schwellwert für nominelle Signifikanz an, der bei $p=0,05$ liegt.

Ergebnisse

untersuchten GWAS Marker, weder als Einzelmarker, noch in der Haplotypanalyse Assoziation mit AD (Abbildung 23).

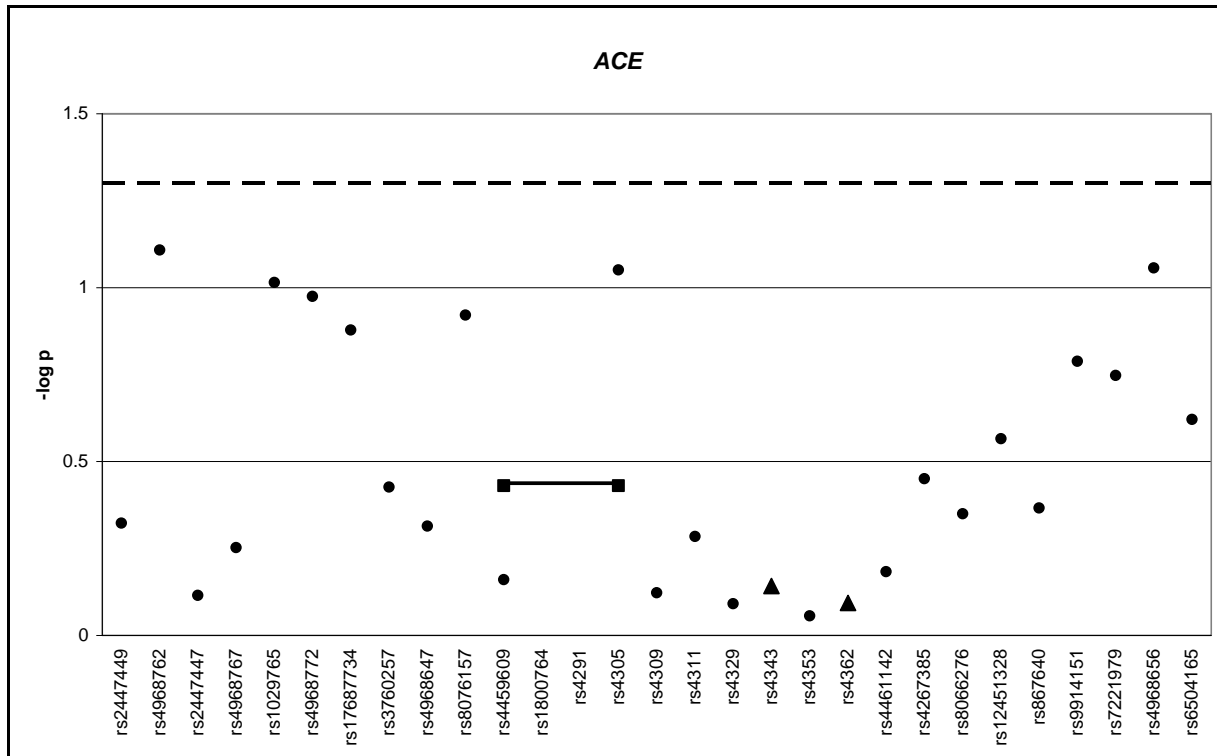


Abbildung 22: Graphische Darstellung der p-Werte des ACE Locus

Angegeben sind die $-\log p$ -Werte für die SNPs in der Region des ACE Gens. Punkte repräsentieren $-\log p$ -Werte von SNPs die in der GWAS genotypisiert wurden und nicht in der AlzGene Datenbank gelistet sind. Dreiecke markieren $-\log p$ -Werte von SNPs die auf AlzGene vorhanden sind. Linien, die Vierecke verbinden, zeigen den $-\log p$ -Wert des zwei-Marker-Haplotyp berechnet mit Haploview. Die gepunktete Linie bei einem $-\log p$ -Wert von etwa 1,3 gibt den Schwellwert für nominelle Signifikanz an, der bei $p=0,05$ liegt.

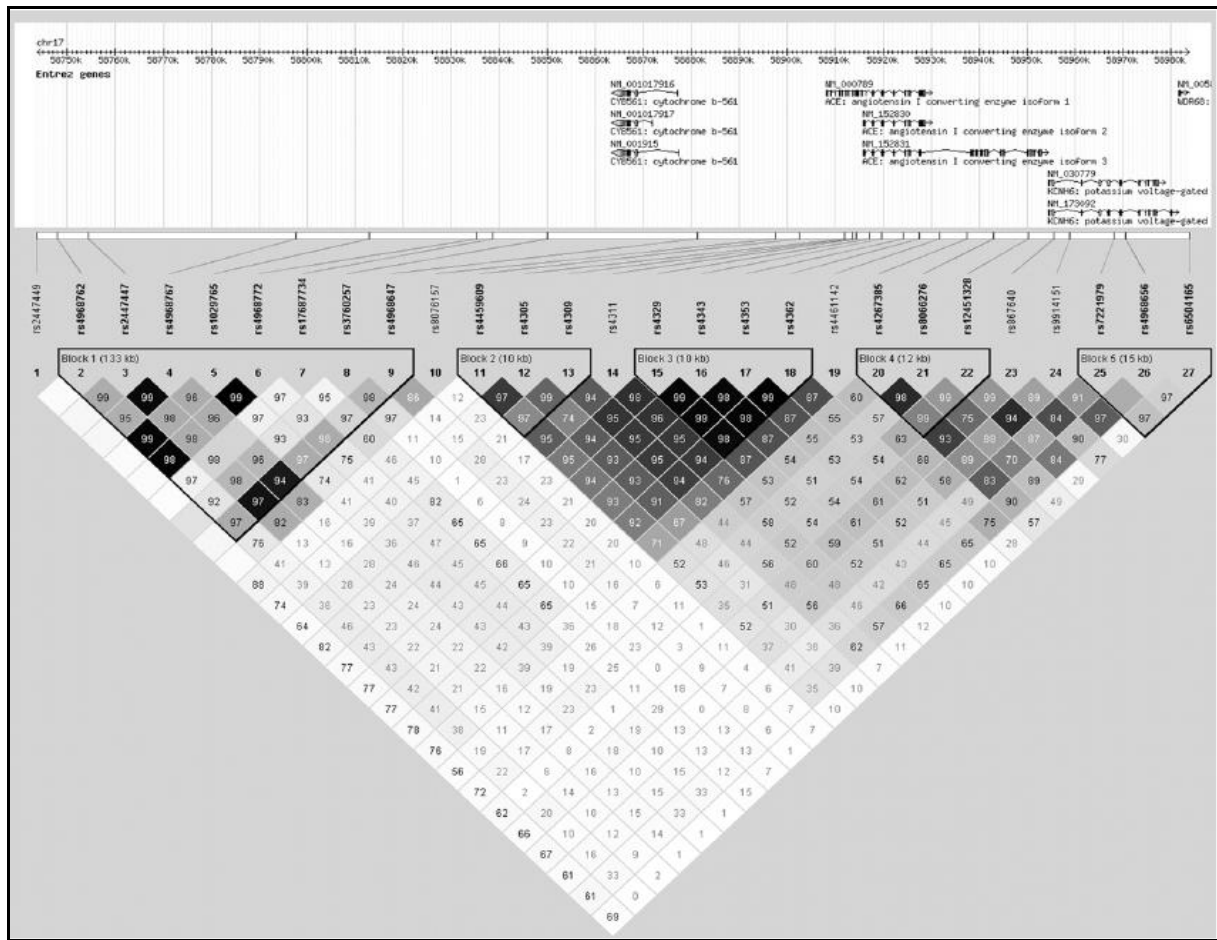


Abbildung 23: LD und Haplotyp Struktur des ACE Locus

Haplotyp-Block-Struktur des ACE Gens. Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Nach der Haplotyp-Block Definition (Gabriel et al., 2002) konnte mit Hilfe von Haploview 4.1 keine nominell signifikante Kombination von Markern innerhalb eines Blockes berechnet werden.

5.1.3.10 MAPT

Das *MAPT* Gen (*microtubule associated protein- τ*) kann mit den Haplotypen H1 und H2 vorkommen. Beide Haplotypen können durch sechs Marker identifiziert werden (Laws et al. 2007; Mukherjee et al. 2007; Myers et al. 2007). In unserer GWAS waren nur drei davon (rs1467967, rs242557 und rs3785883), auf dem von uns benutzten BeadChip, vorhanden. Insgesamt wurden 25 SNPs in der *MAPT* Region, 20 davon in dem Gen selbst, analysiert. Für die drei SNPs, für die ein direkter Vergleich möglich war, erreichte nur rs1467967 in der Promoter-Region von *MAPT* ein nominell signifikantes Assoziationsignal zu AD, mit einem p-Wert von 0,0071 für das dominante Model (Abbildung 24). Keiner der beiden flankierenden Zwei-Marker-Haplotypen, für die SNPs rs2471738 und rs7521, brachte ein signifikantes

Ergebnisse

Ergebnis. Drei andere SNPs, die in unserer GWAS analysiert wurden, zeigten signifikante Assoziation zu AD. Der kleinste p-Wert konnte für den Marker rs3785880 im Intron 1 mit 0,00141 für das rezessive Model berechnet werden. Die anderen beiden Signale mit p-Werten unter 0,05 konnten für rs1158660 (*upstream*) und rs6503454 (*downstream*) berechnet werden (Abbildung 24, Tabelle 34). Da die Haplotypen H1 und H2 nicht bestimmt werden konnten, da nur Genotypisierungsdaten zu drei der benötigten sechs Marker vorlagen, wurde eine Haplotypanalyse (Abbildung 25) mittels Haploview 4.1 durchgeführt und es konnte eine starke Assoziation in Block 1 gefunden werden ($p=0,0007$, Frequenz Fälle/Kontrollen: 0,254/0,324).

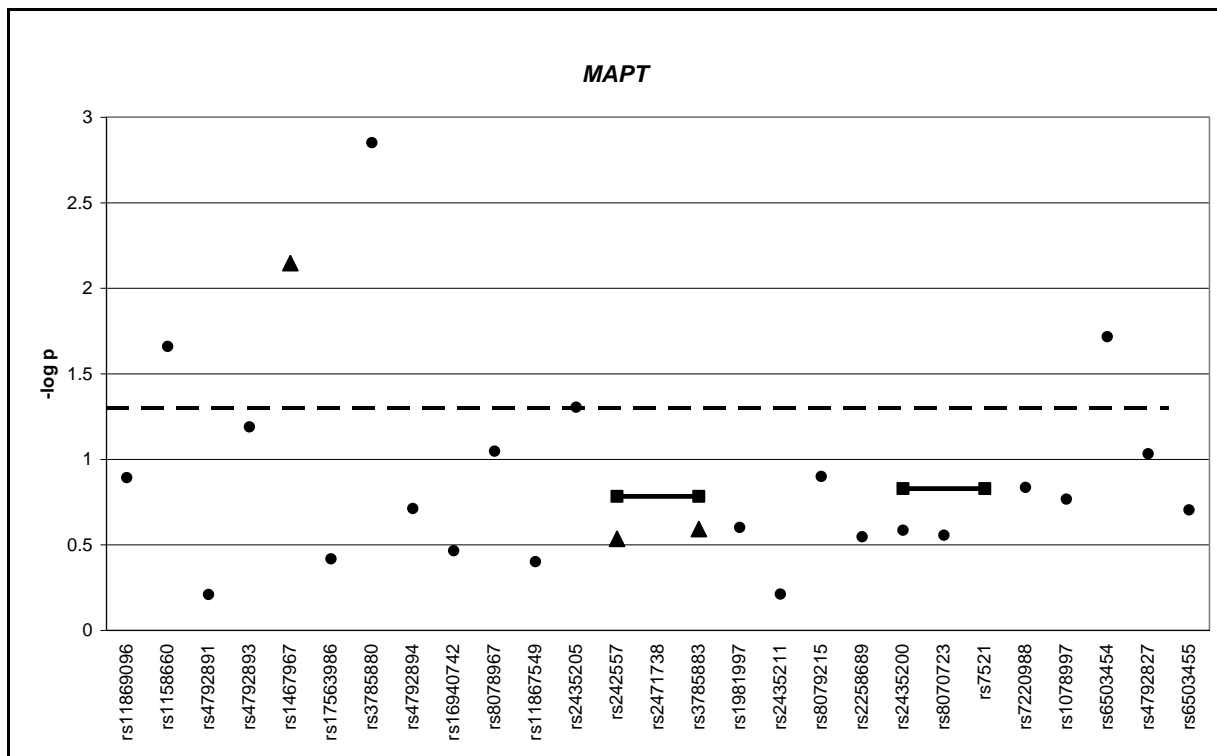


Abbildung 24: Graphische Darstellung der p-Werte des *MAPT* Locus

Angegeben sind die $-\log p$ -Werte für die SNPs in der Region des *MAPT* Gens. Punkte repräsentieren $-\log p$ -Werte von SNPs die in der GWAS genotypisiert wurden und nicht in der AlzGene Datenbank gelistet sind. Dreiecke markieren $-\log p$ -Werte von SNPs die auf AlzGene vorhanden sind. Linien, die Vierecke verbinden, zeigen den $-\log p$ -Wert des zwei-Marker-Haplotyp berechnet mit Haploview. Die gepunktete Linie bei einem $-\log p$ -Wert von etwa 1,3 gibt den Schwellwert für nominelle Signifikanz an, der bei $p=0,05$ liegt.

Ergebnisse

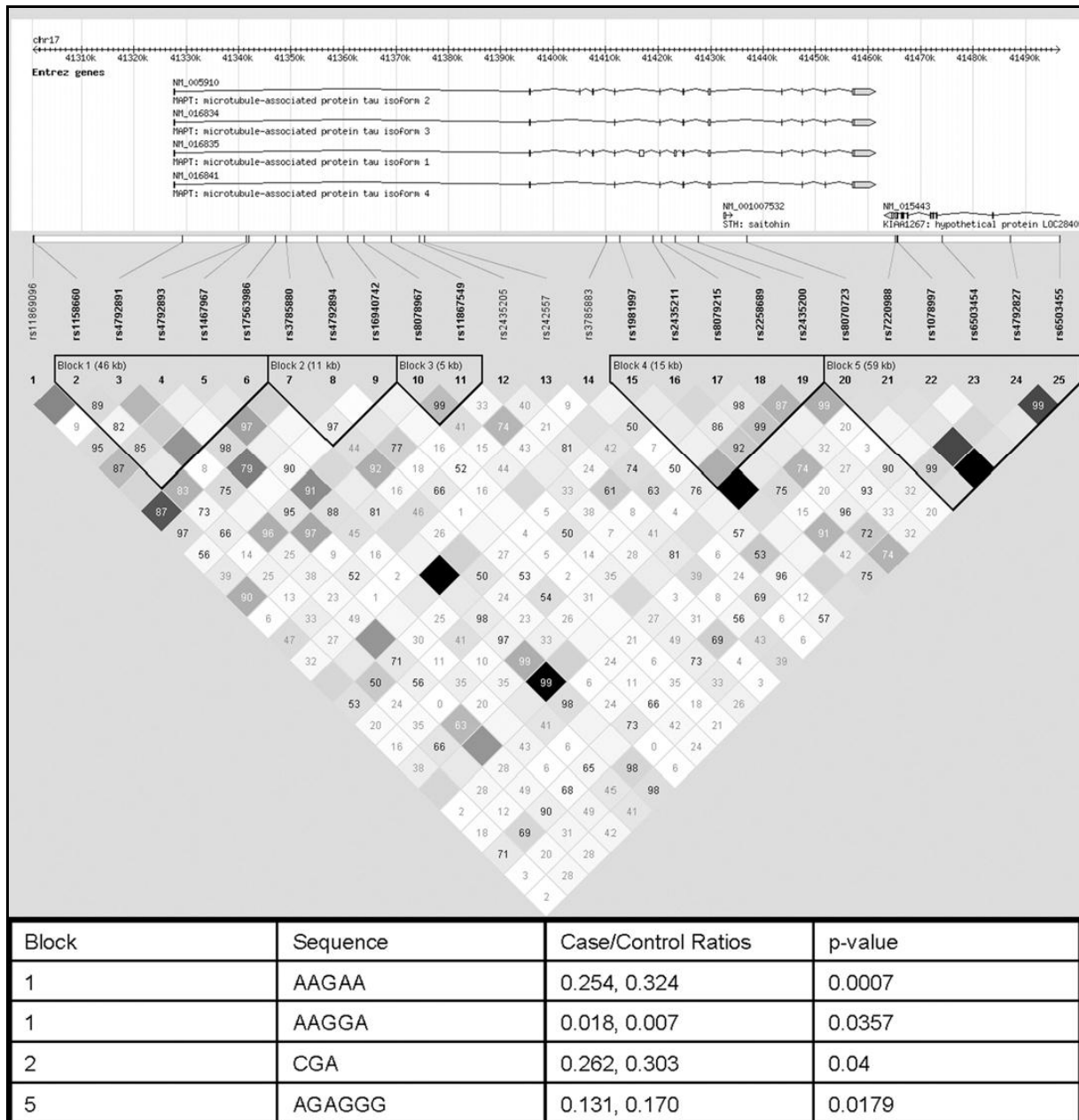


Abbildung 25: LD und Haplotyp Struktur des *MAPT* Locus

Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Vier Kombinationen mit p-Werten kleiner 0,05, sowie die Frequenzen von Fällen und Kontrollen sind unter der Abbildung aufgeführt. Die Haplotypblöcke wurden nach den Definitionen von (Gabriel et al., 2002) erstellt und durch Haploview 4.1 erzeugt.

5.1.3.11 SORL1

Für das Gen *SORL1* (*Sortilin-related receptor*) wurde kurz vor Beginn dieser Studie eine Assoziation mit AD gezeigt (Lee et al. 2007; Rogaeva et al. 2007) und 29 SNPs waren in der Meta-Studie dieses Locus enthalten. In der hier vorliegenden Studie wurden insgesamt 50

Ergebnisse

SNPs in der *SORL1* Region genotypisiert und analysiert, 40 davon lagen in dem Gen selbst und 10 in der direkten Umgebung von $\pm 25\text{kb}$ (Tabelle 34). Für die 10 Marker, für die ein direkter Vergleich unserer Daten mit den aus der Meta-Analyse möglich war, gab es nur für zwei Marker leichte nominell signifikante Assoziationen zu AD (rs4935774 $p^D=0,045$ und rs1614735 $p^R=0,033$; Abbildung 26). Indirekte Analyse mit Hilfe der flankierenden Zwei-Marker-Haplotypen brachte keine weiteren AD assoziierten Signale für die übrigen AlzGene SNPs. Aber, drei andere SNPs erreichten p-Werte kleiner 0,05, die zuvor noch nicht beschrieben wurden. Dabei handelte es sich um die Marker rs12576704 (upstream; $p^D=0,021$), rs10502262 (Intron 13; $p^D=0,031$) und rs3781835 (Exon 25/Intron25 Übergang; $p^D=0,033$). In der Haplotypanalyse mit Haploview 4.1 wurden schwache Signale gefunden, wie in Abbildung 27 dargestellt ist.

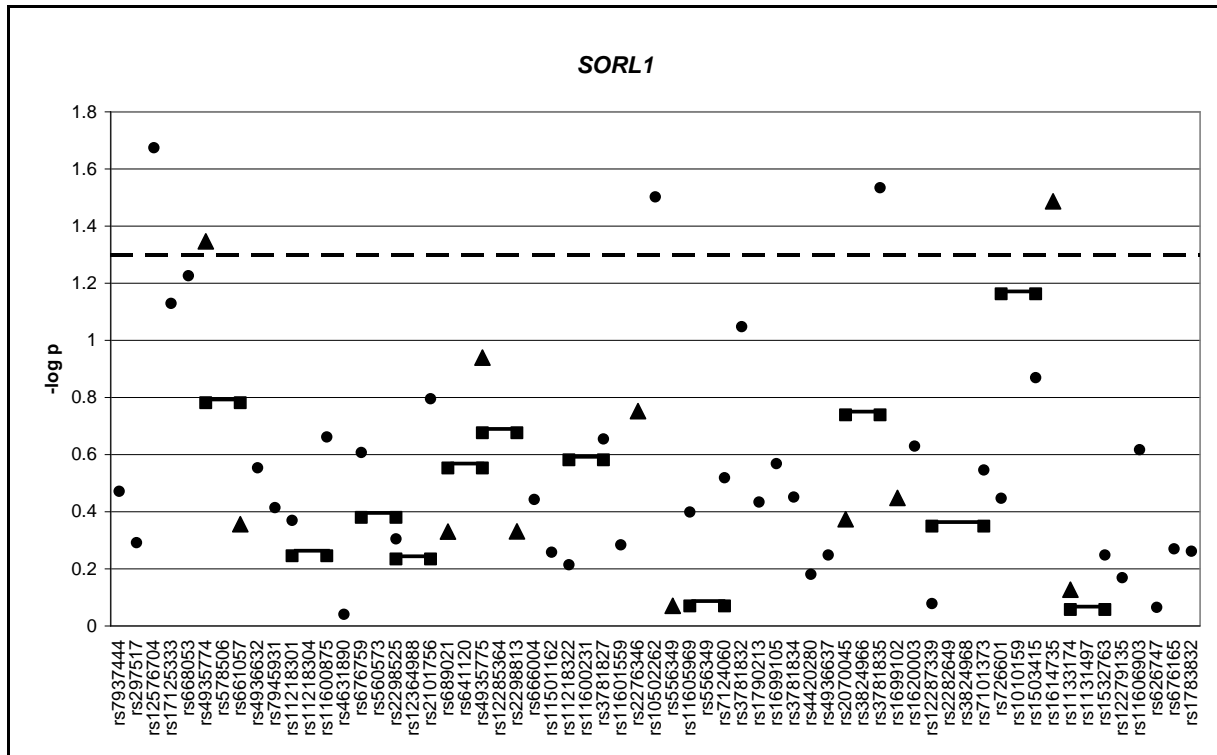


Abbildung 26: Graphische Darstellung der p-Werte des *SORL1* Locus

Angegeben sind die $-\log p$ -Werte für die SNPs in der Region des *SORL1* Gens. Punkte repräsentieren $-\log p$ -Werte von SNPs die in der GWAS genotypisiert wurden und nicht in der AlzGene Datenbank gelistet sind. Dreiecke markieren $-\log p$ -Werte von SNPs die auf AlzGene vorhanden sind. Linien, die Vierecke verbinden, zeigen den $-\log p$ -Wert des zwei-Marker-Haplotyp berechnet mit Haploview. Die gepunktete Linie bei einem $-\log p$ -Wert von etwa 1,3 gibt den Schwellwert für nominelle Signifikanz an, der bei $p=0,05$ liegt.

Ergebnisse

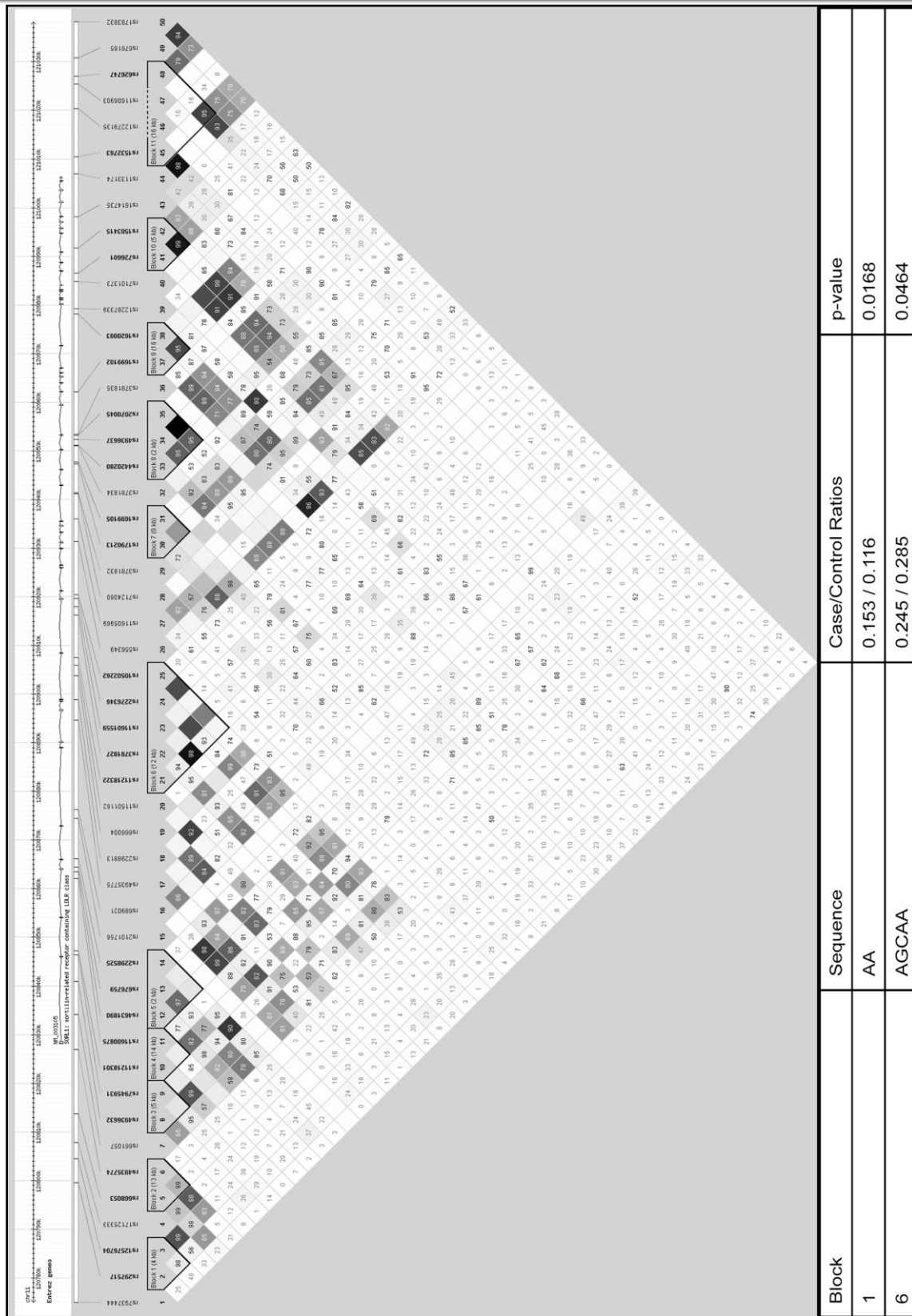


Abbildung 27: LD und Haplotype Struktur des *SORL1* Locus

Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Zwei Kombinationen mit p-Werten kleiner 0,05, sowie die Frequenzen von Fällen und Kontrollen sind unter der Abbildung aufgeführt. Die Haplotype-Blöcke wurden nach den Definitionen von (Gabriel et al., 2002) erstellt und durch Haploview 4.1 erzeugt.

5.2 Tachykinin Rezeptor 2 als Kandidatengen

Zeitgleich zu der Analyse der 11 zuvor beschriebenen Kandidatengene, deren Genotypisierung mit Illumina Technologie (4.2.7.2) erfolgte, wurde ein weiterer Kandidatengenansatz verfolgt, der mit Hilfe der Sequenom Technologie (4.2.7.3) genotypisiert wurde.

Das Tachykinin Rezeptor 2 Gen (*TACR2*) liegt auf Chromosom 10 Abschnitt q21.3 und gehört zu einer Klasse von Rezeptoren die Tachykinin-Neurotransmitter binden. Das *TACR2* bindet das Neurokinin A, auch bekannt als Substanz K, und wird in weiten Teilen des Gehirns exprimiert (Gerard et al. 1990). Funktionell ist *TACR2* an dem stressinduzierten hippocampalen Acetylcholin Ausstoß beteiligt. Des Weiteren liegt *TACR2* in einer zuvor beschriebenen Kopplungsregion für AD (Ertekin-Taner et al. 2000; Myers et al. 2000). Daher ist *TACR2* ein positionelles sowie ein funktionelles Kandidatengen für AD. Um den genetischen Einfluss des *TACR2* Gens in AD zu untersuchen, wurden 13 SNPs, davon sieben *tagging*SNPs von HapMap (International-HapMap-Consortium, 2005), die die komplette Region mit einem durchschnittlichen Markerabstand von 3,1kb abdeckten, genotypisiert. Die Auswahl der SNPs erfolgte mit Hilfe der „Snpper“ Datenbank.

Weblink 7: snpper.chip.org/

Zur Ermittlung der LD- sowie Haplotypstruktur wurde „Haploview 4.1“ benutzt (Barrett, Fry, Maller, & Daly, 2005). Für die Berechnung der Einzelmarker wurden ebenfalls Haploview, sowie die Regressionsmodelle Additiv, Dominant und Rezessiv verwendet. Die Genotypisierung erfolgte mit Hilfe der Sequenom Technologie (4.2.7.3) auf einem gut diagnostiziertem Fall/Kontroll Kollektiv, wie in 4.1.2.2 beschrieben.

Es konnte für keinen der 13 Marker eine Assoziation mit AD festgestellt werden. Einzig der SNP rs12771121 zeigte mit einem p-Wert von 0,031 im dominanten Model nominelle Signifikanz (Tabelle 20); dem Korrigieren für multiples Testen konnte dieses Signal jedoch nicht standhalten. Die LD-Blockstruktur nach (Gabriel et al., 2002) zeigt drei Haplotypblöcke (Abbildung 28) in der *TACR2* Region ohne signifikante Assoziationen in irgendeiner Markerkombination (Tabelle 21). Vergleichend dazu ist die LD-Blockstruktur aus den Daten des Hap-Map Projekts dargestellt (Abbildung 29), woraus ersichtlich wird, dass die Daten unserer Studie eine ähnliche LD-Struktur zeigt, wie die des HapMap-Kollektives. Diese Ergebnisse wurden von uns bereits in der Fachzeitschrift *Neurobiology of Aging* veröffentlicht (Feulner et al., 2011).

Ergebnisse

Tabelle 20: Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse der untersuchten SNPs in der *TACR2* Region

Die Positionen der SNPs auf Chromosom 10 entspricht dbSNP:build 125 (hg17). ^AGenotypische Assoziation wurde für jeden SNPs durch eine logistische Regression separat durchgeführt. Für die Regression wurden jeweils ein additives^a, rezessives^r und dominantes^d Modell gerechnet, wobei Alter und Geschlecht als Kovariablen einbezogen wurden. Gezeigt ist der niedrigste p-Wert der drei Modelle. ^BAllelische p-Werte wurden mithilfe eines χ^2 Testes, in Haploview4.1 berechnet. TaggingSNPs wurden aus den Ergebnissen des HapMap Projekts ausgewählt und sind markiert durch *.

SNP rs	Position	Position	Allele (Major / Minor)	Genotyp Frequenz [%]						Major Allel Frequenz		
	(hg17)	<i>TACR2</i> Gen		Fälle			Kontrollen			p- Werte ^A	Fälle / Kontrollen	p- Werte ^B
12771121*	70817752	Intron HK1	C/T	0.70	0.27	0.04	0.69	0.30	0.02	0.031d	0.836 / 0.827	0.647
4745988*	70825639	Intron HK1	C/T	0.34	0.46	0.21	0.29	0.50	0.20	0.128r	0.542 / 0.571	0.320
1000251*	70832692	Intergenisch	G/A	0.72	0.24	0.04	0.72	0.26	0.03	0.847 a	0.845 / 0.842	0.893
2229170	70834661	Exon 5	G/A	0.65	0.31	0.05	0.64	0.32	0.04	0.790 a	0.799 / 0.800	0.949
1549797	70838951	Intron	G/C	0.30	0.48	0.22	0.30	0.49	0.22	0.600 a	0.540 / 0.543	0.923
10823365	70840772	Intron	G/C	0.37	0.46	0.18	0.35	0.49	0.16	0.595 a	0.589 / 0.588	0.958
12250793	70845490	Intron	C/T	1.00	0.00	0.00	0.99	0.01	0.00	0.622 r	0.998 / 0.998	0.812
5030920*	70846018	Exon 1	T/C	0.68	0.28	0.04	0.61	0.34	0.05	0.131 r	0.782 / 0.815	0.117
3793853	70846635	Promoter	G/A	0.48	0.43	0.09	0.47	0.45	0.08	0.780 a	0.701 / 0.691	0.730
11595348*	70846926	Promoter	C/G	0.72	0.25	0.04	0.69	0.28	0.03	0.726 r	0.828 / 0.840	0.534
10509312*	70851776	Promoter	C/T	0.72	0.25	0.04	0.70	0.27	0.03	0.874 r	0.836 / 0.840	0.844
12772559	70854362	Promoter	G/C	0.58	0.36	0.06	0.58	0.37	0.05	0.794 a	0.763 / 0.750	0.574
4617477*	70858065	Intergenisch	A/G	0.72	0.25	0.03	0.70	0.27	0.03	0.820 r	0.834 / 0.844	0.641

Tabelle 21: Häufige Haplotypen, Frequenzen und Assoziationen zu AD

Alle Haplotypen mit Frequenzen über 1%, die in einem LD-Block in der *TACR2* Region liegen, wurden auf Assoziation zu AD mit Hilfe eines χ^2 -Tests analysiert

Haplotyp ID	Sequenz	Frequenz (Fall/Kontroll)	P-Werte (unkorrigiert)
Block 1			
1.1	TGG	0,451 / 0,425	0,3129
1.2	CGG	0,190 / 0,208	0,3862
1.3	CGA	0,194 / 0,199	0,8210
1.4	CAG	0,158 / 0,161	0,8918
Block 2			
2.1	CG	0,454 / 0,452	0,9335
2.2	GC	0,404 / 0,408	0,8962
2.3	GG	0,136 / 0,136	0,9956
Block 3			
3.1	CCGA	0,580 / 0,578	0,9466
3.2	CCCA	0,246 / 0,253	0,7608
3.3	GTGG	0,162 / 0,151	0,5730

Ergebnisse

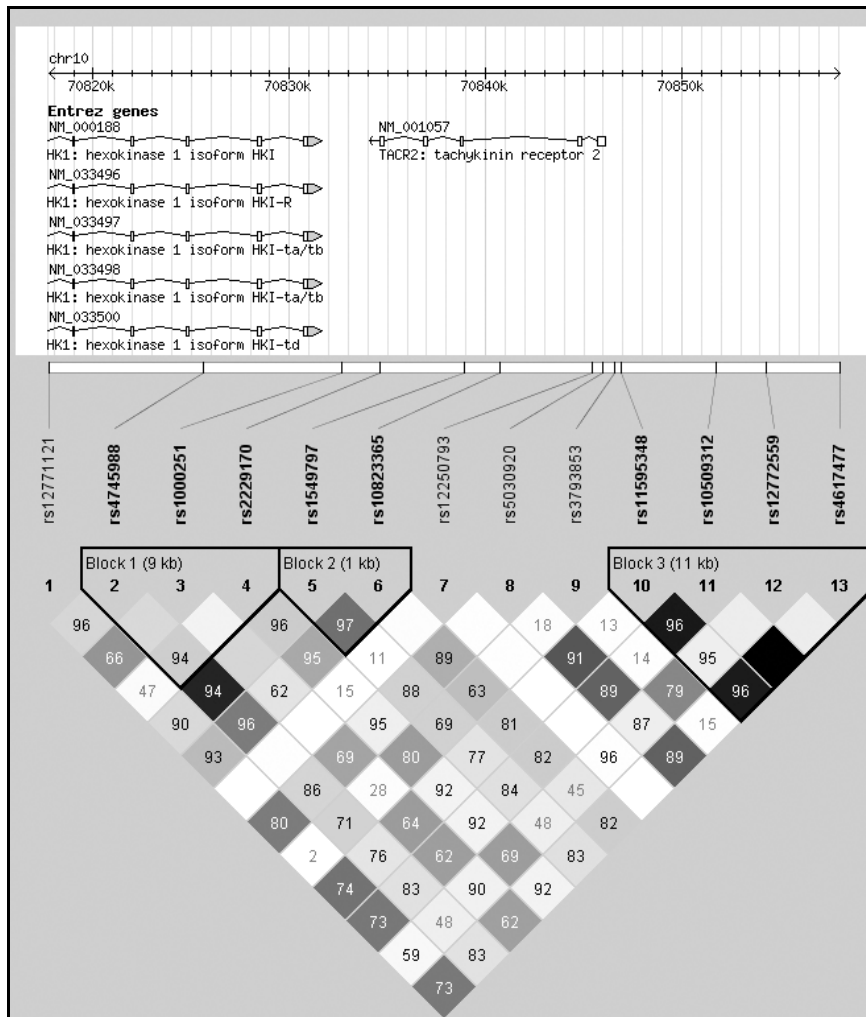


Abbildung 28: LD und Haplotyp Struktur des *TACR2* Locus unserer Daten

LD und Haplotyp-Block-Struktur des *TACR2* Locus. Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Die Blöcke folgen der Haplotyp-Block Definition nach (Gabriel et al., 2002).

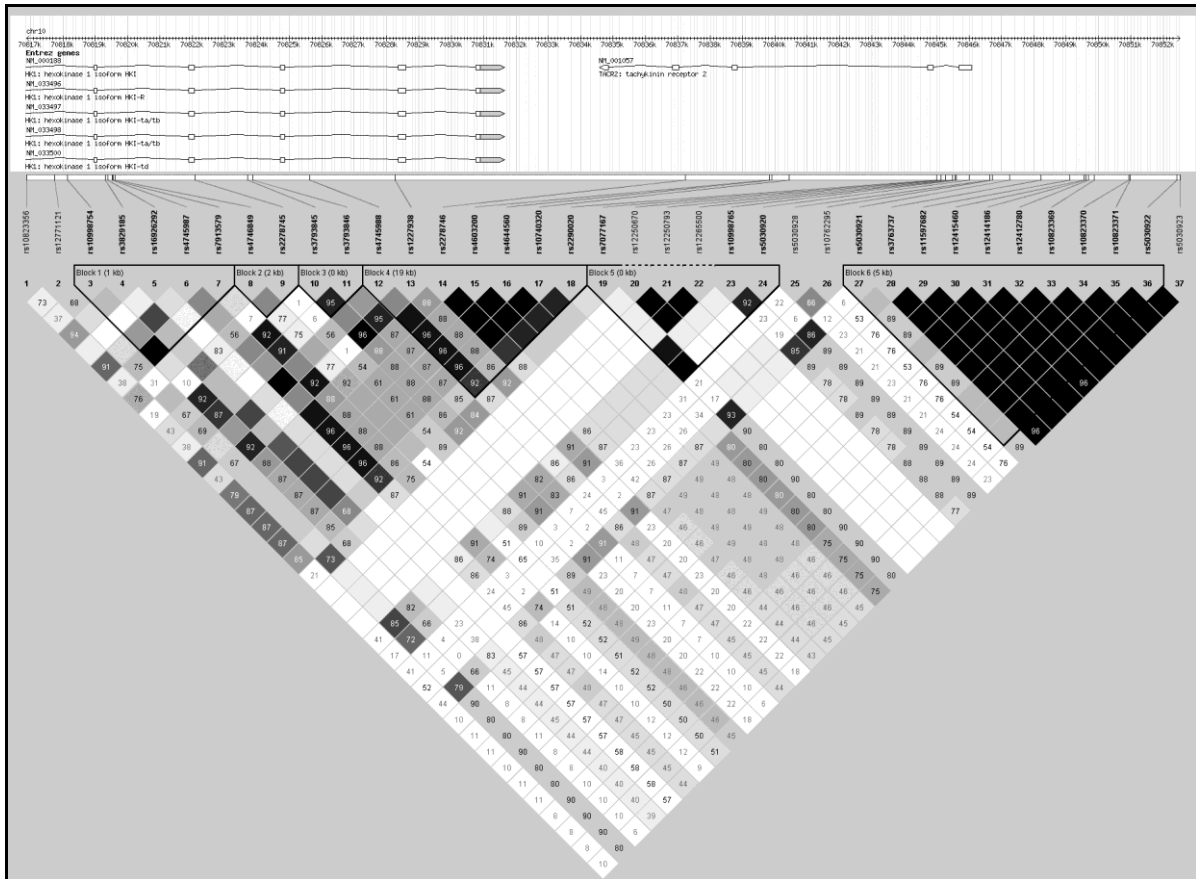


Abbildung 29: LD-Struktur des *TACR2* Locus aus den HapMap Daten

LD und Haplotyp-Block-Struktur des *TACR2* Locus. Zahlenwerte geben D' an und Grautöne stehen für r^2 ($r^2=0$ (Weiß); $0 < r^2 < 1$ (Grau Abstufungen); $r^2=1$ (Schwarz)), wobei weiße Flächen einen starken Hinweis auf Rekombination geben. Hell graue Flächen sind uninformativ und dunkel graue bis schwarze Flächen zeigen starkes LD an. Die Blöcke folgen der Haplotyp-Block Definition nach (Gabriel et al., 2002).

5.3 Erweiterte GWAS

Da in der initialen GWAS, außer dem *APOE* Locus, keine genomweiten signifikanten Assoziationen beobachtet werden konnten, haben wir uns entschlossen die „Initiale GWAS“ zu erweitern, um durch eine größere Fallzahl auch Assoziationen mit kleineren Effekten identifizieren zu können. Die 491 AD Fälle aus der Initialen GWAS (4.1.2.1) wurden durch die „Erweiterte GWAS“ um 236 AD Fälle (4.1.2.3) ausgeweitet. Nach der Qualitätskontrolle (4.2.8.3) umfasste das Gesamtkollektiv 709 AD Fälle. Nach einer genomweiten Berechnung wurde erneut *APOE*, als am stärksten assoziierter Locus, identifiziert. In Abbildung 30 ist ein Manhattan Plot zur Veranschaulichung der Ergebnisse gezeigt. Hierbei ist der *APOE* Locus zur besseren Darstellung ausgeschlossen. Für sieben SNPs wurde ein p-Wert in einem dominanten logistischen Regressionsmodell berechnet. Die Schwelle für genomweite Signifikanz liegt nach Bonferroni (4.2.8.1.2) bei einem p-Wert von $9,8 \cdot 10^{-8}$, dies entspricht

einem $-\log_{10}(\text{p-Wert})$ von 7,01 und ist durch eine waagerechte rote Linie gekennzeichnet. Zeitgleich zu der Auswertung dieser erweiterten GWAS wurden zwei Publikationen in der Fachzeitschrift „Nature Genetics“ veröffentlicht (Harold et al. 2009; Lambert et al. 2009), die in deutlich größeren Kohorten vier neue Risikoloci (*CLU*, *CRI*, *BINI* und *PICALM*) identifiziert haben. Die Assoziationen zu diesen vier Genen können durch unseren Datensatz zunächst nicht validiert werden. Allerdings zeigt ein Vergleich der Allelfrequenzen zwischen Fällen und Kontrollen unseres Kollektivs starke Ähnlichkeit zu den publizierten Frequenzen. Dies lässt darauf schließen, dass die von Harold et al. und Lambert et al. beschriebenen Assoziationen, bei einer höheren Fallzahl, auch in unserer Kohorte zu finden wären. Ein Vergleich der Frequenzen zwischen Fällen und Kontrollen ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Vergleich der Allelfrequenzen für die Gene *BINI*, *CLU*, *CRI* und *PICALM*

Übersicht über die Allelfrequenzen sowie der p-Werte der assoziierten Allele unserer Studie im Vergleich zu den publizierten Studien von Harold et al. und Lambert et al..

Gen/Region	SNP	Studie	Assoziiertes Allel	Allelfrequenz Fälle, Kontrollen	p-Wert
<i>BINI</i>	rs744373	Harold et al.	C	0.313, 0.280	3.2×10^{-6}
<i>BINI</i>	rs744373	Feulner et al.	C	0.324, 0.274	0.0018
<i>BINI</i>	rs7561528	Harold et al.	A	0.366, 0.332	3.0×10^{-6}
<i>BINI</i>	rs7561528	Feulner et al.	A	0.359, 0.319	0.0155
<i>CLU</i>	rs11136000	Harold et al.	T	0.363, 0.403	8.5×10^{-10}
<i>CLU</i>	rs11136000	Feulner et al.	T	0.371, 0.392	0.2094
<i>CLU</i>	rs11136000	Lambert et al.	T	0.350, 0.380	7.5×10^{-9}
<i>CRI</i>	rs3818361	Lambert et al.	T	0.220, 0.180	8.9×10^{-8}
<i>CRI</i>	rs3818361	Feulner et al.	T	0.234, 0.192	0.0029
<i>PICALM</i>	rs3851179	Harold et al.	G	0.335, 0.374	1.3×10^{-9}
<i>PICALM</i>	rs3851179	Feulner et al.	G	0.666, 0.631	0.0318

Aufgrund dieser Ergebnisse, wurde beschlossen, die Assoziationen der sieben genomweit signifikanten SNPs vorerst nicht zu verfolgen und anstatt dessen unsere Kohorte zusammen mit einem internationalen Konsortium in einer stufenweisen Meta-Analyse zu untersuchen. Durch die dadurch erreichten Kohortengrößen (4.1.2.4) ist es möglich Assoziationen mit kleinen Effektgrößen zu identifizieren.

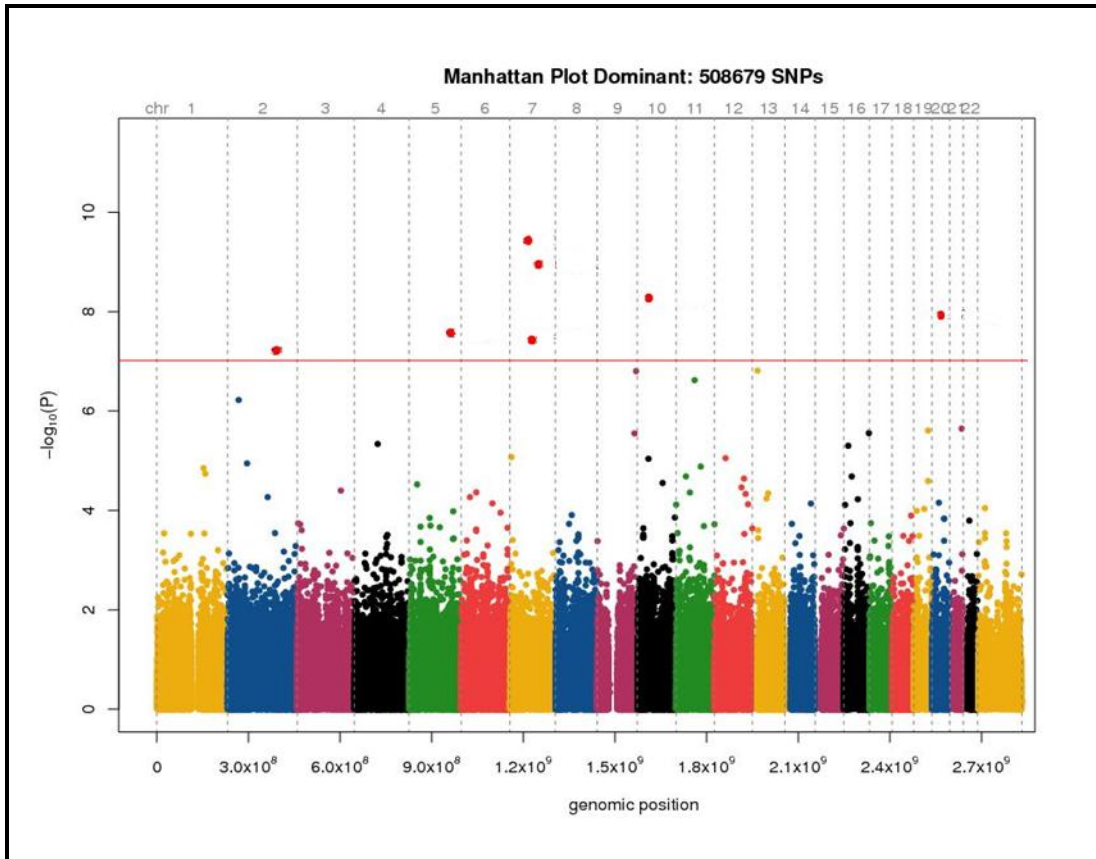


Abbildung 30: Manhattan Plot der erweiterten Fall/Kontroll GWAS

Dargestellt sind die $-\log_{10}$ p-Werte der erweiterten GWAS. In unterschiedlichen Farben sind die Chromosome gezeigt und die waagerechte rote Linie gibt die Schwelle für genomweite Signifikanz nach Bonferroni an. Der APOE Locus ist in dieser Darstellung zur besseren Veranschaulichung entfernt.

5.3.1 Fall/Kontroll-Ansatz in internationalen Konsortien

Zusammen mit einem internationalen europäischen Konsortium konnten wir, durch eine stufenweise Assoziationsstudie (GERAD+ *Genetic and Environmental Risk in Alzheimer's Disease Consortium* +) neue Gene identifizieren, die mit der Alzheimer Krankheit assoziiert sind (Hollingworth et al., 2011). Zusätzlich wurden Loci getestet, die von einem internationalen amerikanischen Konsortium (ADGC *Alzheimer's Disease Genetic Consortium*) gefunden wurden (Naj et al., 2011) und in einer gemeinsamen Meta-Analyse bestätigt werden konnten. Die Gene sind *ABCA7*, *MS4A6A/MS4A4E*, *EPHA1*, *CD33* und *CD2AP* und wurden in der Fachzeitschrift *Nature Genetics* veröffentlicht (Hollingworth et al., 2011). In der gleichen Ausgabe erschien der Artikel des internationalen amerikanischen Konsortiums die zu ähnlichen Ergebnissen gekommen sind (Naj et al., 2011). Der schematische Aufbau der stufenweisen Meta-Analysen ist in Abbildung 31 dargestellt.

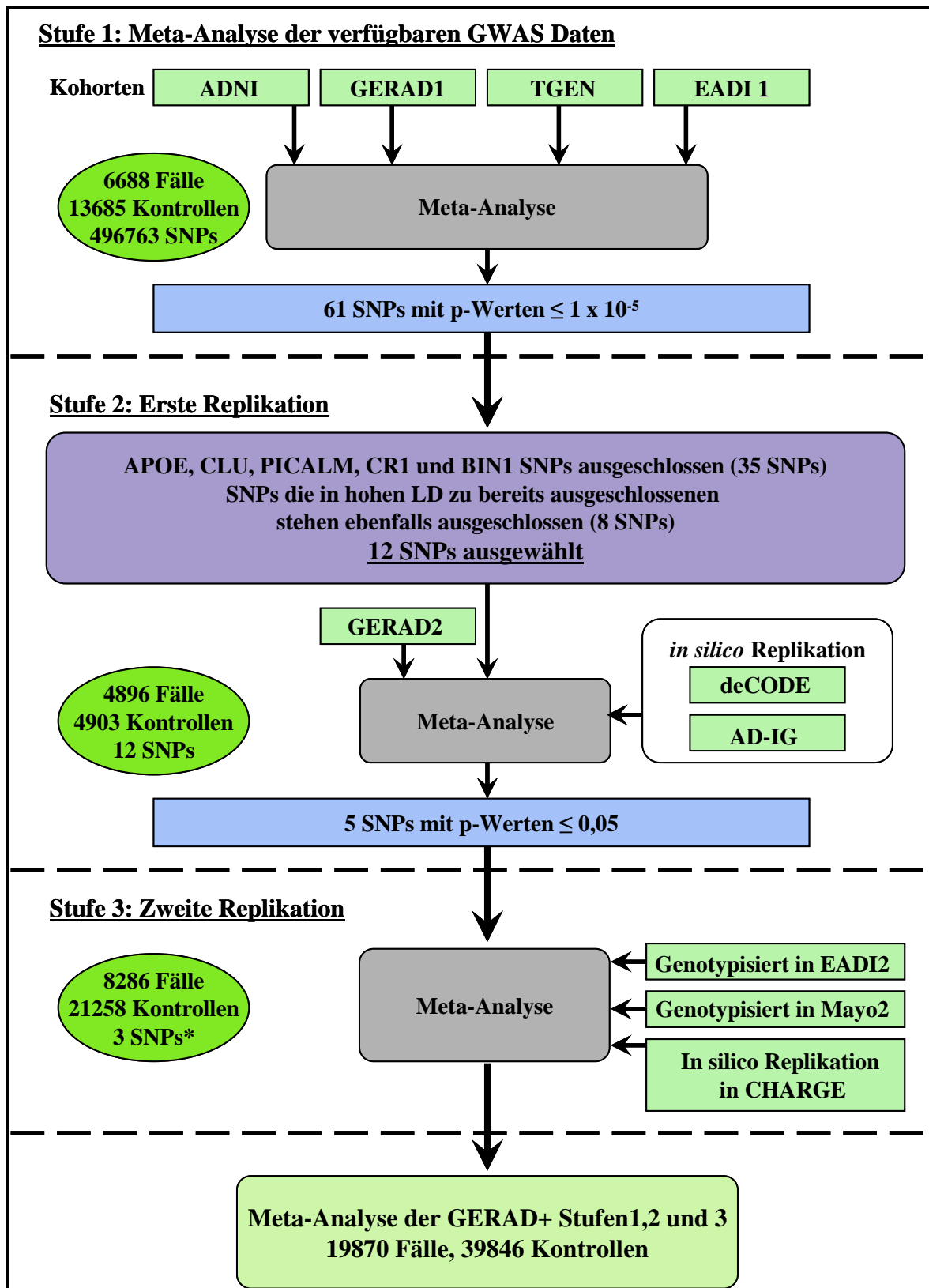


Abbildung 31: Schematischer Aufbau der GERAD+ Studie

*Daten für rs744373 und rs3818361 aus dem CHARGE Konsortium wie auch Daten für rs381861 aus dem EADI2 Kollektiv wurden nicht in Stufe 3 eingebunden, da sie zuvor bereits präsentiert wurden (Abbildung nach Hollingworth 2011, verändert).

Ergebnisse

In der ersten Phase der Studie wurde eine Meta-Analyse von vier GWAS Datensätzen durchgeführt, dazu gehörten die Kohorten GERAD1 (Harold et al., 2009), EADI1 (Lambert et al. 2009), TGEN1 (Reiman et al., 2007) und ADNI (Petersen et al. 2010) mit insgesamt 6688 AD Fällen und 13685 Kontrollen. SNPs die einen p-Wert kleiner gleich 1×10^{-5} zeigten wurden dann in Stufe 2 repliziert. Hierfür wurden die Kollektive GERAD2 (Hollingworth et al., 2011) sowie eine *in silico* Replikation unseres Kollektives, AD-IG (Feulner et al., 2010), als auch des deCODE (Hollingworth et al., 2011) Kollektives vorgenommen. Insgesamt waren in dieser Stufe 4896 AD Fälle und 4903 Kontrollen in die Analyse eingebunden (Abbildung 31). In der dritten Stufe wurden dann zuvor unidentifizierte SNPs die Signifikanz in Stufe 2 zeigten, erneut auf Assoziation mit AD in den Kohorten EADI2 (Lambert et al. 2009) und Mayo2 (Hollingworth et al., 2011) als auch *in silico* in der CHARGE (Seshadri et al., 2010) Kohorte repliziert. Insgesamt standen in dieser Stufe 8286 AD Fälle und 21258 Kontrollen zur Verfügung (siehe Abbildung 31).

In Stufe eins wurden 61 SNPs gefunden, die mit AD assoziiert sind und einen p-Wert unter 1×10^{-5} zeigten, die genauen Ergebnisse zu jedem Kollektiv sind im Anhang in Tabelle 35 gezeigt. 10 davon waren neue, zuvor nicht mit AD in Verbindung gebrachte Loci, und zwei weitere lagen in den Regionen des *BIN1* und *CRI* Gens und wurden noch nicht in GERAD2 getestet. Die übrigen lagen in der *APOE*, *CLU* oder *PICALM* Region oder stehen in hohem LD zu diesen bereits bekannten Risikoloci und wurden daher ausgeschlossen. In Stufe zwei wurden dann, von den 12 untersuchten Loci 5 in unabhängigen Kollektiven repliziert, die eine Signifikanzschwelle von $p = 4,2 \times 10^{-3}$ der Bonferroni-Korrektur unterschritten haben (Tabelle 23).

Tabelle 23: Ergebnisse der zweiten Stufe der Meta-Analyse

Gezeigt sind die Ergebnisse der zweiten Stufe der Meta-Analyse zu den 12 untersuchten SNPs. Die fünf SNPs, die das Signifikanzniveau einer Bonferroni Korrektur von $p < 0,0042$ unterschreiten sind Grau unterlegt.

SNP	Gen/Region	CHR	Position	A1	A2	Stufe 2			
						OR	p-Wert	Fälle	Kontrollen
rs3764650	<i>ABCA7</i>	19	1 046 520	G	T	1.28	1.9E-05	4896	4903
rs744373	<i>BIN1</i>	2	127 894 615	G	A	1.17	3.8E-05	4896	4903
rs670139	<i>MS4A4E</i>	11	59 971 795	T	G	1.11	1.1E-03	4896	4903
rs3818361	<i>CR1</i>	1	207 784 968	A	G	1.14	1.4E-03	4896	4903
rs610932	<i>MS4A6A</i>	11	59 939 307	T	G	0.90	1.6E-03	4896	4903
rs7191155	<i>IQCK</i>	16	19 800 213	C	T	0.94	1.5E-01	4896	4903
rs4782279	<i>IQCK</i>	16	19 759 007	C	A	0.95	1.9E-01	4896	4903
rs1858973	<i>IQCK</i>	16	19 743 649	C	T	0.95	2.1E-01	4896	4903
rs739565	<i>C16orf88</i>	16	19 716 505	A	G	1.02	5.5E-01	4896	4903
rs10501927	<i>CNTN5</i>	11	99 757 729	G	T	1.02	6.9E-01	4896	4903
rs10761558	<i>CDK1</i>	10	62 523 470	A	G	1.00	9.0E-01	4187	3932
rs3809278	<i>CUX2</i>	12	111 725 185	A	C	1.00	9.9E-01	4896	4903

Ergebnisse

Der SNP rs3764650 in dem *ABCA7* Gen, sowie die SNPs rs610932 und rs670139 in dem *MS4A* Gen Cluster zeigten auch in Stufe 2 Assoziation mit AD, diese Loci waren zuvor noch nicht durch andere Studien mit AD in Verbindung gebracht worden. Zwei SNPs in den Genen *BIN1* und *CR1* blieben in Stufe 2 ebenfalls signifikant (Tabelle 23), waren allerdings zuvor schon beschrieben mit AD assoziiert zu sein. Die drei neuen Risikoloci wurden dann in Stufe 3 erneut repliziert und unterschritten alle das Signifikanzniveau der Bonferroni-Korrektur von $p < 0,0167$ (Tabelle 24).

Tabelle 24: Ergebnisse der dritten Studie der Meta-Analyse

In der dritten Stufe unterschritten alle p-Werte der drei untersuchten SNPs den Schwellenwert der Bonferroni Korrektur für multiples Testen von $p < 0,0167$ und sind Grau unterlegt dargestellt.

SNP	Gen/Region	CHR	Position	A1	A2	Stufe 3			
						OR	p-Wert	Fälle	Kontrollen
rs3764650	<i>ABCA7</i>	19	1 046 520	G	T	1.22	2.9E-07	7176	17754
rs670139	<i>MS4A4E</i>	11	59 971 795	T	G	1.06	3.2E-03	8224	21194
rs610932	<i>MS4A6A</i>	11	59 939 307	T	G	0.91	2.1E-05	7312	19874

Durch eine Meta-Analyse der Stufen 1, 2 und 3 konnten alle Assoziationssignale weiter verstärkt werden, die Ergebnisse sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Ergebnisse der Meta-Analyse der Stufen 1, 2 und 3

SNP	Gen/Region	CHR	Position	A1	A2	Meta-Analyse Stufe 1, 2 und 3				
						OR	95% CI	p-Wert	Fälle	Kontrollen
rs3764650	<i>ABCA7</i>	19	1 046 520	G	T	1.23	1.18-1.30	4.5E-17	17683	34269
rs744373	<i>BIN1</i>	2	127 894 615	G	A	1.17	1.12-1.12	2.6E-14	11584	17619
rs670139	<i>MS4A4E</i>	11	59 971 795	T	G	1.09	1.06-1.12	1.4E-09	19262	38024
rs3818361	<i>CR1</i>	1	207 784 968	A	G	1.18	1.13-1.24	3.7E-14	11584	18154
rs610932	<i>MS4A6A</i>	11	59 939 307	T	G	0.90	0.89-0.92	1.8E-14	18990	38080

Die Kombination der GERAD+ mit der ADGC Studie ergab für das *ABCA7* Gen ein p-Wert von $5,0 \times 10^{-21}$ (OR=1,22), für die beiden SNPs rs610932 und rs670139 in dem *MS4A* Gen Cluster wurden p-Werte von $1,2 \times 10^{-16}$ (OR=0,91) bzw. $1,1 \times 10^{-10}$ (OR=1,22) berechnet. Die Positionen der assoziierten SNPs, sowie die Haplotyp Strukturen sind in Abbildung 32 und Abbildung 33 dargestellt.

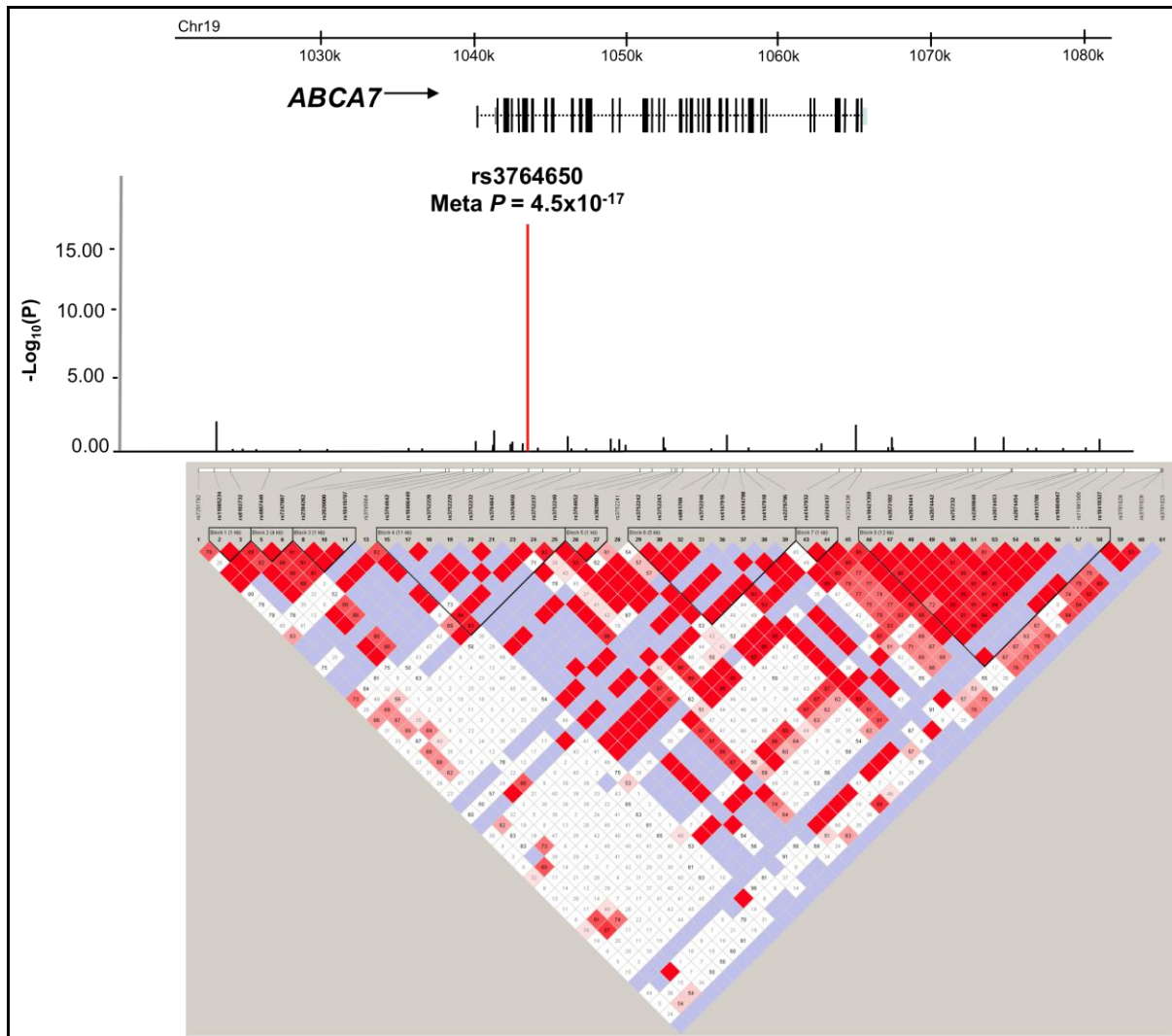


Abbildung 32: Schematische Darstellung der ABCA7 Region

Die chromosomale Position ist oben gezeigt (UCSC Feb 2009), horizontale Pfeile geben die Richtung der Transkription an, schwarze senkrechte Striche die Position der Exons. Der $-\log_{10}$ p-Wert ist zu jedem SNP aus Stufe eins in schwarz in dem Diagramm angegeben, rot gekennzeichnet ist der p-Wert des Markers aus GERAD+ Stufe 1, 2 und 3 Meta-Analyse. Die Bockstruktur der jeweiligen Marker zeigt das LD der Marker zueinander in D' an (Hollingworth et al., 2011).

Der andere Prädispositions-Locus war das *MS4A* (*membrane-spanning 4A*) Gen Cluster in dem die Assoziation zu AD einen LD-Block von 293kb umfasste, in dem 6 der 16 bekannten Gene dieser Familie liegen (*MS4A2*, *MS4A3*, *MS4A4A*, *MS4A4E*, *MS4A6A* und *MS4A6E*). Die assoziierten SNPs wurden in der 3' untranslatierten Region von *MS4A6A* (rs610932) und der intergenischen Region zwischen *MS4A4E* und *MS4A6A* (rs670139) gefunden. Der Marker rs610932 zeigte nominell signifikante Assoziation mit der Expression von *MS4A6A* im Cerebellum und dem temporalen Cortex ($0,01 < p < 0,05$), nicht aber im frontalen Cortex, Pons (Brücke) (J. R. Gibbs et al., 2010) und in Lymphoblastom Zelllinien (Stranger et al., 2005).

Ergebnisse

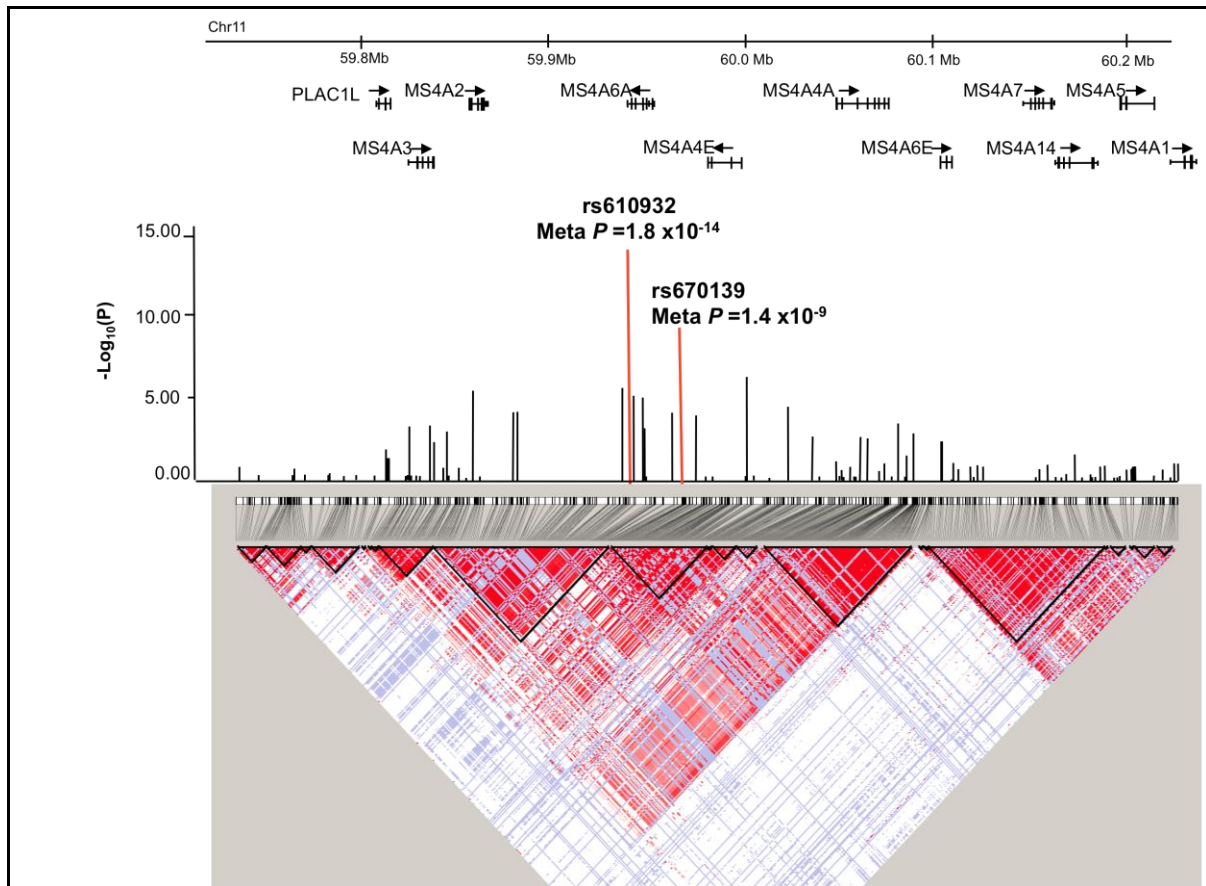


Abbildung 33: Schematische Darstellung des MS4A Gen Clusters

Die chromosomale Position ist oben gezeigt (UCSC Feb 2009), horizontale Pfeile geben die Richtung der Transkription an, schwarze senkrechte Striche die Position der Exons. Der $-\log_{10}$ p-Wert ist zu jedem SNP auf Stufe eins in schwarz in dem Diagramm angegeben, rot gekennzeichnet sind die p-Werte der Marker aus GERAD+ Stufe 1, 2 und 3 Meta-Analyse. Die Blockstruktur der jeweiligen Marker zeigt das LD der Marker zueinander in D' an (Hollingworth et al., 2011).

Des Weiteren wurden vier andere Loci, die in der ADGC Studie (Naj et al., 2011) Assoziation mit AD zeigten ($1 \times 10^{-6} \geq p > 5 \times 10^{-8}$) und in den Genen *CD33*, *EPHA1*, *CD2AP* und *ARID5B* lagen, weiter verfolgt. Hierzu wurden die GERAD+ Kohorte und die ADGC Kohorte gemeinsam in einer Meta-Analyse untersucht, wobei doppelte Individuen entfernt wurden. Es wurde genomweite Assoziation zu AD für die Marker rs9349407, rs3865444 und rs11767557 mit p-Werten von $8,6 \times 10^{-9}$, $1,6 \times 10^{-9}$ bzw. $6,0 \times 10^{-10}$ gefunden. Für den SNP rs2588969 konnte keine Assoziation in dem kombinierten Datensatz gezeigt werden (Hollingworth et al., 2011).

5.3.2 Quantitative Marker Analysen

In einem nächsten Schritt wurde untersucht welchen Einfluss genetische Marker (SNPs), der zuvor mit AD assoziierten Loci, auf quantitative Marker haben.

Für die folgenden Analysen wurde das Kollektiv der erweiterten GWAS, wie in 4.1.2.3 beschrieben, verwendet. Die zur Verfügung stehenden Endophänotypen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die untersuchten genetischen Regionen wurden in zuvor publizierten GWA Studien mit Alzheimer assoziiert gezeigt und daher näher untersucht (Lambert et al. 2009; Harold et al. 2009; Hollingworth et al. 2011; Naj et al. 2011). Hierbei wurde nicht nach Assoziationen zwischen Fällen und Kontrollen gesucht, sondern es wurde der Einfluss von krankheitsspezifischen biochemischen Markern aus Liquor oder Blut und neuropsychiatrischen Tests untersucht. Die analysierten Regionen, deren chromosomale Positionen sowie die Anzahl der untersuchten Marker sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Analyisierte Regionen

Die Angaben der Positionen beziehen sich auf Genom Version NCBI36 hg18

Locus	Chromosom	Start [bp]	Stop [bp]	Größe [bp]	Anzahl analysierter Marker
ABCA7	19	981 014	1 025 315	44 301	211
ARID5B	10	63 271 249	63 535 639	264 390	664
BIN1	2	127 512 010	127 614 937	102 927	438
CD2AP	6	47 543 262	47 711 143	167 881	422
CD33	19	56 410 129	56 444 384	34 255	83
CLU	8	27 500 194	27 537 903	37 709	98
CR1	1	205 726 398	205 890 488	164 090	328
EPHA1	7	142 788 905	142 825 850	36 945	102
GAB2	11	77 593 709	77 815 808	222 099	446
GOLM1	9	87 820 606	87 911 915	91 309	250
MS4A Cluster	11	59 500 964	60 249 530	748 566	2 146
PICALM	11	85 336 520	85 487 565	151 045	442
SORL1	11	120 818 128	121 015 919	197 791	426
Gesamt	—	—	—	2 263 308	6 056

Da es sich bei der Alzheimer Krankheit um eine genetisch komplexe Erkrankung handelt, bei der wahrscheinlich sehr viele Risikoloci eine Rolle spielen, ist es nicht überraschend, dass auch die kürzlich gefundenen Loci einen eher kleinen Effekt zeigen, der bei einer 0,10 bis 0.15 fachen Erhöhung oder Erniedrigung des Alzheimer Risikos für Träger des assoziierten Allels liegt. Daher ist es nötig, dass immer größere Kollektive untersucht werden um auch kleine Effekte identifizieren zu können. Die letzten beiden großen Meta-Analysen untersuchten 19 870 bzw. 18 832 Fälle und 39 846 bzw. 35 597 Kontrollen (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011). In diesen Meta-Analysen blieb allerdings der eigentliche Effekt

der assoziierten Marker unklar, da keiner dieser Marker in einer proteinkodierenden Region liegt. Es ist daher möglich, dass die eigentliche kausale Variante in hohem LD zu den assoziierten Marker liegt. Durch Imputation (4.2.8.4) des Datensatzes konnte die Dichte der Marker deutlich erhöht werden um eventuelle kausale Varianten zu identifizieren. Interessant ist, dass alle untersuchten Gene an Fettstoffwechsel, Immunantwort oder inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Um die Beteiligung dieser neuen Risikoloci bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit weiter zu charakterisieren, wurde der Einfluss von biochemischen Blutparametern wie Serum Level für VLDL, LDL, HDL, Triglyzeride, Cholesterin und Vitamin B12, sowie CSF Level für A β ₄₂ und Tau-Protein untersucht. Des Weiteren wurden neuropsychologische Test Ergebnisse (CERAD-NP (Morris et al. 1989; Mirra et al. 1991)) herangezogen. Für all diese Parameter ist eine Beteiligung am Phänotyp der Krankheit bekannt.

Um den Einfluss von Genotypen auf die erhobenen Endophänotypen zu untersuchen wurde ein dominantes lineares Regressionsmodell mit Alter, Geschlecht und SNP als Kovariaten gerechnet. Für signifikante Ergebnisse wurden im Weiteren Haplotypanalysen durchgeführt, die zum einen einem drei Marker *sliding window* Model folgten und zum anderen nach den Blockdefinitionen von Gabriel et al. ausgerichtet waren (Gabriel et al., 2002). Außerdem ist es erwähnenswert, dass nicht alle Signale die in einzelnen Loci als signifikant gefunden wurden auch völlig unabhängig voneinander sind. Oft deuten sie auf ein und dasselbe Assoziationssignal hin (LD).

5.3.2.1 CR1 (complement receptor 1)

Für den CR1 Locus konnten 10 Assoziationen gefunden werden, die eine durchschnittliche Reduktion des A β ₄₂ Levels im CSF von 23% zeigte (Tabelle 27). Alle Marker befinden sich in der proximalen Region des *CR1* Gens. In Abbildung 34 ist der zuvor identifizierte SNP durch ein Viereck markiert und die LD Berechnungen (r^2) beziehen sich auf diesen SNP. Abbildung 35 zeigt exemplarisch für den Marker rs63341260 die ln(A β ₄₂) Werte nach dem dominanten Model, wobei der niedrigere A β ₄₂ Mittelwert für die Gruppe der heterozygoten und homozygoten für das seltene Allel im Vergleich zu den homozygoten des häufigen Allels deutlich zu erkennen ist. In der Haplotypanalyse konnte ein drei-Marker-Haplotyp, der aus den SNPs rs61811963, rs7533408 und rs62763963 gebildet wurde, identifiziert werden, der ein stärkeres Assoziationssignal ($p=0,00058$) für die GTA Kombination mit einer Häufigkeit von 11,5% hervorbrachte, als in der Einzelmarkeranalyse (rs62763963 $p=0,0044$). Das

Ergebnisse

gleiche Signal mit der gleichen Frequenz konnte auch für den folgenden drei-Marker-Haplotyp (TAG) berechnet werden (rs7533408, rs62763963 und 1-205741136). Zusätzlich zu den beiden drei-Marker-Haplotypen, wurde auch ein 14 Marker Haplotypblock nach den Gabriel et al. Blockdefinitionen gefunden, der eine Frequenz von 11,7% für die Kombination GCGGGAGTAGGATA (chr1:205738244-205742826 Intron 1) und einen p-Wert von 0,00045 zeigte. Die beiden drei-Marker-Haplotypen GTA bzw. TAG liegen in diesem Block und sind Fett gedruckt. Für die *CRI* Region und $A\beta_{42}$ als Endophänotyp war dies die signifikanteste Beobachtung.

Tabelle 27: Ergebnisse der *CRI* Region für $A\beta_{42}$ als Endophänotyp

Locus	SNP	Position Chr1	major	hetero / minor	n major	n hetero +minor	Call-rate	MAF	p-Wert SNP	Mittel $A\beta_{42}$ [pg/ml CSF] major	Mittel $A\beta_{42}$ [pg/ml CSF] hetero+minor	% Abnahme
CR1	rs7519408	205727912	CC	GC/GG	79	27	1	0.132	8.91E-03	517	397	23.2
CR1	rs4618970	205728263	TT	CT/CC	79	27	1	0.132	8.91E-03	517	397	23.2
CR1	rs9429940	205729535	CC	TC/TT	79	27	1	0.132	8.91E-03	517	397	23.2
CR1	rs4525038	205730560	CC	TC/TT	79	27	1	0.132	8.91E-03	517	397	23.2
CR1	rs7525170	205735070	AA	GA/GG	66	39	0.991	0.205	3.54E-03	525	408	22.3
CR1	rs4844597	205737892	TT	CT/CC	66	39	0.991	0.205	3.54E-03	525	408	22.3
CR1	rs4274065	205738099	TT	CT/CC	66	39	0.991	0.205	3.54E-03	525	408	22.3
CR1	rs62763963	205740568	GG	AG/A	65	36	0.953	0.198	4.40E-03	521	404	22.5
CR1	rs4310446	205743227	TT	CT/CC	68	38	1	0.208	2.62E-03	533	406	23.8
CR1	rs63341260	205743391	CC	TC/TT	62	34	0.906	0.203	3.63E-03	533	405	24.1

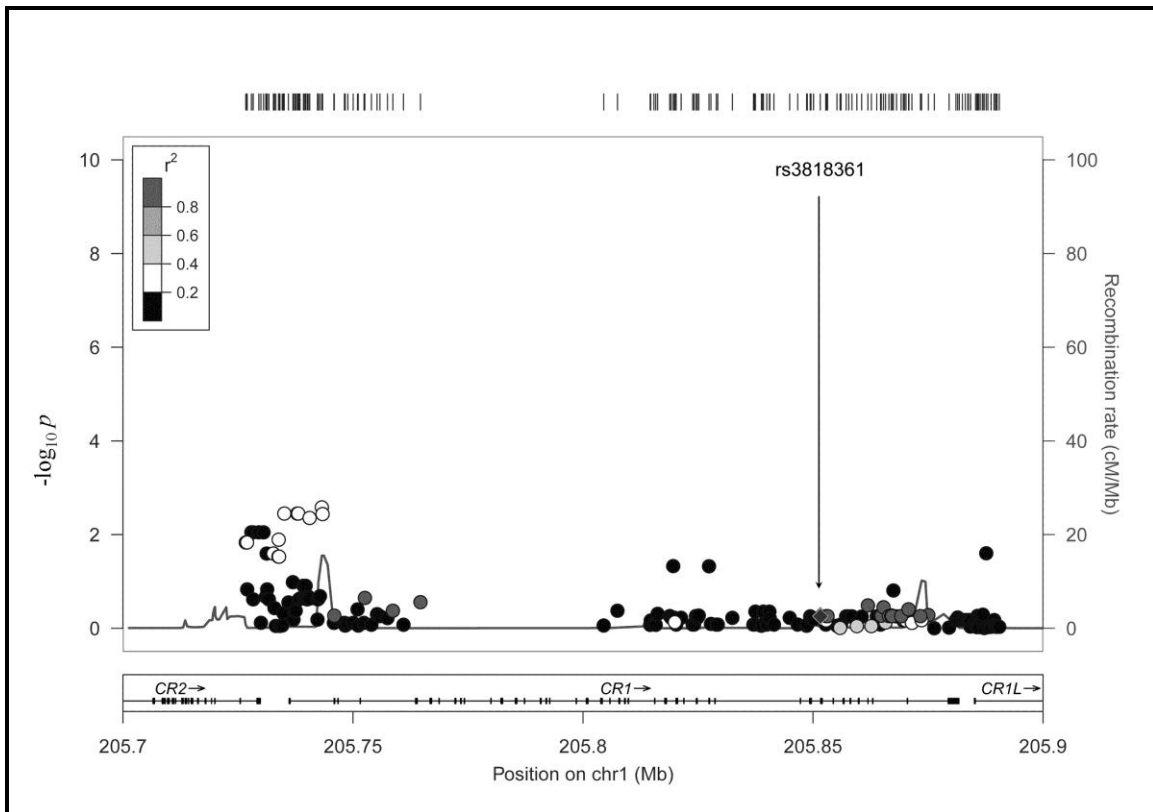


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Assoziationen der *CR1* Region

$-\log p$ -Werte sind auf der linken y-Achse und die genomische Position auf der x-Achse dargestellt. Die rechte y-Achse gibt die Rekombinationsrate an. Der SNP rs3818361, der zuvor von (Harold et al., 2009) identifiziert wurde, ist durch ein Viereck gekennzeichnet. Die LD Berechnungen beziehen sich auf diesen SNP. Diese Grafik wurde mit Hilfe der LocusZoom Software erstellt (Pruim et al., 2010).

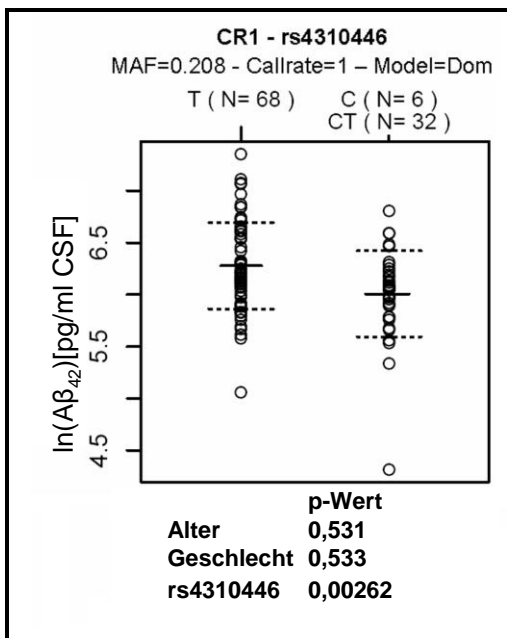


Abbildung 35: Verteilung der A β_{42} Werte nach Genotypen (rs4310446)

Punktdiagramm für den SNP rs4310446, der die größte Erniedrigung der A β_{42} Werte zeigte. Die Gruppen sind nach dem dominanten Model in homozygote Träger des häufigen Allels (TT n=68) und heterozygote zusammen mit homozygoten Trägern des seltenen Allels (CT n=32 + CC n=6 \rightarrow TC/CC n=38) eingeteilt. Linien geben den Mittelwert an und unterbrochene Linien die Standardabweichung.

5.3.2.2 MS4A Cluster (*membrane-spanning 4-domains, Subfamily A*)

Für die *MS4A* Gen Cluster Region konnten 19 von insgesamt 2146 SNPs mit p-Werten zwischen 0,01 und 0,00091 (Anhang, Tabelle 36) für den Endophänotyp A β ₄₂ identifiziert werden. Die zuvor in einem Fall/Kontroll Ansatz gefundenen SNPs rs4938933 (Naj et al., 2011), rs610932 (Hollingworth et al., 2011) und rs670139 (Hollingworth et al., 2011) konnten bei dieser Analyse nicht mit einem veränderten A β ₄₂ Level in Verbindung gebracht werden (Anhang, Abbildung 40, Abbildung 41 und Abbildung 42). Stattdessen wurden 5 Marker in der *MS4A1* Region, 9 in der *MS4A12* Region, wovon 3 intergenisch in 3' Richtung liegen, 5 weitere Marker intergenisch zwischen den Genen *MS4A4A* und *MS4A6E*, gefunden. Diese Assoziationssignale waren durch einen Rekombinations-Hotspot von den 3 zuvor beschriebenen Markern getrennt. Für die 19 Marker wurde eine durchschnittliche Erniedrigung der A β ₄₂ Konzentration von 22,6% für Träger des seltenen Allels berechnet. In der Haplotypanalyse konnte kein stärkeres Signal als in der Einzelmarkeranalyse detektiert werden, weder mittels *sliding window* Analyse, noch mit Hilfe der Gabriel et al. Blockdefinitionen.

5.3.2.3 SORL1 (*sortilin-related receptor 1*)

Assoziationssignale mit dem Endophänotyp A β ₄₂ konnten nicht nur für den *CRI* sowie das *MS4A* Cluster gefunden werden, sondern auch für den *SORL1* Locus, hierbei für die genomische Position 120952023 auf Chromosom 11 (NCBI36/hg18). Es konnte eine Erhöhung des A β ₄₂ Proteins im CSF für homozygote Träger des häufigen Allels (CC n=45) von durchschnittlich 551 pg/ml CSF im Vergleich zu den heterozygoten und homozygoten Trägern des seltenen Allels (n=51), die eine durchschnittliche A β ₄₂ Konzentration von 429pg/ml CSF hatten, beobachtet werden (Abbildung 36).

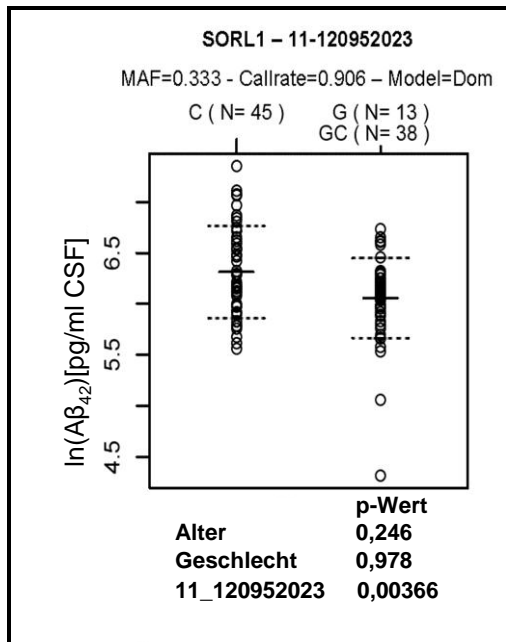


Abbildung 36: Verteilung der A β_{42} Werte nach Genotypen (11-120952023)

Punktdiagramm für den Marker 11-120952023, der die größte Reduktion der A β_{42} Werte zeigte. Die Gruppen sind nach dem dominanten Model in homozygote Träger des häufigen Allels (CC n=45) und heterozygote zusammen mit homozygoten Trägern des seltenen Allels (GC n=38 + GG n=13 → GC/GG n=51) eingeteilt. Linien geben den Mittelwert an und unterbrochene Linien die Standardabweichung.

In der *sliding window* Analyse war das Signal stärker als für die Einzelmarker Berechnung. Der Haplotypblock aus den Markern 11-120952023, rs4936636 und rs4936637 zeigte einen p-Wert von 0,0024 bei einer Häufigkeit von 66,3% für die Kombination CCT.

Für SNPs des *SORL1* Locus konnten zusätzlich Assoziationen mit Vitamin B12 Level gezeigt werden. 18 SNPs, alle in hohem Kopplungsungleichgewicht, erreichten p-Werte zwischen 0,00212 und 0,000377 (Tabelle 28). Alle SNPs lagen in einer 28kb großen Region des *SORL1* Locus, Abbildung 43 im Anhang gibt einen näheren Überblick über die untersuchten Marker, deren Position und des Kopplungsungleichgewichtes.

Ergebnisse

Tabelle 28: Ergebnisse der *SORL1* Region für Vitamin B12 als Endophänotyp

Locus	SNP	Position Chr11	major	hetero / minor	n major	n hetero +minor	Call-rate	MAF	p-Wert SNP	Mittel VB12 [ng/l Blut] major	Mittel VB12 [ng/l Blut] hetero+minor	% Abnahme
SORL1	11_120931061	120931061	CC	TC/TT	410	76	1	0.08	7.08E-04	346	431	24.7
SORL1	11_120932778	120932778	GG	AG/AA	410	76	1	0.08	7.08E-04	346	431	24.7
SORL1	rs11218340	120936564	AA	TA/TT	410	75	0.99	0.08	8.90E-04	347	432	24.4
SORL1	11_120937916	120937916	CC	TC/TT	409	76	0.99	0.08	6.75E-04	346	431	24.8
SORL1	rs10892756	120939766	CC	TC/TT	409	76	0.99	0.08	8.04E-04	347	431	24.4
SORL1	rs10892757	120939960	TT	GT/GG	398	75	0.97	0.08	5.44E-04	345	434	25.5
SORL1	rs3781832	120941480	GG	TG/TT	378	108	1	0.12	2.12E-03	344	411	19.3
SORL1	rs11218344	120942621	GG	AG/AA	393	74	0.96	0.08	5.09E-04	344	433	25.9
SORL1	rs1784920	120942781	GG	AG/AA	376	88	0.95	0.1	9.12E-04	344	423	23.1
SORL1	rs11218345	120943817	TT	AT/AA	392	74	0.95	0.08	4.96E-04	344	433	26
SORL1	rs11218346	120944391	GG	AG/AA	411	75	1	0.08	7.86E-04	346	432	24.7
SORL1	11_120945440	120945440	CC	TC/TT	392	74	0.95	0.08	4.96E-04	344	433	26
SORL1	11_120946598	120946598	GG	TG/TT	392	74	0.95	0.08	4.96E-04	344	433	26
SORL1	rs11218347	120951758	TT	CT/CC	410	75	0.99	0.08	7.67E-04	346	432	24.8
SORL1	rs11218349	120955431	GG	AG/AA	392	75	0.96	0.08	3.77E-04	344	435	26.4
SORL1	11_120958729	120958729	TT	GT/GG	392	75	0.96	0.08	3.77E-04	344	435	26.4
SORL1	rs11218351	120958917	CC	TC/TT	410	75	0.99	0.08	7.67E-04	346	432	24.8
SORL1	rs11218352	120959108	CC	GC/GG	392	75	0.96	0.08	3.77E-04	344	435	26.4

Nach den Haplotyp Blockdefinitionen von Gabriel et al. wurde ein Haplotyp, bestehend aus 61 SNPs und einem Umfang von etwa 36kb (Chr11:120928762-120964732), gefunden, der bei einer Häufigkeit von 6,9% eine Assoziation mit Vitamin B12 Level zeigt ($p=0,0021$). In dem 3-Marker *sliding window* Ansatz konnten p-Werte beobachtet werden, die etwa bei der Hälfte derer aus den Einzelmarker Berechnungen liegen, immer in Markerkombinationen von ungefähr 8% Häufigkeit. Die signifikanten Kombinationen aus den dreier Haplotypblöcken, sind auch immer in dem 61 Marker großen Haplotyp vorhanden. Der Effekt dieser nicht unabhängigen SNPs variiert zwischen 19,3% und 26,4% Erhöhung des Vitamin B12 Level im Blut zwischen den beiden Gruppen des dominanten Modells (Tabelle 28).

5.3.2.4 *ARID5B* (AT-rich interaction domain-containing protein 5B)

Des weitern wurde der Locus um das Gen *ARID5B* untersucht, der zuvor in einer initialen Fall/Kontroll GWAS gefunden wurde (Naj et al., 2011), allerdings keiner Replikation oder Meta-Analyse stand hielt. In dieser Analyse wurden 9 SNPs gefunden die mit einer durchschnittlichen Erhöhung von 46,1% der Tau Protein Level im CSF assoziiert ist (Tabelle 29). All diese Marker zeigten höhere Tau-Konzentrationen für heterozygote und homozygote Träger des seltenen Allels (Mittelwert=637,5pg/ml CSF) verglichen mit homozygoten Trägern des häufigen Allels (Mittelwert=436.5pg/ml CSF).

Ergebnisse

Tabelle 29: Ergebnisse der ARID5B Region für Tau Protein als Endophänotyp

Locus	SNP	Position Chr10	major	hetero / minor	n major	n hetero + minor	Call-rate	MAF	p-Wert SNP	Mittel TAU [pg/ml CSF] major	Mittel TAU [pg/ml CSF] hetero+minor	% Erhöhung
ARID5B	rs2675597	63294818	GG	AG/AA	37	69	0.991	0.415	2.45E-03	422	627	48.7
ARID5B	rs2675598	63295283	AA	GA/GG	37	69	0.991	0.415	2.45E-03	422	627	48.7
ARID5B	rs2675599	63296635	GG	AG/AA	37	69	0.991	0.415	2.45E-03	422	627	48.7
ARID5B	rs1992626	63299417	GG	AG/AA	38	67	0.981	0.405	5.44E-03	431	615	42.7
ARID5B	rs746830	63302767	GG	CG/CC	31	75	0.991	0.434	8.70E-03	423	608	43.7
ARID5B	rs2675607	63303473	AA	GA/GG	31	76	1	0.435	7.37E-03	423	610	44
ARID5B	rs2675608	63305064	TT	AT/AA	31	76	1	0.435	7.37E-03	423	610	44
ARID5B	rs7909873	63358353	TT	CT/CC	65	29	0.879	0.186	3.70E-03	478	735	53.8
ARID5B	rs10821932	63361914	GG	AG/AA	68	38	0.991	0.208	8.05E-03	485	679	40.2

Ein beispielhaftes Punktdiagramm für rs7909873 ist im Anhang in Abbildung 44 gezeigt und veranschaulicht die Verteilung der Tau-Konzentrationen für die beiden Gruppen des dominanten Modells. Mit Hilfe der Haplotypanalyse konnte kein Haplotyp mit einem kleineren p-Wert als in der Einzelmarkeranalyse gefunden werden.

5.3.2.5 BIN1 (*bridging integrator 1*)

Andere untersuchte Blutparameter waren Lipidwerte, wie VLDL, LDL, HDL, Triglyzerid und Cholesterin. Es wurden Marker in der *BIN1* Region gefunden, die mit LDL und VLDL Konzentrationen assoziiert sind und in der *GOLM1* Region wurde Assoziation mit Cholesterin und Triglyzerid Konzentrationen im Blut beobachtet (5.3.2.6). 41 SNPs in der *BIN1* Region haben signifikante Assoziation mit LDL Konzentrationen gezeigt, 35 von diesen sind in perfektem LD und deuten daher auf dasselbe Signal. Eine durchschnittliche Erhöhung der LDL Konzentration von 17,5% wurde in 67 untersuchten Individuen beobachtet. Zwei weitere SNPs, die in 62 AD Patienten untersucht wurden, zeigten mit einer durchschnittlichen Erhöhung von 53% der VLDL Konzentrationen einen signifikanten Einfluss. Die durchschnittliche Erhöhung lag bei 15mg/dl auf 23.5mg/dl VLDL im Blut (Anhang, Tabelle 37). Ein Punktdiagramm ist beispielhaft für den SNP rs11694743 gezeigt (Anhang, Abbildung 45), für den der größte Unterschied (56,3%) in den VLDL Konzentrationen der beiden, nach dem dominanten Modell eingeteilten Gruppen, gefunden wurde.

In der Haplotypanalyse wurde ein Block nach den Blockdefinitionen nach Gabriel et al. gefunden, der sich über die chromosomale Region Chr2:127548281 bis 127559712 erstreckte und 55 Marker mit einer Häufigkeit von 16,4% einschloss. Für diesen Block wurde mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse mit Alter, Geschlecht und SNP als Kovariaten ein p-Wert von 0,0072 für den quantitativen Phänotyp VLDL ermittelt. In dem 3-Marker *sliding window* Ansatz wurde ein Block aus dem Markern rs11690153, rs10194375 und 2_127556817 (TCC)

gefunden, der mit einem p-Wert von 0,0012 signifikanter als die Einzelmarker war, vor allem für den SNP rs10194375 (Einzelmarker p-Wert=0,0061).

5.3.2.6 *GOLM1* (*golgi membrane protein 1*)

Die zuvor von (H. Li et al., 2008) mit Alzheimer assoziierte Region *GOLM1* konnte in den groß angelegten Meta-Studien von (Hollingworth et al., 2011) und (Naj et al., 2011) nicht repliziert werden. In unserer Studie hingegen wurden Marker gefunden, die mit Triglyzerid und Cholesterin Konzentrationen im Blut der untersuchten AD-Fälle korrelieren. Für Triglyzerid wurde bei 6 SNPs eine Veränderung der Konzentration im Blut, die sich von 24,7% bis 30,5% erstreckte, beobachtet (Tabelle 30).

Zwei weitere SNPs wurden in dieser Region gefunden, die Assoziation mit Cholesterin Konzentrationen gezeigt haben. Die Marker rs7031120 und rs11141229 zeigten einen Unterschied von 10,1% bzw. 10,4% in den beiden nach dem dominanten Model kodierten Gruppen (Tabelle 30). Punktediagramme sind beispielhaft für je einen Marker gezeigt der den größten Unterschied in Triglyzerid bzw. Cholesterin Konzentrationen zeigte (Abbildung 37).

Tabelle 30: Ergebnisse der *GOLM1* Region für Triglyzerid und Cholesterin als Endophänotyp

Locus	quanti	SNP	Position Chr9	major	hetero / minor	n major	n hetero +minor	Call-rate	MAF	p-Wert SNP	Mittel quanti [mg/dl Blut] major	Mittel quanti [mg/dl Blut] hetero +minor	% Erhöhung
GOLM1	Triglyzerid	rs11141189	87848958	GG	CG/CC	26	61	0.86	0.44	8.03E-03	146	112	30.5
GOLM1	Triglyzerid	rs7856457	87879648	GG	AG/AA	54	47	1.00	0.27	9.63E-03	129	102	25.9
GOLM1	Triglyzerid	rs7857302	87880311	GG	AG/AA	52	47	0.98	0.28	8.29E-03	130	102	27.3
GOLM1	Triglyzerid	rs4333693	87881869	CC	AC/AA	57	44	1.00	0.27	8.80E-03	128	102	24.7
GOLM1	Triglyzerid	rs2183125	87882627	AA	GA/GG	58	41	0.98	0.24	9.55E-03	128	101	25.9
GOLM1	Triglyzerid	rs6559898	87883431	CC	TC/TT	55	46	1.00	0.27	6.27E-03	129	102	27.5
GOLM1	Cholesterin	rs7031120	87859295	TT	GT/GG	55	50	1.00	0.29	3.13E-03	223	246	10.1
GOLM1	Cholesterin	rs11141229	87897539	CC	TC/TT	36	69	1.00	0.41	5.08E-03	249	226	10.4

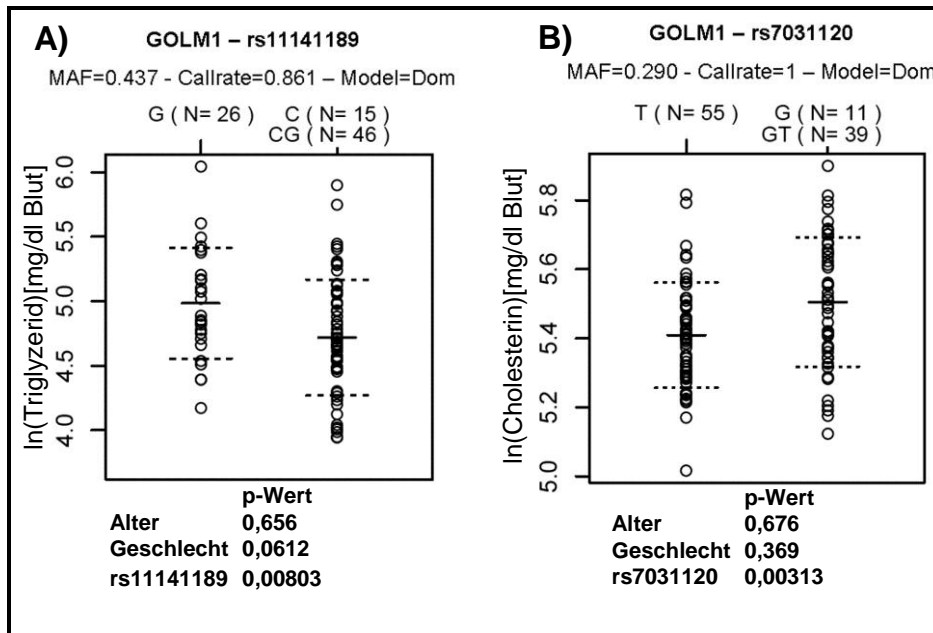


Abbildung 37: Verteilung der Triglyzerid bzw. Cholesterin Konzentration nach Genotypen

A: Punktdiagramm für den SNP rs11141189, der die Reduktion der Triglyzerid Werte zeigte. Die Gruppen sind nach dem dominanten Model in homozygote Träger des häufigen Allels (GG n=26) und heterozygote zusammen mit homozygoten Trägern des seltenen Allels (GT n=46 + CC n=15 → GT/CC n=61) eingeteilt. Linien geben den Mittelwert an und unterbrochene Linien die Standardabweichung.

B: Punktdiagramm für den SNP rs7031120, der die Erhöhung der Cholesterin Werte zeigte. Die Gruppen sind nach dem dominanten Model in homozygote Träger des häufigen Allels (TT n=55) und heterozygote zusammen mit homozygoten Trägern des seltenen Allels (GT n=39 + GG n=11 → GT/GG n=50) eingeteilt. Linien geben den Mittelwert an und unterbrochene Linien die Standardabweichung.

Durch die Haplotypanalyse konnten für Triglyzerid keine weiteren Kombinationen gefunden werden, die einen kleineren p-Wert als in der Einzelmarkeranalyse erreichten. Für Cholesterin hingegen, wurde ein 3-Marker-Haplotyp aus den SNPs rs7031120, rs12553480 and 9-87859649 erstellt, der für die GAC Kombination, welche eine Häufigkeit von 27% hat, einen p-Wert von 0,0014 hervor brachte.

5.3.2.7 CD2AP (CD2-associated protein)

Eine weitere Region die untersucht wurde ist die *CD2AP* Region, die zuvor in den bereits erwähnten Meta-Analysen gefunden wurde. Nach der Analyse mit den vorhandenen quantitativen Daten konnte eine Assoziation mit Markern dieser Region und neuropsychologischen Testergebnissen der CERAD-NP Test Batterie (Morris et al. 1988; Morris et al. 1989) gezeigt werden. Für die Tests ‘Wortliste wiedergeben’ und ‘Wortliste lernen’ wurden 104 bzw. 105 SNPs, alle in hohem Kopplungsungleichgewicht zueinander, gefunden, die einen signifikanten Einfluss haben. 99 von diesen SNPs zeigten für beide

quantitative Marker einen Einfluss, denn Patienten die Probleme haben eine Wortliste zu lernen haben in der Konsequenz auch Probleme diese ein paar Minuten später wiederzugeben. Der beobachtete Effekt bei 'Wortliste lernen' war, dass Patienten die homozygote Träger des häufigen Allels waren, im Mittel 1,3, der 10 zu lernenden Wörter, weniger in der vorgegebenen Zeit lernen können, als Träger der anderen möglichen genetischen Kombinationen. Für den Test 'Wortliste wiedergeben' konnte die Gruppe der homozygoten Träger des häufigen Allels durchschnittlich 0,49 Worte weniger wiedergeben (Anhang, Tabelle 38).

Die Marker in der untersuchten *CD2AP* Region lagen alle in hohem Kopplungsungleichgewicht zueinander, daher gibt es nach den Gabriel et al. Blockdefinitionen auch nur einen großen Block, der die gesamte Region beinhaltet. Die signifikanteste 3-Marker-Haplotyp Kombination, TTC der Marker rs2218356, 6-47634956 und 6-47634996, erreichte einen p-Wert von 0,000218, bei einer Häufigkeit von 32%, für den quantitativen Marker 'Wortliste wiedergeben'. Im Vergleich dazu brachte der SNP rs2218356, in der Einzelmarkeranalyse, einen p-Wert von 0,0079 hervor. Die gleiche 3-Marker Kombination wurde auch für 'Wortliste lernen', mit einem p-Wert von 0,00017, gefunden. Hier wurde in der Einzelmarkeranalyse ein p-Wert für den SNP rs2218356 von 0,0069 berechnet.

5.3.2.8 Übrige Regionen

Für die weiteren untersuchten Regionen (*ABCA7*, *CD33*, *CLU*, *EPHA1*, *GAB2* und *PICALM*) konnten in dieser Analyse keine Assoziationen gefunden werden.

5.3.3 Validierung des *LINGO1* Locus mit A β ₄₂ als quantitativer Marker

In dieser Studie wurde auf Basis des Fall/Kontroll Datensatzes der erweiterten GWAS, eine neue genomweite Assoziationsstudie berechnet, diesmal allerdings in einer reinen AD-Fall-Kohort. Hierbei wurde der Einfluss von SNPs auf die A β ₄₂ Konzentrationen im CSF der Patienten untersucht. Es wurde einen Locus auf Chromosom 15 identifiziert, der knapp unter dem Schwellwert für genomweite Signifikanz nach einer Bonferroni-Korrektur lag. Für die SNPs rs2682911, rs884141 bzw. rs12591110 wurden p-Werte im additiven Model von $1,10 \cdot 10^{-7}$, $1,91 \cdot 10^{-7}$ bzw. $3,08 \cdot 10^{-7}$ berechnet (Abbildung 38). Die drei Marker befanden sich *downstream* von dem Gen *LINGO1* (*Leucine-Rich Repeat Protein, Neuronal, 6A*) und zwar ca. 30,7kb, 24,3kb bzw. 1,4kb (*genome hg19, dbSNPbuild 131*). Im Folgenden wurde diese genetische Region in unabhängigen Kollektiven validiert. Dazu wurden Kollektive aus München und Schweden verwendet, die in den Abschnitten 4.1.2.5.1 und 4.1.2.5.2 genauer beschrieben sind.

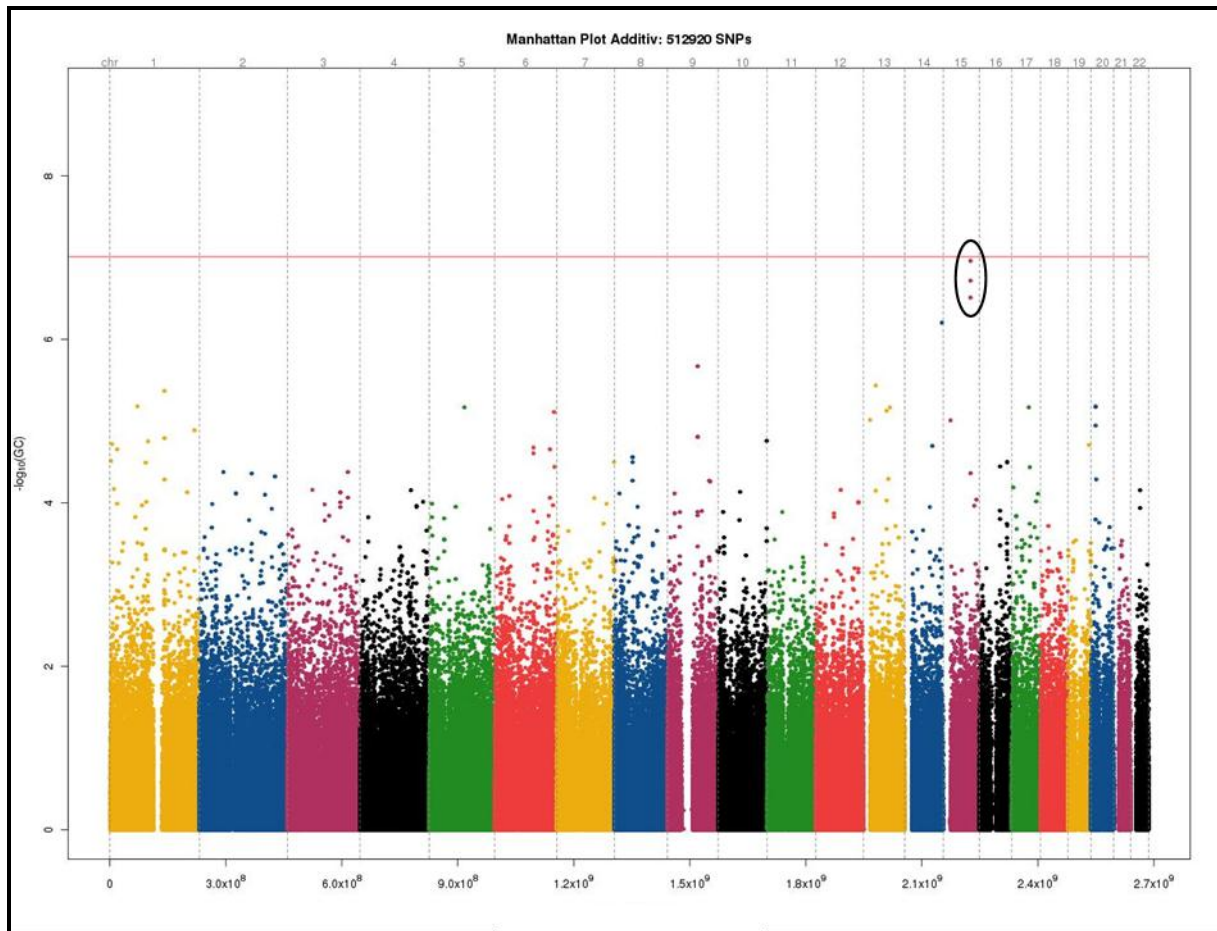


Abbildung 38: Manhattan Plot der erweiterten GWAS für den quantitativen Marker $A\beta_{42}$ im additiven Model

Dargestellt sind 512920 SNPs die nach QC übrig geblieben sind. Unterschiedliche Farben stellen die Chromosome 1 bis 22 dar und die x-Achse ist gibt die Anzahl der gesamten Basen an. Auf der y-Achse sind die p-Werte als $-\log_{10}$ angegeben, die rote Linie gibt den Schwellwert für genomweite Signifikanz nach einer Bonferroni Korrektur an, die etwa bei 10^{-7} liegt.

Der durchschnittliche Abstand zwischen den 23 untersuchten Markern betrug 3,04kb. Die Ergebnisse zu jedem SNP sind in Tabelle 31 zu finden. Die Grau unterlegten Marker sind die gleichen, die wir in unserer erweiterten GWAS gefunden haben (Abbildung 38). Der SNP rs8034247 (graue Schrift) konnte aus technischen Gründen nicht genotypisiert werden und wurde nicht für die Berechnungen herangezogen. Insgesamt wurden in den beiden Kollektiven 367 Individuen untersucht, 149 Männer und 218 Frauen. Das durchschnittliche Alter der Gesamtkohorte beträgt $71,9 \pm 8,9$ Jahre und der durchschnittliche $A\beta_{42}$ Wert liegt bei $516,9 \pm 257,6$ pg/ml. Proben, deren Genotypisierungsrate (*callrate*) unter 80% lag, wurden aus der Analyse ausgeschlossen, in diesem Fall waren es 18. Weitere Qualitätskriterien die zu einem Ausschluss geführt hätten, waren eine MAF $<0,01$ und ein HWE-p-Wert $<0,001$, dies traf auf keinen weiteren SNP zu. Die Zusammensetzung der Kohorte hat sich damit verändert, insgesamt wurden nach der QC 349 Individuen in die Analyse eingeschlossen, 139 Männer und 210 Frauen. Der Mittelwert des Alters beträgt 72,1

Ergebnisse

$\pm 8,7$ Jahre und der Mittelwert des $A\beta_{42}$ Peptids im CSF beträgt $500,2 \pm 244,2$ pg/ml, eine graphische Darstellung der Normalverteilung der $A\beta_{42}$ Werte ist in Abbildung 39 gezeigt. Eine lineare Regression wurde mit der abhängigen Größe $\ln(A\beta_{42})$ und den Einflussgrößen Alter, Geschlecht und SNP berechnet. Der Einfluss eines Markers auf den $A\beta_{42}$ Spiegel wurde in unterschiedlichen genetischen Modellen (Additiv, Dominant und Rezessiv) untersucht. Da die 23 Marker nicht unabhängig voneinander berechnet wurden, wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni angepasst ($0,05/23=0,0022$), das bedeutet, dass erst bei p-Werten unter 0,0022 eine Assoziation vorliegt. Dies war in keinem der drei Modelle für keinen der 23 SNPs der Fall.

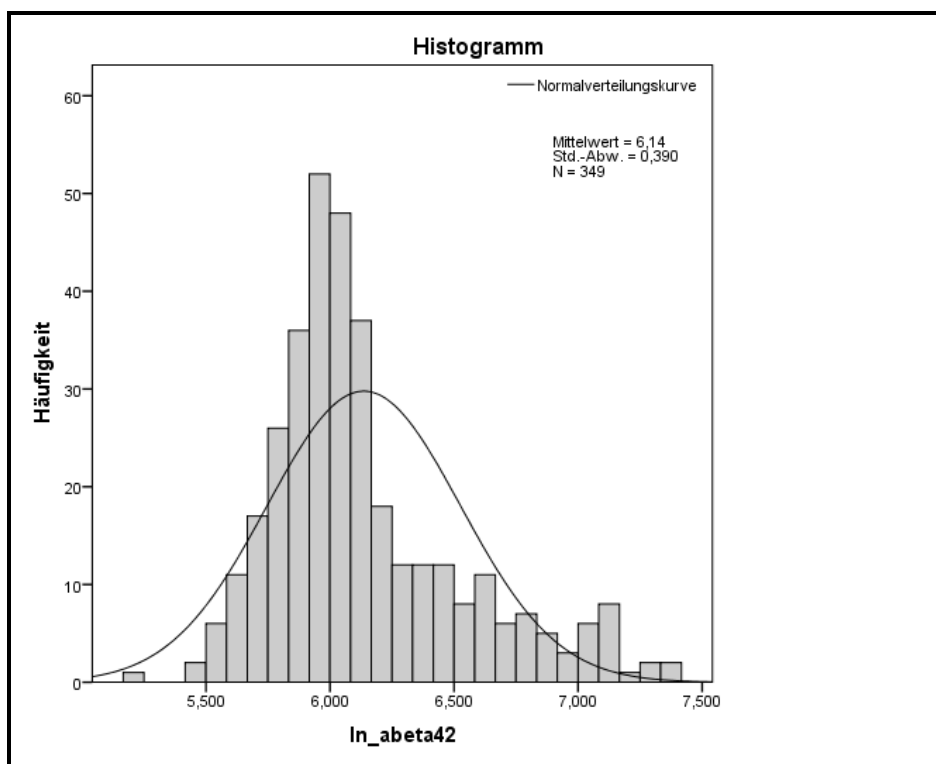


Abbildung 39: Graphische Darstellung der Normalverteilung der $A\beta_{42}$ Werte

Ergebnisse

Tabelle 31: Ergebnisse der LINGO1 Validierung

Ergebnisse der 23 SNPs die in der LINGO1 Region mittels Sequenom iPLEX Technologie genotypisiert wurden. Grau hinterlegte SNPs sind die drei, die in der erweiterten GWAS gefunden wurden. Die p-Werte wurden durch eine lineare Regression mit der abhängigen Größe $A\beta_{42}$ und den Einflussgrößen Alter, Geschlecht und SNP berechnet.

SNP	Gen	Funktion	Chr	Position	callrate	Minor Allel	MAF gesamt	HWE p	p add (Model)	p dom (Model)	p rez (Model)
rs2682911			15	77875591	0.9914	G	0.400	0.8791	0.4923	0.7007	0.4277
rs884141			15	77882123	0.9971	C	0.405	0.9345	0.4021	0.6159	0.3559
rs2667759			15	77884642	1.0000	C	0.405	0.8922	0.3474	0.5066	0.3660
rs12594829			15	77889273	0.9657	C	0.429	0.9638	0.3301	0.4087	0.4460
rs8034247			15	77894256	0.0000	NA	0.000	NA	NA	NA	NA
rs11856468	LINGO1	Downstream	15	77896786	1.0000	A	0.401	0.7220	0.3673	0.5969	0.3109
rs4886887	LINGO1	Downstream	15	77898203	0.9971	T	0.265	0.8943	0.5175	0.1953	0.3604
rs11636780	LINGO1	Downstream	15	77903077	1.0000	T	0.269	0.8374	0.6329	0.2306	0.2638
rs12591110	LINGO1	Downstream	15	77904944	1.0000	A	0.407	0.5090	0.5080	0.6836	0.4723
rs2271396	LINGO1	Exon	15	77907535	1.0000	C	0.316	0.6010	0.7836	0.5082	0.6369
rs2271397	LINGO1	Exon	15	77907775	1.0000	T	0.316	0.6010	0.7836	0.5082	0.6369
rs883669	LINGO1	Intron	15	77910095	0.9971	G	0.333	0.1891	0.8939	0.7150	0.7884
rs11856978	LINGO1	Intron	15	77913171	1.0000	G	0.116	0.4926	0.3875	0.6386	0.1136
rs8024932	LINGO1	Intron	15	77915282	0.9971	G	0.122	0.3611	0.2434	0.4745	0.0690
rs9920132	LINGO1	Intron	15	77921042	0.9943	A	0.036	0.3937	0.6202	0.4151	0.1845
rs1877298	LINGO1	Intron	15	77923072	1.0000	G	0.059	0.2324	0.4001	0.4001	NA
rs13329256	LINGO1	Promoter	15	77926260	1.0000	A	0.052	0.2965	0.2232	0.2232	NA
rs11630768	LINGO1	Promoter	15	77929950	1.0000	C	0.052	0.2965	0.2232	0.2232	NA
rs16969027	LINGO1	Promoter	15	77930952	0.9971	G	0.052	0.2957	0.2296	0.2296	NA
rs11633639	LINGO1	Promoter	15	77931924	0.9971	C	0.050	0.3097	0.2040	0.2040	NA
rs11072660			15	77935992	0.9971	G	0.476	0.9176	0.7381	0.4077	0.7462
rs9806280			15	77937552	0.9971	C	0.052	0.2957	0.4084	0.4084	NA
rs11634778			15	77945548	1.0000	C	0.116	0.2561	0.3463	0.3083	0.8636

6 Diskussion

6.1 Validierung der Top 11 Gene von AlzGene

Durch die Einführung von Techniken, die es erlauben hunderttausende SNPs über das gesamte Genom gleichzeitig zu analysieren, ist die genetische Forschung bestens gerüstet um den genetischen Beitrag zu komplexen Erkrankungen, in einer noch nie dagewesenen detaillierten Auflösung, zu bestimmen. Unsere Studie war zu der Zeit der Durchführung eine der ersten GWAS im Alzheimer Bereich (Feulner et al. 2010; Grupe et al. 2007; Li et al. 2008; Reiman et al. 2007). Nach unserem Wissen, war sie die Erste für eine deutsche AD Population, die Erste die populationsbasierte Kontrollen benutzt hat und die Erste, die mit Illumina Technologie durchgeführt wurde. Ein Vorteil von populationsbasierten Kontrollen ist, dass sie im Rahmen unseres Forschungsnetzwerkes (NGFN, Nationales Genom-forschungsnetz) bereits von anderen Forschungsgruppen genotypisiert sind (Krawczak et al. 2006; Wichmann et al. 2005) und jedem Mitglied zur Verfügung stehen. Populationsbasierte Kontrollen sollen einen unverfälschten Durchschnitt einer Population widerspiegeln, daher können sie als Kontrollen für Assoziationsstudien unterschiedlichster Krankheiten herangezogen werden.

Ein Nachteil bei der Verwendung von populationsbasierten Kontroll-Kohorten besteht in den Unterschieden des durchschnittlichen Alters, denn meist ist die Kontrollgruppe deutlich jünger, als die AD-Fall Gruppe. Daher ist es möglich, dass sich potentielle AD-Fälle in der Kontrollgruppe befinden, die eine genetische Disposition tragen, AD zu entwickeln, aber noch zu jung sind und AD noch nicht ausgebrochen ist. Dies kann man allerdings auch als Vorteil sehen, denn die berechneten Assoziationen sind in diesem Fall aussagekräftiger. Die AlzGene Datenbank, in der bereits einige GWAS zu AD publiziert sind und kontinuierlich weitere dazukommen, stellt ein wichtiges Werkzeug für die Ermittlung von Alzheimer Kandidatengenen dar. Es ist interessant zu erwähnen, dass zum Zeitpunkt unserer Studie (Mai 2008) vier der Top zehn Risikogene durch GWAS identifiziert wurden (Grupe et al. 2007; Li et al. 2008; Reiman et al. 2007). Des Weiteren wurde starke Assoziation von Varianten, die in hohem LD zu dem *APOE* ϵ 4 Haplotyp liegen, ebenfalls durch GWAS gefunden. Dazu gehört das Gen *TOMM40*, das auch in unserer Studie Assoziation mit AD zeigt, allerdings konnten wir den exakten SNP (rs157581), über den bereits zuvor berichtet wurde (Grupe et al., 2007) nicht identifizieren. In unserer GWAS waren es die SNPs rs157580 und rs2075650 für die wir

starke Assoziation mit AD berechnen konnten. Diese beiden SNPs liegen in sehr dichter physikalischer Nähe zu rs157581, vor allem rs157580, bei dem der Abstand nur 448bp beträgt.

Wie erwähnt, konnte das zuvor starke Assoziationssignal zwischen AD und Markern in und um den *APOE* Locus durch unsere Studie validiert werden, dies war nicht der Fall für alle anderen zehn untersuchten Gene. Nur für acht der zehn Gene konnten nominell signifikante Assoziationen mit AD gezeigt werden (Tabelle 32), meistens durch andere SNPs als die, die zuvor auf AlzGene berichtet wurden.

Tabelle 32: Zusammenfassung der Top 11 Kandidatengene

Gezeigt sind die Kandidatengen Loci, die Größe der analysierten Region und die Anzahl der analysierten SNPs, sowie die Anzahl der nominell signifikanten SNPs.

Locus	Chromosom	Locus Start [bp] (NCBI36 hg18)	Locus Stop [bp] (NCBI36 hg18)	Locus Größe [bp]	analysierte SNPs	nominell Signifikant
APOE/TOMM40	19	50 064 799	50 180 407	115 608	18	11
GAB2	11	77 576 745	77 835 049	258 304	27	0
CHRNA2	1	152 772 510	152 849 594	77 084	16	4
CH25H	10	90 921 582	90 991 106	69 524	30	2
PGBD1	6	28 323 425	28 412 548	89 123	28	3
LMNA	1	154 312 597	154 412 842	100 245	14	5
CST3	20	23 526 189	23 592 387	66 198	16	1
PCK1	20	55 538 936	55 609 940	71 004	34	3
ACE	17	58 743 676	58 983 808	240 132	27	0
MAPT	17	41 300 889	41 496 568	195 679	25	5
SORL1	11	120 774 936	121 038 211	263 275	50	5

Die zehn untersuchten Gene können in zwei Gruppen unterteilt werden, zum einen die, bei denen Assoziation zu AD durch klassische hypothesen-basierte (Kandidatengen-Ansatz) Fall/Kontroll Studien gefunden wurde und zum anderen die, die Risikogene durch GWAS identifiziert haben. Sechs der von uns untersuchten Gene fallen in die erste Kategorie und von diesen konnten wir *MAPT*, *CH25H*, *CHRNA2* und *SORL1* mit nominell signifikanter Assoziation zu AD zeigen. Durch unsere GWAS war es nicht möglich die beiden Haplotypen H1 und H2 des *MAPT* Gens zu bestimmen, aber die stärkste Assoziation zu AD konnte durch den Marker rs1467967 der in dem Haplotyp H1c liegt gezeigt werden. Vor einiger Zeit wurde bekannt, dass der *MAPT* Locus an der Symptomatik der Alzheimer Krankheit beteiligt ist, da neuro-fibrilläre *tangles* zusammen mit Plaques die charakteristische Symptomatik der Alzheimer Krankheit ausmachen. Die Ergebnisse unserer Studie unterstützen die Hypothese, die auch schon durch andere Studien aufgestellt wurde (Laws et al. 2007; Myers et al. 2007), dass Varianten des *MAPT* Locus mit der sporadisch auftretenden Form der Alzheimer Krankheit assoziiert sind.

Das Gen *SORL1*, das zu der Zeit der Studie bei AlzGene noch nicht in der Top 10 Risikolocus Datenbank gelistet war, wurde damals von verschiedenen Arbeitsgruppen analysiert (Rogaeva et al. 2007; Bettens et al. 2008; Lee et al. 2007). Die Ergebnisse deuteten immer wieder darauf hin, dass *SORL1* eine Rolle bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit spielen könnte, daher wurde dieses Gen in unserer Studie ebenfalls untersucht. *SORL1*, das für ein Protein kodiert, welches an der Regulation der Prozessierung und am Transport von *APP* beteiligt ist, ist aufgrund dieser Funktion ein interessantes Kandidatengen. Insgesamt wurden 50 SNPs in dieser Region untersucht, 40 davon lagen in dem Gen selbst. *SORL1* ist auch das Gen, das in einer Meta-Analyse auf AlzGene mit der größten Anzahl von SNPs untersucht wurde. Zwei der zehn SNPs bei denen ein direkter Vergleich unserer Daten, zu denen aus der Meta-Analyse auf AlzGene, möglich war, zeigten leichte Assoziationsignale in unserer GWAS. Indirekte Analyse der restlichen Marker, durch die Erstellung von zwei-Marker-Haplotypen aus den jeweils flankierenden SNPs, brachte keine weiteren Assoziationsignale. Für drei SNPs, die nicht auf AlzGene genannt werden, konnten wir nominell signifikante Assoziation zu AD feststellen. Diese Daten benötigen jedoch noch weitergehende Validierungen. Im Vergleich zu vorherigen Studien (Bettens et al. 2008; Kölsch et al. 2009; Lee et al. 2007; Rogaeva et al. 2007) zeigen unsere Daten lediglich moderate Krankheitsassoziationen für *SORL1*.

Das *CHRNA2* Gene wurde zur Zeit der Studie auf Platz drei der AlzGene Datenbank geführt. Dieses Gen, das für den *neuronal nicotinic acetylcholine* Rezeptor kodiert, wurde zuvor in einer einzigen Studie (Cook et al. 2004) als mit Alzheimer assoziiert berichtet. Dieses Ergebnis konnte allerdings nicht in anderen Kohorten repliziert werden. In unserer Studie konnten wir durch indirekte Analyse, eines zwei-Marker-Haplotyp, ebenfalls keinen, mit AD assoziierten, SNP identifizieren. Ein Grund hierfür könnte die LD-Struktur dieser Region sein, da die SNPs teilweise in niedrigem LD zueinander liegen, auch die, der beiden Marker des Zwei-Marker-Haplotyps ($D' = 0,18$). Obwohl kein Signal in dem *CHRNA2* Gen selbst gefunden wurde, konnten wir in unserer Studie Assoziation in drei Genen, die in der direkten Umgebung von *CHRNA2* liegen, finden. Dazu gehört ein funktioneller SNP, der in Exon 9 des *TDRD10* Gens liegt und einen Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin an Position 101 der Aminosäurekette verursacht. Die funktionelle Relevanz dieses AS Austausches sollte auf Proteinebene systembiologisch genauer analysiert werden.

Ähnliches gilt für das Gen *CH25H*, das für *cholesterol-25-hydroxylase* kodiert. Der einzige SNP mit einer signifikanten Assoziation in der Meta-Analyse, rs13500, konnte in unserer Studie nur indirekt betrachtet werden, zeigte aber keine Assoziation. Schwache Assoziation

konnte jedoch für einen SNP *downstream* von *CH25H*, in dem *LIPA* Gen, gefunden werden. Signifikante Assoziation zu AD wurde bis dato für das *LIPA* Gen noch nicht beschrieben. Ein SNP zeigte in der Meta-Analyse von AlzGene kein signifikantes Signal (Riemenschneider et al., 2004), dieser SNP liegt etwa 25kb entfernt von dem, den wir in unserer Studie als nominell signifikant assoziiert gefunden haben. Zusätzliche SNPs in dem *LIPA* Gen die auf der AlzGene Seite verfügbar waren, aber noch keiner Meta-Analyse unterzogen wurden, konnten ebenfalls nicht in unserer Studie validiert werden.

Das siebte und neunte Gen auf der Top Liste von AlzGene, *CST3* bzw. *ACE*, erreichte keine Assoziationssignale, weder im direkten, noch im indirekten Vergleich zu unseren Daten. Allerdings gab es eine Ausnahme, der SNP rs16985615 in der intergenischen Region 15kb *upstream* von *CST3*.

Vier der untersuchten Gene fallen in die zweite, zuvor erwähnte, Kategorie (durch GWAS identifiziert). Von allen 13 SNPs in diesen vier Genen, die durch eine Meta-Analyse untersucht wurden, befinden sich lediglich drei auf dem von uns verwendeten *Sentrix HumanHap550 Genotyping BeadChip* (rs4945261 – *GAB2* / rs3800324 – *PGBD1* / rs8192708 – *PCK1*). Die publizierten Assoziationen konnten durch unsere GWAS nicht validiert werden. Trotzdem zeigten alle vier Gene eine gewisse Assoziation zu AD, allerdings nicht für die zuvor berichteten Marker und in den meisten Fällen nur mit kleinem Effekt.

Im Falle des *GAB2* Gens, ursprünglich von (Reiman et al., 2007) als assoziiert mit AD gefunden, war ein direkter Vergleich möglich, führte aber zu keinem Assoziationssignal, genau wie für den indirekten Vergleich. Die Haplotypanalyse brachte einen Block über das gesamte Gen hervor, der leichte Assoziation mit AD zeigte ($p=0,037$; Abbildung 9). Dieses Signal konnte, auf einen zwei-Marker-Haplotyp der durch die SNPs rs2511175 und rs1981405 definiert ist, genauer eingegrenzt werden. Dieser Block liegt 14kb *downstream*, von dem zuvor publizierten SNP rs4945261 und 9kb *upstream*, von dem ebenfalls zuvor publiziertem SNP rs2510038. Aufgrund der LD-Struktur und der Anzahl der untersuchten SNPs in unserer Studie (Abbildung 9), scheint es unwahrscheinlich, dass wir ein zusätzliches Signal nicht detektieren konnten. Insgesamt deuten unsere Daten für *GAB2* daher nur auf ein minimales Risiko für AD in der deutschen Population hin.

Für die übrigen drei Gene, *PGBD1*, *PCK1* und *LMNA* wurde auch ein Einfluss auf AD berichtet (Grupe et al., 2007), allerdings nur für je ein SNP pro Gen. Von diesen drei SNPs wurden in unserer Studie zwei (*PGBD1* und *PCK1*) ebenfalls analysiert, konnten aber nicht repliziert werden (rs3800324 (*PGBD1*) $p=0,99$; rs8192708 (*PCK1*) $p=0,24$). Im Falle von *PGBD1* wurden ähnliche Genotypfrequenzen, wie zuvor, beobachtet. Dieser SNP war in einer

Meta-Analyse von fünf Studien signifikant mit AD assoziiert (Grube et al., 2007), allerdings nur in einer der fünf Studien brachte er allein ein Risiko hervor. Dies könnte bedeuten, dass die statistische Power in unserem Kollektiv nicht ausreichend vorhanden war um eine Assoziation zu finden. Mit einem deutlich größeren Fall/Kontroll Kollektiv hätten wir die Assoziation wahrscheinlich ebenfalls detektiert. Dafür spricht, dass die Allelfrequenzen von Fällen gegenüber Kontrollen sehr ähnlich zu denen von (Grube et al., 2007) waren. Wir konnten drei andere SNPs mit nominell signifikanter Assoziation zu AD, einer in unmittelbarer Nähe (weniger als 1kb *upstream*) zu rs3800324, identifizieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass *PGBD1* weiter untersucht werden sollte, um die genaue Funktion in AD heraus zu finden. Dies ist aufgrund der spezifischen Expression im Gehirn besonders interessant. Für das *PCK1* Gen konnte die zuvor berichtete Assoziation ebenfalls nicht bestätigt werden, nichts desto trotz konnten wir neue Signale für diesen Locus finden. Ein Signal, das gefunden wurde, ist der SNP rs17411904, der im Promotorbereich liegt. Des Weiteren konnte einen Haplotypblock, der im Bereich des Promotors liegt und den SNP rs17411904 beinhaltet als signifikant mit AD assoziiert finden (Abbildung 21). Gerade die Promotor Region des *PCK1* Gens war zuvor mit Typ 2 *Diabetes Mellitus* (Cao et al., 2004) in Verbindung gebracht worden und ist daher ein vielversprechender Kandidat für weitere Untersuchungen aufgrund der epidemiologischen Verbindung von *Diabetes Mellitus* und AD (Arvanitakis, Wilson, & Bennett, 2006).

Für die Ergebnisse des *LMNA* Gens sieht es ähnlich wie für die zuvor beschriebenen Gene aus (*CHRNA2*, *CH25H*, *PGBD1*, *LMNA*, *CST3* und *PCK1*). Hier konnten die originalen Assoziationssignale nicht repliziert werden, aber neue Signale in der entsprechenden Region detektiert werden. Wie bei *PCK1* war auch bei *LMNA* die Assoziation in der Promotor Region zu beobachten. Ein Haplotyp im Bereich des Promotors gab die stärkste Assoziation unserer Studie (Abbildung 17). Veränderungen in *LMNA* werden mit einigen Krankheiten in Verbindung gebracht (z.B. *Lipodystrophie* (Decaudain et al., 2007) oder das *Hutchinson–Gilford Progeria Syndrom* (Moulson et al., 2007; Reddel & Weiss, 2004)).

Weblink 8: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/150330>

Die genaue Funktion in AD wurde bislang aber noch nicht untersucht. Da die einzigen Studien zu *LMNA* und AD GWAS sind und die Abstände der Marker zueinander relativ groß sind, sollten weitere Studien mit höherer Markerdichte durchgeführt werden, um die Assoziationssignale zu bestätigen und weiter einzugrenzen.

Zusätzlich zu dem *APOE* Locus konnten wir mir unserer GWAS, für eine deutsche Population, nominell signifikante Assoziationen zu AD in sechs der zehn Kandidatengene

nachweisen. Hauptsächlich in anderen SNPs als die, die zuvor von anderen Gruppen identifiziert wurden. Der Hauptgrund dafür ist, dass GWAS nicht alle SNPs einschließen können und sich auf die beschränken müssen, die die beste Abdeckung des Genoms liefern (*taggingSNPs*). Im Falle der Illumina Plattform, die für unsere Studie benutzt wurde, zeigten Studien, dass hierbei eine etwas bessere Abdeckung vorliegt, als bei der anderen für GWAS in AD benutzten Genotypisierungsplattform von Affymetrix (Wollstein et al., 2007). Ungeachtet dessen, erreichten SNPs die auf AlzGene durch GWAS identifiziert wurden mehr Assoziationssignale in unserer Studie, als solche, die durch einen Kandidatengen basierten Fall/Kontroll Ansatz gefunden wurden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass unser Vergleich der elf bis dato bekannten Risikoloci durch eine GWAS in einer deutschen Kohorte über 50% der zuvor publizierten Risikoloci identifizieren konnte. Gleichzeitig bedeutet es aber auch, dass eine Replikation und Validierung in unterschiedlichen Populationen nötig ist, um diese Ergebnisse zu bestärken. Hinzu kommt, dass bislang für diese Gene noch keine kausalen Varianten entdeckt wurden und die Assoziationssignale daher von der populationsbedingten LD-Struktur kommen könnten. Auch ein Vergleich der Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Plattformen könnte zu einer Identifizierung neuer Assoziationssignale führen. Unsere Studie zeigt also, dass GWAS, unabhängig von der Plattform, ein gutes Werkzeug zur Identifizierung von genetischen Varianten bei komplexen menschlichen Erkrankungen, wie AD, sind.

6.2 Kandidatengenansatz für *TACR2*

Dadurch, dass das Gen *TACR2* (Tachikinin Rezeptor 2) in einer zuvor beschriebenen Kopplungsregion auf Chromosom 10 liegt (Ertekin-Taner et al. 2000; Myers et al. 2000) und zusätzlich stark im Gehirn exprimiert ist, auch im medialen Septum / diagonalen Band (MSDB), das bekannt ist cholinergen und GABAergen Neuronen, die Projektionen zum Hippocampus zu senden, wurde diese Region näher untersucht. Atrophie der septohippocampalen cholinergen Neuronen des MSDB wurde zuvor schon mit neurodegenerativen Erkrankungen wie AD beschrieben (Morozova, Wu, Dumalska, & Alreja, 2008). Es wurde ferner beschrieben, dass in Ratten intraseptale Verabreichung von *TACR2* Agonist bzw. Antagonist die hippocampale Acetylcholin-Ausschüttung erhöht bzw. blockiert (Desvignes et al., 2003). Daher repräsentiert der *TACR2* Locus nicht nur ein positionellen, sondern auch einen funktionellen Locus der an dem Risiko einer möglichen Alzheimer Erkrankung beteiligt sein könnte.

Das von uns benutzte Fall/Kontroll Kollektiv sowie die genauen Ergebnisse sind in Abschnitt 4.1.2.2 bzw. 5.2 beschrieben. Die LD-Struktur der 13 genotypisierten SNPs zeigte hohe r^2 Werte, mit Ausnahme des SNPs rs12250793, der allerdings nicht informativ war, aufgrund der niedrigen *minor* Allel-Frequenz von 0,2%. Der Marker rs3793853 lag, im Vergleich zu der HapMap LD-Struktur dieser Region (Abbildung 28 und Abbildung 29), in der direkten Nähe eines Rekombinations-Hot-Spots, erkennbar an den sehr niedrigen r^2 und D' Werten. Da die LD-Struktur die wir für unser Kollektiv beobachtet haben sehr ähnlich zu der des HapMap- Kollektives war, war es eher unwahrscheinlich, dass wir einen kausalen Marker, den wir nicht direkt genotypisiert haben, übersehen haben. Aufgrund des hohen LD in dieser Region hätten wir ein Signal bei einem direkten Nachbarn einer kausalen Variante, die wir nicht genotypisiert haben, erwarten können. Eine Power-Analyse zeigte, dass wir für ein Signifikanzlevel von $\alpha=0,05$ eine Power von 91% hatten um einen Risikoallel mit einer Frequenz von 15% und einem relativen Risiko von 1,6 zu finden. Nimmt die statistische Power aufgrund niedrigerer *minor* Allel-Frequenzen ab, kann eine mögliche Assoziation dieser selteneren Varianten mit AD nicht ausgeschlossen werden und war für uns in diesem Fall nicht detektierbar. Zusammenfassend kann man sagen, dass der von uns verfolgte Kandidatengenansatz kein Indiz dafür liefert, dass häufige Varianten in der *TACR2* Region zu dem Risiko der Alzheimer Krankheit beitragen. Aufgrund der limitierten Anzahl untersuchter AD Fälle schließt unsere Studie die Beteiligung von selteneren Varianten an der Pathogenese von Neurodegeneration in der Alzheimer Krankheit jedoch nicht aus.

6.3 Fall/Kontroll Ansatz in internationalen Konsortien

Durch die GERAD+ Studie eines europäischen Konsortiums wurden neue Risikoloci, die mit der Alzheimer Krankheit assoziiert sind, gefunden, die in mehreren unabhängigen Fall/Kontroll Kollektiven repliziert wurden (Abbildung 31). Ein Locus liegt in dem *ABCA7* Gen (*ATP-binding cassette, sub-family A, member 7*) und der assoziierte Marker rs3764650 liegt im Intron 13 diese Gens. Dieser SNP zeigte sehr niedriges LD zu benachbarten SNPs und war daher auch der einzige SNP der in dieser Region aus der ersten Stufe der Meta-Analyse hervorging. Da dieser SNP in einem Intron liegt und daher nicht relevant für das Protein ist, dass durch das *ABCA7* Gen kodiert wird, wurde nach einem funktionellen Marker in dieser Region gesucht, der mit dem assoziierten SNP im LD liegt. Dieser funktionelle Marker könnte der SNP rs3752246 in Exon 32 des Gens ($r^2=0,36$, $D'=0,89$) sein, welcher ein Aminosäure-Austausch (G1527A) auf Proteinebene erzeugt. Der Austausch ist allerdings

unkritisch und daher ist es unwahrscheinlich, dass dies die funktionell relevante Variante ist (Adzhubei et al., 2010). Auch die Analyse des SNPs rs3764650 auf die Expression des *ABCA7* Gens in anderen zuvor veröffentlichten Expressionsdatensätzen (J. R. Gibbs et al., 2010; Stranger et al., 2005) brachte keine Assoziation, daher sind weitere Analysen erforderlich um die funktionelle Variante dieses Locus zu identifizieren.

ABCA7 zeigt starke Expression im Gehirn, vor allem in den hippocampalen CA1 Neuronen (Woojin Scott Kim et al., 2005) und in Mikroglia Zellen (Woojin S Kim, Guillemain, Glaros, Lim, & Garner, 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *ABCA7* die Prozessierung von *APP* beeinflusst und die β -Amyloid Sekretion in *APP* überexprimierten Zellen hemmt (Jehle et al., 2006). Daher scheint *ABCA7* auch ein funktionell relevantes Gen zu sein, das an der Alzheimer Krankheit beteiligt sein könnte.

Die Gene des *MS4A* Clusters auf Chromosom 11 haben eine ähnliche genomische Struktur wie die anderen Gene dieser Familie, einschließlich der Transmembrandomänen, was darauf hindeutet das sie zu einer Familie von Zelloberflächen Proteinen gehören (Liang et al. 2001). *MS4A2* kodiert für die β -Untereinheit von IgE Rezeptoren (Kinet et al., 1988). Die übrigen Gene in dem zuvor beschriebenen LD-Block haben keine bekannten Funktionen.

CD33 gehört zur Familie der N-Acetylneuraminsäure-Bindenden-Immunglobulin-ähnlichen-Lektine, von der angenommen wird, dass die Zell-Zell-Interaktionen unterstützt und Funktionen von Zellen des angeborenen und erlernten Immunsystems reguliert (Crocker, Paulson, & Varki, 2007). Die meisten Mitglieder dieser Familie, einschließlich *CD33*, fungieren als endozytische Rezeptoren, die durch einen Mechanismus, unabhängig von Clathrin, Endozytose vermitteln (Tateno et al., 2007).

CD2AP ist ein Ankerprotein (Dustin et al., 1998), welches sich mit Cortactin, ein Protein das an der Regulation von rezeptorvermittelter Endozytose beteiligt ist, verbindet (Lynch et al., 2003). Es ist auffällig, dass diese beiden neuen Prädispositionsgene für Alzheimer und die zuvor identifizierten Gene, *PICALM* und *BINI* alle an Zell-Zell-Kommunikation oder Transduktion von Molekülen durch die Zellmembran beteiligt sind.

EPHA1 gehört zur Unterfamilie der Ephrin-Rezeptoren. Ephrine und Ephrin-Rezeptoren sind Membran gebundene Proteine, die bei der Zell- und Axon-Leitung, sowie in der synaptischen Entwicklung und Formbarkeit eine Rolle spielen (Lai & Ip 2009). *EPHA1* ist hauptsächlich in Epithelgewebe exprimiert (Coulthard et al., 2001), wo es die Zell- morphologie und -motilität reguliert (Yamazaki et al., 2009).

Diese Studie hat Varianten von *ABCA7* und dem *MS4A* Gen Cluster identifiziert, die durch Replikationen in zahlreichen unabhängigen Fall/Kontroll Kohorten mit Alzheimer assoziiert sind. Des Weiteren konnten auch die Loci *CD33*, *CD2AP* und *EPHA1* mit genomweiter Signifikanz, als mit Alzheimer assoziiert, identifiziert werden, wenn sie mit den Daten von (Naj et al., 2011) zusammen analysiert werden. Im Falle von *BINI* und *CRI* sind weitere Replikationen erforderlich, da für diese beiden Loci nur ein Trend festgestellt wurde, der einer Korrektur für multiples Testen nicht standhalten konnte. Interessant an den Ergebnissen ist auch, dass die Loci *CLU*, *CRI*, *ABCA7*, *CD33* und *EPHA1* mutmaßlich an Funktionen des Immunsystems beteiligt sind. Die Loci *PICALM*, *BINI*, *CD33* und *CD2AP* sind an Prozessen der Zellmembran und der Endozytose beteiligt. *APOE*, *CLU*, *ABCA7* spielen bei der Lipid Prozessierung eine Rolle (Hollingworth et al., 2011). Es ist denkbar, dass diese Prozesse eine entscheidende Rolle bei der Neurodegeneration und A β -Beseitigung aus dem Gehirn spielen könnten. Daher bieten diese Ergebnisse neue Ansätze für gezielte Studien zum weiteren Verständnis der Pathogenese der Alzheimer Krankheit.

6.4 Kandidatengenanalyse – quantitative Marker

In dieser Studie wurden genetische Regionen, der neu identifizierten Risikoloci, und deren Einfluss auf bekannte klinische Endophänotypen der Alzheimer Krankheit untersucht. Diese Studie ist grundsätzlich unterschiedlich zu den wesentlich größeren und heterogenen Fall/Kontroll Ansätzen durch die diese neuen Risikoloci identifiziert wurden. In der hier vorgestellten Studie wurden ausschließlich Patienten untersucht von denen klinische Daten zum Endophänotyp vorhanden waren. Die quantitative Natur der beobachteten Parameter zeigt nur individuelle Aspekte des Phänotyps der komplexen Alzheimer Krankheit, allerdings durch Imputation in einer höheren Auflösung. Daher erklären die Daten dieser Studie nicht die original SNP- Assoziationen, die in den zuvor durchgeführten großen Fall/Kontroll Meta-Analysen gefunden wurden. Vielmehr ist sie eine völlig unabhängige Studie, die funktionelle Eigenschaften der AD Risikoloci untersucht. Es ist also möglich, dass SNPs die in der vorliegenden Studie mit Endophänotypen assoziiert werden konnten, eher in niedrigem LD und in einer gewissen Entfernung zu den zuvor mit AD assoziierten SNPs sind.

Es wurden Hinweise gefunden, dass Varianten in *CRI*, *SORLI* und dem *MS4A* Gen Cluster einen signifikanten Einfluss auf die A β ₄₂-Konzentration im CSF von Alzheimer Patienten haben. Für *SORLI* wurden zusätzlich vier SNPs gefunden, die signifikant mit der Vitamin B12 Konzentration im Blut assoziiert waren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Lipid

Parameter wie VLDL, LDL, Triglyzerid und Cholesterin Konzentrationen, Unterschiede in Abhängigkeit von SNPs der Gene *BINI* und *GOLM1* zeigten. Auch für das Tau Protein wurde eine Assoziation mit Markern der *ARID5B* Region gefunden. Für neuropsychologische Tests, wie das Erlernen und spätere Wiedergeben einer 10 Worte langen Liste, wurden zahlreiche Marker der *CD2AP* Region gefunden, die einen Einfluss auf diese Parameter zeigten.

Es gibt also begründeten Verdacht, dass die hier vorgestellten Ergebnisse helfen könnten die pathogenen Mechanismen, die einen Einfluss auf die Entwicklung der Alzheimer Krankheit haben, weiter aufzuklären. Die CSF Marker Proteine, wie beispielsweise Tau und A β ₄₂, werden herangezogen um den Fortschritt der Neurodegeneration zu ermitteln. Einige frühere Studien konnten keine Assoziation mit A β ₄₂ Konzentrationen und Markern vor allem der *CRI* Region nachweisen (Schjeide et al. 2011; Brouwers et al. 2011). In diesen Studien wurden allerdings nur die initial gefundenen SNPs untersucht (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011). Eine Gruppe hat allerdings einen Vier-Marker Haplotyp identifiziert, bei dessen Markernkombination immer das seltene Allel mit einem signifikanten Anstieg der A β ₄₂ Konzentration gefunden wurde (Brouwers et al. 2011).

Für *CRI* gibt es einige Arbeiten, die die potentielle Rolle diese Genes bei der Alzheimer Krankheit beschreiben (Khera & Das, 2009). *CRI* ist das wichtigste Rezeptor Protein für das Komplement C3b Protein, ein Schlüsselprotein bei inflammatorischen Prozessen der Alzheimer Krankheit. Es ist berichtet, dass die Aktivierung des Komplement-Rezeptor-Systems während der Neuroinflammation eine Schlüsselrolle pathologischer Prozesse im Alzheimer Hirn spielt (Brouwers et al. 2011; Eikelenboom et al. 2006; McGeer et al. 2005). Bereits gezeigt werden konnte, dass fibrilläre A β -Peptide die Komplement-Kaskade aktivieren und kovalent an C3b binden, daher wird vermutet, dass *CRI* an dem A β Abbau im menschlichen Gehirn beteiligt ist (Webster et al. 1997; Bradt et al. 1998; Rogers et al. 1992). Weiterhin fungiert *CRI* als Regulator des Komplement Systems und kann die Komplement Aktivität im Gehirn hemmen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Marker aus der proximalen Region des *CRI* Gens, die sowohl den Promoter, als auch das erste Intron überspannen, einen Effekt auf die A β -Konzentration haben. Es wurden sowohl Einzelmarker, als auch eine Haplotyp-Kombination gefunden, die eine signifikante Assoziation mit der A β ₄₂-Konzentration zeigte. Der exakte Mechanismus hinter dieser Assoziation bleibt unklar, aber es ist vorstellbar, dass die Expression des *CRI* Gens beeinflusst wird. Weitere Untersuchungen dieser Hypothese sind allerdings notwendig.

Das *MS4A* Gen Cluster ist eine genomische Region die neun Membran überspannende Gene beinhaltet. In den zuvor durchgeführten Meta-Studien wurde Assoziation für den SNP rs4938933, der in der Nähe des *MS4A4A* Gens liegt, gefunden. Die vorliegende Studie untersuchte die gesamte Region auf Assoziation mit klinischen Markern. Für das *MS4A4A* Gen konnte nur moderate Assoziation beobachtet werden, allerdings wurde für das Gen *MS4A1* ein signifikanter Einfluss auf die A β ₄₂-Konzentration im CSF gefunden.

Das *MS4A1* Gen kodiert für ein B-Lymphozyten Oberflächenmolekül, welches eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen in Plasma-Zellen spielt. Es ist beteiligt an Prozessen der Immunantwort und daher hauptsächlich im Blut aber auch im Gehirn exprimiert. Das Protein, das aus dem *MS4A12* Gen exprimiert wird, ist ein Zelloberflächenprotein, das hauptsächlich an der apikalen Membran von Colonozyten zu finden ist. Die Verbindung zu spezifischen AD Parametern, wie A β ₄₂, ist unklar und bis dato wurde von keiner anderen Studie eine Verbindung zwischen Genen des *MS4A* Clusters und A β ₄₂-Konzentrationen im CSF von AD Patienten hergestellt. Weitere Untersuchungen müssen klären ob das *MS4A1* Gen, oder eines seiner Nachbargene wirklich mit der A β -Biologie interagieren.

Das *SORL1* Gen ist ein Mitglied der LDL Rezeptor Familie und ein *APOE* Rezeptor im Gehirn, des Weiteren ist es an Transport und Prozessierung des Amyloid Vorläufer Proteins (*APP*) in Recyclingwege beteiligt. Variationen in diesem Prozess haben daher einen Einfluss auf die A β -Produktion und somit auch auf die Alzheimer Pathologie (Andersen et al. 2006; Offe et al. 2006). Die hier gezeigten Daten für den *SORL1* Locus unterstützen frühere Assoziationsfunde für A β ₄₂-Level mit Markern diese Locus (Alexopoulos et al., 2011; Kölsch et al., 2008, 2009). Es wurde nicht nur ein Einzelmarker, sondern auch ein 3-Marker Haplotyp identifiziert, der signifikanten Einfluss auf die A β ₄₂-Konzentration zeigt.

Zusätzlich konnten einige Marker mit Vitamin B12 Werten im Blut der untersuchten Alzheimer Patienten assoziiert werden. Erhöhte Vitamin B12 Konzentrationen im Plasma, wie auch erhöhte Konzentrationen von Homocystein, einem Vorläufer von Vitamin B12, wurden bereits früher mit einem geringeren Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht (Hooshmand et al., 2010; Van Dam & Van Gool, 2008). Aufgrund der positiven Eigenschaft von Vitamin B12 reicher Nahrung oder Nahrungsergänzungsmitteln wird dies daher häufig empfohlen. Die Verbindung zwischen Vitamin B12 und *SORL1* ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Assoziation mit Markern des *ARID5B* Gens und hohen Konzentrationen des Tau Proteins im CSF war überraschend, da *ARID5B* ein DNA bindendes Protein mit transkriptions-

hemmender Aktivität ist. *ARID5B* ist an der Muskelzellentwicklung (Watanabe, 2002; Whitson, 2003) und der Adipogenese (Yamakawa, Whitson, Li, & Itakura, 2008) sowie der Regulation des Triglyzerid-Metabolismus (Yamakawa, Sugimoto, Whitson, & Itakura, 2010) beteiligt. Eine Rolle im zentralen Nervensystem ist bis heute nicht bekannt und obwohl *ARID5B* stark im menschlichen Gehirn exprimiert ist, kann nur über die Rolle *ARID5Bs* während der Neurodegeneration und der Akkumulation von Tau im CSF spekuliert werden.

Da einige der kürzlich ermittelten AD Risikoloci für Proteine kodieren, die im Lipidmetabolismus eine Rolle spielen, wurden in dieser Studie ebenfalls untersucht ob Marker dieser neuen Risikoloci einen Einfluss auf Serum LDL, VLDL und HDL, oder Triglyzerid und Cholesterin Konzentrationen haben. Interessanterweise wurden für die Gene *ARID5B*, *PICALM*, oder *ABCA7*, deren Rolle in Fettstoffwechselprozessen bekannt ist, keine Assoziation gefunden, wohingegen für die Gene *BINI* und *GOLM1* Assoziationen identifiziert wurden.

Das aus *BINI* kodierte Protein ist ein nukleozytoplasmatisches Adapterprotein das im zentralen Nervensystem exprimiert ist und an der Endozytose synaptischer Vesikel beteiligt sein könnte. Für die Funktion des *GOLM1* Gen, ein Golgi-beheimatetes Transmembranprotein, ist bis heute wenig bekannt.

Abschließend kann gesagt werden, dass in der hier vorgestellten Studie davon ausgegangen wurde, dass ein genetischer Grund für AD, durch Proteine, die aus den zuvor gefundenen Genen kodiert werden, besteht. Es ist aber auch vorstellbar, dass die eigentliche kausale Variante in hohem Kopplungsungleichgewicht zu den zuvor identifizierten SNPs steht und auf ein Gen in der Nachbarschaft deutet. Allerdings geben die Daten dieser Studie starke Indizien, dass einige der untersuchten Kandidatengene krankheitsspezifische Parameter beeinflussen.

6.5 *LINGO1* Locus

Nach einer genomweiten Assoziationsstudie (5.3.3), wurden durch lineare Regressions-Analysen mit der abhängigen Variablen $A\beta_{42}$ und den unabhängigen Variablen Alter, Geschlecht und SNP, drei SNPs in einem additiven Model identifiziert, die knapp unter der Schwelle für genomweite Signifikanz, nach einer Bonferroni Korrektur, liegen (rs2682911, rs884141, rs12591110). Diese SNPs liegen downstream (30,7kb, 24,3kb bzw. 1,4kb) des *LINGO1* Gens. Da das aus dem *LINGO1* Gen kodierte Protein an Prozessen des zentralen

Nervensystems beteiligt ist (Mi et al., 2004), ist dieses Gen ein funktionell interessantes Kandidatengen. Daraufhin wurden in der genetischen Region um den *LINGO1* Locus, 23 SNPs mit Hilfe der Sequenom-Technologie analysiert. Zur Validierung dieser drei SNPs wurden unabhängige AD-Fall Kollektive verwendet (4.1.2.5).

Die zuvor beobachteten Assoziationssignale (rs2682911 $p=1,10 \cdot 10^{-7}$, rs884141 $p=1,91 \cdot 10^{-7}$, rs12591110 $p=3,08 \cdot 10^{-7}$) konnten weder in dem München-Kollektiv (4.1.2.5.1), noch in dem Schweden-Kollektiv (4.1.2.5.2) bestätigt werden. Auch bei der Analyse beider Kohorten gemeinsam konnten die Assoziationssignale nicht validiert werden (Tabelle 31).

Es ist möglich, dass die drei Assoziationen in der GWAS aufgrund einer zu geringen Fallzahl ($n=109$) als falsch positiv identifiziert wurden. Da die Validierungskollektive sich epidemiologisch zu stark von dem GWAS Kollektiv unterscheiden, kann ausgeschlossen werden, da keine Validierung in dem München-Kollektiv erfolgte. Diese Kohorte ist an der gleichen Klinik wie die GWAS Kohorte rekrutiert worden und ist sich epidemiologisch sehr ähnlich.

6.6 Fazit

Durch diese Arbeit konnte die Rolle bekannter Kandidatengene an der Pathogenese der Alzheimer Krankheit teilweise bestärkt, teilweise aber auch widerlegt werden. Die stärkste Assoziation zeigte in dieser, wie auch in vielen anderen Studien, der *APOE* Locus. Auch für die Loci *CHRNA2*, *CH25H*, *PGBD1*, *LMNA*, *CST3*, *PCK1*, *MAPT* und *SORL1* konnte, wenn auch nur nominell signifikante, Assoziation mit AD gezeigt werden und damit die Beteiligung dieser Gene an AD bekräftigt werden. Für den Locus *ACE* konnte in dieser Arbeit keine genetische Assoziation zu AD gezeigt werden. Für das *GAB2* Gen konnte ein Haplotyp identifiziert werden, bestehend aus 22 SNPs, der nominell signifikante Assoziation zu AD zeigt (Feulner et al., 2010).

Ein weiterer potentieller Risikolocus war das *TACR2* Gen, welches in einer zuvor beschriebenen Kopplungsregion liegt. Für dieses Gen konnte eine Beteiligung an AD ausgeschlossen werden (Feulner et al., 2011).

Die GWAS Daten dieser Arbeit halfen bei der Identifizierung neuer Kandidatengene durch die Analyse in einem internationalen Konsortium. Diese Meta-Studie brachte die Loci *ABCA7*, *ARID5B*, *CD2AP*, *CD33*, *EPHA1*, *GOLM1* und das *MS4A* Gen Cluster hervor. Diese

Ergebnisse wurden von unserem Konsortium in der Fachzeitschrift „*Nature Genetics*“ veröffentlicht (Hollingworth et al., 2011).

Für die weitere funktionelle Charakterisierung dieser neuen Loci, sowie der zuvor beschriebenen vier Loci (*CRI*, *CLU*, *BINI* und *PICALM*) (Lambert et al. 2009; Harold et al. 2009), wurden SNPs dieser Loci mit verfügbaren endophänotypischen Daten korreliert. Hierbei zeigten vor allem die Loci *CRI*, *SORL1*, *ARID5B*, *BINI*, *GOLM1*, *CD2AP* und das *MS4A* Gen Cluster Assoziationen zu unterschiedlichen Endophänotypen.

Besonders die neu identifizierten Loci und deren funktionelle Charakterisierung durch Assoziation mit Endophänotypen werden nützlich, für das weitere Verstehen der Pathologie der Alzheimer Krankheit, sein. Allerdings bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um vor allem die eigentlichen funktionellen Varianten und deren pathologische Auswirkungen genauer zu charakterisieren.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- 1000-Genomes-Project-Consortium. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061-73. doi:10.1038/nature09534
- Abecasis, G R, Noguchi, E., Heinzmann, A., Traherne, J. A., Bhattacharyya, S., Leaves, N. I., Anderson, G. G., et al. (2001). Extent and distribution of linkage disequilibrium in three genomic regions. *American journal of human genetics*, 68(1), 191-197. doi:10.1086/316944
- Abraham, Richard, Moskvina, V., Sims, R., Hollingworth, P., Morgan, A., Georgieva, L., Dowzell, K., et al. (2008). A genome-wide association study for late-onset Alzheimer's disease using DNA pooling. *BMC medical genomics*, 1, 44. doi:10.1186/1755-8794-1-44
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., et al. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7(4), 248-9. doi:10.1038/nmeth0410-248
- Alexopoulos, P., Guo, L.-H., Kratzer, M., Westerteicher, C., Kurz, A., & Perneczky, R. (2011). Impact of SORL1 Single Nucleotide Polymorphisms on Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid Markers. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 32(3), 164-170. doi:10.1159/000332017
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie Psychiatrisch-Gerichtl Med*, 64, 146-148.
- Andersen, O. M., Schmidt, V., Spoelgen, R., Gliemann, J., Behlke, J., Galatis, D., McKinstry, W. J., et al. (2006). Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11. *Biochemistry*, 45(8), 2618-28. doi:10.1021/bi052120v
- Ardlie, K. G., Kruglyak, L., & Seielstad, M. (2002). Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature reviews. Genetics*, 3(4), 299-309. doi:10.1038/nrg777
- Arvanitakis, Z., Wilson, R. S., & Bennett, D. A. (2006). Diabetes mellitus, dementia, and cognitive function in older persons. *The journal of nutrition, health & aging*, 10(4), 287-91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886098>
- Ashford, J. W., & Mortimer, J. A. (2002). Non-familial Alzheimer's disease is mainly due to genetic factors. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 4(3), 169-77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12226536>
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(2), 263-5. doi:10.1093/bioinformatics/bth457

- Becaria, A., Campbell, A., & Bondy, S. C. (2002). Aluminum as a toxicant. *Toxicology and industrial health*, 18(7), 309-20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068131>
- Beecham, G. W., Martin, E. R., Li, Y.-J., Slifer, M. A., Gilbert, J. R., Haines, J. L., & Pericak-Vance, M. A. (2009). Genome-wide association study implicates a chromosome 12 risk locus for late-onset Alzheimer disease. *American journal of human genetics*, 84(1), 35-43. doi:10.1016/j.ajhg.2008.12.008
- Bertram, L., Lange, C., Mullin, K., Parkinson, M., Hsiao, M., Hogan, M. F., Schjeide, B. M. M., et al. (2008). Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *American journal of human genetics*, 83(5), 623-32. doi:10.1016/j.ajhg.2008.10.008
- Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D., & Tanzi, R. E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nature genetics*, 39(1), 17-23. doi:10.1038/ng1934
- Bettens, Karolien, Brouwers, N., Engelborghs, 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. *Human mutation*, 29(5), 769-70. doi:10.1002/humu.20725
- Bickeböller, H., & Fischer, C. (2007). *Einführung in die Genetische Epidemiologie*. Springer-Verlag.
- Blacker, D., Bertram, L., Saunders, A. J., Moscarillo, T. J., Albert, M. S., Wiener, H., Perry, R. T., et al. (2003). Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Human molecular genetics*, 12(1), 23-32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490529>
- Bradt, B. M., Kolb, W. P., & Cooper, N. R. (1998). Complement-dependent proinflammatory properties of the Alzheimer's disease beta-peptide. *The Journal of experimental medicine*, 188(3), 431-8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212467&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Brouwers, N, Van Cauwenberghe, C., Engelborghs, S., Lambert, J.-C., Bettens, K., Le Bastard, N., Pasquier, F., et al. (2011). Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites. *Molecular psychiatry*. doi:10.1038/mp.2011.24
- Buch, K., Riemenschneider, M., Bartenstein, P., Willoch, F., Müller, U., Schmolke, M., Nolde, T., et al. (1998). [Tau protein. A potential biological indicator for early detection of Alzheimer disease]. *Der Nervenarzt*, 69(5), 379-85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9629553>
- Bucolo, G., & David, H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical chemistry*, 19(5), 476-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4703655>

- Cao, H., van der Veer, E., Ban, M. R., Hanley, A. J. G., Zinman, B., Harris, S. B., Young, T. K., et al. (2004). Promoter polymorphism in PCK1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase gene) associated with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(2), 898-903. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764811>
- Cardon, L. R., & Bell, J. I. (2001). Association study designs for complex diseases. *Nature reviews. Genetics*, 2(2), 91-9. doi:10.1038/35052543
- Carrasquillo, M. M., Zou, F., Pankratz, V. S., Wilcox, S. L., Ma, L., Walker, L. P., Younkin, S. G., et al. (2009). Genetic variation in PCDH11X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 41(2), 192-8. doi:10.1038/ng.305
- Cathcart, H. M., Huang, R., Lanham, I. S., Corder, E. H., & Poduslo, S. E. (2005). Cystatin C as a risk factor for Alzheimer disease. *Neurology*, 64(4), 755-7. doi:10.1212/01.WNL.0000151980.42337.44
- Collins, F. S., Brooks, L. D., & Chakravarti, A. (1998). A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome research*, 8(12), 1229-31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872978>
- Colucci, M., Cammarata, S., Assini, A., Croce, R., Clerici, F., Novello, C., Mazzella, L., et al. (2006). The number of pregnancies is a risk factor for Alzheimer's disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, 13(12), 1374-7. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01520.x
- Cook, L. J., Ho, L. W., Taylor, A. E., Brayne, C., Evans, J. G., Xuereb, J., Cairns, N. J., et al. (2004). Candidate gene association studies of the alpha 4 (CHRNA4) and beta 2 (CHRNA2) neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 358(2), 142-6. doi:10.1016/j.neulet.2004.01.016
- Coon, K. D., Myers, A. J., Craig, D. W., Webster, J. A., Pearson, J. V., Lince, D. H., Zismann, V. L., et al. (2007). A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *The Journal of clinical psychiatry*, 68(4), 613-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17474819>
- Corder, E H, Saunders, A. M., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Rimmler, J. B., et al. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature genetics*, 7(2), 180-4. doi:10.1038/ng0694-180
- Corder, E H, Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., et al. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5123), 921-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8346443>
- Corder, Elizabeth H, Ghebremedhin, E., Taylor, M. G., Thal, D. R., Ohm, T. G., & Braak, H. (2004). The biphasic relationship between regional brain senile plaque and neurofibrillary tangle distributions: modification by age, sex, and APOE polymorphism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019, 24-8. doi:10.1196/annals.1297.005

- Coulthard, M. G., Lickliter, J. D., Subanesan, N., Chen, K., Webb, G. C., Lowry, A. J., Koblar, S., et al. (2001). Characterization of the EphA1 receptor tyrosine kinase: expression in epithelial tissues. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 18(4), 303-17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11519828>
- Crocker, P. R., Paulson, J. C., & Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 7(4), 255-66. doi:10.1038/nri2056
- Cruts, M., Backhovens, H., Wang, S. Y., Van Gassen, G., Theuns, J., De Jonghe, C. D., Wehnert, A., et al. (1995). Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Human molecular genetics*, 4(12), 2363-71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8634711>
- Decaudain, A., Vantyghem, M.-C., Guerci, B., Hécart, A.-C., Auclair, M., Reznik, Y., Narbonne, H., et al. (2007). New metabolic phenotypes in laminopathies: LMNA mutations in patients with severe metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(12), 4835-44. doi:10.1210/jc.2007-0654
- DerSimonian, R., & Laird, N. (1986). Meta-analysis in clinical trials. *Controlled clinical trials*, 7(3), 177-88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3802833>
- Desvignes, C., Rouquier, L., Souilhac, J., Mons, G., Rodier, D., Soubrié, P., & Steinberg, R. (2003). Control by tachykinin NK(2) receptors of CRF(1) receptor-mediated activation of hippocampal acetylcholine release in the rat and guinea-pig. *Neuropeptides*, 37(2), 89-97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12747940>
- Dodel, R. C., Du, Y., Depboylu, C., Kurz, A., Eastwood, B., Farlow, M., Oertel, W. H., et al. (2002). A polymorphism in the cystatin C promoter region is not associated with an increased risk of AD. *Neurology*, 58(4), 664. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11865157>
- Dustin, M. L., Olszowy, M. W., Holdorf, A. D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., et al. (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell*, 94(5), 667-77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9741631>
- Eikelenboom, P., Veerhuis, R., Scheper, W., Rozemuller, A. J. M., van Gool, W. A., & Hoozemans, J. J. M. (2006). The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 113(11), 1685-95. doi:10.1007/s00702-006-0575-6
- Ertekin-Taner, N., Graff-Radford, N., Younkin, L. H., Eckman, C., Baker, M., Adamson, J., Ronald, J., et al. (2000). Linkage of plasma Abeta42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5500), 2303-4. doi:10.1126/science.290.5500.2303
- Feulner, T. M., Friedrich, P., Laws, S. M., Eckart, K., Pernecky, R., Kurz, A., Förstl, H., et al. (2011). No association of Tachykinin receptor 2 (TACR2) polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 32(3), 544-5. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.03.007

- Feulner, T. M., Laws, S. M., Friedrich, P., Wagenpfeil, S., Wurst, S. H. R., Riehle, C., Kuhn, K. A., et al. (2010). Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study. *Molecular psychiatry*, *15*(7), 756-66. doi:10.1038/mp.2008.141
- Finckh, U., von der Kammer, H., Velden, J., Michel, T., Andresen, B., Deng, A., Zhang, J., et al. (2000). Genetic association of a cystatin C gene polymorphism with late-onset Alzheimer disease. *Archives of neurology*, *57*(11), 1579-83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074789>
- Folstein, M F, Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*, *12*(3), 189-98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1202204>
- Förstl, H. (2000). Clinical issues in current drug therapy for dementia. *Alzheimer disease and associated disorders*, *14 Suppl 1*, S103-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10850737>
- Gabriel, S. B., Schaffner, S. F., Nguyen, H., Moore, J. M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., et al. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5576), 2225-9. doi:10.1126/science.1069424
- Gambaro, G., Anglani, F., & D'Angelo, A. (2000). Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet*, *355*(9200), 308-11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10675088>
- García, T., & Jay, D. (2004). [Phosphorylation of tau and Alzheimer's disease]. *Gaceta médica de México*, *140*(3), 329-33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15259345>
- Gasparini, L., Netzer, W. J., Greengard, P., & Xu, H. (2002). Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends in pharmacological sciences*, *23*(6), 288-93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084635>
- Gerard, N. P., Eddy, R. L., Shows, T. B., & Gerard, C. (1990). The human neurokinin A (substance K) receptor. Molecular cloning of the gene, chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues. *The Journal of biological chemistry*, *265*(33), 20455-62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2173708>
- Gershon, E. S., & Goldin, L. R. (1986). Clinical methods in psychiatric genetics. I. Robustness of genetic marker investigative strategies. *Acta psychiatrica Scandinavica*, *74*(2), 113-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3465198>
- Gibbs, J. R., van der Brug, M. P., Hernandez, D. G., Traynor, B. J., Nalls, M. A., Lai, S.-L., Arepalli, S., et al. (2010). Abundant quantitative trait loci exist for DNA methylation and gene expression in human brain. *PLoS genetics*, *6*(5), e1000952. doi:10.1371/journal.pgen.1000952
- Goate, A M, Haynes, A. R., Owen, M. J., Farrall, M., James, L. A., Lai, L. Y., Mullan, M. J., et al. (1989). Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet*, *1*(8634), 352-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2563508>

- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, *349*(6311), 704-6. doi:10.1038/349704a0
- Gong, C.-X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2005). Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *112*(6), 813-38. doi:10.1007/s00702-004-0221-0
- Gottesman, I. I., & Gould, T. D. (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American journal of psychiatry*, *160*(4), 636-45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668349>
- Grossman, H., Bergmann, C., & Parker, S. (2006). Dementia: a brief review. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, *73*(7), 985-92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195884>
- Grupe, A., Abraham, R., Li, Y., Rowland, C., Hollingworth, P., Morgan, A., Jehu, L., et al. (2007). Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants. *Human molecular genetics*, *16*(8), 865-73. doi:10.1093/hmg/ddm031
- Gómez-Ramos, A., Smith, M. A., Perry, G., & Avila, J. (2004). Tau phosphorylation and assembly. *Acta neurobiologiae experimentalis*, *64*(1), 33-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15190678>
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, *41*(10), 1088-93. doi:10.1038/ng.440
- Hellström-Lindahl, E., Mousavi, M., Ravid, R., & Nordberg, A. (2004). Reduced levels of Abeta 40 and Abeta 42 in brains of smoking controls and Alzheimer's patients. *Neurobiology of disease*, *15*(2), 351-60. doi:10.1016/j.nbd.2003.11.024
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.-C., Carrasquillo, M. M., Abraham, R., et al. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, *43*(5), 429-35. doi:10.1038/ng.803
- Hooshmand, B., Solomon, a, Kåreholt, I., Leiviskä, J., Rusanen, M., Ahtiluoto, S., Winblad, B., et al. (2010). Homocysteine and holotranscobalamin and the risk of Alzheimer disease: a longitudinal study. *Neurology*, *75*(16), 1408-14. doi:10.1212/WNL.0b013e3181f88162
- Howie, B. N., Donnelly, P., & Marchini, J. (2009). A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS genetics*, *5*(6), e1000529. doi:10.1371/journal.pgen.1000529
- International-HapMap-Consortium. (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, *437*(7063), 1299-320. doi:10.1038/nature04226

- International-HapMap-Consortium, Frazer, K. A., Ballinger, D. G., Cox, D. R., Hinds, D. A., Stuve, L. L., Gibbs, R. A., et al. (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, *449*(7164), 851-61. doi:10.1038/nature06258
- Jehle, A. W., Gardai, S. J., Li, S., Linsel-Nitschke, P., Morimoto, K., Janssen, W. J., Vandivier, R. W., et al. (2006). ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. *The Journal of cell biology*, *174*(4), 547-56. doi:10.1083/jcb.200601030
- Juan, D., Zhou, D. H. D., Li, J., Wang, J. Y. J., Gao, C., & Chen, M. (2004). A 2-year follow-up study of cigarette smoking and risk of dementia. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, *11*(4), 277-82. doi:10.1046/j.1468-1331.2003.00779.x
- Karp, A., Kåreholt, I., Qiu, C., Bellander, T., Winblad, B., & Fratiglioni, L. (2004). Relation of education and occupation-based socioeconomic status to incident Alzheimer's disease. *American journal of epidemiology*, *159*(2), 175-83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14718220>
- Kehoe, P. G., Katzov, H., Feuk, L., Bennet, A. M., Johansson, B., Wiman, B., de Faire, U., et al. (2003). Haplotypes extending across ACE are associated with Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, *12*(8), 859-67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668609>
- Kehoe, P., Wavrant-De Vrieze, F., Crook, R., Wu, W. S., Holmans, P., Fenton, I., Spurlock, G., et al. (1999). A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, *8*(2), 237-45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931331>
- Khera, R., & Das, N. (2009). Complement Receptor 1: disease associations and therapeutic implications. *Molecular immunology*, *46*(5), 761-72. doi:10.1016/j.molimm.2008.09.026
- Kim, I., Lee, J., Hong, H. J., Jung, E. S., Ku, Y. H., Jeong, I. K., Cho, Y. M., et al. (2010). A relationship between Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus through the measurement of serum amyloid-beta autoantibodies. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, *19*(4), 1371-6. doi:10.3233/JAD-2010-1332
- Kim, Woojin Scott, Fitzgerald, M. L., Kang, K., Okuhira, K.-ichiro, Bell, S. A., Manning, J. J., Koehn, S. L., et al. (2005). Abca7 null mice retain normal macrophage phosphatidylcholine and cholesterol efflux activity despite alterations in adipose mass and serum cholesterol levels. *The Journal of biological chemistry*, *280*(5), 3989-95. doi:10.1074/jbc.M412602200
- Kim, Woojin S, Guillemin, G. J., Glaros, E. N., Lim, C. K., & Garner, B. (2006). Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *Neuroreport*, *17*(9), 891-6. doi:10.1097/01.wnr.0000221833.41340.cd
- Kinet, J. P., Blank, U., Ra, C., White, K., Metzger, H., & Kochan, J. (1988). Isolation and characterization of cDNAs coding for the beta subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(17), 6483-7. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=281997&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Krawczak, M, Nikolaus, S., von Eberstein, H., Croucher, P. J. P., El Mokhtari, N. E., & Schreiber, S. (2006). PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. *Community genetics*, 9(1), 55-61. doi:10.1159/000090694
- Kruglyak, L. (1999). Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nature genetics*, 22(2), 139-44. doi:10.1038/9642
- Kölsch, H., Jessen, F., Wiltfang, J., Lewczuk, P., Dichgans, M., Kornhuber, J., Frölich, L., et al. (2008). Influence of SORL1 gene variants: association with CSF amyloid-beta products in probable Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 440(1), 68-71. doi:10.1016/j.neulet.2008.05.049
- Kölsch, H., Jessen, F., Wiltfang, J., Lewczuk, P., Dichgans, M., Teipel, S. J., Kornhuber, J., et al. (2009). Association of SORL1 gene variants with Alzheimer's disease. *Brain research*, 1264, 1-6. doi:10.1016/j.brainres.2009.01.044
- Lai, K.-O., & Ip, N. Y. (2009). Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Current opinion in neurobiology*, 19(3), 275-83. doi:10.1016/j.conb.2009.04.009
- Lambert, Jean-Charles, Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 41(10), 1094-9. doi:10.1038/ng.439
- Lander, E S, Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921. doi:10.1038/35057062
- Laws, S M, Friedrich, P., Diehl-Schmid, J., Müller, J., Eisele, T., Bäuml, J., Förstl, H., et al. (2007). Fine mapping of the MAPT locus using quantitative trait analysis identifies possible causal variants in Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*, 12(5), 510-7. doi:10.1038/sj.mp.4001935
- Leboyer, M., Bellivier, F., Nosten-Bertrand, M., Jouvent, R., Pauls, D., & Mallet, J. (1998). Psychiatric genetics: search for phenotypes. *Trends in neurosciences*, 21(3), 102-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9530915>
- Lee, J. H., Cheng, R., Santana, V., Williamson, J., Lantigua, R., Medrano, M., Arriaga, A., et al. (2006). Expanded genomewide scan implicates a novel locus at 3q28 among Caribbean hispanics with familial Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 63(11), 1591-8. doi:10.1001/archneur.63.11.1591
- Lee, J. H., Cheng, R., Schupf, N., Manly, J., Lantigua, R., Stern, Y., Rogaeva, E., et al. (2007). The association between genetic variants in SORL1 and Alzheimer disease in an urban, multiethnic, community-based cohort. *Archives of neurology*, 64(4), 501-6. doi:10.1001/archneur.64.4.501

- Letenneur, Luc, Larrieu, S., & Barberger-Gateau, P. (2004). Alcohol and tobacco consumption as risk factors of dementia: a review of epidemiological studies. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie*, 58(2), 95-9. doi:10.1016/j.biopha.2003.12.004
- Letenneur, Luc. (2004). Risk of dementia and alcohol and wine consumption: a review of recent results. *Biological research*, 37(2), 189-93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15455646>
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5226), 973-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638622>
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D., et al. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5226), 970-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638621>
- Li, Hao, Wetten, S., Li, L., St Jean, P. L., Upmanyu, R., Surh, L., Hosford, D., et al. (2008). Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 65(1), 45-53. doi:10.1001/archneurol.2007.3
- Liang, Y., Buckley, T. R., Tu, L., Langdon, S. D., & Tedder, T. F. (2001). Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. *Immunogenetics*, 53(5), 357-68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11486273>
- Liu, Fan, Arias-Vásquez, A., Slegers, K., Aulchenko, Y. S., Kayser, M., Sanchez-Juan, P., Feng, B.-J., et al. (2007). A genomewide screen for late-onset Alzheimer disease in a genetically isolated Dutch population. *American journal of human genetics*, 81(1), 17-31. doi:10.1086/518720
- Luchsinger, J. A., Tang, M.-X., Shea, S., & Mayeux, R. (2004). Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology*, 63(7), 1187-92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15477536>
- Luchsinger, J. A., Tang, M.-X., Siddiqui, M., Shea, S., & Mayeux, R. (2004). Alcohol intake and risk of dementia. *Journal of the American Geriatrics Society*, 52(4), 540-6. doi:10.1111/j.1532-5415.2004.52159.x
- Lynch, D. K., Winata, S. C., Lyons, R. J., Hughes, W. E., Lehrbach, G. M., Wasinger, V., Corthals, G., et al. (2003). A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*, 278(24), 21805-13. doi:10.1074/jbc.M211407200
- McGeer, E. G., Klegeris, A., & McGeer, P. L. (2005). Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *Neurobiology of aging*, 26 Suppl 1, 94-7. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.08.008

- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., et al. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 263-9. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.005
- 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(7), 939-44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6610841>
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., et al. (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nature neuroscience*, 7(3), 221-8. doi:10.1038/nn1188
- Mirra, S. S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S. M., Crain, B. J., Brownlee, L. M., Vogel, F. S., et al. (1991). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*, 41(4), 479-86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2011243>
- Morozova, E., Wu, M., Dumalska, I., & Alreja, M. (2008). Neurokinins robustly activate the majority of septohippocampal cholinergic neurons. *The European journal of neuroscience*, 27(1), 114-22. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05993.x
- Morris, J C, Heyman, A., Mohs, R. C., Hughes, J. P., van Belle, G., Fillenbaum, G., Mellits, E. D., et al. (1989). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*, 39(9), 1159-65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2771064>
- Morris, J C, Mohs, R. C., Rogers, H., Fillenbaum, G., & Heyman, A. (1988). Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD) clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Psychopharmacology bulletin*, 24(4), 641-52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3249766>
- Moulson, C. L., Fong, L. G., Gardner, J. M., Farber, E. A., Go, G., Passariello, A., Grange, D. K., et al. (2007). Increased progerin expression associated with unusual LMNA mutations causes severe progeroid syndromes. *Human mutation*, 28(9), 882-9. doi:10.1002/humu.20536
- Mukherjee, O., Kauwe, J. S. K., Mayo, K., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2007). Haplotype-based association analysis of the MAPT locus in late onset Alzheimer's disease. *BMC genetics*, 8, 3. doi:10.1186/1471-2156-8-3
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335-50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3431465>

- Myers, A. J., Pittman, A. M., Zhao, A. S., Rohrer, K., Kaleem, M., Marlowe, L., Lees, A., et al. (2007). The MAPT H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiology of disease*, 25(3), 561-70. doi:10.1016/j.nbd.2006.10.018
- Myers, A., Holmans, P., Marshall, H., Kwon, J., Meyer, D., Ramic, D., Shears, S., et al. (2000). Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5500), 2304-5. doi:10.1126/science.290.5500.2304
- Myers, Amanda, Wavrant De-Vrieze, F., Holmans, P., Hamshere, M., Crook, R., Compton, D., Marshall, H., et al. (2002). Full genome screen for Alzheimer disease: stage II analysis. *American journal of medical genetics*, 114(2), 235-44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11857588>
- Naj, A. C., Jun, G., Beecham, G. W., Wang, L.-S., Vardarajan, B. N., Buross, J., Gallins, P. J., et al. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 43(5), 436-41. doi:10.1038/ng.801
- Nechiporuk, A., Fain, P., Kort, E., Nee, L. E., Frommelt, E., Polinsky, R. J., Korenberg, J. R., et al. (1993). Linkage of familial Alzheimer disease to chromosome 14 in two large early-onset pedigrees: effects of marker allele frequencies on lod scores. *American journal of medical genetics*, 48(1), 63-6. doi:10.1002/ajmg.1320480113
- Nothnagel, M. (2004). *The Definition of Multilocus Haplotype Blocks and Common Disease*. HU-Berlin.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(5), 1596-603. doi:10.1523/JNEUROSCI.4946-05.2006
- Ott, A., Andersen, K., Dewey, M. E., Letenneur, L., Brayne, C., Copeland, J. R. M., Dartigues, J. F., et al. (2004). Effect of smoking on global cognitive function in nondemented elderly. *Neurology*, 62(6), 920-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037693>
- Ott, A., Slioter, A. J., Hofman, A., van Harskamp, F., Witteman, J. C., Van Broeckhoven, C., van Duijn, C. M., et al. (1998). Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet*, 351(9119), 1840-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9652667>
- Papassotiropoulos, Andreas, Lambert, J.-C., Wavrant-De Vrièze, F., Wollmer, M. A., von der Kammer, H., Streffer, J. R., Maddalena, A., et al. (2005). Cholesterol 25-hydroxylase on chromosome 10q is a susceptibility gene for sporadic Alzheimer's disease. *Neurodegenerative diseases*, 2(5), 233-41. doi:10.1159/000090362
- Pericak-Vance, M A, Bass, M. L., Yamaoka, L. H., Gaskell, P. C., Scott, W. K., Terwedow, H. A., Menold, M. M., et al. (1998). Complete genomic screen in late-onset familial

- Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 19(1 Suppl), S39-42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9562466>
- Perry, George, Sayre, L. M., Atwood, C. S., Castellani, R. J., Cash, A. D., Rottkamp, C. A., & Smith, M. A. (2002). The role of iron and copper in the aetiology of neurodegenerative disorders: therapeutic implications. *CNS drugs*, 16(5), 339-52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994023>
- Petersen, R C, Aisen, P. S., Beckett, L. A., Donohue, M. C., Gamst, A. C., Harvey, D. J., Jack, C. R., et al. (2010). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI): clinical characterization. *Neurology*, 74(3), 201-9. doi:10.1212/WNL.0b013e3181cb3e25
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., & Gauthier, S. (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342(8873), 697-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8103819>
- Potkin, S. G., Guffanti, G., Lakatos, A., Turner, J. A., Kruggel, F., Fallon, J. H., Saykin, A. J., et al. (2009). Hippocampal atrophy as a quantitative trait in a genome-wide association study identifying novel susceptibility genes for Alzheimer's disease. *PloS one*, 4(8), e6501. doi:10.1371/journal.pone.0006501
- Prince, J A, Feuk, L., Sawyer, S. L., Gottfries, J., Ricksten, A., Nägga, K., Bogdanovic, N., et al. (2001). Lack of replication of association findings in complex disease: an analysis of 15 polymorphisms in prior candidate genes for sporadic Alzheimer's disease. *European journal of human genetics : EJHG*, 9(6), 437-44. doi:10.1038/sj.ejhg.5200651
- Pro, J. D., Smith, C. H., & Sumi, S. M. (1980). Presenile Alzheimer disease: amyloid plaques in the cerebellum. *Neurology*, 30(8), 820-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7191064>
- Pruim, R. J., Welch, R. P., Sanna, S., Teslovich, T. M., Chines, P. S., Gliedt, T. P., Boehnke, M., et al. (2010). LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(18), 2336-7. doi:10.1093/bioinformatics/btq419
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*, 81(3), 559-75. doi:10.1086/519795
- Qiu, C., Karp, A., von Strauss, E., Winblad, B., Fratiglioni, L., & Bellander, T. (2003). Lifetime principal occupation and risk of Alzheimer's disease in the Kungsholmen project. *American journal of industrial medicine*, 43(2), 204-11. doi:10.1002/ajim.10159
- Reddel, C. J., & Weiss, A. S. (2004). Lamin A expression levels are unperturbed at the normal and mutant alleles but display partial splice site selection in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Journal of medical genetics*, 41(9), 715-7. doi:10.1136/jmg.2004.019323

- Reich, D. E., Cargill, M., Bolk, S., Ireland, J., Sabeti, P. C., Richter, D. J., Lavery, T., et al. (2001). Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*, *411*(6834), 199-204. doi:10.1038/35075590
- Reid, P. C., Urano, Y., Kodama, T., & Hamakubo, T. (2007). Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *Journal of cellular and molecular medicine*, *11*(3), 383-92. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00054.x
- Reiman, E. M., Webster, J. A., Myers, A. J., Hardy, J., Dunckley, T., Zismann, V. L., Joshupura, K. D., et al. (2007). GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron*, *54*(5), 713-20. doi:10.1016/j.neuron.2007.05.022
- Riemenschneider, M., Buch, K., Schmolke, M., Kurz, A., & Guder, W. G. (1997). Diagnosis of Alzheimer's disease with cerebrospinal fluid tau protein and aspartate aminotransferase. *Lancet*, *350*(9080), 784. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298004>
- Riemenschneider, M., Klopp, N., Xiang, W., Wagenpfeil, S., Vollmert, C., Müller, U., Förstl, H., et al. (2004). Prion protein codon 129 polymorphism and risk of Alzheimer disease. *Neurology*, *63*(2), 364-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15277640>
- Riemenschneider, M., Wagenpfeil, S., Vanderstichele, H., Otto, M., Wiltfang, J., Kretschmar, H., Vanmechelen, E., et al. (2003). Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *Molecular psychiatry*, *8*(3), 343-7. doi:10.1038/sj.mp.4001220
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., et al. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature genetics*, *39*(2), 168-77. doi:10.1038/ng1943
- Rogers, J., Cooper, N. R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P. L., Styren, S. D., Civin, W. H., et al. (1992). Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(21), 10016-20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=50268&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Roth, M., Tym, E., Mountjoy, C. Q., Huppert, F. A., Hendrie, H., Verma, S., & Goddard, R. (1986). CAMDEX. A standardised instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *The British journal of psychiatry: the journal of mental science*, *149*, 698-709. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3790869>
- Rottkamp, C A, Raina, A. K., Zhu, X., Gaier, E., Bush, A. I., Atwood, C. S., Chevion, M., et al. (2001). Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity. *Free radical biology & medicine*, *30*(4), 447-50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182300>

- Ruitenbergh, A., van Swieten, J. C., Wittteman, J. C. M., Mehta, K. M., van Duijn, C. M., Hofman, A., & Breteler, M. M. B. (2002). Alcohol consumption and risk of dementia: the Rotterdam Study. *Lancet*, 359(9303), 281-6. doi:10.1016/S0140-6736(02)07493-7
- Rösler, N., Wichart, I., & Jellinger, K. A. (2001). CSF Abeta40 and Abeta42: Natural course and clinical usefulness. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 3(6), 599-600. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12214027>
- Satzger, W., Hampel, H., Padberg, F., Bürger, K., Nolde, T., Ingrassia, G., & Engel, R. R. (2001). [Practical application of the CERAD test battery as a neuropsychological dementia screening test]. *Der Nervenarzt*, 72(3), 196-203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268764>
- Schjeide, B.-M. M., Schnack, C., Lambert, J.-C., Lill, C. M., Kirchheiner, J., Tumani, H., Otto, M., et al. (2011). The role of clusterin, complement receptor 1, and phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein in Alzheimer disease risk and cerebrospinal fluid biomarker levels. *Archives of general psychiatry*, 68(2), 207-13. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2010.196
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A. L., Ikram, M. A., DeStefano, A. L., Gudnason, V., Boada, M., Bis, J. C., et al. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 303(18), 1832-40. doi:10.1001/jama.2010.574
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375(6534), 754-60. doi:10.1038/375754a0
- Smyth, K. A., Fritsch, T., Cook, T. B., McClendon, M. J., Santillan, C. E., & Friedland, R. P. (2004). Worker functions and traits associated with occupations and the development of AD. *Neurology*, 63(3), 498-503. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304581>
- Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T. K., Tang, M. X., Wilder, D., & Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 271(13), 1004-10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8139057>
- Stranger, B. E., Forrest, M. S., Clark, A. G., Minichiello, M. J., Deutsch, S., Lyle, R., Hunt, S., et al. (2005). Genome-wide associations of gene expression variation in humans. *PLoS genetics*, 1(6), e78. doi:10.1371/journal.pgen.0010078
- Tanzi, R E, Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., Patterson, D., et al. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4791), 880-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2949367>
- Tanzi, R E, St George-Hyslop, P. H., Haines, J. L., Polinsky, R. J., Nee, L., Foncin, J. F., Neve, R. L., et al. (1987). The genetic defect in familial Alzheimer's disease is not tightly linked to the amyloid beta-protein gene. *Nature*, 329(6135), 156-7. doi:10.1038/329156a0

- Tateno, H., Li, H., Schur, M. J., Bovin, N., Crocker, P. R., Wakarchuk, W. W., & Paulson, J. C. (2007). Distinct endocytic mechanisms of CD22 (Siglec-2) and Siglec-F reflect roles in cell signaling and innate immunity. *Molecular and cellular biology*, 27(16), 5699-710. doi:10.1128/MCB.00383-07
- Teare, M. D., Dunning, A. M., Durocher, F., Rennart, G., & Easton, D. F. (2002). Sampling distribution of summary linkage disequilibrium measures. *Annals of human genetics*, 66(Pt 3), 223-33. doi:doi:10.1017/S0003480002001082
- Terwilliger, J. D., Haghighi, F., Hiekkalinna, T. S., & Göring, H. H. H. (2002). A bias-ed assessment of the use of SNPs in human complex traits. *Current opinion in genetics & development*, 12(6), 726-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433588>
- Truelsen, T., Thudium, D., & Grønbaek, M. (2002). Amount and type of alcohol and risk of dementia: the Copenhagen City Heart Study. *Neurology*, 59(9), 1313-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427876>
- Van Dam, F., & Van Gool, W. A. (n.d.). Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease: A systematic review. *Archives of gerontology and geriatrics*, 48(3), 425-30. doi:10.1016/j.archger.2008.03.009
- Verdile, G., Fuller, S., Atwood, C. S., Laws, S. M., Gandy, S. E., & Martins, R. N. (2004). The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 50(4), 397-409. doi:10.1016/j.phrs.2003.12.028
- Waring, S. C., & Rosenberg, R. N. (2008). Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 65(3), 329-34. doi:10.1001/archneur.65.3.329
- Warnick, G. R., Benderson, J., & Albers, J. J. (1982). Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clinical chemistry*, 28(6), 1379-88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7074948>
- Watanabe, M. (2002). Regulation of Smooth Muscle Cell Differentiation by AT-Rich Interaction Domain Transcription Factors Mrf2alpha and Mrf2beta. *Circulation Research*, 91(5), 382-389. doi:10.1161/01.RES.0000033593.05545.7B
- Webster, S., Bradt, B., Rogers, J., & Cooper, N. (1997). Aggregation state-dependent activation of the classical complement pathway by the amyloid beta peptide. *Journal of neurochemistry*, 69(1), 388-98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202333>
- Welsh, K. A., Butters, N., Mohs, R. C., Beekly, D., Edland, S., Fillenbaum, G., & Heyman, A. (1994). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part V. A normative study of the neuropsychological battery. *Neurology*, 44(4), 609-14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8164812>
- Westfall, P. H., & Young, S. S. (1993). *Resampling-Based Multiple Testing: Examples and Methods for p-Value Adjustment* (p. 360). John Wiley and Sons.

- Whitson, R. (2003). Neonatal mortality and leanness in mice lacking the ARID transcription factor Mrf-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(4), 997-1004. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.026
- Wichmann, H.-E., Gieger, C., & Illig, T. (2005). KORA-gen--resource for population genetics, controls and a broad spectrum of disease phenotypes. *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))*, 67 Suppl 1, S26-30. doi:10.1055/s-2005-858226
- Wiebe, D. A., & Bernert, J. T. (1984). Influence of incomplete cholesteryl ester hydrolysis on enzymic measurements of cholesterol. *Clinical chemistry*, 30(3), 352-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6697478>
- Wollstein, A., Herrmann, A., Wittig, M., Nothnagel, M., Franke, A., Nürnberg, P., Schreiber, S., et al. (2007). Efficacy assessment of SNP sets for genome-wide disease association studies. *Nucleic acids research*, 35(17), e113. doi:10.1093/nar/gkm621
- Xu, W. L., Qiu, C. X., Wahlin, A., Winblad, B., & Fratiglioni, L. (2004). Diabetes mellitus and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study. *Neurology*, 63(7), 1181-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15477535>
- Yamakawa, T., Sugimoto, K., Whitson, R. H., & Itakura, K. (2010). Modulator recognition factor-2 regulates triglyceride metabolism in adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(1), 277-81. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.049
- Yamakawa, T., Whitson, R. H., Li, S.-L., & Itakura, K. (2008). Modulator recognition factor-2 is required for adipogenesis in mouse embryo fibroblasts and 3T3-L1 cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(2), 441-53. doi:10.1210/me.2007-0271
- Yamazaki, T., Masuda, J., Omori, T., Usui, R., Akiyama, H., & Maru, Y. (2009). EphA1 interacts with integrin-linked kinase and regulates cell morphology and motility. *Journal of cell science*, 122(Pt 2), 243-55. doi:10.1242/jcs.036467
- van Duijn, C M, & Hofman, A. (1991). Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease. *BMJ (Clinical research ed.)*, 302(6791), 1491-4. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1670208&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- van Es, M. A., & van den Berg, L. H. (2009). Alzheimer's disease beyond APOE. *Nature genetics*, 41(10), 1047-8. doi:10.1038/ng1009-1047

7.2 Abkürzungsverzeichnis

3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
A	<u>A</u> denin
A β	beta amyloid Peptid
AD	Alzheimer Krankheit (<i>Alzheimer Disease</i>)
AD-IG	<i>German Alzheimer's Disease Integrated Genome Research Network</i>
ADGC	<i>Alzheimer's Disease Genetic Consortium</i>
ADNI	<i>Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative</i>
ADRNA	<i>Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
AflIII	Restriktionsenzym aus <i>Anabaena Flos-aquae</i>
APP	<u>A</u> myloid beta (A4) <u>P</u> recursor <u>P</u> rotein
Arg	<u>A</u> rgenin
AS	<u>A</u> minosäure
BMFSFJ	<u>B</u> undes <u>m</u> inisterium für <u>F</u> amilie, <u>S</u> enioren, <u>F</u> rauen und <u>J</u> ugend
bp	<u>B</u> asenpaare
C	<u>C</u> ytosin
CDR	<i>Clinical Dementia Rating</i>
CERAD	<i>The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
CHARGE	<i>Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology</i>
CSF	Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (<i>Liquor cerebrospinalis fluid</i>)
Cy3	Fluorochrom aus der Cyanin Familie (Grün)
Cy5	Fluorochrom aus der Cyanin Familie (Rot)
Cys	<u>C</u> ystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonuclein acid</i>)
dNTP	<u>D</u> esoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	<u>D</u> idesoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (<i>doublestrand desoxyribonuclein acid</i>)
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
EADI	<i>European Alzheimer's Disease Initiative</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOAD	<i>Early-Onset-Alzheimer-Disease</i>
EtOH	Ethanol
G	<u>G</u> uanin
GERAD	<i>Genetic and Environmental Risk in Alzheimer's Disease Consortium</i>
GWAS	<u>G</u> enom <u>w</u> eite <u>A</u> ssoziations- <u>S</u> tudie
HaeII	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus Aegyptius</i>
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HpaII	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus Parainfluenzae</i>
IBD	<i>identical by descent</i>
IBS	<i>identical by state</i>

Anhang

ICD	<i>International Classification of Disease</i>
kb	<i>Kilo Basen</i>
LD	<i>Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium)</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LOAD	<i>Late-Onset-Alzheimer-Disease</i>
LOD-score	<i>logarithm of the odds score</i>
MAF	<i>Frequenz des seltenen Allels (minor allele frequency)</i>
MALDI TOF MS	<i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry</i>
MBNT	<i>Modified Boston Naming Test</i>
MCV	<i>Volumen-Inhalt des Einzel-Erythrozyten (mean cellular volume)</i>
MDS	<i>Multidimensionale Skalierung (Multidimensional scaling)</i>
MgCl ₂	<i>Magnesiumchlorid</i>
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i>
MSDB	<i>mediale Septum / diagonale Band</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NGFN	<i>Nationales Genomforschungsnetz</i>
NINCDS	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke</i>
OD	<i>optische Dichte</i>
OR	<i>odds ratio</i>
PCR	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction)</i>
PSEN1	<i>Presenilin 1</i>
PSEN2	<i>Presenilin 2</i>
QC	<i>Qualitätskontrolle (quality control)</i>
RBC	<i>Red-Blood-Cell</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)</i>
RT	<i>Raumtemperatur (25°C)</i>
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SD	<i>Standardabweichung (standard deviation)</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)</i>
SNP	<i>Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)</i>
ssDNA	<i>einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (singlestrand desoxyribonuclein acid)</i>
T	<i>Thymin</i>
TBE	<i>TRIS-Borat-EDTA</i>
TGEN	<i>Translational Genomics Research Institute</i>
TSH	<i>Thyreoidea-stimulierendes Hormon</i>
V	<i>Volt</i>
VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i>
λ-DNA	<i>DNA aus der Bakteriophage Lambda</i>

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf der DNA Amplifizierung mittels „ <i>GenomiPhiDNA Amplification Kit</i> “	- 23 -
Abbildung 2: Schematische Darstellung und Gelelektrophorese der <i>APOE</i> Genotypisierung	- 28 -
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Illumina Infinium Assays	- 30 -
Abbildung 4: Schematischer Ablauf der iPLEX Reaktion	- 31 -
Abbildung 5: MALDI-TOF Messung	- 36 -
Abbildung 6 A-D: Darstellung der möglichen MALDI-TOF-MS Spektren.....	- 37 -
Abbildung 7: Schematisches Beispiel von LD zwischen zwei SNPs	- 41 -
Abbildung 8: Graphische Darstellung der p-Werte des <i>GAB2</i> Locus.....	- 49 -
Abbildung 9: LD und Haplotyp Struktur des <i>GAB2</i> Locus	- 50 -
Abbildung 10: Graphische Darstellung der p-Werte des <i>CHRNA2</i> Locus	- 51 -
Abbildung 11: LD und Haplotyp Struktur des <i>CHRNA2</i> Locus	- 52 -
Abbildung 12: Graphische Darstellung der p-Werte des <i>CH25H</i> Locus	- 53 -
Abbildung 13: LD und Haplotyp Struktur des <i>CH25H</i> Locus.....	- 54 -
Abbildung 14: Graphische Darstellung der p-Werte des <i>PGBDI</i> Locus.....	- 55 -
Abbildung 15: LD und Haplotyp Struktur des <i>PGBDI</i> Locus.....	- 56 -
Abbildung 16: Graphische Darstellung der p-Werte des <i>LMNA</i> Locus.....	- 57 -
Abbildung 17: LD und Haplotyp Struktur des <i>LMNA</i> Locus.....	- 58 -
Abbildung 18: Graphische Darstellung der p-Werte des <i>CST3</i> Locus.....	- 59 -
Abbildung 19: LD und Haplotyp Struktur des <i>CST3</i> Locus	- 60 -
Abbildung 20: Graphische Darstellung der p-Werte des <i>PCK1</i> Locus.....	- 61 -
Abbildung 21: LD und Haplotyp Struktur des <i>PCK1</i> Locus	- 62 -
Abbildung 22: Graphische Darstellung der p-Werte des <i>ACE</i> Locus	- 63 -
Abbildung 23: LD und Haplotyp Struktur des <i>ACE</i> Locus.....	- 64 -
Abbildung 24: Graphische Darstellung der p-Werte des <i>MAPT</i> Locus	- 65 -
Abbildung 25: LD und Haplotyp Struktur des <i>MAPT</i> Locus.....	- 66 -
Abbildung 26: Graphische Darstellung der p-Werte des <i>SORL1</i> Locus	- 67 -
Abbildung 27: LD und Haplotyp Struktur des <i>SORL1</i> Locus.....	- 68 -
Abbildung 28: LD und Haplotyp Struktur des <i>TACR2</i> Locus unserer Daten	- 71 -
Abbildung 29: LD-Struktur des <i>TACR2</i> Locus aus den HapMap Daten	- 72 -
Abbildung 30: Manhattan Plot der erweiterten Fall/Kontroll GWAS	- 74 -
Abbildung 31: Schematischer Aufbau der GERAD+ Studie	- 75 -
Abbildung 32: Schematische Darstellung der <i>ABCA7</i> Region	- 78 -
Abbildung 33: Schematische Darstellung des <i>MS4A</i> Gen Clusters	- 79 -
Abbildung 34: Graphische Darstellung der Assoziationen der <i>CR1</i> Region	- 83 -
Abbildung 35: Verteilung der A β ₄₂ Werte nach Genotypen (rs4310446)	- 83 -
Abbildung 36: Verteilung der A β ₄₂ Werte nach Genotypen (11-120952023).....	- 85 -
Abbildung 37: Verteilung der Triglyzerid bzw. Cholesterin Konzentration nach Genotypen ...	- 89 -

Abbildung 38: Manhattan Plot der erweiterten GWAS für den quantitativen Marker $A\beta_{42}$ im additiven Model.....	- 92 -
Abbildung 39: Graphische Darstellung der Normalverteilung der $A\beta_{42}$ Werte.....	- 93 -
Abbildung 40: Graphische Darstellung der <i>MS4A</i> Gen Cluster Region (rs610932).....	CXL
Abbildung 41: Graphische Darstellung der <i>MS4A</i> Gen Cluster Region (rs670139).....	CXLI
Abbildung 42: Graphische Darstellung der <i>MS4A</i> Gen Cluster Region (rs4938933).....	CXLI
Abbildung 43: Graphische Darstellung der <i>SORLI</i> Region (rs11218349).....	CXLII
Abbildung 44: Verteilung der Tau Protein Konzentrationen nach Genotypen (rs7909873)	CXLII
Abbildung 45: Verteilung der VLDL Konzentrationen nach Genotypen (rs11694743)..	CXLIV

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Quantitative Marker	- 17 -
Tabelle 2: Zusammenfassung der Kollektive	- 18 -
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte.....	- 19 -
Tabelle 4: Auflistung der Lösungen zur DNA-Isolierung.....	- 20 -
Tabelle 5: Auflistung sonstiger Puffer, Lösungen, Enzyme und Reagenzien.....	- 20 -
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Reaktionskits	- 21 -
Tabelle 7: Verwendete Software und Datenbanken	- 21 -
Tabelle 8: Reagenzien der PCR zur <i>APOE</i> -Genotypisierung	- 27 -
Tabelle 9: Thermocycler Programm zur Amplifizierung.....	- 27 -
Tabelle 10: Reagenzien der Standard PCR-Reaktion für den iPlex Assay	- 32 -
Tabelle 11: Thermocycler Protokoll der PCR-Reaktion	- 32 -
Tabelle 12: Reagenzien und deren Anteile in der SAP Reaktion	- 33 -
Tabelle 13: Reagenzien der Extensionreaktion	- 33 -
Tabelle 14: Thermocycler Protokoll der Extensionreaktion	- 33 -
Tabelle 15: Allgemeine Berechnung des <i>Odds Ratios</i>	- 38 -
Tabelle 16: Genotypverteilungen	- 39 -
Tabelle 17: Vier-Felder-Tafel zur Abschätzung von Haplotypfrequenzen.....	- 42 -
Tabelle 18: Einteilung der statistischen Modelle	- 44 -
Tabelle 19: Kodierung der Genotypen	- 44 -
Tabelle 20: Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse der untersuchten SNPs in der <i>TACR2</i> Region	- 70 -
Tabelle 21: Häufige Haplotypen, Frequenzen und Assoziationen zu AD	- 70 -
Tabelle 22: Vergleich der Allelfrequenzen für die Gene <i>BIN1</i> , <i>CLU</i> , <i>CRI</i> und <i>PICALM</i> .	- 73 -
Tabelle 23: Ergebnisse der zweiten Stufe der Meta-Analyse.....	- 76 -
Tabelle 24: Ergebnisse der dritten Studie der Meta-Analyse.....	- 77 -
Tabelle 25: Ergebnisse der Meta-Analyse der Stufen 1, 2 und 3.....	- 77 -
Tabelle 26: Analysierte Regionen	- 80 -
Tabelle 27: Ergebnisse der <i>CRI</i> Region für $A\beta_{42}$ als Endophänotyp	- 82 -
Tabelle 28: Ergebnisse der <i>SORLI</i> Region für Vitamin B12 als Endophänotyp.....	- 86 -

Tabelle 29: Ergebnisse der <i>ARID5B</i> Region für Tau Protein als Endophänotyp	- 87 -
Tabelle 30: Ergebnisse der <i>GOLM1</i> Region für Triglyzerid und Cholesterin als Endophänotyp	- 88 -
Tabelle 31: Ergebnisse der <i>LINGO1</i> Validierung	- 94 -
Tabelle 32: Zusammenfassung der Top 11 Kandidatengene	- 96 -
Tabelle 33: Liste der Kooperationspartner und deren Beteiligung an dieser Arbeit.....	CXXXI
Tabelle 34: Vollständige Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse	CXXXIII
Tabelle 35: Ergebnisse aus der ersten Stufe der Meta-Analyse in internationalen Konsortien	CXXXVIII
Tabelle 36: Ergebnisse der <i>MS4A</i> Region für A β ₄₂ als Endophänotyp	CXL
Tabelle 37: Ergebnisse der <i>BINI</i> Region für LDL und VLDL als Endophänotyp	CXLIII
Tabelle 38: Ergebnisse der <i>CD2AP</i> Region für 'Wortliste wiedergeben' und 'Wortliste lernen' als Endophänotyp	CXLIV

7.5 Weblinkverzeichnis

Weblink 1:

http://www.memoryclinic.ch/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=11&Itemid=16	- 14 -
Weblink 2: pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/	- 44 -
Weblink 3: r-project.org/	- 44 -
Weblink 4: mathgen.stats.ox.ac.uk/impute/impute_v2.html	- 45 -
Weblink 5: http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview	- 45 -
Weblink 6: http://www.alzgene.org/	- 47 -
Weblink 7: snpper.chip.org/	- 69 -
Weblink 8: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/150330	- 99 -

7.6 Erklärung an Eides statt

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die in Tabelle 33 aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich/entgeltlich geholfen: Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Ort, Datum

Unterschrift der/des Promovierenden

7.7 Kooperationen

Tabelle 33: Liste der Kooperationspartner und deren Beteiligung an dieser Arbeit

Die komplexe Arbeit in der genetischen Grundlagenforschung ist nur in Zusammenarbeit mit interdisziplinären Kooperationspartnern zu bewältigen, daher ist, in der folgenden Liste, eine genaue Aufstellung von Partnern und deren Beteiligung an dieser Arbeit gezeigt. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass Prof. Dr. med. Matthias Riemenschneider bei der Planung und Koordinierung sämtlicher Studien dieser Arbeit eine leitende Rolle trug, er stellte des weiteren Geräte sowie benötigte Gelder für Verbrauchsmaterialien zur Verfügung.

Kapitel	Bezeichnung	Aufgabe	Ort	Durchführung
4.1.2.1	„Initiale GWAS“	Blutabnahme	TU-München	Diensthabende Ärzte, Demenzambulanz, Psychiatrie, Prof. Dr. A. Kurz
4.1.2.1	„Initiale GWAS“	DNA-Extraktion	TU-München	Tamara Eisele
4.1.2.1	„Initiale GWAS“	neuropsychologische Tests	TU-München	Diensthabende Ärzte, Demenzambulanz, Psychiatrie, Prof. Dr. A. Kurz
4.1.2.1	„Initiale GWAS“	Blutabnahme	Kiel	PopGen Mitarbeiter, Susanna Nikolaus, Prof. Krawczak, Prof. Schreiber
4.1.2.1	„Initiale GWAS“	DNA-Extraktion	Kiel	PopGen Mitarbeiter, Susanna Nikolaus, Prof. Krawczak, Prof. Schreiber
4.1.2.1	„Initiale GWAS“	Genotypisierung	San Diego, CA, USA	Illumina
4.1.2.1	„Initiale GWAS“	QC	TU-München	Thomas Feulner / IMBIE Uni-Bonn, Prof. Dr. Thomas Wiencker
4.1.2.1	„Initiale GWAS“	Statistik	TU-München	Thomas Feulner / Sebastian Wurst / Caterina Riehle / Prof. Dr. Kuhn / Prof. Dr. Wagenpfeil
4.1.2.1	„Initiale GWAS“	Auswertung / Darstellung	TU-München	Thomas Feulner / Simon Laws
4.1.2.1	„Initiale GWAS“	Publikation	TU-München	Thomas Feulner / Simon Laws
4.1.2.2	TACR2	Blutabnahme	TU-München	Diensthabende Ärzte, Demenzambulanz, Psychiatrie, Prof. Dr. A. Kurz
4.1.2.2	TACR2	DNA-Extraktion	TU-München	Tamara Eisele
4.1.2.2	TACR2	Genotypisierung	TU-München	Thomas Feulner / Patricia Friedrich / Kerstin Eckart
4.1.2.2	TACR2	QC	TU-München	Thomas Feulner
4.1.2.2	TACR2	Statistik	TU-München	Thomas Feulner
4.1.2.2	TACR2	Auswertung	TU-München	Thomas Feulner
4.1.2.2	TACR2	Publikation	TU-München	Thomas Feulner / Patricia Friedrich / Simon Laws
4.1.2.3	„Erweiterte GWAS“	Blutabnahme	TU-München	Diensthabende Ärzte, Demenzambulanz, Psychiatrie, Prof. Dr. A. Kurz
4.1.2.3	„Erweiterte GWAS“	DNA-Extraktion	TU-München	Thomas Feulner / Tamara Eisele
4.1.2.3	„Erweiterte GWAS“	neuropsychologische Tests	TU-München	Diensthabende Ärzte, Demenzambulanz, Psychiatrie, Prof. Dr. A. Kurz
4.1.2.3	„Erweiterte GWAS“	Blutabnahme	Helmholtz Zentrum München	KORA Mitarbeiter, Prof. Dr. Dr. Erich Wichmann
4.1.2.3	„Erweiterte GWAS“	DNA-Extraktion	Helmholtz Zentrum München	KORA Mitarbeiter, Prof. Dr. Dr. Erich Wichmann
4.1.2.3	„Erweiterte GWAS“	Genotypisierung	Uniklinikum Tübingen	Microarray Facility, Dr. Michael Bonin
4.1.2.3	„Erweiterte GWAS“	QC	TU-München	Thomas Feulner / Caterina Riehle
4.1.2.3	„Erweiterte GWAS“	Statistik	TU-München	Thomas Feulner / Caterina Riehle
4.1.2.3	„Erweiterte GWAS“	Auswertung / Darstellung	TU-München	Thomas Feulner / Caterina Riehle
Tabelle 1	Quantitative Marker	Daten Erhebung	TU-München	Diensthabende Ärzte, Demenzambulanz, Psychiatrie, Prof. Dr. A. Kurz / Zentrallabor
Tabelle 1	Quantitative Marker	Datenverarbeitung	TU-München	Thomas Feulner
Tabelle 1	Quantitative Marker	Datenauswertung	TU-München	Thomas Feulner
4.1.2.5.1	München Kollektiv (Aß)	Blutabnahme	TU-München	Diensthabende Ärzte, Demenzambulanz, Psychiatrie, Prof. Dr. A. Kurz
4.1.2.5.1	München Kollektiv (Aß)	DNA-Extraktion	TU-München	Thomas Feulner / Cynthia Schiller
4.1.2.5.1	München Kollektiv (Aß)	Aß / Tau-Messungen	TU-München	Tamara Eisele
4.1.2.5.1	München Kollektiv (Aß)	Datenverarbeitung	TU-München	Thomas Feulner

Anhang

4.1.2.5.1	München Kollektiv (Aß)	Auswertung / Darstellung	TU-München	Thomas Feulner
4.1.2.5.1	München Kollektiv (Aß)	Genotypisierung	TU-München	Thomas Feulner
4.1.2.5.2	Schweden Kollektiv (Aß)	Blutabnahme	Universität Göteborg	Sahlgrenska Klinikum, Prof. Kaj Blennow
4.1.2.5.2	Schweden Kollektiv (Aß)	DNA-Extraktion	Universität Göteborg	Sahlgrenska Klinikum, Prof. Kaj Blennow
4.1.2.5.2	Schweden Kollektiv (Aß)	Aß / Tau-Messungen	Uniklinikum Homburg	Cynthia Schiller
4.1.2.5.2	Schweden Kollektiv (Aß)	Datenbearbeitung	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
4.1.2.5.2	Schweden Kollektiv (Aß)	Auswertung / Darstellung	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
4.1.2.5.2	Schweden Kollektiv (Aß)	Genotypisierung	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
4.1.3	Primer	Synthese	Regensburg	Invitrogen
4.2.2	Genomweite Ampifikation	DNA Amplifikation	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner / Cynthia Schiller
4.2.3	DNA QC	DNA QC	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
4.2.3	DNA QC	DNA QC	TU-München	Thomas Feulner
4.2.4	Erhebung klinischer Daten	Lumbalpunktion	TU-München	Diensthabende Ärzte, Demenzambulanz, Psychiatrie, Prof. Dr. A. Kurz
4.2.4	Erhebung klinischer Daten	Aß ELISA	TU-München	Tamara Eisele / Thomas Feulner
4.2.5	PCR	PCR	TU-München	Thomas Feulner
4.2.5	PCR	PCR	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
4.2.6	Gelelektrophorese	QC	TU-München	Thomas Feulner
4.2.6	Gelelektrophorese	QC	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
4.2.7.1	APOE Genotypisierung	Restriktion	TU-München	Thomas Feulner / Cynthia Schiller
4.2.7.1	APOE Genotypisierung	Restriktion	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner / Cynthia Schiller
4.2.8.3	QC / „Erweiterte GWAS“	QC	TU-München	Thomas Feulner / Caterina Riehle
4.2.8.3	Endophänotypen	QC	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
4.2.8.3	Endophänotypen	Statistik	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
4.2.8.3	Endophänotypen	Auswertung / Darstellung	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
4.2.8.4	Imputation	Rechnen	Leibniz-Rechenzentrum, Garching	Caterina Riehle
4.2.8.5	Sliding Window	Rechnen	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
4.2.8.5	Sliding Window	Auswertung / Darstellung	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
5.3.1	Internationales Konsortium	Auswertung / Darstellung	Universität Cardiff	Paul Hollingworth und Kollegen
5.3.1	Internationales Konsortium	Statistik	Universität Cardiff	Paul Hollingworth und Kollegen
5.3.1	Internationales Konsortium	Statistik	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner / Caterina Riehle
5.3.3	LINGO1 Locus	Manhattan Plot	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner / Caterina Riehle
5.3.3	LINGO1 Locus	QC	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner / Caterina Riehle
5.3.3	LINGO1 Locus	Statistik	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner / Caterina Riehle
5.3.3	LINGO1 Locus	Auswertung / Darstellung	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner / Caterina Riehle
5.3.2	Quantitative Marker Analysen	QC	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner
5.3.2	Quantitative Marker Analysen	Statistik	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner / Mathias Rubly
5.3.2	Quantitative Marker Analysen	Auswertung / Darstellung	Uniklinikum Homburg	Thomas Feulner

7.8 Ergänzende Ergebnisse der Kandidatengenanalyse (5.1.3)

Tabelle 34: Vollständige Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse

Dargestellt sind die Einzelmarkeranalysen der initialen GWAS der jeweiligen Kandidatengene. Aufgeführt ist pro SNP nur der niedrigste p-Wert der drei Modelle (additiv, dominant und rezessiv). Grau unterlegt sind p-Werte unter 0,05.

Locus	p-Wert	SNP #	Genomische Position	-log (p)	Model additiv(A) dominant(D) rezessiv(R)
CHRN2	0,02110	rs7556449	152772510	1,6757	R
CHRN2	0,32317	rs4845646	152776327	0,4906	R
CHRN2	0,01062	rs3811448	152783202	1,9737	R
CHRN2	0,57107	rs10908849	152790212	0,2433	D
CHRN2	0,03092	rs7543174	152794296	1,5098	R
CHRN2	0,29698	rs4845652	152804829	0,5273	R
CHRN2	0,15862	rs3811450	152817656	0,7996	R
CHRN2	0,88124	rs11264222	152820981	0,0549	R
CHRN2	0,97240	rs1127314	152822890	0,0122	R
CHRN2	0,15818	rs6677920	152826466	0,8009	D
CHRN2	0,02887	rs9427097	152835307	1,5396	R
CHRN2	0,12253	rs3766924	152838450	0,9117	R
CHRN2	0,35160	rs3738032	152840043	0,4539	R
CHRN2	0,79916	rs2229857	152840591	0,0974	R
CHRN2	0,57833	rs3766923	152843632	0,2378	D
CHRN2	0,69544	rs6699825	152849594	0,1577	D
CH25H	0,12167	rs7902290	90921582	0,9148	R
CH25H	0,32226	rs2841031	90929983	0,4918	R
CH25H	0,19305	rs10887926	90930338	0,7143	R
CH25H	0,11893	rs10887927	90930667	0,9247	R
CH25H	0,46964	rs4269843	90934196	0,3282	R
CH25H	0,54041	rs10788636	90934639	0,2673	D
CH25H	0,12399	rs10509567	90935736	0,9066	R
CH25H	0,66095	rs10788637	90935788	0,1798	R
CH25H	0,12331	rs7091822	90947383	0,9090	R
CH25H	0,01992	rs17117126	90954006	1,7008	R
CH25H	0,07635	rs4417181	90957073	1,1172	R
CH25H	0,35472	rs4933497	90958083	0,4501	R
CH25H	0,08844	rs11594137	90965187	1,0534	D
CH25H	0,42426	rs10749600	90967674	0,3724	D
CH25H	0,44677	rs11203038	90967739	0,3499	D
CH25H	0,41383	rs7908760	90967976	0,3832	D
CH25H	0,16003	rs6586174	90968250	0,7958	R
CH25H	0,03774	rs12780342	90971856	1,4232	R
CH25H	0,15990	rs7922269	90971867	0,7962	R
CH25H	0,12225	rs6586175	90972061	0,9128	D
CH25H	0,18841	rs12358054	90973268	0,7249	D
CH25H	0,13951	rs1556478	90973609	0,8554	R
CH25H	0,09172	rs2297472	90974970	1,0375	R
CH25H	0,10998	rs2254670	90976043	0,9587	R
CH25H	0,10490	rs2254636	90976987	0,9792	D
CH25H	0,25239	rs2071510	90977544	0,5979	D
CH25H	0,22043	rs1041389	90981159	0,6567	R
CH25H	0,20400	rs885561	90982084	0,6904	D
CH25H	0,60659	rs1029074	90989016	0,2171	D
CH25H	0,20214	rs11203047	90991106	0,6944	D
PGBD1	0,32210	rs1233710	28323425	0,4920	D
PGBD1	0,23635	rs2235359	28323620	0,6265	R
PGBD1	0,23645	rs2185955	28330959	0,6263	R
PGBD1	0,27740	rs12214383	28331710	0,5569	R
PGBD1	0,22427	rs12000	28335415	0,6492	R
PGBD1	0,34493	rs1635	28335583	0,4623	D
PGBD1	0,18365	rs9461446	28335612	0,7360	D
PGBD1	0,26717	rs1778507	28338696	0,5732	D
PGBD1	0,31341	rs2179174	28346948	0,5039	R
PGBD1	0,22272	rs1419183	28350773	0,6522	R

Anhang

PGBD1	0,63677	rs1150724	28358215	0,1960	R
PGBD1	0,65045	rs2142731	28358892	0,1868	D
PGBD1	0,10022	rs13211507	28365356	0,9991	D
PGBD1	0,01936	rs9461448	28371700	1,7130	D
PGBD1	0,99236	rs3800324	28372660	0,0033	D
PGBD1	0,09820	rs2743554	28373619	1,0079	A
PGBD1	0,24762	rs2281043	28376476	0,6062	R
PGBD1	0,37019	rs1997660	28377642	0,4316	R
PGBD1	0,44386	rs853693	28390627	0,3527	D
PGBD1	0,96287	rs4713159	28391751	0,0164	D
PGBD1	0,93916	rs742107	28398693	0,0273	R
PGBD1	0,28167	rs853684	28402529	0,5503	R
PGBD1	0,46281	rs853679	28404842	0,3346	R
PGBD1	0,46281	rs853676	28407666	0,3346	D
PGBD1	0,00811	rs17312661	28408315	2,0912	D
PGBD1	0,02887	rs7772827	28409122	1,5395	D
PGBD1	0,05234	rs1416920	28410763	1,2812	D
PGBD1	0,56432	rs9295769	28412548	0,2485	
LMNA	0,53568	rs3738593	154312597	0,2711	R
LMNA	0,02429	rs11578696	154323592	1,6146	D
LMNA	0,00029	rs9919256	154329156	3,5389	D
LMNA	0,44579	rs10737170	154330504	0,3509	D
LMNA	0,00587	rs915179	154344873	2,2310	D
LMNA	0,25101	rs2485662	154350092	0,6003	R
LMNA	0,69440	rs2485668	154368173	0,1584	D
LMNA	0,57031	rs2485664	154371961	0,2439	D
LMNA	0,26734	rs1468772	154383112	0,5729	R
LMNA	0,01106	rs12128066	154393992	1,9564	R
LMNA	0,14049	rs510441	154396592	0,8524	R
LMNA	0,05274	rs1984508	154398241	1,2779	D
LMNA	0,38255	rs11264452	154407556	0,4173	R
LMNA	0,01670	rs12401573	154412842	1,7773	D
MAPT	0,12818	rs11869096	41300889	0,8922	R
MAPT	0,02193	rs1158660	41301077	1,6590	R
MAPT	0,61654	rs4792891	41329294	0,2100	D
MAPT	0,06462	rs4792893	41341550	1,1897	D
MAPT	0,00712	rs1467967	41342006	2,1473	D
MAPT	0,38233	rs17563986	41347100	0,4176	R
MAPT	0,00141	rs3785880	41349204	2,8508	R
MAPT	0,19417	rs4792894	41355031	0,7118	D
MAPT	0,34211	rs16940742	41360752	0,4658	D
MAPT	0,08974	rs8078967	41363929	1,0470	R
MAPT	0,39655	rs11867549	41369064	0,4017	D
MAPT	0,04954	rs2435205	41374593	1,3050	D
MAPT	0,29128	rs242557	41375573	0,5357	R
MAPT	0,25559	rs3785883	41410269	0,5924	D
MAPT	0,25010	rs1981997	41412603	0,6019	D
MAPT	0,61396	rs2435211	41419081	0,2119	R
MAPT	0,12586	rs8079215	41420688	0,9001	D
MAPT	0,28399	rs2258689	41423219	0,5467	D
MAPT	0,25999	rs2435200	41427688	0,5850	R
MAPT	0,27794	rs8070723	41436901	0,5561	R
MAPT	0,14621	rs7220988	41465321	0,8350	R
MAPT	0,17097	rs1078997	41465690	0,7671	D
MAPT	0,01919	rs6503454	41474116	1,7169	D
MAPT	0,09277	rs4792827	41487141	1,0326	D
MAPT	0,19760	rs6503455	41496568	0,7042	D
PCK1	0,04443	rs12106016	55538936	1,3523	D
PCK1	0,02319	rs6025610	55543699	1,6347	D
PCK1	0,52391	rs6128069	55545020	0,2807	D
PCK1	0,86865	rs6070131	55546963	0,0612	D
PCK1	0,05963	rs6099671	55549131	1,2245	D
PCK1	0,10423	rs8119374	55552072	0,9820	D
PCK1	0,72290	rs4811873	55554835	0,1409	R
PCK1	0,07868	rs4811876	55557206	1,1041	R
PCK1	0,25798	rs1474758	55559297	0,5884	D
PCK1	0,16932	rs6092495	55559435	0,7713	D
PCK1	0,00332	rs17411904	55561336	2,4791	D
PCK1	0,08940	rs1543375	55564026	1,0486	R

Anhang

PCK1	0,41916	rs1328757	55568605	0,3776	D
PCK1	0,19657	rs6070157	55570590	0,7065	R
PCK1	0,65105	rs1040566	55571093	0,1864	D
PCK1	0,24223	rs8192708	55572027	0,6158	R
PCK1	0,15513	rs1804160	55572771	0,8093	R
PCK1	0,09510	rs2179706	55573277	1,0218	D
PCK1	0,35927	rs6015032	55581782	0,4446	D
PCK1	0,12039	rs6025639	55584143	0,9194	R
PCK1	0,16863	rs6025642	55587305	0,7731	R
PCK1	0,46974	rs1546913	55587441	0,3281	D
PCK1	0,55164	rs6025643	55589409	0,2583	D
PCK1	0,22411	rs6025645	55590747	0,6495	R
PCK1	0,69338	rs6015037	55590955	0,1590	D
PCK1	0,41283	rs6513317	55592682	0,3842	R
PCK1	0,30937	rs2064393	55593756	0,5095	D
PCK1	0,33370	rs4811880	55593981	0,4766	R
PCK1	0,39797	rs6123708	55594125	0,4002	D
PCK1	0,12881	rs13038139	55595004	0,8901	D
PCK1	0,23241	rs761345	55595537	0,6337	D
PCK1	0,66286	rs4810086	55597093	0,1786	D
PCK1	0,38783	rs6015040	55609667	0,4114	D
PCK1	0,11059	rs17413414	55609940	0,9563	A
CST3	0,45288	rs1158167	23526189	0,3440	R
CST3	0,72057	rs2983639	23534184	0,1423	R
CST3	0,22299	rs2983640	23534360	0,6517	D
CST3	0,18022	rs13043610	23534941	0,7442	R
CST3	0,73397	rs10485646	23540543	0,1343	R
CST3	0,26654	rs17751897	23540714	0,5742	R
CST3	0,39056	rs6036478	23559359	0,4083	R
CST3	0,26666	rs2424577	23561750	0,5740	D
CST3	0,41418	rs2145231	23573547	0,3828	R
CST3	0,21940	rs911122	23573746	0,6588	D
CST3	0,19625	rs8122922	23580776	0,7072	D
CST3	0,65144	rs2424590	23584980	0,1861	D
CST3	0,25390	rs13040731	23590389	0,5953	R
CST3	0,03186	rs16985615	23590427	1,4967	R
CST3	0,33025	rs3004153	23590458	0,4812	D
CST3	0,21057	rs2424595	23592387	0,6766	R
ACE	0,47553	rs2447449	58743676	0,3228	D
ACE	0,07802	rs4968762	58747932	1,1078	R
ACE	0,76706	rs2447447	58754541	0,1152	D
ACE	0,55920	rs4968767	58797676	0,2524	D
ACE	0,09666	rs1029765	58813016	1,0148	R
ACE	0,10604	rs4968772	58835351	0,9745	R
ACE	0,13250	rs17687734	58838777	0,8778	R
ACE	0,37483	rs3760257	58850203	0,4262	D
ACE	0,48502	rs4968647	58881409	0,3142	R
ACE	0,11997	rs8076157	58897593	0,9209	R
ACE	0,69110	rs4459609	58902680	0,1605	D
ACE	0,08896	rs4305	58911961	1,0508	D
ACE	0,75413	rs4309	58913655	0,1226	D
ACE	0,51938	rs4311	58914495	0,2845	D
ACE	0,81138	rs4329	58917190	0,0908	D
ACE	0,72123	rs4343	58919763	0,1419	D
ACE	0,87891	rs4353	58924154	0,0561	R
ACE	0,80685	rs4362	58927493	0,0932	R
ACE	0,65604	rs4461142	58931780	0,1831	R
ACE	0,35427	rs4267385	58937488	0,4507	D
ACE	0,44723	rs8066276	58942997	0,3495	D
ACE	0,27197	rs12451328	58950280	0,5655	R
ACE	0,43042	rs867640	58955677	0,3661	D
ACE	0,16297	rs9914151	58959018	0,7879	R
ACE	0,17883	rs7221979	58968249	0,7476	D
ACE	0,08781	rs4968656	58970691	1,0565	R
ACE	0,23944	rs6504165	58983808	0,6208	R
GAB2	0,58238	rs3133324	77576745	0,2348	R
GAB2	0,52916	rs2450132	77584034	0,2764	R
GAB2	0,06909	rs2510044	77586662	1,1606	D
GAB2	0,20894	rs2511188	77598578	0,6800	R

Anhang

GAB2	0,32366	rs2450135	77605643	0,4899	R
GAB2	0,26182	rs1318241	77608440	0,5820	D
GAB2	0,32572	rs2450129	77618033	0,4872	D
GAB2	0,48545	rs731600	77640781	0,3139	D
GAB2	0,45709	rs1893447	77650830	0,3400	R
GAB2	0,32849	rs2511175	77652729	0,4835	D
GAB2	0,07134	rs1981405	77653856	1,1466	R
GAB2	0,53384	rs7927923	77657062	0,2726	D
GAB2	0,43837	rs4945261	77667908	0,3582	D
GAB2	0,33614	rs7107174	77675584	0,4735	D
GAB2	0,42580	rs4944196	77686379	0,3708	D
GAB2	0,30579	rs6592772	77693211	0,5146	D
GAB2	0,37369	rs10899469	77695961	0,4275	D
GAB2	0,64282	rs11237451	77703107	0,1919	R
GAB2	0,25216	rs2292572	77730512	0,5983	D
GAB2	0,34544	rs10501426	77734770	0,4616	D
GAB2	0,06848	rs11601726	77745687	1,1645	R
GAB2	0,23026	rs11603112	77751139	0,6378	D
GAB2	0,29086	rs7112234	77780118	0,5363	D
GAB2	0,27450	rs7941639	77794607	0,5615	D
GAB2	0,29028	rs10899496	77801479	0,5372	D
GAB2	1,00000	rs7934948	77825022	0,0000	D
GAB2	0,30110	rs7950865	77835049	0,5213	D
SORL1	0,33811	rs7937444	120774936	0,4709	D
SORL1	0,51145	rs297517	120799570	0,2912	R
SORL1	0,02119	rs12576704	120804498	1,6740	D
SORL1	0,07431	rs17125333	120807856	1,1290	D
SORL1	0,05948	rs668053	120813735	1,2256	R
SORL1	0,04505	rs4935774	120826964	1,3463	D
SORL1	0,44015	rs661057	120834164	0,3564	R
SORL1	0,27966	rs4936632	120840938	0,5534	R
SORL1	0,38549	rs7945931	120846472	0,4140	R
SORL1	0,42707	rs11218301	120847297	0,3695	D
SORL1	0,21795	rs11600875	120862178	0,6616	D
SORL1	0,91047	rs4631890	120863571	0,0407	D
SORL1	0,24728	rs676759	120864475	0,6068	D
SORL1	0,49597	rs2298525	120866225	0,3045	D
SORL1	0,16036	rs2101756	120874460	0,7949	D
SORL1	0,46776	rs689021	120876330	0,3300	R
SORL1	0,11494	rs4935775	120894712	0,9395	R
SORL1	0,46630	rs2298813	120898894	0,3313	D
SORL1	0,36110	rs666004	120903788	0,4424	D
SORL1	0,55201	rs11501162	120905972	0,2580	R
SORL1	0,61122	rs11218322	120907595	0,2138	D
SORL1	0,22149	rs3781827	120916251	0,6547	R
SORL1	0,52053	rs11601559	120918047	0,2836	R
SORL1	0,17714	rs2276346	120919686	0,7517	R
SORL1	0,03149	rs10502262	120920522	1,5019	D
SORL1	0,85107	rs556349	120931417	0,0700	D
SORL1	0,39927	rs11605969	120936082	0,3987	R
SORL1	0,30283	rs7124060	120941176	0,5188	D
SORL1	0,08961	rs3781832	120941480	1,0476	D
SORL1	0,36861	rs1790213	120947399	0,4334	R
SORL1	0,27045	rs1699105	120947829	0,5679	D
SORL1	0,35432	rs3781834	120951150	0,4506	D
SORL1	0,66028	rs4420280	120951269	0,1803	D
SORL1	0,56508	rs4936637	120952398	0,2479	R
SORL1	0,42314	rs2070045	120953300	0,3735	D
SORL1	0,02925	rs3781835	120953464	1,5338	D
SORL1	0,35655	rs1699102	120962172	0,4479	D
SORL1	0,23500	rs1620003	120978203	0,6289	D
SORL1	0,83595	rs12287339	120979235	0,0778	D
SORL1	0,28472	rs7101373	120984895	0,5456	D
SORL1	0,35753	rs726601	120986617	0,4467	D
SORL1	0,13532	rs1503415	120991762	0,8686	R
SORL1	0,03265	rs1614735	120998211	1,4861	R
SORL1	0,74711	rs1133174	121006965	0,1266	D
SORL1	0,56493	rs1532763	121010533	0,2480	D
SORL1	0,67795	rs12279135	121020437	0,1688	D

Anhang

SORL1	0,24188	rs11606903	121025447	0,6164	A
SORL1	0,86089	rs626747	121027054	0,0651	D
SORL1	0,53740	rs676165	121030877	0,2697	R
SORL1	0,54757	rs1783832	121038211	0,2616	R

7.9 Ergebnisse der internationalen Meta-Studie

Tabelle 35: Ergebnisse aus der ersten Stufe der Meta-Analyse in internationalen Konsortien

Angegeben sind die einzelnen Ergebnisse zu den 61 SNPs der GERAD1, EADI1, ADNI und TGEN Kohorten aus der ersten Stufe der Meta-Analyse.

CHR	BP	A1	A2	GERAD1				EADI1			
				Frequenz A1	OR	95%CI	P	Frequenz A1	OR	95%CI	P
1	207 377 891	T	C	0.20	1.12	1.04-1.20	3.6E-03	0.22	1.17	1.07-1.28	5.8E-04
1	207 390 204	T	C	0.20	1.11	1.03-1.20	4.8E-03	0.22	1.17	1.07-1.28	6.5E-04
1	207 653 395	C	A	0.16	1.12	1.04-1.21	1.8E-03	0.17	1.18	1.07-1.30	8.0E-04
1	207 676 604	C	T	0.19	1.10	1.02-1.18	1.0E-02	0.19	1.19	1.08-1.30	2.1E-04
1	207 784 968	A	G	0.19	1.16	1.08-1.24	3.7E-05	0.19	1.28	1.17-1.40	8.5E-08
1	207 786 289	A	G	0.19	1.17	1.09-1.25	8.7E-06	0.19	1.25	1.14-1.37	1.1E-06
1	207 804 141	A	C	0.19	1.17	1.09-1.25	8.3E-06	0.19	1.25	1.14-1.37	1.7E-06
2	127 894 615	G	A	0.29	1.16	1.10-1.24	1.4E-06	0.29	1.15	1.06-1.25	5.7E-04
8	27 464 519	T	C	0.39	0.84	0.79-0.89	1.4E-09	0.38	0.81	0.75-0.87	5.2E-08
10	62 523 470	A	G	0.31	1.26	1.13-1.40	1.6E-05	0.32	1.12	1.03-1.21	4.4E-03
11	59 936 979	G	A	0.46	0.89	0.84-0.94	2.5E-05	0.48	0.94	0.87-1.01	7.0E-02
11	59 939 307	T	G	0.42	0.87	0.82-0.92	1.5E-06	0.44	0.93	0.86-1.00	4.6E-02
11	59 942 757	C	T	0.43	0.88	0.83-0.93	5.2E-06	0.45	0.95	0.88-1.02	1.5E-01
11	59 947 252	C	T	0.43	0.88	0.83-0.93	5.3E-06	0.45	0.95	0.88-1.02	1.6E-01
11	59 962 166	A	G	0.40	0.88	0.83-0.94	7.9E-05	0.42	0.95	0.88-1.02	1.4E-01
11	59 971 795	T	G	0.41	1.13	1.06-1.21	8.7E-05	0.38	1.06	0.99-1.14	1.2E-01
11	59 975 078	T	C	0.40	0.88	0.83-0.94	8.3E-05	0.42	0.95	0.89-1.02	1.7E-01
11	60 001 573	C	T	0.41	1.14	1.08-1.20	6.3E-06	0.38	1.04	0.98-1.12	2.1E-01
11	60 023 087	C	A	0.41	0.88	0.83-0.93	1.0E-05	0.42	0.96	0.89-1.03	2.4E-01
11	85 757 589	C	T	0.32	0.88	0.83-0.93	1.6E-05	0.31	0.88	0.82-0.96	3.0E-03
11	85 787 824	C	T	0.31	0.86	0.80-0.92	3.5E-06	0.30	0.88	0.81-0.96	3.7E-03
11	85 788 351	C	T	0.31	0.87	0.82-0.92	2.3E-06	0.30	0.88	0.81-0.96	3.5E-03
11	85 815 030	G	A	0.34	0.87	0.82-0.92	1.1E-06	0.33	0.94	0.87-1.01	1.1E-01
11	85 820 077	A	G	0.33	0.86	0.81-0.91	6.9E-07	0.31	0.93	0.86-1.01	9.1E-02
11	85 824 859	A	G	0.37	0.86	0.81-0.92	3.6E-06	0.36	0.93	0.86-1.01	7.1E-02
11	85 858 538	G	A	0.31	0.84	0.79-0.90	2.1E-07	0.30	0.91	0.84-0.99	2.4E-02
11	85 868 640	T	C	0.36	0.85	0.80-0.90	1.9E-08	0.35	0.92	0.85-0.99	3.1E-02
11	99 757 729	G	T	0.20	1.16	1.08-1.24	2.3E-05	0.21	1.10	1.02-1.19	1.2E-02
12	111 725 185	A	C	0.13	1.12	1.03-1.21	5.4E-03	0.11	1.23	1.11-1.37	1.0E-04
16	19 716 505	A	G	0.39	1.07	1.01-1.13	3.1E-02	0.39	1.19	1.10-1.28	9.9E-06
16	19 743 649	C	T	0.17	0.91	0.85-0.98	1.5E-02	0.18	0.80	0.72-0.88	1.6E-05
16	19 759 007	C	A	0.17	0.92	0.85-0.99	2.1E-02	0.19	0.80	0.72-0.88	5.4E-06
16	19 792 598	T	C	0.17	0.93	0.86-1.01	8.0E-02	0.18	0.80	0.72-0.88	2.3E-05
16	19 800 213	C	T	0.17	0.91	0.84-0.98	1.1E-02	0.18	0.80	0.72-0.89	2.4E-05
19	1 046 520	G	T	0.10	1.24	1.12-1.38	4.1E-05	0.11	1.21	1.08-1.37	1.0E-03
19	45 231 478	A	G	0.23	0.91	0.85-0.97	4.7E-03	0.27	0.82	0.75-0.90	6.5E-06
19	45 146 103	C	T	0.25	0.88	0.83-0.94	7.4E-05	0.27	0.90	0.84-0.97	3.4E-03
19	45 237 812	C	T	0.31	0.86	0.81-0.91	4.6E-07	0.35	0.78	0.72-0.85	1.9E-09
19	45 242 107	A	G	0.23	1.25	1.17-1.33	3.0E-11	0.22	1.21	1.11-1.32	2.9E-05
19	45 247 627	G	A	0.07	0.77	0.68-0.87	2.8E-05	0.06	0.73	0.61-0.87	5.7E-04
19	45 254 168	A	C	0.14	1.24	1.14-1.35	2.9E-07	0.13	1.28	1.15-1.42	4.1E-06
19	45 326 768	T	C	0.37	0.89	0.84-0.95	1.2E-04	0.38	0.89	0.82-0.96	2.6E-03
19	45 329 214	G	T	0.34	1.36	1.29-1.44	1.5E-26	0.32	1.36	1.26-1.48	8.5E-15
19	45 351 746	G	A	0.38	0.85	0.80-0.90	1.3E-08	0.39	0.82	0.76-0.89	2.0E-06
19	45 362 667	A	G	0.40	1.20	1.14-1.27	8.4E-11	0.39	1.10	1.02-1.18	1.2E-02
19	45 370 838	A	G	0.16	0.81	0.75-0.88	7.7E-07	0.17	0.81	0.73-0.90	6.8E-05
19	45 382 034	A	G	0.46	1.46	1.38-1.54	7.0E-41	0.44	1.31	1.22-1.41	3.8E-13
19	45 395 266	G	A	0.35	0.63	0.59-0.67	9.6E-54	0.37	0.62	0.57-0.67	5.1E-33
19	45 395 619	G	A	0.20	2.53	2.37-2.71	1.8E-157	0.15	3.17	2.86-3.51	1.2E-130
19	45 401 666	G	A	0.37	0.68	0.64-0.72	5.4E-39	0.40	0.66	0.61-0.71	6.5E-27
19	45 408 836	G	T	0.49	0.70	0.66-0.74	4.9E-37	0.48	1.38	1.28-1.49	5.3E-18
19	45 414 451	T	C	0.33	0.72	0.68-0.77	2.7E-23	0.36	0.63	0.58-0.69	5.1E-31
19	45 448 465	G	T	0.36	1.17	1.11-1.24	3.4E-08	0.37	1.09	1.01-1.18	1.9E-02
19	45 457 180	C	T	0.47	1.15	1.09-1.22	4.0E-07	0.46	1.12	1.04-1.20	2.8E-03
19	45 482 884	C	T	0.49	0.89	0.84-0.94	7.8E-05	0.49	1.10	1.02-1.19	9.2E-03
19	45 483 438	C	A	0.33	1.16	1.09-1.23	6.1E-06	0.35	1.11	1.03-1.20	4.6E-03
19	45 636 201	T	C	0.10	1.31	1.20-1.43	2.2E-09	0.10	1.12	1.00-1.26	4.6E-02
19	45 640 124	G	A	0.23	1.15	1.08-1.23	1.9E-05	0.22	1.09	0.98-1.20	1.0E-01
19	45 650 386	T	C	0.10	1.32	1.20-1.44	1.5E-09	0.09	1.17	1.04-1.33	9.4E-03
19	45 708 758	G	A	0.16	1.15	1.07-1.25	3.9E-04	0.14	1.18	1.07-1.31	1.1E-03
19	45 708 888	C	T	0.17	1.16	1.08-1.25	5.2E-05	0.14	1.19	1.07-1.32	1.0E-03

Anhang

CHR	BP	A1	A2	ADNI				TGEN1			
				Frequenz A1	OR	95%CI	P	Frequenz A1	OR	95%CI	P
1	207 377 891	T	C	0.21	1.28	0.88-1.88	2.0E-01	0.23	1.18	0.93-1.50	1.6E-01
1	207 390 204	T	C	0.21	1.27	0.87-1.85	2.2E-01	0.23	1.20	0.95-1.52	1.2E-01
1	207 653 395	C	A	0.14	1.45	0.93-2.26	1.0E-01	0.16	1.39	1.04-1.87	2.6E-02
1	207 676 604	C	T	0.18	1.44	0.96-2.16	7.8E-02	0.19	1.25	0.96-1.63	9.4E-02
1	207 784 968	A	G	0.19	1.58	1.06-2.35	2.4E-02	0.21	1.20	0.94-1.53	1.4E-01
1	207 786 289	A	G	0.19	1.58	1.06-2.35	2.4E-02	0.21	1.20	0.94-1.53	1.4E-01
1	207 804 141	A	C	0.18	1.66	1.11-2.49	1.5E-02	0.21	1.20	0.94-1.53	1.4E-01
2	127 894 615	G	A	0.32	1.13	0.83-1.56	4.4E-01	0.32	1.35	1.05-1.73	1.7E-02
8	27 464 519	T	C	0.39	0.93	0.68-1.27	6.4E-01	0.38	0.80	0.61-1.05	1.0E-01
10	62 523 470	A	G	0.28	1.12	0.80-1.58	5.1E-01	0.32	1.07	0.86-1.34	5.4E-01
11	59 936 979	G	A	0.45	0.96	0.70-1.31	7.8E-01	0.45	0.76	0.62-0.93	6.4E-03
11	59 939 307	T	G	0.40	0.88	0.64-1.22	4.5E-01	0.42	0.74	0.60-0.90	2.8E-03
11	59 942 757	C	T	0.40	0.92	0.67-1.27	6.2E-01	0.42	0.75	0.61-0.91	3.9E-03
11	59 947 252	C	T	0.40	0.92	0.67-1.27	6.2E-01	0.42	0.75	0.61-0.91	3.9E-03
11	59 962 166	A	G	0.37	0.91	0.66-1.26	5.8E-01	0.40	0.72	0.59-0.88	1.3E-03
11	59 971 795	T	G	0.43	1.08	0.78-1.49	6.6E-01	0.41	1.26	1.03-1.54	2.3E-02
11	59 975 078	T	C	0.37	0.89	0.64-1.23	4.7E-01	0.40	0.72	0.59-0.88	1.1E-03
11	60 001 573	C	T	0.43	1.07	0.77-1.49	6.7E-01	0.41	1.27	1.04-1.55	2.0E-02
11	60 023 087	C	A	0.38	0.96	0.69-1.32	7.8E-01	0.40	0.71	0.58-0.87	6.7E-04
11	85 757 589	C	T	0.32	1.02	0.73-1.43	9.0E-01	0.31	0.91	0.73-1.12	3.5E-01
11	85 787 824	C	T	0.31	0.98	0.70-1.38	9.3E-01	0.30	0.90	0.73-1.11	3.4E-01
11	85 788 351	C	T	0.31	1.00	0.72-1.40	9.9E-01	0.30	0.90	0.73-1.11	3.4E-01
11	85 815 030	G	A	0.35	1.03	0.75-1.42	8.4E-01	0.34	0.91	0.74-1.11	3.6E-01
11	85 820 077	A	G	0.33	0.92	0.66-1.29	6.4E-01	0.32	0.88	0.72-1.08	2.2E-01
11	85 824 859	A	G	0.38	1.07	0.77-1.47	7.0E-01	0.35	0.93	0.76-1.13	4.5E-01
11	85 858 538	G	A	0.31	0.90	0.64-1.27	5.4E-01	0.30	0.84	0.69-1.04	1.0E-01
11	85 868 640	T	C	0.35	0.83	0.60-1.16	2.8E-01	0.35	0.82	0.67-1.01	6.3E-02
11	99 757 729	G	T	0.21	1.38	0.94-2.01	1.0E-01	0.20	1.00	0.75-1.33	1.0E+00
12	111 725 185	A	C	0.12	1.34	0.83-2.16	2.3E-01	0.15	1.23	0.93-1.63	1.5E-01
16	19 716 505	A	G	0.40	1.01	0.75-1.36	9.5E-01	0.46	1.38	1.02-1.87	3.6E-02
16	19 743 649	C	T	0.17	0.92	0.61-1.38	6.8E-01	0.18	0.73	0.58-0.94	1.4E-02
16	19 759 007	C	A	0.20	1.03	0.71-1.48	9.0E-01	0.18	0.73	0.57-0.93	1.2E-02
16	19 792 598	T	C	0.17	0.92	0.62-1.39	7.0E-01	0.18	0.71	0.55-0.9	5.8E-03
16	19 800 213	C	T	0.17	0.92	0.61-1.38	6.8E-01	0.18	0.71	0.55-0.91	5.9E-03
19	1 046 520	G	T	0.08	1.01	0.58-1.75	9.7E-01	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 231 478	A	G	0.25	1.00	0.69-1.44	9.9E-01	0.28	1.14	0.81-1.60	4.6E-01
19	45 146 103	C	T	0.30	0.70	0.50-0.96	2.9E-02	0.23	1.35	0.90-2.03	1.4E-01
19	45 237 812	C	T	0.33	1.00	0.72-1.40	9.9E-01	0.36	1.11	0.82-1.51	4.9E-01
19	45 242 107	A	G	0.24	1.25	0.87-1.78	2.2E-01	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 247 627	G	A	0.05	0.83	0.39-1.76	6.3E-01	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 254 168	A	C	0.14	1.63	1.06-2.51	2.8E-02	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 326 768	T	C	0.36	1.10	0.81-1.49	5.5E-01	0.36	0.86	0.70-1.06	1.5E-01
19	45 329 214	G	T	0.36	0.94	0.69-1.28	6.9E-01	0.36	1.22	0.99-1.50	5.5E-02
19	45 351 746	G	A	0.36	0.94	0.69-1.28	6.9E-01	0.38	0.84	0.62-1.14	2.6E-01
19	45 362 667	A	G	0.42	1.07	0.77-1.48	6.9E-01	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 370 838	A	G	0.13	0.99	0.62-1.59	9.7E-01	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 382 034	A	G	0.47	1.39	1.02-1.89	3.9E-02	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 395 266	G	A	0.31	0.46	0.32-0.66	1.7E-05	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 395 619	G	A	0.22	3.07	2.05-4.61	6.3E-08	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 401 666	G	A	0.33	0.79	0.56-1.11	1.7E-01	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 408 836	G	T	0.47	0.72	0.52-1.01	5.4E-02	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 414 451	T	C	0.32	0.47	0.33-0.66	1.9E-05	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 448 465	G	T	0.37	1.29	0.92-1.82	1.4E-01	0.33	1.11	0.77-1.61	5.8E-01
19	45 457 180	C	T	0.48	1.25	0.91-1.73	1.7E-01	0.43	1.13	0.79-1.61	5.0E-01
19	45 482 884	C	T	0.49	0.85	0.62-1.17	3.1E-01	0.53	0.95	0.71-1.28	7.3E-01
19	45 483 438	C	A	0.34	1.23	0.87-1.74	2.4E-01	0.35	1.06	0.82-1.36	6.6E-01
19	45 636 201	T	C	0.10	1.20	0.72-1.99	4.9E-01	0.11	2.18	1.53-3.11	4.7E-06
19	45 640 124	G	A	0.24	0.91	0.63-1.31	6.0E-01	0.25	1.46	1.16-1.84	1.3E-03
19	45 650 386	T	C	0.10	1.12	0.66-1.87	6.8E-01	0.11	2.20	1.53-3.17	6.0E-06
19	45 708 758	G	A	0.17	1.29	0.85-1.95	2.4E-01	N/A	N/A	N/A	N/A
19	45 708 888	C	T	0.17	1.29	0.85-1.95	2.4E-01	N/A	N/A	N/A	N/A

7.10 Zusätzliche Ergebnisse der quantitativen Marker Analysen

Tabelle 36: Ergebnisse der *MS4A* Region für $A\beta_{42}$ als Endophänotyp

Locus	SNP	Position Chr11	major	hetero + minor	n major	n hetero +minor	Call-rate	MAF	p SNP	Mittel abeta42 [pg/ml CSF] major	Mittel abeta42 [pg/ml CSF] hetero+minor	% Abnahme
MS4A	11 60015605	60015605	CC	TC/TT	31	66	0.915	0.428	1.72E-03	404	531	23.9
MS4A	rs2155710	60025816	TT	CT/CC	38	57	0.896	0.353	1.77E-03	404	541	25.4
MS4A	rs11230334	59989587	CC	GC/GG	29	77	1.000	0.462	3.24E-03	395	522	24.2
MS4A	rs1051593	59994567	TT	CT/CC	29	76	0.991	0.462	3.42E-03	395	522	24.3
MS4A	rs2298553	60021578	CC	TC/TT	32	74	1.000	0.443	5.46E-03	404	523	22.7
MS4A	rs4939368	60012624	AA	TA/TT	31	74	0.991	0.452	6.16E-03	404	523	22.7
MS4A	rs11604104	60013877	GG	AG/AA	31	74	0.991	0.452	6.16E-03	404	523	22.7
MS4A	rs4939370	60013976	CC	TC/TT	31	74	0.991	0.452	6.16E-03	404	523	22.7
MS4A	rs7951049	60018918	GG	AG/AA	31	73	0.981	0.447	6.56E-03	404	522	22.6
MS4A	rs1051594	59994630	CC	TC/TT	31	75	1.000	0.453	6.60E-03	404	521	22.4
MS4A	rs11230342	60018498	TT	AT/AA	31	65	0.906	0.417	7.72E-03	404	527	23.3
MS4A	rs11230255	59846723	GG	AG/AA	46	56	0.962	0.338	8.18E-03	554	442	20.4
MS4A	rs11560964	59846887	TT	GT/GG	46	56	0.962	0.338	8.18E-03	554	442	20.4
MS4A	rs11560913	59846965	TT	CT/CC	46	56	0.962	0.338	8.18E-03	554	442	20.4
MS4A	rs11230256	59847614	AA	GA/GG	46	56	0.962	0.338	8.18E-03	554	442	20.4
MS4A	rs11230257	59847683	CC	AC/AA	46	56	0.962	0.338	8.18E-03	554	442	20.4
MS4A	rs4939383	60028950	GG	AG/AA	31	73	0.981	0.447	9.24E-03	408	522	21.9
MS4A	rs4146870	59988562	GG	AG/AA	29	69	0.925	0.444	3.64E-04	395	530	25.4
MS4A	rs1051461	59993810	TT	CT/CC	45	52	0.915	0.320	9.18E-04	428	554	22.8

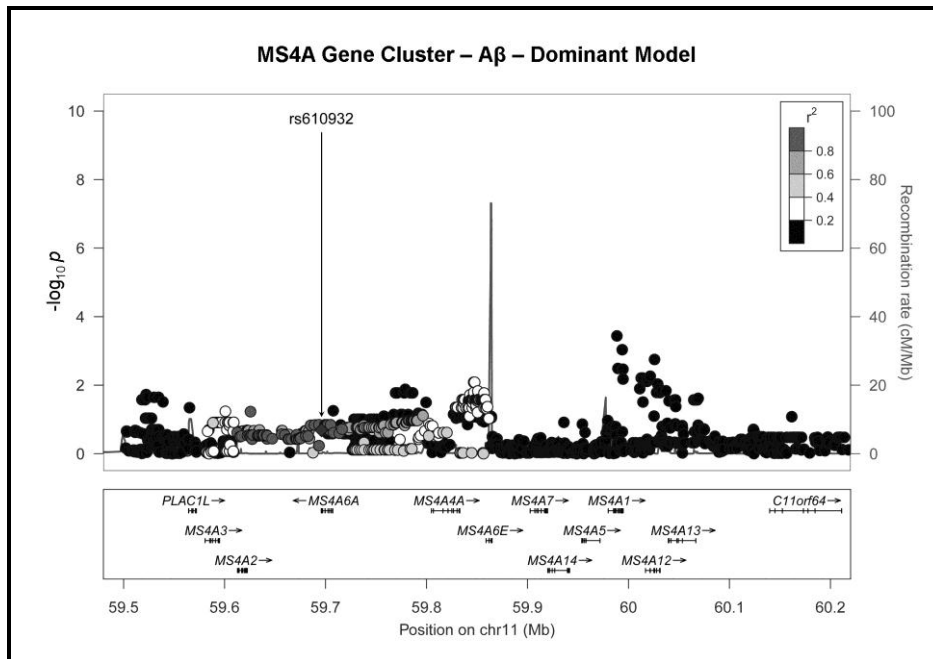


Abbildung 40: Graphische Darstellung der *MS4A* Gen Cluster Region (rs610932)

$-\log p$ -Werte sind auf der linken y-Achse und die genomische Position auf der x-Achse dargestellt. Die rechte y-Achse gibt die Rekombinationsrate an. Der SNP rs610932 der zuvor von (Hollingworth et al., 2011) identifiziert wurde, ist durch ein Viereck gekennzeichnet. Die LD Berechnungen beziehen sich auf diesen SNP. Diese Grafik wurde mit Hilfe der LocusZoom Software erstellt (Pruim et al., 2010).

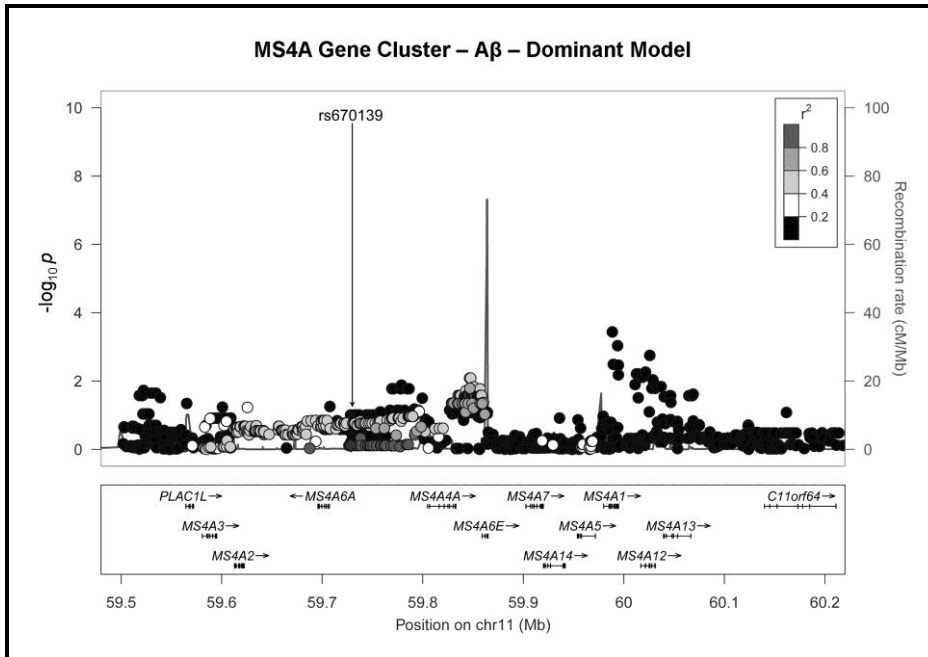


Abbildung 41: Graphische Darstellung der *MS4A* Gen Cluster Region (rs670139)

-log p-Werte sind auf der linken y-Achse und die genomische Position auf der x-Achse dargestellt. Die rechte y-Achse gibt die Rekombinationsrate an. Der SNP rs610932 der zuvor von (Hollingworth et al., 2011) identifiziert wurde, ist durch ein Viereck gekennzeichnet. Die LD Berechnungen beziehen sich auf diesen SNP. Diese Grafik wurde mit Hilfe der LocusZoom Software erstellt (Pruim et al., 2010).

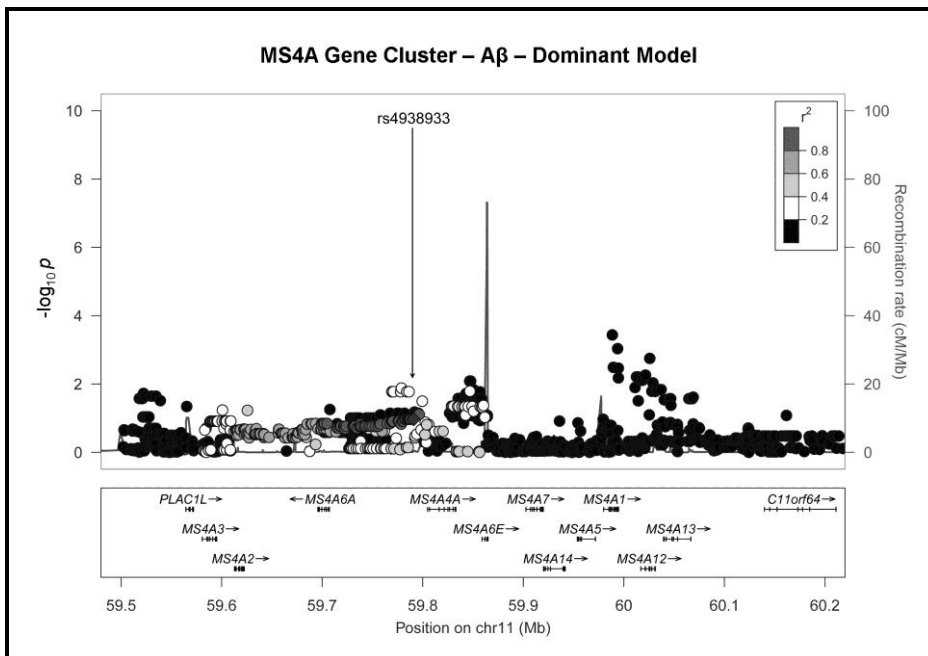


Abbildung 42: Graphische Darstellung der *MS4A* Gen Cluster Region (rs4938933)

-log p-Werte sind auf der linken y-Achse und die genomische Position auf der x-Achse dargestellt. Die rechte y-Achse gibt die Rekombinationsrate an. Der SNP rs4938933 der zuvor von (Naj et al., 2011) identifiziert wurde, ist durch ein Viereck gekennzeichnet. Die LD Berechnungen beziehen sich auf diesen SNP. Diese Grafik wurde mit Hilfe der LocusZoom Software erstellt (Pruim et al., 2010).

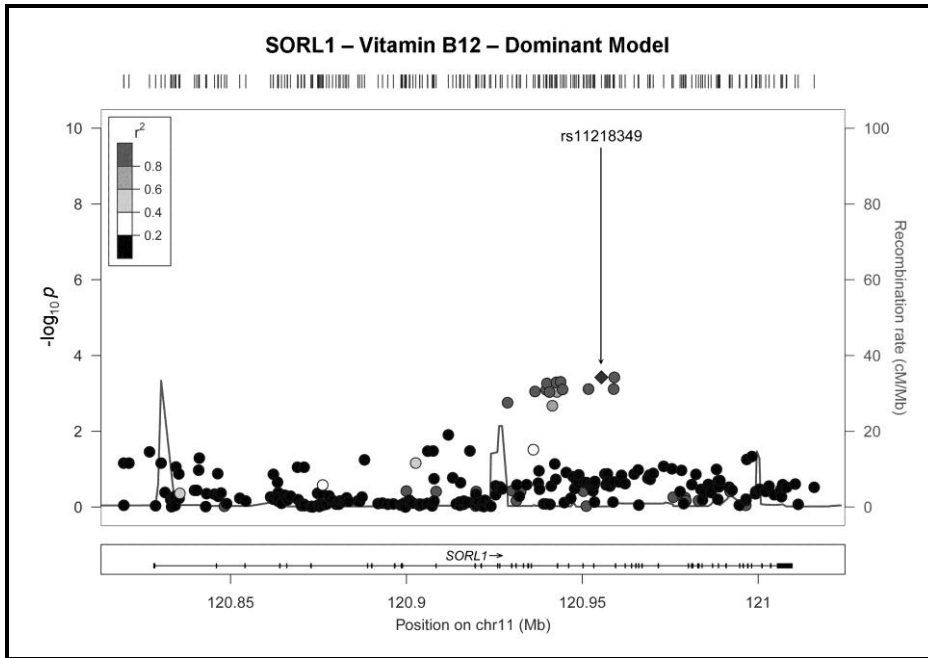


Abbildung 43: Graphische Darstellung der *SORL1* Region (rs11218349)

-log p-Werte sind auf der linken y-Achse und die genomische Position auf der x-Achse dargestellt. Die rechte y-Achse gibt die Rekombinationsrate an. Für den SNP rs11218349 konnte der niedrigste p-Wert berechnet werden, dieser ist durch ein Viereck gekennzeichnet. Die LD Berechnungen beziehen sich auf diesen SNP. Diese Grafik wurde mit Hilfe der LocusZoom Software erstellt (Pruim et al., 2010).

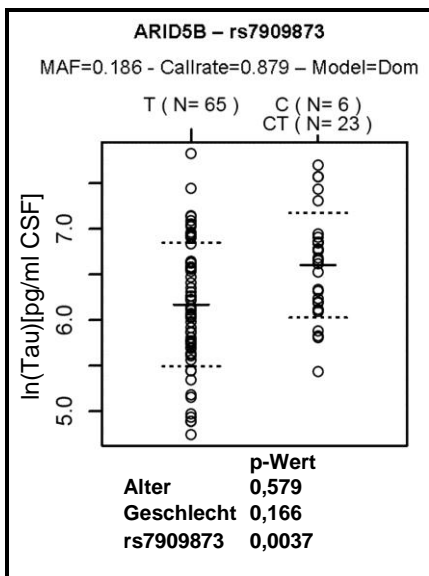


Abbildung 44: Verteilung der Tau Protein Konzentrationen nach Genotypen (rs7909873)

Punktdiagramm für den Marker rs7909873, der die größte Erniedrigung der Tau Protein Konzentration zeigte. Die Gruppen sind nach dem dominanten Modell in homozygote Träger des häufigen Allels (TT n=65) und heterozygote zusammen mit homozygoten Trägern des seltenen Allels (CT n=23 + CC n=6 → CT/CC n=29) eingeteilt. Linien geben den Mittelwert an und unterbrochene Linien die Standardabweichung.

Anhang

Tabelle 37: Ergebnisse der *BIN1* Region für LDL und VLDL als Endophänotyp

Locus	quanti	SNP	Position Chr2	major	hetero + minor	n major	n hetero +minor	Call-rate	MAF	P_SNP	Mittel LDL/VLDL [mg/dl Blut] major	Mittel LDL/VLDL [mg/dl Blut] hetero +minor	% Erhöhung
BIN1	LDL	rs6705636	127549154	TT	GT/GG	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs6754017	127549303	CC	GC/GG	47	19	0.985	0.167	9.68E-03	149	127	17.4
BIN1	LDL	rs6705877	127549354	TT	GT/GG	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs56275366	127550087	CC	TC/TT	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs13386828	127550206	TT	CT/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs13383872	127550365	AA	TA/TT	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs2276576	127550433	CC	TC/TT	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs2276575	127550606	TT	CT/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs62157856	127550839	CC	TC/TT	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs13387613	127550854	TT	CT/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs13430398	127550998	CC	TC/TT	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs17014893	127551050	GG	CG/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs6704659	127551262	CC	TC/TT	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs6750960	127551475	GG	AG/AA	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs6710752	127551516	AA	CA/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs6714477	127551592	TT	CT/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs6714626	127551705	TT	GT/GG	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs13388023	127551843	AA	CA/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs60622257	127552049	TT	CT/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs60355033	127552094	TT	CT/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs58050378	127552105	AA	GA/GG	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs60874665	127552136	CC	GC/GG	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs56173738	127552239	AA	CA/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs59469917	127552243	AA	CA/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs17014903	127552297	TT	CT/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs13394753	127552836	TT	AT/AA	47	19	0.985	0.159	6.13E-03	149	126	18.4
BIN1	LDL	rs13394666	127553397	AA	GA/GG	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs13430599	127553511	GG	TG/TT	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs55769487	127554585	CC	TC/TT	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs61525314	127555983	GG	AG/AA	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	VLDL	rs10194375	127556251	CC	AC/AA	29	33	1.000	0.315	6.06E-03	23	15	50.3
BIN1	LDL	rs10194975	127556854	CC	TC/TT	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs10195067	127556958	CC	AC/AA	45	20	0.970	0.177	7.73E-03	149	127	17.4
BIN1	LDL	rs13422890	127557218	AA	GA/GG	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs13426725	127557807	TT	CT/CC	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	VLDL	rs11694743	127559077	AA	GA/GG	24	38	1.000	0.395	2.21E-03	24	15	56.3
BIN1	LDL	rs13430214	127559221	AA	GA/GG	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs62158723	127559344	CC	TC/TT	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs13425613	127559663	CC	AC/AA	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs13425623	127559712	CC	AC/AA	47	20	1.000	0.172	8.14E-03	149	127	17.2
BIN1	LDL	rs6431219	127578603	CC	TC/TT	20	43	0.940	0.413	1.01E-03	125	152	21.4
BIN1	LDL	rs7584040	127579694	CC	TC/TT	37	22	0.881	0.220	4.75E-03	132	157	18.9
BIN1	LDL	rs2276574	127580670	CC	AC/AA	46	18	0.955	0.148	5.21E-03	150	126	19.5

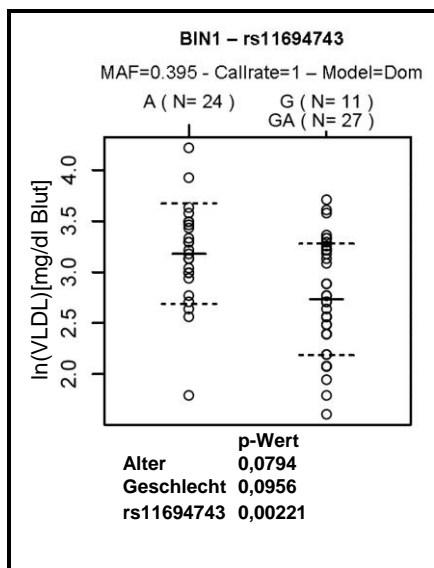


Abbildung 45: Verteilung der VLDL Konzentrationen nach Genotypen (rs11694743)

Punktdiagramm für den Marker rs11694743, der die größte Erniedrigung der VLDL Konzentration zeigte. Die Gruppen sind nach dem dominanten Model in homozygote Träger des häufigen Allels (AA n=24) und heterozygote zusammen mit homozygoten Trägern des seltenen Allels (GA n=27 + GG n=11 → GA/GG n=38) eingeteilt. Linien geben den Mittelwert an und unterbrochene Linien die Standardabweichung.

Tabelle 38: Ergebnisse der CD2AP Region für 'Wortliste wiedergeben' und 'Wortliste lernen' als Endophänotyp

Locus	Quanti CERAD word list	SNP	Position Chr6	major	hetero / minor	n major	n hetero + minor	Call-rate	MAF	p SNP	Mittel quanti [points] major	Mittel quanti [points] hetero +minor	% Erhöhung
CD2AP	recall	rs6916985	47546555	TT	CT/CC	229	166	0.932	0.232	6.83E-03	1.524	2.030	33.2
CD2AP	recall	rs6912099	47549444	CC	TC/TT	197	183	0.896	0.279	8.01E-03	1.503	2.000	33.1
CD2AP	recall	rs35741654	47551604	CC	TC/TT	197	183	0.896	0.279	8.01E-03	1.503	2.000	33.1
CD2AP	recall	rs62410676	47552099	AA	TA/TT	197	183	0.896	0.279	8.01E-03	1.503	2.000	33.1
CD2AP	recall	rs4715021	47555846	GG	AG/AA	216	197	0.974	0.275	4.30E-03	1.505	2.020	34.3
CD2AP	recall	rs13192160	47555872	TT	GT/GG	244	168	0.972	0.226	8.33E-03	1.537	2.024	31.7
CD2AP	recall	rs9367280	47561045	GG	AG/AA	214	190	0.953	0.272	6.55E-03	1.509	2.005	32.9
CD2AP	recall	rs58692350	47563828	AA	GA/GG	246	170	0.981	0.226	7.52E-03	1.533	2.018	31.7
CD2AP	recall	rs4715022	47564024	AA	GA/GG	214	191	0.955	0.273	5.72E-03	1.509	2.010	33.2
CD2AP	recall	rs9369700	47565420	CC	GC/GG	214	191	0.955	0.273	5.72E-03	1.509	2.010	33.2
CD2AP	recall	rs9357540	47568369	GG	AG/AA	216	196	0.972	0.274	6.50E-03	1.509	1.995	32.2
CD2AP	recall	6 47569532	47569532	AA	GA/GG	248	171	0.988	0.226	6.77E-03	1.536	2.023	31.7
CD2AP	recall	rs6934265	47571923	CC	TC/TT	219	201	0.991	0.276	7.79E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs6934441	47571987	GG	TG/TT	219	201	0.991	0.276	7.79E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs12664637	47574208	CC	TC/TT	239	170	0.965	0.230	5.40E-03	1.523	2.035	33.6
CD2AP	recall	rs9473121	47574352	CC	GC/GG	219	202	0.993	0.277	9.70E-03	1.507	1.970	30.8
CD2AP	recall	rs1564926	47578105	CC	TC/TT	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs9369705	47578480	AA	CA/CC	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs34785743	47580258	CC	TC/TT	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs12661873	47582907	TT	CT/CC	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs9395264	47582981	GG	TG/TT	184	201	0.908	0.301	5.87E-03	1.467	1.980	34.9
CD2AP	recall	rs62410684	47590032	TT	AT/AA	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs9369708	47590153	GG	AG/AA	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4

Anhang

CD2AP	recall	rs9381569	47590278	AA	GA/GG	216	204	0.991	0.280	6.06E-03	1.500	1.990	32.7
CD2AP	recall	rs16869214	47590858	AA	GA/GG	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs9296560	47592010	CC	GC/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs7767598	47593057	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs7745990	47596346	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs1352027	47600081	GG	CG/CC	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs6932718	47600545	TT	GT/GG	191	194	0.908	0.296	9.57E-03	1.508	1.979	31.3
CD2AP	recall	rs6912197	47600546	CC	TC/TT	198	192	0.920	0.286	3.94E-03	1.470	1.995	35.7
CD2AP	recall	rs4711881	47601405	GG	AG/AA	191	210	0.946	0.307	6.47E-03	1.497	2.010	34.2
CD2AP	recall	rs16876006	47602677	AA	CA/CC	250	173	0.998	0.226	8.35E-03	1.540	2.012	30.6
CD2AP	recall	rs1352030	47603683	GG	TG/TT	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs7349860	47605196	CC	TC/TT	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs12661631	47607368	TT	CT/CC	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs4715027	47608115	TT	CT/CC	174	192	0.863	0.305	3.66E-03	1.437	2.000	39.2
CD2AP	recall	rs4715028	47608658	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs58586595	47608672	GG	TG/TT	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs57816367	47608898	GG	AG/AA	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs58709182	47608953	CC	TC/TT	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs2171088	47611109	TT	CT/CC	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs4711882	47611262	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs9395273	47612355	GG	AG/AA	215	205	0.991	0.281	8.59E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs7753753	47613176	AA	GA/GG	184	192	0.887	0.297	1.26E-03	1.364	1.969	44.3
CD2AP	recall	rs13201541	47616430	TT	CT/CC	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs6941555	47617368	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs9473130	47619586	CC	TC/TT	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs6915993	47620188	TT	CT/CC	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs6916578	47620549	TT	CT/CC	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs7767662	47621035	GG	AG/AA	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs6458571	47621311	CC	TC/TT	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs6458572	47623218	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs2151976	47623677	GG	AG/AA	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs9367285	47626898	TT	AT/AA	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs6458573	47627280	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs923150	47628791	TT	AT/AA	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs9473132	47630316	AA	GA/GG	211	202	0.974	0.282	4.46E-03	1.493	2.005	34.3
CD2AP	recall	rs7451940	47631198	GG	AG/AA	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs1811596	47632137	GG	AG/AA	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs2218356	47632648	CC	TC/TT	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs13191654	47635722	AA	GA/GG	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs1931825	47638674	GG	TG/TT	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs11751578	47639681	TT	AT/AA	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs9395278	47640642	AA	TA/TT	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs9463339	47643167	CC	AC/AA	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs9367287	47647084	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs60532695	47647261	GG	TG/TT	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs4711884	47648449	GG	AG/AA	218	205	0.998	0.279	8.94E-03	1.514	1.980	30.8
CD2AP	recall	rs9369714	47648814	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs9395280	47651647	AA	TA/TT	198	195	0.927	0.288	6.47E-03	1.510	2.021	33.8
CD2AP	recall	rs978448	47653017	TT	CT/CC	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs10498774	47655779	GG	AG/AA	250	172	0.995	0.225	9.09E-03	1.540	2.012	30.6
CD2AP	recall	rs1352029	47656904	TT	GT/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs9296566	47657085	TT	CT/CC	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs2275446	47657842	CC	TC/TT	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs4711886	47663504	CC	AC/AA	193	205	0.939	0.305	6.01E-03	1.508	2.034	34.9
CD2AP	recall	rs6458576	47664068	TT	CT/CC	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs35214470	47666009	AA	TA/TT	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0

Anhang

CD2AP	recall	rs34208440	47667099	TT	CT/CC	252	166	0.986	0.218	3.21E-03	1.532	2.072	35.3
CD2AP	recall	rs6917252	47667926	GG	AG/AA	219	199	0.986	0.274	6.57E-03	1.507	1.990	32.1
CD2AP	recall	rs1485781	47670725	TT	CT/CC	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs34977645	47672163	CC	TC/TT	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs6922508	47674366	CC	TC/TT	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs11758792	47675397	CC	GC/GG	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs1485786	47676149	CC	TC/TT	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs923146	47683356	AA	GA/GG	203	206	0.965	0.293	3.48E-03	1.493	2.039	36.6
CD2AP	recall	rs28360587	47684272	GG	TG/TT	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs6908162	47684395	GG	AG/AA	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs9395287	47685023	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs13200694	47685230	AA	GA/GG	250	174	1.000	0.226	7.58E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs12661844	47686933	CC	TC/TT	250	172	0.995	0.225	9.09E-03	1.540	2.012	30.6
CD2AP	recall	rs9381581	47688654	GG	AG/AA	203	200	0.950	0.293	8.90E-03	1.985	1.505	31.4
CD2AP	recall	rs13192521	47690335	GG	AG/AA	250	173	0.998	0.226	7.97E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs13208188	47692050	AA	GA/GG	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs58535694	47692727	AA	GA/GG	250	173	0.998	0.226	7.97E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs12664165	47698121	CC	GC/GG	250	173	0.998	0.226	7.97E-03	1.540	2.017	31.0
CD2AP	recall	rs4142971	47699137	CC	AC/AA	264	132	0.934	0.178	3.71E-03	1.561	2.129	36.4
CD2AP	recall	rs9369718	47699364	TT	CT/CC	219	205	1.000	0.278	7.89E-03	1.507	1.980	31.4
CD2AP	recall	rs1043276	47701961	CC	TC/TT	221	184	0.955	0.256	4.15E-03	1.516	2.038	34.5
CD2AP	recall	rs719856	47702681	GG	AG/AA	240	172	0.972	0.231	6.45E-03	1.525	2.023	32.7
CD2AP	recall	rs2046465	47705200	AA	CA/CC	186	196	0.901	0.298	9.94E-03	1.543	2.036	31.9
CD2AP	recall	rs9369719	47709215	TT	CT/CC	177	194	0.875	0.305	4.34E-03	1.497	2.046	36.7
CD2AP	recall	rs9369720	47709281	TT	CT/CC	177	195	0.877	0.305	5.37E-03	1.497	2.036	36.0
CD2AP	memory	rs6916985	47546555	TT	CT/CC	233	167	0.932	0.230	4.77E-03	9.592	10.922	13.9
CD2AP	memory	rs6912099	47549444	CC	TC/TT	201	184	0.897	0.277	2.09E-03	9.413	10.886	15.6
CD2AP	memory	rs35741654	47551604	CC	TC/TT	201	184	0.897	0.277	2.09E-03	9.413	10.886	15.6
CD2AP	memory	rs62410676	47552099	AA	TA/TT	201	184	0.897	0.277	2.09E-03	9.413	10.886	15.6
CD2AP	memory	rs4715021	47555846	GG	AG/AA	220	198	0.974	0.273	7.67E-03	9.591	10.813	12.7
CD2AP	memory	rs13192160	47555872	TT	GT/GG	248	169	0.972	0.224	7.90E-03	9.597	10.840	13.0
CD2AP	memory	rs9367280	47561045	GG	AG/AA	218	191	0.953	0.270	4.37E-03	9.491	10.812	13.9
CD2AP	memory	rs58692350	47563828	AA	GA/GG	250	171	0.981	0.224	4.81E-03	9.556	10.860	13.6
CD2AP	memory	rs4715022	47564024	AA	GA/GG	218	192	0.956	0.271	3.87E-03	9.491	10.823	14.0
CD2AP	memory	rs9369700	47565420	CC	GC/GG	218	192	0.956	0.271	3.87E-03	9.491	10.823	14.0
CD2AP	memory	rs9357540	47568369	GG	AG/AA	220	197	0.972	0.272	7.98E-03	9.532	10.746	12.7
CD2AP	memory	6 47569532	47569532	AA	GA/GG	252	172	0.988	0.224	5.79E-03	9.603	10.866	13.2
CD2AP	memory	rs6934265	47571923	CC	TC/TT	223	202	0.991	0.274	7.97E-03	9.525	10.733	12.7
CD2AP	memory	rs6934441	47571987	GG	TG/TT	223	202	0.991	0.274	7.97E-03	9.525	10.733	12.7
CD2AP	memory	rs12664637	47574208	CC	TC/TT	243	171	0.965	0.228	3.54E-03	9.650	10.988	13.9
CD2AP	memory	rs9473121	47574352	CC	GC/GG	223	203	0.993	0.275	6.59E-03	9.525	10.768	13.1
CD2AP	memory	rs1564926	47578105	CC	TC/TT	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9369705	47578480	AA	CA/CC	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs34785743	47580258	CC	TC/TT	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs12661873	47582907	TT	CT/CC	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs9395264	47582981	GG	TG/TT	187	202	0.907	0.299	4.41E-03	9.481	10.822	14.1
CD2AP	memory	rs62410684	47590032	TT	AT/AA	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs9369708	47590153	GG	AG/AA	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9381569	47590278	AA	GA/GG	219	205	0.988	0.278	5.72E-03	9.530	10.795	13.3
CD2AP	memory	rs16869214	47590858	AA	GA/GG	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs9296560	47592010	CC	GC/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs7767598	47593057	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs7745990	47596346	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs1352027	47600081	GG	CG/CC	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs6912197	47600546	CC	TC/TT	202	192	0.918	0.283	8.35E-03	9.569	10.792	12.8
CD2AP	memory	rs4711881	47601405	GG	AG/AA	195	211	0.946	0.304	7.71E-03	9.523	10.787	13.3

Anhang

CD2AP	memory	rs16876006	47602677	AA	CA/CC	254	174	0.998	0.224	3.81E-03	9.563	10.885	13.8
CD2AP	memory	rs1352030	47603683	GG	TG/TT	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs7349860	47605196	CC	TC/TT	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs12661631	47607368	TT	CT/CC	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs4715027	47608115	TT	CT/CC	177	193	0.862	0.303	4.41E-03	9.492	10.881	14.6
CD2AP	memory	rs4715028	47608658	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs58586595	47608672	GG	TG/TT	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs57816367	47608898	GG	AG/AA	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs58709182	47608953	CC	TC/TT	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs2171088	47611109	TT	CT/CC	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs4711882	47611262	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9395273	47612355	GG	AG/AA	219	206	0.991	0.279	7.27E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs7753753	47613176	AA	GA/GG	188	193	0.888	0.294	1.77E-03	9.213	10.767	16.9
CD2AP	memory	rs13201541	47616430	TT	CT/CC	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs6941555	47617368	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9473130	47619586	CC	TC/TT	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs6915993	47620188	TT	CT/CC	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs6916578	47620549	TT	CT/CC	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs7767662	47621035	GG	AG/AA	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs6458571	47621311	CC	TC/TT	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs6458572	47623218	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs2151976	47623677	GG	AG/AA	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9367285	47626898	TT	AT/AA	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs6458573	47627280	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs923150	47628791	TT	AT/AA	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9473132	47630316	AA	GA/GG	215	203	0.974	0.280	5.80E-03	9.516	10.788	13.4
CD2AP	memory	rs7451940	47631198	GG	AG/AA	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs1811596	47632137	GG	AG/AA	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs2218356	47632648	CC	TC/TT	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs13191654	47635722	AA	GA/GG	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs1931825	47638674	GG	TG/TT	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs11751578	47639681	TT	AT/AA	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs9395278	47640642	AA	TA/TT	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9463339	47643167	CC	AC/AA	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9367287	47647084	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs60532695	47647261	GG	TG/TT	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs4711884	47648449	GG	AG/AA	222	206	0.998	0.277	8.31E-03	9.554	10.757	12.6
CD2AP	memory	rs9369714	47648814	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9395280	47651647	AA	TA/TT	202	196	0.928	0.285	5.58E-03	9.485	10.806	13.9
CD2AP	memory	rs978448	47653017	TT	CT/CC	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs10498774	47655779	GG	AG/AA	254	173	0.995	0.224	4.26E-03	9.563	10.879	13.8
CD2AP	memory	rs1352029	47656904	TT	GT/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9296566	47657085	TT	CT/CC	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs2275446	47657842	CC	TC/TT	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs4502933	47660711	GG	AG/AA	248	174	0.984	0.227	4.93E-03	9.585	10.879	13.5
CD2AP	memory	rs6458576	47664068	TT	CT/CC	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs35214470	47666009	AA	TA/TT	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs13198881	47666946	AA	GA/GG	265	137	0.937	0.187	9.55E-03	9.645	10.920	13.2
CD2AP	memory	rs34208440	47667099	TT	CT/CC	256	167	0.986	0.216	9.18E-04	9.555	11.108	16.3
CD2AP	memory	rs6917252	47667926	GG	AG/AA	223	200	0.986	0.272	4.59E-03	9.525	10.810	13.5
CD2AP	memory	rs1485781	47670725	TT	CT/CC	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs34977645	47672163	CC	TC/TT	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs6922508	47674366	CC	TC/TT	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs11758792	47675397	CC	GC/GG	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs1485785	47675718	CC	TC/TT	254	174	0.998	0.223	4.16E-03	9.563	10.874	13.7
CD2AP	memory	rs1485786	47676149	CC	TC/TT	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2

Anhang

CD2AP	memory	rs28360587	47684272	GG	TG/TT	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs6908162	47684395	GG	AG/AA	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs9395287	47685023	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs13200694	47685230	AA	GA/GG	254	175	1.000	0.225	2.99E-03	9.563	10.920	14.2
CD2AP	memory	rs12661844	47686933	CC	TC/TT	254	173	0.995	0.224	4.26E-03	9.563	10.879	13.8
CD2AP	memory	rs13192521	47690335	GG	AG/AA	254	174	0.998	0.224	3.63E-03	9.563	10.897	13.9
CD2AP	memory	rs13208188	47692050	AA	GA/GG	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs58535694	47692727	AA	GA/GG	254	174	0.998	0.224	3.63E-03	9.563	10.897	13.9
CD2AP	memory	rs12664165	47698121	CC	GC/GG	254	174	0.998	0.224	3.63E-03	9.563	10.897	13.9
CD2AP	memory	rs9369718	47699364	TT	CT/CC	223	206	1.000	0.276	6.94E-03	9.525	10.757	12.9
CD2AP	memory	rs1043276	47701961	CC	TC/TT	225	185	0.956	0.254	3.83E-03	9.596	10.919	13.8
CD2AP	memory	rs719856	47702681	GG	AG/AA	244	173	0.972	0.229	4.33E-03	9.561	10.896	14.0
CD2AP	memory	rs7763798	47705071	GG	TG/TT	193	187	0.886	0.284	2.23E-03	9.580	11.048	15.3
CD2AP	memory	rs2046465	47705200	AA	CA/CC	190	197	0.902	0.296	2.54E-03	9.568	11.005	15.0
CD2AP	memory	rs9349418	47706384	AA	GA/GG	187	196	0.893	0.296	3.89E-03	9.545	10.949	14.7
CD2AP	memory	rs10807356	47708797	AA	GA/GG	187	195	0.890	0.295	4.40E-03	9.545	10.933	14.5
CD2AP	memory	rs9369719	47709215	TT	CT/CC	181	195	0.876	0.302	1.53E-03	9.541	11.051	15.8
CD2AP	memory	rs9369720	47709281	TT	CT/CC	181	196	0.879	0.302	1.82E-03	9.541	11.031	15.6

8 Dank

Ich möchte mich ganz herzlich bei all den Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben. Mein Dank gilt:

- vor Allem Prof. Dr. med. Matthias Riemenschneider für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung über die gesamte Zeit in München und in Homburg,
- Prof. Dr. rer. nat. Tobias Hartmann, der ohne zu zögern der Betreuung dieser Arbeit zugestimmt hat,
- Dr. rer. nat. Manuel Mayhaus für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit, sowie für die Beantwortung meiner vielen Fragen,
- Caterina Riehle aus dem Institut für medizinische Statistik and Epidemiologie am Klinikum r. d. Isar der TU-München, für die Unterstützung bei der statistische Auswertung meiner Ergebnisse, sowie für die vielen Telefonate,
- allen Mitarbeitern des Neurogenetischen Labors am Klinikum r. d. Isar der TU-München für die Unterstützung des praktischen Teils dieser Arbeit
- allen Mitarbeitern des Neurogenetischen Labors der Uniklinik Homburg, hier vor allem Cynthia Schiller, Sophia Rasch, Katrin Rubly und Karl Heiz Hoffmann für die tatkräftige Unterstützung im Labor, sowie Dr. rer. nat. Manuel Mayhaus, Dr. rer. nat. Gilles Gasparoni, Dipl. Biologin Sabrina Pichler für die vielen Lösungsvorschläge bei projektspezifischen Problemen,
- ganz besonders aber meiner Frau Jantje und meiner Tochter Clara sowie meinen Eltern und Großeltern, die meine Entscheidungen stets mitgetragen und mich bedingungslos unterstützt haben.

9 Publikationen

9.1 Publikationen

- **Thomas M. Feulner**, Caterina Riehle, Gilles Gasparoni, Cynthia Schiller, Stefan Wagenpfeil, Sebastian H. R. Wurst, Manuel Mayhaus and Matthias Riemenschneider. „Genome wide association study of recently found new Alzheimer candidate genes PICALM, CLU, CR1 and BIN1 in a German cohort“ in preparation

- J-C Lambert, B Grenier-Boley, D Harold, D Zelenika, V Chouraki, Y Kamatani, K Sleegers, M A Ikram, M Hiltunen, C Reitz, I Mateo, **T Feulner**, M Bullido, D Galimberti, L Concari, V Alvarez, R Sims, A Gerrish, J Chapman, C Deniz-Naranjo, V Solfrizzi, S Sorbi, B Arosio, G Spalletta, G Siciliano, J Epelbaum, D Hannequin, J-F Dartigues, C Tzourio, C Berr, E M C Schrijvers, R Rogers, G Tosto, F Pasquier, K Bettens, C Van Cauwenberghe, L Fratiglioni, C Graff, M Delepine, R Ferri, C A Reynolds, L Lannfelt, M Ingelsson, J A Prince, C Chillotti, A Pilotto, D Seripa, A Boland, M Mancuso, P Bossù, G Annoni, B Nacmias, P Bosco, F Panza, F Sanchez-Garcia, M Del Zompo, E Coto, M Owen, M O'Donovan, F Valdivieso, P Caffara, E Scarpini, O Combarros, L Buée, D Champion, H Soinen, M Breteler, M Riemenschneider, C Van Broeckhoven, A Alperovitch, M Lathrop, D-A Trégouët, J Williams and P Amouyel EADI consortium, GERAD consortium. “Genome-wide haplotype association study identifies the *FRMD4A* gene as a risk locus for Alzheimer's disease” *Nature Mol Psychiatry*, March 20, 2012; doi:10.1038/mp.2012.14
 Impact Factor: **15.470** (2010)

- Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Jones N, Stretton A, Thomas C, Richards A, Ivanov D, Widdowson C, Chapman J, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Beaumont H, Warden D, Wilcock G, Love S, Kehoe PG, Hooper NM, Vardy ER, Hardy J, Mead S, Fox NC, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Ruther E, Schürmann B, Heun R, Kölsch H, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Gallacher J, Hüll M, Rujescu D, Giegling I, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Pankratz VS, Sando SB, Aasly JO, Barcikowska M, Wszolek ZK, Dickson DW, Graff-Radford NR, Petersen RC; the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, van Duijn CM, Breteler MM, Ikram MA, Destefano AL, Fitzpatrick AL, Lopez O, Launer LJ, Seshadri S; CHARGE consortium, Berr C, Champion D, Epelbaum J, Dartigues JF, Tzourio C, Alperovitch A, Lathrop M; EADI consortium, **Feulner TM**, Friedrich P, Riehle C, Krawczak M, Schreiber S, Mayhaus M, Nicolhaus S, Wagenpfeil S, Steinberg S, Stefansson H, Stefansson K, Snædal J,

Björnsson S, Jonsson PV, Chouraki V, Genier-Boley B, Hiltunen M, Soininen H, Combarros O, Zelenika D, Delepine M, Bullido MJ, Pasquier F, Mateo I, Frank-Garcia A, Porcellini E, Hanon O, Coto E, Alvarez V, Bosco P, Siciliano G, Mancuso M, Panza F, Solfrizzi V, Nacmias B, Sorbi S, Bossù P, Piccardi P, Arosio B, Annoni G, Seripa D, Pilotto A, Scarpini E, Galimberti D, Brice A, Hannequin D, Licastro F, Jones L, Holmans PA, Jonsson T, Riemenschneider M, Morgan K, Younkin SG, Owen MJ, O'Donovan M, Amouyel P, Williams J. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics* 2011 May;43(5):429-35. Epub 2011 Apr 3.

Impact Factor: **36.377** (2010)

- **Feulner TM**, Friedrich P, Laws SM, Eckart K, Perneczky R, Kurz A, Forstl H, Riemenschneider M, 2009. No association of Tachykinin receptor 2 (TACR2) polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011 Mar;32(3):544-5. Epub 2009 Apr 18.

Impact Factor: **5.937** (2009).

- **Feulner TM**, Laws SM, Friedrich P, Wagenpfeil S, Wurst SH, Riehle C, Kuhn KA, 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. *Nature Mol Psychiatry*. 2010 Jul;15(7):756-66. Epub 2009 Jan 6.

Impact Factor: **15.049** (2009).

- Abou Jamra R, Becker T, Georgi A, **Feulner T**, Schumacher J, Stromaier J, Schirmbeck F, Schulze TG, Propping P, Rietschel M, Nothen MM, Cichon S, 2008. Genetic variation of the FAT gene at 4q35 is associated with bipolar affective disorder. *Nature Mol Psychiatry*. 2008 Mar;13(3):277-84. Epub 2007 Oct 16.

Impact Factor: **12.537** (2008).

9.2 Poster

- Epigenetic profiling of Alzheimer's disease brain samples.
Gilles Gasparoni, Sabrina Pichler, Caterina Riehle, Petra Leidinger, **Thomas M. Feulner**, Cynthia Schiller, Hans Kretschmar, Andreas Keller, Eckhardt Meese, Stefan Wagenpfeil, Manuel Mayhaus and Matthias Riemenschneider (2011 CLEPSO (clinical-epigenetics-society) –Meeting, Homburg)
- Epigenetic phenotyping of Alzheimer's disease brain samples.
Gilles Gasparoni, Sabrina Pichler, Caterina Riehle, **Thomas M. Feulner**, Cynthia Schiller, Hans Kretschmar, Rupert Egensperger, Manuel Mayhaus, Andreas Keller, Eckhardt Meese, Stefan Wagenpfeil and Matthias Riemenschneider (2011, HelMA Meeting, München)
- GWAS meets functional analysis of candidate genes in Alzheimer's disease.

Sabrina Pichler, Gilles Gasparoni, Caterina Riehle, **Thomas M. Feulner**, Cynthia Schiller, Hans Kretzschmar, Patricia Friedrich, Kerstin Eckart, Stefan Wagenpfeil, Manuel Mayhaus and Matthias Riemenschneider (2011, HelMA Meeting, München)

- Genome-wide analysis of quantitative markers associated with Alzheimer's disease.
Thomas M. Feulner, Caterina Riehle, Stefan Wagenpfeil, Gilles Gasparoni, Cynthia Schiller, Annica Sjölander, Kaj Blennow, Luisa Benussi, Roberta Ghidoni, Giuliano Binetti, Manuel Mayhaus and Matthias Riemenschneider (2010, NGFN Meeting, Berlin)
- Genome-wide association study (GWAS) of Alzheimer's disease.
Thomas M. Feulner, Caterina Riehle, Stefan Wagenpfeil, Gilles Gasparoni, Cynthia Schiller, Thomas Illig, H. Erich Wichmann, Michael Krawczak, Stefan Schreiber, Susanna Nikolaus, Manuel Mayhaus and Matthias Riemenschneider (2010, NGFN Meeting, Berlin)
- Epigenetic characterization of Alzheimer's disease brain samples.
Gilles Gasparoni, Sabrina Pichler, Caterina Riehle, **Thomas M. Feulner**, Cynthia Schiller, Manuel Mayhaus, Hans Kretzschmar, Rupert Egensperger, Sven Poths, Michael Bonin and Matthias Riemenschneider (2010, NGFN Meeting, Berlin)
- Examination of the current top candidate genes for AD in a genome wide association study. **Thomas M. Feulner**, Simon M. Laws, Patricia Friedrich, Stefan Wagenpfeil, Sebastian H. R. Wurst, Caterina Riehle, Klaus A. Kuhn, Michael Krawczak, Stefan Schreiber, Susanna Nikolaus, Hans Förstl, Alexander Kurz and Matthias Riemenschneider (2009, 15th Annual Meeting of the German Society of Neurogenetics)
- Alzheimer-typical increased $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ratio downregulates IGF2 and BDNF signalling converging in repression of AKT/PKC signalling. Markus Uhrig, **Thomas M. Feulner**, Gilles Gasparoni, Yuri Knyazev, Annette Weninger, Inge Tomic, Matthias Riemenschneider and Tobias Hartmann (2009, 15th Annual Meeting of the German Society of Neurogenetics)

10 Lebenslauf

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

- Name Thomas Marc Feulner
- Geburtsdatum 03. März 1981
- Geburtsort Bonn
- Adresse Robert-Koch-Str. 21
66424 Homburg
- Staatsangehörigkeit deutsch
- Familienstand verheiratet, eine Tochter

HOCHSCHULAUFBILDUNG

Curriculum Vitae

- 04/2009 – 04/2012 Fortsetzung der Promotion am Uniklinikum der Universität des Saarlandes in Homburg unter Prof. Dr. med. M. Riemenschneider.
- 11/2007 – 04/2009 Naturwissenschaftliche Promotion am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München im Bereich der SNP Genotypisierung unter PD Dr. med. M. Riemenschneider.
- 09/2001 – 07/2007 Diplomstudiengang „Bioingenieurwesen“, Schwerpunkt „Lebensmitteltechnologie und Verbraucherschutz“ an der Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich
- 12/2006 – 06/2007 Diplomarbeit: „Molekulargenetische Untersuchungen bei bipolar affektiven Störungen in der chromosomalen Region 8q24“ am Life&Brain Center, department of genomics der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn (Note: 1,3)
- 12. Juli 2007 Abschlussprüfung zum Dipl.-Ing. (FH) für Biotechnologie (Note: 1,3)

PRAKTIKA, BERUFLICHE ERFAHRUNGEN

- 04/2012 – LifeScience Spezialist bei VWR International
- 03/2007 Teilnahme an der viertägigen Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) in Bonn.
- 03/2007 – 03/2007 Studentische Hilfskraft im Vertrieb bei Roche Diagnostics, Abteilung Applied Science
- 09/2006 – 03/2007 Mitarbeiter im Life&Brain Center unter anderem beteiligt an dem Forschungsprojekt: „Isolierung genomischer DNA auf Vollblutproben und anschließender Genotypisierung (Heinz Nixdorf Recall Studie)“
- 03/2006 – 12/2006 Praktikum im Life&Brain Center, department of genomics, Bonn

Curriculum Vitae

- 07/2001 – 09/2001 13 wöchiges Grundpraktikum am Max-Delbrück-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft für Züchtungsforschung in Köln

SCHULBILDUNG

- März 2000 Abitur am Rhein-Sieg-Gymnasium in Sankt Augustin
- 09/1992 – 03/2000 Rhein-Sieg-Gymnasium, Sankt Augustin

ZIVILDIENTST

- 08/2000 – 07/2001 Zivildienst an der Rheinischen Schule für Körperbehinderte in Sankt Augustin

ZUSÄTZLICHE QUALIFIKATIONEN

- Praktika Studienbegleitende Praktika und Vorlesungen unter anderem im Bereich Molekularbiologie, Biochemie, Instrumentelle Analytik, Mikrobiologie, Bioverfahrenstechnik, Umweltanalytik u. a.
- EDV-Kenntnisse MS-Office
SPSS
PLINK
Programmierung mit R, HTML und CSS
- Fremdsprachen Deutsch (Muttersprache)
Englisch (fließend in Wort und Schrift)

Homburg, 23. März 2012

Thomas Feulner