

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Assoziation genetischer Polymorphismen
der ABC-Transporterfamilie
und dem Erkrankungsrisiko
des Morbus Alzheimer**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
CHARLOTTE FLÜH
aus Eckernförde

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi, Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer, Klinik für Neurologie

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel den

gez.

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

| | |
|--|-----------|
| 3 Ergebnisse | 29 |
| 3.1 Statistische Analyse des Alzheimerrisikos in Bezug auf die ABC-Transporter | 29 |
| 3.2 Untersuchung des ApoE-Genotyps bei Alzheimer-Patienten und bei gesunden Kontrollen | 33 |
| 3.3 Einfluss der ABCB1-Genotypen auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 35 |
| 3.3.1 Einfluss des SNPs ABCB1 1236C>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 35 |
| 3.3.2 Einfluss des SNPs ABCB1 2677G>TA auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 36 |
| 3.3.3 Einfluss des SNPs ABCB1 3435C>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 37 |
| 3.4 Einfluss des SNPs ABCC2 3972GC>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 38 |
| 3.5 Einfluss des Geschlechts auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 39 |
| 3.6 Ergebnisse der logistischen Regressionsanalyse | 42 |
| 4 Diskussion | 43 |
| 4.1 Einfluss des Transportgleichgewichts an der Blut-Hirn-Schranke auf das Risiko einer Alzheimer-Demenz | 43 |
| 4.2 Einfluss von P-gp auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 44 |
| 4.2.1 Einfluss des SNPs ABCB1 1236C>T auf das Risiko der Entstehung einer AD | 45 |
| 4.2.2 Einfluss des SNPs ABCB1 2677G>TA auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 46 |
| 4.2.3 Einfluss des SNPs ABCB1 3435C>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 47 |
| 4.3 Einfluss des SNPs ABCC2 3972C>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 49 |
| 4.4 Einfluss von ABCA1 und ABCG2 auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 50 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.5 | Einfluss von ApoE ϵ 4 auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 51 |
| 4.6 | Einfluss des Alters und des Geschlechts auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz | 51 |
| 5 | Zusammenfassung | 54 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 56 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| 1 | A: Fotografie der Auguste Deter B: Von Alois Alzheimer gezeichnete neurofibrilläre Bündel unter dem Lichtmikroskop | 3 |
| 2 | Histopathologische Charakteristika der Alzheimer-Demenz A: Aufnahme eines Amyloid-Plaques (Pfeil), umgeben von dystrophen Neuriten (Pfeilkopf) B: Elektronenmikroskopische Aufnahme von neurofibrillären Bündeln | 3 |
| 3 | A: Schema des nicht-amyloidogenen α -Sekretase-Stoffwechselweges; B: Schema des amyloidogenen β -Sekretase-Stoffwechselweges | 6 |
| 4 | Schema der im Pyrosequencer ablaufenden Enzymkaskade mit nachfolgender Aufzeichnung der Peaks | 22 |
| 5 | Beispiel für ein Pyrogram TM : Umwandlung der freigesetzten Lichtblitze in Peaks unterschiedlicher Höhe | 22 |
| 6 | Apyrase-Reaktion: Substratüberschüsse werden degradiert und das Reaktionsgemisch wird für den nächsten Zyklus regeneriert | 22 |
| 7 | Beispieloberfläche der Peak Height Determination Prototype Software | 23 |
| 8 | Erkennungssequenz des Enzyms BsrI bei Vorliegen eines Wildtyps im SNP ABCG2 34G>A (N = A, C, G oder T) | 25 |
| 9 | Bandenmuster der Restriktionsfragmente nach Agarosegel-Elektrophorese zur Identifizierung des Genotyps bei SNP ABCG2 34G>A | 25 |
| 10 | Relative Häufigkeit des Auftretens des ApoE- ϵ 4-Allels in der Gruppe der gesunden Kontrollen (AD negativ) und der Gruppe der Alzheimer-Patienten (AD positiv). | 34 |
| 11 | Relative Anteile der Träger des ABCB1 1236 C-Allels (CC- oder CT-Genotyp) und der Träger des wildtypspezifischen T-Allels (TT-Genotyp) an AD-positiven und AD-negativen Probanden mit neg. ApoE- ϵ 4-Allelstatus in der Gruppe mindestens 65-Jährigen | 35 |
| 12 | Relative Anteile der Träger des ABCB1 2677 G-Allels (GG-, GT- oder GA-Genotyp) und der Träger ohne wildtypspezifisches G-Allel (TT-, TA- und AA-Genotyp) an AD-negativen und AD-positiven Probanden in der Gruppe der mindestens 65-Jährigen; keine Einbeziehung von ApoE-Status und Geschlecht | 36 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 13 | Relative Anteile im rezessiven Modell (CC+CT vs. TT) SNPs ABCB1 3435C>T an AD-positiven und AD-negativen Probanden bei negativem ApoE-ε4-Allelstatus in der Gruppe der mindestens 60-Jährigen | 37 |
| 14 | Relative Anteile der Genotypen des SNPs ABCC2 3972C>T, keine Alterseinschränkungen, ApoE-ε4-Allelstatus negativ, rezessives Modell | 38 |
| 15 | Relative Anteile der Träger der C-Allels (CC- oder CT-Genotyp) und der Träger des T-Allels in Bezug auf den SNP ABCB1 1236C>T an AD-negativen und AD-positiven Probanden; keine Alterseinschränkungen, keine Einbeziehung des ApoE-ε4-Allelstatus. A: Männer, B: Frauen | 40 |
| 16 | Relative Anteile der Träger des G-Allels (GG-, GT- oder GA-Genotyp) und der Träger ohne wildtypspezifisches G-Allel (TT-, TA- und AA-Genotyp) des SNPs ABCB1 2677G>TA an AD-negativen und AD-positiven Probanden bei Verzicht auf eine Alterseinschränkung; A: Männer, B: Frauen | 41 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| 1 | Untersuchte Polymorphismen | 17 |
| 2 | PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der DNA-Fragmente der SNPs ABCA1 -14C>T und 1051G>A, ABCB1 1236C>T, 2677G>TA und 3435C>T (hier auch Einsatz von 1µl DNA möglich), ABCC2 24C>T, 1249G>A und 3972C>T, ApoE 176C>T und ABCG2 421C>A | 18 |
| 3 | Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente der SNPs ABCA1 -14C>T und 1051G>A, ABCB1 3435C>T und 2677G>TA, ABCC2 24C>T und 1249G>A, ApoE 176C>T, ABCG2 421C>A | 18 |
| 4 | Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ABCB1 1236C>T | 18 |
| 5 | Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ABCC2 3972C>T | 18 |
| 6 | PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ApoE 130C>T | 19 |
| 7 | Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ApoE 130C>T | 19 |
| 8 | PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ABCG2 34G>A | 24 |
| 9 | Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ABCG2 34G>A | 24 |
| 10 | Restriktionsansatz mit BsrI zur Analyse der Genotypen des SNPs ABCG2 34G>A | 24 |
| 11 | Primernamen, Primersequenzen und Fragmentlängen der PCR-Produkte bezüglich der SNPs ABCA1 -14C>T und 1051G>A, ABCB1 1236C>T, 2677G>TA und 3435C>T, ABCC2 24C>T, 1249G>A und 3972C>T, ABCG2 421C>A und ApoE 130C>T und 176C>T | 27 |
| 12 | Primernamen, Primersequenzen, Restriktionsenzym sowie Länge der nach Verdau entstandenen DNA-Fragmente zur Identifizierung des SNPs ABCG2 34G>A | 28 |
| 13 | Anzahl der Probanden in den unterschiedlichen Altersgruppen | 29 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 14 | Genotypfrequenzen der SNPs der ABC-Transporter bei gesunden Kontrollen und Alzheimer-Patienten | 30 |
| 15 | Genotypfrequenzen der SNPs der ABC-Transporter bei gesunden Kontrollen und Alzheimer-Patienten; rezessive und dominante Modelle | 31 |
| 16 | Ermittlung des ApoE- ϵ 4-Allelstatus | 33 |
| 17 | Genotypfrequenzen bei gesunden Kontrollen und Alzheimer-Patienten in Bezug auf ApoE 130C>T, 176C>T und das ϵ 4-Allel | 34 |
| 18 | Genotypfrequenzen zu ABCB1 1236C>T der mindestens 65-Jährigen, rezessives Modell, ApoE- ϵ 4-Allel-Status negativ | 35 |
| 19 | Genotypfrequenzen zu ABCB1 2677G>TA der mindestens 65-Jährigen: rezessives Modell, keine Einbeziehung von ApoE ϵ 4-Allelstatus | 36 |
| 20 | Genotypfrequenzen zu ABCB1 2677G>TA der mindestens 65-Jährigen, rezessives Modell, ApoE ϵ 4-Allelstatus negativ | 36 |
| 21 | Genotypfrequenzen zu ABCB1 3435C>T der mindestens 60-Jährigen, ApoE- ϵ 4-Allel-Status negativ | 38 |
| 22 | Genotypfrequenzen zu ABCC2 3972C>T im rezessiven Modell, ApoE- ϵ 4-Allelstatus negativ, keine Alterseinschränkungen | 38 |
| 23 | Überblick der Genoytpfrequenzen von ABCB1 bei Stratifikation nach Geschlecht | 39 |
| 24 | Genotypfrequenzen zu ABCB1 1236C>T unter Einbeziehung des Geschlechts; rezessives Modell, keine Alterseinschränkung, keine Einbeziehung des ApoE- ϵ 4-Allelstatus | 40 |
| 25 | Genotypfrequenzen des SNPs ABCB1 2677G>TA unter Einbeziehung des Geschlechts; G-rezessives Modell, keine Alterseinschränkung, keine Einbeziehung des ApoE- ϵ 4-Allelstatus | 41 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|--------|---|----------------|---|
| Abb. | Abbildung | FXR | <i>Farnesoid X receptor</i> |
| ABC | <i>ATP-binding-cassette</i> | GFR | glomeruläre Filtrationsrate |
| ABCP | <i>ABC transporter expressed in placenta</i> | HDL | <i>high density lipoprotein</i> |
| ACE | <i>angiotensin-converting enzyme</i> | HIV | <i>Human immunodeficiency Virus</i> |
| AD | Alzheimer-Demenz | HUGO | <i>Human Gene Nomenclature</i> |
| AICD | <i>APP intracellular domain</i> | HWE | Hardy-Weinberg Equilibrium |
| Aph | <i>anterior pharynx defective</i> | ICD-10 | <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i> , 10. Ausgabe |
| ApoE | Apolipoprotein E | | |
| APP | <i>amyloid precursor protein</i> | | |
| ATP | Adenosintriphosphat | | |
| AUC | Area under the curve | jew. | jeweilig(e, es) |
| BACE | <i>β-site APP cleaving enzyme</i> | kb | Kilobasenpaare |
| BCRP | breast cancer related protein | kDa | Kilodalton |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke | KHK | Koronare Herzkrankheit |
| bp | Basenpaare | K _m | Michaeliskonstante |
| bzw. | beziehungsweise | LAD | <i>late-onset Alzheimer's disease</i> |
| °C | Grad Celsius | | |
| CAR | <i>constitutive androstane Receptor</i> | LDL | <i>low density lipoprotein</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> | LRP-1 | <i>low density lipoprotein receptor related protein-1</i> |
| CERAD | <i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i> | LXR | <i>Liver X receptor</i> |
| CYP450 | Cytochrom P 450 Enzyme | MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| CTF | <i>C-terminal fragment</i> | MDR | <i>Multidrug resistance</i> |
| d.h. | das heißt | Mio. | Million |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | mRNA | <i>messenger</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | | Ribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleotidtriphosphate | MRP | <i>multidrug resistance-associated protein</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure | | |
| et al. | <i>et alteri</i> | | |

| | | | |
|---------------|---|-------------------|----------------------------------|
| FAD | familiäre Alzheimer-Demenz | tj | <i>tight junction</i> |
| MXR | <i>mitoxantrone resistance protein</i> | U | <i>unit</i> |
| n | Anzahl | UV | Ultraviolett |
| NaOH | Natriumhydroxid | v.a. | vor allem |
| NBD | Nukleotidbindende Domäne | V _{max.} | maximale |
| OD | optische Dichte | | Transportgeschwindigkeit |
| OR | <i>Odds ratio</i> | WHO | <i>World Health Organization</i> |
| p | Signifikanzniveau | wt | Wildtyp |
| Pat. | Patienten | z.B. | zum Beispiel |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung | ZNS | zentrales Nervensystem |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> | | |
| Pen | <i>presenilin enhancer protein</i> | | |
| PhIP | 2-Amino-1-methyl-6-Phenylimidazol[4,5-b]pyridin | | |
| P-gp | P-Glykoprotein | | |
| PPi | Pyrophosphat | | |
| PS | Presenilin | | |
| PSQ | <i>Pyrosequencing</i> | | |
| PXR | <i>pregnan X receptor</i> | | |
| RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System | | |
| RFLP | Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus | | |
| RNA | Ribonukleinsäure | | |
| rs | <i>reference SNP</i> | | |
| RXR | <i>Retinoid receptor X</i> | | |
| SNP | <i>single nucleotide Polymorphism</i> | | |
| SXR | <i>steroid and xenobiotic receptor</i> | | |
| Tab. | Tabelle | | |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer | | |
| Taq | <i>Thermophilus aquaticus</i> | | |
| TNF- α | <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> | | |

Nukleinbasen

| | |
|---|---------|
| A | Adenin |
| C | Cytosin |
| G | Guanin |
| I | Inosin |
| T | Thymin |
| U | Uracil |

Aminosäuren

| | | | |
|---------|----------------|---------|--------------|
| Ala (A) | Alanin | Leu (L) | Leucin |
| Arg (R) | Arginin | Lys (K) | Lysin |
| Asn (N) | Asparagin | Met (M) | Methionin |
| Asp (D) | Asparaginsäure | Phe (F) | Phenylalanin |
| Cys (C) | Cystein | Pro (P) | Prolin |
| Gln (Q) | Glutamin | Ser (S) | Serin |
| Glu (E) | Glutaminsäure | Thr (T) | Threonin |
| Gly (G) | Glycin | Trp (W) | Tryptophan |
| His (H) | Histidin | Tyr (Y) | Tyrosin |
| Ile (I) | Isoleucin | Val (V) | Valin |

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Alzheimer-Demenz

Im Jahre 2001 litten bereits 24 Mio. Menschen weltweit an Demenz – wobei sich die Zahl voraussichtlich alle 20 Jahre verdoppelt, sodass es im Jahr 2040 bereits 81 Mio. Erkrankte geben wird (1). Bei ca. 50-60% der Fälle (2) handelt es sich dabei um die Alzheimersche Krankheit. Insgesamt ist ca. 1% der 60- 64-Jährigen in der westlichen Welt betroffen. Mit steigendem Alter nimmt die Prävalenz der Alzheimer-Demenz (AD) exponentiell zu: Unter den über 84-Jährigen beträgt sie bereits 24-35% (1). Die Ursache für die steigende Zahl liegt vor allem in der zunehmenden Lebenserwartung der Bevölkerung in den westlichen Industriestaaten. Für Kliniken, Krankenkassen, potentielle Angehörige und die medizinische Forschung wird die Krankheit somit ein immer wichtigeres Thema. Bezüglich der Ätiologie und Therapie der AD befindet sich die heutige Medizin jedoch in einem Dilemma: Trotz intensiver Forschung, trotz hoher epidemiologischer Relevanz und trotz hohem Humankapital in Labor und Klinik gibt es weder sicher etablierte Kausaltherapien noch eine geschlossene Argumentationskette bezüglich der neurodegenerativen Ursachen der Alzheimer-Demenz.

1.2 Definition und Diagnosestellung

Nach der International Classification of Diseases (ICD-10) der WHO ist eine Demenz als eine Gedächtnisstörung mit Nachlassen anderer kognitiver Fähigkeiten und des Denkvermögens, Veränderungen der Persönlichkeit und demzufolge einer Beeinträchtigung der Selbstständigkeit im Alltag definiert. Die Symptomatik muss über mindestens sechs Monate nachweisbar sein (3).

1.2.1 Klinisches Bild

Nach einem Prodromalstadium, welches durch eine Gedächtnisstörung und das sog. „Minimal Cognitive Impairment“, d.h. eine Einschränkung bei komplizierten Tagesaufgaben, gekennzeichnet ist (4), kommen im Verlauf der Erkrankung weitere Frühsymptome wie eine Benennungsstörung, eine räumliche Orientierungsstörung, ein Verlust der Selbstständigkeit und bei einem Teil der Patienten depressive Symptomatiken hinzu.

Im Verlauf entwickelt sich das Vollbild einer kortikalen Demenz, wobei das Kernsymptom in einer ausgeprägten Neugedächtnisstörung liegt. Außerdem kommt es zu visuell-räumlichen Verarbeitungsstörungen (Abzeichnen, Schreiben, Rechnen, Uhrenlesen, Orientierung im

Raum), psychischen Symptomen (v.a. Depressionen, Unruhe, Angst) und einer zunehmend inhaltsarmen, unpräzisen und phrasenhaften Sprache.

Charakteristisch für die Alzheimer-Demenz ist außerdem, dass Patienten oft zwanghaft versuchen, die „gute Fassade“ aufrechtzuerhalten. Vigilanz, psychomotorisches Tempo und Persönlichkeit bleiben oft lange gut erhalten.

Im Spätstadium der Krankheit kommt es schließlich zum Abbau aller höheren Hirnleistungen, zu Mutismus und Inkontinenz. Motorik und Sensorik sind oft relativ resistent gegen den kontinuierlichen Abbau (3).

Die Alzheimer-Demenz zeigt einen chronisch progredienten Verlauf. Sie endet, meist fünf bis acht Jahre nach Diagnosestellung letal. Klinisch gesehen handelt es sich bei der Alzheimer-Demenz um eine Ausschlussdiagnose, deren Sicherung nur postmortal durch neuropathologische Analysen vorgenommen werden kann (5).

1.3 Histopathologische Grundlagen der Alzheimer-Demenz

Am 3. November 1906 stellte der neuropathologisch tätige Psychiater Alois Alzheimer (*1864 Marktbreit, Bayern, †1915 Breslau) erstmals einen Fall der später nach ihm benannten Demenz auf einem Kongress in Tübingen vor. Erst 1910 fand die offizielle Benennung durch den Psychiater Emil Kraepelin, der die Alzheimer-Demenz in der achten Ausgabe des „Lehrbuchs für Psychiatrie“ erwähnte, statt (6). Am Beispiel seiner langjährigen Patientin Auguste Deter hatte Alzheimer zunächst klinische Charakteristika wie Gedächtnisverlust und eine Störung der exekutiven Funktionen diagnostiziert und, nachdem die Patientin mit 51 Jahren starb, ihr Gehirn neuropathologisch untersucht (7).

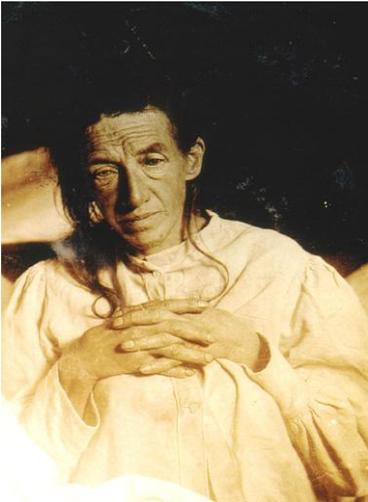
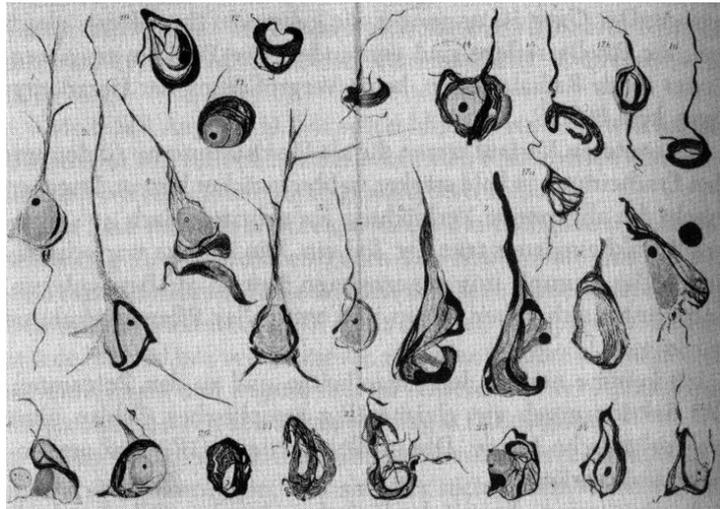
A**B**

Abb. 1: **A:** Fotografie der Auguste Deter; **B:** Von Alois Alzheimer gezeichnete neurofibrilläre Bündel unter dem Lichtmikroskop (8).

Hierbei wies er erstmalig sog. Amyloid-Plaques und neurofibrilläre Bündel nach. Auch heute noch stellen diese beiden Charakteristika die Grundlage für die post-mortem Diagnose der Krankheit dar (9, 10). Vor allem der Nachweis in Hippocampus, Neocortex und dem limbischen System gilt als charakteristisch (10).

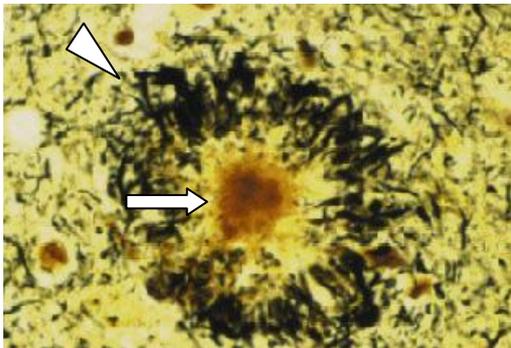
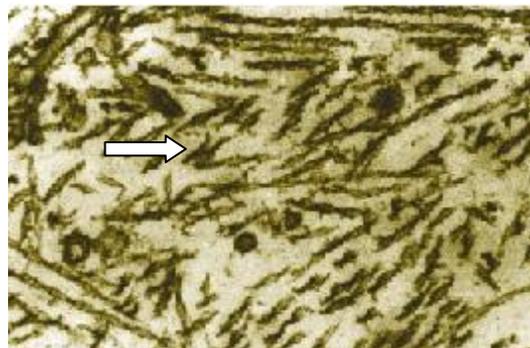
A**B**

Abb. 2: Histopathologische Charakteristika der Alzheimer-Demenz

A: Aufnahme eines Amyloid-Plaques (Pfeil), umgeben von dystrophen Neuriten (Pfeilkopf),

B: Elektronenmikroskopische Aufnahme von neurofibrillären Bündeln (11).

Neurofibrilläre Bündel, die sog. Tangles, finden sich vor allem intrazellulär in Neuronen, wobei sie hier vor allem somatisch-dendritisch, zu einem Teil aber auch axonal (12) lokalisiert sind. Die Fibrillen bestehen aus gepaarten helikalen Filamenten des in abnormalem

Maße hyperphosphoryliertem und somit unlöslichem Tau-Protein (13, 14). Die hierdurch bedingte Zytotoxizität führt schließlich zum Untergang des Neurons (15).

Neben den sog. Tangles stehen die sog. Amyloid- oder A β -Plaques im Zentrum der Alzheimerpathologie. Im Gegensatz zu Tau-Fibrillen sind diese vor allem extrazellulär und in cerebralen Gefäßwänden nachweisbar (16). Hierbei werden diffuse Plaques und klassische kernhaltige („cored“) Plaques, subpiales bandartiges Amyloid, Lake-like-amyloid, fleecy Amyloid, core-only-Plaques und Marklagerplaques unterschieden (17). Neben den extrazellulären A β -Ablagerungen lassen sich auch intrazellulär in Neuronen Ablagerungen des Proteins nachweisen. Studien an transgenen Mäusen und menschlichem Autopsiegewebe ergaben, dass die intrazelluläre Akkumulation von A β der extrazellulären Ablagerung vorausgeht (18, 19). Obwohl von großer ätiologischer Bedeutung steht intrazelluläres A β noch nicht im Zentrum der post-mortem Diagnostik.

1.4 Molekulare und genetische Pathomechanismen der Alzheimer-Demenz

Obwohl die Ablagerung von A β -Plaques und die Entstehung von Tau-Bündeln wichtige neuropathologische Charakteristika der AD darstellen, sind sie nicht spezifisch für die Alzheimersche Krankheit (20, 21). So führen genetische Mutationen in Tau-Genen zu Parkinsonismus oder frontotemporaler Demenz. Außerdem ergab eine Studie an amerikanischen Nonnen, deren kognitive Fähigkeiten untersucht wurden und deren Gehirne postmortal auf A β -Plaques untersucht wurden, dass einige kognitiv gesunde Personen viele Plaques aufwiesen, während bei einigen Probanden, die Einschränkungen im Rahmen einer AD gezeigt hatten, teilweise nur sehr wenige Plaques nachgewiesen wurden. Trotzdem gilt die Schlüsselposition der A β in der Pathogenese der Alzheimer-Demenz als unumstritten (16, 22, 23).

Einige Studien weisen darauf hin, dass die Ablagerung von A β -Plaques der Bildung von Tau-Fibrillen vorausgeht (24).

Untersucht man A β -Plaques auf ihre Bestandteile hin, so ergibt sich, dass sie vor allem aus einem kurzen, amphipathischen Peptid, dem A β -Peptid, bestehen. Weitere Bestandteile sind ApoE und J, α 1-Antichymotrypsin und Proteoglykane (25). Überraschenderweise wird A β aber auch im gesunden Gehirn kontinuierlich produziert (26). Es wird zwischen einer physiologischen, nicht amyloidogenen Prozessierung, und einer alzheimer-typischen, amyloidogenen Prozessierung unterschieden.

1.4.1 Die Prozessierung von β APP und die Bildung des A β -Peptids

Sowohl in gesunden als auch in von Alzheimer betroffenen Gehirnen entsteht A β aus einem Vorläuferprotein, dem amyloid precursor protein (APP), einem integralen Membranprotein, welches aus 39 bis 43 Aminosäuren besteht und auf Chromosom 21 kodiert wird. Das APP-Gen enthält 18 Exons und verfügt über 7 bekannte Splice-Varianten. Die am häufigsten vorkommenden Varianten sind 695, eine Variante, die vor allem in Neuronen vorkommt, 751 und 771 (27), ein Transkript, welches in vielen nicht-neuronalen Zellen exprimiert wird.

Über die eigentliche Funktion des APP herrscht Unklarheit, obwohl es in fast allen Geweben exprimiert wird. Vieles weist darauf hin, dass es mehrere Funktionen hat, so z.B. die Stimulation von Neuritenwachstum, die Bildung von Zell-Adhäsionsmolekülen und die Induktion von Synaptogenese und Zellüberleben (28).

Interessanterweise leiden Patienten mit Down-Syndrom oft bereits mit 40 Jahren an einer Alzheimersymptomatik. Die Ursache liegt im zusätzlichen Chromosom 21 und ist demzufolge ein Gendosiseffekt (28).

Nach seinem Einbau in die neuronale Zytoplasmamembran wird aus dem APP durch eine Reihe von Proteasen A β freigesetzt. Aufgrund der durch Proteolyse entstehenden Sezernierungsprodukte werden diese Proteasen auch als Sekretasen bezeichnet. Zunächst wird das vorliegende APP durch die α - oder β -Sekretase gespalten, das entstandene Produkt wiederum wird nochmals durch die γ -Sekretase geschnitten. Die Nomenklatur der entstehenden A β -Peptide leitet sich aus ihrer jeweiligen Länge ab.

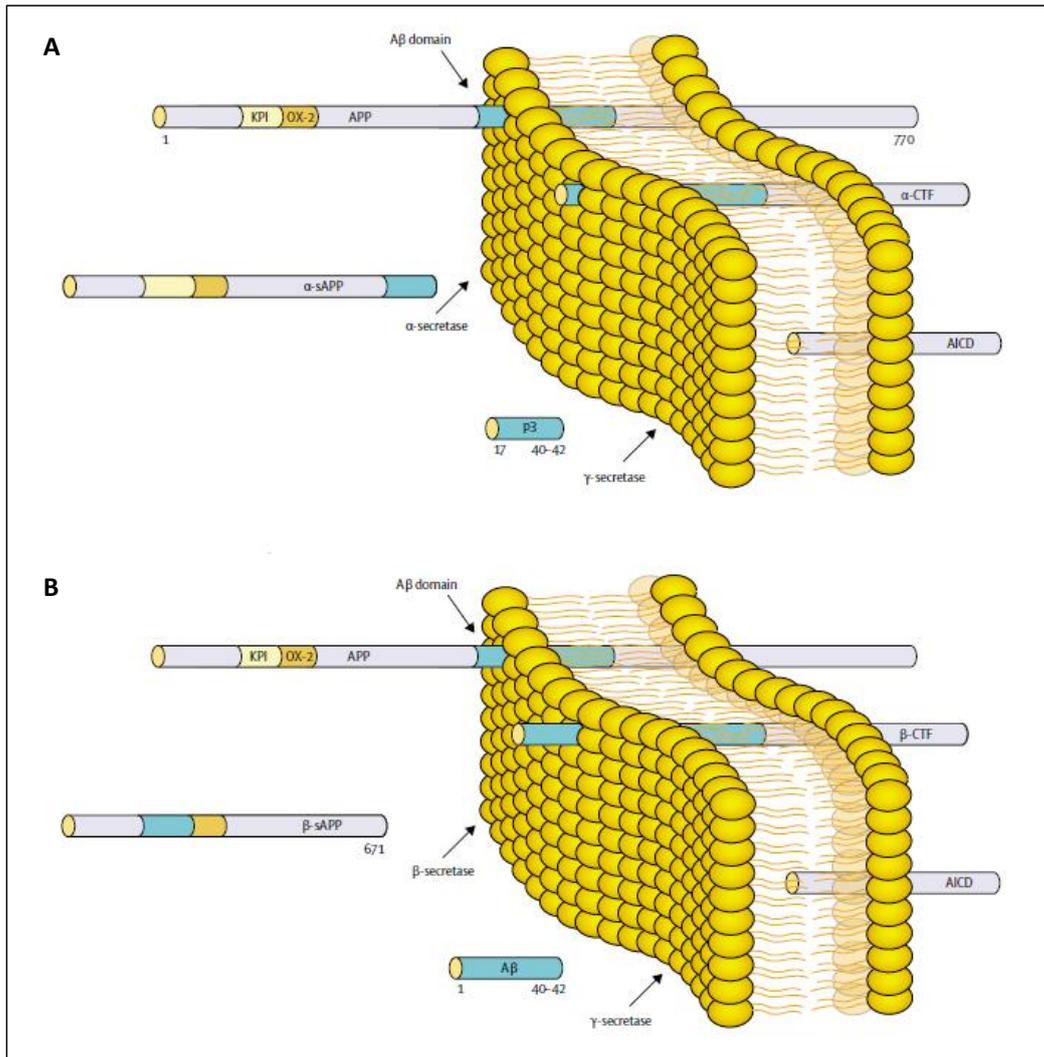


Abb. 3: **A:** Schema des nicht-amyloidogenen α -Sekretase-Stoffwechselweges; **B:** Schema des amyloidogenen β -Sekretase-Stoffwechselweges (2).

1.4.2 Die hereditäre AD

Im Falle einer hereditären AD liegt das Erkrankungsalter häufig im frühen Erwachsenenalter. Die klinische Entwicklung der Demenz inklusive ihrer Begleitsymptome lässt sich eindeutig anhand bestimmter Genmutationen begründen: Diese befinden sich im Amyloid-Precursor-Protein (APP)-Gen auf Chromosom 21 (29) im Presenilin (PS)-1-Gen und im Presenilin (PS)-2-Gen (30, 31). Insgesamt ist die ausschließlich genetisch verursachte Form der AD mit einer Prävalenz von 0.1% sehr selten (32).

Die meisten Mutationen führen entweder dazu, dass insgesamt mehr A β produziert wird oder dass selektiv mehr A β_{42} entsteht. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die schwedische Doppelmutation K595N/M596L: Hierbei handelt es sich um eine erstmals bei einer schwedischen Familie nachgewiesene Form der familiären AD (33), die inzwischen

auch in Form einer „knock-out“-Maus vorliegt. Die Mutation führt zu einer erhöhten Affinität der β -Sekretase zu ihrem Substrat (34-36). Konsekutiv wird mehr A β gebildet, welches akkumuliert und die Demenzsymptomatik hervorruft.

Bei einer Mutation der α -Sekretase kommt es höchstwahrscheinlich zu einer Veränderung im Bereich der Tertiärstruktur des Enzyms und so zu einer verminderten Aktivität (37, 38). Hierdurch gewinnt die β -Sekretase an Gewicht und es entstehen größere Mengen an A β (39).

1.4.3 Die sporadische AD

Der weitaus größte Teil der Fälle von AD ist sporadischen Typs (2). Hierbei ist die Ätiologie weitaus breitgefächerter angelegt als bei der erblichen Variante der AD. Nach heutigem Stand der Wissenschaft beruht die Demenzentstehung auf drei großen Säulen: genetische Faktoren, exogene Faktoren und physiologische Alterungsprozesse spielen eine herausragende Rolle.

1.4.3.1 Genetische Ursachen der sporadischen AD und Funktion von ApoE

Es existierten drei verschiedene ApoE-Allele ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$), von denen in der Gesamtpopulation vor allem das $\epsilon 3$ -Allel vertreten ist. Die $\epsilon 2$ - und $\epsilon 4$ -Allele sind seltener. Während für das $\epsilon 2$ -Allel eine schützende Funktion nachgewiesen werden konnte (40), erwies sich das $\epsilon 4$ -Allel als wichtigster genetischer Risikofaktor für die sporadische Alzheimer-Demenz (41).

Schon im Jahr 1993 beschrieben zwei Gruppen (32, 42) den Zusammenhang zwischen dem Apolipoprotein E (ApoE) $\epsilon 4$ -Allel und dem Risiko, an AD zu erkranken. Bei Heterozygoten wird das Risiko verdreifacht, bei Homozygoten sogar ver-15-facht (43). Der molekulare Mechanismus hinter dieser Tendenz ist komplex: ApoE fungiert im ZNS als Cholesterol-Transporter, wobei ApoE- $\epsilon 4$ weniger effizient ist als andere Varianten. Dies bezieht sich vor allem auf das Recycling von Membranbestandteilen und Reparaturmechanismen in Neuronen (44).

Außerdem könnte ApoE direkt in die A β -Deposition involviert sein, indem es die Bildung von Plaques und die Fibrillisation von A β fördert. Eventuell wirkt es hierbei vor allem als Chaperon (45). Auch die von der ApoE-Genosis abhängigen Spiegel von A β_{42} im Liquor cerebrospinalis könnte hierdurch zustande kommen (46).

1.5 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

Ein erst in letzter Zeit in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückter Aspekt der AD ist die Rolle der Blut-Hirn-Schranke (BHS) bei Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen.

Im Normalfall beruht die BHS einerseits auf festen Interzellulärkontakten, wie z.B. den tight junctions zwischen den Endothelzellen, und andererseits auf multiplen, größtenteils hochselektiven Ein- und Auswärtstransporten an apikaler und basolateraler Seite der Endothelzelle. Beides dient dem Schutz des Hirnparenchyms vor einerseits fakultativ pathogenen exogenen Faktoren (bestimmte Medikamente, Gifte etc.), andererseits schädigenden körpereigenen Substanzen und zytopathologisch relevanten Stoffwechselsituationen wie z.B. bei Glucosemangel, Urämie oder Hyperurikämie (47). Das dichte Netz aus tight junctions führt dazu, dass kleine hydrophile Moleküle die BHS nicht überqueren können. Besonders die Intaktheit des Endothels bezüglich intra- und interzellulärer Funktionen ist also ausschlaggebend für die Integrität der fragilen Stoffwechselsituation in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und anderer Zellen jenseits der BHS.

Der Transport verschiedener Moleküle über die BHS ist generell nach zwei verschiedenen Prinzipien möglich:

Einerseits können kleine, unpolare Moleküle die BHS durch freie (passive) Diffusion überwinden, andererseits werden größere, polare, aber auch lipophile Substanzen durch ATP-katalysierte Membrantransporter transportiert (48). Nur so gelangen essentielle Stoffwechselsubstrate wie Elektrolyte, Nukleoside, Aminosäuren, Schilddrüsenhormone, Amine, Purinbasen, Nucleotide und Glucose (49-52) zu den Zellen jenseits der BHS. Größere Moleküle durchdringen die BHS kaum, wobei Proteine wie Transferrin, Lactoferrin und low-density lipoprotein (LDL) Ausnahmen darstellen und über Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert werden (53, 54). In umgekehrter Richtung (von der basolateralen Seite der BHS-Endothelzellen zu ihrer apikalen Seite, wo sie ins Blut abgegeben werden) werden vor allem Medikamente, Toxine und diverse andere, potentiell neurotoxische Stoffe transportiert. Die Aufrechterhaltung des stetigen Effluxes beruht neben dem Verbrauch von Adenosintriphosphat auf folgendem Prinzip: Durch die Exkretion der Stoffe an der apikalen Membran der Endothelzellen wird die Konzentration des jeweiligen Substrats im Zytoplasma der Zelle erniedrigt, wodurch der Gradient zwischen Zytoplasma und Hirnparenchym für die jeweilige Substanz verstärkt wird (55).

Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen und auch bei allen Typen der AD gehört die Ablagerung neuropathologischer Plaques zur Krankheitsätiologie. Auch in den Gehirnen gesunder Personen werden diese Stoffe allerdings gebildet. Es liegt also der Schluss nahe, dass bei AD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen der Abtransport bestimmter Stoffe über die BHS gestört ist.

Ein Ansatzpunkt, in dieser Dissertation ausschlaggebend, ist der Besatz insbesondere der kleinsten Kapillaren mit Ein- und Auswärtstransportern aus der Familie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette-Transporter).

1.6 Die ABC-Transporterproteine

Die transmembrären ABC-Transporter (ATP-binding Cassette) gehören zur Familie der ABC-Proteine, wobei aktuell 49 humane ABC-Gene beschrieben sind. Wichtige Vertreter sind unter anderem ABCA1, MDR1 (multi drug resistance protein 1, auch als P-Glykoprotein (P-gp) oder nach HUGO als ABCB1 bezeichnet), MRP2 (multi drug resistance protein 2, nach HUGO auch als ABCC2 bezeichnet) und ABCG2. Die physiologische Funktion der ABC-Transporter liegt vor allem im Bereich des Arzneimittelmetabolismus und der Fremdstoffabwehr: An der Blut-Hirn-Schranke, in Leber, Niere, Darm, an der Plazenta und vielen anderen Geweben sind die apikal-luminal lokalisierten Transporter für den unter ATP-Verbrauch stattfindenden aktiven Transport endogener und exogener Substrate und deren Konjugate aus den Zellen in die Exkretionsorgane verantwortlich (56). ABC-Transporter dienen also sowohl zum Schutz insbesondere des Gehirns vor exogenen, potentiell toxischen Substanzen, sorgen aber eventuell auch für den Abtransport endogener Schadstoffe wie höchstwahrscheinlich auch A β . Eine Funktionsminderung dieses Schutzmechanismus könnte also das Alzheimerisiko erhöhen.

1.6.1 Der ABCA1-Transporter

Das ABCA1-Gen liegt auf Chromosom 9q22 und beinhaltet 50 Exons. Das nach der Translation entstehende Protein weist eine Länge von 2261 Aminosäuren auf und verfügt über ein Molekulargewicht von 220 kDa (57). Der Transporter ist vor allem in Leber, Uterus und Nebenniere, aber auch im Gehirn, besonders in Putamen, Occipitallappen, Amygdala, Nucleus caudatus, Hippocampus, Substantia nigra und im Occipitallappen lokalisiert. Besonders auf Mikro- und Astrogliazellen findet sich eine hohe Transporterdichte (58). Der ABCA1-Transporter transportiert vor allem Cholesterol und nimmt daher eine wichtige Rolle in der Regulation des ApoE- und HDL-Metabolismus ein. Im Rahmen der Tangier-Krankheit,

die durch verschiedene Mutationen auf dem ABCA1-Gen definiert ist, kommt es so zum Beispiel zu stark verminderten Serum-HDL- und ApoE-AI-Spiegeln und zu einer schweren Störung des Cholesterinstoffwechsels mit massiven Ablagerungen von Cholesterolestern in Makrophagen (59, 60).

Eine ABCA1-Defizienz führt außerdem zu einer cerebralen Akkumulation von Cholesterol in kultivierten Gliazellpopulationen, einer eingeschränkten glialen ApoE-Freisetzung und folglich zu erhöhten A β -Spiegeln (61, 62). Ein erhöhtes intrazelluläres Cholesterol begünstigt außerdem die Spaltung von APP durch die β - und γ -Sekretase (63). Es liegt somit nahe, dass die ABCA1-Aktivität mit dem Risiko, an Alzheimer-Demenz zu erkranken, assoziiert ist.

Das ABCA1-Gen weist einige Polymorphismen auf, die mit der Aktivität des Transporters assoziiert sind. Studien von Rodriguez-Rodriguez et al. (2007), Katzov et al. (2004) und Sundar et al. (2007) (64-66) bestätigten diesen Zusammenhang und ergaben, dass Träger des ApoE ϵ 4-Allels, die gleichzeitig homozygot für das ABCA1 -14T-Allel sind, ein 3.7 fach erhöhtes Alzheimerisiko tragen (OR 13,99) (64). In einigen anderen Studien wurde dieser Zusammenhang nicht bestätigt (67-70).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Polymorphismen ABCA1 -14C>T, ein SNP, der in der Promotorregion des ABCA1-Gens liegt, sowie 1051G>A genotypisiert (71, 72).

1.6.2 Der ABCB1-Transporter

Das auf Chromosom 7q21 liegende ABCB1-Gen umfasst 28 Exons und führt nach der Translation zur Entstehung eines Proteins mit einer Länge von 1280 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa (47). Erstmals auf Cholchizin-resistenten Hamster-Ovarialzellen nachgewiesen (73), fiel später auf, dass mit Chemotherapeutika behandelte Zellen nicht nur gegen diese, sondern auch gegen andere Zytostatika Kreuzresistenzen entwickelten (74, 75). Der Transporter wurde, um dieser Eigenschaft Rechenschaft zu tragen, als „multidrug resistance“ (MDR) protein 1 bezeichnet. Neben seiner Expression in Leber, Darm, Niere, Plazenta und Blut-Hoden-Schranke (76) wird der ABCB1-Transporter auch an den Endothelien der Blut-Hirn-Schranke (76, 77), perivaskulären Parenchymzellen und Astrozyten exprimiert (47, 50). Obwohl der ABCB1-Transporter in vielen Geweben nachweisbar ist und er diverse amphiphile, neutrale und kationische Substrate transportiert, ergaben Untersuchungen an *mdr1*-knock-out-Mäusen, dass diese gegenüber Wildtyp-Mäusen unter Normalbedingungen keine Auffälligkeiten aufweisen (78). Bei Gabe des neurotoxischen Makrolidantibiotikums Ivermectin war allerdings eine massiv erhöhte zentrale Akkumulation

nachweisbar, die zum Exitus der Tiere führte (79, 80). Die Schlüsselrolle des Transporters liegt also in der Exkretion von Xenobiotika und Pharmazeutika (81).

Der ABCB1-Transporter transportiert Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Vinblastin, Etoposid, Paclitaxel und Methotrexat, Immunsuppressiva wie Ciclosporin A und Tacrolimus, Corticoide, Analgetika wie Morphin, Methadon und Fentanyl, HIV-Proteaseinhibitoren, Cytokine, Antiepileptika und viele andere Arzneimittel (47). Von hoher Relevanz für die klinische Forschung ist außerdem, dass der ABCB1-Transporter durch Inhibitoren wie Verapamil, PSC 833 (Valspodar) und GF 120918 (Elacridar) gehemmt werden kann und durch Induktoren wie Rifampicin, Hyperforin, Dexamethason, Clotrimazol und Phenobarbital vermehrt aktiviert wird (47). Klinische Relevanz erlangt das große Interaktionspotential des ABCB1-Transporters z.B. bei der Pharmakoresistenz bei Epilepsien, Depressionen und Schizophrenien (82-84).

Neben einigen spezie-spezifischen Rezeptoren wie PXR/SXR ist die Regulation der Transporteraktivität durch verschiedene stressassoziierte Umweltfaktoren beschrieben: Cytotoxische Agentien, Hitzeschock, Wärmestrahlung, genotoxischer Stress, Entzündungsmediatoren, Cytokine und verschiedene Wachstumsfaktoren (85) können die Transporterexpression beeinflussen.

Im hochpolymorphen ABCB1-Gen finden sich über 50 single nucleotide polymorphisms (SNPs), drei insertions-deletions-Polymorphismen und zahlreiche Promoteralterationen (86). In dieser Arbeit sollen die SNPs ABCB1 1236C>T, 2677G>TA und 3435C>T untersucht werden.

Der nicht-synonyme triallelische SNP 2677G>TA (Ala893Ser/Thr) liegt im Exon 21, der synonyme SNP ABCB1 3435C>T (Ile1145Ile) im Exon 26, der ebenfalls synonyme SNP ABCB1 1236C>T im Exon 12. Lediglich 2677G>TA verursacht einen Aminosäureaustausch in einer strukturell wichtigen Transmembrandomäne des Proteins. 3435C>T und 1236C>T ziehen keinen Aminosäureaustausch auf Proteinebene nach sich, haben aber eventuell funktionelle Bedeutung (87-89). Alle drei SNPs sind aneinander gekoppelt, was dazu führt, dass bestimmte Haplotypen in einer Population gehäuft anzutreffen sind.

1.6.3 Der ABCC2-Transporter

Das auf Chromosom 10q24 liegende ABCC2-Gen umfasst 32 Exons und mündet nach der Translation in ein 1545 Aminosäuren langes Protein von 190 kDa Molekulargewicht.

ABCC2, welches nach alter Nomenklatur als multidrug resistance-associated protein 1 (MRP 2) bezeichnet wird, ist vor allem für den Transport von organischen, anionischen Gluthation-, Sulfat- und Glucoronidkonjugaten zuständig, die endogen über die Galle ausgeschieden werden. Unter den vielen organischen Anionen, die ABCC2 transportiert, ist die Affinität zu Glucoronat und GSH-Konjugaten lipophiler Substanzen besonders hoch (90, 91). Auch exogene Substanzen wie 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridin (PhIP), ein beim Erhitzen von Nahrungsmitteln entstehender Giftstoff, Pravastatin, welches bilär durch ABCC2 ausgeschieden wird, Arsen, welches zunächst an Gluthation gekoppelt wird, Methotrexat, LTC₄, DNP-SG, E217betaG, Vincristin, Etoposid und Bilirubingluconoside werden von ABCC2 transportiert (92-96). Leukotrien C₄, Probenecid und MK-571 führen zu einer Inhibition von ABCC2 (47). Der ABCC2-Transporter findet sich vor allem apikal-luminal in Hepatozyten (97), proximalen Tubulusepithelzellen der Niere (98, 99) und auf Dünndarmenterozyten (100). ABCC2 und ABCB1 scheinen hierbei häufig kolokalisiert zu sein (80). Die Nachweisbarkeit an der Blut-Hirn-Schranke wird kontrovers diskutiert (101). Sollte der Transporter hier vorhanden sein, so ist er dies in einem weitaus geringeren Maße als hepatisch oder renal (102, 103). Der ABCC2-Transporter gewinnt im ZNS vor allem im Rahmen von pharmakoresistenten Epilepsien an Bedeutung: In epilepsiegeschädigten Hirnarealen ist der ABCC2-Transporter vermehrt an der BHS nachweisbar (104, 105).

Das ABCC2-Gen verfügt über 200 natürlich vorkommende Sequenzvarianten, die in Exons, Introns oder den an 5'- und 3'-Ende lokalisierten flankierenden Regionen lokalisiert sind. Die meisten von ihnen haben keine funktionelle Bedeutung. Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom (106) weisen verschiedene autosomal rezessiv vererbte Mutationen oder Deletionen im ABCC2-Gen auf, die zu einer Funktionsminderung oder einem Funktionsverlust des Transportproteins an der kanalikulären Hepatozytenmembran führen (107, 108). Konsekutiv ist bei den Betroffenen eine konjugierte Hyperbilirubinämie und eine vermehrte Pigmentierung der Hepatozyten zu beobachten. Außerdem werden andere Transporter wie z.B. ABCC3 (MRP3), ein vor allem hepatisch basolateral lokalisiertes ABC-Familienmitglied, überexprimiert (109, 110).

Interessanterweise scheint bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten das ABCC2 -24T-Allel häufiger vorzukommen (111). Das ABCC2 1249A-Allel, welches schwach an das -24T-Allel gekoppelt ist, lässt sich mit -24T zu einem Haplotypen zusammenfassen, welcher bei Patienten mit therapieresistenter Epilepsie ebenfalls gehäuft zu beobachten ist (111). Wie dieser Effekt zustande kommt, wird kontrovers diskutiert, denn in vitro konnte gezeigt

werden, dass das -24T-Allel mit einer verminderten Transporteraktivität assoziiert ist, was eigentlich höhere zentrale Antikonvulsivaspiegel zur Folge haben müsste (112). Auch eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Methotrexat (113) und eine verminderte orale Clearance von Mykophenolat (114) konnte bei Trägern des -24T-Allels vermehrt gezeigt werden. Höchstwahrscheinlich findet bei Epilepsiepatienten eine kompensatorische Heraufregulation des ABCB1-Transporters statt, wodurch letztendlich die schlechtere Prognose zustande kommt (111).

Hier wurden die SNPs ABCC2 -24C>T, 1249G>A und 3972C>T untersucht.

1.6.4 Der ABCG2-Transporter

Das ABCG2-Gen liegt auf Chromosom 4q22 (115). Das entstehende Protein ist 655 Aminosäuren lang und wiegt 72,1 kDa. Der ABCG2-Transporter ist auch unter dem Namen breast cancer related protein (BCRP), mitoxantrone resistance protein (MXR) und ABC transporter expressed in placenta (ABCP) zu finden. Die Erstbeschreibung fand an Doxorubicin-resistenten menschlichen Mamma-Karzinomzellen (116), an Placentazellen (115) und an hochgradig Mitoxantron-resistenten Kolonkarzinomzellen statt (117).

Wie bei allen ABCG-Transportern handelt es sich bei ABCG2 um einen half-Transporter mit nur einer ATP-Bindungsstelle und sechs Transmembrandomänen. Um ihre volle Funktionsfähigkeit zu erreichen, müssen jeweils zwei half-Transporter zu einem Homodimer oder full-Transporter dimerisieren (118, 119).

Das ABCG2-Protein ist vor allem für den intestinalen Efflux von exogenen Substanzen, darunter viele Chemotherapeutika wie dem Folsäureantagonisten Mitoxantron, den Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Gifitinib, Topoisomerase-I-Inhibitoren wie Topotecan und Irinotecan, Prazosin, Dehydroepiandrosteron-sufat (120) und vielen anderen verantwortlich (121). Auch am Transport von Antibiotika wie Nitrofurantoin (122), der biliären Exkretion von Fluorchinolonen und der tubulären Sekretion von Ciprofloxacin und Grepafloxacin ist ABCG2 beteiligt (123). Durch GF 120918 (Elacridar) findet, wie auch bei ABCB1, eine Inhibition statt. Auch Fumitremorgin C (FTC), Analoga davon und Pantoprazol hemmen den Transporter (47).

Der ABCG2-Transporter findet sich apiko-luminal in Dünndarm, Dickdarm, Leber, Lunge, Niere, Kapillarendothel, auf einigen Subpopulationen von pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen (124-126), an der Blut-Hoden-Schranke und an der Plazenta auf der apikalen Membran von Trophoblastzellen. Auch im ZNS an der Blut-Hirn-Schranke ist ABCG2 valide nachweisbar (127, 128). Wie ABCB1 und ABCC1 kann auch eine Überexpression von

ABCG2 zur Chemoresistenz verschiedener Tumoren führen und wird so zu den „multi drug resistance“-Proteinen gezählt (115, 129).

Außerdem könnte ABCG2 in die Entstehung einer AD involviert sein: Xiong et al. beobachteten sowohl an AD-Patienten als auch im AD-Mausmodell eine Heraufregulation von ABCG2. Bei Mäusen, denen der ABCG2-Transporter fehlt, kommt es zu einer signifikant erhöhten cerebralen Akkumulation von A β (130).

Das ABCG2-Gen verfügt über mehr als 50 SNPs. Der mit Abstand am besten charakterisierte ist der SNP 421C>A im Exon 5. Der SNP führt zu einem Aminosäureaustausch von Gln (Glutamin) zu Lys (Lysin) im Codon 141 und führt in vivo an Flp-In-293-Zellen zu einer dem Wildtyp gegenüber halbierten Proteinexpression (131). Variantallelträger (421A oder 141K) weisen im Vergleich zum Wildtyp außerdem eine verminderte ATPase-Aktivität des Transporters auf (132). Der SNP ABCG2 421C>A verändert nicht nur die Proteinexpression, sondern auch die Aktivität des enkodierten Proteins. In Bezug auf die Frequenz dieses Polymorphismus gibt es starke Unterschiede zwischen den Ethnien: Während die Mutation unter Chinesen mit 35% relativ häufig ist, ist sie unter Afroamerikanern mit 1% sehr selten (133). Spezifische, durch einen Funktionsverlust von ABCG2 bedingte Krankheiten sind bisher nicht bekannt. ABCG2-knock-out-Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar (134, 135). Interessanterweise lässt sich bei *mdr1a*-knock-out-Mäusen eine Überexpression von BCRP an der Blut-Hirn-Schranke beobachten. Wird ABCG2 nun durch Gabe von GF120918 gehemmt, kommt es zu einer verstärkten Aufnahme der ABCG2-Substrate Prazosin und Mitoxantron ins ZNS (136).

1.8 Zielsetzung

Die intrazerebrale Akkumulation des toxischen Proteins A β ₄₂ steht im Zentrum der Pathogenese der Alzheimer-Demenz. Der Abtransport des Proteins über die Blut-Hirn-Schranke ins periphere Blut ist dementsprechend ebenfalls von großer Bedeutung. Transporter an der Blut-Hirn-Schranke, wie z.B. die der ABC-Transporterfamilie, interagieren mit A β und vermindern so seine Spiegel im zentralen Nervensystem. Wichtig für die Aktivität dieser Transporter sind einzelne Basenmutationen, sog. single nucleotide polymorphisms, die mit einer bestimmten Frequenz in der Normalbevölkerung vorkommen.

In dieser Studie wurden 151 Gehirnproben untersucht, wobei es sich bei 71 Personen um Träger einer klinisch und post-mortem neuropathologisch diagnostizierten Alzheimer-Demenz handelte.

Im Zentrum stand die Frage, ob genetische Varianten in ABC-Transportergenen das Risiko, an Morbus Alzheimer zu erkranken, beeinflussen. Besonders im Fokus stand der Transporter ABCB1, da hier bereits gezeigt werden konnte, dass er β -Amyloid transportiert. Die Untersuchung der Transporteraktivität und – funktionalität könnte auf diese Weise einen Teil zur Klärung der komplizierten Pathogenese der Alzheimer-Demenz beitragen und eventuell neue Ausblicke in Bezug auf genetische Diagnostik und Therapie ermöglichen.

Vor diesem Hintergrund wurden SNPs der ABC-Transporter ABCA1, B1, C2 und G2 genotypisiert. Außerdem wurde der einzige bisher feststehende genetische Risikofaktor der idiopathischen Alzheimerdemenz, der ApoE- ϵ 4-Allelstatus, erhoben, um eine zusätzliche Risikostratifikation zu ermöglichen. Außerdem treten die Effekte der ABC-Transportervarianten bei Fehlen des ApoE- ϵ 4-Allels stärker in den Vordergrund.

Als zusätzliche Stratifikationskriterien wurden das Alter und das Geschlecht der Probanden herangezogen.

2 Material und Methoden

2.1 Proben

Insgesamt wurden 71 cerebelläre Proben von unter histopathologischen Kriterien an Alzheimerdemenz erkrankten Probanden mit signifikanten hohen cerebralen A β -Spiegeln (CERAD B/C) und 80 nicht-demente Kontrollen mit keinen oder sehr geringen A β -Ablagerungen in die Studie einbezogen. Von diesen Proben entstammten 50 AD-Fälle und 49 Kontrollen aus dem BrainNet (München, Deutschland). Weitere 21 AD-Fälle und 31 Kontrollen stammten aus den neuropathologischen Instituten der Universitäten Greifswald und Ulm, wobei hier vor allem Frau Privatdozent Dr. med. Silke Vogelgesang und Prof. Dr. Frank Dombrowski beteiligt waren. Diese Proben lagen entweder in gefrorenem oder formalinfixiertem Zustand vor, was eine variable Qualität der DNA zur Folge hatte. Unter den AD-Fällen (Männer 44.3%, Frauen 55.7%) lag das mittlere Alter bei 78.4 ± 10.7 Jahren (39 – 98 Jahre), unter den Kontrollen (Männer 59.3%, Frauen 40.7%) bei 69.5 ± 11.4 Jahren (21 – 100 Jahre). Die Studie wurde durch das Ethikkomitee der Universität Greifswald bewilligt.

2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung wurde photometrisch (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt, wobei mit einer Wellenlänge von 260 nm die Extinktion gemessen wurde. Die optische Dichte (OD) bei 260 nm Wellenlänge wurde gleich eins gesetzt ($OD_{260}=1$) und entsprach einem Gehalt doppelsträngiger DNA von 50 $\mu\text{g/ml}$. Außerdem wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm die Absorption gemessen, um aus dem Quotienten $OD_{260/280}$ den Kontaminationsgrad mit Proteinen zu errechnen. Die DNA-Konzentration wurde auf ein Optimum von 30-100 ng DNA pro μl verdünnt.

2.3 Genotypisierung

Grundlage aller Genotypisierungsreaktionen war die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), wobei das Ergebnis jeweils stichprobenartig über Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert wurde. Die weiterführende Analyse fand mittels Pyrosequencing und enzymatischem Verdau im Rahmen eines Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP, bei ABCG2 34G>A) statt.

Tab. 1: untersuchte Polymorphismen

| Gen | Polymorphismus | rs-Nummer | Methode |
|-------|----------------|-----------|------------|
| ABCA1 | -14C>T | rs180097 | PCR + PSQ |
| | 1051G>A | rs2230806 | PCR + PSQ |
| ABCB1 | 1236C>T | rs1128503 | PCR + PSQ |
| | 2677G>TA | rs2032582 | PCR + PSQ |
| | 3435C>T | rs1045642 | PCR + PSQ |
| ABCC2 | 24C>T | rs717620 | PCR + PSQ |
| | 1249G>A | rs2273697 | PCR + PSQ |
| | 3972C>T | rs3740066 | PCR + PSQ |
| ABCG2 | 34G>A | rs2231137 | PCR + RFLP |
| | 421C>A | rs2231142 | PCR + PSQ |
| ApoE | 130C>T | rs429358 | PCR + PSQ |
| | 176C>T | rs7412 | PCR + PSQ |

2.3.1 Alleldiskriminierung mittels PCR und Pyrosequencing

Zur Ermittlung des Genotyps der erwähnten Basenaustausche (SNPs, single nucleotide polymorphisms) für ABCA1 (-14C>T und 1051G>A), ABCB1 (1236C>T, 2677G>TA und 3435C>T), ABCC2 (24C>T, 1249G>A und 3972C>T), ApoE (130C>T und 176C>T) und ABCG2 (34G>A und 421C>A) wurde zunächst eine PCR durchgeführt. Die Versuchsprotokolle wurden den jeweiligen Primer-Längen und der Schmelztemperatur des jeweiligen Primers angepasst. Es wurden jeweils 0,8 bis 1 µl DNA, einer rekombinanten Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Desoxyribonukleotidtriphosphate (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) und zwei flankierende Primer (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland oder Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland, Primerdesign mit Pyrosequencing™ Assay Design Software, Biotage) verwendet (Primersequenzen, Annealingtemperaturen und Fragmentlängen siehe Tab.11). Einer dieser Primer war jeweils am 5'-Ende biotinyliert. Unter dem jeweils 50 Zyklen umfassenden Aufeinanderfolgen von Denaturierung, Annealing und Elongation wurden so Primer-flankierte DNA-Fragmente, die

den jeweiligen Polymorphismus enthielten, amplifiziert. Die PCR-Reaktionsansätze und die Thermocycler-Bedingungen (9700 GeneAmp, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) sind in den Tabellen 2 bis 7 aufgeführt:

Tab. 2: PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der DNA-Fragmente der SNPs ABCA1 -14C>T und 1051G>A, ABCB1 1236C>T, 2677G>TA und 3435 C>T(hier auch Einsatz von 1µl DNA möglich), ABCC2 24C>T, 1249 G>A und 3972C>T, ApoE 176C>T und ABCG2 421C>A.

| Reagenzien | Volumen [µl] | Endkonzentration |
|--------------------------|--------------|------------------|
| Taq-Puffer (10x) | 2,5 | 1x |
| MgCl ₂ (50mM) | 1,25 | 2,5 mM |
| dNTP (10mM) | 2,5 | 1 mM |
| Primer forward (10 µM) | 0,5 | 200 nM |
| Primer reverse (10 µM) | 0,5 | 200 nM |
| Taq-Polymerase (5 U/µl) | 0,15 | 0,03 U/µl |
| DNA (30-100 ng/µl) | 0,8 | - |
| aqua bidest. | ad | - |
| Endvolumen | 25 | |

Tab. 3: Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente der SNPs ABCA1 -14C>T und 1051G>A, ABCB1 3435C>T und 2677G>TA, ABCC2 24C>T und 1249G>A, ApoE 176C>T und ABCG2 421C>A.

| Denaturierung | Denaturierung | Annealing | Elongation | terminale Elongation |
|---------------|---------------|------------|------------|----------------------|
| 4 min. | 30 sec. | 30 sec. | 30 sec. | 7 min. |
| 94 °C | 94 °C | 53 - 65 °C | 72 °C | 72 °C |
| 50 Cyclen | | | | |

Tab. 4: Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ABCB1 1236C>T.

| Denaturierung | Denaturierung | Annealing | Elongation | terminale Elongation |
|---------------|---------------|-----------|------------|----------------------|
| 5 min. | 30 sec. | 30 sec. | 30 sec. | 7 min. |
| 95 °C | 95 °C | 52 °C | 72 °C | 72 °C |
| 50 Cyclen | | | | |

Tab. 5: Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ABCC2 3972C>T.

| Denaturierung | Denaturierung | Annealing | Elongation | terminale Elongation |
|---------------|---------------|-----------|------------|----------------------|
| 4 min. | 30 sec. | 30 sec. | 30 sec. | 7 min. |
| 94 °C | 94 °C | 61 °C | 72 °C | 72 °C |
| 45 Cyclen | | | | |

Tab 6: PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ApoE 130C>T.

| Reagenzien | Volumen [μ l] | Endkonzentration |
|-------------------------------|--------------------|------------------|
| Taq-Puffer (10x) | 2,5 | 1x |
| MgCl ₂ (50mM) | 1,25 | 2,5 mM |
| dNTP (10mM) | 2,5 | 1 mM |
| DMSO (99%) | 1,25 | 5x |
| Primer forward (10 μ M) | 0,5 | 200 nM |
| Primer reverse (10 μ M) | 0,5 | 200 nM |
| Taq-Polymerase (5 U/ μ l) | 0,15 | 0,03 U/ μ l |
| DNA (30-100 ng/ μ l) | 0,8 | - |
| aqua bidest. | ad | - |
| Endvolumen | 25 | |

Tab. 7: Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ApoE 130C>T.

| Denaturierung | Denaturierung 1 | Annealing 1 | Elongation 1 |
|--|-----------------|--------------|----------------------|
| 2 min. | 15 sec. | 45 sec. | 45 sec. |
| 95 °C | 95 °C | 70 °C | 72 °C |
| 23 Cyclen, Reduktion der Temperatur um 0,7 °C pro Cyclus | | | |
| Denaturierung 2 | Annealing 2 | Elongation 2 | terminale Elongation |
| 15 sec. | 45 sec. | 45 sec. | 5 min. |
| 95 °C | 55 °C | 72 °C | 72 °C |
| 28 Cyclen | | | |

Anschließend wurde jeweils mit vier Proben einer Platte und zusätzlich mit allen Negativkontrollen einer Platte das PCR-Produkt durch Gelelektrophorese kontrolliert. Es wurden jeweils 1,5 bis 3%ige Agarosegele (Roti@GAROSE, Roth, Karlsruhe, Deutschland, 1x TBE-Puffer (90 mM Tris-HCl, 90 mM Borsäure, beides Sigma, Deisenhofen, Deutschland, 2 mM EDTA, pH 8,0 (Merck, Darmstadt, Deutschland)) verwendet. Nach Einbringen von jeweils 7 μ l PCR-Produkt und 2 μ l Blaumarker (BlueJuice Gel-Loading Buffer, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in die Taschen des Gels wurde dies in 1x TBE-Laufpuffer in die Elektrophoresekammer (Sub Cell, Biorad, München, Deutschland, Generator: PowerPac Basic, Biorad, München, Deutschland) eingebracht. Das beim Gießen des Gels zugefügte Ethidiumbromid (Sigma) interkalierte hierbei mit der DNA des PCR-Produktes. Dieses konnte so im ultravioletten Licht erkannt werden. Zur Trennung der unterschiedlich geladenen Bestandteile des Tascheninhalts wurde eine Spannung von 120 Volt angelegt, unter der die negativ geladene DNA zur Anode wanderte. Nach 15-20 Minuten Laufzeit konnte unter UV-Durchlicht eine jeweils SNP-spezifische Bande sichtbar gemacht werden (Kodak Image Station 440 CF, Kodak, Stuttgart, Deutschland). Um sicherzugehen, dass diese auch

die zu erwartende Länge aufwies, wurde außerdem ein Vergleichsmarker mit verschiedenen Fragmenten definierter Länge mit in das Agarosegel gegeben

(Gene Ruler™ 100bp DNA ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

Anschließend wurde die Sequenzierung auf dem Pyrosequencer™ durchgeführt.

Hierzu wurde jeweils 7,5-14 µl PCR-Produkt mit 26-32,5 µl Aqua bidest (Ultra pure water, Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 37 µl 1x Bindungspuffer (10x Binding Buffer, Biotage, Upsala, Schweden) und 3 µl Sepharose Beads (High Performance Streptavidin Sepharose™, GE Healthcare, München, Deutschland) gemischt und auf eine 96-Well-Platte aufgebracht. Das Gemisch wurde 15-20 Minuten auf einem Schüttler (Variomag Monoshake, H+P Labortechnik, Oberschleissheim, Deutschland) vermischt. Hierdurch banden die ins PCR-Produkt integrierten biotinylierten PCR-Produkte an die Sepharosemoleküle im Puffer. Die Biotin-Streptavidin-Bindung gehört zu den stärksten in der Natur vorkommenden Bindungen und bietet die Grundlage für die später folgende Selektion der richtigen DNA-Fragmente und ihre sequenzspezifische Sequenzierung. Durch den ebenfalls hinzugefügten Bindungspuffer (Biotage, Upsala, Schweden) wurde das für diese Reaktion nötige Milieu geschaffen.

Das Gemisch aus PCR-Produkt, Sepharose-Beads und Bindungspuffer wurde anschließend jeweils 6 Sekunden in 0,1 mM Natriumhydroxidlösung (NaOH, Merck), 6 Sekunden in 70%igem Ethanol (Merck) und 8 Sekunden in 1x Waschpuffer (1 mM, Washing Buffer, Biotage, Upsala, Schweden) gereinigt. Diese Vorgänge wurden auf einer PyroMark Vacuum Prep Workstation (Biotage) durchgeführt. Der Weitertransport des festen Bestandteile der eingesetzten Lösung wurde über eine Biotage-Saugpumpe (PyroMark Vacuum Prep Tool, Biotage) durchgeführt.

Der Kontakt mit NaOH führte zur Denaturierung der DNA-Stränge, sodass an den nun vorliegenden Einzelsträngen die Sequenzierung durchgeführt werden konnte. Durch das nachfolgende Spülen mit Ethanol und Waschpuffer wurden schließlich überschüssige, nicht Streptavidin-gebundene DNA-Fragmente entfernt.

Schließlich wurden die aufgereinigten Bestandteile unter Abschalten des Unterdrucks an der Saugpumpe in ein Gemisch aus jeweils 11 µl Annealing-Puffer (1x, Biotage) und 1 µl Sequenzierprimer (10 µM, TIB Molbiol, Berlin, Deutschland und Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland, Primerdesign mit Pyrosequencing™ Assay Design Software, Biotage) in ein 96er Format überführt.

Das entstandene Gemisch wurde anschließend zwei Minuten bei 80 °C auf einer Heizplatte (VWR Hotplate/Stirrer, Darmstadt, Deutschland) erhitzt, wobei hier die Bindung des Sequenzierprimers an die Einzelstränge stattfand.

Die Sequenzierung im Pyrosequencer (PSQ HS 96, Biotage, Upsala, Schweden) verlief anschließend nach folgendem Schema:

Die in der vorherig durchgeführten PCR entstandene, durch die Denaturierung mittels NaOH in Einzelstrangform vorliegende und mit dem Sequenzierprimer hybridisierte DNA wurde gemeinsam mit einer festgelegten Menge der Enzyme DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase, Adenosin-5`Phosphosulfat und Apyrase (Pyro Gold Reagents, Enzyme mixture, Biotage) inkubiert. Außerdem wurden die Substrate Desoxycytosin- (dCTP), Desoxyguanin- (dGTP), Desoxythymidin- (dTTP) und Desoxyadenosin- α -thio-Triphosphat (dATP α S) anstelle von Desoxyadenosintriphosphat (dATP) (Pyro Gold Reagents dNTPs und Substrate mixture, Biotage) sequenzadaptiert zugegeben. Hierbei wurde auf die Verwendung von ATP verzichtet, da dies in der späteren Nachweisreaktion mittels Luciferase als Substrat dient und zusätzliches, nicht äquimolar zur Menge aller eingebauten Nukleotide vorhandenes ATP die quantitativ ausgewertete Schlüsselreaktion empfindlich beeinflussen würde.

Die dNTPs wurden zuvor in 50%iger Verdünnung mit TE-Puffer (10ml 1mM Tris (pH 7.5), Sigma, Deisenhofen, Deutschland, 2 ml 0.5 mM EDTA (pH 8.0), Merck, Darmstadt, Deutschland) in die Kartuschen des Gerätes gegeben.

Die Dispersionsabfolge der automatisch hinzugefügten dNTPs musste mittels der Height Determination Prototype Software (Pyrosequencing AB, Biotage) vorgegeben werden.

Sobald das entsprechende Desoxiribonukleotid (dNTP) durch den Pyrosequencer hinzupipettiert wurde, katalysierte die DNA-Polymerase dessen Einbau in den komplementären DNA-Strang. Hierbei wurde eine zur Menge des eingebauten Nukleotids äquimolare Menge an Pyrophosphat (PPi) freigesetzt.

In der nun folgenden Reaktion konvertierte die ATP-Sulfurylase aus dem Enzym-Mix die Umwandlung von Adenosin-5`Phosphosulfat (APS) und PPi zu ATP. Die ebenfalls hinzupipettierte Luciferase wandelte das im Substratmix enthaltene Luciferin in Oxyluciferin um. Bei dieser Reaktion wurde außerdem das in der vorherig abgelaufenen Sulfurylase-Reaktion entstandene ATP benötigt, bei dessen Integration in das Luciferin Energie in Form von Lichtblitzen freigesetzt wurde (Abb.4). Da die Beleuchtungsstärke des Lichtes (lux) proportional zur verbrauchten Menge an ATP ist, ließ das entstandene Licht sich optimal als indirektes Maß für die Menge der vorher in den komplementären DNA-Strang eingebauten Nukleotide nutzen. Eine charge coupled device (CCD) Kamera im Pyrosequencer™ detektierte die Lichtblitze und zeichnete ihre Stärke in Form von Peaks in einem sogenannten Pyrogram™ auf (Abb. 5). Anhand ihrer Höhe konnte schließlich erkannt werden, ob keins,

eins, zwei oder drei aufeinanderfolgende Nukleotide eines Typs in den komplementären DNA-Strang eingebaut worden waren.

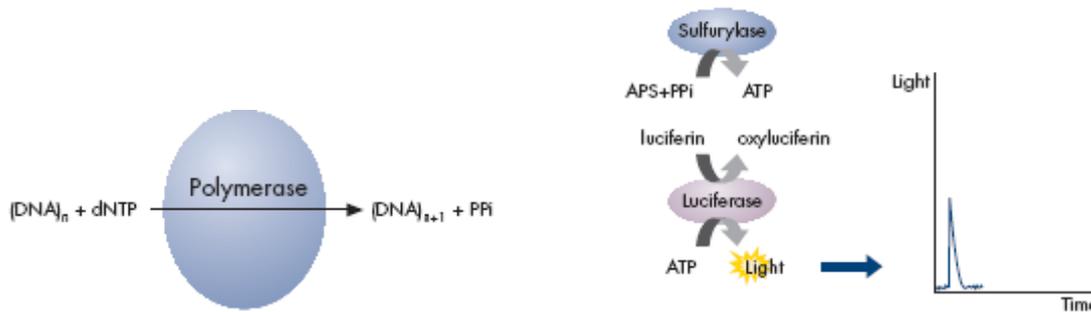


Abb. 4: Schema der im Pyrosequencer ablaufenden Enzymkaskade mit nachfolgender Aufzeichnung der Peaks (137).

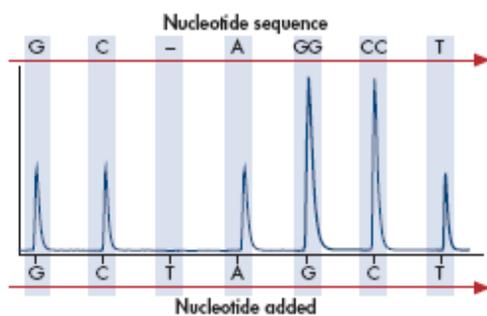


Abb. 5: Beispiel für ein Pyrogramm™: Umwandlung der freigesetzten Lichtblitze in Peaks unterschiedlicher Höhe (137).

Um nach der Luciferase-Reaktion noch vorhandenes ATP und überschüssige dNTPs abzubauen, reagierte anschließend eine festgelegte Menge des Enzyms Apyrase mit den noch vorhandenen Substratüberschüssen. Hierbei entstanden äquimolare Mengen der Desoxyribonukleotiddiphosphate (dNDPs) aus den jeweiligen dNTPs und Phosphat als Abfallprodukte (Abb. 6).



Abb. 6: Apyrase-Reaktion: Substratüberschüsse werden degradiert und das Reaktionsgemisch wird für den nächsten Zyklus regeneriert (137).

Diese Abfolge von Synthese des Komplementärstranges, Energiefreisetzung und Abbaureaktion wurde mit jedem Zyklus, in dem ein weiteres Nukleotid hinzupipettiert wurde, wiederholt. Pro SNP bedeutete dies eine Anzahl von 9 bis 17 verschiedenen hinzugefügten dNTPs.

Die anschließende Analyse der Peaks im PyrogrammTM ergab die jeweilige Basenabfolge des sequenzierten DNA-Abschnitts. Zur quantitativen Analyse wurde hierbei das Programm Peak Height Determination Prototype SW benutzt. Es verwendet ausgewählte Peaks nichtpolymorpher Basen als Referenz, indem es deren Höhe in Prozentverhältnisse konvertiert und so die qualitative Bewertung der restlichen Peaks möglich macht (Abb. 7).

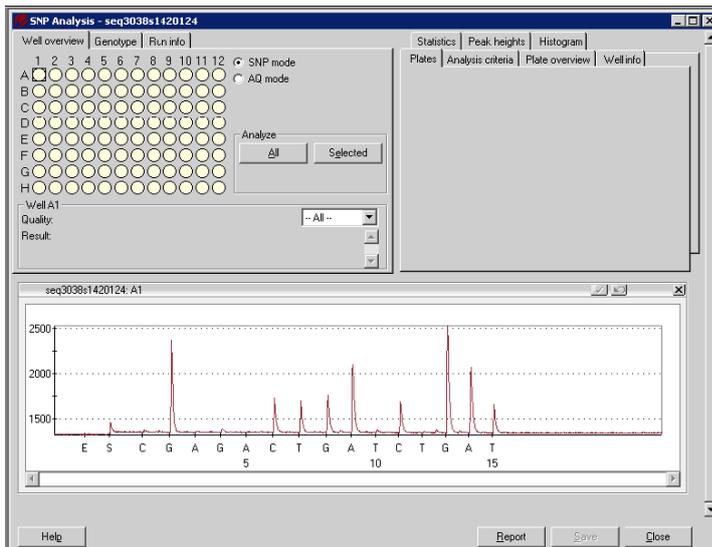


Abb. 7: Beispieloberfläche der Peak Height Determination Prototype Software

2.3.2 Alleldiskriminierung mittels PCR und Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

Bei der Alleldiskriminierung des SNPs ABCG2 34G>A (rs2231137) wurde nach der zunächst durchgeführten PCR ein enzymatischer Verdau mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) durchgeführt (Primersequenz und Fragmentlängen siehe Tab. 12).

Für die PCR wurden 1 µl DNA (30-100 ng/µl), eine rekombinante Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 2,5 mM Desoxyribonukleotidtriphosphate (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland), Taq-Puffer (10x, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 99%iges Di-Methyl-Sulfoxid (DMSO, Merck) sowie zwei flankierende Primer (TIB Molbiol) eingesetzt.

Tab. 8: PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ABCG2 34G>A.

| Reagenzien | Volumen [μl] | Endkonzentration |
|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Taq-Puffer (10x) | 2,5 | 1,0x |
| MgCl ₂ (50mM) | 1 | 2,0 mM |
| dNTP (10mM) | 2,5 | 1,0 mM |
| DMSO (99%) | 1,25 | 5x |
| Primer forward (10 μM) | 0,5 | 200 nM |
| Primer reverse (10 μM) | 0,5 | 200 nM |
| Taq-Polymerase (5 U/ μl) | 0,15 | 0,03 U/ μl |
| DNA (30-100 ng/ μl) | 1,0 | - |
| aqua bidest. | ad | - |
| Endvolumen | 25 | |

Tab. 9: Thermocyclerbedingungen zur Amplifikation der DNA-Fragmente des SNPs ABCG2 34G>A.

| Denaturierung | Denaturierung | Annealing | Elongation | terminale Elongation |
|---------------|---------------|-----------|------------|----------------------|
| 3 min. | 30 sec. | 30 sec. | 30 sec. | 7 min. |
| 94 °C | 94 °C | 60 °C | 72 °C | 72 °C |
| 35 Cyclen | | | | |

Das entstandene PCR-Produkt wurde stichprobenartig mittels Agarosegel-Elektrophorese (2% Agarose) kontrolliert. Die restlichen Bedingungen entsprachen den der im Rahmen der PCR-Kontrolle bei Analyse über Pyrosequencing angewandten Vorschriften. Anschließend wurde unter Zugabe des Restriktionsenzym Bsr I (10 U/ μl , New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) und 10x BsrI-Puffer (ebenfalls New England Biolabs) ein Verdau durchgeführt:

Tab. 10: Restriktionsansatz mit BsrI zur Analyse der Genotypen des SNPs ABCG2 34G>A.

| Reagenzien | Volumen [μl] | Endkonzentration |
|------------------------------------|---------------------------|----------------------|
| PCR-Produkt | 18,75 | |
| Bsr-Puffer (10x) | 3,75 | 1x |
| Enzym (BsrI) (10U/ μl) | 0,75 | 0,2 U/ μl |
| aqua bidest. | 14,25 | |
| Endvolumen | 37,5 | |

Das Gemisch wurde sechs Stunden bei 65°C inkubiert (Thermocycler 9700 GeneAmp, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und das Produkt anschließen mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

Hierzu wurden jeweils 37,5 μl Verdauprodukt und 3,5 μl Blaumarker in ein 2,5%iges Agarosegel gegeben und 40 Minuten bei 120 Volt laufen gelassen. Es wurde ein 100bp Vergleichsmarker verwendet. Die Bedingungen entsprachen denen der im Rahmen der PCR-

Kontrolle vor dem Pyrosequencing und dem RFLP-Verfahren angewandten Agarose-gel-Elektrophoresen.

Nach 40 Minuten Laufzeit konnten unter UV-Durchlicht jeweils SNP-spezifische Banden sichtbar gemacht werden (Kodak Image Station 440 CF, Kodak, Stuttgart, Deutschland).

Bei Betrachtung des SNPs ABCG2 34G>A ergab sich hierbei ein wildtypspezifisches Muster mit Banden von 47, 99 und 141 Basenpaaren, im Falle einer Mutation ein Muster mit 99 und 180 Basenpaaren. Das Fragment von 47 bp ist allerdings zu kurz, um im Gel detektiert zu werden (Abb. 9).

Die Funktionsweise des Verfahrens beruht darauf, dass das Restriktionsenzym BsrI das PCR-Produkt nur dann schneiden kann, wenn an der Bindungsstelle im Minusstrang ein Cytosin (C) bzw. ein Guanin (G) im Plusstrang vorhanden ist und das jeweilige Allel demzufolge dem Wildtyp des SNPs entspricht. So entstehen in diesem Fall drei anstelle von zwei DNA-Fragmente (Abb. 8).

5' ...ACTGGN[▼] ...3'
3' ...TGAC[▲]CN...5'

Abb. 8: Erkennungssequenz des Enzyms BsrI bei Vorliegen eines Wildtyps im SNP ABCG2, 34 G>A (N = A, C, G oder T, <http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0527.asp>)

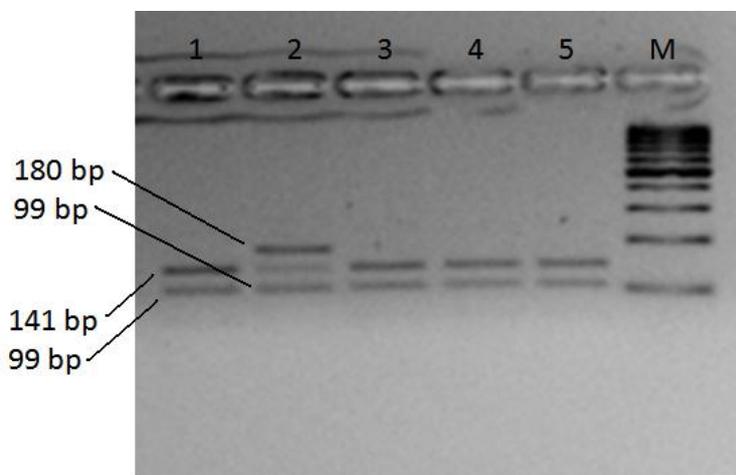


Abb. 9: Bandenmuster der Restriktionsfragmente nach Agarosegel-Elektrophorese zur Identifizierung des Genotyps bei SNP ABCG2 34G>A. **Bahn 1, 3, 4 und 5:** 34GG: homozygoter Wildtyp. **Bahn 2:** 34 GA: heterozygote Variante. Homozygote Variantallelträger waren nicht im Probenmaterial enthalten. **M:** Bandenmuster des Größenstandards Gene Ruler™ 100bp DNA ladder.

2.4 Statistische Methoden

Um zu testen, ob die untersuchte Population sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befand, wurde Clinical Trials Design Program, Version 1.0 verwendet. Hierbei kommt es zur Anwendung der ersten binomischen Formel, die den Zusammenhang zwischen Allelfrequenz und Genotypenfrequenz beschreibt: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, wobei p und q die beobachteten Allelfrequenzen beider Allele eines bestimmten Gen-Lokus sind. Die beobachteten und erwarteten Häufigkeiten der westeuropäischen Normalbevölkerung wurden mittels χ^2 -Test verglichen.

Um Unterschiede der Genotypenhäufigkeiten zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zu detektieren, wurde ebenfalls der χ^2 -Test verwendet. Hierbei wurde ebenfalls die Odds-Ratio berechnet. War die Zelhäufigkeit eines Tests zu gering, wurde alternativ zum χ^2 -Test der exakte Test nach Fisher angewandt.

Beide Tests wurden mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 15.0, durchgeführt.

Außerdem wurden alle Tests für multiples Testen korrigiert. Hierbei wurde die Bonferroni-Holm-Methode angewandt.

In dieser Arbeit wurde eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0.05$) als Signifikanzgrenze bei zweiseitigem Testen angenommen. Beim multiplen Testen nach der Bonferroni-Holm-Methode verringerte sich die Signifikanzgrenze entsprechend der Anzahl der Tests (n) nach der Beziehung $0.05/n$.

Tab. 11: Primernamen, Primersequenzen und Fragmentlängen der PCR-Produkte bezüglich der SNPs ABCA1 -14C>T und 1051G>A, ABCB1 1236C>T, 2677G>TA und 3435C>T, ABCC2 24C>T, 1249G>A und 3972C>T, ABCG2 421C>A und ApoE 130C>T und 176C>T.

| Gen | SNP | Primernamen | Primersequenz in der PCR (5'-3') | Annealingtemperatur | Fragmentlänge |
|-------|----------|----------------------|----------------------------------|---------------------|---------------|
| ABCA1 | -14C>T | PSQ A1 -14f bio | 5'-bio-AGCACAGGCTTTGACCGATAGTAA | 53 °C | 102 bp |
| | | PSQ A1 -14r | 5'-ACTCACTCTCGCTCGCAATTAC | | |
| | | PSQ A1 -14s | 5'-TTACGGGGTTTTTTC | | |
| | 1051G>A | PSQ A1 219f bio | 5'-bio-ACCCAGCTTCCAATCTTCATAATC | 56 °C | 242 bp |
| | | PSQ A1 219r | 5'-CACCAGGATTGGCTTCAGGATAC | | |
| | | PSQ A1 219s | 5'-GCAGCCAGTTTCTCC | | |
| ABCB1 | 1236C>T | PQ B1 1236f | 5'-TCCTGTGTCTGTGSSTTGCCT | 60 °C | |
| | | PQ B1 1236r | 5'-bio-GTCTAGCTCGCATGGGTCAT | | |
| | | PQ B1 1236s | 5'-TGGTAGATCTTGAAGGG | | |
| | 2677G>TA | PSQ B1 2677f bio | 5'-bio-GCAGGAGTTGTTGAAATGAAAAT | 65 °C | 311 bp |
| | | PSQ B1 2677r | 5'-AATGGCCTGAAAAGTAAAAAGTC | | |
| | | PSQ B1 2677s | 5'-TTAGTTTGAATCACCTTCC | | |
| | 3435C>T | PSQ B1 3435f bio | 5'-bio-GGAGCCCATCCTGTTTGAC | 65 °C | 134 bp |
| | | PSQ B1 3435r | 5'-TAGGCAGTGACTCGATGAAGG | | |
| | | PSQ B1 3435s | 5'-CTCCTTTGCTGCCCT | | |
| ABCC2 | 24C>T | PSQ C2 -24 geDNAf | 5'-GGTCATCCTTTACGGAGAACAT | 63 °C | 149 bp |
| | | PSQ C2 -24geDNAr bio | 5'-bio-GCAGAACTTCTCCAGCATGATT | | |
| | | PSQ C2 -24geDNAs | 5'-TCATATTAATAGAAGAGTCT | | |
| | 1249G>A | PSQ C2 1249f bio | 5'-bio-CAACTTGCCAGGAAGGAGTA | 63 °C | 109 bp |
| | | PSQ C2 1249r | 5'-TTCTGGGCATCCACAGACA | | |
| | | PSQ C2 1249s | 5'-TCAGGTTCACTGTTTCTC | | |
| | 3972C>T | PSQC2 3972f | 5'-CTGGTCCTCAGAGGGATCACTT | 61 °C | 54 bp |
| | | PSQC2 3972r | 5'-TCCACCTACCTTCTCCATGCTAC | | |
| | | PSQC23972f | 5'-CCTACCTTCTCCATGCTA | | |
| ABCG2 | 421C>A | PSQ G2 Ex5f bio | 5'-bio-GATGATGTTGTGATGGGCACTC | 63 °C | 102 bp |
| | | PSQ G2 Ex5r | 5'-CCGTTTCGTTTTTTTCATGATTCG | | |
| | | PSQ G2 Ex5s | 5'-GAAGAGCTGCTGAGAACT | | |
| ApoE | 130C>T | PQ ApoE 130f_2 | 5'-AATCGGAACTGGAGGAACAAC | siehe Tab. 7 | 244 bp |
| | | PQ ApoE 130r_2 bio | 5'-bio-TGCAGGTCATCGGCATCG | | |
| | | PQ ApoE 130s_2 | 5'-GCGGACATGGAGGAC | | |
| | 176C>T | PQ ApoE 176 f | 5'-CTCCGCGATGCCGATGAC | 57 °C | 52 bp |
| | | PQ ApoE 176r bio | 5'-bio-CCCCGGCCTGGTACTCTG | | |
| | | PQ ApoE 176s | 5'-CGATGACCTGCAGAAG | | |

Tab. 12: Primernamen, Primersequenzen, Restriktionsenzym sowie Länge der nach Verdau entstandenen DNA-Fragmente zur Identifizierung des SNPs ABCG2 34 G>A.

| Gen | SNP | Primernamen | Primersequenz (5'-3') | Enzym | Fragmentlänge (bp) mut/wt |
|-------|-------|------------------------|--|-------|---------------------------|
| ABCG2 | 34G>A | BCRP Ex2f BCRP Ex2r | 5'-GATAAAAACTCTCCAGATGTCTTGC 5'-AGCCAAAACCTGTGAGGTTAC | BsrI | 99, 180 / 47, 99, 141 |

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden eine Reihe genetischer Merkmale und das damit assoziierte Risiko für eine Alzheimer-Demenz untersucht.

Dazu wurden 151 Kleinhirnproben von Verstorbenen eingeschlossen. Die Unterscheidung in gesunde Kontrollen und Alzheimer-Patienten wurde nach dem CERAD-Score durchgeführt. Einer gesunden Kontrolle wird hierbei ein CERAD-Score von A zugeordnet, während Alzheimer-Positivität als CERAD-Score B oder C definiert ist. In der Studie wurden 80 gesunden Kontrollen 71 Alzheimer-Patienten gegenübergestellt.

Da bei der Alzheimer-Demenz, einer Erkrankung des höheren Lebensalters, das Alter der Studienteilnehmer zum Todeszeitpunkt eine wichtige Rolle in Bezug auf die Penetranz der genetischen Faktoren in der Krankheitsätiologie spielt (138), wurde die Kohorte zusätzlich in unterschiedliche Altersgruppen eingeteilt: Es wurden die selben statistischen Tests jeweils auf die Gruppe der mindestens 50-, mindestens 60- und mindestens 65-Jährigen angewandt. Die Aufteilung der Patienten und Kontrollen in die einzelnen Altersklassen ist in Tab. 13 wiedergegeben.

Tab. 13: Anzahl der Probanden in den unterschiedlichen Altersgruppen.

| Kohorte | Anzahl | Patienten | Kontrollen |
|------------|--------|-----------|------------|
| gesamt | 151 | 71 | 80 |
| ≥ 50 Jahre | 148 | 69 | 79 |
| ≥ 60 Jahre | 134 | 67 | 67 |
| ≥ 65 Jahre | 120 | 63 | 57 |

3.1 Statistischen Analyse des Alzheimererrisikos in Bezug auf die ABC-Transporter

Mittels PCR und Pyrosequencing bzw. RFLP-Methode wurde zunächst die Genotypisierung durchgeführt. Hierbei wurden die Polymorphismen ABCA1 -14C>T und 1051G>A, ABCB1 1236C>T, 2677G>TA und 3435C>T, ABCC2 24C>T, 1249G>A und 3972C>T, ABCG2 421C>A und 34G>A, ApoE SNP 130C>T und 176C>T untersucht (Tab. 14, 15 und 17).

Tab. 14: Genotypfrequenzen der SNPs der ABC-Transporter bei gesunden Kontrollen und Alzheimer-Patienten.

| SNP | Genotyp | Alzheimer (n) | 95% KI Alzheimer | Kontrollen (n) | 95% KI Kontrollen | p-Wert |
|-------------------|---------|------------------|---------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| ABCA1 -14C>T | CC | 0.30 (21) | 0.21-0.43 | 0.35 (28) | 0.24-0.46 | 0.252 |
| | CT | 0.58 (41) | 0.44-0.68 | 0.45 (36) | 0.34-0.57 | |
| | TT | 0.12 (9) | 0.06-0.22 | 0.20 (16) | 0.12-0.31 | |
| ABCA1 1051G>A | GG | 0.51 (36) | 0.39-0.63 | 0.57 (43) | 0.44-0.67 | 0.761 |
| | GA | 0.39 (28) | 0.28-0.52 | 0.36 (27) | 0.25-0.51 | |
| | AA | 0.10 (7) | 0.04-0.19 | 0.08 (6) | 0.03-0.17 | |
| ABCB1 1236 C>T | CC | 0.33 (21) | 0.22-0.46 | 0.32 (23) | 0.22-0.45 | 0.835 |
| | CT | 0.50 (32) | 0.37-0.63 | 0.47 (33) | 0.35-0.59 | |
| | TT | 0.17 (11) | 0.09-0.29 | 0.21 (15) | 0.12-0.32 | |
| ABCB1 2677G>TA | GG | 0.35 (25) | 0.24-0.46 | 0.34 (26) | 0.24-0.46 | 0.456 |
| | GT | 0.48 (34) | 0.37-0.61 | 0.38 (29) | 0.26-0.49 | |
| | TT | 0.16 (11) | 0.08-0.25 | 0.25 (19) | 0.16-0.36 | |
| | GA | 0.01 (1) | 0.00-0.07 | 0.03 (2) | 0.00-0.09 | |
| | TA | 0.00 (0) | - | 0.013 (1) | 0.00-0.07 | |
| | AA | 0.00 (0) | - | 0.00 (0) | - | |
| ABCB1 3435C>T | CC | 0.13 (9) | 0.07-0.25 | 0.22 (16) | 0.12-0.32 | 0.074 |
| | CT | 0.59 (41) | 0.46-0.70 | 0.41 (30) | 0.29-0.53 | |
| | TT | 0.28 (19) | 0.17-0.39 | 0.38 (28) | 0.27-0.51 | |
| ABCC2 24C>T | CC | 0.63 (44) | 0.52-0.75 | 0.70 (57) | 0.58-0.79 | 0.618 |
| | CT | 0.34 (24) | 0.23-0.45 | 0.27 (22) | 0.18-0.39 | |
| | TT | 0.03 (2) | 0.00-0.09 | 0.03 (2) | 0.00-0.09 | |
| ABCC2 1249G>A | GG | 0.61 (43) | 0.50-0.74 | 0.60 (47) | 0.48-0.69 | 0.958 |
| | GA | 0.34 (24) | 0.23-0.45 | 0.35 (28) | 0.25-0.48 | |
| | AA | 0.04 (3) | 0.01-0.12 | 0.05 (4) | 0.01-0.13 | |
| ABCC2 3972C>T | CC | 0.35 (23) | 0.21-0.44 | 0.5 (36) | 0.38-0.62 | 0.211 |
| | CT | 0.51 (33) | 0.26-0.58 | 0.38 (27) | 0.26-0.50 | |
| | TT | 0.14 (9) | 0.06-0.22 | 0.12 (9) | 0.06-0.22 | |
| ABCG2 34G>A | GG | 0.99 (69) | 0.93-0.99 | 0.96 (69) | 0.88-0.99 | 0.62 ¹ |
| | GA | 0.01 (1) | 0.00-0.08 | 0.04 (3) | 0.01-0.12 | |
| | AA | 0.00 (0) | - | 0.00 (0) | - | |
| ABCG2 421C>A | CC | 0.79 (56) | 0.67-0.87 | 0.83 (66) | 0.74-0.91 | 0.489 |
| | CA | 0.21 (15) | 0.13-0.33 | 0.16 (13) | 0.08-0.25 | |
| | AA | 0.00 (0) | - | 0.01 (1) | 0.00-0.07 | |

¹ errechnet nach dem einseitigen Fisher's exakten Test

Die Gesamtanzahl in Bezug auf die Analyse einzelner SNPs weicht häufig voneinander ab, da nicht immer alle insgesamt 151 verfügbaren Proben genotypisiert werden konnten.

Um den statistischen Einfluss der unterschiedlichen Genotypen ermitteln zu können, wurde neben dem statistischen Vergleich aller jew. SNP-spezifischen Allelkombinationen die Untersuchung der SNPs mit Hilfe von dominant-rezessiven Modellen durchgeführt. Hierbei wurden jeweils zwei verschiedene Allelkombinationen zusammengefasst und mit einer dritten verglichen, wobei primär nach Wildtyp (dominantes Modell) und Varianttyp (rezessives Modell) unterschieden wurde. Für ABCB1 3435C>T gilt zum Beispiel: Im rezessiven Modell findet ein Vergleich der Gruppe der Wildtypallelträger (CT- oder CC-Genotyp) mit der Gruppe der TT-Allelträger statt. Im dominanten Modell wird ein Vergleich der Gruppe der Variantallelträger, d.h. Probanden TT- oder CT-Genotyp, mit der Gruppe der CC-Träger durchgeführt. Der SNP ABCB1 2677G>TA nimmt diesbezüglich eine Sonderstellung ein, da es sich hierbei um einen triallelischen Polymorphismus handelt und somit drei mögliche Basen zur Verfügung stehen. Im G-rezessiven Modell werden die Genotypen GG, GA und GT mit den Genotypen AA, AT und TT verglichen, im T-rezessiven Modell die Genotypen TT, TA und GT mit den Kombinationen GG, GA und AA und im A-rezessiven Modell die Genotypen AA, TA und GA mit den Genotypen GG, GT und TT.

Tab. 15: Genotypfrequenzen der SNPs der ABC-Transporter bei gesunden Kontrollen und Alzheimer-Patienten; rezessive und dominante Modelle.

| SNP | | Allel | Alzheimer (n) | Kontrollen (n) | p-Wert |
|-------------------|--------|----------|---------------|----------------|--------|
| ABCA1 -14C>T | Dom. | CC | 0.30 (21) | 0.35 (28) | 0.477 |
| | | CT+TT | 0.70 (50) | 0.65 (52) | |
| | Rez. | CC+CT | 0.87 (62) | 0.80 (64) | 0.227 |
| | | TT | 0.13 (9) | 0.20 (16) | |
| ABCA1 1051G>A | Dom. | GG | 0.51 (36) | 0.57 (43) | 0.475 |
| | | GA+AA | 0.49 (35) | 0.43 (33) | |
| | Rez. | GG+GA | 0.90 (64) | 0.92 (70) | 0.675 |
| | | AA | 0.10 (7) | 0.08 (6) | |
| ABCB1 1236C>T | Dom. | CC | 0.33 (21) | 0.32 (23) | 0.959 |
| | | CT+TT | 0.67 (43) | 0.68 (48) | |
| | Rez. | CC+CT | 0.83 (53) | 0.79 (56) | 0.562 |
| | | TT | 0.17 (11) | 0.21 (15) | |
| ABCB1 2677G>TA | G-dom. | GG | 0.35 (25) | 0.34 (26) | 0.853 |
| | | Restl. | 0.65 (46) | 0.66 (51) | |
| | G-Rez. | GG+GT+GA | 0.85 (60) | 0.74 (57) | 0.117 |
| | | TT+TA+AA | 0.16 (11) | 0.26 (20) | |

| SNP | | Allel | Alzheimer (n) | Kontrollen (n) | p-Wert |
|------------------|------|-------|---------------|----------------|--------------------|
| ABCB1 3435C>T | Dom. | CC | 0.13 (9) | 0.22 (16) | 0.177 |
| | | CT+TT | 0.87 (60) | 0.78 (58) | |
| | Rez. | CC+CT | 0.73 (50) | 0.62 (46) | 0.190 |
| | | TT | 0.28 (19) | 0.38 (28) | |
| ABCC2 -24C>T | Dom. | CC | 0.63 (44) | 0.70 (57) | 0.328 |
| | | CT+TT | 0.37 (26) | 0.30 (24) | |
| | Rez. | CC+CT | 0.97(68) | 0.98 (79) | 0.882 |
| | | TT | 0.03 (2) | 0.03 (2) | |
| ABCC2 1249G>A | Dom. | GG | 0.61 (43) | 0.60 (47) | 0.810 |
| | | GA+AA | 0.39 (27) | 0.41 (32) | |
| | Rez. | GG+GA | 0.96 (67) | 0.95 (75) | 0.823 |
| | | AA | 0.04 (3) | 0.05 (4) | |
| ABCC2 3972C>T | Dom. | CC | 0.35 (23) | 0.50 (36) | 0.085 |
| | | CT+TT | 0.65 (42) | 0.50 (36) | |
| | Rez. | CC+CT | 0.86 (56) | 0.88 (63) | 0.816 |
| | | TT | 0.14 (9) | 0.13 (9) | |
| ABCG2 34G>A | Dom. | GG | 0.99 (69) | 0.96 (69) | 0.620 ¹ |
| | | GA+AA | 0.01 (1) | 0.04 (3) | |
| | Rez. | GG+GA | 1.00 (70) | 1.00 (72) | - |
| | | AA | 0.00 (0) | 0.00 (0) | |
| ABCG2 421C>A | Dom. | AA | 0.79 (56) | 0.83 (66) | 0.572 |
| | | CA+CC | 0.21 (15) | 0.18 (14) | |
| | Rez. | CC | 1.00 (71) | 0.99 (79) | 1.00 ¹ |
| | | CA+AA | 0.00 (0) | 0.01 (1) | |

¹errechnet nach dem einseitigen Fisher's exakten Test

Alle ermittelten Genotypenfrequenzen in allen Supra- und Subgruppen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tab. 14). Hierbei wurden jeweils die für die Normalbevölkerung angenommenen Genotypenverteilungen mit denen der untersuchten Stichprobe verglichen. Durch die Übereinstimmung der Genotypfrequenzen insbesondere in der Gruppe der gesunden Kontrollen wurde auf diese Weise die Annahme bestätigt, dass es sich hierbei um eine repräsentative Stichprobe der Normalbevölkerung handelte (Tab. 14, 15).

Alle nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson ermittelten p-Werte wurden einer Korrektur für multiples Testen unterzogen. Hierbei wurde eine Permutationsanalyse nach Carmago, Azuaje et al. (139) durchgeführt.

In Bezug auf die Polymorphismen ABCA1 (SNPs -14C>T und 1051G>A) und ABCG2 (SNPs 421C>A und 34G>A) ergab sich weder bei Verzicht auf die Altersstratifizierung noch in der Gruppe der mindestens-50, -60- oder 65-Jährigen ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Genotyp und dem Erkrankungsrisiko für Alzheimer-Demenz. Auch bei Betrachtung der SNPs ABCC2 -24C>T und 1249G>A ergaben sich keine signifikanten Werte (Tab. 14 und 15).

3.2 Untersuchung des ApoE-Genotyps bei Alzheimer-Patienten und bei gesunden Kontrollen

Jede Gruppe wurde nach dem ApoE- ϵ 4-Allelstatus unterteilt. Dieser gilt als bisher einziger replizierbarer genetischer Einflussfaktor für die Entwicklung der Alzheimer-Demenz (32, 42). Der ApoE- ϵ 4-Allelstatus wurde aus Kombination der SNPs ApoE 130C>T und 176C>T ermittelt (siehe Tab. 16). Hierbei wurde als ApoE- ϵ 4-Allel-positiv gewertet, wer über einen Allelstatus von ϵ 2/4, ϵ 3/4 oder ϵ 4/4 verfügte, und als ApoE- ϵ 4-Allel-negativ gewertet, wer eine Allelstatus von ϵ 2/2, ϵ 2/3 oder 3/3 aufwies (Tab. 17).

Tab. 16: Ermittlung des ApoE- ϵ 4-Allelstatus (140).

| ApoE 130C>T-Genotyp | ApoE 176 C>T-Genotyp | ApoE- ϵ 4-Allelstatus |
|---------------------|----------------------|--------------------------------|
| C/C | C/C | ϵ 4 / ϵ 4 |
| T/C | C/C | ϵ 3 / ϵ 4 |
| T/T | C/C | ϵ 3 / ϵ 3 |
| T/T | T/C | ϵ 2 / ϵ 3 |
| T/C | T/C | ϵ 2 / ϵ 4 |
| T/T | T/T | ϵ 2 / ϵ 2 |

Da nicht bei allen Proben eine Analyse des ApoE- ϵ 4-Allelstatus durchgeführt werden konnte, standen hierbei insgesamt 137 Probanden zur statistischen Analyse zur Verfügung, wobei es sich bei 68 um gesunde Kontrollen und bei 69 um Alzheimer-Patienten handelte.

Tab. 17: Genotypfrequenzen bei gesunden Kontrollen und Alzheimer-Patienten in Bezug auf ApoE 130C>T, 176C>T und das ε4-Allel.

| SNP | Genotyp | Alzheimer (n) | 95% KI Alzheimer | Kontrollen (n) | 95% KI Kontrollen | p-Wert |
|--|---------|---------------|------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| ApoE 130C>T | TT | 0.42 (29) | 0.32-0.56 | 0.87 (59) | 0.76-0.94 | <0.0001 |
| | TC | 0.42 (29) | 0.29-0.53 | 0.12 (8) | 0.05-0.22 | |
| | CC | 0.16 (11) | 0.08-0.26 | 0.01 (1) | 0.00-0.08 | |
| ApoE 176C>T | CC | 0.93 (65) | 0.85-0.98 | 0.79 (64) | 0.68-0.87 | 0.05 |
| | CT | 0.07 (5) | 0.02-0.15 | 0.20 (16) | 0.12-0.30 | |
| | TT | 0.00 (0) | - | 0.01 (1) | 0.00-0.07 | |
| ApoE 0 = kein ε4-Allel 1 = ε4-Allel | 0 | 0.42 (29) | | 0.87 (59) | | <0.0001 |
| | 1 | 0.58 (40) | | 0.13 (9) | | |

In allen Altersgruppen (d.h. einerseits bei Nicht-Berücksichtigung jeglicher Alterseingrenzungen, andererseits aber auch bei Betrachtung der mindestens 50-, mindestens 60- und mindestens 65-Jährigen) zeigte sich der statistisch signifikante Einfluss des ApoE-Genotyps auf das Alzheimerisiko. Dies wurde auch in Form von zahlreichen anderen Studien belegt (32, 42). Als Beispiel kann an dieser Stelle die Verteilung in der Gruppe ohne Altersstratifizierung angeführt werden: Während unter den gesunden Kontrollen nur 13.2% das ApoE- ε4-Allel trugen, waren es unter den AD-Patienten 58 % ($p < 0.0001$ Abb. 10, Tab. 17). Die Odds-Ratio betrug 9.04, das 95%-Konfidenzintervall 3.87 – 21.2. Auch in allen anderen Altergruppen bestätigte sich dieses Ergebnis ($p_{\geq 50 \text{ Jahre}} < 0.0001$, $p_{\geq 60 \text{ Jahre}} < 0.0001$, $p_{\geq 65 \text{ Jahre}} < 0.0001$).

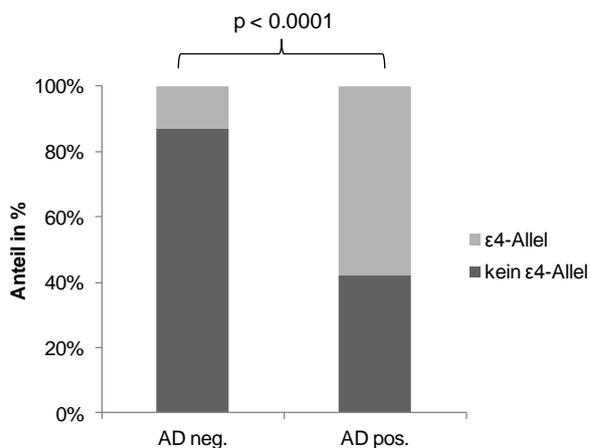


Abb. 10: Relative Häufigkeit des Auftretens des ApoE-ε4-Allels in der Gruppe der gesunden Kontrollen (AD negativ) und der Gruppe der Alzheimer-Patienten (AD positiv).

3.3 Einfluss der ABCB1-Genotypen auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Zunächst wurden zu den im ABCB1-Gen untersuchten SNPs 1236 C>T, 2677G>TA und 3435C>T Genotypen- und Allelfrequenz berechnet (Tab. 14 und 15).

3.3.1 Einfluss des SNPs ABCB1 1236 C>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Sowohl in den Altergruppen der mindestens-60- als auch der mindestens-65-Jährigen ließ sich unter der Voraussetzung der Abwesenheit des Apo-E- ε4-Allels eine signifikante Assoziation zwischen Auftreten der Alzheimererkrankung und Vorliegen des Wildtypallels (C) beobachten (CC+CT vs. TT; $p_{\geq 60 \text{ Jahre}} = 0.044$, $p_{\geq 65 \text{ Jahre}} = 0.038$, Abb. 11, Tab. 18).

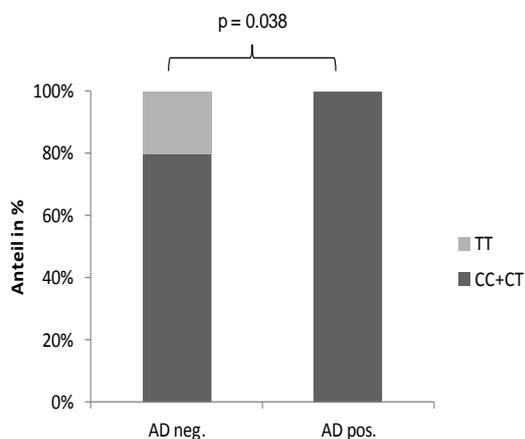


Abb. 11: Relative Anteile der Träger des ABCB1 1236 C-Allels (CC- oder CT-Genotyp) und der Träger des wildtypspezifischen T-Allels (TT-Genotyp) an AD-positiven und AD-negativen Probanden mit neg. ApoE-ε4-Allelstatus in der Gruppe der mindestens 65-Jährigen.

Tab. 18: Genotypfrequenzen zu ABCB1 1236C>T der mindestens 65-Jährigen, rezessives Modell, ApoE- ε4-Allel-Status negativ.

| SNP | Allel | Kontrollen (n) | Alzheimer (n) | p-Wert |
|---------|-------|----------------|---------------|--------------------------|
| ABCB1 | CC+CT | 0.80 (28) | 1.00 (21) | 0.038¹ |
| 1236C>T | TT | 0.20 (7) | 0.00 (0) | |

¹ errechnet nach dem einseitigen Fisher's exakten Test

3.3.2 Einfluss des SNPs ABCB1 2677G>TA auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Unabhängig von der Stratifizierung nach ApoE-ε4-Allelstatus zeigte sich in der Gruppe der mindestens 65-Jährigen Alzheimer-Patienten eine signifikant höhere Zahl an Trägern des ABCB1 2677 GG-, GT- oder GA-Genotyps (Wildtypallel) (OR 2.7, 95%-KI 0.14 – 0.95, $p_{\geq 65 \text{ Jahre}}=0.036$, Abb. 12). Unter den nicht von Alzheimer-Demenz Betroffenen waren die Genotypen ABCB1 2677 TT, TA und AA häufiger (Tab. 19). Alle p-Werte wurden mittels des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson bestimmt.

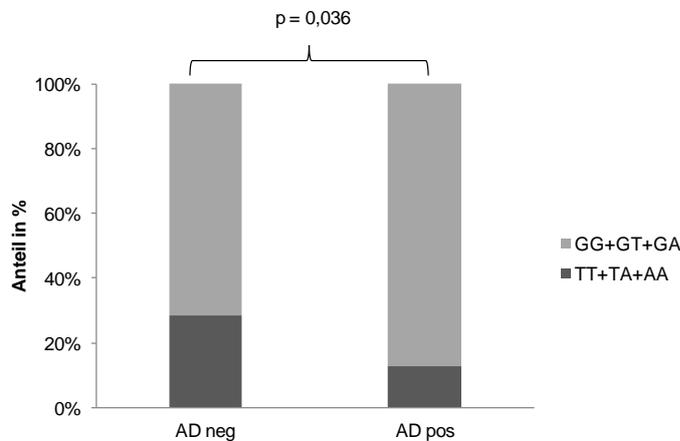


Abb. 12: Relative Anteile der Träger des ABCB1 2677 G-Allels (GG-, GT- oder GA-Genotyp) und der Träger ohne wildtypspezifisches G-Allel (TT-, TA- und AA-Genotyp) an AD-negativen und AD-positiven Probanden in der Gruppe der mindestens 65-Jährigen; keine Einbeziehung von ApoE-Status und Geschlecht.

Tab. 19: Genotypfrequenzen zu ABCB1 2677G>TA der mindestens 65-Jährigen: G-rezessives Modell, keine Einbeziehung von ApoE ε4-Allelstatus.

| SNP | Allel | Kontrollen (n) | Alzheimer (n) | p-Wert |
|----------|----------|----------------|---------------|--------------|
| ABCB1 | GG+GT+GA | 0.72 (38) | 0.87 (55) | 0.036 |
| 2677G>TA | TT+TA+AA | 0.28 (15) | 0.13 (8) | |

Bei Einbeziehung des Apo-E-ε4-Allelstatus fanden sich ausschließlich in der Gruppe der ε4-Negativen signifikante Werte: Auch hier war ein GG-, GT-, oder GA-Allelstatus mit einem höheren Alzheimerisiko assoziiert ($p_{\geq 60 \text{ Jahre}}=0.011$, $p_{\geq 65 \text{ Jahre}}=0.018$, Tab. 20).

Tab. 20: Genotypfrequenzen zu ABCB1 2677G>TA der mindestens 65-Jährigen, G-rezessives Modell: ApoE ε4-Allelstatus negativ.

| SNP | Allel | Kontrollen (n) | Alzheimer (n) | p-Wert |
|----------|----------|----------------|---------------|--------------------------|
| ABCB1 | GG+GT+GA | 0.78 (29) | 1.00 (24) | 0.018¹ |
| 2677G>TA | TT+TA+AA | 0.22 (8) | 0.00 (0) | |

¹errechnet nach dem Fisher's exakten Test

3.3.3 Einfluss des SNPs ABCB1 3435C>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Auch bei der Untersuchung des SNPs ABCB1 3435C>T ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp und Alzheimerisiko ermitteln, welcher sich vor allem bei Betrachtung der ApoE-ε4-Allel-negativen Probanden andeutete. In der Gruppe der mindestens 60-jährigen-ApoEε4-Allel-Negativen zeigte sich bei an Alzheimer-Demenz erkrankten Probanden eine signifikante Häufung des ABCB1 3435 Wildtypallels C (ABCB1 3435, CC vs. CT vs. TT $p_{\geq 60 \text{ Jahre}} = 0.041$, siehe Abb. 13; rezessives Modell: $p_{\geq 60 \text{ Jahre}} = 0,049$, Tab. 21). In der Gruppe ohne Alterseinschränkungen und in der Gruppe der mindestens 65-Jährigen war der Effekt ebenfalls angedeutet, allerdings nicht signifikant. Bei Außerachtlassen des ApoE-ε4-Allelstatus zeigte sich in der Gruppe der mindestens-60-Jährigen und der mindestens 65-Jährigen eine leichte, aber die Signifikanz verfehlende Häufung von Alzheimererkrankungen bei Vorliegen des Wildtypallels ($p_{\geq 60 \text{ Jahre}} = 0.054$, $p_{\geq 65 \text{ Jahre}} = 0.063$).

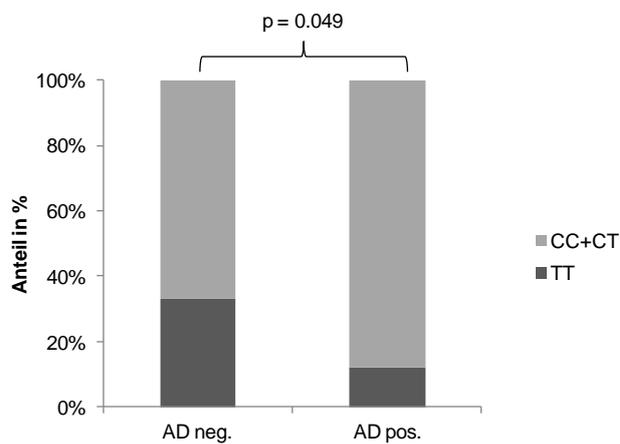


Abb. 13: Relative Anteile im rezessiven Modell (CC+CT vs. TT) SNPs ABCB1 3435C>T an AD-positiven und AD-negativen Probanden bei negativem ApoE-ε4-Allelstatus in der Gruppe der mindestens-60-Jährigen.

Tab. 21: Genotypfrequenzen zu ABCB1 3435C>T der mindestens 60-Jährigen, ApoE- ε4-Allel-Status negativ.

| SNP | Allel | Kontrollen (n) | Alzheimer (n) | p-Wert |
|------------------|-------|----------------|---------------|--------------|
| ABCB1 3435C>T | CC | 0.25 (12) | 0.16 (4) | 0.041 |
| | CT | 0.42 (20) | 0.72 (18) | |
| | TT | 0.33 (16) | 0.12 (3) | |
| | CC+CT | 0.67 (32) | 0.88 (22) | 0.049 |

3.4 Einfluss des SNPs ABCC2 3972C>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Bei Betrachtung des SNPs ABCC2 3927 C>T ließ sich in allen Altersgruppen bei Apo-E- ε4-Allel-Negativen eine signifikante Assoziation zwischen Alzheimererkrankung und Vorliegen des Variantallels (T) beobachten (OR 3.73, 95%-KI 1.37 – 40.4, $p_{\text{keine Alterseinschränkungen}} = 0.008$, Abb. 14, Tab. 22). Auch bei Betrachtung der einzelnen Altersgruppen bestätigte sich dies ($p_{\geq 60 \text{ Jahre}} = 0.012$, $p_{\geq 65 \text{ Jahre}} = 0.011$).

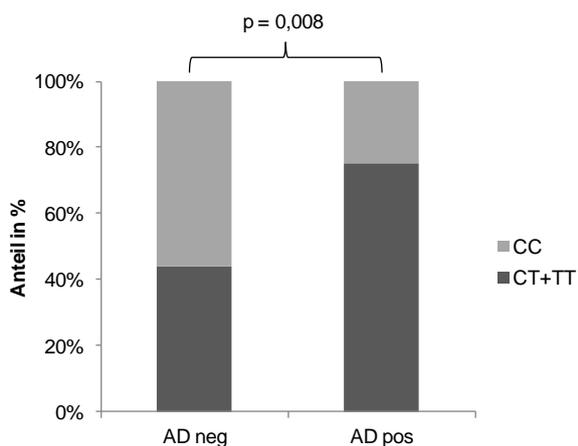


Abb. 14: Relative Anteile der Genotypen des SNPs ABCB1 3435C>T, keine Alterseinschränkungen, ApoE-ε4-Allelstatus negativ, rezessives Modell.

Tab. 22: Genotypfrequenzen zu ABCC2 3972C>T im rezessiven Modell, ApoE-ε4-Allelstatus negativ, keine Alterseinschränkungen.

| SNP | Allel | Kontrollen (n) | Alzheimer (n) | p-Wert | |
|-------------------|----------------------|----------------|---------------|-----------|-------------------|
| ABCC2 3972 C>T | ApoE ε4- Negative | CC | 0.56 (29) | 0.25 (7) | 0.008 |
| | | CT+TT | 0.44 (23) | 0.75 (21) | |
| | ApoE ε4- Positive | CC | 0.38 (3) | 0.42 (15) | 1.00 ¹ |
| | | CT+TT | 0.62 (5) | 0.58 (21) | |

¹ errechnet nach dem einseitigen Fisher's exakten Test

3.5 Einfluss des Geschlechts auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Zunächst wurde die gesamte Kohorte ohne Berücksichtigung von Alterseinschränkungen oder ApoE-ε4-Allelstatus untersucht.

Hierbei ergab sich über alle Altersgruppen hinweg, dass sich die signifikanten Effekte in Bezug auf die SNPs ABCB1 1236C>T und 2677G>TA, angedeutet auch in Bezug auf ABCB1 3435C>T, ausschließlich in der weiblichen Subgruppe beobachten ließen (Tab. 23).

Tab. 23: Überblick der Genotypfrequenzen von ABCB1 bei Stratifikation nach Geschlecht.

| SNP ABCB1 | Geschlecht | Genotyp | Alzheimer Prozent (%) | Kontrollen, Prozent (%) | OR | 95% KI | p-Wert | |
|--|-------------------------------------|---|-----------------------------|-------------------------------|-----------|---------------|--------------|--|
| 1236C>T | männlich | CC | 0.30 (8) | 0.33 (14) | | | | |
| | | CT | 0.44 (12) | 0.54 (23) | | | | |
| | | TT | 0.26 (7) | 0.14 (6) | | | 0.450 | |
| | | rezessives Modell (TTvs.CC+CT) | | | 2.16 | 0.64- 7.30 | 0.210 | |
| | weiblich | CC | 0.36 (13) | 0.32 (9) | | | | |
| | | CT | 0.56 (20) | 0.36 (10) | | | | |
| | | TT | 0.08 (3) | 0.32 (9) | | | 0.046 | |
| | | Rezessives Modell (TT vs. CC+CT) | | | 0.19 | 0.05- 0.80 | 0.015 | |
| | 2677G>TA | männlich | GG | 0.29 (9) | 0.40 (19) | | | |
| | | | GT+TA | 0.48 (15) | 0.43 (21) | | | |
| TT+TA+AA | | | 0.23 (7) | 0.17 (8) | | | 0.598 | |
| Rezessives Modell (TT+TA+AA vs.GG+GA+GA) | | | | | 1.46 | 0.47- 4.53 | 0.513 | |
| weiblich | | GG | 0.41 (16) | 0.24 (7) | | | | |
| | | GT+TA | 0.49 (19) | 0.35 (10) | | | | |
| | | TT+TA+AA | 0.10 (4) | 0.41 (12) | | | 0.011 | |
| | | Rezessives Modell (TT+TA+AA vs. GG+GA+GA) | | | 0.16 | 0.04- 0.58 | 0.003 | |
| 3435C>T | | männlich | CC | 0.10 (3) | 0.26 (12) | | | |
| | | | CT | 0.57 (17) | 0.41 (19) | | | |
| | TT | | 0.33 (10) | 0.33 (15) | | | 0.193 | |
| | Rezessives Modell (TT vs. CC+CT) | | | | 1.03 | 0.39- 2.75 | 0.948 | |
| | weiblich | CC | 0.16 (6) | 0.14 (4) | | | | |
| | | CT | 0.60 (23) | 0.39 (11) | | | | |
| | | TT | 0.24 (9) | 0.47 (13) | | | 0.140 | |
| | | Rezessives Modell (TT vs. CC+CT) | | | 0.36 | 0.12- 1.03 | 0.053 | |

Unter Frauen ist der Zusammenhang zwischen erhöhtem AD-Risiko und Vorliegen des C-Allels im SNP ABCB1 1236C>T mit $p=0.015$ signifikant, während dies mit einem p von 0.21 in der männlichen Subgruppe nicht der Fall ist (Abb. 15, Tab.24).

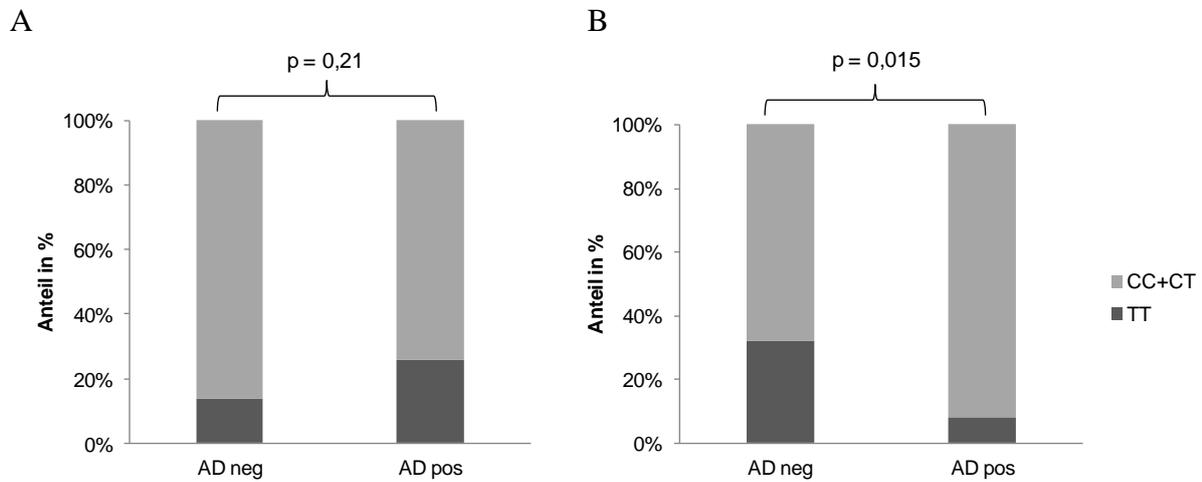


Abb. 15: Relative Anteile der Träger der C-Allels (CC- oder CT-Genotyp) und der Träger des T-Allels in Bezug auf den SNP ABCB1 1236C>T an AD-negativen und AD-positiven Probanden; keine Alterseinschränkungen, keine Einbeziehung des ApoE- ϵ 4-Allelstatus. A: Männer, B: Frauen.

Tab. 24: Genotypenfrequenzen zu ABCB1 1236C>T unter Einbeziehung des Geschlechts; rezessives Modell, keine Alterseinschränkung, keine Einbeziehung des ApoE- ϵ 4-Allelstatus.

| Polymorphismus | | Allel | Kontrollen (n) | Alzheimer (n) | p-Wert |
|-------------------|----------|-------|----------------|---------------|--------------|
| ABCB1 1236 C>T | männlich | CC+CT | 0.86 (37) | 0.74 (20) | 0.21 |
| | | TT | 0.14 (6) | 0.26 (7) | |
| | weiblich | CC+CT | 0.68 (19) | 0.92 (33) | 0.015 |
| | | TT | 0.32 (9) | 0.08 (3) | |

Ähnlich sieht es bei Betrachtung des SNPs ABCB1 2677G>TA aus: Während das G-Allel bei Frauen mit einem p von 0.003 einen signifikanten Risikofaktor darstellt, ist dies bei einem p von 0.513 unter den Männern nicht der Fall (Modell: GG+GT+GA vs. TT+TA+AA, Abb. 16, Tab. 25).

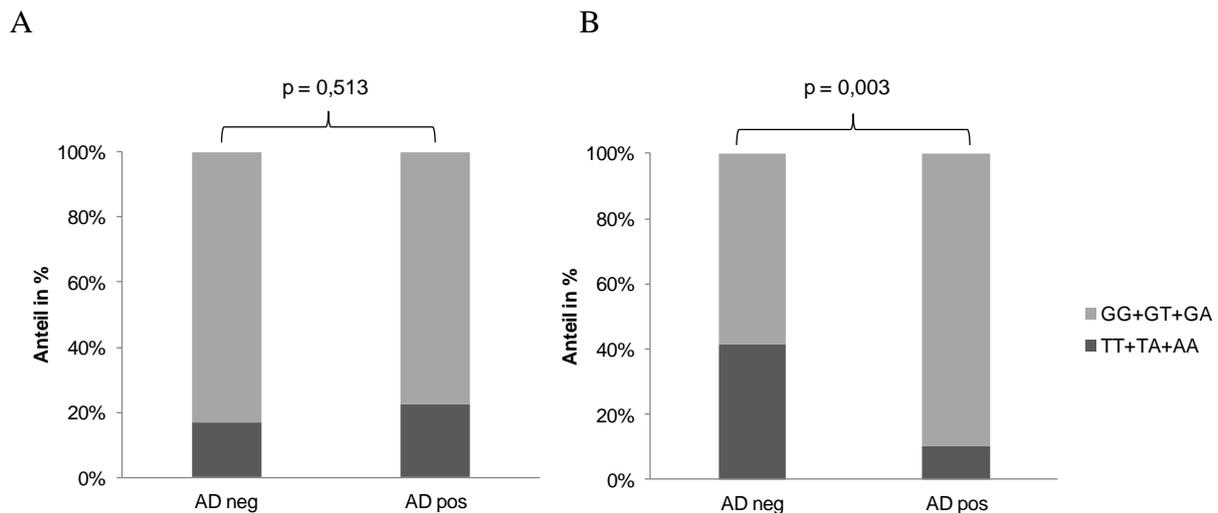


Abb. 16: Relative Anteile der Träger des G-Allels (GG-, GT- oder GA-Genotyp) und der Träger ohne wildtypspezifisches G-Allel (TT-, TA- und AA-Genotyp) des SNPs ABCB1 2677G>TA an AD-negativen und AD-positiven Probanden bei Verzicht auf eine Alterseinschränkung. A: Männer, B: Frauen.

Tab. 25: Genotypenfrequenzen des SNPs ABCB1 2677G>TA unter Einbeziehung des Geschlechts; G-rezessives Modell, keine Alterseinschränkung, keine Einbeziehung des ApoE-ε4-Allelstatus.

| Polymorphismus | | Allel | Kontrollen (n) | Alzheimer (n) | p-Wert | |
|-------------------|----------|----------|----------------|---------------|--------|--------------|
| ABCB1 2677G>TA | Männlich | GG+GT+GA | 0.83 (40) | 0.77 (24) | 0.513 | |
| | | TT+TA+AA | 0.17 (8) | 0.23 (7) | | |
| | weiblich | GG+GT+GA | 0.59 (17) | 0.90 (35) | | 0.003 |
| | | TT+TA+AA | 0.41 (12) | 0.10 (4) | | |

Auch in den Altersgruppen der mindestens 60- und 65-Jährigen ließ sich der entsprechende Effekt feststellen (keine Einbeziehung des ApoE-ε4-Allelstatus: ABCB1 1236C>T, rez. Modell: $p_{\geq 60\text{Jahre, weiblich}}=0.022$, $p_{\geq 60\text{Jahre, männlich}}=0.328$ $p_{\geq 65\text{Jahre, weiblich}}=0.045$, $p_{\geq 65\text{Jahre, männlich}}=0.732$; ABCB1 2677G>TA, G-rez. Modell: $p_{\geq 60\text{Jahre, weiblich}}=0.003$, $p_{\geq 60\text{Jahre, männlich}}=0.762$, $p_{\geq 65\text{Jahre, weiblich}}=0.014$, $p_{\geq 65\text{Jahre, männlich}}=0.757$).

In der Gruppe der ApoE-ε4-Negativen kommt der Effekt ebenfalls zum Tragen (ABCB1 1236C>T: $p_{\geq 60\text{ Jahre, weiblich}}=0.046$, $p_{\geq 60\text{ Jahre, männlich}}=1.000$; ABCB1 2677 G>TA: $p_{\geq 60\text{ Jahre, weiblich}}=0.007$, $p_{\geq 60\text{ Jahre, männlich}}=1.000$; $p_{\geq 65\text{ Jahre, weiblich}}=0.018$, $p_{\geq 65\text{Jahre, männlich}}=0.379$).

Ein ähnliches, die statistische Signifikanz leicht verfehlendes Ergebnis ließ sich beim SNP ABCB1 3435C>T beobachten: Bei den Frauen, die an Alzheimer-Demenz erkrankt waren, war das ABCB1 3435 C-Allel gegenüber dem T-Allel häufiger nachweisbar ($p = 0.053$). Bei

den Männern hingegen war kein protektiver Charakter des T-Allels zu beobachten ($p = 0.948$).

Auch bei der Analyse des SNPs ABCC2 3972C>T bestätigte sich dieser Trend: In der weiblichen Subgruppe ergab sich unter AD-Patienten eine Häufung des T-Allels, wobei das übliche Signifikanzniveau leicht verfehlt wurde ($p=0.056$). Bei den korrelierenden männlichen Patienten ließ sich kein solcher Effekt beobachten ($p=0.537$).

Bei Zusammenfassung der homozygoten Träger des Wildtypallels für ABCB1 1236C>T, 2677G>TA und 3435C>T zu einem Diplotyp *1/*1 und homozygoten Trägern des Variantallels zum Diplotyp *2/*2 (141) ergab sich eine Häufung der *1/*1-Diplotyps gegenüber den *2/*2-Diplotypen unter den weiblichen Kontrollen, wobei die statistische Signifikanz ($p=0.058$, OR 6.77, 95%-KI 0.86 – 55.6) leicht verfehlt wurde.

3.6 Ergebnisse der logistischen Regressionsanalyse

Aufgrund der signifikanten Ergebnisse in Bezug auf ABCB1 und ABCB2 wurde eine logistische Regressionanalyse durchgeführt, in die Alter, Geschlecht und die dichotomen Genotypenmodelle zu ApoE, ABCB12677G>TA und ABCC2 3972C>T einbezogen wurden. Weiterhin blieb das ApoE- ϵ 4-Allel in signifikanter Assoziation mit dem Alzheimerisiko (OR 15.6, 95%-KI 4.22 – 57.6, $p<0.001$). Auch in Bezug auf ABCC2 ergab sich weiterhin ein signifikanter Zusammenhang (OR 3.57, 95%-KI 1.09 – 11.7, $p=0.035$). Dies war in Bezug auf ABCB1 nicht der Fall. Die logistische Regressionsanalyse an den ApoE- ϵ 4-Allel-Negativen ergab weiterhin signifikante Werte für ABCC2 ($p=0.010$), allerdings keine Assoziation in Bezug auf ABCB1.

4 Diskussion

4.1 Einfluss des Transportgleichgewichts an der Bluthirnschranke auf das Risiko einer Alzheimer-Demenz

Die Alzheimer-Demenz hat viele Ursachen. Neben multiplen exogenen Faktoren, die in der Krankheitsgenese eine Rolle spielen, sind vor allem biochemische Prozesse auf hirnorganischer Ebene von entscheidender ätiologischer Bedeutung. Hauptverursacher für den Untergang von Neuronen in den krankheitsrelevanten Hirnarealen ist neben intrazellulärer Ablagerung des Proteins Tau das im Übermaß vorhandene A β (16, 142).

Das bei AD vermehrt vorliegende A β_{40-42} induziert oxidativen Stress, stört insbesondere die neuronale Calcium-Homöostase (143), hemmt den neuronalen Energie-Metabolismus und führt schließlich zur oxidativen Schädigung von Proteinen, DNA und Lipiden. Besonders die Synapsen, die als Ort der Signalübertragung ständig extremen Schwankungen der Ionenkonzentration ausgesetzt sind, reagieren sehr sensibel. Folge der A β -Überlastung ist außerdem eine Aktivierung von Mikroglia: Die Immunzellen des ZNS produzieren pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α oder Interferon- γ . Außerdem werden Proteine der Komplementkaskade freigesetzt: Insbesondere C1q interagiert hierbei mit A β und sorgt für eine zusätzliche Verstärkung seiner Aggregation (28).

Die Folge ist schließlich der Untergang von Neuronen in besonders vulnerablen Gehirnarealen, z.B. dem Hippocampus und dem Temporallappen.

Bei den meisten AD-Patienten liegen im Gegensatz zu den wenigen erblich bedingten Fällen keine Mutationen im Bereich der A β -Produktion vor. Dementsprechend muss es andere Ursachen für die erhöhte Akkumulationsneigung des fehlgefalteten Proteins geben, z.B. ein gestörter Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke.

Der Influx von A β wird physiologisch vor allem über die Interaktion von A β mit dem Receptor for advanced glycation end products (RAGE) gesteuert, ein Rezeptorprotein, welches unter anderem an der luminalen Seite der Endothelzellen der BHS lokalisiert ist (144). Die Clearance von A β hingegen wird vor allem mittels des low-density lipoprotein receptor related protein-1 (LRP1) gewährleistet (145-147). Der Transporter ist an der abluminalen Seite der Endothelzellen der Hirnkapillaren lokalisiert (145, 146). Er ist Mitglied der low density lipoprotein (LDL) Rezeptorfamilie und spielt eine wichtige Rolle beim

Transport von Cholesterol, welches beim Heraustransport meinst an ApoE-Lipoproteine gekoppelt ist (148).

Außerdem findet eine enzymatische Degradation innerhalb des Gehirns statt (149).

Bei im Sinne einer AD veränderten Gehirnen findet sich einerseits eine erhöhte Expression von RAGE und andererseits eine verminderte Expression von LRP-1 an der BHS (148). Die vermehrte Akkumulation von A β im Interneuralraum führt schließlich zu vermehrter Oligomerisierung und verstärkter Neurotoxizität der Aggregate. Dieser Effekt allein reicht jedoch nicht aus, um die Entstehung einer AD zu erklären. Hochverdächtige Kandidaten sind hierbei vor allem die Transportproteine der ABC-Familie.

4.2 Einfluss von P-gp auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

A β steht im Zentrum der Pathogenese der Alzheimer-Demenz. Viele Studien belegen, dass unter den ABC-Transportern vor allem P-gp direkt mit A β interagiert und maßgeblich an seinem Efflux über die Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist:

Laut einer in-vitro-Studie an HEK-293-Zellen von Lam et al. (150) bindet und transportiert ABCB1 (MRD1-P-Glykoprotein, P-gp) A β ₄₀ und A β ₄₂. Der Transporter wird neben seinen recht populären Lokalisationen in Tumorzellen, Dünndarmepithelien und proximalen Nierentubulusepithelien auch an der luminalen Seite der Endothelien von Hirnkapillaren exprimiert. Versuche an P-gp-knockout-Mäusen ergaben, dass bei ihnen erhöhte intracerebrale Spiegel von P-gp-Substraten vorlagen (151). Neben dem Efflux von verschiedenen Xenobiotika, allerdings auch komplexen Lipiden und Ionen, ist ABCB1 also auch für den Transport von A β verantwortlich (152-154).

Die Ergebnisse einer Studie von Kuhnke et al. (155) bestätigen diese These: An einem in-vitro-Zell-Modell eines humanen Gefäßendothels ergab sich eine inverse Korrelation zwischen der Menge des am Endothel exprimierten P-gp und der Anzahl der transzellulär vorhandenen A β -Plaques. Dies bedeutet, dass A β in basoapikaler Richtung transportiert wird und belegt, dass diese Interaktion beim vermehrten Vorliegen von A β -Plaques im Gehirn gestört sein könnte. Die Ergebnisse der Studie implizieren, dass eine geringere Dichte oder verminderte Aktivität des ABCB1-Transporters an der BHS dazu beitragen könnte, dass sich bevorzugt intracerebrale A β -Plaques bilden, was aufgrund der erhöhten Neurotoxizität wiederum die Entstehung einer AD fördern würde.

Hartz et al. wiesen direkt an der intakten Blut-Hirn-Schranke transgener Mäuse, die humanes APP überexprimierten, nach, dass A β durch P-gp in das cerebrale Kapillarlumen transportiert wird. Wenn außerdem, wie in diesem Modell nachgewiesen, P-gp vermindert vorliegt oder durch chemische Inhibitoren gehemmt wird und besonders viel APP vorhanden ist, kommt es zur cerebralen Akkumulation von A β (156).

Eine weitere, von Vogelgesang, Cascorbi et al. publizierte Studie an nicht-dementen älteren Westeuropäern (157) konnte zwar zunächst keinen Zusammenhang zwischen ABCB1-Genotyp und der Expression des Transporters ermitteln, belegte allerdings trotzdem eine inverse Korrelation zwischen ABCB1-Expression an der BHS und A β ₄₀ bzw. A β ₄₂-Deposition im medialen Temporallappen und Hippocampus. Dies war eine der ersten in-vivo-Studien am Menschen, die direkt belegte, wie eng die A β und ABCB1 miteinander verknüpft sind.

Die Studie ergab außerdem einen, allerdings keine statistische Signifikanz erreichenden, positiven Zusammenhang zwischen P-gp-Expression und ABCB1 2677 TT- oder TA-Status. Ein ähnlicher Zusammenhang ergab sich auch für ABCB1 3435 TT-Allelträger.

Aus Betrachtung insbesondere dieser beiden Studien ergab sich die Frage, ob der ABCB1-Genotyp selbst Einfluss auf die A β -Last und folglich das Risiko der Entstehung einer AD hat. Da alle bereits existierenden Studien sich entweder auf in-vitro-Modelle oder gesunde Probanden bezogen, handelt es sich bei dieser Arbeit um die erste Studie, bei der ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Alzheimer-Demenz und dem ABCB1-Genotyp untersucht und gefunden wurde.

4.2.1 Einfluss des SNPs ABCB1 1236C>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Sowohl in den Altergruppen der mindestens-60- als auch der mindestens-65-Jährigen ließ sich in der Gruppe der Apo-E- ϵ 4-Allel-negativen eine signifikante Assoziation zwischen Auftreten der Alzheimererkrankung und Vorliegen des Wildtypallels (C) beobachten (CC+CT vs. TT; $p_{\geq 60 \text{ Jahre}} = 0.044$, $p_{\geq 65 \text{ Jahre}} = 0.038$).

Wie auch bei ABCB1 3435C>T handelt es sich bei 1236C>T um einen synonymen, d.h. nicht primär mit einer Veränderung der Proteinstruktur assoziierten SNP. Trotzdem gibt es einige Theorien, die eine Beeinflussung der Transporterfunktion durch 1236C>T erklären können. Dies geschieht z.B. über eine Beeinflussung der Translation (158), auch aber über

allelspezifische Unterschiede der Sekundärstruktur der RNA, wodurch wiederum Splicingprozesse und die Translationskontrolle beeinflusst werden (159). Eine andere Beeinflussungsmöglichkeit ist eine Stabilisierung der mRNA durch den SNP, was in einer erhöhten Proteinexpression (160) oder einer verbesserten Substrataffinität (161) resultiert.

Auch eine Assoziation des Genotyps mit der P-gp-Expression wird beschrieben. Die Studienlage ist hierbei mit der zu ABCB1 3435C>T vergleichbar: Bei beiden SNPs scheint, zumindest in Bezug auf das Ansprechen auf Immunsuppression mit Cyclosporin A und Tacrolimus bei Nierentransplantierten (162) oder das Ansprechen auf Psychopharmaka bei Schizophrenen oder Autismus (163), das T-Allel mit besserem therapeutischen Outcome assoziiert zu sein. Da es vermutlich mit geringeren zellulären P-gp-Konzentrationen verbunden ist (164), können die von P-gp transportierten Medikamente höhere Wirkspiegel erreichen.

Ähnlich zu ABCB1 3435C>T ergibt sich in Bezug auf die hier untersuchten Alzheimerpatienten ein anderes Bild. Vieles weist darauf hin, dass P-gp-assoziierte Prozesse in Darm oder Nieren nicht ohne weiteres auf das ZNS übertragbar sind.

4.2.2 Einfluss des SNPs ABCB1 2677G>TA auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

In der vorliegenden Arbeit waren Personen, die an Alzheimer-Demenz erkrankt sind und bei denen die klinische Diagnose histopathologisch bestätigt wurde, signifikant häufiger Träger des ABCB1 2677 G-Allels. Dies ist vor allem unter den älteren Probanden von mindestens 65 Jahren zu beobachten ($p_{\geq 65 \text{ Jahre}}=0,036$), deutete sich aber auch in den anderen Altersgruppen an ($p_{\geq 60 \text{ Jahre}}=0,054$, $p_{\text{keine Altersbeschränkungen}}=0,057$). Bei Fehlen des ApoE- ϵ 4-Allels verstärkt sich der Effekt maßgeblich ($p_{\geq 60 \text{ Jahre}}=0,011$, $p_{\geq 65 \text{ Jahre}}=0,018$).

Das ABCB1 2677G-Allel stellt also einen Risikofaktor für die Entstehung einer Alzheimer-Demenz dar.

Als wegweisend erwies sich eine Studie von Schaefer et al. (165): Hier ergab sich bei Untersuchung des Genotyps von ABCB1 2677G>TA und 3435C>T zunächst keine Assoziation zwischen Allelstatus und Proteinexpression. ABCB1 war allerdings signifikant mit dem Ansprechen auf das Antidepressivum und P-gp-Substrat Paroxetin assoziiert: Vor allem ABCB1 2677-A-Allelträger sprachen besser an als Patienten mit GG-Genotyp, was darauf hinweist, dass das G-Allel mit einer verminderten P-gp-Aktivität verknüpft ist.

In Bezug auf die Transportkapazitäten des ABCB1-Transporters ergab sich ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis:

Träger des ABCB1 2677 T- oder A-Allels verfügten gegenüber Trägern des G-Allels über eine signifikant höhere maximale Transportgeschwindigkeit V_{\max} des ABCB1-Transporters ($p=0.01$) (165). Auch die intrinsische Clearance, d.h. dem Quotienten aus Maximalgeschwindigkeit V_{\max} und der Michaeliskonstante K_m , einem inversen Maß für die Affinität des Substrats ($A\beta$) zum Enzym (ABCB1), lag, wie eine weitere Studie von Ishikawa et al. bestätigt, bei A-Allelstatus trotz Verfehlen der statistischen Signifikanz deutlich höher als bei T- oder G-Allelstatus (166).

Die Tatsache, dass sich der Effekt im Rahmen dieser Arbeit insbesondere bei Probanden mit negativem ApoE- $\epsilon 4$ -Allelstatus besonders deutlich darstellte, könnte damit zusammenhängen, dass der stark proamyloidogene Einfluss des $\epsilon 4$ -Allels nicht mehr durch den eher nachrangigen Effekt des ABCB1-2677-Genotyps überdeckt wurde. Der negative Effekt des T- oder A-Allels auf die $A\beta$ -Last wird also erst dann relevant in Bezug auf die $A\beta$ -Last, wenn der starke Effekt des ApoE- $\epsilon 4$ -Allels wegfällt.

Da hier, im Gegensatz zu den vorherigen Studien, Patienten untersucht wurden, bei denen im Voraus feststand, ob sie an einer histopathologisch gesicherten Alzheimer-Demenz erkrankt waren, wird deutlich, dass die Veränderung der Aktivität des ABCB1-Transporters direkt mit der Entwicklung einer neuropathologisch sicher diagnostizierten AD zusammenhängt.

4.2.3 Einfluss des SNPs ABCB1 3435C>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Neben dem SNP ABCB1 2677G>TA wurde in dieser Arbeit auch der SNP ABCB1 3435C>T untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei Alzheimer-Patienten eine signifikante Häufung des ABCB1 3435 C-Allels vorlag. Der proamyloidogene Effekt ließ sich vor allem in der Gruppe der ApoE- $\epsilon 4$ -Allel-negativen Probanden im Alter von mindestens 60 Jahren bei ABCB1 3435 CC- und CT-Allelstatus nachweisen ($p_{\geq 60 \text{ Jahre}} = 0,049$, auch im Modell CC vs. CT vs. TT $p_{\geq 60 \text{ Jahre}} = 0.041$). Auch bei Außerachtlassen des ApoE- $\epsilon 4$ -Allel-Status deutete sich dieses Ergebnis an.

Obwohl sich wenige Studien mit dem direkten Zusammenhang zwischen ABCB1 3435C>T-Genotyp und dem Alzheimerisiko beschäftigen, weisen einige Studien auf das erbrachte Ergebnis hin.

Da der SNP ABCB1 3435C>T in einer nichtkodierenden Genregion und fern der Promotor-Region gelegen ist, ist ein direkter Einfluss des SNPs auf die Proteinexpression und Aktivität des Transporters unwahrscheinlich (164). Prinzipiell wäre eine Beeinflussung von Splicing- oder Transkriptionsvorgängen zwar möglich (161), allerdings könnte die direkte funktionelle Wirkung auch über das Linkage disequilibrium mit den SNP ABCB1 2677G>TA zustandekommen (141, 167).

Hochinteressant sind zum Beispiel die Ergebnisse einer Publikation von Kim et al. (141): An einer Studie mit Amerikanern europäischer und afrikanischer Herkunft ergab sich, dass das ABCB1 3435T-Allel mit einer erhöhten Transporteraktivität assoziiert ist (bzw. das C-Allel mit einer geringeren Aktivität). Bei Betrachtung der AUC von Fexofenadin, einem Substrat des ABCB1-Transporters, ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen CC- und TT-Allelträgern.

Zu einem ähnlichen Resultat kommen Haenisch et al. (112): An Nierencarcinomzellen wurde hier bei homozygoten Trägern des ABCB1 3435 TT-Genotyps eine signifikant höhere mRNA-Expression ($p=0.043$) als bei homozygoten Trägern des Wildtyps beobachtet.

In Bezug auf HIV und ZNS-Erkrankungen wie Epilepsie und Morbus Parkinson scheinen sich diese Annahmen bezüglich der Funktionalität des SNPs ABCB1 3435 jedoch nicht zu bestätigen: Die Parkinsonsche Erkrankung, deren Ursachen einerseits auf genetischer Basis, andererseits in der Exposition von Umweltfaktoren, wie z.B. dem Trinken von Oberflächenwasser oder Pestiziden wie Paraquat/Rotenon, liegen, scheint ätiologisch mit der Aktivität des ABCB1-Transporters verknüpft. In einer Studie von Drozdik et al. (168) fiel nur bei Betrachtung der Früherkrankten (jünger als 50 Jahre), nicht allerdings bei den im späteren Lebensalter Erkrankten, eine Häufung von ABCB1 3435 TT-Genotypen auf. Auch unter Parkinsonpatienten, die vermehrt Umweltgiften ausgesetzt waren, fand sich ein höherer Anteil an heterozygoten Genotypen (CT-Allelstatus). Der Anteil der TT-Genotypen war hier leicht erhöht, wies aber keine Signifikanz auf. Die Häufung des T-Allels insbesondere bei early-onset Parkinsonpatienten wurde zwar auch in anderen Arbeiten vermutet, erreichte hier jedoch ebenfalls nie statistische Signifikanz (169, 170). Sollte die Assoziation fundiert sein, so wäre ein T-Allelstatus mit einer verringerten Transportaktivität des ABCB1-Proteins verbunden und lieferte so die Begründung für eine vermehrte intracerebrale Akkumulation von neurotoxischen Stoffen.

In Studien am Dünndarm kam es zu ähnlichen Ergebnissen wie in Bezug auf die Resultate an Parkinsonpatienten: ABCB1 3435 TT-Allelträger wiesen eine 2-fach niedrigere, allerdings nicht signifikante ($p=0.056$) Expression des Transporters auf, CC-Allelträger dagegen eine höhere (164).

Auch in CD4⁺-Lymphozyten spielt der ABCB1-3435C>T-Genotyp eine entscheidende Rolle: Bei HIV-Patienten mit TT-Allelstatus war die antiretrovirale Therapie, deren Einzelkomponenten wie Nelfinavir oder Efavirenz auch durch ABCB1-Proteine transportiert werden, effektiver als bei CT- oder CC-Allelstatus: Die mittlere Plasmakonzentration war höher, ebenso die CD4⁺-Zellzahlen sechs Monate nach Therapiebeginn und die Rate der innerhalb von 24 Wochen regenerierten naiven T-Zellen (171). Bei den relevanten Zellpopulationen handelte es sich vorwiegend um hämatopoietische Progenitorzellen, Lymphozyten und Makrophagen in bestimmten Entwicklungsstadien und insbesondere T-Zellen in diversen Differenzierungsformen. Bei TT-Allelstatus, so die Studie, sei die Aktivität des ABCB1-Transporters vermindert und so die Akkumulationsneigung des jew. Medikaments in der Zielzelle erhöht. Trotzdem konnte hier kein direkter Zusammenhang zwischen ABCB1-3435-Genotyp und Pharmakosensibilität gezogen werden, da komplexe alternative Interaktionsmöglichkeiten, wie z.B. die Koregulation von CYP3A4 oder die direkte Interaktion von P-gp und den Invasionsstrategien des HI-Virus, ebenfalls eine Rolle spielten. Außerdem gab es keine signifikante Korrelation zwischen ABCB1-Genotyp und Viruslast.

Immer wieder wurde außerdem der Zusammenhang zwischen P-gp-Genotyp und der Entwicklung einer pharmakoresistenten Epilepsie diskutiert. Viele Antiepileptika werden P-gp-abhängig transportiert. Konsekutiv wurde vermutet, dass es in epilepsieveränderten Gehirnarealen zu einer Hochregulation der ABCB1-Expression kommen könnte (172). Einige Studien ließen vermuten, dass besonders der ABCB1 3435CC-Genotyp bei therapierefraktären Patienten gehäuft vorkommt und somit mit einer erhöhten Transporteraktivität assoziiert ist (173, 174). Neuere Studien (175, 176) unter identischen Auswahlkriterien und mit erhöhter Teilnehmerzahl konnten den Einfluss des C-Allels jedoch nicht bestätigen und deklarierten das vorherige Ergebnis als statistischen Fehler. Die Zusammenschau aktueller Studien legt nahe, dass der Zusammenhang zwischen P-gp und therapierefraktärer Epilepsie bisher eher überschätzt wurde (177, 178).

Bei allen Studien an Parkinson- oder Epilepsiepatienten muss angemerkt werden, dass es sich um Studien an hochgradig verändertem Zellmaterial handelt. Besonders die von Epilepsie

betroffenen Hirnareale verweisen über eine teilweise völlig veränderte Transporterexpression, die Studien sind ergo nur begrenzt auf ein anderes Patientenkollektiv übertragbar.

Zusammenfassend betrachtet ergibt sich also, ähnlich wie in Bezug auf den SNP ABCB1 1236C>T, kein konsistentes Bild der Auswirkung des Genotyps im ABCB1 3435C>T-SNP auf die Expression des Transporterproteins.

4.3 Einfluss des SNPs ABCC2 3972C>T auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Bei Betrachtung des SNPs ABCC2 3927C>T ließ sich in allen Altersgruppen bei Apo-E- ϵ 4-Allel-Negativen eine signifikante Assoziation zwischen Alzheimererkrankung und Vorliegen des Variantallels (T) beobachten ($p_{\text{keine Altersbeschränkungen}} = 0.008$, $p_{\geq 60 \text{ Jahre}} = 0.012$, $p_{\geq 65 \text{ Jahre}} = 0.011$).

Bisher ist die Studienlage zu ABCC2 und A β wenig ergiebig. Neuere Veröffentlichungen weisen jedoch darauf hin, dass ABCC2-Transportervarianten maßgeblich am medikamentösen Therapieerfolg bei Epilepsiepatienten teilhaben (111, 179). Dies legt nahe, dass auch ABCC2 am Transport antikonvulsiver Wirkstoffe über die Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist.

Obwohl der Zusammenhang von ABCC2 und A β bisher eher wenig untersucht wurde, wäre es möglich, dass auch ABCC2 A β bindet und transportiert. Eine genauere Evaluation sollte im Zentrum zukünftiger Projekte stehen.

4.4 Einfluss von ABCA1 und ABCG2 auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Bei keinem der SNPs der Transporter ABCA1 und G2 (BCRP) konnte in dieser Studie ein signifikanter Zusammenhang zur Alzheimerdemenz nachgewiesen werden. Vor allem für BCRP steht allerdings fest, dass das Protein A β ₄₀ und A β ₄₂ aktiv transportiert (130). Auch ABCA1, ein Cholesteroltransporter, wird mit einer zerebralen Cholesterollakkumulation in Verbindung gebracht, was wiederum eine Induktion von A β und dementsprechend eine Zunahme des AD-Risikos bewirkt (180, 181). Eine ABCA1-Überexpression im Mausmodell für Alzheimerdemenz resultierte in einer verminderten Akkumulation von A β (182). Einige Studien, wie unter anderem die von Rodriguez-Rodriguez et al. (183) und Kolsch et al. (68) sahen eine enge Korrelation von ABCA1-Polymorphismen und Alzheimerisiko. Viele andere Studien (70, 184), wie auch diese Studie, beobachteten allerdings keinen Zusammenhang. Die

Rolle von ABCA1 und G2 im Pathogenesemodell der Alzheimer-Demenz ist also weiterhin nicht klar abzugrenzen.

4.5 Einfluss von ApoE ϵ 4 auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Das ApoE ϵ 4-Allel ist einer der am besten replizierbaren und damit der größte genetische Risikofaktor für die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz. Dies bestätigte sich in allen Altersgruppen dieser Studie. Dem massiven Effekt des ApoE ϵ 4-Allels Rechnung tragend, ließen sich die Effekte vieler ABC-Transporter auf das AD-Risiko vor allem in der Gruppe der ϵ 4-Allel-Negativen beobachten.

Interessanterweise gibt es einige direkte Zusammenhänge zwischen ApoE und den cerebralen ABC-Transportern: Elali et al. wiesen nach, dass ApoE maßgeblich an der Regulation von ABC-Transportern im ischämischen Gehirn beteiligt ist und somit den zentralen Medikamentenspiegel entscheidend mitbeeinflusst (184). Eine andere Studie von Vogelgesang et al. ergab außerdem, dass bei ApoE ϵ 4-positiven, aber nicht-dementen älteren Patienten signifikant weniger P-gp exprimiert wurde (157). Der ApoE-Genotyp könnte also unabhängig von seiner amyloidmodifizierenden Rolle im Cholesterolsystem auch einen direkten Einfluss auf die P-gp-Expression haben.

4.6 Einfluss des Alters und des Geschlechts auf das Risiko der Entstehung einer Alzheimer-Demenz

Bei Stratifikation nach dem Geschlecht wurde ein weiterer wichtiger Effekt sichtbar: Alle signifikanten Ergebnisse in Bezug auf die ABC-Transporter ließen sich ausschließlich in der weiblichen Subgruppe beobachten (zum Beispiel für ABCB1 1236C>T im rezessiven Modell: $p_{\text{weiblich}}=0.015$; $p_{\text{männlich}}=0.21$; für ABCB1 2677G>TA im G-rezessiven Modell: $p_{\text{weiblich}}=0.003$, $p_{\text{männlich}}=0.513$). Die weitverbreitete Annahme, dass vor allem Frauen an AD erkranken, wird hierdurch bestätigt. Nur in der durch den entscheidenden Risikofaktor des weiblichen Geschlechts vorbelasteten Gruppe lässt sich also die zusätzliche, durch die Mutationen im ABCB1-Gen verursachte Risikosteigerung beobachten.

Einer der wichtigsten Gründe für die erhöhte Inzidenz bei Frauen liegt zweifelsohne in der höheren Lebenserwartung, der daraus resultierenden längeren Krankheitsdauer und der erhöhten kumulativen Wahrscheinlichkeit, über die Jahre eine AD zu entwickeln. Außerdem ist bei Frauen die Inzidenz der vaskulären Demenz wesentlich geringer als in vergleichbaren männlichen Populationen. Hierdurch treten die durch AD bewirkten zerebralen Veränderungen stärker in den Vordergrund (185). Bei Männern hingegen, deren Risiko, an

vaskulärer Demenz zu erkranken, höher ist, können die hierdurch hervorgerufenen Symptome die Anzeichen einer AD maskieren und so die Inzidenz der AD artifiziell senken.

Einige Studien belegen außerdem, dass die AD-assozierte Mortalität bei Männern gegenüber Frauen erhöht ist. Die niedrigere Prävalenz könnte also auch durch den oft kürzeren Krankheitsverlauf bei Männern bedingt sein (186).

Eine gute formale Bildung gilt generell als protektiver Faktor in Bezug auf das Risiko der Entstehung einer AD und die kognitive Reserve. Eine andere Teilursache für den Frauenüberhang könnte also in der tendenziell geringeren Bildung der heutigen AD-Patientinnen liegen: In ihrer Jugend war es oft üblich, dass Männer eine tendenziell längere schulische oder akademische Ausbildung genossen (187).

Ein wichtiger Grundpfeiler der AD-Suszeptibilität liegt außerdem im Östrogenspiegel. Bei Frauen, die postmenopausal Östrogene im Rahmen einer Hormontherapie einnahmen, wurde eine signifikant geringere Inzidenz der Alzheimer-Demenz beobachtet (188). Eine frühe Menarche und besonders langzeitige Östrogen-Einnahme senkten das Risiko zusätzlich (189). Auch eine Behandlung mit Testosteron bei Männern, deren Spiegel des Geschlechtshormons im Alter ebenfalls sinkt, hatte einen signifikanten Einfluss auf die Reduktion von A β (190). Viele zentrale Neurone exprimieren Estrogenrezeptoren (191), was die Relevanz der Geschlechtshormone in Bezug auf zentrale Regulationsmechanismen unterstreicht.

Estrogene scheinen neben Neuritenwachstum und synaptischer Plastizität vor allem auch zentrale cholinerge Transmittersysteme zu fördern, die bei Alzheimer mit im Zentrum der Pathogenese stehen. Außerdem scheinen akute inflammatorische Prozesse durch Estrogene gehemmt und sowohl antioxidative Vorgänge sowie viele weitere neuroprotektive Funktionen gefördert zu werden (192). Obwohl die Studienergebnisse teilweise widersprüchlich sind (193), da meist nur wenige Probanden einbezogen wurden und viele konfundierende Faktoren vorlagen, weist vieles darauf hin, dass Sexualhormone über vielfältige neuroprotektive und neurotrope Effekte verfügen.

Ein anderes Argument für die erhöhte Quote der Frauen unter den AD-Patienten könnte in der Transporteraktivität des P-gp für A β liegen. Es gibt Hinweise darauf, dass Frauen generell eine niedrige P-gp-Expression aufweisen als Männer. Dieser Unterschied tritt besonders in der Leber zu Tage und ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf die Blut-Hirn-Schranke übertragbar (194, 195). Im Rahmen von Chemotherapien ergab sich: Bei Frauen kam es durch eine verminderte P-gp-Expression zu einem vergleichsweise höheren Risiko für

Myelosuppression und gastrointestinale Toxizität (196) (interessant ist hierbei ein Letter to the editor von Mellar und Davis).

Auch im Mausmodell bestätigte sich die Geschlechtsabhängigkeit: Callahan et al. wiesen nach, dass weibliche APP-transgene Mäuse früher und in größeren Mengen A β -Plaques entwickeln als ihre männlichen Korrelate (197).

Vieles spricht dafür, dass sich auch bei diesem Aspekt der Alzheimer-Demenz keine einfache oder eindeutige Ursache-Wirkungs-Beziehung aufstellen lässt. Da der erhöhte Anteil von Frauen unter den AD-Patienten konsistent und replizierbar beobachtet wird, besteht ein starker Anreiz, die Ursache in zukünftigen Forschungsarbeiten tiefergehend zu klären.

5 Zusammenfassung

Die Demenz vom Alzheimer-Typ gewinnt aufgrund der steigenden Inzidenz insbesondere in der Bevölkerung der Industrienationen kontinuierlich an Bedeutung. Trotzdem sind viele Fragen bezüglich der Ätiologie und Therapie bisher ungeklärt. Im Zentrum der Pathogenese stehen die übermäßige Bildung und der Abtransport des potentiell neurotoxischen Peptids A β über die Blut-Hirn-Schranke. Einige Studien weisen darauf hin, dass an der Bluthirnschranke lokalisierte Transporter aus der Familie der ABC-Transporter und insbesondere ABCB1 (P-Glykoprotein) maßgeblich an der Akkumulation von A β beteiligt sind.

Da P-gp hochpolymorph ist, bestand die Kernaufgabe in dieser Arbeit darin, den Einfluss einzelner ABCB1-Genotypen und anderer ABC-Transportergene auf das Risiko der sporadischen Alzheimer-Demenz zu ermitteln.

In dieser Arbeit wurden die ABC-Transporter-Polymorphismen (sog. single nucleotide polymorphisms) ABCA1 -14C>T und 1051G>A, ABCB1 1236C>T, 2677G>TA und 3435C>T, ABCC2 -24C>T, 1249G>A und 3972C>T, ABCG2 34G>A und 421C>A mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), Pyrosequencing und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) untersucht. Um dem einzigen bisher valide ermittelten genetischen Risikofaktor der sporadischen Alzheimer-Demenz Rechnung zu tragen, wurde außerdem der ApoE- ϵ 4-Allelstatus über Genotypisierung der SNPs ApoE 130C>T und 176C>T ermittelt. Des Weiteren wurde eine Stratifikation nach Alter und Geschlecht vorgenommen.

Es wurde die DNA von insgesamt 151 Probanden einbezogen, wobei es sich bei 71 Personen um Träger einer neuropathologisch gesicherten Alzheimer-Demenz handelte.

Es konnte gezeigt werden, dass unter Berücksichtigung eines rezessiven Modells die Variante ABCB1 2677G>TA bei Patienten mit einem Alter über 65 Jahren signifikant mit dem Auftreten einer AD assoziiert ist (OR 2.7, 95% KI 0.14-0.95, p=0.036). Bei Abwesenheit des ApoE- ϵ 4-Allels ließ die Assoziation schon ab einem Alter von 60 Jahren nachweisen. Auch bei Betrachtung der SNPs ABCB1 3435C>T (p=0.041) und 1236C>T (p=0.044) ergab sich in der Altersgruppe der mindestens 60-Jährigen eine Assoziation des Wildtypallels mit dem AD-Risiko, allerdings nur bei Abwesenheit des ApoE- ϵ 4-Allels. Außerdem zeigte sich, dass auch ABCC2 mit dem AD-Risiko assoziiert ist: Bei Abwesenheit des ApoE- ϵ 4-Allels hatten Träger des Variantallels (T) im SNP ABCC2 3972C>T ein signifikant höheres AD-Risiko (p=0.008). Eine signifikante Assoziation ließ sich auch bei weiblichen Patienten für ABCB1 1236C>T-

und 2677G>TA-, nicht aber 3435C>T nachweisen ($p=0.015$ bzw. $p=0.003$). In Abwesenheit des ApoE- $\epsilon 4$ -Allels verstärkte sich der Effekt.

Für die Transporter ABCA1 und ABCG2 konnte keine signifikante Assoziationen mit dem Alzheimerisiko nachgewiesen werden.

Insgesamt bestätigt sich in dieser Arbeit die Vermutung, dass die ABC-Transporter und vor allem ABCB1 eine Schlüsselrolle in der Entwicklung einer AD spielen. Es ist bereits bekannt, dass ABCB1 A β an der Blut-Hirn-Schranke bindet und es nach intravaskulär transportiert. Insbesondere die SNPs ABCB1 1236C>T, 2677G>TA und ABCC2 3972C>T scheinen jedoch direkt mit dem AD-Risiko assoziiert zu sein. Während dieser Zusammenhang in Bezug auf ABCB1 sich bereits in einigen anderen Studien andeutet, bleiben vor allem in Bezug auf ABCC2 die genaueren Hintergründe der Assoziation noch zu klären.

Um die volle Bedeutung der ABC-Transporter für das AD-Risiko abzuschätzen, bedarf es einer Validierung unserer Befunde an einem größeren Kollektiv, an dem unter anderem auch die Funktionalität der Transporter in Zusammenhang mit der Alzheimer-Pathogenese tiefergehend geklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005;366(9503):2112-7. Epub 2005/12/20.
2. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006;368(9533):387-403. Epub 2006/08/01.
3. Hufschmidt A LC. *Neurologie compact für Klinik und Praxis*. 4. Auflage ed2006.
4. Morris JC. Mild cognitive impairment is early-stage Alzheimer disease: time to revise diagnostic criteria. *Arch Neurol*. 2006;63(1):15-6. Epub 2006/01/13.
5. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34(7):939-44. Epub 1984/07/01.
6. Moller HJ, Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1998;248(3):111-22. Epub 1998/09/05.
7. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*. 1995;8(6):429-31. Epub 1995/01/01.
8. Maurer U. *Das Leben eines Arztes und die Karriere einer Krankheit*. München: Piper; 1998.
9. Thorsett ED, Latimer LH. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol*. 2000;4(4):377-82. Epub 2000/08/26.
10. Braak H, Braak E, Yilmazer D, de Vos RA, Jansen EN, Bohl J. Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm*. 1996;103(4):455-90. Epub 1996/01/01.
11. Sisodia SS, St George-Hyslop PH. gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(4):281-90. Epub 2002/04/23.
12. Terry RD, Gonatas NK, Weiss M. The ultrastructure of the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Trans Am Neurol Assoc*. 1964;89:12. Epub 1964/01/01.
13. Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*. 1996;383(6600):550-3. Epub 1996/10/10.
14. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(13):4913-7. Epub 1986/07/01.

15. Bondareff W, Harrington CR, McDaniel SW, Wischik CM, Roth M. Presence of axonal paired helical filament-tau in Alzheimer's disease: submicroscopic localization. *J Neurosci Res.* 1994;38(6):664-9. Epub 1994/08/15.
16. Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature.* 1999;399(6738 Suppl):A23-31. Epub 1999/07/07.
17. Thal DR, Braak H. [Post-mortem diagnosis of Alzheimer's disease]. *Pathologe.* 2005;26(3):201-13. Epub 2004/09/15. Postmortale Diagnosestellung bei Morbus Alzheimer. Stadiengliederungen der kennzeichnenden Hirnveränderungen.
18. Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, et al. Intra-neuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol.* 2002;161(5):1869-79. Epub 2002/11/05.
19. Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, et al. Intra-neuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett.* 2001;306(1-2):116-20. Epub 2001/06/19.
20. Joachim CL, Selkoe DJ. The seminal role of beta-amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1992;6(1):7-34. Epub 1992/01/01.
21. Morris HR, Khan MN, Janssen JC, Brown JM, Perez-Tur J, Baker M, et al. The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Arch Neurol.* 2001;58(11):1813-6. Epub 2001/11/16.
22. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002;297(5580):353-6. Epub 2002/07/20.
23. Huse JT, Doms RW. Neurotoxic traffic: uncovering the mechanics of amyloid production in Alzheimer's disease. *Traffic.* 2001;2(2):75-81. Epub 2001/03/15.
24. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24(8):1063-70. Epub 2003/12/04.
25. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(4):321-39. Epub 1997/04/01.
26. Greenberg SM, Vonsattel JP. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke.* 1997;28(7):1418-22. Epub 1997/07/01.
27. Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science.* 1987;235(4791):877-80. Epub 1987/02/20.
28. Dawbarn D. *Neurobiology of Alzheimer's Disease; Third Edition.* G.L. Collingridge SPH, N.J. Rothwell, editor. New York, United States: Oxford University Press; 2007.
29. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991;349(6311):704-6. Epub 1991/02/21.

30. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995;375(6534):754-60. Epub 1995/06/29.
31. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995;269(5226):973-7. Epub 1995/08/18.
32. Harvey RJ, Skelton-Robinson M, Rossor MN. The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74(9):1206-9. Epub 2003/08/23.
33. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. 1992;1(5):345-7. Epub 1992/08/01.
34. Cai XD, Golde TE, Younkin SG. Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science*. 1993;259(5094):514-6. Epub 1993/01/22.
35. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, et al. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*. 1992;360(6405):672-4. Epub 1992/12/17.
36. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999;286(5440):735-41. Epub 1999/10/26.
37. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet*. 1992;1(3):218-21. Epub 1992/06/01.
38. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, et al. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 1990;248(4959):1124-6. Epub 1990/06/01.
39. Vassar R. Beta-secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(12):1589-602. Epub 2002/11/28.
40. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Jr., et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet*. 1994;7(2):180-4. Epub 1994/06/01.
41. Raber J, Huang Y, Ashford JW. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging*. 2004;25(5):641-50. Epub 2004/06/03.
42. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261(5123):921-3. Epub 1993/08/13.
43. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997;278(16):1349-56. Epub 1997/10/29.

44. Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1994;17(12):525-30. Epub 1994/12/01.
45. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, et al. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(6):2892-7. Epub 2000/03/01.
46. Prince JA, Zetterberg H, Andreasen N, Marcusson J, Blennow K. APOE epsilon4 allele is associated with reduced cerebrospinal fluid levels of Abeta42. *Neurology.* 2004;62(11):2116-8. Epub 2004/06/09.
47. Loscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol.* 2005;76(1):22-76. Epub 2005/07/14.
48. Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol.* 1999;5(6):556-69. Epub 1999/12/22.
49. Demeule M, Regina A, Jodoin J, Laplante A, Dagenais C, Berthelet F, et al. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol.* 2002;38(6):339-48. Epub 2003/01/18.
50. Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R. Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev.* 2001;53(4):569-96. Epub 2001/12/06.
51. Tsuji A, Tamai H. Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999;36(2-3):277-90. Epub 2000/06/06.
52. Kushihara H, Sugiyama Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 1). *Drug Discov Today.* 2001;6(3):150-6. Epub 2001/02/13.
53. Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G, Cecchelli R. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* 1997;138(4):877-89. Epub 1997/08/25.
54. Fillebeen C, Descamps L, Dehouck MP, Fenart L, Benaissa M, Spik G, et al. Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J Biol Chem.* 1999;274(11):7011-7. Epub 1999/03/06.
55. Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Methods Mol Med.* 2003;89:385-99. Epub 2003/09/06.
56. Sissung TM, Baum CE, Kirkland CT, Gao R, Gardner ER, Figg WD. Pharmacogenetics of membrane transporters: an update on current approaches. *Mol Biotechnol.* 2010;44(2):152-67. Epub 2009/12/02.
57. Probst MC, Thumann H, Aslanidis C, Langmann T, Buechler C, Patsch W, et al. Screening for functional sequence variations and mutations in ABCA1. *Atherosclerosis.* 2004;175(2):269-79. Epub 2004/07/21.

58. Kim WS, Guillemin GJ, Glaros EN, Lim CK, Garner B. Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *Neuroreport*. 2006;17(9):891-6. Epub 2006/06/02.
59. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*. 1999;22(4):336-45. Epub 1999/08/04.
60. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, et al. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest*. 1999;104(8):R25-31. Epub 1999/10/19.
61. Koldamova R, Staufenbiel M, Lefterov I. Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J Biol Chem*. 2005;280(52):43224-35. Epub 2005/10/07.
62. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Hartman RE, Bales KR, Paul SM, et al. Deletion of Abca1 increases A β deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2005;280(52):43236-42. Epub 2005/10/07.
63. Wolozin B. A fluid connection: cholesterol and A β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5371-3. Epub 2001/05/10.
64. Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, Llorca J, Sanchez-Quintana C, Infante J, Garcia-Gorostia I, et al. Association of genetic variants of ABCA1 with Alzheimer's disease risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007;144B(7):964-8. Epub 2007/05/19.
65. Katzov H, Chalmers K, Palmgren J, Andreasen N, Johansson B, Cairns NJ, et al. Genetic variants of ABCA1 modify Alzheimer disease risk and quantitative traits related to beta-amyloid metabolism. *Hum Mutat*. 2004;23(4):358-67. Epub 2004/03/17.
66. Sundar PD, Feingold E, Minster RL, DeKosky ST, Kamboh MI. Gender-specific association of ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) polymorphisms with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007;28(6):856-62. Epub 2006/05/27.
67. Wollmer MA, Streffer JR, Lutjohann D, Tsolaki M, Iakovidou V, Hegi T, et al. ABCA1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(3):421-6. Epub 2003/02/26.
68. Kolsch H, Lutjohann D, Jessen F, Von Bergmann K, Schmitz S, Urbach H, et al. Polymorphism in ABCA1 influences CSF 24S-hydroxycholesterol levels but is not a major risk factor of Alzheimer's disease. *International journal of molecular medicine*. 2006;17(5):791-4. Epub 2006/04/06.
69. Shibata N, Kawarai T, Lee JH, Lee HS, Shibata E, Sato C, et al. Association studies of cholesterol metabolism genes (CH25H, ABCA1 and CH24H) in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2006;391(3):142-6. Epub 2005/09/15.
70. Li Y, Tacey K, Doil L, van Luchene R, Garcia V, Rowland C, et al. Association of ABCA1 with late-onset Alzheimer's disease is not observed in a case-control study. *Neuroscience letters*. 2004;366(3):268-71. Epub 2004/08/04.

71. Hodoglugil U, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW. Common polymorphisms of ATP binding cassette transporter A1, including a functional promoter polymorphism, associated with plasma high density lipoprotein cholesterol levels in Turks. *Atherosclerosis*. 2005;183(2):199-212. Epub 2005/06/07.
72. Kyriakou T, Hodgkinson C, Pontefract DE, Iyengar S, Howell WM, Wong YK, et al. Genotypic effect of the -565C>T polymorphism in the ABCA1 gene promoter on ABCA1 expression and severity of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):418-23. Epub 2004/11/06.
73. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976;455(1):152-62. Epub 1976/11/11.
74. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):48-58. Epub 2002/03/21.
75. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(9):3004-8. Epub 1987/05/01.
76. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(2):695-8. Epub 1989/01/01.
77. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem*. 1989;37(2):159-64. Epub 1989/02/01.
78. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):4028-33. Epub 1997/04/15.
79. Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest*. 1995;96(4):1698-705. Epub 1995/10/01.
80. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(1):3-29. Epub 2003/01/22.
81. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:361-98. Epub 1999/05/20.
82. Fava M, Davidson KG. Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. *Psychiatr Clin North Am*. 1996;19(2):179-200. Epub 1996/06/01.
83. Hellewell JS. Treatment-resistant schizophrenia: reviewing the options and identifying the way forward. *J Clin Psychiatry*. 1999;60 Suppl 23:14-9. Epub 2000/01/07.

84. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med.* 2000;342(5):314-9. Epub 2000/02/05.
85. Sukhai M, Piquette-Miller M. Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals. *J Pharm Pharm Sci.* 2000;3(2):268-80. Epub 2000/09/20.
86. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* 2008;9(1):105-27. Epub 2007/12/25.
87. Meissner K, Sperker B, Karsten C, Zu Schwabedissen HM, Seeland U, Bohm M, et al. Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(10):1351-6. Epub 2002/10/05.
88. Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(3):260-77. Epub 2005/09/13.
89. Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A, et al. Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72(2):209-19. Epub 2002/08/22.
90. Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch.* 2007;453(5):643-59. Epub 2006/07/19.
91. Jedlitschky G, Keppler D. Transport of leukotriene C4 and structurally related conjugates. *Vitam Horm.* 2002;64:153-84. Epub 2002/03/20.
92. Dallas S, Miller DS, Bendayan R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev.* 2006;58(2):140-61. Epub 2006/05/23.
93. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J.* 1997;327 (Pt 1):305-10. Epub 1997/11/14.
94. Evers R, Kool M, van Deemter L, Janssen H, Calafat J, Oomen LC, et al. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest.* 1998;101(7):1310-9. Epub 1998/04/29.
95. Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol.* 1999;55(5):929-37. Epub 1999/04/30.
96. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(16):1295-302. Epub 2000/08/17.
97. Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, et al. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem.* 1996;271(25):15091-8. Epub 1996/06/21.

98. Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dorsam J, Staehler G, et al. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(6):1159-69. Epub 1999/06/11.
99. Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, et al. Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(8):1213-21. Epub 1997/08/01.
100. Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Vore M. Expression and localization of multidrug resistant protein *mrp2* in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;293(3):717-23. Epub 2000/06/28.
101. Nies AT, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP, et al. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience.* 2004;129(2):349-60. Epub 2004/10/27.
102. Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(1):124-31. Epub 2003/03/29.
103. Soontornmalai A, Vlaming ML, Fritschy JM. Differential, strain-specific cellular and subcellular distribution of multidrug transporters in murine choroid plexus and blood-brain barrier. *Neuroscience.* 2006;138(1):159-69. Epub 2005/12/20.
104. Sisodiya SM. Mechanisms of antiepileptic drug resistance. *Curr Opin Neurol.* 2003;16(2):197-201. Epub 2003/03/20.
105. Kubota H, Ishihara H, Langmann T, Schmitz G, Stieger B, Wieser HG, et al. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res.* 2006;68(3):213-28. Epub 2005/12/20.
106. Dubin IN, Johnson FB. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore).* 1954;33(3):155-97. Epub 1954/09/01.
107. Keitel V, Kartenbeck J, Nies AT, Spring H, Brom M, Keppler D. Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 2000;32(6):1317-28. Epub 2000/11/28.
108. Materna V, Lage H. Homozygous mutation Arg768Trp in the ABC-transporter encoding gene MRP2/cMOAT/ABCC2 causes Dubin-Johnson syndrome in a Caucasian patient. *J Hum Genet.* 2003;48(9):484-6. Epub 2003/08/28.
109. Donner MG, Keppler D. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology.* 2001;34(2):351-9. Epub 2001/08/02.
110. Keppler D, Kartenbeck J. The canalicular conjugate export pump encoded by the *cmrp/cmoat* gene. *Prog Liver Dis.* 1996;14:55-67. Epub 1996/01/01.
111. Ufer M, Mosyagin I, Muhle H, Jacobsen T, Haenisch S, Hasler R, et al. Non-response to antiepileptic pharmacotherapy is associated with the ABCC2 -24C>T polymorphism in

young and adult patients with epilepsy. *Pharmacogenetics and genomics*. 2009;19(5):353-62. Epub 2009/05/06.

112. Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck CJ, Dazert P, Siegmund W, et al. Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J*. 2007;7(1):56-65. Epub 2006/06/22.

113. Rau T, Erney B, Gores R, Eschenhagen T, Beck J, Langer T. High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80(5):468-76. Epub 2006/11/23.

114. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation*. 2006;82(8):1074-84. Epub 2006/10/25.

115. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res*. 1998;58(23):5337-9. Epub 1998/12/16.

116. Chen YN, Mickley LA, Schwartz AM, Acton EM, Hwang JL, Fojo AT. Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. *J Biol Chem*. 1990;265(17):10073-80. Epub 1990/06/15.

117. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res*. 1999;59(1):8-13. Epub 1999/01/19.

118. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 2001;11(7):1156-66. Epub 2001/07/04.

119. Ewart GD, Howells AJ. ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. *Methods Enzymol*. 1998;292:213-24. Epub 1998/08/26.

120. Lee YJ, Kusuhara H, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y. Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(1):44-52. Epub 2004/09/28.

121. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*. 2001;61(8):3458-64. Epub 2001/04/20.

122. Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, van Herwaarden AE, Schinkel AH. The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol*. 2005;67(5):1758-64. Epub 2005/02/15.

123. Ando T, Kusuhara H, Merino G, Alvarez AI, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(10):1873-9. Epub 2007/07/20.
124. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 2001;7(9):1028-34. Epub 2001/09/05.
125. Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, et al. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res.* 2002;8(1):22-8. Epub 2002/01/22.
126. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood.* 2002;99(2):507-12. Epub 2002/01/10.
127. Eisenblatter T, Galla HJ. A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(4):1273-8. Epub 2002/06/11.
128. Cooray HC, Blackmore CG, Maskell L, Barrand MA. Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport.* 2002;13(16):2059-63. Epub 2002/11/20.
129. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15665-70. Epub 1998/12/23.
130. Xiong H, Callaghan D, Jones A, Bai J, Rasquinha I, Smith C, et al. ABCG2 is upregulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for Abeta(1-40) peptides. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2009;29(17):5463-75. Epub 2009/05/01.
131. Tamura A, Wakabayashi K, Onishi Y, Takeda M, Ikegami Y, Sawada S, et al. Re-evaluation and functional classification of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Cancer Sci.* 2007;98(2):231-9. Epub 2007/02/14.
132. Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer.* 2004;109(2):238-46. Epub 2004/01/30.
133. de Jong FA, Marsh S, Mathijssen RH, King C, Verweij J, Sparreboom A, et al. ABCG2 pharmacogenetics: ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition. *Clin Cancer Res.* 2004;10(17):5889-94. Epub 2004/09/10.
134. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, et al. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15649-54. Epub 2002/11/14.

135. Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12339-44. Epub 2002/09/10.
136. Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F, Scherrmann JM. Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res*. 2004;64(9):3296-301. Epub 2004/05/06.
137. www.pyrosequencing.com.
138. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*. 2007;68(5):326-37. Epub 2007/01/31.
139. Camargo A, Azuaje F, Wang H, Zheng H. Permutation - based statistical tests for multiple hypotheses. *Source Code Biol Med*. 2008;3:15. Epub 2008/10/23.
140. Ingelsson M, Shin Y, Irizarry MC, Hyman BT, Lilius L, Forsell C, et al. Genotyping of apolipoprotein E: comparative evaluation of different protocols. *Curr Protoc Hum Genet*. 2003;Chapter 9:Unit9 14. Epub 2008/04/23.
141. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;70(2):189-99. Epub 2001/08/15.
142. Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2004;351(1):56-67. Epub 2004/07/02.
143. Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 2004;430(7000):631-9. Epub 2004/08/06.
144. Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, et al. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med*. 2003;9(7):907-13. Epub 2003/06/17.
145. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, et al. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest*. 2000;106(12):1489-99. Epub 2000/12/20.
146. Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, et al. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron*. 2004;43(3):333-44. Epub 2004/08/06.
147. Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*. 2004;35(11 Suppl 1):2628-31. Epub 2004/10/02.
148. Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009;8(1):16-30. Epub 2009/03/12.

149. Selkoe DJ. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron*. 2001;32(2):177-80. Epub 2001/10/31.
150. Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ, et al. beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *Journal of neurochemistry*. 2001;76(4):1121-8. Epub 2001/02/22.
151. Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999;36(2-3):179-94. Epub 2000/06/06.
152. Ambudkar SV, Kim IW, Sauna ZE. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci*. 2006;27(5):392-400. Epub 2005/12/15.
153. Demeule M, Labelle M, Regina A, Berthelet F, Beliveau R. Isolation of endothelial cells from brain, lung, and kidney: expression of the multidrug resistance P-glycoprotein isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(3):827-34. Epub 2001/03/10.
154. Golden PL, Pardridge WM. Brain microvascular P-glycoprotein and a revised model of multidrug resistance in brain. *Cell Mol Neurobiol*. 2000;20(2):165-81. Epub 2000/03/04.
155. Kuhnke D, Jedlitschky G, Grube M, Krohn M, Jucker M, Mosyagin I, et al. MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) Mediates Transport of Alzheimer's amyloid-beta peptides--implications for the mechanisms of Abeta clearance at the blood-brain barrier. *Brain Pathol*. 2007;17(4):347-53. Epub 2007/07/06.
156. Hartz AM, Miller DS, Bauer B. Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol*. 2010;77(5):715-23. Epub 2010/01/27.
157. Vogelgesang S, Cascorbi I, Schroeder E, Pahnke J, Kroemer HK, Siegmund W, et al. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics*. 2002;12(7):535-41. Epub 2002/10/03.
158. Sparreboom A, Danesi R, Ando Y, Chan J, Figg WD. Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2003;6(2):71-84. Epub 2003/05/06.
159. Shen LX, Basilion JP, Stanton VP, Jr. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(14):7871-6. Epub 1999/07/08.
160. Frittitta L, Ercolino T, Bozzali M, Argiolas A, Graci S, Santagati MG, et al. A cluster of three single nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of human glycoprotein PC-1 gene stabilizes PC-1 mRNA and is associated with increased PC-1 protein content and insulin resistance-related abnormalities. *Diabetes*. 2001;50(8):1952-5. Epub 2001/07/27.
161. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007;315(5811):525-8. Epub 2006/12/23.
162. Singh R, Srivastava A, Kapoor R, Mittal RD. Do drug transporter (ABCB1) SNPs influence cyclosporine and tacrolimus dose requirements and renal allograft outcome in the

posttransplantation period? *Journal of clinical pharmacology*. 2011;51(4):603-15. Epub 2010/06/24.

163. Correia CT, Almeida JP, Santos PE, Sequeira AF, Marques CE, Miguel TS, et al. Pharmacogenetics of risperidone therapy in autism: association analysis of eight candidate genes with drug efficacy and adverse drug reactions. *The pharmacogenomics journal*. 2010;10(5):418-30. Epub 2009/12/10.

164. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(7):3473-8. Epub 2000/03/15.

165. Schaefer M, Roots I, Gerloff T. In-vitro transport characteristics discriminate wild-type ABCB1 (MDR1) from ALA893SER and ALA893THR polymorphisms. *Pharmacogenetics and genomics*. 2006;16(12):855-61. Epub 2006/11/17.

166. Ishikawa T, Hirano H, Onishi Y, Sakurai A, Tarui S. Functional evaluation of ABCB1 (P-glycoprotein) polymorphisms: high-speed screening and structure-activity relationship analyses. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2004;19(1):1-14. Epub 2004/10/23.

167. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;297(3):1137-43. Epub 2001/05/18.

168. Drozdziak M, Bialecka M, Mysliwiec K, Honczarenko K, Stankiewicz J, Sych Z. Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*. 2003;13(5):259-63. Epub 2003/05/02.

169. Furuno T, Landi MT, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I, Nappi G, et al. Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*. 2002;12(7):529-34. Epub 2002/10/03.

170. Le Couteur DG, Davis MW, Webb M, Board PG. P-glycoprotein, multidrug-resistance-associated protein and Parkinson's disease. *Eur Neurol*. 2001;45(4):289-90. Epub 2001/06/01.

171. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet*. 2002;359(9300):30-6. Epub 2002/01/26.

172. Sisodiya SM, Heffernan J, Squier MV. Over-expression of P-glycoprotein in malformations of cortical development. *Neuroreport*. 1999;10(16):3437-41. Epub 1999/12/22.

173. Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med*. 2003;348(15):1442-8. Epub 2003/04/11.

174. Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, Gleiss A, Dal-Bianco A, Zimprich A, et al. Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2004;63(6):1087-9. Epub 2004/09/29.
175. Tan NC, Heron SE, Scheffer IE, Pelekanos JT, McMahon JM, Vears DF, et al. Failure to confirm association of a polymorphism in ABCB1 with multidrug-resistant epilepsy. *Neurology*. 2004;63(6):1090-2. Epub 2004/09/29.
176. Sills GJ, Mohanraj R, Butler E, McCrindle S, Collier L, Wilson EA, et al. Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment. *Epilepsia*. 2005;46(5):643-7. Epub 2005/04/29.
177. Cascorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handbook of experimental pharmacology*. 2011(201):261-83. Epub 2010/11/26.
178. Cascorbi I. ABC transporters in drug-refractory epilepsy: limited clinical significance of pharmacogenetics? *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2010;87(1):15-8. Epub 2009/12/19.
179. Ufer M, von Stulpnagel C, Muhle H, Haenisch S, Remmler C, Majed A, et al. Impact of ABCC2 genotype on antiepileptic drug response in Caucasian patients with childhood epilepsy. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(10):624-30. Epub 2011/07/30.
180. Koldamova RP, Lefterov IM, Staufenbiel M, Wolfe D, Huang S, Glorioso JC, et al. The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(6):4079-88. Epub 2004/11/24.
181. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Kim J, Li A, Knoten A, et al. Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):671-82. Epub 2008/01/19.
182. Reynolds CA, Hong MG, Eriksson UK, Blennow K, Bennet AM, Johansson B, et al. A survey of ABCA1 sequence variation confirms association with dementia. *Human mutation*. 2009;30(9):1348-54. Epub 2009/07/17.
183. Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, Infante J, Llorca J, Garcia-Gorostiaga I, Vazquez-Higuera JL, et al. Interaction between HMGCR and ABCA1 cholesterol-related genes modulates Alzheimer's disease risk. *Brain research*. 2009;1280:166-71. Epub 2009/05/19.
184. ElAli A, Hermann DM. Apolipoprotein E controls ATP-binding cassette transporters in the ischemic brain. *Science signaling*. 2010;3(142):ra72. Epub 2010/10/07.
185. Lerner AJ. Alzheimer's disease in males: endocrine issues and prospects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3416-9. Epub 1999/10/16.
186. Lapane KL, Gambassi G, Landi F, Sgadari A, Mor V, Bernabei R. Gender differences in predictors of mortality in nursing home residents with AD. *Neurology*. 2001;56(5):650-4. Epub 2001/03/14.

187. Qiu C, Backman L, Winblad B, Aguero-Torres H, Fratiglioni L. The influence of education on clinically diagnosed dementia incidence and mortality data from the Kungsholmen Project. *Arch Neurol*. 2001;58(12):2034-9. Epub 2001/12/26.
188. Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, et al. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet*. 1996;348(9025):429-32. Epub 1996/08/17.
189. Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med*. 1996;156(19):2213-7. Epub 1996/10/28.
190. Gouras GK, Xu H, Gross RS, Greenfield JP, Hai B, Wang R, et al. Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(3):1202-5. Epub 2000/02/03.
191. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 1997;388(4):507-25. Epub 1997/12/05.
192. Henderson VW. Estrogen, cognition, and a woman's risk of Alzheimer's disease. *Am J Med*. 1997;103(3A):11S-8S. Epub 1997/10/31.
193. Hogervorst E, Williams J, Budge M, Riedel W, Jolles J. The nature of the effect of female gonadal hormone replacement therapy on cognitive function in post-menopausal women: a meta-analysis. *Neuroscience*. 2000;101(3):485-512. Epub 2000/12/13.
194. Benet LZ, Cummins CL, Wu CY. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *Int J Pharm*. 2004;277(1-2):3-9. Epub 2004/05/26.
195. Schuetz EG, Furuya KN, Schuetz JD. Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;275(2):1011-8. Epub 1995/11/01.
196. Meyers PA, Schwartz CL, Krailo M, Kleinerman ES, Betcher D, Bernstein ML, et al. Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J Clin Oncol*. 2005;23(9):2004-11. Epub 2005/03/19.
197. Callahan MJ, Lipinski WJ, Bian F, Durham RA, Pack A, Walker LC. Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *The American journal of pathology*. 2001;158(3):1173-7. Epub 2001/03/10.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben und sowohl auf fachlich-theoretischer, als auch auf praktischer Seite maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben. Zuallererst gilt dies Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi, insbesondere für die angenehme und zuverlässige Zusammenarbeit.

Bei Frau Privatdozentin Dr. Silke Vogelgesang, Prof. Dr. Rolf W. Warzok und Prof. Dr. Frank Dombrowski vom Neuropathologischen Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald möchte ich mich dafür bedanken, dass sie die Proben zur Verfügung gestellt und präpariert haben.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein für die herzliche Aufnahme, die Hilfe im Labor und am Computer. Besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. Cornelia Remmler, die für mich immer erreichbar war und mir bei vielen Problemen zur Seite stand. Auch Dr. Sierk Hänisch, Marion Pauer und Micheline Neubert unterstützten mich maßgeblich, vor allem bei der praktischen Umsetzung im Labor.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern, Geschwistern und Freunden für die Toleranz und die uneingeschränkte Unterstützung, ohne die ich die Hürden in Zusammenhang mit dieser Arbeit wohl weitaus schlechter gemeistert hätte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name **Charlotte Flüh**

Ausbildung

2005 – 2011 **Christian-Albrechts-Universität, Kiel**
Studium der Humanmedizin
1997 – 2005 **Gymnasium Lornsenschule Schleswig**

Klinische Erfahrungen

Praktisches Jahr

4/2011 – 6/2011 **Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel**
Klinik für Neurochirurgie
12/2010 – 4/2011 **Westküstenklinikum Heide**
Klinik für Innere Medizin
8/2010 – 12/2010 **Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA**
Department of Surgery

Berufliche Erfahrungen

4/2009 – 4/2010 **Universitätskinderklinik, Kiel**
11/2009 – 7/2010 **Institut für Physiologie der Christian-Albrechts-Universität, Kiel**
1/ 2008 – 2/2008 **Institut für Anatomie der Christian-Albrechts-Universität, Kiel**

Kiel, 17.01.2012

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde. Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis angefertigt habe.

Kiel, 17.01.2012

Charlotte Flüh

Veröffentlichungen

“Association of ABC-transporter variants with an increased risk of Alzheimer`s disease”,
Charlotte Flueh , Cornelia Remmler , Sierk Haenisch , Frank Faltraco , Warzok RW, Silke
Vogelgesang, Ingolf Cascorbi . *Naunyn-Schmiedeberg`s 381: 51, 87 – 88.*

Posterpräsentation auf der 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie
und Toxikologie, 23. – 25. März 2010, Mainz