View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Philipps-Universität Marburg

Aus der Klinik für Neurologie

Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Timmermann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Die Genetik des Lipidstoffwechsels als Risikofaktor für kognitive Defizite bei der Parkinson-Krankheit

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Charlotte Söling

aus Göttingen

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 19.03.20

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. R. Dodel

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. B. Straube

Inhaltsverzeichnis

I. Verzeichnisse 1

I.I Abkürzungsverzeichnis 1

I.II Abbildungsverzeichnis 5

I.III Tabellenverzeichnis 5

1. Einleitung 6

1.1 Epidemiologie der Parkinson-Krankheit 6

1.2 Klinik der Parkinson-Krankheit 6

1.3 Ätiologie und Pathogenese der Parkinson-Krankheit 8

1.4 Kognitive Dysfunktion und Demenz bei der Parkinson-Krankheit 9

1.4.1 Diagnostik der PDD 10

1.4.2 Diagnostik der PD-MCI 13

1.5 Genetische Variabilität und Pathogenität 14

1.6 Histopathologie und Genetik der PDD 15

1.6.1 Histopathologie der PDD 15

1.6.2 Genetik der PDD 16

1.7 Der Cholesterinmetabolismus bei neurodegenerativen Erkrankungen 17

1.8 Zur Genetik ausgewählter Cholesterin-Transportproteine 20

1.8.1 Apolipoprotein E 20

1.8.2 Apolipoprotein A1 21

1.8.3 Apolipoprotein J 22

1.8.4 ABCA1 23

1.8.5 VLDLR 24

1.9 Fragestellung 25

2. Material und Methoden 27

2.1 Material 27

2.2 Methoden 30

2.2.1 Konzentrationsmessung mit dem NanoDrop 30

2.2.2 *Primer*-Design 30

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion 31
2.2.4 Gelelektrophorese 34
2.2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte 34
2.2.6 Sequenzierung 35
2.2.7 Patientenkollektiv 36
2.2.8 Ethikvotum 37
2.2.9 Statistik 41
3. Ergebnisse 42
4. Diskussion 51
4.1 Apolipoprotein A1 51
4.2 Apolipoprotein E 51
4.3 Apolipoprotein J 53
4.4 ABCA1 55
4.5 Fazit 57
4.6 Ausblick 58
5. Deutsche und Englische Zusammenfassung 60
5.1 Deutsche Zusammenfassung 60
5.2 Englische Zusammenfassung (Summary) 62
6. Literaturverzeichnis 63
7. Anhang 85
7.1 Publikationen 85
7.2 Liste der akademischen Lehrer 85
7.3 Danksagung 86

I. Verzeichnisse

I.I Abkürzungsverzeichnis

24S-OHC	24S-Hydroxycholesterin
27-OHC	27-Hydroxycholesterin
Abb.	Abbildung
ABCA1	Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1
ADL	Activities of Daily Living
aMCI	Amnestic Mild Cognitive Impairment
APOA1	Apolipoprotein A1
APOD	Apolipoprotein D
APOE	Apolipoprotein E
APOJ	Apolipoprotein J
APP	Amyloid-Precursor-Protein
ATP	Adenosine Triphosphate
ATP13A2	Probable Cation-transporting Adenosine Triphosphatase 13A2
Aβ	Amyloid-β
BACE1	β-site of Amyloid-Precursor-Protein Cleaving Enzyme
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
CH24H	Cholesterol-24-Hydroxylase
CH25H	Cholesterol-25-Hydroxylase
CLU	Clusterin
CNV	Copy Number Variation
ddNTP	Didesoxyribonukleotid

DJ-1	Protein Deglycase 1
DLB	Dementia with Lewy Bodies
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EOAD	Early-Onset Alzheimer's Disease
et al.	Et alii/et aliae
EUR	Europäische Normalbevölkerung
e.V.	Eingetragener Verein
GWAS	Genome-wide Association Study
H&Y	Hoehn und Yahr
HD	Huntington’s Disease
HDL	High-Density Lipoprotein
Hg.	Herausgeber
IBM	International Business Machines Corporation
IDL	Intermediate-Density Lipoprotein
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low-Density Lipoprotein
LDLR	Low-Density-Lipoprotein Receptor
L-Dopa	Levodopa
LOAD	Late-Onset Alzheimer's Disease
LRP1	Low-Density Lipoprotein-related Protein 1

LRRK2	Leucine-rich Repeat Kinase 2
MAF	Minor Allele Frequency
MCI	Mild Cognitive Impairment
MDS	Movement Disorder Society
MMST	Mini-Mental-Status-Test
MRT	Magnetresonanztomographie
NFT	Neurofibrillary Tangle
PARK2	Parkin 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Parkinson's Disease
PDD	Parkinson‘s Disease Dementia
PD-MCI	Parkinson's Disease – Mild Cognitive Impairment
PDNC	Parkinson's Disease with Normal Cognition
PiB	Pittsburgh Compound B
PINK1	Phosphatase and Tensin Homolog-induced Putative Kinase 1
PSEN1	Presenilin-1
PSEN2	Presenilin-2
p-tau	Phosphorylated tau
RELN	Reelin
SD	Standard Deviation
SNCA	Synuclein Alpha
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPARE-AD	Spatial Pattern of Abnormalities for Recognition of Early Alzheimer's Disease
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

Tab.	Tabelle
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-tau	Total tau
UKBB	United Kingdom Parkinson’s Disease Society Brain Bank
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein
VLDLR	Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

I.II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Exemplarische Gelbilder aller Exone…….. 44

Abb. 2: Darstellung der Einzelnukleotid-Polymorphismen bei exemplarischen Sequenzen……..... 48

I.III Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung der Stadien bei der Parkinson-Krankheit nach der Hoehn und Yahr Skala (Goetz et al. 2004)…….. 7

Tab. 2: Orientierende Schweregradeinteilung am Beispiel der Alzheimer-Demenz anhand des Mini Mental Status Tests (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), S3-Leitlinie "Demenzen" 2016)…..... 10

Tab. 3: Liste der Geräte und Anlagen…..... 27

Tab. 4: Verwendete Materialien für die Polymerase-Kettenreaktion…… 28

Tab. 5: Verwendete Materialien für die Gelelektrophorese..... 28

Tab. 6: Verwendeter Kit……..... 28

Tab. 7: Verwendete *Primer* von Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland..... 29

Tab. 8: Beispielhafte Zusammensetzung für einen 25 µl Mastermix..... 31

Tab. 9: Übersicht über die PCR-Protokolle. 33

Tab. 10: Auflistung der Patientencharakteristika und Plattenbelegung..... 38

Tab. 11: Übersicht über die Einzelnukleotid-Polymorphismen… 45

Tab. 12: Kontingenzanalyse zur Evaluation des Effekts der Einzelnukleotid-Polymorphismen auf das Vorliegen einer Parkinson-Demenz……. 49

Tab. 13: Allelverteilung PDD versus PDNC…. 49

Tab. 14: Allelverteilung bei Apolipoprotein E.. 50

Tab. 15: Genotypen von Apolipoprotein E..... 52

Tab. 16: Ergebnisse der Metaanalyse von Wang et al. 56

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie der Parkinson-Krankheit

Die Parkinson-Krankheit (*englisch:* Parkinson's Disease, PD) gehört zu den Basalganglienerkrankungen und ist nach der Alzheimer-Krankheit (*englisch:* Alzheimer's Disease, AD) die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung.
Aktuell sind rund 4,1 Millionen Menschen weltweit von der Parkinson-Krankheit betroffen, wobei die Prävalenz der über 75-jährigen Bevölkerung in Deutschland bei 1.800/100.000 liegt (Oertel et al. 2012, Kapitel 2.1). Die Inzidenz beträgt 20 von 100.000 Einwohnern pro Jahr mit steigender Tendenz, die auf den demographischen Wandel und die mit der besseren Behandlung verbundene, längere Lebenszeit zurückzuführen ist (Dorsey et al. 2007). Ab dem 50. Lebensjahr steigt das Risiko, an Parkinson zu erkranken, pro Jahr um 9% an.

1.2 Klinik der Parkinson-Krankheit

In seiner 1817 veröffentlichten Arbeit „An Essay on the Shaking Palsy“ (*zu deutsch:* „Eine Abhandlung über die Schüttellähmung“) beschrieb der britische Arzt James Parkinson (1755-1824) erstmals die Symptomatik der Erkrankung, für die er heute als Namensgeber dient. Die von James Parkinson geprägte Bezeichnung „Schüttellähmung“ oder „Paralysis agitans“ ist dabei auf den eindrücklichen Ruhetremor vieler Patienten zurückzuführen (Parent 2018). 1884 führte der französische Psychiater Jean-Martin Charcot (1825–1893) die bis heute gebräuchliche Terminologie der Parkinson-Krankheit (synonym zu „Morbus Parkinson“ oder „Parkinson-Syndrom“) ein. Auf histologischer Ebene identifizierte der deutsche Neurologe Fritz Heinrich Lewy (1885-1950) erstmals 1912 die nach ihm benannten Lewy-Körper als neuropathologisches Korrelat (Wakabayashi et al. 2013).

Leitliniengemäß sind Parkinson-Syndrome durch das Vorliegen einer Bradykinese bei gleichzeitigem Vorhandensein eines der Kardinalsymptome wie Rigor, Ruhetremor oder posturaler Instabilität definiert (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hg.), S3-Leitlinie "Idiopathisches Parkinson-Syndrom" 2016). Im Vordergrund für Diagnostik und Patientenmobilität steht die Verlangsamung der Willkürmotorik.
Die Bradykinese reicht dabei von der Hypokinese mit verminderter Bewegungsamplitude und verminderten Spontanbewegungen bis hin zur Akinese mit gestörter Bewe-

gungsinitiation und vollständiger Bewegungsblockade (Oertel et al. 2012, Kapitel 2.1). Alle motorischen Funktionen sind davon betroffen, wobei zu Beginn der Erkrankung häufig eine unilaterale Ausprägung besteht.

Als Rigor ist eine Steifigkeit oder Starre der Muskulatur definiert, die durch den erhöhten Grundtonus zustande kommt (Masuhr et al. 2013, Kapitel 1.2). Der gesamte Bewegungsumfang des Patienten ist betroffen und es kann darüber hinaus zu schmerzhaften Missempfindungen kommen.

Der Ruhetremor ist charakteristisch für die Parkinson-Krankheit und kommt im Krankheitsverlauf bei 75% der Patienten vor (Hufschmidt et al. 2013, Kapitel 1.5). Zu beobachten ist dieses Symptom besonders ausgeprägt bei entspannter Position der Arme, vor allem im Liegen. Bei Ablenkung durch geistige Forderung, wie z.B. Rechenaufgaben, tritt meist eine Aggravation ein. Der spezifische Tremor der Hände, die neben den Armen am häufigsten betroffen sind, wird als Pillendreher-Phänomen beschrieben (Hufschmidt et al. 2013, Kapitel 1.5).

Zur Klassifikation der verschiedenen Erkrankungsstadien werden vor allem motorische Symptome herangezogen, worauf auch die 5-Punkte Skala nach Hoehn und Yahr beruht (1998).

Tabelle 1: Einteilung der Stadien bei der Parkinson-Krankheit nach der Hoehn und Yahr Skala (Goetz et al. 2004). H&Y = Hoehn & Yahr.

H&Y 1	Einseitige Symptomatik, ohne oder allenfalls mit geringgradiger Behinderung
H&Y 2	Beidseitige Symptomatik, keine Haltungsinstabilität
H&Y 3	Leichte Haltungsinstabilität, Arbeitsfähigkeit noch zum Teil erhalten
H&Y 4	Mit Hilfe geh- und stehfähig
H&Y 5	An den Rollstuhl gefesselt oder bettlägerig

Von den motorischen Manifestationen sind die nicht-motorischen Symptome abzugrenzen. Depression, Apathie, kognitive Dysfunktion, Psychose und Impulskontrollstörungen zählen zu den neuropsychiatrischen Symptomen (Oertel et al. 2012, Kapitel 2.1). Blasenentleerungsstörungen, orthostatische Hypotension, Obstipation und sexuelle Dysfunktionen werden unter den autonomen Störungen zusammengefasst (Shulman et al. 2001). Typische Schlafstörungen, wie die *Rapid Eye Movement*-Schlaf-Verhaltensstörung, und sensorische Ausfälle, wie die Hyposmie, können außerdem frühzeitig festgestellt werden und den motorischen Symptomen vorausgehen (Bassetti 2011).

1.3 Ätiologie und Pathogenese der Parkinson-Krankheit

Die Pathologie der idiopathischen Parkinson-Krankheit besteht in einer Degeneration der dopaminergen Neurone der Substantia nigra im extrapyramidalmotorischen System (Hirsch et al. 1988). Der Funktionsverlust der melaninhaltigen Zellen verursacht die verminderte Synthese des Neurotransmitters Dopamin (Kempster et al. 2007). Die ausbleibende hemmende Wirkung des Dopamins auf die cholinergen Neurone des Striatums bedingt einen sekundären Acetylcholinüberschuss (Wichmann und DeLong 2003). Die Konzentration weiterer Neurotransmitter, wie Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin, kann ebenfalls verändert sein. Das Ungleichgewicht der Transmitter führt zu einem breiten Spektrum an neurologischen Störungen.
Von den motorischen Kardinalsymptomen bei der Parkinson-Krankheit sind nichtmotorische Symptome abzugrenzen, die autonome sowie häufig auftretende neuropsychologische bzw. psychische Störungen und Verhaltensauffälligkeiten beinhalten (Oertel et al. 2012, Kapitel 2.1).

Zu den wesentlichen molekularen Mechanismen, die zur Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen beitragen, zählen oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion, Inflammation und Exzitotoxizität (Lin und Beal 2006; Dong et al. 2009). Auf histologischer Ebene sind dabei häufig die typischen eosinophilen zytoplasmatischen Einschlusskörper, sogenannte Lewy-Körper, in den zugrunde gehenden Neuronen zu finden (Bartels und Leenders 2009). Sie enthalten verschiedene Proteine, darunter α-Synuklein, Ubiquitin und Proteasomen.
Der Cholesterinstoffwechsel des Gehirns beeinflusst über seine oxidierten Metabolite die vermehrte α-Synuklein-Aggregation und Apoptose dopaminerger Neurone (Bar-On et al. 2008). Die Apolipoproteine, hydrophile Transportvehikel des hydrophoben Cholesterins im Gehirn, regulieren dabei die Endo- und Exozytose sowie den interzellulären Cholesterinaustausch (Lahiri 2004).

Rund ein Drittel des Parkinson-Risikos ist auf genetische Faktoren zurückzuführen, wobei monogenetische familiäre Erkrankungen weniger als 5% ausmachen (Oertel et al. 2012, Kapitel 3.2). Die funktionelle Analyse der damit assoziierten Genloci hat bereits zur Aufklärung zellulärer Mechanismen der Pathogenese beigetragen und in mindestens 6 Genen (*englisch:* Synuclein Alpha, SNCA; Leucine-rich Repeat Kinase 2, LRRK2; Parkin 2, PARK2; PTEN-induced Putative Kinase 1, PINK1; Protein Deglycase 1, DJ-1; Probable Cation-transporting ATPase 13A2, ATP13A2) wurden Mutationen identifiziert (Tysnes und Storstein 2017; Weykopf et al. 2019).

Bisher sind mehr als 10 PARK-Mutationen bekannt, die Proteine wie α-Synuklein, Parkin oder Ubiquitin direkt enkodieren oder indirekt auf deren Metabolismus einwirken (Healy et al. 2004).
Etwa 75% der Parkinson-Syndrome sind idiopathisch und treten sporadisch auf (Mattle und Mumenthaler 2008, Kapitel 2.8.1). Bei dieser großen Mehrheit der Erkrankten gibt es bislang kein identifizierbares Vererbungsmuster.
Weitere 20% der Parkinson-Syndrome sind als symptomatisch bzw. sekundär einzuordnen und werden zum Beispiel durch Medikamente und Noxen verursacht oder treten im Rahmen metabolischer oder entzündlicher Erkrankungen des Gehirns auf (Hacke 2016, Kapitel 24.1).

Die Ätiologie des idiopathischen Parkinson-Syndroms ist bis heute unklar und nach aktuellem Stand der Wissenschaft wird eine multifaktorielle Genese angenommen (Jenner und Olanow 2006). Es handelt sich dabei um eine Kombination aus Altersdefiziten, Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition.

1.4 Kognitive Dysfunktion und Demenz bei der Parkinson-Krankheit

Das Spektrum der kognitiven Dysfunktion bei der Parkinson-Krankheit reicht von milden kognitiven Defiziten (*englisch:* Parkinson‘s Disease – Mild Cognitive Impairment, PD-MCI) bis hin zur manifesten Demenz (*englisch:* Parkinson‘s Disease Dementia, PDD) (Dubois et al. 2007; Emre et al. 2007; Litvan et al. 2012). In Abgrenzung dazu werden Parkinson-Erkrankte ohne kognitive Beeinträchtigung in der vorliegenden Arbeit als PDNC (*englisch:* Parkinson's Disease with Normal Cognition) bezeichnet.

Kognitive Defizite können bei 20% aller neudiagnostizierten Patienten mit einem Parkinson-Syndrom festgestellt werden (Aarsland et al. 2009). Darüber hinaus zeigten Beobachtungsstudien, dass bis zu 80% aller Parkinson-Patienten im Krankheitsverlauf eine Demenz entwickeln (Aarsland et al. 2003). Insgesamt 3,6% aller Fälle von Demenz können auf PDD zurückgeführt werden.
Sowohl in klinischer als auch in pathologischer Hinsicht gibt es Überschneidungen der PDD mit der Demenz mit Lewy-Körpern (*englisch:* Dementia with Lewy Bodies, DLB). Beide Krankheitsbilder weisen dieselbe Neuropathologie als Synukleinopathie auf (Irwin et al. 2013). *Per definitionem* unterscheidet die zeitliche Abfolge der kognitiven Störung in Bezug auf die motorischen Kardinalsymptome beide Krankheitsbilder. Bei Patienten mit DLB entwickeln sich die motorischen Symptome gleichzeitig oder inner-

halb eines Jahres nach Auftreten der Demenz. Wenn motorische Symptome der kognitiven Störung vorausgehen, wird die Erkrankung als PDD definiert (McKeith 2006).
DLB ist die zweithäufigste Form der neurodegenerativen Demenz mit einer geschätzten Prävalenz von bis zu 30% aller Demenzerkrankungen (Zaccai et al. 2005). Die Entwicklung einer PDD ist häufiger bei Männern, bei älteren Patienten und bei Vorliegen einer ausgeprägten Parkinson-Symptomatik (Hughes et al. 2000). Eine negative Prognose sowie eine erhöhte Morbidität und Mortalität resultieren desweiteren aus einer PDD (Forsaa et al. 2010).

Als Beispiel für einen klinischen Basis-Demenz-Test kann der Mini Mental Status Test (MMST) (*englisch:* Mini Mental State Examination, MMSE) herangezogen werden. Dieser Test wurde 1975 von Folstein entwickelt und beinhaltet 9 Teilaspekte, in denen zeitliche und räumliche Orientierung, Merk- und Erinnerungsfähigkeit, Aufmerksamkeit, Sprache und Sprachverständnis sowie Lesen, Schreiben, Zeichnen und Rechnen untersucht werden. Anhand der erbrachten Leistung werden Punkte vergeben, woraus die Einteilung der dementiellen Schweregrade resultiert (Folstein et al. 1975).

Tabelle 2: Orientierende Schweregradeinteilung am Beispiel der Alzheimer-Demenz anhand des Mini Mental Status Tests (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), S3-Leitlinie "Demenzen" 2016).

Gesamtpunktzahl	**Ergebnis**
20 bis 26 Punkte	Leichte Demenz
10 bis 19 Punkte	Moderate/Mittelschwere Demenz
Weniger als 10 Punkte	Schwere Demenz

1.4.1 Diagnostik der PDD

Für die Diagnostik der PDD ist zunächst das Vorliegen einer Parkinson-Krankheit entscheidend. Gemäß der klinischen Kriterien der *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank* (UKBB) gliedert sich die Diagnostik in 3 Schritte (Hughes et al. 1992).

Schritt 1: Diagnostik eines Parkinson-Syndroms durch Vorliegen einer Bradykinese und mindestens eines der Symptome wie Rigor, Ruhetremor oder posturale Instabilität (nicht primär visuell, vestibulär, cerebellär oder durch propriozeptive Dysfunktion bedingt).

Schritt 2: Ausschlusskriterien für das Vorliegen einer PD werden ermittelt, worunter die Abklärung wichtiger Differentialdiagnosen fällt (z.B. Zustand nach neurologischen Erkrankungen unterschiedlicher Genese, frühzeitige autonome Beteiligung, frühe Demenz, Vorhandensein eines zerebralen Tumors, ausbleibende Reaktion auf hohe Levodopa (L-Dopa) Dosen bei Ausschluss von Malabsorption oder 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-Exposition).

Schritt 3: Unterstützende prospektive Kriterien für die definitive Diagnosestellung einer PD werden analysiert, von denen 3 oder mehr in Kombination mit Schritt 1 erfüllt sein müssen. Dazu zählen unilateraler Befall bei Beginn, Ruhetremor, persistierende Asymmetrie (meist unilateralem Befall entsprechend), exzellentes Ansprechen auf L-Dopa (70-100%), schwere L-Dopa-induzierte Chorea, Ansprechen auf L-Dopa für mehr als 5 Jahre oder klinischer Verlauf über 10 Jahre und mehr (Hughes et al. 1992).

Im weiteren Verlauf der Parkinson-Krankheit kann sich ein dementielles Syndrom entwickeln, das durch einen schleichenden Beginn und eine langsame Progression gekennzeichnet ist (Emre et al. 2007). Es können dabei Einschränkungen in kognitiven Domänen, darunter Aufmerksamkeit, exekutive und visuell-räumliche Funktionen, Gedächtnis und Sprache, entstehen. Die Abnahme der Kognition ist im Vergleich zum prämorbiden Niveau zu beurteilen. Die Ausprägung der Defizite führt im weiteren Verlauf dazu, dass es zu Einschränkungen im täglichen Leben (*englisch:* Activities of Daily Living, ADL) kommt, die nicht auf motorische oder autonome Symptome der PD zurückzuführen sind. Klinisch können Verhaltensmerkmale wie Apathie, Persönlichkeitsveränderungen mit Depression und Angst, Halluzinationen, paranoider Wahn und verstärkte Tagesmüdigkeit imponieren (Emre et al. 2007; Goetz et al. 2008).
Auf dieser Definition der PDD bauen die Merkmalsgruppen einer *wahrscheinlichen* und einer *möglichen PDD* nach Emre et al. auf, die der klinischen Diagnostik einer PDD dienen (2007). Folgende Kriterien werden dabei festgelegt:

Kernmerkmal 1: Exakte Diagnosestellung der Parkinson-Krankheit gemäß UKBB Kriterien (Hughes et al. 1992).

Kernmerkmal 2: Vorliegen eines langsam fortschreitenden dementiellen Syndroms mit schleichendem Beginn, welches im Zusammenhang mit einer Parkinson-Krankheit steht und folgende Symptome beinhaltet: Verschlechterung in mehr als einer kognitiven Domäne, Abnahme des Funktionsniveaus im Vergleich zum prämorbiden Ausgangspunkt, Beeinträchtigung der ADL, unabhängig von motorischen oder autonom-vegetativen krankheitsbedingten Einbußen.

Entsprechend dieser Kriterien ist von einer *wahrscheinlichen PDD* auszugehen, wenn die Parkinson-Diagnose durch die UKBB Kriterien gesichert ist und die Demenz, wie oben erläutert, charakterisiert ist. Neben den beiden Kernmerkmalen müssen in diesem Fall in 2 oder mehr kognitiven Domänen pathologische Auffälligkeiten vorliegen. Eine *mögliche PDD* ist definiert durch das Vorhandensein beider Kernmerkmale und pathologischer Veränderungen in mindestens einer kognitiven Domäne. Das Vorliegen einer Verhaltensauffälligkeit ist nicht obligat. Ein Ausschlusskriterium darf nicht bestehen, es kann jedoch einen diagnostisch unsicheren Faktor geben.

Auf dieser Grundlage erfolgte die Entwicklung einer Strategie für die Diagnosestellung der PDD durch Dubois et al. mit dem Ziel der Operationalisierung und Erleichterung in der klinischen Praxis. Im Rahmen einer Leitlinie wurden 2 *Movement Disorder Society* (MDS) Level definiert (2007).

<u>MDS-Level I Kriterien:</u> Die Kriterien dienen in ihrer Funktion als *Screening* Verfahren zur Diagnosestellung der PDD und werden direkt am Patienten erhoben. Die Level II Testung stellt eine Ergänzung, im Sinne einer Absicherung bei Unklarheit, dar. Für die Diagnose einer PDD müssen folgende Punkte erfüllt sein: gesicherte Diagnose einer PD gemäß UKBB Kriterien, PD geht dem Beginn der Demenz voraus, PD geht mit kognitiven Defiziten einher, der Schweregrad der kognitiven Defizite beeinträchtigt die Alltagskompetenzen, die vorliegende Beeinträchtigung betrifft dabei mehr als eine kognitive Domäne. Das Vorhandensein von neuropsychiatrischen Symptomen ist nicht notwendig, aber als unterstützend zu betrachten. Eine Major Depression, ein Delirium oder andere psychiatrische Grunderkrankungen müssen ausgeschlossen werden. Eine alleinige Einschätzung anhand der Level I Kriterien zeigt jedoch eine nicht ausreichende Sensitivität für die Diagnostik einer PDD (Kiesmann et al. 2013; Barton et al. 2014).

<u>MDS-Level II Kriterien:</u> Das Ziel der weiteren Testung ist die Konkretisierung einer unsicheren Diagnose, wobei Beeinträchtigungen detaillierter beschrieben und Behandlungsfortschritte aufgezeigt werden können. Folgende Domänen werden dabei im Speziellen untersucht: Allgemeine Leistungsfähigkeit, Exekutivfunktionen, Gedächtnis sowie instrumentale und neuropsychiatrische Funktionen. Eine Differenzierung der kognitiven Dysfunktion ist vor allem im Rahmen der Forschung von hoher Bedeutung. Die Level II Testung weist eine hohe Spezifität für die Diagnosestellung einer PDD auf (Serrano-Dueñas et al. 2017).

1.4.2 Diagnostik der PD-MCI

Die Krankheitsbezeichnung *Mild Cognitive Impairment* (MCI) beinhaltet subjektive und objektivierbare kognitive Defizite bei erhaltener Alltagskompetenz (Oertel et al. 2012, Kapitel 3.6). Unter diesem Begriff können leichte kognitive Störungen in Abgrenzung zur altersbedingten Verschlechterung des Gedächtnisses zusammengefasst werden. Die jährliche Übergangshäufigkeit von einer MCI zur manifesten Demenz liegt bei bis zu 10% (Litvan et al. 2012). Verschiedene Definitionen einer MCI wurden bisher entwickelt.

Petersen et al. stellten dabei folgende Kriterien auf: Subjektives Beklagen des Patienten einer kognitiven Verschlechterung (objektivierbar durch eine verlässliche Quelle), minimaler Effekt auf das tägliche Leben, Abwesenheit einer Demenz sowie Beweis einer nicht-altersbedingten Dysfunktion (2004). Diese Evidenz kann auf einer klinischen Beurteilung beruhen, wobei eine neuropsychologische Testung hilfreich ist. Spezifische Tests und Ausschlusskriterien werden nicht benannt, quantitative Messungen der kognitiven Funktionen und ADL sind nicht vorgesehen.

Litvan et al. entwickelten Petersens Ansatz weiter und stellten genaue Ein- und Ausschlusskriterien für die Diagnose MCI bei PD auf.
Zu den Einschlusskriterien zählt neben der UKBB Diagnose der PD eine graduelle Verschlechterung der kognitiven Leistung, subjektiv wahrgenommen vom Patienten bzw. Informanten oder beobachtet von einem Kliniker (2012). Die kognitiven Defizite müssen in einer neuropsychologischen Testung oder einer Skala globaler kognitiver Fähigkeiten objektiviert werden, genaue Verfahren werden dazu erläutert. Die funktionelle Unabhängigkeit des Patienten ist trotz geringfügiger Schwierigkeiten bei komplexen Aufgaben nicht wesentlich eingeschränkt. Zu den Ausschlusskriterien zählen die Diagnose einer PDD gemäß der MDS-Leitlinie, andere primäre Ursachen für eine kognitive Dysfunktion (Delirium, Apoplex, Major Depression, metabolische Ursache, Medikamente, Schädel-Hirn-Trauma) sowie andere PD-assoziierte Komorbiditäten (motorische Beeinträchtigung, Angst, depressive Verstimmung, extreme Tagesmüdigkeit, Psychose). Darüber hinaus wurden PD-spezifische Richtlinien für MCI festlegt:

<u>Level I:</u> In einem zweistufigen Modell wird eine gekürzte Untersuchung erläutert. Diese umfasst den Einsatz einer PD-geeigneten Skala zur Messung globaler kognitiver Fähigkeiten. Eine Beeinträchtigung muss feststellbar sein.

<u>Level II:</u> In diesem Schritt erfolgt eine umfassende Beurteilung, die eine neuropsychologische Testung mit 2 Verfahren, die jeweils 5 kognitive Domänen abbilden, beinhal-

tet. Dabei muss eine Verschlechterung in einer Domäne in beiden Tests oder eine Verschlechterung in 2 Domänen in einem Test feststellbar sein. Diese ist zu objektivieren, indem ein Vergleich zum prämorbiden Niveau oder eine Serientestung vorgenommen wird oder eine signifikante Abweichung von der Altersnorm vorliegt.

Aus den Ergebnissen der Level II-Untersuchungen ergeben sich 2 Subtypen der PD-MCI: *PD-MCI single-domain* und *PD-MCI multiple domain*, je nach Anzahl der betroffenen Domänen (Goldman et al. 2015).

1.5 Genetische Variabilität und Pathogenität

Als Einzelnukleotid-Polymorphismus (*englisch:* Single Nucleotide Polymorphism, SNP) oder Punktmutation wird eine Variation eines einzelnen Basenpaares in einem Strang der Desoxyribonukleinsäure (DNA) bezeichnet. Es handelt sich dabei um geerbte und vererbbare genetische Varianten (Schaaf et al. 2013, Kapitel 3.1).

Einzelnukleotid-Polymorphismen sind die häufigste Ursache für genetische Variabilität unter Menschen und müssen keinen Krankheitswert besitzen. Schätzungsweise tritt durchschnittlich ein SNP pro 300 Nukleotide auf, was eine ungefähre Gesamtanzahl von 10 Millionen SNPs im humanen Genom vermuten lässt (Graw und Hennig 2015, Kapitel 2.1).
Von einer Mutation ist dann die Rede, wenn weniger als 1% der Bevölkerung davon betroffen sind, während bei einem Polymorphismus mehr als 1% Träger sind (Nachman 2001). Man bezeichnet dabei die ursprüngliche Base als Referenz und die neue Base als Variante. Wenn Referenz (R) und Variante (V) übereinstimmen, also dieselbe Base zweimal vorhanden ist, spricht man von einer homozygoten Referenzsequenz (RR) oder einer homozygoten varianten Mutation (VV) (Varela und Amos 2010). Bei der Kombination von Referenz und Variante (RV) handelt es sich wiederum um eine heterozygote Mutation. Die Referenz, auch als *major allele* bezeichnet, entspricht dabei dem Nukleotid, welches mit einer höheren Frequenz exprimiert wird und stellt somit den Wildtyp dar (Barreiro et al. 2008). Die seltenere Variante, das *minor allele*, entspricht im Gegensatz dazu einer Mutation und besitzt definitionsgemäß einen Krankheitswert.
Die Auswirkungen einer Punktmutation sind dabei verschieden: Das Leseraster kann erhalten bleiben oder verschoben werden. Kommt es zu einer Substitution, dem Austausch einer Base in einer kodierenden Region, entwickelt sich entweder eine sinnverändernde (*englisch:* missense) oder eine sinnentstellende (*englisch:* nonsense) Mutation (Nordheim und Knippers 2015, Kapitel 11.2). Bei der *missense* Mutation entsteht durch Austausch einer Aminosäure ein dysfunktionales Protein, während es bei der

nonsense Mutation durch Bildung eines Stopcodons zum sofortigen Abbruch der Translation kommt. Neben der Substitution können auch Deletionen und Insertionen mit der Folge einer Leserasterverschiebung (*englisch*: frameshift) auftreten. Es handelt es sich dabei um den Ausfall oder Zugewinn einer Base, was zu einer komplett veränderten Proteinstruktur führt.
Die DNA-Lokalisationen der Einzelnukleotid-Polymorphismen sind dabei für das Resultat maßgeblich verantwortlich: Wenn diese in nicht-kodierenden Genabschnitten, den Introns, liegen, können sie regulatorisch auf die Gentranskription einwirken. Wenn sie hingegen in den kodierenden Abschnitten, den Exonen, liegen, nehmen sie direkten Einfluss auf die Proteinsynthese, die durch eine veränderte Aminosäuresequenz gestört ist (Graw und Hennig 2015, Kapitel 10). Methode der Wahl zur Identifikation von Einzelnukleotid-Polymorphismen ist die DNA-Sequenzierung (Sanger et al. 1977) (siehe Abschnitt 2.2.6).

1.6 Histopathologie und Genetik der PDD

1.6.1 Histopathologie der PDD

Die bereits erwähnten neuronalen intrazytoplasmatischen Lewy-Körper sind die typischen Veränderungen der Substantia nigra, Pars compacta, bei PDD (Breydo et al. 2012). Darüber hinaus finden sie sich auch in Kerngebieten des Hirnstamms, wie dem dorsalen motorischen Vaguskern oder im Locus coeruleus, und in supratentoriellen Gebieten des Hypothalamus sowie im Nucleus basalis Meynert (Polymeropoulos et al. 1997). Die Lewy-Körper treten in den neuronalen Fortsätzen auf, welche als Lewy-Neuriten bezeichnet werden (Kalaitzakis und Pearce 2009). Die Einschlusskörper, Aggregate gerader oder paarig gewundener Intermediärfilamente, zeigen bei Immunpräzipitation eine starke Färbereaktion für α-Synuklein und andere abnorm phosphorylierte Neurofilamente sowie Ubiquitin (Ostrerova et al. 1999). Spillantini et al. zeigten mit dem Einsatz von spezifischen Antikörpern, dass Lewy-Körper und Lewy-Neuriten immunoreaktiv für α-Synuklein sind (1998).

Darüber hinaus treten kennzeichnende pathologische Korrelate der AD auch bei PDD auf (Jellinger und Attems 2008; Compta et al. 2014). Dazu gehören extrazelluläre Plaques aus Amyloid-β Peptid (Aβ) und intrazelluläre Neurofibrillen (*englisch:* Neurofibrillary Tangles, NFTs). Bei PDD-Patienten liegen höhere Spiegel von Aβ und NFTs im Vergleich zu PDNC-Patienten vor (Lippa et al. 2007; Kempster et al. 2010). Eine synergistische Rolle der Alzheimer-Pathologie und Synukleinopathie wird außer-

dem diskutiert (Buongiorno et al. 2011). Im transgenen Mausmodell mit einer Lewy-Alzheimer-Kombination konnte sowohl eine vermehrte α-Synuklein-Aggregation als auch eine Exazerbation der Aβ-Akkumulation festgestellt werden (Masliah et al. 2001; Clinton et al. 2010). Andere Untersuchungen stellten eine Korrelation zwischen größeren Aβ-Plaques und kortikalen Lewy-Körpern fest (Lashley et al. 2008), wobei der erhöhte Aβ-Gehalt ein früheres Auftreten der Demenz zur Folge hatte (Halliday et al. 2008; Compta et al. 2011). Die subkortikale Aβ-Last im Bereich des Striatums bei PDD wurde ebenfalls als Risikofaktor der Progression diskutiert (Kalaitzakis et al. 2008).

Ruffmann et al. sahen in der Last der kortikalen Lewy-Körper ebenfalls den einzigen unabhängigen Prädiktor für die Entwicklung einer Demenz, ermittelt durch topographische und semi-quantitative Messung von Lewy-Körpern, Aβ-Plaques und Tau-positiven *neuropil threads* bei Patienten mit PDD, DLB und PDNC (2016).

1.6.2 Genetik der PDD

Ausgehend von einer substantiellen Überschneidung der klinischen und pathologischen Charakteristika von PDD und AD, werden gemeinsame genetische Risikofaktoren erforscht. Meeus et al. führten zu diesem Zweck eine Mutationsanalyse aller bekannten Hauptrisikogene von AD und PD bei 75 PDD- und DLB-Patienten durch, wobei ätiologisch familiäre und sporadische Erkrankungsformen vorhanden waren (2012). Im Rahmen des genetischen *Screenings* wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen und Kopienzahlvariationen (*englisch:* Copy Number Variation, CNV) detektiert. In den Genen des Amyloid-Vorläuferproteins (*englisch:* Amyloid-Precursor-Protein, APP), SNCA und PARK2 wurden CNV ermittelt. In Bezug auf die Parkinson-Gene konnten eine SNCA-Duplikation, eine bekannte Mutation am Locus r1221C des LRRK2-Gens und 4 neue heterozygote sinnverändernde *missense* Varianten mit unklarer Pathogenität identifiziert werden.

Ishikawa et al. sequenzierten im Rahmen eines Fallberichts das Genom eines männlichen PDD-Erkrankten in Bezug auf AD-assoziierte Risikogene, wie z.B. Präsenilin-1 (*englisch:* Presenilin-1, PSEN1) (2005). Bekannte Mutationen von PSEN1, das zur Gruppe der Transmembranproteine gehört und unter anderem APP spalten kann, stehen im Zusammenhang mit der familiären AD (Bentahir et al. 2006). Der untersuchte Patient litt an einer frühmanifesten L-Dopa-sensitiven Parkinson-Krankheit und entwickelte 7 Jahre nach Erstmanifestation eine Demenz, demnach als PDD klassifiziert. In der Familienanamnese war ein fraglich autosomal dominantes Vererbungsmuster ähn-

licher neurologischer Erkrankungen erkennbar. Mittels direkter Sequenzierung zeigte sich eine neue C-terminale Deletion im Exon 12 des PSEN1-Gens, woraus die fehlende Aminosäure Threonin (Codon 440) resultierte. In weiteren Genen wie APP, Präsenilin-2 (*englisch:* Presenilin-2, PSEN2) und SNCA lagen keine Mutationen vor. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass eine spezifische PSEN1-Mutation in gleicher Weise zur α-Synuklein- sowie β-Amyloid-Pathologie beiträgt. In Analogie dazu stehen die Ergebnisse von Leverenz et al.: Sie konnten an 24 Fällen von familiärer AD mit 9 bekannten PSEN1-Mutationen mittels α-Synuklein-Immunohistochemie das Vorhandensein von Lewy-Körpern nachweisen (2006).

Berlyand et al. wendeten eine etablierte Kombination von 5 Biomarkern zur Detektion von AD bei 75 PD-Erkrankten an, wobei ein großes Spektrum der kognitiven Defizite vorlag (2016). Die folgenden Biomarker kamen dabei zum Einsatz: Liquorgehalt von Gesamt-Tau (*englisch:* total tau, t-tau), phosphoryliertem Tau (*englisch:* phosphorylated tau, p-tau) und Amyloid-β42 (Aβ42), APOE-Genotyp und *Spatial Pattern of Abnormalities for Recognition of Early Alzheimer's Disease* (SPARE-AD)-Bildgebung. Dieses diagnostische Instrument war mit einer Genauigkeit von 80% in der Lage, PDD und PDNC zu unterscheiden. Basierend auf 5 Parametern, die bereits *intra vitam* erhoben werden, ist eine Identifikation und Abgrenzung von PDD gegenüber PDNC frühzeitig möglich und darüber hinaus eine therapeutische Überschneidung mit der AD-Therapie denkbar.

Um die Prävalenz der AD-assoziierten Liquor-Biomarker Aβ42, t-tau und p-tau im Spektrum der DLB zu evaluieren, schlossen Van Steenoven et al. Patienten mit DLB, PDD und PDNC in eine große, multizentrische Kohorten Studie ein (2016). Als Liquor-AD-Profil war dabei ein pathologischer Aβ-Wert mit abnormem t-tau und/oder p-tau definiert. Bei DLB-Patienten waren vermehrt abnorme Werte für Aβ42, t-tau und p-tau messbar, während diese bei PDNC kaum auftraten. Patienten mit PDD lagen im Mittelfeld. Das Liquor-AD-Profil war bei 25% der DLB-Patienten feststellbar, verglichen mit 9% bei PDD und 3% bei PDNC. Unter den AD-Profil-positiven DLB-Patienten waren ältere und überwiegend weibliche Erkrankte, die schlechter im Mini-Mental-Status-Test abschnitten, und eine kürzere Krankheitsdauer aufwiesen.

1.7 Der Cholesterinmetabolismus bei neurodegenerativen Erkrankungen

Cholesterin wirkt sowohl im Zentralnervensystem (ZNS) als auch im peripheren Gewebe an der Bildung und Aufrechterhaltung von Zellmembranen mit und reguliert ihre

Fluidität (Horn und Moc 2015, Kapitel 27.3). Als Vorläufermolekül von Vitamin D und Steroidhormonen findet sein peripherer Metabolismus hauptsächlich in der Leber statt, wo es letztlich zu Galle konvertiert wird.
2 Hauptgruppen von hydrophilen Lipoproteinen bewerkstelligen den Cholesterintransport im Blut: Die *Low-Density Lipoproteins* (LDL) bewegen das hydrophobe Cholesterin an seine Zielorte, während *High-Density Lipoproteins* (HDL) es zurück zur Leber führen.

Die im Gehirn vorhandenen Fette setzen sich zu ungefähr gleichen Teilen aus Glycerophospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterin zusammen (Korade und Kenworthy 2008). Das Gehirn enthält im Vergleich zu anderen Organen mit 20% des Gesamtcholesterins das meiste Cholesterin des Körpers und verfügt über eigene Synthesemöglichkeiten im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle (DeGrella und Simoni 1982; Noguchi et al. 2014). Im ausgewachsenen Organismus ist die *de novo* Synthese die Hauptquelle des zerebralen Cholesterins, da Lipoproteine die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können (Jeske und Dietschy 1980). Als essentielle Strukturkomponente von zellulären Membranen und Myelin wird es für den großen Oberflächenaufbau der Neurone mit ihren Axonen und Dendriten benötigt (Goritz et al. 2005). An Synapsen und postsynaptischen Fortsätzen sowie präsynaptischen Vesikeln konnte ein deutlich erhöhter Cholesteringehalt der Membranen bestimmt werden (Pfenninger 2009). Unter physiologischen Bedingungen bleibt der absolute Cholesteringehalt des Gehirns dabei relativ konstant: Es kommt zu einem anhaltenden, streng regulierten Austausch von abgesondertem und neu synthetisiertem Cholesterin.

Neben seiner Bedeutung für die Bildung von Synapsen und Dendriten und seinem Beitrag zur axonalen Leitung (Chaves et al. 1997; Fester et al. 2009), kann Cholesterin die Zellfunktion in seiner oxidierten Form beeinflussen (Janowski et al. 1999). Es wird enzymatisch und nicht-enzymatisch zu biologisch aktiven Metaboliten, sogenannten Oxysterolen, umgesetzt (Leoni und Caccia 2011). Es handelt sich dabei im Wesentlichen um 24S-Hydroxycholesterin (24S-OHC) und 27-Hydroxycholesterin (27-OHC), welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Lange et al. 1995). Im Gehirn sind hohe Konzentrationen von bis zu 30 µM des freien 24S-OHC messbar mit einem Nettoausstrom von 6-7 mg/Tag in die Peripherie, wo es zu gleichen Teilen über die Leber verstoffwechselt und in seine Konjugate umgewandelt wird (Bjorkhem et al. 2002). 27-OHC ist überwiegend im peripheren Kreislauf präsent, hat jedoch freien Zugang zum Gehirn, wo es ebenfalls in geringen Mengen synthetisiert wird (Brown et al. 2004; Heverin et al. 2005).

Der zerebrale Cholesterinmetabolismus und seine komplexe Homöostase sind für eine intakte Hirnfunktion von hoher Bedeutung. Defekte des Stoffwechselwegs sind in die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-, Parkinson- und Huntington-Krankheit (*englisch:* Huntington's Disease, HD) involviert (Block et al. 2010; Di Paolo und Kim 2011; Wang et al. 2011). Als molekulare Pathomechanismen konnten oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion, Inflammation und Exzitotoxizität identifiziert werden (Lin und Beal 2006; Dong et al. 2009). Hypercholesterinämie kann oxidativen Stress und damit assoziierte neuropathologische oxidative Schäden des Hirnparenchyms verursachen (Aytan et al. 2008; Thirumangalakudi et al. 2008).

Bei Alzheimer-Patienten wurde eine Cholesterinanreicherung in zerebralen Plasmamembranen beim Fortschreiten der Erkrankung gezeigt (Cutler et al. 2004; Xiong et al. 2008). Hydrophobe, senile Aβ-Plaques akkumulieren im extrazellulären Raum und gelten wie unter 1.5 beschrieben als pathologisches Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit (Di Paolo und Kim 2011). *In vitro* Studien belegten, dass eine Cholesterinüberladung der Membranen in kultivierten primären Neuronen zu einem Anstieg der Aβ-Produktion durch Beta-Sekretase-vermittelte (*englisch:* β-site of APP Cleaving Enzyme, BACE1) APP-Spaltung führt (Marquer et al. 2011). In diesem Zusammenhang kommt es zu einer verminderten Transkription von *Low-Density Lipoprotein-related Protein 1* (LRP1), wodurch die exogene Rekrutierung von Cholesterin an der Plasmamembran zurückgeht und letztlich der zelluläre Cholesterinspiegel absinkt (Liu et al. 2007).

In Bezug auf die Parkinson-Krankheit lieferten wenige prospektive Studien den Beweis, dass ein höherer Anteil von Plasmacholesterin mit dem Auftreten von PD korreliert (Hu et al. 2008; Miyake et al. 2010), während andere Untersuchungen gegensätzliche Ergebnisse hervorbrachten (Huang et al. 2011; Gudala et al. 2013; Tan et al. 2015). Deutlich erhöhte Oxysterolspiegel wurden im Plasma und Liquor von PD- und DLB-Patienten gemessen (Bosco et al. 2006; Lee et al. 2009). In der neuronalen Zellkultur und im PD-Tiermodell konnte der Einfluss von Cholesterin auf die α-Synukleinopathie ebenfalls demonstriert werden: Während Cholesterin-senkende Medikamente, wie Statine, die Aggregation unterdrücken, treibt die exogene Zufuhr von Cholesterin den Prozess voran (Bar-On et al. 2008; Koob et al. 2010). Ein Anstieg des zirkulierenden 27-OHC als Cholesterinmetabolit in der Peripherie korreliert bei PD-Patienten mit einer Erhöhung des 27-OHC-Gehalts im Liquor und im zerebralen Kortex (Heverin et al. 2005; Umetani et al. 2014; Marwarha und Ghribi 2015). Lee et al. beobachteten ein Absinken des 24S-OHC-Plasmaspiegels um 67% bei PD und folgerten daraus einen Nutzen als potentiellen diagnostischen Marker (2009).

Im Gegensatz dazu beschrieben Björkhem et al. einen Anstieg des Liquorgehalts von 24S-OHC und 27-OHC bei 10% der PD-Patienten sowie eine signifikante Korrelation zwischen 24S-OHC-Spiegel und Erkrankungsdauer (2013). Neben einer erhöhten α-Synukleinaggregation induzieren Oxysterole die Apoptose von dopaminergen Neuronen (Marwarha et al. 2011). Wie bereits erwähnt, findet die zelleigene Cholesterinsynthese Adenosintriphosphat-abhängig im Endoplasmatischen Retikulum statt, von wo aus es rasch zur Zellmembran befördert wird (DeGrella und Simoni 1982). Die Umverteilung in verschiedene subzelluläre Kompartimente, wie z.B. dem Golgi-Apparat, wird dabei von einer Kombination aus Vesikel-abhängigem interorganellem und Protein-vermitteltem Transport durch das Zytosol bewerkstelligt. Durch seine geringe Wasserlöslichkeit liegt das Cholesterin dort hauptsächlich in seiner Protein-gebundenen Form, dem Apolipoprotein-E-enthaltenden Partikel, vor. Es kommt zu einem regen Apolipoprotein-E-Austausch unter Hirnzellen, da dieses als wesentliches Transportprotein des extrazellulären Cholesterins dient und zu dessen Aufnahme in neuronale und nicht-neuronale Zellen führt (Lahiri 2004). Die Komponenten des Cholesterinmetabolismus als endogene Risikofaktoren der Parkinson-Krankheit erfordern eine systematische Untersuchung und strukturelle Analyse der assoziierten Gene (Paul et al. 2015; Zhang und Liu 2015).

1.8 Zur Genetik ausgewählter Cholesterin-Transportproteine

1.8.1 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (APOE) dient im Speziellen als Ligand für die Cholesterinendozytose der Leber, es ist ein Strukturprotein von Chylomikronen, *Very-Low-Density Lipoproteins* (VLDL), *Intermediate-Density Lipoproteins* (IDL) und *High-Density Lipoproteins* (HDL) (Corder et al. 1993). Darüber hinaus ist es das Hauptlipoprotein des ZNS mit der zweithöchsten Organ-Expressionsrate des Körpers nach der Leber (Linton et al. 1991).

APOE hat 3 Allele: APOE ε2, ε3 und ε4. APOE ε4 repräsentiert den Hauptrisikofaktor für AD bei spätem Erkrankungsalter (*englisch:* Late-Onset Alzheimer's Disease, LOAD), während ε2 als protektiv betrachtet wird (Corder et al. 1993; Roses 1994; Farrer et al. 1997). ε4 ist ebenfalls mit einer höheren Prävalenz der PDD assoziiert (Huang et al. 2006). In einer prospektiven Kohorten Studie mit 212 PD-Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen ε4 und einem schneller fortschreitenden kognitiven Verfall festgestellt werden (Morley et al. 2012). Kurz et al. verfolgten 63 Patienten mit

PD über einen Zeitraum von 9,7 Jahren und zeigten eine Korrelation von APOE-Status und dementieller Entwicklung (2009).
Tsuang et al. verglichen die Häufigkeit des ε4 Allels in einer Post-Mortem-Studie mit Autopsiebefunden von Patienten mit PDD, AD und DLB (2013). Eine positive Korrelation zwischen Allelfrequenz und PDD konnte mit einer *Odds Ratio* (OR) von 3.1 gezeigt werden. Nach Auswertung einer umfassenden neuropsychologischen Testung und APOE-Genotypisierung beurteilten Mata et al. ε4 als Prädiktor der kognitiven Funktion bei PD (2014). 1079 PD-Patienten wurden in den Domänen Gedächtnis, Aufmerksamkeit, Exekutivfunktion, Sprachverarbeitung, visuospatiale Fähigkeiten und globaler kognitiver Funktion überprüft. Bei PDNC-Patienten ist ε4 eher mit Defiziten beim Erlernen von Wörterlisten und mit eingeschränkter verbaler Flüssigkeit verbunden, was dem typischen Muster der frühen Alzheimer-Demenz entspricht. Eine Verstärkung der Alzheimer-typischen Symptome bei PD kann aus neuropathologischer Sicht auf die erhöhte Frequenz von Amyloidplaques bei APOE-ε4-Trägern zurückgeführt werden (Monsell et al. 2014). Während die Ausprägung der motorischen Symptome bei PD weitestgehend unabhängig vom APOE-Status ist, sind Halluzinationen ε4-assoziiert.

1.8.2 Apolipoprotein A1

Bei Apolipoprotein A1 (APOA1) handelt es sich um ein Strukturprotein von HDL im reversen Cholesterolstoffwechsel (Mendez 2010). APOA1 ist weiterhin ein Kofaktor für das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) sowie ein Teil von Chylomikronen (Paula-Lima et al. 2009). APOA1 wird in der Leber und im Dünndarm exprimiert. Es ist außerdem in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und liegt im Liquor und zerebralen Parenchym vor (Merched et al. 2000).

Ein niedriger HDL-Spiegel bzw. ein niedriges Vorkommen von APOA1 korreliert mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für AD (Dias et al. 2014). Bereits identifizierte SNPs bei AD, die auf dem langen Arm von Chromosom 11 lokalisiert sind, nehmen Einfluss auf die Genexpression (Vollbach et al. 2005). Darunter findet sich eine häufige G/A Substitution (rs670), die mit einem erhöhten Krankheitsrisiko für eine frühe AD-Manifestation (*englisch:* Early-Onset Alzheimer's Disease, EOAD) einhergeht.

Smach et al. untersuchten in Anlehnung an Vollbachs Ergebnisse die Bedeutung des 75 Basenpaare (bp) Polymorphismus als Prädisposition für AD bei bereits APOE-genotypisierten Patienten (2011). Der Schweregrad der AD, evaluiert durch den MMST, korreliert unabhängig von Alter, Geschlecht und APOE-Genotyp mit der Kon-

zentration von APOA1. Vorangegangene Studien beschrieben bereits eine geringere Mortalität und verlängerte Überlebenszeit bei hohen APOA1- und HDL-C-Serumspiegeln (van den Kommer et al. 2009; van Vliet et al. 2009). Smach et al. postulierten synergistisch, dass hohe APOA1-Serumspiegel mit geringeren kognitiven Defiziten einhergehen.

In einer Fall-Kontroll-Studie beschrieben Shibata et al. den Zusammenhang zwischen frühem und spätem Erkrankungsalter bei AD und Polymorphismen der Gene APOA1 und Apolipoprotein D (APOD) (2013). Dabei war keine Assoziation der beiden identifizierten intronischen SNPs mit dem Erkrankungsbeginn oder dem allgemeinen AD-Risiko feststellbar. Shibata et al. stellten in Ausblick, dass unklare exonische Promotorpolymorphismen des Gens Einfluss auf EOAD nehmen könnten.

Choi et al. verglichen eine Gruppe von Patienten mit anamnestisch milden kognitiven Defiziten (*englisch:* amnestic Mild Cognitive Impairment, aMCI) mit gesunden Kontrollpersonen in Hinblick auf APOA1-Serumspiegel und Vorhandensein von Amyloidplaques (2015). Basierend auf einer Bildgebung mittels *Pittsburgh Compound B* (PiB) Positronenemissionstomografie wurden die aMCI-Patienten in 2 Subgruppen nach hoher und niedriger Aβ-Last unterteilt (aMCI+, aMCI-). Ein Übergang zur Alzheimer-Demenz wurde bei 26,7% der aMCI+ Patienten beobachtet, während keiner der aMCI- Patienten binnen der Nachfolgedauer von einem Jahr daran erkrankte. Diese Gruppe zeigte ebenso wie die gesunde Kontrollgruppe niedrigere APOA1-Serumspiegel, welche Aβ-unabhängig zur kognitiven Verschlechterung und Hirnatrophie beitrugen. Der Beitrag von APOA1 zur Aβ-unabhängigen Neurodegeneration in Hinblick auf die Ausprägung einer PDD bleibt vorerst offen und erfordert eine weitere Eingrenzung.

1.8.3 Apolipoprotein J

Apolipoprotein J (APOJ), auch Clusterin (CLU) genannt, ist ein multifunktionales Protein, das an zahlreichen Prozessen wie Lipidtransport, Regulierung der Komplementkaskade, Membranrecycling, Zelltod, Immunregulierung, Zelladhäsion und morphologischer Transformation beteiligt ist (Oda et al. 1995). Pathognomonisch betrachtet ist es ein Amyloid-assoziiertes Protein, das mit fibrillären Ablagerungen bei systemischen und lokalisierten Amyloiderkrankungen kolokalisiert.

Bei AD wird Clusterin in Amyloidplaques und zerebrovaskulären Ablagerungen beobachtet. Um zu untersuchen, ob APOJ die regionale Deposition von Aβ steuert, führten

Miners et al. eine Messung von löslichem und unlöslichem APOJ, Aβ40 und Aβ42 in zerebralen Prädilektionsstellen der Amyloidpathologie mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durch (2016). Das APOJ-Level korrelierte mit der lokalen Ablagerung von Aβ. Der Spiegel des löslichen APOJ stieg signifikant mit der zunehmenden Schwere der zerebralen Amyloidangiopathie an und war im frontalen und parietalen Kortex am höchsten bei homozygoten Trägern von APOE ε4.

Das C Allel am Locus rs11136000 des CLU Gens ist der drittstärkste bekannte genetische Risikofaktor für das Auftreten von LOAD hinter APOE ε4 und der deutlich selteneren Variante von *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2* (TREM2) (Rajagopalan et al. 2013; Roussotte et al. 2014). Die rs11136000-Variante wurde simultan von 2 unabhängigen genomweiten Assoziationsstudien (*englisch:* Genome-wide Association Study, GWAS) identifiziert (Harold et al. 2009; Lambert et al. 2009) und später in einer anderen GWAS bestätigt (Wijsman et al. 2011). Das C Allel steht im Zusammenhang mit einem rascheren kognitiven Abbau in präsymptomatischen Stadien der AD-Progression und einer schlechteren Gedächtnisfunktion bei AD-Patienten und gesunden älteren Individuen (Thambisetty et al. 2013; Pedraza et al. 2014).
Yeh et al. identifizierten Apolipoproteine, wie APOJ und APOE, als Liganden von TREM2 (2016). Die Bindung dieser Liganden durch TREM2 war aufgehoben oder reduziert durch AD-assoziierte Mutationen. Überexpression des Wildtyps von TREM2 führte zur verstärkten Aufnahme von LDL, APOJ und APOE in heterologe Zellen, während pathologische Varianten von TREM2 diesen Vorgang beeinträchtigten. Aβ war an Lipoproteine gebunden, dieser Komplex wurde TREM2-vermittelt von Mikroglia aufgenommen.
Mit dem Ziel neurodegenerative Erkrankungen durch *in vivo* Marker zu differenzieren, verglichen Vranová et al. die Liquorspiegel von Tau, Aβ1-42 und Clusterin bei insgesamt 96 Patienten mit PDNC, PDD, DLB und AD. Es konnten höhere Clusterinspiegel für Patienten mit PD ($p=0.005$) und PDD ($p=0.052$) gezeigt werden (2014).

1.8.4 ABCA1

Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) sind Transportproteine, die für den Cholesterolefflux aus dem Zellinneren an die Membranoberfläche verantwortlich sind, wo Lipiddomänen entstehen (Oram 2003). Die Apolipoproteine A1 und E können das präsentierte Cholesterin binden, was zur Bildung von HDL führt (Oram et al. 2008). ABCA1 wird vor allem von Endothelzellen exprimiert.

Wollmer et al. vermuteten, dass die genetische Variabilität von ABCA1 mit der Pathogenese von AD interferiert (2003). Sie stellten fest, dass gesunde ältere Träger des A Allels eines nicht-synonymen SNP (rs2234884) ein um 33% verringertes Gesamtcholesterin gegenüber Nicht-Trägern aufwiesen. Bei 169 LOAD-Patienten war dieses Allel darüber hinaus mit einem durchschnittlich 1,7 Jahre späteren Erkrankungsalter bei Erstdiagnose assoziiert. Es bestand ein signifikanter Einfluss von ABCA1 auf Ablagerung von Aβ im AD-Mausmodell sowie eine Assoziation verschiedener genetischer Polymorphismen mit dem allgemeinen Erkrankungsrisiko für AD (Koldamova et al. 2014).

Im Laufe der letzten 10 Jahre konnten Studien die Bedeutung von ABCA1 als Regulator des APOE-Levels zeigen. Im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie sequenzierten Shibata et al. 3 Gene des Cholesterolstoffwechsels in Bezug auf ihre Rolle als AD-Risikofaktoren (2006). Es handelte sich dabei neben ABCA1 um Cholesterol-24- und -25-Hydroxylase (CH24H, CH25H). Für ABCA1 konnten 4 Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert werden, die in der Promotorregion sowie den Exonen 7, 18 und 35 lokalisiert sind. Im APOE-abhängigen Modell konnte eine signifikante Assoziation von AD mit 2 nicht-synonymen SNPs gezeigt werden: Im Zusammenhang mit dem G Allel am Locus rs2230806 in Abwesenheit von APOE ε4 ($p=0.007$) sowie mit dem A Allel am Locus rs2230808 in Anwesenheit von APOE ε4 ($p=0.038$). Boehm-Cagan et al. verwendeten im Mausmodell das Peptid CS-6253, einen direkten ABCA1-Aktivator *in vitro*, und beobachteten inwiefern es den Grad der Lipidisierung von APOE ε4 *in vivo* beeinflusst (2016). Die Behandlung mit CS-6253 führte zum Rückgang der ε4-gesteuerten Aβ42-Akkumulation und Hyperphosphorylierung von Tau in hippocampalen Neuronen. Synaptische Schäden und kognitive Defizite nahmen außerdem ab. Da pathologische Effekte von ε4 mit Deaktivierung von ABCA1 und verminderter Lipidisierung von ε4 korrelieren, ist es möglich, der zerebralen AD-Pathologie und kognitiven Defiziten durch die Behandlung mit einem ABCA1-Agonisten entgegenzuwirken (Ya und Lu 2017).

1.8.5 VLDLR

Der *Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor* (VLDLR) gehört zur Familie der transmembranen Lipoproteinrezeptoren Typ 1 mit 5 Strukturdomänen. Der Rezeptor wird in Herz, Skelettmuskel, Fettgewebe und ZNS exprimiert, während er in der Leber fehlt. Seine Rolle im Cholesterinstoffwechsel hängt mit dem Metabolismus von Triacylglycerol-reichen Lipoproteinen zusammen, die seinen Liganden, das Apolipo-

protein E, beinhalten. Weiterhin ist er bei der neuronalen Migration im Laufe der Entwicklung von hoher Bedeutung.

Jaeger und Pietrzik untersuchten verschiedene Mitglieder aus der Familie der *Low-Density-Lipoprotein Receptors* (LDLR). Rezeptoren mit hoher Endozytose-Rate verringern die Sekretion von APP bei AD, während die Aβ-Produktion durch verstärkte APP-Internalisierung zunimmt (2008). Rezeptoren, die weniger schnell eingeschleust werden, bedingen ein erhöhtes Vorkommen von APP an der Zelloberfläche durch verstärkte APP-Sekretion und verminderte Aβ-Produktion. VLDLR bindet an extrazelluläre Glykoproteine wie Reelin und F-spondin, was zu einer Phosphorylierung von Adaptorproteinen und einer Aktivierung von Signalkaskaden führt (Divekar et al. 2014). Erhöhte Reelinspiegel konnten bereits mit AD assoziiert werden und die Kaskade des Gens Reelin (RELN), auch als *Downstream Signaling* bezeichnet, wirkt sich neben VLDLR auch auf den Rezeptor 2 von APOE aus (Herring et al. 2012).

Im Zusammenhang mit dem heterogen vererbten Dysäquilibrium-Syndrom, einer Kombination aus einer autosomal rezessiven, nicht-progressiven zerebellären Ataxie und mentaler Retardierung, wiesen Ali et al. die erste homozygote *missense* Mutation bei VLDLR Exon 15 nach (chr9:2650382 G> T) (2012). Diese ist in der extrazellulären Domäne des Rezeptors, dem epidermalen Wachstumsfaktor (*englisch:* Epidermal Growth Factor, EGF), lokalisiert und für die Fehlfaltung des Proteins verantwortlich. Es kommt somit zur Retention im Endoplasmatischen Retikulum und dem Abbau des Proteins, woraus ein Funktionsverlust von VLDLR resultiert.

1.9 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine systematische genetische Untersuchung ausgewählter Apolipoproteine und ihrer Rezeptoren bzw. Transporter bei PDD- und PDNC-Patienten. Ein Vererbungsmuster konnte bei den idiopathischen Parkinson-Syndromen, die etwa 75% ausmachen, bisher nicht identifiziert werden. Bis zu 80% aller Parkinson-Patienten entwickeln im Krankheitsverlauf eine Demenz, wobei die Ursachen ebenfalls weitestgehend unklar sind (Aarsland et al. 2003). Der zerebrale Cholesterinmetabolismus ist dabei für intakte Hirnfunktion mitverantwortlich. Mögliche *missense* oder *nonsense* Mutationen an Gen Loci des Lipidstoffwechsels können zu einer veränderten Proteinstruktur führen, die mit einem Funktionsverlust einhergeht, und zur Ausbildung von kognitiven Defiziten bei PD führt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen bestimmten Einzelnukleotid-Polymorphismen in den selektierten Genen und Exonen und dem Auftreten einer Demenz bei PD besteht. Wie bereits erläutert, liegt eine histopathologische Überschneidung der neurodegenerativen Erkrankungen vor. Nachgewiesene AD-Risikogene, wie APOE und APOJ, standen daher im Fokus dieser Arbeit.

Im Sinne eines genetischen *Screenings* wurden alle kodierenden Abschnitte von APOE, APOA1 und APOJ sequenziert. Zusätzlich wurden ausgewählte Exone von ABCA1 (Exon 7, 18, 35) und VLDLR (Exon 15) untersucht. Die Auswahl der Exone ergab sich aus den unter 1.8.4 und 1.8.5 angeführten Arbeiten von Shibata et al. und Ali et al.. Für ABCA1 konnten durch Erstgenannte 4 Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert werden, die in der Promotorregion sowie den Exonen 7, 18 und 35 lokalisiert sind. Im APOE-abhängigen Modell konnte bereits für AD eine signifikante Assoziation mit 2 nicht-synonymen SNPs gezeigt werden (Shibata et al. 2006), sodass in dieser Arbeit das Auftreten dieser SNPs bei Patienten mit PDD untersucht wurde. Für eine weitere neurodegenerative Erkrankung, dem heterogen vererbten Dysäquilibrium-Syndrom, wiesen Ali et al. die erste homozygote *missense* Mutation bei VLDLR Exon 15 nach (2012). Die daraus resultierende Fehlfunktion des Rezeptors kann möglicherweise ebenfalls in die Pathogenese der PDD involviert sein.
Das Patientenkollektiv (PDD, PDNC) entstammte der Datenbank der longitudinalen LANDSCAPE Studie, als Ausgangsmaterial lag isolierte DNA vor. In dieser Arbeit wurden in einem Ansatz zunächst 47 PDNC-Patienten mit 47 PDD-Patienten verglichen. Dabei wurde im Vorfeld ein *Matching* zwecks höherer Vergleichbarkeit beider Gruppen durchgeführt. Nachdem SNPs im Rahmen der laborchemischen Versuche identifiziert wurden, erfolgte die Berechnung der statistischen Signifikanz in Bezug auf das Vorhandensein einer Demenz bei PD. Die Detektion möglicher Risikogene der PDD und eine Prognose über das Auftreten einer PDD wurden somit in Aussicht gestellt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 3: Liste der Geräte und Anlagen

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammer	E-PB 0	Febikon GmbH, Wermelskirchen, Deutschland
Feinwaage	SC2020	Scout/Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Geldokumentationssystem	Transilluminator	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Mehrkanalpipette	Finnpipette® 0,5-10 µl 5-50 µl	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Mikrowelle	Continent MW 800	GGV Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Kaarst, Deutschland
Pipette	Eppendorf® Research® plus 2-20 µl 20-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette	Finnpipette® 0,2-2 µl 20-200 µl 200-1000 µl	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Power Supply/Netzgerät	PowerPac™ Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spektrometer	NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermocycler für Polymerase-Kettenreaktion	MyCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vortex-Schüttler	444-1372	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5414D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	PicoFuge	Stratagene, CA, USA

Tabelle 4: Verwendete Materialien für die Polymerase-Kettenreaktion

Produkt	Bezug
Biosphere® Filter Tips 0,1-10 µl 2-20 µl 2-100 µl 100-1000 µl	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Tubes® 5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Glycerol	Fluka Analytical/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Streifen, 1 x 8 Gefäße 0,2 ml, ohne Deckel	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
peqGOLD dNTP-set	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Platinum™ Taq DNA Polymerase (mit gebrauchsfertigen Puffern S/Y)	Invitrogen (Life Technologies), CA, USA
Reagiergefäß 1,5 ml SafeSeal	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Strip-Cap für 8 Gefäße	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Taq DNA Polymerase 250 u	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Water for molecular biology, DEPC-treated, sterile filtered	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
96 PCR-Platte randlos	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Materialien für die Gelelektrophorese

Produkt	Bezug
Aqua destillata	membraPure GmbH, Berlin, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Borsäure H_3BO_3 (61,83 g/mol)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
DNA Gel Loading Dye (6x)	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), MA, USA
EDTA disodium salt (372,24 g/mol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (10.000 x concentrate in DMSO)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Tris base [tris(hydroxymethyl)aminomethane] (121,14 g/mol)	Acros Organics (Thermo Fisher Scientific), MA, USA
100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, MA, USA

Tabelle 6: Verwendeter Kit

Name	Bezug
PCR/DNA Clean-Up DNA Purification Kit	roboklon/EURx, Gdansk, Polen

Tabelle 7: Verwendete *Primer* von Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland. ABCA1 = *Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1*; APOA1 = Apolipoprotein 1; APOE = Apolipoprotein E; APOJ = Apolipoprotein J; Ex = Exon; Temp = Anlagerungstemperatur in °C; VLDLR = *Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor*.

Gen	**Exon**	**forward Primer**	**reverse Primer**	**Temp (°C)**
APOA1	Ex2	AGGTCTTCTCCCGCTCTGTG	CTGAGATCTGAGCCGAAAGG	60,5
APOA1	Ex3	GAGGCAGCAGGTTTCTCACT	GGGCCCAGCTCATCAGATAT	59
APOA1	Ex4	TAGTCCCAGCTCTGTCTC	AGCTGCTTCCCACTTTGG	57
APOE	Ex 2	CAGGGTCTGCCTGAATGG	GAAGGCTAACCTGGGGTGA	60
APOE	Ex 3	ACAGGGGCAGAATGAAACCT	TTTGTGGAGCACCTTCTGTG	62
APOE	Ex 4A	ACCTGCTCCTTCACCTCGT	CCGTTCCTTCTCTCCCTCTT	58,5
APOE	Ex 4B	ACTAGGGTCCACCCCAGGAG	ACGAGGTGAAGGAGCAGGT	62
APOJ	Ex1	GGCCTGATAGAGAGGCACTG	GTGTCCATGGCAAGTCTGGT	60
APOJ	Ex2	TAATTGCAGCCTCAGCATCA	TGACAGCCCCTGAACTGAAC	60
APOJ	Ex3	GCATGCGGAATGAAGCATA	GGAGCAAGGGTAGGCACTT	60
APOJ	Ex4	CCCTTGTGATATTGCTGGAGA	GCTGTTGGTCACTTGCTGTG	62
APOJ	Ex5	AAGGCAGCACCAGTGAGG	CAGAGTGAGACCCTGTCTGTAAA	65↓0,5
APOJ	Ex6	AGCCTTCCCTTCACACTTCT	TGCCGTGTGATAAATGCTCAG	55
APOJ	Ex7	GCTTTCCGCGGCATTCTTT	CCAAGACACATTTGCGAAAGG	59
APOJ	Ex8	GGGAAGCAGCAACTCAACAT	CCAAGAACAAAGCCAGGAAG	60
ABCA1	Ex7	CCTGATGCATTGGACTGTTGC	TGGCCCAAAAGTCTGAAAGAAC	59
ABCA1	Ex18	TTAGCTCCCTCTTTCCCCAC	TTGGAAAGGGACACTGCATG	58
ABCA1	Ex35	ACTACACCGTACTGCCTCAC	GTCACTTGGTTCTCAGGAGC	59
VLDLR	Ex15	ACCCGGCATACAATAGCAGA	CATGCTGCCTGTACCTGTAT	57

Verwendete Puffer

10x Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure (TBE)

Der Puffer wird mit destilliertem Wasser aus der Reinstwasseranlage (Astacus, membraPure GmbH) angesetzt.

108 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) base (121,14 g/mol)

55 g Borsäure H_3BO_3 (61,83 g/mol)

7,5 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) disodium salt (372,24 g/mol)

Lösen in 800 ml destilliertem Wasser, auffüllen auf 1 Liter. Eventuell Erhitzen zwecks Lösung. Lagerung bei Raumtemperatur.

Elektrophorese Ladepuffer

250 µl 6x Loading Dye mit 250 µl H_2O vermischen, ergibt 3x Loading Dye.

Lagerung bei 4-8 °C.

2.2 Methoden

2.2.1 Konzentrationsmessung mit dem NanoDrop

Es handelt sich bei dem Gerät um ein Mikrovolumen-Spektrometer, das die Extinktion der DNA-Probe bei 260 nm misst. Die allgemeine Funktionsweise beruht auf der Absorption von UV-Licht durch Nukleotide (Stoscheck 1990). Die Reinheit der DNA wird zusätzlich über den Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt (A260/A280). Da dieser Quotient bei den Messungen dieser Arbeit stets kleiner 1,8 betrug, konnte eine Kontamination der Proben ausgeschlossen werden. Die Quantifizierung des DNA-Gehalts der Proben ist ein wichtiger präanalytischer Vorgang vor Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (*englisch:* Polymerase Chain Reaction, PCR). Die Ausgangskonzentration der DNA-Proben lag bei ungefähr 100 ng/µl. Es erfolgte eine Verdünnung auf 10 ng/µl zur Verwendung für die PCR.

2.2.2 *Primer*-Design

Als Ansatzpunkt der DNA-Polymerase bei der Polymerase-Kettenreaktion werden sogenannte *Primer* benötigt. Dabei handelt es sich um spezifische Oligonukleotide mit einer Länge von 18 bis 24 Basen, die sich an die komplementäre Sequenz der Matrizen-DNA anlagern. Entscheidend ist dabei, dass sich *Primer* mit einer ausreichenden Stabilität an eine bestimmte Stelle der Matrize anlagern und somit den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt festlegen.
Das individuelle *Primer*-Design der zu sequenzierenden Exone erfolgte mit dem PC-Programm Primer3web version 4.0.0 (http://primer3.ut.ee/).
Mit Hilfe der Online-Datenbank Genatlas (http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/imagine/gene.php?menu=gene) können die kodierenden Exone der zu untersuchenden Gene eingesehen werden und Basen aus den Anfangsregionen der Exone in das Primer3web-Programm kopiert werden. Das Programm erzeugt einen komplementären *Primer*. Es wurden für jedes Exon ein Vorwärts- (*englisch:* forward) und Rückwärts- (*englisch:* reverse) *Primer* erstellt. Der Unterschied der beiden *Primer* besteht dabei in der entgegengesetzten Leserichtung. Die Charakteristika der *Primer* mit ihrer Sequenz und Anlagerungstemperatur sind in Tab. 7 aufgeführt.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Das Verfahren der PCR dient der *In-vitro*-Amplifizierung eines bestimmten DNA-Abschnitts und wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt (Saiki et al. 1985). Die Voraussetzung ist dabei das Vorhandensein der zu amplifizierenden DNA und *forward*- sowie *reverse-Primer*, die als Reaktionszünder dienen. Eine DNA-Polymerase synthetisiert den komplementären Strang zu den ausgewählten Exonen und durch mehrmalige Wiederholung wird eine hohe Vervielfältigungsrate erreicht. Im Anschluss daran wird die Gelelektrophorese zum Sichtbarmachen der Amplikons verwendet (Ansorge und Labeit 1984).

Der Reaktionsansatz für die PCR setzt sich aus dem *Primer*-Gemisch (*forward*- und *reverse-Primer*) und Nukleotiden in ihrer Desoxyform (Desoxyribonukleosidtriphosphate, dNTPs) sowie einer hitzestabilen DNA-Polymerase zusammen (Chen und Janes 2002). Letztere kann kurzfristig auch Temperaturen von über 90 °C standhalten und benötigt die Zugabe eines passenden Puffers, der einen bestimmten pH-Wert und Salzgehalt vorgibt. Die hier verwendete Taq-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, dessen natürlicher Lebensraum im hohen Temperaturgebiet liegt. Das Arbeitsoptimum befindet sich bei 72 °C. Diese Temperatur wird im PCR-Zyklus für die Dauer der Elongation konstant aufrecht erhalten.

Tabelle 8: Beispielhafte Zusammensetzung für einen 25 µl Mastermix. DNA = Desoxyribonukleinsäure; dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphate.

H_2O	16,4 µl
Puffer S	2,5 µl
dNTP 2 mM	2,5 µl
Primer Mix 10 µM	1,0 µl
Taq Polymerase	0,1 µl
DNA 10 ng/µl	2,5 µl

Die hier eingesetzte DNA-Menge variierte zwischen 20 und 50 ng, dementsprechend betrugen die Volumina zwischen 2,0 und 5,0 µl. Die H_2O-Menge wurde angepasst und auf 25 µl ergänzt. In einigen Fällen wurden Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glycerol, gemischt im Verhältnis 1:1, zugegeben, um die Spezifität der PCR zu erhöhen. Nach der DNA-Zugabe zum vorgelegten Mastermix auf einer 96-Well-Platte und anschließendem Durchmischen sowie Zentrifugieren wurde die Platte auf die PCR-Maschine gestellt. Die jeweiligen Protokolle sind der Tab. 9 zu entnehmen.

Der PCR-Zyklus gliederte sich in folgende Schritte:

1. Denaturierung und Auftrennung des DNA-Doppelstrangs in 2 Einzelstränge bei 95/96°C
2. Anlagerung (*englisch:* Annealing) spezifischer *forward-* bzw. *reverse-Primer* am 5‘- und 3‘-Ende des zu amplifizierenden Bereiches an den Einzelsträngen, Temperatur individuell verschieden (siehe Tab. 7)
3. Elongation durch die DNA-Polymerase bei 72 °C

Ab der Bindungsstelle der *Primer* können die komplementären Stränge in 5‘-Richtung synthetisiert werden, bis die Polymerase vom Strang abfällt oder die Reaktion durch Temperaturerhöhung unterbrochen wird. Der betreffende Abschnitt wurde somit amplifiziert und die Anzahl der weiteren Zyklen (32 bis 40 Wiederholungen) regelt die Menge der zu erstellenden DNA.

Beispiel für PCR-Programm:

95 °C – 3 min
95 °C – 15 sec
55 °C – 15 sec } 32 - 40x
72 °C – 45 sec
72 °C – 6 min
4 °C – ∞

Als Nebenprodukt des gewünschten Amplikons entstehen darüber hinaus weitere DNA-Stücke, die aufgrund des mangelnden Stopp-Signals länger sind als dieses.

Tabelle 9: Übersicht über die PCR-Protokolle. ABCA1 = *Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1*; APOA1 = Apolipoprotein 1; APOE = Apolipoprotein E; APOJ = Apolipoprotein J; Ex = Exon; PCR = *Polymerase Chain Reaction*; VLDLR = *Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor*.

APOA1	**PCR Protokoll**
Ex2	96°C-10min, 35 Zyklen (96°C-45s, 60,5°C-50s, 72°C-45s), 72°C-5min, 4°C - ∞
Ex3	95°C-3min, 36 Zyklen (95°C-15s, 59°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex4	96°C-10min, 35 Zyklen (96°C-45s, 57°C-45s, 72°C-55s), 72°C-8min, 4°C - ∞
APOE	
Ex 2	95°C-3min, 40 Zyklen (95°C-15s, 60°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex 3	95°C-3min, 36 Zyklen (95°C-15s, 62°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex 4	95°C-3min, 40 Zyklen (95°C-15s, 58,5°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
APOJ	
Ex1	95°C-3min, 40 Zyklen (95°C-15s, 60°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex2	95°C-3min, 40 Zyklen (95°C-15s, 60°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex3	95°C-3min, 40 Zyklen (95°C-15s, 60°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex4	95°C-3min, 32 Zyklen (95°C-15s, 62°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex5 Touchdown	95°C-3min, 30 Zyklen (95°C-15s, 65°C↓0,5°C-15s, 72°C-45s), 20 Zyklen (95°C-15s, 50°C-15s, 72°C-45s), 72°C-7min, 4°C - ∞
Ex6	95°C-3min, 32 Zyklen (95°C-15s, 55°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex7	95°C-3min, 36 Zyklen (95°C-15s, 59°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex8	95°C-3min, 40 Zyklen (95°C-15s, 60°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
ABCA1	
Ex7	95°C-3min, 36 Zyklen (95°C-15s, 59°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex18	95°C-3min, 36 Zyklen (95°C-15s, 58°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
Ex35	95°C-3min, 36 Zyklen (95°C-15s, 59°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞
VLDLR	
Ex15	95°C-3min, 40 Zyklen (95°C-15s, 57°C-15s, 72°C-45s), 72°C-6min, 4°C - ∞

Anmerkung zu APOJ Exon 5: Es wurde eine sogenannte *Touchdown-PCR* durchgeführt. Es handelt es sich dabei um eine Variante der PCR, bei der eine unspezifische Amplifizierung durch die *Primer* gezielt unterbunden werden soll (Don et al. 1991). Der Schmelzpunkt des *Primers* legt dabei die Obergrenze der zu wählenden Anlagerungstemperatur fest (Roux 1994). Die hoch spezifische Basenpaarung zwischen *Primer* und Matrize ist bei Temperaturen, die knapp unter diesem Punkt liegen, möglich. Die Spezifität der Bindung nimmt mit sinkender Temperatur ab. Wenn viele unspezifische Sequenzen in frühen Schritten der Amplifizierung entstehen, verdrängen diese die spezifische Amplikons durch die exponentielle Vervielfältigungsaktivität der Polymerase. Die *Touchdown-PCR* erhöht daher die Spezifität der Reaktion bei hohen Temperaturen

und ermöglicht eine hohe Effizienz gegen Ende der Reaktion durch Absenken der Anlagerungstemperatur (Hecker und Roux 1996).

2.2.4 Gelelektrophorese

An die PCR schließt sich die Gelelektrophorese an. Dieses Verfahren dient zur Auftrennung von geladenen Makromolekülen zwischen 0,5 und 25 kb und erfolgt auf einem Träger-Gel durch das Anlegen einer elektrischen Spannung (Olsson et al. 1984; Mülhardt 2006, Kapitel 4.1). Jedes Molekül entwickelt eine spezifische Wanderungsgeschwindigkeit, abhängig von seiner Größe, Form und Nettoladung in Bezug auf den pH-Wert (Clark et al. 2009, Kapitel 2). Im Gel nimmt die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente mit zunehmender Größe ab.

Das hier verwendete 1,5%-Agarose-Gel diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten, die mehr als 500 Nukleotide umfassen. Die Agarose wurde mit 1x TBE-Puffer zum Kochen gebracht und nach Zugabe von SYBR® Gold zum Aushärten in eine Form gegossen. Die 5 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl 3x Loading Dye vermischt und nach Einlegen des Trägers in die Kammer in die einzelnen Taschen aufgetragen. Es wurden dabei Stichproben ausgewählt (eine Probe je Spalte) sowie stets die Negativkontrolle aufgetragen. Für 90 min wurde eine Spannung von 110 Volt angelegt. Da die Nukleotide der DNA negative Ladungen tragen, wandern sie im elektrischen Feld zu Anode. Als Referenz wurde eine 100 bp Leiter (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) aufgetragen. Nach der Laufzeit wurde das Gel in einem Geldokumentationssystem mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm beleuchtet. Die Fragmente konnten dank der Zugabe von SYBR® Gold via Fluoreszenz sichtbar gemacht und überprüft werden. Das Ergebnis der Elektrophorese waren Exon-spezifische Banden, die somit die Spezifität der *Primer* und ein sauberes PCR-Produkt belegten.

2.2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden zur Vorbereitung der Sequenzierung mit einem PCR/DNA Clean-Up DNA Purification Kit des Herstellers roboklon/EURx aufgereinigt. Dieser Vorgang dient der Entfernung der während der PCR benötigten Oligonukleotide, dNTPs, Salze, Polymerase und Puffer.
Bei der zugrunde liegenden chromatographischen Reinigung werden Molekularsiebsäulen, sogenannte *spin-columns*, verwendet (Kaltenböck 2008, Kapitel 2). Die Poren-

größe des Siebs reguliert die Auftrennung des Gemischs. Die Zentrifugation dient als Beschleunigung der Wasch-Schritte mit verschiedenen Puffern.

Aufreinigungsprotokoll nach Herstellerempfehlung:

1. Je 40 µl Buffer DX auf die Säule pipettieren zur Aktivierung der Membran
2. 20 µl PCR-Produkt und 400 µl Orange DX Buffer mischen in 1,5 ml Eppendorf Tube und auf Säule geben
3. Zentrifugieren 1 min/12.000 rpm mit Eppendorf Centrifuge 5414D
4. Durchfluss verwerfen, Säule wieder auf Sammelgefäß stecken
5. 500 µl Wash DX1 Buffer auf Säule geben, zentrifugieren 1 min/12.000 rpm
6. Durchfluss verwerfen, Säule wieder auf Sammelgefäß stecken
7. 650 µl Wash DX2 Buffer auf Säule geben, zentrifugieren 1 min/12.000 rpm
8. Durchfluss verwerfen, Säule wieder auf Sammelgefäß stecken
9. Zentrifugieren 2 min/12.000 rpm
10. Säule auf 1,5 ml Eppendorf Tube stecken, Sammelgefäß verwerfen
11. 30 µl Elution Buffer auf die Säule geben, 2 min bei Raumtemperatur inkubieren
12. Zentrifugieren 1 min/12.000 rpm, Säule verwerfen. Aufgereinigtes PCR-Produkt kann verwendet werden, Lagerung bei 8 °C

2.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger, auch Didesoxymethode genannt, durchgeführt. Das zugrunde liegende Prinzip ist die Verlängerung eines DNA-Strangs mit einer Polymerase in Gegenwart von *Primern* und Nukleotiden, wobei hier neben Desoxyribonukleotiden (dNTPs) auch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) zugegeben werden (Sanger et al. 1977). DNA-Polymerasen können ddNTPs ebenso wie dNTPs einbauen, wobei bei ddNTPs die 3‘-OH-Gruppen durch ein einzelnes H ersetzt sind (Horn und Moc 2015, Kapitel 12.2). Diese sind für die Ausbildung von Phosphodiesterbrücken und die Polymerisation erforderlich. Es kommt somit zum Kettenabbruch bei ddNTP-Einbau, welche zusätzlich mit 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Pro Matrize werden 4 Reaktionen durchgeführt mit je einem der 4 ddNTPs. Das Verhältnis dNTP zu ddNTP ist von hoher Bedeutung, damit die entstehenden markierten Stränge eine Abfolge von Molekülen mit einer Länge von bis zu mehreren 1000 Basen und definiertem Endpunkt bilden (Alphey 1998, Kapitel 3.2). Da genügend DNA-Moleküle im Reaktionsansatz vorhanden sind, ist davon auszugehen, dass es an jeder Basenposition zum Kettenabbruch kommt.

Im nächsten Schritt kommt es zur Auftrennung der Moleküle nach ihrer Größe mittels einer hochauflösenden denaturierenden Gelelektrophorese, wobei ein Polyacrylamidgel verwendet wird. Durch die Reihenfolge der Farben erschließt sich die Abfolge der eingebauten ddNTPs, woraus man die zu analysierende DNA-Sequenz ablesen kann.

Gliederung der Sequenzierung in folgende Schritte (Alphey 1998, Kapitel 3.2):

1. Denaturierung bei 94-96 °C
2. *Annealing* des *Primers* (in diesem Fall *forward-Primer*)
3. Markierungsreaktion: Zugabe von dNTPs, Puffer und DNA-Polymerase
4. Terminationsreaktion: Aufteilung der Reaktion auf 4 Gefäße, Zugabe weiterer dNTPs und jeweils eines ddNTP (farbmarkiert)
5. Elongation erfolgt bis zum Kettenabbruch
6. Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese
7. Autoradiographische Darstellung und Ablesen der Nukleotidsequenz

Die Sequenzierung erfolgte extern durch den Sequenzier-Service von Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland. Zu 15 µl des aufgereinigten PCR-Produkts wurden 2 µl des *forward*-oder *reverse-Primers* mit einer Konzentration von 2 mM hinzugegeben und die Proben anschließend versendet.

2.2.7 Patientenkollektiv

Als Ausgangsmaterial wurde isolierte DNA aus Blut-Proben von PDD- und PDNC-Patienten aus der Datenbank der fortlaufenden longitudinalen LANDSCAPE Studie verwendet (Balzer-Geldsetzer et al. 2011). Es erfolgte eine Fallzahlschätzung bei geplanter Untersuchung der Häufigkeitsverteilung (Chi-Quadrat) bei Annahme einer großen Effektstärke (d=0.5) und einer Power von 0.8 nach Bortz und Döring (Bortz und Döring 2006, Kapitel 9.2), die eine Fallzahl von 47 ergab. Dementsprechend wurde eine Kontrollgrupppe von 47 PDNC-Patienten gebildet.

Vorläufer der *Follow-up* LANDSCAPE Studie war die DEMPARK Studie, die im März 2011 604 Parkinson-Patienten umfasste, von welchen 56,3% an PDNC erkrankt waren, 30,6% zusätzlich an milden kognitiven Defiziten (MCI) litten und bei 13,1% eine manifeste Demenz (PDD) vorlag (Balzer-Geldsetzer et al. 2011).

Ziel der Studie war es, das natürliche Fortschreiten der kognitiven Beeinträchtigung bei Patienten mit PD zu charakterisieren und beeinflussende Faktoren zu identifizieren. Zu

diesem Zweck wurden Patienten mit PDNC, MCI und PDD eingeschlossen und mittels standardisierter Testverfahren wie der Magnetresonanztomographie (MRT) sowie genetischen und proteomischen Methoden untersucht. Um an der Studie teilzunehmen, mussten die Teilnehmer den UKBB Kriterien einer idiopathischen PD entsprechen (Hughes et al. 2002). Patienten mit MCI unterlagen den Petersen-Kriterien (2004), Patienten mit PDD den Richtlinien nach Emre et al. (2007). Jeder Teilnehmer durchlief eine umfangreiche neuropsychologische Testung. Die Studie wurde in Anlehnung an die Deklaration von Helsinki geführt (Goodyear et al. 2007).

In dieser Arbeit wurden in einem Ansatz, wie oben erläutert, 47 PDNC-Patienten mit 47 PDD-Patienten verglichen. Dabei wurde ein *Matching* anhand der Kriterien Geschlecht, ≥ 6 Jahre Erkrankungsdauer und ± 7 Jahre Altersdifferenz durchgeführt. Die Patientencharakteristika sind nachfolgend in Tab. 10 aufgeführt.

2.2.8 Ethikvotum

Ein positives Ethikvotum für die LANDSCAPE bzw. DEMPARK Studie wurde durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg am 18.06.2011 erteilt (Aktenzeichen 25/11).

Tabelle 10: Auflistung der Patientencharakteristika und Plattenbelegung.
No = Nummer; Plate = Plattenbelegung A1-H12; ID Dem = ID gemäß DEMPARK Register; ID Tü = ID gemäß Tübinger Register; Dis = Erkrankungstyp (1 = PDNC, 3 = PDD); Age = Alter zum Zeitpunkt der Erfassung in Jahren; Sex = Geschlecht (1 = männlich, 2 = weiblich); Dur = Erkrankungsdauer in Jahren; MMSE = *Mini Mental State Examination*/Status Test, Testergebnis in Punkten (max. 30); AgeOn = Alter in Jahren bei Erstdiagnose M. Parkinson; H&Y = Hoehn & Yahr Klassifikation der Erkrankungsstadien (1-5).

No	Plate	ID Dem	ID Tü	Dis	Age	Sex	Dur	MMSE	AgeOn	H&Y
1	A1	aaa0XX	187XX	1	68	1	7	30	61	2
2	A2	evm0XX	214XX	1	64	1	12	26	52	2
3	A3	mbd3XX	180XX	1	74	1	6	30	64	2
4	A4	tni4XX	177XX	1	73	1	8	29	63	2
5	A5	usr6XX	187XX	1	71	1	6	29	65	1
6	A6	phl7XX	214XX	1	76	2	9	29	66	2
7	A7	aqs6XX	183XX	3	77	1	10	27	65	4
8	A8	hbv6XX	174XX	3	76	1	12	20	63	4
9	A9	ouo2XX	152XX	3	78	1	7	24	67	2
10	A10	vpi9XX	193XX	3	71	1	10	23	59	2
11	A11	aay0XX	222XX	3	70	2	10	28	---	3
12	A12	mej2XX	151XX	3	68	2	9	26	57	3
13	B1	aaa0XX	218XX	1	76	1	7	29	67	2
14	B2	fze8XX	187XX	1	73	1	8	28	64	2
15	B3	msj3XX	183XX	1	69	1	14	28	54	4
16	B4	urp0XX	214XX	1	71	1	8	29	63	1
17	B5	aaa0XX	174XX	1	65	2	10	28	54	3
18	B6	sah2XX	221XX	1	58	2	7	28	48	1
19	B7	atf5XX	186XX	3	75	1	7	24	68	2
20	B8	iiw6XX	159XX	3	78	1	10	23	66	3
21	B9	pbn7XX	164XX	3	71	1	20	26	49	3
22	B10	vus7XX	194XX	3	72	1	7	28	62	2
23	B11	ahx7XX	182XX	3	68	2	13	25	54	2
24	B12	nqs1XX	172XX	3	70	2	9	28	60	3
25	C1	aaa0XX	186XX	1	71	1	17	29	54	4
26	C2	gcx9XX	185XX	1	73	1	11	29	61	3
27	C3	rbl9XX	183XX	1	71	1	12	28	56	3
28	C4	vdz6XX	175XX	1	61	1	12	28	46	3
29	C5	aaa6XX	187XX	1	70	2	7	29	62	2
30	C6	vcv1XX	193XX	1	76	2	11	29	64	2
31	C7	bcr6XX	184XX	3	76	1	7	23	66	3
32	C8	izc1XX	171XX	3	76	1	13	27	61	3
33	C9	pio3XX	182XX	3	78	1	13	23	64	3
34	C10	wbs1XX	182XX	3	74	1	24	25	44	3
35	C11	gtu9XX	167XX	3	69	2	9	24	50	3
36	C12	sfe0XX	180XX	3	78	2	10	24	67	2

No	Plate	ID Dem	ID Tü	Dis	Age	Sex	Dur	MMSE	AgeOn	H&Y
37	D1	aaf0XX	220XX	1	74	1	14	29	58	2
38	D2	gko0XX	231XX	1	71	1	16	---	---	---
39	D3	rst8XX	218XX	1	68	1	7	29	60	3
40	D4	vmd5XX	214XX	1	63	1	11	29	50	3
41	D5	kab2XX	231XX	1	73	2	9	29	65	3
42	D6	wch7XX	172XX	1	68	2	8	28	58	2
43	D7	cxb5XX	183XX	3	62	1	18	29	43	3
44	D8	jjy8XX	178XX	3	79	1	15	18	64	3
45	D9	pqf3XX	154XX	3	79	1	7	21	70	3
46	D10	wtq5XX	186XX	3	73	1	12	27	60	3
47	D11	gxc5XX	195XX	3	70	2	23	26	47	4
48	D12	vjl9XX	171XX	3	81	2	9	29	71	3
49	E1	aao9XX	193XX	1	65	1	13	27	51	2
50	E2	hat6XX	192XX	1	76	1	7	30	---	3
51	E3	rye9XX	182XX	1	61	1	7	29	53	1
52	E4	vwx2XX	231XX	1	70	1	15	29	52	2
53	E5	kxl8XX	193XX	1	80	2	7	30	71	2
54	E6	xwj8XX	175XX	1	72	2	13	26	54	2
55	E7	dpo8XX	180XX	3	73	1	17	25	55	2
56	E8	jln9XX	188XX	3	68	1	11	26	---	5
57	E9	qbm3XX	171XX	3	75	1	13	28	61	3
58	E10	xph0XX	196XX	3	75	1	22	24	53	3
59	E11	hzq6XX	174XX	3	74	2	11	18	62	4
60	E12	zzl5XX	221XX	3	63	2	7	22	56	2
61	F1	bgy4XX	179XX	1	64	1	9	29	52	2
62	F2	icw8XX	175XX	1	67	1	9	27	55	1
63	F3	sse6XX	197XX	1	77	1	9	25	67	2
64	F4	---	---	---	---	---	---	---	---	---
65	F5	laa8XX	192XX	1	70	2	8	29	62	3
66	F6	yxx8XX	209XX	1	79	2	11	30	65	3
67	F7	fkd8XX	183XX	3	67	1	8	25	58	2
68	F8	mjg5XX	221XX	3	72	1	22	23	50	2
69	F9	tnw3XX	179XX	3	72	1	12	26	59	3
70	F10	xvs8XX	175XX	3	73	1	10	26	49	3
71	F11	kmz1XX	193XX	3	70	2	13	---	---	---
72	F12	bsu5XX	183XX	3	74	2	6	28	68	3

No	Plate	ID Dem	ID Tü	Dis	Age	Sex	Dur	MMSE	AgeOn	H&Y
73	G1	can5XX	220XX	1	78	1	7	29	68	3
74	G2	jze0XX	218XX	1	75	1	9	28	65	3
75	G3	tci8XX	221XX	1	62	1	17	29	43	2
76	G4	yao7XX	214XX	1	73	1	9	28	63	2
77	G5	ldg0XX	183XX	1	60	2	12	29	30	2
78	G6	zho8XX	222XX	1	61	2	6	26	53	2
79	G7	fur2XX	195XX	3	75	1	14	24	59	3
80	G8	mmb2XX	231XX	3	61	1	12	28	48	3
81	G9	tpm4XX	187XX	3	65	1	15	26	50	2
82	G10	ybe2XX	231XX	3	73	1	6	30	66	5
83	G11	kto6XX	231XX	3	67	2	9	29	57	5
84	G12	---	---	---	---	---	---	---	---	---
85	H1	cba1XX	182XX	1	69	1	14	26	54	3
86	H2	kxw2XX	181XX	1	64	1	7	30	55	3
87	H3	tgt7XX	231XX	1	71	1	11	27	58	3
88	H4	ygp3XX	231XX	1	63	1	12	30	49	2
89	H5	ldk2XX	183XX	1	65	2	9	30	55	3
90	H6	aab6XX	191XX	3	72	1	9	25	62	4
91	H7	gye3XX	191XX	3	71	1	20	27	49	3
92	H8	olw4XX	176XX	3	75	1	6	21	64	4
93	H9	vlb2XX	160XX	3	71	1	20	22	50	4
94	H10	yml2XX	168XX	3	66	1	12	---	---	---
95	H11	lmm5XX	182XX	3	79	2	13	28	65	3
96	H12	---	---	---	---	---	---	---	---	---

2.2.9 Statistik

Hinsichtlich der Schätzung des Stichprobenumfangs lagen zunächst keine vergleichbaren Daten aus anderen Studien vor. Da eine Untersuchung von 5 Genen geplant war, wurde eine Bonferroni-Korrektur von α auf 0.05/5 = 0.01 durchgeführt. Wie unter 2.2.7 erläutert, erfolgte eine Fallzahlschätzung bei geplanter Untersuchung der Häufigkeitsverteilung (Chi-Quadrat) bei Annahme einer großen Effektstärke (d=0.5) und einer Power von 0.8 nach Bortz und Döring (Bortz und Döring 2006, Kapitel 9.2), die eine Fallzahl von 47 ergab. Dementsprechend wurde eine Kontrollgrupppe von 47 PDNC-Patienten gebildet.

Als Analyse-Software wurde SPSS von IBM verwendet. Nach Einpflegen der Patientendaten erfolgte die Definition der Variablen. Der Chi-Quadrat-Test aus der Gruppe Hypothesentests wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanz herangezogen (McHugh 2013). Grundlegend beobachtet man dabei 2 statistische Merkmale, in diesem Fall einen SNP und das Vorliegen einer PDD. In Bezug auf die vorliegende Arbeit lautete die Nullhypothese dementsprechend, dass kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines spezifischen SNPs und dem Vorliegen einer PDD besteht. Die Alternativhypothese hingegen bejahte den Zusammenhang bzw. die Abhängigkeit. Zu Beginn erfolgte nun die Berechnung der absoluten und relativen Häufigkeiten bzw. die Analyse der Merkmalsverteilung, wovon ausgehend die Wahrscheinlichkeiten ermittelt wurden. Dabei war eine Mindestgröße für jede erwartete Häufigkeit entscheidend, die in dieser Arbeit bei 5 lag. Wenn dieser Fall eintrat, wurde auf den exakten Test nach Fisher zurückgegriffen, der keine Voraussetzungen an den Stichprobenumfang stellt (Mehta und Patel 1986). Das Resultat sind verlässliche Ergebnisse, auch bei einer kleinen Anzahl von Beobachtungen. Eine weitere Voraussetzung für beide Tests besteht darin, dass die Stichprobe zufällig entnommen sein muss. Als Limitation war ein begrenzter Umfang der Stichprobe zu betrachten, was Gegenstand der Diskussion sein wird.

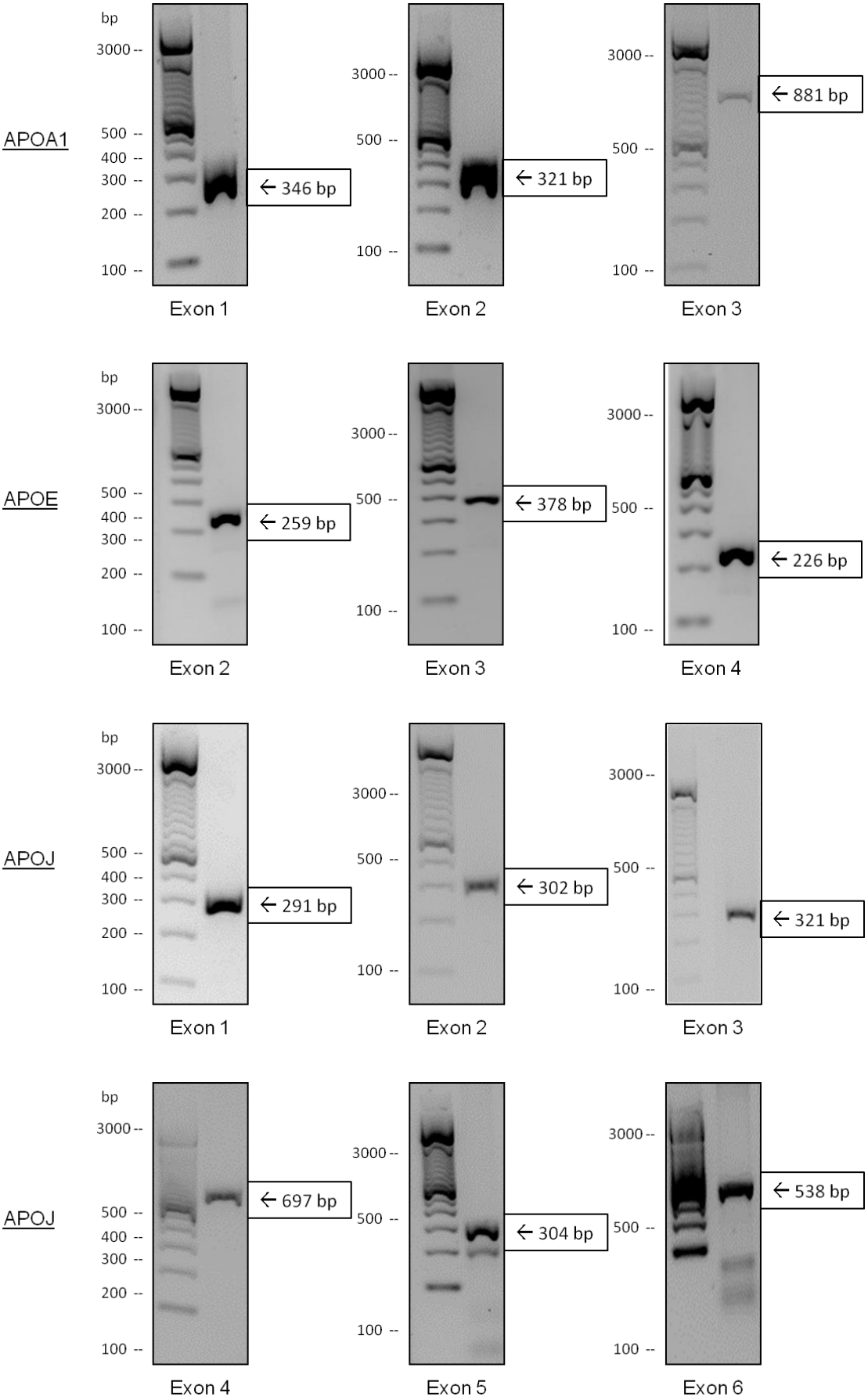
3. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Genanalyse wurden 5 Gene des Cholesterinmetabolismus untersucht und insgesamt 8 SNPs identifiziert.

Bereits isolierte DNA von PD-Patienten aus der Datenbank der DEMPARK bzw. LANDSCAPE Studie stellte das Ausgangsmaterial der Untersuchungen dar. Im Rahmen eines *Matchings* wurden 47 Paare von Patienten mit PDD und PDNC gebildet, um eine höhere Vergleichbarkeit beider Gruppen zu erzielen und eine optimale Selektion der Kontrollen zu gewährleisten. Als Merkmale wurden dabei das Geschlecht, die Erkrankungsdauer (≥ 6 Jahre) sowie die Altersdifferenz (± 7 Jahre) ausgewählt, um diese als Risikofaktoren in den Hintergrund treten zu lassen und primär genetische Mutationen zu betrachten.

Wie unter 1.8 erläutert, lag der Fokus der laborchemischen Versuche auf den Apolipoproteinen: Bei APOA1, APOE und APOJ wurden alle kodierenden Exone analysiert, während bei ABCA1 die Exone 7, 18 und 35 sowie bei VLDLR ausschließlich Exon 15 untersucht wurden. Die Eingrenzung der genannten Exone bei ABCA1 und VLDLR beruhte auf den Publikationen von Shibata et al. und Ali et al. (siehe 1.8.4, 1.8.5).

Nach Konzentrationsbestimmung der Patienten-DNA mittels NanoDrop wurden für jedes Exon 2 spezifische *Primer* designt und zunächst an Stichproben getestet. Je Exon wurde ein individuelles PCR-Protokoll mit erfolgreicher Amplifikation entwickelt (siehe 2.2.3, Tab. 9), im ersten Durchgang wurde dabei stets der *forward-Primer* verwendet. In einem PCR-Reaktionsansatz konnten auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Wells 94 Patientenproben sowie eine Negativ-Kontrolle aufgetragen werden. Der Mastermix der Negativ-Kontrolle beinhaltet H_2O anstelle der DNA. Zur Qualitätskontrolle erfolgte eine Gel-Elektrophorese, welche Exon-spezifische Banden zeigte (siehe Abb. 1). Als Größenreferenz diente eine 100 Basenpaar-Leiter, zusätzlich wurde stets die Negativkontrolle aufgetragen, um potenzielle Verunreinigungen zu detektieren.


APOA1
bp
3000
500
400
300
200
100
← 346 bp
Exon 1
3000
500
100
← 321 bp
Exon 2
3000
500
100
← 881 bp
Exon 3
APOE
bp
3000
500
400
300
200
100
← 259 bp
Exon 2
3000
500
100
← 378 bp
Exon 3
3000
500
100
← 226 bp
Exon 4
APOJ
bp
3000
500
400
300
200
100
← 291 bp
Exon 1
3000
500
100
← 302 bp
Exon 2
3000
500
100
← 321 bp
Exon 3
APOJ
bp
3000
500
400
300
200
100
← 697 bp
Exon 4
3000
500
100
← 304 bp
Exon 5
3000
500
100
← 538 bp
Exon 6

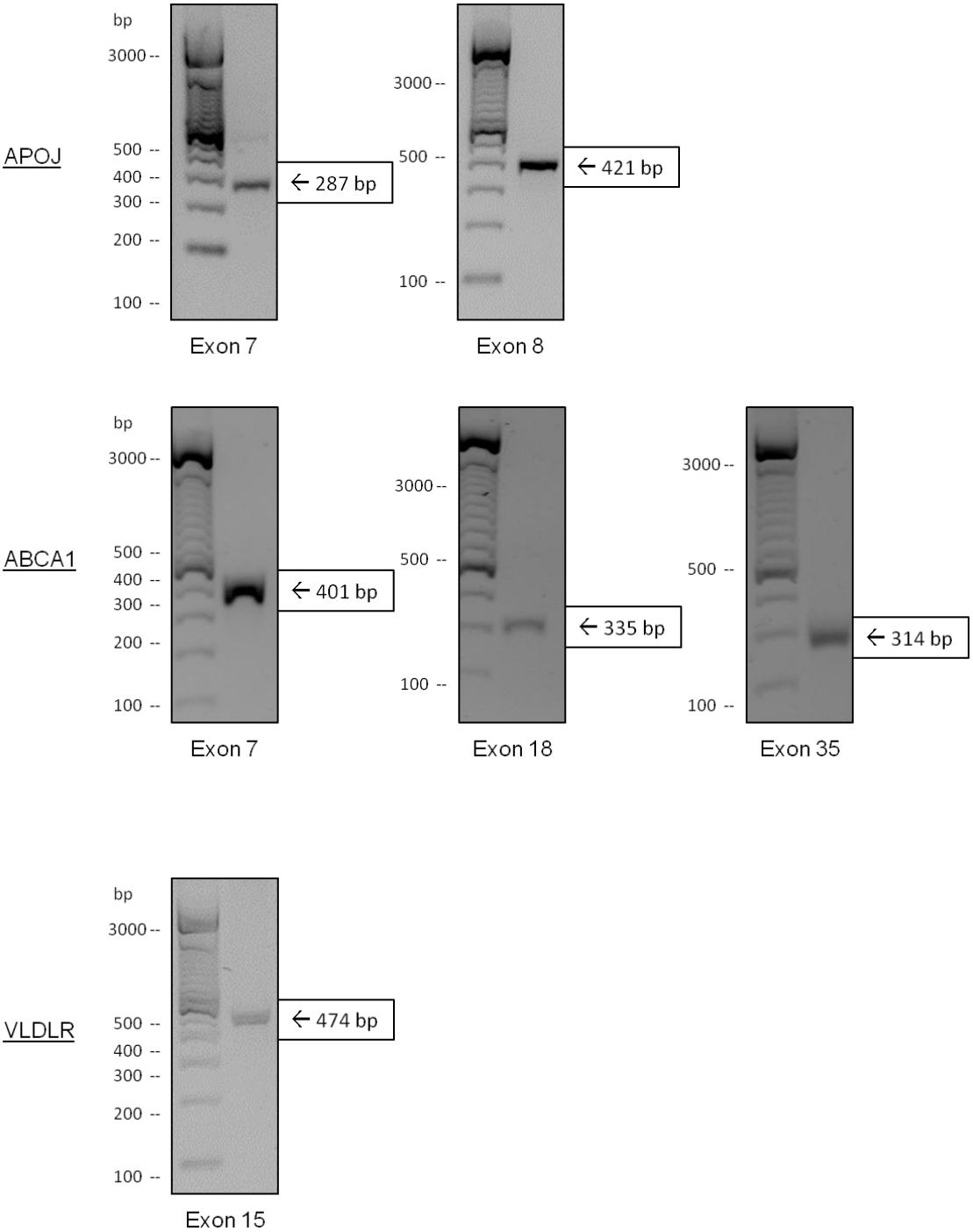


Abbildung 1: Exemplarische Gelbilder aller Exone. Via Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte, wobei ein 1,5%-Agarose-Gel verwendet wurde. Die Banden wurden durch Zugabe von SYBR® Gold sichtbar gemacht. Als Referenz diente eine Leiter mit 100 Basenpaaren (bp). Das Ergebnis waren Exon-spezifische Banden, wie hier beispielhaft gezeigt. Durch den Pfeil ist die berechnete Größe des Exons gekennzeichnet. ABCA1 = *Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1*; APOA1 = Apolipoprotein 1; APOE = Apolipoprotein E; APOJ = Apolipoprotein J; bp = Basenpaare; PCR = *Polymerase Chain Reaction*; VLDLR = *Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor*.

Die PCR-Produkte wurden durch Verwendung des PCR/DNA Clean-Up DNA Purification Kits aufgereinigt, sodass anschließend die externe Sequenzierung mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt werden konnte. Im zweiten Durchgang wurden unsaubere Sequenzen wiederholt, zum Teil unter Verwendung des *reverse-Primers*, um eine möglichst hohe Einschlussquote zu erreichen. Da bei 2 Proben frühzeitig keine ausreichende DNA-Menge mehr vorrätig war, schieden diese aus, sodass die maximale Probenanzahl bei 92 anstelle von 94 lag. Der Mittelwert der eingeschlossenen Proben lag bei 89.86 (SD=1.773). Eine Übersicht der identifizierten SNPs ist Abb. 2 und Tab. 11 zu entnehmen. Es handelte sich nach Abgleich mit der Genom-Datenbank Ensembl bei allen Mutationen um bereits identifizierte SNPs, wobei insgesamt 7 *missense* Mutationen und eine synonyme Variante in allen untersuchten Genen vorlagen. APOA1 und VLDLR wiesen keine Mutation auf.

Tabelle 11: Übersicht über die Einzelnukleotid-Polymorphismen. Dargestellt ist ihre Lokalisation und Auswirkung. Bis auf eine synonyme Variante liegen *missense* Mutationen vor. rs374329439 liegt im untranslatierten Bereich (UTR-3). Die Mutationen haben einen Basenaustausch zur Folge, zum Beispiel wird bei rs769452 Thymin durch Cytosin ersetzt, woraus eine abweichende Aminosäurenstruktur des Proteins resultiert. A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymin; ABCA1 = *Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1*; APOA1 = Apolipoprotein 1; APOE = Apolipoprotein E; APOJ = Apolipoprotein J; SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*; UTR-3 = *Three Prime Untranslated Region*.

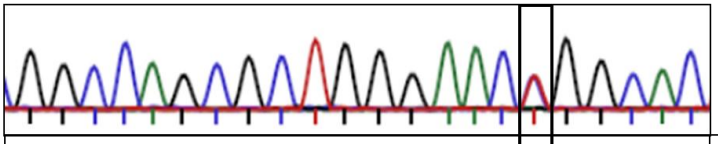
Chromosom	Gen	Exon	SNP	Bedeutung	Basen
19	APOE	3	rs769452	missense	T/C
19	APOE	4	rs7412	missense	C/T
19	APOE	4	rs429358	missense	T/C
19	APOE	4	rs374329439	UTR-3	C/T
8	APOJ	5	rs7982	missense (A)/ synoym	A/C/G
9	ABCA1	7	rs2230806	missense	C/T
9	ABCA1	18	rs2066714/ rs4149313	missense	T/C
9	ABCA1	35	rs2230808	missense	T/C

In Bezug auf APOE ist hervorzuheben, dass das Gen einen Polymorphismus zeigt und 3 verschiedene Allele daraus resultieren: rs7412 und rs429358 prägen dabei den Genotyp durch eine veränderte Aminosäure an Position 112 bzw. 158. Die Bedeutung der Allele und ihr Einfluss auf das Erkrankungsrisiko werden unter anderem Gegenstand der folgenden Diskussion sein.

In der statistischen Berechnung wurden als Signifikanz-Tests auf Unabhängigkeit der Chi-Quadrat-Test bzw. der Exakte Test nach Fisher angewendet. Da der Erwartungswert zum Teil kleiner 5 betrug, wurde auf den Letztgenannten zurückgegriffen.

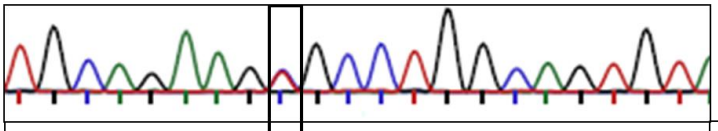
In diesem Fall wurden keine Voraussetzungen an den Stichprobenumfang gestellt, wodurch auch für eine geringe Anzahl an Beobachtungen Aussagen getroffen werden konnten. In der Zusammenschau der Berechnungen wies keine der Mutationen eine statistische Signifikanz auf (siehe Tab. 3).

Es sind jedoch 2 Trends erkennbar: rs7982 (APOJ Exon 5) mit einer OR von 1.575 (95% KI=0.680~3,646, p=0.288) sowie rs2066714/ rs4149313 (ABCA1 Exon 18) mit einer OR von 1,4 (95% KI=0.551~3,554, p=0.478). Um die Häufigkeit und Verteilung von SNPs in der Allgemeinbevölkerung beurteilen zu können, wird außerdem die MAF (*englisch:* Minor Allele Frequency) herangezogen. Als MAF ist die Frequenz des selteneren Allels definiert. Wenn MAF größer 5% werden SNPs als häufig, zwischen 0,5-5% als niedrig und unter 0,5% als selten bezeichnet.
In Tab. 13 ist die Allelverteilung bei PDD und PDNC im Vergleich zur europäischen Normalbevölkerung (EUR) aufgetragen. Bei Gegenüberstellung der MAF beider Gruppen PDD versus PDNC sind erneut rs7982 und rs2066714/ rs4149313 hervorzuheben, da das seltenere Allel in diesen Fällen häufiger bei PDD vorliegt.



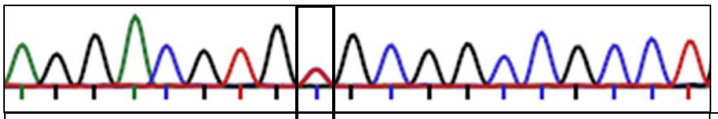
G G C C A G C G C T G G G A A C **C** G G C A
G G C C A G C G C T G G G A A C **T** G G C A

rs769452; APOE Exon 3 (Nr. 17)
T/C : **CTG → CCG***



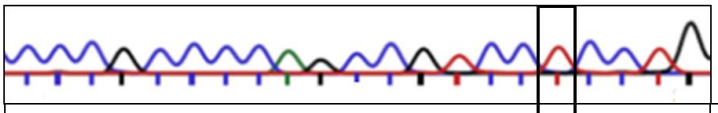
T G C A G A A G **T** G C C T G G C A G T G T
T G C A G A A G **C** G C C T G G C A G T G T

rs7412; APOE Exon 4 (Nr. 93)
C/T : **CGC → TGC***



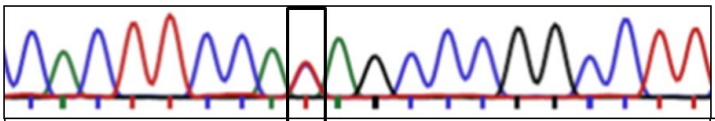
A G G A C G T G **C** G C G G C C G C C T
A G G A C G T G **T** G C G G C C G C C T

rs429358; APOE Exon 4 (Nr. 85)
T/C : **TGC → CGC***



C C C G C C C C A G C C G T C C **T** C C T G
C C C G C C C C A G C C G T C C **C** C C T G

rs374329439; APOE Exon 4 (Nr. 49)
C/T **→ UTR-3***



C A C T T C C A **C** A G C C C G G C C T T
C A C T T C C A **T** A G C C C G G C C T T

rs7982; APOJ Exon 5 (Nr. 63)
A/G : **CAT → CAC***

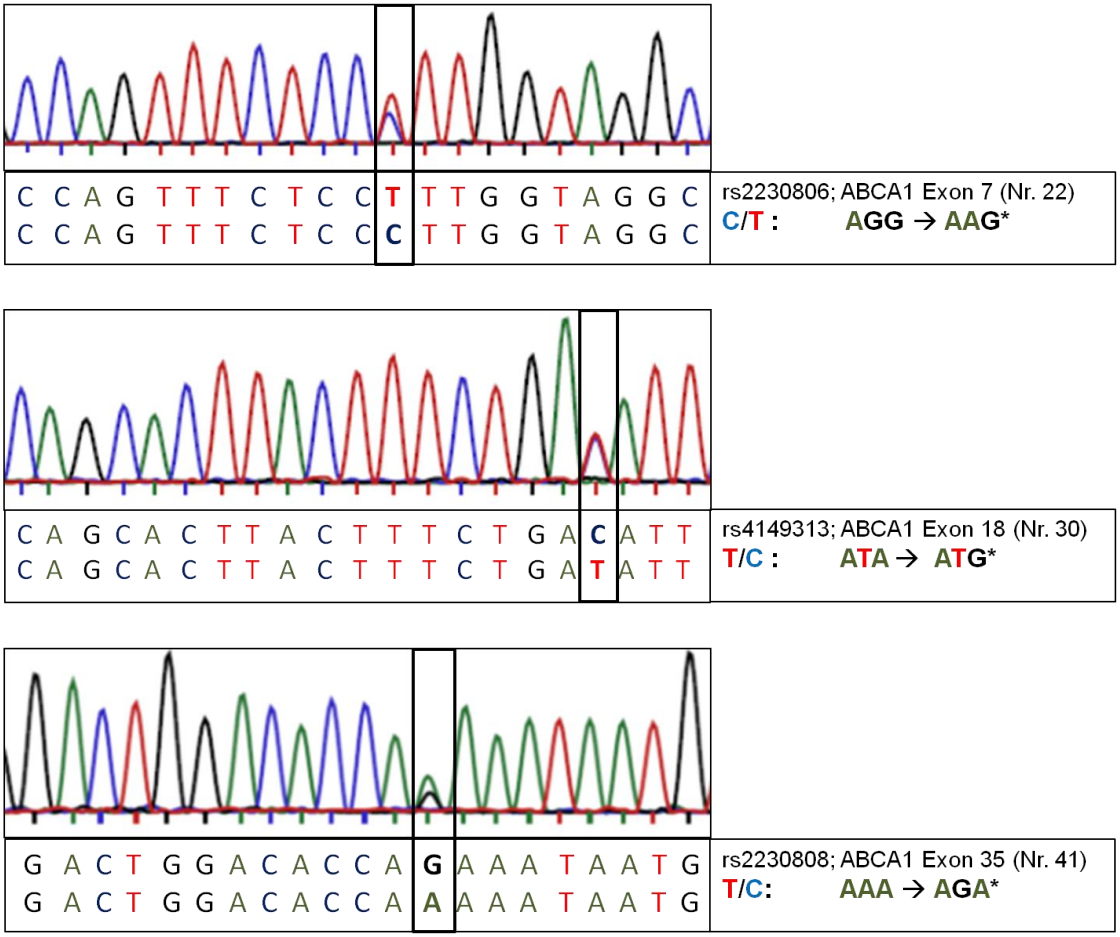


Abbildung 2: Darstellung der Einzelnukleotid-Polymorphismen bei exemplarischen Sequenzen. Die Sequenzierung wurde mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Abgebildet sind repräsentative Sequenzen, wobei sich je nach Basenaustausch abweichende Codons ergeben (im Kasten rechts abgebildet). A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymin; Nr. = Patientennummer des Registers; UTR-3 = *Three Prime Untranslated Region*.

Tabelle 12: Kontingenzanalyse zur Evaluation des Effekts der Einzelnukleotid-Polymorphismen auf das Vorliegen einer Parkinson-Demenz. Der Effekt ist als signifikant anzunehmen, wenn p<0.05 ist. Zur Berechnung wurden als Signifikanz-Tests auf Unabhängigkeit der Chi-Quadrat-Test bzw. der Exakte Test nach Fisher angewendet. Da der Erwartungswert zum Teil kleiner 5 betrug, wurde auf den Letztgenannten zurückgegriffen. In diesem Fall wurden keine Voraussetzungen an den Stichprobenumfang gestellt und somit konnten auch für eine geringe Anzahl an Beobachtungen Aussagen getroffen werden. In der Zusammenschau der Berechnungen wies keine der Mutationen eine statistische Signifikanz auf. *rs7412** und *rs429358** werden in Tabelle 14 erläutert. p<0.05: statistisch signifikant. ABCA1 = *Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1*; APOE = Apolipo-protein E; APOJ = Apolipo-protein J; Ex = Exon; KI = Konfidenzintervall; OR = *Odds ratio*; SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*.

SNP	Gen	p-Wert		OR	95% KI
		χ^2	Fisher		
rs769452	APOE_Ex3	---	0.508	0.5	0.044-5.717
rs7412*	APOE_Ex4	0.339	---	---	---
rs429358*	APOE_Ex4	0.373	---	---	---
rs374329439	APOE_Ex4	---	0.483	---	---
rs7982	APOJ_Ex5	0.288	---	1.575	0.68-3.646
rs2230806	ABCA1_Ex7	0.341	---	0.667	0.289-1.537
rs2066714/ rs4149313	ABCA1_Ex18	0.478	---	1.4	0.551-3.554
rs2230808	ABCA1_Ex35	0.500	---	0.732	0.154-3.479

Tabelle 13: Allelverteilung PDD versus PDNC. Als MAF (*englisch:* Minor Allele Frequency) ist die Frequenz des selteneren Allels definiert. Wenn MAF>5% werden SNPs als häufig, zwischen 0.5-5% als niedrig und unter 0.5% als selten bezeichnet. Im Vergleich zur Allelverteilung bei PDD und PDNC ist die prozentuale Verteilung bei der europäischen Normalbevölkerung (EUR) aufgetragen. Bei Gegenüberstellung der MAF beider Gruppen PDD versus PDNC sind rs7982 und rs2066714/ rs4149313 hervorzuheben, da das seltenere Allel in diesen Fällen häufiger bei PDD vorliegt. *rs7412** und *rs429358** werden in Tabelle 14 erläutert. Maj = *Major Allele*; Min = *Minor Allele*; PDD = *Parkinson's Disease Dementia*; PDNC = *Parkinson's Disease with Normal Cognition*; SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*.

SNP	Anzahl		EUR		PDD		PDNC	
	PDD	PDNC	Min (%)	Maj (%)	Min (%)	Maj (%)	Min (%)	Maj (%)
rs769452	45	46	(0)	(100)	1 (2.22)	44 (97.78)	2 (4.35)	44 (95.65)
*rs7412**	---	---	---	---	---	---	---	---
*rs429358**	---	---	---	---	---	---	---	---
rs374329439	43	46	(0)	(100)	1 (2.33)	42 (97.67)	0 (0)	46 (100)
rs7982	46	46	(39)	(61)	21 (45.65)	25 (54.35)	16 (34.78)	30 (65.22)
rs2230806	45	44	(24)	(76)	20 (44.44)	25 (55.56)	24 (54.55)	20 (45.45)
rs2066714/ rs4149313	44	44	(14)	(86)	14 (31.82)	30 (68.18)	11 (25.00)	33 (75.00)
rs2230808	44	44	(79)	(21)	40 (90.91)	4 (9.09)	41 (93.18)	3 (6.82)

Tabelle 14: Allelverteilung bei Apolipoprotein E. APOE ist mit 3 Allelen (ε2, ε3, ε4) und 6 Genotypen vertreten. ε3 ist mit 70-80% das häufigste Allel und wird als normal betrachtet, während ε2 und ε4 das Ergebnis einer einzelnen Aminosäuren-Substitution an Position 112 (rs429358) oder 158 (rs7412) sind. APOE = Apolipoprotein E; Maj = *Major Allele*; Min = *Minor Allele*; PDD = *Parkinson's Disease Dementia*; PDNC = *Parkinson's Disease with Normal Cognition*; SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*.

APOE-Genotyp	Anzahl		PDD		PDNC	
	PDD	PDNC	Min (%)	Maj (%)	Min (%)	Maj (%)
ε2	44	46	2 (4.55)	42 (95.45)	4 (8.70)	42 (91.30)
ε3	44	46	38 (86.36)	6 (13.64)	40 (86.96)	6 (13.04)
ε4	44	46	4 (9.09)	40 (90.91)	2 (4.35)	44 (95.65)

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, genetische Risikofaktoren der Parkinson-Demenz in Bezug auf den Fettstoffwechsel zu detektieren. Die Familie der Apolipoproteine erschien von besonderem Interesse in Bezug auf Initiation, Progression und Prognose der PD (Mollenhauer et al. 2014; Li et al. 2017).

Die Analyse ihrer kritischen Gene kann eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit der PDD ermöglichen, worin ein Ansatzpunkt der therapeutischen Intervention liegen könnte (Maarouf et al. 2012). Als Zielsetzung ist dabei ein verlangsamtes Voranschreiten der Erkrankung bis hin zum Ausbleiben des Ausbruchs denkbar.

4.1 Apolipoprotein A1

Das Plasmalevel von APOA1 korreliert invers mit dem Risiko für PD, wobei ebenfalls ein Einfluss auf das Manifestationsalter und die Ausprägung der motorischen Symptome nachgewiesen wurde (Swanson et al. 2015). 2 epidemiologische Studien konnten ein vermindertes PD-Risiko unter Statin-Medikation nachweisen, wodurch erhöhte APOA1- und HDL-Spiegel bedingt sind (Gao et al. 2012; Lee et al. 2013). Niedrige APOA1-Spiegel rufen eine verminderte Aktivität der Serum-Paraoxonase/Arylesterase 1 (PON1) hervor, welche eine der wesentlichen anti-artherosklerotischen Komponenten von HDL darstellt (Qiang et al. 2013). Auf genetischer Ebene ist bekannt, dass die Plasma-APOA1-Level durch einen SNP an Position -75 bp (rs670) beeinflusst und gesteigert werden (Zhang et al. 2012).

Da im Rahmen dieser Arbeit lediglich ein synonymer SNP identifiziert werden konnte und keine quantitative Analyse der APOA1-Spiegel im Plasma erfolgte, kann diesbezüglich keine Aussage getroffen werden. Fest steht, dass APOA1 als potentieller Biomarker des PD-Risikos und möglicher neuroprotektiver Faktor des dopaminergen Systems diskutiert werden kann.

4.2 Apolipoprotein E

APOE ist mit 3 Allelen (ε2, ε3, ε4) und 6 Genotypen vertreten (Suastegui Roman et al. 2002). ε3 ist mit 70-80% das häufigste Allel und wird als normal betrachtet, während ε2

und ε4 das Ergebnis einer einzelnen Aminosäuren-Substitution an Position 112 (rs429358) oder 158 (rs7412) sind (Weisgraber et al. 1981; Huang und Mahley 2014).

Tabelle 15: Genotypen von Apolipoprotein E. APOE = Apolipoprotein E; C = Cytosin; T = Thymin.

	rs429358	rs7412
APOE ε2	T	T
APOE ε3	T	C
APOE ε4	C	C
Nicht beobachtet	C	T

APOE wird ebenfalls als Biomarker für PD und PDD diskutiert und kann als Indikator der kognitiven Beeinträchtigung bei Patienten mit PD und AD herangezogen werden (Harhangi et al. 2000). Studien konnten nachweisen, dass ε2 mit einem höheren PD-Risiko vergesellschaftet ist: Eine Meta-Analyse, die 22 weitere Studien beinhaltete, belegte eine ε2-vermittelte erhöhte Wahrscheinlichkeit für PD (OR=1.23; 95% KI 1.04~1.46; p=0.8) (Huang et al. 2004). Während auf der einen Seite ε4 als ursächlich für PD angenommen wird, kommen auf der anderen Seite auch beide Allele, ε2 und ε4, als Risikofaktoren in Betracht (Li et al. 2004; Williams-Gray et al. 2009; Gao et al. 2011; Monsell et al. 2014).
Zusammengefasst ist die Studienlage nicht eindeutig, wobei ebenfalls zahlreiche Untersuchungen vorlagen, die keinen signifikanten Unterschied der Allelfrequenz zwischen PD-Patienten und Kontrollen zeigen konnten (Maraganore et al. 2000; Goetz et al. 2001; Federoff et al. 2012; Multhammer et al. 2014; Nicoletti et al. 2016).

Genetische Risikofaktoren und multiple Umwelteinflüsse sind Determinanten der Ätiologie und Pathogenese der PD. Die Unstimmigkeiten der Studien können möglicherweise durch die Unterschiede der Patientencharakteristika, darunter ethnischer Hintergrund, Manifestationsalter, Zeitpunkt der Diagnosestellung und Schweregrad der Erkrankung, erklärt werden (Li et al. 2017). Ebenfalls beeinflusst eine divergierende Methodik, die zur Identifikation der APOE-Isoformen verwendet wurde, die Ergebnisse.

Der APOE-Genotyp ist der am beste untersuchte genetische Risikofaktor der PDD (Mollenhauer et al. 2014). Mehrere Querschnitts-Studien haben den Effekt des APOE-Genotyps auf die Entwicklung einer Demenz evaluiert und schlussfolgerten, dass eine Korrelation zwischen APOE-Genexpression und einer kognitiven Beeinträchtigung bei PD besteht (Harhangi et al. 2000; Morley et al. 2012; Tsuang et al. 2013; Monsell et al. 2014; Paul et al. 2016; Rasmussen et al. 2018). Eine große Metaanalyse mit 1145 Fällen und 501 Kontrollen postulierte, dass eine Überrepräsentation von ε4-Trägern unter Patienten mit PDD bestand, was sich mit den Ergebnissen einer weiteren Metaanalyse

mit 458 PD-Fällen (163 mit PDD, 295 mit PDNC) deckte (Huang et al. 2006; Williams-Gray et al. 2009). Ein schnellerer kognitiver Verfall war unter ε4-Trägern im Rahmen einer longitudinalen Studie über 4 Jahre messbar (Morley et al. 2012). Nichtsdestotrotz zeigte der APOE-Genotyp keinerlei Relevanz in Bezug auf PDD in diversen anderen Studien (Marder et al. 1994; Harhangi et al. 2000; Kurz et al. 2009; Ryu und Kwon 2010; Mengel et al. 2016). So konnte beispielsweise in einer longitudinalen Kohorten Studie mit 107 erstdiagnostizierten PD-Patienten keine Assoziation von APOE-Genotyp und der Entwicklung einer Demenz gezeigt werden, ein *Follow-up* wurde über 5 Jahre durchgeführt (Williams-Gray et al. 2009).

Auch Mengel et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen APOE ε4 und kognitiven Defiziten bei 447 Patienten mit PDNC, PD-MCI und PDD, wobei das Kollektiv ebenfalls der LANDSCAPE Studie entstammte (2016). In diesem Kontext wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede der Populationscharakteristika zwischen ε4-Trägern und Nicht-Trägern beschrieben. Ebenfalls wurde keine Assoziation von ε4 mit einer kognitiven Beeinträchtigung (PD-MCI oder PDD) beschrieben, sodass im Rahmen dieser Arbeit keine weitere Auseinandersetzung mit dem APOE-Genotyp stattfand.

Die ausbleibende Korrelation zwischen APOE-Genotyp und kognitiven Defizitien kann durch mehrere Phänomene erklärt werden: Zunächst ist es schwierig, einen Bezug zwischen APOE-Genotyp und der Entwicklung einer PD bei Gruppen mit geringer Fallzahl, abweichender Methodik in der Diagnostik einer Demenz und fehlendem *Follow-up* herzustellen (Li et al. 2017). Außerdem befinden sich PD-Patienten möglicherweise unter dem Schutz einer genetischen Variante durch Mechanismen, die bisher nicht verstanden sind (Morley et al. 2012). Zuletzt ist der Einfluss des APOE-Genotyps auf den kognitiven Status bei PDD nicht identisch mit den spezifischen Effekten auf AD und DLB, was auf unterschiedliche APOE-Isoformen zurückgeführt werden kann (Tsuang et al. 2013).

4.3 Apolipoprotein J

Die APOJ-Genexpression ist im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen deutlich gesteigert, darunter PD, DLB, Multisystematrophie und AD (Sasaki et al. 2002). Clusterin scheint in die Signalübertragung der Neurotoxizität von Aβ auf Neurone involviert zu sein (Killick et al. 2014). Aβ-Peptide zielen auf das Clusterin-Protein ab, wobei ihre Komplexe für pathologische Veränderungen verantwortlich sind, sodass in

der Aufhebung des Aβ-Effekts ein möglicher therapeutischer Ansatz zu sehen ist. Es wurde vermutet, dass APOJ die α-Synuklein-Aggregation verhindern kann, indem es sich mit α-Synuklein in Lewy-Körpern als molekulares Chaperon zusammenlagert (Carreras et al. 2005).

Vranova et al. konnten höhere Clusterin-Spiegel im Liquor von Patienten mit PD und PDD im Vergleich zu Gesunden nachweisen (2014). Auf der anderen Seite postulierten Dijk et al., dass Clusterin-Level nicht mit Erkrankungsdauer, Stadium und Ausprägung der motorischen Symptome korreliert werden können (2013). Der Zusammenhang zwischen erhöhtem Clusterin und PD war jedoch stärker ausgeprägt bei dementen Patienten, analog zur Korrelation zwischen Clusterin-Level und kognitivem Verfall bei AD. Eine Clusterin-basierte Therapie zeigte bereits positive Effekte in der Behandlung von Artherosklerose, peripherer Polyneuropathie und AD im Tiermodell (Dati et al. 2007; Zhang et al. 2010).

Auf genetischer Ebene konnte unabhängig vom APOE-Genotyp und anderen Risikofaktoren der PD eine Assoziation von PD mit dem CLU-spezifischen SNP rs11136000 gezeigt werden (Gao et al. 2011). Harold et al. hatten ursprünglich mit dem Ziel, neue genetische Risikofaktoren für AD zu identifizieren, insgesamt 19.000 Proben im Rahmen einer GWAS untersucht, wobei dieser Locus mit Genom-weiter Signifikanz für AD beschrieben wurde (2009). rs11136000 befindet sich auf Chromosom 8 und ist in einem Intron lokalisiert. Auf der Suche nach einer funktionellen Variante wurde analysiert, welche Loci durch Kopplungsungleichgewicht (*englisch*: Linkage Disequilibrium, LD) mit dem Allel in Verbindung stehen. rs7982 auf Exon 5 befand sich in einem starken Kopplungsungleichgewicht und zeigte eine vergleichbare Assoziation mit AD. Exon 5 beeinflusst insgesamt die Kodierung der Beta-Kette des Clusterin-Proteins und somit indirekt auch das *Splicing* (Jun et al. 2010).

Auch Guerreiro et al. verglichen die genetischen Variationen auf Exon 5 bei 849 AD-Patienten und 1067 gesunden Kontrollen (2010). rs7982 war der einzige SNP mit einer MAF>0.05 (p=0.6296, OR=0.9429), übereinstimmend mit den Ergebnissen von Harold et al. (2009). Eine statistische Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden.
Im Rahmen einer Alters-gematchten Fall-Kontroll-Studie konnte ebenfalls eine Assoziation von rs7982 mit einer APOE ε4-negativen Gruppe von AD-Patienten gezeigt werden (Komatsu et al. 2011). Tan et al. konnten eine signifikante Assoziation von rs7982 mit Aβ-Aggregation nachweisen, wobei sie Subgruppen von Patienten mit AD, MCI und unbeeinträchtigter Kognition untersuchten (2016). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich rs7982 im Falle einer homozygoten Mutation protektiv in der gesunden

Gruppe auswirkt. In diesem Stadium der unbeeinträchtigten Kognition kommt es zur AD-Initiation durch abnorme Aβ-Faltung, die zur Ausbildung von Plaques führt (Jack et al. 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte rs7982 (OR=1.575) mit einer MAF von 0.46 bei PDD versus 0.35 bei PDNC nachgewiesen werden. In Anlehnung an die Ergebnisse von Tan et al. liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine pathophysiologische Überschneidung in Bezug auf die Aβ-assoziierten kognitiven Defizite bei beiden Erkrankungen handelt. Die fehlende Signifikanz ist auch in diesem Fall der geringen Fallzahl geschuldet, der SNP ist jedoch unter den Ergebnissen dieser Arbeit als relevant zu betrachten.

4.4 ABCA1

Ebenfalls Gegenstand der AD-Forschung sind genetische Variationen im ABCA1-Gen und ihre Auswirkungen auf das Erkrankungsrisiko (Wollmer et al. 2003). Wie bereits unter 1.8.4 erläutert, vereinfacht ABCA1 den unidirektionalen Efflux von freiem Cholesterol und Phospholipiden und vermittelt die Lipidisierung der meisten Apolipoproteine, darunter APOA1 und APOE, mit dem Ergebnis eines dysfunktionalen HDL-Moleküls (Yancey et al. 2003).

Studien konnten zeigen, dass eine Defizienz von ABCA1 im Gehirn zu einem absinkenden APOE-Level führt (Hirsch-Reinshagen et al. 2004). In diversen Fall-Kontroll-Studien der letzten 20 Jahre wurde der Einfluss von 3 *missense* Mutationen auf die AD-Entwicklung untersucht: rs2230806 (R219 K), rs4149313 (I883 M) und rs2230808 (R1587 K) (Shibata et al. 2006; Sundar et al. 2007; Wahrle et al. 2007; Rodriguez-Rodriguez et al. 2010; Koldamova et al. 2014).

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnislage unternahmen Wang et al. eine Metaanalyse von insgesamt 13 Studien (6.214 AD-Patienten, 6.034 Kontrollen), wobei letztlich kein signifikanter Zusammenhang zwischen AD-Prädisposition und oben genannten ABCA1-Polymorphismen nachgewiesen werden konnte (2013). Als Limitationen führten Wang et al. auch hier eine nicht ausreichende Fallzahl sowie die hohe ethnische Diversität an. Die Häufigkeit des 219 K Allels war beispielsweise unter weißen Amerikanern deutlich erhöht im Vergleich zu Kaukasiern einer anderen Studie (Li et al. 2004; Shibata et al. 2006). Analog zu dieser Aussage konnte auch im Rahmen dieser Arbeit keine Korrelation zwischen den SNPs und kognitiven Defiziten bei PD hergestellt werden.

Tabelle 16: Ergebnisse der Metaanalyse von Wang et al.. Zwischen den ABCA1-Polymorphismen und der Prädisposition für eine dementielle Entwicklung bei der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit kann keine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden. ABCA1 = *Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1*; AD = *Alzheimer's Disease*; OR = *Odds Ratio*; PDD = *Parkinson's Disease Dementia*.

	OR AD	OR PDD
rs2230806 (R219 K)	1.01	0.67
rs4149313 (I883 M)	1.10	1.40
rs2230808 (R1587 K)	1.08	0.73

Auch wenn ABCA1 in Bezug auf AD eine wichtige Funktion zugesprochen wird (Li et al. 2004; Wahrle et al. 2004), bleibt der Einfluss auf PD bislang unklar.

Ya und Lu analysierten zu diesem Zweck ABCA1 R219 K bei chinesischen Patienten mit AD und PD und bestimmten unter anderem die Serumlevel von ABCA1, APOA1, APOA2, APOB, HDL und LDL, um die Assoziation dieser Faktoren mit der AD- bzw. PD-Prädisposition zu erforschen (2017).
Eine Verteilungsanalyse von ABCA1 R219K zeigte signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit AD und PD sowie gesunden Kontrollen: Die ABCA1 R219K R Allelfrequenz war bei AD deutlich erniedrigt im Vergleich zu PD, während R219K K erhöht messbar war. Nichtsdestotrotz waren keine signifikanten Unterschiede der R219K Allelfrequenz von AD- oder PD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen messbar. Diese Ergebnisse legen erstmals die Vermutung nahe, dass eine unterschiedliche R219K Verteilung bei beiden neurodegenerativen Erkrankungen vorliegt. In einer anschließenden Genotyp-Analyse (ABCA1 R219K RR+RK versus ABCA1 R219K KK) konnten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen beiden Erkrankungen und gesunden Kontrollen, nicht jedoch zwischen AD- und PD-Patienten gefunden werden. In Bezug auf ABCA1 R219K RR versus ABCA1 R219K RK+KK wurde ein signifikanter Unterschied zwischen AD und PD, als auch zwischen PD und Gesunden, beschrieben. Bei PD-Patienten mit Genotyp R219K RR oder RK war ein raschere Progression feststellbar, während bei R219K RR ein langsameres Voranschreiten messbar war, was einen möglichen protektiven Effekt des K Allels nahelegt.
Gegensätzliche Phänomene waren bei AD feststellbar, was die unterschiedlichen Auswirkungen des R219K Genotyps auf beide Erkrankungen belegt.

In den vergangenen Jahren berichteten viele Studien über eine deutlich erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Faktoren bei Patienten mit AD und PD, ausgehend von der Hypothese, dass die Neuroinflammation das AD- bzw. PD-Risiko erhöht (Du et al. 2000; Wahner et al. 2007; Reale et al. 2009). Ya und Lu konnten bei PD-Patienten erniedrigte Spiegel von ABCA1 nachweisen, während APOA1, APOB und HDL erhöht waren (2017).

Bei AD-Patienten zeigten sich APOA1, APOA2 und APOB sowie HDL bei PD erniedrigt im Vergleich zu gesunden Kontrollen, während ABCA1 bei PD-Patienten höher lag. Mit der Progression der Erkrankungen scheinen demnach abweichende Serumspiegel einherzugehen. Die Autoren äußerten darüber hinaus die Vermutung, dass das R219K R Allel abnorme ABCA1-Level bei PD-Patienten induziert, nachdem sie die Korrelation zwischen R219K Verteilung und Serumfaktoren untersucht hatten. Es bestand eine negative Korrelation zwischen Serum-HDL und dem Schweregrad der PD nach H&Y. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass mit höheren Schweregraden die pro-inflammatorischen Faktoren ansteigen, was mit dem Absinken des protektiven HDL einhergeht. Die Autoren schließen sich damit der Meinung an, dass Serum-ABCA1-Level mit der Progression von AD und PD korreliert werden können (Xiao et al. 2012; Dong et al. 2016). Bei den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte ein Vergleich der MAF von rs4149313 (OR=1.40) eine deutliche Erhöhung für PDD=0.32 versus MAF PDNC=0.25 versus MAF EUR=0.14.
Es handelt sich dabei um den am wenigsten untersuchten SNP unter den publizierten Studien, sodass auch hier eine spezifische Einflussnahme auf kognitive Defizite bei PD wenig verstanden ist und weitere Abklärung erfordert.

4.5 Fazit

In der Zusammenschau der Ergebnisse liefert diese Arbeit Informationen über mögliche Risikogene bzw. kritische Einzelnukleotid-Polymorphismen bei der Parkinson-Demenz. Mit dem Ziel, die genetische Prädisposition der PDD aufzudecken, wurden unterschiedliche Gruppen von PD-Patienten miteinander verglichen. Der primäre Versuchsansatz der Arbeit beinhaltete verschiedene Apoliproteine, um zunächst möglichst breit Mutationen zu detektieren.

Im Rahmen des genetischen *Screenings* wurden 7 *missense* Mutationen und eine synonyme Variante, insgesamt bereits bekannte SNPs, identifiziert. Eine statistische Signifikanz lag für keinen Einzelnukleotid-Polymorphismus vor.

Folgende mögliche Limitationen der Arbeit müssen in Betracht gezogen werden: In der geringen Fallzahl ist die fehlende Signifikanz der SNPs rs7982 (APOJ Exon 5) und rs2066714/ rs4149313 (ABCA1 Exon 18) begründet. Die initial angenommene große Effektgröße wurde möglicherweise falsch eingeschätzt, retrospektiv ist von einer mittleren bis kleinen Effektgröße auszugehen. Davon ausgehend wäre eine höhere Fallzahl von 130 bzw. 1.168 Patienten pro Gruppe anzustreben. Die Datenbank der

LANDSCAPE Studie ermöglicht den Zugriff auf die DNA von PDNC- und PDD-Patienten, sodass eine gezielte Untersuchung der oben genannten SNPs bei einem größeren Kollektiv möglich und kurzfristig realisierbar wäre.

Die Betrachtung einer anderen Population wäre ebenfalls von Interesse, da im Kollektiv der LANDSCAPE Studie primär Europäer enthalten sind. Lokal bedingt können sich große Abweichungen der MAF ergeben.

Durch das *Matching* anhand von Alter, Geschlecht und Erkrankungsdauer wurde bereits eine möglichst hohe Kompatibilität der beiden Gruppen angestrebt. Der Schweregrad der Erkrankung zum Zeitpunkt der Untersuchung bzw. das genaue kognitive Stadium wurden dabei allerdings nicht miteinbezogen. Anhand vorliegender Patientencharakteristika, die ebenfalls im Rahmen der LANDSCAPE Studie erhoben wurden, wäre eine Anpassung des *Matchings* unter Hinzunahme weiterer Parameter zwecks höherer Aussagekraft denkbar.

Die Auswahl der zu untersuchenden Apolipoproteine ergab sich im Wesentlichen durch bereits identifizierte Risikogene der Alzheimer-Demenz. Die Überschneidung der beiden neurodegenerativen Erkrankungen konnte auf molekularer Ebene bereits nachgewiesen werden, wie unter 1.6 erläutert. Als dritte assoziierte Erkrankung bedarf auch die Demenz mit Lewy-Körpern einer genauen Untersuchung. In diesem Zusammenhang wäre eine Fall-Kontroll-Studie mit PDD- und DLB-Patienten ergänzend denkbar.

Zusammengefasst ist es anhand der Ergebnisse möglich, APOJ und ABCA1 mit ihren SNPs aus der Gruppe der untersuchten Apolipoproteine bzw. ihrer assoziierten Transporter hervorzuheben. Die Bedeutung des Cholesterinstoffwechsels in Bezug auf PDD ist nicht umfassend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen, wobei diese Arbeit einen Anstoß in Bezug auf die oben genannten Gene liefern kann.

4.6 Ausblick

Im Zuge des demographischen Wandels rücken neurodegenerative Erkrankungen in den Fokus der biomedizinischen Forschung. Die Bedeutung des Lipidstoffwechsels für eine vaskuläre Pathogenese ist anerkannt, jedoch auf genetischer Ebene nur in Ansätzen verstanden. Neben den neurodegenerativen sind auch die kardiovaskulären Erkrankungen mit einem ähnlichen Risikoprofil behaftet, sodass genetische Analysen auch hier Pathomechanismen entschlüsseln können. Als häufigste Todesursache in

den westlichen Industrienationen zeigen Zweitgenannte die Relevanz des vaskulären Status auf.

Verschiedene Formen der Hypercholesterinämie erfordern eine konsequente Therapie. In der Primär- und Sekundärprävention des Myokardinfarkts bzw. Apoplex werden seit langem Statine verordnet. Ziel ist dabei, eine suffiziente Senkung des LDL-Cholesterins zu erreichen, um der Atherosklerose entgegenzuwirken. Eine Anpassung des Lebenswandels zur Reduktion des Cholesterins, insbesondere der Ernährungsgewohnheiten, wird ebenfalls empfohlen.

Neue Substanzen, wie Mipomersen, greifen bereits in die Regulationsebene der Apolipoproteine ein. Es handelt sich dabei um Oligonukleotide, die an bestimmte Loci der Messenger Ribonukleinsäure binden und somit die Bildung eines Genprodukts verhindern (Parhofer 2012). Im Fall von Mipomersen führt dieser Mechanismus dazu, dass in der Leber weniger Apolipoprotein B gebildet wird. Aufgrund des ausgeprägten Nebenwirkungsprofils ist das Medikament in Deutschland aktuell nicht zugelassen. Ein höheres Verständnis über die Funktionsweise der Apolipoproteine und ihrer Transporter bzw. Rezeptoren kann eine spezifischere medikamentöse Therapie ermöglichen. Auch eine Antiköper-vermittelte Therapie steht in Aussicht.

Die Identifikation von Risikogenen bzw. Mutationen bei PD ist daher besonders relevant, da eine Genanalyse bereits vor Diagnosestellung eine Vorhersage über die Erkrankungswahrscheinlichkeit treffen kann. Demnach können besonders gefährdete Individuen identifiziert und engmaschig untersucht werden.

In der Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind die determinierenden genetischen Faktoren der neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere der Parkinson-Demenz, weiterhin an größeren Fallzahlen und diversen Populationen zu untersuchen.

5. Deutsche und Englische Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

„Die Genetik des Lipidstoffwechsels als Risikofaktor für kognitive Defizite bei der Parkinson-Krankheit“

Die Parkinson-Krankheit gehört zu den Basalganglienerkrankungen und ist nach der Alzheimer-Krankheit die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Von den typischen motorischen Leitsymptomen sind kognitive Defizite, auch Parkinson-Demenz genannt, abzugrenzen. Etwa 75% der Parkinson-Syndrome sind idiopathisch und treten sporadisch auf. Bei dieser großen Mehrheit der Erkrankten gibt es bislang kein identifizierbares Vererbungsmuster.

Für eine intakte Hirnfunktion ist der zerebrale Cholesterinmetabolismus von hoher Bedeutung, sodass kodierende Gene des Cholesterinstoffwechsels in die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere der Alzheimer-Krankheit, involviert sind. Ausgehend von der bekannten pathophysiologischen Überschneidung der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit, dient diese Arbeit einer systematischen Untersuchung ausgewählter Gene des Lipidstoffwechsels im Zusammenhang mit der Parkinson-Demenz.

Das Kollektiv aus 94 Parkinson-Erkrankten entstammte der Datenbank der longitudinalen LANDSCAPE Studie, wobei 2 Gruppen von Parkinson-Patienten mit Demenz und unbeeinträchtigter Kognition gebildet wurden. Im Vorfeld wurde ein *Matching* zwecks höherer Vergleichbarkeit der Fall- und Kontrollgruppe anhand der Kriterien Geschlecht, ≥ 6 Jahre Erkrankungsdauer und ± 7 Jahre Altersdifferenz durchgeführt. Als Ausgangsmaterial der laborchemischen Versuche lag isolierte Desoxyribonukleinsäure vor, wobei mittels Polymerase-Kettenreaktion bestimmte Gen-Loci zwecks weiterer Aufschlüsselung amplifiziert wurden. Im Sinne eines genetischen *Screenings* wurden alle kodierenden Abschnitte der Apolipoproteine E, A1 und J sequenziert, wobei es sich um etablierte Risikogene der Alzheimer-Krankheit handelt. Zusätzlich wurden ausgewählte Exone von *Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1* (Exon 7, 18, 35) und *Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor* (Exon 15) untersucht, bei denen bereits im Vorfeld kritische Mutationen beschrieben wurden. Im Fokus stand dabei die Identifikation von Einzelnukleotid-Polymorphismen, die möglicherweise mit der Ausprägung einer Demenz bei der Parkinson-Krankheit zusammenhängen.

Im Rahmen der Sequenzierung mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger wurden insgesamt 8 Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert, darunter 7 *missense* Mutationen und eine synonyme Variante. Apolipoprotein A1 und *Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor* wiesen keine Mutation auf.

Eine statistische Signifikanz konnte für keinen Einzelnukleotid-Polymorphismus gezeigt werden. Dementsprechend konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer Mutation und der Ausbildung einer Parkinson-Demenz in der vorliegenden Stichprobe abgeleitet werden. In der Tendenz waren jedoch 2 Mutationen hervorzuheben: rs7982 (Apolipoprotein J Exon 5) mit einer *Odds ratio* von 1.575 (95% Konfidenzintervall=0.680~3.646, p=0.288) sowie rs2066714/ rs4149313 (*Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1* Exon 18) mit einer *Odds Ratio* von 1.4 (95% Konfidenzintervall=0.551~3.554, p=0.478). Apolipoprotein J und *Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1* stellen somit als mögliche Risikogene der Parkinson-Demenz das Ziel weiterer Analysen dar.

Als Limitation der Arbeit war die geringe Fallzahl bei initial zu hoch geschätzter Effektgröße zu betrachten, sodass die fokussierte Untersuchung in Bezug auf oben genannte Mutationen an weiteren Patienten der LANDSCAPE Studie sinnvoll und in Zukunft geplant ist.

5.2 Englische Zusammenfassung (Summary)

„The role of lipid metabolism as a risk factor for Parkinson's Disease Dementia"

Parkinson's Disease is the second most neurodegenerative disorder following Alzheimer's Disease. Among Patients with Parkinson's Disease cognitive decline is common and occurs after motor symptoms. The cause of Parkinson's Disease Dementia is not understood so far. Therefore, analyzing genetic risk factors is important for identifying individuals at high risk of Parkinson's Disease Dementia. Cholesterol metabolism and its regulation play a major role in an operating central nervous system. Apolipoproteins are associated with a diagnosis of cognitive impairment in Alzheimer's Disease and might influence a cognitive decline among Parkinson's patients as well.

In this dissertation a total of 94 patients with Parkinson's Disease (47 patients without cognitive impairment, 47 patients with dementia) were included from an observational German multicenter cohort study (LANDSCAPE study). Primarily, a data matching was held to achieve a higher comparability and a better selection of controls. As criteria served gender, a period of disease ≥ 6 years and a difference of age ± 7 years.

Several studies reported of different genes as being associated with the risk of developing Parkinson's Disease Dementia. To further characterize this association sequencing of the coding region of the Apolipoproteins E, A1 and J and of selected exons of Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1 and Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor was performed. A total of 8 variants were found in both cases and controls. No significant differences were observed in the distribution of these Single Nucleotide Polymorphisms between Parkinson's Disease Dementia patients and controls.

Nonetheless, regarding the present results rs7982 (Apolipoprotein J Exon 5; Odds ratio 1.575; 95% confidence interval=0.680~3.646; p=0.288) and rs2066714/ rs4149313 (Adenosine Triphosphate-binding Cassette Transporter A1 Exon 18; Odds Ratio 1.4; 95% confidence interval=0.551~3.554; p=0.478) have been suggested to be risk factors for dementia in Parkinson's Disease.

The lack of significance might be based on the small number of cases. As a perspective more patients of the LANDSCAPE collective could be included and investigated concerning these 2 variants as above-mentioned.

6. Literaturverzeichnis

Aarsland, D; Andersen, K; Larsen, J P; Lolk, A; Kragh-Sorensen, P (2003): Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. *Arch Neurol.* 60: 387–392.

Aarsland, D; Bronnick, K; Larsen, J P; Tysnes, O B; Alves, G (2009): Cognitive impairment in incident, untreated Parkinson disease: the Norwegian ParkWest study. *Neurology.* 72: 1121–1126.

Ali, B R; Silhavy, J L; Gleeson, M J; Gleeson, J G; Al-Gazali, L (2012): A missense founder mutation in VLDLR is associated with Dysequilibrium Syndrome without quadrupedal locomotion. *BMC Med Genet.* 13: 80.

Alphey, L (1998): DNA-Sequenzierung. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Ansorge, W; Labeit, S (1984): Field gradients improve resolution on DNA sequencing gels. *J Biochem Biophys Methods.* 10: 237–243.

Aytan, N; Jung, T; Tamturk, F; Grune, T; Kartal-Ozer, N (2008): Oxidative stress related changes in the brain of hypercholesterolemic rabbits. *Biofactors.* 33: 225–236.

Balzer-Geldsetzer, M; Costa, Ana Sofia Ferreira Braga da; Kronenburger, M; Schulz, J B; Roske, S; Spottke, A; Wullner, U; Klockgether, T; Storch, A; Schneider, C; Riedel, O; Wittchen, H-U; Seifried, C; Hilker, R; Schmidt, N; Witt, K; Deuschl, G; Mollenhauer, B; Trenkwalder, C; Liepelt-Scarfone, I; Graber-Sultan, S; Berg, D; Gasser, T; Kalbe, E; Bodden, M; Oertel, W H; Dodel, R (2011): Parkinson's disease and dementia: a longitudinal study (DEMPARK). *Neuroepidemiology.* 37: 168–176.

Bar-On, P; Crews, L; Koob, A O; Mizuno, H; Adame, A; Spencer, B; Masliah, E (2008): Statins reduce neuronal alpha-synuclein aggregation in in vitro models of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 105: 1656–1667.

Barreiro, L B; Laval, G; Quach, H; Patin, E; Quintana-Murci, L (2008): Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat Genet.* 40: 340–345.

Bartels, A L; Leenders, K L (2009): Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex.* 45: 915–921.

Barton, B R; Bernard, B; Czernecki, V; Goldman, J G; Stebbins, G; Dubois, B; Goetz, C G (2014): Comparison of the Movement Disorder Society Parkinson's disease dementia criteria with neuropsychological testing. *Mov Disord.* 29: 1252-7.

Bassetti, C L (2011): Nonmotor disturbances in Parkinson's disease. *Neurodegener Dis.* 8: 95–108.

Bentahir, M; Nyabi, O; Verhamme, J; Tolia, A; Horre, K; Wiltfang, J; Esselmann, H; Strooper, B de (2006): Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem.* 96: 732–742.

Berlyand, Y; Weintraub, D; Xie, S X; Mellis, I A; Doshi, J; Rick, J; McBride, J; Davatzikos, C; Shaw, L M; Hurtig, H; Trojanowski, J Q; Chen-Plotkin, A S (2016): An Alzheimer's Disease-Derived Biomarker Signature Identifies Parkinson's Disease Patients with Dementia. *PLoS One.* 11: e0147319.

Bjorkhem, I; Lovgren-Sandblom, A; Leoni, V; Meaney, S; Brodin, L; Salveson, L; Winge, K; Palhagen, S; Svenningsson, P (2013): Oxysterols and Parkinson's disease: evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neurosci Lett.* 555: 102–105.

Bjorkhem, I; Meaney, S; Diczfalusy, U (2002): Oxysterols in human circulation: which role do they have? *Curr Opin Lipidol.* 13: 247–253.

Block, R C; Dorsey, E R; Beck, C A; Brenna, J T; Shoulson, I (2010): Altered cholesterol and fatty acid metabolism in Huntington disease. *J Clin Lipidol.* 4: 17–23.

Boehm-Cagan, A; Bar, R; Liraz, O; Bielicki, J K; Johansson, J O; Michaelson, D M (2016): ABCA1 Agonist Reverses the ApoE4-Driven Cognitive and Brain Pathologies. *J Alzheimers Dis.* 54: 1219–1233.

Bortz, J; Döring, N (2006): Forschungsmethoden und Evaluation für Human- und Sozialwissenschaftler (4. Auflage). Berlin: Springer Verlag.

Bosco, D A; Fowler, D M; Zhang, Q; Nieva, J; Powers, E T; Wentworth, P, JR; Lerner, R A; Kelly, J W (2006): Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. *Nat Chem Biol.* 2: 249–253.

Breydo, L; Wu, J W; Uversky, V N (2012): Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1822: 261–285.

Brown, J 3; Theisler, C; Silberman, S; Magnuson, D; Gottardi-Littell, N; Lee, J M; Yager, D; Crowley, J; Sambamurti, K; Rahman, M M; Reiss, A B; Eckman, C B; Wolozin, B (2004): Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 279: 34674–34681.

Buongiorno, M; Compta, Y; Marti, M J (2011): Amyloid-beta and tau biomarkers in Parkinson's disease-dementia. *J Neurol Sci.* 310: 25–30.

Carreras, I; Garrett-Young, R; Ullman, M D; Eisenhauer, P B; Fine, R E; Wells, J M; Conn, K J (2005): Upregulation of clusterin/apolipoprotein J in lactacystin-treated SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res.* 79: 495–502.

Chaves, E I de; Rusinol, A E; Vance, D E; Campenot, R B; Vance, J E (1997): Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. *J Biol Chem.* 272: 30766–30773.

Chen, B Y; Janes, H W (Hg.) (2002): PCR cloning protocols. *Methods in molecular biology.* 192.

Choi, H J; Seo, E H; Yi, D; Sohn, B K; Choe, Y M; Byun, M S; Lee, J M; Woo, J I; Lee, D Y (2015): Amyloid-Independent Amnestic Mild Cognitive Impairment and Serum Apolipoprotein A1 Levels. *Am J Geriatr Psychiatry*. 24: 144–153.

Clark, D P; Pazdernik, N J; Held, A; Jarosch, B (2009): Molekulare Biotechnologie. *Grundlagen und Anwendungen.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Clinton, L K; Blurton-Jones, M; Myczek, K; Trojanowski, J Q; LaFerla, F M (2010): Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. *J Neurosci.* 30: 7281–7289.

Compta, Y; Parkkinen, L; Kempster, P; Selikhova, M; Lashley, T; Holton, J L; Lees, A J; Revesz, T (2014): The significance of alpha-synuclein, amyloid-beta and tau pathologies in Parkinson's disease progression and related dementia. *Neurodegener Dis.* 13: 154–156.

Compta, Y; Parkkinen, L; O'Sullivan, S S; Vandrovcova, J; Holton, J L; Collins, C; Lashley, T; Kallis, C; Williams, D R; Silva, R de; Lees, A J; Revesz, T (2011): Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: which is more important? *Brain.* 134: 1493–1505.

Corder, E H; Saunders, A M; Strittmatter, W J; Schmechel, D E; Gaskell, P C; Small, G W; Roses, A D; Haines, J L; Pericak-Vance, M A (1993): Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261: 921–923.

Crosiers, D; Theuns, J; Cras, P; van Broeckhoven, C (2011): Parkinson disease: insights in clinical, genetic and pathological features of monogenic disease subtypes. *J Chem Neuroanat.* 42: 131–141.

Cutler, R G; Kelly, J; Storie, K; Pedersen, W A; Tammara, A; Hatanpaa, K; Troncoso, J C; Mattson, M P (2004): Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in

ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 2070–2075.

Dati, G; Quattrini, A; Bernasconi, L; Malaguti, M C; Antonsson, B; Nicoletti, F; Alliod, C; Di Marco, R; Sagot, Y; Vitte, P A; Hiver, A; Greco, B; Roach, A; Zaratin, P F (2007): Beneficial effects of r-h-CLU on disease severity in different animal models of peripheral neuropathies. *J Neuroimmunol.* 190: 8–17.

DeGrella, R F; Simoni, R D (1982): Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 257: 14256–14262.

Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hg.) (2016): S3-Leitlinie "Idiopathisches Parkinson-Syndrom". <https://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2016/PDFs_Download/030010_LL_kurzfassung_ips_2016.pdf> (27.08.2019).

Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde; Deutsche Gesellschaft für Neurologie in Zusammenarbeit mit der Deutschen Alzheimer Gesellschaft e.V. - Selbsthilfe Demenz (Hg.) (2016): S3-Leitlinie "Demenzen". <https://www.dgppn.de/_Resources/Persistent/ade50e44afc7eb8024e7f65ed3f44e995583c3a0/S3-LL-Demenzen-240116.pdf> (27.08.2019).

Di Paolo, G; Kim, T-W (2011): Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci.* 12: 284–296.

Dias, I H K; Polidori, M C; Li, L; Weber, D; Stahl, W; Nelles, G; Grune, T; Griffiths, H R (2014): Plasma levels of HDL and carotenoids are lower in dementia patients with vascular comorbidities. *J Alzheimers Dis.* 40: 399–408.

Divekar, S D; Burrell, T C; Lee, J E; Weeber, E J; Rebeck, G W (2014): Ligand-induced homotypic and heterotypic clustering of apolipoprotein E receptor 2. *J Biol Chem.* 289: 15894–15903.

Don, R H; Cox, P T; Wainwright, B J; Baker, K; Mattick, J S (1991): 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic acids Res.* 19: 4008.

Dong, X; Liu, T; Xu, S; Zhu, L; Zhang, P; Cheng, A; Qian, Q (2016): The relevance of ABCA1 R219K polymorphisms and serum ABCA1 protein concentration to Parkinson’s disease pathogenesis and classification. A case–control study. *Genes & Genomics.* 38: 243–250.

Dong, X-x; Wang, Y; Qin, Z-h (2009): Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 30: 379–387.

Dorsey, E R; Constantinescu, R; Thompson, J P; Biglan, K M; Holloway, R G; Kieburtz, K; Marshall, F J; Ravina, B M; Schifitto, G; Siderowf, A; Tanner, C M (2007): Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.* 68: 384–386.

Du, Y; Dodel, R C; Eastwood, B J; Bales, K R; Gao, F; Lohmuller, F; Muller, U; Kurz, A; Zimmer, R; Evans, R M; Hake, A; Gasser, T; Oertel, W H; Griffin, W S; Paul, S M; Farlow, M R (2000): Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurology.* 55: 480–483.

Dubois, B; Burn, D; Goetz, C; Aarsland, D; Brown, R G; Broe, G A; Dickson, D; Duyckaerts, C; Cummings, J; Gauthier, S; Korczyn, A; Lees, A; Levy, R; Litvan, I; Mizuno, Y; McKeith, I G; Olanow, C W; Poewe, W; Sampaio, C; Tolosa, E; Emre, M (2007): Diagnostic procedures for Parkinson's disease dementia: recommendations from the movement disorder society task force. *Mov Disord.* 22: 2314–2324.

Emre, M; Aarsland, D; Brown, R; Burn, D J; Duyckaerts, C; Mizuno, Y; Broe, G A; Cummings, J; Dickson, D W; Gauthier, S; Goldman, J; Goetz, C; Korczyn, A; Lees, A; Levy, R; Litvan, I; McKeith, I; Olanow, W; Poewe, W; Quinn, N; Sampaio, C; Tolosa, E; Dubois, B (2007): Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 22: 1689.

Farrer, L A; Cupples, L A; Haines, J L; Hyman, B; Kukull, W A; Mayeux, R; Myers, R H; Pericak-Vance, M A; Risch, N; van Duijn, C M (1997): Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* 278: 1349–1356.

Federoff, M; Jimenez-Rolando, B; Nalls, M A; Singleton, A B (2012): A large study reveals no association between APOE and Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 46: 389–392.

Fester, L; Zhou, L; Bütow, A; Huber, C; Lossow, R von; Prange-Kiel, J; Jarry, H; Rune, G M (2009): Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus.* 19: 692–705.

Folstein, M F; Folstein, S E; McHugh, P R (1975): "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 12: 189–198.

Forsaa, E B; Larsen, J P; Wentzel-Larsen, T; Alves, G (2010): What predicts mortality in Parkinson disease?: a prospective population-based long-term study. *Neurology.* 75: 1270–1276.

Gao, J; Huang, X; Park, Y; Hollenbeck, A; Chen, H (2011): An exploratory study on CLU, CR1 and PICALM and Parkinson disease. *PLoS One.* 6: e24211.

Gao, J; Huang, X; Park, Y; Liu, R; Hollenbeck, A; Schatzkin, A; Mailman, R B; Chen, H (2011): Apolipoprotein E genotypes and the risk of Parkinson disease. *Neurobiol Aging.* 32: 2106.e1-6.

Gao, X; Simon, K C; Schwarzschild, M A; Ascherio, A (2012): Prospective study of statin use and risk of Parkinson disease. *Arch Neurol.* 69: 380–384.

Goetz, C G; Burke, P F; Leurgans, S; Berry-Kravis, E; Blasucci, L M; Raman, R; Zhou, L (2001): Genetic variation analysis in parkinson disease patients with and without hallucinations. Case-control study. *Arch Neurol.* 58: 209–213.

Goetz, C G; Emre, M; Dubois, B (2008): Parkinson's disease dementia: definitions, guidelines, and research perspectives in diagnosis. *Ann Neurol.* 64: 92.

Goetz, C G; Poewe, W; Rascol, O; Sampaio, C; Stebbins, G T; Counsell, C; Giladi, N; Holloway, R G; Moore, C G; Wenning, G K; Yahr, M D; Seidl, L (2004): Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale. Status and recommendations. *Mov Disord.* 19: 1020–1028.

Goldman, J G; Holden, S; Ouyang, B; Bernard, B; Goetz, C G; Stebbins, G T (2015): Diagnosing PD-MCI by MDS Task Force criteria: how many and which neuropsychological tests? *Mov Disord.* 30: 402–406.

Goodyear, M D E; Krleza-Jeric, K; Lemmens, T (2007): The Declaration of Helsinki. *BMJ.* 335: 624–625.

Goritz, C; Mauch, D H; Pfrieger, F W (2005): Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci.* 29: 190–201.

Graw, J; Hennig, W (2015): Genetik (6. Auflage). Berlin: Springer Verlag.

Gudala, K; Bansal, D; Muthyala, H (2013): Role of serum cholesterol in Parkinson's disease: a meta-analysis of evidence. *J Parkinsons Dis.* 3: 363–370.

Guerreiro, R J; Beck, J; Gibbs, J R; Santana, I; Rossor, M N; Schott, J M; Nalls, M A; Ribeiro, H; Santiago, B; Fox, N C; Oliveira, C; Collinge, J; Mead, S; Singleton, A; Hardy, J (2010): Genetic variability in CLU and its association with Alzheimer's disease. *PLoS One.* 5: e9510.

Hacke, W (Hg.) (2016): Neurologie (14. Auflage). Berlin: Springer Verlag.

Halliday, G; Hely, M; Reid, W; Morris, J (2008): The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 115: 409–415.

Harhangi, B S; Rijk, M C de; van Duijn, C M; van Broeckhoven, C; Hofman, A; Breteler, M M (2000): APOE and the risk of PD with or without dementia in a population-based study. *Neurology.* 54: 1272–1276.

Harold, D; Abraham, R; Hollingworth, P; Sims, R; Gerrish, A; Hamshere, M L; Pahwa, J S; Moskvina, V; Dowzell, K; Williams, A; Jones, N; Thomas, C; Stretton, A; Morgan, A R; Lovestone, S; Powell, J; Proitsi, P; Lupton, M K; Brayne, C; Rubinsztein, D C; Gill, M; Lawlor, B; Lynch, A; Morgan, K; Brown, K S; Passmore, P A; Craig, D; McGuinness, B; Todd, S; Holmes, C; Mann, D; Smith, A D; Love, S; Kehoe, P G; Hardy, J; Mead, S; Fox, N; Rossor, M; Collinge, J; Maier, W; Jessen, F; Schurmann, B; Heun, R; van den Bussche, H; Heuser, I; Kornhuber, J; Wiltfang, J; Dichgans, M; Frolich, L; Hampel, H; Hull, M; Rujescu, D; Goate, A M; Kauwe, J S K; Cruchaga, C; Nowotny, P; Morris, J C; Mayo, K; Sleegers, K; Bettens, K; Engelborghs, S; Deyn, P P de; van Broeckhoven, C; Livingston, G; Bass, N J; Gurling, H; McQuillin, A; Gwilliam, R; Deloukas, P; Al-Chalabi, A; Shaw, C E; Tsolaki, M; Singleton, A B; Guerreiro, R; Muhleisen, T W; Nothen, M M; Moebus, S; Jockel, K-H; Klopp, N; Wichmann, H-E; Carrasquillo, M M; Pankratz, V S; Younkin, S G; Holmans, P A; O'Donovan, M; Owen, M J; Williams, J (2009): Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41: 1088–1093.

Healy, D G; Abou-Sleiman, P M; Wood, N W (2004): PINK, PANK, or PARK? A clinicians' guide to familial parkinsonism. *Lancet Neurol.* 3: 652–662.

Hecker, K H; Roux, K H (1996): High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques.* 20: 478–485.

Herring, A; Donath, A; Steiner, K M; Widera, M P; Hamzehian, S; Kanakis, D; Kolble, K; ElAli, A; Hermann, D M; Paulus, W; Keyvani, K (2012): Reelin depletion is an early phenomenon of Alzheimer's pathology. *J Alzheimers Dis.* 30: 963–979.

Heverin, M; Meaney, S; Lutjohann, D; Diczfalusy, U; Wahren, J; Bjorkhem, I (2005): Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. *J Lipid Res.* 46: 1047–1052.

Hirsch, E; Graybiel, A M; Agid, Y A (1988): Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature.* 334: 345–348.

Hirsch-Reinshagen, V; Zhou, S; Burgess, B L; Bernier, L; McIsaac, S A; Chan, J Y; Tansley, G H; Cohn, J S; Hayden, M R; Wellington, C L (2004): Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain. *J Biol Chem.* 279: 41197–41207.

Hoehn, M M; Yahr, M D (1998): Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967. *Neurology.* 50: 318–334.

Horn, F; Moc, I (2015): Biochemie des Menschen (6. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Hu, G; Antikainen, R; Jousilahti, P; Kivipelto, M; Tuomilehto, J (2008): Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology.* 70: 1972–1979.

Huang, X; Auinger, P; Eberly, S; Oakes, D; Schwarzschild, M; Ascherio, A; Mailman, R; Chen, H (2011): Serum cholesterol and the progression of Parkinson's disease: results from DATATOP. *PLoS One.* 6: e22854.

Huang, X; Chen, P; Kaufer, D I; Troster, A I; Poole, C (2006): Apolipoprotein E and dementia in Parkinson disease: a meta-analysis. *Arch Neurol.* 63: 189–193.

Huang, X; Chen, P C; Poole, C (2004): APOE-epsilon2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology.* 62: 2198–2202.

Huang, Y; Mahley, R W (2014): Apolipoprotein E. Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis.* 72: 3–12.

Hufschmidt, A; Lücking, C H; Rauer, S (2013): Neurologie compact. Für Klinik und Praxis (6. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Hughes, A J; Daniel, S E; Ben-Shlomo, Y; Lees, A J (2002): The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain.* 125: 861–870.

Hughes, A J; Daniel, S E; Kilford, L; Lees, A J (1992): Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 55: 181–184.

Hughes, T A; Ross, H F; Musa, S; Bhattacherjee, S; Nathan, R N; Mindham, R H; Spokes, E G (2000): A 10-year study of the incidence of and factors predicting dementia in Parkinson's disease. *Neurology.* 54: 1596–1602.

Irwin, D J; Abrams, J Y; Schonberger, L B; Leschek, E W; Mills, J L; Lee, V M-Y; Trojanowski, J Q (2013): Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone. *JAMA Neurol.* 70: 462–468.

Ishikawa, A; Piao, Y S; Miyashita, A; Kuwano, R; Onodera, O; Ohtake, H; Suzuki, M; Nishizawa, M; Takahashi, H (2005): A mutant PSEN1 causes dementia with Lewy bodies and variant Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 57: 429–434.

Jack, C R, JR; Knopman, D S; Jagust, W J; Shaw, L M; Aisen, P S; Weiner, M W; Petersen, R C; Trojanowski, J Q (2010): Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 9: 119–128.

Jaeger, S; Pietrzik, C U (2008): Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 5: 15–25.

Janowski, B A; Grogan, M J; Jones, S A; Wisely, G B; Kliewer, S A; Corey, E J; Mangelsdorf, D J (1999): Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 266–271.

Jellinger, K A; Attems, J (2008): Cerebral amyloid angiopathy in Lewy body disease. *J Neural Transm.* 115: 473–482.

Jenner, P; Olanow, C W (2006): The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology.* 66: 36.

Jeske, D J; Dietschy, J M (1980): Regulation of rates of cholesterol synthesis in vivo in the liver and carcass of the rat measured using 3Hwater. *J Lipid Res*. 21: 364–376.

Jun, G; Naj, A C; Beecham, G W; Wang, L-S; Buros, J; Gallins, P J; Buxbaum, J D; Ertekin-Taner, N; Fallin, M D; Friedland, R; Inzelberg, R; Kramer, P; Rogaeva, E; St George-Hyslop, P; Cantwell, L B; Dombroski, B A; Saykin, A J; Reiman, E M; Bennett, D A; Morris, J C; Lunetta, K L; Martin, E R; Montine, T J; Goate, A M; Blacker, D; Tsuang, D W; Beekly, D; Cupples, L A; Hakonarson, H; Kukull, W; Foroud, T M; Haines, J; Mayeux, R; Farrer, L A; Pericak-Vance, M A; Schellenberg, G D (2010): Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch Neurol.* 67: 1473–1484.

Kalaitzakis, M E; Graeber, M B; Gentleman, S M; Pearce, R K B (2008): Striatal beta-amyloid deposition in Parkinson disease with dementia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67: 155–161.

Kalaitzakis, M E; Pearce, R K B (2009): The morbid anatomy of dementia in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 118: 587–598.

Kaltenböck, K (2008): Chromatographie für Einsteiger (1. Auflage). Weinheim: Wiley-VCH.

Kempster, P A; Hurwitz, B; Lees, A J (2007): A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology.* 69: 482–485.

Kempster, P A; O'Sullivan, S S; Holton, J L; Revesz, T; Lees, A J (2010): Relationships between age and late progression of Parkinson's disease: a clinico-pathological study. *Brain.* 133: 1755–1762.

Kiesmann, M; Chanson, J-B; Godet, J; Vogel, T; Schweiger, L; Chayer, S; Kaltenbach, G (2013): The Movement Disorders Society criteria for the diagnosis of Parkinson's disease dementia. Their usefulness and limitations in elderly patients. *J Neurol.* 260: 2569–2579.

Killick, R; Ribe, E M; Al-Shawi, R; Malik, B; Hooper, C; Fernandes, C; Dobson, R; Nolan, P M; Lourdusamy, A; Furney, S; Lin, K; Breen, G; Wroe, R; To, A W M; Leroy, K; Causevic, M; Usardi, A; Robinson, M; Noble, W; Williamson, R; Lunnon, K; Kellie, S; Reynolds, C H; Bazenet, C; Hodges, A; Brion, J-P; Stephenson, J; Simons, J P; Lovestone, S (2014): Clusterin regulates beta-amyloid toxicity via Dickkopf-1-driven induction of the wnt-PCP-JNK pathway. *Mol Psychiatry.* 19: 88–98.

Koldamova, R; Fitz, N F; Lefterov, I (2014): ATP-binding cassette transporter A1: from metabolism to neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 72: 13–21.

Komatsu, M; Shibata, N; Kuerban, B; Ohnuma, T; Baba, H; Arai, H (2011): Genetic association between clusterin polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *Psychogeriatrics.* 11: 14–18.

Koob, A O; Ubhi, K; Paulsson, J F; Kelly, J; Rockenstein, E; Mante, M; Adame, A; Masliah, E (2010): Lovastatin ameliorates alpha-synuclein accumulation and oxidation in transgenic mouse models of alpha-synucleinopathies. *Exp Neurol.* 221: 267–274.

Korade, Z; Kenworthy, A K (2008): Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology.* 55: 1265–1273.

Kurz, M W; Dekomien, G; Nilsen, O B; Larsen, J P; Aarsland, D; Alves, G (2009): APOE alleles in Parkinson disease and their relationship to cognitive decline: a population-based, longitudinal study. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 22: 166–170.

Lahiri, D K (2004): Apolipoprotein E as a target for developing new therapeutics for Alzheimer's disease based on studies from protein, RNA, and regulatory region of the gene. *J Mol Neurosci.* 23: 225–233.

Lambert, J-C; Heath, S; Even, G; Campion, D; Sleegers, K; Hiltunen, M; Combarros, O; Zelenika, D; Bullido, M J; Tavernier, B; Letenneur, L; Bettens, K; Berr, C; Pasquier, F; Fievet, N; Barberger-Gateau, P; Engelborghs, S; Deyn, P de; Mateo, I; Franck, A; Helisalmi, S; Porcellini, E; Hanon, O; Pancorbo, M M de; Lendon, C; Dufouil, C; Jaillard, C; Leveillard, T; Alvarez, V; Bosco, P; Mancuso, M; Panza, F; Nacmias, B;

Bossu, P; Piccardi, P; Annoni, G; Seripa, D; Galimberti, D; Hannequin, D; Licastro, F; Soininen, H; Ritchie, K; Blanche, H; Dartigues, J-F; Tzourio, C; Gut, I; van Broeckhoven, C; Alperovitch, A; Lathrop, M; Amouyel, P (2009): Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41: 1094–1099.

Lange, Y; Ye, J; Strebel, F (1995): Movement of 25-hydroxycholesterol from the plasma membrane to the rough endoplasmic reticulum in cultured hepatoma cells. *J Lipid Res.* 36: 1092–1097.

Lashley, T; Holton, J L; Gray, E; Kirkham, K; O'Sullivan, S S; Hilbig, A; Wood, N W; Lees, A J; Revesz, T (2008): Cortical alpha-synuclein load is associated with amyloid-beta plaque burden in a subset of Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol.* 115: 417–425.

Lee, C-Y J; Seet, R C S; Huang, S H; Long, L H; Halliwell, B (2009): Different patterns of oxidized lipid products in plasma and urine of dengue fever, stroke, and Parkinson's disease patients: cautions in the use of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 11: 407–420.

Lee, Y-C; Lin, C-H; Wu, R-M; Lin, M-S; Lin, J-W; Chang, C-H; Lai, M-S (2013): Discontinuation of statin therapy associates with Parkinson disease. A population-based study. *Neurology.* 81: 410–416.

Leoni, V; Caccia, C (2011): Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids.* 164: 515–524.

Leverenz, J B; Fishel, M A; Peskind, E R; Montine, T J; Nochlin, D; Steinbart, E; Raskind, M A; Schellenberg, G D; Bird, T D; Tsuang, D (2006): Lewy body pathology in familial Alzheimer disease: evidence for disease- and mutation-specific pathologic phenotype. *Arch Neurol.* 63: 370–376.

Li, L; Liu, M-S; Li, G-Q; Tang, J; Liao, Y; Zheng, Y; Guo, T-L; Kang, X; Yuan, M-T (2017): Relationship between Apolipoprotein Superfamily and Parkinson's Disease. *Chin Med J.* 130: 2616–2623.

Li, Y; Tacey, K; Doil, L; van Luchene, R; Garcia, V; Rowland, C; Schrodi, S; Leong, D; Lau, K; Catanese, J; Sninsky, J; Nowotny, P; Holmans, P; Hardy, J; Powell, J; Lovestone, S; Thal, L; Owen, M; Williams, J; Goate, A; Grupe, A (2004): Association of ABCA1 with late-onset Alzheimer's disease is not observed in a case-control study. *Neurosci Lett.* 366: 268–271.

Li, Y J; Hauser, M A; Scott, W K; Martin, E R; Booze, M W; Qin, X J; Walter, J W; Nance, M A; Hubble, J P; Koller, W C; Pahwa, R; Stern, M B; Hiner, B C; Jankovic, J; Goetz, C G; Small, G W; Mastaglia, F; Haines, J L; Pericak-Vance, M A; Vance, J M (2004): Apolipoprotein E controls the risk and age at onset of Parkinson disease. *Neurology.* 62: 2005–2009.

Lin, M T; Beal, M F (2006): Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443: 787–795.

Linton, M F; Gish, R; Hubl, S T; Butler, E; Esquivel, C; Bry, W I; Boyles, J K; Wardell, M R; Young, S G (1991): Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J Clin Invest.* 88: 270–281.

Lippa, C F; Duda, J E; Grossman, M; Hurtig, H I; Aarsland, D; Boeve, B F; Brooks, D J; Dickson, D W; Dubois, B; Emre, M; Fahn, S; Farmer, J M; Galasko, D; Galvin, J E; Goetz, C G; Growdon, J H; Gwinn-Hardy, K A; Hardy, J; Heutink, P; Iwatsubo, T; Kosaka, K; Lee, V M-Y; Leverenz, J B; Masliah, E; McKeith, I G; Nussbaum, R L; Olanow, C W; Ravina, B M; Singleton, A B; Tanner, C M; Trojanowski, J Q; Wszolek, Z K (2007): DLB and PDD boundary issues: diagnosis, treatment, molecular pathology, and biomarkers. *Neurology.* 68: 812–819.

Litvan, I; Goldman, J G; Troster, A I; Schmand, B A; Weintraub, D; Petersen, R C; Mollenhauer, B; Adler, C H; Marder, K; Williams-Gray, C H; Aarsland, D; Kulisevsky, J; Rodriguez-Oroz, M C; Burn, D J; Barker, R A; Emre, M (2012): Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord.* 27: 349–356.

Liu, Q; Zerbinatti, C V; Zhang, J; Hoe, H-S; Wang, B; Cole, S L; Herz, J; Muglia, L; Bu, G (2007): Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron.* 56: 66–78.

Maarouf, C L; Beach, T G; Adler, C H; Shill, H A; Sabbagh, M N; Wu, T; Walker, D G; Kokjohn, T A; Roher, A E (2012): Cerebrospinal fluid biomarkers of neuropathologically diagnosed Parkinson's disease subjects. *Neurol Res.* 34: 669–676.

Maraganore, D M; Farrer, M J; Hardy, J A; McDonnell, S K; Schaid, D J; Rocca, W A (2000): Case-control study of debrisoquine 4-hydroxylase, N-acetyltransferase 2, and apolipoprotein E gene polymorphisms in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 15: 714–719.

Marder, K; Maestre, G; Cote, L; Mejia, H; Alfaro, B; Halim, A; Tang, M; Tycko, B; Mayeux, R (1994): The apolipoprotein epsilon 4 allele in Parkinson's disease with and without dementia. *Neurology.* 44: 1330–1331.

Marquer, C; Devauges, V; Cossec, J-C; Liot, G; Lecart, S; Saudou, F; Duyckaerts, C; Leveque-Fort, S; Potier, M-C (2011): Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J.* 25: 1295–1305.

Marwarha, G; Ghribi, O (2015): Does the oxysterol 27-hydroxycholesterol underlie Alzheimer's disease-Parkinson's disease overlap? *Exp Gerontol.* 68: 13–18.

Marwarha, G; Rhen, T; Schommer, T; Ghribi, O (2011): The oxysterol 27-hydroxycholesterol regulates alpha-synuclein and tyrosine hydroxylase expression levels in human neuroblastoma cells through modulation of liver X receptors and estrogen receptors--relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.* 119: 1119–1136.

Masliah, E; Rockenstein, E; Veinbergs, I; Sagara, Y; Mallory, M; Hashimoto, M; Mucke, L (2001): beta-amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 12245–12250.

Masuhr, K F; Masuhr, F; Neumann, M (2013): Neurologie (7. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Mata, I F; Leverenz, J B; Weintraub, D; Trojanowski, J Q; Hurtig, H I; van Deerlin, V M; Ritz, B; Rausch, R; Rhodes, S L; Factor, S A; Wood-Siverio, C; Quinn, J F; Chung, K A; Peterson, A L; Espay, A J; Revilla, F J; Devoto, J; Hu, S-C; Cholerton, B A; Wan, J Y; Montine, T J; Edwards, K L; Zabetian, C P (2014): APOE, MAPT, and SNCA genes and cognitive performance in Parkinson disease. *JAMA Neurol.* 71: 1405–1412.

Mattle, H; Mumenthaler, M (2008): Neurologie (1. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

McHugh, M L (2013): The chi-square test of independence. *Biochem Med.* 23: 143–149.

McKeith, I G (2006): Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the Consortium on DLB International Workshop. *J Alzheimers Dis.* 9: 417–423.

Meeus, B; Verstraeten, A; Crosiers, D; Engelborghs, S; van den Broeck, M; Mattheijssens, M; Peeters, K; Corsmit, E; Elinck, E; Pickut, B; Vandenberghe, R; Cras, P; Deyn, P P de; van Broeckhoven, C; Theuns, J (2012): DLB and PDD: a role for mutations in dementia and Parkinson disease genes? *Neurobiol Aging.* 33: 629.

Mehta, C R; Patel, N R (1986): ALGORITHM 643. FEXACT: a FORTRAN subroutine for Fisher's exact test on unordered r×c contingency tables. *ACM Transactions on Mathematical Software.* 12: 154–161.

Mendez, A J (2010): The promise of apolipoprotein A-I mimetics. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 17: 171–176.

Mengel, D; Dams, J; Ziemek, J; Becker, J; Balzer-Geldsetzer, M; Hilker, R; Baudrexel, S; Kalbe, E; Schmidt, N; Witt, K; Liepelt-Scarfone, I; Graber, S; Petrelli, A; Neuser, P; Schulte, C; Linse, K; Storch, A; Wittchen, H-U; Riedel, O; Mollenhauer, B; Ebentheuer, J; Trenkwalder, C; Klockgether, T; Spottke, A; Wullner, U; Schulz, J B; Reetz, K; Heber, I A; Ramirez, A; Dodel, R (2016): Apolipoprotein E epsilon4 does not affect cognitive performance in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 29: 112–116.

Merched, A; Xia, Y; Visvikis, S; Serot, J M; Siest, G (2000): Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 21: 27–30.

Miners, J S; Clarke, P; Love, S (2016): Clusterin Levels are Increased in Alzheimer's Disease and Influence the Regional Distribution of Abeta. *Brain Pathol.* 27: 305–313.

Miyake, Y; Sasaki, S; Tanaka, K; Fukushima, W; Kiyohara, C; Tsuboi, Y; Yamada, T; Oeda, T; Miki, T; Kawamura, N; Sakae, N; Fukuyama, H; Hirota, Y; Nagai, M (2010): Dietary fat intake and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *J Neurol Sci.* 288: 117–122.

Mollenhauer, B; Rochester, L; Chen-Plotkin, A; Brooks, D (2014): What can biomarkers tell us about cognition in Parkinson's disease? *Mov Disord.* 29: 622–633.

Monsell, S E; Besser, L M; Heller, K B; Checkoway, H; Litvan, I; Kukull, W A (2014): Clinical and pathologic presentation in Parkinson's disease by apolipoprotein e4 allele status. *Parkinsonism Relat Disord.* 20: 503–507.

Morley, J F; Xie, S X; Hurtig, H I; Stern, M B; Colcher, A; Horn, S; Dahodwala, N; Duda, J E; Weintraub, D; Chen-Plotkin, A S; van Deerlin, V; Falcone, D; Siderowf, A (2012): Genetic influences on cognitive decline in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 27: 512–518.

Mülhardt, C (2006): Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics (5. Auflage). München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.

Multhammer, M; Michels, A; Zintl, M; Mendoza, M C; Klunemann, H-H (2014): A large ApoE epsilon4/epsilon4 homozygous cohort reveals no association with Parkinson's disease. *Acta Neurol Belg.* 114: 25–31.

Nachman, M W (2001): Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans. *Trends Genet.* 17: 481–485.

Nicoletti, G; Manners, D N; Novellino, F; Testa, C; Gagliardi, M; Tonon, C; Lodi, R; Quattrone, A (2016): Voxel-based morphometry to detect effect of APOE on brain gray matter changes in Parkinson's Disease. *Psychiatry Res Neuroimaging.* 254: 177–179.

Noguchi, N; Saito, Y; Urano, Y (2014): Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 446: 692–696.

Nordheim, A; Knippers, R (Hg.) (2015): Molekulare Genetik (10. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Oda, T; Wals, P; Osterburg, H H; Johnson, S A; Pasinetti, G M; Morgan, T E; Rozovsky, I; Stine, W B; Snyder, S W; Holzman, T F (1995): Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol.* 136: 22–31.

Oertel, W H; Deuschl, G; Poewe, W (2012): Parkinson-Syndrome und andere Bewegungsstörungen (1. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Olsson, A; Moks, T; Uhlen, M; Gaal, A B (1984): Uniformly spaced banding pattern in DNA sequencing gels by use of field-strength gradient. *J Biochem Biophys Methods.* 10: 83–90.

Oram, J F (2003): HDL Apolipoproteins and ABCA1 Partners in the Removal of Excess Cellular Cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 720–727.

Oram, J F; Wolfbauer, G; Tang, C; Davidson, W S; Albers, J J (2008): An Amphipathic Helical Region of the N-terminal Barrel of Phospholipid Transfer Protein Is Critical for ABCA1-dependent Cholesterol Efflux. *J Biol Chem.* 283: 11541–11549.

Ostrerova, N; Petrucelli, L; Farrer, M; Mehta, N; Choi, P; Hardy, J; Wolozin, B (1999): alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci.* 19: 5782–5791.

Parent, A (2018): A Tribute to James Parkinson. *Can J Neurol Sci.* 45: 83–89.

Parhofer, K G (2012): Mipomersen: evidence-based review of its potential in the treatment of homozygous and severe heterozygous familial hypercholesterolemia. *Core Evid.* 7: 29-38.

Paul, K C; Rausch, R; Creek, M M; Sinsheimer, J S; Bronstein, J M; Bordelon, Y; Ritz, B (2016): APOE, MAPT, and COMT and Parkinson's Disease Susceptibility and Cognitive Symptom Progression. *J Parkinsons Dis.* 6: 349–359.

Paul, R; Choudhury, A; Borah, A (2015): Cholesterol - A putative endogenous contributor towards Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 90: 125–133.

Paula-Lima, A C; Tricerri, M A; Brito-Moreira, J; Bomfim, T R; Oliveira, F F; Magdesian, M H; Grinberg, L T; Panizzutti, R; Ferreira, S T (2009): Human apolipoprotein A–I binds amyloid-β and prevents Aβ-induced neurotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol.* 41: 1361–1370.

Pedraza, O; Allen, M; Jennette, K; Carrasquillo, M; Crook, J; Serie, D; Pankratz, V S; Palusak, R; Nguyen, T; Malphrus, K; Ma, L; Bisceglio, G; Roberts, R O; Lucas, J A; Ivnik, R J; Smith, G E; Graff-Radford, N R; Petersen, R C; Younkin, S G; Ertekin-Taner, N (2014): Evaluation of memory endophenotypes for association with CLU, CR1, and PICALM variants in black and white subjects. *Alzheimers Dement.* 10: 205–213.

Petersen, R C (2004): Challenges of epidemiological studies of mild cognitive impairment. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 18: 1–2.

Pfenninger, K H (2009): Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat Rev Neurosci.* 10: 251–261.

Polymeropoulos, M H; Lavedan, C; Leroy, E; Ide, S E; Dehejia, A; Dutra, A; Pike, B; Root, H; Rubenstein, J; Boyer, R; Stenroos, E S; Chandrasekharappa, S; Athanassiadou, A; Papapetropoulos, T; Johnson, W G; Lazzarini, A M; Duvoisin, R C; Di Iorio, G; Golbe, L I; Nussbaum, R L (1997): Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 276: 2045–2047.

Qiang, J K; Wong, Y C; Siderowf, A; Hurtig, H I; Xie, S X; Lee, V M-Y; Trojanowski, J Q; Yearout, D; B Leverenz, J; Montine, T J; Stern, M; Mendick, S; Jennings, D; Zabetian, C; Marek, K; Chen-Plotkin, A S (2013): Plasma apolipoprotein A1 as a biomarker for Parkinson disease. *Ann Neurol.* 74: 119–127.

Rajagopalan, P; Hibar, D P; Thompson, P M (2013): TREM2 and neurodegenerative disease. *N Engl J Med.* 369: 1565–1567.

Rasmussen, K L; Tybjaerg-Hansen, A; Nordestgaard, B G; Frikke-Schmidt, R (2018): Plasma apolipoprotein E levels and risk of dementia. A Mendelian randomization study of 106,562 individuals. *Alzheimers Dement.* 14: 71–80.

Reale, M; Iarlori, C; Thomas, A; Gambi, D; Perfetti, B; Di Nicola, M; Onofrj, M (2009): Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun.* 23: 55–63.

Rodriguez-Rodriguez, E; Vazquez-Higuera, J L; Sanchez-Juan, P; Mateo, I; Pozueta, A; Martinez-Garcia, A; Frank, A; Valdivieso, F; Berciano, J; Bullido, M J; Combarros, O (2010): Epistasis between intracellular cholesterol trafficking-related genes (NPC1 and ABCA1) and Alzheimer's disease risk. *J Alzheimers Dis.* 21: 619–625.

Roses, A D (1994): Apolipoprotein E is a relevant susceptibility gene that affects the rate of expression of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 15: 7.

Roussotte, F F; Gutman, B A; Madsen, S K; Colby, J B; Thompson, P M (2014): Combined effects of Alzheimer risk variants in the CLU and ApoE genes on ventricular expansion patterns in the elderly. *J Neurosci.* 34: 6537–6545.

Roux, K H (1994): Using mismatched primer-template pairs in touchdown PCR. *Biotechniques.* 16: 812–814.

Ruffmann, C; Calboli, F C F; Bravi, I; Gveric, D; Curry, L K; Smith, A de; Pavlou, S; Buxton, J L; Blakemore, A I F; Takousis, P; Molloy, S; Piccini, P; Dexter, D T; Roncaroli, F; Gentleman, S M; Middleton, L T (2016): Cortical Lewy bodies and Abeta burden are associated with prevalence and timing of dementia in Lewy body diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 42: 436–450.

Ryu, H G; Kwon, O D (2010): Apolipoprotein E epsilon 4 allele is not associated with age at onset or MMSE of Parkinson's disease in a Korean study. *Parkinsonism Relat Disord.* 16: 615–617.

Saiki, R; Scharf, S; Faloona, F; Mullis, K; Horn, G; Erlich, H; Arnheim, N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230: 1350–1354.

Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, A R (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 5463–5467.

Sasaki, K; Doh-ura, K; Wakisaka, Y; Iwaki, T (2002): Clusterin/apolipoprotein J is associated with cortical Lewy bodies. Immunohistochemical study in cases with alpha-synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* 104: 225–230.

Schaaf, C P.; Zschocke, J; Watson, J D (2013): Basiswissen Humangenetik (2. Auflage). Berlin: Springer Verlag.

Serrano-Dueñas, M; Serrano, M; Villena, D; Granda, D (2017): Validation of the Parkinson's Disease-Cognitive Rating Scale Applying the Movement Disorder Society Task Force Criteria for Dementia Associated with Parkinson's Disease. *Mov Disord Clin Pract.* 4: 51–57.

Shibata, N; Kawarai, T; Lee, J H; Lee, H-S; Shibata, E; Sato, C; Liang, Y; Duara, R; Mayeux, R P; St George-Hyslop, P H; Rogaeva, E (2006): Association studies of cholesterol metabolism genes (CH25H, ABCA1 and CH24H) in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 391: 142–146.

Shibata, N; Nagata, T; Shinagawa, S; Ohnuma, T; Shimazaki, H; Komatsu, M; Kuerban, B; Tomson, K; Nakayama, K; Yamada, H; Arai, H (2013): Genetic association between APOA1 and APOD polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *J Neural Transm.* 120: 1599–1603.

Shulman, L M; Taback, R L; Bean, J; Weiner, W J (2001): Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 16: 507–510.

Smach, M A; Edziri, H; Charfeddine, B; Ben Othman, L; Lammouchi, T; Ltaief, A; Nafati, S; Dridi, H; Bennamou, S; Limem, K (2011): Polymorphism in apoA1 Influences High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels but Is Not a Major Risk Factor of Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* 1: 249–257.

Spillantini, M G; Crowther, R A; Jakes, R; Hasegawa, M; Goedert, M (1998): alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 6469–6473.

Stoscheck, C M (1990): Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 182: 50–68.

Suastegui Roman, R A; Yescas Gomez, P; Guerrero Camacho, J L; Ochoa Morales, A; Granados, J; Jara Prado, A; Lopez-Caro, O A; Alonso Vilatela, M E (2002): Frequency of apolipoprotein E in a Nahua population. *Rev Invest Clin.* 54: 415–421.

Sundar, P D; Feingold, E; Minster, R L; DeKosky, S T; Kamboh, M I (2007): Gender-specific association of ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) polymorphisms with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 28: 856–862.

Swanson, C R; Berlyand, Y; Xie, S X; Alcalay, R N; Chahine, L M; Chen-Plotkin, A S (2015): Plasma apolipoprotein A1 associates with age at onset and motor severity in early Parkinson's disease patients. *Mov Disord.* 30: 1648–1656.

Tan, L; Wang, H-F; Tan, M-S; Tan, C-C; Zhu, X-C; Miao, D; Yu, W-J; Jiang, T; Tan, L; Yu, J-T (2016): Effect of CLU genetic variants on cerebrospinal fluid and neuroimaging markers in healthy, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease cohorts. *Sci Rep.* 6: 26027.

Tan, L C; Methawasin, K; Tan, E-K; Tan, J H; Au, W-L; Yuan, J-M; Koh, W-P (2015): Dietary cholesterol, fats and risk of Parkinson's disease in the Singapore Chinese Health Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 87: 86–92.

Thambisetty, M; Beason-Held, L L; An, Y; Kraut, M; Nalls, M; Hernandez, D G; Singleton, A B; Zonderman, A B; Ferrucci, L; Lovestone, S; Resnick, S M (2013): Alzheimer risk variant CLU and brain function during aging. *Biol Psychiatry.* 73: 399–405.

Thirumangalakudi, L; Prakasam, A; Zhang, R; Bimonte-Nelson, H; Sambamurti, K; Kindy, M S; Bhat, N R (2008): High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J Neurochem.* 106: 475–485.

Tsuang, D; Leverenz, J B; Lopez, O L; Hamilton, R L; Bennett, D A; Schneider, J A; Buchman, A S; Larson, E B; Crane, P K; Kaye, J A; Kramer, P; Woltjer, R; Trojanowski, J Q; Weintraub, D; Chen-Plotkin, A S; Irwin, D J; Rick, J; Schellenberg, G D; Watson, G S; Kukull, W; Nelson, P T; Jicha, G A; Neltner, J H; Galasko, D; Masliah, E; Quinn, J F; Chung, K A; Yearout, D; Mata, I F; Wan, J Y; Edwards, K L; Montine, T J; Zabetian, C P (2013): APOE epsilon4 increases risk for dementia in pure synucleinopathies. *JAMA Neurol.* 70: 223–228.

Tysnes, O-B; Storstein, A (2017): Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 124: 901–905.

Umetani, M; Ghosh, P; Ishikawa, T; Umetani, J; Ahmed, M; Mineo, C; Shaul, P W (2014): The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol promotes atherosclerosis via proinflammatory processes mediated by estrogen receptor alpha. *Cell Metab.* 20: 172–182.

van den Kommer, T N; Dik, M G; Comijs, H C; Fassbender, K; Lutjohann, D; Jonker, C (2009): Total cholesterol and oxysterols: early markers for cognitive decline in elderly? *Neurobiol Aging.* 30: 534–545.

van Dijk, K D; Jongbloed, W; Heijst, J A; Teunissen, C E; Groenewegen, H J; Berendse, H W; van de Berg, W D J; Veerhuis, R (2013): Cerebrospinal fluid and plasma clusterin levels in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 19: 1079–1083.

van Steenoven, I; Aarsland, D; Weintraub, D; Londos, E; Blanc, F; van der Flier, W M; Teunissen, C E; Mollenhauer, B; Fladby, T; Kramberger, M G; Bonanni, L; Lemstra, A W (2016): Cerebrospinal Fluid Alzheimer's Disease Biomarkers Across the Spectrum of Lewy Body Diseases: Results from a Large Multicenter Cohort. *J Alzheimers Dis.* 54: 287–295.

van Vliet, P; van de Water, W; de Craen, Anton J M; Westendorp, R G J (2009): The influence of age on the association between cholesterol and cognitive function. *Exp Gerontol.* 44: 112–122.

Varela, M A; Amos, W (2010): Heterogeneous distribution of SNPs in the human genome: Microsatellites as predictors of nucleotide diversity and divergence. *Genomics.* 95: 151–159.

Vollbach, H; Heun, R; Morris, C M; Edwardson, J A; McKeith, I G; Jessen, F; Schulz, A; Maier, W; Kolsch, H (2005): APOA1 polymorphism influences risk for early-onset nonfamiliar AD. *Ann Neurol.* 58: 436–441.

Vranova, H P; Henykova, E; Kaiserova, M; Mensikova, K; Vastik, M; Mares, J; Hlustik, P; Zapletalova, J; Strnad, M; Stejskal, D; Kanovsky, P (2014): Tau protein, beta-amyloid(1)(-)(4)(2) and clusterin CSF levels in the differential diagnosis of Parkinsonian syndrome with dementia. *J Neurol Sci.* 343: 120–124.

Wahner, A D; Sinsheimer, J S; Bronstein, J M; Ritz, B (2007): Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease. *Arch Neurol.* 64: 836–840.

Wahrle, S E; Jiang, H; Parsadanian, M; Legleiter, J; Han, X; Fryer, J D; Kowalewski, T; Holtzman, D M (2004): ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem.* 279: 40987–40993.

Wahrle, S E; Shah, A R; Fagan, A M; Smemo, S; Kauwe, J S K; Grupe, A; Hinrichs, A; Mayo, K; Jiang, H; Thal, L J; Goate, A M; Holtzman, D M (2007): Apolipoprotein E levels in cerebrospinal fluid and the effects of ABCA1 polymorphisms. *Mol Neurodegener.* 2: 7.

Wakabayashi, K; Tanji, K; Odagiri, S; Miki, Y; Mori, F; Takahashi, H (2013): The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 47: 495–508.

Wang, Q; Yan, J; Chen, X; Li, J; Yang, Y; Weng, J; Deng, C; Yenari, M A (2011): Statins: multiple neuroprotective mechanisms in neurodegenerative diseases. *Exp Neurol.* 230: 27–34.

Wang, X-F; Cao, Y-W; Feng, Z-Z; Fu, D; Ma, Y-S; Zhang, F; Jiang, X-X; Shao, Y-C (2013): Quantitative assessment of the effect of ABCA1 gene polymorphism on the risk of Alzheimer's disease. *Mol Biol Rep.* 40: 779–785.

Weisgraber, K H; Rall, S C, JR; Mahley, R W (1981): Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem.* 256: 9077–9083.

Weykopf, B; Haupt, S; Jungverdorben, J; Flitsch, L J; Hebisch, M; Liu, G-H; Suzuki, K; Belmonte, J C I; Peitz, M; Blaess, S; Till, A; Brustle, O (2019): Induced pluripotent stem

cell-based modeling of mutant LRRK2-associated Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 49: 561–589.

Wichmann, T; DeLong, M R (2003): Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 991: 199–213.

Wijsman, E M; Pankratz, N D; Choi, Y; Rothstein, J H; Faber, K M; Cheng, R; Lee, J H; Bird, T D; Bennett, D A; Diaz-Arrastia, R; Goate, A M; Farlow, M; Ghetti, B; Sweet, R A; Foroud, T M; Mayeux, R (2011): Genome-wide association of familial late-onset Alzheimer's disease replicates BIN1 and CLU and nominates CUGBP2 in interaction with APOE. *PLoS Genet.* 7: e1001308.

Williams-Gray, C H; Goris, A; Saiki, M; Foltynie, T; Compston, D A; Sawcer, S J; Barker, R A (2009): Apolipoprotein E genotype as a risk factor for susceptibility to and dementia in Parkinson's disease. *J Neurol.* 256: 493–498.

Wollmer, M A; Streffer, J R; Lutjohann, D; Tsolaki, M; Iakovidou, V; Hegi, T; Pasch, T; Jung, H H; Bergmann, K v; Nitsch, R M; Hock, C; Papassotiropoulos, A (2003): ABCA1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 24: 421–426.

Xiao, Z; Wang, J; Chen, W; Wang, P; Zeng, H; Chen, W (2012): Association studies of several cholesterol-related genes (ABCA1, CETP and LIPC) with serum lipids and risk of Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis.* 11: 163.

Xiong, H; Callaghan, D; Jones, A; Walker, D G; Lue, L-F; Beach, T G; Sue, L I; Woulfe, J; Xu, H; Stanimirovic, D B; Zhang, W (2008): Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis.* 29: 422–437.

Ya, L; Lu, Z (2017): Differences in ABCA1 R219K Polymorphisms and Serum Indexes in Alzheimer and Parkinson Diseases in Northern China. *Med Sci Monit.* 23: 4591–4600.

Yancey, P G; Bortnick, A E; Kellner-Weibel, G; La Llera-Moya, M de; Phillips, M C; Rothblat, G H (2003): Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 712–719.

Yeh, F L; Wang, Y; Tom, I; Gonzalez, L C; Sheng, M (2016): TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron.* 91: 328–340.

Zaccai, J; McCracken, C; Brayne, C (2005): A systematic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies. *Age Ageing.* 34: 561–566.

Zhang, J; Liu, Q (2015): Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell.* 6: 254–264.

Zhang, X; Yin, X; Yu, H; Liu, X; Yang, F; Yao, J; Jin, H; Yang, P (2012): Quantitative proteomic analysis of serum proteins in patients with Parkinson's disease using an isobaric tag for relative and absolute quantification labeling, two-dimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Analyst.* 137: 490–495.

Zhang, X-Z; Li, X-J; Zhang, H-Y (2010): Valproic acid as a promising agent to combat Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 81: 3–6.

7. Anhang

7.1 Publikationen

Mengel, D; Thelen, M; Balzer-Geldsetzer, M; **Soeling, C**; Bach, J-P; Schaeffer, E; Herold, C; Becker, T; Liepelt, I; Becker, J; Riedel-Heller, S; Scherer, M; Jessen, F; Maier, W; Dodel, R; Ramirez, A (2016): TREM2 rare variant p.R47H is not associated with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 23: 109–111.

7.2 Liste der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrenden waren in Frankfurt am Main die Damen und Herren:

Benzenhöfer, Boles, Brandes, Brandt, Heid, Kaiser, Korf, Mäntele, Müller-Esterl, Nürnberger, Roeper, Rüb.

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg die Damen und Herren:

Barth, Bartsch, Bauer, Becker, Behr, Bien, Bliemel, Dodel, Egert, Engelhardt-Cabilic, Geks, Gerlach, Görg, Gress, Grimm, Hamer, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Kann, Kanngießer, Kircher, Kirschbaum, Klose, Knake, Köhler, Kolb-Niemann, König, Lohoff, Maier, Moll, Möller, Nenadic, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Renz, Rosenow, Ruchholtz, Schieffer, Schmidt, Schneider, Schu, Sekundo, Sevinc, Vogelmeier, Wagner, Wulf.

7.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Dodel und Herrn Dr. med. D. Mengel für die engmaschige Betreuung und Förderung bedanken. Trotz der zuletzt großen räumlichen Distanz standen wir im regen Austausch. Insbesondere Herr Dr. Mengel vermittelte mir einen theoretischen und praktischen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten und unterstützte mich in jeder Situation mit Rat und Tat.

Darüber hinaus gebührt mein besonderer Dank Frau S. Stei, die mir im Labor bei der experimentellen Durchführung zur Seite stand. Ihre langjährige Erfahrung erleichterte mir die Fehlersuche, wenn ein Versuch missglückte. Sie trug gemeinsam mit den anderen wissenschaftlichen Mitarbeitern der AG Dodel zur offenen und freundlichen Arbeitsatmosphäre des Labors bei.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die stets ein offenes Ohr für Inhaltliches und Persönliches hatten. In den vielen Gesprächen und Diskussionen konnte ich neue Inspiration, Motivation und Durchhaltevermögen sammeln.