

**Demographische und klinische Aspekte in Bezug zu
Risiko-Allelen bei Lewykörper-Erkrankungen: Ein
genetisch-klinisch-biochemischer Ansatz**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Dilger, Sarah Selina

2015

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. W. Maetzler

2. Berichterstatter:

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	14
1.1 Lewykörper-Erkrankungen, <i>Lewy body disorders</i> (LBD).....	14
1.1.1 Allgemeine Aspekte	14
1.1.2 Epidemiologie und klinische Aspekte der PD.....	14
1.1.3 Kognitive Beeinträchtigung und Demenz bei PD	15
1.1.3.1 Kognitive Symptome bei PD und Abgrenzung zu AD	16
1.1.4 Diagnostik der PD und PDD.....	16
1.1.4.1 Diagnostische Kriterien	16
1.1.4.2 Stadieneinteilung.....	17
1.1.5 Epidemiologie und klinische Aspekte der DLB.....	18
1.1.6 Klinische Unterscheidung der PDD von der DLB.....	18
1.1.7 Diagnostik der DLB	18
1.1.7.1 Diagnostische Kriterien	18
1.1.8 Ätiologie und Pathogenese der LBD (PD und DLB).....	19
1.1.8.1 Neuropathologische Aspekte	19
1.1.8.2 Was haben wir von monogenetischen Parkinson-Syndromen gelernt?.....	22
1.1.8.3 Molekularbiologie und Biochemie der LBD	25
1.1.8.4 Einzelnukleotidpolymorphismen (<i>single nucleotide polymorphisms</i> ; SNPs) ...	31
1.2 Apolipoprotein E – ApoE4.....	32
1.2.1 Lokalisation, Struktur und Polymorphismen von <i>APOE</i>	32
1.2.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD	32
1.3 Serin-Threonin-Kinase 39 – STK39	34
1.3.1 Lokalisation und Struktur von <i>STK39</i>	34
1.3.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD	35
1.4 Humanes Leukozyten-Antigen – HLA	36
1.4.1 Lokalisation und Struktur von <i>HLA</i>	36
1.4.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD	36
1.5 Immunoglobulin-bindendes Protein – BiP.....	37
1.5.1 Lokalisation und Struktur von <i>BIP</i>	37
1.5.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD	37
1.6 Cyclin G-assoziierte Kinase – GAK.....	39
1.6.1 Lokalisation und Struktur von <i>GAK</i>	39
1.6.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD	40

1.7	Microtubuli-assoziiertes Protein Tau – MAPT	41
1.7.1	Lokalisation und Struktur von <i>MAPT</i>	41
1.7.2	Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD	43
1.8	Fragestellung	44
2	Studienkollektiv, Material und Methoden	46
2.1	Studienkollektiv	46
2.1.1	Charakterisierung der Stichprobe	46
2.1.2	DNA- und Liquorproben	49
2.1.3	Demographische, klinische und biochemische Daten.....	49
2.2	Material	55
2.2.1	Chemikalien und Enzyme	55
2.2.2	Puffer und Lösungen.....	55
2.2.3	Oligonukleotide (Primer)	56
2.2.4	Referenzsequenzen	56
2.2.5	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Hilfsmittel.....	56
2.2.6	Hard- und Software	56
2.3	Methoden	56
2.3.1	Standardmethoden.....	57
2.3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	57
2.3.1.2	Agarosegelelektrophorese	58
2.3.2	SNaPshot-Verfahren	59
2.4	Studienbeschreibung (Versuchsablauf)	60
	Genotypisierung der SNPs mithilfe des SNaPshot-Verfahrens	60
2.4.1	PCR.....	60
2.4.2	Gelelektrophorese.....	63
2.4.3	Purifikation	64
2.4.4	SNaPshot-Reaktion.....	65
2.4.5	Post-Extensionsbehandlung (<i>Post Extension Treatment</i>).....	66
2.4.6	Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese.....	67
2.5	Datenanalyse und statistische Auswertung	67
2.6	Betrachtung der Risikoallele im rezessiven und dominanten Modell	69
3	Ergebnisse	71
	Zusammenhang zwischen den analysierten dominanten und rezessiven Modellen der Risiko-SNPs von <i>APOE</i> , <i>STK39</i> , <i>HLA</i> , <i>BIP</i> , <i>GAK</i> und <i>MAPT</i> und den LBD-assoziierten demographischen und klinischen Parametern.....	71

3.1	SNPs und erhöhtes Erkrankungsrisiko	71
3.1.1	Erkrankungsrisiko für LBD	71
3.1.2	Erkrankungsrisiko aufgegliedert nach motorischen Subtypen	73
3.1.3	Erkrankungsrisiko für Demenz	74
3.2	SNPs und Beginn der Erkrankung sowie Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz.....	75
3.2.1	Beginn des Parkinsonismus.....	76
3.2.2	Beginn der Demenz	77
3.2.3	Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenerkrankung.....	78
3.3	SNPs und Auftreten/ Betonung spezifischer Krankheitssymptome	80
3.4	SNPs und Progression von Krankheitssymptomen	87
3.5	SNPs und neurodegenerative Marker im Nervenwasser	91
4	Diskussion	94
4.1	<i>APOE</i>.....	94
4.1.1	Einfluss der <i>APOE</i> -SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD	94
4.1.2	Einfluss der <i>APOE</i> -SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne	96
4.1.3	Einfluss der <i>APOE</i> -SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter.....	97
4.1.4	Einfluss der <i>APOE</i> -SNPs auf die Progression klinischer Parameter	99
4.1.5	Einfluss der <i>APOE</i> -SNPs auf biochemische Parameter	103
4.2	<i>STK39</i>.....	105
4.2.1	Einfluss des <i>STK39</i> -SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD	105
4.2.2	Einfluss des <i>STK39</i> -SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne	106
4.2.3	Einfluss des <i>STK39</i> -SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter	107
4.2.4	Einfluss des <i>STK39</i> -SNPs auf die Progression klinischer Parameter.....	108
4.2.5	Einfluss des <i>STK39</i> -SNPs auf biochemische Parameter.....	109
4.3	<i>HLA</i>.....	109
4.3.1	Einfluss des <i>HLA</i> -SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD	109
4.3.2	Einfluss des <i>HLA</i> -SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne	112

4.3.3	Einfluss des <i>HLA</i> -SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter	114
4.3.4	Einfluss des <i>HLA</i> -SNPs auf die Progression klinischer Parameter.....	115
4.3.5	Einfluss des <i>HLA</i> -SNPs auf biochemische Parameter.....	115
4.4	<i>BIP</i>	116
4.4.1	Einfluss des <i>BIP</i> -SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD	116
4.4.2	Einfluss des <i>BIP</i> -SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne	119
4.4.3	Einfluss des <i>BIP</i> -SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter	120
4.4.4	Einfluss des <i>BIP</i> -SNPs auf die Progression klinischer Parameter.....	121
4.4.5	Einfluss des <i>BIP</i> -SNPs auf biochemische Parameter.....	121
4.5	<i>GAK</i>	122
4.5.1	Einfluss des <i>GAK</i> -SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD	122
4.5.2	Einfluss des <i>GAK</i> -SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne	124
4.5.3	Einfluss des <i>GAK</i> -SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter.....	125
4.5.4	Einfluss des <i>GAK</i> -SNPs auf die Progression klinischer Parameter.....	126
4.5.5	Einfluss des <i>GAK</i> -SNPs auf biochemische Parameter	126
4.6	<i>MAPT</i>	126
4.6.1	Einfluss des <i>MAPT</i> -SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD	126
4.6.2	Einfluss des <i>MAPT</i> -SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne	129
4.6.3	Einfluss des <i>MAPT</i> -SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter	130
4.6.4	Einfluss des <i>MAPT</i> -SNPs auf die Progression klinischer Parameter.....	131
4.6.5	Einfluss des <i>MAPT</i> -SNPs auf biochemische Parameter.....	132
4.7	Limitationen der Arbeit	132
5	Zusammenfassung	134
6	Anhangsverzeichnis	136
7	Literaturverzeichnis	144
	Erklärung zum Eigenanteil	157
	Danksagung	159
	Lebenslauf	160

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
α	Alpha
<i>aao_dem</i>	Erkrankungsalter der Demenz (<i>age at onset dementia</i>)
<i>aao_PD</i>	Erkrankungsalter der PD (<i>age at onset PD</i>)
A β	Amyloid- β /Abeta
ABI	<i>Applied Biosystems-Mix</i>
AD	Alzheimer Erkrankung (<i>Alzheimer's Disease</i>)
AGD	<i>agyrophilic grain disease</i>
ALP	Autophagen-Lysosomen-System (<i>autophagy-lysosomal pathway</i>)
AP	Adaptorprotein (<i>adaptor protein</i>)
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (<i>amyloid-precursor protein</i>)
ApoE	Apolipoprotein E-Protein (<i>apolipoprotein E</i>)
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E-Gen
AS	Aminosäure
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
<i>ATP13A2</i>	<i>ATPase type 13A2</i> -Gen
β	Beta
BBB	Blut-Hirn-Schranke (<i>blood brain barrier</i>)
BiP	Immunoglobulin-bindendes Protein (<i>binding immunoglobulin protein</i>)
<i>BIP</i>	Immunoglobulin-bindendes Protein-Gen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CAMCOG	<i>Cambridge Cognition Examination for Mental Disorders in the Elderly</i>
CBD	Kortikobasale Degeneration (<i>corticobasal degeneration</i>)
CCV	mit Clathrin-beschichtete Vesikel (<i>Clathrin coated vesicle</i>)
CD4+ bzw. CD8+	<i>cluster of differentiation 4</i> bzw. <i>8</i> ; Glykoprotein an der Oberfläche von Zellen des Immunsystems
Cl ⁻	Chlorid
CTSD	Aspartylproteinase Cathepsin D (<i>pre-cathepsin D</i>)
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
<i>DCAKD</i>	<i>dephospho-CoA kinase domain containing</i> -Gen

Abkürzungsverzeichnis

dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dd	Erkrankungsdauer (<i>disease duration</i>)
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d. h.	das heißt
DJ-1	DJ-1-Protein, auch genannt PARK7 (<i>parkinson protein 7</i>)
<i>DJ-1</i>	<i>DJ-1-Gen</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DLB	Demenz mit Lewykörpern (<i>Dementia with Lewy bodies</i>)
DRS-2	<i>Mattis Dementia Rating Scale-2</i>
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ε	Epsilon; Risikoallel von <i>APOE</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EOPD	<i>early onset PD</i>
eQTL	<i>expression quantitative trait loci</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum (<i>endoplasmic reticulum</i>)
ERAD	ER-assoziierte Proteindegradation (<i>endoplasmic reticulum-associated degradation</i>)
et al.	und andere (et alii, et aliae, et alia)
EXO I	Exonuklease I
f.	die angegebene und die folgende Seite
ff.	die angegebene und die beiden folgenden Seiten
<i>FBX07</i>	<i>F-box protein 7-Gen</i>
FTDP-17	Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus in Verbindung mit dem Chromosom 17 (<i>frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17</i>)
γ	Gamma
g	Gramm
G	Guanin
GABA _A	γ-Aminobuttersäure
GAK	Cyclin G-assoziierte Kinase (<i>cyclin G-associated kinase</i>)
<i>GAK</i>	<i>Cyclin G-assoziierte Kinase-Gen</i>
<i>GBA</i>	<i>Glucozerebrosidase-Gen</i>

Abkürzungsverzeichnis

GCK	Keimzentrum-Kinasen (<i>germinal center kinase</i>)
GDNF	<i>glial cell line-derived neurothrophic factor</i>
GRP	<i>Glucose-regulated protein</i>
GWAS	<i>genome-wide association study</i>
h	Stunde(n)
HD	Huntington (<i>Huntington disease</i>)
H1, H2	unterschiedliche Haplotypen des Tau-Gens
H ₂ O	Wasser
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
<i>HLA</i>	humanes Leukozyten-Antigen-Gen
HLA-DR	MHC Klasse-II-Rezeptor/HLA Klasse-II-Molekül
<i>HLA-DRA</i>	Gen, welches für ein HLA Klasse-II-Molekül mit α -Kette kodiert
<i>HLA-DRB</i>	Gen, welches für ein HLA Klasse-II-Molekül mit β -Kette kodiert
HLA-DQ	MHC Klasse-II-Rezeptor/HLA Klasse-II-Molekül
Hsc	<i>heat shock cognate protein</i>
Hsp	Hitze-Schock-Protein (<i>heat shock protein</i>)
HSPA5	Hitze-Schock-Protein 5 70kDa (<i>heat shock 70kDa protein 5</i>)
<i>HSPA5</i>	Hitze-Schock-Protein 5 70kDa-Gen
h-Tau	Gesamt-Tau, Total-Tau
H&Y	Hoehn & Yahr
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
IFN- γ	Interferon-Gamma
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
K ⁺	Kalium
kbp	Kilo-Basenpaare
KCC2	K ⁺ /Cl ⁻ -Co-Transporter
kDa	Kilo-Dalton
Kit	gebrauchsfertige Reaktionslösung
l	Liter
LB	Lewykörper (<i>Lewy bodies</i>)
LBD	Lewykörper-Erkrankungen (<i>Lewy body disorders</i>)
LD	Kopplungsungleichgewicht (<i>linkage disequilibrium</i>)
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor (<i>low-density lipoprotein receptor</i>)
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin

Abkürzungsverzeichnis

LINGO1	<i>leucine rich repeat and Ig domain containing 1-Gen</i>
LN	Lewyneuriten (<i>Lewy neurites</i>)
LOPD	<i>late onset PD</i>
LRRK2	<i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
LRRK2	<i>leucine-rich repeat kinase 2-Gen</i>
M	Molalität in mol/kg
MAF	Frequenz der selteneren Variante eines Gens (<i>minor allele frequency</i>)
MALDI-TOF	Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation, Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (<i>matrix assisted laser desorption/ionization time of flight</i>)
MAOA	Monoaminoxidase A (<i>monoamine oxidase A</i>)
MAOB	Monoaminoxidase B (<i>monoamine oxidase B</i>)
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau (<i>microtubule-associated protein tau</i>)
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau-Gen
MAPT-H1C	Subhaplotyp des Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau-Gens
Mb	Mega-Basenpaare
MDS	<i>Movement Disorder Society</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP-3	Matrix-Metalloproteinase-3
MMSE	Mini-Mental-Status-Test (<i>Mini-Mental-State-Examination</i>)
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MS	Multiple Sklerose (<i>Multiple sclerosis</i>)
MSA	Multisystematrophie
mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
N	Anzahl (numerisch)
Na ⁺	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm

Abkürzungsverzeichnis

NKCC1	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ -Co-Transporter
NMS	nicht-motorische Symptome (<i>non-motor symptoms</i>)
NMS-Quest	<i>NMS-questionnaire</i>
NSAID	nicht-steroidale Antiphlogistika (<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
o. g.	oben genannt
p	p-Wert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	Parkinson-Erkrankung ohne weitere Subklassifizierung (<i>Parkinson's disease</i>)
PDD	Parkinson-Erkrankung mit Demenz (<i>Parkinson's disease with dementia</i>)
PDND	Parkinson-Erkrankung ohne Demenz (<i>Parkinson's disease non-demented/without dementia</i>)
<i>PDXK</i>	<i>pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase-Gen</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
PiD	Morbus Pick (<i>Pick's Disease</i>)
<i>PINK1</i>	PTEN-induzierte Kinase 1 (<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>)-Gen
<i>PITX3</i>	<i>paired-like homeodomain 3</i> -Gen
<i>PLA2G6</i>	<i>phospholipase A2, group VI</i> -Gen
<i>PRKN</i>	Parkin-Gen
PSP	Progressive supranukleäre Blickparese (<i>progressive supranuclear palsy</i>)
p-Tau	phosphoryliertes Tau, Phospho-Tau
PTEN	Phosphatase und tensin homologer Tumorsupressor (<i>phosphatase and tensin homolog</i>)
RBD	REM-Schlafverhaltensstörung (<i>rapid eye movement-sleep behaviour disorder</i>)
REM	<i>rapid eye movement</i>
RNS	reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
s. a.	siehe auch
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
sec.	Sekunde
SMOX	<i>spermine oxidase</i>
SNCA	Alpha-Synuklein-Gen
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)

Abkürzungsverzeichnis

SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
s. o.	siehe oben
SPAK	<i>Ste20-related proline-alanine-rich kinase</i>
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>)
SPMSQ	<i>Short Portable Mental Status Questionnaire</i>
SPS	Selenophosphat-Synthetase (<i>selenophosphate synthetase</i>)
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Std	Standarddeviation/Standardabweichung
STE20	<i>Sterile 20</i> (gehört zu den Serin-Threonin Kinasen)
STK39	Serin-Threonin Kinase 39 (<i>serine-threonine kinase 39</i>)
STK39	Serin-Threonin Kinase 39-Gen
s. u.	siehe unten
T	Thymin
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGN	trans-Golgi Netzwerk
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U	Unit, Enzymeinheit
u. a.	unter anderem/ unter anderen
UK	<i>United Kingdom</i>
UPDRS	<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasomen System (<i>ubiquitin-proteasome system</i>)
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
VPS35	<i>Vacuolar protein sorting 35-Gen</i>
vs.	versus
X	Allel $\epsilon 2$ oder Allel $\epsilon 3$ von <i>APOE</i>
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Lewykörper-Erkrankungen, *Lewy body disorders* (LBD)

1.1.1 Allgemeine Aspekte

Unter dem Begriff der Lewykörper-Erkrankungen (*Lewy body disorders*; LBD) werden die Krankheitsbilder der Parkinson-Erkrankung (*Parkinson's disease*; PD) mit Demenz (*PD with dementia*; PDD), der Parkinson-Erkrankung ohne Demenz (*PD non-demented*; PDND) und der Demenz mit Lewykörpern (*Dementia with Lewy bodies*; DLB) zusammen gefasst.

Ihre gemeinsame Bezeichnung erfolgt zum einen aufgrund einer vergleichbaren Neuropathologie. Allen gemeinsam sind neben spezifischer Neurodegeneration die charakteristischen histopathologischen Veränderungen, die Lewykörper (*Lewy bodies*; LB) und die Lewyneuriten (*Lewy neurites*; LN) [1]. Eine genauere Beschreibung der Neuropathologie findet sich in Kapitel 1.1.8. dieser Arbeit.

Zum Anderen teilen sich die LBD auch das gehäufte Vorkommen von einigen klinischen Merkmalen, wie beispielsweise Parkinsonismus (zwingend in PD, nicht zwingend aber sehr häufig in DLB), Halluzinationen, Wahnvorstellungen, Depressionen, REM-Schlafverhaltensstörungen (*rapid eye movement sleep behaviour disorder*; RBD) und verschiedene autonome Dysfunktionen [2].

1.1.2 Epidemiologie und klinische Aspekte der PD

PD ist nach der Alzheimer Erkrankung (*Alzheimer's disease*; AD) die häufigste neurodegenerative Erkrankung, welche >1% der über 65-Jährigen und >4% der über 85-Jährigen betrifft [3]. Die Prävalenz der PD nimmt mit steigendem Alter zu [4]. Aufgrund der sich ändernden Altersstruktur in der Bevölkerung, wird deshalb die Zahl der an PD Erkrankten in den kommenden Jahren zunehmen.

Bezüglich einer geschlechtsspezifischen Differenz in Inzidenz und Prävalenz der PD existieren unterschiedliche Meinungen. Rijk et al. [4] beschreibt – basierend auf Studien mit Screening-Verfahren auf Parkinsonismus und PD – keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Geschlechter. Daneben gibt es eine Vielzahl von Studien, die sowohl eine höhere Inzidenz, als auch Prävalenz der PD bei Männern zeigen [5, 6]. Die Autoren führen die bei Frauen

physiologischerweise höheren Dopamin-Spiegel im Striatum – vermutlich bedingt durch Östrogen – als mögliche protektive Ursache an [5].

Parkinson-Syndrome werden klinisch charakterisiert durch das Vorliegen einer Bradykinese und mindestens einem der weiteren Kardinalsymptome Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität. Die Konstellation der Kardinalsymptome innerhalb einer betroffenen Person legt den Subtyp der PD fest (Tremor-dominanter-Typ, akinetisch-rigider-Typ, Äquivalenz-Typ, monosymptomatischer Ruhetremor).

Außer den beschriebenen motorischen Auffälligkeiten können Begleitsymptome auftreten. Hierzu gehören vegetative Symptome (autonome Dysfunktionen wie Blutdruckschwankungen bzw. Hypotonie, Harnblasendysfunktion, sexuelle Dysfunktion, Schlafstörungen – insbesondere RBD), sensorische Störungen (Dysästhesien, Schmerzen), neuropsychiatrische Symptome (v. a. Depression) und kognitive Einschränkungen, welche bis zur Demenz führen können (PDD) [7].

1.1.3 Kognitive Beeinträchtigung und Demenz bei PD

Entgegen der ursprünglichen Auffassung des Erstbeschreibers James Parkinson im Jahre 1817 mit „*An Essay on the Shaking Palsy*“, bei der PD würde die intellektuelle Funktion erhalten bleiben, ist die kognitive Beeinträchtigung bei der PD deutlich gehäuft vorzufinden (etwa 4- bis 6-fach erhöhtes Risiko gegenüber einer gleichaltrigen Person die keine PD hat [8, 9]) und heute als prognostisch wichtiger Faktor der PD anerkannt [10]. Laut Levy et al. [11] bringt die Entwicklung einer Demenz ein 2-fach erhöhtes Mortalitätsrisiko der PD mit sich.

Die Prävalenz einer Demenz bei PD liegt im Durchschnitt bei etwa 40% [8]. Als prädiktive Faktoren für die Entwicklung einer Demenz bei PD gelten hohes Lebensalter bei Erstmanifestation der PD, längere Zeitdauer der PD-Symptome, Vorhandensein von Halluzinationen, akinetisch-rigider Phänotyp, ein hoher *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS)-Wert (s. u.) und Defizite des Gedächtnisses, der visuell-räumlichen und konstruktiven Fähigkeiten,

sowie des Redeflusses (semantische Störung) schon früh im Verlauf der Erkrankung [12, 13]. Somit kann durch neuropsychologische Testverfahren eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Demenz bei PD ermittelt werden [13].

1.1.3.1 Kognitive Symptome bei PD und Abgrenzung zu AD

Bei der PD zeigen sich verschiedene kognitive Defizite, welche als Anzeichen für die Entwicklung einer Demenz (PDD) angesehen werden [14]. So wird die PDD u. a. charakterisiert durch Störungen der Aufmerksamkeit, des Gedächtnisses, der visuell-räumlichen Funktionen, Veränderungen des Verhaltens wie der Affektivität, Halluzinationen und Apathie [15]. Als eine der wichtigen Domänen gilt außerdem die Beeinträchtigung der exekutiven Funktionen wie Planung, Kontrolle der Hemmung, verminderte Geschwindigkeit der Verarbeitung und Zeitgefühl [14]. Diese Dysfunktionen sind denen einer Frontallappenläsion ähnlich. Kognitive Beeinträchtigungen des parietalen und temporalen Lappens betreffen vorwiegend die kortikale Demenz der AD, sind aber ebenfalls bei PDD wahrscheinlich [16]. Trotz dieser und neuropathologischer Gemeinsamkeiten (s. u.) und einer Überlappung der klinischen Ausprägungen, zeigen AD und PDD klinisch unter anderem folgende Unterschiede [17]: PDD-Patienten zeigen vorrangig Defizite in Aufmerksamkeit, exekutiver Funktion und visuell-räumlicher Funktion. Gedächtnisstörungen sind typisch für AD und bei PDD weniger ausgeprägt. Bei PDD ist der Redefluss als dominante Störung der Sprache beeinträchtigt, während bei AD Schwierigkeiten der Benennung und ein gestörtes Verständnis im Vordergrund stehen. Neuropsychiatrische Symptome wie visuelle Halluzinationen und Depression scheinen bei PDD häufiger aufzutreten [16].

1.1.4 Diagnostik der PD und PDD

1.1.4.1 Diagnostische Kriterien

Die Diagnose der PD wird klinisch gestellt und orientiert sich weitgehend an den Kriterien der „*United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank*“ (UK

Parkinson's Disease Society Brain Bank clinical diagnostic criteria) [18] mit folgenden diagnostischen Schritten:

Dem Nachweis für das Vorliegen einer PD mithilfe der o. g. charakteristischen Symptome; dem Ausschluss einer symptomatischen PD oder häufiger Differentialdiagnosen; dem Beachten wichtiger Warnsymptome, welche für eine atypische PD sprechen würden; dem Beachten von Hinweisen, welche auf eine familiäre Form der PD hindeuten (Familienanamnese, besonders früher Erkrankungsbeginn); die Bestätigung im Verlauf [7].

Um die Entwicklung einer PDD diagnostizieren zu können wurden von der *Movement Disorder Society* (MDS) klinisch diagnostische Kriterien definiert [15].

1.1.4.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung nach Hoehn & Yahr (H&Y) berücksichtigt das Vorhandensein von uni- oder bilateralen motorischen Symptomen, posturaler Stabilität und funktionaler Defizite. Sie teilt die PD in die Kategorien mild (1-2; in modifizierter Form in 0,5 Abstufungen (1,5; 2,5)), moderat (3) und fortgeschritten (4-5) ein [19].

Eine weitere, häufig angewandte Möglichkeit, um die Ausprägung von PD-assoziierten Symptomen zu beurteilen und die Wirksamkeit einer Behandlung zu erfassen, ist die UPDRS [19].

Diese Bewertungsskala, bestehend aus vier Komponenten (I: mentale Aktivität, Verhalten und Stimmung; II: Aktivitäten des täglichen Lebens; III: motorischer Aspekt; IV: motorische und nicht-motorische Komplikationen in Zusammenhang mit der dopaminergen Behandlung auftretend), wurde zusammengesetzt aus verschiedenen Elementen bereits existierender klinischer Skalen, um möglichst viele Aspekte der Krankheit beurteilen zu können [20].

Um nicht-motorische Symptome (*non-motor symptoms*; NMS) der PD zusätzlich besser beurteilen zu können, existieren Skalen wie der *non-motor symptoms questionnaire* (NMS-Quest) [21]. Dieser enthält 30 Einheiten mit Fragen, welche die PD-Patienten auf neuropsychiatrische, den Schlaf betreffende, urogenitale,

gastrointestinale, sensorische und kognitive Beeinträchtigungen screenen sollen [22].

1.1.5 Epidemiologie und klinische Aspekte der DLB

Die DLB macht etwa 15-35% der Demenz Fälle aus und ist nach der AD die zweithäufigste Demenz [23].

Während die PD hauptsächlich von motorischen Symptomen dominiert wird, steht bei der DLB eine deutliche Fluktuation von Aufmerksamkeit und kognitiver Leistung im Vordergrund [2, 24]. Die DLB präsentiert sich klinisch vor allem mit einer progredienten kognitiven Beeinträchtigung, speziell mit Defiziten der visuell-räumlichen Fähigkeiten, sowie der frontalen Exekutivfunktionen. Begleitet werden diese Symptome von spontan rezidivierenden visuellen Halluzinationen, sowie normalerweise nur mild bis moderat ausgeprägtem Parkinsonismus, welcher oft akinetisch-rigide ausgeprägt ist [24, 25].

1.1.6 Klinische Unterscheidung der PDD von der DLB

Die DLB und PDD werden klinisch mithilfe der „Ein-Jahres-Regel“ unterschieden. Das heißt, dass bei der PDD die motorischen Symptome mehr als ein Jahr vor der dementiellen Entwicklung aufgetreten sind, und bei der DLB die kognitiven Symptome den motorischen entweder zeitlich vorausgegangen sind, oder aber innerhalb eines Jahres des Erstauftretens von motorischen Symptomen auftraten (wenn diese überhaupt auftreten) [15, 25].

Es gibt derzeit eine intensive Diskussion darüber, ob PDD und DLB nicht verschiedene Eckpunkte eines gemeinsamen Spektrums ein und derselben Erkrankung darstellen. Dies wird v. a. durch die sehr ähnliche Neuropathologie der beiden Erkrankungen, sowie dem Überlappen der o. g. kognitiven Symptome (bei unterschiedlicher Ausprägung) gestützt.

1.1.7 Diagnostik der DLB

1.1.7.1 Diagnostische Kriterien

Die Kriterien zur klinischen Diagnose der DLB [25] umfassen verschiedene Merkmale, welche je nach Vorhandensein eine DLB möglich oder

wahrscheinlich machen. Für detaillierte Darstellungen dieser Charakteristika der DLB, hauptsächlich zusammengesetzt aus Hauptmerkmalen (zunehmende kognitive Störungen mit Beeinträchtigungen sozialer und beruflicher Funktionen mit Prominenz o. g. kognitiver Fähigkeiten), Kernmerkmalen (kognitive Fluktuationen, visuelle Halluzinationen, Parkinsonismus), hinweisenden (wie z. B. REM-Schlaf-Verhaltensstörung) und unterstützenden Merkmalen (u. a. autonome Dysfunktionen, Depressionen) wird auf die Referenzen verwiesen [23, 25, 26]. Bei wenig spezifischen klinischen Symptomen kann eine Verdachtsdiagnose mithilfe von SPECT oder PET gestellt werden, welche im Falle einer DLB eine verminderte präsynaptische Dopamin-Transporter Aufnahme in den Basalganglien zeigen [23, 26].

1.1.8 Ätiologie und Pathogenese der LBD (PD und DLB)

1.1.8.1 Neuropathologische Aspekte

Die neuropathologische Diagnose der PD wird definiert durch den Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) und zusätzlich vorliegenden intraneuronalen Einschlüssen (LB und LN) in diesem Bereich. Zusätzlich findet sich auch im peripheren und autonomen Nervensystem oft eine LB-Pathologie [27].

LB und LN finden sich oft auch in limbischen und neokortikalen Regionen, vorrangig in kleinen Neuronen der tieferen Schichten des Kortex. Diese LB und LN beinhalten das (fehlgefaltete) Protein Alpha-Synuklein, das pathologische Kennzeichen von PD und DLB [28, 29].

Alpha-Synuklein findet sich unter physiologischen Bedingungen vorrangig in präsynaptischen Endigungen, hier vorzugsweise in Synapsen-reichen molekularen Schichten des Zerebellums, Neokortex, Hippocampus und der Retina [30]. Die Funktion von Alpha-Synuklein ist letztlich nicht geklärt. Es wird angenommen, dass es für die Entstehung, Lokalisation und/oder Erhaltung einer Teilmenge der präsynaptischen Vesikel notwendig ist, welche als Reserve, beziehungsweise als sogenannter „ruhender Pool“ dienen [29, 31]. Eine synaptische Dysfunktion, hervorgerufen z. B. durch die Neurotoxizität von

fehlgefaltetem Alpha-Synuklein und dessen Aggregaten, wird vorrangig für die Entwicklung einer Neurodegeneration verantwortlich gemacht [32].

Des Weiteren wurde eine Vielzahl anderer fehlgefalteter Proteine in LB identifiziert, wie Neurofilamente, Hitze-Schock-Proteine (*heat shock proteins*; Hsps), Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP-2), Tau und Ubiquitin, um nur wenige der anderen Proteine zu benennen [29].

Es wird angenommen, dass das Fortschreiten der typischen neuropathologischen Veränderungen der PD – basierend auf fortschreitender Neurodegeneration, sowie Menge und Lokalisation der LB – einem bestimmten, von caudal nach rostral progressiven Ausbreitungsmuster folgt (Braak-Staging, [33]). Bereits in frühen Fällen der Erkrankung sollen Schäden im Bulbus und Traktus olfaktorius, dem dorsalen motorischen Kern des Nervus vagus, im Rückenmark und in den Nervengeflechten in der Wand des Magen-Darm-Traktes vorhanden sein [34]. Von diesen, teils peripheren Regionen, breitet sich die pathologische Schädigung über umfassende Gebiete des zentralen Nervensystems (ZNS) aus. Innerhalb des ZNS ist die Ausbildung von LB und LN anfangs auf die Medulla oblongata, das pontine Tegmentum (inklusive des dorsalen motorischen Kerns des Nervus vagus und des Locus coeruleus) und anteriore olfaktorische Strukturen beschränkt (Stadium 1-2 nach Braak; präsymptomatische oder frühe nicht-motorische Periode). Im Folgenden breitet sich die Neurodegeneration und LB-Pathologie auf die SN und andere Kerne des basalen Mittel- und Vorderhirns (u. a. den Nucleus Basalis Meynert), sowie auf den Mesokortex aus. Während dieser Phase manifestiert sich das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung (Stadium 3-4 nach Braak; motorische Periode). Im finalen Stadium korreliert die ausgedehnte neokortikale Neurodegeneration und LB-Ablagerung mit einer deutlichen kognitiven Beeinträchtigung, assoziiert mit Halluzinationen und schwerem Parkinsonismus (Stadium 5-6 nach Braak) [3, 28, 34].

Neuere Studien haben neben diesem Ausbreitungsmuster außerdem Charakteristika bezüglich der PD-Subtypen entdeckt: So sollen Patienten mit posturaler Instabilität, sowie nicht Tremor-dominanten und Gangbild-dominanten klinischen Erscheinungsbildern signifikant mehr kortikale LB und

Amyloid- β -Plaques (A β -Plaques) aufweisen, verglichen mit einem Tremor-dominanten Subtyp. Weiterhin scheint im Gegensatz zu PDND-Patienten bei PDD-Patienten in größerem Umfang eine kortikale Alpha-Synuklein-Pathologie vorhanden zu sein und dessen Schwere mit der AD-Pathologie zu korrelieren [28]. Deshalb, und weil in einer Studie etwa 40% der PDD-Fälle (zusätzlich) neuro-pathologische diagnostische Kriterien einer AD aufwiesen (welche das klinische Erscheinungsbild wahrscheinlich relevant mitprägt), erscheint eine reine Klassifizierung im Sinne von Braak et al. unzureichend [35, 36].

Subkortikale und kortikale LB- und AD-assoziierte (Neurofibrillenbündel, A β -Plaques) Pathologien sind vermutlich Teil eines komplexen Prozesses, welcher zu Veränderungen der kognitiven Funktion in LBD-Patienten führt. Wie schon durch das Auftreten der morphologischen Korrelate und dem Verlust von Neuronen an den verschiedenen Lokalisationen des Gehirns ersichtlich, beruhen diese kognitiven Dysfunktionen nicht nur auf Störungen des dopaminergen, sondern auch des serotoninergeren, noradrenergen und – ähnlich wie bei der AD – des cholinergen Netzwerks [17, 37].

Es konnten bisher keine eindeutigen pathologischen Kriterien gefunden werden, welche PDD und DLB voneinander unterscheiden [28]. Lediglich gewisse Abweichungen in Schwere und Verteilung der Läsionen und Alpha-Synuklein-Ablagerungen sind vorhanden. Ein größerer morphologischer Unterschied diesbezüglich ergibt sich u. a. durch eine verstärkte Anreicherung von diffusen A β -Plaques im Striatum bei DLB [38]. Auch die Feststellung, dass die Entwicklung einer Demenz in PD bei begleitender AD-Pathologie beschleunigt wird [39] lässt vermuten, dass A β (s. u.) v. a. auf DLB (mit definitionsgemäß einer Demenzentwicklung innerhalb eines Jahres) einen größeren Einfluss nimmt. Es wurde jedoch auch schon angenommen, dass DLB direkt mit der Schwere der LB-Pathologie korreliert, jedoch in umgekehrter Relation zu der Schwere der begleitenden AD-Pathologie steht [28].

A β -Pathologie in PDD und DLB

A β ist v. a. bekannt durch seine Akkumulation in AD in Form von unlöslichen senilen Plaques oder extrazellulären Depositionen im Gehirnparenchym.

Das A β -Peptid (mit 40 oder 42 Aminosäuren; AS; A β_{1-40} oder A β_{1-42}) wird durch Enzym-Komplexe mit β - und γ -Sekretasen von dem Vorläuferprotein APP (*β -amyloid precursor protein*) abgespalten [28]. Ein Ungleichgewicht zwischen dessen Produktion und Beseitigung soll eine Bildung von A β -Oligomeren und die Ablagerung unlöslicher Plaques im Gehirn mit anschließender Neurodegeneration und kognitiver Schädigung zur Folge haben [40]. Neben der direkten neurotoxischen Wirkung, insbesondere der löslichen A β -Oligomere, wird eine Schädigung der Neurone durch A β über eine inflammatorische Reaktion aktivierter Mikrogliazellen – mit Produktion von u. a. freien Radikalen – diskutiert [41]. Wie bereits erwähnt, spielt A β in wechselseitiger Beeinflussung mit Alpha-Synuklein und Tau auch bei LBD eine bedeutende Rolle. So zeigen v. a. sowohl PDD- als auch DLB-Patienten gehäuft eine AD-typische Pathologie und eine verminderte A β_{1-42} -Konzentration im Liquor bei Vorhandensein dieser Plaques [42-44]. Die A β_{1-42} -Konzentration im Liquor soll dabei in umgekehrter Relation zu der Dichte der A β -Depositionen im Gehirn stehen [43]. Außerdem sind höhere Werte von Autoantikörpern gegen u. a. Alpha-Synuklein sowie A β_{42} im Serum von PDD- und DLB-Patienten nachzuweisen [45]. Des Weiteren sollen Transmitter wie Acetylcholin und Dopamin modulierend auf die A β -Synthese und -Degradierung wirken und könnten somit bei Dysfunktion bzw. Reduktion (wie bei PD) einen Einfluss auf die A β -Akkumulation und damit v. a. auch auf die kognitive Performance nehmen [43].

In unserer Arbeit scheint A β zusätzlich von besonderer Bedeutung, da ApoE (Apolipoprotein E-Protein; *apolipoprotein E*) vermutlich an dessen proteolytischer Beseitigung beteiligt ist [46]. Die Isoform ApoE4 – eine der Risiko-Varianten für PD (s. u.) – soll hingegen diesen Ablauf stören und zur Stabilisierung der besonders neurotoxischen A β -Oligomere führen [40, 46].

1.1.8.2 Was haben wir von monogenetischen Parkinson-Syndromen gelernt?

Durch die Identifizierung der monogenetischen Varianten der PD und die fortwährende Entdeckung weiterer prädisponierender Loci, ergeben sich Hinweise auf pathologische Mechanismen, welche zur Entstehung der PD beitragen [47].

Die PD ist größten Teils eine multifaktorielle Erkrankung, welche sich vermutlich durch eine Kombination aus (meist) polygenetischer Vererbung, modifizierenden Effekten durch prädisponierende Allele, Umwelteinflüsse und Gen-Umwelt-Interaktionen, sowie ihrem direkten Einfluss auf das sich entwickelnde und alternde Gehirn ergibt [3, 48]. Nur in etwa 10-20% der PD-Fälle wird ein familiärer Hintergrund angenommen, bei dem das genaue Vererbungsmodell jedoch auch nicht immer ersichtlich ist. Die familiäre PD, welche in ihrer Vererbung den Mendelschen Regeln folgt, ist selten und macht in unseren Breiten weniger als 5% aller PD-Patienten aus [27].

In den letzten Jahrzehnten konnten mithilfe familiärer PD-Studien viele weitere Erkenntnisse bezüglich genetischer Komponenten der Erkrankung erzielt werden. Dadurch wurden unter anderem Gene identifiziert (*LRRK2*, *SNCA*, *VPS35*, *Parkin*, *PINK1*, *DJ1*), welche in direktem Zusammenhang mit einer monogenetischen Form der PD stehen [3], und Gene mit ebenfalls monogenetischem Vererbungsmuster (*ATP13A2*, *FBXO7*, *PLA2G6*), welche allerdings einen atypischen Phänotyp (mit beispielsweise Spastik, Dystonie) auslösen. Auf einen Teil dieser Risiko-Gene wird zum besseren Verständnis im Folgenden näher eingegangen.

Mutationen im Alpha-Synuklein (*SNCA*)-Gen folgen einem autosomal-dominanten Erbgang, sind sehr selten und gehen oft mit einer frühen Manifestation, sowie einem rasch progredienten Verlauf der Erkrankung einher. Im Zusammenhang mit der als Schlüsselement der PD betrachteten synaptischen Dysfunktion gilt als sicher, dass die Aggregation des in den LB vorhandenen Alpha-Synuklein hierbei eine entscheidende Rolle spielt [3].

Ebenfalls autosomal-dominant aber weitaus häufiger, werden Mutationen im *leucine-rich repeat kinase 2* (*LRRK2*)-Gen vererbt. Es wurde gezeigt, dass eine durch *LRRK2*-Mutationen bedingte erhöhte Aktivität der *LRRK2*-Kinase zu Neurotoxizität führen kann, welche in Verbindung mit einer Mitochondrien-abhängigen Apoptose steht [49]. Betroffene Patienten zeichnen sich durch eine typische Klinik der *late onset* PD (LOPD) aus. Eine dementielle Entwicklung ist seltener als bei der idiopathischen PD [3].

In diesen beiden Fällen der dominant vererbten monogenen PD (*SNCA*, *LRRK2*), wird eine toxische *gain-of-function*-Mutation für eine Neurodegeneration verantwortlich gemacht [47].

Eine autosomal-rezessive und früh manifestierende Form der PD (*early onset PD*; EOPD, Manifestation vor dem 50. Lebensjahr [50]), wird z. B. durch die Gene *DJ-1*, *PINK1* und *Parkin (PRKN)* verursacht [47].

Das Protein DJ-1 ist im Zytosol und im Bereich der mitochondrialen Matrix lokalisiert und wirkt vermutlich direkt als Antioxidans. Eine erhöhte Expression von DJ-1 scheint neben anderen Funktionen einen neuroprotektiven Effekt gegen oxidativen Stress – verursacht durch mitochondriale Toxine – auszuüben [51].

PINK1 kodiert für die *phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1)*, eine Serin/Threonin-Kinase, welche bei der Regulation des Zellzyklus mitwirkt und ebenfalls im Zytosol, sowie in den Mitochondrien zu finden ist. Es wird eine direkte Beeinflussung des programmierten Zelltods als Protektion gegen Neurodegeneration angenommen. Da außerdem die PINK1 in transfizierten Zellen in die Mitochondrien transportiert wird und dort akkumuliert, wird angenommen, dass das Genprodukt eine relevante Rolle im mitochondrialen Stoffwechsel spielt [51, 52].

Bei Mutationen im *Parkin (PRKN)*-Gen konnte im Vergleich zur idiopathischen PD ein selektiver Verlust von Neuronen mit Beschränkung auf die SN und den Locus coeruleus, sowie – interessanterweise – das Fehlen der typischen LB-Pathologie festgestellt werden [53]. *Parkin* befindet sich meist im Zytosol, kann aber unter Stressbedingungen in die äußere Mitochondrienmembran und das Endoplasmatische Retikulum (ER) aufgenommen werden. Es hat die Funktion einer E3 Ubiquitin-Ligase im Prozess der Ubiquitinierung und Degradation von zellulären Proteinen. Durch *Parkin*-Mutationen wird die Interaktion zwischen *Parkin* oder dessen Substraten beeinflusst. Die Folge sind teils akkumulierte, nicht-ubiquitinierte intrazelluläre Proteine, welche zum Untergang dopaminergener Neurone führen. Außerdem soll eine Überexpression des *Parkin*-Proteins eine neuroprotektive Wirkung gegenüber der durch eine Alpha-Synuklein-Mutation verursachten Zytotoxizität mit Bildung von LB erfüllen [49].

Das *ATP13A2*-Gen wird ebenfalls rezessiv vererbt. Dessen Mutation zeigt einen sehr frühen Erkrankungsbeginn (11-16 Jahre) eines atypischen Parkinsonismus. Das Gen kodiert für ein gleichnamiges lysosomales Membranprotein mit ATPase-Domäne, welches überwiegend im Gehirn – hier vor allem im Bereich des ventralen Mittelhirns (inklusive der SN) – exprimiert wird. Genaue Funktionen sind jedoch noch nicht bekannt [3].

1.1.8.3 Molekularbiologie und Biochemie der LBD

Die beschriebenen monogenetischen Formen der PD können bereits gewisse molekulare Hinweise darauf geben, wie die nicht monogenetisch bedingten PD-Formen entstehen und verlaufen können. So konnte durch verschiedene Analysen, Modelle und postmortale Studien nachgewiesen werden, dass bestimmte molekulare Mechanismen eng mit LBD assoziiert sind. Darunter fallen u. a. mitochondriale Dysfunktion, oxidative Stressantwort, fehlregulierte Proteinaggregation, Störungen im Ubiquitin-Proteasomen System (*ubiquitin-proteasome system*; UPS) oder den Kinase-Signalwegen und unkontrollierte Inflammation [51]. Ein dynamisches Zusammenspiel der verschiedenen pathologischen Prozesse (und nicht die einzelnen Prozesse per se) wird vermutlich schlussendlich zur Neurodegeneration führen. Es bleibt noch zu ermitteln, in welcher Abfolge diese Dysfunktionen auftreten, ob manche als Auslöser fungieren oder sich nur als Folge oder Reaktion auf bestimmte Prozesse ergeben. Auch wenn der Initiator oder die Initiatoren im Detail nicht verstanden sind, wird – etwas unspezifisch – die bereits erwähnte Interaktion von Genen und Umwelt für das Überschreiten einer Grenze zur Prädisposition für die Neurodegeneration und damit den Beginn der Erkrankung verantwortlich gemacht [54].

Die für diese Arbeit relevanten Mechanismen werden nun etwas näher vorgestellt.

Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion

Um den hohen basalen Energiebedarf der Neurone decken zu können, sind diese besonders auf die aerobe Glykolyse mit anschließender oxidativer

Phosphorylierung in den Mitochondrien angewiesen. Die Energieumwandlung über den Weg der Elektronen-Transport-Kette in den verschiedenen mitochondrialen Komplexen liefert letztendlich die benötigte Energiequelle ATP (Adenosintriphosphat) [55]. Ein geringer Teil der zwischen diesen Komplexen übertragenen Elektronen reagiert mit Sauerstoff zu molekularen Sauerstoff- und Superoxidanionen, welche in andere, zum Teil stärker reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) umgewandelt werden können. Zum Schutz der Zelle wirken einer exzessiven Entstehung von ROS verschiedene endogene Antioxidations-Systeme entgegen. Wenn dieser Schutzmechanismus jedoch überfordert ist, können die ROS mit verschiedenen Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden, als auch Nukleinsäuren – und damit der DNA (Desoxyribonukleinsäure; *deoxyribonucleic acid*) – interagieren und diesen Schaden zufügen. Dieses Ereignis definiert den Begriff „oxidativer Stress“ und steht in Verbindung mit verschiedenen pathologischen Geschehnissen und dem Alterungsprozess [56].

Es besteht eine sogenannte „*mitochondrial theory of aging*“. Diese Hypothese beruht auf einer gegenseitigen Beeinflussung zwischen Defekten im oxidativen Phosphorylierungssystem der Mitochondrien und der Wirkung der ROS. Durch verschiedene Szenarien wie einer Stressantwort, einer Erkrankung, oder einer durch Schädigung oder zunehmendes Alter entstandenen mitochondrialen Dysfunktion, können vermehrt ROS anfallen. Die ROS können, wie oben beschrieben, eine gesteigerte Mutationsrate der mtDNA (mitochondriale DNA) bewirken, was wiederum eine Zunahme an Defekten in der Atmungskette begünstigen und sogar beschleunigen kann. Die dadurch weiterhin zunehmende Produktion und Ansammlung von ROS hat eine Fortsetzung und Verschlimmerung dieses pathologischen Prozesses zur Folge [55].

Die besonders vielfältigen Erscheinungsformen von Störungen im oxidativen Phosphorylierungssystem sind darauf zurückzuführen, dass viele Unter-einheiten der verschiedenen Komplexe der Atmungskette vom mitochondrialen Genom kodiert werden. Daraus ergibt sich eine ausgeprägte Heteroplasmie. Dies bedeutet, dass Grad und Art der Erkrankung abhängig sind von dem genetischen Defekt selbst, ebenso wie vom Anteil der defekten mitochondrialen

Gene und Mitochondrien in den Zellen. Außerdem ist die mtDNA weitaus anfälliger gegenüber Mutationen, da Histone und ein effektiver Reparaturmechanismus fehlen. Aus diesen Überlegungen kann der progressive Verlauf von altersabhängigen degenerativen Erkrankungen abgeleitet werden [57] und die mitochondriale Dysfunktion als eine der Schlüsselfunktionen in der Entstehung sporadischer, sowie familiärer PD-Fälle angenommen werden [58].

Proteinfaltung und Proteinaggregation

Veränderungen im Protein-Metabolismus – wie Fehlfaltung und Aggregation, post-translationale Modifikation oder dysfunktionale Degradation von zytotoxischen Proteinen – wurden bereits als bedeutendes Element in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie der PD beschrieben [59]. Nicht zuletzt werden bestimmte Krankheiten nach ihrem pathologischen Charakteristikum – wie unlöslichen, akkumulierten Aggregationen – zusammengefasst. Als Beispiel sind hier die Alpha-Synukleinopathien (PD, DLB, zusammen mit der Multisystematrophie (MSA) und einigen seltenen Erkrankungen) zu nennen [60].

Der allgemeine Prozess der Proteinfaltung während der Proteinbildung, aber auch während des Abbaus von Proteinen, benötigt das Durchlaufen vielfältiger Schritte. Währenddessen können verschiedene Intermediärprodukte entstehen, welche unlösliche Aggregate bilden und die Zelle damit gefährden können. Um solche funktionsuntüchtigen Verklumpungen der Polypeptide zu vermeiden und Fehlfaltungen zu minimieren, bedient sich die Zelle gewisser Schutz- und Hilfssysteme [57]. Die sogenannten Chaperone (*chaperone*) oder auch Hsps, binden die naszierenden Polypeptidketten und verhindern so vor allem in Stresssituationen eine fehlerhafte Interaktion und Aggregation ihrer hydrophoben AS-Sequenzen. Sie beschleunigen und erleichtern den korrekten Faltungsprozess, zusätzlich assistieren sie bei der Translokation von Proteinen und spielen bei manchen Signalwegen der Zelle eine wichtige Rolle [61]. Für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Protein-Homöostase verantwortlich, interagieren die Chaperone außerdem, wie weiter oben bereits angedeutet, mit

verschiedenen Systemen der Proteindegradation wie dem UPS oder verschiedenen Autophagensystemen [59].

Die Hsps sind ebenfalls in der Lage, eine Aggregation von Alpha-Synuklein und damit deren Neurotoxizität zu unterbinden. Aufgrund des Vorhandenseins von manchen Untergruppen der Hsps in LB wird angenommen, dass durch diese Sequestration ein funktionaler Verlust der Chaperone entsteht. Die Wirkung der Schutzsysteme, der Abbau von fehlerhaften Proteinen und die Protektion gegenüber Alpha-Synuklein sind dadurch eingeschränkt. Vermehrte synaptische Dysfunktionen und eine Degeneration sind die Folge [59].

Ubiquitin-Proteasomen System

Das UPS trägt zur selektiven, streng regulierten Degradation von Proteinen bei. So können beispielsweise regulatorische Proteine, welche an der Signaltransduktion, der Zellzyklusprogression, der Apoptose und der zellulären Differenzierung beteiligt sind, zielgerichtet abgebaut werden [62].

Proteasomen, in denen mithilfe spezifischer Untereinheiten [62] die Proteine endoproteinolytisch abgebaut werden, befinden sich im Zytosol und im Zellkern. Um die Substrate der Degradation für das Proteasom erkenntlich zu machen, werden Ubiquitin-Polypeptid-Ketten kovalent an das abzubauende Protein gebunden.

Auch die Beseitigung von fehlgefalteten Proteinen aus dem ER fällt in den Zuständigkeitsbereich des UPS, wobei die Gesamtheit dieses Entsorgungssystems als ER-assoziierte Proteindegradation (*endoplasmic reticulum-associated degradation*; ERAD) bezeichnet wird. In diesem Zyklus werden Glykoproteine mit verzögerter Faltung und nicht-glykosylierte Proteine mit ähnlichen Faltungsproblemen durch eine Retrotranslokation ins Zytosol transportiert, polyubiquitiniert und proteasomal abgebaut [57].

Nun wurde in verschiedenen Studien – z. B. in postmortalem Gehirngewebe von PD-Patienten – gezeigt, dass eine Störung dieses UPS an der Pathogenese der PD beteiligt ist. Unterstützend dabei sind die Tatsachen, dass viele ubiquitinierte Proteine Inhalt der LB sind [63], und dass das UPS, ebenso wie das Autophagen-Lysosomen-System (*autophagy-lysosomal pathway*; ALP)

die Hauptabbauwege von Alpha-Synuklein darstellen [59]. Es kann bis heute jedoch nicht eindeutig belegt werden, ob eine dementsprechende Dysfunktion der Abbaumaschinerie der Zelle Ursache oder begleitende Folge in der Entstehung der Neurodegeneration ist [62].

Kinase-Signalwege

Transferasen sind Enzyme, die den Transfer einer funktionellen Gruppe zwischen zwei Substraten katalysieren. Die Kinasen, oder auch Phosphotransferasen, bilden eine Gruppe innerhalb der Transferasen. Sie katalysieren die Übertragung der γ -Phosphatgruppe des ATP auf Akzeptorsubstrate [57].

Unter den ersten Genen, die mit PD in Verbindung gebracht wurden, befinden sich beispielsweise *PINK1* und *LRRK2*, welche für Kinasen kodieren. *PINK1* ist eine mitochondriale Proteinkinase. Mutationen im Gen führen zu mitochondrialer Dysfunktion, sowie einem Defekt im Apoptose-Weg [64].

Da die Signaltransduktionswege allgemein wichtig für die inter- und intrazelluläre Kommunikation und eine funktionierende Regulation der Zellfunktionen sind, kann angenommen werden, dass diese einen weiteren Ansatzpunkt zur Klärung der Pathologie des neuronalen Zellverlustes bei PD bieten.

Inflammation

Experimentelle Modelle der PD, Untersuchungen des Liquors und nigralen Gewebes von PD-Patienten, als auch postmortale Autopsien zeigen aktivierte Mikrogliazellen, reaktive Astrozyten, eine Akkumulation von Zytokinen, eine Erhöhung aktivierter Caspasen und anderer Induktoren des programmierten Zelltods, sowie vermehrt oxidativ geschädigte Proteine. Dies ist als Hinweis zu deuten, dass chronische inflammatorische Prozesse einen Beitrag zur Progression der PD leisten [27, 65].

Die glialen Zellen sind wesentlich an der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn beteiligt, und sorgen so für das Überleben der Neurone [65]. Den Astrozyten wird eine protektive Funktion im Allgemeinen, aber auch speziell bei der PD zugeschrieben: Beispielsweise durch das Mitwirken bei der

Sequestration geschädigter Zellen, der Metabolisierung von Dopamin, dem vermehrten Glutathion-abhängigen Abbau von ROS und der Produktion von neurotrophen Faktoren für dopaminerge Neurone wie dem *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) [27]. Andererseits sezernieren sie pro-inflammatorische Faktoren (beispielsweise *intracellular adhesion molecule 1*; ICAM-1), welche die Mikrogliazellen aktivieren und somit einen Entzündungsprozess unterhalten können [66]. Die Mikrogliazellen übernehmen die Aufgabe als Phagozyten und vermitteln die angeborene Immunantwort. Sie können u. a. aktiviert werden durch Pathogene oder auch durch Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3), Interferon-Gamma (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und aggregiertem Alpha-Synuklein. All diese letztgenannten Metaboliten sind bei der PD erhöht [67]. Aktivierte Mikroglia vermögen ihrerseits eine Vielzahl an Faktoren zu produzieren, unter diesen sind inflammatorischen Zytokine wie TNF- α , Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 β (IL-1 β) [66], sowie reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS). Manche dieser Substanzen wirken bei Reparaturprozessen mit und haben neuroprotektive Effekte. Andere fördern durch ihre Freisetzung die Unterhaltung und Ausbreitung der Inflammation. Werden diese gegensätzlichen Wirkungsweisen (z. B. durch exogene oder endogene Faktoren) aus dem Gleichgewicht gebracht, ist der Untergang von Neuronen, insbesondere in den vulnerablen neuronalen Populationen wie der SN, eine mögliche Folge. Durch die chronische und dysregulierte Entzündung wird auch oxidativer Stress induziert [65].

Fehlgefaltetes Alpha-Synuklein vermag einen solchen inflammatorischen Prozess in Gang zu setzen und/oder zu unterhalten, da es in der Lage ist, sowohl Mikrogliazellen zu aktivieren, als auch Astrozyten zur Produktion von IL-6 und ICAM-1 anzuregen [66]. Da aktivierte Mikrogliazellen demgegenüber durch ihre Freisetzung von freien Radikalen zu einer Modifikation und Aggregation von Alpha-Synuklein führen, kann hier von einer gegenseitigen Beeinflussung ausgegangen werden [68].

Ob die o. g. Verbindungen ausreichend sind, um die Progression des Verlustes an Neuronen erklären zu können, ist letztlich nicht geklärt. Vorstellungen von

einer gestörten Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke (*blood brain barrier*, BBB) und einem sich dadurch ergebenden autoimmunen Prozess bedürfen einer weiteren Abklärung [67].

Der Prozess der Neurodegeneration mit begleitender Proteinakkumulation und Bildung charakteristischer neuropathologischer Strukturen ist mit dem Vorhandensein von biochemischen Markern im Liquor verbunden. Für diese Arbeit interessant sind das Tau-Protein (vermutlich als Marker der Neurodegeneration) und Amyloid- β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$) als Marker parenchymaler $A\beta$ -Ablagerungen [69].

1.1.8.4 Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*; SNPs)

Nach der Vorstellung des „idiopathischen“ Parkinsonsyndroms inklusive der DLB, der monogenetischen Formen der PD, sowie der Beschreibung verschiedener relevanter Pathomechanismen im Entstehungsprozess dieser neurodegenerativen Erkrankungen, sollen nun die genetischen Varianten, die die LBD beeinflussen, diskutiert werden.

Es gibt verschiedene Sequenzvariationen im menschlichen Genom. Am häufigsten, mit ca. 1 auf 1000 Basenpaare (bp), sind die Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*; SNPs). Dabei ist lediglich ein Nukleotid (A, T, C, oder G), also ein Basenpaar, in einem definierten DNA-Abschnitt verändert. Definitionsgemäß beträgt die Allelfrequenz dieser Variante in der Bevölkerung $>1\%$. Die Verteilung der Polymorphismen im Genom ist nicht gleichmäßig. Entsprechend ihrer Position und der Art des Basenpaar-austausches, kann es zu funktionellen Auswirkungen kommen. Liegt ein SNP in einer kodierenden Region, kann ein AS-Austausch beispielsweise zu veränderter Proteinfunktion, -menge oder -stabilität führen.

Die SNPs haben eine große Bedeutung im Hinblick auf bestimmte Gesundheitsrisiken, wobei die Auswirkungen auf bestimmte Erkrankungen bzw. Krankheitsverläufe noch unvollständig verstanden sind. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Assoziation von potentiell Krankheits-relevanten SNPs mit demographischen, klinischen und biochemischen Aspekten von LBD.

Die bis dato bekannten Rollen der SNPs, welche in dieser Arbeit berücksichtigt wurden – *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK*, *MAPT* – werden nachfolgend detaillierter beschrieben.

1.2 Apolipoprotein E – ApoE4

1.2.1 Lokalisation, Struktur und Polymorphismen von *APOE*

Das aus 299 AS bestehende Apolipoprotein E (ApoE), ein Glykoprotein von 35 Kilo Dalton (kDa), wird von dem *APOE*-Gen auf dem Chromosom 19q13.2 kodiert. Dieses setzt sich zusammen aus vier Exons und umfasst 3,6 Kilo-Basenpaare (kbp) [70].

Die Variation zweier SNPs der *APOE*-Region, rs429358 und rs7412, resultiert in verschiedenen Isoformen von ApoE, welche eine Heterogenität bezüglich bestimmter AS-Sequenzen aufweisen. Aus diesen SNPs abgeleitet konnten drei Hauptallele – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ – identifiziert werden, woraus sich sechs verschiedene homozygote und heterozygote Genotypen ergeben: $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ und $\epsilon 3/\epsilon 4$. Die drei Hauptallele kodieren für die drei entsprechenden Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4. Die verschiedenen Varianten unterscheiden sich lediglich durch einen AS-Austausch an den Positionen 112 und/oder 158 (Isoform: 112/158). ApoE2 enthält Cystein (Cys) an diesen beiden Lokalisationen (Cys/Cys), während ApoE3 Cystein nur an Position 112 und Arginin (Arg) an der Position 158 (Cys/Arg) beinhaltet. Bei der Isoform ApoE4 werden beide AS-Standorte von Arginin (Arg/Arg) besetzt [70-72].

1.2.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD

Das im Plasma vorhandene ApoE entstammt vorrangig der Leber und in geringerem Ausmaß den Makrophagen. Es wird jedoch in großer Vielfalt auch in anderen Organen wie Gehirn, Milz, Nieren, Nebennieren, Lunge und Ovarien exprimiert. Im ZNS, wo ApoE eines der hauptsächlichen Apolipoproteine darstellt, findet dessen Synthese lokal – vorrangig in den Astrozyten und Mikrogliazellen – statt [70, 73].

ApoE vermittelt als Ligand die endozytotische Aufnahme von Lipoprotein-Partikeln. Bei Bindung an spezifische Lipoprotein-Rezeptoren aus der Familie der *low-density lipoproteins* (LDL) wird der Ligand-Rezeptor-Komplex durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen und dissoziiert in Endosomen. Der ApoE-Rezeptor wird dabei zurück an die Zelloberfläche transportiert, während der ApoE-beihaltende Lipoprotein-Partikel zu den Lysosomen gelangt, worin Cholesterin für den zellulären Gebrauch verfügbar wird [74]. Im ZNS können Veränderungen im Cholesterin-Metabolismus mit verschiedenen Erkrankungen wie u. a. AD, PD, Multipler Sklerose (*Multiple sclerosis*; MS) und Huntington (*Huntington disease*; HD) in Verbindung gebracht werden [75], denn Cholesterin ist als ein Haupt-Bestandteil der neuronalen Zellmembranen und Synapsen wichtig für deren Erhalt und Funktion [76]. ApoE scheint mit der Beteiligung an dem Transport von Lipiden auch für die Cholesterin-Homöostase verantwortlich zu sein.

Außerdem ist u. a. ApoE an der beschleunigten Aufnahme und dem lysosomalen Transport von A β beteiligt. Dies geschieht Isoformen-abhängig, mit einer effizienteren Degradierung bei ApoE3 im Gegensatz zu ApoE4, der Risikovariante von neurodegenerativen Erkrankungen [77]. Es wird diskutiert, ob diese Induktion der A β -Degradierung u. a. über einen erniedrigten zellulären Cholesterin-Spiegel – ebenfalls durch ApoE – vermittelt wird [78]. Bei *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass ApoE4 im Vergleich zu ApoE3 die Beseitigung von A β sogar signifikant erniedrigte [77]. Auch eine ApoE4-induzierte Akkumulation von A β_{42} und hyperphosphoryliertem Tau mit einhergehender kognitiver Störung konnte in einer Studie bereits nachgewiesen werden [79]. Außerdem führte in einem transgenen Maus-Modell die Überexpression eines LDL-Rezeptors (*low-density lipoprotein receptor*, LDLR), welcher an ApoE bindet, zur Erniedrigung von ApoE und zu einer verminderten A β -Deposition und einer verstärkten extrazellulären Beseitigung von A β [74]. Es scheint offensichtlich, dass ApoE die Akkumulation bzw. Beseitigung von A β beeinflusst. Der genaue Mechanismus bleibt jedoch noch unklar.

Des Weiteren führt der Genotyp *APOE* – v. a. mit $\epsilon 4$ – vermutlich zu neuro-inflammatorischen Prozessen und damit vermehrter neuronaler Schädigung [80].

Nach o. g. Erkenntnissen, dass der Cholesterin-Metabolismus sowie die A β -Pathologie Einfluss auf neurodegenerative Erkrankungen wie AD und PD nehmen, und da zwischen diesen beiden Erkrankungen klinische, pathologische und genetische Ähnlichkeiten bestehen, scheint es in diesen Zusammenhängen plausibel und durchaus wahrscheinlich, dass *APOE* nicht nur Risikofaktor für AD, sondern auch für PD (und PD-assoziierte Symptome wie Demenz) darstellt. Auch, wenn die Ergebnisse diesbezüglich nicht immer einstimmig sind, konnte das *APOE* $\epsilon 4$ -Allel mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für PD und einem jüngeren Erkrankungsalter der PD bereits in Verbindung gebracht werden [81].

1.3 Serin-Threonin-Kinase 39 – STK39

1.3.1 Lokalisation und Struktur von *STK39*

Das *STK39*-Gen, gleichbedeutend mit *SPAK* (*Ste20-related proline-alanine-rich kinase*), ist auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (2q24.3) lokalisiert. Das humane *SPAK*-Gen kodiert für ein aus 547 AS bestehendes Protein, welches als ein Mitglied der Untergruppe der Selenophosphat-Synthetasen (*selenophosphate synthetase*; SPS1)/Keimzentrum-Kinasen (*germinal center kinases*; GCK) aus der Familie der STE20-Kinasen (*Sterile 20*, gehört zu den Serin/Threonin-Kinasen) identifiziert wurde [82]. Am N-terminalen Ende des Proteins befindet sich eine Region von Wiederholungen der AS Alanin und Prolin (PAPA box). Vermutlich kann dieser Abschnitt der Kinase intermolekulare Interaktionen mit Strukturen des Zytoskeletts wie Aktin oder ähnlichen Proteinen eingehen. Die katalytische Domäne mit der Funktion einer Serin/Threonin-Kinase folgt nach dem N-Terminus mit einer Distanz von 61 AS. Am C-terminalen Ende befindet sich die Struktur, an der die Caspasen die *SPAK* spalten können [82].

1.3.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD

Die SPAK wird ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert, zeigt jedoch eine Präferenz für das Gehirn und das Pankreas [82].

Diese Phosphoryltransferase (STK39) soll eine Rolle bei der Regulation der zellulären Stressantwort spielen, hier insbesondere auf der Ebene der p38 Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (*mitogen activated protein kinase*; MAPK)-Kaskade. Die MAP-Kinasen können aufgrund ihrer aktivierenden Faktoren eingeteilt werden. Eine Aktivierung der Familie der p38-Kinasen – benannt nach ihrer Molekülmasse von 38 kDa – wird z. B. hervorgerufen durch oxidativen Stress, osmotische Veränderungen und pro-inflammatorische Zytokine. Es wurde gezeigt, dass u. a. die Aktivierung des p38-MAPK Weges mit der Apoptose korreliert [82].

Um die Kinasen zu aktivieren, spielen sogenannte Caspasen, eine Familie aus proteolytischen Enzymen, eine Rolle. Caspasen sind Cysteinproteasen, welche Proteine hinter Aspartyl-Resten spalten. Sie vermitteln in der intrazellulären Proteolysekaskade und tragen so ihren Teil zur eingeleiteten Apoptose bei [82]. Johnston et al. [82] fand heraus, dass die Expression einer katalytisch aktiven SPAK, sowie einer durch Caspasen C-terminal gespaltenen und dadurch verkürzten SPAK, die p38-Kaskade spezifisch aktiviert. Ebenso konnte bei einer zellulären Stressantwort eine Beeinflussung der Aktivität von Kalium-Chlorid-Kotransportern u. a. in Assoziation der Stress-Kinase SPAK gezeigt werden [83]. Durch diese Erkenntnisse ist es also naheliegend, dass SPAK bei der Stress-Antwort von Zellen involviert ist. Da bei LBD (wie o. g.) vermutlich gewisse Stressstimuli bestehen bzw. Einfluss auf dessen Entstehung haben, könnte diesbezüglich eine Verbindung mit STK39 und dessen Beeinflussung der Pathologie vermutet werden. Diese Hypothese müsste jedoch zunächst abgeklärt werden um eine Aussage darüber treffen zu können, inwiefern die Kaskade über Caspasen und Stress-Kinasen wie SPAK in der Entwicklung der PD eine Rolle spielen könnte. In Bezug zu PD konnte *STK39* in einer Analyse von Daten mehrerer *genomewide association studies* (GWAS) als Prädispositionsfaktor identifiziert [84] und anderweitig bestätigt werden [85-88].

1.4 Humanes Leukozyten-Antigen – HLA

1.4.1 Lokalisation und Struktur von *HLA*

Das *HLA*-Gen (*human leukocyte antigen*) ist auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisiert. Der für unsere Arbeit relevante SNP rs3129882 liegt im Intron 1 von *HLA-DRA*, in der nicht-kodierenden Region [89].

Die HLA-DR Region – als Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*; MHC) mit ihren verschiedenen Haplotypen – wird von vielen Loci kodiert und ist genetisch hoch komplex. *HLA-DRA* und *HLA-DRB* kodieren für HLA-DR Antigene, welche zu den HLA Klasse-II-Molekülen gehören [89, 90]. Laut Tan et al. [89] liegt der SNP rs3129882 zwar in der nicht-kodierenden Region, ist aber (entweder direkt oder über ein sogenanntes Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*; LD)) mit der Expression von *HLA-DRA* korreliert. LD bedeutet, Allele an benachbarten Genorten würden in dieser Situation nicht mehr nach dem Zufallsprinzip, sondern wesentlich häufiger gemeinsam vererbt werden. Aufgrund der geringen Diskrepanz ihrer Loci auf dem Chromosom treten sie somit abhängig voneinander auf.

1.4.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD

Antigen-präsentierende Zellen – also auch Mikrogliazellen – exprimieren den Zelloberflächen-Rezeptor HLA-DR (wie o. g. ein Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse-II-Rezeptor), welcher u. a. auch mit T-Zell-Rezeptoren interagiert [89, 91]. Das HLA-DR Antigen fungiert demnach als ein Antigen-präsentierendes Molekül oder regulatorisches Molekül, welches in der angeborenen und spezifischen Immunabwehr involviert ist [90].

HLA wurden ursprünglich als Oberflächenantigene bezeichnet, welche die „*Graft-versus-Host Disease*“ vermitteln. Die *HLA*-Region ist v. a. in Verbindung mit Immun-Erkrankungen als Prädispositionsfaktor sehr wichtig, spielt aber auch in vielen anderen Erkrankungen eine Rolle [89, 92].

In mehreren GWAS konnten Varianten von *HLA* (mit besonders starker Assoziation die kodierende Region des Rezeptors *HLA-DR* [93]) als Risikofaktor für die Entwicklung einer PD definiert werden [84, 94, 95]. Einige Studien konnten diesen Zusammenhang bestätigen [90, 92, 96]. Auch deshalb

wird vermutet, dass Mechanismen bzw. Dysfunktionen des Immunsystems an der Entstehung, aber v. a. auch der Progression der PD beteiligt sind. In der SN und anderen beteiligten Gehirn-Regionen von PD-Patienten konnte das Vorhandensein von HLA-DR positiven Mikrogliazellen nachgewiesen werden, besonders in Bereichen mit starker Neurodegeneration [90, 97]. Im Liquor von PD-Patienten konnte außerdem eine vermehrte HLA-DR Expression der Monozyten gemessen werden [98]. Auch konnten sowohl CD4+, als auch CD8+ T-Lymphozyten – mit denen HLA-DR interagiert (s. o.) – in post-mortem Gehirnanalysen von PD-Patienten nachgewiesen werden [91]. In Betrachtung der Funktion von HLA in Immun-vermittelten Erkrankungen scheint somit auch dessen Beteiligung an Entstehung und/oder Progression von PD möglich.

1.5 Immunoglobulin-bindendes Protein – BiP

1.5.1 Lokalisation und Struktur von *BIP*

Das *BIP*-Gen ist auf dem Chromosom 9q33.3 lokalisiert, erstreckt sich über 5 kb und besteht aus acht Exons und sieben Introns [99].

BiP (*binding immunoglobulin protein*), identisch mit HSPA5 (*heat shock 70kDa protein 5*) sowie auch GRP 78 (*glucose-regulated protein 78kDa*), gehört zur Familie der Hitze-Schock-Proteine 70 (Hsp70).

Die Hsp70-Isoformen unterscheiden sich voneinander hinsichtlich ihrer AS-Sequenzen, ihrer Expression, ihrer subzellulären Lokalisation, und ihrer Induktion als Antwort auf variable Stress-Stimuli [100]. Das translatierte Hsp70 Protein besteht aus zwei Hauptdomänen: dem N-Terminus von etwa 45kDa mit der ATPase-Aktivität und der C-terminalen Substrat-bindenden Domäne von etwa 25 kDa [101].

1.5.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD

Aus der „*Genetic Association Database*“ lässt sich entnehmen, dass das humane BiP verschiedene genetische Assoziationen zu Krankheiten in diversen Organen aufweist. Diese Erkenntnis setzt dessen ubiquitäres Vorkommen voraus.

Die Aufgabe der Stress-induzierten Hsp70 beinhaltet das Verhindern einer Akkumulation von durch Stress denaturierten Proteinen. Neben diesen, durch bestimmte Signale vermehrt gebildeten Hsp70, konnten ebenfalls konstitutiv exprimierte Hsp70 identifiziert werden. Folgende Funktionen werden diesen dauerhaft vorhandenen Regulationsproteinen unter physiologischen Bedingungen zugeschrieben: Das Falten von naszierenden Proteinen, die Protein Translokation zwischen zellulären Kompartimenten, die Degradation von instabilen oder fehlgefalteten Proteinen, die Regulation von Assemblierung und Disassemblierung von Proteinkomplexen [100].

Das HSPA5/BiP ist ein bedeutendes Hsp70-Chaperon im Lumen des ER, wo die posttranslationale Modifizierung, Faltung und Oligomerisierung der Proteine statt findet [57]. Dort fungiert es als Hilfsprotein im Proteinfaltungsprozess und in Stresssituationen im Rahmen der Zell-Antwort auf ungefaltete Proteine (*unfolded protein response*; UPR) [102].

Bereits aus Modellen früherer Studien besteht die Vorstellung, dass auf dem Weg zur Neurodegeneration ER-Stress eine ausschlaggebende Rolle spielt [103, 104]. Der Prozess der Stressentstehung im ER und die darauf folgende Antwort aus dem Zellkern – die Induktion von Hilfs- und Kontrollmechanismen – setzt eine optimale Kommunikation zwischen den Kompartimenten voraus. Im Zusammenhang mit neuronaler Degeneration werden v. a. die (fehlerhafte) Aktivierung folgender Systeme und Signal-Transduktionswege diskutiert: Das UPS, die ERAD und die UPR [103].

Ein durch Akkumulation von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen im Lumen des ER hervorgerufener ER-Stress [57], fordert eine höhere Beanspruchung des Hsp70-Chaperons BiP. Außerdem bildet Zellstress eine neue Grundlage für eine zusätzliche Störung der korrekten Faltungsschritte von Polypeptiden und führt unter Umständen zu einer Zerstörung von bereits gebildeten nativen Proteinen. Die Registrierung dieses Zustandes führt über den UPR-Signalweg zur Informationsübertragung in den Zellkern. Dort wird als Gegenregulation der Zelle eine Induktion von molekularen Chaperonen wie BiP eingeleitet und die Aktivität des ERAD-Systems erhöht [57, 103].

Die Funktionen von BiP scheinen in Betrachtung der o. g. Pathogenese von PD v. a. in Bezug zu ER-Stress und Apoptose von Neuronen interessant. Der normale Alterungsprozess an sich ist mit Veränderungen von Struktur und Funktion des ER vergesellschaftet [105]. Es wird vermutet, dass u. a. der Aktivitätsverlust von BiP und anderen wichtigen ER-Chaperonen (in Beteiligung von oxidativem Stress) für diesen ER-Funktionsverlust verantwortlich ist. Deshalb wird angenommen, dass der Funktionsverlust von BiP auch für altersabhängige neurodegenerative Erkrankungen wie PD einen prä-disponierenden Faktor darstellt. Denn auch in verschiedenen PD-Modellen sollen sowohl Menge, als auch Lokalisation von BiP verändert sein [105]. In einem weiteren PD-Modell konnte gezeigt werden, dass BiP die Neurotoxizität von Alpha-Synuklein – dessen Akkumulation u. a. zu ER-Stress und Aktivierung der UPR führt – vermindern konnte. Somit könnte BiP durchaus protektiv auf die dopaminergen Neurone wirken und deren Apoptose reduzieren [106].

1.6 Cyclin G-assoziierte Kinase – GAK

1.6.1 Lokalisation und Struktur von GAK

Das GAK-Gen kodiert für die gleichnamige GAK (*cyclin G-associated kinase*), eine Serin/Threonin-Kinase, und befindet sich auf dem Chromosom 4p16.3. Die GAK ist ein 160 kDa Protein und wird auch als Auxilin 2 bezeichnet. Das vergleichbare Auxilin 1 ist zwar der GAK/Auxilin 2 funktionell homolog, zeigt jedoch u. a. Abweichungen bezüglich dessen Struktur. Denn nur die GAK, nicht aber Auxilin 1, weist eine Kinase-Domäne am N-terminalen Ende auf, welche die Clathrin Adaptoren AP-1 und AP-2 (*adaptor protein*; AP) *in vitro* phosphorylieren kann. Der C-Terminus der GAK fungiert mit seiner J-Domäne *in vitro* als Co-Chaperon für das Hitze-Schock-Protein Hsc70 (*heat shock cognate*; Hsps, welche hauptsächlich konstitutiv exprimiert werden und nur schwach induzierbar sind) bei der Proteinfaltung, dem Proteintransport und der Beeinflussung von Protein-Protein Interaktionen [107, 108].

1.6.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD

Im Expressionsmuster zeigt sich ebenfalls ein Unterschied zwischen o. g. Auxilin 1 und 2. Denn neben der ubiquitär vorkommenden GAK/Auxilin 2 ist Auxilin 1 Neuronen-spezifisch.

In unterschiedlichen Studien wurden die vielfältigen Funktionen der GAK im Zusammenhang mit verschiedenen Zellvorgängen diskutiert [109-111].

Es wird angenommen, dass die Kinase über verschiedene Mechanismen in einem komplexen Zusammenspiel an der Clathrin-vermittelten Endozytose und verschiedenen Vesikel-Transportvorgängen des trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) beteiligt ist. Außerdem soll die GAK bei der Bindung von Clathrin und Adaptoren an die Plasmamembran und den Golgi-Apparat eine Rolle spielen, sowie bei der Regulation einer korrekten Funktion der Endosomen mitwirken [112, 113].

Die Clathrin-Beschichtung fungiert bei dem Transport einer aufgenommenen Ladung von der Zellmembran zu den Endosomen als mechanisches Gerüst und ist somit notwendig für die geregelte Clathrin-abhängige Endozytose während der Interphase. Dabei werden gelöste Substanzen an einen spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche gebunden. Über die sogenannten Adaptine, welche auf der zytosolischen Seite der Membran die beladenen Rezeptoren erkennen, kann letztendlich Clathrin gebunden werden. Durch dessen Struktur wird die Zellmembran zur Abschnürung veranlasst. Die zuerst entstehenden Einbuchtungen (*coated pits*) entwickeln sich zu Vesikeln (*coated vesicles*). Damit diese mit Clathrin-beschichteten Vesikel (*Clathrin coated vesicles*; CCVs) zu frühen Endosomen werden können, muss die Clathrinhülle ab-dissoziieren. An dieser Dissoziation als Regulator beteiligt ist das Chaperon Hsc 70. Als Co-Faktor wird die J-Domäne, entweder des Proteins Auxillin oder der GAK benötigt. Diese veranlasst die Bindung der CCVs an das Hsc 70 [57, 114].

All diese Proteine – einschließlich Clathrin, Hsc70 und GAK – sind ebenfalls beteiligt an der Vesikelabschnürung am Ende des TGN. Zusätzlich spielt hier der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR) eine Rolle, welcher für die Sortierung der Enzyme aus dem Golgi-Apparat in die Lysosomen zuständig ist. In Beteiligung dieser Strukturen konnte *in vitro* in Zellen mit einer verminderten

GAK eine Reduktion der Rezeptor-vermittelten Endozytose, ein Effekt auf den Vesikelverkehr vom TGN zu den Lysosomen, sowie Auswirkungen auf die Zellstruktur (Reduktion von Adaptoren der Plasmamembran und des TGN und Verminderung von Clathrin) festgestellt werden [112, 113].

Neben diesen Vorgängen im Vesikeltransport, scheint eine funktionierende Kooperation (bei subzellulärer Co-Lokalisation) der Moleküle GAK und Clathrin ebenfalls Voraussetzung für die Regulation eines intakten mitotischen Ablaufs zu sein [111, 115, 116].

Den Nachweis der Beteiligung der GAK an einem weiteren Mechanismus der Zelle erbrachte eine Studie an einem Zebrafisch-Modell, wo *Auxilin*- und *GAK*-Gen starke Homologien mit denen von Säugetieren aufweisen. Eine Inhibition der GAK-Funktion verursachte dabei eine gesteigerte Apoptose in neuroektodermalen Geweben. Dies wiederum hatte eine schwere Degeneration neuronaler Strukturen zur Folge [117]. Des Weiteren beeinträchtigte eine verminderte Kinase-Funktion den Notch-Signalweg während der Neurogenese. Dieser Signalweg wird ebenfalls durch verschiedene Faktoren der Endozytose reguliert, was eine Verbindung zu der bereits besprochenen Funktion der GAK bei der Clathrin-assoziierten Aufnahme von Substanzen herstellt. Diese Beobachtungen deuten an, dass die GAK eventuell eine fördernde oder erhaltende Funktion beim Überleben neuronaler Zellen einnimmt, was hinsichtlich der Assoziation zu PD von Bedeutung sein könnte [117]. Denn das *GAK*-Gen wurde bereits in GWAS – im Hinblick auf sporadische sowie familiäre PD-Fälle – als mögliche Prädisposition für PD identifiziert [84, 94, 118]. Eine zusammenfassende Meta-Analyse aller Daten genetischer Assoziations-Studien von PD (ohne Mendelsches Vererbungsmuster) konnte diesen Zusammenhang von *GAK* und PD bestätigen [88].

1.7 Microtubuli-assoziiertes Protein Tau – MAPT

1.7.1 Lokalisation und Struktur von *MAPT*

Das *MAPT*-Gen, welches für das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau kodiert, befindet sich auf Chromosom 17q21.1 und besteht aus 16 Exons [119].

Die chromosomale Region, welche u. a. das *MAPT*-Gen enthält, ist hoch komplex. Sie wurde mithilfe verschiedener Forschungen durch zahlreiche Polymorphismen über den Bereich der gesamten *MAPT* kodierenden Region hinweg erweitert: Beispielsweise bei der Untersuchung der allelischen Assoziation von *MAPT* und den neurodegenerativen Erkrankungen wie der progressiven supranukleären Blickparese (*progressive supranuclear palsy*; PSP) und der kortikobasalen Degeneration (*corticobasal degeneration*; CBD) [120]. Es wird angenommen, dass sich der beschriebene Bereich – hervorgegangen als „Ur-Ereignis“ aus einem invertierten Fragment von 900 kb – aus zwei Haupt-Haplotypen, H1 und H2, entwickelt hat. Aus Subhaplotypen zusammengesetzt, haben die zwei unterschiedlichen Haplotypen individuell und unabhängig voneinander verschiedene Sequenzvariationen angesammelt. Als Folge einer unterdrückten Rekombination oder gewollten Selektion von Rekombinanten sind sie in der Population weit verbreitet [121]. Die haploiden Genotypen werden definiert durch die oben bereits erwähnten, zahlreich vorhandenen Polymorphismen. Diese befinden sich über die gesamte Region hinweg im kompletten LD. Durch weitere genetische Erkenntnisse und mit Hilfe von SNPs konnte für die Region, welche sich im LD befindet und *MAPT* flankiert, eine maximale Ausdehnung von ~1,8 Mega-Basenpaaren (Mb) ermittelt werden. Neben dem *Tau*-Gen beinhaltet dieser haploide Block zusätzlich noch weitere Gene, welche im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen als mögliche pathologische Gen-Lokationen hinzugezogen werden müssen [120, 122]. Dies scheint in Zusammenhang mit unserer Arbeit ebenfalls wichtig. Denn aufgrund der Tatsache, dass die SNPs miteinander in vollkommenem LD stehen, kann der Zusammenhang eines bekannten H1/H2-SNP mit einem bestimmten Erkrankungsrisiko infolge der funktionalen Variation innerhalb jeglichen Segments von *MAPT* oder eines Nachbarschaftsgens entstanden sein [121].

1.7.2 Vorkommen, Funktion und Zusammenhänge mit LBD

Im Nervensystem werden die Tau-Proteine abhängig von der neuronalen Reife und dem Neuronentyp exprimiert. Die Expression erfolgt in den Neuronen, besonders reichlich sind sie in den Axonen vorhanden [123].

Tau-Proteine sind eine Gruppe phosphorylierter Proteine, welche an die Mikrotubuli binden und diese in ihrer Assemblierung und Stabilisierung fördern [123]. Tau hat damit eine Schlüsselrolle, was die Organisation und Intaktheit des Zytoskeletts betrifft [121].

Das im humanen Gehirn exprimierte Tau wurde von Jensen et al. [124] als Ligand von Alpha-Synuklein identifiziert und deren interagierende Domänen beschrieben. Diese befinden sich am C-Terminus von Alpha-Synuklein und der Mikrotubuli-bindenden Region von Tau. Darüber hinaus konnte eine Co-Lokalisation der beiden Proteine in den Axonen nachgewiesen werden, und gezeigt werden, dass Alpha-Synuklein eine Neigung besitzt, die Phosphorylierung von spezifischen Serin-Residuen in dem gelösten Tau-Protein zu stimulieren. Daraus ergibt sich durch Verminderung der Konzentration eines funktionstüchtigen Mikrotubuli-bindenden Proteins Tau ein indirekter Einfluss von Alpha-Synuklein auf die Stabilität und Dynamik der axonalen Mikrotubuli, mit möglicherweise letalen Folgen für das Neuron [125]. Alpha-Synuklein ist also in der Lage, die Bildung von phosphorylierten Tau-Fasern zu induzieren und beide Proteine – Alpha-Synuklein und Tau – beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Polymerisation zur Bildung von Ablagerungen [126].

Eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen wird mit Mutationen im *MAPT*-Gen assoziiert. Zu diesen gehören die AD, die CBD, die PSP, Morbus Pick (*Pick's disease*; PiD), die *agryophilic grain disease* (AGD) und die frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus in Verbindung mit dem Chromosom 17 (*frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17*; FTDP-17) [119]. Diese sogenannten Tauopathien weisen charakteristische, faserartige, neuronale Einschlüsse – die Neurofibrillenbündel (*neurofibrillary tangles*) – auf. Sie bestehen aus abnorm phosphoryliertem Tau-Protein und befinden sich an den Neuriten der Nervenzellen [124]. Des

Weiteren wird das *MAPT*-Gen in einer großen GWAS mit dem Auftreten von PD in Verbindung gebracht [84], was andere Studien ebenso bestätigen konnten [121, 127, 128]. Die H1-Variante wird weiters auch mit kognitiver Beeinträchtigung und Demenz bei PD assoziiert [129, 130].

In grundlagenwissenschaftlichen Arbeiten konnte eine erhöhte transkriptionale Aktivität von H1 gegenüber H2 bei PD-Patienten nachgewiesen werden. Interessant ist unter diesem Aspekt auch, dass die H1-Variante in PD möglicherweise zu einer durch Tau vermittelten, verstärkten Fibrillenbildung bei Alpha-Synuklein führt. Diese beiden Aspekte könnten erklären, warum der Haplotyp H1 des *MAPT*-Gens mit dem gehäuften Auftreten von PD assoziiert ist [123]. Die genauen Ursachen und Zusammenhänge sind jedoch noch unklar.

Passend zu den o. g. biochemischen Beobachtungen von Alpha-Synuklein und Tau konnte auch – das Erkrankungsrisiko für PD betreffend – eine „Interaktion“ von *MAPT*- und eines *SNCA*-SNPs beobachtet werden. Die Kombination der Risiko-Genotypen in *MAPT* und *SNCA* verdoppelte das Risiko an PD zu erkranken [130].

1.8 Fragestellung

Aufgrund der in der Einleitung geschilderten, bereits bekannten Beziehungen der Gene/Proteine mit PD/LBD, wurden in einer großen Kohorte von LBD-Patienten und Kontrollen folgende SNPs definiert:

APOE-SNP: Chr. 19, Position: 50103781, SNPID: rs429358 und
Chr. 19, Position: 50103919, SNPID: rs7412

STK39-SNP: Chr. 2, Position: 168800545, SNPID: rs4668049

HLA-SNP: Chr. 6, Position: 32517508, SNPID: rs3129882

BIP-SNP: Chr. 9, Position: 127040940, SNPID: rs430397

GAK-SNP: Chr. 4, Position: 929087, SNPID: rs6599388

MAPT-SNP: Chr. 17, Position: 41074926, SNPID: rs393152

und die Ergebnisse auf folgende Fragestellungen hin analysiert:

1. Besteht bei Vorliegen der jeweiligen SNPs
 - a. ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für LBD?

- b. eine Assoziation mit dem Auftreten von motorischen Subtypen?
 - c. ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Demenz?
2. Sind die SNPs assoziiert mit
 - a. dem Krankheitsbeginn von Parkinsonismus?
 - b. dem Krankheitsbeginn von Demenz?
 - c. der Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenzerkrankung?
3. Sind die SNPs mit einem der folgenden Krankheitssymptome assoziiert?
 - a. Mit motorischen Symptomen – gemessen an H&Y-Stadium und UPDRS-III.
 - b. Mit kognitiven Symptomen – gemessen am MMSE (*Mini-Mental-Status-Test*; *Mini-Mental-State-Examination*)-Wert.
 - c. Mit Hyposmie – gemessen am Sniffin-Sticks-Testwert.
4. Sind die SNPs mit der Progression der o. g. Krankheitssymptome assoziiert?
5. Sind die SNPs mit dem neurodegenerativen Marker Tau – Gesamt-Tau (Total-Tau; h-Tau), phosphoryliertes Tau (Phospho-Tau; p-Tau), dem Quotienten p-Tau/h-Tau – oder A β ₁₋₄₂ im Liquor assoziiert?

2 Studienkollektiv, Material und Methoden

2.1 Studienkollektiv

Das Studienkollektiv wurde von der Abteilung für Neurologie der Universität Tübingen rekrutiert und nach unten beschriebenen Auswahlkriterien zusammengestellt. Alle Teilnehmer wurden über die Studie aufgeklärt und willigten schriftlich in die Einverständniserklärung ein. Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät Tübingen genehmigte die Studie (Ethikanträge: 343/2003, 497/2004 und 199/2011BO1; Genetik: Projektnummer: 287/2004v).

In die vorliegende Riskpanel-Studie wurden 1038 Probanden mit Alter > 50 Jahren eingeschlossen, welche sich aus 347 Kontrollen und 691 Patienten zusammensetzten. Je nach Gegenüberstellung gingen davon die Daten einer unterschiedlichen Anzahl an Probanden in die statistische Analyse ein. Diese kann dem jeweiligen Kapitel entnommen werden.

2.1.1 Charakterisierung der Stichprobe

Patienten

Die Charakterisierung der Patienten erfolgte nach aktuell geltenden Diagnosekriterien. Für die klinische Diagnostik erfüllten die PD-Patienten die *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank* Kriterien [18]. Die PDD-Patienten erfüllten zusätzlich die Kriterien für Demenz nach DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV*) der amerikanischen psychiatrischen Vereinigung und die DLB-Patienten die Diagnose-Kriterien nach McKeith et al. [25]. Zum Ausschluss aus der Studie führten folgende Kriterien: Entzündungen des ZNS in der Anamnese, Ischämien, Neoplasien, tiefe Hirnstimulation, Schädel-Hirn-Traumata, psychiatrische Erkrankungen (wie Schizophrenie, Psychose, schwere Depression), andere neurodegenerative Erkrankungen, sowie Patienten mit MSA oder PSP.

Die Diagnose wurde von erfahrenen Ärzten der Abteilung für neurodegenerative Erkrankungen des Universitätsklinikums in Tübingen gestellt.

Klinische Daten wurden aus dem klinikinternen KAS-System und der retrospektiven Zusammenfassung anhand von Arztbriefen ermittelt. Im Folgenden sollen von den erhobenen klinischen Daten nur die für diese Arbeit relevanten Aspekte genannt werden: Datum der klinischen Untersuchung, Alter, Geschlecht, Diagnose, Differentialdiagnose, Familiengeschichte bezüglich PD, Alter bei Beginn der Symptome, Erkrankungsdauer seit Beginn der Symptome, motorischer Subtyp (Tremor-dominanter-Typ, Akinetisch-rigider-Typ, Äquivalenz-Typ), H&Y-Stadium, UPDRS-III, Vorhandensein einer Demenz, Alter bei Demenzbeginn, Erkrankungsdauer der Demenz, MMSE mit Erhebungsdatum, Alter bei MMSE-Erhebung, Erkrankungsdauer bei MMSE-Erhebung, Einnahme von Antidementiva, Vorhandensein einer Hyposmie (Sniffin-Testwert), L-Dopa-Äquivalenzdosis, Datum der Liquor-Entnahme und Liquor-Konzentrationen für h-Tau, p-Tau und A β ₄₂.

Ebenfalls größtenteils anhand der Arztbriefe, wurden die Patienten unter der übergeordneten Kategorie der LBD in die folgende Untergruppen gegliedert: 74 PDD-Patienten, 279 PDND-Patienten, 39 DLB-Patienten und 299 PD-Patienten (ohne verfügbare Zuordnung in PDND und PDD). Unter dem Aspekt kognitiver Einschränkungen in Zusammenhang mit LBD wurde zusätzlich eine Demenz-Gruppe, bestehend aus PDD-Patienten und DLB-Patienten abgegrenzt.

Kontrollen

Die Kontrollen wurden aus der bestehenden Biobank unter folgenden Vorgaben rekrutiert: vorhandene A β ₄₂-Werte aus der Liquoranalyse, sowie ein MMSE-Wert. Die Untersuchung dieser Probanden erfolgte vorrangig in der Gedächtnisambulanz der Abteilung für neurodegenerative Erkrankungen in der Universitätsklinik Tübingen (Leiter Prof. Dr. Walter Maetzler). Zum kleinen Teil erfolgte eine Rekrutierung auf der Station der Abteilung für Neurologie. Gründe für die Liquorpunktion waren der Ausschluss einer neurodegenerativen, entzündlichen oder vaskulären Erkrankung.

Eine detaillierte Darstellung zu den Daten der Probandenzahlen ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Abbildung 2.1 soll die prozentuale Verteilung in der Gesamtgruppe veranschaulichen.

Tabelle 2.1: Anzahl der Kontrollen und Patienten in den jeweiligen Kategorien der LBD- und Demenz-Gruppe mit Subklassifikationen.

	Total	LBD	Demenz
Kontrollen	347		
DLB	39	691	113
PDD	74		
PDND	279		
PD	299		
Total	1038		

DLB: Demenz mit Lewykörpern (*Dementia with lewy bodies*); LBD: Lewykörper-Erkrankungen (*Lewy body disorders*); PD: Parkinson-Erkrankung (*Parkinson's disease*); PDD: Parkinson-Erkrankung mit Demenz (*Parkinson's disease with dementia*); PDND: Parkinson-Erkrankung ohne Demenz (*Parkinson's disease non-demented/without dementia*)

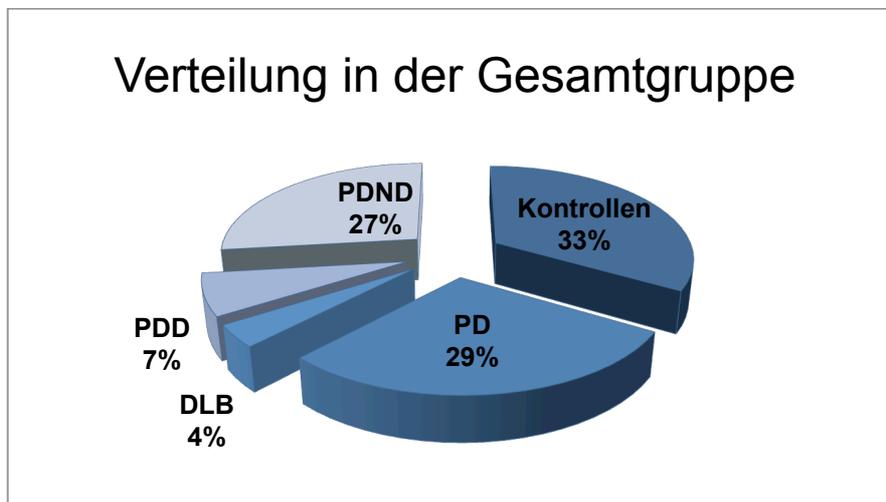


Abbildung 2.1: Prozentuale (%) Verteilung der Kontrollen und jeweiligen Untergruppen der LBD in der Gesamtgruppe. Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 2.1 ausgeführt.

Insgesamt (Kontroll-Gruppe + LBD-Gruppe) zeigte sich eine Geschlechterverteilung von 624 (60,1%) männlichen und 414 (39,9%) weiblichen Probanden/innen. Die Verteilung innerhalb der einzelnen Kohorten nach Geschlecht ist in Tabelle 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.2: Aufteilung in die Kategorien Kontrollen, LBD-Gruppe, PDND-Gruppe, Demenz-Gruppe (PDD + DLB) nach Geschlecht in Prozent (%) und Anzahl (N) der eingeschlossenen Probanden.

Geschlecht	Kontrollen % (N)	LBD % (N)	PDND % (N)	Demenz % (N)
männlich	56,8 (197)	61,8 (427)	62,0 (173)	65,5 (74)
weiblich	43,2 (150)	38,2 (264)	38,0 (106)	34,5 (39)

Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 2.1 ausgeführt.

2.1.2 DNA- und Liquorproben

Die Gewinnung und Aufarbeitung der Proben war nicht Teil dieser Arbeit, weshalb nicht im Detail darauf eingegangen werden soll.

Es wurden für diese Studie nur Probanden mit normalen Liquor-Werten (Leukozytenzahl $<4 \times 10^6$, IgG (Immunglobulin G)-Index Liquor/Serum $<0,6$) eingeschlossen, welche außerdem keinen Hinweis auf eine intrathekale IgG-Produktion zeigten.

2.1.3 Demographische, klinische und biochemische Daten

Nach der Charakterisierung der Stichprobe sollen nun die erhobenen und für diese Arbeit relevanten demographischen, klinischen und biochemischen Daten folgen. Die Darstellung erfolgt mit der jeweiligen Anzahl N der Probanden, bei der diese Daten ermittelt werden konnten, sowie deren Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Std) in den folgenden Tabellen 2.3 bis 2.8.

Die PD kann anhand der Ausprägung der motorischen Symptome in drei Subtypen eingeteilt werden, welche sich in unserer PD-Kohorte (LBD-Gruppe) wie folgt zusammensetzten:

Tabelle 2.3: Demographische und klinische Daten zur Einteilung der motorischen Subtypen in Prozent (%) und Anzahl (N) der eingeschlossenen Probanden in der LBD-Gruppe.

Motorischer Subtyp	N	%
Tremor-dominant	71	23,0
akinetisch-rigide	105	34,0
äquivalent	133	43,0

Das Erkrankungsalter der PD (*age at onset PD; aao_PD*) und das Erkrankungsalter der Demenz (*age at onset dementia; aao_dem*) wurde in der LBD-Gruppe und den jeweiligen Untergruppen der LBD ermittelt.

Das durchschnittliche Erkrankungsalter der PD lag bei 60 Jahren. Dieses wurde festgelegt nach Angaben der Patienten über das Auftreten der ersten Symptome des Parkinsonismus, bzw. nach der Dokumentation der Erstdiagnose, falls keine genauere Information vorlag. Bei LBD-Patienten mit Demenz lag das Erkrankungsalter der PD im Mittel höher als bei nicht dementen LBD-Patienten. An einer Demenz erkrankten die PDD- und DLB-Gruppe im Mittel mit 69 Jahren.

Die Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Erkrankung an Demenz errechnet sich aus dem Erkrankungsalter bei Beginn der Demenz minus des Erkrankungsalters bei Beginn von Parkinsonismus und ermöglicht eine Aussage über die Progression der kognitiven Störung. Eine frühe Demenzentwicklung würde dementsprechend für eine schnellere Progression sprechen – wie bei der DLB-Gruppe. Eine spätere Entwicklung der Demenz hingegen für eine langsame Progression – wie bei der PDD-Gruppe mit im Mittel 7 Jahren.

Tabelle 2.4: Demographische und klinische Daten zum Erkrankungsalter der PD (in Jahren), dem Erkrankungsalter der Demenz (in Jahren) und der Progression der Erkrankung anhand der Zeitspanne zwischen Erkrankung an Parkinsonismus und Erkrankung an Demenz (in Jahren) in der LBD-Gruppe, der PDND-Gruppe, der Demenz-Gruppe, der PDD-Gruppe und der DLB-Gruppe.

	LBD MW±Std (N)	PDND MW±Std (N)	Demenz MW±Std (N)	PDD MW±Std (N)	DLB MW±Std (N)
Erkrankungsalter PD	60±11 (659)	59±10 (278)	66±8,5 (113)	64±9 (74)	68±8 (39)
Erkrankungsalter Demenz	-	-	69,5±6,5 (63)	71±6 (29)	68±7 (34)
Zeitspanne	-	-	3,5±2 (63)	7±3 (29)	0±1 (34)

MW±Std: Mittelwerte und Standardabweichungen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; weitere Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 2.1 ausgeführt.

Die funktionellen und motorischen Symptome wurden mithilfe des H&Y-Stadiums und der UPDRS-III erfasst und dokumentiert. Dabei wurde auch das Alter bei Klassifizierung, sowie die bisherige Erkrankungsdauer der Symptome (*disease duration*; dd) bis zur Klassifizierung berücksichtigt, um später den zeitlichen Verlauf und damit einen Einfluss auf die Progression der Symptome ermitteln zu können.

Tabelle 2.5: Demographische und klinische Daten der motorischen Symptome (gemessen an H&Y-Stadium und UPDRS-III) in der LBD-Gruppe.

	LBD MW±Std (N)
H&Y	2,2±0,7 (391)
UPDRS-III	26±11 (311)
Alter bei Klassifizierung in Jahren	66±10 (674)
Krankheitsdauer bei Klassifizierung in Jahren	7±6 (644)

H&Y: Hoehn & Yahr; LBD: Lewykörper-Erkrankungen (*Lewy body disorders*); MW±Std: Mittelwerte und Standardabweichungen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; UPDRS-III: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*

Die kognitiven Symptome wurden mithilfe des MMSE-Wertes erfasst und dokumentiert, wobei ebenfalls das Alter und die bisherige Erkrankungsdauer (*disease duration*; dd) bis zur Datenerhebung berücksichtigt wurden.

Tabelle 2.6: Demographische und klinische Daten der kognitiven Symptome (gemessen am MMSE-Wert) in der Kontroll-Gruppe und der LBD-Gruppe.

	Kontrollen MW±Std (N)	LBD MW±Std (N)
MMSE-Wert	29±1 (305)	27±4 (414)
Alter bei MMSE-Erhebung in Jahren	66±6 (305)	67±10 (414)
Krankheitsdauer bei MMSE-Erhebung in Jahren	-	6±6 (414)

LBD: Lewykörper-Erkrankungen (*Lewy body disorders*); MMSE: Mini-Mental-Status-Test (*Mini-Mental-State-Examination*); MW±Std: Mittelwerte und Standardabweichungen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden

Die Hyposmie wurde mithilfe der Sniffin-Sticks erfasst, wobei ebenfalls das Alter und die bisherige Erkrankungsdauer (*disease duration*; dd) bei Datenerhebung berücksichtigt wurden.

Tabelle 2.7: Demographische und klinische Daten der Hyposmie (gemessen am Sniffin-Test) in der LBD-Gruppe.

	LBD MW±Std (N)
Richtig gewertete Anzahl von Sniffin-Sticks	6±3 (170)
Alter bei Klassifizierung in Jahren	66±10 (674)
Krankheitsdauer bei Klassifizierung in Jahren	7±6 (644)

LBD: Lewykörper-Erkrankungen (*Lewy body disorders*); MW±Std: Mittelwerte und Standardabweichungen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden

Die Bestimmung der p-Tau, h-Tau und A β_{1-42} –Konzentration im Liquor erfolgte routinemäßig im chemischen Labor für Neurologie mit ELISA Kits der Firma Innogenetics NV.

Tabelle 2.8: Demographische, klinische und biochemische Daten bestimmter neurodegenerative Marker in der Kontroll-Gruppe und der LBD-Gruppe.

	Kontrollen MW±Std (N)	LBD MW±Std (N)
p-Tau-Wert (pg/ml)	42±14 (52)	47±22 (116)
h-Tau-Wert (pg/ml)	221±112 (52)	241±155 (123)
p-Tau/h-Tau Ratio	0,21±0,06 (52)	0,22±0,07 (116)
A β_{1-42} -Wert (pg/ml)	904±286 (53)	606±267 (123)
Alter bei Labor-Bestimmung in Jahren	59±10 (52)	68±9 (123)
Krankheitsdauer bei Labor-Bestimmung in Jahren	-	6±5 (123)

A β_{1-42} : Amyloid- β_{1-42} -Wert im Liquor (in pg/ml); h-Tau: Gesamt-Tau/Total-Tau-Wert im Liquor (in pg/ml); LBD: Lewykörper-Erkrankungen (*Lewy body disorders*); MW±Std: Mittelwerte und Standardabweichungen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; p-Tau: Phospho-Tau-Wert im Liquor in (pg/ml)

Für die Bestimmung der genetischen Varianten von *MAPT-H1C*, *LRRK2*, *SNCA*, *HLA*, *MAPT*, *PDXK*, *PITX3*, *LINGO1*, *GAK* und *STK39* wurde auf die

Biobank des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung und der neurologischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen zurückgegriffen. Insgesamt wurden die genannten 10 SNPs innerhalb eines Teilprojektes der Riskpanel-Studie der neurologischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen genotypisiert (s. a. Seite 157 f.: Erklärung zum Eigenanteil), von denen letztendlich 4 SNPs (*STK39*, *HLA*, *GAK*, *MAPT*) für die weitere statistische Analyse und Bearbeitung der Fragestellung verwendet wurden. Die SNPs *BIP* und *APOE* wurden aufgrund deren bisher bekannten und für diese Fragestellung interessanten o. g. Zusammenhänge mit LBD im Rahmen der erwähnten übergeordneten Riskpanel-Studie übernommen.

Die folgenden, für die statistische Analyse und Diskussion relevanten Genotypen (*APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK*, *MAPT*), werden in ihrer Häufigkeit und Verteilung im Gesamtkollektiv in Tabelle 2.9 dargestellt.

Tabellen 2.10 und 2.11 zeigen den prozentualen Anteil ihrer Genotypfrequenzen in der Kontroll- und LBD-Gruppe und den jeweiligen Untergruppen der LBD.

Tabelle 2.9: Allel-Häufigkeit der SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* und deren MAF in der gesamten Kohorte (Kontroll-Gruppe + LBD-Gruppe).

	N	MAF
<i>APOE</i> ε4 (rs429358 und rs7412)	981	0,127
<i>STK39</i> (rs4668049)	651	0,216
<i>HLA</i> (rs3129882)	920	0,461
<i>BIP</i> (rs430397)	649	0,08
<i>GAK</i> (rs6599388)	922	0,335
<i>MAPT</i> (rs393152)	962	0,189

APOE: Apolipoprotein E (*apolipoprotein E*)-Gen; *BIP*: Immunoglobulin-bindendes Protein (*binding immunoglobulin protein*)-Gen; *GAK*: Cyclin G-assoziierte Kinase (*cyclin G-associated kinase*)-Gen; *HLA*: Humanes Leukozyten-Antigen (*human leukocyte antigen*)-Gen; MAF: Frequenz der selteneren Variante eines Gens (*minor allele frequency*); *MAPT*: Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau (*microtubule-associated protein tau*)-Gen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; *STK39*: Serin-Threonin-Kinase 39 (*serine-threonine kinase 39*)-Gen

Tabelle 2.10: Häufigkeit und Verteilung der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* in der Kontroll-Gruppe und LBD-Gruppe in Prozent (%) und Anzahl (N) der eingeschlossenen Probanden.

	Genotyp	Kontrollen % (N)	LBD % (N)
<i>APOE</i>	ε4/ε4	1,9 (6)	2,4 (16)
	ε4/X	18,5 (60)	22,1 (145)
	X/X	79,6 (257)	75,5 (497)
<i>STK39</i>	AA	5,9 (2)	8,8 (54)
	AC	17,6 (6)	26,4 (163)
	CC	76,5 (26)	64,8 (400)
<i>HLA</i>	GG	21,0 (59)	20,2 (129)
	GA	48,4 (136)	52,6 (336)
	AA	30,6 (86)	27,2 (174)
<i>BIP</i>	AA	2,9 (1)	0,8 (5)
	AG	26,5 (9)	13,5 (83)
	GG	70,6 (24)	85,7 (527)
<i>GAK</i>	TT	8,5 (24)	14,4 (92)
	TC	40,8 (115)	42,2 (270)
	CC	50,7 (143)	43,4 (278)
<i>MAPT</i>	AA	66,2 (202)	67,1 (441)
	AG	27,9 (85)	28,9 (190)
	GG	5,9 (18)	4,0 (26)

A: Adenin; C: Cytosin; ε4: Risikoallel von *APOE*; G: Guanin; LBD: Lewykörper-Erkrankungen (*Lewy body disorders*); T: Thymin; X: Allel ε2 oder Allel ε3 von *APOE*; weitere Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 2.9 ausgeführt.

Tabelle 2.11: Häufigkeit und Verteilung der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* in der PD-Gruppe, der PDND-Gruppe, PDD-Gruppe, der DLB-Gruppe, und der Demenz-Gruppe in Prozent (%) und Anzahl (N) der eingeschlossenen Probanden.

	Genotyp	PD % (N)	PDND % (N)	PDD % (N)	DLB % (N)	Demenz % (N)
<i>APOE</i>	ε4/ε4	2,1 (6)	1,5 (4)	1,4 (1)	15,2 (5)	5,7 (6)
	ε4/X	18,2 (53)	24 (63)	22,2 (16)	39,3 (13)	27,6 (29)
	X/X	79,7 (231)	74,5 (196)	76,4 (55)	45,5 (15)	66,7 (70)

STK39	AA	8,5 (24)	9,8 (25)	7,0 (5)	0 (0)	6,4 (5)
	AC	26,1 (74)	25,7 (66)	31 (22)	14,3 (1)	47,5 (23)
	CC	65,4 (185)	64,5 (165)	62,0 (44)	85,7 (6)	46,1 (50)
HLA	GG	21,0 (61)	19,6 (53)	18,3 (13)	28,6 (2)	19,2 (15)
	GA	50,7 (147)	53,5 (145)	57,8 (41)	42,6 (3)	56,4 (44)
	AA	28,3 (82)	26,9 (73)	23,9 (17)	28,6 (2)	24,4 (19)
BIP	AA	1 (3)	0,8 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	AG	12,1 (35)	41 (36)	14,3 (9)	42,9 (3)	17,1 (12)
	GG	86,9 (251)	85,2 (218)	85,7 (54)	57,1 (4)	82,9 (58)
GAK	TT	13,3 (39)	14,4 (39)	18,8 (13)	14,3 (1)	18,4 (14)
	TC	38,6 (113)	44,6 (121)	49,3 (34)	28,6 (2)	47,4 (36)
	CC	48,1 (141)	41 (111)	31,9 (22)	57,1 (4)	34,2 (26)
MAPT	AA	65 (191)	69,3 (187)	64,4 (47)	80,0 (16)	67,7 (63)
	AG	30,2 (89)	28,1 (76)	30,1 (22)	15 (3)	26,9 (25)
	GG	4,8 (14)	2,6 (7)	5,5 (4)	5 (1)	5,4 (5)

A: Adenin; C: Cytosin; ε4: Risikoallel von *APOE*; G: Guanin; T: Thymin; X: Allel ε2 oder Allel ε3 von *APOE*; weitere Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 2.1 und Tabelle 2.9 ausgeführt.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien und Enzyme

Für diese Arbeit wurden die in Anhang 1 auf Seite 136 dargestellten Chemikalien und Enzyme verwendet.

2.2.2 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

Die Zusammensetzung des für diese Arbeit verwendeten Bromphenolblau-markers und des Tris-Borat-EDTA-Puffers (TBE-Puffers) findet sich in Anhang 2 und Anhang 3 auf Seite 136.

0,5x TBE-Puffer wurde als Laufpuffer und als Bestandteil des Agarosegels bei der Gelelektrophorese eingesetzt. Bromphenolblau wurde ebenfalls bei der Gelelektrophorese verwendet.

2.2.3 Oligonukleotide (Primer)

Für diese Arbeit wurden die in Anhang 4 auf Seite 137 aufgelisteten Primer von der Metabion International AG verwendet. Diese wurden mithilfe der Primer-Design-Software Primer 3 (<http://primer3.sourceforge.net>) ausgewählt.

In Anhang 5 auf Seite 137 f. finden sich die Sequenzen der PCR und SNaP-Shot-Primer, sowie die Länge des PCR-Produktes.

2.2.4 Referenzsequenzen

Die Referenzsequenzen von *HLA* (NM_019111), *GAK* (NM_005255), *STK39* (NM_013233), *MAPT-H1C* (NM_001123066), *MAPT* (NM_001123066), *LRRK2* (NM_198578), *SNCA* (NM_001146055), *PDXK* (NM_003681), *PITX3* (NM_005029), *LINGO1* (NM_032808) wurden von UCSC und NCBI unter den Internetadressen <http://genome.ucsc.edu> und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> bezogen.

Auf Seite 139 ff. finden sich beispielhaft in Anhang 6 bis Anhang 9 Auszüge aus den ausgewählten Referenzsequenzen von *HLA*, *GAK*, *STK39* und *MAPT*.

2.2.5 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Hilfsmittel

Es wurden die in Anhang 10 auf Seite 141 ff. genannten Verbrauchsmaterialien, Geräte und Hilfsmittel eingesetzt.

2.2.6 Hard- und Software

Zur Erfassung, Dokumentation und Analyse der Daten wurden die in Anhang 11 auf Seite 143 aufgeführten Hard- und Softwaresysteme benötigt.

2.3 Methoden

Zunächst sollen die verwendeten Standardmethoden, sowie das SNaPshot-Verfahren geschildert werden, um ein besseres Verständnis des anschließend erläuterten Versuchsablaufs zu gewährleisten.

2.3.1 Standardmethoden

2.3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Um eine ausreichende Menge an bestimmten DNA-Abschnitten zu erhalten, wird eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) *in vitro* durchgeführt. Durch den Zyklus von drei aufeinander folgenden Schritten, können kleinste Mengen der DNA amplifiziert und mit weiteren Labormethoden – hier der SNaPshot-Reaktion – untersucht werden [57].

Die Reaktionslösung für die PCR enthält:

- die zu amplifizierenden doppelsträngigen DNA-Moleküle.
- die Primer (Oligonukleotide in der Länge von 15-30 bp), welche den zu vervielfältigenden Abschnitt der DNA definieren und komplementär zu den entsprechenden DNA-Einzelsträngen sind.
- die Nukleotide (Desoxyribonukleotidtriphosphate; dNTPs), die zum Aufbau der Kopien dienen.
- die DNA-abhängige, hitzestabile Taq-Polymerase, welche die komplementären Stränge bildet.
- Puffer und MgCl₂.

Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Moleküle ist der erste Schritt: Die Lösung wird auf 94°C erhitzt, wodurch sich die beiden komplementären Stränge der DNA trennen. Die beiden entstandenen Einzelstränge dienen in den folgenden Schritten als Matrizen.

Es folgt die Hybridisierung: Durch das Herabsetzen der Temperatur auf etwa 50-60°C, dem Schmelzpunkt der Primer, können sich diese einzelsträngigen Startermoleküle an die jeweils spezifischen Basenpaare der vorliegenden DNA-Einzelstränge anlagern (*annealing*). Die genaue Temperatur für die Anlagerung der Primer ist abhängig von deren Sequenz und Länge.

Den letzten Schritt bildet die Elongation: Mit Beginn am freien 3'-Ende des gesetzten Primers verbindet die Taq-Polymerase die fehlenden dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mit den Moleküleinzelsträngen – den DNA-Matrizen. Diese Synthese der identischen DNA-Doppelstränge erfolgt bei 72°C, da die benötigte DNA-abhängige Taq-Polymerase unter dieser Temperatur ihr Aktivitätsoptimum erreicht.

Durch Wiederholung dieses Prozesses (Denaturierung, Anlagerung, Elongation), ergibt sich die exponentielle Zunahme des spezifischen DNA-Fragments. Die entstandenen Produkte dienen dabei wieder als Matrizen für den nächsten Zyklus.

Um Unreinheiten der Reaktionslösung auszuschließen, läuft bei allen Verdopplungs-Zyklen eine Negativkontrolle (H₂O-Probe statt DNA-Probe) mit.

In dieser Arbeit wurde die PCR zur weiteren Genotypisierung der SNPs verwendet, wie in Kapitel 2.4 Studienbeschreibung (Versuchsablauf) geschildert.

2.3.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, welche die Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld beschreibt. Die Teilchen – hier DNA-Fragmente – besitzen entsprechend ihrer Eigenschaften, wie Größe und Ladung, eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Die DNA-Fragmente sind durch Phosphatgruppen negativ geladen und wandern deshalb, nach Anlegen an ein elektrisches Feld, von der Kathode durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Anode [57].

Durch die Poren der im Gel vernetzten Agarosepolymerfäden resultiert ein Siebeffekt für die Moleküle. Kleinere Molekülfragmente können sich schneller durch die Poren des Gels bewegen. Die Geschwindigkeit der Auftrennung erfolgt also entsprechend der Größe der DNA-Fragmente, ist jedoch ebenfalls abhängig von der DNA-Konformation, der Beschaffenheit des Gels, der Zusammensetzung des Laufpuffers und der angelegten Spannungshöhe.

Dem Gel wird Ethidiumbromid – ein Fluoreszenzfarbstoff – hinzugefügt. Dieser lagert sich in die doppelsträngige DNA ein, weshalb die entstandenen DNA-Banden im Agarosegel unter UV-Licht visualisiert und ausgewertet werden können.

In dieser Arbeit wurde ein 2%iges Agarosegel als elektrisch neutrale Trägermatrix verwendet. Die Herstellung und Verwendung des Gels werden in Kapitel 2.4 Studienbeschreibung (Versuchsablauf) näher erläutert.

2.3.2 SNaPshot-Verfahren

Das SNaPshot-Verfahren wird verwendet zur Genotyp-Bestimmung von genetischen Variationen, welche aus nur einem Nukleotid (einer Base) bestehen (SNPs). Teil dieser sogenannten Genotypisierung der SNPs ist die SNaPshot-PCR, welche ebenfalls in der Schrittfolge der Denaturierungsphase, der Anlagerungsphase und (im Falle des SNaPshot-Verfahrens) einer abschließenden Einzelbasen-Elongation erfolgt. Durch die Extension einer Einzelbase kann bestimmt werden welche Base – und damit welcher Genotyp – der Probe jeweils vorliegt.

Bei der SNaPshot-PCR hybridisiert der SNaPshot-Primer so mit dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt, dass er genau an die letzte Base vor dem SNP heranreicht. Bei einer SNaPshot-Reaktion können mehrere SNPs gleichzeitig untersucht werden, da für jeden SNP unterschiedlich lange SNP-Primer gewählt werden. Die Verlängerung des Primers erfolgt durch die zur Position des SNP komplementäre Bindung eines der vier spezifisch fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs; ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Die ddNTPs sind im Gegensatz zu den dNTPs am 3'-Kohlenstoff-Atom der Ribose ebenfalls hydrolysiert. Sie besitzen demnach keine freie 3'-Hydroxyl-Gruppe, welche für eine weitere Phosphodiesterbindung zur Verknüpfung mit einem weiteren Nukleotid für die Verlängerung benötigt wird. Die terminierte Elongation der Primer um lediglich eine Base ergibt sich folglich durch den Einbau eines ddNTPs, welches die weitere Polymerisierung verhindert und damit zum Kettenabbruch führt. Durch die Farbmarkierung der ddNTPs können mit der entsprechenden Software nach erfolgreicher Sequenzierung die Genotypen den SNPs zugeordnet werden.

Der Ablauf des gesamten SNaPshot-Verfahrens, welches sich zusammensetzt aus den Schritten PCR, Gelelektrophorese, Purifikation, SNaPshot-Reaktion, Post-Extensionsbehandlung (*Post Extension Treatment*) und der abschließenden Elektrophorese im Sequenzierer, soll nun im Versuchsablauf genauer erläutert werden.

2.4 Studienbeschreibung (Versuchsablauf)

Genotypisierung der SNPs mithilfe des SNaPshot-Verfahrens

Um die DNA im folgend beschriebenen Versuchsablauf einheitlich verwenden zu können, erfolgte zunächst eine Verdünnung der reinen DNA-Proben (mit unterschiedlichen Ausgangs-Konzentrationen) auf eine einheitlich eingestellte Konzentration (10 ng/µl in 100 µl Aqua bidest Li Chrosolv) nach folgendem Schema:

$$\frac{\text{Endvolumen } (\mu\text{l}) \times \text{Endkonzentration } (\text{ng}/\mu\text{l})}{\text{Ausgangskonzentration der DNA } (\text{ng}/\mu\text{l})} = \mu\text{l DNA pro Well}$$

auffüllen zum gewünschten Endvolumen mit H₂O doppelt destilliert.

2.4.1 PCR

Für den ersten Schritt des SNaPshot-Verfahrens erfolgte die Durchführung einer PCR, um die DNA-Abschnitte, welche die SNPs (*MAPT-H1C*, *LRRK2*, *SNCA*, *HLA*, *MAPT*, *PDXK*, *PITX3*, *LINGO1*, *GAK*, *STK39*) enthielten zu amplifizieren. Dabei wurden 4 Blöcke Multiplex-PCRs angesetzt mit jeweils unterschiedlich verwendetem Primer (jeweils *forward*- und *reverse*-Primer, welche den entsprechenden DNA-Abschnitt der verschiedenen SNPs flankieren). Für die Amplifikation mehrerer Proben wurde zuerst ein Mastermix aus H₂O, PCR-Puffer, MgCl₂ (vom jeweiligen Block abhängig), dNTPs, Primern, der Taq-Polymerase und bei Block III zusätzlich DMSO hergestellt. Von diesem Mastermix wurden je 12 µl in die einzelnen Wells pipettiert mit anschließendem Hinzufügen von 3 µl der jeweiligen DNA-Probe, womit eine Gesamtmenge von 15 µl pro Einzelansatz/Well resultierte. Für die Negativkontrollen wurde pro Platte anstelle einer DNA-Probe eine Einzelprobe mit 3 µl H₂O eingesetzt. Die Vorgänge des Pipettierens erfolgten bei allen Ansätzen auf Eis und – mit Ausnahme der Taq-Polymerase – nach Vortexen der Reagenzien.

Für Block I und II der Ansätze wurden folgende Primer verwendet:

Block I	Block II
MAPT-H1C	MAPT

LRRK2	PDXK
SNCA	PITX3
HLA	LINGO1

PCR-Ansatz von Block I und II jeweils:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>
H ₂ O	4,4 µl
Puffer (5x)	3,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,8 µl
dNTPs (10 mM)	0,3 µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	0,3 µl (4 Primer à 0,3 µl; insgesamt 1,2 µl)
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	0,3 µl (4 Primer à 0,3 µl; insgesamt 1,2 µl)
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl

	12 µl
	+ 3 µl DNA (10 ng/µl)

	15 µl pro Well

Für Block III der Ansätze wurde folgender Primer verwendet: GAK

PCR-Ansatz von Block III:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>
H ₂ O	7,0 µl
Puffer (5x)	3,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	-
dNTPs (10 mM)	0,3 µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	0,3 µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	0,3 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
DMSO	1,0 µl

	12 µl

+ 3 µl DNA (10 ng/µl)

15 µl pro Well

Für Block IV der Ansätze wurde folgender Primer verwendet: STK39

PCR-Ansatz von Block IV:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>
H ₂ O	8,0 µl
Puffer (5x)	3,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	-
dNTPs (10 mM)	0,3 µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	0,3 µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	0,3 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl

12 µl

+ 3 µl DNA (10 ng/µl)

15 µl pro Well

Die Proben in den verschiedenen Ansätzen (Block I-IV) durchliefen im Thermocycler folgendes Temperaturprofil des PCR-Protokolls:

Intervall

1. Inkubation bei 94°C für 5 min.
2. Inkubation bei 94°C für 30 sec.
3. Inkubation bei 60°C für 30 sec.
4. Inkubation bei 72°C für 30 sec.
5. Wiederholung von Schritt 2-4 für insgesamt 34 Zyklen.
6. Inkubation bei 72°C für 10 min.
7. Inkubation bei 12°C dauerhaft.

Anschließend erfolgte die Lagerung des PCR-Produktes bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung in den folgenden Schritten.

2.4.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente zur Überprüfung der PCR. So konnten durch die Negativkontrolle etwaige Kontaminationen oder unerwünschte Interaktionen ausgeschlossen und festgestellt werden, ob die PCR-Produkte in ausreichender Menge und der erwarteten Größenordnung vorlagen. Das allgemeine Prinzip der Gelelektrophorese wurde im Kapitel 2.3.1.2 auf Seite 58 bereits abgehandelt.

Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels wurden 4g Agarosepulver mit 200ml TBE-Puffer für ca. 1,5 min. in der Mikrowelle aufgeköcht bis zur vollständigen Verflüssigung der Agarose. Anschließend erfolgte mithilfe eines Magnetrührgerätes eine Vermengung mit 5µl Ethidiumbromid und folgend das Einbringen des Gels in die Plexiglas-Gelkammern. Das Einsetzen von Gelkammern wurde entsprechend der gewünschten Volumina der Geltaschen durchgeführt.

Nach vollständiger Polymerisation der Gelmatrix wurden die Gelkämme entfernt und die Matrix vollständig mit TBE-Laufpuffer (als Trennmedium) bedeckt. Die Laufaschen befanden sich dabei auf der Seite der negativen Elektrode der Spannungsquelle.

Um eine Diffusion aus dem Gel zu verhindern und eine sichtbare Wanderung zu ermöglichen, wurden Stichproben der PCR-Produkte (jeweils 4µl) vorab mit einem Bromphenolblaumarker (1µl) versetzt. Die sich daraus ergebenden 5 µl einer Stichprobe wurden anschließend in die Geltaschen eingebracht. Zur Identifizierung der DNA-Abschnitte wurde gleichzeitig eine DNA-Standardreagenz (DNA-Ladder 100 bp) als DNA-Größenstandard in eine Geltasche aufgetragen. Dieser DNA-Marker ermöglichte eine Größenbestimmung doppelsträngiger DNA mit Fragmentgrößen von 100 bis 1000 bp. Die H₂O-Negativkontrolle wurde ebenfalls in eine Geltasche eingebracht. Unter einer Spannung von 100 bis 200 Volt wurde die Gelelektrophorese je nach Bedarf 30-45 min. durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Kontrolle unter UV-Licht mit einer digitalen Fotodokumentationsanlage. Bei fehlender Verunreinigung des PCR-Produktes zeigte sich dementsprechend in der H₂O-Leerprobe ohne DNA keine Bande unter UV-Licht. Bei ausreichender Länge und Größenordnung der PCR-Produkte stellten sich die Banden entsprechend der DNA-Standardreagenz dar.

2.4.3 Purifikation

Der nächste Schritt umfasste den enzymatischen Verdau, d. h. eine Aufreinigung der nach der durchgeführten PCR entstandenen Lösung. Diese enthielt neben den amplifizierten DNA-Abschnitten zusätzlich noch überschüssige, an der Vervielfältigung nicht beteiligte Primer und nicht gebundene dNTPs, sowie Enzyme und Puffer. Um eine mögliche Interaktion der PCR-Nukleotide und ein Konkurrenzverhalten zwischen den Primern der PCR-Produkte und den in der folgenden SNaPshot-Reaktion verwendeten Sequenzier-Primern zu vermeiden, wurden die nun nicht mehr benötigten dNTPs und Primer mithilfe der Enzyme SAP (*shrimp alkaline phosphatase*, 1U/μl) und Exo I (*Exonuclease I*) zersetzt, und damit aus dem Reaktionsgemisch entfernt.

Protokoll des Ansatzes für den enzymatischen Verdau:

Zusammensetzung Exo I-Mix:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>
H ₂ O	5 μl
Puffer (10x)	4 μl
Exo I (1 U/μl)	1 μl
	<hr/>
	10 μl Exo I-Mix

Für den Ansatz wurde der Exo I-Mix anschließend mit dem Enzym SAP wie folgt zusammengeführt:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>
SAP (1 U/ μ l)	2 μ l
Exo I- Mix	1 μ l
	<hr/>
	3 μ l pro Well

Für den Vorgang der Reinigung wurden die PCR-Produkte aller vier Blöcke – und somit alle insgesamt verwendeten SNPs – bei jeweils übereinstimmender DNA in einen gemeinsamen Ansatz verbracht.

Daraus ergab sich folgende Zusammensetzung:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>
SAP und Exo I-Mix	3 μ l pro Well
+ PCR-Produkt Block I	4 μ l pro Well
+ PCR-Produkt Block II	4 μ l pro Well
+ PCR-Produkt Block III	4 μ l pro Well
+ PCR-Produkt Block IV	4 μ l pro Well
	<hr/>
	19 μ l pro Well

Durch Zugabe der SAP wurden bei der Reaktion im Thermocycler mit einer Inkubation von 1 h bei 37°C (Arbeitsoptimum der Enzyme) die nicht benutzten dNTPs hydrolysiert. Die Exo I verdaut die Einzelstränge der DNA-Primer. Anschließend wurden beide Enzyme durch eine Inkubation bei 75°C in einer Zeitspanne von 15 Minuten deaktiviert.

Der gereinigte Ansatz wurde im Folgenden erneut bei einer Temperatur von 4°C – jedoch möglichst nicht länger als 24h – bis zur nächsten Verarbeitung gelagert.

2.4.4 SNaPshot-Reaktion

Für die nachfolgende SNaPshot-Reaktion wurde der *SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems-Mix, ABI-Mix), welcher ddNTPs und die

Polymerase mit zugehörigem Puffer enthält, mit den jeweiligen SNaPshot-Primern (je SNP ein *forward*-Primer) und H₂O nach protokolliertem Schema angesetzt:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>
ABI-Mix	2 µl
SNaPshot-Primer (4 µM)	0,5 µl pro Primer (x10; insgesamt 5 µl)

	7 µl pro Well
	+ 3 µl gereinigtes PCR-Produkt

	10 µl pro Well

Im Thermocycler fand anschließend die eigentliche Reaktion der SNaPshot-PCR mit folgendem Profil statt:

Intervall

1. Inkubation bei 94°C für 1 min.
2. Inkubation bei 96°C für 10 sec.
3. Inkubation bei 50°C für 5 sec.
4. Inkubation bei 60°C für 30 sec.
5. Wiederholung von Schritt 2-4 für insgesamt 25 Zyklen.
6. Inkubation bei 12°C dauerhaft.

2.4.5 Post-Extensionsbehandlung (*Post Extension Treatment*)

Vor dem finalen Schritt der Sequenzierung wurden die bei der SNaPshot-Reaktion nicht verwerteten und in der PCR-Produktlösung verbliebenen ddNTPs durch die SAP am 5'-Ende dephosphoryliert. Durch diese Maßnahme kann das Wanderungsverhalten der ddNTPs modifiziert und deren potenziell störende Einflussnahme auf die Wanderung der extendierten Primer in der Kapillarelektrophorese verhindert werden.

Hierfür wurde zu jeder Probe 1 µl SAP hinzugefügt mit der im Thermocycler folgenden Inkubation bei 37°C und einer Reaktionszeit von 1h. Die abschließende 15-minütige Inaktivierung der Phosphatase bei 75°C beendete das Programm.

Es erfolgte die weitere Lagerung bei 4°C (<24h).

2.4.6 Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese

Nach Verlängerung der SNaPshot-Primer um genau eine fluoreszenzmarkierte Base und der Aufreinigung des PCR-Produktes konnten nun im letzten Schritt die SNaPshot-Fragmente kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden. Dazu wurde je 1 µl des aufgereinigten SNaPshot-PCR-Produktes mit Formamid und LIZ-Standardreagenz in folgender Zusammensetzung auf einer für die Sequenzierung geeigneten Platte aufgetragen:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>
Formamid	10 µl
LIZ	0,2 µl

	10,2 µl pro Well
	+ 1 µl gereinigtes PCR-Produkt

	11,2 µl pro Well

Anschließend wurden die Fragmente mit dem Sequenzer ABI Prism 3100 Genetic Analyser aufgetrennt und mit der Software Gene Mapper Version 3.5 analysiert. Die SNP-Allele konnten dabei entsprechend der jeweiligen Farbkodierung visuell zugeordnet werden.

2.5 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS Version 19 der Software der Firma IBM Chicago, IL und dient der Beurteilung der aufgestellten Alternativhypothesen. Diesen gegenübergestellt ist die

Nullhypothese, welche keinen signifikanten Unterschied der betrachteten Variablen annimmt. Der p-Wert beschreibt dabei die Wahrscheinlichkeit, die Alternativhypothese fälschlicherweise zu akzeptieren und die Nullhypothese zu verwerfen, obwohl diese richtig gewesen wäre. Die Signifikanz des p-Wertes wurde auf <0.05 festgelegt. Das heißt, die Wahrscheinlichkeit, fälschlich Daten zu beobachten, die zu dieser Teststatistik geführt haben, obwohl eigentlich kein Effekt vorhanden ist, liegt unter 5%. In dieser Arbeit wurde neben diesem signifikanten Zusammenhang außerdem eine Tendenz für einen Zusammenhang zwischen den Risiko-SNPs und den Hypothesen festgelegt mit $p < 0.10$.

Als Signifikanz-Test auf Unabhängigkeit von kategorialen Variablen (z. B. SNP-Genotyp/Allel, Erkrankungsrisiko ja/nein, Demenz ja/nein, Hyposmie ja/nein) wurde der *Chi-Quadrat-Test nach Pearson (Pearson-Chi²-Test)* bei ausreichender Stichprobe (Beobachtungszahl >5) und bei geringerer Beobachtungszahl (<5) der *Fishers-exact-Test* verwendet.

Für den Vergleich von zwei unabhängigen, normalverteilten Stichproben (z. B. als metrische Variable das Alter bei Beginn der Demenzerkrankung/Risiko-SNPs als kategoriale Variablen) wurde der *t-Test* angewendet. Zwei unabhängige, nicht-normalverteilte Stichproben (z. B. als metrische Variable die Differenz zwischen Erkrankungsalter an Parkinsonismus und Demenz/Risiko-SNPs als kategoriale Variablen) wurden mit dem nicht-parametrischen Testverfahren nach *Mann und Whitney (Mann-Whitney-Test)* analysiert. Der *Kolmogorov-Smirnov-Test* wurde benutzt um die metrischen Variablen auf eine Normalverteilung zu überprüfen.

Durch den Einfluss mehrerer Variablen auf eine Zielvariable bei dem Vorhandensein von Störfaktoren (z. B. Alter, Erkrankungsdauer, Geschlecht) wurde die logistische Regression (bei einer kategorialen abhängigen Variable) bzw. die lineare Regression (bei einer metrischen abhängigen Variable) zur Auswertung herangezogen. In dieser Studie wurde kein Verfahren zur Korrektur von multiplen Testen (z. B. Bonferroni) angewendet, d. h. alle genannten p-Werte sind diesbezüglich unkorrigiert.

2.6 Betrachtung der Risikoallele im rezessiven und dominanten Modell

Es wurden die Risiko-SNPs *APOE* (rs429358, rs7412), *STK39* (rs4668049), *HLA* (rs3129882), *BIP* (rs430397), *GAK* (rs6599388) und *MAPT* (rs393152) im dominanten und rezessiven Modell untersucht. Dabei wurde jeweils das Risikoallel dem protektiven Allel gegenübergestellt. Im dominanten Modell hat das Risikoallel heterozygot und homozygot einen Effekt gegenüber dem Wildtyp. Im rezessiven Modell hat das Risikoallel nur homozygot einen Effekt gegenüber dem Wildtyp und dem heterozygoten Typ.

Im Gen *APOE* wurden die beiden funktionellen SNPs rs429358 und rs7412 untersucht. Durch den o. g. AS-Austausch zwischen den Allelen $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ von *APOE*, ergeben sich unterschiedliche Darstellungen für das Risikoallel als $\epsilon 4$ oder Allel C. Der Risikotyp *APOE4* mit dem Risikoallel $\epsilon 4$ weist im Gegensatz zu $\epsilon 2$ und $\epsilon 3$ die AS Arginin an der Position 112 auf. Dies ist zurück zu führen auf den Ersatz des T Nukleotids (führt zur AS Cystein bei $\epsilon 2$ und $\epsilon 3$) durch das C Nukleotid (führt zur AS Arginin) in der Allel-Frequenz des *APOE4*-Typs. Das dominante Modell stellt sich somit als CC/CT vs. TT, beziehungsweise als $\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX dar. Dabei steht X für das $\epsilon 2$ -oder $\epsilon 3$ -Allel von *APOE*. Daraus ergeben sich für $\epsilon 4X$ folgende Genotypen: $\epsilon 4\epsilon 2$, $\epsilon 4\epsilon 3$ und für XX folgende Genotypen $\epsilon 2\epsilon 2$, $\epsilon 2\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 3$. Das rezessive Modell kann dementsprechend dargestellt werden als CC vs. CT/TT beziehungsweise als $\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$. Das Risikoallel $\epsilon 4$ zeigte in einer PET-Studie eine erhöhte Prävalenz bei LBD-Patienten mit deutlichen kortikalen A β -Ablagerungen [131].

Im Gen *STK39* wurde der SNP rs4668049 untersucht. *STK39* konnte als Risikovariante für PD bestätigt werden [84]. Dabei gilt A als Risikoallel und C als protektives Allel. Daraus ergeben sich die Modelle von dominant mit AA/AC vs. CC und rezessiv mit AA vs. AC/CC.

Im Gen *HLA* wurde der SNP rs3129882 untersucht. Vorrangig diese Variante konnte innerhalb der *HLA*-Region bereits mit starker Assoziation zu PD dargestellt werden [93]. Das Risikoallel G steht dabei dem protektiven Allel A gegenüber. Das dominante Modell stellt sich damit als GG/GA vs. AA und das rezessive Modell als GG vs. GA/AA dar.

Im Gen *BIP* wurde der SNP rs430397 untersucht. BiP – als molekulares Chaperon – soll einen bedeutenden, protektiven Einfluss auf eine durch Alpha-Synuklein induzierte Neurodegeneration in einem PD-Modell aufweisen [106]. Ob eine vergleichbare Pathologie eventuell durch das *BIP*-SNP ebenfalls entstehen kann und sich dadurch Auswirkungen auf Erkrankungsrisiko, Klinik oder biochemische Parameter innerhalb der LBD belegen lassen, sollte deshalb analysiert werden. Das Risikoallel A steht G als protektivem Allel gegenüber. Daraus ergeben sich die Modelle von dominant mit AA/AG vs. GG und rezessiv mit AA vs. AG/GG.

Im Gen *GAK* wurde der SNP rs6599388 untersucht. Mit T als Risikoallel und C als protektivem Allel stellt sich das dominante Modell mit TT/TC vs. CC und das rezessive Modell mit TT vs. TC/CC dar. Im Bereich von *GAK* konnten bereits vermehrt signifikante Assoziationen zu PD bestätigt werden [84].

Im Gen *MAPT* wurde der SNP rs393152 untersucht – ein mit PD hoch signifikant assoziierter SNP, dessen Risikoallel im LD mit dem H1 Haplotyp von *MAPT* stehen soll [128]. Das Allel A gilt dabei als Risikoallel gegenüber Allel G als protektivem Allel. Das dominante Modell stellt sich somit dar als AA/AG vs. GG und das rezessive Modell als AA vs. AG/GG.

Innerhalb der Kontroll-Gruppe und LBD-Patientengruppe, sowie deren Subgruppen, wurden verschiedene Erkrankungsrisiken, Krankheitsparameter und Krankheitssymptome registriert und im Zusammenhang mit den Varianten der Polymorphismen analysiert.

3 Ergebnisse

Zusammenhang zwischen den analysierten dominanten und rezessiven Modellen der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* und den LBD-assozierten demographischen und klinischen Parametern

3.1 SNPs und erhöhtes Erkrankungsrisiko

Die Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* wurden im dominanten und rezessiven Modell betrachtet und in Bezug zum Erkrankungsrisiko für LBD, für bestimmte motorische Subtypen und für Demenz gesetzt. Die Analyse erfolgte aus der Gesamtgruppe aller Proben (Kontroll-Gruppe vs. LBD-Gruppe).

3.1.1 Erkrankungsrisiko für LBD

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *GAK*-Gen und dem Erkrankungsrisiko für LBD im dominanten und rezessiven Modell. Für *BIP* zeigte sich diesbezüglich ein signifikanter Zusammenhang im dominanten Modell.

Die restlichen Tests zeigten keinen signifikanten Zusammenhang und auch keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem Erkrankungsrisiko für LBD in der Gesamtgruppe.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte*
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX	0.16
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	0.57
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.16
	AA vs. AC/CC	0.76**
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.30
	GG vs. GA/AA	0.78

Ergebnisse

<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.017
	AA vs. AG/GG	0.28**
<i>GAK</i>	TT/TC vs. CC	0.041
	TT vs. TC/CC	0.013
<i>MAPT</i>	AA/AG vs. GG	0.18
	AA vs. AG/GG	0.78

Signifikante Werte sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit dem Pearson-Chi²-Test berechnet. **Wegen einer Probenanzahl <5 wurde der p-Wert mit dem Fishers-exact-Test ermittelt. A: Adenin; *APOE*: Apolipoprotein E (*apolipoprotein E*)-Gen; *BIP*: Immunoglobulin-bindendes Protein (*binding immunoglobulin protein*)-Gen; C: Cytosin; ε4: Risikoallel von *APOE*; G: Guanin; *GAK*: Cyclin G-assoziierte Kinase (*cyclin G-associated kinase*)-Gen; *HLA*: Humanes Leukozyten-Antigen (*human leukocyte antigen*)-Gen; *MAPT*: Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau (*microtubule-associated protein tau*)-Gen; *STK39*: Serin-Threonin-Kinase 39 (*serine-threonine kinase 39*)-Gen; T: Thymin; vs.: versus; X: Allel ε2 oder Allel ε3 von *APOE*

Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2 sollen das signifikante Ergebnis von *BIP* und *GAK* besser veranschaulichen.

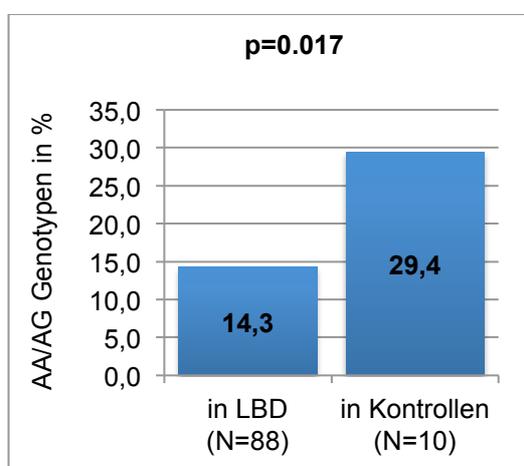


Abbildung 3.1: Zusammenhang von *BIP* mit Genotypen AA/AG und LBD. A: Adenin; G: Guanin; LBD: Lewykörper-Erkrankungen (*Lewy body disorders*); N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden

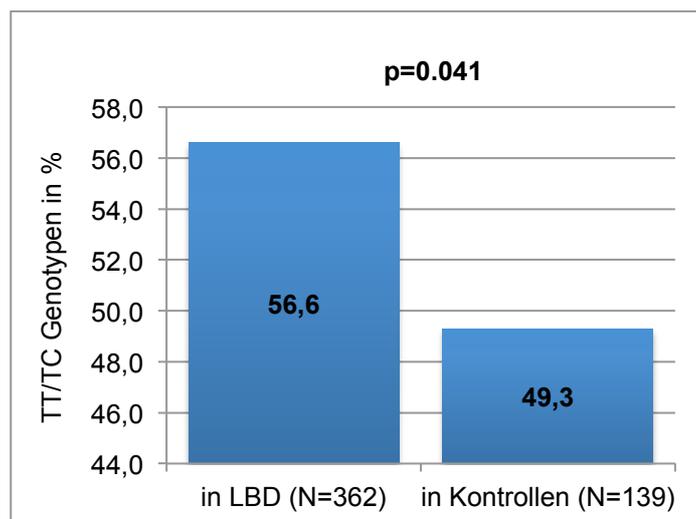


Abbildung 3.2: Zusammenhang von *GAK* mit Genotypen TT/TC und LBD. C: Cytosin; LBD: Lewykörper-Erkrankungen (*Lewy body disorders*); N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; T: Thymin

3.1.2 Erkrankungsrisiko aufgegliedert nach motorischen Subtypen

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang und auch kein Trend für einen Zusammenhang zwischen den Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell und dem Erkrankungsrisiko für bestimmte motorische Subtypen der PD (Tremor-dominante, akinetisch-rigide, äquivalente Form der PD).

Die p-Werte sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem Erkrankungsrisiko für motorische Subtypen in der Gesamtgruppe.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte*
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX	0.70
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	0.22
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.83
	AA vs. AC/CC	0.64
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.60
	GG vs. GA/AA	0.42
<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.47

Ergebnisse

	AA vs. AG/GG	0.71
GAK	TT/TC vs. CC	0.52
	TT vs. TC/CC	0.97
MAPT	AA/AG vs. GG	0.37
	AA vs. AG/GG	0.31

*Die p-Werte wurden mit dem Pearson-Chi2-Test berechnet. Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 3.1 ausgeführt.

3.1.3 Erkrankungsrisiko für Demenz

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *APOE*-Gen und dem Erkrankungsrisiko für eine Demenz im rezessiven Modell.

Die restlichen Tests zeigten keinen signifikanten Zusammenhang und auch keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem Erkrankungsrisiko für Demenz in der Gesamtgruppe.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte*
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX	0.13
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	0.035**
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.95
	AA vs. AC/CC	0.36
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.65
	GG vs. GA/AA	0.95
<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.64
	AA vs. AG/GG	1.00**
GAK	TT/TC vs. CC	0.29
	TT vs. TC/CC	0.39
MAPT	AA/AG vs. GG	0.20
	AA vs. AG/GG	0.79

Signifikante Werte sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit dem Pearson-Chi2-Test berechnet. **Wegen einer Probenanzahl <5 wurde der p-Wert mit dem Fishers-exact-Test ermittelt. Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 3.1 ausgeführt.

Abbildung 3.3 soll das signifikante Ergebnis von *APOE* besser veranschaulichen.

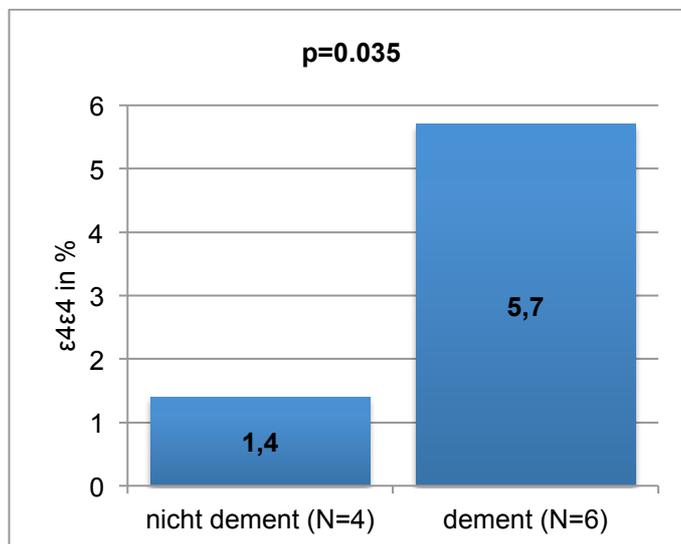


Abbildung 3.3: Zusammenhang von *APOE* mit Genotyp $\epsilon 4\epsilon 4$ und Demenz bei LBD. $\epsilon 4$: Risikoallel von *APOE*; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; X: Allel $\epsilon 2$ oder Allel $\epsilon 3$ von *APOE*

3.2 SNPs und Beginn der Erkrankung sowie Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz

Es wurden die Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell betrachtet und hinsichtlich einer Beziehung zum Beginn des Parkinsonismus und dem Beginn der Demenz getestet. Die zeitliche Betrachtung des Auftretens von Parkinsonismus erfolgte in der LBD-Gruppe, der PDND-Gruppe, der PDD-Gruppe und DLB-Gruppe. Bei Untersuchung der Risiko-SNPs auf einen Zusammenhang mit dem Beginn der Demenz wurden die gesamte demente LBD-Gruppe (Demenz-Gruppe), sowie die PDD-Gruppe und DLB-Gruppe getrennt getestet.

Zusätzlich wurden die jeweiligen Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* auf deren Einfluss auf die Zeitspanne zwischen Alter bei Beginn von Parkinsonismus und Alter bei Beginn der Demenzerkrankung

getestet. Diese Untersuchung wurde ebenfalls in der dementen LBD-Gruppe (Demenz-Gruppe), sowie der PDD-Gruppe und DLB-Gruppe getrennt getestet.

3.2.1 Beginn des Parkinsonismus

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell und dem Beginn des Parkinsonismus.

Es zeigten sich Trends für einen Zusammenhang zwischen der Frequenz von Risiko-SNPs und Beginn des Parkinsonismus für *STK39* im rezessiven Modell in der PDD-Gruppe, für *HLA* im rezessiven Modell in der DLB-Gruppe, für *GAK* im dominanten Modell in der LBD-Gruppe, sowie für *MAPT* im rezessiven Modell in der DLB-Gruppe.

Die restlichen Tests zeigten keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem Erkrankungsbeginn des Parkinsonismus in der LBD-Gruppe, der PDND-Gruppe, der PDD-Gruppe und der DLB-Gruppe mit Anzahl (N) der eingeschlossenen Probanden.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte* LBD (N)	p-Werte* PDND (N)	p-Werte* PDD (N)	p-Werte* DLB (N)
<i>APOE</i>	ε4ε4/ε4X vs. XX	0.13 (626)	0.82 (262)	0.92 (72)	0.96 (33)
	ε4ε4 vs. ε4X/XX	0.58 (626)	0.55 (262)	0.97** (72)	0.67 (33)
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.96 (585)	0.43 (255)	0.61 (71)	0.86** (7)
	AA vs. AC/CC	0.73 (585)	0.91 (255)	0.060 (71)	-***
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.96 (608)	0.70 (270)	0.43 (71)	0.86** (7)
	GG vs. GA/AA	0.75 (608)	0.32 (270)	0.85 (71)	0.095** (7)
<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.84 (583)	0.95 (255)	0.27 (63)	0.23** (7)
	AA vs. AG/GG	0.14 (583)	0.90 (255)	-***	-***
<i>GAK</i>	TT/TC vs. CC	0.10 (608)	0.77 (270)	0.32 (69)	0.23** (7)
	TT vs. TC/CC	0.89 (608)	0.20 (270)	0.90 (69)	0.86** (7)

Ergebnisse

<i>MAPT</i>	AA/AG vs. GG	0.14 (625)	0.39 (269)	0.79** (73)	0.20** (20)
	AA vs. AG/GG	0.60 (625)	0.40 (269)	0.25 (73)	0.099** (20)

Trends für einen Zusammenhang sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. **Wegen einer Probenanzahl <5 wurde der p-Wert mit dem Fishers-exact-Test ermittelt. ***In dieser Gruppe konnte aufgrund einer zu geringen Probenanzahl kein Ergebnis ermittelt werden. DLB: Demenz mit Lewykörpern (*Dementia with lewy bodies*); LBD: Lewykörper-Erkrankungen (*Lewy body disorders*); PD: Parkinson-Erkrankung (*Parkinson's disease*); PDD: Parkinson-Erkrankung mit Demenz (*Parkinson's disease with dementia*); PDND: Parkinson-Erkrankung ohne Demenz (*Parkinson's disease non-demented/without dementia*); Weitere Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 3.1 ausgeführt.

3.2.2 Beginn der Demenz

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell und dem Beginn der Demenz.

Es zeigte sich ein Trend für einen Zusammenhang zwischen *HLA* und dem Erkrankungsbeginn der Demenz im rezessiven Modell in der DLB-Gruppe.

Die restlichen Tests zeigten keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem Erkrankungsbeginn für Demenz in der Demenz-Gruppe, der PDD-Gruppe, und der DLB-Gruppe mit Anzahl (N) der eingeschlossenen Probanden.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte* Demenz (N)	p-Werte* PDD (N)	p-Werte* DLB (N)
<i>APOE</i>	ε4ε4/ε4X vs. XX	0.94 (60)	0.49 (29)	0.77 (31)
	ε4ε4 vs. ε4X/XX	0.28 (60)	0.55** (29)	0.59 (31)
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.16 (36)	0.18 (29)	0.86** (7)
	AA vs. AC/CC	0.61** (36)	0.55** (29)	***
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.69 (33)	0.56 (26)	0.86** (7)
	GG vs. GA/AA	0.47 (33)	0.61** (26)	0.095** (7)
<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.29** (28)	0.76** (21)	0.23** (7)
	AA vs. AG/GG	***	***	***

Ergebnisse

GAK	TT/TC vs. CC	0.94 (31)	0.34 (24)	0.23** (7)
	TT vs. TC/CC	0.74 (31)	0.97 (24)	0.86** (7)
MAPT	AA/AG vs. GG	0.44** (48)	1.00** (29)	0.21** (19)
	AA vs. AG/GG	0.82 (48)	0.77 (29)	0.21** (19)

Trends für einen Zusammenhang sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. **Wegen einer Probenanzahl <5 wurde der p-Wert mit dem Fishers-exact-Test ermittelt. ***In dieser Gruppe konnte aufgrund einer zu geringen Probenanzahl kein Ergebnis ermittelt werden. Abkürzungen werden in den Legenden von Tabelle 3.1 und Tabelle 3.4 ausgeführt.

3.2.3 Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenzerkrankung

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *APOE*-Gen im dominanten Modell, sowie dem *STK39*-Gen im dominanten Modell und der Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz, jeweils in der Demenz-Gruppe.

Die restlichen Tests zeigten keinen signifikanten Zusammenhang.

Es zeigten sich Trends für einen Zusammenhang zwischen der Frequenz von Risiko-SNPs und der Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz für *APOE* im rezessiven Modell in der Demenz-Gruppe und in der PDD-Gruppe, für *STK39* im dominanten und rezessiven Modell in der PDD-Gruppe.

Die restlichen Tests zeigten keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit der Differenz vom Zeitpunkt des Beginns von Parkinsonismus zum Beginn der Demenzerkrankung in der DLB-Gruppe, der PDD-Gruppe und der Demenz-Gruppe mit Anzahl (N) der eingeschlossenen Probanden.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte* DLB (N)	p-Werte* PDD (N)	p-Werte* Demenz (N)
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX	0.96 (31)	0.30 (29)	0.014 (60)
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	1.00 (31)	0.069** (29)	0.073 (60)

Ergebnisse

<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	1.00** (7)	0.06 (29)	0.012 (36)
	AA vs. AC/CC	***	0.069** (29)	0.44** (36)
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.38** (7)	0.31 (26)	0.30 (33)
	GG vs. GA/AA	0.38** (7)	0.43** (26)	0.91 (33)
<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.40** (7)	0.38** (21)	0.24** (28)
	AA vs. AG/GG	***	***	***
<i>GAK</i>	TT/TC vs. CC	1.00** (7)	0.39 (24)	0.17 (31)
	TT vs. TC/CC	1.00** (7)	0.94 (24)	0.74 (31)
<i>MAPT</i>	AA/AG vs. GG	0.21** (19)	0.49** (29)	0.63** (48)
	AA vs. AG/GG	0.42** (19)	0.22 (29)	0.99 (48)

Signifikante Werte und Trends für einen Zusammenhang sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. **Wegen einer Probenanzahl <5 wurde der p-Wert mit dem Fishers-exact-Test ermittelt. ***In dieser Gruppe konnte aufgrund einer zu geringen Probenanzahl kein Ergebnis ermittelt werden. Abkürzungen werden in den Legenden von Tabelle 3.1 und Tabelle 3.4 ausgeführt.

Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 sollen die signifikanten Ergebnisse von *APOE* und *STK39* besser veranschaulichen.

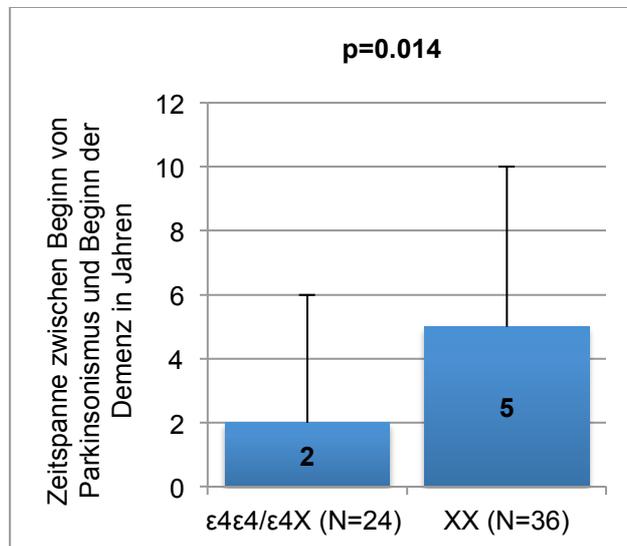


Abbildung 3.4: Einfluss von *APOE* mit Risikoallel $\epsilon 4$ (Genotypen $\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. Genotypen XX) auf die Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz (in Jahren) in der gesamten Demenz-Gruppe. N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; X: Allel $\epsilon 2$ oder Allel $\epsilon 3$ von *APOE*

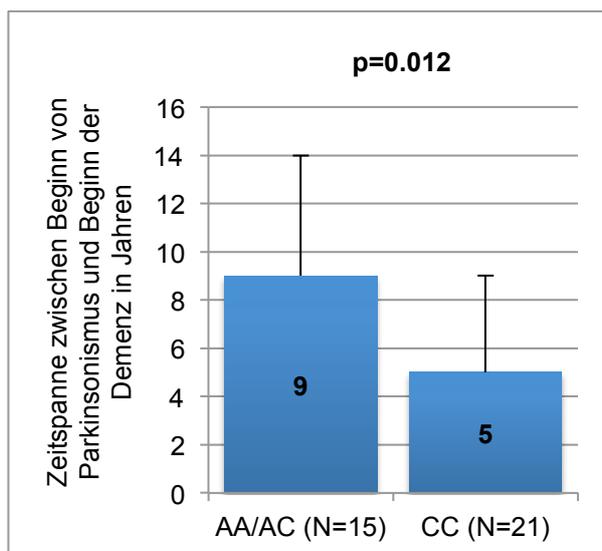


Abbildung 3.5: Einfluss von *STK39* mit Risikoallel A (Genotypen AA/AC vs. Genotyp CC) auf die Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz (in Jahren) in der gesamten Demenz-Gruppe. A: Adenin; C: Cytosin; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden

3.3 SNPs und Auftreten/ Betonung spezifischer Krankheitssymptome

Die Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* wurden in Beziehung zum Auftreten bzw. dem Vorherrschen von spezifischen Krankheitssymptomen der LBD gesetzt. Dabei wurde nach folgenden Symptomen unterschieden:

1. Motorische Symptome (Punktwerte des H&Y- und UPDRS-III-Stadiums)
2. Kognitive Symptome (MMSE-Wert)
3. Olfaktorische Komponente (Hyposmie mit Sniffin-Wert<9 und Punktwert des Sniffin-Tests).

Die Analyse erfolgte jeweils in der gesamten LBD-Gruppe.

Motorische Symptome

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *APOE*-Gen und dem Punktwert des H&Y-Stadiums im rezessiven Modell. *BIP* zeigte einen signifikanten Zusammenhang zum Punktwert des UPDRS-III-Score im dominanten Modell.

Ergebnisse

Die restlichen Tests zeigten keinen signifikanten Zusammenhang und auch keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem Auftreten von motorischen Symptomen in der LBD-Gruppe.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte*	
		H&Y	UPDRS-III
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX	0.52	0.34
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	0.024	0.24
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.97	0.11
	AA vs. AC/CC	0.98	0.30
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.61	0.48
	GG vs. GA/AA	0.16	0.11
<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.73	0.049
	AA vs. AG/GG	0.45	0.45
<i>GAK</i>	TT/TC vs. CC	0.58	0.13
	TT vs. TC/CC	0.78	0.57
<i>MAPT</i>	AA/AG vs. GG	0.77	0.92
	AA vs. AG/GG	0.78	0.95

Signifikante Werte sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit der linearen Regression berechnet und für Erkrankungsdauer (*disease duration*, dd), Alter und Geschlecht korrigiert. H&Y: Hoehn & Yahr; UPDRS-III: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*; Weitere Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 3.1 ausgeführt.

Tabelle 3.8 und Tabelle 3.9, sowie Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7 sollen die signifikanten Ergebnisse von *APOE* und *BIP* besser veranschaulichen.

Tabelle 3.8: Übersicht über die Verteilung des Genotyps $\epsilon 4\epsilon 4$ und der Genotypen $\epsilon 4X/XX$ von *APOE* mit Bezug zum H&Y-Stadium. Erkrankungsdauer (in Jahren), Alter (in Jahren) und Geschlecht (Anzahl der männlichen Probanden in Prozent (%)) als Variablen, für die p korrigiert wurde.

	H&Y		Erkrankungsdauer	Alter	Geschlecht
	MW±Std	N			
<i>APOE</i>	MW±Std	N	MW±Std	MW±Std	männlich%
$\epsilon 4\epsilon 4$	1,8±0,6	7	7±7	68±6	71,4

Ergebnisse

$\epsilon 4X/XX$	2,3 \pm 0,7	367	7 \pm 6	66 \pm 10	61,6
------------------	---------------	-----	-----------	-------------	------

APOE: Apolipoprotein E (*apolipoprotein E*)-Gen; $\epsilon 4$: Risikoallel von *APOE*; H&Y: Hoehn & Yahr; MW \pm Std: Mittelwerte und Standardabweichungen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; X: Allel $\epsilon 2$ oder Allel $\epsilon 3$ von *APOE*

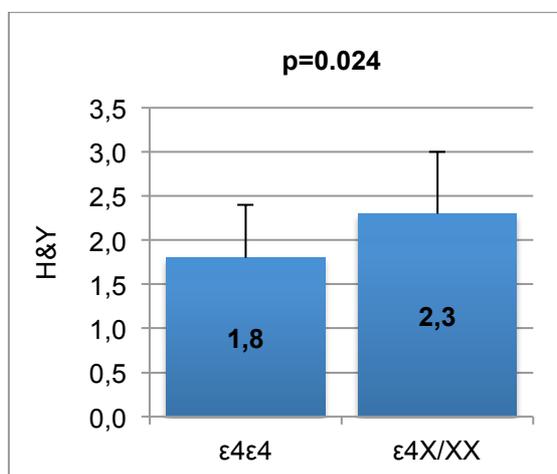


Abbildung 3.6: Einfluss von *APOE* $\epsilon 4\epsilon 4$ Genotyp auf das H&Y-Stadium (korrigiert für Krankheitsdauer, Alter und Geschlecht). H&Y: Hoehn & Yahr; X: Allel $\epsilon 2$ oder Allel $\epsilon 3$ von *APOE*

Tabelle 3.9: Übersicht über die Verteilung der Genotypen AA/AG und des Genotyps GG von *BIP* mit Bezug zum UPDRS-III-Score. Erkrankungsdauer (in Jahren), Alter (in Jahren) und Geschlecht (Anzahl der männlichen Probanden in Prozent (%)) als Variablen, für die p korrigiert wurde.

	UPDRS-III		Erkrankungsdauer	Alter	Geschlecht
	MW \pm Std	N			
<i>BIP</i>	MW \pm Std	N	MW \pm Std	MW \pm Std	männlich%
AA/AG	22 \pm 10	42	5 \pm 5	64 \pm 11	59,5
GG	26 \pm 11	230	6 \pm 6	67 \pm 10	60,0

A: Adenin; *BIP*: Immunoglobulin-bindendes Protein (*binding immunoglobulin protein*)-Gen; G: Guanin; MW \pm Std: Mittelwerte und Standardabweichungen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; UPDRS-III: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*

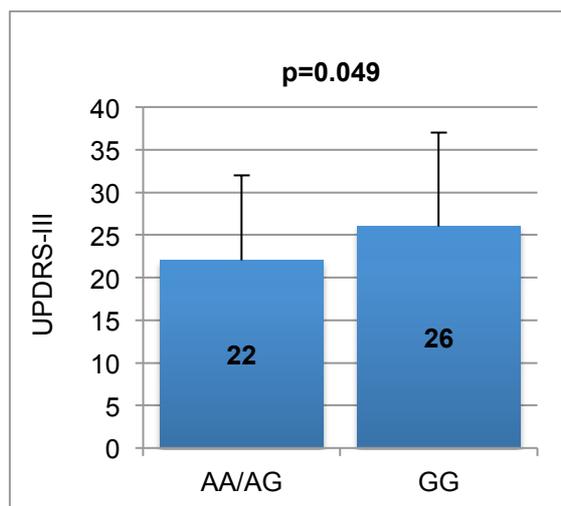


Abbildung 3.7: Einfluss von *BIP* mit Risikoallel A (Genotypen AA/AG vs. Genotyp GG) auf den UPDRS-III-Score (korrigiert für Krankheitsdauer, Alter und Geschlecht). A: Adenin; G: Guanin; UPDRS-III: *Unified Parkinson's disease Rating Scale*

Kognitive Symptome

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *APOE*-Gen und dem MMSE-Wert im rezessiven Modell, sowie zwischen dem *MAPT*-Gen und dem MMSE-Wert im dominanten Modell.

Die restlichen Tests zeigten keinen signifikanten Zusammenhang.

Es zeigte sich ein Trend für einen Zusammenhang zwischen dem *GAK*-Gen und dem MMSE-Wert im dominanten Modell.

Die restlichen Tests zeigten keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.10 dargestellt.

Tabelle 3.10: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem Auftreten von kognitiven Symptomen in der LBD-Gruppe.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte* MMSE
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX	0.12
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	0.01
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.84
	AA vs. AC/CC	0.48
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.19
	GG vs. GA/AA	0.52

Ergebnisse

<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.87
	AA vs. AG/GG	0.16
<i>GAK</i>	TT/TC vs. CC	0.086
	TT vs. TC/CC	0.53
<i>MAPT</i>	AA/AG vs. GG	0.003
	AA vs. AG/GG	0.56

Signifikante Werte und Trends für einen Zusammenhang sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit der linearen Regression berechnet und für Erkrankungsdauer (*disease duration*, dd), Alter und Geschlecht korrigiert. MMSE: Mini-Mental-Status-Test (*Mini-Mental-State-Examination*); Weitere Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 3.1 ausgeführt.

Tabelle 3.11 und Tabelle 3.12, sowie Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9 sollen die signifikanten Ergebnisse von *APOE* und *MAPT* besser veranschaulichen.

Tabelle 3.11: Übersicht über die Verteilung des Genotyps $\epsilon 4\epsilon 4$ und der Genotypen $\epsilon 4X/XX$ von *APOE* mit Bezug zum MMSE-Wert, Erkrankungsdauer (in Jahren), Alter (in Jahren) und Geschlecht (Anzahl der männlichen Probanden in Prozent(%)) als Variablen, für die p korrigiert wurde.

<i>APOE</i>	MMSE		Erkrankungsdauer	Alter	Geschlecht
	MW \pm Std	N	MW \pm Std	MW \pm Std	männlich%
$\epsilon 4\epsilon 4$	23 \pm 8	11	6 \pm 6	69 \pm 6	63,6
$\epsilon 4X/XX$	27 \pm 4	375	6 \pm 6	67 \pm 10	60,8

APOE: Apolipoprotein E (*apolipoprotein E*)-Gen; $\epsilon 4$: Risikoallel von *APOE*; MMSE: Mini-Mental-Status-Test (*Mini-Mental-State-Examination*); MW \pm Std: Mittelwerte und Standardabweichungen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; X: Allel $\epsilon 2$ oder Allel $\epsilon 3$ von *APOE*

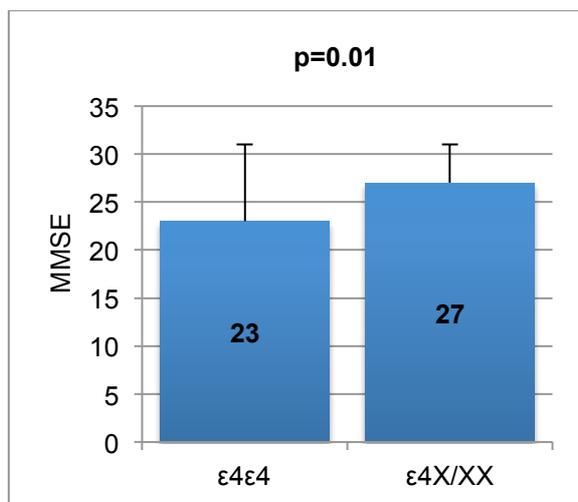


Abbildung 3.8: Einfluss von APOE ε4ε4 Genotyp auf den MMSE-Punktwert (korrigiert für Krankheitsdauer, Alter und Geschlecht). MMSE: Mini-Mental-Status-Test (*Mini-Mental-State-Examination*); X: Allel ε2 oder Allel ε3 von APOE

Tabelle 3.12: Übersicht über die Verteilung der Genotypen AA/AG und des Genotyps GG von MAPT mit Bezug zum MMSE-Wert. Erkrankungsdauer (in Jahren), Alter (in Jahren) und Geschlecht (Anzahl der männlichen Probanden in Prozent(%)) als Variablen, für die p korrigiert wurde.

MAPT	MMSE		Erkrankungsdauer	Alter	Geschlecht
	MW±Std	N			
AA/AG	27±4	371	6±6	67±10	61,2
GG	24±6	13	5±4	68±9	61,5

A: Adenin; G: Guanin; MAPT: Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau (*microtubule-associated protein tau*)-Gen; MMSE: Mini-Mental-Status-Test (*Mini-Mental-State-Examination*); MW±Std: Mittelwerte und Standardabweichungen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden

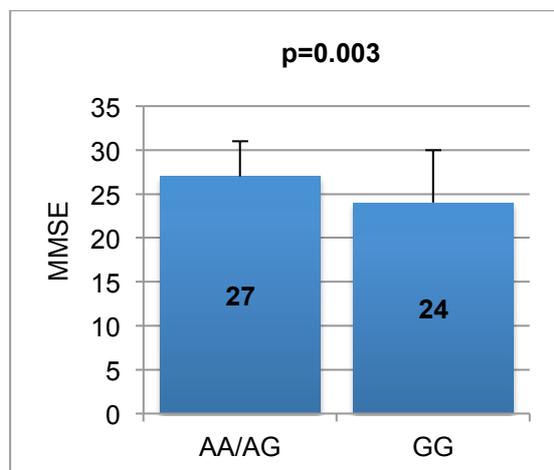


Abbildung 3.9: Einfluss von *MAPT* mit Genotypen AA und AG auf den MMSE-Punktwert (korrigiert für Krankheitsdauer, Alter und Geschlecht). A: Adenin; G: Guanin; MMSE: Mini-Mental-Status-Test (*Mini-Mental-State-Examination*)

Hyposmie

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell und einer Hyposmie bzw. dem Punktwert im Sniffin-Test.

Es zeigten sich Trends für einen Zusammenhang zwischen Frequenzen von Risiko-SNPs und einer Hyposmie für *STK39* im rezessiven Modell, sowie für *BIP* im dominanten Modell.

Die restlichen Tests zeigten keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.13 dargestellt.

Tabelle 3.13: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem Auftreten von Hyposmie oder dem Sniffin-Testwert in der LBD-Gruppe.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte* Hyposmie	p-Werte* Sniffin
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX	0.27	0.74
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	1.00	0.11
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.11	0.62
	AA vs. AC/CC	0.076	0.60
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.18	0.30

	GG vs. GA/AA	0.53	0.66
<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.081	0.86
	AA vs. AG/GG	_***	_***
<i>GAK</i>	TT/TC vs. CC	0.37	0.90
	TT vs. TC/CC	0.45	0.87
<i>MAPT</i>	AA/AG vs. GG	0.24	0.44
	AA vs. AG/GG	0.75	0.87

Trends für einen Zusammenhang sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit der linearen Regression berechnet und für Erkrankungsdauer (*disease duration*, dd), Alter und Geschlecht korrigiert. ***In dieser Gruppe konnte aufgrund einer zu geringen Probenanzahl kein Ergebnis ermittelt werden. Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 3.1 ausgeführt.

3.4 SNPs und Progression von Krankheitssymptomen

Des Weiteren wurden die Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* hinsichtlich einer Progression der genannten Krankheitssymptome der LBD getestet. Dafür wurden die Testverfahren jeweils ins Verhältnis zur Erkrankungsdauer der PD (*disease duration*, dd) gesetzt:

1. Progression motorischer Symptome (H&Y-Wert/dd und UPDRS-III-Wert/dd).
2. Progression kognitiver Symptome (MMSE-Wert/dd).
3. Progression einer olfaktorischen Komponente (Sniffin-Wert/dd).

Die Analyse erfolgte jeweils in der LBD-Gruppe.

Progression motorischer Symptome

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen *STK39* und einer Progression motorischer Symptomatik, gemessen anhand des UPDRS-III-Score, im dominanten Modell.

Die restlichen Tests zeigten keinen signifikanten Zusammenhang und auch keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.14 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 3.14: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem H&Y-Stadium im Verhältnis zur Erkrankungsdauer und dem UPDRS-III-Wert im Verhältnis zur Erkrankungsdauer.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte* H&Y/dd	p-Werte* UPDRS-III/dd
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX	0.70	0.83
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	0.77	0.48
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.15	0.013
	AA vs. AC/CC	0.46	0.86
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.15	0.25
	GG vs. GA/AA	0.59	0.69
<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.85	0.58
	AA vs. AG/GG	_ ***	_ ***
<i>GAK</i>	TT/TC vs. CC	0.45	0.95
	TT vs. TC/CC	0.30	0.77
<i>MAPT</i>	AA/AG vs. GG	0.22	0.29
	AA vs. AG/GG	0.89	0.56

Signifikante Werte sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. ***In dieser Gruppe konnte aufgrund einer zu geringen Probenanzahl kein Ergebnis ermittelt werden. dd: Erkrankungsdauer (*disease duration*); H&Y: Hoehn & Yahr-Stadium; UPDRS-III: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*; Weitere Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 3.1 ausgeführt.

Abbildung 3.10 soll das signifikante Ergebnis von *STK39* besser veranschaulichen.

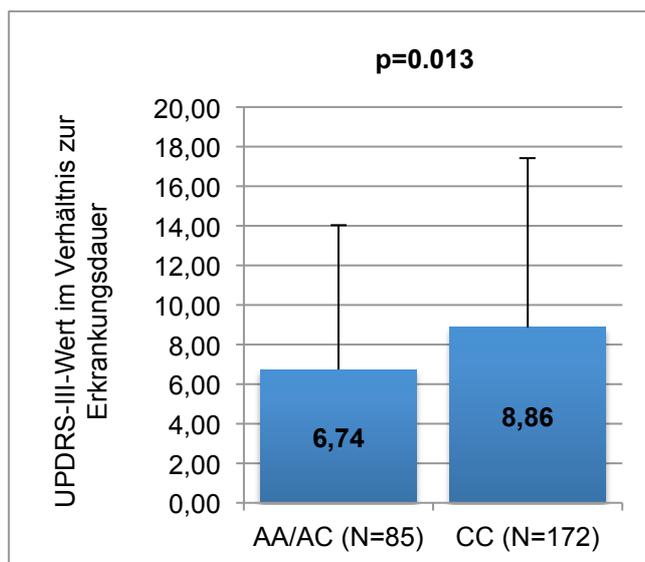


Abbildung 3.10: Einfluss von *STK39* mit Risikoallel A (Genotypen AA/AC gegenüber Genotyp CC) auf den UPDRS-III-Wert im Verhältnis zur Erkrankungsdauer. A: Adenin; C: Cytosin; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; UPDRS-III: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*

Progression kognitiver Symptome

Es zeigten sich kein signifikanter Zusammenhang und auch kein Trend für einen Zusammenhang zwischen den Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell und einer Progression von kognitiven Symptomen.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.15 dargestellt.

Tabelle 3.15: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem MMSE-Wert im Verhältnis zur Erkrankungsdauer.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte* MMSE/dd
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX	0.53
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	0.78
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.12
	AA vs. AC/CC	0.33
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.43
	GG vs. GA/AA	0.65

Ergebnisse

<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.74
	AA vs. AG/GG	_***
<i>GAK</i>	TT/TC vs. CC	0.67
	TT vs. TC/CC	0.58
<i>MAPT</i>	AA/AG vs. GG	0.64
	AA vs. AG/GG	0.48

*Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. ***In dieser Gruppe konnte aufgrund einer zu geringen Probenanzahl kein Ergebnis ermittelt werden. dd: Erkrankungsdauer (*disease duration*); MMSE: Mini-Mental-Status-Test (*Mini-Mental-State-Examination*); Weitere Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 3.1 ausgeführt.

Progression der Hyposmie/Sniffin-Testwert

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen *APOE* und einer Progression im Sniffin-Testwert im rezessiven Modell.

Die restlichen Tests zeigten keinen signifikanten Zusammenhang und auch keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.16 dargestellt.

Tabelle 3.16: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit dem Sniffin-Testwert im Verhältnis zur Erkrankungsdauer.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte* Sniffin-Wert/dd
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. XX	0.92
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	0.042**
<i>STK39</i>	AA/AC vs. CC	0.30
	AA vs. AC/CC	0.26
<i>HLA</i>	GG/GA vs. AA	0.11
	GG vs. GA/AA	0.29
<i>BIP</i>	AA/AG vs. GG	0.68
	AA vs. AG/GG	_***
<i>GAK</i>	TT/TC vs. CC	0.77
	TT vs. TC/CC	0.18
<i>MAPT</i>	AA/AG vs. GG	0.33

	AA vs. AG/GG	0.64
--	--------------	------

Signifikante Werte sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. **Wegen einer Probenanzahl <5 wurde der p-Wert mit dem Fishers-exact-Test ermittelt. ***In dieser Gruppe konnte aufgrund einer zu geringen Probenanzahl kein Ergebnis ermittelt werden. dd: Erkrankungsdauer (*disease duration*); Weitere Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 3.1 ausgeführt.

Abbildung 3.11 soll den signifikanten Zusammenhang von *APOE* besser veranschaulichen.

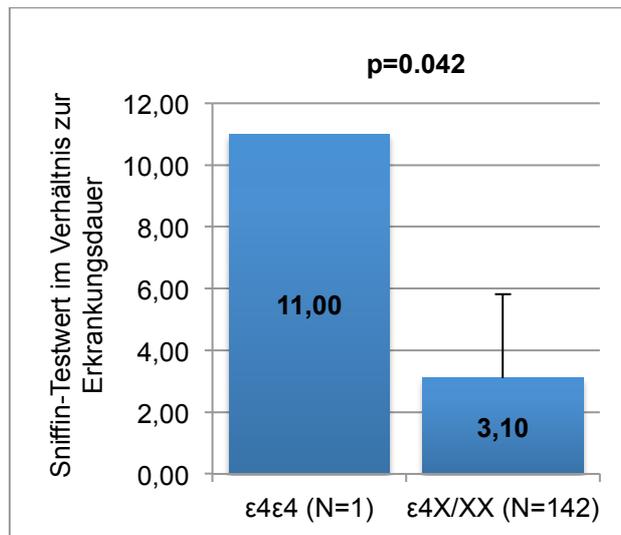


Abbildung 3.11: Einfluss von *APOE* mit Risikoallel $\epsilon 4$ (Genotyp $\epsilon 4\epsilon 4$ vs. Genotypen $\epsilon 4X/XX$) auf den Sniffin-Testwert im Verhältnis zur Erkrankungsdauer. N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; X: Allel $\epsilon 2$ oder Allel $\epsilon 3$ von *APOE*

3.5 SNPs und neurodegenerative Marker im Nervenwasser

Die Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* wurden des Weiteren in Bezug zu den neurodegenerativen Markern h-Tau, p-Tau, dem Quotienten p-Tau/h-Tau sowie zu $A\beta_{1-42}$ gesetzt. Die Analyse erfolgte in der LBD-Gesamtgruppe.

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen *APOE* und der Konzentration von $A\beta_{1-42}$ im Liquor im dominanten und rezessiven Modell. Die restlichen Tests zeigten keinen signifikanten Zusammenhang.

Ergebnisse

Es zeigten sich Trends für einen Zusammenhang zwischen *HLA* und der $A\beta_{1-42}$ -Konzentration im Liquor im dominanten Modell, sowie zwischen *BIP* und der p-Tau-Konzentration im Liquor im dominanten Modell.

Die restlichen Tests zeigten keinen Trend für einen Zusammenhang.

Die p-Werte sind in Tabelle 3.17 dargestellt.

Tabelle 3.17: Assoziation der Risiko-SNPs von *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT* im dominanten und rezessiven Modell mit den neurodegenerativen Markern h-Tau, p-Tau, $A\beta_{1-42}$, sowie der Ratio p-Tau/h-Tau in der LBD-Gruppe.

	Genotyp mit Risikoallel im dominanten und rezessiven Modell	p-Werte* h-Tau	p-Werte* p-Tau	p-Werte* p-Tau/ h-Tau	p-Werte* $A\beta_{1-42}$
<i>APOE</i>	$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ vs. <i>XX</i>	0.11	0.13	0.73	0.0002
	$\epsilon 4\epsilon 4$ vs. $\epsilon 4X/XX$	0.97	0.80	0.78	0.014
<i>STK39</i>	<i>AA/AC</i> vs. <i>CC</i>	0.64	0.53	0.90	0.87
	<i>AA</i> vs. <i>AC/CC</i>	0.70	0.59	0.76	0.90
<i>HLA</i>	<i>GG/GA</i> vs. <i>AA</i>	0.17	0.11	0.87	0.10
	<i>GG</i> vs. <i>GA/AA</i>	0.93	0.58	0.53	0.29
<i>BIP</i>	<i>AA/AG</i> vs. <i>GG</i>	0.16	0.090	0.17	0.60
	<i>AA</i> vs. <i>AG/GG</i>	0.52	0.33	0.76	0.20
<i>GAK</i>	<i>TT/TC</i> vs. <i>CC</i>	0.41	0.44	0.68	0.47
	<i>TT</i> vs. <i>TC/CC</i>	0.66	0.63	0.44	0.57
<i>MAPT</i>	<i>AA/AG</i> vs. <i>GG</i>	1.00	0.86	0.49	0.16
	<i>AA</i> vs. <i>AG/GG</i>	0.79	0.80	0.70	0.94

Signifikante Werte und Trends für einen Zusammenhang sind hervorgehoben. *Die p-Werte wurden mit der linearen Regression berechnet und für Erkrankungsdauer (*disease duration*, *dd*), Alter und Geschlecht korrigiert. $A\beta_{1-42}$: Amyloid- β_{1-42} -Konzentration im Liquor; h-Tau: Gesamt-Tau/Total-Tau-Konzentration im Liquor; p-Tau: Phospho-Tau-Konzentration im Liquor; Weitere Abkürzungen werden in der Legende von Tabelle 3.1 ausgeführt.

Tabelle 3.18 und Abbildung 3.12 sollen das signifikante Ergebnis von *APOE* besser veranschaulichen.

Tabelle 3.18: Übersicht über die Verteilung der Genotypen $\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ und der Genotypen *XX* von *APOE* mit Bezug zum $A\beta_{1-42}$ -Spiegel im Liquor (in pg/ml) in der

Ergebnisse

LBD-Gruppe. Erkrankungsdauer (in Jahren), Alter (in Jahren) und Geschlecht (Anzahl der männlichen Probanden in Prozent(%)) als Variablen, für die p korrigiert wurde.

	A β ₁₋₄₂		Erkrankungsdauer	Alter	Geschlecht
	MW \pm Std	N			
<i>APOE</i>					
$\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$	471 \pm 224	39	6 \pm 5	69 \pm 9	53,8
XX	663 \pm 264	81	7 \pm 5	68 \pm 9	60,5

A β ₁₋₄₂: Amyloid- β ₁₋₄₂-Konzentration im Liquor; *APOE*: Apolipoprotein E (*apolipoprotein E*)-Gen; $\epsilon 4$: Risikoallel von *APOE*; MW \pm Std: Mittelwerte und Standardabweichungen; N: Anzahl der eingeschlossenen Probanden; X: Allel $\epsilon 2$ oder Allel $\epsilon 3$ von *APOE*

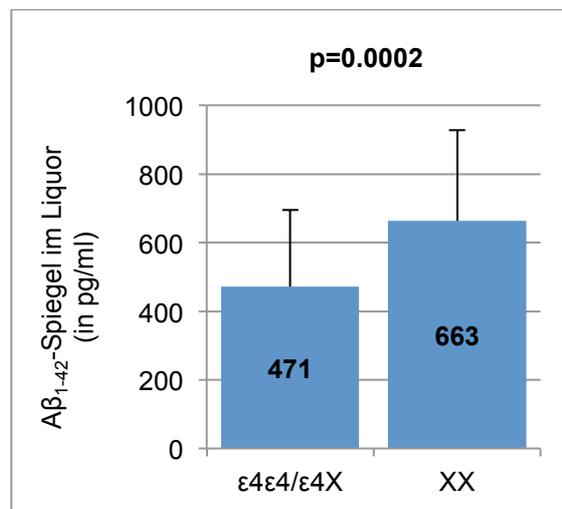


Abbildung 3.12: Einfluss von *APOE* $\epsilon 4\epsilon 4/\epsilon 4X$ Genotypen auf die A β ₁₋₄₂-Konzentration in der LBD-Gruppe (korrigiert für Krankheitsdauer, Alter und Geschlecht). A β ₁₋₄₂: Amyloid- β ₁₋₄₂-Konzentration im Liquor; X: Allel $\epsilon 2$ oder Allel $\epsilon 3$ von *APOE*

4 Diskussion

PD und DLB sind Lewykörper-Erkrankungen (LBD), und es ist weitgehend akzeptiert, dass sie „Extreme“ eines Kontinuums einer neurodegenerativen Erkrankung – eben der LBD – darstellen [1]. Es macht daher Sinn, in wissenschaftlichen Untersuchungen beide Krankheiten – PD und DLB – mit einzubeziehen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit SNPs, die mit dem Auftreten von LBD (meistens PD) in Verbindung gebracht wurden, und vergleicht dabei demographische, klinische und laborchemische Parameter mit dem Auftreten der SNPs.

Im Folgenden werden die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit, geordnet nach untersuchten SNPs, dargestellt und diskutiert.

4.1 *APOE*

4.1.1 Einfluss der *APOE*-SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD

In der vorliegenden Arbeit konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den SNPs rs429358 und rs7412 von *APOE* und dem Erkrankungsrisiko an LBD finden.

Dieser Befund ist vereinbar mit Ergebnissen von Studien, welche bei *APOE4*-Trägerstatus (in unterschiedlichen Ethnien) ebenfalls keine Prädisposition für PD finden konnten [132-136]. In einer Studie innerhalb einer kaukasischen Population konnte sogar ein niedrigeres Risiko für PD bei Vorhandensein von *APOE4* gezeigt werden [137]. Auch in familiären Fällen von PD konnte *APOE4* nicht als Risikofaktor für PD identifiziert werden [138].

Im Gegensatz dazu fand Li et al. [81] bei Vorhandensein von *APOE4* ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für PD. Im Unterschied zu unserer Arbeit wurde dabei allerdings eine positive Familienanamnese für PD als wesentlich beeinflussender Faktor auf das Erkrankungsrisiko vermutet.

Ebenfalls kein Zusammenhang ergab sich in unserer Arbeit zwischen den SNPs rs429358 und rs7412 von *APOE* und bestimmten motorischen Subtypen der PD. Diesbezüglich muss die Datenlage noch erweitert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass *APOE* bei Vorhandensein von zwei $\epsilon 4$ -Allelen im Gesamtkollektiv signifikant mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Demenz assoziiert war ($p=0.035$). Dabei konnte der Genotyp $\epsilon 4\epsilon 4$ etwa viermal häufiger in der Demenz-Gruppe (5,7%) als in der nicht-dementen Gruppe (1,4%) nachgewiesen werden, wobei ein Gen-Dosis-Effekt durchaus möglich erscheint.

Dieses Ergebnis ist vereinbar mit anderen Studien, in welchen *APOE4* als wichtiger genetischer Faktor für Demenz in PD und anderen neurodegenerativen Störungen – wie v. a. auch der AD – beschrieben wird [139, 140]. Wobei Irwin et al. [140] belegen konnte, dass das *APOE* $\epsilon 4$ -Allel signifikant häufiger bei dementen PD-Patienten (PDD), als in der nicht-dementen PD-Gruppe (PDND) auftritt und somit möglicherweise bereits ein $\epsilon 4$ -Allel zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Demenz führen könnte. Allerdings finden sich im Vergleich in unserer Studie niedrigere prozentuale Anteile an PDD-Patienten, sowie eine zusätzliche Betrachtung der DLB-Patienten. Durch diese Unterschiede könnte die bei uns fehlende Signifikanz bezüglich eines $\epsilon 4$ -Allels erklärt werden. Eine erhöhte Frequenz von $\epsilon 4$ -Trägern konnte jedoch bei PDD und auch DLB, im Vergleich zu PD ohne Demenz, bereits anderweitig nachgewiesen werden [133, 141]. Auch in familiären PD-Fällen wurde dies beobachtet [142].

Dagegen beschreibt eine andere Studie bei familiärer Disposition einen Zusammenhang von *APOE4* mit PD, ohne Beteiligung der kognitiven Leistungsfähigkeit [81]. Die fehlende Assoziation zu einer kognitiven Störung könnte hierbei jedoch an einer zu geringen Probandenzahl mit entsprechenden kognitiven Symptomen liegen [81].

Somit wird der von uns gefundene Zusammenhang von *APOE4* v. a. mit Demenz, und nicht mit dem Erkrankungsrisiko für PD, von bis dato bekannten Studien bestätigt. Dennoch werden weitere Daten mit u. a. größeren Probandenzahlen innerhalb der PD benötigt, um diese Ergebnisse weiter zu stützen und die Wahrscheinlichkeit eines Gen-Dosis-Effektes genauer zu betrachten.

4.1.2 Einfluss der *APOE*-SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne

Es zeigte sich in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen den SNPs rs429358 und rs7412 von *APOE* und dem Beginn des Parkinsonismus.

Der offensichtlich fehlende Einfluss des *APOE*-Gens auf das Erkrankungsalter von PD ist vereinbar mit Ergebnissen, welche zwar eine erhöhte Frequenz des ϵ 4-Allels in der PD-Altersgruppe >70 Jahren (LOPD) beschreiben, jedoch nicht auf eine Assoziation mit dem Erkrankungsalter hindeuten [133]. Auch anderweitig konnte kein Einfluss des *APOE*-Gens auf das Erkrankungsalter bei PD nachgewiesen werden [135].

Andere Studien deuten hingegen darauf hin, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem *APOE4*-Genotyp und einem um meist ca. 3 Jahre verfrühten Auftreten von PD besteht [81, 132, 143, 144]. Dort wurden im Gegensatz zu unserer Studie jedoch beispielsweise u. a. vermehrt familiäre Fälle der PD untersucht [81], oder auch vermehrt weibliche Probanden eingeschlossen [132], weshalb es sich bei dieser Beobachtung u. a. auch um einen geschlechts- aber nicht krankheitsgetriggerten Effekt handeln könnte. Außerdem wurde in unserer Studie die LBD-Gruppe allgemein, sowie demente und nicht-demente LBD-Gruppen getrennt (mit somit auch niedrigeren Probandenzahlen) getestet und nicht nur eine hohe Probandenzahl an PD-Fällen. Die v. a. kognitiv beeinflussenden DLB-Patienten waren somit in unserer Studie enthalten und könnten auf den Effekt des Erkrankungsalters des Parkinsonismus – der v. a. motorisch beeinflussenden Symptome – relevant mit einwirken. Auch kann natürlich die Information der Probanden selbst über die subjektive Einschätzung, beziehungsweise persönliche Registrierung des ersten Auftretens von Parkinsonismus, den Beginn der Erkrankung beeinflussen [144], wenn dieser nicht einheitlich über positive Tests diagnostiziert und festgelegt werden konnte.

Die SNPs rs429358 und rs7412 von *APOE* zeigten in unserer Studie ebenfalls keinen Einfluss auf das Alter bei Erkrankungsbeginn einer Demenz, jedoch eine klare Auswirkung auf die Zeitspanne zwischen Beginn des Parkinsonismus und der Entwicklung einer Demenz in der Demenz-Gruppe. Bereits bei

Vorhandensein eines $\epsilon 4$ -Allels zeigten *APOE4*-Träger nach Beginn des Parkinsonismus signifikant früher Demenzsymptome ($p=0.014$). Auch in der untersuchten PDD-Gruppe zeigte sich ein Trend für ein früheres Auftreten der Demenzsymptome durch das Vorhandensein beider $\epsilon 4$ -Allele von *APOE*.

Dieses Ergebnis ist vereinbar mit einer früheren Studie [139], welche ebenfalls einen früheren Beginn klinisch signifikanter kognitiver Defizite bei Nachweis von *APOE4* bei PD-Patienten fand.

Nach Betrachtung der erwähnten Studien ist es gut möglich, dass der *APOE4*-Trägerstatus das allgemeine Erkrankungsalter bei Beginn des Parkinsonismus oder Beginn der Demenz unbeeinflusst lässt, beziehungsweise je nach Zusammensetzung und Befragung der Kohorte Assoziationen gefunden werden können. Eine gewisse Disposition zur frühzeitigen Entwicklung dementieller Symptome in PDD oder DLB scheint durch *APOE4* jedoch durchaus gegeben zu sein. Auch die wahrscheinlich bedeutende geschlechtsbezogene Modifikation des *APOE4*-Effektes auf neurodegenerative Pathologien [132] könnte somit die bei uns fehlende Assoziation zum Beginn des Parkinsonismus oder der Demenz erklären.

4.1.3 Einfluss der *APOE*-SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter

APOE mit Genotyp $\epsilon 4\epsilon 4$ war in dieser Arbeit signifikant mit einem niedrigeren H&Y-Stadium assoziiert ($p=0.024$). Dies erscheint auf den ersten Blick überraschend. Insbesondere, da eine frühere Studie ein höheres H&Y-Stadium, als auch eine schlechtere Performance im UPDRS, mit einem *APOE4*-positiven Trägerstatus bei PD in Verbindung brachte [139]. Auch andere Studien fanden einen eher negativen Einfluss von *APOE4* auf die Progression motorischer Defizite bei älteren Personen [145, 146].

Es ist daher anzunehmen, dass das *APOE*-Gen hier bei LBD und Nicht-LBD verschiedene Rollen ausübt. Vorstellbar ist, dass in unserer Kohorte der Effekt durch den Einschluss von DLB-Patienten getriggert wurde. Diese zeigen oft prominente kognitive Einschränkungen und haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit *APOE4*-positiv zu sein, sind nach klinischer Erfahrung aber oft motorisch relativ mild (oder eben gar nicht) betroffen. Auch interessant

scheint hierbei, dass in unserer Studie das Vorhandensein von zwei $\epsilon 4$ -Allelen das Erkrankungsrisiko für eine Demenz signifikant zu beeinflussen vermag, und ebenso das Vorhandensein von zwei $\epsilon 4$ -Allelen sich nun kaum, bzw. eher positiv auf die motorischen Fähigkeiten auszuwirken scheint. Da die Anzahl der Probanden in dieser Gruppe (*APOE* $\epsilon 4\epsilon 4$ -Träger) allerdings sehr gering ausfiel, müsste unser signifikantes Ergebnis in größeren Kohorten auf Reproduzierbarkeit überprüft werden. Es werden also sicherlich weitere Studien benötigt, um diesbezüglich Zusammenhänge bestätigen oder widerlegen zu können.

Unter dem Aspekt der kognitiven Leistung war *APOE* mit Genotyp $\epsilon 4\epsilon 4$ signifikant mit niedrigeren MMSE-Werten assoziiert ($p=0.01$).

Diese Beobachtung wurde in einer früheren Studie bereits gefunden, wobei hier schon ein $\epsilon 4$ -Allel für die Beeinflussung der kognitiven Funktionen bei PD ausreichend sei [139].

Ein Einfluss von *APOE* auf kognitive Defizite wurde jedoch nicht nur in PD oder in AD postuliert, sondern scheint selbst in der „normalen“ Bevölkerung gegeben zu sein [139]. In einer brasilianischen Studie konnte in einer gesunden Population mithilfe des MMSE-Wertes nachgewiesen werden, dass durch die homozygote Trägerschaft $\epsilon 4\epsilon 4$ von *APOE* die Kognition innerhalb des normalen Alterungsprozesses (bei Individuen >60 Jahren) beeinflusst wird [147]. Dieses Ergebnis bestätigt Studien, welche diese Assoziation zwischen *APOE4* und der Entwicklung kognitiver Defizite (mit MMSE-Werten innerhalb kognitiv-unauffälliger Probanden) in verschiedenen Kohorten ebenso feststellen konnten [148, 149]. Die Auswirkung von *APOE4* auf eine dementielle Entwicklung bei älteren Menschen (auch ohne neurodegenerative Erkrankung), lässt durch den größeren Effekt bei Vorhandensein von zwei $\epsilon 4$ -Allelen hierbei wiederum einen Gen-Dosis-Effekt vermuten [147].

Zu der letzten klinischen Komponente, welche wir untersuchten – die Hyposmie – konnte in unserer Arbeit keine signifikante Assoziation zu den Genotypen der *APOE*-SNPs gefunden werden.

Bezüglich der genetischen Beeinflussung der Riechfunktion durch *APOE4* speziell bei PD, muss die Datenlage zunächst noch erweitert werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Es existiert bisher eine eher allgemeine

Erfahrung (ohne Assoziation zur LBD), dass die olfaktorische Funktion sowohl mit dem Alter, als v. a. auch bei $\epsilon 4$ -Trägerstatus vermehrt nachlässt [150].

Unter der zusammenfassenden Betrachtung unserer Ergebnisse, dass *APOE* mit Genotyp $\epsilon 4\epsilon 4$ sowohl mit Demenz, als auch mit dem MMSE-Wert korreliert, ist es auch in Bezug zu erwähnten Studien also sehr wahrscheinlich, dass das Risikoallel von *APOE* in unterschiedlichen Genotypen zwar die Kognition wesentlich beeinflusst, aber demgegenüber möglicherweise einen eher positiven Effekt bzw. keine Verschlechterung der motorischen Symptome mit sich bringt. V. a. wenn man beachtet, dass *APOE4* wie o. g. oftmals nicht als Prädispositionsfaktor für die Entwicklung einer PD – bei der motorische Symptome zu den wichtigen diagnostischen Kriterien gehören – angesehen wird. *APOE4* konnte somit eher in Assoziation zu PDD und DLB (also mit starker kognitiver Komponente) bestätigt werden. Innerhalb des LBD-Patientenkollektivs ist *APOE4* hierbei also überwiegend mit AD assoziierten Symptomen vergesellschaftet.

Andererseits ist es aufgrund der Tatsache, dass $\epsilon 4$ an sich schon einen Risikofaktor für eine Demenz darstellt schwer zu definieren, ob *APOE* zusätzlich speziell hinsichtlich PD das Erkrankungsrisiko an Demenz erhöht, oder ob dies lediglich der genetische Einfluss von $\epsilon 4$ allgemein auf die alternde Bevölkerung ist. Eine Erweiterung der Literatur bezüglich einer Abklärung der altersabhängigen Beeinflussung des Demenzrisikos durch *APOE4* wäre hier sinnvoll.

Die bei uns fehlende Assoziation zwischen Riechvermögen und *APOE4* soll in einer Hypothese im folgenden Abschnitt der Diskussion – zur Progression der Hyposmie – näher erläutert werden.

4.1.4 Einfluss der *APOE*-SNPs auf die Progression klinischer Parameter

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen den SNPs rs429358 und rs7412 von *APOE* und einer Progression motorischer Symptome (gemessen am H&Y-Stadium und UPDRS-III-Wert) feststellen.

Wie bereits erwähnt, existieren zahlreiche Studien über die Auswirkung von *APOE4* auf eine Demenz, jedoch nicht über eine Assoziation mit motorischen

Symptomen. Eine fehlende Progression der motorischen Belastbarkeit würde jedoch wiederum für eine hauptsächlichliche Beeinflussung der kognitiven Leistung durch *APOE4* sprechen.

Wir konnten in dieser Arbeit jedoch keinen Einfluss der *APOE*-SNPs auf die Progression dementieller Symptome (gemessen am MMSE-Wert) erheben. Andere Studien und Testverfahren zeigten hierbei eher gegenteilige Ergebnisse. Beispielsweise, dass die kognitive Leistungsminderung pro Jahr bei PD-Patienten mit *APOE4*-Trägerstatus rascher voranschritt [139]. Bei Erfassung der kognitiven Leistung von DLB-Patienten durch ein Verfahren wie „*Cambridge Assessment for Mental Disorders in the Elderly, section B*“ (CAMCOG) war *APOE4* ebenfalls stärkster Einflussfaktor auf ein besonders beschleunigtes Fortschreiten der Demenz [151]. Auch bei *APOE4*-Trägern (>65 Jahren) mit verschiedenen ethnischen Ursprüngen – jedoch ohne PD oder Demenz – konnte beispielsweise mit dem „*Short Portable Mental Status Questionnaire*“ (SPMSQ) nicht nur eine schlechtere kognitive Leistung zu Beginn der longitudinalen Studie, sondern auch eine bedeutendere Verschlechterung über 4 Jahre hinweg festgestellt werden [152]. Da jedoch meistens mehrere verschiedene Testverfahren für die kognitive Leistung verwendet wurden, ist es gut möglich, dass der MMSE-Wert in dieser Arbeit für die Erfassung einer progressiven Leistungsminderung verschiedener Gedächtnisfunktionen nicht ausreichend war.

Interessant im Zusammenhang mit der Entwicklung einer kognitiven Störung scheint auch die bei uns getestete olfaktorische Komponente der LBD.

In unserer Arbeit ergab sich ein signifikant höherer Sniffin-Wert im Verhältnis zur Krankheitsdauer (Sniffin-Wert/dd mit MW 11) bei *APOE* mit dem Genotyp $\epsilon 4\epsilon 4$ ($p=0.042$), im Vergleich zu *APOE* mit Genotypen $\epsilon 4X/XX$ (Sniffin-Wert/dd mit $MW \pm Std$ $3,1 \pm 2,73$). Allerdings konnte nur ein *APOE* $\epsilon 4\epsilon 4$ -Träger im Vergleich zu 142 *APOE* $\epsilon 4X/XX$ -Trägern in die Analyse mit eingeschlossen werden, weshalb zunächst weitere Studien mit größeren Kohortenzahlen zur Reproduzierbarkeit benötigt werden.

Nun existieren zwar keine Studien, welche einen direkten Einfluss des Genotyps auf die Progression einer olfaktorischen Störung bei PD bestätigen

oder widerlegen könnten. V. a. in Zusammenhang mit *APOE* und dessen offensichtlicher Beeinflussung kognitiver Funktionen scheint hierbei jedoch folgendes erwähnenswert: Olfaktorische Störungen konnten bei Individuen mit milder kognitiver Störung, Gedächtnisschwierigkeiten, als auch bei neurodegenerativen Störungen wie der AD, der PD, der fronto-temporalen Demenz und der DLB nachgewiesen werden [153]. Eine Schädigung des olfaktorischen Sinnessystems, insbesondere die Differenzierung und Identifizierung von Gerüchen, wurde dabei bereits in empirischen und klinischen Studien als prognostisch für einen zukünftigen kognitiven Verfall beschrieben [153].

Auch im Hinblick auf das spezifische pathologische Ausbreitungsmuster der Neuropathologie („*Braak-Staging*“) erscheint es plausibel, dass ein progressiver Verlust der Geruchsfunktion einer kognitiven Störung (wie beispielsweise auch bei Vorhandensein von *APOE4*) voraus geht. Während sich die typische Neuropathologie der LB in der präklinischen Phase der PD u. a. im anterioren olfaktorischen Kern befindet, breitet sich die Alpha-Synuklein-Pathologie anschließend progressiv im olfaktorischen System aus. Es wird vermutet, dass zuerst die peripheren Strukturen betroffen sind, während die komplexeren kortikalen Strukturen erst in einer späteren Phase, in der die PD klinisch manifest wird, beeinträchtigt werden [154].

In diesem histopathologischen Zusammenhang konnte außerdem bereits belegt werden, dass die olfaktorische Dysfunktion mit dem Genotyp *APOE4*, dem Schweregrad der Tau-Pathologie im Gehirn und mit den LB im Kortex und der Amygdala v. a. in AD, AD/LBD und LBD korreliert [155].

Wenn nun *APOE* mit entsprechendem Genotyp als Prädispositionsfaktor vorhanden ist und damit ein hohes Risiko für die Entwicklung einer neurodegenerativen Störung mit dementieller Komponente besteht, kann vermutlich schon früh eine Abnahme der Geruchsidentifizierung beobachtet werden, bevor Veränderungen in anderen Testverfahren der Demenz-Diagnostik auftreten [156]. Damit könnte ein Screening des Riechvermögens derer, welche ein erhöhtes Risiko einer Demenzentwicklung mit sich bringen – wie vermutlich bei *APOE4*-Trägerstatus – ein zeitnahes Eingreifen in die Progredienz der Gedächtnisstörungen ermöglichen. Allerdings scheint hierbei

die Verwendung verschiedener Methoden zur Messung des Riechvermögens zu erheblich unterschiedlichen und nicht übereinstimmenden Ergebnissen zu führen [153]. Auch kann die PD meistens erst dann anhand der Klinik identifiziert werden, wenn der orbito-frontale Kortex betroffen ist. Die klinische Diagnose der PD ist jedoch schwieriger zu stellen, wenn sich die Pathologie auf den olfaktorischen Bulbus und Trakt beschränkt [154]. Diese Fehlerquellen könnten auch eine Erklärung dafür sein, warum in unserer Arbeit nur eine signifikante Assoziation des *APOE* ϵ 4-Allels mit der Progression, nicht aber dem Auftreten einer Hyposmie mithilfe des Sniffin-Tests eruiert werden konnte. Die frühzeitige Diagnostik einer Hyposmie scheint für sich bereits grundlegend erschwert zu sein. Ein stetiger Verlust des Riechvermögens könnte hingegen möglicherweise eine erleichterte Beurteilung und Dokumentation zulassen.

Somit lässt sich der *APOE*-Genotyp also durchaus mit den verschiedenen pathologischen Charakteristika der LBD im olfaktorischen System und damit einem Verlust der Riechfunktion in Verbindung bringen, was jedoch gegen unser signifikantes Ergebnis sprechen würde. Um jedoch genauere Aussagen diesbezüglich treffen zu können, wird im Rahmen einer ausreichenden Anzahl an Probanden die Anwendung einheitlicher Testverfahren zur Erfassung des Riechvermögens über einen längeren Zeitraum hinweg benötigt. Denn ebenso können andere Variablen – wie Umwelteinflüsse, welche auf das olfaktorische System wirken – das Ergebnis der Sniffin-Sticks verändern. Diesbezüglich konnte bereits beobachtet werden, dass junge Erwachsene *APOE*4-Genträger, welche einer hohen Umweltbelastung ausgesetzt waren, $A\beta_{42}$ in den Neuronen des Bulbus olfactorius akkumulierten [157]. Außerdem zeigten sie Marker für oxidativen Stress, für Abnormalitäten der Mitochondrien und Dysfunktionen des Proteasomen-Systems als Zeichen einer Inflammation – alles dies sind auch Zellsysteme, welche für eine PD-Entstehung verantwortlich gemacht werden. In der genannten Studie aus Mexico City wiesen die Probanden mit *APOE* ϵ 4-Allel trotz kürzerem Aufenthalt in stark Schadstoff belasteten Gebieten eine beträchtliche Reduktion der Riechfunktion auf. Dadurch kann von einer gewissen Prädisposition für die Entwicklung von Veränderungen im

olfaktorischen System und einer Beschleunigung der Symptome bei entsprechendem *APOE*-Genotyp ausgegangen werden [157].

Es lässt sich also festhalten, dass bei uns kein Einfluss von *APOE* auf die Progression der Motorik oder der Kognition gefunden werden konnte.

Genannte Zusammenhänge der klinischen Symptome Hyposmie und Demenz (über o. g. Neuropathologie und Studien plausibel erklärbar) wurden in unserer Studie nicht untersucht. Ebenso können wir keine Aussage über die genaue zeitliche Abfolge des Auftretens der Symptome treffen. *APOE* mit Genotyp $\epsilon 4\epsilon 4$ zeigte in unserer Studie einen signifikanten Einfluss auf ein erhöhtes Erkrankungsrisiko an einer Demenz, jedoch gegenteilig auch auf eine geringere olfaktorische Komponente in der Progression. Bei der Anzahl von lediglich einem $\epsilon 4\epsilon 4$ -Träger scheint es v. a. nach geschilderten Studien bezüglich der Zusammenhänge von Kognition und Hyposmie wichtig, dieses Ergebnis erneut zu überprüfen.

4.1.5 Einfluss der *APOE*-SNPs auf biochemische Parameter

Hinsichtlich der neurodegenerativen Marker konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den SNPs rs429358 und rs7412 von *APOE* und h-Tau, p-Tau, sowie dem Quotienten p-Tau/h-Tau feststellen. In dieser Arbeit war jedoch *APOE4* mit signifikant niedrigeren $A\beta_{1-42}$ -Konzentrationen im Liquor assoziiert. Bei *APOE4*-Trägern lag der $A\beta_{1-42}$ -Spiegel im Liquor im Mittel bei 471pg/ml und damit deutlich unter der $A\beta_{1-42}$ -Konzentration von 663pg/ml bei Nicht-Trägern des *APOE* $\epsilon 4$ -Allels ($p=0.0002$).

Dies ist vereinbar mit anderen Forschungsergebnissen [158]. In der genannten Studie – mit allerdings kognitiv gesunden *APOE4*-tragenden Individuen – konnte eine lineare Abnahme der $A\beta_{1-42}$ -Konzentration im Liquor festgestellt werden. Verstärkt wurde dieser genotypische Einfluss auf die Verminderung der $A\beta_{1-42}$ -Konzentration durch ein steigendes Lebensalter. Der größte Effekt der beiden Variablen ergab sich zwischen dem 50.-60. Lebensjahr der Probanden [158]. In unserer Studie wurden die Ergebnisse nach dem Alter der Teilnehmer korrigiert, wodurch wir keine Aussage bezüglich des altersabhängigen Einflusses auf die $A\beta_{1-42}$ -Konzentration machen können. Bei der Liquor-

Untersuchung waren die Probanden der Kontrollgruppe jedoch im Mittel 59 Jahre alt und damit jünger als die Probanden der LBD-Gruppe mit im Mittel 68 Jahren. Deshalb könnte der Altersfaktor durchaus eine Rolle spielen.

Eine erniedrigte $A\beta_{1-42}$ -Konzentration im Liquor von Patienten ist als Biomarker für die AD gut untersucht. *APOE4* soll dabei die Ablagerung und Beseitigung von $A\beta$ modulieren und eine Plaque-Formation des Proteins im Gehirngewebe begünstigen. Vermutlich führt dieser Niederschlag von $A\beta$ zu einer Konzentrationsänderung des Proteins im Liquor [158].

Die LBD gehört jedoch zu den Synukleinopathien mit dem neuropathologischen Charakteristikum der LB mit Alpha-Synuklein-Einschlüssen. Es ist möglich, dass die genotypische Konstellation des gemeinsamen Prädispositionsfaktors *APOE4* die Entwicklung der LBD so beeinflusst, dass die für eine AD typischen Eigenschaften den Krankheitsverlauf dominieren, und dass in diesem Falle der $A\beta$ -assoziierte Stoffwechsel als auslösende Pathologie im Vordergrund steht. Eine Verminderung der $A\beta_{1-42}$ -Konzentration im Liquor von LBD-Patienten wäre somit durch eine überlappende AD-Amyloid-Plaque-Pathologie erklärbar. So existieren auch Studien, welche eine gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Pathologien von $A\beta$, Tau und Alpha-Synuklein in den neurodegenerativen Erkrankungen (neben AD auch DLB) und einer Entwicklung starker kognitiver Defizite beschreiben [159]. Es soll u. a. eine pathologische $A\beta$ -Deposition bei PD bzw. LBD mit Demenz zu vermehrten kortikalen Alpha-Synuklein Läsionen und damit LB führen [160].

Zusammenfassend ist es also sehr wahrscheinlich, dass $A\beta$ in Assoziation mit der in LBD beschriebenen Pathologie steht und sich damit auch die Konzentration des Markers $A\beta_{1-42}$ – v. a. bei Prädispositionsfaktoren wie *APOE* – in LBD-Patienten verändern kann. Damit würde sich auch unser Ergebnis einer niedrigeren $A\beta_{1-42}$ -Konzentration im Liquor bei *APOE4*-Trägern in diese Datenlage einreihen. Auch in Betrachtung der bei uns gefundenen Zusammenhänge mit dem Erkrankungsrisiko für eine Demenz, dem MMSE-Status und nun der Konzentration des biochemischen Markers $A\beta_{1-42}$ im Liquor, zeigt sich eine Tendenz von *APOE* – meist mit $\epsilon 4\epsilon 4$ -Genotyp – für eine kognitive Komponente der Erkrankung.

Möglicherweise könnten dann in Assoziation zur Hyposmie tatsächlich Testverfahren der olfaktorischen Funktion für eine Früherkennung einer beginnenden kognitiven Einschränkung – v. a. auch bei *APOE4*-Trägern – verwendet werden. Der biochemische Parameter $A\beta_{1-42}$ könnte dabei als Unterstützung heran gezogen werden.

4.2 *STK39*

4.2.1 Einfluss des *STK39*-SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD

In der vorliegenden Studie konnte für das SNP rs4668049 von *STK39* kein Einfluss auf das Erkrankungsrisiko an LBD eruiert werden.

Der fehlende Einfluss auf das Erkrankungsrisiko für PD ergab sich ebenfalls in einer chinesischen Studie, jedoch bei Testung eines anderen *STK39*-SNP [161].

Im Gegensatz dazu konnten in anderen Studien verschiedenster Populationen SNPs der *STK39*-Region als Risikofaktoren für die Entwicklung einer PD gefunden werden [84-88]. Allerdings handelte es sich dabei ebenfalls nicht um den in unserer Studie verwendeten SNP, wodurch unsere fehlende Assoziation erklärt werden könnte.

In unserer Studie konnte außerdem kein Zusammenhang zwischen dem *STK39*-SNP und bestimmten motorischen Subtypen der PD gefunden werden. Die momentane Datenlage ist diesbezüglich noch nicht ausreichend um vergleichbare Ergebnisse diskutieren zu können.

Ebenfalls keinen Zusammenhang fanden wir zwischen dem SNP von *STK39* und dem Erkrankungsrisiko an Demenz. Ähnlich wie bei PD allgemein, fehlt für genauere Aussagen hierzu noch eine ausführliche Studienlage.

Allgemein scheint in unserer Arbeit somit das untersuchte *STK39*-SNP weder mit den Erkrankungsrisiken für Parkinsonismus und den motorischen Subtypen der PD, noch mit der kognitiven Domäne der Erkrankung – der Demenz – assoziiert zu sein. Auch wenn Studien bereits gegenteilige Ergebnisse gefunden haben, muss nicht jeder SNP der Region um *STK39* ähnliche Funktionen ausüben, oder als hauptsächlich beeinflussender Faktor agieren.

Ob gegenseitige Einflüsse zwischen den SNPs stattfinden, oder nur bestimmte Risiko-SNPs von *STK39* Auswirkungen haben, bleibt in weiteren Nachforschungen zu untersuchen.

4.2.2 Einfluss des *STK39*-SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne

Für den Genotyp AA des *STK39*-SNPs konnte eine Tendenz für den Einfluss auf den Erkrankungsbeginn des Parkinsonismus in der vorliegenden PDD-Gruppe gefunden werden. Bei Vorhandensein des Genotyps AA zeigte sich ein im Mittel höheres Erkrankungsalter von 71 Jahren (N=5) im Vergleich zu den Genotypen AC/CC mit 64 Jahren (N=66). Ob der Trägerstatus AA wirklich zu einem eher späteren Erkrankungsbeginn des Parkinsonismus führen kann, und ob dies v. a. auch mit einer begleitenden kognitiven Komponente der Erkrankung wie bei PDD zusammenhängt, muss in weiteren Studien mit größeren Kohortenzahlen zunächst reevaluiert werden, um weitere Aussagen treffen zu können.

Es ergab sich in dieser Arbeit kein Anhalt für einen Zusammenhang des *STK39*-SNP und dem Beginn einer Demenz. Diesbezüglich ist die Datenlage noch nicht ausreichend.

Ein signifikanter Zusammenhang, sowie Tendenzen für einen Zusammenhang zeigten sich in unserer Arbeit zwischen den Genotypen AA und AC von *STK39* und der Zeitspanne zwischen Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz in der PDD- und Demenzgruppe. Dabei führte das Vorhandensein des Risikoallels A jedoch zu einer Verlängerung der Zeitspanne auf im Mittel 9 Jahre im Gegensatz zu 5 Jahren bei Genotyp CC ohne Risikoallel A ($p=0.012$). Dies würde bedeuten, dass bei Risikoallel-Trägern von *STK39* zwar möglicherweise eine Prädisposition zur PD besteht, die Entwicklung einer zusätzlichen kognitiven Symptomatik dadurch jedoch verzögert wird. Passend hierzu konnten wir Trends für einen Zusammenhang nur in der PDD-Gruppe und ein signifikantes Ergebnis in der Demenzgruppe, nicht aber in der DLB-Gruppe eruieren. Die Demenzgruppe zeigte allerdings auch entsprechend die höchste Probandenzahl.

Zusammenfassend erscheinen unsere Ergebnisse sehr interessant, da das Risikoallel A von *STK39* bei entsprechendem Genotyp einerseits zu einem späteren Beginn des Parkinsonismus führen würde und andererseits auch die dementielle Komponente, beziehungsweise Progression der PD, positiv beeinflussen würde. Um jedoch genauere Aussagen über die o. g. zeitlichen Aspekte der LBD in Bezug zu Varianten von *STK39* treffen zu können, werden weitere Studien benötigt.

4.2.3 Einfluss des *STK39*-SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter

In dieser Arbeit ergab sich kein Anhalt für einen Zusammenhang zwischen den Genotypen des *STK39*-SNPs und motorischen Symptomen der LBD.

Auch keine Assoziation ergab sich zwischen dem SNP rs4668049 von *STK39* und kognitiven Symptomen einer LBD. Die momentane Datenlage bietet keine Anhaltspunkte für vereinbare oder widerlegende Ergebnisse bezüglich Motorik und Kognition.

Innerhalb der LBD-Gruppe ergab sich ein Trend für ein vermehrtes Auftreten einer Hyposmie bei Genotyp AA von *STK39* im Gegensatz zu Trägern der Genotypen AC und CC.

Es gibt unseres Wissens zwar keine Studien, die diesen direkten Zusammenhang bei LBD bestätigen könnten, jedoch scheint *STK39*/SPAK eine Rolle im olfaktorischen System zu spielen: Der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Co-Transporter (NKCC1) wird in der Ziliarmembran olfaktorischer neuronaler Rezeptoren exprimiert und ist an der Entstehung eines Chlorid-Stroms über die Membran, und somit einer Potenzialentstehung beteiligt. Die Aktivität dieses Co-Transporters ist u. a. abhängig von der SPAK [162]. Diese Beteiligung der SPAK zeigt, dass eine Beeinflussung dieser Kinase, und damit auch deren Funktion in der Ionen-Homöostase, eventuell zu Veränderungen des Geruchssinnes führen könnte.

Diese Hypothese könnte in weiteren Studien verfolgt werden, um genauere Aussagen zu *STK39* und deren Beeinflussung von Symptomen ermöglichen zu können. Die Datenlage bezüglich *STK39* und verschiedenen Faktoren der LBD scheint momentan für weitere Diskussionen noch zu gering zu sein.

4.2.4 Einfluss des *STK39*-SNPs auf die Progression klinischer Parameter

In dieser Arbeit zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Genotypen AA und AC von *STK39* und einer Progression der motorischen Symptomatik, gemessen anhand des Punktwertes des UPDRS-III-Score ($p=0.013$). Bei Vorhandensein des Risikoallels A wies der UPDRS-III-Score (im Verhältnis zur Erkrankungsdauer betrachtet) signifikant niedrigere Werte auf, als bei Vorhandensein des Genotyps CC ohne Risikoallel A. Dies würde bedeuten, dass sich das Risikoallel A protektiv auf die Entwicklung der motorischen Symptomatik auswirken würde, womit ein positiver Einfluss auf die motorische Progression der Erkrankung resultiert.

In der verfügbaren Literatur fanden sich keine Studien, welche ähnliche Assoziationen von *STK39* und der Progression motorischer Symptome in verschiedenen Gruppen der LBD analysiert haben.

Einen Zusammenhang der SPAK mit der Aktivität des Bewegungsapparates allgemein zeigt jedoch eine Studie von Geng et al. [163]. Dort wiesen SPAK-Knockout-Mäuse eine verminderte lokomotorische Aktivität auf. Da Muskelkraft, Propriozeption und Balance unbeeinträchtigt waren und als Ursache dieser Symptome ausgeschlossen werden konnten, schien es möglich, dass das SPAK-Defizit das ZNS involviert. Als mögliches Ziel von SPAK im ZNS ergab sich hier wiederum ein Ionen-Co-Transporter (K^+ /Cl⁻-Co-Transporter; KCC2), welcher die GABA_A vermittelte Hyperpolarisation unterstützt.

Bei ubiquitärem Vorkommen der SPAK [82], dessen Beeinflussung verschiedener Ionen-Transporter und damit der Entstehung von Membranpotenzialen, erscheint es in Zusammenhang mit der Entdeckung als Risikofaktor für PD durchaus möglich, dass die unterschiedlichen Systeme (wie bei uns die motorische Progression und die Hyposmie) bei LBD durch *STK39*-SNPs beeinflusst werden können.

Allerdings konnten wir für die Progression der anderen betrachteten klinischen Parameter der LBD – Kognition und Hyposmie – wiederum keine Assoziation zum *STK39*-SNP feststellen.

Ob nun das eigentliche Risikoallel A von *STK39* protektiv gegenüber der Entwicklung verschiedener Symptome und deren Progression wirkt, und um

zusammenfassend tatsächliche spezielle klinische Assoziationen diskutieren zu können, bedarf es sicher weiterer Studien an LBD-Patienten.

4.2.5 Einfluss des *STK39*-SNPs auf biochemische Parameter

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang für das SNP rs4668049 des *STK39*-Gens und neurodegenerativen Markern im Liquor wie p-Tau, h-Tau, dessen Quotient oder A β ₁₋₄₂ festgestellt werden.

Dies ist mit den oben diskutierten Ergebnissen einer nicht einheitlichen Assoziation zu LBD, je nach untersuchtem SNP, gut vereinbar und spricht gegen einen relevanten Einfluss von *STK39* auf die A β -Pathologie bei LBD.

4.3 HLA

4.3.1 Einfluss des *HLA*-SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD

Wir konnten in dieser Arbeit keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem SNP rs3129882 von *HLA* und dem Erkrankungsrisiko für LBD finden.

Andere Studien sind mit unserem Ergebnis vereinbar, da sie den betrachteten SNP der *HLA-DRA* Region ebenfalls nicht als Risikovariante für PD replizieren konnten [86, 164, 165]. In PD Fall-Kontroll-Studien in den Vereinigten Staaten von Amerika, Irland und Polen [166] zeigte sich bei homozygoten Trägern des eigentlich postulierten Risikoallels G des *HLA*-SNP rs3129882 sogar ein erniedrigtes Risiko für eine PD. Auch in chinesischen und taiwanesischen Studien konnte keine Assoziation zwischen diesem *HLA*-SNP und PD hergestellt werden [167-169].

Im Rahmen einer GWAS [93] wird im Gegensatz dazu das *HLA*-SNP rs3129882, beziehungsweise dessen Minor-Allel G, als Risikofaktor für die PD, v. a. bei Individuen europäischen Ursprungs beschrieben [89]. Auch andere Studien konnten dieses Ergebnis für *HLA* als Risiko-Variante von PD bestätigen [94, 95], wenn auch teils andere Regionen von *HLA*, wie u. a. Allele von *HLA-DRB1* oder *HLA-DRB5* und nicht der von uns untersuchte SNP eine Assoziation zeigten [84, 90, 92, 96].

Diese unterschiedlichen Ergebnisse wurden bereits von Hamza et al. [93] vermutet, der aufgrund einer variablen Allel-Frequenz davon ausging, dass der ethnische oder geographische Ursprung einer Population einen bedeutenden Einfluss für *HLA* als Risikofaktor der PD hat. Außerdem soll ein weiterer Grund für diese gegenteiligen Ergebnisse im Unterschied der Regionen von *HLA* liegen. *HLA-DRA* und *HLA-DRB* sind eng miteinander verknüpft und kodieren für Proteinketten, welche die Antigene der Klasse II bilden. Die polymorphen „klassischen“ *HLA-DRB*-Loci kodieren dabei für eine Vielfalt von variablen Proteinen für die Antigen-Erkennung und stehen in Zusammenhang mit verschiedenen *HLA*-assoziierten Erkrankungen. *HLA-DRA* hingegen ist weitgehend monomorph und deshalb auch normalerweise nicht für Erkrankungs-Assoziationen untersucht [93, 95]. Dementsprechend könnte sich das signifikante Ergebnis zu dem SNP rs3129882 der *HLA-DRA* Region folgendermaßen erklären lassen [93]: PD soll mit einem klassisch polymorphen HLA-Antigen assoziiert sein. Das SNP rs3129882 gehört dabei allerdings vermutlich zu bestimmten Chromosomenabschnitten, den sogenannten *expression quantitative trait loci* (eQTL), welche die Gen-Expression beeinflussen können. Dadurch fungiert rs3129882 als eine regulatorische Variante, welche nachweislich mit der Expression von u. a. *HLA-DRB5* signifikant korreliert [93, 96]. Somit könnte letztendlich auch die Prädisposition für PD durch diesen SNP beeinflusst werden.

Auch bezüglich der einleitend erwähnten Rolle des Immunsystems erscheint es wahrscheinlich, dass *HLA* in Kombination mit Neuroinflammation und Neurodegeneration eine Rolle bei der PD spielt. Denn aktivierte, HLA-DR positive Mikrogliazellen konnten u. a. lokalisiert in der SN von PD-Patienten festgestellt werden [93, 97, 165, 166, 170]. Die Rolle der Entzündungsreaktion und aktivierten Mikrogliazellen in der Pathogenese der PD – u. a. auch in Beteiligung der Alpha-Synuklein-Pathologie [171, 172] – ist Bestandteil weiterer Studien und wird durch stetig neue Erkenntnisse erweitert. Dass LB die Immunantwort mit vermehrt aktivierten Gliazellen direkt provozieren, konnte jedoch noch nicht sicher bewiesen werden [173].

In unserer Arbeit ergab sich kein Zusammenhang zwischen dem *HLA*-SNP und bestimmten motorischen Subtypen der PD. Diesbezüglich muss die Datenlage noch erweitert werden.

Wir konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem *HLA*-SNP und dem Erkrankungsrisiko für die Demenz finden.

Diesbezüglich fehlen leider noch ähnliche Beobachtungen. Die diffuse Verteilung von MHC Klasse-II-positiven Mikroglia im Hippocampus von PD-Patienten – sowie speziell auch DLB-Patienten – könnte jedoch auch hier für funktionelle Veränderungen der Neurone verantwortlich und damit auch Hinweis für die Entstehung kognitiver Defizite bei PD sein [174]. Ob gerade die Trägerschaft des hier untersuchten *HLA*-SNPs dafür jedoch prädisponierend ist, muss nach Erweiterung der momentanen Datenlage reevaluiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in dem großen, komplexen Prozess der neuronalen Inflammation vermutlich sehr viele Faktoren gegenseitig beeinflussen. Ob die Immunreaktion der Mikrogliazellen nun Folge oder Ursache für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen darstellt [172] ist in einem chronisch entzündlichen Zyklus durchaus schwieriger zu eruieren. U. a. gibt es Theorien, dass der fortschreitende Verlust von Neuronen (und damit auch deren verminderte Kontrolle über die Immunüberwachung des ZNS) in einer verstärkten Immunantwort resultiert [175]. Durch diese entzündliche Reaktion mit MHC II-reaktiven Mikrogliazellen und begleitender Neurodegeneration wird wiederum oxidativer Stress in vulnerablen Regionen induziert [170] und führt zu einem sich selbst unterhaltenden Kreislauf und einer weiteren Progression der Erkrankung. Die Bedeutung eines bestimmten Genotyps von *HLA* würde dann beispielsweise im Zusammenhang der bei PD beobachteten hochregulierten Expression von u. a. HLA-DR [170] zum Tragen kommen. Die Entdeckung, dass durch regelmäßigen Konsum entzündungshemmender Medikamente (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*; NSAID) die Inzidenz der PD reduziert werden konnte [89], muss durch gegenteilige Ergebnisse [166], wiederum in Frage gestellt und weiter abgeklärt werden.

Es ist durchaus möglich, dass das *HLA-DRA*-SNP rs3129882 im Sinne des Kopplungsungleichgewichtes (LD) mit anderen Allelen der komplexen *HLA*-

Region interagiert [166], bzw. wie o. g. als eQTL Einfluss auf die Expression anderer, mit PD-assoziiierter Gene nimmt. Dadurch wird es umfangreicher, die einzelnen Lokationen und SNPs zu bestimmen, welche tatsächlich in manchen Populationen das Risiko für eine LBD, motorische Subtypen bzw. Demenz direkt oder indirekt beeinflussen. Daraus lassen sich unterschiedliche Studien-Ergebnisse auch plausibel erklären und bieten Anlass für weitere Nachforschungen.

4.3.2 Einfluss des *HLA*-SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne

Eine Tendenz für einen Zusammenhang zeigte sich zwischen dem Genotyp GG von *HLA* und dem Erkrankungsbeginn des Parkinsonismus in der DLB-Gruppe. Träger des Genotyps GG zeigten im Mittel ein jüngeres Erkrankungsalter von 56 Jahren (N=2) im Vergleich zu Trägern der Genotypen GA und AA mit 71 Jahren (N=5).

Für denselben SNP rs3129882 des *HLA*-Gens konnten andere Studien ebenfalls einen Einfluss auf den Beginn der Erkrankung, jedoch gegensätzlich ein späteres Erkrankungsalter der PD (LOPD) u. a. bei Amerikanern europäischer Abstammung, sowie bei einer chinesischen Han-Population nachweisen [89, 93, 176]. Da auch festgestellt werden konnte, dass Mikrogliazellen älterer Ratten eher dazu neigen zu proliferieren und MHC II zu exprimieren [173], scheint eine alters-abhängige Entwicklung dieses Prozesses wahrscheinlich und wäre eher vereinbar mit einer Assoziation zu einem späteren Erkrankungsbeginn von Parkinsonismus.

Da der bei uns gefundene Trend nur bei einer sehr geringen Probandenzahl in der DLB-Gruppe nachweisbar war, könnte dieses unterschiedliche Ergebnis erklärt werden. Außerdem ist es durchaus denkbar, dass die verschiedenen Untergruppen der LBD – wie hier insbesondere die DLB-Gruppe – auch differente Auswirkungen v. a. auf die zeitlichen Komponenten der Erkrankung haben. In Kohorten mit einer größeren Anzahl an Probanden scheint es also durchaus interessant, ob unser Ergebnis reproduzierbar wäre.

Es ergab sich in unserer Arbeit ebenfalls ein Trend für einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp GG von *HLA* und dem Erkrankungsbeginn der Demenz in der DLB-Gruppe. Träger des Genotyps GG waren mit 56 Jahren im Mittel jünger zum Zeitpunkt der Erkrankung an Demenz (N=2), im Vergleich zu Trägern der Genotypen GA und AA mit 71 Jahren (N=5). Explizit diese Fragestellung betreffend werden weitere Daten benötigt, um den Einfluss von *HLA* auf den Beginn einer Demenz weiter abklären zu können.

In unserer Studie zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem betrachteten *HLA*-SNP und der Zeitspanne zwischen Auftreten von Parkinsonismus und dem Beginn der Demenz. In einer post-mortem Analyse der SN von PD-Patienten konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die *HLA*-DR Expression der Mikrogliazellen zwar positiv mit der Alpha-Synuklein-Deposition, aber nicht mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung oder deren Progression korrelierte [170].

Zusammenfassend bleibt es also fraglich, ob die zeitliche Komponente bezüglich Parkinsonismus und Demenz in LBD durch *HLA* beeinflusst wird. Man könnte vermuten, dass im Rahmen funktioneller Veränderungen und der neuronalen Entzündungsreaktion v. a. ein zeitlicher Einfluss mit zunehmender Beteiligung kognitiv wichtiger Zentren durch *HLA* besteht. Die verstärkte Entzündungsreaktion könnte somit modulierend auf den Entwicklungsprozess und damit den Beginn des Parkinsonismus oder einer Demenz einwirken. Denn wenn Gene, welche mit Immunantwort und Entzündungsreaktion assoziiert sind, im Verlauf des normalen kognitiven Alterungsprozesses aktiviert werden, könnte dies zu einer Neuroinflammation führen, welche fördernd auf neurodegenerative Kaskaden und kognitive Defizite wirkt [177]. Dabei bedarf es wahrscheinlich der Überschreitung einer gewissen Grenze bis sich die Erkrankung manifestiert, wobei Proteinablagerungen (wie z. B. A β) und bestimmte Gene einen zusammenspielenden schädlichen Effekt ausüben [177]. Bezogen auf LBD wäre es dann ebenfalls nur eine Frage der Zeit, wann es durch verschiedene beeinflussende Faktoren – wie veränderter Expression von *HLA*, Ablagerungen von A β und Alpha-Synuklein – zur überschießenden Aktivierung der Immunantwort mit vermehrtem Einsatz von MHC II-positiven

Mikrogliazellen und potenzierte chronische Entzündungsreaktion mit Untergang von Neuronen und damit einer Manifestation des Parkinsonismus oder einer begleitenden Demenz kommt.

Aufgrund dieser Hypothesen müssen weitere Studien folgen, um die Auswirkungen von *HLA* auf den Beginn des Parkinsonismus und der Demenz, sowie der Zeitspanne bis zur Entwicklung einer Demenz eindeutiger betrachten zu können.

4.3.3 Einfluss des *HLA*-SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter

In der vorliegenden Studie konnte kein Einfluss des *HLA*-SNP rs3129882 auf das Auftreten klinischer Parameter, die Motorik, Kognition und Hyposmie der LBD betreffend, gefunden werden.

Eine Studie, welche unsere Ergebnisse unterstützen könnte, jedoch nicht direkt einen Zusammenhang zwischen *HLA*-Region und klinischen PD-Symptomen untersucht hat, stammt von Croisier et al. [173] mit folgenden Erkenntnissen: Dort wurde vermutet, dass PD-Fälle mit vermehrter Ablagerung von Alpha-Synuklein auch eine erhöhte Anzahl an MHC II-reaktiven Mikrogliazellen aufweist. Wie genau diese Beobachtungen miteinander verknüpft sind und ob der Verlust an Neuronen (assoziiert mit PD) tatsächlich mit dem Vorhandensein von Mikrogliazellen in Verbindung steht, ist nicht ausreichend geklärt und in der Literatur teils widersprüchlich. Wenn aktivierte Mikrogliazellen jedoch eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PD spielen, könnte somit auch eine Assoziation zu klinischen Symptomen bestehen. Von Croisier et al. [173] konnte aber keine Korrelation zwischen der Expression von MHC II-Antigenen durch Mikroglia in der SN und der Schwere klinischer Subtypen oder Symptome der PD hergestellt werden.

Um diesbezüglich eindeutigere Aussagen zur *HLA*-Region treffen zu können, müsste die momentane Datenlage mit entsprechenden Studien erweitert werden.

4.3.4 Einfluss des *HLA*-SNPs auf die Progression klinischer Parameter

Für das *HLA*-SNP rs3129882 konnte keine Assoziation zur Progression der betrachteten klinischen Parameter (Motorik, Kognition, Hyposmie) der LBD hergestellt werden.

Wie bereits o. g. betrachtet Croisier et al. [173] eine Assoziation zwischen der mikroglialen MHC II-Expression und dem Verlauf der Erkrankung als kritisch, nimmt jedoch an, dass eine funktionelle Bedeutung dieser aktivierten Mikroglia in der Progression der PD besteht. Aussagen diesbezüglich sind jedoch vorsichtig zu treffen. Es bedarf hier ebenfalls weiterer Studien, um etwaige Beteiligungen bestätigen oder widerlegen zu können. Oft genannte Assoziationen von PD mit Alpha-Synuklein-Deposition und mikroglialer MHC II-Expression würden in diesem Prozess einer sich selbst unterhaltenden Entzündung jedoch eher eine gewisse Progression vermuten lassen.

4.3.5 Einfluss des *HLA*-SNPs auf biochemische Parameter

In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem *HLA*-SNP rs3129882 und den biochemischen Markern p-Tau und h-Tau im Liquor, sowie dessen Quotient hergestellt werden. Es zeigte sich jedoch ein Trend für einen Zusammenhang zwischen den Genotypen GG und GA des SNP rs3129882 von *HLA* und der Konzentration von A β ₁₋₄₂ im Liquor. Bei Vorhandensein des Risikoallels G lag der A β ₁₋₄₂-Spiegel im Liquor im Mittel bei 620pg/ml (N=71) und damit unter der A β ₁₋₄₂-Konzentration von im Mittel 717pg/ml bei Genotyp AA (N=26) ohne Risikoallel G. Vergleichbare Studien liegen unseres Wissens dazu nicht vor. In Betrachtung des o. g. Prozesses der aktivierten Gliazellen und dessen vermuteter Assoziation zur Pathogenese der PD kann auch hier wieder folgende Feststellung genannt werden: Es erscheint möglich, dass bestimmte MHC II-Moleküle (oder deren Kombination untereinander) die humorale und zelluläre Immunantwort gegen A β ₁₋₄₂ beeinflussen [178]. Bei AD konnte bereits ein morphologischer Zusammenhang zwischen MHC II-positiven Mikroglia und den senilen A β -Plaques nachgewiesen werden: Die Gliazellen häuften sich, vermutlich als Folge der Amyloid-Ablagerungen, im Bereich kompakter A β -Plaques an [179, 180]. Eine weitere Beobachtung (zusätzlich

altersabhängig), zeigte bei Hemmung aktivierter Gliazellen eine aufgehobene Toxizität von A β (in fibrillärer Form) [181].

Diese Zusammenhänge lassen eine Assoziation von *HLA* (und damit den MHC II-tragenden reaktiven Mikrogliazellen) und einer A β -Pathologie vermuten und legen nahe, dass diese nicht nur bei AD, sondern auch im Zusammenhang anderer neurodegenerativer Störungen mit ähnlichen pathologischen Charakteristika (wie der LBD) zu finden ist. Die Pathologie und Toxizität von A β könnte dadurch möglicherweise letztendlich auch in Verbindung mit der A β ₁₋₄₂-Konzentration im Liquor stehen.

4.4 BIP

4.4.1 Einfluss des *BIP*-SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD

In unserer Arbeit wiesen die LBD-Patienten signifikant niedriger das Risikoallel A des *BIP*-SNPs mit den Genotypen AA und AG (14,3 %) auf, als die entsprechende Kontroll-Gruppe (29,4%) ($p=0.017$). Inwiefern dieser Effekt des Risikoallels A von *BIP* einzuordnen ist, bleibt für zukünftige Untersuchungen offen.

Die Literatur bietet v. a. folgend genannte Studien, welche einen Zusammenhang des Hsp70 Chaperons BiP als Regulator in LBD relevanten, neuropathologischen Prozessen wie dem ER- und Mitochondrien-UPR-Weg der Proteindegradation nachweisen konnten. Diese würden *BIP* eher als Risikovariante für LBD vermuten lassen und sollen aufgrund dessen zum Interesse weiterer Nachforschungen kurz erwähnt werden: So wird beispielsweise bezüglich familiärer Fälle neurodegenerativer Erkrankungen über Mutationen berichtet, welche die Regulator-Proteine der Proteindegradation (wozu nach bereits geschilderten Erkenntnissen auch BiP gehört) beeinflussen und damit wiederum in Verbindung mit der Inzidenz dieser Erkrankungen gebracht werden konnten [182]. Interessant dabei erscheint, dass BiP in PD-Modellen mit einer Alpha-Synuklein Überexpression direkt an Alpha-Synuklein bindet [182]. Dies zeigt eine Interaktion dieser beiden Proteine

und würde eine Beteiligung von *BIP*-Mutationen an einer LB-Entstehung unterstützen.

In einer anderen Studie [183] konnte eine verminderte Expression von BiP bei LBD zwar im Zusammenhang mit Mutationen im *GBA*-Gen (kodiert für die Glucozerebrosidase) und nicht durch eine Mutation im für das BiP-Protein kodierenden Gen *BIP* gefunden werden. Dies scheint aber auch für unsere Erkenntnisse interessant, da eine verminderte Expression von BiP bei LBD vermutlich ein häufiges Phänomen ist [183]. Andererseits scheint laut anderen Untersuchungen BiP, ebenso wie andere Signalmoleküle des ER-UPR, in anderen PD-Modellen erhöht zu sein [182]. Dies wirft die Frage auf, in welchem Zusammenhang nun eine verminderte oder vermehrte Expression von BiP steht, was Ursache und was Wirkung der Erkrankung an LBD darstellt. Der UPR-Signalweg ist offensichtlich am Prozess der Neurodegeneration beteiligt, wobei unklar bleibt, ob es durch dessen Beteiligung zur Induktion der Apoptose von Neuronen kommt oder dessen vermehrte Aktivität dem Versuch einer Gegenregulation, und somit dem Überleben der neuronalen Zellen zu Gute kommen soll [182].

Nun können Überlegungen folgen, in denen eine Mutation im *BIP*-Gen beispielsweise ebenfalls zu einer verminderten Expression von BiP führt. In diesem Fall könnten etwaige Möglichkeiten zur Gegenregulation von fehlgefalteten Protein-Aggregationen nicht mehr suffizient durchgeführt werden, und würden somit das Risiko für eine LBD erhöhen [183]. Dem zu Folge könnte die erhöhte Expression des ER-Chaperon BiP in anderen PD-Modellen Ausdruck einer Reaktion der Zellen auf die Entwicklung von ER-Stress und mitochondrialer Dysfunktion sein, beispielsweise ausgelöst durch eine Alpha-Synuklein-Überexpression [184]. Denn speziell Neurone bedürfen einer geregelten Protektion und Aufrechterhaltung ihrer Integrität, wodurch die Bedeutung der Chaperone (wie BiP) zu tragen kommt [185].

Am Beispiel von *Drosophila* konnte beispielsweise bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von Hsp70 (zu deren Familie BiP gehört) einen dopaminergen Neuronenverlust – hervorgerufen durch vermehrt anfallendes Alpha-Synuklein – verhindern kann. Eine Reduktion der Chaperone führte

umgekehrt zu einer verstärkten Alpha-Synuklein-Toxizität [185]. Die Erkenntnisse deuten also darauf hin, dass BiP vor neuronalem Zelltod schützen kann [186]. Es gibt bereits neue Therapieansätze, um die vermutete neuroprotektive Wirkung von BiP zu unterstützen und eine Elevation von endogenem BiP/GRP78 zu erreichen [105, 187]. Eine Induktion von BiP, einem entscheidenden Glied in der Kette der Stressbewältigungsmechanismen einer Zelle, könnte damit eine neuronale Schädigung verhindern [104].

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Einfluss des SNP rs430397 von *BIP* auf das Erkrankungsrisiko an bestimmten motorischen Subtypen der LBD gefunden werden. Diesbezüglich werden weitere Studien benötigt, die ähnliche Assoziationen betrachten und erforschen.

Ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zeigte sich in unserer Arbeit zwischen dem *BIP*-SNP und dem Erkrankungsrisiko für eine Demenz.

Die bereits oben beschriebene Assoziation von Parkinsonismus und *GBA*-Mutationen berichtet jedoch, dass v. a. diese PD-Fälle mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit kognitiver Einschränkungen und Demenz (im Rahmen der LBD dann überwiegend auch mit DLB) vergesellschaftet sind [183]. Da im Pathomechanismus dieser *GBA*-Mutation BiP wahrscheinlich eine Rolle spielt, könnte dies im Rückschluss einen Zusammenhang mit dem Erkrankungsrisiko für Demenz herstellen.

Bei der AD existieren ähnliche Überlegungen bezüglich der UPR-Pathologie wie oben bei der BiP-assoziierten LBD beschrieben. Es wurde festgestellt, dass eine Aggregation von A β im ER ebenfalls zur Erhöhung von UPR-Komponenten – wie u. a. BiP – führt. Dieses bindet hier APP (*Amyloid precursor protein*) und limitiert dadurch die Produktion des toxischen A β . Ein vermindertes BiP, wie z. B. bei Mutationen, welche mit familiärer AD assoziiert sind, würde somit den Überschuss und eine vermehrte Toxizität durch A β erklären, wodurch die Neurone sensitiver gegenüber ER-Stress reagieren und zur Apoptose neigen [182]. BiP ist über seine Funktion im Protein-Degradierungssystem somit anscheinend nicht nur bei der Akkumulation von Alpha-Synuklein involviert, sondern reduziert auch die Bildung von A $\beta_{40,42}$ [188]. Da laut Petrou et al. [189] eine A β -Ablagerung auch zu Demenz in PD führt, kann in diesem Zusammen-

hang ebenfalls angenommen werden, dass für BiP eine Assoziation zu kognitiver Beeinträchtigung besteht.

Zusammenfassend wäre es nach diesen Überlegungen durchaus plausibel, wenn *BIP* – entgegen unseres Ergebnisses – eine Risikovariante für die Entwicklung einer LBD darstellt. Auch hinsichtlich dessen klinischer Ausprägung und einer Demenz bleibt es interessant, ob sich diese Vermutungen in anderen Studien bestätigen oder widerlegen lassen. Durch teils gegensätzliche Feststellungen über verminderte oder vermehrte Expression von BiP bei Modellen mit LBD oder PD erscheint es momentan noch schwierig, eine klare Aussage über dessen Einfluss treffen zu können. Deshalb werden weiterhin Studien benötigt, um *BIP* eindeutig als Risikofaktor für den Parkinsonismus, oder eben als protektive Variante in Zusammenhang einer Induktion von BiP/GRP78 bezeichnen zu können.

4.4.2 Einfluss des *BIP*-SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne

In unserer Arbeit gab es keinen Anhalt für einen Zusammenhang zwischen den Genotypen des in der *BIP*-Region enthaltenen SNP rs430397 und dem Beginn des Parkinsonismus.

Studien, welche vergleichbare Ergebnisse erzielen konnten, werden noch benötigt. Wie im Falle des Erkrankungsrisikos, konnte hierzu bei Betrachtung von *GBA*-Mutationsträgern mit verminderter Expression von BiP, eine Assoziation zu einer frühen Verlaufsform von PD ermittelt werden [183]. Inwiefern die Beteiligung von BiP hier Einwirkungen auf den Erkrankungsbeginn hat ist jedoch unklar.

In unserer Arbeit konnte außerdem weder für den Beginn der Demenz noch für die Zeitspanne zwischen Auftreten von Parkinsonismus und Beginn der Demenz eine signifikante Assoziation zu dem *BIP*-SNP gefunden werden. Auch dadurch bleibt ein zeitlicher Einfluss von *BIP* fraglich, wobei in der verfügbaren Literatur dazu keine weitere Meinung eingeholt werden konnte.

4.4.3 Einfluss des *BIP*-SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter

Wir konnten in dieser Arbeit einen signifikant niedrigeren Wert von im Mittel 22 Punkten im UPDRS-III-Score für die Genotypen AA und AG des Risiko-SNPs rs430397 von *BIP* ermitteln ($p=0.049$). Im Gegensatz dazu ergab der UPDRS-III-Score bei Fehlen des Risikoallels A (Genotyp GG) von *BIP* einen Wert von im Mittel 26 Punkten, was einer schlechteren motorischen Leistung entspricht. Dies würde bedeuten, dass das Risikoallel A des *BIP*-SNP eher protektiv gegenüber der motorischen Ausprägung bei LBD agieren würde.

Den UPDRS-III-Score betreffend, muss in folgenden Studien zunächst weiter abgeklärt werden, ob die Regulierung der Proteindegradation und damit auch eine modifizierte Expression von BiP, mit dem Auftreten bzw. der Protektion gegenüber motorischen Symptomen verstärkt assoziiert ist.

Ein signifikanter Einfluss des *BIP*-SNPs auf eine kognitive Komponente der LBD konnte in dieser Arbeit nicht eruiert werden. Auch hier fehlen vergleichbare Studien um mehr Informationen über diesen Zusammenhang diskutieren zu können.

Die Hyposmie betreffend konnte wiederum eine Tendenz für einen Zusammenhang mit den Genotypen AA und AG des *BIP*-SNP gefunden werden. Bei Vorhandensein des Risikoallels A kam es somit zu einem vermehrten Auftreten einer Hyposmie, im Gegensatz zu Trägern des Genotyps GG ohne Risikoallel A von *BIP*. Weiterreichende Ergebnisse werden diesbezüglich ebenfalls benötigt, um eine Beteiligung des Geruchssinnes in Assoziation mit *BIP* genauer betrachten zu können. Da sich im olfaktorischen System schon früh im Krankheitsverlauf LB – und damit auch Alpha-Synuklein und andere Proteine vermehrt ansammeln – ist es jedoch nicht unwahrscheinlich, dass eine frühzeitige oder signifikante Hyposmie bei Patienten mit reduziertem Degradierungs- und Kontroll-System durch Mutationen im *BIP*-Gen auftritt.

4.4.4 Einfluss des *BIP*-SNPs auf die Progression klinischer Parameter

Einen Einfluss des *BIP*-SNP rs430397 auf die Progression spezifischer motorischer, kognitiver oder olfaktorischer Symptome konnte in unserer Arbeit nicht festgestellt werden.

Die anfangs geschilderte Pathologie – im Speziellen ER-Stress und oxidativer Stress – scheint an der Progression der PD beteiligt zu sein. Kim et al. [190] konnte einen durch ER-Stress induzierten Zelltod durch eine Behandlung mit IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) reduzieren. Durch IGF-1 konnte dabei wiederum eine signifikant vermehrte Expression von BiP gezeigt werden. Vermindert vorkommendes BiP könnte damit nicht nur an der Krankheitsentstehung, sondern auch an einem Progressionserhalt der Erkrankung beteiligt sein, wenn dadurch das Unterbinden der in Gang gesetzten Apoptose nicht mehr gewährleistet wäre.

Dieser hypothetische Einfluss ist jedoch zu wenig ausgeprägt, als dass er zu einem signifikanten Effekt in unserer Studie führen würde und müsste in folgenden Studien zunächst belegt werden.

4.4.5 Einfluss des *BIP*-SNPs auf biochemische Parameter

Es konnte ein Trend für einen Zusammenhang zwischen den Genotypen AA und AG des *BIP*-SNP rs430397 und der Konzentration des neurodegenerativen Markers p-Tau im Liquor gefunden. Bei Vorhandensein des Risikoallels A von *BIP* konnte eine niedrigere Konzentration von p-Tau im Liquor mit im Mittel 35pg/ml gefunden werden (N=14), im Gegensatz zu einem p-Tau-Wert von im Mittel 47pg/ml bei Genotyp GG ohne Risikoallel A (N=74).

Es gibt bereits Hinweise, dass Hitzeschock Proteine wie Hsp70 einer Tau-Akkumulation und damit Neurodegeneration entgegenwirken [191]. Allerdings wurde bei Aktivitätssteigerung der ATPase von Hsp70 eine begünstigte Akkumulation von Tau und im Gegensatz dazu bei Inhibition eine verbesserte Degradation von Tau beobachtet. Außerdem war einer der angewendeten Inhibitoren in der Lage p-Tau zu reduzieren und die Kognition in den Maus-Modellen zu verbessern [191]. Da jedoch allgemein von Hsp 70 und nicht direkt BiP die Rede ist, muss dies weiter untersucht werden.

Keinen Zusammenhang konnten wir zwischen *BIP* und den anderen neurodegenerativen Markern h-Tau, dem Quotienten p-Tau/h-Tau, sowie A β ₁₋₄₂ finden.

Damit verhält sich der *BIP*-SNP im Hinblick auf eine für Demenz u. a. verantwortliche A β -Pathologie gleichsinnig mit der in unserer Studie erfassten, nicht signifikanten Assoziation mit kognitiven Symptomen oder Demenz bei LBD. Im Gegensatz dazu stehen o. g. Studien, welche im Zuge von A β -Toxizität und kognitiver Beeinträchtigung eine Beteiligung von BiP zeigen konnten [189]. Weitere Studien werden auch hier benötigt, um den Einfluss einer Induktion oder Inhibition von BiP und direkte Zusammenhänge in LBD genauer zu untersuchen.

4.5 GAK

4.5.1 Einfluss des GAK-SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD

In unserer Arbeit konnte die Trägerschaft des Risikoallels T des GAK-SNPs rs6599388 als signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung einer LBD ermittelt werden ($p=0.041$).

SNPs in der Region von GAK konnten bereits als Risikofaktor in Assoziation mit PD, dabei interessanterweise in Bezug zu familiären Fällen der Erkrankung, identifiziert werden [118]. Mehrere Studien kaukasischer, als auch u. a. taiwanesischer oder chinesischer Populationen, konnten prädisponierende Allele für eine PD (neben familiärer PD auch die sporadische Form), innerhalb von GAK ebenfalls bestätigen [84, 88, 93, 109, 165, 168, 192, 193]. Eine starke Assoziation, v. a. des SNP rs1564282, schließt andere Loci (so auch unser SNP rs6599388) innerhalb oder um die Region von GAK als Risikofaktoren nicht aus [194]. Verschiedene kausale SNPs, als auch eine Populations-spezifische Heterogenität führen deshalb wahrscheinlich dazu, dass nicht in jeder Studie unterschiedlicher Ethnien ein Zusammenhang von GAK und PD festgestellt werden konnte [194].

Neben den o. g. allgemeinen funktionellen Aspekten der GAK, konnte speziell in Bezug auf PD eine signifikante Assoziation zwischen einem Polymorphismus

im *GAK*-Gen (rs1564282) und einer höheren *SNCA*-Expression bei einer post-mortalen Analyse des frontalen Kortex von PD-Patienten festgestellt werden [195]. Außerdem konnte in verschiedenen Modellen eine Interaktion zwischen *GAK* und Alpha-Synuklein gezeigt werden. Eine reduzierte Funktion der *GAK* führte bei einer Überexpression von Alpha-Synuklein in einer Zellkultur zu dessen erhöhter Neurotoxizität. Bei einem *in vitro* PD-Modell in den „*Primary Neurons*“ von Ratten, konnte durch die Mutation A53T-*SNCA* und einem Knockdown von *GAK*, eine verminderte Zellüberlebensfähigkeit nachgewiesen werden. Ein Knockdown der Expression von *GAK* führte also in beiden Fällen zu vermehrtem Zelltod [195].

Einen weiteren Hinweis einer interagierenden Pathologie von *GAK* und Alpha-Synuklein liefert eine Verbindung der beiden Proteine über die Aspartylproteinase Cathepsin D (*pre-cathepsin D*; CTSD). Diese ist eines der wichtigsten lysosomalen Enzyme, welches an der Alpha-Synuklein Degradierung beteiligt ist. Mutationen im *CTSD*-Gen können zu einer pathologischen Akkumulation des Proteins Alpha-Synuklein führen. Die *GAK* ist bei diesem Prozess wie folgt involviert: Die Clathrin-bindende, C-terminale Domäne der *GAK* bindet das Enzym CTSD und ist dafür verantwortlich, das Pro-Enzym (Zymogen) in die entsprechenden Clathrin-beschichteten Vesikel (CCVs) für den Transport zu den Lysosomen zu sortieren, um somit auch die Beseitigung von Alpha-Synuklein zu gewährleisten [195].

Neben diesen Mechanismen, welche über ein bestimmtes SNP von *GAK* zu einer LB-Entstehung durch Akkumulation von Alpha-Synuklein führen könnten, existieren weitere Zusammenhänge. Es könnten beispielsweise Informationen eines erhöhten Erkrankungsrisikos für PD in Zusammenhang mit *GAK* über die *spermine oxidase* (*SMOX*)-Expression in Erfahrung gebracht werden [196]. Das Enzym *SMOX* spielt eine Rolle im Polyamin Katabolismus und ist u. a. beteiligt an einer Antwort auf Medikamente, Stress und Apoptose. Außerdem ist *SMOX* ein Teil des Dopamin-Rezeptor-Signalwegs, wo es mit anderen Proteinen, u. a. MAOA (*monoamine oxidase A*) und MAOB (*monoamine oxidase B*), den MAO-Komplex bildet. Eine erhöhte Expression von *SMOX* konnte bei PD nachgewiesen werden, hat laut Dumitriu et al. [196] vermutlich einen

protektiven Effekt und wird somit als Antwort auf die biochemischen Veränderungen bei der PD benötigt. Diese Möglichkeit wurde in Betracht gezogen, da bei dem Minor-Allel eines SNP rs11731387 innerhalb von *GAK* (mit einem erhöhten Risiko für PD), eine verminderte Expression von *SMOX* nachgewiesen werden konnte. Über den Zusammenhang der beschriebenen Mechanismen und Proteine (Dopamin-Rezeptor, *SMOX*, *MAOA*, *MAOB*), welche in Verbindung mit PD stehen, könnte *GAK* also ebenfalls eine Rolle in der Entwicklung der Erkrankung spielen.

Im Gegensatz dazu konnte für diese Arbeit kein signifikanter Zusammenhang des *GAK*-SNP mit dem Erkrankungsrisiko für motorische Subtypen der PD oder einer Demenz ermittelt werden. Es werden weitere Studien diesbezüglich benötigt, um mögliche Assoziationen feststellen zu können.

Zusammenfassend scheinen verschiedene SNPs von *GAK* also ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an PD bzw. LBD mit sich zu bringen. Wobei abgeklärt werden müsste, ob die untersuchten SNPs ähnliche Funktionen beeinflussen, bevor dessen Auswirkungen gleichwertig betrachtet werden können.

Zurückgeführt auf die allgemeine Bedeutung von *GAK* als Protein-Kinase in verschiedenen Prozessen der Zelle – wie des Protein- und Transport-metabolismus – erscheint dessen Assoziation und Beteiligung an der Pathogenese der PD durchaus plausibel.

4.5.2 Einfluss des *GAK*-SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne

Ein Trend für einen Zusammenhang zeigte sich zwischen dem Auftreten der Genotypen TT und TC des *GAK*-SNPs rs6599388 und dem Beginn des Parkinsonismus. Es zeigte sich ein allerdings im Mittel nur um ein Jahr höheres Erkrankungsalter mit 60 Jahren bei Vorhandensein des Risikoallels T (N=347), im Gegensatz zu 59 Jahren bei Genotyp CC ohne Risikoallel T (N=261).

Andere Studien, welche sich allerdings auf das *GAK*-SNP rs1564282 bezogen, berichten über einen fehlenden Einfluss auf das Erkrankungsalter der PD [192]. Diese Feststellung konnte in einer weiteren chinesischen Studie bestätigt

werden, bei der ebenfalls keine Assoziation von *GAK*-SNP und EOPD oder LOPD gezeigt werden konnte [193].

In unserer Studie gab es keinen Anhalt für einen Zusammenhang zwischen *GAK* und dem Beginn einer Demenz oder der Zeitspanne zwischen dem Auftreten von Parkinsonismus und Beginn der Demenz.

Es werden allgemein weitere Studien benötigt um *GAK* im zeitlichen Kontext der LBD zu untersuchen und unseren Trend für einen Zusammenhang zum höheren Erkrankungsalter möglicherweise bestätigen oder widerlegen zu können.

4.5.3 Einfluss des *GAK*-SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter

Die Motorik betreffend konnten wir in unserer Arbeit keinen signifikanten Zusammenhang zu dem *GAK*-SNP rs6599388 herstellen.

In einer chinesischen Han-Population konnte ebenfalls kein Unterschied bezüglich klinischer Symptome oder motorischer Schweregrade (gemessen an H&Y und UPDRS) hinsichtlich des Trägerstatus eines *GAK*-SNP (rs1564282) gefunden werden [192].

Im Bereich der kognitiven Symptomatik zeigte sich eine Tendenz für einen niedrigeren MMSE-Wert mit im Mittel 27 Punkten bei den Genotypen TT und TC der *GAK* SNP-Variante (N=225), gegenüber 28 Punkten bei Genotyp CC ohne Risikoallel T (N=145).

GAK konnte zwar in zahlreichen o. g. Studien als prädisponierendes Gen für die PD entdeckt und auch mehrmals repliziert werden, im Zusammenhang mit PDD oder DLB – und somit auch einer kognitiven Komponente – fehlen jedoch weiterreichende Erkenntnisse. Außerdem konnten wir *GAK* weder mit dem Erkrankungsrisiko, noch mit dem Beginn einer Demenz in Zusammenhang bringen, was eher gegen eine eindeutige Beeinflussung der kognitiven Funktionen spricht.

Bezüglich der Hyposmie zeigte sich in unserer Arbeit kein Zusammenhang mit dem *GAK*-SNP.

4.5.4 Einfluss des *GAK*-SNPs auf die Progression klinischer Parameter

Für das *GAK*-SNP konnte keine Assoziation zur Progression der betrachteten klinischen Parameter (Motorik, Kognition, Hyposmie) hergestellt werden.

Nach unserer Analyse scheint *GAK* wenig Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung zu nehmen. Dies könnte ähnliche Ursachen haben, wie Latourelle et al. [197] über den Erkrankungsbeginn berichtet: So sollen „Major-Gene“ eher einen Einfluss auf den Beginn des Parkinsonismus oder die Penetranz haben, als Gene, welche lediglich eine Prädisposition vorgeben, zu denen vermutlich auch *GAK* gehören könnte.

4.5.5 Einfluss des *GAK*-SNPs auf biochemische Parameter

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang für das SNP rs6599388 von *GAK* und den Konzentrationen der neurodegenerativen Marker wie p-Tau, h-Tau, dessen Quotient oder A β ₁₋₄₂ festgestellt werden.

Dies ist gut damit erklärt, dass *GAK* als Protein-Kinase in Zusammenhang mit CTSD möglicherweise am Ablauf der lysosomalen Degradation von Alpha-Synuklein beteiligt ist [195] und keine direkten Hinweise zum Einfluss auf A β -Ablagerung bestehen.

4.6 *MAPT*

4.6.1 Einfluss des *MAPT*-SNPs auf Erkrankungsrisiko für LBD oder bestimmte motorische Subtypen und Demenz in LBD

Wir konnten in dieser Arbeit keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem SNP rs393152 der *MAPT*-Region und dem Erkrankungsrisiko für LBD feststellen.

Bezüglich einer Assoziation von *MAPT* und dem Erkrankungsrisiko für PD existieren v. a. in verschiedenen Populationen unterschiedliche Ergebnisse. In GWAS asiatischer Populationen konnte ebenfalls kein Einfluss auf das Erkrankungsrisiko für PD bestätigt werden [85, 128].

In anderen GWAS – v. a. in Populationen kaukasischen Ursprungs – konnten allerdings variierende SNPs in der Region von *MAPT* als häufige Risikofaktoren der PD ermittelt werden [85, 198, 199]. Darunter konnte auch ein eindeutiger

Zusammenhang zwischen dem SNP rs393152 im Bereich von *MAPT* und PD-Probanden nachgewiesen werden [128]. Besonders der Haplotyp H1 von *MAPT* soll mit PD assoziiert sein [129].

Insbesondere bei *MAPT* erscheint jedoch die genaue Bezeichnung eines spezifischen Risikogens schwierig, da sich die Region – wie bereits in der Einleitung erwähnt – über ein umfassendes invertiertes Fragment entwickelt hat. In diesem unterscheidet sich demnach der H1-Haplotyp mit einem erhöhten Risiko für PD und kognitive Defizite, von dem weniger häufigen und PD-protectiven H2-Haplotyp [200]. Außerdem befinden sich die SNPs durch die Inversion über einen sehr weiten Bereich hinweg im LD [139, 200]. U. a. aufgrund dieser, auf spezifische Vorfahren zurückzuführenden Entwicklung, kann wahrscheinlich auch eine Populations-spezifische, genetische Heterogenität der PD vermutet werden [85, 128].

Auch Latourelle et al. [200] analysierte in der hohen Komplexität der *MAPT*-Region die funktionalen Konsequenzen einer Assoziation von Risiko-SNPs mit PD. Es wurde hierbei die Modifikation von Gen-Expressionen durch u. a. das SNP rs393152 im Bereich von *MAPT* in Proben des präfrontalen Kortex von pathologisch bestätigten PD-Fällen und Kontrollen untersucht. In dieser Studie konnte zwar keine Assoziation zwischen dem SNP rs393152 und der Expression von *MAPT* selbst gefunden werden, jedoch zeigten PD-Proben mit dem „Major-Allel“ des SNP (im Fall von *MAPT* das Risikoallel für PD) eine gesteigerte Expression des Gens *DCAKD* (800kb proximal von *MAPT*), im Gegensatz zu einer verminderten Expression des Gens bei Kontroll-Proben mit dem Risiko-SNP [200]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass u. a. das Gen *DCAKD* in der Region von *MAPT* – in Zusammenhang mit u. a. dem SNP rs393152 – das Erkrankungsrisiko für PD beeinflussen kann [200]. Da hierbei jedoch weitläufige Zusammenhänge mit anderen beeinflussenden Genen vorausgesetzt werden ist es schwierig, mit unserem Ergebnis Vergleiche zu ziehen, es zu bestätigen oder zu widerlegen.

Für das Erkrankungsrisiko an bestimmten motorischen Subtypen der LBD konnten wir keinen Einfluss durch *MAPT* zeigen. Es fehlen diesbezüglich noch vergleichbare Erkenntnisse.

Wir konnten ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem *MAPT*-SNP und dem Erkrankungsrisiko einer Demenz finden.

Laut Morley et al. [139] konnten bereits mehrere Studien keinen Einfluss der *MAPT*-Varianten auf die Entwicklung einer Demenz bei PD finden.

Andererseits soll wie o. g. der H1-Haplotyp – speziell die H1/H1 Variante von *MAPT* – auch mit einem vermehrten Risiko für kognitive Störungen und der Entwicklung einer Demenz bei PD assoziiert sein [130, 201]. Eine longitudinale Studie zeigte, dass H1 nicht nur ein Risikofaktor für Demenz darstellt, sondern auch die Pathologie in post-mortem LBD-Proben beeinflusst, indem es die Transkription einer Isoform von Tau (mit 4 Mikrotubuli-bindenden Domänen; „4-repeat tau“; 4R-Tau) um 20% steigert [201]. Auch anderweitig wird durch verschiedene Varianten von *MAPT* – ebenfalls v. a. hinsichtlich des H1-Haplotyps – eine gesteigerte Expression oder eine veränderte Verarbeitung von Tau diskutiert. Dies soll wiederum einen Prozess mit vermehrtem Anfallen von Tau, sowie folgend verschiedenen pathologischen Proteinaggregationen nach sich ziehen [198, 202]. Da hierbei auch Studien mit pathologisch gesicherter PD Assoziationen zum *MAPT*-Lokus bestätigen konnten, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass eine Dysfunktion von Tau die Proteinaggregation und u. a. damit die Pathogenese der PD und den dementiellen Prozess bedeutend beeinflussen kann [202].

Durch den H1/H1-Haplotyp von *MAPT* konnte jedoch ebenfalls eine vermehrte diffuse Alpha-Synuklein-Ablagerung und eine erhöhte Anzahl an LB bei DLB gezeigt werden [203]. Dies bietet wiederum Hinweise, dass der pathologische Einfluss von *MAPT* auch über die Modifikation des Hauptmarkers der LBD – Alpha-Synuklein – bedeutend sein könnte [204].

Es bedarf also weiterer Forschungen, um den ätiologischen und damit auch pathogenetischen Einfluss von *MAPT* auf die LBD (speziell auch DLB und PDD) klären zu können. Denn allgemein erscheint es erschwert, für *MAPT* spezifische Aussagen über die prädisponierten Krankheitsrisiken und deren Zusammenhänge – wie die Relevanz von Tau-Aggregation und Alpha-Synuklein-Ablagerungen – zu treffen. Die Komplexität der Region lässt zahlreiche beeinflussende Faktoren zu. So auch beispielsweise benachbarte

Gene, welche vermutlich in Kombination u. a. an der Beeinflussung des Erkrankungsrisikos für PD beteiligt sind [118, 199, 200, 205]. Dadurch wird das Zusammenspiel der verschiedenen *MAPT*-Varianten und folgenden Pathologien zu umfangreich, um überhaupt eine klare Aussage über eine direkte Beeinflussung durch lediglich ein spezifisches SNP treffen zu können. Zudem muss bei allen genannten Ergebnissen und Assoziationen anderer Studien beachtet werden, dass es sich dabei nicht immer um das SNP rs393152 (welches wir in unserer Studie ausgewählt haben) handelte. Deshalb lässt sich diesbezüglich nur vermuten, dass die SNPs ähnliche Funktionen und damit auch vergleichbare Auswirkungen haben, wenn wir in diesem Zusammenhang eine Aussage über *MAPT* als signifikanten Risikofaktor treffen wollen.

4.6.2 Einfluss des *MAPT*-SNPs auf Beginn von Parkinsonismus und Beginn der Demenz sowie deren Zeitspanne

In dieser Arbeit ließ sich eine Tendenz für einen Zusammenhang zwischen *MAPT*-SNP und Beginn des Parkinsonismus in der DLB-Gruppe herstellen. Träger des Genotyps AA zeigten im Mittel ein höheres Erkrankungsalter mit 69 Jahren (N=16), gegenüber den Trägern der Genotypen AG und GG mit 64 Jahren (N=4).

Die Rolle von Tau bei der PD-Entstehung scheint bedeutend durch das Alter beeinflusst zu werden, da gerade bei PD-Patienten in höherem Alter der Nachweis einer Assoziation zu *MAPT* mit H1-Haplotyp am deutlichsten gezeigt werden konnte [205]. Somit könnte unser Ergebnis unterstützt werden und ein Einfluss von *MAPT* auf den Erkrankungsbeginn von Parkinsonismus scheint möglich. Jedoch existieren auch Ergebnisse, welche keinen Zusammenhang von *MAPT*-SNPs mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn von Parkinsonismus finden konnten [206]. Diese gegenteiligen Ergebnisse könnten allerdings auf der Untersuchung unterschiedlicher SNPs der *MAPT*-Region beruhen.

Bezüglich des Erkrankungsbeginns einer Demenz oder der Zeitspanne zwischen Auftreten von Parkinsonismus und Beginn der Demenz ergab sich in unserer Arbeit kein Zusammenhang mit *MAPT*.

Es existiert jedoch eine longitudinale Studie, in der *MAPT* als genetischer Risikofaktor für eine frühzeitige Entwicklung einer kognitiven Störung oder Demenz bei PD durchaus hinweisend war [130].

Inwiefern *MAPT* tatsächlich zeitliche Faktoren der Erkrankung beeinflusst, sollte daher in zukünftigen Studien weiter analysiert werden.

4.6.3 Einfluss des *MAPT*-SNPs auf das Auftreten klinischer Parameter

In unserer Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang von *MAPT* und motorischen Symptomen gefunden werden.

Es konnte jedoch hinsichtlich kognitiver Symptome ein signifikant höherer MMSE-Wert von im Mittel 27 Punkten bei den Genotypen AA und AG im Gegensatz zu im Mittel 24 Punkten bei dem Genotyp GG ohne Risikoallel A von *MAPT* gezeigt werden ($p=0.003$). Somit würde sich das Risikoallel von *MAPT* protektiv gegenüber einer kognitiven Symptomatik auswirken.

Diese Art eines protektiven Effektes konnte zwar anderweitig nicht beobachtet werden, jedoch konnte zumindest ein signifikanter Zusammenhang zwischen *MAPT* und dem Grad des kognitiven Defizits ebenfalls nicht bestätigt werden [139]. Im Vergleich zu unserer Studie erfolgte allerdings die Verwendung der *Mattis Dementia Rating Scale-2* (DRS-2) zur Einschätzung der kognitiven Performance.

Die bereits oben mehrfach erwähnte Studie von Williams-Gray et al. [201] führte die Untersuchungen bezüglich einer Demenz u. a. ebenfalls mithilfe des MMSE-Wertes durch und konnte damit gegensätzlich einen Zusammenhang von *MAPT* und der Demenzentwicklung bei PD finden. Interessanterweise fand Morley et al. [139] durch *MAPT* zumindest eine Beeinflussung der Gedächtnisfunktion im Sinne eines vermutlich vorwiegend Temporallappen-dominanten Effektes, vergleichbar mit AD.

Schlussendlich bleibt das hier beobachtete Ergebnis nicht schlüssig erklärt, und eine suffiziente Antwort würde letztendlich post-mortem Untersuchungen verlangen.

Es ergab sich in unserer Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen *MAPT* und einer Hyposmie.

Über *MAPT* als möglicherweise beeinflussenden Faktor der Tau-Pathologie wäre ein Zusammenhang jedoch durchaus denkbar. Denn in Fällen von LBD war eine Tau-Pathologie im anterioren olfaktorischen Nukleus nachweisbar und diese Pathologie korrelierte u. a. wiederum mit der Anzahl kortikaler LB [155]. Dies lässt bei Vorliegen beider pathologischer Prozesse innerhalb der LBD, den vermuteten synergistischen Effekt von Tau und Alpha-Synuklein im olfaktorischen Bulbus an Bedeutung gewinnen. Durch etwaige pathogenetische Zusammenhänge wäre dann durchaus auch eine Auswirkung auf die Geruchsfunktionen bei LBD durch *MAPT* denkbar. Es bedarf jedoch weiterer Studien, um belegbare Aussagen über Assoziationen von Hyposmie und *MAPT* zulassen zu können.

4.6.4 Einfluss des *MAPT*-SNPs auf die Progression klinischer Parameter

In der vorliegenden Studie konnte für das *MAPT*-SNP kein Einfluss auf die Progression der motorischen Symptome gefunden werden.

Durch Evans et al. [204] konnte vergleichbar ebenfalls keine Assoziation zur H&Y-Progression hergestellt werden.

Auch die Progression der kognitiven Einschränkungen betreffend, konnten wir in unserer Arbeit keinen signifikanten Zusammenhang bezüglich *MAPT* eruieren.

Bereits erwähnte Studie von Morley et al. [139] konnte weder einen signifikanten Zusammenhang zwischen *MAPT* und den zu Beginn geleisteten kognitiven Fähigkeiten, noch zum Grad der Gedächtnisleistung im Verlauf zeigen. Da hierbei jedoch mithilfe eines anderweitigen Systems zur Erfassung der kognitiven Performance (DRS-2) gearbeitet wurde, sind jene Ergebnisse mit unseren nur eingeschränkt vergleichbar.

Longitudinale Studien über mehrere Jahre, welche den Verlauf einer Erkrankung und damit v. a. auch die Progression bestimmter Symptome beurteilen können, konnten einen signifikanten Zusammenhang von *MAPT* – v. a. mit dem Haplotyp H1 – sowohl mit Demenz bei PD, als auch einem beschleunigten kognitiven Verfall (u. a. gemessen am MMSE-Wert) nachweisen [130, 201].

Dieses bei uns ausgebliebene Ergebnis könnte zum einen durch eine zu geringe regelmäßige Dokumentation bzw. eine zu geringe Zeitspanne der MMSE-Messungen im Verlauf unserer Arbeit begründet sein. Auch umfasst die bei uns analysierte gesamte LBD-Gruppe mehrere Subgruppen, im Vergleich zu einer reinen PD-Gruppe für sich.

Was die Progression der Hyposmie der LBD betrifft konnten wir keinen Einfluss von *MAPT* finden.

In Zukunft bleibt interessant, ob *MAPT* nun als protektiver oder doch als Risikofaktor – wie bei genannten Studien plausibel beschrieben – vorwiegend kognitive Aspekte der PD beeinflusst und inwiefern unser Ergebnis in dieser Reihe einzuordnen ist.

4.6.5 Einfluss des *MAPT*-SNPs auf biochemische Parameter

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang für das SNP rs393152 der *MAPT*-Region und der Konzentration der neurodegenerativen Marker p-Tau, h-Tau, dessen Quotient oder A β ₁₋₄₂ im Liquor festgestellt werden.

Obwohl durch das *MAPT*-SNP die Expression von Tau gesteigert werden soll [201], zeigte sich in unserer Studie kein entsprechendes Korrelat im Liquor. Es bedarf weiterer Studien, die *MAPT* und v. a. dessen Einfluss auf Tau und dessen Konzentration im Liquor näher betrachten.

4.7 Limitationen der Arbeit

Es existieren einige Faktoren, welche die Ergebnisse unserer Arbeit möglicherweise beeinflusst haben könnten. Hierunter fällt beispielsweise die Größe und Verteilung des Studienkollektivs. Die Gesamtgruppe/Anzahl der LBD-Patienten war groß, die genaue Zuordnung bezüglich der Subklassifizierung in u. a. PD jedoch in einer relevanten Population nicht möglich und einzelne Subgruppen damit teils recht klein, wie v. a. die dementen Untergruppen (Demenz-Gruppe, PDD, DLB). Von diesen Untergruppen wiederum, konnte nicht bei allen ein MMSE-Status erhoben oder die neurodegenerativen Marker im Liquor bestimmt werden. Aufgrund dieser zahlreichen Einordnungen und Subklassifizierungen war die Betrachtung einer

Assoziation in den einzelnen Gruppen nicht immer möglich, bzw. zeigten sich Zusammenhänge in Unter-Gruppen mit nur sehr geringer Probandenzahl.

Auch die retrospektive Erfassung des Beginns der ersten Symptome der PD wird oft subjektiv geleitet und wurde manchmal nicht in den Arztbriefen erwähnt.

Einen weiteren Kritikpunkt im Vergleich zu anderen Studien bildet der MMSE-Status als Maß für die Einteilung kognitiver Defizite. Da dieser durch zahlreiche Störfaktoren beeinflusst wird und nicht optimal die kognitiven Defizite bei LBD abbildet, heißen ihn viele für ungeeignet.

Die Hyposmie betreffend wurde lediglich die Geruchsidentifizierung überprüft und die Patienten in der Anamnese bezüglich einer Hyposmie befragt.

Auch wurde nicht die genaue Abfolge der Symptome erforscht, was wie in der Arbeit erwähnt v. a. bezüglich kognitiver Symptome und dem Geruchssinn äußerst interessant erscheint.

Ebenfalls schwierig festzustellen und zu dokumentieren erscheint die Progression der unterschiedlichen Symptome, da eine ausreichend lange Beobachtung des Krankheitsverlaufs notwendig ist. So konnte beispielsweise auch anderweitig die Progression motorischer Symptome bei behandelten Patienten als nur mäßig beschrieben werden (um ca. 2,2 Punkte jährlich nach dem UPDRS-III-Score) [204].

5 Zusammenfassung

Die LBD, als bedeutende neurodegenerative Erkrankung der alternden Bevölkerung, bleibt in ihrer Ätiologie bisher weitgehend unklar. Monogenetische Vererbungsmuster und identifizierte Gen-Varianten können lediglich Vermutungen über gewisse Zusammenhänge und Einflussfaktoren, die Neuropathologie betreffend, liefern. Es fehlen jedoch weitgehend Kenntnisse über die spezifische Beeinflussung von genetischen Varianten auf klinische und biochemische Aspekte der LBD. Für diese Arbeit lag der Schwerpunkt daher auf der Genotypisierung bereits identifizierter Risikovarianten für LBD und deren Beeinflussung des Krankheitsrisikos, des Krankheitsbeginns, bestimmter Symptome, der Krankheitsprogression und relevanter biochemischer Parameter. Aus derartigen Analysen können Hypothesen über beteiligte pathologische Mechanismen an der Krankheitsentstehung, bestimmten Symptomen und deren Progression aufgestellt werden, und für die Entwicklung von therapeutischen Interventionen bei vorliegendem Genotyp behilflich sein.

Die erwähnten Risikovarianten bzw. SNPs betreffen die Gene *APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT*.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass das Vorliegen des Risikoallels T des *GAK*-SNPs (rs6599388) sowohl im homozygoten als auch im heterozygoten Zustand ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für eine LBD darstellt. Jedoch wiesen wir im Gegensatz dazu einen höheren Anteil an Trägern mindestens eines Risikoallels A des *BIP*-SNPs (rs430397) in der Kontroll-Gruppe nach. Träger beider ϵ 4-Allele von *APOE* (rs429358, rs7412) erkrankten im Rahmen der LBD signifikant häufiger an einer Demenz. Des Weiteren präsentierte sich die Zeitspanne, nach Beginn des Parkinsonismus eine Demenz zu entwickeln, signifikant kürzer bei Vorliegen mindestens eines ϵ 4-Allels von *APOE*. Hierzu gegensätzlich erkrankten Patienten ohne Risikoallel A im *STK39*-SNP (rs4668049), also mit Genotyp CC, im Schnitt nach kürzerem LBD-Krankheitsverlauf an einer Demenz. Die Risikovariante für die Erkrankung an PD (welche bei uns allerdings nicht bestätigt werden konnte) würde demnach protektiv gegenüber einer frühen Demenzentwicklung wirken. Im Gegensatz zu

dessen Einfluss auf die Demenz, zeigten LBD-Patienten bei Vorhandensein beider $\epsilon 4$ -Allele von *APOE* weniger stark ausgeprägte motorische Symptome. Träger mit mindestens einem Risikoallel A des *BIP*-SNP zeigten ebenfalls eine geringere motorische Ausprägung der Symptome. Bezüglich dementieller Symptome zeigte sich abermals ein signifikanter Zusammenhang mit *APOE*, indem bei LBD-Patienten mit beiden $\epsilon 4$ -Allelen der MMSE-Wert deutlich niedriger ausfiel als bei anderen Genkonstellationen. Auch konnten deutlich niedrigere $A\beta_{1-42}$ -Spiegel im Liquor bei $\epsilon 4$ -Trägerstatus von *APOE* in der LBD-Gruppe festgestellt werden. Das protektive Allel des *MAPT*-SNPs (rs393152) war mit einem schlechteren MMSE-Status der LBD-Patienten assoziiert. Die eigentliche Risikovariante für die Erkrankung an PD (welche bei uns ebenfalls nicht bestätigt werden konnte) würde demnach protektiv gegenüber einem kognitiven Defizit wirken. Eine beschleunigte Progression motorischer Symptome (den UPDRS betreffend) konnte bei homozygotem Vorliegen des an sich protektiven Allels des *STK39*-SNPs, also mit Genotyp CC, gezeigt werden. Somit würde die Risikovariante für die Erkrankung an PD (welche in unserer Studie nicht belegt werden konnte) einer raschen Progression von motorischen Symptomen entgegenwirken. Ebenso zeigte sich bei Vorhandensein beider $\epsilon 4$ -Allele von *APOE* ein besserer Sniffin-Wert im Verhältnis zur Erkrankungsdauer. Unsere Ergebnisse lassen somit durchaus spezifische Einflüsse der SNPs auf klinische und laborchemische Parameter der Erkrankung erkennen. Hervorzuheben ist beispielsweise der durchweg relevante Einfluss des *APOE* $\epsilon 4$ -Allels auf LBD-assoziierte kognitive Defizite, vermutlich über Beteiligung des $A\beta$ -Stoffwechselweges, womit bereits bekannte Zusammenhänge dieser Risikovariante mit Demenz bestätigt werden. Auch deshalb sollte hier die durchaus interessante Verbindung zwischen Demenz und Hyposmie v. a. bei *APOE4* genauer verfolgt werden. Unsere Resultate zu den motorischen Symptomen und deren Progression zeigten überraschender Weise einen vorwiegend positiven Effekt der eigentlichen Risikovarianten. Das erhöhte Risiko an LBD zu erkranken, muss möglicherweise also nicht gleichzeitig bedeuten, dass die klinische Ausprägung dadurch ebenfalls negativ beeinflusst wird.

6 Anhangsverzeichnis

Agarose	Biozym LE
Aqua bidest Li Chrosolv, Wasser für Chromatographie	Merck
BigDye® Terminator V3.1 cycle sequencing	Applied Biosystems
Big Dye Puffer	Applied Biosystems
Bromphenolblau	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas
DNA-Ladder 100 bp	Fermentas
DNA-Polymerase GoTaq® 5 U/ µl	Promega, USA
Ethanol p.a.	Merck, Emsure®
Ethidiumbromid	Merck
Exonuclease I (Exo I) 20 U/µl	Fermentas
Exonuclease I-Puffer	Fermentas
Formamid	Applied Biosystems
Gene Scan-120 LIZ Size Standard	Applied Biosystems
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Promega
Natriumacetat	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
PCR-Puffer GoTaq® farblos	Promega
PCR-Puffer GoTaq® grün	Promega
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄), 85%ig	Merck
Sequenzier-Puffer	Applied Biosystems
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) 1 U/ µl	Fermentas
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (incl. ddNTPs)	Applied Biosystems
Wasser Chromanorm	VWR, Prolabo®

Anhang 1 zu Kapitel 2.2.1 auf Seite 55: Chemikalien, Enzyme und Hersteller.

Glycerol	20 ml
Bromphenolblau	0,04 ml
Xylencyanol	0,04 g

Anhang 2 zu Kapitel 2.2.2 auf Seite 55: Zusammensetzung des Bromphenolblau-markers.

TrisBase	108 g
Borat	55 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	40 ml

Anhang 3 zu Kapitel 2.2.2 auf Seite 55: Zusammensetzung des TBE-Puffers; wird mit doppelt destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Anhangsverzeichnis

cacagaggca	gcatactctc	caagtgtagc	tttctctttt	catgttcatt	3687381
attcccttgg	tgttggttat	tct caatgtc	aatcataaca	gaacatcttc	3687431
cataataaca	gtcccaattt	aaggagcatt	aagataaaag	gtggaattgc	3687481
caaggtcaat	ccagacgaga	accttctcat	agaggtaacc	accgtgtggg	3687531
tttgatgct	gggaagcagg	gggactatga	cgctacaagg	tctcagtctt	3687581
aatTTTTgga	gtacttcagt	ccccaggtat	atTTTccata	gatttggccc	3687631
ttaaataaag	agaagcttct	gactct aaaa	tgtaaacagt	gcttgttaca	3687681
gtcttgttga	tatattaaga	aattactcac	cttatctcat	ttaatcttaa	3687731
aaacaaacc	ctgacaggat	caaaaccaca	gcagggtac	ataataggaa	3687781
aactatacat	aaataggtag	aataatctgc	tcaggatcac	taggtaagtt	3687831
gctgaataag	aattcaagat	gtttttgatc	ccagagtta	aaaccaacc	3687881
tttcaaacag	cgtttctttc	ttcttagagt	acaatgttct	gagaaagaga	3687931
tcctctggaa	ttctggccta	agtgtattta	atgccc gggt	aaagaaagtg	3687981
agagaacatt	tctctttagg	ggctgctgct	ggatttctaa	aaagaaaata	3688031
atTtctcagc	tagtaacatg	gagccaaaca	acagcttcac	aagactctgg	3688081

Anhang 6 zu Kapitel 2.2.4 auf Seite 56: Auszug aus der genomischen Referenzsequenz von *HLA* (NM_019111). Hervorgehoben und schräggestellt sind die Anlagerungsstellen der PCR-Primer F und R, sowie einfach hervorgehoben die Anlagerungsstelle des SNaPshot-Primers für den SNP rs3129882.

Die Nummern stehen für die Positionsangabe, Zahlenangabe einfach durchnummeriert. Große Buchstaben stehen für Exon-Regionen, kleine Buchstaben für Intron-Regionen.

agccaagatc	acgccattgc	actccagcct	gggcaacaag	agtaaactctc	922575
cgtctcacca	aaaaaaaaag	aaaagaaaaa	agaatgtt ct	ggactgggtg	922525
agggcactgt	gaatatttgg	tactgactga	cagttgcaga	atcatgtggt	922475
acaagcaaga	ctcttggttg	caagtttcag	aaaccctccc	aggtgggctc	922425
agtggcagga	aggcccatg	tctccaaggt	gggctcagtg	gcaggggagg	922375
ccgcatgctg	gccccatgtg	tcctccgcag	ggtacacttg	agatcatttt	922325
cttttattga	aaagagtctg	gctctgtcgc	ccatgttgag	tgcagtggag	922275
cgatcacgac	tactgcagc	cttgaactcc	tgggcctacg	tgatccccct	922225
ggcctaggcc	tcccagagtg	ctgggacgac	aggcatgaga	taatgtgcc	922175
agccttagac	tgatcttaaa	agtagaccgg	gccgggcacg	acggctcacg	922125
cctgtaatcc	cagcactttg	ggaggccgag	gtgggcagat	caccgaagt	922075
caggagtctg	aaaccagcct	gaccaacatg	gcaaaacccc	atctctactg	922025
aaaatacaaa	aactagctgg	gcatggtggc	gcgtgcctgt	aatcccagct	921975
gctcaggagg	ctgaggcagg	agaatcactt	gaacctggga	ggtggaggct	921925
gcagtgagct	aagattgcac	cactgcactc	cagcctggac	gacagagcga	921875
gactctatct	caaaaaaag	tagaccctta	ggttgctgtg	gcgagccagc	921825

Anhangsverzeichnis

cttgtagccg	accctcttcc	cacataggac	ttgtgactga	gggcaccagc	921775
ctctgaagct	ccgtgctggt	ctcttggcca	tgtgactgag	ggcaccagcc	921725
tctgcagctc	tgtgctggtc	tcttagccac	cagggttctg	tcatccttgc	921675
ttctttgtac	ctctcctgga	cccagagcct	gaagtgcggt	ggctgcgctc	921625
accaggggag	gggtgcgggg	cctgcgctca	cccagggagg	gggtgcggggc	921575
agtgcagagc	gcaggtaagc	agggaggggt	gcggggcagt	gcagagcgca	921525
ggtaagcagg	gaggggtgcg	gggcagtgcg	gagggcaggt	gagcggggag	921475
gggtgcgggg	cagtgcggac	tacaggtgag	cggggagggg	tgcggggcag	921425
tgcggactgc	aggtgagccg	ggaggggtgc	ggggcagtgc	ggactgcagg	921375
tgagccggga	ggggtgcggg	gcagtgcgga	ctgcaggtga	gccgggaggg	921325
gtgcggggca	gtgc ggaccg	caggtgagcg	gggaggggtg	cggactgcag	921275
gtgagccggg	aggggtgctg	ggcagtgcgg	actgcaggtg	agcggggagg	921225
gggtgcggggc	agtgcggact	gcaggtgagc	cgggaggggt	gcggggcagt	921175
gcggactgca	ggtgagcggg	gaggggtgcg	gggcagtgcg	gactgcaggt	921125
gagccgggag	gggtgcgggg	cagtgcggac	tgcaggtgag	cggggagggg	921075
tgcggggcag	tgcggagcgc	aggtgagccg	ggaggggtgt	ggggcagtgc	921025
ggagggcagg	tgagccggga	ggggtgcggg	gcagtgcgga	ctgcaggtga	920975
gccgggaggg	gtgcggggca	gtgcggagcg	caggtgagcc	gggaggggtg	920925
tggggcagtg	cggactgcag	gtgagcgggg	aggggtgctg	ggcagtgcgg	920875
actgcaggtg	agcgggaagg	ggtgcggggc	agtgcggagc	gcaggtgagc	920825
ggggaggggt	gcggggcagt	gcggagcgtc	ggtgagccgg	gaggggtgcg	920775
gggcagtgcg	gagcgcaggt	gagcggggag	gggtgcgggg	cagtgcggag	920725
cgctggtgag	ccgggagggg	tgcggggcag	tgcggagcgc	aggtgagcgg	920675
ggtggggggg	ggtgcggggc	agtgcggagc	gcaggtgagc	tgggaggggt	920625
gcggggcagt	gcggagcgca	ggtaagcagg	gtctctgggg	cttggttagt	920575
tggttctagg	tcatcaggcc	tgtgaggccc	agattctgcc	acagagtagc	920525

Anhang 7 zu Kapitel 2.2.4 auf Seite 56: Auszug aus der genomischen Referenzsequenz von GAK (NM_005255). Hervorgehoben und schräggestellt sind die Anlagerungsstellen der PCR-Primer F und R, sowie einfach hervorgehoben die Anlagerungsstelle des SNaPshot-Primers für den SNP rs6599388. Weitere Erläuterungen sind in der Legende von Anhang 6 ausgeführt.

tccagaatct	acaatgaact	ccaacaaatt	tacaagaaaa	aaacaacccc	169092806
at caaaaagt	gggcgaagga	tat gaacaga	cacttctcaa	aagaagacat	169092756
ttatgcagcc	aaaagacaca	tgaaaaaatg	ctcatcatcg	ctggctatca	169092706
gagaaatgca	aatgaaaacc	acaatgagat	accatctcac	accagttaga	169092656
atggtgatca	ttaaaaagtc	aggaaacaac	aggtgctgga	gaggatgtgg	169092606
agaaatagga	acacttttac	actgttggtg	ggactgtaaa	ctagttcaac	169092556

Anhangsverzeichnis

cattgtggaa gtcagtgtgg cgattcctca gggatctaga actagaaata 169092506
 ccatttgacc cagccattcc attactgggt atatacccaa aggattataa 169092456
 atcattctgc tataaagaca catgcacacg tatgtttatt gtggcactat 169092406
 tcacagtagc aaagacttgg aaccaacca gatgtccaac aatgatagac 169092356
 tggattaaga aaatgtggca catatacacc atggaatact atgcagtcac 169092306
 aaaaaaggat **gagttcatgt cctttgtagg** gacatggatg aagctggaaa 169092256
 ccatcattct cagcaacta ttgcaggac aaaaaatcaa acaccgcatg 169092206
 ttctcactca taggtgggaa ttgaacaatg agaacacatg gacacaggaa 169092156
 ggggaacatc aactctggg gcctgttgtg ggggtggggg aggggggagg 169092106
 gatagcatta ggagaaatac ctaataccta atgttaaatac acgagttact 169092056
 gggcgcagca caccaacatg gcacatgtat acatatgtaa cctgcacatt 169092006
 gtacacatgt accctaaac ttaaagtata ataataatta aaaaaaaaaa 169091956
 aatcccaggc tcgtgattct gccctaattc agtattttct tccacttata 169091906
 tcacattggt tcctt**gttgg tggaaaggca gatgt**tagaa atattattga 169091856
 ctcgggccgg ccgtggtggc tcagggacgc ctgtagtccc agcacttcag 169091806

Anhang 8 zu Kapitel 2.2.4 auf Seite 56: Auszug aus der genomischen Referenzsequenz von *STK39* (NM_013233). Hervorgehoben und schräggestellt sind die Anlagerungsstellen der PCR-Primer F und R, sowie einfach hervorgehoben die Anlagerungsstelle des SNaPshot-Primers für den SNP rs4668049. Weitere Erläuterungen sind in der Legende von Anhang 6 ausgeführt.

TCTAAGTACA CCCTACTGCC TTGGAATCTG CTGAAGACCA AGCCCCTGCC 45641578
 CCCAAGCCAT GGCA**AAGAAG GAGGGAAGGA AGCAAAGGTG** CCCAGCGGGG 45641628
 ACAACTCGGG GAGGGGCGAG GTGCCCAGGG CCCAGGAAGG CCAAGCAGCA 45641678
 TGTGGCAGGG CAGCATCAGG TGACTCCCAA GAAG**GAAATGA GGAGAGGATA** 45641728
 TGAGGAAAGA GCCACAGCAC AGAGGCCTGC TGTTAGGTCA GCGGAGACCA 45641778
 CGGCCCATGG **GACCTGGATC TACCCTTGAT GCTAACAATG** TTCTTTGGGG 45641828
 AAAAAATCTA TAATCACAAA GTTTCTGCAA CTGGACTGTA GTCATGGTTG 45641878

Anhang 9 zu Kapitel 2.2.4 auf Seite 56: Auszug aus der genomischen Referenzsequenz von *MAPT* (NM_001123066). Hervorgehoben und schräggestellt sind die Anlagerungsstellen der PCR-Primer F und R, sowie einfach hervorgehoben die Anlagerungsstelle des SNaPshot-Primers für den SNP rs393152. Weitere Erläuterungen sind in der Legende von Anhang 6 ausgeführt.

Abi Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Cellstar® Tubes	Greiner bio-one, (50ml)
Combitips® plus für Multipette	Eppendorf (0,1ml; 0,2ml; 0,5ml; 1ml)
Digitales pH-Meter	Schott
Einfachpipetten	Gilson pipetman, (P2; P10; P20; P100; P200; P1000)
Einfachpipetten	Eppendorf, Research plus, (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000)

Anhangsverzeichnis

Eismaschine ZBE	Ziegra Eismaschinen
Erlenmeyer-Kolben	Schott Duran (300ml)
Erlenmeyer-Kolben	Simax, approx.vol., Czech Republic (500ml)
Falkonständer	Nalgene®
Feinwaage, Explorer® Pro	Ohaus
Frischhaltefolie	
Gefrierschrank -25°C	Liebherr Premium
Gefrierschrank -20°C	Dometic Medical Systems, MF280
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
Gelelektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH
Kühlschrank	Bosch
Kühlschrank	Dometic Medical Systems, ML 402 5°C
Latexhandschuhe	Hygrip®, Micro-touch®, Ansell
Magnetrührgerät MR3000	Heidolph Instruments
Magnetrührstäbchen	neoLab®
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research® (0,5-10µl, 10-100µl)
Mikrowellenherd	Panasonic
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, Germany
Nanodrop Spectrophotometer ND1000	Peqlab Biotechnologie GmbH
Nitrilhandschuhe Safeskin Purple Nitrile	Kimberly Clark
Parafilm®M	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago
PCR-Plattenständer	
PCR-Platten semi-skirted (96-well)	Brand GmbH+ Co KG Wertheim, Germany
PCR-Verschlussmatten (Plattensepten)	Brand GmbH+ Co KG Wertheim, Germany
Pipettenspitzen	Greiner (0,5-10µl; 2-200µl; 100-1000µl)
Pipettenspitzen	Premium Tips, Biozym (10µl; 20µl; 100µl; 200µl; 1000µl)
Platten (96-well) für Sequenzierer	Thermo Scientific
Plattensepten für Sequenzierer	Applied Biosystems
Plexiglaskämme 16well; 24well (1,5mm)	Peqlab Biotechnologie GmbH
Reaktionsgefäße, eppendorf Tubes	Eppendorf (0,5ml; 1,5ml; 2ml)
Spannungsquelle E835 (300 V - 500 mA)	Consort

Anhangsverzeichnis

Spectrafuge™ Mini Centrifuge	Labnet International, Woodbridge, NY
Stabpipetten	Costar® (5ml; 50ml)
Summit-Analysewaage	Denver Instrument, SI-234
Thermo-Cycler DNA-Engine DYAD™	Bio-Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tubes-Ständer	
UV-Tisch	Vilber Lourmat
Varispenser®	Eppendorf
Vortex Genie 2 (Model No G-560E)	Scientific Industries, Bohemia N.Y., 11716 USA
Waage Explorer®	Ohaus
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Germany
8er-Tube-Strips 0,2ml und Deckel	Peqlab Biotechnologie GmbH

Anhang 10 zu Kapitel 2.2.5 auf Seite 56: Verbrauchsmaterialien, Geräte und Hilfsmittel mit deren Hersteller.

Gene Mapper Version 3.5	Applied Biosystems
Sequencing Analysis	Applied Biosystems

Anhang 11 zu Kapitel 2.2.6 auf Seite 56: Hard- und Softwaresysteme.

7 Literaturverzeichnis

1. Lippa, CF, Duda, JE, et al. "DLB and PDD boundary issues: diagnosis, treatment, molecular pathology, and biomarkers". *Neurology*, 2007. 68(11): p. 812-9.
2. Gaig, C, Valldeoriola, F, et al. "Rapidly progressive diffuse Lewy body disease". *Mov Disord*, 2011. 26(7): p. 1316-23.
3. Bekris, LM, Mata, IF, and Zabetian, CP. "The genetics of Parkinson disease". *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 2010. 23(4): p. 228-42.
4. de Rijk, MC, Tzourio, C, et al. "Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1997. 62(1): p. 10-5.
5. Haaxma, CA, Bloem, BR, et al. "Gender differences in Parkinson's disease". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2007. 78(8): p. 819-24.
6. Smith, KM and Dahodwala, N. "Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders". *Exp Neurol*, 2014. 259: p. 44-56.
7. Eggert, K, Oertel, WH, and Reichmann, H, "Parkinson-Syndrome – Diagnostik und Therapie", in *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. 2012.
8. Fernandez, HH. "Nonmotor complications of Parkinson disease". *Cleve Clin J Med*, 2012. 79 Suppl 2: p. S14-8.
9. Aarsland, D, Andersen, K, et al. "Risk of dementia in Parkinson's disease: a community-based, prospective study". *Neurology*, 2001. 56(6): p. 730-6.
10. Sonnen, JA, Postupna, N, et al. "Pathologic correlates of dementia in individuals with Lewy body disease". *Brain Pathol*, 2010. 20(3): p. 654-9.
11. Levy, G, Tang, MX, et al. "The association of incident dementia with mortality in PD". *Neurology*, 2002. 59(11): p. 1708-13.
12. Williams-Gray, CH, Foltynie, T, et al. "Evolution of cognitive dysfunction in an incident Parkinson's disease cohort". *Brain*, 2007. 130(Pt 7): p. 1787-98.
13. Hobson, P and Meara, J. "Risk and incidence of dementia in a cohort of older subjects with Parkinson's disease in the United Kingdom". *Mov Disord*, 2004. 19(9): p. 1043-9.
14. Parker, KL, Lamichhane, D, et al. "Executive dysfunction in Parkinson's disease and timing deficits". *Front Integr Neurosci*, 2013. 7: p. 75.
15. Emre, M, Aarsland, D, et al. "Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease". *Mov Disord*, 2007. 22(12): p. 1689-707; quiz 1837.
16. Hildebrandt, H, Fink, F, et al. "Cognitive profiles of patients with mild cognitive impairment or dementia in Alzheimer's or Parkinson's disease". *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 2013. 3(1): p. 102-12.
17. Farlow, MR, Schmitt, F, et al. "Comparing clinical profiles in Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia". *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 2013. 3(1): p. 281-90.

18. Hughes, AJ, Daniel, SE, et al. "Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1992. 55(3): p. 181-4.
19. Goetz, CG, Poewe, W, et al. "Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations". *Mov Disord*, 2004. 19(9): p. 1020-8.
20. "The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations". *Mov Disord*, 2003. 18(7): p. 738-50.
21. Romanets, SR, Wolfson, C, et al. "Validation of the non-motor symptoms questionnaire (NMS-Quest)". *Parkinsonism Relat Disord*, 2012. 18(1): p. 54-8.
22. Khoo, TK, Yarnall, AJ, et al. "The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease". *Neurology*, 2013. 80(3): p. 276-81.
23. Zupancic, M, Mahajan, A, and Handa, K. "Dementia with lewy bodies: diagnosis and management for primary care providers". *Prim Care Companion CNS Disord*, 2011. 13(5).
24. Geser, F, Wenning, GK, et al. "How to diagnose dementia with Lewy bodies: state of the art". *Mov Disord*, 2005. 20 Suppl 12: p. S11-20.
25. McKeith, IG, Dickson, DW, et al. "Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium". *Neurology*, 2005. 65(12): p. 1863-72.
26. Forstl, H, Gratz, S, et al. "[Dementia with Lewy bodies and reduced dopamine transporter binding indicates significant acetylcholine deficiency]". *Dtsch Med Wochenschr*, 2008. 133 Suppl 1: p. S11-4.
27. Alexander, GE. "Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder". *Dialogues Clin Neurosci*, 2004. 6(3): p. 259-80.
28. Taipa, R, Pinho, J, and Melo-Pires, M. "Clinico-pathological correlations of the most common neurodegenerative dementias". *Front Neurol*, 2012. 3: p. 68.
29. Shults, CW. "Lewy bodies". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(6): p. 1661-8.
30. Kahle, PJ, Neumann, M, et al. "Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain". *J Neurosci*, 2000. 20(17): p. 6365-73.
31. Cabin, DE, Shimazu, K, et al. "Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein". *J Neurosci*, 2002. 22(20): p. 8797-807.
32. Schulz-Schaeffer, WJ. "The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia". *Acta Neuropathol*, 2010. 120(2): p. 131-43.
33. Braak, H, Del Tredici, K, et al. "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease". *Neurobiol Aging*, 2003. 24(2): p. 197-211.
34. Braak, H and Del Tredici, K. "[Pathophysiology of sporadic Parkinson's disease]". *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2010. 78 Suppl 1: p. S2-4.

35. Mattila, PM, Rinne, JO, et al. "Alpha-synuclein-immunoreactive cortical Lewy bodies are associated with cognitive impairment in Parkinson's disease". *Acta Neuropathol*, 2000. 100(3): p. 285-90.
36. Jellinger, KA. "A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders". *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1792(7): p. 730-40.
37. Jellinger, KA. "Morphological substrates of mental dysfunction in Lewy body disease: an update". *J Neural Transm Suppl*, 2000. 59: p. 185-212.
38. Jellinger, KA. "Significance of brain lesions in Parkinson disease dementia and Lewy body dementia". *Front Neurol Neurosci*, 2009. 24: p. 114-25.
39. Compta, Y, Parkkinen, L, et al. "Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: which is more important?". *Brain*, 2011. 134(Pt 5): p. 1493-505.
40. Cerf, E, Gustot, A, et al. "High ability of apolipoprotein E4 to stabilize amyloid-beta peptide oligomers, the pathological entities responsible for Alzheimer's disease". *FASEB J*, 2011. 25(5): p. 1585-95.
41. Heneka, MT and O'Banion, MK. "Inflammatory processes in Alzheimer's disease". *J Neuroimmunol*, 2007. 184(1-2): p. 69-91.
42. Slaets, S, Le Bastard, N, et al. "Amyloid pathology influences abeta1-42 cerebrospinal fluid levels in dementia with lewy bodies". *J Alzheimers Dis*, 2013. 35(1): p. 137-46.
43. Stefani, A, Brusa, L, et al. "CSF and clinical hallmarks of subcortical dementias: focus on DLB and PDD". *J Neural Transm*, 2012. 119(7): p. 861-75.
44. Nutu, M, Zetterberg, H, et al. "Evaluation of the cerebrospinal fluid amyloid-beta1-42/amyloid-beta1-40 ratio measured by alpha-LISA to distinguish Alzheimer's disease from other dementia disorders". *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2013. 36(1-2): p. 99-110.
45. Maetzler, W, Berg, D, et al. "Autoantibodies against amyloid and glial-derived antigens are increased in serum and cerebrospinal fluid of Lewy body-associated dementias". *J Alzheimers Dis*, 2011. 26(1): p. 171-9.
46. Jiang, Q, Lee, CY, et al. "ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta". *Neuron*, 2008. 58(5): p. 681-93.
47. Gasser, T. "Update on the genetics of Parkinson's disease". *Mov Disord*, 2007. 22 Suppl 17: p. S343-50.
48. Klein, C and Westenberger, A. "Genetics of Parkinson's disease". *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(1): p. a008888.
49. Pirkevi, C, Lesage, S, et al. "From genes to proteins in mendelian Parkinson's disease: an overview". *Anat Rec (Hoboken)*, 2009. 292(12): p. 1893-901.
50. Alcalay, RN, Mejia-Santana, H, et al. "Self-report of cognitive impairment and mini-mental state examination performance in PRKN, LRRK2, and GBA carriers with early onset Parkinson's disease". *J Clin Exp Neuropsychol*, 2010. 32(7): p. 775-9.
51. Gandhi, S and Wood, NW. "Molecular pathogenesis of Parkinson's disease". *Hum Mol Genet*, 2005. 14 Spec No. 2: p. 2749-2755.

52. Beilina, A, Van Der Brug, M, et al. "Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(16): p. 5703-8.
53. Lucking, CB, Durr, A, et al. "Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene". *N Engl J Med*, 2000. 342(21): p. 1560-7.
54. Durrenberger, PF, Grunblatt, E, et al. "Inflammatory Pathways in Parkinson's Disease; A BNE Microarray Study". *Parkinsons Dis*, 2012. 2012: p. 214714.
55. Surmeier, DJ, Guzman, JN, et al. "Physiological phenotype and vulnerability in Parkinson's disease". *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(7): p. a009290.
56. Fukui, H and Moraes, CT. "The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis?". *Trends Neurosci*, 2008. 31(5): p. 251-6.
57. Löffler, G, Petrides, PE, and Heinrich, PC, eds. "Biochemie&Pathobiochemie" S. 62-63; 113; 194-196; 247-248; 301-302; 319-322; 509-513; 1036. 8. Auflage ed. 2007, Springer Verlag Heidelberg.
58. Bueler, H. "Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease". *Exp Neurol*, 2009. 218(2): p. 235-46.
59. Ebrahimi-Fakhari, D, Wahlster, L, and McLean, PJ. "Molecular Chaperones in Parkinson's Disease - Present and Future". *J Parkinsons Dis*, 2011. 1(4): p. 299-320.
60. Marques, O and Outeiro, TF. "Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death". *Cell Death Dis*, 2012. 3: p. e350.
61. Nollen, EA and Morimoto, RI. "Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins". *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 14): p. 2809-16.
62. Cook, C and Petrucelli, L. "A critical evaluation of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease". *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1792(7): p. 664-75.
63. Bonini, NM. "Chaperoning brain degeneration". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99 Suppl 4: p. 16407-11.
64. Savitt, JM, Dawson, VL, and Dawson, TM. "Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine". *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1744-54.
65. Tansey, MG and Goldberg, MS. "Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention". *Neurobiol Dis*, 2010. 37(3): p. 510-8.
66. McGeer, PL and McGeer, EG. "Glial reactions in Parkinson's disease". *Mov Disord*, 2008. 23(4): p. 474-83.
67. Monahan, AJ, Warren, M, and Carvey, PM. "Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis". *Cell Transplant*, 2008. 17(4): p. 363-72.

68. Gao, HM, Kotzbauer, PT, et al. "Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration". *J Neurosci*, 2008. 28(30): p. 7687-98.
69. Prikrylova Vranova, H, Mares, J, et al. "CSF markers of neurodegeneration in Parkinson's disease". *J Neural Transm*, 2010. 117(10): p. 1177-81.
70. Hauser, PS, Narayanaswami, V, and Ryan, RO. "Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology". *Prog Lipid Res*, 2011. 50(1): p. 62-74.
71. Zhang, H, Wu, LM, and Wu, J. "Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines". *Mediators Inflamm*, 2011. 2011: p. 949072.
72. McKay, GJ, Silvestri, G, et al. "Variations in apolipoprotein E frequency with age in a pooled analysis of a large group of older people". *Am J Epidemiol*, 2011. 173(12): p. 1357-64.
73. Gong, JS, Kobayashi, M, et al. "Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 knock-in mice". *J Biol Chem*, 2002. 277(33): p. 29919-26.
74. Kim, J, Castellano, JM, et al. "Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance". *Neuron*, 2009. 64(5): p. 632-44.
75. Cermenati, G, Brioschi, E, et al. "Liver X receptors, nervous system, and lipid metabolism". *J Endocrinol Invest*, 2013. 36(6): p. 435-43.
76. de Lau, LM, Koudstaal, PJ, et al. "Serum cholesterol levels and the risk of Parkinson's disease". *Am J Epidemiol*, 2006. 164(10): p. 998-1002.
77. Li, J, Kanekiyo, T, et al. "Differential regulation of amyloid-beta endocytic trafficking and lysosomal degradation by apolipoprotein E isoforms". *J Biol Chem*, 2012. 287(53): p. 44593-601.
78. Lee, CY, Tse, W, et al. "Apolipoprotein E promotes beta-amyloid trafficking and degradation by modulating microglial cholesterol levels". *J Biol Chem*, 2012. 287(3): p. 2032-44.
79. Liraz, O, Boehm-Cagan, A, and Michaelson, DM. "ApoE4 induces Abeta42, tau, and neuronal pathology in the hippocampus of young targeted replacement apoE4 mice". *Mol Neurodegener*, 2013. 8: p. 16.
80. Zhu, Y, Nwabuisi-Heath, E, et al. "APOE genotype alters glial activation and loss of synaptic markers in mice". *Glia*, 2012. 60(4): p. 559-69.
81. Li, YJ, Hauser, MA, et al. "Apolipoprotein E controls the risk and age at onset of Parkinson disease". *Neurology*, 2004. 62(11): p. 2005-9.
82. Johnston, AM, Naselli, G, et al. "SPAK, a STE20/SPS1-related kinase that activates the p38 pathway". *Oncogene*, 2000. 19(37): p. 4290-7.
83. Piechotta, K, Lu, J, and Delpire, E. "Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1)". *J Biol Chem*, 2002. 277(52): p. 50812-9.
84. Nalls, MA, Plagnol, V, et al. "Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies". *Lancet*, 2011. 377(9766): p. 641-9.
85. Sharma, M, Ioannidis, JP, et al. "Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci". *Neurology*, 2012. 79(7): p. 659-67.

86. Liu, X, Cheng, R, et al. "Genome-wide association study identifies candidate genes for Parkinson's disease in an Ashkenazi Jewish population". *BMC Med Genet*, 2011. 12: p. 104.
87. Pihlstrom, L, Axelsson, G, et al. "Supportive evidence for 11 loci from genome-wide association studies in Parkinson's disease". *Neurobiol Aging*, 2013. 34(6): p. 1708 e7-13.
88. Lill, CM, Roehr, JT, et al. "Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database". *PLoS Genet*, 2012. 8(3): p. e1002548.
89. Tan, EK. "Genetic marker linking inflammation with sporadic Parkinson's disease". *Ann Acad Med Singapore*, 2011. 40(2): p. 111-2.
90. Sun, C, Wei, L, et al. "HLA-DRB1 alleles are associated with the susceptibility to sporadic Parkinson's disease in Chinese Han population". *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e48594.
91. Stevens, CH, Rowe, D, et al. "Reduced T helper and B lymphocytes in Parkinson's disease". *J Neuroimmunol*, 2012. 252(1-2): p. 95-9.
92. Saiki, M, Baker, A, et al. "Association of the human leucocyte antigen region with susceptibility to Parkinson's disease". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010. 81(8): p. 890-1.
93. Hamza, TH, Zabetian, CP, et al. "Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease". *Nat Genet*, 2010. 42(9): p. 781-5.
94. Do, CB, Tung, JY, et al. "Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease". *PLoS Genet*, 2011. 7(6): p. e1002141.
95. Hill-Burns, EM, Factor, SA, et al. "Evidence for more than one Parkinson's disease-associated variant within the HLA region". *PLoS One*, 2011. 6(11): p. e27109.
96. Wissemann, WT, Hill-Burns, EM, et al. "Association of Parkinson disease with structural and regulatory variants in the HLA region". *Am J Hum Genet*, 2013. 93(5): p. 984-93.
97. Orr, CF, Rowe, DB, et al. "A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease". *Brain*, 2005. 128(Pt 11): p. 2665-74.
98. Fiszer, U, Mix, E, et al. "Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expression on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO+ T cells in peripheral blood". *Acta Neurol Scand*, 1994. 90(3): p. 160-6.
99. Ting, J and Lee, AS. "Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation". *DNA*, 1988. 7(4): p. 275-86.
100. Wisniewska, M, Karlberg, T, et al. "Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78". *PLoS One*, 2010. 5(1): p. e8625.
101. Mayer, MP and Bukau, B. "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism". *Cell Mol Life Sci*, 2005. 62(6): p. 670-84.

102. Gething, MJ. "Role and regulation of the ER chaperone BiP". *Semin Cell Dev Biol*, 1999. 10(5): p. 465-72.
103. Bauereis, B, Haskins, WE, et al. "Proteomic insights into the protective mechanisms of an in vitro oxidative stress model of early stage Parkinson's disease". *Neurosci Lett*, 2011. 488(1): p. 11-6.
104. Oida, Y, Izuta, H, et al. "Induction of BiP, an ER-resident protein, prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil". *Brain Res*, 2008. 1208: p. 217-24.
105. Gorbatyuk, MS and Gorbatyuk, OS. "The Molecular Chaperone GRP78/BiP as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders: A Mini Review". *J Genet Syndr Gene Ther*, 2013. 4(2).
106. Gorbatyuk, MS, Shabashvili, A, et al. "Glucose regulated protein 78 diminishes alpha-synuclein neurotoxicity in a rat model of Parkinson disease". *Mol Ther*, 2012. 20(7): p. 1327-37.
107. Zhang, CX, Engqvist-Goldstein, AE, et al. "Multiple roles for cyclin G-associated kinase in clathrin-mediated sorting events". *Traffic*, 2005. 6(12): p. 1103-13.
108. Ungewickell, E, Ungewickell, H, et al. "Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles". *Nature*, 1995. 378(6557): p. 632-5.
109. Rhodes, SL, Sinsheimer, JS, et al. "Replication of GWAS associations for GAK and MAPT in Parkinson's disease". *Ann Hum Genet*, 2011. 75(2): p. 195-200.
110. Tanenbaum, ME, Vallenius, T, et al. "Cyclin G-associated kinase promotes microtubule outgrowth from chromosomes during spindle assembly". *Chromosoma*, 2010. 119(4): p. 415-24.
111. Shimizu, H, Nagamori, I, et al. "GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane traffic, also controls centrosome integrity and chromosome congression". *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 17): p. 3145-52.
112. Lee, DW, Zhao, X, et al. "Depletion of GAK/auxilin 2 inhibits receptor-mediated endocytosis and recruitment of both clathrin and clathrin adaptors". *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 18): p. 4311-21.
113. Zhang, L, Gjoerup, O, and Roberts, TM. "The serine/threonine kinase cyclin G-associated kinase regulates epidermal growth factor receptor signaling". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(28): p. 10296-301.
114. Eisenberg, E and Greene, LE. "Multiple roles of auxilin and hsc70 in clathrin-mediated endocytosis". *Traffic*, 2007. 8(6): p. 640-6.
115. Royle, SJ, Bright, NA, and Lagnado, L. "Clathrin is required for the function of the mitotic spindle". *Nature*, 2005. 434(7037): p. 1152-7.
116. Sato, J, Shimizu, H, et al. "GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane trafficking, localizes not only in the cytoplasm but also in the nucleus". *Genes Cells*, 2009. 14(5): p. 627-41.
117. Bai, T, Seebald, JL, et al. "Disruption of zebrafish cyclin G-associated kinase (GAK) function impairs the expression of Notch-dependent genes during neurogenesis and causes defects in neuronal development". *BMC Dev Biol*, 2010. 10: p. 7.
118. Pankratz, N, Wilk, JB, et al. "Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease". *Hum Genet*, 2009. 124(6): p. 593-605.

119. Caffrey, TM and Wade-Martins, R. "Functional MAPT haplotypes: bridging the gap between genotype and neuropathology". *Neurobiol Dis*, 2007. 27(1): p. 1-10.
120. Pittman, AM, Myers, AJ, et al. "Linkage disequilibrium fine mapping and haplotype association analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration". *J Med Genet*, 2005. 42(11): p. 837-46.
121. Zabetian, CP, Hutter, CM, et al. "Association analysis of MAPT H1 haplotype and subhaplotypes in Parkinson's disease". *Ann Neurol*, 2007. 62(2): p. 137-44.
122. Pittman, AM, Myers, AJ, et al. "The structure of the tau haplotype in controls and in progressive supranuclear palsy". *Hum Mol Genet*, 2004. 13(12): p. 1267-74.
123. Refenes, N, Bolbrinker, J, et al. "Role of the H1 haplotype of microtubule-associated protein tau (MAPT) gene in Greek patients with Parkinson's disease". *BMC Neurol*, 2009. 9: p. 26.
124. Jensen, PH, Hager, H, et al. "alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356". *J Biol Chem*, 1999. 274(36): p. 25481-9.
125. Qureshi, HY and Paudel, HK. "Parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and alpha-synuclein mutations promote Tau protein phosphorylation at Ser262 and destabilize microtubule cytoskeleton in vitro". *J Biol Chem*, 2011. 286(7): p. 5055-68.
126. Giasson, BI, Forman, MS, et al. "Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein". *Science*, 2003. 300(5619): p. 636-40.
127. Tobin, JE, Latourelle, JC, et al. "Haplotypes and gene expression implicate the MAPT region for Parkinson disease: the GenePD Study". *Neurology*, 2008. 71(1): p. 28-34.
128. Simon-Sanchez, J, Schulte, C, et al. "Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease". *Nat Genet*, 2009. 41(12): p. 1308-12.
129. Seto-Salvia, N, Clarimon, J, et al. "Dementia risk in Parkinson disease: disentangling the role of MAPT haplotypes". *Arch Neurol*, 2011. 68(3): p. 359-64.
130. Goris, A, Williams-Gray, CH, et al. "Tau and alpha-synuclein in susceptibility to, and dementia in, Parkinson's disease". *Ann Neurol*, 2007. 62(2): p. 145-53.
131. Maetzler, W, Liepelt, I, et al. "Cortical PIB binding in Lewy body disease is associated with Alzheimer-like characteristics". *Neurobiol Dis*, 2009. 34(1): p. 107-12.
132. Buchanan, DD, Silburn, PA, et al. "Association of APOE with Parkinson disease age-at-onset in women". *Neurosci Lett*, 2007. 411(3): p. 185-8.
133. Parsian, A, Racette, B, et al. "Parkinson's disease and apolipoprotein E: possible association with dementia but not age at onset". *Genomics*, 2002. 79(3): p. 458-61.
134. Chung, SJ, Jung, Y, et al. "Alzheimer's disease and Parkinson's disease genome-wide association study top hits and risk of Parkinson's disease in Korean population". *Neurobiol Aging*, 2013. 34(11): p. 2695 e1-7.

135. Whitehead, AS, Bertrand, S, et al. "Frequency of the apolipoprotein E epsilon 4 allele in a case-control study of early onset Parkinson's disease". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1996. 61(4): p. 347-51.
136. Williams-Gray, CH, Goris, A, et al. "Apolipoprotein E genotype as a risk factor for susceptibility to and dementia in Parkinson's disease". *J Neurol*, 2009. 256(3): p. 493-8.
137. Gao, J, Huang, X, et al. "Apolipoprotein E genotypes and the risk of Parkinson disease". *Neurobiol Aging*, 2011. 32(11): p. 2106 e1-6.
138. "Apolipoprotein E genotype in familial Parkinson's disease. The French Parkinson's Disease Genetics Study Group". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1997. 63(3): p. 394-5.
139. Morley, JF, Xie, SX, et al. "Genetic influences on cognitive decline in Parkinson's disease". *Mov Disord*, 2012. 27(4): p. 512-8.
140. Irwin, DJ, White, MT, et al. "Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia". *Ann Neurol*, 2012. 72(4): p. 587-98.
141. Tsuang, D, Leverenz, JB, et al. "APOE epsilon4 increases risk for dementia in pure synucleinopathies". *JAMA Neurol*, 2013. 70(2): p. 223-8.
142. Blazquez, L, Otaegui, D, et al. "Apolipoprotein E epsilon4 allele in familial and sporadic Parkinson's disease". *Neurosci Lett*, 2006. 406(3): p. 235-9.
143. Zarepari, S, Kaye, J, et al. "Modulation of the age at onset of Parkinson's disease by apolipoprotein E genotypes". *Ann Neurol*, 1997. 42(4): p. 655-8.
144. Pankratz, N, Byder, L, et al. "Presence of an APOE4 allele results in significantly earlier onset of Parkinson's disease and a higher risk with dementia". *Mov Disord*, 2006. 21(1): p. 45-9.
145. Melzer, D, Dik, MG, et al. "The apolipoprotein E e4 polymorphism is strongly associated with poor mobility performance test results but not self-reported limitation in older people". *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2005. 60(10): p. 1319-23.
146. Verghese, J, Holtzer, R, et al. "Role of APOE genotype in gait decline and disability in aging". *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2013. 68(11): p. 1395-401.
147. Quintino-Santos, SR, Lima-Costa, MF, et al. "Homozygosity for the APOE E4 allele is solely associated with lower cognitive performance in Brazilian community-dwelling older adults: the Bambui Study". *Rev Bras Psiquiatr*, 2012. 34(4): p. 440-5.
148. Caselli, RJ, Reiman, EM, et al. "A distinctive interaction between memory and chronic daytime somnolence in asymptomatic APOE e4 homozygotes". *Sleep*, 2002. 25(4): p. 447-53.
149. Yaffe, K, Cauley, J, et al. "Apolipoprotein E phenotype and cognitive decline in a prospective study of elderly community women". *Arch Neurol*, 1997. 54(9): p. 1110-4.
150. Green, AJ, Cervantez, M, et al. "Age and apolipoprotein E epsilon4 effects on neural correlates of odor memory". *Behav Neurosci*, 2013. 127(3): p. 339-49.

151. Ballard, C, O'Brien, J, et al. "The progression of cognitive impairment in dementia with Lewy bodies, vascular dementia and Alzheimer's disease". *Int J Geriatr Psychiatry*, 2001. 16(5): p. 499-503.
152. Fillenbaum, GG, Landerman, LR, et al. "The relationship of APOE genotype to cognitive functioning in older African-American and Caucasian community residents". *J Am Geriatr Soc*, 2001. 49(9): p. 1148-55.
153. Sohrabi, HR, Bates, KA, et al. "Olfactory discrimination predicts cognitive decline among community-dwelling older adults". *Transl Psychiatry*, 2012. 2: p. e118.
154. Hubbard, PS, Esiri, MM, et al. "Alpha-synuclein pathology in the olfactory pathways of dementia patients". *J Anat*, 2007. 211(1): p. 117-24.
155. Tsuboi, Y, Wszolek, ZK, et al. "Tau pathology in the olfactory bulb correlates with Braak stage, Lewy body pathology and apolipoprotein epsilon4". *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2003. 29(5): p. 503-10.
156. Calhoun-Haney, R and Murphy, C. "Apolipoprotein epsilon4 is associated with more rapid decline in odor identification than in odor threshold or Dementia Rating Scale scores". *Brain Cogn*, 2005. 58(2): p. 178-82.
157. Calderon-Garciduenas, L, Franco-Lira, M, et al. "Urban air pollution: influences on olfactory function and pathology in exposed children and young adults". *Exp Toxicol Pathol*, 2010. 62(1): p. 91-102.
158. Peskind, ER, Li, G, et al. "Age and apolipoprotein E*4 allele effects on cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 in adults with normal cognition". *Arch Neurol*, 2006. 63(7): p. 936-9.
159. Clinton, LK, Blurton-Jones, M, et al. "Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline". *J Neurosci*, 2010. 30(21): p. 7281-9.
160. Pletnikova, O, West, N, et al. "Abeta deposition is associated with enhanced cortical alpha-synuclein lesions in Lewy body diseases". *Neurobiol Aging*, 2005. 26(8): p. 1183-92.
161. Li, NN, Tan, EK, et al. "Genetic Association Study between STK39 and CCDC62/HIP1R and Parkinson's Disease". *PLoS One*, 2013. 8(11): p. e79211.
162. Hengl, T, Kaneko, H, et al. "Molecular components of signal amplification in olfactory sensory cilia". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(13): p. 6052-7.
163. Geng, Y, Byun, N, and Delpire, E. "Behavioral analysis of Ste20 kinase SPAK knockout mice". *Behav Brain Res*, 2010. 208(2): p. 377-82.
164. Ahmed, I, Tamouza, R, et al. "Association between Parkinson's disease and the HLA-DRB1 locus". *Mov Disord*, 2012. 27(9): p. 1104-10.
165. Simon-Sanchez, J, van Hilten, JJ, et al. "Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch". *Eur J Hum Genet*, 2011. 19(6): p. 655-61.
166. Puschmann, A, Verbeeck, C, et al. "Human leukocyte antigen variation and Parkinson's disease". *Parkinsonism Relat Disord*, 2011. 17(5): p. 376-8.

167. Chiang, HL, Lee-Chen, GJ, et al. "Genetic analysis of HLA-DRA region variation in Taiwanese Parkinson's disease". *Parkinsonism Relat Disord*, 2012. 18(4): p. 391-3.
168. Lin, CH, Chen, ML, et al. "Reaffirmation of GAK, but not HLA-DRA, as a Parkinson's disease susceptibility gene in a Taiwanese population". *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2013.
169. Zhao, Y, Gopalai, A, et al. "Association of HLA locus variant in Parkinson's disease". *Clin Genet*, 2013. 84(5): p. 501-4.
170. Sanchez-Guajardo, V, Barnum, CJ, et al. "Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to alpha-synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity". *ASN Neuro*, 2013. 5(2): p. 113-39.
171. Gao, HM, Zhang, F, et al. "Neuroinflammation and alpha-synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease". *Environ Health Perspect*, 2011. 119(6): p. 807-14.
172. McGeer, PL and McGeer, EG. "History of innate immunity in neurodegenerative disorders". *Front Pharmacol*, 2011. 2: p. 77.
173. Croisier, E, Moran, LB, et al. "Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition". *J Neuroinflammation*, 2005. 2: p. 14.
174. Imamura, K, Hishikawa, N, et al. "Cytokine production of activated microglia and decrease in neurotrophic factors of neurons in the hippocampus of Lewy body disease brains". *Acta Neuropathol*, 2005. 109(2): p. 141-50.
175. Szpak, GM, Lechowicz, W, et al. "Neurons and microglia in central nervous system immune response to degenerative processes. Part 1: Alzheimer's disease and Lewy body variant of Alzheimer's disease. Quantitative study". *Folia Neuropathol*, 2001. 39(3): p. 181-92.
176. Guo, Y, Deng, X, et al. "HLA rs3129882 variant in Chinese Han patients with late-onset sporadic Parkinson disease". *Neurosci Lett*, 2011. 501(3): p. 185-7.
177. Cribbs, DH, Berchtold, NC, et al. "Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study". *J Neuroinflammation*, 2012. 9: p. 179.
178. Das, P, Chapoval, S, et al. "Immune responses against Abeta1-42 in HLA class II transgenic mice: implications for Abeta1-42 immune-mediated therapies". *Neurobiol Aging*, 2003. 24(7): p. 969-76.
179. Perlmutter, LS, Scott, SA, et al. "MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions". *J Neurosci Res*, 1992. 33(4): p. 549-58.
180. Itagaki, S, McGeer, PL, et al. "Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease". *J Neuroimmunol*, 1989. 24(3): p. 173-82.
181. Leung, E, Guo, L, et al. "Microglia activation mediates fibrillar amyloid-beta toxicity in the aged primate cortex". *Neurobiol Aging*, 2011. 32(3): p. 387-97.

182. Bernales, S, Soto, MM, and McCullagh, E. "Unfolded protein stress in the endoplasmic reticulum and mitochondria: a role in neurodegeneration". *Front Aging Neurosci*, 2012. 4: p. 5.
183. Kurzawa-Akanbi, M, Hanson, PS, et al. "Glucocerebrosidase mutations alter the endoplasmic reticulum and lysosomes in Lewy body disease". *J Neurochem*, 2012. 123(2): p. 298-309.
184. Colla, E, Coune, P, et al. "Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo". *J Neurosci*, 2012. 32(10): p. 3306-20.
185. Ali, YO, Kitay, BM, and Zhai, RG. "Dealing with misfolded proteins: examining the neuroprotective role of molecular chaperones in neurodegeneration". *Molecules*, 2010. 15(10): p. 6859-87.
186. Wang, M, Ye, R, et al. "Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis". *Cell Death Differ*, 2010. 17(3): p. 488-98.
187. Kudo, T, Kanemoto, S, et al. "A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress". *Cell Death Differ*, 2008. 15(2): p. 364-75.
188. Yang, Y, Turner, RS, and Gaut, JR. "The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Abeta40 and Abeta42 secretion". *J Biol Chem*, 1998. 273(40): p. 25552-5.
189. Petrou, M, Bohnen, NI, et al. "Abeta-amyloid deposition in patients with Parkinson disease at risk for development of dementia". *Neurology*, 2012. 79(11): p. 1161-7.
190. Kim, Y, Li, E, and Park, S. "Insulin-like growth factor-1 inhibits 6-hydroxydopamine-mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via regulation of heme oxygenase-1 and Nrf2 expression in PC12 cells". *Int J Neurosci*, 2012. 122(11): p. 641-9.
191. Miyata, Y, Koren, J, et al. "Molecular chaperones and regulation of tau quality control: strategies for drug discovery in tauopathies". *Future Med Chem*, 2011. 3(12): p. 1523-37.
192. Li, NN, Chang, XL, et al. "GWAS-linked GAK locus in Parkinson's disease in Han Chinese and meta-analysis". *Hum Genet*, 2012. 131(7): p. 1089-93.
193. Chen, YP, Song, W, et al. "GAK rs1564282 and DGKQ rs11248060 increase the risk for Parkinson's disease in a Chinese population". *J Clin Neurosci*, 2013. 20(6): p. 880-3.
194. Tseng, WE, Chen, CM, et al. "Genetic variations of GAK in two Chinese Parkinson's disease populations: a case-control study". *PLoS One*, 2013. 8(6): p. e67506.
195. Dumitriu, A, Pacheco, CD, et al. "Cyclin-G-associated kinase modifies alpha-synuclein expression levels and toxicity in Parkinson's disease: results from the GenePD Study". *Hum Mol Genet*, 2011. 20(8): p. 1478-87.
196. Dumitriu, A, Latourelle, JC, et al. "Gene expression profiles in Parkinson disease prefrontal cortex implicate FOXO1 and genes under its transcriptional regulation". *PLoS Genet*, 2012. 8(6): p. e1002794.
197. Latourelle, JC, Pankratz, N, et al. "Genomewide association study for onset age in Parkinson disease". *BMC Med Genet*, 2009. 10: p. 98.

198. Edwards, TL, Scott, WK, et al. "Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease". *Ann Hum Genet*, 2010. 74(2): p. 97-109.
199. Spencer, CC, Plagnol, V, et al. "Dissection of the genetics of Parkinson's disease identifies an additional association 5' of SNCA and multiple associated haplotypes at 17q21". *Hum Mol Genet*, 2011. 20(2): p. 345-53.
200. Latourelle, JC, Dumitriu, A, et al. "Evaluation of Parkinson disease risk variants as expression-QTLs". *PLoS One*, 2012. 7(10): p. e46199.
201. Williams-Gray, CH, Evans, JR, et al. "The distinct cognitive syndromes of Parkinson's disease: 5 year follow-up of the CamPaIGN cohort". *Brain*, 2009. 132(Pt 11): p. 2958-69.
202. Charlesworth, G, Gandhi, S, et al. "Tau acts as an independent genetic risk factor in pathologically proven PD". *Neurobiol Aging*, 2012. 33(4): p. 838 e7-11.
203. Colom-Cadena, M, Gelpi, E, et al. "MAPT H1 haplotype is associated with enhanced alpha-synuclein deposition in dementia with Lewy bodies". *Neurobiol Aging*, 2013. 34(3): p. 936-42.
204. Evans, JR, Mason, SL, et al. "The natural history of treated Parkinson's disease in an incident, community based cohort". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2011. 82(10): p. 1112-8.
205. Skipper, L, Wilkes, K, et al. "Linkage disequilibrium and association of MAPT H1 in Parkinson disease". *Am J Hum Genet*, 2004. 75(4): p. 669-77.
206. Elbaz, A, Ross, OA, et al. "Independent and joint effects of the MAPT and SNCA genes in Parkinson disease". *Ann Neurol*, 2011. 69(5): p. 778-92.
207. Stirnkorb, JG, "Amyloid-beta-assoziierte Stoffwechselwege und kognitive Einschränkungen bei Lewykörper-Erkrankungen: Ein genetisch-klinisch-biochemischer Ansatz." Medizinische Dissertationsschrift. 2013: Universität Tübingen.
208. Maetzler, W, Apel, A, et al. "Comparable autoantibody serum levels against amyloid- and inflammation-associated proteins in Parkinson's disease patients and controls". *PLoS One*, 2014. 9(2): p. e88604.

Erklärung zum Eigenanteil

Im Rahmen einer Riskpanel-Studie für LBD der Abteilung für neurodegenerative Erkrankungen des Universitätsklinikums und des Hertie-Instituts in Tübingen – mit insgesamt 3789 Proben und 44 SNPs – handelt es sich bei dieser Arbeit um ein Teilprojekt.

Für die Hauptstudie wurde die Genotypisierung im Helmholtz-Institut in München durchgeführt. Die SNPs wurden somit je nach ausgewählter, optimaler methodischer Variante teilweise in München mit dem MALDI-TOF Verfahren (Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation, Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator; *matrix assisted laser desorption/ionization time of flight*) genotypisiert, teilweise im Rahmen der SNaPshot-Reaktion im Hertie-Institut in Tübingen bearbeitet. Die Nachbearbeitung und Auswertung erfolgte jeweils im Hertie-Institut in Tübingen.

In diesem Teilprojekt wurde mit 567 Proben gearbeitet. Durch einleitend geschilderte Beobachtungen bezüglich der Zusammenhänge der Gene/Proteine mit PD/LBD, wurde innerhalb der bereits genotypisierten, sowie der noch zu bearbeitenden SNPs eine Auswahl bezüglich der in dieser Arbeit beschriebenen SNPs getätigt. Dabei wurde aus Interesse der klinischen, demographischen und biochemischen Zusammenhänge auch auf das SNP *APOE* zurückgegriffen, welches im Rahmen eines anderen Teilprojektes, der Dissertation von Johannes Georg Stirnkorb [207], ebenfalls bereits genotypisiert und in anderem Kontext analysiert wurde.

Aufgrund dessen differieren die in der Fragestellung definierten und folgend analysierten und diskutierten SNPs (*APOE*, *STK39*, *HLA*, *BIP*, *GAK* und *MAPT*), teils von den 10 SNPs (*MAPT-H1C*, *LRRK2*, *SNCA*, *HLA*, *MAPT*, *PDXK*, *PITX3*, *LINGO1*, *GAK*, *STK39*), welche in eigener Arbeit genotypisiert wurden. Eine Auswahl der eigens genotypisierten SNPs wurde wiederum in einem anderen Teilprojekt der Riskpanel-Studie verwendet, u. a. hinsichtlich der retrospektiv erfassten klinischen Daten analysiert und publiziert [208]. In der genannten Publikation wurden keine relevanten Daten veröffentlicht, die sich mit dieser Doktorarbeit überschneiden.

Methoden und Assays gehörten zum Standard der Arbeitsgruppe „Neurodegeneration“ und konnten nach Einarbeitung durch Frau Ann-Kathrin Hauser weitgehend selbstständig durchgeführt werden. Die Qualität der Arbeit und die Auswertung wurden während allen Arbeitsschritten kontrolliert.

Arbeit der Promovendin Sarah Selina Dilger innerhalb dieses Teilprojektes:

Die eigene Arbeit im Rahmen dieses Teilprojektes bestand somit in der Genotypisierung von 10 SNPs (*MAPT-H1C*, *LRRK2*, *SNCA*, *HLA*, *MAPT*, *PDXK*, *PITX3*, *LINGO1*, *GAK*, *STK39*) der 567 Proben nach dem in Kapitel 2.4 beschriebenen Versuchsablauf.

Außerdem erfolgte in Arbeitsteilung mit weiteren Mitarbeitern der Abteilung für Neurologie der Universität Tübingen innerhalb der Riskpanel-Studie eine retrospektive Erfassung wichtiger klinischer Daten der teilnehmenden Patienten anhand von Arztbriefen.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von Frau Dipl. Biol. Claudia Schulte am Hertie-Institut Tübingen.

Herr Prof. Dr. Walter Maetzler war an der Konzeption des Teilprojektes innerhalb der Riskpanel-Studie beteiligt, er hat die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Daniela Berg für die Möglichkeit und das entgegengebrachte Vertrauen, diese Dissertationsschrift verfassen zu dürfen. Danke hierbei auch für die Bereitstellung der Materialien.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Walter Maetzler, der als mein Betreuer und Doktorvater maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Vielen herzlichen Dank für die Unterstützung, Anregung und anhaltende Motivation, sowie das zügige und gründliche Korrekturlesen.

Des Weiteren danke ich Frau Dipl. Biol. Claudia Schulte ganz herzlich für die statistische Arbeit, ihre Hilfe und Unterstützung bei Fragen und Unklarheiten. Bei Frau Ann-Kathrin Hauser (MTA) möchte ich mich bedanken für die Einführung und Unterstützung während der Laborarbeit und der Hilfestellung bei den Experimenten.

Herrn Prof. Dr. Thomas Gasser danke ich ebenfalls für die Bereitstellung der Materialien, Geräte und Räumlichkeiten.

Frau Dr. Inga Liepelt und Herrn Heiko Huber sei herzlich für die Hilfe bei der Erfassung und Zusammenstellung der klinischen Daten gedankt.

Außerdem danke ich allen Kollegen und Kolleginnen der Universitätsklinik Tübingen, sowie der Arbeitsgruppe des Hertie-Instituts, welche zur Datenerhebung innerhalb der Studie beigetragen haben.

Mein ausdrücklicher Dank gilt allen Teilnehmern dieser Studie. Nur durch ihre Mithilfe konnte die Basis zur Gewinnung neuer Erkenntnisse geschaffen werden.

Zuletzt ganz lieben Dank an Tobias, für die mentale Unterstützung, den Zusammenhalt und die Hilfe bei Problemlösungen während dieser Arbeit. Von Herzen danke ich meiner Familie und besonders meinen lieben Eltern für den Beistand und den bedingungslosen Rückhalt während dieser Zeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name und Vorname(n)	Sarah Selina Dilger
Geburtsdatum	03.11.1986
Geburtsort	Nürtingen
Nationalität	deutsch

Schulbildung

1993 – 1997	Friedrich-Glück-Schule Oberensingen
1997 – 2006	Max-Planck-Gymnasium Nürtingen
	Abschluss: Allgemeine Fachhochschulreife

Universitäre Ausbildung

10/2006 – 03/2007	Studium für das Lehramt an Gymnasien in Deutsch und Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10/2007 – 09/2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
10/2009 – 11/2013	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
08/09/2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/11/2013	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2013	Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

seit 02/2014	Assistenzärztin der Inneren Medizin, Klinikum am Steinberg Reutlingen
--------------	---

Famulaturen

03/2010	Famulatur Gynäkologie, Klinikum Nürtingen
08/2010	Famulatur Dermatologie, Praxis Dr. med. Kamenz, Senden
09/2010 – 10/2010	Famulatur Neurologie, Universitätsklinikum Ulm
08/2011	Famulatur Innere Medizin, Tri-Service General Hospital, Taipeh, Taiwan
02/2012 – 03/2012	Famulatur Pädiatrie, Praxis Dres. med. Suder/Wenk/Dörr, Tübingen

Lebenslauf

Praktisches Jahr

08/2012 – 10/2012	St. Thomas' Hospital London, King's College London, England (Tertial Chirurgie)
10/2012 – 12/2012	Royal Melbourne Hospital, University of Melbourne, Australien (Tertial Chirurgie)
12/2012 – 06/2013	Klinikum am Steinenberg Reutlingen, Wahlfach Anästhesie

Kusterdingen-Wankheim, im März 2015