

Aus dem  
Centrum für Anatomie  
Institut für Integrative Neurobiologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

**Zur Bedeutung der Apolipoproteinexpression für die  
Entwicklung einer Senilen Demenz vom Alzheimer-Typ**  
Semiquantitative Bestimmung von Apolipoprotein E und D  
im Hippokampus im Verlauf der Erkrankung

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frauke Glöckner

aus Leipzig

**Dekan:**                   **Prof. Dr. med. Martin Paul**

Gutachter:       1. Prof. Dr. Th. G. Ohm  
                      2. Prof. Dr. T. Arendt  
                      3. Prof. Dr. W. März

eingereicht:               02.06.2005

Datum der Promotion:   27.02.2006

## **Abstract**

Der bedeutendste Risikofaktor für die Demenz vom Alzheimer Typ (DAT) ist, neben dem Alter, der Besitz des  $\epsilon 4$ -Allels des Lipidtransportmoleküls Apolipoprotein E (APOE, Gen; ApoE, Protein). Neben funktionellen Unterschieden der Isoformen könnte auch die quantitative Verfügbarkeit des Proteins bei der Pathogenese der DAT eine Rolle spielen. Da ApoE als Lipidtransporter insbesondere bei plastischen Umbauprozessen im Gehirn wichtig sein könnte, wurde der Proteingehalt in Bezug auf die Schwere der DAT-assoziierten Veränderungen entsprechend der neuropathologischen Stadieneinteilung nach Braak untersucht. Neben ApoE wurde auch Apolipoprotein D (ApoD) in der Pathogenese der DAT diskutiert. Um herauszufinden, ob es hier eine Beziehung zur Schwere der neuropathologischen Veränderungen und/oder dem APOE-Polymorphismus gibt, wurde auch der ApoD-Gehalt untersucht. Bestimmt wurde der Apolipoproteingehalt in 104 nach Alter, Geschlecht, Braak-Stadium und APOE-Genotyp abgeglichenen Hippokampusproben, da diese Hirnregion im Verlauf einer Demenz früh und nachhaltig betroffen ist. Die Daten zeigen einen Anstieg von ApoE in den frühen Stadien der Erkrankung, in denen neuroplastische Reparationsvorgänge nachweisbar sind, und eine kontinuierliche Zunahme des ApoD-Gehalts mit der Schwere der neurofibrillären Veränderungen in den APOE  $\epsilon 3/3$ -Proben. In den Proben, die das Risikoallel APOE  $\epsilon 4$  trugen, waren keine statistisch signifikanten Veränderungen nachweisbar.

The most important risk factor for Alzheimer's disease (AD), besides age, is the inheritance of the  $\epsilon 4$ -allele of the lipid transporting apolipoprotein E (APOE, gen; apoE, protein). Apart from functional differences of the apoE isoforms, the quantitative availability of the protein might be important in AD pathogenesis. As a lipid transporter, apoE should be relevant especially during plastic response of neuronal structures. Hence, apoE levels were investigated in correlation to the severity of pathological changes as staged according to the neuropathological Braak classification of AD. Besides apoE, apolipoprotein D (apoD) is discussed in AD pathogenesis. To clarify whether there is a correlation to AD related neuropathological changes, apoD levels were also determined. The apolipoproteins were determined in 104 age-, gender-, Braak stage- and APOE genotype-matched samples of hippocampal protein extracts because

this brain region is early and enduring affected by the disease.

The data show an increase in apoE in the early stages of the disease where plastic remodelling occurs and a continuous increase in apoD with the severity of neurofibrillary changes in the APOE  $\epsilon$ 3/3-group only. No statistically relevant changes were observed in samples carrying the AD-risk allele  $\epsilon$ 4.

Schlagwörter:

Demenz vom Alzheimer Typ, Apolipoprotein E, Apolipoprotein D, Hippokampus

Keywords:

Alzheimer's disease, apolipoprotein E, apolipoprotein D, hippocampus

Teile der vorliegenden Promotion wurden auf Postern präsentiert auf:

- der 18. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft September 2001 in Würzburg (Poster Nr. 55)
- dem Berlin Neuroscience Forum April 2002 in Bad Liebenwalde (Poster Nr. 32 und Nr. 33)
- der 9<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders Juli 2002 in Stockholm (Poster Nr. 1489 und Nr. 1491)

und in folgenden Artikeln publiziert:

- **Glöckner, F**, Meske, V, Ohm, TG (2002). Genotype-related differences of hippocampal apolipoprotein E levels only in early stages of neuropathological changes in Alzheimer's disease. **Neuroscience** **114 (4)**, 1103-1114
- Ohm TG, **Glöckner F**, Distl R, Treiber-Held S, Meske V, Schönheit B (2003). Plasticity and the spread of Alzheimer's disease-like changes. **Neurochemical Research**. **28 (11)**, 1715-23
- Ohm, TG, Treiber-Held, S, Distl, R, **Glöckner, F**, Tamanai M, Meske, V (2003) Cholesterol and tau – Findings in Alzheimer's and Niemann Pick C's disease. **Pharmacopsychiatry** **36 (S2)**, S120-S126
- **Glöckner, F**, Ohm, TG (2003). Apolipoprotein D is stage-dependently altered in hippocampal tissue from Alzheimer's disease patients. **Neuroscience** **122**, 103-110
- Schönheit, B, **Glöckner, F**, and Ohm, TG (2006). Apolipoprotein E polymorphism and dendritic shape. **Neurobiology of Aging** (in press)

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung	9
1.1	Demenz vom Alzheimer-Typ	9
1.1.1	Bedeutung und Symptomatik	9
1.1.2	Neuropathologische Veränderungen	10
1.1.3	Braak Klassifikation der DAT	10
1.1.4	Ätiologie	11
1.2	Apolipoprotein E	12
1.3	Apolipoprotein D	18
2	Aufgabenstellung	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Hirnproben	24
3.2	Neuropathologische Stadieneinteilung der Alzheimer'schen Demenz nach Braak (Braak Klassifikation)	24
3.3	Bestimmung des Apolipoprotein E-Genotyps	25
3.4	Analyse des Apolipoproteingehalts	25
3.4.1	Fallauswahl	25
3.4.2	Präparation der Gewebshomogenate	28
3.4.3	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	29
3.4.4	Western Blot Analyse	29
3.5	Statistische Auswertung	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Einfluss der postmortalen Verzögerung auf den Apolipoproteingehalt	32
4.2	Apolipoproteinbestimmung in hippokampalen Gewebshomogenaten	34

4.2.1	Apolipoprotein E	34
4.2.2	Apolipoprotein D	41
4.3	Einfluss anderer Faktoren	46
4.3.1	Gesamtproteingehalt	46
4.3.2	Geschlecht	46
4.3.3	Alter	47
5	Diskussion	52
5.1	Apolipoprotein E	52
5.1.1	Eigene Ergebnisse im Vergleich zu vorliegenden Daten	52
5.1.2	Was können die unterschiedlichen ApoE-Spiegel für die Entwicklung der DAT bedeuten?	55
5.2	Apolipoprotein D	58
5.2.1	Eigene Ergebnisse im Vergleich zu vorliegenden Daten	58
5.2.2	Welche Rolle könnte ApoD bei der Entwicklung der DAT spielen?	60
5.3	Wie könnten die Veränderungen von ApoE und ApoD zusammenhängen?	62
5.3.1	Cholesterinrecycling	62
5.3.2	Oxidativer Stress	62
6	Schlussfolgerung	64
7	Zusammenfassung	65
8	Literaturverzeichnis	67

## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	beta-Amyloid
APOE/ApoE	Apolipoprotein E Gen/Protein
APOD/ApoD	Apolipoprotein D Gen/Protein
BA	Brodmann Areal
CA	cornu ammonis
CAA	zerebrale Amyloidangiopathie
CETP	Cholesterinester Transfer Protein
(S)DAT	(Senile) Demenz vom Alzheimer-Typ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Entorhinale Kortexläsion
ES	externer Standard
HMG-CoA	$\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl-glutary-Coenzym A
IR	Immunoreaktivität
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase
min	Minuten
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NFT	neurofibrillary tangles
NFV	Neurofibrilläre Veränderungen
(SDS)-PAGE	(Sodiumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PNS	Peripheres Nervensystem
ROD	Relative Optische Densität
SP	senile Plaques
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Demenz vom Alzheimer-Typ

### 1.1.1 Bedeutung und Symptomatik

Demenzielle Erkrankungen sind in den Industriestaaten ein zunehmendes Problem, das viel Leid für die Betroffenen mit sich bringt und zu einer erheblicher Belastung der Gesellschaft führt. Prävalenz und Inzidenz steigen mit dem Alter stark an. Bei den über 65jährigen verdoppelt sich die Zahl der Erkrankten etwa alle fünf Altersjahre. Die Prävalenzrate beträgt hier im Mittel 7,2%. Das entspricht derzeit etwa 1 Million an einer Demenz erkrankten Menschen unter den über 65jährigen in Deutschland<sup>19</sup>. Die Demenz vom Alzheimer-Typ ist hierbei die häufigste Ursache.

Im Jahre 1906 beschrieb Alois Alzheimer am Fall der Patientin Auguste D. erstmals die präsenile Form der später nach ihm benannten Demenz<sup>3</sup>. Unter dem Namen Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT) werden heute sowohl die präsenile (early-onset: Beginn vor dem 65. Lebensjahr) als auch die senile (SDAT, late-onset: Beginn nach dem 65. Lebensjahr) Form der Alzheimer'schen Erkrankung zusammengefasst<sup>78</sup>.

Das klinische Bild der DAT ist gekennzeichnet durch schleichend einsetzende Gedächtnis- und Merkfähigkeitsstörungen, häufig begleitet von einer depressiven Symptomatik. Später treten Orientierungs- und Wortfindungsstörungen, paranoide Denkinhalte sowie eine Desynchronisation des Schlaf-Wach-Rhythmus, häufig verbunden mit Ruhelosigkeit, hinzu. Die Persönlichkeit bleibt lange erhalten, auch neurologische Symptome treten nicht regelmäßig und erst spät auf. Die Symptomatik verschlechtert sich in den meisten Fällen allmählich über viele Jahre und führt zu zunehmender Pflegebedürftigkeit. Die Symptomatik und das neuropathologische Bild der präsenilen und der senilen Form unterscheiden sich nicht.

Noch immer gibt es keine kausale Therapie.

### **1.1.2 Neuropathologische Veränderungen**

Histopathologisch sind die DAT gekennzeichnet durch die primär intrazelluläre Formation neurofibrillärer Veränderungen (NFV), die extrazelluläre Anhäufung von Amyloid und dem fortschreitenden Verlust von Synapsen und Neuronen. Die NFV sind charakterisiert als pathologisch aggregierte Filamente, deren Hauptbestandteil hochphosphorilierte Formen des Mikrotubuli stabilisierenden Proteins Tau sind <sup>45</sup>. Hierbei unterscheidet man Neuropilfäden (neuropil threads; NT) in den peripheren Dendritenabschnitten, Fibrillenbündel in den Somata (neurofibrillary tangles; NFT) und Amyloid enthaltende Konglomerate neuritischer Degenerationsprodukte (Neuritische Plaques). Diese pathologischen Tau-Aggregate sind gegenüber Degradationsvorgängen sehr widerstandsfähig und bleiben nach Absterben der Neurone über sehr lange Zeit als extrazelluläre Fibrillen (ghost tangles) im Neuropil bestehen.

Amyloidablagerungen bestehen aus einem 39 bis 43 Aminosäuren langen Proteinfragment, das Aggregate mit einer  $\beta$ -Faltblattstruktur ausbilden kann (A $\beta$ ). Es wird proteolytisch abgespalten <sup>18,148</sup> vom sogenannten Amyloid Precursor Protein, einem transmembranären Protein, dessen Funktion bisher unklar ist <sup>64</sup>. A $\beta$  ist der Hauptbestandteil seniler Plaques (SP) und findet sich als Amyloidablagerung in der Wandung von Blutgefäßen als zerebrale Amyloidangiopathie (CAA).

Keine dieser Veränderungen ist spezifisch für die DAT oder konnte als direkt ursächlich für den Synapsen- und Zellverlust bewiesen werden. Das Ausmaß der NFV korreliert besser mit dem Schweregrad der kognitiven Defizite als die Anzahl der SP, die engste Korrelation findet sich hier jedoch zum Synapsenverlust <sup>7,76</sup>.

### **1.1.3 Braak Klassifikation der DAT**

SP und NFV entwickeln sich im Verlauf der DAT schon Jahre bis Jahrzehnte, bevor kognitive Defizite auffällig werden <sup>98</sup>. Insbesondere die Ausbreitung der NFV folgt einem charakteristischen Verteilungsmuster, anhand dessen Braak und Braak eine neuropathologische Klassifikation der DAT <sup>24</sup> erarbeitet und auf die klinische Symptomatik bezogen haben <sup>26</sup>. Besonders vulnerabel für die Tau-Pathologie sind transentorhinaler und entorhinaler Kortex. Hier treten zuerst NFV auf (Transentorhinale Stadien = Braak NFV I und II). Klinisch zeigen sich in diesen Stadien keine Symptome. Bei Fortschreiten der pathologischen Veränderungen werden mehr und mehr limbische

Areale einbezogen, die Zahl der NFV im medialen Temporallappen nimmt zu (Limbische Stadien = Braak NFV III und IV). Klinisch können hier erste kognitive Defizite nachweisbar werden. Schließlich weitet sich die Tau-Pathologie auf die Assoziations- und zuletzt auf die Projektionsareale des Isokortex aus (Isokortikale Stadien = Braak NFV V und VI). Klinisch entsprechen diese Stadien einer manifesten Demenz.

Die Verteilung der Amyloidablagerungen erscheint weniger aussagekräftig bezüglich einer neuropathologischen Stadieneinteilung der DAT. Die Prädilektionsstelle für Amyloidablagerungen ist der Isokortex. Die Hippokampusformation bleibt vorerst frei von A $\beta$  (Braak-Stadium A $\beta$  A). Später finden sich SP in sämtlichen isokortikalen Assoziationsarealen, lediglich die primären sensorischen und motorischen Areale bleiben frei. Auch im Hippokampus sind wenige Amyloidablagerungen nachweisbar (Braak-Stadium A $\beta$  B). Das Fortschreiten der pathologischen Veränderungen ist vor allem durch den Befall der primären isokortikalen Areale gekennzeichnet. Die Hippokampusformation zeigt unverändert eher wenige SP. Neben dem zerebralen Kortex zeigen nun auch subkortikale Strukturen und das Zerebellum Amyloidablagerungen (Braak-Stadium A $\beta$  C).

Die neuropathologische Stadieneinteilung der DAT nach Braak liegt dieser Arbeit zugrunde.

#### **1.1.4 Ätiologie**

In etwa 5% aller Fälle tritt die Demenz familiär mit autosomal dominantem Erbgang und fast 100% Penetranz auf. Erkrankungsbeginn ist meist vor dem 65. Lebensjahr. Bisher wurden drei Gene identifiziert, die diesen familiären Formen der DAT zugrunde liegen: Amyloid Precursor Protein auf Chromosom 21, Presenilin 1 auf Chromosom 14 und Presenilin 2 auf Chromosom 1.

Die Mehrzahl der Fälle hat jedoch eine komplexe Ätiologie, der genetische und Umwelt bedingte Faktoren zugrunde liegen. Diese „sporadische“ Form der DAT ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Eine Mutation im Apolipoprotein E-Gen (APOE) auf Chromosom 19 (19q32.2) wurde als der bedeutsamste genetische Risikofaktor für die Entstehung einer DAT identifiziert (Meta-Analyse bei <sup>119</sup>). Die Angaben darüber, welchen Anteil der APOE-Polymorphismus an der totalen genetischen Varianz des DAT-Risikos hat, schwanken jedoch (s.u.). Auch scheint der Einfluss dieses

Risikofaktors nicht in allen Völkern gleich zu sein <sup>119</sup>. Neben dem APOE-Polymorphismus wurden auch andere mögliche Risikogene identifiziert (Übersichtsarbeit bei <sup>117</sup>). Bei Afro-Amerikanern, die zwar ein höheres Risiko haben, an einer DAT zu erkranken als Amerikaner europäischer Abstammung, bei denen jedoch insbesondere bei der senilen DAT eine deutlich schwächere Assoziation zum APOE-Polymorphismus gefunden wird, wurde eine Assoziation der DAT mit Mutationen im Apolipoprotein D-Gen auf Chromosom 3 (3q26.2-3qter) beschrieben <sup>32</sup>. Eine finnische Studie fand eine Assoziation von bestimmten APOD-Haplotypen mit einem erhöhten Risiko an der präsenilen Form der DAT zu erkranken <sup>54</sup>. Das APOD-Gen ist in enger Nachbarschaft zur 3q25-26-Region, die bereits früher mit einem erhöhten DAT-Risiko in Verbindung gebracht wurde <sup>110</sup>.

## 1.2 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (Protein: ApoE; Gen: APOE) ist ein Glykoprotein mit 299 Aminosäuren. Das aus der primären Aminosäuresequenz kalkulierte Molekulargewicht beträgt 34 kDa. Das tatsächliche Molekulargewicht hängt von der Glykosylierung ab und liegt zwischen 34 und 39,5 kDa. ApoE wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert. Im Blut wird es in Assoziation gefunden mit Chylomikronen, Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL) und in diskoidalen Lipoproteinen hoher Dichte (HDL<sub>2</sub>), die noch arm sind an Cholesterinestern. Es gehört zu den austauschbaren Apolipoproteinen und hat einen hohen Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturen. ApoE wird auch im Gehirn synthetisiert und ist Bestandteil der Lipoproteine des Liquors. Es ist das nach der bisherigen Erkenntnis wichtigste Apolipoprotein des zentralen Nervensystems (ZNS) <sup>23,106</sup>. Das Protein spielt eine wichtige Rolle in der Cholesterinhomeostase des Gehirns und ist verantwortlich für die Mobilisierung und Verteilung von Cholesterin während neuronaler Umbauprozesse <sup>155</sup>. Das aminoternale Ende (Aminosäure 1-191) bildet eine globuläre Struktur, die die Rezeptorbindungsstelle enthält. Das C-terminale Ende (Aminosäure 216-299) ist helikal und beinhaltet die Lipoproteinbindungsfunktionen <sup>154</sup>. Auch A $\beta$  wird am C-terminalen Ende gebunden <sup>135</sup>. Das humane APOE-Gen liegt in drei verschiedenen Allelen vor: APOE  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 und  $\epsilon$ 4, die ko-dominant vererbt werden <sup>162</sup>. Es leiten sich drei Isoformen des Proteins ab, ApoE 2, ApoE 3 und ApoE 4, welche sich nur in zwei der 299 Aminosäurepositionen

unterscheiden<sup>153</sup>. ApoE 3 trägt in Position 112 Cystein und in Position 158 Arginin. ApoE 2 hat in beiden Positionen Cystein, während ApoE 4 in beiden Positionen Arginin trägt. Die Mutationen betreffen den für die Rezeptorbindung wichtigen Bereich des Proteins.

Der Besitz des APOE  $\epsilon$ 4-Allels wurde bereits 1993 als Risikofaktor für die Entstehung einer DAT identifiziert<sup>124,134</sup> und ist, abhängig auch von der Anzahl der vorliegenden Genkopien (ein oder zwei), assoziiert mit einem früheren Beginn der klinischen Symptomatik<sup>30</sup> und der DAT-assoziierten Neuropathologie<sup>100</sup> im Vergleich zu APOE  $\epsilon$ 3-homozygoten Individuen. Im Gegensatz dazu wurde der Besitz des APOE  $\epsilon$ 2-Allels bei der sporadischen Form der DAT als protektiv erkannt<sup>119</sup> und eine positive Korrelation zu Langlebigkeit beschrieben<sup>44,61</sup>.

Viele Studien beschäftigten sich mit dem möglichen Einfluss des APOE-Polymorphismus auf die Pathogenese der DAT (Übersichtsarbeiten bei<sup>107,123</sup>). Die Rolle von ApoE wurde hierbei im Zusammenhang mit der Isoform-abhängigen Interaktion des Proteins mit Tau<sup>37,58,116,133</sup> und A $\beta$ <sup>69,125,135,143</sup>, bei Veränderungen der Neurotransmission (cholinerge Dysfunktion)<sup>13</sup>, im Zusammenhang mit der Kalzium vermittelten Erregungsübertragung<sup>90,144,145,150</sup> und als Modulator in den Reaktionen auf oxidativen Streß<sup>29,62,97,112,113,137</sup> und der Immunantwort<sup>9,29</sup> diskutiert. Der entscheidende Pathomechanismus, der dem erhöhten Alzheimer-Risiko bei APOE  $\epsilon$ 4-Allelträgern zugrunde liegt, konnte bisher jedoch nicht aufgeklärt werden. In vielen Studien wurde belegt, dass der APOE-Polymorphismus einen bedeutenden genetischen Risikofaktor darstellt. Er ist jedoch weder eine notwendige noch eine hinreichende Bedingung für die Erkrankung. Die Angaben über den Anteil des APOE-Polymorphismus an der genetischen Varianz des Risikos, an einer DAT zu erkranken, schwanken. Der Anteil an der totalen Varianz wird auf 7 – 9% geschätzt<sup>151</sup>. Homozygote für APOE  $\epsilon$ 4 haben ein etwa elffach erhöhtes Risiko, an einer DAT zu erkranken, im Vergleich zum APOE  $\epsilon$ 3/3-Genotyp<sup>119</sup>. Die Geschwindigkeit der Progression der klinischen Symptomatik wie auch der neuropathologischen Veränderungen scheint nicht durch den APOE-Polymorphismus beeinflusst zu sein<sup>30,100</sup>.

Eine Hypothese, warum der APOE-Polymorphismus einen genetisch-bedingten Modifikator des Alzheimer-Risikos darstellt, die klinische Ausprägung einer DAT aber

nicht zwangsläufig bedingt, bezieht sich auf die Plastizität des Nervensystems. Mehrere Studien zeigten, dass ApoE in Abhängigkeit vom Genotyp und /oder von der Isoform, die Kapazität zur plastischen Reorganisation geschädigten Nervengewebes, z.B. nach Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Trauma, unterschiedlich beeinflusst<sup>72,79,121</sup>. In einer neuropathologischen Studie an Gehirnen von DAT-Patienten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die plastische Umorganisation in Reaktion auf die Neurodegeneration bei APOE ε4-Allelträgern beeinträchtigt ist<sup>4</sup>. Verschiedene neuropsychologische Studien untersuchten den Einfluss des APOE-Polymorphismus auf kognitive Funktionen. Die Daten sind hier nicht einheitlich (Übersicht bei<sup>94</sup>). Es wird aber deutlich, dass ältere nicht-demente APOE ε4-Allelträger in Teilbereichen der Gedächtnisleistung schlechter abschneiden als APOE ε3-homozygote Individuen<sup>118</sup> und die Gedächtnisleistung bei ihnen mit zunehmendem Alter schneller abnimmt<sup>157</sup>. Bei Patienten mit einer (wahrscheinlichen) SDAT fand sich nur in frühen Stadien der Erkrankung ein Einfluss des APOE-Polymorphismus auf kognitive Teilleistungen. In fortgeschritteneren Stadien gab es zwischen den Genotypen keine Unterschiede<sup>67</sup>.

Neben funktionellen, also qualitativen, Unterschieden der drei Isoformen könnten jedoch auch quantitative Unterschiede der Proteinverfügbarkeit im Gehirn bei der Pathogenese der DAT eine Rolle spielen.

In verschiedenen Studien wurde der ApoE-Gehalt in Hirnhomogenaten untersucht. Einige Gruppen fanden den Proteingehalt erniedrigt<sup>12,17,55,77,104,105,113,120,138</sup>, während andere keine Unterschiede<sup>52,112</sup> oder sogar einen erhöhten ApoE-Gehalt<sup>2,73</sup> bei Vorliegen einer DAT fanden. Daten zur Korrelation von ApoE-Gehalt und Genotyp sind in der Literatur ebenfalls widersprüchlich. Eine Übersicht über die in der Literatur vorliegenden Daten findet sich in Tab. 1.

**Tabelle 1:**  
**Verfügbare Literatur zum ApoE-Gehalt in Hirnhomogenaten**

**Abkürzungen:**

AD: DAT-Fälle, Ko: Kontrollfälle

# Autopsie bestätigt ohne Angabe der diagnostischen Kriterien.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0005$

§ Schwerpunkte der Studie waren Liquordaten und ApoD, die ApoE-Daten waren nicht eindeutig.

? Ergebnis wurde im Zusammenhang mit deutlich längerem post-mortalen Intervall in der Kontrollgruppe diskutiert.

‡ Keine statistischen Angaben.

**Quellenverzeichnis diagnostische Kriterien:**

1. Adolfsson, R. et al (1981) Prevalence of dementia in institutionalized Swedish old people: The work load imposed by caring for these patients. *Acta Psychiatr Scand* 63: 225-244
2. Alafuzoff, I. et al (1987) Histopathological criteria for progressive dementia disorders: Clinical-pathological correlation and classification by multivariate analysis. *Acta Neuropathologica*. 74: 209-225.
3. Folstein, M.F. et al (1975) „Mini-mental state“. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12 (3): 189 - 98.
4. Khachaturian, Z.S. (1985) Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*. 31, 545-548.
5. McKhann, G. et al (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurol* 34: 939-944
6. Mirra, S.S. et al (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease ( CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41: 479-486.
7. Pirttila, T. et al (1996) Apolipoprotein E (apoE) levels in brains from Alzheimer disease patients and controls. *Brain Res*. 722: 71-77.
8. Reisberg, B. et al (1982) The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry* 139: 1136-1139

Studie	Untersuchtes Hirnareal	Diagnostische Kriterien		Methode	n	ApoE-Gehalt in Abhängigkeit von		
		klinisch	neuro-pathologisch			Histopathologie		in Ko
						AD	Ko	
Bertrand, P. 1995. Brain Res Mol Brain Res 33: 174-178	Hippokampus	#	#	Western Blot, reduzierend	22	15	AD < Ko*	4/4 < 4/3 < 3/3 *
	Frontalkortex				11	AD ≥ Ko	4/4 < 4/3 < 3/3 *	
Terrisse, L. et al. 1998. J Neurochem 71: 1643-1650	Hippokampus	#	#	Western Blot, reduzierend/nicht-red.	22	15	AD < Ko*§	4/4 ≤ 4/3 ≤ 3/3
	Hippokampus Frontalkortex Temporalkortex Cerebellum	NINCD-ADRDA <sup>5</sup> Geriatric rating scale <sup>1</sup>	CERAD <sup>6</sup> NFT-/SP-Zählung, semi-quantitativ <sup>2</sup>	Western Blot, reduzierend	19	9	AD < Ko* AD < Ko* AD = Ko AD = Ko	keine Relation 4/4 = 4/3 = 3/3 nicht spezifiziert
Beffert, U. 1999. Brain Res 834: 87-94	Hippokampus	#	Khatchaturian <sup>4</sup>	ELISA	35	20	AD < Ko*	inverse
	Frontalkortex				49	26	AD ≤ Ko	Relation bestimmt
	Cerebellum				16	23	AD = Ko	nicht bestimmt
Petit-Turcotte, C. 2001. Neurobiol Disease 8: 953-63	Hippokampus	Global Deterioration Scale <sup>8</sup>	Khatchaturian <sup>4</sup>	ELISA	24	24	AD < Ko*	4/x < 3/3 *
	Frontalkortex				48	25	AD < Ko*	4/x = 3/3
Masliah, E. 1996. Prog Neurobiol 50: 493-503	Frontalkortex	#	#	Western Blot	29	12	AD < Ko*	4/x = 3/3 nicht spezifiziert
	Frontalkortex	#	CERAD <sup>6</sup>	Western Blot, reduzierend	23	13	AD = Ko	4/4 = 4/3 = 3/3
Pirttilä, T. 1996. Brain Res 722: 71-77	Frontalkortex	NINCD-ADRDA <sup>5</sup> MMS <sup>3</sup>	CERAD <sup>6</sup> NFT-/SP-Zählung, semi-quantitativ <sup>7</sup>	ELISA	24	19	AD < Ko****	keine Relation
	Temporalkortex				22	19	AD < Ko**	inverse Relation
	Cerebellum				18	18	AD > Ko**** <sup>7</sup>	keine Relation
Ramassamy, C. 1999. Free Radic Biol Med 27 (5/6): 544-553	Frontalkortex	NINCD-ADRDA <sup>5</sup>	CERAD <sup>6</sup> Khatchaturian <sup>4</sup>	ELISA	28	10	AD = Ko	4/4 ≤ 4/3 ≤ 3/3
	Hippokampus				28	10	AD < Ko*	nicht bestimmt
Laws, S.M. et al 2002. Mol Psychiatry 7: 886-890	Frontalkortex	#	NINCD-ADRDA <sup>5</sup>	Western Blot	20	40	AD > Ko****	4/4 > 4/3* ≥ 3/3 (Angaben in <sup>[4]</sup> )
	Cerebral-kortex				18	15	AD < Ko****	nicht spezifiziert
Aizawa, Y. 1997. Brain Res 768: 208-214	Nicht genannt	#	#	Western Blot	?10	?3	AD > Ko‡	nicht spezifiziert

Verschiedene immunohistochemische Studien<sup>2,8,16,33,34,43,47,51-53,55,66,75,82,91,95,114,122,127,128,147,158,161</sup> zeigten ApoE-Immunoreaktivität (IR) in Kontroll- und DAT-Hirnen in Verbindung mit SP, CAA, NFT und NT. Eine im Vergleich zu Kontrollhirnen erhöhte ApoE-IR wurde bei Vorliegen einer DAT in Astrozyten, insbesondere in aktivierten Astrozyten, und in einigen Neuronen mit oder ohne Tau-Pathologie gefunden<sup>2,8,16,34,50,51,53,91,114,128,159,161</sup>, während andere Untersucher<sup>47,55,82</sup> eine allgemein verminderte ApoE-IR im Neuropil und in Neuronen in DAT-Hirnen fanden. In den immunohistologischen Studien konnte keine Korrelation zwischen der Intensität der ApoE-IR und dem APOE-Genotyp gefunden werden<sup>2,47,51,52,95,114,127</sup> bis auf Gearing et al<sup>43</sup>, die mehr ApoE-immunoreaktive Plaques in der Großhirnrinde APOE ε4-homozygoter DAT-Hirne fanden.

Die Studien sind nur bedingt vergleichbar, da beispielsweise unterschiedliche Hirnareale untersucht oder unterschiedliche Diagnosekriterien herangezogen wurden. Verschiedene Studien untersuchten auch die APOE-Expression auf der mRNA-Ebene. Ein erhöhter ApoE mRNA-Gehalt wurde bei Vorliegen einer DAT im Hippokampus und im Frontalkortex<sup>34</sup>, im Temporalkortex<sup>160</sup> oder nur im CA1-Sektor des Ammonshorns<sup>163</sup> gefunden. Andere Untersucher<sup>159</sup> fanden jedoch keine Unterschiede der ApoE-Expression im Hippokampus und im Frontalkortex.

Hinsichtlich der Transkriptionsaktivität des APOE-Gens fand sich eine Assoziation zwischen verschiedenen Polymorphismen des proximalen APOE-Promotors mit einem erhöhten Risiko, an einer DAT zu erkranken. Der Einfluss der Promoterpolymorphismen wurde als unabhängig vom Risiko, das mit dem Besitz eines APOE ε4-Allels verbunden ist, erkannt. Für einige dieser Polymorphismen wurde jedoch ein partielles Kopplungsungleichgewicht zum APOE ε2/3/4-Polymorphismus beschrieben. Ein erhöhtes Risiko, an einer DAT zu erkranken, war assoziiert mit einer vermehrten Expression von APOE auch für die homozygoten APOE ε3-Allelträger (Übersichtsarbeit bei<sup>27,117</sup>).

Die differierenden Ergebnisse der aufgeführten Untersuchungen in Hirngewebshomogenaten (Western-Blot bzw. ELISA und Northern-Blot) und am Gewebsschnitt (Immunohistochemie und In-situ-Hybridisierung) zum ApoE-Gehalt sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene könnten dadurch bedingt sein, dass die APOE-Expression im adulten Gehirn Regulationsmechanismen unterliegt, die abhängig sind von Ausmaß und Art (akut oder chronisch) einer Schädigung, vom Typ der

zellulären Reaktion in einem bestimmten Hirnareal und davon, wie effektiv Mechanismen der plastischen Reorganisation in einem betroffenen Hirnareal Neuronenverlust kompensieren können. Wenn man eine Regulation der ApoE-Expression im Zusammenhang mit plastischen Umbauvorgängen im Gehirn annimmt, sollte eine mögliche Abhängigkeit dieser Antwort vom APOE-Genotyp untersucht werden. Hier könnte eine Erklärung dafür liegen, warum ein APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger ein höheres Risiko hat, eher an einer DAT zu erkranken, die Erkrankung dann aber im weiteren Verlauf mit gleicher Geschwindigkeit fortschreitet wie bei APOE  $\epsilon$ 3-homozygoten DAT-Patienten.

### 1.3 Apolipoprotein D

Neben ApoE, dem wichtigsten Cholesterintransporter des Gehirns, wurden auch andere Apolipoproteine, die im ZNS exprimiert werden, im Zusammenhang mit der Pathogenese der DAT diskutiert.

Apolipoprotein D (Protein: ApoD; Gen: APOD) wurde als Plasmaprotein als Bestandteil der HDL und VLDL beschrieben<sup>80</sup>. Es wurde in Assoziation mit der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT) und mit dem Cholesterinester-Transfer-Protein (CETP)<sup>41,126</sup> gefunden und darum als Bestandteil eines Komplexes verstanden, der Cholesterin / Cholesterinester aus den peripheren Geweben zur Leber transportiert<sup>35</sup>. Ein großer Teil des Plasma-ApoD scheint jedoch in Form enzymfreier Komplexe mit ApoA-I und ApoA-II und ApoB100 vorzuliegen<sup>20,36</sup>. Insbesondere die frühen Studien zur Verteilung der Apolipoproteine im Plasma (und auch im Liquor) sind jedoch schwierig zu bewerten, da die zur Separation der Lipoproteinklassen angewandte Ultrazentrifugation zu einem Verlust an Apolipoproteinen führt.

ApoD ist ein 169 Aminosäuren langes Glykoprotein. Das aus der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht beträgt 22,7 kDa, das apparente Molekulargewicht ist aufgrund der Glykosylierung deutlich höher (27 – 33 kDa). ApoD hat kaum strukturelle Gemeinsamkeiten mit den anderen Apolipoproteinen. Im Gegensatz zu diesen hat es wenig  $\alpha$ -helikale Strukturen. ApoD besteht aus einer achtsträngigen  $\beta$ -Faltblattstruktur, die wie ein kleines Fass geformt ist und im Inneren eine hydrophobe Bindungsstelle enthält.

ApoD wird in vielen humanen Geweben exprimiert, mit höchstem mRNA-Nachweis in

den Nebennieren, in der Plazenta und im Nervensystem<sup>35</sup>. Wie ApoE entstammt auch ApoD im Liquor der Synthese im ZNS. Im Unterschied zu anderen Apolipoproteinen wird ApoD in Leber und Dünndarm nur gering exprimiert.

ApoD wurde, teilweise unabhängig von seiner Beschreibung als Plasmaapolipoprotein, in ganz unterschiedlichen Körperflüssigkeiten nachgewiesen. Als Gross Cystic Disease Fluid Protein 24 (GCDFP-24)<sup>6,49,102</sup> wurde es in sehr hohen Konzentrationen in Zystenflüssigkeit bei der Zystischen Mastopathie, einer prinzipiell gutartigen, aber u.U. präkanzerogenen Erkrankung der (weiblichen) Brust, gefunden. Als Apocrine Secretion Odor-Binding Protein 2 (ASOB2)<sup>164</sup> wurde ApoD im Sekret der Duftdrüsen beschrieben. Auch in der Tränenflüssigkeit, die unterschiedliche Lipide enthält, wurde ApoD nachgewiesen<sup>56</sup>. Im Gegensatz zum Plasma wurde ApoD hier nicht in einem Komplex mit der LCAT oder ApoA-I gefunden; weder LCAT noch ApoA-I wurden in der Tränenflüssigkeit nachgewiesen<sup>56</sup>. Als Syntheseort wurde in dieser Arbeit die Glandula lacrimalis bestimmt, die zumindest einen Teil der Lipide der Tränenflüssigkeit sezerniert. Darüber hinaus wurde ApoD noch als Perilymph Acidic Protein 30 (AP30)<sup>136</sup> in der Perilymphe des Mittelohres beschrieben.

Strukturell ist ApoD ein Mitglied der Lipocalin-Proteinfamilie<sup>35</sup>, die multifunktionale Transporter kleiner, hydrophober Liganden umfasst<sup>40</sup>. Neben Cholesterin resp. Cholesterinestern wurden andere Liganden für ApoD diskutiert, aber kein Ligand konnte bisher als der „einzig wahre“ physiologische Ligand bewiesen werden, noch konnte ein Rezeptor für ApoD identifiziert werden. Eine Studie identifizierte Arachidonsäure als den Liganden mit der höchsten Affinität zu ApoD<sup>88</sup>. Aber ApoD bindet ebenfalls Steroide, insbesondere Pregnenolon, mit hoher Affinität<sup>74,102</sup>. Eine andere Studie demonstrierte, dass ApoD Hämabbauprodukte wie Bilirubin ebenfalls bindet und mit höherer Affinität als Cholesterin<sup>103</sup>. Neben seiner vermuteten Transportfunktion wurde ApoD auch mit einer chymotrypsinartigen Proteaseaktivität in Brustzystenaspirat in Verbindung gebracht<sup>65</sup>.

Eine lokale Bedeutung wurde für dieses Protein postuliert<sup>111</sup> und die unterschiedlichen Liganden, die man in unterschiedlichen Geweben mit diesem Protein assoziiert gefunden hat, lassen eine eher komplexe Rolle, die vom jeweiligen Milieu abhängt, vermuten.

ApoD wurde im Zusammenhang mit unterschiedlichen Schädigungen untersucht. Die sehr umfangreiche Literatur, die sich mit ApoD im Zusammenhang mit Zystischer

Mastopathie, Brustkrebs und Erkrankungen der Prostata befasst, soll nicht Gegenstand dieser Arbeit sein. Im peripheren Nervensystem (PNS) wurden bei Läsionsstudien an der Ratte gewaltige ApoD- und ApoE-Anstiege in Nerven in der Phase der Regeneration nach Durchtrennung gefunden<sup>22,132</sup>. Innerhalb des ZNS beschrieben verschiedene Arbeitsgruppen einen ApoD-Anstieg im Tierversuch in Reaktion auf eine Schädigung<sup>42,87,101,139,146</sup>. Hippokampales ApoD war erhöht nach Kainatsäurebehandlung<sup>87,101</sup> und nach Läsion des entorhinalen Kortex (ECL)<sup>139</sup>, die die Hauptafferenz zum Hippokampus zerstört.

Aufgrund der vermuteten Rolle in der Nervenregeneration untersuchten verschiedene Gruppen ApoD im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen. Zwei Studien fanden keine Unterschiede im Vergleich DAT gegen Kontrolle im Western Blot im frontalen (Brodmann Areal (BA) 10)<sup>52</sup> und im temporalen<sup>63</sup> Kortex. Kalman et al<sup>63</sup> beschrieben aber eine stärkere ApoD-IR im temporalen und parietalen Kortex bei den DAT-Fällen als bei den Kontrollen, die jedoch nicht quantitativ auswertbar war. Diese Studie beschrieb eine starke ApoD-IR in Pyramidenzellen, die Zeichen einer granulovakuolären Degeneration zeigen. Eine weitere Studie zeigte eine positive Korrelation der ApoD-IR in entorhinalem Kortex und CA1-Sektor des Hippokampus mit der numerischen Dichte von NFT<sup>14</sup>. Diese Studie zeigte auch eine erhöhte ApoD mRNA-Expression in zwei DAT-Fällen im Vergleich mit zwei Kontrollen. In hippokampalen Gewebshomogenaten wurde bei Vorliegen einer DAT ein erhöhter ApoD-Gehalt gefunden<sup>138</sup>. Diese Studie untersuchte auch Liquor von DAT-Patienten und von Patienten mit verschiedenen anderen neurologischen Erkrankungen und fand ApoD und ApoE, wenn auch weniger drastisch, im Liquor bei Vorliegen einer neurologischen Erkrankung generell erhöht. Die Studie konnte aber nicht unterscheiden, ob dieser Befund auf einer erhöhter intrathekalen Produktion der Apolipoproteine oder aber auf Störungen der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen ist. Reindl et al<sup>115</sup> konnte zeigen, dass bei Patienten mit Multipler Sklerose die intrathekale ApoD-Produktion erhöht ist, während bei demyelinisierenden Erkrankungen des PNS und auch bei infektiösen Erkrankungen des ZNS die erhöhten Liquor-ApoD-Werte auf eine gestörte Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen sind. Eine weitere Arbeit<sup>141</sup> zeigte bei Vorliegen einer DAT einen erhöhten ApoD-Gehalt in frontalen Hirnhomogenaten (BA 9). Einige der aufgeführten Studien untersuchten auch den Einfluss des APOE ε4-Allels auf den ApoD-Gehalt, aber die publizierten Ergebnisse waren auch nicht einheitlich. Die verfügbare Literatur ist in Tab. 2 zusammengestellt.

**Tabelle 2:****Verfügbare Literatur zur ApoD-Expression im Alter und bei Vorliegen einer DAT****Abkürzungen:**

AD: DAT-Fälle, Ko: Kontrollfälle,

AKo: Ko > 65 Jahre, JuKo: Ko < 65 Jahre

SDAT/PSDAT: Senile/Präsenile Demenz vom Alzheimer-Typ

# Autopsie bestätigt ohne Angabe der diagnostischen Kriterien.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0005$

§ APOE  $\epsilon 4$ -Allelträger hatten höhere Braak-Stadien (NFV).

**Quellenverzeichnis diagnostische Kriterien:**

1. Braak, H. et Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol Berl 82: 239-259
2. Folstein, M.F. et al (1975) „Mini-mental state“. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res 12 (3): 189 – 98
3. McKhann, G. et al (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS- ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. Neurol 34: 939-944
4. Mirra, S.S. et al (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease ( CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. Neurology 41: 479-486

Studie	Untersuchtes Hirnareal	Diagnostische Kriterien		Methode	n		ApoD-Gehalt in Abhängigkeit von			
		klinisch	neuro-pathologisch		AD	Ko	Histopathologie		in Ko	
							AB	NFV		APOE ε4-Allel
Terrisse, L. 1998. J Neurochem 71: 1643-1650	Hippokampus	#	#	Western Blot, reduzierend/nicht-red.	27	19	AD > Ko**	nicht bestimmt	3/3 = 4/3 = 4/4	3/3 ≥ 4/3
	Liquor	NINCD-ADRDA <sup>3</sup> MMS <sup>2</sup>			41	11	AD > Ko****		3/3 > 4/3 > 4/4****	3/3 = 4/3
Harr, S.D. 1996. J Neurochem 66: 429-435	Frontalkortex	#	CERAD <sup>4</sup>	Western Blot, reduzierend	6	6	AD = Ko	nicht bestimmt		3/3 = 4/x
Thomas E.A. 2003. Biol Psychiatry 54: 136-141	Frontalkortex	#	NINCD-ADRDA <sup>3</sup>	ELISA	12SDAT 8PSDAT	40	AD > Ko SDAT = PSDAT	nicht bestimmt	3/3 = 4/3 = 4/4	3/3 = 4/x
	Temporalkortex Zerebraler Kortex, Cerebellum, Thalamus	#	CERAD <sup>4</sup>	Western Blot, reduzierend Immunhisto- chemie	9 9	7 12	AD = Ko AD > Ko (AKo > JuKo)	nicht bestimmt		nicht bestimmt
Belloir, B. 2001. J Neurosci Res 64: 61-69	Entorhinaler Kortex			Northern Blot	1	2	AD > Ko	nicht bestimmt III < VI		
	Frontal-, Temporalkortex	#	Braak Klassifikation <sup>1</sup>	In situ Hybridisation	2	2	AD > Ko	nicht bestimmt III < VI		
	Hippokampus, Entorhinaler Kortex			Immunhisto- chemie	5	9	AD > Ko	keine Relation		3/3 < 4/3**§
Navarro, A. 2003. Exp Neurol 184: 697-704	Zerebraler Kortex, Hippokampus	#	CERAD <sup>4</sup>	Immunhisto- chemie	12	0	nicht bestimmt	Kaum Kolokali- sation	nicht bestimmt	nicht bestimmt
	Striatum				10CAA					
Del Valle, E. 2003. J Histochem Cytochem 51 (10): 1285-1290	Zerebraler Kortex	Keine neurologischen Erkrankungen bekannt	#	Immunhisto- chemie + In situ Hybridisation	0	12AKo 8JuKo	(AKo > JuKo)	nicht bestimmt (ApoD erhöht in reaktiven Astrozyten)		nicht bestimmt

## 2 Aufgabenstellung

Unter Annahme der Hypothese, dass die ApoE-Expression im Zusammenhang mit plastischen Umbauvorgängen im ZNS reguliert wird, sollte eine mögliche Abhängigkeit der Verfügbarkeit des Proteins, sei es nun durch ein verändertes Expressionsmuster oder durch eine isoformabhängige Abbaukinetik, vom APOE-Genotyp untersucht werden. Da neben funktionellen Unterschieden der ApoE-Isoformen, auch die quantitative Verfügbarkeit des Proteins für die reparative Kapazität des Gehirns bei der neuroplastischen Antwort auf eine Schädigung von Bedeutung sein kann, sollte der ApoE-Gehalt in Abhängigkeit von der Schwere der DAT-assoziierten Veränderungen und vom Genotyp bestimmt werden.

Um herauszufinden, ob der ApoD-Gehalt mit der Entwicklung der NFV oder SP als neuropathologische Merkmale der DAT und/oder dem Besitz des APOE  $\epsilon$ 4-Allels als einem Hauptrisikofaktor für die Erkrankung korreliert, sollten neben Veränderungen im ApoE-Gehalt auch Veränderungen im ApoD-Gehalt bestimmt werden.

Untersucht werden sollte der Apolipoproteingehalt im Hippokampus, da dieser bei der Entwicklung einer Demenz früh und nachhaltig betroffen ist. Es erfolgte eine semiquantitative Bestimmung der Proteine im Western Blot, um den Apolipoproteingehalt in Hippokampus-homogenaten aus unterschiedlich schwer betroffenen Hirnen mit unterschiedlichen Genotypen vergleichen zu können.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Hirnproben**

Die Gehirne wurden bei Routineautopsien gewonnen (Institut für Pathologie und Neuropathologie der Charité, Humboldt-Universität, Berlin, und Institut für Neuropathologie, Johann Gutenberg Universität, Mainz).

Die Hirnhälften wurden median-sagittal getrennt. Die Hippokampusformation wurde beidseits herausgetrennt. Die rechte Hemisphäre und vorderer Hippokampus rechts wurden in 4% Formalin fixiert. Teile der linken Hemisphäre und die gesamte linke Hippokampusformation wurden in Scheiben mittels Isopentan schockgefroren.

#### **3.2 Neuropathologische Stadieneinteilung der Alzheimer'schen Demenz nach Braak (Braak Klassifikation)**

Für die Stadieneinteilung nach Braak und Braak<sup>24</sup> wurden Hippokampus (Uncus) mit angrenzendem temporalen Kortex (Area transentorhinalis/entorhinalis) und okzipitaler Kortex mit den Brodmann-Arealen 17 – 19 herangezogen. Die Gewebeblöcke wurden in Polyethylenglycol (PEG) eingebettet und 100µm dick geschnitten. Neurofibrilläre Veränderungen und senile Plaques wurden mittels Versilberung nach Gallyas und nach Campell/Switzer dargestellt<sup>24</sup>. Die Einteilung erfolgte nach Ausbreitung neurofibrillärer Veränderungen (NFV 0 = Keine pathologischen Veränderungen; I/II = Transentorhinale Stadien; III/IV = Limbische Stadien; V/VI = Isokortikale Stadien) und seniler Plaques (Aß 0 = Keine pathologischen Veränderungen; A = Initiale Ablagerungen im basalen Isokortex; B = Ablagerungen in allen isokortikalen Assoziationszentren, Hippokampusformation mäßig betroffen; C = Ablagerungen im gesamten Isokortex und Hippokampus). Darüberhinaus wurden eine Übersichtfärbung mit Hämatoxylin-Eosin und eine Lipofuszin färbung mit Aldehydfuchsin zur Sicherung der Diagnose sowie zum Ausschluss möglicher anderer Demenzformen/Pathologien angefertigt.

### **3.3 Bestimmung des Apolipoprotein E-Genotyps**

Aus der aus schockgefrorenem Hirngewebe extrahierten genomischen DNA wurde die den Polymorphismus tragende Sequenz auf Exon 4 des APOE-Gens mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (Primer: TAA gCT Tgg CAC ggC TgT CCA Agg und ACA gAA TTC gCC CCg gCC Tgg TAC AC) <sup>100</sup>. Der PCR-Ansatz enthielt in 50µl 0,5µg genomische DNA, je 50µM dATP, dCTP, dTTP und dGTP, 10µM Primer, 2,5U Taq Polymerase (Perkin Elmers Cetus, Emerville, USA), 2,125mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Dimethylsulfoxid in dem mit der Taq Polymerase bereitgestellten kommerziellen Puffer. Die PCR wurde in einem T3 Thermocycler der Firma Biometra nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Denaturierung 3min bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen

Denaturierung 1min bei 94°C

Annealing 1min bei 59°C

Extension 2min bei 72°C und

Amplifikationsabschluss 10min bei 72°C.

Je 10µl des PCR-Produktes wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, um die Amplifikatlänge (228 Basenpaare) zu überprüfen. Der Rest des PCR-Produktes wurde einem Restriktionsenzymverdau mit Cfo I (einem Isoschizomer von Hha I) unterzogen. Die DNA-Fragmente wurden mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) aufgetrennt unter Verwendung von 12,5% Polyacrylamid-Gelen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Anhand des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus erfolgte die Zuordnung der Proben zu den Genotypen.

### **3.4 Analyse des Apolipoproteingehalts**

#### **3.4.1 Fallauswahl**

Für die Studie wurden 91 Gehirne nach APOE-Genotyp und neuropathologischem Befund entsprechend der Stadieneinteilung nach Braak ausgewählt. APOE ε4-Allelträgern wurden nach Alter, Geschlecht und Braak-Stadium passende APOE ε3/3 zugeordnet, wobei der Schwerpunkt hierbei auf der Ausbreitung der neurofibrillären Veränderungen lag.

Da die Fälle mit ausgeprägten neuropathologischen Veränderungen (Braak-Stadien

NFV III-VI) durch dieses Zuordnungsverfahren signifikant älter waren als solche ohne, wurden zusätzlich 13 APOE ε3-homozygote Fälle höheren Lebensalters mit keinen oder geringen pathologischen Veränderungen (Alter: 76 - 89 Jahre, Braak-Stadien NFV 0 – II, Aβ 0 – A) analysiert.

**Tabelle 3:**  
**Charakteristik der verwendeten Fälle: ApoE**

	<b>n, gesamt</b>	<b>n, nach APOE Genotyp</b>				
<b>Braak Stadium: NFV</b>		<b>ε 3/3</b>	<b>ε 4/2</b>	<b>ε 4/3</b>	<b>ε 4/4</b>	<b>ε 4/x</b>
<b>0</b>	14	4 (+4)	1	5		6
<b>I/II</b>	39	26	6	7		13
<b>III/IV</b>	25	14	3	7	1	11
<b>V/VI</b>	18	10	1	4	3	8
<b>Braak Stadium: Aβ</b>	(Einteilung fehlt für einen Fall.)	<b>ε 3/3</b>	<b>ε 4/2</b>	<b>ε 4/3</b>	<b>ε 4/4</b>	<b>ε 4/x</b>
<b>0</b>	38	24 (+2)	3	9		12
<b>A</b>	14	10 (+1)	1	2		3
<b>B</b>	13	6	3	4		7
<b>C</b>	30	14	4	8	4	16
<b>n, gesamt (alle Braak Stadien)</b>	96	58	11	23	4	38
<b>Alter (Jahre ± SD)</b>	71 ± 11	72 ± 11				70 ± 12
<b>Geschlecht (weiblich/männlich)</b>	26/70	16/42				10/28
<b>Post-mortales Intervall (Stunden ± SD)</b>	32 ± 18	30 ± 18				35 ± 19

**Tabelle 4:**  
**Charakteristik der verwendeten Fälle: ApoD**

	n, gesamt	n, nach APOE Genotyp				
<b>Braak Stadium: NFV</b>		$\epsilon$ 3/3	$\epsilon$ 4/2	$\epsilon$ 4/3	$\epsilon$ 4/4	$\epsilon$ 4/x
<b>0</b>	14	4 (+4)	1	5		6
<b>I/II</b>	47	26 (+8)	6	7		13
<b>III/IV</b>	25	14	3	7	1	11
<b>V/VI</b>	18	10	1	4	3	8
<b>Braak Stadium: AB</b>	(Einteilung fehlt für einen Fall.)	$\epsilon$ 3/3	$\epsilon$ 4/2	$\epsilon$ 4/3	$\epsilon$ 4/4	$\epsilon$ 4/x
<b>0</b>	43	24 (+7)	3	9		12
<b>A</b>	15	10 (+2)	1	2		3
<b>B</b>	14	5 (+2)	3	4		7
<b>C</b>	31	14 (+1)	4	8	4	16
<b>n, gesamt (alle Braak Stadien)</b>	104	66	11	23	4	38
<b>Alter (Jahre <math>\pm</math> SD)</b>	72 $\pm$ 11	73 $\pm$ 11				70 $\pm$ 11
<b>Geschlecht (weiblich/männlich)</b>	30/74	20/46				10/28
<b>Post-mortales Intervall (Stunden <math>\pm</math> SD)</b>	32 $\pm$ 18	30 $\pm$ 18				35 $\pm$ 19

Insgesamt wurden 104 Fälle mitteleuropäischer Herkunft ohne bekannte andere neurologische oder psychiatrische Erkrankungen als DAT in diese Studie eingeschlossen. Die Charakteristik der Fälle ist zusammengefasst in Tab. 3 (ApoE) und Tab. 4 (ApoD).

Humane Hirnproben (aus dem Temporallappen) wurden bei Epilepsie-Operationen zur Verfügung gestellt (Klinik für Neurochirurgie der Charité). Diese Proben wurden zerteilt und jeweils ein Teil sofort und der andere nach Lagerung für 24h bei 4°C über Isopentan Schock gefroren. Diese Hirnproben wurden zur Untersuchung des Einflusses der postmortalen Verzögerung auf die Proteinkonzentration herangezogen und wie die übrigen analysiert.

Die Patienten gaben ihre Einwilligung zur wissenschaftlichen Studie an dem entfernten Gewebe.

Die vorliegende Studie wurde entsprechend der Deklaration von Helsinki und den Richtlinien der Ethikkommission der Charité durchgeführt.

### **3.4.2 Präparation der Gewebshomogenate**

Eine ca. 5mm starke Scheibe des mittleren Hippokampus (Höhe der Corpora geniculata) ohne den entorhinalen Kortex wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Das Gewebepulver wurde in vorgekühltem Extraktionspuffer I (50mM Tris/HCl ph 7,4; 1mM EDTA; 1mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 150mM NaCl; 0,5% Triton X100; Complete® Protease-Inhibitor-Cocktail, Boehringer-Mannheim, Germany) unter Verwendung eines motorisierten Rotor/Stator-Homogenisators homogenisiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben einer differentiellen Zentrifugation bei 4°C unterzogen: 10min, 3000 x g und 20min, 20000 x g. Die Überstände und Pellets wurden gesammelt und bei - 80°C gelagert.

Um möglicherweise gebundene Apolipoproteine aus der Pelletfraktion zu lösen, wurden beide Pelletfraktionen einem weiteren Extraktionsschritt unterzogen. Beide Pellets wurden durch Vortexen in Extraktionspuffer II (50mM Tris/HCl ph 7,4; 0,5% Triton X100; 1% SDS) gelöst, für 10min auf 95°C erhitzt, auf Eis gestellt und für 15min bei 4°C mit 1000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bei - 80°C gelagert. Bei den meisten Proben blieb nach der zweiten Extraktion kaum Pellet übrig.

Der Überstand der ersten Extraktion wird als Präparation 1 (Präp 1) bezeichnet, der Überstand der Pelletextraktion als Präparation 2 (Präp 2).

### 3.4.3 Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Der Gesamtproteingehalt wurde mittels BCA Protein Assay Reagent Kit®, Pierce, USA, nach den Angaben des Herstellers in Mikrotiterplatten bestimmt. Die Methode beruht auf photometrischer Messung eines Bicinchoninsäure - Cu<sup>1+</sup> - Komplexes nach Biuret-Reaktion. Alle Proben wurden dreifach bestimmt und der Mittelwert als Gesamtproteinkonzentration der Untersuchung zugrunde gelegt.

### 3.4.4 Western Blot Analyse

Die Proben wurden mittels Sodiumdodecylsulfat(SDS)-PAGE unter Verwendung von 15% Polyacrylamidgelen unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt<sup>71</sup>. Einander zugeordnete Fälle wurden auf nebeneinander liegenden Bahnen analysiert. Zwei Hirnhomogenate, die nach dem gleichen Protokoll extrahiert worden waren (Präp 1), wurden als externer Standard (ES) auf jedes einzelne Gel aufgetragen. Eine angefärbte Molekulargewichtsleiter (Rainbow™ Coloured protein molecular weight markers, Amersham Pharmacia Biotech, UK) wurde ebenfalls mit aufgetragen. Für ApoE war das Antigen verfügbar (Recombinantes humanes ApoE, Panvera) und wurde bei einigen Gelen mit aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen (Immobilon-P, Millipore, USA) geblottet. Die Membranen wurden 1h bei Raumtemperatur in TBST (20mM Tris/HCl ph 7,6; 150mM NaCl; 0,1% Tween) gewaschen. Für den immunologischen ApoD-Nachweis wurde 10% Magermilchpulver zugesetzt. Nach dem Blockieren wurden die Membranen bei 4°C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 5 aufgelistet. Nach dem Waschen wurden die Membranen für 2h bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper (s. Tab. 5) inkubiert. Die immunoreaktiven Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz (Meerrettichperoxidase/Wasserstoffperoxid katalysierte Oxidation von Luminol) detektiert (Western Blot Chemiluminescence Reagent Renaissance® NEL 102, NEN™ Life Science Products, USA; Hyperfilm™ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, UK). Die entwickelten Filme wurden mit einem Epson Expression™ 1680 Pro Densitometer (Epson, Japan) gescannt. Die Proteinbanden wurden als Relative optische Densität (ROD) (einheitsfrei) mit der frei erhältlichen NIH-Image free software quantifiziert.

Alle Proben wurden mindestens dreifach bestimmt.

Unterschiedliche Probenverdünnungen wurden analysiert, um für jedes der bestimmten Apolipoproteine die optimale Gesamtproteinauftragsmenge, die eine lineare Signalentwicklung garantiert, zu bestimmen (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 5:**  
**Verwendete Antikörper**

<b>Analysiertes Protein</b>	<b>Gesamtprotein je Bahn</b>	<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
<b>ApoE</b>	Präp 1: 2µg Präp 2: 10µg	Ziegenantiserum gegen humanes apoE (CR9016G, Europa Bioproducts Ltd, UK) 1 : 5000 in TBST	Horse anti-goat IgG (Vector Laboratories Inc., USA) 1 : 10000 in TBST
<b>ApoD</b>	Präp 1: 5µg (Präp 2: 30µg)	Monoclonaler Mausantikörper (NCL-apo-D Novocastra Laboratories LTD.) 1 : 1500 in TBST/3% Magermilchpulver	Horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories Inc., USA) 1 : 5000 in TBST

### 3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse wurde in Excel und mit BIAS, einem PC-basierten Statistikprogramm <sup>1</sup>, durchgeführt.

Es wurden multiple Vergleiche durchgeführt unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests mit Alpha-Korrektur nach Holm. Ein Holm-korrigiertes  $p \leq 0,05$  ( $p^*$ ) wurde als statistisch signifikant angesehen.

Für Vergleiche zweier unabhängiger Gruppen wurde der zweiseitige Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test (signifikant:  $p \leq 0,05$ ) verwendet.

Um die Beeinflussung der Apolipoproteinwerte durch andere Faktoren als die DAT-assoziierten Veränderungen einschätzen zu können, wurde eine mögliche Korrelation der Apolipoproteinwerte zum Alter und zum postmortalen Intervall unter Annahme

einer einfachen linearen Regression berechnet (Grafische Darstellung in Excel, Partielle Korrelation in BIAS).

Für die Auswertung der Daten des Pilotversuchs zum Einfluss der postmortalen Verzögerung auf den Proteingehalt der Proben wurde der Student t-Test verwendet (Signifikanzniveau auch 5%).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der postmortalen Verzögerung auf den Apolipoproteingehalt

Um den Einfluss der postmortalen Verzögerung zwischen dem Tod des Individuums und der Asservierung des Gewebes auf den spezifischen Proteingehalt der Proben zu untersuchen, wurden neurochirurgische Gewebeproben, die bei Epilepsie-Operationen gewonnen wurden, einer kontrollierten Verzögerung der Kryokonservierung unterzogen.

Statistisch signifikante Veränderungen des spezifischen Proteingehalts durch eine Verzögerung der Kryokonservierung um 24h fanden sich im Vergleich zu dem sofort Schock gefrorenen Teil der Probe bei keinem der untersuchten Apolipoproteine (Werte s. Tab. 6).

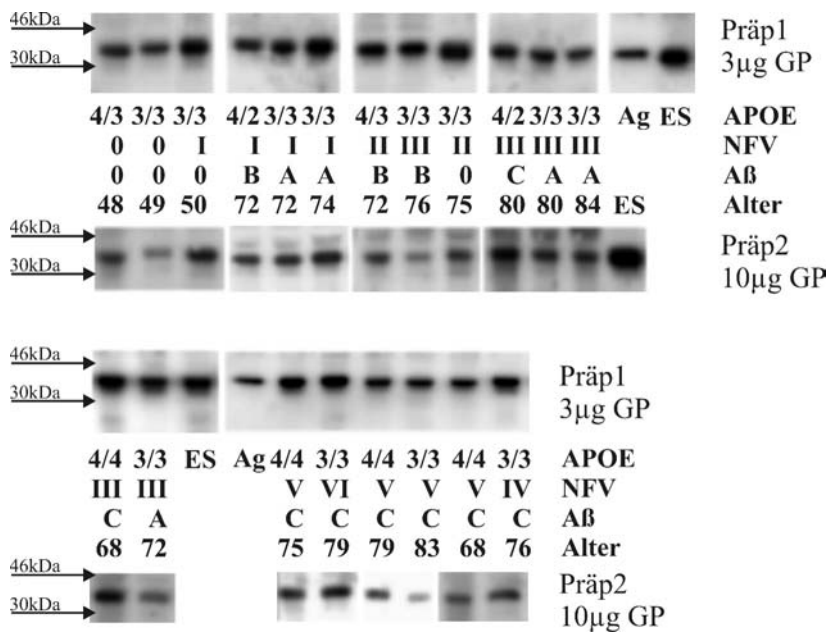
**Tabelle 6:**  
**Einfluss der postmortalen Verzögerung auf den Proteingehalt der Proben**

<b>Verzögerung der Kryokonservierung um:</b>	<b>ApoE (ROD ± SEM) (Mittelwert aus neun Proben)</b>	<b>ApoD (ROD ± SEM) (Mittelwert aus vier Proben)</b>
<b>0h</b>	129,2 ± 6,1	157,0 ± 27,3
<b>24h</b>	125,2 ± 9,2	152,5 ± 29,7
<b>t-Test (0 vs. 24h)</b>	p = 0,8	p = 0,9

Die Kontrollprobe, die als externer Standard zum Vergleich der Blots diente, wurde mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren. In jedem Zyklus wurde jeweils ein Teil der Probe aliquotiert. Ein Vergleich der Aliquots im Western Blot zeigte keine signifikante Abnahme der spezifischen Proteinbanden für die untersuchten Apolipoproteine oder Degradationserscheinungen.

In Übereinstimmung mit diesen Voruntersuchungen zur Brauchbarkeit der Proben für die geplante Untersuchung zeigte sich keine Korrelation des Apolipoprotein Gehalts der Proben von der Länge des postmortalen Intervalls der ausgewählten Fälle (ApoE: Bestimmtheitsmass  $R^2 = 0,08$  und ApoD: Bestimmtheitsmass  $R^2 = 0,006$  bei Annahme eines linearen Trends). Zwischen den einzelnen Untergruppen (Braak-Stadien/Genotypen) bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des postmortalen Intervalls.

**Abbildung 1:**  
**Immunologischer Nachweis von ApoE in hippokampalen Gewebshomogenaten**



Obere Reihen: Präp1, Auftrag 3µg Gesamtprotein (GP)

Untere Reihen: Präp2, Auftrag 10µg Gesamtprotein (GP)

APOE Genotyp, Braak-Stadium für NVF (0-VI) und Aβ (0-C), Alter in Jahren wie angegeben

ES: externer Standard (s. Pkt. 2.4.4)

Ag: ApoE-Antigen (s. Pkt. 2.4.4)

## 4.2 Apolipoproteinbestimmung in hippokampalen Gewebshomogenaten

### 4.2.1 Apolipoprotein E

Immunoblotting nach reduzierender SDS-PAGE zeigte eine Bande bei 34kDa (Abb. 1). Rekombinantes ApoE, das auf einige Gele aufgetragen worden war, wurde auf gleicher Höhe dargestellt (Abb. 1).

Nach Weglassen des Primärantikörpers zeigte sich keine spezifische Bande.

#### Präparation 1

APOE  $\epsilon$ 3-homozygote Fälle zeigten einen signifikant höheren ApoE-Gehalt in Hirnproben der Braak-Stadien I/II im Vergleich zu Hirnproben ohne DAT-assoziierte neuropathologische Veränderungen und im Vergleich zu Proben aus Gehirnen mit ausgedehnten NF Veränderungen und SP (Braak-Stadien V/VI). In der Gruppe der APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger (hetero- und homozygot) waren keine signifikanten Unterschiede des hippokampalen ApoE-Gehalts zwischen den einzelnen Braak-Stadien zu beobachten. Die Daten sind zusammengefasst in Tab. 7 und 8.

#### Präparation 2

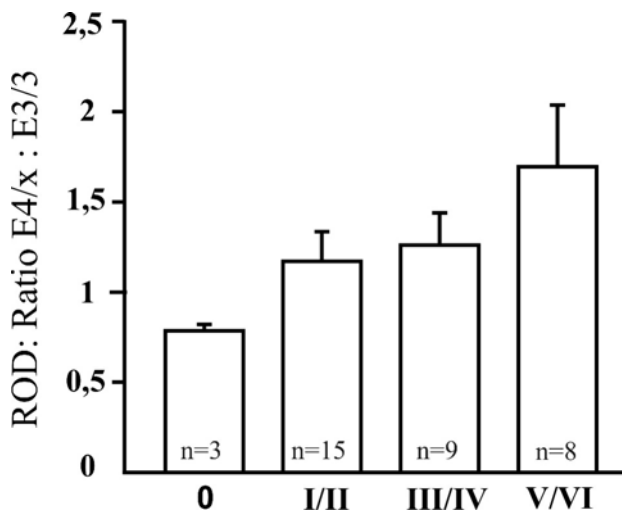
Der nach Immunoblotting nach reduzierendem SDS-PAGE als ROD gemessene ApoE-Gehalt der Pelletfraktion (Präp 2) erreichte 10 – 30% des Gehalts der ersten Extraktion (Präp 1). Die Daten sind in Tab. 7 und 8 zusammengefasst.

In den Gruppen beider Genotypen gab es die Tendenz, zu einem höheren ApoE-Gehalt in den Pellets aus Proben schwerbetroffener Gehirne. Eine signifikante Korrelation zu NF - oder Amyloidpathologie bestand jedoch nicht.

Um APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger und  $\epsilon$ 3-Homozygote innerhalb der Pärchen direkt vergleichen zu können, wurde das Verhältnis der ApoE-Gehalte der Pärchen berechnet. Aus der Pelletfraktion der APOE  $\epsilon$ 4/x-Fälle konnte mehr ApoE extrahiert werden als bei den nach Alter und Geschlecht zugeordneten APOE  $\epsilon$ 3/3-Fällen mit entsprechenden neuropathologischen Veränderungen (NFV und A $\beta$ ) (s. Abb. 2).

Obwohl die Fälle mit höheren Braak-Stadien einen höheren ApoE-Gehalt in der Pelletfraktion aufwiesen, wurden die Resultate (Präp 1) nicht prinzipiell verändert. Aus diesem Grund wurden die Daten für die weitere Analyse zusammengefasst und als Gesamt-ApoE bezeichnet.

**Abbildung 2:**  
**ApoE aus der Pelletfraktion (Präp2)**



ROD- Ratio APOE 4/x : APOE 3/3 + SEM

(Zugeordnete Pärchen, Proben nebeneinander aufgetragen)

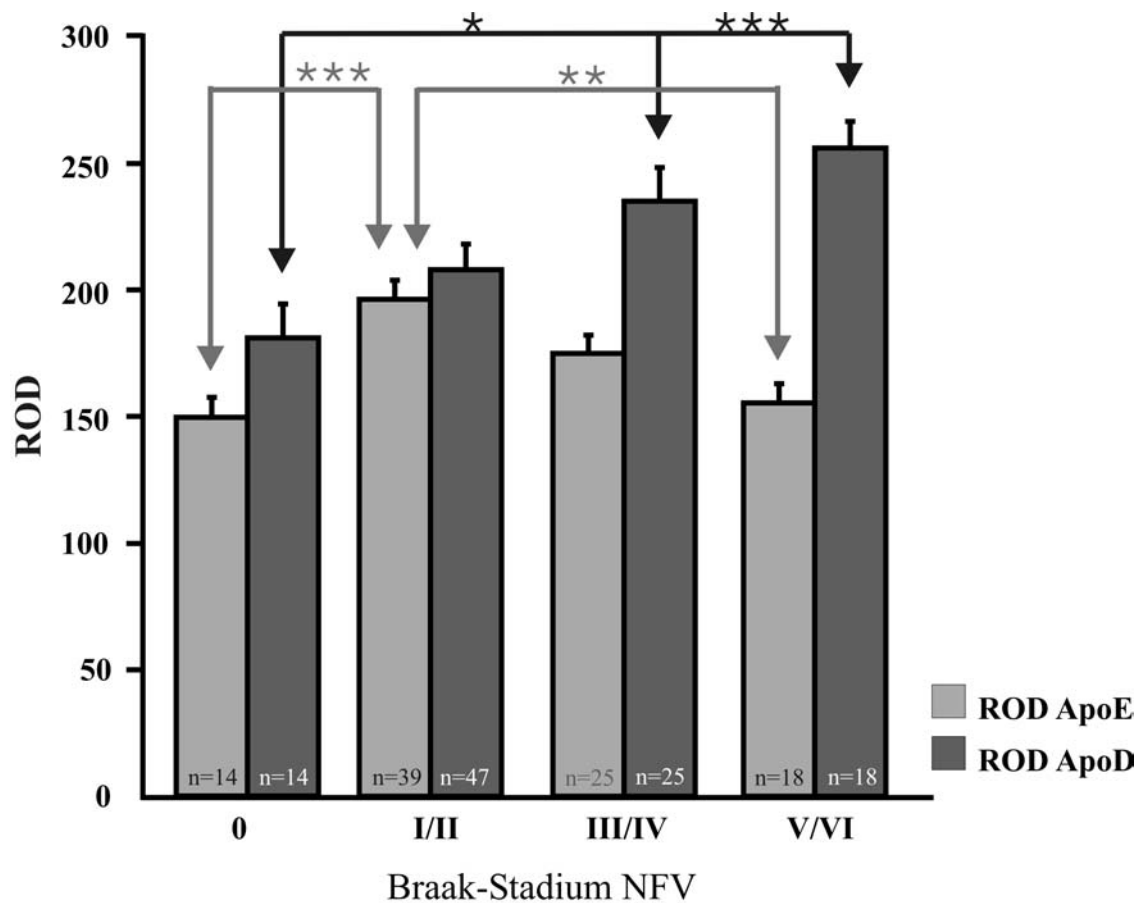
#### 4.2.1.1 Gesamt-ApoE in Korrelation zu neurofibrillären Veränderungen

Die Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte zeigte einen erhöhten hippokampalen ApoE-Gehalt mit Beginn der DAT-assoziierten Pathologie (Braak-Stadien I/II) im Vergleich zu Gehirnen ohne pathologische Veränderungen: Braak NFV 0 (ROD = 149,5) vs. Stadien I/II (ROD = 196,3):  $p^* \leq 0,001$ . Schwerer betroffene Gehirne (Braak-Stadien III/VI und V/VI) zeigten einen niedrigeren ApoE-Gehalt mit dem niedrigsten ApoE in den am schlimmsten betroffenen Gehirnen: Stadien I/II (ROD = 196,3) vs. Stadien V/VI (ROD = 155,3):  $p^* \leq 0,01$ . Ein Vergleich der Braak

NFV 0-Gruppe (ROD = 149,5) mit der Gruppe mit weitverbreiteten NFV (Stadien V/VI: ROD = 155,3) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der hippocampalen ApoE-Gehalte.

Die Daten sind in Tab. 7 und in Abb. 3 zusammengefasst.

**Abbildung 3:**  
ApoE und ApoD im Hippokampus in Abhängigkeit von NFV



\* NFV 0 vs. NFV III/IV:  $p^* < 0,05$

\*\* NFV I/II vs. NFV V/VI:  $p^* < 0,01$

\*\*\* ApoE NFV 0 vs. NFV I/II; ApoD NFV 0 vs. NFV V/VI:  $p^* < 0,005$

**Tabelle 7:**  
**Hippokampaler ApoE-Gehalt (ROD) in Abhängigkeit von APOE-Genotyp und NFV**

Braak-Stadium NFV	APOE ε3/3			Alle Genotypen
	Präp 1	Präp 2	Gesamt-ApoE	Gesamt-ApoE
<b>0</b>	117,0 ± 5,9	18,3 ± 2,5	133,4 ± 6,9	149,5 ± 7,9
<i>NFT 0 - Aβ 0</i>			139,1 ± 19,3	
<b>I/II</b>	195,1 ± 8,1	21,6 ± 1,7	208,1 ± 9,2 <sup>a</sup>	196,3 ± 7,5 <sup>a</sup>
<b>III/IV</b>	154,6 ± 8,0	16,4 ± 1,3	171,0 ± 8,7	174,9 ± 7,2
<b>V/VI</b>	140,3 ± 8,5	24,0 ± 2,8	163,0 ± 10,9	155,3 ± 7,6 <sup>b</sup>
<b>Alle Stadien</b>			181,0 ± 6,1	
	APOE ε4/x			
	Präp 1	Präp 2	Gesamt-ApoE	
<b>0</b>	154,4 ± 8,9	16,4 ± 2,6	170,8 ± 11,2*	
<i>NFT 0 - Aβ 0</i>			153,4 ± 4,4	
<b>I/II</b>	148,8 ± 7,9	24,1 ± 2,5	172,9 ± 9,7*	
<b>III/IV</b>	159,5 ± 11,3	22,9 ± 4,0	179,8 ± 11,8	
<b>V/VI</b>	126,0 ± 8,3	21,1 ± 1,7	145,7 ± 9,4	
<b>Alle Stadien</b>			168,8 ± 5,8	

\* APOE ε3/3 vs. APOE ε4/x:  $p \leq 0,05$  (U-Test)

<sup>a</sup> Braak NFV 0 vs. NFV I/II:  $p^* \leq 0,001$  (Kruskal-Wallis)

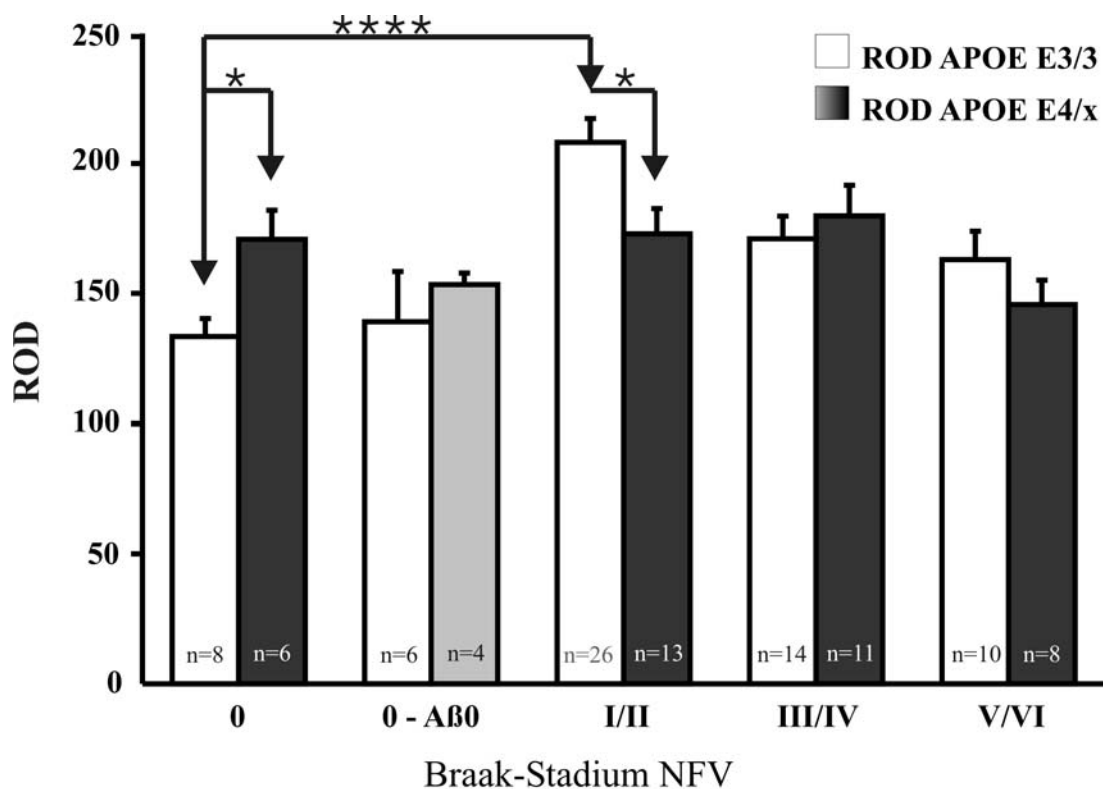
<sup>b</sup> Braak NFV I/II vs. NFV V/VI:  $p^* \leq 0,01$  (Kruskal-Wallis)

Eine Analyse der Daten unter Beachtung des APOE-Genotyps ergab, dass der implizierte Anstieg des hippokampalen ApoE-Gehalts mit Beginn der DAT-assoziierten neuropathologischen Veränderungen in der APOE ε3/3-Gruppe sehr viel deutlicher ausgeprägt war als bei den ε4-Allelträgern: Braak NFV 0 (ROD = 133,4) vs. Stadien I/II (ROD = 208,1):  $p^* \leq 0,00005$ .

Im Unterschied hierzu, konnten bei den APOE ε4-Allelträgern keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden: Braak NFV 0

(ROD = 170,8) vs. Stadien I/II (ROD = 172,9):  $p^* = 1$ ; Braak NFV 0 (ROD = 170,8) vs. Stadien V/VI (ROD = 145,7):  $p^* \geq 0,5$ ; Stadien I/II vs. Stadien V/VI:  $p^* \geq 0,1$ .

**Abbildung 4:**  
**ApoE (ROD) im Hippokampus in Abhängigkeit von Genotyp und NFV**



\* APOE  $\epsilon 3/3$  vs. APOE  $\epsilon 4/x$ :  $p < 0,05$  (U-Test)

\*\*\*\* APOE  $\epsilon 3/3$  NFV 0 vs. NFV I/II:  $p^* < 0,00005$  (Kruskal-Wallis-Test)

Bei den Hirnproben ohne NFV ( Braak NFV 0) zeigte die APOE  $\epsilon 4/x$ -Gruppe einen deutlich höheren durchschnittlichen ApoE-Gehalt. Dieser Unterschied war statistisch signifikant: Braak NFV 0 APOE  $\epsilon 3/3$  (ROD = 133,4) vs. Braak NFV 0 APOE  $\epsilon 4/x$  (ROD = 170,8):  $p \leq 0,05$ .

In der APOE  $\epsilon 4/x$  Braak NFV 0-Untergruppe zeigten zwei der sechs Fälle Amyloidablagerungen in allen isokortikalen Assoziationszentren sowie eine mäßig betroffene Hippokampusformation (Braak-Stadium A $\beta$  B). Schloss man diese beiden

Fälle aus der Analyse aus, zeigte diese Untergruppe einem der Braak NFV 0 APOE  $\epsilon$ 3/3-Untergruppe vergleichbareren Durchschnittswert (s. Abb. 3 und Tab. 7). Die APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger zeigten insgesamt höhere Braak-Stadien für A $\beta$  als die APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten (s.a. Pkt. 4.2.1.2). Statistisch signifikant (U-Test) war dieser Unterschied aber in keiner der im Genotyp korrespondierenden NFV-Untergruppen. In den entorhinalen Stadien I/II zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Genotypgruppen: APOE  $\epsilon$ 3/3 (ROD = 208,1) vs.  $\epsilon$ 4/x (ROD = 172,9):  $p \leq 0,05$ . Ein Vergleich der schwer betroffenen Gehirne (Stadien V/VI) zeigte keine Unterschiede zwischen den Genotypen: APOE  $\epsilon$ 3/3 (ROD = 163,0) vs.  $\epsilon$ 4/x (ROD = 145,7):  $p \geq 0,1$ . Die Daten sind in Tab. 7 und in Abb. 4 zusammengefasst.

Eine weitere Analyse der APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger bezüglich des zweiten Allels zeigte in allen Braak-Stadien die Tendenz zu höheren ApoE-Werten bei den Fällen, die APOE  $\epsilon$ 2 neben dem  $\epsilon$ 4-Allel exprimierten, im Vergleich zu den APOE  $\epsilon$ 4/3-Fällen. Kein Unterschied war zu sehen zwischen APOE  $\epsilon$ 4/3-Fällen und APOE  $\epsilon$ 4-Homozygoten, jedoch waren hier nur Fälle mit ausgeprägter Pathologie verfügbar (s.a. Tab. 3). Eine statistische Analyse schien aufgrund der geringen Gruppengröße hier nicht sinnvoll.

#### 4.2.1.2 Gesamt-ApoE in Korrelation zu senilen Plaques

Die Unterteilung der beiden Genotypgruppen entsprechend der Braak-Klassifikation für Amyloidablagerungen führte zu weniger gut abgestimmten Untergruppen, da bei der Auswahl der Fälle der Schwerpunkt auf der Tau-Pathologie lag. Im allgemeinen zeigten die APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger mehr SPs (höhere Braak-Stadien für A $\beta$ ) als die APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten. In beiden Genotypgruppen zeigten Fälle mit ausgedehnten NFV regelmäßig viele SPs. In der APOE  $\epsilon$ 4/x-Gruppe hatten aber auch Fälle mit milden oder ohne NF Veränderungen zum Teil ausgedehnte Amyloidablagerungen (Braak-Stadium A $\beta$  B oder C). Im Gegensatz hierzu zeigten etliche der APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten mit NFV in den Stadien I/II keine SPs (Braak A $\beta$  0). Der statistische Vergleich erbrachte aber keine signifikanten Unterschiede bezüglich der NFV (oder anderer Parameter wie Alter, Geschlecht bzw. der postmortalen Verzögerung) der im Genotyp korrespondierenden A $\beta$ -Untergruppen.

**Tabelle 8:**  
**Hippokampaler ApoE-Gehalt (ROD) in Abhängigkeit von APOE-Genotyp und Aβ**

Braak-Stadium Aβ	APOE ε3/3			Alle Genotypen
	Präp 1	Präp 2	Gesamt-ApoE	Gesamt-ApoE
<b>0</b>	171,6 ± 8,7	18,9 ± 1,6	184,8 ± 9,1	178,4 ± 7,0
<b>A</b>	181,7 ± 14,5	19,9 ± 2,0	196,5 ± 15,7	192,6 ± 13,0
<b>B</b>	136,8 ± 8,9	21,6 ± 4,7	156,4 ± 13,2	172,6 ± 10,0
<b>C</b>	156,7 ± 10,5	22,6 ± 2,0	176,9 ± 11,4	169,2 ± 7,4
<b>Alle Stadien</b>			182,2 ± 6,2	
	APOE ε4/x			
	Präp 1	Präp 2	Gesamt-ApoE	
<b>0</b>	144,3 ± 7,5	20,4 ± 3,0	164,7 ± 9,5	
<b>A</b>	155,6 ± 10,6	23,0 ± 3,4	178,7 ± 14,0	
<b>B</b>	166,6 ± 12,1	19,9 ± 2,0	186,5 ± 12,5	
<b>C</b>	141,2 ± 8,6	23,9 ± 2,8	162,4 ± 9,6	
<b>Alle Stadien</b>			168,8 ± 5,8	

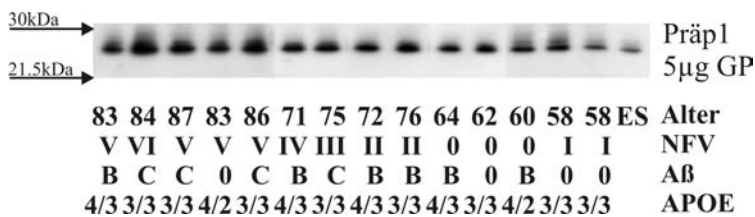
In der APOE ε3/3 Braak Aβ 0-Gruppe zeigten nur die Fälle, die weder SPs noch NFV aufwiesen, niedrige ApoE-Werte. Die Fälle jedoch, die NFV in der transentorhinalen Region aufwiesen (Braak NFV I/II), hatten einen hohen hippokampalen ApoE-Gehalt. Hirnproben im Stadium A zeigten ebenfalls hohe ApoE-Werte, während die Fälle mit ausgedehnten Amyloidablagerungen (Stadium C) niedrige ApoE-Werte aufwiesen. Die statistische Analyse (Kruskal-Wallis-Test) erbrachte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Aβ-Untergruppen. (Tab. 8)

APOE ε4-Allelträger ohne SPs (Braak Aβ 0) zeigten niedrige ApoE-Werte. Eine Erhöhung des hippokampalen ApoE-Gehalts wurde in den Stadien A und B gefunden. Fälle im Stadium C zeigten niedrige ApoE-Werte, wie die APOE ε3-Homozygoten. Statistisch waren die Unterschiede aber ebenfalls nicht signifikant. (Tab. 8)

#### 4.2.2 Apolipoprotein D

Immunoblotting nach reduzierenden SDS-PAGE zeigte eine Bande bei 29kDa (Abb. 5).  
Nach Weglassen des Primärantikörpers zeigte sich keine spezifische Bande.

**Abbildung 5:**  
**Immunologischer Nachweis von ApoD in hippokampalen Gewebshomogenaten**



Präp1, Auftrag 5µg Gesamtprotein (GP)

Alter in Jahren, Braak-Stadium für NfV (0-VI) und Aβ (0-C), APOE Genotyp wie angegeben

ES: externer Standard (s. Pkt. 2.4.4)

#### Präparation 2

Um möglicherweise gebundenes ApoD aus der Pelletfraktion zu lösen, wurde ein zweiter Extraktionsschritt durchgeführt (s.o.). Mehrere Proben (Präp 2) unterschiedlicher Braak-Stadien und APOE-Genotypen wurden analysiert. Es wurden ansteigende Gesamtproteinmengen (bis zu 30µg Gesamtprotein je Bahn) aufgetragen. Es wurden nur Spuren von ApoD im Western-Blot gefunden. Aus diesem Grund wurde die Pelletfraktion nicht weiter auf ApoD untersucht (Blots nicht gezeigt).

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse beziehen sich also ausschließlich auf die Untersuchung der Präparation 1.

**Tabelle 9:**  
**Hippokampaler ApoD-Gehalt (ROD) in Abhängigkeit von APOE-Genotyp und NFV**

Braak-Stadium NFV	APOE ε3/3	APOE ε4/x	Alle Genotypen
	ApoD (Präp 1)	ApoD (Präp 1)	ApoD (Präp 1)
<b>0</b>	207,2 ± 15,1	146,0 ± 14,9*	180,9 ± 13,4
NFT 0 - Aβ 0	206,0 ± 15,1	139,4 ± 15,9*	
<b>I/II</b>	209,9 ± 12,0	203,1 ± 18,9	208,0 ± 10,1
<b>III/IV</b>	239,6 ± 14,4	229,2 ± 24,0	235,1 ± 13,3 <sup>c</sup>
<b>V/VI</b>	280,5 ± 12,2 <sup>a,b</sup>	225,7 ± 10,7*	256,1 ± 10,5 <sup>a,b</sup>
<b>Alle Stadien</b>	226,6 ± 7,9	206,4 ± 11,1	

\* APOE ε3/3 vs. APOE ε4/x:  $p \leq 0,05$  (U-Test)

<sup>a</sup> Braak NFV 0 vs. NFV V/VI:  $p^* \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis)

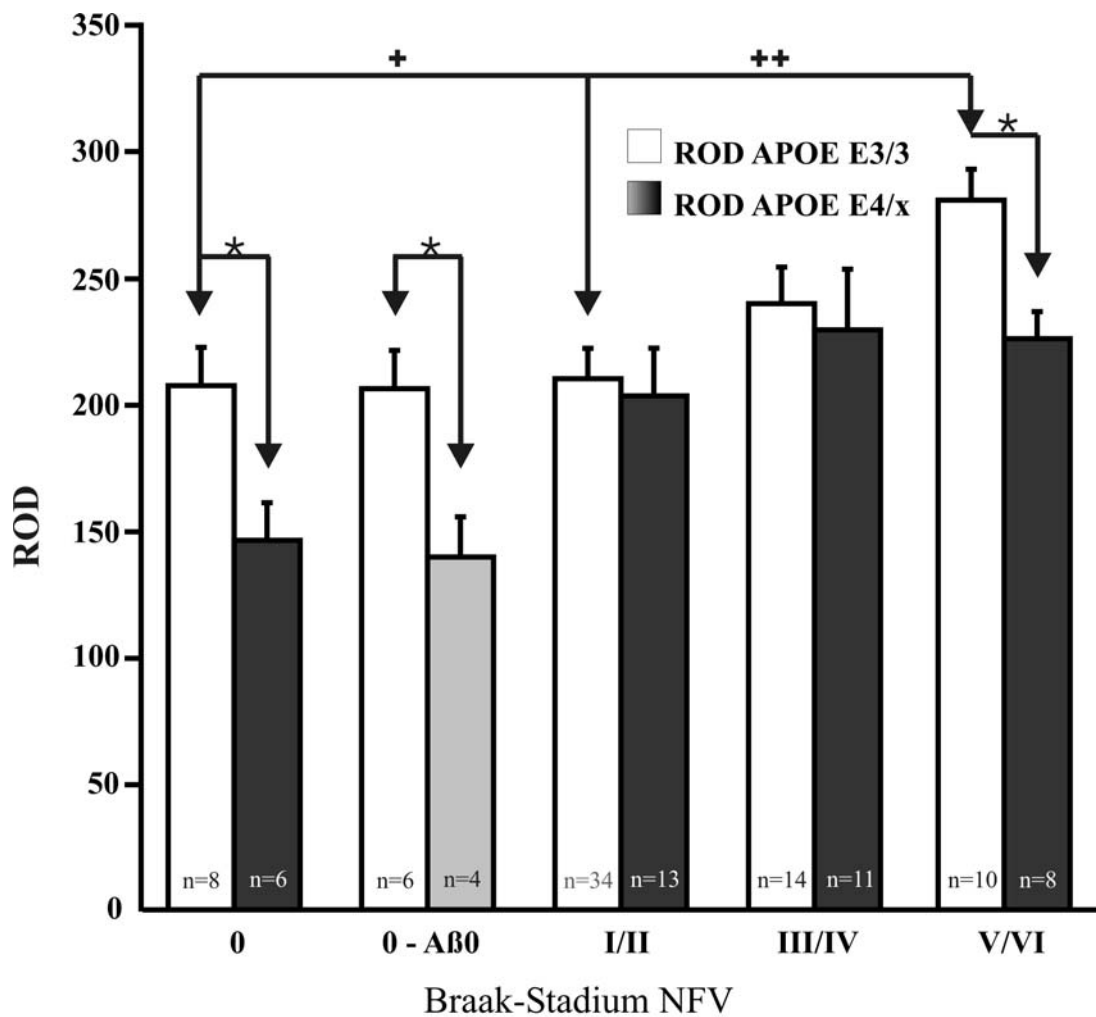
<sup>b</sup> Braak NFV I/II vs. NFV V/VI:  $p^* \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis)

<sup>c</sup> Braak NFV 0 vs. NFV III/IV:  $p^* \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis)

#### 4.2.2.1 ApoD (Präparation 1) in Korrelation zu neurofibrillären Veränderungen

Proben höherer Braak-Stadien wiesen einen zunehmend höheren ApoD-Gehalt auf. Die Gruppe, die die histopathologischen Kriterien für eine vollausgeprägte DAT aufwies (Isokortikale Stadien V/VI nach Braak), zeigte einen signifikant höheren durchschnittlichen ApoD-Gehalt als Proben ohne neuropathologischen Veränderungen: Stadien V/VI (ROD = 256,1) vs. Braak NFV 0 (ROD = 180,9):  $p^* \leq 0,005$ , und als Proben mit transentorhinalen NFV und nur mildem Befall von CA1 (Transentorhinale Stadien nach Braak): Stadien V/VI vs. Stadien I/II (ROD = 208,0):  $p \leq 0,05$ . Die Gruppe mit mittelschwer ausgeprägten Veränderungen (Limbische Stadien III/IV) zeigte einen mittleren ApoD-Anstieg (s. Abb. 3 und Tab. 9).

**Abbildung 6:**  
**ApoD (ROD) im Hippokampus in Abhängigkeit von APOE Genotyp und NFV**

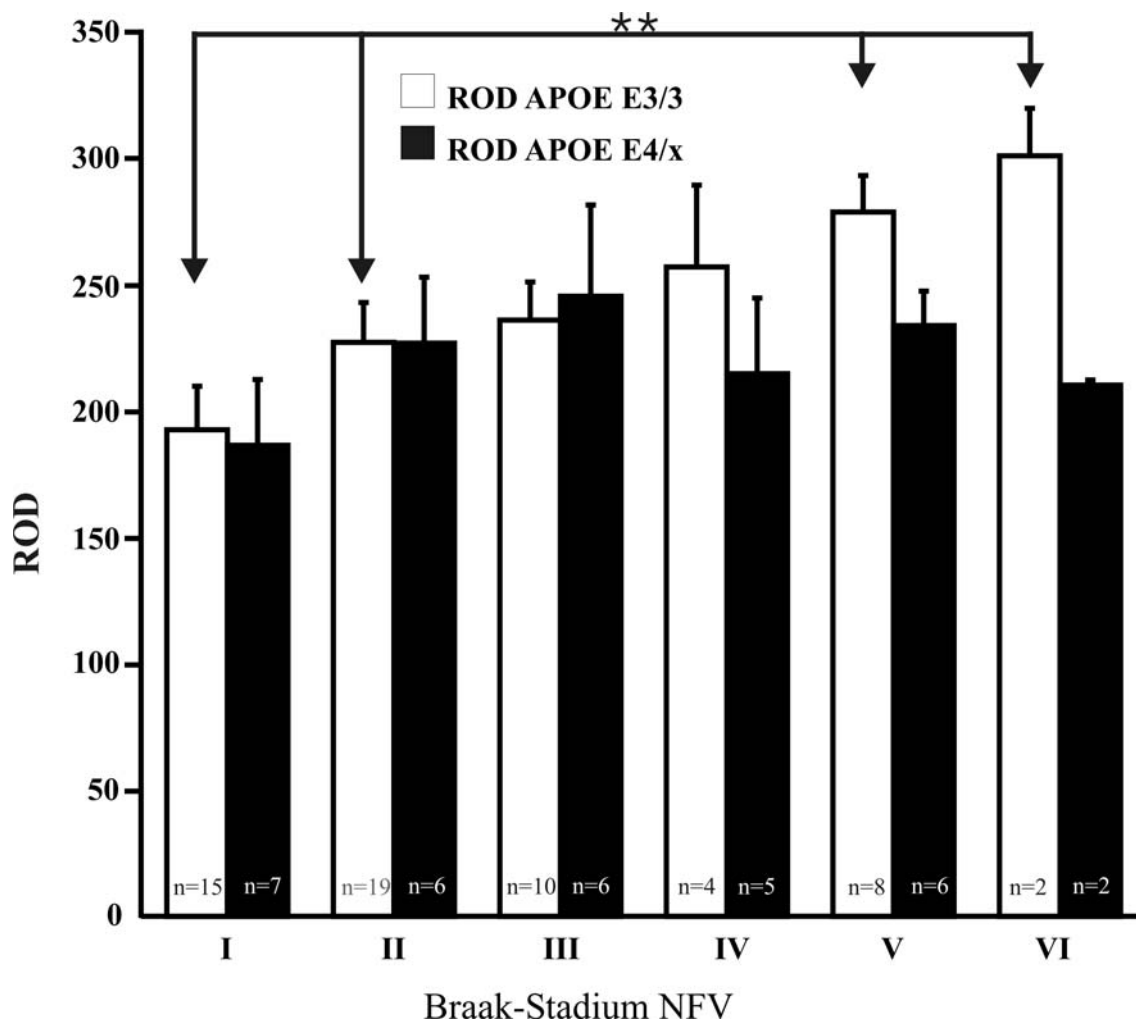


\* APOE ε3/3 vs. APOE ε4/x:  $p < 0,05$  (U-Test)

+ APOE ε3/3 NFV 0 vs. NFV V/VI:  $p^* < 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test)

++ APOE ε3/3 NFV I/II vs. NFV V/VI:  $p^* < 0,01$  (Kruskal-Wallis-Test)

**Abbildung 7:**  
**Hippokampales ApoD (ROD) in Abhängigkeit vom Verlauf der NFV und vom APOE Genotyp**



\*\* APOE E3/3 NFV I/II vs. NFV V/VI:  $p^* < 0,01$

Eine Analyse der Daten unter Beachtung des APOE-Genotyps ergab, dass der Anstieg der ApoD-Werte in den isokortikalen Stadien der NFV sich auf die APOE  $\epsilon 3/3$ -Gruppe beschränkte: Stadien I/II (ROD = 209,9) vs. Stadien V/VI (ROD = 280,5):  $p^* \leq 0,01$  (s. Tab. 9 und Abb. 6 und 7).

Bei den Gehirnen mit schweren neuropathologischen Veränderungen (Stadien V/VI) fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den APOE  $\epsilon 3$ -Homozygoten und den APOE  $\epsilon 4$ -Allelträgern: APOE  $\epsilon 3/3$  (ROD = 280,5) vs. APOE  $\epsilon 4/x$  (ROD = 225,7):

$p \leq 0,05$ . Dieser Unterschied zeigte sich bereits im Stadium IV, war hier jedoch nicht signifikant (s. Abb. 7).

Höhere ApoD-Werte in der APOE  $\epsilon 3/3$ -Gruppe im Vergleich zu den APOE  $\epsilon 4$ -Allelträgern fanden sich auch in den Proben ohne NFV (Braak-Stadium NFV 0). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ) und blieb auch bestehen, wenn die Fälle mit Amyloidablagerungen (Braak NFV 0, aber A $\beta$  A, B oder C) aus der Analyse herausgenommen wurden (s. Tab. 9 und Abb. 6). Die Gruppe ohne DAT-assoziierte neuropathologische Veränderungen war die kleinste Gruppe und, bezüglich der ApoD-Werte, auch die heterogenste.

#### 4.2.2.2 ApoD in Korrelation zu senilen Plaques

Zur Problematik der Probenauswahl (Zuordnungsverfahren) bezüglich der Amyloidpathologie siehe Abschnitt 4.2.1.2 (Gesamt-ApoE in Korrelation zu senilen Plaques).

**Tabelle 10:**  
**Hippokampaler ApoD-Gehalt (ROD) in Abhängigkeit von APOE-Genotyp und A $\beta$**

Braak-Stadium A $\beta$	APOE $\epsilon 3/3$	APOE $\epsilon 4/x$	Alle Genotypen
	ApoD (Präp 1)	ApoD (Präp 1)	ApoD (Präp 1)
<b>0</b>	204,3 $\pm$ 12,8	187,5 $\pm$ 18,6	199,6 $\pm$ 10,5
<b>A</b>	240,6 $\pm$ 12,5	151,6 $\pm$ 40,2	222,8 $\pm$ 15,6
<b>B</b>	257,7 $\pm$ 22,0	225,4 $\pm$ 23,9	241,6 $\pm$ 16,8
<b>C</b>	244,4 $\pm$ 14,5	222,6 $\pm$ 15,9	233,1 $\pm$ 10,9
<b>Alle Stadien</b>	226,0 $\pm$ 8,1	206,4 $\pm$ 11,1	

Es gab keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem hippokampalen ApoD-Gehalt und der Braak-Klassifikation für senile Plaques.

Eine Analyse der Daten unter Beachtung des APOE-Genotyps zeigte eine Tendenz zu höheren ApoD-Werten bei den APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten, aber ebenfalls ohne statistische Relevanz.

Die Daten sind in Tab. 10 zusammengefasst.

### **4.3 Einfluss anderer Faktoren**

#### **4.3.1 Gesamtproteingehalt**

Der Gesamtproteingehalt der hippokampalen Gewebshomogenate zeigte keine Korrelation zur Schwere der neuropathologischen Veränderungen, weder in der ersten (Präp 1) noch in der zweiten Extraktion (Präp 2).

Die Länge des postmortalen Intervalls hatte keinen Einfluss auf den Gesamtproteingehalt der Proben, weder in der ersten (Präp 1) noch in der zweiten Extraktion (Präp 2).

#### **4.3.2 Geschlecht**

##### **4.3.2.1 Apolipoprotein E**

Es zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede der hippokampalen ApoE-Werte (Daten nicht gezeigt). Allerdings waren in der vorliegenden Studie Männer überrepräsentiert.

##### **4.3.2.2 Apolipoprotein D**

Nach dem Beginn der DAT-assoziierten Veränderungen zeigten Männer die Tendenz zu höheren hippokampalen ApoD-Werten als Frauen. Dieser Unterschied war in keiner der korrespondierenden Braak NFV-Untergruppen signifikant (U-Test), wobei die statistische Auswertung insofern kritisch zu sehen ist, da in der vorliegenden Studie Männer überrepräsentiert waren.

### 4.3.3 Alter

Bedingt durch das Zuordnungsverfahren waren die Gruppen mit den höheren Braak-Stadien signifikant älter als die Gruppen ohne oder mit gering ausgeprägten neuropathologischen Veränderungen. Höheres Lebensalter ist aber der hauptsächliche Risikofaktor für die Entwicklung einer Demenz. Um zu überprüfen, dass die gefundenen Veränderungen des Apolipoproteingehalts der Proben nicht ausschließlich als altersbedingte Veränderungen anzusehen sind, wurden zusätzlich einige Fälle mit höherem Lebensalter, aber ohne ausgeprägte neuropathologische Veränderungen (für ApoE nur Braak NFV 0; für ApoD Braak NFV 0 – II) untersucht. Hierfür wurden APOE  $\epsilon$ 3-homozygote Fälle ausgewählt, um einen möglichen Einfluss des APOE-Polymorphismus auszuschließen und aufgrund der Tatsache, dass „altgewordene“ APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger ohne DAT-assoziierte Veränderungen nicht verfügbar waren (und sind).

#### 4.3.3.1 Apolipoprotein E

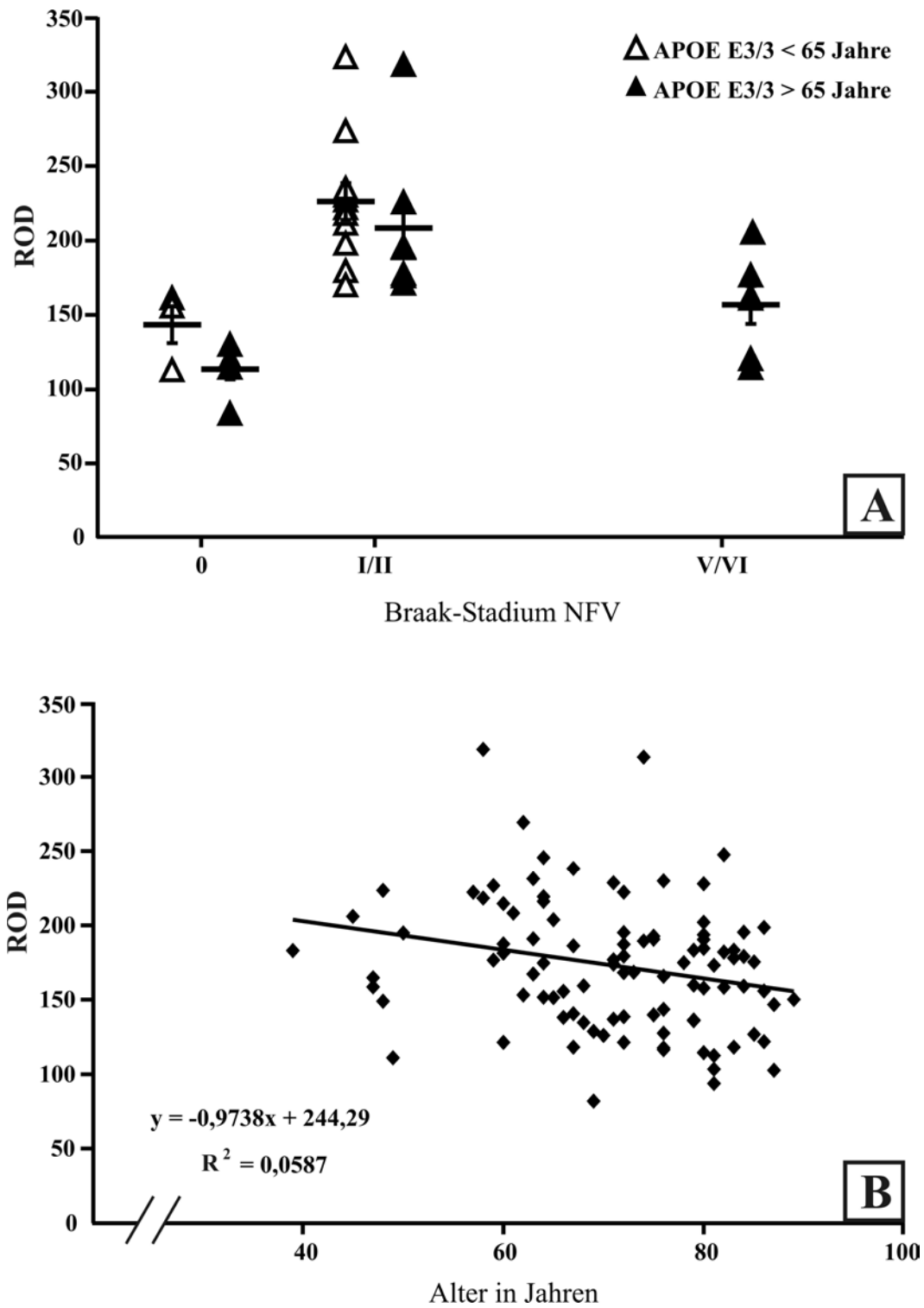
Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede beim Vergleich jüngerer mit älteren APOE  $\epsilon$ 3-homozygoten Individuen ohne DAT-assoziierte pathologische Veränderungen (Braak-Stadium 0): <65 Jahre (ROD  $\pm$  SEM: 142,7  $\pm$  12,7) vs. >65 Jahre (ROD  $\pm$  SEM: 113,0  $\pm$  7,1):  $p \geq 0,5$  oder mit frühen Braak-Stadien (NFV I/II): <65 Jahre (ROD  $\pm$  SEM: 225,4  $\pm$  12,2) vs. >65 Jahre (ROD  $\pm$  SEM: 207,7  $\pm$  18,1):  $p \geq 0,05$  (s. Abb. 8A und Tab. 11).

Sowohl bei jüngeren als auch bei älteren APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten fand sich eine klare Beziehung der hippokampalen ApoE-Werte zu neuropathologischen Veränderungen (s. Abb. 8A und Tab. 11). Fälle mit Braak-Stadium NFV I/II zeigten im Durchschnitt höhere ApoE-Werte als Fälle ohne neuropathologische Veränderungen und Fälle mit ausgedehnten NF Degenerationen (und SP) (nur >65 Jahre).

Abbildung 8:

A: Hippokampales ApoE in Abhängigkeit von Alter und Diagnose (APOE E3/3)

B: Hippokampales ApoE (alle Proben) in Abhängigkeit von Alter



**Tabelle 11:**  
**Einfluss des Lebensalters auf die hippocampalen ApoE-Werte**

Diagnose (neuro-pathologisch)	Braak-Stadium (NFV)	n =	Alter in Jahren Mittelwert (Spanne)	ApoE als ROD $\pm$ SEM
<b>Non-DAT</b>	<b>0</b>	3	53 (47 – 62)	142,7 $\pm$ 12,7
	<b>I/II</b>	11	58 (48 – 63)	225,4 $\pm$ 12,2**
	<b>0</b>	5	75 (67 – 81)	113 $\pm$ 7,1
	<b>I/II</b>	7	76 (72 – 81)	207,7 $\pm$ 18,1****
<b>DAT</b>	<b>V/VI</b>	6	79 (71 – 83)	156 $\pm$ 12,8 <sup>+</sup>

Statistische Angaben:

\*\* NFV 0 vs. NFV I/II  $p^* \leq 0,01$

\*\*\*\* NFV 0 vs. NFV I/II  $p^* \leq 0,001$

<sup>+</sup> NFV I/II vs. NFV V/VI  $p^* = 0,08$

In Übereinstimmung mit der Untersuchung zum Einfluss des Alters auf die Ergebnisse, fand sich für alle Proben keine Korrelation der ApoE-Werte zum Alter in der Spanne, die untersucht wurde (Bestimmtheitsmass  $R^2 = 0,06$  bei Annahme eines linearen Trends) (s. Abb. 8B). Der unter Berücksichtigung der NFV errechnete partielle Korrelationskoeffizient  $R_{\text{ROD-Alter.NFV}}$  lag bei  $-0,26$ , wobei einschränkend gesagt werden muss, dass die „Werte“ der Braak-Einteilung eben eine Rangskala sind.

#### 4.3.3.2 Apolipoprotein D

Beim Vergleich jüngerer (n = 11, Altersspanne 47 bis 64 Jahre, Mittel 57 Jahre) mit älteren (n = 10, Altersspanne 65 bis 86 Jahre, Mittel 76 Jahre) APOE  $\epsilon 3$ -homozygoten Individuen ohne oder mit geringen DAT-assoziierte pathologische Veränderungen (Braak-Stadien 0 - I) fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede: <65 Jahre (ROD  $\pm$  SEM: 197,4  $\pm$  19,8) vs. >65 Jahre (ROD  $\pm$  SEM: 194,6  $\pm$  18,3):  $p \geq 0,5$  (s. Abb. 9A und Tab. 12).

Bei den über 65jährigen APOE ε3-Homozygoten korrelierten die hippokampalen ApoD-Werte mit der Schwere der DAT-assoziierten neuropathologischen Veränderungen: Braak NFV 0 - I (n = 10, Altersspanne 76 bis 86, Mittel 77 Jahre, ROD ± SEM 194,6 ± 18,3) vs. Braak NFV V/VI (n = 10, Altersspanne 71 bis 87, Mittel 82 Jahre, ROD ± SEM 280,5 ± 13,7):  $p \leq 0,005$  (s.a. Abb. 9A und Tab. 12). Unter 65jährige mit schweren NF Degenerationen waren nicht vorhanden.

In Übereinstimmung hiermit, fand sich bei der Gesamtheit der Proben keine Korrelation der ApoD-Werte zum Alter in der Spanne, die untersucht wurde (Bestimmtheitsmass  $R^2 = 0,06$  bei Annahme eines linearen Trends) (s. Abb. 9B). Der unter Berücksichtigung des Braak-Stadiums (NFV) errechnete partielle Korrelationskoeffizient  $R_{\text{ROD-Alter.NFV}}$  lag bei 0.05 (s.a. Pkt. 4.3.3.1!).

**Tabelle 12:**  
**Einfluss des Lebensalters auf die hippokampalen ApoD-Werte**

Diagnose (neuropathologisch)	Braak-Stadium (NFV)	n =	Alter in Jahren Mittelwert (Spanne)	ApoD als ROD ± SEM
Non-DAT	0	3	53 (47 – 62)	219,8 ± 24,1
	I/II	8	59 (50 – 64)	188,8 ± 25,1
	0	3	78 (76 – 81)	198,7 ± 28,6
	I/II	7	77 (65 – 86)	192,9 ± 23,1
DAT	V/VI	10	82 (71 – 87)	280,5 ± 13,7**

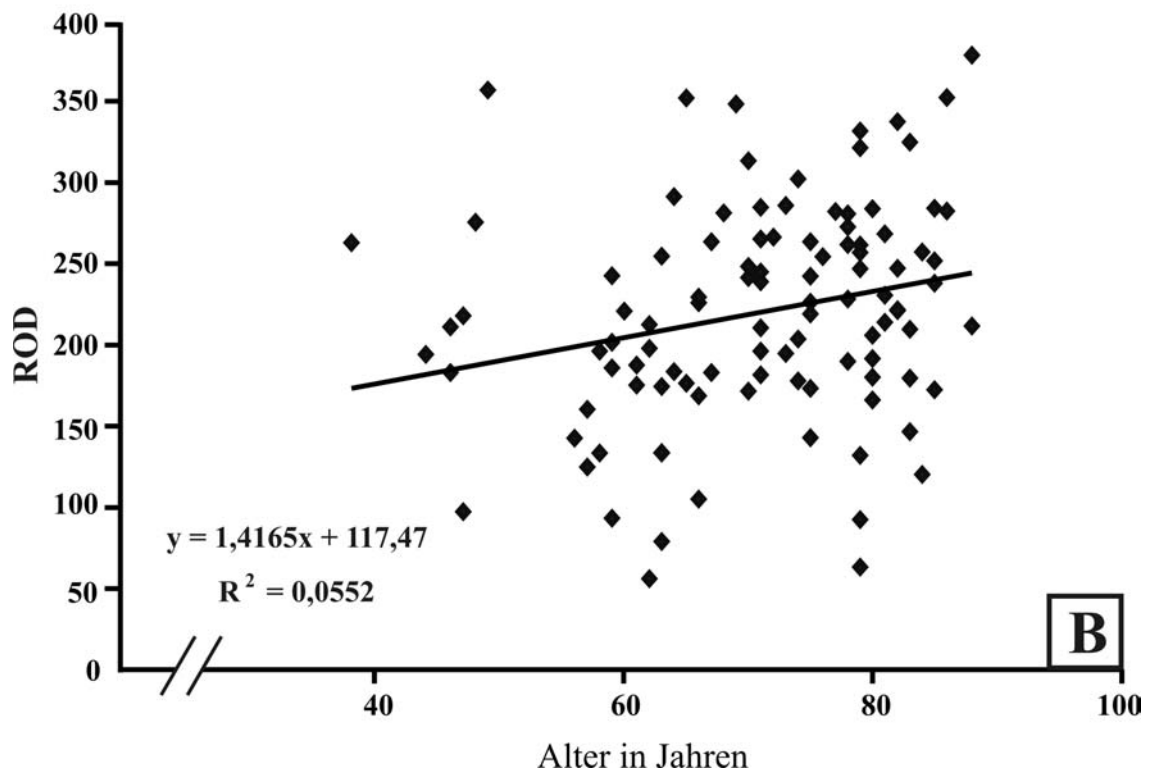
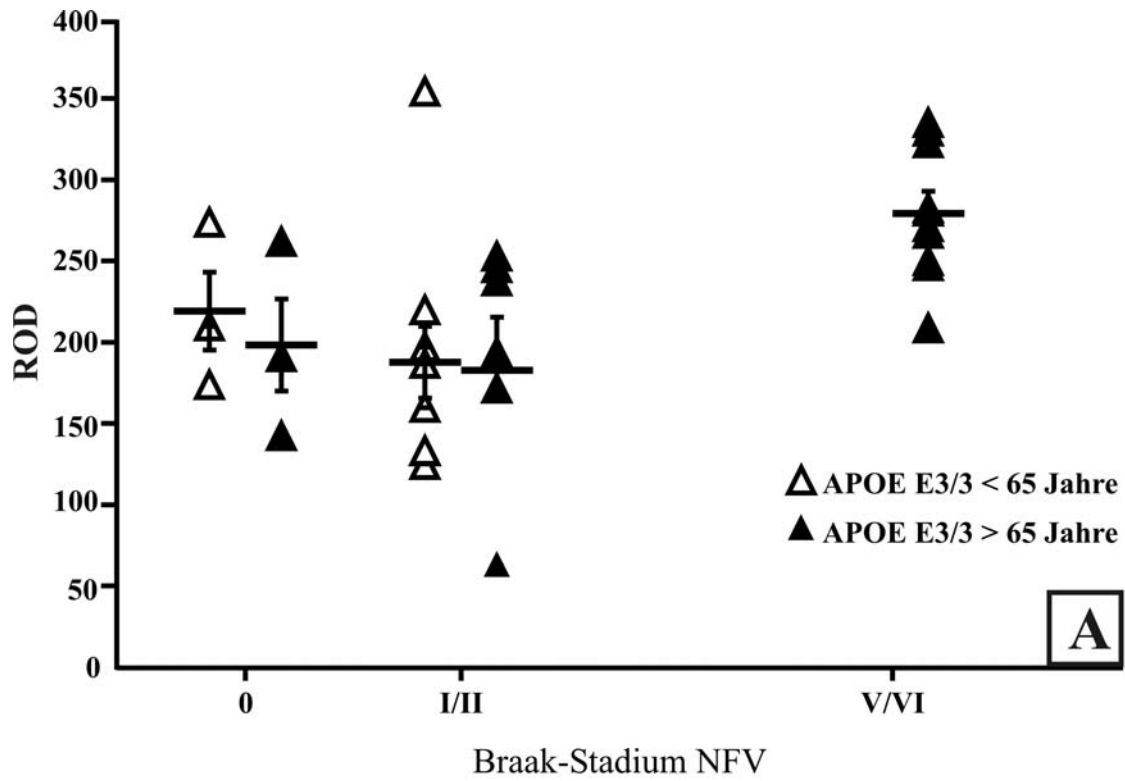
Statistische Angaben:

\*\* NFV 0 vs. NFV V/VI  $p^* \leq 0,01$ ; NFV I vs. NFV V/VI  $p^* = 0,08$

Abbildung 9:

A: Hippokampales ApoD in Abhängigkeit von Alter und Diagnose (APOE E3/3)

B: Hippokampales ApoD (alle Proben) in Abhängigkeit von Alter



## 5 Diskussion

### 5.1 Apolipoprotein E

#### 5.1.1 Eigene Ergebnisse im Vergleich zu vorliegenden Daten

In verschiedenen Studien wurde der ApoE-Gehalt im Gehirn in Bezug auf Vorliegen einer DAT (klinische Diagnose) bzw. DAT-assoziiertes neuropathologischer Veränderungen (verschiedene neuropathologische Diagnosekriterien) und in Bezug auf den APOE-Genotyp untersucht. Die Ergebnisse waren jedoch zum Teil widersprüchlich (s. Tab. 1).

Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass die ApoE-Expression verstärkt wird, wenn sich neuronale Strukturen in Reaktion auf eine Schädigung plastisch umstrukturieren (plastic remodelling)<sup>108,139</sup>. In anderen Studien wurde gezeigt, dass eine solche plastische Antwort bereits in den frühen Phasen der Entwicklung einer DAT stattfindet<sup>89,152</sup>, vielleicht im Zuge einer versuchten Regeneration, um den Verlust an Neuronen zu kompensieren. Neuropsychologische Untersuchungen zeigten anhand spezieller Leistungstests, dass der Einfluss des APOE-Polymorphismus gerade in den frühen Stadien der Erkrankung und im Vorfeld einer beginnenden DAT von Bedeutung ist<sup>67,118,157</sup>.

Folgt man der Braak'schen Klassifikation der DAT-assoziierten neuropathologischen Veränderungen, so zeigen die transentorhinalen Stadien (Braak NFV I/II) nur sehr umschriebene Veränderungen. Ein Individuum, dessen Gehirn diese ersten Anzeichen einer Schädigung zeigt, würde in einer neuropsychologischen Untersuchung keine oder nur sehr dezente Hirnleistungsstörungen erkennen lassen. Diese Gehirne würden also sehr wahrscheinlich der Kontrollgruppe (Non-DAT) zugeordnet werden, sowohl bei einer klinischen Diagnosestellung als auch in einer neuropathologischen Routineuntersuchung, insbesondere wenn hierbei der Schwerpunkt auf der Amyloidpathologie liegt und weniger bei den NFV. Obwohl klinisch unauffällig, zeigen diese Patienten jedoch schon erste strukturelle Veränderungen im Vorfeld einer DAT, gehören also i.d.S. nicht mehr zur „Kontrollgruppe“, die keine neuropathologischen Veränderungen aufweisen sollte.

Der ApoE-Gehalt einer bestimmten Hirnregion variiert möglicherweise mit dem

Ausmaß, in dem diese Region von degenerativen Prozessen einer beginnenden DAT betroffen ist, und wie effizient Mechanismen der plastischen Reorganisation in dieser Struktur den Neuronenverlust bzw. den Verlust an Afferenzen von geschädigten Neuronen kompensieren können. Um diese Hypothese zu testen, wurde der ApoE-Gehalt in Korrelation zum APOE-Genotyp und zum Schweregrad der DAT-assoziierten neuropathologischen Veränderungen entsprechend der Braak-Klassifikation bestimmt. Untersucht wurde der ApoE-Gehalt im Hippokampus, da dieser bei demenziellen Prozessen besonders betroffen ist. Insbesondere die frühen Stadien der DAT-Pathologie betreffen relativ isoliert das entorhinal-hippokampale System, bevor die Pathologie mit einer Verzögerung von wahrscheinlich 1-2 Dekaden auf andere kortikale Areale übergreift<sup>98</sup>.

Die hippocampalen ApoE-Werte zeigten eine Abhängigkeit von der Schwere der NFV. In den frühen Stadien der DAT (Braaks transentorhinale/entorhinale Stadien I/II) fanden sich signifikant höhere Werte als in den Gehirnen ohne DAT-assoziierte Veränderungen (eigentliche Kontrollgruppe). Proben aus schwer betroffenen Hirnen zeigten niedrigere ApoE-Werte als die der Stadien I/II, aber der hippocampale ApoE-Gehalt in den Stadien V/VI war im Durchschnitt immer noch höher als der in den Hirnen ohne neuropathologische Veränderungen (Braak NFV 0) (s.a. Abb. 3).

Bei der weiteren Analyse der Daten zeigte sich die Abhängigkeit dieser Regulation der ApoE-Expression vom APOE-Genotyp. Der (implizierte) Anstieg des hippocampalen ApoE mit Auftreten der ersten NFV im entorhinalen Kortex war auf die APOE  $\epsilon 3/3$ -Gruppe beschränkt (s.a. Abb. 4). Bei den APOE  $\epsilon 4$ -Allelträgern fand sich solch ein vorübergehender Anstieg nicht. Diese Gruppe zeigte jedoch im Stadium NFV 0 höhere ApoE-Werte als die APOE  $\epsilon 3$ -Homozygoten (Abb. 4). In der APOE  $\epsilon 4/x$  Braak NFV 0-Untergruppe zeigten zwei der sechs Fälle SP in allen isokortikalen Assoziationszentren sowie eine mäßig betroffene Hippokampusformation (A $\beta$  Braak-Stadium B). Der höhere hippocampale ApoE-Gehalt in gerade diesen beiden Fällen (s.a. Abschnitt: 4.2.1.1 Gesamt-ApoE in Korrelation zu neurofibrillären Veränderungen) könnte eine Reaktion auf den beginnenden pathologischen Prozeß widerspiegeln. A $\beta$  kann Astrozyten aktivieren<sup>81</sup> und diese Aktivierung kann zu einer erhöhten ApoE-Synthese in den Astrozyten führen<sup>28,34,70,129</sup>. Aber weder in der Braak NFV 0-Gruppe noch in den Stadien I/II zeigten die APOE  $\epsilon 4$ -Allelträger so hohe ApoE-Werte wie die APOE  $\epsilon 3/3$  Stadien I/II-Gruppe. Ein Vergleich der Gehirne mit weit verbreiteten NFV und A $\beta$

Ablagerungen (Endstadium der DAT) zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypgruppen.

Die gefundenen Veränderungen waren nicht abhängig vom kalendarischen Alter allein, ohne Berücksichtigung der NFV. Sowohl bei jüngeren als auch bei älteren APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten fand sich eine klare Beziehung der hippocampalen ApoE-Werte zu neuropathologischen Veränderungen (s. Abb. 8A und Tab. 11). Fälle mit Braak-Stadium NFV I/II zeigten im Durchschnitt höhere ApoE-Werte als Fälle ohne neuropathologische Veränderungen und Fälle mit ausgedehnten NF Degenerationen (nur >65 Jahre).

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass APOE  $\epsilon$ 3-homozygote Individuen zu Beginn des pathologischen Prozesses, der zu den DAT-assoziierten Störungen des Zytoskeletts führt, quantitativ oder qualitativ andere Kompensationsmöglichkeiten zur Verfügung haben als Individuen, die das Risikoallel APOE  $\epsilon$ 4 tragen. Der Mechanismus, der diese unterschiedlichen ApoE-Spiegel bedingt, kann mit dieser Studie nicht geklärt werden. Hier wurden letztlich Nettoeffekte bestimmt, so dass eine Aussage darüber, ob die hier präsentierten Daten durch eine veränderte Synthese und/oder Degradation des Proteins bedingt sind, nicht möglich ist.

Betrachtet man die Amyloidpathologie unabhängig von den NFV, fanden sich bei den APOE  $\epsilon$ 4-Allelträgern mehr SPs sowohl in der Anzahl der Plaques als auch im Anteil höherer Braak-Stadien (Stadium C) als bei den APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten. Obwohl für die Studie eine umfangreiche Hirnbank zur Verfügung stand und die beiden Genotypgruppen so genau wie möglich im Schweregrad der Pathologie (Schwerpunkt war die Tau-Pathologie) abgeglichen wurden, zeigten die APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger mehr A $\beta$  Ablagerungen und früher im Verlauf der Erkrankung als die APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten mit gleichen NFV. Die Beobachtung, dass APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger mehr und früher SP zeigen, wurde schon in frühen Studien berichtet<sup>51,114,127</sup>. Eine signifikante Korrelation vom Braak-Stadium für A $\beta$  zum hippocampalen ApoE-Gehalt fand sich jedoch in keiner der beiden Genotypgruppen (Tab. 8).

Der verminderte ApoE-Gehalt im Hippokampus von DAT-Hirnen, der von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde<sup>12,17,55,104,113,138</sup>, könnte also

tatsächlich den hier beschriebenen Unterschied im ApoE-Gehalt zwischen den transentorhinalen/entorhinalen Stadien I/II und den isokortikalen Endstadien V/VI widerspiegeln. Ein Vergleich der Hirne ohne DAT-assoziierte Veränderungen mit den Endstadien zeigte in keiner der Genotypgruppen signifikante Unterschiede im hippocampalen ApoE-Gehalt. Dies stimmt mit den Beobachtungen zweier Arbeitsgruppen<sup>52,112</sup> überein, die keinen Unterschied im ApoE-Gehalt im Frontalkortex von Alzheimerpatienten und Kontrollen fand. Zwei Arbeitsgruppen beschrieben einen erhöhten ApoE-Gehalt im DAT-Hirn im Vergleich zur Kontrollgruppe<sup>2,73</sup>. In der APOE ε3/3-Gruppe, der häufigsten genetischen Variante des APOE-Polymorphismus, fand sich in der hier vorliegenden Studie in den Gehirnen mit hohen Braak-Stadien immer noch ein höherer ApoE-Gehalt als in den Hirnen ohne pathologische Veränderungen (Braak-Stadium 0).

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen eine Korrelation des ApoE-Gehalts zum Schweregrad der NFV im Hippokampus, einer Hirnregion, die im Verlauf einer DAT frühzeitig und nachhaltig betroffen ist. Der Anstieg des ApoE-Gehalts in den frühen Stadien der Pathologie zeigte eine Abhängigkeit vom APOE-Genotyp. Eine Korrelation zur Amyloidpathologie, deren Prädilektionsstelle isokortikale Areale sind, fand sich hier nicht. Ein Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Untersuchungen lässt vermuten, dass der ApoE-Gehalt in Abhängigkeit von der regional unterschiedlich ausgeprägten Pathologie in verschiedenen Hirnarealen im Verlauf einer DAT variiert. Möglicherweise unterliegt die ApoE-Expression auch regional unterschiedlichen Regulationsmechanismen<sup>129</sup>. Die in der Literatur gefundenen, zum Teil widersprüchlichen Angaben zur ApoE-Expression in Abhängigkeit von Pathologie und/oder Genotyp beruhen vermutlich eher auf der Auswahl der untersuchten Fälle als auf Unterschieden in der Analytik. Genotypabhängige Unterschiede würden immer dann offensichtlich werden, wenn die APOE ε3/3-Gruppe mehr Individuen mit einer weniger stark ausgeprägten Pathologie enthält als die der APOE ε4-Allelträger.

### **5.1.2 Was können die unterschiedlichen ApoE-Spiegel für die Entwicklung der DAT bedeuten?**

In vitro Studien und ex vivo Untersuchungen zeigten einen Einfluss des APOE-Polymorphismus auf die neuronale Plastizität. Der Besitz des APOE ε4-Allels oder das

Vorhandensein von ApoE 4 war assoziiert mit eingeschränkter Mikrotubuliformation und Neuritenwachstum in Spinalganglienzellen vom Kaninchen<sup>92</sup> und in einer Neuroblastomzelllinie<sup>15,93</sup>. In postmortalen Untersuchungen an DAT-Fällen fand sich eine herabgesetzte Synaptophysin-IR im Frontalkortex, die bei APOE ε4-Allelträgern noch stärker vermindert war als bei DAT-Fällen, die das Risikoallel nicht aufwiesen<sup>84</sup>. Der Besitz des APOE ε4-Allels war ebenfalls assoziiert mit einer ineffizienten dendritischen Plastizität im DAT-Hirn<sup>4</sup>. Die reparative Kapazität, wie sie von Arendt et al.<sup>4</sup> definiert wurde, nimmt im Verlauf einer DAT ab, während der Neuronenverlust fortschreitet. In den frühen Stadien der Erkrankung beschrieben Arendt et al. einen signifikanten Unterschied in dieser Kapazität zwischen den unterschiedlichen Genotypen (APOE ε3/3, 4/3, 4/4) mit der höchsten reparativen Kapazität bei den APOE ε3-Homozygoten. Mit dem Fortschreiten der DAT verschwand dieser Unterschied jedoch. Die niedrigen ApoE-Werte in den Braak-Stadien V/VI, die in der hier vorliegenden Studie in beiden Genotypgruppen gleichermaßen gefunden wurden, könnten die Erschöpfung dieser angenommenen reparativen Kapazität in den APOE ε3/3-Fällen durch den fortschreitenden Neuronenverlust widerspiegeln. Das Fehlen eines signifikanten Anstiegs des ApoE in den frühen Stadien der DAT in der APOE ε4/x-Gruppe könnte zu der herabgesetzten reparativen Kapazität in diesen Fällen beitragen, eben genau dann, wenn hippocampale Neurone aufgrund der gestörten Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex plastisch reagieren sollten. Gehirne mit frühen Stadien der DAT-Pathologie unterliegen wahrscheinlich erheblichen plastischen Veränderungen<sup>89,152</sup>. Gerade die Prädilektionsstellen für NFV, wie der entorhinale Kortex, behalten die Fähigkeit zur neuroplastischen Umstrukturierung lebenslang<sup>5,25</sup>. In den frühen Braak-Stadien sind die NFV auf den entorhinalen Kortex beschränkt, wo sie in den Neuronen zu finden sind, die den Tractus perforans, die Hauptafferenz für den Hippokampus, bilden. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Deafferenzierung des Hippokampus<sup>59</sup>. Die experimentelle Deafferenzierung des Hippokampus durch Läsion des entorhinalen Kortex (ECL) führt zu einem Anstieg des hippocampalen ApoE auf der mRNA- und auf der Proteinebene<sup>108,139</sup> und zu nachhaltigen dendritischen Veränderungen in der Ratte und beim Affen<sup>83,96</sup>. Veränderungen der Dendriten, wie die im Tierexperiment gefundenen<sup>83,96</sup>, finden sich auch im humanen Hippokampus in Abhängigkeit von den NFV. Im Stadium II kommt es zu einem vorübergehenden Auswachsen solcher Dendriten, was mit Fortschreiten der Deafferenzierung zurückgeht<sup>99</sup>. Körnerzellen im Gyrus dentatus, die die Hauptafferenz

über den Tractus perforans erhalten, zeigen altersabhängig und im Verlauf einer DAT Veränderungen ihres Dendritenbaumes<sup>38,39</sup>. Später konnte gezeigt werden<sup>99</sup>, dass in Gehirnen mit frühen Braak-Stadien Neurone im Gyrus dentatus tendenziell längere und reicher verzweigte apikale Dendritenbäumen aufweisen als die in reinen Kontrollhirnen. Mit Fortschreiten der Pathologie nahmen Länge und Verzweigung der Dendritenbäume signifikant ab. Diese Studie untersuchte Parvalbumin-positive Neurone, die keine NFV zeigen. Die plastische Umstrukturierung des apikalen Dendritenbaumes beruht also sehr wahrscheinlich auf der gestörten Afferenz und nicht auf pathologischen Veränderungen des Zytoskeletts der Zellen selbst. Der genetische APOE-Polymorphismus fand in diesen früheren Studien zu plastischen Phänomenen im Verlauf der DAT keine Berücksichtigung, aber es ist wahrscheinlich, dass in den frühen Braak-Stadien I/II APOE  $\epsilon$ 3-homozygote Individuen überrepräsentiert sind. In den meisten Studien wird versucht, Kontrollen und DAT-Fälle möglichst genau in Alter und natürlichem Geschlecht abzugleichen. Individuen, die das Risikoallel APOE  $\epsilon$ 4 tragen, weisen aber im höheren Lebensalter meistens fortgeschrittene DAT-assoziierte neuropathologische Veränderungen auf. All diese Studien legen nahe, dass, abhängig vom Braak-Stadium, hippocampale Neurone plastisch reagieren als ein Versuch, die funktionellen Folgen des Neuronenverlustes zu kompensieren<sup>89,152</sup>.

Eine weitere Studie an Parvalbumin-positiven Interneuronen im CA1-Sektor des Hippokampus konnte zeigen, dass es primär, also bevor es zu der beschriebenen Deafferenzierung kommt, keine Unterschiede im Dendritenbaum zwischen APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten und APOE  $\epsilon$ 4-Allelträgern gibt. Es wurden ebenfalls die hippocampalen ApoE-Spiegel bestimmt, wobei sich ein Trend zu höheren Werten bei den APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten in den Stadien I/II fand. Eine aussagekräftige Statistik war hier aber aufgrund der geringen Gruppengröße nicht möglich.

Folgt man der vorgeschlagenen Rolle für ApoE bei neuronaler Plastizität<sup>108,139</sup>, liegt es nahe, die hier gefundenen genotypabhängigen Unterschiede im ApoE-Gehalt in den frühen Braak-Stadien mit der eingeschränkten neuronalen Plastizität bei den APOE  $\epsilon$ 4-Allelträgern in Verbindung zu bringen, die zu dem früheren Beginn der DAT bei diesen Individuen beitragen kann.

## 5.2 Apolipoprotein D

### 5.2.1 Eigene Ergebnisse im Vergleich zu vorliegenden Daten

ApoD wurde im Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen des ZNS untersucht. Die Studien, die die ApoD-Expression in Bezug auf Vorliegen einer DAT (klinische Diagnose) bzw. DAT-assoziiierter neuropathologischer Veränderungen (verschiedene neuropathologische Diagnosekriterien) untersuchten, lieferten z.T. widersprüchliche Ergebnisse (s. Tab. 2).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Anstieg des hippokampalen ApoD-Gehalts in Korrelation mit der Schwere der DAT-assoziierten intraneuronalen Pathologie (NFV) nicht jedoch mit dem Braak-Stadium für extrazelluläre SP gefunden. Folgt man der Braak'schen Einteilung der DAT-assoziierten NFV wird die Stadienabhängigkeit der Pathologie insbesondere in den kortikalen Assoziationszentren deutlich. Hier könnten Unterschiede früherer Studiendaten (BA 9 vs. BA 10) begründet sein. Immunohistochemisch wurde ApoD, im Gegensatz zu ApoE, nicht in Assoziation mit NFT<sup>14,52,63</sup> gefunden. Bezüglich A $\beta$  sind die Daten widersprüchlich. Eine Arbeit zeigte eine Kolo-kalisation mit A $\beta$ <sup>60</sup>, andere Studien<sup>52,63</sup> fanden aber keine ApoD-IR in SP.

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem gefundenen ApoD-Anstieg um ein altersabhängiges Phänomen handelt wie andere Autoren vermutet hatten<sup>31,63,142</sup>, wurden alte und „jüngere“ APOE  $\epsilon$ 3-Homozygote ohne oder mit nur geringen NFV untersucht. Es fand sich keine Korrelation der hippokampalen ApoD- (wie der ApoE-) Werte zum kalendarischen Alter allein (Abb. 9).

Der Anstieg des ApoD-Gehalts mit der Schwere der NFV beschränkte sich jedoch auf die APOE  $\epsilon$ 3-homozygoten Fälle. Bei den APOE  $\epsilon$ 4-Allelträgern fanden sich keine signifikanten Veränderungen des ApoD-Gehalts in den verschiedenen Gruppen, wengleich auch hier eine Tendenz zu ansteigenden ApoD-Werten bis zum Stadium III zu sehen war (Abb. 7).

Wie in vorherigen Untersuchungen<sup>63</sup> fand sich auch in dieser Studie eine recht beachtliche interindividuelle Streuung der ApoD-Werte. Besonders auffällig war dies in Fällen ohne oder mit nur geringen DAT-assoziierten Veränderungen. In Fällen mit

schweren NFV war diese Variabilität herabgesetzt. In den Proben ohne NFV fanden sich in der APOE  $\epsilon$ 3/3-Gruppe signifikant höhere ApoD-Werte als bei den APOE  $\epsilon$ 4-Allelträgern. Im Gegensatz zu den ApoE-Werten blieb dieser Unterschied auch bestehen, wenn die Fälle mit Amyloidablagerungen (Braak NFV 0, aber A $\beta$  A,B oder C) aus der Analyse herausgenommen wurden (s. Tab. 9 und Abb. 6). Die Gruppe ohne DAT-assoziierte neuropathologische Veränderungen war die kleinste Gruppe und, bezüglich der ApoD-Werte, auch die heterogenste. Die weite Streuung der Werte in dieser Gruppe könnte darin begründet sein, dass als Stadium 0 zum einen auch Fälle diagnostiziert werden, die bereits erste Störungen im Vorfeld einer DAT aufweisen, ohne jedoch schon die klassischen histopathologischen Veränderungen (NFV, SP) zu zeigen, zum anderen aber eben Fälle, die nie eine DAT entwickeln werden. Andererseits könnte man vermuten, dass in den weit fortgeschrittenen Stadien der DAT die starke Schädigung des Hippokampus die Variabilität einschränkt. Es ist nicht wahrscheinlich, dass die weite Streuung der Werte in der Gruppe ohne DAT-assoziierte neuropathologische Veränderungen durch Unterschiede im postmortalen Intervall begründet ist. In den Pilotversuchen erwies sich ApoD als stabil. Auch zeigte sich keine Korrelation des Apolipoproteingehalts der Proben von der Länge des postmortalen Intervalls der 104 Fälle.

In mehreren Studien<sup>14,52,138,141</sup> wurde die ApoD-Expression unter Berücksichtigung des APOE-Polymorphismus untersucht. Liquor-ApoD zeigte bei DAT-Patienten eine positive Korrelation zur Anzahl der APOE  $\epsilon$ 4-Allele, bei den hippocampalen Gewebshomogenaten bestand eine solche Beziehung jedoch nicht<sup>138</sup>. In Proteinextrakten aus dem Frontalkortex wurde ebenfalls keine Korrelation zum APOE  $\epsilon$ 4-Allelträgerstatus gefunden<sup>52,141</sup>. Im Gegensatz hierzu beschrieben Belloir et al<sup>14</sup> eine positive Korrelation zwischen ApoD-IR in der Hippokampusformation und Besitz eines APOE  $\epsilon$ 4-Allels. In dieser Studie wiesen die APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger eine schwerere Pathologie (höhere Braak-Stadien) auf als die APOE  $\epsilon$ 3-homozygoten Fälle. Die APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger zeigen DAT-assoziierte neuropathologische Veränderungen eher, d.h. in jüngerem Alter, als APOE  $\epsilon$ 3-homozygote Individuen. Werden APOE-Genotypgruppen bezüglich des kalendarischen Alters aneinander angeglichen ohne Berücksichtigung des Schweregrades der Pathologie (also Unterteilung in DAT bzw. non-DAT ohne Stadieneinteilung), besteht die Wahrscheinlichkeit, dass die APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger eben schwerer ausgeprägte neuropathologische Veränderungen (höhere Braak Stadien)

aufweisen als die APOE ε3-Homozygoten. In der hier vorliegenden Untersuchung wurde bei den APOE ε4-Allelträgern ein niedrigerer hippocampaler ApoD-Gehalt in den in der Histopathologie (und in Alter wie Geschlecht) abgeglichenen Gruppen gefunden. Dieser Unterschied erreichte in den Stadien NFV V/VI statistische Signifikanz. Auch regionale Unterschiede könnten die von einander abweichenden Ergebnisse mitbedingen. NFV sind im Frontalkortex weniger ausgeprägt als in der Hippokampusformation.

### **5.2.2 Welche Rolle könnte ApoD bei der Entwicklung der DAT spielen?**

Ong et al <sup>101</sup> vermuteten, dass ApoD in Neuronen exprimiert wird, die so stark geschädigt sind, dass sie zugrunde gehen werden, und schlug eine Rolle für ApoD im Transport von Arachidonsäure für die Prostaglandinsynthese vor. Eine solche hypothetische Rolle für ApoD im Arachidonsäurestoffwechsel, entweder für die Prostaglandinbiosynthese oder in der Beeinflussung des Membranphospholipidgehalts, fände Unterstützung durch Daten, die bei psychiatrischen Patienten erhoben wurden <sup>140</sup>. Störungen im Arachidonsäurestoffwechsel und Veränderungen in der Membranzusammensetzung an Phospholipiden und Fettsäuren wurden im Frontalkortex schizophrener Patienten beschrieben (Übersichtsarbeit bei <sup>57</sup>), wo Thomas et al <sup>140</sup> erhöhte ApoD-Spiegel fanden. ApoD bindet Arachidonsäure mit hoher Affinität <sup>88,149</sup>. Auch in der Pathogenese der DAT scheint Arachidonsäure als Modulator der Membranorganisation, insbesondere der synaptischen Membran, und als limitierendes Substrat für die Eicosanoidsynthese von Bedeutung zu sein. Die Erhöhung verschiedener proinflammatorischer Abkömmlinge des Arachidonsäurestoffwechsels in den betroffenen Gehirnen ist lange bekannt (Übersicht bei <sup>10</sup>). Die mit der Schwere der NVF korrelierende Erhöhung der ApoD-Werte wäre dann eher im Zusammenhang mit einem begleitenden entzündlichen Geschehen zu sehen als durch die Tau-Pathologie selbst bedingt oder ursächlich für diese.

Die hier gefundenen, NFV-Stadien abhängig, ansteigenden hippocampalen ApoD-Werte bei den APOE ε3-Homozygoten könnten auch einen Schutz vor oxidativem Stress bedeuten. Folgt man den Daten von Nunomura et al <sup>97</sup> und dem von Ramassamy <sup>113</sup> gezeigten Befund, wonach die peroxidablen Phospholipide im Hippokampus von DAT-Fällen (also vermutlich ab NFV Braak-Stadium IV) bei APOE

$\epsilon$ 3-Homozygoten weniger stark oxidiert sind als bei APOE  $\epsilon$ 4-Allelträgern, könnten die hier gefundenen ApoD-Werte mit dem Redoxungleichgewicht in diesen Gehirnen zusammenhängen. Bis Stadium NFV III zeigen beide Genotypgruppen die Tendenz zu ansteigenden hippokampalen ApoD-Werten. Ab Stadium IV stagnieren diese Werte in der APOE  $\epsilon$ 4/x-Gruppe, während bei den APOE  $\epsilon$ 3-Homozygoten ApoD weiter ansteigt (s.a. Abb. 7).

Bezüglich der Amyloidpathologie bestand in der vorliegenden Arbeit kein so klarer Zusammenhang zur Schwere der Veränderungen. Es bestand eine Tendenz zu ansteigenden ApoD-Werten bis Stadium B. Bei den APOE  $\epsilon$ 4-Allelträgern zeigte Stadium A niedrige ApoD-Werte. Dieser Wert ist schwer zu interpretieren, da die Gruppengröße zu klein ist (n=3). Im Stadium C zeigten aber beide Genotypgruppen die Tendenz zu niedrigeren Werten als im Stadium B (s. Tab. 10). Folgt man der Argumentation Smiths und Perrys<sup>130</sup>, die die Amyloidablagerungen in Gehirnen von DAT-Patienten nicht als ursächliche Noxe, sondern als Schutz, vor allem als Antioxidans, diskutieren, könnte das leichte Abfallen der ApoD-Werte im Aß Braak-Stadium C Ausdruck eines kompensatorischen Mechanismus durch die extrazellulären Amyloidablagerungen sein. APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger zeigen früher und ausgeprägtere SP als APOE  $\epsilon$ 3-Homozygote. Betrachtet man ApoD im Zusammenhang mit einem neuroinflammatorischen Geschehen oder oxidativem Stress, könnten die niedrigeren ApoD-Spiegel bei den APOE  $\epsilon$ 4-Allelträgern mit den ausgeprägteren Amyloidablagerungen in dieser Gruppe in Zusammenhang stehen (s.a. Pkt. 4.2.1.2).

Zwei Arbeiten zeigten, dass ApoD das Hämabbauprodukt Bilirubin binden kann<sup>46,103</sup>, eine andere Studie konnte das mit einem bakteriellen Expressionssystem für ApoD jedoch nicht bestätigen<sup>149</sup>. Bilirubin hat antioxidative Eigenschaften und könnte bei der Bekämpfung von oxidativem Stress auch im ZNS von Bedeutung sein. Es fand sich eine signifikante Erhöhung von Bilirubin im Liquor von DAT-Patienten, aber nicht bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen<sup>68</sup>. Die Erhöhung der Bilirubinwerte zeigte aber keine Beziehung zur Schwere der Erkrankung (klinische Diagnose) oder zum APOE Genotyp. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die durch verschiedene Stimuli, wie z.B. durch oxidativen Stress, induzierbare Hämoxxygenase-1, die die Bilirubinbildung katalysiert, im ZNS von DAT-Patienten in Verbindung mit NFV verstärkt nachweisbar ist<sup>131</sup>. Die Autoren interpretierten diese Daten im Zusammenhang mit einer verstärkten Bilirubinsynthese im Gehirn zur

Abwehr von oxidativem Stress. ApoD könnte als Transportprotein für Bilirubin für den antioxidativen Schutz von Bedeutung sein. Die niedrigeren ApoD-Werte im Aß Braak-Stadium C im Vergleich zu Stadium B könnten die antioxidativen Eigenschaften von Amyloidplaques widerspiegeln<sup>130</sup>. Inwieweit diese Mechanismen aber spezifisch sind für die DAT, ist nicht klar, denn eine intrathekale ApoD-Erhöhung findet sich auch bei anderen neurologischen Erkrankungen<sup>115,138</sup>.

### **5.3 Wie könnten die Veränderungen von ApoE und ApoD zusammenhängen?**

#### **5.3.1 Cholesterinrecycling**

In früheren Untersuchungen zu De- und Regenerationsvorgängen von Nerven im PNS war neben einem massiven ApoE-Anstieg auch ein starkes Ansteigen von ApoD nach experimenteller Nervendurchtrennung gefunden worden<sup>22</sup>. Für beide Apolipoproteine wurde hierbei eine Rolle im Cholesterintransport bzw. in der vorübergehender Speicherung der bei der Läsion freiwerdenden Membranbausteine bis zu ihrer Wiederverwertung bei der Regeneration des Nerven diskutiert. Auch im ZNS wurden nach experimentell gesetzten Läsionen massive Anstiege sowohl von ApoE<sup>21,109,156</sup> als auch von ApoD gefunden<sup>42,87,101,139</sup>. Die Hochregulation der Apolipoproteine wurde auch hier mit einem erhöhten Cholesterinbedarf während der plastischen Reorganisation der geschädigten<sup>21,42,87,101</sup> resp. deafferenzierten<sup>108,109,139,156</sup> Struktur in Verbindung gebracht.

Die hier gefundenen Daten, wonach APOE ε4-Allelträger, obwohl sie eher und vielleicht auch ausgeprägter neurodegenerative Veränderungen zeigen als APOE ε3-Homozygote, keine statistisch signifikanten Unterschiede im ApoD-Gehalt aufweisen, passen nicht in diese Argumentationslinie, die beide Apolipoproteine mit dem Cholesterintransport in Verbindung bringt.

#### **5.3.2 Oxidativer Stress**

Oxidative Schäden werden als ursächlich diskutiert für das Altern und spielen bei der Entwicklung der DAT eine Rolle<sup>11</sup>. Verschiedene Arbeiten zeigen eine Verbindung zwischen dem APOE-Genpolymorphismus und den oxidativen Schäden im Gehirn von

DAT-Patienten. ApoE zeigt isoformabhängig antioxidatives Potential, wobei ApoE4 im Zellkulturexperiment Rattenneurone am schlechtesten vor oxidativen Zellschäden schützen konnte, während die mit Langlebigkeit assoziierte Isoform des Proteins, ApoE2, das stärkste antioxidative Potential zeigte<sup>85</sup>. ApoE selbst kann oxidativ verändert werden. Hierdurch kann sich die Proteinstruktur verändern, es wird eher proteolytisch abgebaut und kann weniger effizient mit Phospholipiden interagieren. Die Isoformen zeigen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Schäden, wobei auch hier ApoE4 am schlechtesten abschneidet, während die als protektiv gegen die Alzheimer'sche Erkrankung diskutierte Isoform ApoE2 am wenigsten vulnerabel ist<sup>62</sup>. Verschiedene Studien zeigten eine Abhängigkeit der mit der DAT assoziierten neuronalen oxidativen Schäden vom APOE-Genotyp<sup>86,113,137</sup>. Der Besitz des APOE ε4-Allels ist mit einer verstärkten Lipidperoxidation verbunden. In allen drei Studien wurden kumulative Veränderungen der Membranlipide bestimmt. Untersucht wurden verschiedene Hirnregionen, eine Stadieneinteilung der neuropathologischen Veränderungen wurde nicht durchgeführt. Nunomura und Kollegen<sup>97</sup> konnten zeigen, dass der oxidative Stress in den frühen Stadien der Erkrankung hoch ist und mit dem Fortschreiten der Erkrankung abnimmt. Diese Studie untersuchte oxidative RNA-Schäden und Proteinmodifikationen, die nicht akkumulieren, in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten und zeigte, dass der akute oxidative Stress mit der Erkrankungsdauer, mit der Anzahl extrazellulärer Amyloidplaques und mit dem Auftreten intrazellulärer NFV abnimmt. Die Anzahl der Amyloidablagerungen korrelierte in allen DAT-Fällen mit der Erkrankungsdauer, jedoch war dies bei den APOE ε4-Allelträgern sehr viel ausgeprägter (s.a. Pkt. 4.2.1.2 und Pkt. 5.1.1 Absatz 5). Nur bei den APOE ε4-Allelträgern bestand ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Zunahme der Amyloidplaques und der Abnahme des akuten oxidativen Stresses, während die Korrelation zu den NFV unabhängig war vom APOE-Genotyp. Einen direkten Einfluss auf die Marker für oxidativen Stress hatte der APOE-Genotyp in jener Studie nicht.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen relativ hohen ApoE-Werte in den frühen Braak-Stadien in der APOE ε3/3-Gruppe könnten protektiv gegenüber oxidativem Stress wirken. Die höheren Werte in der APOE ε4/x-Gruppe ohne NFV könnten Ausdruck einer höheren oxidativen Belastung, z.B. durch intraneuronal akkumulierendes Aβ<sup>48</sup>, sein (s.a. Pkt. 4.2.1.2).

## 6 Schlussfolgerung

Die hier gefundenen Daten weisen daraufhin, dass der mit einer Erhöhung des DAT-Risikos assoziierte Polymorphismus im APOE-Gen in den frühen, d.h. präklinischen Stadien der Erkrankung zum Tragen kommt. Dies kann ursächlich bedingt sein durch die isoformabhängige Beeinflussung des Lipidstoffwechsels durch das Genprodukt ApoE. Eine pharmakologische Beeinflussung z.B. des Cholesterinstoffwechsels würde in den präklinischen Stadien vorteilhaft sein, solange die reparative Kapazität des Gehirns noch nicht erschöpft ist.

Die Rolle von ApoD in der Pathogenese der DAT scheint nicht mit dem Cholesterintransport in Verbindung zu stehen oder in anderer Weise der von ApoE zu entsprechen. Die nachweisbaren Proteinmengen deuten auf unterschiedliche Expressionsmuster der beiden Apolipoproteine hin. Auch fand sich hier kein Hinweis darauf, dass APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger kompensatorisch ApoD exprimieren, um niedrige ApoE-Werte auszugleichen. Die hier gefundenen Daten weisen eher darauf hin, dass ApoD bei nicht mit dem Cholesterintransport in Zusammenhang stehenden Prozessen, wie dem gestörten Redoxgleichgewicht im DAT-Hirn von Bedeutung sein könnte.

## 7 Zusammenfassung

Die Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT) ist der häufigste Grund für eine Demenz im höheren Lebensalter. Neuropathologische Kennzeichen der Erkrankung sind fibrilläre Veränderungen in den Neuronen (NFV) und extrazelluläre Amyloidplaques. Der bedeutendste Risikofaktor für die DAT ist, neben dem Alter, ein Polymorphismus im Gen des Lipidtransportmoleküls Apolipoprotein E (APOE, Gen; ApoE, Protein). Der entscheidende Pathomechanismus, warum der Besitz des APOE  $\epsilon$ 4-Allels mit diesem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert ist, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Neben funktionellen Unterschieden der Isoformen könnte auch die quantitative Verfügbarkeit des Proteins bei der Pathogenese der DAT eine Rolle spielen, worauf eine Assoziation von Polymorphismen im APOE-Promotor mit einem erhöhten DAT-Risiko hinweisen. Die Literaturangaben zum ApoE-Gehalt im Hirn in Abhängigkeit von Diagnose und/oder Genotyp sind widersprüchlich. Da ApoE als Lipidtransporter insbesondere bei plastischen Umbauprozessen in Gehirn wichtig sein könnte, erschien es sinnvoll, den Proteingehalt weniger in Abhängigkeit von der Diagnose (DAT oder nicht) als vielmehr in Korrelation zur Schwere der Veränderungen (z.B. entsprechend der neuropathologischen Stadieneinteilung der DAT nach der Braak) zu untersuchen.

Neben ApoE wurden auch andere Apolipoproteine wie Apolipoprotein D (ApoD) in der Pathogenese der DAT diskutiert. Wie ApoE steigt ApoD nach experimentellen Nervenläsionen und nach Läsion des entorhinalen Kortex, welche die Hauptafferenz zum Hippokampus zerstört, stark an. Um herauszufinden, ob es hier eine Beziehung zur Entwicklung der NFV oder von Amyloidplaques und dem APOE-Polymorphismus gibt, wurden auch Veränderungen im hippokampalen ApoD-Gehalt bestimmt.

Untersucht wurde der Apolipoproteingehalt in 104 nach Alter, Geschlecht, Braak-Stadium und APOE-Genotyp abgeglichenen Hippokampusproben, da diese Hirnregion im Verlauf einer Demenz früh und nachhaltig betroffen ist. Es erfolgte ein semiquantitativer, immunhistochemischer Nachweis mittels Western Blot, um den Proteingehalt verschiedener Proben miteinander vergleichen zu können.

Die Untersuchung zeigte einen Anstieg des hippokampalen ApoE in den frühen Stadien der Erkrankung mit neurofibrillären Veränderungen im entorhinalen Kortex und

nachfolgend eine Verminderung von ApoE mit dem Fortschreiten der pathologischen Veränderungen. Im Gegensatz hierzu stieg der ApoD-Gehalt mit der Schwere der neurofibrillären Veränderungen kontinuierlich an. Die Veränderungen waren jedoch im Wesentlichen auf die APOE ε3/3-Proben beschränkt. In den Proben, die das Risikoallel APOE ε4 trugen, waren keine statistisch signifikanten Veränderungen nachweisbar.

Keines der beiden Apolipoproteine zeigte eine Abhängigkeit von der Ausbreitung/Schwere der Amyloidablagerungen.

Die ApoE-Daten sprechen dafür, dass APOE ε3-homozygote Individuen zu Beginn der DAT-assoziierten NFV andere Reparationsmechanismen zur Verfügung haben könnten als Menschen, die das Risikoallel APOE ε4 besitzen. Hier könnte eine Erklärung dafür liegen, dass APOE ε4-Allelträger früher an einer DAT erkranken. Der mit dem Fortschreiten der NFV verbundene ApoD-Anstieg in der APOE ε3/3-Gruppe könnte ein zusätzlicher protektiver Faktor sein.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Ackermann H. (1991) BIAS - A programme package for biometrical analysis of samples. *Comp. Stat.* 11, 223-224.
2. Aizawa Y., Fukatsu R., Takamaru Y., Tsuzuki K., Chiba H., Kobayashi K., Fujii N., and Takahata N. (1997) Amino-terminus truncated apolipoprotein E is the major species in amyloid deposits in Alzheimer's disease-affected brains: a possible role for apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 768, 208-214.
3. Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Centralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie*, 177-179.
4. Arendt T., Schindler C., Brückner M.K., Eschrich K., Bigl V., Zedlick D., and Markova L. (1997) Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein e4 allele. *J. Neurosci.* 17, 516-529.
5. Arendt T., Bruckner M.K., Gertz H.J., and Marcova L. (1998) Cortical distribution of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease matches the pattern of neurons that retain their capacity of plastic remodelling in the adult brain. *Neurosci.* 83, 991-1002.
6. Balbin M., Freije J.M., Fueyo A., Sanchez L.M., and Lopez-Otin C. (1990) Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem. J.* 271, 803-807.
7. Baner C., Jellinger K., Lassmann H., Fischer P., and Leblhuber F. (1996) Correlations between mental state and quantitative neuropathology in the Vienna Longitudinal Study on Dementia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 246, 137-146.
8. Bao F., Arai H., Matsushita S., Higuchi S., and Sasaki H. (1996) Expression of apolipoprotein E in normal and diverse neurodegenerative disease brain. *Neuroreport* 7, 1733-1739.
9. Barger S.W. and Harmon A.D. (1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* 388, 878-881.
10. Bazan N.G., Colangelo V., and Lukiw W.J. (2002) Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 197-210.
11. Beal M.F. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 38, 357-366.

12. Beffert U., Cohn J.S., Petit Turcotte C., Tremblay M., Aumont N., Ramassamy C., Davignon J., and Poirier J. (1999) Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease- related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res.* 843, 87-94.
13. Beffert U. and Poirier J. (1996) Apolipoprotein E, plaques, tangles and cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777, 166-174.
14. Belloir B., Kövari E., Surini-Demiri M., and Savioz A. (2001) Altered apolipoprotein D expression in the brain of patients with Alzheimer disease. *J. Neurosci. Res.* 64, 61-69.
15. Bellosta S., Nathan B.P., Orth M., Dong L.M., Mahley R.W., and Pitas R.E. (1995) Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 270, 27063-27071.
16. Benzing W.C. and Mufson E.J. (1995) Apolipoprotein E immunoreactivity within neurofibrillary tangles: relationship to Tau and PHF in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 132, 162-171.
17. Bertrand P., Poirier J., Oda T., Finch C.E., and Pasinetti G.M. (1995) Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 33, 174-178.
18. Beyreuther K. and Masters CL (1990) Nomenclature of Amyloid A4 Proteins and Their Precursors in Alzheimers Disease and Downs Syndrome. *Neurobiol. Aging.* 11, 66-68.
19. Bickel H. (2000) Demenzsyndrom und Alzheimer Krankheit: Eine Schätzung des Krankenbestandes und der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland. [Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany]. *Gesundheitswesen* 62, 211-218.
20. Blanco Vaca F., Via D.P., Yang C.Y., Massey J.B., and Pownall H.J. (1992) Characterization of disulfide-linked heterodimers containing apolipoprotein D in human plasma lipoproteins. *J. Lipid Res.* 33, 1785-1796.
21. Boschert U., Merlo Pich E., Higgins G., Roses A.D., and Catsicas S. (1999) Apolipoprotein E expression by neurons surviving excitotoxic stress. *Neurobiol. Dis.* 6, 508-514.
22. Boyles J.K., Notterpek L.M., and Anderson L.J. (1990) Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 265, 17805-17815.

23. Boyles J.K., Pitas R.E., Wilson E., Mahley R.W., and Taylor J.M. (1985) Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* 76, 1501-1513.
24. Braak H. and Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 82, 239-259.
25. Braak H. and Braak E. (1996) Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 92, 197-201.
26. Braak H., Duyckaerts C., Braak E., and Piette F. (1993) Neuropathological staging of Alzheimer related changes correlates with psychometrically assessed intellectual status. *Alzheimer's Disease: Advances in Clinical and Basic Research* 131-137.
27. Bullido M.J. and Valdivieso F. (2000) Apolipoprotein E gene promoter polymorphisms in Alzheimer's disease. *Microscopy Res. Tech.* 50, 261-267.
28. Cedazo-Minguez A., Hamker U., Veh R., Meske V., Albert F., Cowburn R.F., and Ohm T.G. (2001) Regulation of apolipoprotein E secretion in rat primary hippocampal astrocyte cultures. *Neurosci.* 105(3), 651-661.
29. Colton C.A., Brown C.M., and Cook D. (2002) ApoE and the regulation of microglial nitric oxide production: a link between genetic risk and oxidative stress. *Neurobiol. Aging* 23, 777-785.
30. Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Rimmler J.B., Locke P.A., Conneally P.M., Schmechel K.E., Tanzi R.E., Gusella J.F., Small G.W., Roses A.D., Pericak Vance M.A., and Haines J.L. (1995) Apolipoprotein E, survival in Alzheimer's disease patients, and the competing risks of death and Alzheimer's disease. *Neurology.* 45(7),1323-1328.
31. del Valle E., Navarro A., Astudillo A., and Tolivia J. (2003) Apolipoprotein D expression in human brain reactive astrocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1285-1290.
32. Desai P.P., Hendrie H.C., Evans R.M., Murrell J.R., Dekosky S.T., and Kamboh M.I. (2003) Genetic variation in apolipoprotein D affects the risk of Alzheimer disease in african-americans. *Am. J. Med. Genet.* 116B, 98-101.
33. Dickson D.W., Sinicropi S., Yen S.H., Ko L.W., Mattiace L.A., Bucala R., and Vlassara H. (1996) Glycation and microglial reaction in lesions of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 17, 733-743.
34. Diedrich J.F., Minnigan H., Carp R.I., Whitaker J.N., Race R., Frey W.2., and Haase A.T. (1991) Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J. Virol.* 65, 4759-4768.

35. Drayna D., Fielding C., Mclean J., Baer B., Castro G., Chen E., Comstock L., Henzel W., Kohr W., Rhee L., and et al (1986) Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J. Biol. Chem.* 261, 16535-16539.
36. Fielding P.E. and Fielding C.J. (1980) A cholesteryl ester transfer complex in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 3327-3330.
37. Fleming L.M., Weisgraber K.H., Strittmatter W.J., Troncoso J.C., and Johnson G.V. (2001) Differential binding of apolipoprotein E isoforms to tau and other cytoskeletal proteins. *Exp. Neurol.* 138, 252-260.
38. Flood DG, Buell S.J., Horwitz GJ, and Coleman PD (1987) Dendritic extent in human dentate gyrus granule cells in normal aging and senile dementia. *Brain Res.* 402, 205-216.
39. Flood D.G., Buell S.J., Defiore C.H., Horwitz G.J., and Coleman P.D. (1985) Age-related dendritic growth in dentate gyrus of human brain is followed by regression in the 'oldest old'. *Brain Res.* 345, 366-368.
40. Flower D.R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318, 1-14.
41. Francone O.L., Gurakar A., and Fielding C. (1989) Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol. *J.Biol.Chem.* 264, 7066-7072.
42. Franz G., Reindl M., Patel S.C., Beer R., Unterrichter I., Berger T., Schmutzhard E., Poewe W., and Kampf A. (1999) Increased expression of apolipoprotein D following experimental traumatic brain injury. *J. Neurochem.* 73, 1615-1625.
43. Gearing M., Schneider J.A., Robbins R.S., Hollister R.D., Mori H., Games D., Hyman B.T., and Mirra S.S. (1995) Regional variation in the distribution of apolipoprotein E and A beta in Alzheimer's disease. *J.Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 833-841.
44. Gerdes L.U., Jeune B., Ranberg K.A., Nybo H., and Vaupel J.W. (2000) Estimation of apolipoprotein E genotype-specific relative mortality risks from the distribution of genotypes in centenarians and middle-aged men: apolipoprotein E gene is a "frailty gene" not a "longevity gene". *Genet.Epidemiol.* 19, 202-210.
45. Goedert M., Wischik C.M., Crowther R.A., Walker J.E., and Klug A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4051-4055.

46. Goessling W. and Zucker S.D. (2000) Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G356-G365.
47. Gomez-Ramos P., Mufson E.J., and Moran M.A. (2001) Apolipoprotein E immunoreactivity in neurons and neurofibrillary degeneration of aged non-demented and Alzheimer's disease patients. *Microsc. Res. Tech.* 55, 48-58.
48. Gouras G.K., Tsai J., Naslund J., Vincent B., Edgar M., Checler F., Greenfield J.P., Haroutunian V., Buxbaum J.D., Xu H., Greengard P., and Relkin N.R. (2000) Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* 156, 15-20.
49. Haagensen D.E. and Mazoujian G. (1986) Biochemistry and Immunohistochemistry of fluid proteins of the breast in gross cystic disease. In *Diseases of the breast*, 3rd edn. (ed. C.D.Haagensen (Ed.)), pp. 500. Saunders, Philadelphia.
50. Han S.H., Einstein G., Weisgraber K.H., Strittmatter W.J., Saunders A.M., Pericak Vance M., Roses A.D., and Schmechel D.E. (1994a) Apolipoprotein E is localized to the cytoplasm of human cortical neurons: a light and electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 535-544.
51. Han S.H., Hulette C., Saunders A.M., Einstein G., Pericak-Vance M., Strittmatter W.J., Roses A.D., and Schmechel D.E. (1994b) Apolipoprotein E Is Present in Hippocampal Neurons without Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease and in Age-Matched Controls. *Exp. Neurol.* 128, 13-26.
52. Harr S.D., Uint L., Hollister R., Hyman B.T., and Mendez A.J. (1996) Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 66, 2429-2435.
53. Hayashi S., Wakabayashi K., Iwanaga K., Kakita A., Seki K., Tanaka M., Okuizumi K., Onodera O., Tanaka H., Tsuji S., and Takahashi H. (1998) Pick's disease: selective occurrence of apolipoprotein E-immunoreactive Pick bodies in the limbic system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 95, 1-4.
54. Helisalmi S., Hiltunen M., Vepsäläinen S., Iivonen S., Corder E.H., Lehtovirta M., Mannermaa A., Koivisto A.M., and Soininen H. (2004) Genetic variation in apolipoprotein D and Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 251, 951-957.
55. Hesse C., Bogdanovic N., Davidsson P., and Blennow K. (1999) A quantitative and immunohistochemical study on apolipoprotein E in brain tissue in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10, 452-459.
56. Holzfeind P., Merschak P., Dieplinger H., and Redl B. (1995) The human lacrimal gland synthesizes apolipoprotein D mRNA in addition to tear prealbumin mRNA, both species encoding members of the lipocalin superfamily. *Exp. Eye Res.* 61, 495-500.

57. Horrobin D.F. and Bennett C.N. (1999) New gene targets related to schizophrenia and other psychiatric disorders: enzymes, binding proteins and transport proteins involved in phospholipid and fatty acid metabolism. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 60, 141-167.
58. Huang D.Y., Weisgraber K.H., Goedert M., Saunders A.M., Roses A.D., and Strittmatter W.J. (1995) ApoE3 binding to tau tandem repeat I is abolished by tau serine262 phosphorylation. *Neurosci. Lett.* 192, 209-212.
59. Hyman B.T., van Hoesen G.W., Damasio A.R., and Barnes C.L. (1984) Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225, 1168-1170.
60. Ikonovic M.D., Desai P.P., Kamboh M.I.H.R.L., Klunk W.E., and Dekosky S.T. (2002) Apolipoprotein D and beta-amyloid in progression of neuritic plaques: a study of Alzheimer's disease and lewy body variant. *Neurobiol. Aging* 23[1S], S 394.
61. Jian-Gang Z., Yong-Xing M., Chuan-Fu W., Pei-Fang L., Song-Bai Z., Nui-Fan G., Guo-Yin F., and Lin H. (1998) Apolipoprotein E and longevity among Han Chinese population. *Mech. Ageing Dev.* 104, 159-167.
62. Jolivald C., Leininger-Muller B., Bertrand P., Herber R., Christen Y., and Siest G. (2000) Differential oxidation of apolipoprotein E isoforms and interaction with phospholipids. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 129-140.
63. Kalman J., McConathy W., Araoz C., Kasa P., and Lacko A.G. (2000) Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia. *Neurol. Res.* 22, 330-336.
64. Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., and Müller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
65. Kesner L., Yu W.S., Bradlow H.L., Breed C.W., and Fleisher M. (1988) Proteases in cyst fluid from human gross cyst breast disease. *Cancer Res.* 48, 6379-6383.
66. Kida E., Golabek A.A., Wisniewski T., and Wisniewski K.E. (1994) Regional differences in apolipoprotein E immunoreactivity in diffuse plaques in Alzheimer's disease brain. *Neurosci. Lett.* 167, 73-76.
67. Kim K.W., Jhoo J.H., Lee J.H., Lee D.Y., Lee K.U., Youn J.C., Youn J.Y., and Woo J.I. (2002) The domain-specific, stage-limited impact of the apolipoprotein E epsilon-4 allele on cognitive functions in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 13, 125-129.

68. Kimpara T., Takeda A., Yamaguchi T., Arai H., Okita N., Takase S., Sasaki H., and Itoyama Y. (2000) Increased bilirubins and their derivatives in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 551-554.
69. LaDu M.J., Falduto M.T., Manelli A.M., Reardon C.A., Getz G.S., and Frail D.E. (1994) Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol. Chem.* 269, 23403-23406.
70. LaDu M.J., Shah J.A., Reardon C.A., Getz G.S., Bu G., Hu J., Guo L., and Van Eldik L.J. (2000) Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures. *J. Biol. Chem.* 275, 33974-33980.
71. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
72. Laskowitz D.T., Horsburgh K., and Roses A.D. (1998) Apolipoprotein E and the CNS response to injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 465-471.
73. Laws S.M., Hone E., Taddei K., Harper C., Dean B., McClean C., Masters C., Lautenschlager N., Gandy S.E., and Martins R.N. (2002) Variation at the apoe-491 promoter locus is associated with altered brain levels of apolipoprotein E. *Molec. Psych.* 7, 886-890.
74. Lea O.A. (1988) Binding properties of progesterone-binding Cyst protein, PBCP. *Steroids* 52, 337-338.
75. Liberski P.P. and Budka H. (1999) Neuroaxonal pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 97, 329-334.
76. Lue L.F., Kuo Y.M., Roher A.E., Brachova L., Shen Y., Sue L., Beach T., Kurth J.H., Rydel R.E., and Rogers J. (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 155, 853-862.
77. Masliah E., Mallory M., Veinbergs I., Miller A., and Samuel W. (1996) Alterations in apolipoprotein E expression during aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 50, 493-503.
78. Maurer K., Ihl R., and Frölich L. (1993) Alzheimer: Grundlagen, Diagnostik, Therapie. Springer, Berlin, Heidelberg.
79. Mayeux R., Ottman R., Maestre G., Ngai C., Tang M.X., Ginsberg H., Chun- M, Tycko B., and Shelanski M. (1995) Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease [ see comments]. *Neurology* 45, 555-557.
80. McConathy W.J. and Alaupovic P. (1973) Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett.* 37, 178-182.

81. Meske V., Hamker U., Albert F., and Ohm T.G. (1998) The effects of beta /A4-amyloid and its fragments on calcium homeostasis, glial fibrillary acidic protein and S100 beta staining, morphology and survival of cultured hippocampal astrocytes. *Neurosci.* 85, 1151-1160.
82. Metzger R.E., LaDu M.J., Pan J.B., Getz G.S., Frail D.E., and Falduto M.T. (1996) Neurons of the human frontal cortex display apolipoprotein E immunoreactivity: implications for Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 372-380.
83. Miehe U., Leranth C., Ohm T.G., and Nitsch R. (1994) Long-lasting transneuronal dendritic changes of GABAergic neurons in the monkey dentate gyrus following entorhinal cortex lesion. *Neurosci. Lett.* 168, 115-118.
84. Miller A., Alford M., Katzman R., Thal L., Saitoh T., and Masliah E. (1994) The expression of the APO-epsilon4 allele in Alzheimer's disease accentuates the synaptic loss and the severity of the dementia. *Ann. Neurol.* 36, 268.
85. Miyata M. and Smith J.D. (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat. Genet* 14, 55-61.
86. Montine K.S., Olson S.J., Amarnath V., Whetsell W.O., Jr., Graham D.G., and Montine T.J. (1997) Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in Alzheimer's disease is associated with inheritance of APOE4. *Am. J. Pathol.* 150, 437-443.
87. Montpied P., de Bock F., Lerner Natoli M., Bockaert J., and Rondouin G. (1999) Hippocampal alterations of apolipoprotein E and D mRNA levels in vivo and in vitro following kainate excitotoxicity. *Epilepsy Res.* 35, 135-146.
88. Morais Cabral J.H., Atkins G.L., Sanchez L.M., Lopez Boado Y.S., Lopez O.-C., and Sawyer L. (1995) Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Lett.* 366, 53-56.
89. Mukaetova-Ladinska E.B., Garcia-Siera R., Hurt J., Gertz H.J., Xuereb J.H., Hills R., Brayne C., Huppert F.A., Paykel E.S., McGee M., Jakes R., G.Honer W., Harrington C.R., and Wischik C.M. (2000) Staging of cytoskeletal and beta-amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 157, 623-636.
90. Müller W., Meske V., Berlin K., Scharnagl H., Marz W., and Ohm T.G. (1998) Apolipoprotein E isoforms increase intracellular Ca<sup>2+</sup> differentially through a omega-agatoxin IVA-sensitive Ca<sup>2+</sup>-channel. *Brain Pathol.* 8, 641-653.
91. Namba Y., Tomonaga M., Kawasaki H., Otomo E., and Ikeda K. (1991) Apolipoprotein-E Immunoreactivity in Cerebral Amyloid Deposits and Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease and Kuru Plaque Amyloid in Creutzfeldt-Jakob Disease. *Brain Res.* 541, 163-166.

92. Nathan B.P., Bellosta S., Sanan D.A., Weisgraber K.H., Mahley R.W., and Pitas R. (1994) Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264, 850-852.
93. Nathan B.P., Chang K.C., Bellosta S., Brisch E., Ge N., Mahley R.W., and Pitas R.E. (1995) The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization. *J. Biol. Chem.* 270, 19791-19799.
94. Nilsson L.G., Nyberg L., and Backman L. (2002) Genetic variation in memory functioning. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 841-848.
95. Nishiyama E., Iwamoto N., Ohwada J., and Arai H. (1997) Distribution of apolipoprotein E in senile plaques in brains with Alzheimer's disease: investigation with the confocal laser scan microscope. *Brain Res.* 750, 20-24.
96. Nitsch R. (1993) Transneuronal changes in the lesioned entorhinal-hippocampal system. In *Hippocampus* (ed. Nitsch R. and Ohm T.G.), pp. 247-256. Churchill Livingstone, New York.
97. Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj E.K., Jones P.K., Ghanbari H., Wataya T., Shimohama S., Chiba S., Atwood C.-S., Petersen R.B., and Smith M.A. (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 759-767.
98. Ohm T.G., Müller H., Braak H., and Bohl J. (1995) Close-meshed prevalence rates of different stages as a tool to uncover the rate of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurosci.* 64, 209-217.
99. Ohm T.G., Münch S., Schönheit B., Zarski R., and Nitsch R. (2002) Transneuronally altered dendritic processing of tangle-free neurons in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 103, 437-443.
100. Ohm T.G., Scharnagl H., März W., and Bohl J. (1999) Apolipoprotein E isoforms and the development of low and high Braak stages of Alzheimer's disease-related lesions. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 98, 273-280.
101. Ong W.Y., He Y., Suresh S., and Patel S.C. (1997) Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neurosci.* 79, 359-367.
102. Pearlman W.H., Gueriguian J.L., and Sawyer M.E. (1973) A specific progesterone-binding component of human breast cyst fluid. *J. Biol. Chem.* 248, 5736-5741.
103. Peitsch M.C. and Boguski M.S. (1990) Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol.* 2, 197-206.

104. Petit-Turcotte C., Stohl S.M., Beffert U., Cohn J.S., Aumont N., Tremblay M., Dea D., Yang L., Poirier J., and Shachter N.S. (2001) Apolipoprotein C-I expression in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 8, 953-963.
105. Pirttila T., Soininen H., Heinonen O., Lehtimäki T., Bogdanovic N., Paljarvi L., Kosunen O., Winblad B., Riekkinen P., Sr., Wisniewski H.M., and Mehta P.D. (1996) Apolipoprotein E (apoE) levels in brains from Alzheimer disease patients and controls. *Brain Res.* 722, 71-77.
106. Pitas R.E., Boyles J.K., Lee S.H., Foss D., and Mahley R.W. (1987) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 917, 148-161.
107. Poirier J. (2000) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 92481-90, -90.
108. Poirier J., Baccichet A., Dea D., and Gauthier S. (1993) Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neurosci.* 55, 81-90.
109. Poirier J., Hess M., May P.C., and Finch C.E. (1991) Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 11, 97-106.
110. Price D.L., Tanzi R.E., Borchelt D.R., and Sisodia S.S. (1998) Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu. Rev. Genet.* 32, 461-493.
111. Provost P.R., Weech P.K., Tremblay N.M., Marcel Y.L., and Rassart E. (1990) Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J. Lipid Res.* 31, 2057-2065.
112. Ramassamy C., Averill D., Beffert U., Bastianetto S., Theroux L., Lussier-Cacan S., Cohn J.S., Christen Y., Davignon J., Quirion R., and Poirier J. (1999) Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 544-553.
113. Ramassamy C., Averill D., Beffert U., Theroux L., Lussier-Cacan-S., Cohn J.S., and Christen Y. (2000) Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.* 7, 23-37.
114. Rebeck G.W., Reiter J.S., Strickland D.K., and Hyman B.T. (1993) Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11, 575-580.
115. Reindl M., Knipping G., Wicher I., Dilitz E., Egg R., Deisenhammer F., and Berger T. (2001) Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 119, 327-332.

116. Richey P.L., Siedlak S.L., Smith M.A., and Perry G. (1995) Apolipoprotein E interaction with the neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer disease: implications for disease pathogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 657-663.
117. Rocchi A., Pellegrini S., Siciliano G., and Murri L. (2003) Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res. Bull.* 61, 1-24.
118. Rosen V.M., Bergeson J.L., Putnam K., Harwell A., and Sunderland T. (2002) Working memory and apolipoprotein E: what's the connection? *Neuropsychologia* 40, 2226-2233.
119. Rubinsztein D.C. and Easton D.F. (1999) Apolipoprotein E genetic variation and Alzheimer's disease. a meta-analysis. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10, 199-209.
120. Russo C., Angelini G., Dapino D., Piccini A., Piombo G., Schettini G., Chen S., Teller J.K., Zaccheo D., Gambetti P., and Tabaton M. (1998) Opposite roles of apolipoprotein E in normal brains and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95/26.
121. Samatovicz R.A. (2000) Genetics and brain injury: apolipoprotein E. *J. Head Trauma Rehabil.* 15, 869-874.
122. Sasaki N., Fukatsu R., Tsuzuki K., Hayashi Y., Yoshida T., Fujii N., Koike T., Wakayama I., Yanagihara R., Garruto R., Amano N., and Makita Z. (1998) Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Am. J. Pathol.* 153, 1149-1155.
123. Saunders A.M. (2000) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: an update on genetic and functional analyses. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 751-758.
124. Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D., St. George-Hyslop P.H., Pericak Vance M.A., Joo S.H., Rosi B.L., Gusella J.F., Crapper-MacLachlan D.R., Alberts M.J., Hulette C., Crain B., Goldgaber D., and Roses A.D. (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon-4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 43, 1467-1472.
125. Scharnagl H., Tisljar U., Winkler K., Hüttinger M., Nauck M.A., Gross W., Wieland H., Ohm T.G., and März W. (1999) The A4 amyloid peptide enhances the uptake of beta-very low density lipoproteins by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor and heparan sulfate proteoglycans pathway. *Lab. Invest.* 79, 1271-1286.
126. Schindler P.A., Settineri C.A., Collet X., Fielding C.J., and Burlingame A.L. (1995) Site-specific detection and structural characterization of the glycosylation of human plasma proteins lecithin:cholesterol acyltransferase and apolipoprotein D using HPLC/electrospray mass spectrometry and sequential glycosidase digestion. *Protein Sci.* 4, 791-803.

127. Schmechel D.E., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Crain B.J., Hulette C.M., Joo S.H., Pericak Vance M.A., Goldgaber D., and Roses A.D. (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 9649-9653.
128. Schwab C., Steele J.C., Akiyama H., and Mcgeer P.L. (1996) Distinct distribution of apolipoprotein E and beta-amyloid immunoreactivity in the hippocampus of Parkinson dementia complex of Guam. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 92, 378-385.
129. Shao Y., Gearing M., and Mirra S.S. (1997) Astrocyte-apolipoprotein E associations in senile plaques in Alzheimer disease and vascular lesions: a regional immunohistochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 376-381.
130. Smith M.A., Joseph J.A., and Perry G. (2000) Tracking the culprit in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 924, 35-38.
131. Smith M.A., Kutty R.K., Richey P.L., Yan S.D., Stern D., Chader G.J., Wiggert B., Petersen R.B., and Perry G. (1994) Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 145, 42-47.
132. Spreyer P., Schaal H., Kuhn G., Rothe T., Unterbeck A., Olek K., and Muller H.W. (1990) Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J.* 9, 2479-2484.
133. Strittmatter W.J., Saunders A.M., Goedert M., Weisgraber K.H., Dong L.M., Jakes R., Huang D.Y., Pericak Vance M., Schmechel D., and Roses A.D. (1994) Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11183-11186.
134. Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D., Pericak Vance M., Enghild J., Salvesen G.S., and Roses A.D. (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1977-1981.
135. Strittmatter W.J., Weisgraber K.H., Huang D.Y., Dong L.M., Salvesen G.S., Pericak Vance M., Schmechel D., Saunders A.M., Goldgaber D., and Roses A.D. (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8098-8102.
136. Sun Q., Disher M.J., Rustad T., Telian S.A., and Andrews P.C. (1998) AP30, a differential protein marker for perilymph and cerebrospinal fluid in middle ear fluid, has been purified and identified as human apolipoprotein D. *Biochim. Biophys. Acta* 1384, 405-413.

137. Tamaoka A., Miyatake F., Matsuno S., Ishii K., Nagase S., Sahara N., Ono S., Mori H., Wakabayashi K., Tsuji S., Takabashi H., and Shoji S. (2000) Apolipoprotein E allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease. *Neurology* 54, 2319-2321.
138. Terrisse L., Poirier J., Bertrand P., Merched A., Visvikis S., Siest G., Milne R., and Rassart E. (1998) Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J. Neurochem.* 71, 1643-1650.
139. Terrisse L., Seguin D., Bertrand P., Poirier J., Milne R., and Rassart E. (1999) Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E expression in rat hippocampus after entorhinal cortex lesion. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 70, 26-35.
140. Thomas E.A., Dean B., Pavey G., and Sutcliffe J.G. (2001) Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4066-4071.
141. Thomas E.A., Laws S.M., Sutcliffe J.G., Harper C., Dean B., McClean C., Masters C., Lautenschläger N., Gandy S.E., and Martins R.N. (2003) Apolipoprotein D levels are elevated in prefrontal cortex of subjects with Alzheimer's disease: no relation to apolipoprotein E expression or genotype. *Biol. Psychiatry* 54, 136-141.
142. Thomas E.A., Sautkulis L.N., Criado J.R., Games D., and Sutcliffe J.G. (2001) Apolipoprotein D mRNA expression is elevated in PDAPP transgenic mice. *J. Neurochem.* 79, 1059-1064.
143. Tokuda T., Calero M., Matsubara E., Vidal R., Kumar A., Permanne B., Zlokovic B., Smith J.D., LaDu M.J., Rostagno A., Frangione B., and Ghiso J. (2000) Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem. J.* 348 Pt 2, 359-365.
144. Tolar M., Keller J.N., Chan S., Mattson M.P., Marques M.A., and Crutcher K.A. (1999) Truncated apolipoprotein E (ApoE) causes increased intracellular calcium and may mediate ApoE neurotoxicity. *J. Neurosci.* 19, 7100-7110.
145. Tolar M., Marques M.A., Harmony J.A.K., and Crutcher K.A. (1997) Neurotoxicity of the 22 kDa thrombin-cleavage fragment of apolipoprotein E and related synthetic peptides is receptor-mediated. *J. Neurosci.* 17, 5678-5686.
146. Trieu V.N. and Uckun F.M. (2000) Apolipoprotein E and apolipoprotein D expression in a murine model of singlet oxygen-induced cerebral stroke. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 835-841.
147. Uchihara T., Duyckaerts C., He Y., Kobayashi K., Seilhean D., Amouyel P., and Hauw J.J. (1995) ApoE immunoreactivity and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Neurosci. Lett.* 195, 5-8.

148. Vassar R. and Citron M. (2001) A beta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron* 27, 419-422.
149. Vogt M. and Skerra A. (2001) Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *J. Mol. Recognit.* 14, 79-86.
150. Wang X.S. and Gruenstein E. (1997) Rapid elevation of neuronal cytoplasmic calcium by apolipoprotein E peptide. *J. Cell Physiol.* 173, 73-83.
151. Warwick-Daw E., Payami H., Nemens E.J., Nochlin D., Bird T.D., Schellenberg G.D., and Wijsman E.M. (2000) The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 196-204.
152. Weaver C.L., Espinoza M., Kress V., and Davies P. (2000) Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 719-727.
153. Weisgraber K.H. (1990) Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J. Lipid Res.* 31, 1503-1511.
154. Weisgraber K.H. (1994) Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv. Protein Chem.* 45, 249-302.
155. Weisgraber K.H., Roses A.D., and Strittmatter W.J. (1994) The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr. Opin. Lipidol.* 5, 110-116.
156. White F., Nicoll J.A.R., and Horsburgh K. (2001) Alterations in ApoE and ApoJ in relation to degeneration and regeneration in a mouse model of entorhinal cortex lesion. *Exp. Neurol.* 169, 307-318.
157. Wilson R.S., Bienias J.L., Berry-Kravis E., Evans D.A., and Bennett D.A. (2002) The apolipoprotein E epsilon 2 allele and decline in episodic memory. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 73, 672-677.
158. Wisniewski T. and Frangione B. (1992) Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci. Lett.* 135, 235-238.
159. Xu P.T., Gilbert J.R., Qiu H.L., Ervin J., Rothrock Christian T.R., Hulette C., and Schmechel D.E. (1999) Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am. J. Pathol.* 154, 601-611.
160. Yamada T., Kondo A., Takamatsu J.-I., Tateishi J., and Goto I. (1995) Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 129, 56-61.

161. Yamaguchi H., Ishiguro K., Sugihara S., Nakazato Y., Kawarabayashi T., Sun X., and Hirai S. (1994) Presence of apolipoprotein E on extracellular neurofibrillary tangles and on meningeal blood vessels precedes the Alzheimer beta-amyloid deposition. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 88, 413-419.
162. Zannis V.I. and Breslow J.L. (1981) Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochem.* 20, 1033-1041.
163. Zarow C. and Victoroff J. (1998) Increased apolipoprotein E mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease and in rats after entorhinal cortex lesioning. *Exp. Neurol.* 149, 79-86.
164. Zeng C., Spielman A.I., Vowels B.R., Leyden J.J., Biemann K., and Preti G. (1996) A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6626-6630.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Thomas G. Ohm möchte ich an erster Stelle danken für die Überlassung des Themas und die freundliche Begleitung der wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn Dr. Volker Meske, Frau Rosemarie Döscher, Herrn Daniel Richter und Herrn Frank Albert möchte ich für die Einarbeitung im Labor danken und natürlich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die anregenden Diskussionen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Roland Distl für seine Diskussionsfreude.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die geduldige Unterstützung meiner Arbeit.

### **Eidstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.