

Erster Fall von Alzheimer-Krankheit molekular geklärt

Entdeckung einer Mutation im Gen *PSEN1* bei Auguste Deter

Von Ulrich Müller, Pia Winter und Manuel B. Graeber



Die molekulare Aufklärung des Falles, an dem Alois Alzheimer die nach ihm benannte Krankheit vor über 100 Jahren zum ersten Mal beschrieben hat, ist Wissenschaftlern des Instituts für Humangenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen in Zusammenarbeit mit einem Wissenschaftler des Hirnforschungsinstituts der Universität Sydney, Australien, gelungen. Die Ergebnisse ihrer Forschungsarbeit wurden in der renommierten Zeitschrift „The Lancet Neurology“ im Dezember 2012 zunächst online und im Februar 2013 in gedruckter Form publiziert.

In Industriegesellschaften stellt die Alzheimersche Krankheit heute eines der größten Gesundheitsprobleme dar. Allein in Deutschland sind zurzeit 1,3 Millionen Menschen an Morbus Alzheimer erkrankt, und die Zahl der Erkrankten steigt durch eine zunehmende Lebensdauer ständig an. Global werden für das Jahr 2050 mehr als 100 Millionen Demenzerkrankte erwartet, wobei ein Großteil an der Alzheimerschen Krankheit leiden wird, wenn man nicht rechtzeitig ein Gegenmittel findet.

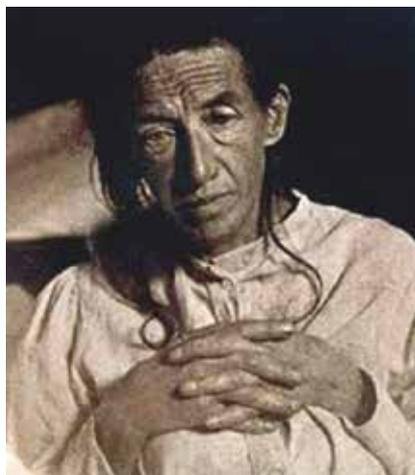
Alois Alzheimer (Abb. 1) hat 1907 erstmals die später nach ihm benannte Krankheit an der Patientin Auguste Deter (Abb. 2) beschrieben. Auguste Deter war 51 Jahre alt, als sie 1901 in das damals als „Städtische Irren-Anstalt Frankfurt a.M.“ bezeichnete Krankenhaus wegen Verwirrtheitszuständen, Halluzinationen und starkem Gedächtnisverlust eingewiesen wurde. Dort hat sie bis zu ihrem Tod im

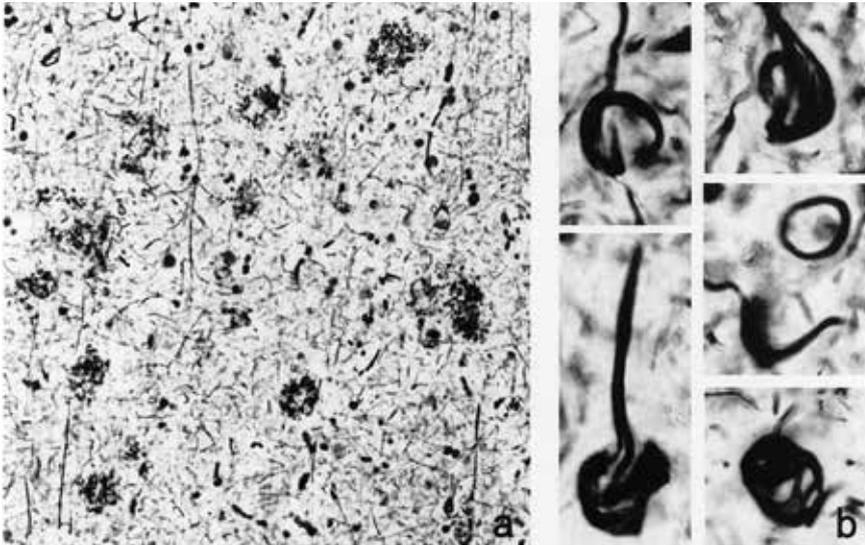
Jahr 1906 gelebt. Das Gehirn der Verstorbenen wurde dann nach München gebracht, wo Alois Alzheimer in Emil Kraepelins berühmter Klinik seit 1904 ein Forschungslabor aufbaute. Anhand von Gehirnschnitten der Verstorbenen beschrieb Alzheimer die für die Erkrankung charakteristischen morphologischen Veränderungen: Neben Amyloid-Plaques zwischen den Zellen des Gehirns sah er auch erstmals die ebenfalls nach ihm benannten Fibrillenbündel in den Neuronen („neurofibrillary tangles“). Sowohl Plaques als auch „Tangles“ interferieren mit der normalen Funktion der Nervenzellen und werden als Ursachen für den Nervenzelltod (Neurodegeneration) angeführt. Die bei Auguste Deter gefundenen morphologischen Veränderungen im Gehirn sind typisch für schwere Alzheimer-Krankheit (AK). Abb. 3 zeigt diese Veränderungen im Gehirn von Auguste Deter.

Die meisten Fälle von AK haben eine multifaktorielle Ätiologie, d.h. verschiedene Genvarianten im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren führen zur Erkrankung. Von den genetischen Varianten ist das Allel $\epsilon 4$ des für Apolipoprotein E kodierenden Gens *APOE* der größte Risikofaktor. Von den nicht-genetischen (Umwelt-) Faktoren hat fortgeschrittenes Alter den größten prädisponierenden Effekt. Nur ein kleiner Prozentsatz aller Alzheimer-Fälle (< 2%) ist auf eine Veränderung in einem einzigen Gen zurückzuführen.

■ Abb. 1: Deutsch-polnische Gedenktafel für Alois Alzheimer in Breslau, wo seine letzte Lebensstation war. An der schlesischen Friedrich-Wilhelm-Universität wurde er Direktor der „Königlich Psychiatrischen und Nervenklinik“.

■ Abb. 2: Archivbild von Auguste Deter (aus Maurer et al., 1997)





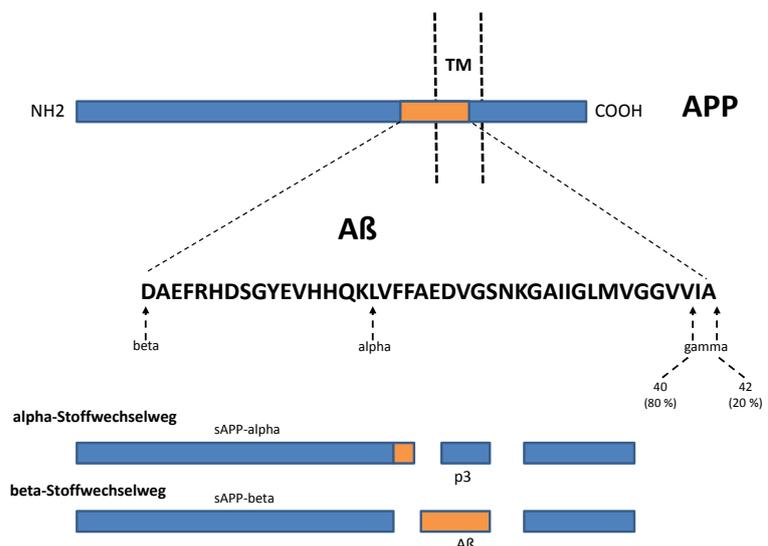
■ Abb. 3: Zahlreiche Amyloid-Plaques (links in a). Abb. b (rechts) zeigt verschiedene Formen Alzheimerscher Neurofibrillenveränderungen. Bielschowsky-Silberimprägnation. Primäre Vergrößerung x20 (aus Graeber et al., 1998)

■ Abb. 4: Spaltung des membran-überspannenden Proteins APP durch Sekretasen. Die innerhalb der Membran schneidende γ -Sekretase erzeugt zusammen mit der β -Sekretase Spaltstücke (Amyloid β -Peptide) von 40 Aminosäuren. Nur ein kleiner Prozentsatz (unter 20 %) der Spaltprodukte hat eine Größe von 42 Aminosäuren. Bei Mutationen in den Genen *PSEN1* und *PSEN2* ist die Funktion der γ -Sekretase beeinträchtigt, und es entstehen primär (über 80 %) Amyloid β -Peptide von 42 Aminosäuren, die stark amyloidogen sind. Eine weitere Sekretase (α -Sekretase) spaltet ebenfalls APP, spielt jedoch für die Entstehung von Plaques keine Rolle.

Im Gegensatz zur Großzahl der Fälle von Alzheimer-Krankheit, die jenseits des 65. Lebensalters beginnen („late onset Alzheimer disease“, LOAD), erkrankte Auguste Deter bereits mit Ende 40. Sie litt damit an einer seltenen, bereits vor dem 65. Lebensjahr einsetzenden Variante. Man spricht von „early onset Alzheimer disease“ (EOAD), die nur 5% aller Fälle von AK ausmacht. Etwas weniger als die Hälfte der EOAD-Fälle wird autosomal dominant vererbt, das bedeutet, dass die Erkrankung durch eine Veränderung in einem einzigen

Gen verursacht wird und Verwandte ersten Grades, also Kinder und Geschwister, ein Risiko von 50% haben, die Genveränderung zu erben und damit ebenfalls an EOAD zu erkranken. Außer dem Erkrankungsbeginn lassen sich EOAD und LOAD weder klinisch noch neuropathologisch voneinander unterscheiden.

Heute sind drei Gene bekannt, die mutiert zu EOAD führen können: Die beiden einander sehr ähnlichen Gene *PSEN1* und *PSEN2*, die für die Proteine Präsenilin 1 und 2 kodieren, sowie das für das „amyloid precursor protein“ (APP) kodierende Gen *APP*. Spaltprodukte des die Zellmembran überspannenden APP tragen zur Entstehung von Amyloid Plaques bei. Das membranständige Protein APP wird durch die Wirkung von drei Proteasen (der α -, β - und γ -Sekretase) prozessiert (Abb. 4). Die β -Sekretase erzeugt zusammen mit der das APP innerhalb der Membran schneidenden γ -Sekretase primär Spaltprodukte von 40 Aminosäuren (Amyloid β -Peptid von 40 Aminosäuren: $A\beta_{40}$). Funktionsänderungen der γ -Sekretase führen zu vermehrter Bildung von Spaltprodukten von 42 Aminosäuren ($A\beta_{42}$), die hochgradig amyloido-





gen wirken. Die Präseniline 1 und 2 sind Teil eines Proteinkomplexes, der zusammen mit weiteren Proteinen (Nikastrin, APH-1 (anterior phaynx-defective 1), PEN2 (presenilin enhancer2)) die γ -Sekretase bildet. Mutationen in den Genen *PSEN1* und *PSEN2* führen zu einer gestörten Funktion der γ -Sekretase und zu vermehrter Bildung von $A\beta_{42}$.

Die Krankengeschichte von Auguste Deter, die seit 1909 verschollen war, wurde 1996 in der Abteilung für Psychiatrie der Universität Frankfurt wiederentdeckt (Maurer et al., 1997, Abb. 5). Die wahrscheinlich von Alois Alzheimer selbst von Auguste Deters Gehirn angefertigten Schnitte wurden 1997 von Manuel Graeber im Keller des Instituts für Neuropathologie der LMU München gefunden (Graeber et al., 1998). Wir haben eines dieser von Auguste Deters Gehirn angefertigten Präparate (Abb. 6) verwendet, um DNA zu isolieren und Mutationsanalysen durchzuführen.

Durch die Paraffineinbettung, Formalin-Fixierung und Färbung der Präparate wird die DNA stark geschädigt und fragmentiert. Um überhaupt analysierbare DNA aus Formalin-fixierten Gewebeschnitten gewinnen zu können, muss die Gesamt-DNA amplifiziert werden, ein Vorgang, der als „Whole



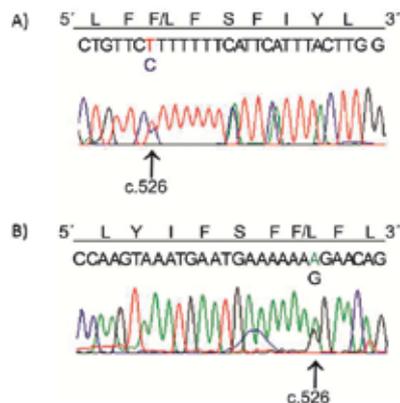
genome amplification“ (WGA) bezeichnet wird. Wir haben zur Amplifikation der DNA eine Variante der „multiple displacement amplification“-Methode angewendet. Zunächst wird ein Gewebestückchen vom Objektträger unter sterilen Bedingungen abgekratzt und das Gewebe denaturiert. Anschließend werden die kleinen fragmentierten DNA-Stückchen ligiert, so dass größere Fragmente entstehen, die dann unter Verwendung zufällig ausgewählter Hexamere amplifiziert werden können (REPLI-gFFPE kit von Qiagen). Die gewonnene DNA wurde dann als „template“ zur Amplifizierung und Sequenzierung von Bereichen der Gene *PSEN1* und *PSEN2* verwendet.

Bei der Sequenzierung von Exon 6 des Gens *PSEN1* fand sich an Position 526 ein Austausch der Base Thymin durch Cytosin (c.526T>C). Diese Veränderung führt zur Substitution der Aminosäure Phenylalanin durch Leucin an Position 176 des Präsenilin1-Proteins (p.Phe176Leu) (Müller et al., 2012, Abb. 7). Exon 6 kodiert im Wesentlichen für die Transmembrandomäne 3 von Präsenilin 1. Wir haben den Befund in unabhängig voneinander extrahierten DNA-Chargen bestätigt.

Mehrere Befunde sprechen dafür, dass der Phe176Leu-Austausch die Ursache für die Erkrankung von Au-

■ Abb. 5: Krankenakte von Auguste Deter, die 1996 von Maurer wiederentdeckt wurde (aus Maurer et al., 1997).

■ Abb. 6: Objektträger mit Gewebeschnitt von Auguste Deter, von dem DNA zur Untersuchung extrahiert wurde.



■ Abb. 7: Sequenzchromatogramm von 28 Basenpaaren (bp) von Exon 6 des *PSEN1*-Gens von Auguste Deter. Durch die Sequenzierung fand sich eine c.526T>C-Substitution. Die Abbildung zeigt sowohl die Sequenz des Vorwärtsstrangs (a) als auch des Rückwärtsstrangs (b). Die Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch Phe176Leu (F/L).

guste Deter ist: 1) An Position 176 des *PSEN1*-Gens wurde kein „single nucleotide polymorphism“ (SNP), also keine Variante eines Basenpaars in der DNA, beschrieben; 2) Phenylalanin an Position 176 der Transmembrandomäne 3 von Präsenilin 1 ist evolutionär hochgradig konserviert (Abb. 8). Dies spricht dafür, dass diese Aminosäure

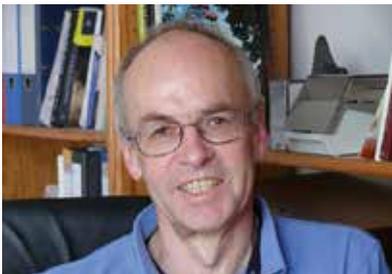
essentiell für eine normale Funktion von Präsenilin 1 ist; und 3) Die benachbarte Aminosäure Phenylalanin an Position 177 führt, wenn verän-

dert, zu autosomal dominant vererbter EOAD. Auch dieser Befund belegt die funktionelle Bedeutung dieser Region von Präsenilin 1.

Durch Veränderung der Struktur von Präsenilin 1 ändert sich die Funktion des Proteinkomplexes γ -Sekretase (Abb. 4), es werden vermehrt Amy-

DIE AUTOREN

Ulrich Müller, Jahrgang 1952, studierte von 1971 bis 1977 in Freiburg Medizin und promovierte 1977 zum Dr. med. Von 1977 bis 1984 war er am Institut für Humangenetik der Universität Freiburg tätig, unterbrochen durch einen Forschungsaufenthalt am Sloan Kettering Cancer Center und der Cornell University in New York von 1979 bis 1980. 1982: Habilitation im Fach Humangenetik. Mit einem Heisenberg-Stipendium



ging er an die Genetics Division des Children's Hospital der Harvard Medical School. Von 1987 bis 1992 war er Assistent und dann Associate Professor of Pediatrics/Genetics an der Harvard Medical School. 1991: Ruf auf die Professur für Humangenetik der Universität Gießen. Schwerpunkt der Forschung: Neurogenetik, insbesondere Dystonien, spinocerebelläre Ataxien, Alzheimer Krankheit, Progressive supranukleäre Blickparese, amyotrophe Lateralsklerose. 1994-2004: Präsident der deutschen Gesellschaft für Neurogenetik. Mitgründer und Herausgeber der Zeitschrift Neurogenetics seit 1997. Seine Forschungsergebnisse wurden in renommierten Zeitschriften publiziert, u.a. in Cell, Nature Genetics, Lancet Neurology, Pro-

ceedings of the National Academy of Sciences (USA), Annals of Neurology, American Journal of Human Genetics, Human Molecular Genetics.

Pia Winter, Jahrgang 1958, absolvierte eine Ausbildung zur Medizinisch-technischen Assistentin in Trier. Seit 1981 ist sie Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik. Zunächst war sie beteiligt an Forschungsarbeiten zur Proteinana-



lytik mit Schwerpunkt hereditäre Amyloidosen, später dann bei der Etablierung molekulargenetischer Methoden. Der Schwerpunkt ihrer Arbeit seit 2000 sind Beiträge zur Erforschung neurogenetischer Erkrankungen wie die Alzheimer Krankheit, ALS und Dystonien.

Manuel B. Graeber, Dr. med. (TUM), Dr. med. habil. (LMU) ist ein deutsch-britischer Neuropathologe und Barnett-Cropper Chair of Brain Tumor Research am Brain and Mind Research Institute (BMRI) der Universität Sydney, Australien. Er war erst Doktorand und dann wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München (1987-1989), danach drei Jahre Post-Doc an der Harvard Medical School

in Boston, USA. Die letzten beiden Jahre als Post-Doc verbrachte er im dortigen Labor von Prof. Ulrich Müller. Von 1992 bis 1999 baute Prof. Graeber jeweils ein Labor für Molekulare Neuropathologie an der LMU München und dann am Max-Planck Institut für Neurobiologie (Abt. Kreuzberg) auf. 1995: Center of Excellence Visiting Scientist Award des National Institute of Neuroscience, Tokyo, Japan, und Gastwissenschaftler dort im Herbst 1996. 1997 Gründung der Zeitschrift Neurogenetics gemeinsam mit Prof. Müller und E. Hoffman. 1998 sieben Monate als Visiting Clinician an der Mayo Clinic in Rochester, MN, USA. 1999: Ruf auf den neuen Lehrstuhl für Neuropathologie an das Imperial College London/Hammersmith Hospitals Trust und 2000 Gründung des University Department of Neuropathology, das er als Chairman leitete und im achten Jahr aufgrund ethischer Bedenken hinsichtlich der dortigen Multiple Sklerose- und Parkinson-Hirnbanken wieder schloss. Später im selben Jahr (2007) Gründungsvorsitzender (mit D. Troost, Amsterdam) der European Fellowship of Neuropathology. 2008: Sabbatical und Gewinn eines „Whistleblowing“-Prozesses gegen die 2007-Exekutive von Imperial College London finanziert von der British Medical Association. 2009: Head der Division of Neuropathology, King Fahd Medical City, Ministry of Health, Riyadh, KSA und Ruf auf den neuen Lehrstuhl am BMRI, den er bis heute innehat, und Umzug nach Sydney 2010.

■ Abb. 8: Evolutionäre Konservierung von Phenylalanin (Phe) an Position 176 des PSEN1-Proteins (grau unterlegt) sowie benachbarter Aminosäuren. Die entsprechenden Nukleotid-Sequenzen sind auch angegeben.

loid beta-Peptide von 42 Aminosäuren (A β 42) gebildet, die hochgradig amyloidogen wirken und zur Ablagerung der für Neuronen toxischen Amyloid-Plaques führen.

Vor Entdeckung der c.526T>C Mutation in *PSEN1* wurde spekuliert, dass Auguste Deter mit den so genannten Wolga-Deutschen verwandt gewesen sein könnte. Bei den Wolga-Deutschen handelt es sich um die Nachfahren einer aus Hessen, aus der Nähe von Büdingen stammenden Personengruppe, die in den Jahren um 1760 in das Gebiet der südlichen Wolga in Russland ausgewandert sind. Im späten 19. und frühen 20. Jahrhundert sind viele Wolga-Deutsche in die USA emigriert.

Bei den Wolga-Deutschen tritt durch eine Mutation im Gen *PSEN2* (c.422A>T) EOAD häufig auf. Das häufige Vorkommen der früh einsetzenden Variante der Alzheimer Krankheit bei dieser Population geht auf einen „founder effect“ zurück, d.h. eine oder mehrere Vorfahren der Wolga-Deutschen trugen die zu EOAD führende *PSEN2*-Mutation, die sich infolge autosomal dominanter Vererbung in der Population ausgebreitet hat. Da Auguste Deter wie auch die Vorfahren der Wolga-Deutschen aus Hessen stammte und an EOAD erkrankt war, wurde spekuliert, dass sie aus derselben Population stammen könnte, von der ein Teil an die Wolga ausgewandert ist (Yu et al., 2010). Wir haben untersucht, ob die c.422A>T-Mutation in *PSEN2* bei Auguste Deter vorliegt. Diese Mutation fand sich bei Auguste Deter nicht, wodurch die Hypothese

	nucleotide sequence	amino acid sequence
Homo sapiens	TTGCTGTTCTTTTTTTCATTC	LLFFFSF
Macaca mulatta	TTGCTGTTCTTTTTTTCATTC	LLFFFSF
Mus musculus	TTGCTGTTCTTTTTTTCGTTTC	LLFFFSF
Bos taurus	TTGCTGTTCTTTTTTCTCATTC	LLFFFSF
Gallus gallus	CTGCTTTTCTTTTTTTCATTC	LLFFFSF
Anolis carolinensis	TTGCTTTTCTTTTTTTCATTC	LLFFFSF
Xenopus laevis	TTGCTTTTTTCTTCTCTTAT	LLFFFSY
Takifugu rubripes	TTGCTTTTCTTCTTCTCCTAC	LLFFFSY
Danio rerio	CTGCTCTTCTTTTTTCTCCTTA	LLFFFSL
Drosophila melanogaster	TTGTTGTTTCATTTTACGTAC	LLFIFTY
Caenorhabditis elegans	CTTCTTTTCTTACTACTACA	LLFLFSL

einer möglichen Verwandtschaft mit den Wolga-Deutschen widerlegt werden konnte (Müller et al., 2011).

Unsere historischen Untersuchungen haben gezeigt, dass Auguste Deter an der sehr seltenen, durch eine Mutation im *PSEN1*-Gen verursachten EOAD gelitten hat. Dieser Befund würde es grundsätzlich ermöglichen, Nachfahren von Auguste Deter auf das Vorliegen der Mutation zu untersuchen. Über das Schicksal des einzigen Kindes, einer Tochter, von Auguste Deter ist jedoch nichts bekannt.

Es ist eine Ironie der Medizin-Geschichte, dass die Alzheimer-Krankheit, von der die LOAD-Variante ein enormes Gesundheitsproblem in den westlichen Industriestaaten darstellt, ausgerechnet an einer extrem seltenen Variante (autosomal dominante EOAD) dieser heute so häufigen Krankheit entdeckt worden ist. Schließlich beendet die molekulare Aufklärung des ersten Alzheimer-Falles endgültig alle Spekulationen über die Ursache der Krankheit von Alois Alzheimers Patientin. •



LITERATUR

Graeber MB, Kösel S, Grasbon-Frodl E, Möller HJ, Mehraein P (1998): Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics* 1: 223-228

Maurer K, Volk S, Gerbaldo H (1997): Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349: 1546-1549

Yu CE, Marchani E, Nikisch G, Müller U, Nolte D, Hertel A, Wijsman EM, Bird TD (2010): The N141I mutation in *PSEN2*: implications for the quintessential case of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 67: 631-633

Müller U, Winter P, Graeber MB (2011): Alois Alzheimer's case, Auguste D., did not carry the N141I mutation in *PSEN2* characteristic of Alzheimer disease in Volga Germans. *Arch Neurol* 68: 1210-1211

Müller U, Winter P, Graeber MB (2013): A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* 12: 129-130 (doi:10.1016/S1474-4422(12)70307-1)

KONTAKT

Prof. Dr. Ulrich Müller
Justus-Liebig-Universität
Institut für Humangenetik
Schlangenzahl 14
35392 Gießen
Telefon: 0641 99-41601
Ulrich.Mueller@humangenetik.med.uni-giessen.de