

**Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt
Neurodegenerative Erkrankungen**

**Untersuchung des Einflusses von *SNCA-Rep1* auf das
Erkrankungsalter und klinische Parameter bei Patienten
mit idiopathischem Parkinson-Syndrom**

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

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

vorgelegt von

Silimon, Norbert

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Gasser

2. Berichterstatter: Professor Dr. Y. Weber

Tag der Disputation: 25.04.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Klassifikation der Parkinson-Syndrome	10
1.2	Epidemiologie	11
1.3	Neuropathologie	12
1.4	Klinik	13
1.5	Diagnose	15
1.6	Therapie	17
1.7	Genetik der Parkinson-Krankheit	19
1.7.1	Monogenetische Formen der Parkinson-Krankheit	20
1.7.1.1	Autosomal dominante Formen der Parkinson-Krankheit	21
1.7.1.1.1	PARK1/4: SNCA (alpha-Synuklein)	21
1.7.1.1.2	PARK8: LRRK2	22
1.7.1.2	Autosomal rezessive Formen der Parkinson-Krankheit	23
1.7.1.2.1	PARK2: Parkin	23
1.7.1.2.2	PARK6 (PINK1) und PARK7 (DJ1)	23
1.7.2	Genetische Risikofaktoren der Parkinson-Krankheit	24
1.7.2.1	Morbus Gaucher und das <i>GBA</i> -Gen	24
1.7.2.2	<i>SNCA-Rep1</i>	25
1.7.2.3	SNPs im <i>SNCA</i> -Gen	26
1.8	Fragestellung der Arbeit	27
2	Studienkollektiv, Material und Methoden	28
2.1	Studienkollektiv	28
2.2	Bestimmung des <i>Rep1</i> -Genotyps	30
2.2.1	Material	30
2.2.1.1	Geräte	30
2.2.1.2	Verbrauchsmaterialien	30
2.2.1.3	Reagenzien für die PCR	31
2.2.1.4	Synthetische Oligonukleotide für die PCR (Primer)	31
2.2.1.5	Reagenzien für die DNA-Fragmentanalyse	32

2.2.1.6	Puffer	33
2.2.1.7	Weitere Reagenzien	33
2.2.1.8	Verwendete Computerprogramme	33
2.2.1.9	Verwendete Internetseiten	34
2.2.2	Methoden.....	34
2.2.2.1	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	34
2.2.2.2	Verdünnung der DNA-Proben.....	35
2.2.2.3	Polymerasekettenreaktion	35
2.2.2.4	Gelelektrophorese	38
2.2.2.5	DNA-Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese	40
2.2.2.6	Auswertung der Fragmentanalyse	42
2.3	Klinische Parameter	44
2.3.1	Klinisch-neurologische Untersuchung	44
2.3.2	Neuropsychologische Untersuchung	45
2.3.3	Parkinson-Medikation	45
2.4	Statistische Analysen	46
2.4.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	46
2.4.2	Genetisches Modell	47
2.4.3	T-Test	47
2.4.4	Chi-Quadrat-Test.....	48
2.4.5	Lineare Regressionsmodelle	48
2.4.6	Kovarianzanalyse (ANCOVA).....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Charakterisierung des Studienkollektivs.....	50
3.1.1	Charakterisierung der klinischen Parameter des Studienkollektivs	52
3.2	<i>Rep1</i>-Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten	54
3.3	Auswertung: <i>Rep1</i>-Genotyp und Alter bei Erkrankungsbeginn	55
3.3.1	Ergebnisse: <i>Rep1</i> -Genotyp und Alter bei Erkrankungsbeginn	55
3.3.2	Häufigkeitenvergleich: <i>Rep1</i> -Genotypen bei Patienten mit und ohne bekannter Mutation	58

3.3.3	Ergebnisse: <i>Rep1</i> -Genotyp und Alter bei Erkrankungsbeginn mit SNPs als Kovariaten	59
3.4	Auswertung: <i>Rep1</i>-Genotyp und klinische Parameter	60
3.4.1	Ergebnisse: <i>Rep1</i> -Genotyp und motorische Marker	60
3.4.1.1	Querschnittsdaten.....	61
3.4.1.2	Longitudinaldaten	62
3.4.2	Ergebnisse: <i>Rep1</i> -Genotyp und neuropsychologische Marker	64
3.4.2.1	<i>Rep1</i> -Genotyp und Gedächtnisleistung.....	64
3.4.2.1.1	Querschnittsdaten.....	64
3.4.2.1.2	Longitudinaldaten	65
3.4.2.2	<i>Rep1</i> -Genotyp und Depression	66
3.4.3	Ergebnisse: <i>Rep1</i> -Genotyp und L-Dopa-Äquivalenzdosen	68
3.4.3.1	Querschnittsdaten.....	68
3.4.3.2	Longitudinaldaten	70
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	72
4	Diskussion	74
4.1	Diskussion der Methodik.....	74
4.1.1	Sicherheit der Parkinson-Diagnose	74
4.1.2	Sicherheit und Aussagekraft der Ergebnisse	75
4.1.2.1	Bestimmung des Genotyps.....	75
4.1.2.2	Alter bei Erkrankungsbeginn.....	75
4.1.2.3	Klinische Parameter.....	76
4.2	Diskussion der Ergebnisse	77
4.2.1	Studienkollektiv.....	77
4.2.2	Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten	77
4.2.3	<i>Rep1</i> und Alter bei Erkrankungsbeginn	80
4.2.3.1	Beurteilung der gegensätzlichen Ergebnisse in der Literatur	83
4.2.3.1.1	Mögliche Beeinflussung von <i>Rep1</i> durch SNPs	83
4.2.3.1.2	Mögliche Beeinflussung des <i>Rep1</i> -Effekts durch Umweltfaktoren ...	85
4.2.4	<i>Rep1</i> und klinische Parameter	87
4.2.4.1	Motorische Marker – UPDRS III	88

4.2.4.2	Gedächtnisleistung	90
4.2.4.3	Depression.....	91
4.2.4.4	L-Dopa-Äquivalenzdosis.....	92
4.2.4.5	Beurteilung der Erkenntnisse über klinische Parameter.....	93
4.2.5	Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Arbeit.....	94
4.3	Ausblick	94
5	Zusammenfassung.....	97
6	Anhang	99
6.1	UPDRS III (<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale III</i>)	99
6.2	Beck-Depressions-Inventar (BDI)	102
6.3	Mini-Mental-Status-Test (MMST).....	105
6.4	Montreal Cognitive Assessment (MoCA).....	106
7	Abbildungsverzeichnis	107
8	Tabellenverzeichnis	108
9	Literaturverzeichnis	110
10	Erklärung zum Eigentel	119
11	Danksagung.....	120
12	Lebenslauf	121

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenosin
ANCOVA	Kovarianzanalyse (analysis of covariance)
<i>ATP13A2</i>	ATPase type 13A2
BDI	Beck-Depressions-Inventar
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
c	Konzentration
C	Cytosin
CBD	Kortikobasale Degeneration
CCD	Photosensor (charge coupled device)
CI	Konfidenzintervall (confidence interval)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DAT	Dopamintransporter
<i>DJ-1</i>	oncogene DJ-1
DLB	Demenz mit Lewy-Körperchen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ex	Exon
F	Forward
<i>FBXO7</i>	F-box only protein 7
G	Guanin
<i>GBA</i>	Glukozerebrosidase
<i>GIGYF2</i>	GBR10-interacting GYF protein 2
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser

<i>HTRA2</i>	high temperature requirement protein A2
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
K	kurzes Allel
L	langes Allel
LD	Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium)
<i>LRRK2</i>	Leucine-rich repeat kinase 2
m	männlich
M	mittleres Allel
MAO-B	Monoaminoxidase-Typ-B
MDS-UPDRS III	Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Dritter Teil
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	millimolar
MMST	Mini-Mental-Status-Test
MoCA	Montreal Cognitive Assessment
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSA	Multisystematrophie
<i>NACP</i>	<i>SNCA</i> , alpha-Synuklein
nm	Nanometer
o	oder
<i>PARP-1</i>	Poly-(ADP-ribose)-polymerase 1
PCR	Polimerasekettenreaktion
<i>PINK1</i>	PTEN-induced putative kinase 1
<i>PLA2G6</i>	Phospholipase A2 group VI
pmol	Picomol
PSP	Progressive supranukleäre Paralyse
R	Reverse

rs	reference SNP
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SNCA	alpha-Synuklein
SNP	single nucleotide repeat
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>UCHL1</i>	ubiquitin C-terminal hydrolase L1
UPDRS III	Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Dritter Teil
V	Volumen
vs	versus
w	weiblich
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Aminosäuren wurden nach dem international gültigen Einbuchstabencode angegeben:

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

1 Einleitung

Die Parkinson-Krankheit ist eine langsam fortschreitende neurodegenerative Bewegungsstörung. Sie ist durch die Degeneration dopaminergener Neuronen vornehmlich der Substantia nigra und durch die Verarmung von Hirnstrukturen an Dopamin gekennzeichnet [1]. Die Krankheit wurde bereits im Jahre 1817 – also vor rund 200 Jahren – vom englischen Arzt James Parkinson beschrieben: In seiner Abhandlung über die Schüttellähmung („*An Essay on the Shaking Palsy*“) berichtete er über Patienten mit unwillkürlichen, zitternden Bewegungen in unbewegten Körperteilen und der Neigung, den Rumpf nach vorne zu beugen [2]. Später schlug der französische Arzt Charcot vor, dieses als Schüttellähmung beschriebene Krankheitsbild, nach seinem Beschreiber, Parkinson-Krankheit zu nennen [3].

1.1 Klassifikation der Parkinson-Syndrome

Das Parkinson-Syndrom wird durch das Vorliegen der klinischen Symptome Bradykinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität – in variabler Ausprägung – definiert [3]. Dabei können verschiedenartige Ursachen zu den erwähnten Symptomen führen.

Die weitaus häufigste Ursache dieses Syndroms ist die Parkinson-Krankheit (*Parkinson's disease*, PD) [4], die in der Mehrheit der Fälle sporadisch auftritt. Bis heute ist die Ätiologie dieser Fälle ungeklärt [1], weshalb sie als idiopathisches oder auch primäres Parkinson-Syndrom (= IPS) bezeichnet wird.

Es konnten bisweilen bestimmte Veränderungen in Genen identifiziert werden, die zum Parkinson-Syndrom führen. Sie bilden die Gruppe der familiären Parkinson-Krankheit. Obwohl diese Genmutationen nur einen Bruchteil der Parkinson-Syndrome erklären können, helfen sie molekulare Signalwege aufzudecken, die wahrscheinlich auch bei der idiopathischen Form eine Rolle spielen [5].

Wenn von der Parkinson-Krankheit die Rede ist, meint das meist die idiopathisch auftretende Erkrankung. Traditionell werden bislang auch die genetisch determi-

nierten Fälle zu der Parkinson-Krankheit gezählt [6]. Um sie zu unterscheiden, wird oft der Zusatz idiopathisch/sporadisch oder familiär verwendet.

Davon abzugrenzen sind eine Reihe symptomatischer (auch *sekundär* genannt) Parkinson-Syndrome, deren Genese bekannt ist. Diese können beispielsweise durch bestimmte Toxine hervorgerufen werden (zum Beispiel MPTP oder einige Pestizide) [1] oder medikamenteninduziert sein (zum Beispiel Neuroleptika) [6].

Die letzte Gruppe der Parkinson-Syndrome bilden die sogenannten atypischen Parkinson-Syndrome (Parkinson-Plus-Syndrome). Diese sind unter anderem gekennzeichnet durch über das IPS hinausgehende Symptome und ein schlechteres Ansprechen auf die L-Dopa basierte Parkinson-Medikation. Zu ihnen gehören die Multisystematrophie (MSA), die progressive supranukleäre Paralyse (PSP), die kortikobasale Degeneration (CBD) und die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) [6].

1.2 Epidemiologie

Die Parkinson-Krankheit ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Krankheit [7]. Die Inzidenz über alle Altersgruppen beträgt 13,4/100.000, wobei sie stark mit dem Alter ansteigt. Erkrankten unter den 50-59-Jährigen rund 10 von 100.000 neu an der Parkinson-Krankheit, so liegt diese Zahl bei den über 80-Jährigen bei knapp 120/100.000. Männer erkranken im Durchschnitt häufiger als Frauen [8], was möglicherweise auf einen protektiven Effekt von Östrogenen zurückzuführen ist [1]. Zudem werden unterschiedliche Inzidenzraten in verschiedenen ethnischen Gruppen berichtet, wonach Europäer häufiger an Parkinson erkranken als Asiaten oder Afroamerikaner [8].

In industrialisierten Ländern liegt die Prävalenz in der allgemeinen Bevölkerung bei 0,3% [7] und steigt bei über 60-Jährigen auf 1% an. Das mediane Erkrankungsalter liegt etwa bei 60 Jahren mit einer medianen Krankheitsdauer von rund 15 Jahren [3].

1.3 Neuropathologie

Das klassische Kennzeichen der Parkinson-Krankheit ist ein Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta. Dadurch kommt es zu einer Abnahme des Transmitters Dopamin in den Basalganglien [9]. Da Dopamin insgesamt gesehen einen fördernden Einfluss auf die Motorik ausübt, bewirkt der Mangel nun eine Verminderung der spontanen Bewegung (Hypokinese) [6] und ist ferner verantwortlich für viele weitere motorische Symptome der Parkinson-Krankheit [9]. Die Degeneration betrifft in einem geringeren Ausmaß aber auch Neurone anderer Transmittersysteme des Nervensystems, was eine mögliche Erklärung für die nicht-motorischen Parkinson-Symptome liefert [1].

Der Nervenzellverlust wird begleitet durch intrazelluläre, eosinophile Einschlusskörperchen, den sogenannten Lewy-Körperchen, in den noch lebenden Zellen. Sie bestehen hauptsächlich aus fehlgefaltetem und aggregiertem alpha-Synuklein [3]. Interessant sind dabei die Ergebnisse von Braak et al. [10, 11], die aggregiertes alpha-Synuklein und Lewy-Körperchen, neben der Substantia nigra, in verschiedenen Kernen des zentralen Nervensystems sowie dem Bulbus olfactorius fanden; selbst im autonomen Plexus der Darmwand wurden diese Einschlüsse entdeckt. Sie schlugen eine Hypothese vor, wonach eine Propagation von aggregiertem alpha-Synuklein entlang von axonalen Bahnen möglich wäre.

Die Pathogenese der Parkinson-Krankheit ist bis heute allerdings nicht abschließend geklärt, ebenso wie die genaue Rolle der Lewy-Körperchen weitestgehend unbekannt ist. Diskutiert werden momentan einige Mechanismen, die zur Neurodegeneration führen können: oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion, Fehlfunktion des Proteinabbaus über das Ubiquitin-Proteasom-System und die Aggregation von fehlgefalteten Proteinen, die einen toxischen Effekt auf Nervenzellen ausüben [1].

1.4 Klinik

Frühe Krankheitszeichen

Die Parkinson-Krankheit beginnt in der Regel schleichend. Viele Patienten schreiben anfängliche Krankheitszeichen dem Alter, anderen Krankheiten oder Gelenkbeschwerden zu. Solche Krankheitszeichen äußern sich häufig als eine Beeinträchtigung der Fingerfertigkeit, als leicht abgeschwächtes Mitschwingen eines Armes oder durch verminderte Mimik. Des Weiteren kann das Gangbild kleinschrittiger und das gewohnte Schriftbild kleiner werden (Mikrographie). Die Symptome werden selten vom Patienten selbst bemerkt, häufiger fällt es Familienmitgliedern oder Arbeitskollegen auf. Deshalb ist ein Abstand von zwei bis drei Jahren zwischen den ersten Symptomen und der Diagnose nicht ungewöhnlich [3, 12].

Motorische Symptome

Nach dieser häufigen, von relativ subtilen Symptomen geprägten Anfangsphase beginnen die klassischen motorischen Symptome einseitig. Obwohl die Erkrankung im Verlauf auch die andere Körperhälfte betrifft, bleibt die Asymmetrie in der Regel bestehen [6]. Zu den vier Kardinalsymptomen der Parkinson-Krankheit zählen Bradykinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität.

Bradykinese beschreibt eine Verlangsamung von Bewegungen und ist häufig auch mit einer Verarmung an Spontanbewegungen sowie mit Defiziten in der Planung, Initiierung und Ausführung von (gleichzeitigen) Bewegungen („Multitasking“) verbunden [13]. Eine häufige Ausprägung dessen ist das „Freezing“, welches sich durch das „Einfrieren“ der Bewegung zu Beginn (zum Beispiel Ganginitiierungsstörung) oder inmitten des Ablaufs auszeichnet: Oft sind bestimmte Situationen Auslöser, beispielsweise wenn der Patient umdrehen möchte [14]. Rigor bezeichnet eine Erhöhung des Muskeltonus, der meist vom sogenannten „Zahnradphänomen“ begleitet wird. Das beschreibt die Tatsache, dass bei Bewegungen der Muskeltonus ruckartig nachlässt, was an das Ineinandergreifen von Zahnrädern erinnert und eine gleichmäßige Bewegung erschwert. Von Patienten wird das oft als Steifheitsgefühl oder Schmerz (durch die andauernde Muskelspannung) wahrgenom-

men [14]. Tremor ist ein häufiges Symptom: Er stellt bei Parkinson-Kranken ein Zittern in Ruhe dar – meist der distalen Extremitäten. Der Tremor hat üblicherweise eine mittlere Frequenz (4 - 6 Hz) und eine mittlere Amplitude [14]. Als eine eher späte Manifestation der Krankheit tritt eine Haltungsinstabilität auf, welche auf den Verlust der posturalen Reflexe zurückzuführen ist. Es ist häufig die Ursache von Stürzen und als Konsequenz davon von Frakturen [4, 14]. Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium laufen gebeugt mit kleinen Schritten und flektierten angezogenen Armen [14].

Diese Kardinalsymptome kommen je nach Patient in unterschiedlichem Ausmaß vor. Seltener können auch andere motorische Manifestationen auftreten.

Nicht-motorische Symptome

Neben den motorischen Symptomen treten auch eine Reihe von Beschwerden auf, die sich nicht auf das motorische System beziehen, welche aber die Lebensqualität der Erkrankten trotzdem erheblich einschränken können. Riechstörungen, die sich meist als Hyposmie zeigen, betreffen bis zu 90 % der Parkinson Patienten; sie gehören zu den Frühsymptomen und können auf die Krankheit hinweisen [6, 15, 16]. Viele Patienten berichten des Weiteren über Dysfunktionen des autonomen Nervensystems. Diese Beschwerden zeigen sich häufig als orthostatische Hypotension, chronische Obstipation oder Dranginkontinenz [17].

Recht häufig sind auch neuropsychologische Symptome. An einer kognitiven Beeinträchtigung im Sinne einer Demenz leiden rund 40 % der Patienten, wobei die Zahl in späteren Krankheitsstadien noch weiter ansteigt [4, 14]. Nahezu die Hälfte der Patienten leidet an depressiven Symptomen, welche sie in ihrem Alltag einschränken [18]. Häufig sind auch Schlafstörungen und Halluzinationen [14].

1.5 Diagnose

Klinische Diagnostik

Die Diagnose der Parkinson-Krankheit stützt sich hauptsächlich auf den klinisch-neurologischen Befund. Als diagnostische Kriterien werden am häufigsten die der *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank* [3, 12] verwendet. Diese basieren auf dem Vorliegen der klassischen motorischen Symptome, dem Fehlen von atypischen Symptomen und auf Zeichen, welche die Diagnose unterstützen [14, 16, 19]. Die motorischen Zeichen wurden schon im Kapitel 1.4 besprochen. Zu den unterstützenden Zeichen, die für die Parkinson-Krankheit sprechen, gehören unter anderem ein einseitiger Beginn der Symptomatik mit Persistenz der Asymmetrie, ein Krankheitsverlauf von zehn oder mehr Jahren, ein sehr gutes Ansprechen auf L-Dopa, Hyposmie und visuelle Halluzinationen. Ausschlusskriterien für die Diagnose sind unter anderem eine schrittweise Progression der Parkinson Symptome bei wiederholten Schlaganfällen in der Patientengeschichte, Neuroleptika-Einnahme bei Beginn der Symptome, ein zerebraler Tumor, ein kommunizierender Hydrozephalus, eine supranukleäre Blickparese, frühes Auftreten von schweren autonomen Symptomen oder schwerer Demenz sowie fehlendes Ansprechen auf große L-Dopa-Dosen [16].

Die definitive Diagnose kann aber bis heute nur durch eine postmortale Autopsie gestellt werden unter Berücksichtigung der neuropathologischen Kriterien für die Parkinson-Krankheit (siehe Kapitel 1.3) [20].

Differentialdiagnosen

Die Klinik der klassischen Parkinson-Krankheit ist recht charakteristisch, viele Patienten präsentieren sich aber mit weniger bezeichnenden Symptomen; in diesen Fällen ist eine sorgfältige Differentialdiagnose notwendig. Zu den möglichen Differentialdiagnosen zählen zunächst die sekundären Parkinson-Syndrome, bei denen oft eine ausführliche Anamnese mögliche auslösende Faktoren identifizieren kann (z.B. Medikamentenanamnese, Toxin-Exposition). Atypische Parkinson-Syndrome müssen ebenfalls ausgeschlossen werden, vor allem die MSA, die sich häufig mit

schweren autonomen Symptomen (zum Beispiel Synkopen) manifestiert, und die PSP, bei der eine vertikale supranukleäre Blickparese charakteristisch ist; im Allgemeinen sind die atypischen Parkinson-Syndrome schneller progredient. Schließlich müssen noch andere neurologische Krankheitsbilder betrachtet werden. Der essentielle Tremor wird oft als Parkinson-Krankheit fehldiagnostiziert. Bei diesem ist aber meist keine Bradykinese vorhanden, es liegt meist ein Halte- und kein Ruhetremor vor und der Tremor bessert sich häufig bei geringen Mengen Alkohol [3].

Apparative Diagnostik

Apparative Diagnostik kann helfen die Diagnose zu bestätigen und Differentialdiagnosen auszuschließen. Riechtests sind kostengünstig und können schon früh Hinweise auf eine mögliche Parkinson-Krankheit liefern, sie sind allerdings wenig spezifisch, da viele in der älteren Bevölkerung und auch andere Krankheitsbilder eine Riechstörung aufweisen. Zudem sind Riechtests auch geeignet (mit gewissen Ausnahmen), atypische und sekundäre Parkinson-Syndrome von der Parkinson-Krankheit abzugrenzen [16].

In der Bildgebung spielt an einigen Zentren die transkraniale Sonographie eine Rolle, um frühe Formen der Parkinson-Krankheit zu detektieren sowie von atypischen Parkinson-Syndromen zu unterscheiden. Die Magnetresonanztomographie (MRT) kann häufig helfen eine MSA oder PSP zu detektieren und von der Parkinson-Krankheit abzugrenzen, da diese Patienten oft charakteristische Gehirnveränderungen zeigen. Zudem können Tumore, Schlaganfälle und ein Hydrozephalus ausgeschlossen werden, die für parkinsonoide Symptome verantwortlich sein können. Schließlich kann die *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) mithilfe von radioaktiv markierten Liganden präsynaptische Dopamintransporter (DAT) untersuchen. Im Falle einer regelgerechten Funktion des DAT liegt der Verdacht nahe, dass eher ein essentieller Tremor vorliegt [16].

Molekulare Diagnostik und Biomarker

Bislang steht kein verlässlicher Biomarker zur Verfügung, der eine Diagnose erlaubt oder den Krankheitsverlauf widerspiegeln kann [20]. Jedoch bietet die DNA-Diagnostik eine Möglichkeit, Patienten auf genetische Mutationen zu untersuchen. Da genetisch determinierte Parkinson-Formen klinisch nicht sicher von der idiopathischen Form zu unterscheiden sind [5], macht dies vor allem bei Patienten mit mehreren betroffenen Familienmitgliedern Sinn, bei bestimmten Bevölkerungsgruppen, in denen bestimmte Mutationen sehr häufig sind, oder bei einem ungewöhnlich frühen Alter bei Erkrankungsbeginn. Da im Moment aber keine spezielle Therapie für diese Fälle vorliegt, begrenzt sich die Rolle der DNA-Diagnostik auf die Beratung des Patienten bezüglich der Prognose und das genetische Risiko für die Familienmitglieder [16].

1.6 Therapie

Die Parkinson-Krankheit stellt immer noch eine unheilbare Krankheit dar. Es steht jedoch eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Verfügung, die Krankheit zu behandeln, um die Lebensqualität und Funktionalität im Alltag zu steigern [3].

L-Dopa plus Decarboxylasehemmer

L-Dopa (auch *Levodopa*) zusammen mit einem peripheren Decarboxylasehemmer ist bis heute die effektivste Therapie [21]. L-Dopa wird über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) transportiert und zu Dopamin decarboxyliert, um das Dopamin-Defizit auszugleichen. Das direkte Verabreichen von Dopamin wäre ineffektiv, da es die BHS nicht überqueren kann. Periphere Decarboxylasehemmer (Benserazid und Carbidopa) können die BHS ebenso wenig passieren, verhindern aber, dass L-Dopa in der Peripherie zu Dopamin umgewandelt wird, wodurch die Nebenwirkungen stark reduziert werden [6, 22]. L-Dopa verbessert Bradykinese und Rigor; der Tremor wird je nach Patient erst im Verlauf gebessert [3].

Im Laufe der Therapie zeigt sich aber oft das L-Dopa-Langzeitsyndrom, das durch Symptomfluktuationen (ON/OFF-Phänomen) gekennzeichnet ist. Zusätzlich können bei hohem Wirkstoffspiegel nach der Einnahme der Medikation Dyskinesien (Peak-dose-Dyskinesien) auftreten, die beim darauf folgenden Talspiegel von akinetischen Symptomen (End-of-Dose-Akinesie, OFF-Phase) gefolgt werden [6].

Dopaminagonisten

Dopaminagonisten können direkt an Dopamin-Rezeptoren von Neuronen binden und diesen aktivieren. Dopaminagonisten (zum Beispiel Pramipexol und Ropinirol) sind weniger wirksam als L-Dopa. Sie stellen aber einen wichtigen Therapiepfeiler vor allem in der Behandlung der frühen Parkinson-Stadien und jüngeren Patienten dar. Sie führen seltener zu Dyskinesien, haben aber mehr periphere Nebenwirkungen [21, 22].

COMT-Inhibitoren

Die *Catechol-O-Methyltransferase* (COMT) baut verschiedene Neurotransmitter und auch L-Dopa ab. Durch die Hemmung dieses Enzyms wird dieser Vorgang unterbunden, wodurch dem Körper mehr L-Dopa zur Verfügung steht. COMT-Inhibitoren (Entacapon und Tolcapon) werden aufgrund ihres Wirkprinzips immer zusammen mit L-Dopa und einem peripheren Decarboxylasehemmer verabreicht. Sie reduzieren Fluktuationen im L-Dopa-Wirkspiegel und verringern dadurch OFF-Phasen – entsprechend werden sie oft in späten Krankheitsstadien angewendet [21, 22].

MAO-B-Inhibitoren

Die *Monoaminoxidase-Typ-B* (MAO-B) baut Dopamin ab, nachdem es den Rezeptor aktiviert hat. Durch ihre irreversible Hemmung durch MAO-B-Inhibitoren (Rasagilin und Selegilin) steigt der Dopamin-Gehalt in den Basalganglien [6]. Die Wirksamkeit ist geringer als bei L-Dopa oder Dopaminagonisten. Da sie aber die Krankheitsprogression in den Anfangsstadien zu verzögern scheinen, haben sie in

der Initialtherapie von Patienten einen Stellenwert, die noch nicht zu ausgeprägte motorische Symptome zeigen [3, 21, 22].

Weitere Medikamente

Um andere Symptome zu bessern, können weitere Arzneimittel ergänzt werden. Anticholinergika können beispielsweise den Ruhetremor bessern und Amantadin kann Dyskinesien lindern [22]. Die nicht-motorischen Symptome können ebenfalls mit entsprechenden Medikamenten angegangen werden.

Tiefe Hirnstimulation

Bei langjähriger Krankheitsdauer und zunehmender klinischer Symptomatik, die medikamentös schwer kontrollierbar ist, kann die Implantation eines Hirnstimulators erwogen werden. Dabei werden Elektroden in den Nucleus subthalamicus oder den Globus pallidus internus operativ eingelassen, um sie dann mit hochfrequenten elektrischen Impulsen zu stimulieren. Mit der Operation wird in der Regel eine beträchtliche Verbesserung der Symptome erzielt [6, 21].

1.7 Genetik der Parkinson-Krankheit

Die Parkinson-Krankheit tritt nach heutigem Wissen in der Mehrzahl der Fälle sporadisch auf. Bei etwa 10 - 20 % der Patienten liegt aber eine positive Familienanamnese vor [19, 23]. Diese Erkenntnis führte in den letzten 20 Jahren zur Entdeckung einer Vielzahl von Genen, die zu monogenetischen Formen der Parkinson-Krankheit führen, die den Mendelschen Vererbungsregeln folgen [24]. Zudem fanden genomweite Assoziationsstudien (*genome-wide association study*, GWAS) genetische Risikofaktoren, die zwar nicht direkt krankheitsverursachend sind, aber die Empfänglichkeit für die Krankheit steigern können [25-28]. Diese Risikovarianten sind weitaus häufiger als die monogenetischen Krankheitsvarianten und könnten deshalb eine beträchtliche Rolle in der großen Gruppe der sporadischen Parkinson-Patienten spielen, was das Krankheitsrisiko betrifft [29].

In den nachfolgenden Kapiteln soll zunächst auf monogenetisch verursachte Parkinson-Formen eingegangen werden. Im Anschluss werden dann genetische Risikovarianten besprochen.

1.7.1 Monogenetische Formen der Parkinson-Krankheit

Bislang wurde eine Reihe von Genen beschrieben, deren Mutationen direkt zur Parkinson-Krankheit führen. Sie können anhand ihres Vererbungsmodus in autosomal dominante und rezessive sowie X-chromosomale Formen eingeteilt werden. Mutationen in diesen Genen verursachen weniger als 10 % der Parkinson-Fälle [24]. Eine Zusammenfassung der wichtigsten dieser Gene ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der monogenetischen Parkinson-Loci, modifiziert nach [5, 19, 24, 29]

- a. Punktmutationen
- b. Duplikation oder Triplikation
- c. Patienten mit diesen Mutationen weisen meist zusätzlich atypische Symptome auf

Lokus	Gen	Chromosom	Vererbungsmodus	Erkrankungsalter in Jahren
<i>PARK1</i>	<i>SNCA</i> ^a	4q21	dominant	40
<i>PARK2</i>	<i>Parkin</i>	6q25-q27	rezessiv	20-40
<i>PARK3</i>	<i>unbekannt</i>	2p13	dominant	60
<i>PARK4</i>	<i>SNCA</i> ^b	4q21	dominant	30
<i>PARK5</i>	<i>UCHL1</i>	4p14	dominant	50
<i>PARK6</i>	<i>PINK1</i>	1p36	rezessiv	30-40
<i>PARK7</i>	<i>DJ1</i>	1p36	rezessiv	30-40
<i>PARK8</i>	<i>LRRK2</i>	12q12	dominant	60
<i>PARK9</i>	<i>ATP13A2</i>	1p36	rezessiv	10-20 ^c
<i>PARK10</i>	<i>unbekannt</i>	1p32	unbekannt	50-60
<i>PARK11</i>	<i>GIGYF2</i>	2q37	dominant	später Beginn
<i>PARK12</i>	<i>unbekannt</i>	Xq21-q25	X-chromosomal	später Beginn
<i>PARK13</i>	<i>HTRA2</i>	2p12	dominant	später Beginn
<i>PARK14</i>	<i>PLA2G6</i>	22q13	rezessiv	10-20 ^c
<i>PARK15</i>	<i>FBXO7</i>	22q12-q13	rezessiv	früher Beginn ^c

ATP13A2 = ATPase type 13A2

DJ-1 = oncogene DJ-1

FBXO7 = F-box only protein 7

GIGYF2 = GBR10-interacting GYF protein 2

LRRK2 = Leucine-rich repeat kinase 2

HTRA2 = high temperature requirement protein A2

PLA2G6 = phospholipase A2 group VI

PINK1 = PTEN-induced putative kinase 1

SNCA = alpha-Synuklein

UCHL1 = ubiquitin C-terminal hydrolase L1

1.7.1.1 Autosomal dominante Formen der Parkinson-Krankheit

1.7.1.1.1 *PARK1/4: SNCA* (alpha-Synuklein)

SNCA war das erste Gen überhaupt, das als Verursacher von familiären Formen der Parkinson-Krankheit identifiziert werden konnte [30]. Die Veränderungen des Gens rufen ein autosomal dominantes Parkinson-Syndrom hervor. *SNCA* liegt auf dem langen Arm von Chromosom 4 (4q23) [31] und codiert für insgesamt 6 Exons [32]. Die genaue Funktion des alpha-Synuklein-Proteins, das von *SNCA* codiert

wird, ist nicht bekannt. Allerdings konnte festgestellt werden, dass alpha-Synuklein in präsynaptischen Nervenenden an Vesikel bindet [33, 34] und dort in den Transport- und Wiederbefüllungsprozess der Transmitter-Vesikel involviert ist [35] sowie eine gewisse neuronale Plastizität vermitteln soll [36]. Normalerweise liegt alpha-Synuklein als entfaltetes Monomer vor; es kann aber Oligomere bilden, die sich schließlich zu Fibrillen vereinigen können. Die Aggregation von fibrillärem alpha-Synuklein führt letzten Endes zur Bildung von intrazellulären Einschlusskörperchen, den Lewy-Körperchen [37, 38], was als neuropathologisches Kennzeichen der familiären und auch der sporadischen Parkinson-Krankheit gilt [39].

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind drei Punktmutationen in *SNCA* bekannt (A53T [30], A30P [40], E46K [41]), welche zu einer erhöhten Aggregationstendenz von alpha-Synuklein beitragen [42]. Zusätzlich wurden bislang Duplikationen [43, 44] und Triplikationen [45] des *SNCA*-Gens gefunden. Durch diese Vervielfältigung des Gens steigt die Expression des alpha-Synuklein-Wildtyps an [46], was offensichtlich schon ausreichend ist, ein Parkinson-Syndrom hervorzurufen. Die Beobachtung, dass mit steigender Kopienzahl der Krankheitsverlauf schwerer wird und die Erkrankung früher beginnt, legt einen Dosiseffekt des *SNCA*-Gens nahe [47].

1.7.1.1.2 PARK8: LRRK2

Mutationen im *LRRK2*-Gen verursachen ebenfalls autosomal dominante Parkinson-Formen. Die genaue Funktion des Proteins, für welches *LRRK2* kodiert, ist unbekannt. Es enthält jedoch eine Kinase-Region, die bestimmte Substrate im Gehirn zu phosphorylieren vermag [48]. Bislang wurden einige pathogene Punktmutationen identifiziert, wie zum Beispiel G2019S oder R1441C [49], die möglicherweise über eine Zunahme der Kinase-Aktivität zur Entwicklung der Parkinson-Krankheit beitragen [50].

LRRK2-Mutationen sind mit bis zu 15 % die häufigste Ursache der familiären Parkinson-Krankheit, sie können aber manchmal auch in sporadischen Parkinson-Patienten gefunden werden [19]. In einigen Bevölkerungsgruppen ist die Frequenz

von *LRRK2*-Mutationen um ein Vielfaches höher als in der europäischen Bevölkerung. Die G2019S-Mutation kommt in Ashkenazi-jüdischen Patienten in rund 20 % der Fälle vor [51], in der nordafrikanischen Bevölkerung ist sie noch häufiger mit etwa 40 % [52].

1.7.1.2 Autosomal rezessive Formen der Parkinson-Krankheit

1.7.1.2.1 *PARK2: Parkin*

Das *Parkin*-Gen kodiert für ein Protein, das der Gruppe der Ubiquitin-Ligasen angehört. Es ist in den Prozess involviert, der Ubiquitin an Proteine anheftet, um sie für die Degradation im Proteasom zu markieren [53]. Zusätzlich spielt das Gen eine Rolle bei mitochondrialen Prozessen [54]; möglicherweise induziert es die Autophagie von funktionsgestörten Mitochondrien [55]. Mutationen im *Parkin*-Gen führen zu einer autosomal rezessiven Form der Parkinson-Krankheit, welche sich durch ein sehr niedriges Erkrankungsalter auszeichnet (im Durchschnitt 32 Jahre). Die Krankheitsprogredienz ist langsam, Patienten sprechen gut auf eine L-Dopa-Therapie an, es treten allerdings früh im Krankheitsverlauf Dyskinesien auf [56]. *Parkin*-Mutationen sind die häufigste Ursache von früh beginnenden Parkinson-Syndromen (<30 Jahre) [57]. Neuropathologisch zeigen Patienten in wenigen und kontroversen Studien eine schwere isolierte Degeneration in der Substantia nigra und im Locus coeruleus, jedoch meist ohne das Vorliegen von Lewy-Körperchen [58].

1.7.1.2.2 *PARK6 (PINK1) und PARK7 (DJ1)*

Mutationen in *PINK1* und *DJ1* führen, ähnlich dem *Parkin*, zu einer autosomal rezessiven Parkinson-Krankheit mit einem frühen Krankheitsbeginn (etwa 30 - 40 Jahre) und vergleichbaren klinischen Symptomen [59, 60]. Mutationen in diesen Genen sind allerdings selten verglichen mit *Parkin*; sie machen nur wenige Prozent der früh beginnenden Parkinson-Syndrome aus [19]. Beide Proteine, für die diese

Gene kodieren, sind an Prozessen beteiligt, welche die mitochondriale Antwort auf oxidativen Stress betreffen. Sie wirken einer Dysfunktion von Mitochondrien entgegen, die andauerndem oxidativen Stress ausgesetzt sind, und bewahren sie vor der Apoptose. Auf diese Weise vermitteln sie eine protektive Wirkung auf Neuronen. Durch die Fehlfunktion von *PINK1* und *DJ1* – durch diverse Mutationen – werden Neuronen anfälliger für oxidativen Stress, was zur Degeneration führen kann [61-63].

1.7.2 Genetische Risikofaktoren der Parkinson-Krankheit

Monogenetische Mutationen können das Parkinson-Syndrom nur in einem kleinen Teil der Patienten erklären (familiäre Parkinson-Krankheit). Die Mehrzahl der Mutationen führt allerdings nicht direkt zu einem Parkinsonismus, sie erhöhen bloß das Risiko, an der Parkinson-Krankheit zu erkranken. Obwohl sie das individuelle Risiko nicht voraussagen können, bergen diese Mutationen das Potenzial, zunehmend auf den Patienten zugeschnittene Vorhersagen über den Krankheitsverlauf und den Therapieerfolg zu geben.

1.7.2.1 Morbus Gaucher und das *GBA*-Gen

Homozygote und compound-heterozygote Mutationsträger des Glukozerebrosidase-Gens (*GBA*) erkranken an Morbus Gaucher, einer seltenen lysosomalen Speicherkrankheit. Glukozerebrosidase ist ein lysosomales Enzym, das bestimmte Membranlipide (Glukozerebroside) für den weiteren Abbau spalten kann. Durch die Mutationen liegt ein Defizit des Enzyms vor, wodurch sich diese Lipide in den Zellen verschiedener Gewebe anreichern, was zu multisystemischen Manifestationen führt [64]. Interessanterweise erkranken heterozygote Mutationsträger des *GBA*-Gens häufiger an der Parkinson-Krankheit, als die Inzidenz der Normalbevölkerung dies vermuten ließe [65]. Etwa 7 % der Parkinson-Patienten tragen eine heterozygote *GBA*-Mutation, verglichen mit etwa 1 % der Normalbevölkerung; unter Ash-

kenazi-jüdischen Parkinson-Patienten ist die Zahl noch höher mit etwa 20 % Mutationsträgern [66]. Heterozygote *GBA*-Mutationen (die häufigsten sind N370S und L444P) sind damit momentan die stärksten genetischen Risikofaktoren der Parkinson-Krankheit, obwohl der Pathomechanismus, wie die Mutationen zur Krankheit führen, unklar ist [65].

1.7.2.2 *SNCA-Rep1*

Die Tatsache, dass Lewy-Körperchen (aggregiertes alpha-Synuklein) bei den meisten Parkinson-Patienten vorkommen, familiär und sporadisch, war ein Hinweis dafür, dass das *SNCA*-Gen möglicherweise auch bei der sporadischen Parkinson-Krankheit eine Rolle spielt. Die Feststellung, dass eine erhöhte Expression des alpha-Synuklein-Wildtyps durch Duplikation oder Triplikation des *SNCA*-Gens zur Parkinson-Krankheit führen kann (siehe Kapitel 1.7.1.1.1), führte zu der Untersuchung der Promotorregion von *SNCA*. Promotoren sind im Allgemeinen Regionen eines Gens, die deren regulierte Expression ermöglichen. *Rep1* (D4S3481) bezeichnet eine Sequenz aus Dinukleotid-Wiederholungen (*dinucleotide repeats*) in der Promotorregion von *SNCA* etwa 10.000 Basenpaare vor dem 5'-Ende des Gens (siehe Abbildung 1), was zum ersten Mal von Xia et al. 1996 beschrieben wurde [67]. Es wirkt modulierend auf die Expression von alpha-Synuklein, wobei festgestellt wurde, dass die Anzahl der Wiederholungen (der Basenfolge CA) den Effekt ausübt [68-70]. Somit kann die Länge von *Rep1* in Basenpaaren (bp) als stellvertretender Marker für die Sequenzunterschiede verwendet werden [70]. *Rep1* kommt in der kaukasischen Bevölkerung in drei häufigen Ausprägungen (Längen) vor: Das kurze Allel ist 265 bp lang, das mittlere 267 bp und das lange Allel 269 bp. Dabei wurde das lange Allel als die Risikovariante in einer Metaanalyse von Maraganore et al. identifiziert und das kurze als eher protektive Variante [71]. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den Feststellungen, dass das kurze Allel mit niedrigeren *SNCA*-mRNA- und alpha-Synuklein-Konzentrationen in verschiedenen Gehirngeweben einhergeht als das Risikoallel [72, 73]. In letzter Zeit wur-

den auch krankheitsmodifizierende Effekte des *Rep1* beschrieben, die einerseits das Erkrankungsalter betreffen; dabei gibt es im Moment gegensätzliche Hinweise in der Literatur [71, 74-83]. Andererseits betreffen sie die motorische Progression, wonach das lange *Rep1*-Allel mit einer schnelleren motorischen Verschlechterung vergesellschaftet sein soll [84].

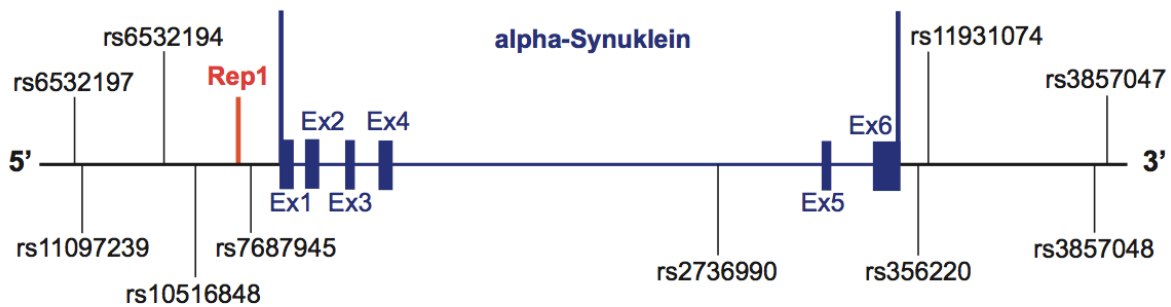


Abbildung 1: Darstellung des SNCA-Gens mit *Rep1* in der Promotorregion

SNCA weist 6 Exons auf, mit der Promotorregion am 5'-Ende des Gens. Die eingetragenen SNPs stellen Punktmutationen dar, die in einige Analysen dieser Studie einfließen. Sie sind anhand ihrer Identifikationsnummern angegeben. Ex = Exon, rs = reference SNP

1.7.2.3 SNPs im *SNCA*-Gen

In den letzten Jahren wurden viele genomweite Assoziationsstudien (GWAS) durchgeführt, die eine Reihe von Genen aufzeigten, die durch ihre Varianten – meist Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) – das Parkinson-Risiko beeinflussen oder krankheitsmodifizierend wirken können. Einige der SNPs im *SNCA*-Gen konnten bislang zuverlässig als Risikovarianten festgestellt werden [25-28, 85]. Diese *SNCA*-Varianten verändern vermutlich, ähnlich dem *Rep1*, die Expression des alpha-Synuklein-Wildtyps und prädisponieren so zur Entwicklung eines Parkinson-Syndroms [86].

1.8 Fragestellung der Arbeit

Nach der Entdeckung bestimmter genetischer Mutationen, die seltene familiäre Formen der Parkinson-Krankheit verursachen können – beispielsweise Mutationen im *SNCA*-Gen – wurde schnell klar, dass die Mehrzahl der genetischen Varianten lediglich die Empfänglichkeit für die sporadische Parkinson-Krankheit erhöhen und nicht direkt krankheitsverursachend sind. Aufgrund der Häufigkeit dieser Varianten spielen sie eine große Rolle für das Parkinson-Risiko in der Bevölkerung; auch wenn sie nicht das individuelle Risiko voraussagen können. In letzter Zeit wurden Bemühungen verfolgt, um herauszufinden, ob einige der Genvarianten auch krankheitsmodifizierend wirken können, was sich im Erkrankungsalter oder in der Krankheitsprogression (Rate der Verschlechterung von motorischen und nicht-motorischen Symptomen) abzeichnen würde. Schließlich könnte das zu einem besseren Verständnis der klinischen Charakteristika der Krankheit führen und gleichzeitig erlauben, zunehmend individualisierte Prognosen über den Krankheitsverlauf und den Therapieerfolg zu geben.

Bislang wurden einige Varianten des *SNCA*-Gens entdeckt, die mit der Parkinson-Krankheit assoziiert sind; eine dieser Varianten ist *Rep1*. Aktuell ist aber die Studienlage über krankheitsmodifizierende Eigenschaften inkonsistent.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Wissen über diese krankheitsmodifizierenden Effekte von *SNCA-Rep1* zu erweitern. Dazu soll der *Rep1*-Genotyp von Parkinson-Patienten bestimmt werden, um dann folgende Fragen zu beantworten:

1. Besteht ein Unterschied im Erkrankungsalter bei Patienten mit unterschiedlichem *Rep1*-Genotyp?
2. Bestehen Unterschiede in klinischen Parametern bei Patienten mit unterschiedlichem *Rep1*-Genotyp?

Dazu sollen motorische Fähigkeiten, Gedächtnisleistung, depressive Symptomatik sowie die Parkinson-Medikation unter den Genotypen verglichen werden. Zum einen sollen die Parameter im Querschnitt untersucht werden; zum anderen sollen im Hinblick auf die Progression dieser Parameter im Krankheitsverlauf longitudinale Analysen durchgeführt werden.

2 Studienkollektiv, Material und Methoden

2.1 Studienkollektiv

Für die Durchführung der hier dargestellten Studie wurde mit DNA-Proben von Patienten gearbeitet, die an der Parkinson-Krankheit (*Parkinson's disease*, PD) erkrankt sind. Einige von ihnen wiesen bekannte Mutationen in Genen auf, die mit der Parkinson Krankheit assoziiert sind (siehe Tabelle 2). Die DNA-Proben stammten überwiegend von Patienten aus dem Einzugsgebiet des Universitätsklinikums Tübingen und lagen in der Tübinger Neuro-Biobank vor; ebenso das schriftliche Einverständnis der Probanden sowie das Votum der Ethikkommission (Projekt-Nr.: 287/2004v).

Tabelle 2: Studienkollektiv mit PD, aufgeteilt nach bekannten Mutationen

Patienten mit Parkinson-Krankheit	Anzahl Patienten
Ohne bekannte Mutation	1.026
Mit bekannter Mutation	18
GBA L444P	12
GBA N370S	6
Summe	1.044

PD = Parkinson's disease; GBA = *glucosidase, beta, acid*

Die Zusammenstellung der DNA-Proben wurde so gewählt, dass bei jedem Patienten das Alter bei Erkrankungsbeginn bekannt war; dazu Daten von zehn verschiedenen SNPs (*single nucleotide polymorphism*), die ebenfalls mit der Parkinson-Krankheit in Verbindung stehen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Die verwendeten SNPs mit den offiziell registrierten Identifizierungsnummern

single nucleotide polymorphism (SNP)	
<i>rs3857047</i>	<i>rs7687945</i>
<i>rs3857048</i>	<i>rs10516848</i>
<i>rs11931074</i>	<i>rs6532194</i>
<i>rs356220</i>	<i>rs11097239</i>
<i>rs2736990</i>	<i>rs6532197</i>

SNP = single nucleotide polymorphism, rs = reference snp

Die Rekrutierung erfolgte in zwei Kohorten, wobei bei der zweiten beachtet wurde, dass möglichst viele Patienten in longitudinalen Studien partizipierten, in welchen auch klinische Parameter (siehe Kapitel 2.3) erhoben wurden. Die Quellen dieser klinischen Daten sind in Tabelle 4 zusammengefasst; wobei bemerkt sein soll, dass viele Patienten an mehreren dieser Studien teilnahmen und nicht jede Studie jeden Parameter erhob, wodurch es teilweise zu erheblichen Überschneidungen kam.

Tabelle 4: Quellen, aus denen klinische Daten für die vorliegende Studie bezogen wurden

Datenursprung	Anzahl Patienten
Studien	
COEN	61
Dempark	49
Dyskinesie	54
LRRK2	6
MODEP	17
PMPP	8
PPMI	8
Riskpanel	522
Sonstige Quellen	
Arztbriefe	131
Hertie-Datenbank	165

2.2 Bestimmung des *Rep1*-Genotyps

2.2.1 Material

2.2.1.1 Geräte

3500xL Genetic Analyzer	Applied Biosystems®
Einkanalpipetten 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
Gelelektrophoresekammern	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Kühlschrank 5,4 °C	Dometic Medical Systems
Kühlschrank -25 °C	Liebherr
Magnetrührer MR 3000	Heidolph Instruments
Magnetrührstäbchen	neolab®
Mehrkanalpipette 10µl	Eppendorf
Mikrowellenherd	Panasonic
Multipette® M4	Eppendorf
Plexiglaskämme	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Spannungsquelle E835	Consort
Spectrafuge Mini	Labnet International, Inc.
Spektralphotometer	Nanodrop™ 1000 PEQLAB
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad
Vortex Genie® 2	Scientific Industries, Inc.
Waage Explorer	Ohaus GmbH
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

2.2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platten und Deckel für DNA	PEQLAB Biotechnologie GmbH
96-Well-Platten und Matten für die PCR	Brand GmbH + CO KG

96-Well-Platten für die DNA-Fragmentanalyse Thermo Scientific

Combitips advanced® für die Multipette®	Eppendorf
Deckmatten für die Fragmentanalyse	Applied Biosystems®
Cellstar® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One
Filterpipettenspitzen	Biozym
Handschuhe Peha-soft® nitril white	PAUL HARTMANN AG
Handschuhe Safeskin Purple Nitrile	Kimberly Clark
Parafilm® M	American National Can™
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,5 µl, 1,5 µl, 2 µl	Eppendorf

2.2.1.3 Reagenzien für die PCR

Desoxyribonukleosid-	
triphosphate (dNTP) 10 mM	Fermentas GmbH
GoTaq® DNA-Polymerase 5 u/µl	Promega GmbH
Colorless GoTaq® PCR-Puffer	Promega GmbH
MgCl ₂ 25 mM	Promega GmbH

2.2.1.4 Synthetische Oligonukleotide für die PCR (Primer)

Polymerasekettenreaktionen (PCR) benötigen kurze Nukleotidsequenzen (etwa 20 Nukleotide), an denen die Kettenreaktion starten kann – diese werden Primer genannt. Da die DNA als Doppelstrang vorliegt, ist einer der Primer komplementär zum Sense-Strang und wird Forward-Primer (F) genannt; der andere zum Antisense-Strang und heißt Reverse-Primer (R).

Die zwei Oligonukleotid-Sequenzen, die dem *Rep1* als Primer dienten, publizierte erstmals Farrer et al. im Jahr 2001 [87]. Sie wurden in dieser Studie unverändert übernommen und sind in Tabelle 5 dargestellt. Da die spätere DNA-

Fragmentanalyse wenigstens einen fluoreszenzfarbstoffmarkierten Primer benötigt, ist hier dem Forward-Primer das 6-FAM™ am 5'-Ende angehängt (siehe Abbildung 2).

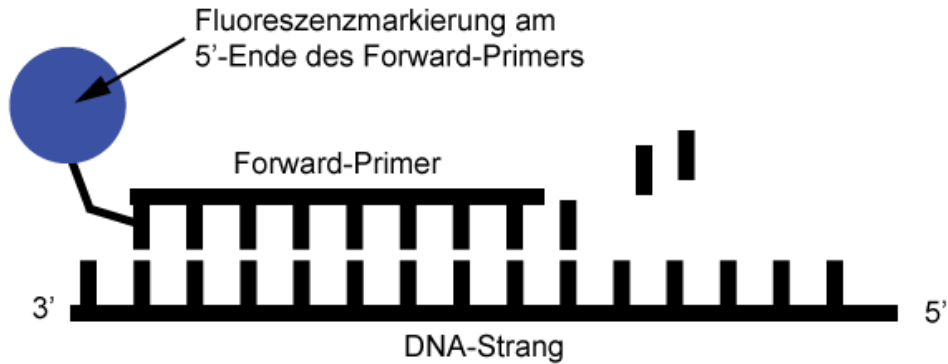


Abbildung 2: DNA-Strang mit angelagertem Forward-Primer, der eine Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende aufweist

Die Synthese führte die Firma Metabion International AG durch. Die Primer wurden zunächst auf die Konzentration 100 pmol/µl eingestellt. Für die Experimente wurden sie um den Faktor 10 auf 10 pmol/µl verdünnt.

Tabelle 5: Sequenz der *NACP-Rep1* (*SNCA-Rep1*) Primer (accession no. U46895)
Der Forward-Primer (F) ist am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM™ (*Fam*) markiert.

Oligonukleotidname	Nukleotidsequenz	Fragmentlänge
<i>NACP-REP1</i>	F: <i>Fam</i> -5'-CCT GGC ATA TTT GAT TGC AA-3'	261 - 271 bp
	R: 5'-GAC TGG CCC AAG ATT AAC CA-3'	

bp = Basenpaare, Fam = Fluoreszenzfarbstoff, F = Forward, R = Reverse

2.2.1.5 Reagenzien für die DNA-Fragmentanalyse

Hi-Di™ Formamid	Applied Biosystems®
GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0	Applied Biosystems®
POP-7™ Elektrophoresepolymer	Applied Biosystems®

2.2.1.6 Puffer

TBE-Puffer (10x):	TRIS-Base	108 g
	Borat	55 g
	EDTA (0,5 M; pH 8)	40 ml
	mit doppelt destilliertem Wasser (H ₂ O _{dd}) auf 1 Liter auffüllen	
TE-Puffer (10x):	TRIS-Base	6,057 g
	EDTA (0,25 M; pH 7,4)	20 ml
	mit H ₂ O _{dd} auf 500 ml auffüllen	

2.2.1.7 Weitere Reagenzien

Agarose LE	Biozym®
Borat	Merck
DNA Loading Dye 6x (Ladepuffer)	Thermo Scientific
EDTA	Merck
Ethanol 99 %	SAV Liquid Production
Ethidiumbromid	Merck
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific
H ₂ O _{dd}	Merck
Midori Green Advance DNA Stain	NIPPON Genetics Europe GmbH
Tris-Base	Roth

2.2.1.8 Verwendete Computerprogramme

GeneMapper® 4.1	Applied Biosystems®
NanoDrop 1000 v3.7.1	PEQLAB Biotechnologie GmbH
PLINK v1.07	Shaun Purcell [88]
SPSS Statistics Version 21 für Mac OS X	IBM®

2.2.1.9 Verwendete Internetseiten

National Center for Biotechnology Information (NCBI)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

UCSC Genome Browser [89]

<http://genome.ucsc.edu/>

Hardy-Weinberg Equilibrium Calculator for 3 Alleles

<http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-3-alleles.html>

2.2.2 Methoden

2.2.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Proben lagen bereits isoliert und in TE-Puffer (1x) gelöst in der Tübinger Neuro-Biobank vor. Für die meisten Proben war auch die Konzentration bekannt; nur für etwa 25 Proben lag keine Konzentration vor.

Diese konnten über Absorptionsphotometrie mit Hilfe des Spektralphotometers Nanodrop™ gemessen werden: Absorptionsphotometrie bestimmt die optische Dichte einer Lösung, das heißt die Abschwächung der Lichtintensität über die Säule des Mediums definierter Dicke. Spektral bedeutet hier, dass nicht eine bestimmte Wellenlänge des Lichts verwendet, sondern eine ganze Bandbreite an Wellenlängen durchwandert wird.

Üblicherweise erreichte die DNA die maximale Abschwächung bei einer Wellenlänge des Lichts von 260 nm. Indem zunächst die Absorption von TE-Puffer (1x) bestimmt wurde, erhielt man einen Leerwert, an dem die Proben gemessen werden konnten und das Gerät die Konzentrationen errechnen konnte.

2.2.2.2 Verdünnung der DNA-Proben

Für die weiteren Experimente wurde die DNA wässrig verdünnt, bis eine Konzentration von 10 ng/μl erreicht wurde. Für die Berechnung des Verdünnungsvolumens wurde folgende Formel verwendet:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

Dabei war c_1 die bekannte DNA-Konzentration der Probe, c_2 die gewünschte DNA-Konzentration, welche hier 10 ng/μl betrug. V_1 war das Volumen der ursprünglichen DNA-Lösung, das für die Verdünnung verwendet wurde. Es wurde hier willkürlich auf 1 μl gesetzt, da dies eine ausreichende Menge DNA darstellte. V_2 ist schließlich das Volumen, das die verdünnte Probe haben wird.

Sie ist die gesuchte Variable und wird verwendet, um zu berechnen, in welches Volumen Wasser (V_{H_2O}) das eine Mikroliter der ursprünglichen DNA-Probe pipetiert werden soll, um die Konzentration 10 ng/μl zu erhalten.

Wenn man nun die obige Gleichung nach der gesuchten Variable (V_2) umstellt, erhält man:

$$V_2 = \frac{c_1 \cdot V_1}{c_2}$$

Hieraus lässt sich V_{H_2O} wie folgt berechnen: $V_{H_2O} = V_2 - 1 \mu l$.

2.2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Sie wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt.

Das Prinzip der Reaktion besteht darin, den langen DNA-Doppelstrang (auf dem die gewünschte Zielsequenz liegt) zu trennen, die Zielsequenz mittels synthetischer Oligonukleotide (Primer) zu flankieren und den dazwischen liegenden DNA-Abschnitt durch eine Polymerase zu vervielfältigen, um anschließend diesen Zyklus oft zu wiederholen. Hierzu wird in einem Reaktionsansatz die DNA mit der

Zielsequenz vermischt mit Primern im Überschuss, allen vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) und der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase. Damit eine wässrige Lösung entsteht werden eine PCR-Pufferlösung und Wasser hinzugegeben. Magnesium-Ionen bilden mit dNTPs Komplexe und dienen der *Taq*-Polimerase als Kofaktor bei der Reaktion. Die *Taq*-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, das in heißen Quellen lebt. Dies ist von großer Relevanz, da der Reaktionsansatz auf sehr hohe Temperaturen erhitzt wird, aber diese Polymerase trotz der Hitze intakt bleibt.

Ein Zyklus einer Kettenreaktion teilt sich in drei Schritte:

Erstens werden die zwei Stränge der ursprünglichen DNA getrennt, in dem der Ansatz kurz auf über 90 °C erhitzt wird (Denaturierung). Als zweiter Schritt wird der Ansatz auf 50 - 60 °C abgekühlt, auf eine Temperatur, bei der sich die Primer an ihre komplementäre Stelle auf der nun einsträngigen DNA anlagern (Annealing). Der Forward-Primer hybridisiert mit dem Sense-Strang, der Reverse-Primer mit dem Antisense-Strang. Der dritte Schritt, die Elongation, besteht darin, dass die Lösung auf 72 °C erhitzt wird, nämlich dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase. Diese kann nun, am Primer beginnend, den komplementären Strang zum Ausgangs-DNA-Strang aus dNTPs synthetisieren. Die Synthese erfolgt von 5' in 3'-Richtung und verlängert somit das 3'-Ende des Primers.

Am Ende des ersten Zyklus resultieren so zwei DNA-Doppelstränge. Im zweiten Zyklus werden diese zwei Doppelstränge erneut getrennt; und jetzt dienen sowohl die zwei ursprünglichen DNA-Einzelstränge als auch die zwei neu hergestellten DNA-Einzelstränge als Vorlage zum Komplementieren. Durch jeden Zyklus wird die Anzahl der DNA (im optimalen Fall) verdoppelt – es handelt sich somit um eine exponentielle Vervielfältigung. Üblicherweise wird der Zyklus etwa 20-40-mal wiederholt. Es entstehen DNA-Fragmente, die der DNA-Sequenz entsprechen, die von den Primern eingefasst wird.

PCR-Protokoll

Tabelle 6 stellt den Reaktionsansatz für die PCR dieser Studie dar. Die Reagenzien wurden als Mastermix angesetzt und anschließend auf die Reaktionsgefäße einer 96-Well-Platte aufgeteilt. In 95 Reaktionsgefäße wurde anschließend jeweils 4,0 µl der verdünnten Patienten-DNA (10 ng/µl) gegeben. In das letzte Reaktionsgefäß wurde 4,0 µl Wasser pipettiert. Sie diente als Negativkontrolle.

Das verwendete Temperaturschema ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 6: Reaktionsansatz der PCR

Bestandteil	V [µl]	V _{Mastermix} (x100) [µl]
H ₂ O	8,3	830
PCR-Puffer (5x)	4,0	400
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	240
dNTPs (10 mM)	0,4	40
Primer F (10 pmol/µl)	0,4	40
Primer R (10 pmol/µl)	0,4	40
Taq-Polymerase (5 u/µl)	0,1	10
DNA (10 ng/µl)	4,0	–
Gesamtvolumen	20	1600

Tabelle 7: Temperaturschema der PCR

Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	35 Zyklen
Annealing	30 s	60 °C	
Elongation	30 s	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	
Kühlung	∞	12 °C	

2.2.2.4 Gelelektrophorese

Durch Agarose-Gelelektrophorese können Moleküle in einem elektrischen Gleichstromfeld nach ihrer Größe und elektrischer Ladung aufgetrennt werden. Für die Elektrophorese von Nukleinsäuren besteht der Aufbau aus einer Elektrophoresekammer, welche mit einer Pufferlösung gefüllt ist und in welcher das elektrisch inerte Agarosegel als Trägermatrix liegt. Die Pufferlösung stellt sicher, dass die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA frei bleiben und somit die ganze DNA negativ geladen vorliegt – damit wird eine Auftrennung ermöglicht. Die DNA wird in die Geltaschen des Agarosegels gegeben, die sich auf der Kathodenseite der Kammer befinden. Wird Gleichstrom angelegt, wandert die negativ geladene DNA (Anionen) in Richtung Anode. Generell gilt, dass die Wanderungsgeschwindigkeit ungefähr umgekehrt proportional zur Größe des Moleküls ist, also de facto zur DNA-Fragment-Länge. Gleichzeitig hängt die Geschwindigkeit auch von der angelegten Spannung, der Beschaffenheit des Gels, der Pufferlösung und der räumlichen Konformation der DNA ab. Bei der Herstellung des Agarosegels wird ein DNA-Farbstoff hinzugemischt, welcher an die DNA bindet und dadurch Banden unter ultraviolettem Licht sichtbar macht.

Herstellung des Agarosegels

Für die durchgeführten Experimente wurde 2%iges Agarosegel verwendet. Zur Herstellung wurden 4 g Agarose mit 200 ml TBE-Puffer (0,5x) vermischt und unter Schwenken bis zum Aufkochen erhitzt. Der Ansatz wurde anschließend zum Kühlen auf den Magnetrührer gestellt. Als DNA-Farbstoff wurden 10 µl Ethidiumbromid oder 10 µl Midori Green Advance unter ständigem Rühren hinzugegeben. Als beim Rühren eine homogene Masse entstand, wurde das Gel zum Aushärten in eine Plexiglaskammer gegossen und mit Gelkämmen bestückt; sie formten die Geltaschen für die DNA. Nach dem Auskühlen konnten die Kämmen entfernt und das Gel aus der Form gelöst werden.

Gelelektrophorese des PCR-Produkts

Eine Möglichkeit die amplifizierten DNA-Fragmente nachzuweisen und somit den Erfolg der PCR zu bestätigen, ist die Gelelektrophorese. Hierzu wurde zunächst das erstellte Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TBE-Puffer (0,5x) bedeckt. Anschließend wurden jeweils 4 µl des PCR-Produkts (von drei zufällig ausgewählten Reaktionsgefäßen) mit 1 µl eines Ladepuffers auf einem Stück Parafilm durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette durchmischt. Die Negativkontrolle, die alle Reagenzien, aber keine DNA enthielt, wurde ebenfalls auf obige Weise mit Ladepuffer vermengt. Der Ladepuffer erhöhte das Gewicht der Lösung und gewährleistete so das Absinken des DNA-Gemischs in die Geltasche und schränkte die Diffusion der DNA aus der Tasche heraus ein.

In die erste Geltasche wurden stets 5 µl einer DNA-Leiter pipettiert. Dieser enthielt DNA-Fragmente definierter Länge, anhand dessen eine ungefähre Zuordnung der Länge der PCR-Fragmente möglich war. In die nächsten drei Taschen wurde das DNA-Ladepuffer-Gemisch verteilt; in die letzte kam die Negativprobe.

Die Banden der DNA-Fragmente sollten sauber sein und keine Nebenbanden aufweisen – das weist darauf hin, dass die PCR ein spezifisches Fragment erstellte. Die Negativkontrolle sollte gleichzeitig keine Bande aufweisen. Dies wäre ein Hinweis auf eine Kontamination der Proben. Diese Art von Nebenbanden oder Verunreinigungen traten bei den hier durchgeführten Analysen nicht auf.

An die Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 110 V für ungefähr 20 Minuten angelegt. Nach Beenden des Laufs wurde das Gel unter ultraviolettem Licht betrachtet, was die DNA-Banden sichtbar werden ließ. Über das Geldokumentationssystem konnten die Banden fotografisch (siehe Abbildung 3) dokumentiert werden.

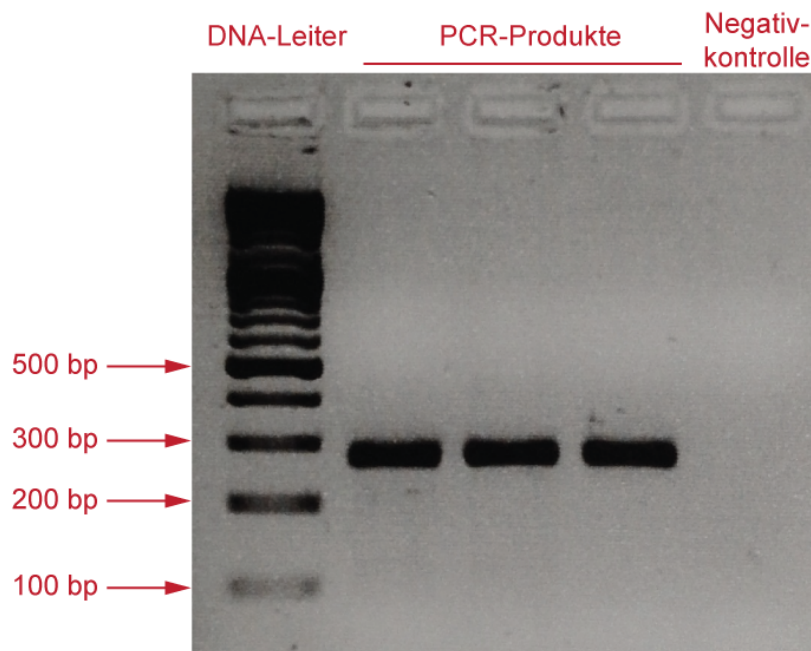


Abbildung 3: Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit DNA-Leiter und Negativkontrolle

Die Bande der PCR-Produkte befindet sich am oberen Ende zwischen den Banden für 200 bp und 300 bp. Dies entspricht in etwa ihrer Fragmentlänge von rund 270 bp. Die Negativkontrolle enthält keine Bande. bp = Basenpaare

2.2.2.5 DNA-Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese

Die DNA-Fragmentanalyse ist ein molekularbiologisches Verfahren, mit dessen Hilfe die Größe von DNA-Stücken, genauer die Anzahl der Nukleinsäuren eines DNA-Stranges, bestimmt werden kann.

Die Funktionsweise ist wie folgt: Das Analyse-System füllt Kapillaren definierter Länge mit einem Polymer, welche als Elektrophorese-Kammern für die Proben dienen. Die PCR amplifizierten DNA-Fragmente werden zusammen mit einer Mischung aus DNA-Stücken bestimmter Länge, einem Größenstandard-Mix, in eine der Kapillaren (elektrokinetisch) injiziert. Wie schon weiter oben ausgeführt, sind die Primer der DNA-Stücke fluoreszenzmarkiert. Auch an die DNA des Größenstandards sind fluoreszierende Moleküle angehängt, jedoch handelt es sich um einen anderen Farbstoff (LIZ®). Analog zur Gelelektrophorese wandert bei Anlegen der Spannung die negativ geladene DNA zur Anode und die DNA wird aufgrund der Wanderungsgeschwindigkeit der Größe nach aufgetrennt. Am Ende der Kapil-

lare werden die DNA-Farbstoffe von einem Laser erregt, worauf der Farbstoff ein Licht bestimmter Wellenlänge emittiert. Die Farbstoffe der DNA-Fragmente und die des Größenstandards unterscheiden sich in der abgestrahlten Wellenlänge bei Anregung und können dadurch vom System unterschieden werden. Dazu wird das emittierte Licht in einzelne Wellenlängen zerlegt und je einem Feld eines Photosensors (= CCD; *charge coupled device*) zugeführt. Die Elektrophorese wird so lange durchgeführt, bis alle Moleküle durch den Laser treten. Das Gerät benutzt die DNA-Stücke des Größenstandards dazu, die Laufzeit gegen die Größe der DNA aufzutragen und eine Eichkurve zu erstellen. Anhand der Laufzeit des PCR-Produkts und der Eichkurve berechnet es anschließend die Länge des Fragments auf die Nukleinsäure genau.

DNA-Fragmentanalyse des PCR-Produkts

Um die amplifizierte DNA-Fragmente im vorliegenden Experiment zu vermessen, wurden diese zunächst 1:41 verdünnt, das bedeutet, 1 µl des PCR-Produkts wurde in 40 µl Wasser pipettiert. Das war notwendig, um die DNA-Menge für das Fragmentanalyse-System in einen messbaren Bereich zu bringen. War die Verdünnung zu gering oder zu hoch, wurde die Messung in entsprechend veränderter Verdünnung wiederholt.

Der Analyseansatz kann aus Tabelle 8 entnommen werden. Der Mastermix wurde auf eine 96-Well-Platte verteilt und in 95 davon anschließend die verdünnte DNA gegeben. Das letzte Reaktionsgefäß diente auch hier als Negativkontrolle. Die Kapillarelektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen bei 60 °C und 50 cm Kapillarlänge durchgeführt und als Polymer wurde POP-7™ verwendet. Diese Bedingungen bewirkten, dass das PCR-Produkt denaturierte, sich die Doppelstränge also trennten. Das machte aus Sicht der Vergleichbarkeit Sinn, wenn man bedenkt, dass die DNA-Stücke des verwendeten Größenstandards (GeneScan™ 600 LIZ®) auch als Einzelstränge vorlagen. Da bei den PCR-Produkten nur der Forward-Primer fluoreszenzmarkiert war, wurde nur der Forward-Strang detektiert.

Der Reverse-Strang lief mit, erzeugte aber kein Signal. Das Formamid in der Reaktionslösung bewirkte eine Destabilisierung der DNA-Doppelstränge [90], wodurch die Temperatur für die Denaturierung niedriger gewählt werden konnte (60 °C anstelle von 90 °C). Die Messung lief auf dem 3500xL Genetic Analyser im Modus „Mikrosatellitenanalyse“ (*microsatellite analysis*).

Tabelle 8: Reaktionsansatz DNA-Fragmentanalyse

Bestandteil	V [μ l]	V _{Mastermix} (x98) [μ l]
Hi-Di™ Formamid	10,0	980
GeneScan™ 600 LIZ®	0,2	19,6
Verdünntes PCR-Produkt	1,0	–
Gesamtvolumen	11,2	999,6

2.2.2.6 Auswertung der Fragmentanalyse

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GeneMapper® 4.1. Das Programm trug die DNA-Länge (in Basenpaaren) gegen die Signalintensität auf. Abbildung 4 und Abbildung 5 stellen Ausschnitte der resultierenden Kurven dar.

Die Bestimmung der DNA-Länge erfolgte anhand der Kurvenspitzen:

Bei homozygotem Genotyp, wie hier in Abbildung 4 dargestellt, gilt die Spitze der höchsten Intensität des PCR-Produkts. Die niedrigeren Spitzen stellen sogenannte „Stotterbanden“ dar. Es wurde beobachtet, dass Polymerasen immer wieder vom Template-Strang abrutschen, wenn sie Sequenzen synthetisieren, bei denen sich zwei Nukleinsäuren über längere Zeit abwechselnd wiederholen (*dinucleotide repeat*). Das hier betrachtete *Rep1* beinhaltet eben solche Dinukleotidwiederholungen. Während sich die Polymerase dann wieder an die verlassene Stelle heftet, löst sich die Template-DNA von dem neu synthetisierten Strang, bildet eine Schlinge und hybridisiert dann wieder an die nächste Zweifachwiederholung. Daraus resultiert ein Template-Strang, der de facto zwei Neukleotide kürzer ist, wodurch der

neu synthetisierte Strang ebenfalls zwei Nukleotide kürzer wird. Über diesen Mechanismus können „Stotterfragmente“ entstehen, die um das Vielfache einer Zweifachwiederholung kürzer sind [91-93].

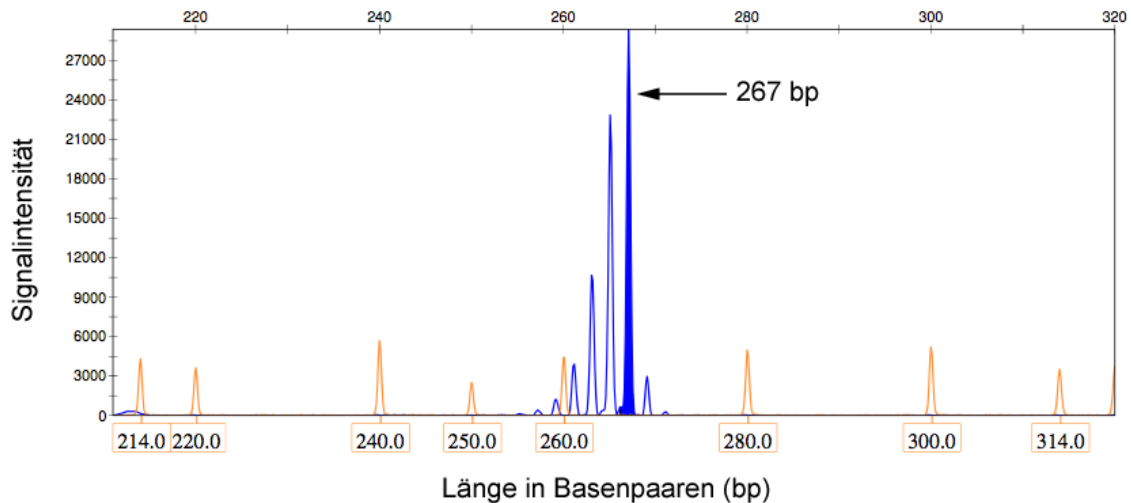


Abbildung 4: Fragmentanalyse einer homozygoten Probe mit zwei 267bp-Allelen

Die Fragmente des Größenstandards sind als Spitzensignale an jeweils definierten Größen (in bp) dargestellt (orange). Die ausgefüllte blaue Kurvenspitze stellt die Länge des verdünnten PCR-Produkts dar; die vorangehenden Spitzensignale sind „Stotterbanden“. bp = Basenpaare

Bei heterozygotem Genotyp, wie in Abbildung 5 gezeigt, stellt die Spitze der höchsten Intensität ein Allel dar und die darauf folgende Spitze mit der höchsten Intensität das zweite Allel. Die Spitze des ersten Allels und dessen „Stotterbanden“ sind höher als die des zweiten, weil sich die „Stotterbanden“ des zweiten Allels zu den vorangehenden Banden hinzuaddieren.

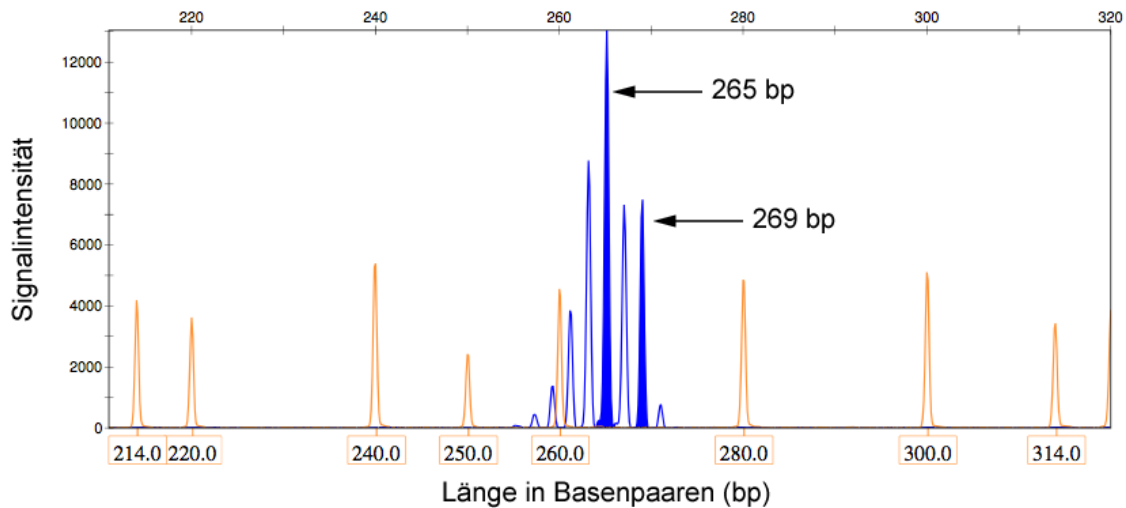


Abbildung 5: Fragmentanalyse einer heterozygoten Probe mit einem 265bp-Allel und einem 269bp-Allel

Größenstandard: orange, erste ausgefüllte blaue Spitze: 265 bp; zweite: 269 bp. Die 265bp-Spitze ist höher als die 269bp-Spitze. bp = Basenpaare

2.3 Klinische Parameter

Die nachfolgenden klinischen Tests wurden im Rahmen der oben erwähnten Studien oder bei routinemäßiger Vorstellung des Patienten von Ärzten der Abteilung Neurologie erhoben.

2.3.1 Klinisch-neurologische Untersuchung

Für die Quantifizierung der motorischen Auffälligkeiten der Patienten wurde der dritte Teil des *Unified Parkinson's Disease Rating Scales* (UPDRS III) herangezogen (siehe Kapitel 6.1). Diese Beurteilungsskala bildet einen Punktwert, der zwischen 0 und 108 liegt, wobei 108 die höchst mögliche Beeinträchtigung darstellt. Bei einigen jüngeren Untersuchungen wurde die durch die Movement Disorder Society (MDS) revidierte Version (MDS-UPDRS [94]) verwendet. Bei den meisten Patienten fand die Untersuchung unter regulärer Einnahme ihrer Medikation statt. Einige wurden jedoch aufgrund des spezifischen Studienaufbaus ohne Parkinsonmedikation untersucht.

2.3.2 Neuropsychologische Untersuchung

Die vorliegende Studie begrenzte sich bei der neuropsychologischen Testung auf die Gedächtnisleistung und die Eruierung einer Depression.

Die Gedächtnisleistung wurde mittels des *Mini-Mental-Status-Tests* (MMST) und des *Montreal Cognitive Assessments* (MoCA) beurteilt (siehe Kapitel 6.3 und 6.4). Beide stellen Methoden dar eine kognitive Beeinträchtigung oder eine Demenz zu erkennen; wobei der MoCA eine höhere Sensitivität und der MMST eine höhere Spezifität besitzt. Die maximal erreichbare Punktzahl liegt bei beiden bei 30 Punkten, ein Wert unter 24 Punkten gilt beim MMST [95], einer unter 26 Punkten beim MoCA [96] als Hinweis auf ein kognitives Defizit. Im Allgemeinen ist ein niedrigerer Punktwert mit einer schwereren kognitiven Beeinträchtigung assoziiert.

Das Vorliegen einer Depression wurde anhand des *Beck-Depressions-Inventars* (siehe Kapitel 6.2) untersucht. Ein Punktwert von 0 steht für keinerlei Depressions-symptome und 63 für die höchstmögliche Ausprägung. Ab 18 Punkten liegt der Wert zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert von Gesunden, weshalb man dann von einer klinisch relevanten Depression ausgeht [97].

2.3.3 Parkinson-Medikation

Ein relativ guter Surrogat-Marker für den Zustand des Parkinson-Patienten stellt dessen Medikation dar – genauer gesagt diejenigen Medikamente, die in den Dopaminstoffwechsel eingreifen. Das ist einerseits das klassische L-Dopa (Levodopa), die Vorstufe des Dopamins. Jedoch zählen auch Stoffe dazu, die am Dopamin-Rezeptor als Agonisten fungieren (zum Beispiel Pramipexol), oder Stoffe, welche den Abbau des Dopamins vermindern, indem sie die Catechol-O-Methyl-Transferase hemmen (zum Beispiel Entacapon). Die Wirkung all dieser Medikamente lässt sich zur Vergleichbarkeit in eine sogenannte L-Dopa-Äquivalenzdosis umrechnen: Es lässt sich also eine L-Dopa-Dosis bestimmen, die ein Patient pro Tag verabreicht bekommen würde, wenn sämtliche Parkinsonmedikamente durch

L-Dopa ersetzt werden würden. Hierfür wurden von Tomlinson et al. im Jahr 2010 Umrechnungsfaktoren publiziert [98].

Für die meisten Patienten waren im Rahmen der longitudinalen Studien schon die L-Dopa-Äquivalenzdosen bestimmt und konnten übernommen werden. Für die Patienten der Dempark-Studie und für die Patienten, deren klinische Daten aus Arztbriefen recherchiert wurden, lagen diese Äquivalenzdosen nicht vor. Sie wurden aus den vorliegenden Medikationsplänen der Patienten nach dem von Tomlinson et al. veröffentlichten Verfahren berechnet.

2.4 Statistische Analysen

Die Berechnungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit Hilfe des Programms SPSS (siehe Kapitel 2.2.1.8) berechnet und es wurde stets der zweiseitige Signifikanzwert bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgesetzt.

2.4.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) erlaubt es, Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten einer idealen Population mathematisch zu charakterisieren. Wenn Genotyphäufigkeiten vom Gleichgewicht abweichen, kann das rein biologisch als Zeichen für eine Selektion von gegebenen Genotypen gedeutet werden [99]. Das HWG wird üblicherweise in Kontrollpersonen überprüft und dient dann als eine Art Qualitätsprüfung, da Genotypen einer Normalpopulation das HWG erfüllen sollten. Starke Abweichungen vom HWG weisen dann meist auf einen Genotypisierungsfehler hin. Hingegen sind geringe Abweichungen vom HWG in erkrankten Personen häufig hinweisend für eine Krankheitsassoziation [99, 100].

Da *Rep1* in drei häufigen Ausprägungen vorliegt, wurde das HWG für drei Allele angewendet.

2.4.2 Genetisches Modell

Für die Auswertungen der *Rep1*-Genotypen wurden dominant genetische Modelle verwendet, wie sie ursprünglich von Maraganore et al. [71] vorgestellt wurden: Das erste Modell vergleicht die Genotypen 269/269 und 269/X mit X/X, wobei X entweder für das 265bp-Allel oder das 267bp-Allel steht (Träger des 269bp-Genotyps gegen alle anderen). Das zweite vergleicht 265/265 und 265/X mit X/X, wobei X hier entweder das 267bp-Allel oder das 269bp-Allel darstellt (Träger des 265bp-Genotyps gegen alle anderen). Der Grund für die Verwendung dieser Modelle ist, dass anhand von ihnen das lange Allel (hier das 269bp-Allel) als Risikovariante und das kurze Allel (hier das 265bp-Allel) als eher protektive Variante entdeckt wurde (siehe Kapitel 1.7.2.2). Daher sollen in dieser Arbeit mögliche krankheitsmodifizierende Effekte von *Rep1* in analoger Weise ergründet werden. Zusätzlich ergeben sich durch diese Modelle adäquate Patientengrößen für die Analysen.

2.4.3 T-Test

Der T-Test ist ein statistisches Verfahren, welches Mittelwerte von zwei Stichproben miteinander vergleicht. Hierzu muss die Messgröße als normalverteilte kontinuierliche Variable vorliegen. Der T-Test dient dazu, zu prüfen, ob die erwähnten Mittelwerte sich signifikant voneinander unterscheiden – dies ist der Fall, wenn der Signifikanzwert p unter dem Signifikanzniveau von 0,05 liegt. Dann kann die Alternativhypothese angenommen werden, und der Unterschied zwischen den Stichproben ist signifikant. Im Allgemeinen existieren zwei Versionen des Tests: eine für unverbundene und eine für verbundene Stichproben.

Der T-Test für unverbundene Stichproben wurde verwendet, um zu überprüfen, ob das Alter bei Erkrankungsbeginn mit der Länge der *Rep1*-Genotypen zusammenhängt. Zudem wurde es für Intergruppenvergleiche verwendet bei der Fragestellung, ob *Rep1*-Genotypen mit UPDRS- oder MMST-Punktwerten und L-Dopa-

Dosen zusammenhängen. Des Weiteren erfolgte der Vergleich der BDI-Werte unter den *Rep1*-Genotypen ebenfalls mit diesem Test.

Der T-Test für verbundene Stichproben diente dazu, Intragruppenvergleiche durchzuführen, ebenfalls bei der Fragestellung, ob *Rep1*-Genotypen mit UPDRS- oder MMST-Werten und L-Dopa-Dosen zusammenhängen.

2.4.4 Chi-Quadrat-Test

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests lässt sich vergleichen, ob sich erwartete Häufigkeiten von tatsächlich beobachteten Häufigkeiten unterscheiden.

Dieser Test wurde eingesetzt, um zu prüfen, wie sich die Häufigkeiten der *Rep1*-Genotypen der Patienten mit bekannter Mutation (siehe Tabelle 2) zu denen ohne verhalten. Des Weiteren wurde er für die Auswertung der Fragestellung eingesetzt, wie sich die Genotyphäufigkeiten verhalten bei Patienten mit Depression und Patienten, die in dieser Hinsicht unauffällig sind.

2.4.5 Lineare Regressionsmodelle

Regressionsanalysen haben das Ziel eine abhängige Variable mathematisch durch eine oder mehrere unabhängige Variablen (Prädiktoren) zu modellieren. Dies erfolgt in diesem Fall auf eine lineare Weise: Die Koeffizienten, die den Beitrag der unabhängigen Variablen zur abhängigen beschreiben, gehen in der ersten Potenz (linear) in die Berechnung ein.

Lineare Regressionsmodelle wurden verwendet, um ebenfalls zu überprüfen, ob *Rep1*-Genotypen mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn assoziiert sind, allerdings mit dem Zusatz, dass jeweils die erwähnten SNPs (siehe oben) als Kovariaten in die Berechnung aufgenommen wurden. Dies wurde durchgeführt, um aufzuklären, ob *Rep1* mit dem Erkrankungsalter zusammenhängt, wenn für den Effekt des jeweiligen SNPs korrigiert wird. Die Berechnung wurde mithilfe des Programms PLINK (siehe Kapitel 2.2.1.8) durchgeführt.

2.4.6 Kovarianzanalyse (ANCOVA)

Die Kovarianzanalyse (ANCOVA = *analysis of covariance*) ist ein Verfahren, das ähnlich dem T-Test Mittelwerte miteinander vergleicht; gleichzeitig lässt das Verfahren aber zu, für Kovariaten zu korrigieren. Damit können unerwünschte beeinflussende Faktoren ausgeblendet oder „geglättet“ werden.

Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde untersucht, ob *Rep1*-Genotypen mit MMST-, MoCA-, und UPDRS-Punktwerten zusammenhängen. Dabei wurde stets für die Dauer der Erkrankung (in ganzen Jahren) bis zum Zeitpunkt der Erhebung des jeweiligen Punktwertes und für das Alter korrigiert. Beim UPDRS wurde zusätzlich die L-Dopa-Dosis als Kovariate eingefügt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Die Rekrutierung des Studienkollektivs erfolgte in zwei Kohorten, die zuerst getrennt und anschließend zusammengefasst untersucht wurden. Insgesamt wurden 1.044 Patienten in der vorliegenden Studie untersucht, von welchen 18 Mutationsträger von PD assoziierten Genen sind (siehe Kapitel 2.1). Informationen zum Patientenkollektiv bezüglich der Geschlechterverteilung, Alter und dem Alter bei Erkrankungsbeginn sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Patientendaten aufgeteilt nach Kohorten 1 und 2 sowie nach Mutationsträgern

a. In Jahren angegeben

Patienten	Anzahl	Alter ^a Mittelwert (± SD)	Geschlecht Anzahl (%)	Erkrankungsalter ^a Mittelwert (± SD)	Range in Jahren
Kohorte 1	551	68,9 (± 10,5)	m: 339 (61,5) w: 212 (38,5)	59,4 (± 11,1)	27 - 87
Kohorte 2	475	70,0 (± 11,6)	m: 308 (64,8) w: 167 (35,2)	56,8 (± 12,3)	25 - 85
Gesamtkohorte (Kohorte 1 und 2)	1.026	69,4 (± 11,0)	m: 647 (63,1) w: 379 (36,9)	58,2 (± 11,7)	25 - 87
Mutationsträger	18	76,8 (± 10,6)	m: 10 (55,6) w: 8 (44,4)	53,1 (± 10,1)	35 - 71

m = männlich, w = weiblich, SD = Standardabweichung, range = Spannweite

Die Verteilung des Erkrankungsalters der Patienten mit und ohne bekannte Mutation findet sich in Abbildung 6 und Abbildung 7.

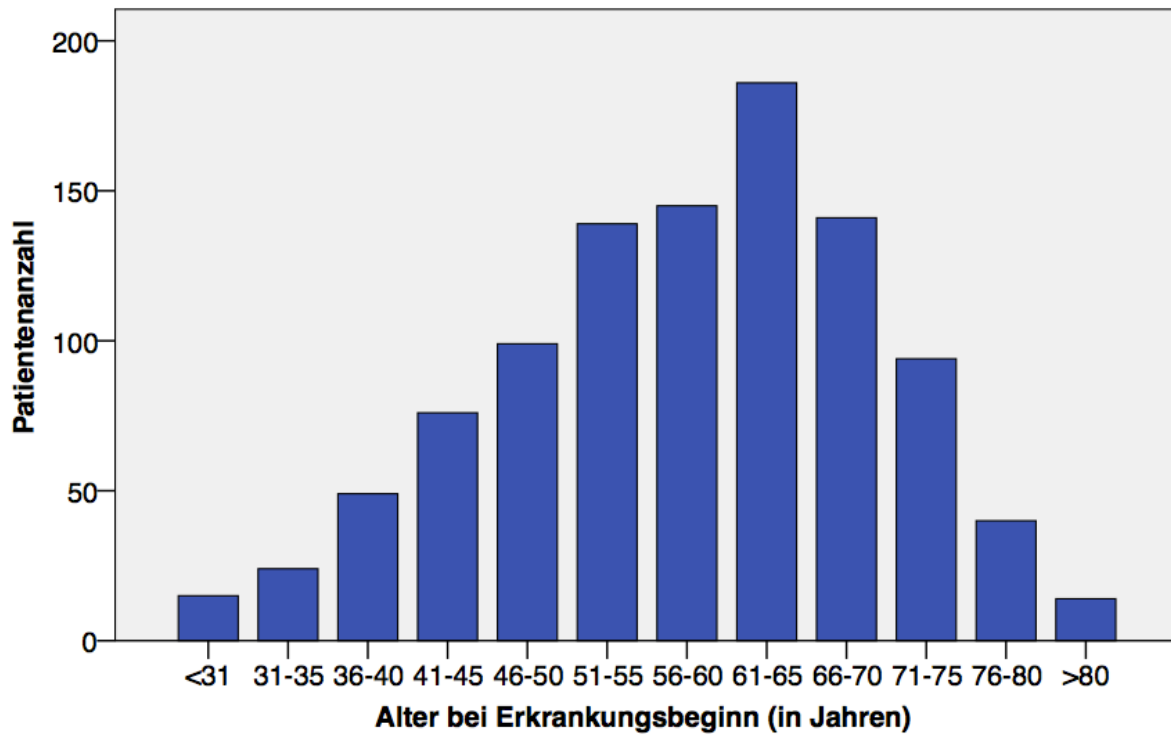


Abbildung 6: Alter bei Erkrankungsbeginn in der Gesamtkohorte (ohne Mutationsträger)
Bei 4 Patienten fehlten Angaben zu Erkrankungsbeginn.

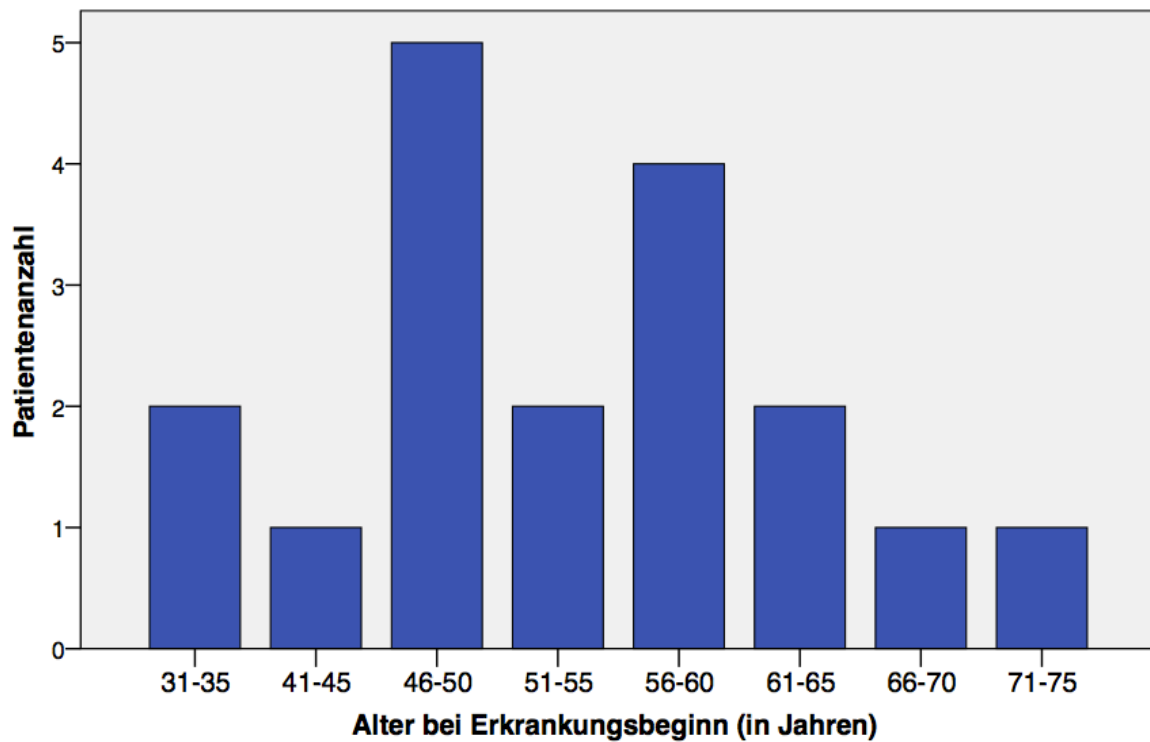


Abbildung 7: Alter bei Erkrankungsbeginn unter den Mutationsträgern

3.1.1 Charakterisierung der klinischen Parameter des Studienkollektivs

Wie in Kapitel 2 beschrieben, wurden für die Patienten klinische Daten gesammelt; dabei wurden sowohl motorische als auch nicht motorische Parameter zusammengetragen. Tabelle 10 fasst diese Daten zusammen und gibt einen Überblick über die Anzahl der Patienten, für die ein Wert des jeweiligen klinischen Markers vorliegt. Zusätzlich sind die Mittelwerte des Alters, der Erkrankungsdauer bis zur Erhebung des jeweiligen Parameters und die Mittelwerte der Testergebnisse angegeben. Es handelt sich um Daten der Gesamtkohorte ohne Mutationsträger.

Tabelle 10: Zusammenfassung der klinischen Daten des Studienkollektivs (Gesamtkohorte ohne Mutationsträger)

- a. In Jahren angegeben
 b. Angegeben ist die Punktzahl für den 3. Teil des UPDRS (UPDRS III)
 c. Patienten mit zwei UPDRS III-Werten als longitudinale Daten (MDS-UPDRS III, nur im ON)
 d. Verstrichene Zeit zwischen der Erhebung des ersten und zweiten Werts (in Jahren)
 e. Patienten mit zwei MMST-Werten als longitudinale Daten
 f. L-Dopa: als L-Dopa-Äquivalenzdosis angegeben
 g. Patienten mit zwei L-Dopa-Äquivalenzwerten als longitudinale Daten
 h. In mg pro Tag (mg/d)

Parameter		Anzahl	Alter Mittelwert (\pm SD) ^a	Erkrankungsdauer Mittelwert (\pm SD) ^a	Punktzahl Mittelwert (\pm SD)	Punktzahl Range
UPDRS ^b	ON	340	70,1 (\pm 10,5)	6,3 (\pm 5,7)	24,5 (\pm 10,9)	2 - 55
	OFF	35	69,6 (\pm 6,4)	7,2 (\pm 6,8)	29,1 (\pm 11,9)	10 - 55
UPDRS longitudinal ^c	1. Wert	36	72,6 (\pm 10,3)	1,2 (\pm 0,9) ^d	32,9 (\pm 14,7)	5 - 67
	2. Wert				34,8 (\pm 14,0)	10 - 76
MMST		592	70,5 (\pm 10,0)	6,0 (\pm 6,0)	27,7 (\pm 2,9)	11 - 30
MMST longitudinal ^e	1. Wert	140	70,7 (\pm 9,5)	1,7 (\pm 1,5) ^d	27,4 (\pm 3,1)	15 - 30
	2. Wert				27,6 (\pm 3,1)	7 - 30
MoCA		97	66,9 (\pm 8,8)	5,9 (\pm 3,9)	26,3 (\pm 3,4)	11 - 30
BDI		284	69,3 (\pm 9,9)	6,9 (\pm 6,0)	8,9 (\pm 7,1)	0 - 42
L-Dopa ^f		529	71,4 (\pm 9,8)	7,6 (\pm 6,1)	491 (\pm 298) ^h	33 - 1700 ^h
L-Dopa longitudinal ^g	1. Wert	149	72,6 (\pm 9,3)	1,6 (\pm 0,9) ^d	554 (\pm 300) ^h	52 - 1500 ^h
	2. Wert				555 (\pm 329) ^h	100 - 1950 ^h

BDI = Beck-Depressions-Inventar
 MMST = Mini-Mental-Status-Test
 MoCA = Montreal Cognitive Assessment

SD = Standardabweichung
 UPDRS = Unified Parkinson's Disease Rating Scale

3.2 *Rep1*-Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten

Die PCR mit den oben beschriebenen Primern lieferte Fragmente mit Längen zwischen 261 und 271 Basenpaaren. Die drei am häufigsten vorkommenden Ausprägungen waren 265, 267 und 269 Basenpaare lang; die anderen vorkommenden Allele waren sehr selten und wurden für weitere Untersuchungen ausgeschlossen. Die Genotyp-Information für einen Patienten fehlt.

Tabelle 11 und Tabelle 12 geben eine Zusammenschau der Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten an. Bezüglich der Genotyphäufigkeiten wurde untersucht, ob sie vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) abweichen: Beide Kohorten erfüllen separat das HWG ($p > 0,05$) – zusammengenommen weichen sie mit $p = 0,04$ knapp signifikant davon ab. Die Mutationsträger erfüllen das HWG.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Allelfrequenzen

Bei einem Patienten fehlt der *Rep1*-Genotyp.

a. Seltene Genotypen wurden für der Analyse der Genotyphäufigkeiten ausgeschlossen

Allel- frequenzen	Kohorte 1	Kohorte 2	Kohorte 1 u. 2	Mutationsträger
	Anzahl der Allele (%)			
<265 ^a	2 (0,2)	1 (0,1)	3 (0,15)	–
265	270 (24,5)	247 (26,0)	517 (25,2)	10 (27,7)
267	752 (68,4)	640 (67,4)	1392 (67,9)	21 (58,3)
269	75 (6,8)	62 (6,5)	137 (6,7)	5 (13,8)
>269 ^a	1 (0,1)	–	1 (0,05)	–
Summe	1.100	950	2.050	36

Tabelle 12: Zusammenfassung der Genotyphäufigkeiten

Der p-Wert gibt an, ob die beobachteten Häufigkeiten signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) abweichen. Die abweichenden Werte sind mit * markiert.

Genotyp	Kohorte 1	Kohorte 2	Kohorte 1 u. 2	Mutationsträger
	Genotyphäufigkeiten bei Patienten (%)			
265/265	37 (6,7)	30 (6,3)	67 (6,6)	2 (11,1)
265/267	170 (31,1)	171 (36,1)	341 (33,4)	4 (22,2)
267/267	269 (49,2)	216 (45,6)	485 (47,5)	7 (38,9)
267/269	42 (7,7)	36 (7,6)	78 (7,6)	3 (16,7)
269/269	4 (0,7)	5 (1,1)	9 (0,9)	0 (0,0)
265/269	25 (4,6)	16 (3,3)	41 (4,0)	2 (11,1)
HWG	p = 0,07	p = 0,14	p = 0,04*	p = 0,66

HWG = Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

3.3 Auswertung: *Rep1*-Genotyp und Alter bei Erkrankungsbeginn

3.3.1 Ergebnisse: *Rep1*-Genotyp und Alter bei Erkrankungsbeginn

Die Auswertung erfolgte anhand des Verfahrens, das in Kapitel 2.4 beschrieben wurde. Es erfolgten zwei Analysen: die erste verglich den 269bp-Genotyp (269/269 oder 269/X) mit den übrigen Genotypen (X/X), die zweite den 265bp-Genotyp (265/265 oder 265/X) mit den übrigen Genotypen (X/X). Das Ziel der Untersuchung war es, zu sehen, ob sich die Erkrankungsalter in den jeweiligen Genotyp-Gruppen signifikant unterschieden. In Tabelle 13 und Tabelle 14 sind die Ergebnisse dargestellt; darin sind jeweils die Patientenzahlen und die Mittelwerte der Genotyp-Gruppen sowie der p-Wert des Signifikanztests verzeichnet. Der p-Wert wurde zusätzlich als Subgruppenanalyse getrennt für Männer und Frauen berechnet.

In Kohorte 1 konnte ein signifikant niedrigeres mittleres Alter bei Erkrankungsbeginn ($p=0,03$) in der 269bp-Genotyp Gruppe gegenüber der 265bp- und 267bp-Gruppe festgestellt werden. Zu beachten ist hierbei, dass die weibliche Subgruppe

ein signifikantes Ergebnis erbrachte ($p=0,01$), wohingegen die männliche Subgruppe das Signifikanzniveau nicht erreichte ($p=0,41$).

Das Ergebnis konnte in der zweiten Kohorte nicht bestätigt werden ($p=0,30$) und auch in der Gesamtkohorte war kein signifikanter Unterschied im Erkrankungsalter festzustellen ($p=0,34$).

Tabelle 13: Erkrankungsalter beim 269bp-Genotyp, verglichen mit den übrigen Genotypen

Statistische Berechnungen erfolgten mittels T-Test, * signifikant ($p<0,05$)

a. In Jahren angegeben

Patienten	Genotypen	Anzahl	Alter bei Erkrankungsbeginn ^a Mittelwert (\pm SD)	Signifikanz
Kohorte 1	269/269 o. 269/X	70	56,4 (\pm 12,2)	0,03*
	vs. X/X	478	59,8 (\pm 10,9)	m: 0,41 w: 0,01*
Kohorte 2	269/269 o. 269/X	56	58,3 (\pm 11,5)	0,30
	vs. X/X	417	56,6 (\pm 12,4)	m: 0,54 w: 0,25
Gesamtkohorte (Kohorte 1 u. 2)	269/269 o. 269/X	126	57,2 (\pm 11,9)	0,34
	vs. X/X	895	58,3 (\pm 11,7)	m: 0,82 w: 0,18
Mutationsträger	269/269 o. 269/X	5	53,0 (\pm 5,7)	0,97
	vs. X/X	13	53,2 (\pm 11,6)	m: 0,83 w: 0,94

X = 265bp- oder 267bp-Allel, m = männlich, w = weiblich, SD = Standardabweichung

Der Vergleich des 265bp-Genotyps mit den übrigen Genotypen wies ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Erkrankungsalters auf.

Tabelle 14: Erkrankungsalter beim 265bp-Genotyp, verglichen mit den übrigen Genotypen

Statistische Berechnungen erfolgten mittels T-Test

a. In Jahren angegeben

Patienten	Genotypen	Anzahl	Alter bei Erkrankungsbeginn ^a Mittelwert (\pm SD)	Signifikanz
Kohorte 1	265/265 o. 265/X	232	60,1 (\pm 11,5)	0,21
	vs. X/X	317	58,9 (\pm 10,9)	m: 0,45 w: 0,30
Kohorte 2	265/265 o. 265/X	216	56,9 (\pm 13,1)	0,81
	vs. X/X	257	56,7 (\pm 11,5)	m: 0,69 w: 0,74
Gesamtkohorte (Kohorte 1 u. 2)	265/265 o. 265/X	448	58,5 (\pm 12,4)	0,39
	vs. X/X	574	57,9 (\pm 11,2)	m: 0,46 w: 0,66
Mutationsträger	265/265 o. 265/X	8	51,4 (\pm 13,4)	0,56
	vs. X/X	10	54,5 (\pm 7,0)	m: 0,75 w: 0,34

X = 267bp- oder 269bp-Allel, m = männlich, w = weiblich, SD = Standardabweichung

Obwohl zwischen den Genotyp-Gruppen kein signifikanter Unterschied im Erkrankungsalter bestand, nahmen die Mittelwerte mit steigender *Rep1*-Länge tendenziell ab. Abbildung 8 zeigt die Mittelwerte des Erkrankungsalters der Gesamtkohorte (ohne Mutationsträger) mit dem 95 % Konfidenzintervall (CI), die auf drei Gruppen verteilt vorliegen: Die erste Gruppe enthält Patienten mit den Genotypen 265/265 und 265/267, die zweite nur den Genotyp 267/267 und die dritte die Genotypen 267/269 und 269/269. Diese Einteilung wurde gewählt, um die Werte der drei häufigsten *Rep1*-Allele nebeneinander visualisieren zu können.

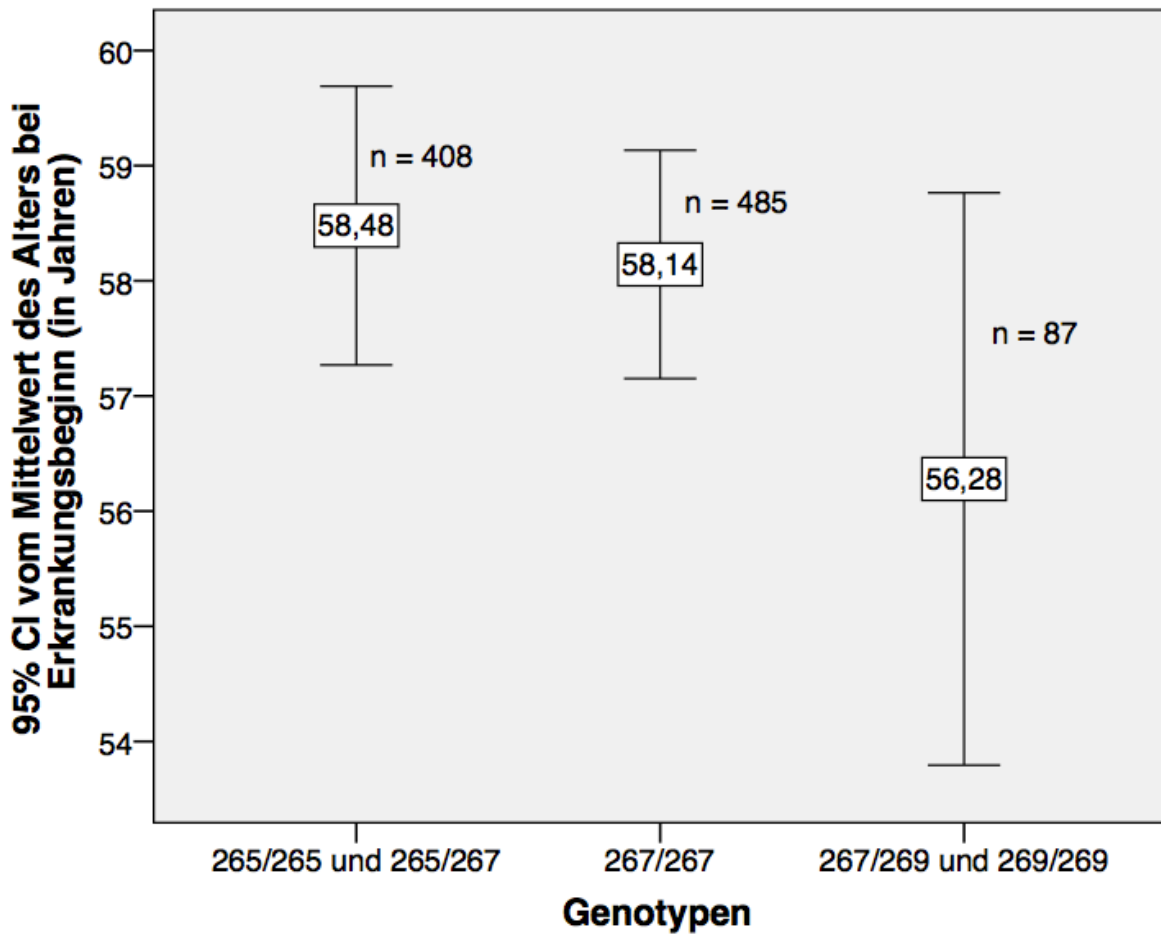


Abbildung 8: Mittelwerte des Erkrankungsalters mit 95 % Konfidenzintervallen (CI) für die Gesamtkohorte ohne Mutationsträger, verteilt auf die Genotyp-Gruppen mit 265, 267 und 269 Basenpaaren

n = Patientenanzahl

3.3.2 Häufigkeitenvergleich: *Rep1*-Genotypen bei Patienten mit und ohne bekannter Mutation

Neben der Fragestellung, ob die *Rep1*-Genotypen mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn zusammenhängen, wurde auch analysiert, ob der 269bp- oder 265bp-Genotyp signifikant häufiger oder seltener unter den Mutationsträgern vorkommt als in der Gesamtkohorte der Parkinson-Patienten ohne bekannte Mutation. Dabei sollte geprüft werden, ob *GBA*-Mutationen mit bestimmten *Rep1*-Allelen assoziiert sind. Die Untersuchung zeigte, dass weder das 269bp-Allel ($p=0,07$) noch das

265bp-Allel ($p=0,99$) signifikant häufiger in den beiden Gruppen vorliegt (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Vergleich der Häufigkeiten der *Rep1*-Genotypen bei Mutationsträgern und der Gesamtkohorte mittels Chi-Quadrat-Test

a. X = 265bp- oder 267bp-Allel

b. X = 267bp- oder 269bp-Allel

Genotypen	Mutationsträger Anzahl (%)	Gesamtkohorte Anzahl (%)	Signifikanz
269/269 o. 269/X vs. X/X ^a	5 (27,8) 13 (72,2)	128 (12,5) 898 (87,5)	0,07
265/265 o. 265/X vs. X/X ^b	8 (44,4) 10 (55,6)	450 (43,9) 576 (56,1)	0,99

3.3.3 Ergebnisse: *Rep1*-Genotyp und Alter bei Erkrankungsbeginn mit SNPs als Kovariaten

Eine weitere interessante Fragestellung, die es zu untersuchen galt, war, ob in der Nähe des *Rep1* SNPs existieren, die Einfluss nehmen könnten auf die Assoziation zwischen *Rep1* und dem Erkrankungsalter. Hintergrund dieser Überlegung war, dass hohe Kopplungsungleichgewichte (*linkage disequilibrium*, LD) zwischen *Rep1* und bestimmten SNPs dazu führen könnten, dass SNP-Effekte den *Rep1*-Effekt überlagern. Ein signifikanter p-Wert bei einem SNP würde nun dafür sprechen, dass der SNP-Effekt tatsächlich den *Rep1*-Effekt überlagert. Für die Analyse wurde die Gesamtkohorte erneut in die weiter oben schon verwendeten Gruppen eingeteilt, wonach Patienten mit dem 269bp-Genotyp mit den restlichen Patienten sowie Patienten mit dem 265bp-Genotyp mit den restlichen Patienten verglichen wurden. In die Untersuchung flossen die SNPs aus Tabelle 3 ein. Für jeden SNP wurde eine separate Untersuchung durchgeführt: Das Alter bei Erkrankungsbeginn wurde zwischen den zwei Genotyp-Gruppen verglichen (ähnlich wie in Kapitel 3.3.1) aber zusätzlich wurde für den Effekt des jeweiligen SNPs korrigiert. Die p-

Werte für die einzelnen Analysen sind in Tabelle 16 dargestellt. Wie aus ihr ersichtlich ist, sind sämtliche p-Werte unter der Signifikanzschwelle von 0,05 ($p > 0,05$). Somit ist der für SNPs korrigierte Vergleich der Unterschiede im Erkrankungsalter unter den Genotyp-Gruppen nicht signifikant.

Tabelle 16: p-Werte: Vergleich des Erkrankungsalters zwischen den *Rep1*-Genotypen, korrigiert für SNPs (Gesamtkohorte ohne Mutationsträger)

Statistische Berechnungen erfolgten mittels linearer Regressionsmodelle

a. X = 265bp- oder 267bp-Allel

b. X = 267bp- oder 269bp-Allel

Kovariaten-SNP	Signifikanz	
	269/269 o. 269/X vs. X/X ^a	265/265 o. 265/X vs. X/X ^b
<i>rs3857047</i>	0,58	0,59
<i>rs3857048</i>	0,46	0,56
<i>rs11931074</i>	0,98	0,58
<i>rs356220</i>	0,77	0,75
<i>rs2736990</i>	0,69	0,56
<i>rs7687945</i>	0,36	0,44
<i>rs10516848</i>	0,63	0,20
<i>rs6532194</i>	0,47	0,53
<i>rs11097239</i>	0,56	0,50
<i>rs6532197</i>	0,68	0,61

SNP = single nucleotide polymorphism

3.4 Auswertung: *Rep1*-Genotyp und klinische Parameter

Für die folgenden Analysen wurden Daten des Gesamtkollektivs verwendet; die bekannten Mutationsträger wurden a priori ausgeschlossen.

3.4.1 Ergebnisse: *Rep1*-Genotyp und motorische Marker

Um zu analysieren, ob *Rep1* motorische Marker beeinflusst, wurden die Mittelwerte der UPDRS III-Punktzahlen unter den *Rep1*-Genotypen verglichen. Das geschah

einerseits als Querschnittsvergleich und andererseits als Vergleich von Longitudinaldaten.

3.4.1.1 Querschnittsdaten

Patienten, bei denen ein UPDRS III-Wert vorlag, wurden in zwei Gruppen eingeteilt je nach dem, ob die Erhebung unter Parkinson-Medikation (ON) oder ohne diese (OFF) erfolgte. Anschließend wurden die Mittelwerte der Punktzahlen mittels Kovarianzanalyse in den einzelnen Genotyp-Gruppen (269bp-Allel gegen alle anderen und 265bp-Allel gegen alle anderen) miteinander verglichen. Da Erkrankungsdauer und Alter der Patienten großen Einfluss auf die motorischen Fähigkeiten (aber auch auf andere Teilaspekte der Parkinson-Krankheit) ausüben, wurden diese als Kovariaten in die Berechnung mit einbezogen. Bei den Patienten im ON-Status wurde eine zusätzliche Berechnung durchgeführt, bei der neben Krankheitsdauer und Alter auch für die L-Dopa-Äquivalenzdosis korrigiert wurde.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt. Aus ihr geht hervor, dass sich die UPDRS III-Werte im ON-Status zwischen den Genotyp-Gruppen nicht signifikant unterscheiden. Für Patienten im OFF-Status konnte ein signifikanter Unterschied in den motorischen Punktwerten festgestellt werden: Patienten, die den 265bp-Genotyp tragen (265/265 und 265/X), haben signifikant niedrigere UPDRS III-Werte als Patienten mit den übrigen Genotypen. Der p-Wert ist allerdings nicht für multiples Testen korrigiert – nach Korrektur wäre der Wert nicht mehr signifikant.

Tabelle 17: Kovarianzanalyse von UPDRS III-Werten der *Rep1*-Genotypen, korrigiert für Krankheitsdauer und Alter* signifikant ($p < 0,05$)

a. X = 265bp- oder 267bp-Allel

b. X = 267bp- oder 269bp-Allel

c. L-Dopa-Äquivalenzdosis angegeben in mg pro Tag (mg/d)

d. Korrigiert für Krankheitsdauer (Mittelwert: 6,3 Jahre) und Alter (Mittelwert: 70,0 Jahre)

e. Korrigiert für Krankheitsdauer (Mittelwert: 7,2 Jahre) und Alter (Mittelwert: 69,6 Jahre)

f. P-Wert zusätzlich korrigiert für L-Dopa-Äquivalenzdosen (Mittelwert: 491 mg/d)

UP-DRS	Genotypen	Anzahl	Korrigierter UPDRS Mittelwert (95% CI)	L-Dopa-Dosis Mittelwert (\pm SD) ^c	Korrigierte Signifikanz
ON	269/269 o. 269/X	34	24,3 (20,8 - 27,8) ^d	597 (\pm 365)	0,94
	vs. X/X ^a	306	24,5 (23,3 - 25,6) ^d	479 (\pm 313)	dopa: 0,50 ^f
	265/265 o. 265/X	145	24,8 (23,1 - 26,5) ^d	471 (\pm 302)	0,64
	vs. X/X ^b	195	24,2 (22,8 - 25,7) ^d	507 (\pm 332)	dopa: 0,36 ^f
OFF	269/269 o. 269/X	5	31,0 (22,5 - 39,5) ^e	–	0,65
	vs. X/X ^a	30	28,8 (25,6 - 32,1) ^e	–	
	265/265 o. 265/X	14	25,3 (20,8 - 29,8) ^e	–	
	vs. X/X ^b	21	31,7 (28,0 - 35,4) ^e	–	0,04*

CI = Konfidenzintervall, SD = Standardabweichung

3.4.1.2 Longitudinaldaten

Für rund 50 Patienten lagen motorische Marker zu zwei Zeitpunkten vor; von ihnen konnten nur diejenigen ausgewertet werden, deren Punktzahlen nach dem neuen MDS-UPDRS III ermittelt wurden und die Erhebung unter Parkinson-Medikation (ON) erfolgte. Darüber hinaus wurden nur Patienten ausgewertet, deren zweite Messung ein Jahr Abstand zur ersten Erhebung aufwies. Die restlichen Daten wurden ausgeschlossen, da die Patientenzahlen für weitere Subgruppenanalysen zu gering waren. Übrig blieben 29 Patienten.

Die Auswertung erfolgte, indem Mittelwerte der Punktzahlen erstens zwischen den einzelnen Genotyp-Gruppen (269bp-Allel gegen alle anderen und 265bp-Allel gegen alle anderen) miteinander verglichen wurden. Zweitens wurden die MDS-UPDRS III-Werte der zwei Zeitpunkte (Ersterhebung und nach einem Jahr) innerhalb einer Gruppe verglichen. Geachtet wurde darauf, dass sich sowohl das Alter als auch die Krankheitsdauer der einzelnen Genotyp-Gruppen nicht signifikant unterscheiden, da diese Faktoren die motorischen Fähigkeiten beeinflussen (siehe oben). Auch die L-Dopa-Äquivalenzdosen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den Genotypen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengetragen und zeigen, dass sich die UPDRS-Werte im Mittel weder innerhalb noch zwischen den Genotyp-Gruppen in signifikantem Ausmaß geändert haben ($p > 0,05$).

Tabelle 18: Vergleich von UPDRS-Werten (MDS-UPDRS III) der *Rep1*-Genotypen zum Zeitpunkt Null und nach einem Jahr

- a. X = 265bp- oder 267bp-Allel
- b. X = 267bp- oder 269bp-Allel
- c. In Jahren angegeben
- d. Berechnet mittels T-Test für verbundene Stichproben
- e. Berechnet mittels T-Test für unverbundene Stichproben

Genotypen	Anzahl	Alter ^c	Krankheitsdauer ^c	L-Dopa-Äquivalenz in mg/d	UP-DRS t = 0 J.	UP-DRS t = 1 J.	Intragruppen Signifikanz ^d
269/269 o. 269/X	5	73,8	11,4	284 (± 191)	36,4	35,0	0,86
vs. X/X ^a	24	71,5	7,0	438 (± 264)	31,3	31,5	0,89
<i>Intergruppen-Signifikanz ^e</i>		0,65	0,08	0,17	0,59	0,68	
265/265 o. 265/X	12	73,8	8,5	465 (± 347)	34,2	32,8	0,67
vs. X/X ^b	17	70,5	7,3	373 (± 169)	30,7	31,7	0,67
<i>Intergruppen-Signifikanz ^e</i>		0,41	0,53	0,35	0,55	0,82	

UPDRS = Unified Parkinson's Disease Rating Scales

3.4.2 Ergebnisse: *Rep1*-Genotyp und neuropsychologische Marker

3.4.2.1 *Rep1*-Genotyp und Gedächtnisleistung

Die Gedächtnisleistung wurde mittels MMST und MoCA quantifiziert und zielte darauf ab, ein kognitives Defizit zu erkennen. Um einen Zusammenhang zwischen *Rep1* und der Gedächtnisleistung zu untersuchen, wurden die Mittelwerte des MMST und MoCA unter den *Rep1*-Genotypen verglichen. Das geschah einerseits als Querschnittsvergleich und andererseits als Vergleich von Longitudinaldaten.

3.4.2.1.1 Querschnittsdaten

Die Auswertung erfolgte, indem die mittleren Punktzahlen zwischen den einzelnen Genotyp-Gruppen (269bp-Allel gegen alle anderen und 265bp-Allel gegen alle anderen) miteinander verglichen wurden. Analog zu den Auswertungen beim UPDRS flossen auch hier das Erkrankungsalter und das Lebensalter als Kovariaten in die Berechnung mit ein.

Tabelle 19 stellt die Ergebnisse des Vergleichs der MMST-Werte zwischen den Genotyp-Gruppen dar. Aus ihr geht hervor, dass sich die Mittelwerte nicht signifikant zwischen den Genotypen unterscheiden ($p > 0,05$).

Tabelle 19: Kovarianzanalyse von MMST-Werten der *Rep1*-Genotypen, korrigiert für Krankheitsdauer und Alter

a. X = 265bp- oder 267bp-Allel

b. X = 267bp- oder 269bp-Allel

c. Korrigiert für Krankheitsdauer (Mittelwert: 6,0 Jahre) und Alter (Mittelwert: 70,5 Jahre)

Genotypen	Anzahl	Korrigierter MMST Mittelwert (95% CI)	Korrigierte Signifikanz
269/269 o. 269/X vs. X/X ^a	67 525	27,8 (27,1 - 28,4) ^c 27,7 (27,4 - 27,9) ^c	0,78
265/265 o. 265/X vs. X/X ^b	260 332	27,8 (27,4 - 28,1) ^c 27,6 (27,3 - 27,9) ^c	0,51

CI = Konfidenzintervall, MMST = Mini-Mental-Status-Test

Auf gleiche Weise wurden auch die MoCA-Werte zwischen den Genotyp-Gruppen verglichen (siehe Tabelle 20). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ermittelt werden.

Tabelle 20: Kovarianzanalyse von MoCA-Werten der *Rep1*-Genotypen, korrigiert für Krankheitsdauer und Alter

a. X = 265bp- oder 267bp-Allel

b. X = 267bp- oder 269bp-Allel

c. Korrigiert für Krankheitsdauer (Mittelwert: 5,9 Jahre) und Alter (Mittelwert: 66,9 Jahre)

Genotypen	Anzahl	Korrigierter MoCA Mittelwert (95% CI)	Korrigierte Signifikanz
269/269 o. 269/X vs. X/X ^a	12 85	27,8 (25,9 - 29,7) ^c 26,1 (25,4 - 26,7) ^c	0,09
265/265 o. 265/X vs. X/X ^b	43 54	26,4 (25,4 - 27,4) ^c 26,2 (25,3 - 27,1) ^c	0,76

CI = Konfidenzintervall, MoCA = Montreal Cognitive Assessment

Des Weiteren sei noch bemerkt, dass die Gedächtnisleistung im Durchschnitt über den cut-off-Werten der Tests für eine kognitive Beeinträchtigung lag. Beim MMST lagen von insgesamt 592 Patienten 48 (8,1 %) unter dem cut-off, beim MoCA waren es von insgesamt 97 Patienten 29 (29,9 %).

3.4.2.1.2 Longitudinaldaten

Für 145 Patienten lagen MMST-Werte zu zwei Zeitpunkten vor. Es konnten allerdings nur Patienten ausgewertet werden, bei welchen der zeitliche Abstand zwischen Erst- und Zweiterhebung ein Jahr betrug. Die restlichen Daten (höherer oder geringerer zeitlicher Abstand) wurden ausgeschlossen, da die Patientenzahlen für weitere Subgruppenanalysen zu gering waren, um statistische Aussagen treffen zu können. Die Analysen wurden in einer finalen Gruppe von 83 Patienten durch-

geführt. Für den MoCA konnten nur Werte eines Erhebungszeitpunktes erschlossen werden. Folglich waren sie ungeeignet für longitudinale Analysen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 zusammengefasst und zeigen, dass sich die MMST-Werte im Mittel weder innerhalb noch zwischen den Genotyp-Gruppen in signifikantem Ausmaß geändert haben ($p > 0,05$). Dabei wurde darauf geachtet, dass sich sowohl Alter als auch Krankheitsdauer der einzelnen Genotyp-Gruppen nicht signifikant unterscheiden (siehe Kapitel 3.4.1.2).

Tabelle 21: Vergleich von MMST-Werten der *Rep1*-Genotypen zum Zeitpunkt Null und nach einem Jahr

- a. X = 265bp- oder 267bp-Allel
- b. X = 267bp- oder 269bp-Allel
- c. In Jahren angegeben
- d. Berechnet mittels T-Test für verbundene Stichproben
- e. Berechnet mittels T-Test für unverbundene Stichproben

Genotypen	Anzahl	Alter ^c	Krankheitsdauer ^c	MMST t = 0 J.	MMST t = 1 J.	Intragruppen Signifikanz ^d
269/269 o. 269/X vs. X/X ^a	11 72	68,3 71,0	7,0 4,1	28,6 27,4	27,7 27,4	0,19 1,0
<i>Intergruppen- Signifikanz^e</i>		0,37	0,13	0,052	0,67	
265/265 o. 265/X vs. X/X ^b	28 55	69,6 71,2	4,2 4,6	27,5 27,5	27,3 27,4	0,25 0,86
<i>Intergruppen- Signifikanz^e</i>		0,50	0,76	0,99	0,82	

MMST = Mini-Mental-Status-Test

3.4.2.2 *Rep1*-Genotyp und Depression

Die Eruierung von Depressionszeichen erfolgte anhand des Beck-Depressions-Inventars. Die Punktwerte, die aus dem Test resultierten, wurden zwischen den Genotyp-Gruppen verglichen. Tabelle 22 zeigt, dass weder ein signifikanter Unterschied zwischen dem 269bp-Genotyp und den übrigen Genotypen noch zwischen dem 265bp-Genotyp und den übrigen Genotypen besteht ($p > 0,05$).

Tabelle 22: Vergleich von BDI-Mittelwerten zwischen den Rep1-Genotyp-Gruppen

Statistische Berechnungen erfolgten mittels T-Test

a. X = 265bp- oder 267bp-Allel

b. X = 267bp- oder 269bp-Allel

Genotypen	Anzahl	BDI Mittelwert (\pm SD)	Signifi- kanz
269/269 o. 269/X vs. X/X ^a	36 248	9,7 (\pm 7,2) 8,8 (\pm 7,0)	0,49
265/265 o. 265/X vs. X/X ^b	121 163	8,6 (\pm 6,4) 9,2 (\pm 7,6)	0,50

SD = Standardabweichung

Eine zweite Untersuchung zielte darauf ab, zu erfahren, ob unter den einzelnen Genotypen möglicherweise häufiger Patienten vorkommen, die unter einer Depression leiden. Dazu wurden die Patienten anhand der BDI-Werte in eine Gruppe eingeteilt, bei der ein „Hinweis auf eine Depression“ besteht, und eine weitere Gruppe, bei der dieser Hinweis nicht besteht. Als cut-off-Wert wurden 18 Punkte verwendet (siehe Kapitel 2.3.2). Tabelle 23 zeigt die Häufigkeiten der Patienten der einzelnen Gruppen (Depressionshinweise ja/nein und Genotyp); die Häufigkeiten unterscheiden sich auch hier nicht signifikant zwischen den Genotyp-Gruppen ($p > 0,05$).

Tabelle 23: Vergleich der Patientenhäufigkeiten mit und ohne Hinweis auf eine klinisch relevante Depression unter den Rep1-Genotypen mittels Chi-Quadrat-Test

a. X = 265bp- oder 267bp-Allel

b. X = 267bp- oder 269bp-Allel

Genotypen	<u>Kein Hinweis auf</u> eine Depression (%)	<u>Hinweis auf eine</u> Depression (%)	Signifikanz
269/269 o. 269/X vs. X/X ^a	31 (12,2) 224 (87,8)	5 (17,2) 24 (82,8)	0,39
265/265 o. 265/X vs. X/X ^b	110 (43,1) 145 (56,9)	11 (37,9) 18 (62,1)	0,69

3.4.3 Ergebnisse: *Rep1*-Genotyp und L-Dopa-Äquivalenzdosen

Neben der Untersuchung von motorischen und neuropsychologischen Markern wurde auch überprüft, ob *Rep1* einen Einfluss auf die Parkinson-Medikation ausübt. Dazu wurden die Mittelwerte der L-Dopa-Äquivalenzdosen unter den *Rep1*-Genotypen verglichen. Das geschah ähnlich wie beim UPDRS einerseits als Querschnittsvergleich und andererseits als Vergleich von Longitudinaldaten.

3.4.3.1 Querschnittsdaten

Aus den Patientendaten ermittelte L-Dopa-Äquivalenzdosen wurden verwendet, um mittels Kovarianzanalyse die mittleren Dosen in den einzelnen Genotyp-Gruppen (269bp-Genotypen gegen alle anderen und 265bp-Genotypen gegen alle anderen) miteinander zu vergleichen. Erkrankungsdauer und Alter der Patienten wurden als Kovariaten in die Berechnung mit einbezogen.

Tabelle 24 stellt die Ergebnisse des Vergleichs der L-Dopa-Dosen zwischen den Genotyp-Gruppen dar. Aus ihr geht hervor, dass sich die Mittelwerte nicht signifikant zwischen den Genotypen unterscheiden ($p > 0,05$).

Tabelle 24: Kovarianzanalyse von L-Dopa-Äquivalenzdosen der *Rep1*-Genotypen, korrigiert für Krankheitsdauer und Alter

a. X = 265bp- oder 267bp-Allel

b. X = 267bp- oder 269bp-Allel

c. Korrigiert für Krankheitsdauer (Mittelwert: 7,6 Jahre) und Alter (Mittelwert: 71,4 Jahre)

Genotypen	Anzahl	Korrigierter DOPA Mittelwert (95% CI) in mg/d	Korrigierte Signifikanz
269/269 o. 269/X vs. X/X ^a	62 467	529 (462 - 595) ^c 485 (461 - 510) ^c	0,23
265/265 o. 265/X vs. X/X ^b	233 296	473 (438 - 507) ^c 504 (474 - 535) ^c	0,18

Obwohl zwischen den Genotyp-Gruppen kein signifikanter Unterschied in den L-Dopa-Dosen bestand, nahmen die Mittelwerte mit der *Rep1*-Länge zu. Abbildung 9 zeigt die Mittelwerte der L-Dopa-Äquivalenzdosen mit dem 95 % Konfidenzintervall (CI), die auf analoge Weise auf die Genotyp-Gruppen aufgeteilt wurden, wie schon in Kapitel 3.3.1 besprochen.

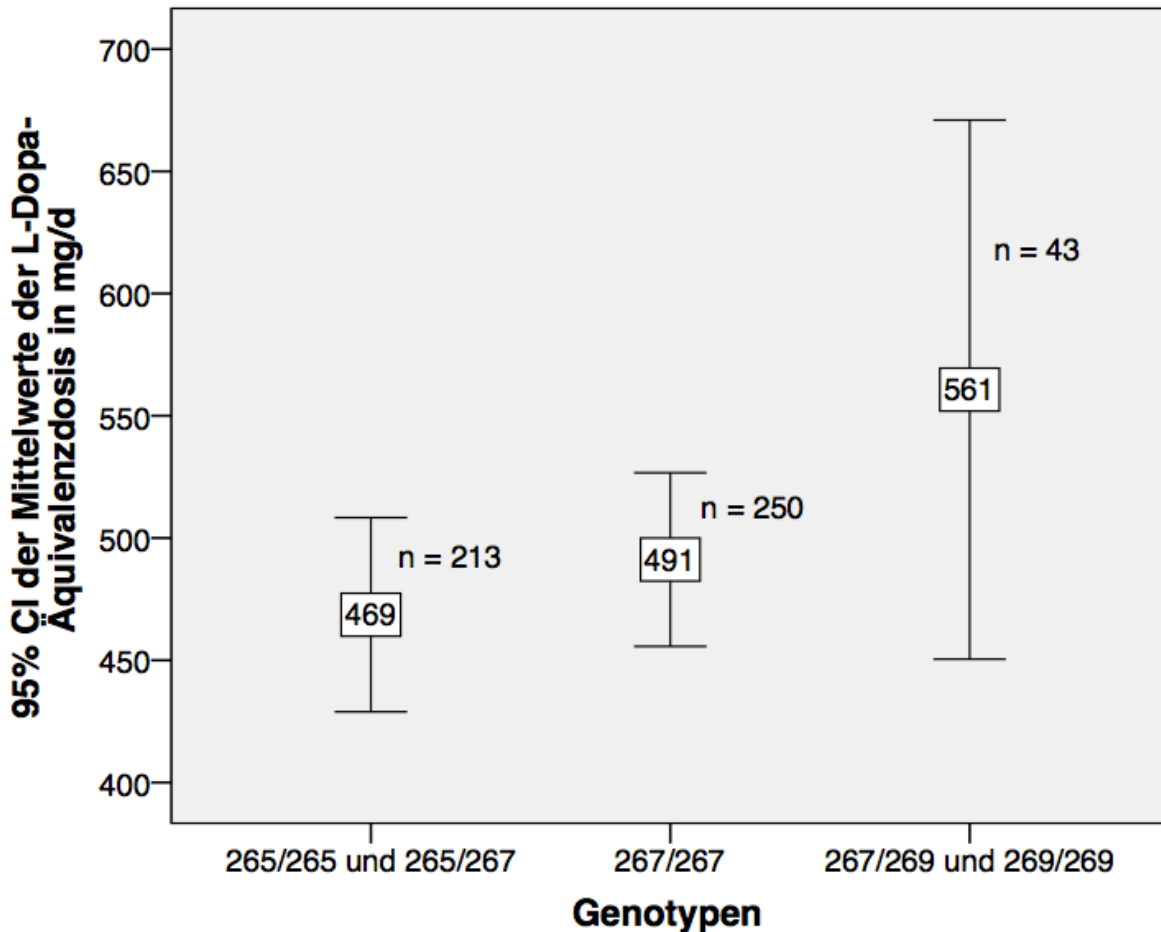


Abbildung 9: Mittelwerte der L-Dopa-Äquivalenzdosen mit 95 % Konfidenzintervallen (CI), verteilt auf die Genotyp-Gruppen mit 265, 267 und 269 Basenpaaren
n = Patientenzahl

3.4.3.2 Longitudinaldaten

Für rund 150 Patienten lagen L-Dopa-Äquivalenzdosen zu zwei Zeitpunkten vor. Patienten wurden nach dem zeitlichen Abstand zwischen Ersterhebung und Nachfolgeerhebung stratifiziert. Daraus entstanden drei Gruppen: Die erste Gruppe enthielt Patienten, bei denen zwischen Erst- und Nachfolgeerhebung ein Jahr verstrichen ist. In der zweiten Gruppe lagen zwei Jahre zwischen den Erhebungen und in der dritten Gruppe drei Jahre. Die restlichen Daten wurden ausgeschlossen, da die Patientenzahlen zu niedrig waren, um statistische Aussagen treffen zu können. Übrig blieben 114 Patienten in den drei erwähnten Gruppen.

Die Auswertung erfolgte, indem Mittelwerte der L-Dopa-Dosen erstens zwischen den einzelnen Genotyp-Gruppen (269bp-Allel gegen alle anderen und 265bp-Allel gegen alle anderen) miteinander verglichen wurden. Zweitens wurden die L-Dopa-Dosen der zwei Zeitpunkte (Erst- und Nachfolgeuntersuchung) innerhalb einer Gruppe verglichen. Geachtet wurde darauf, dass sich sowohl das Alter als auch die Krankheitsdauer der einzelnen Genotyp-Gruppen nicht signifikant unterscheiden, da diese Faktoren den Krankheitsverlauf beeinflussen (siehe oben).

Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse für die Untersuchung des 269bp-Genotyps gegen die übrigen Genotypen: Die L-Dopa-Äquivalenzwerte unterscheiden sich im Mittel weder zwischen den Genotyp-Gruppen signifikant noch änderten sie sich innerhalb der Gruppen in signifikantem Ausmaß ($p > 0,05$).

Tabelle 25: Vergleich von L-Dopa-Äquivalenzdosen zwischen 269bp-Genotyp und allen anderen mit Laufzeiten zwischen einem und drei Jahren zwischen Erst- und Nachfolgeberhebung

- a. X = 265bp- oder 267bp-Allel
 b. In Jahren angegeben
 c. In mg pro Tag (mg/d)
 d. Berechnet mittels T-Test für verbundene Stichproben
 e. Berechnet mittels T-Test für unverbundene Stichproben

Laufzeit	Genotypen	Anzahl	Alter ^b	Krankheitsdauer ^b	DOPA _{t₀} ^c	DOPA _{t₁} ^c	Intragruppen Signifikanz ^d
0-1	269/269 o. 269/X	8	68,5	13,6	585	607	0,80
	vs. X/X ^a	54	73,7	7,5	506	482	0,45
<i>Intergruppen-Signifikanz^e</i>			0,28	0,06	0,57	0,39	
0-2	269/269 o. 269/X	6	73,3	8,3	490	554	0,47
	vs. X/X ^a	21	74,5	8,0	567	549	0,79
<i>Intergruppen-Signifikanz^e</i>			0,78	0,84	0,51	0,96	
0-3	269/269 o. 269/X	5	73,4	10,6	716	694	0,93
	vs. X/X ^a	20	69,5	7,1	499	485	0,88
<i>Intergruppen-Signifikanz^e</i>			0,38	0,19	0,29	0,22	

DOPA = L-Dopa-Äquivalenzdosis, t₀ = Ersterhebung, t₁ = Nachfolgeberhebung

Korrespondierend dazu zeigt Tabelle 26 die Untersuchung des 265bp-Genotyps gegen die übrigen Genotypen. Auch hier unterscheiden sich die L-Dopa-Äquivalenzwerte im Mittel weder zwischen den Genotyp-Gruppen signifikant noch änderten sie sich innerhalb der Gruppen in signifikantem Ausmaß ($p > 0,05$). Zu beachten ist zudem, dass in der Analyse der Patienten mit zwei Jahren Abstand zwischen Erst- und Nachfolgeberhebung die Krankheitsdauer in den Genotyp-Gruppen signifikant verschieden ist. Das Ergebnis ist damit nur eingeschränkt gültig.

Tabelle 26: Vergleich von L-Dopa-Äquivalenzdosen zwischen 265bp-Genotyp und allen anderen mit Laufzeiten zwischen einem und drei Jahren zwischen Erst- und Nachfolgeberhebung

* signifikant ($p < 0,05$)

a. X = 267bp- oder 269bp-Allel

b. In Jahren angegeben

c. In mg pro Tag (mg/d)

d. Berechnet mittels T-Test für verbundene Stichproben

e. Berechnet mittels T-Test für unverbundene Stichproben

Laufzeit	Genotypen	Anzahl	Alter ^b	Krankheitsdauer ^b	DOPA _{t₀} ^c	DOPA _{t₁} ^c	Intragruppen Signifikanz ^d
0-1	265/265 o. 265/X	27	74,6	8,2	525	489	0,40
	vs. X/X ^a	35	71,8	8,3	509	505	0,93
<i>Intergruppen-Signifikanz^e</i>			0,27	0,92	0,84	0,82	
0-2	265/265 o. 265/X	10	78,0	4,7	589	588	0,99
	vs. X/X ^a	17	72,1	10,0	527	527	0,99
<i>Intergruppen-Signifikanz^e</i>			0,10	0,004*	0,62	0,73	
0-3	265/265 o. 265/X	10	71,6	9,3	499	478	0,18
	vs. X/X ^a	15	69,3	6,8	571	560	0,10
<i>Intergruppen-Signifikanz^e</i>			0,57	0,25	0,57	0,40	

DOPA = L-Dopa-Äquivalenzdosis, t₀ = Ersterhebung, t₁ = Nachfolgeberhebung

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die dargestellten Analysen dieses Kapitels lässt sich zusammenfassend festhalten, dass sich das Erkrankungsalter zwischen den *Rep1*-Genotypen nicht signifikant unterschied, obwohl mit längerem *Rep1* das Erkrankungsalter abnahm. Auch das Hinzunehmen von SNPs als Kovariaten änderte nicht das Ergebnis. Ferner wurde festgestellt, dass verschiedene *Rep1*-Genotypen nicht mit signifikanten Unterschieden in MMST-, MoCA- und BDI-Punktzahlen sowie L-Dopa-Äquivalenzdosen einhergehen. Signifikante Unterschiede im UPDRS III konnten nur bei Patienten nachgewiesen werden, welche ohne Parkinson-Medikation (OFF)

untersucht wurden. Dabei war das 265bp-Allel mit einer besseren Punktzahl verknüpft. Nach Korrektur für multiples Testen war das Ergebnis allerdings nicht mehr signifikant.

4 Diskussion

Die Parkinson-Krankheit stellt aufgrund ihrer vielseitigen Symptomatik eine große Belastung für den Patienten und sein Umfeld dar. Aber auch für den behandelnden Arzt ergeben sich Schwierigkeiten, da die Krankheit bis heute nicht kausal erklärt werden kann und in den meisten Fällen auch wenig über den individuellen Verlauf aussagbar ist. Fragen, ob sich die motorischen Funktionen des Patienten schnell oder langsam verschlechtern werden, ob es wahrscheinlich ist, dass sich eine Demenz oder eine Depression entwickeln, können bislang meist nur spekulativ beantwortet werden.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob *Rep1*-Genotypen krankheitsmodifizierend wirken können, in der Hoffnung, den Krankheitsverlauf der sporadischen Parkinson-Krankheit evidenzbasierter beurteilen zu können. Diese Arbeit konnte allerdings keine signifikanten Anhalte dafür finden, dass bestimmte *Rep1*-Genotypen mit dem Erkrankungsalter, den motorischen Funktionen, einer kognitiven Beeinträchtigung oder einer Depression assoziiert wären.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Sicherheit der Parkinson-Diagnose

Die DNA-Proben dieser Studie stammten von Parkinson-Patienten, deren Diagnose in der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen gestellt oder verifiziert wurde; dabei erfolgte die Diagnose gemäß den international gültigen Konsensuskriterien. Sicher kann die Parkinson-Krankheit nur postmortal in einer Autopsie festgestellt werden und bei keinem der Patienten lag solch eine definitive Diagnose vor. Dennoch beschreibt die Literatur eine 91%ige Sensitivität und 98%ige Spezifität für die rein klinische Diagnose in spezialisierten Zentren [101], wobei man hier von solch einem Zentrum ausgehen kann. Die Patienten wurden meist über Jahre hinweg am Klinikum betreut und erhielten oft auch eine Bildgebung, wodurch die Diagnosesi-

cherheit ansteigt. Sicherlich ist es nicht auszuschließen, dass Patienten irrtümlicherweise als „Parkinson-Krank“ klassifiziert wurden, obwohl in Wirklichkeit eine andere Krankheit vorlag. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass aufgrund der Erfahrung der betreuenden Ärzte, durch Betrachtung im Verlauf und durch Ausschluss von Differentialdiagnosen, die Zahl der fälschlicherweise als Parkinson-Patienten in diese Studie eingeschlossenen Personen sich in sehr engen Grenzen hält.

4.1.2 Sicherheit und Aussagekraft der Ergebnisse

4.1.2.1 Bestimmung des Genotyps

Die DNA-Proben wurden unter strengen Hygienebedingungen untersucht und durch das Mitführen von Negativkontrollen wurde die Abwesenheit von Verunreinigungen stets überprüft. Bei keiner der Analysen dieser Studie trat eine Kontamination der Negativkontrolle auf. Die PCR-Bedingungen zur Amplifizierung der Proben-DNA wurden auf *Rep1* zugeschnitten; die Primer-Sequenzen waren bereits lange publiziert [87] und in vielen anderen Studien verwendet. Die Fragmentanalyse ist ein sehr zuverlässiges und robustes Verfahren zur Bestimmung der Fragmentlänge. Traten Unstimmigkeiten beim Ablesen der Fragmentlänge auf, so wurde die Analyse wiederholt, bis ein eindeutiges Ergebnis erzielt wurde. Die verwendeten Methoden sind etabliert und gut geeignet, die Länge eines DNA-Fragments auf ein Basenpaar genau zu bestimmen. Die Fehlerrate bei der Fragmentanalyse liegt laut dem Hersteller des Gerätes unter 0,15 % [102]. Es kann daher angenommen werden, dass die bestimmten Genotypen aussagekräftig sind.

4.1.2.2 Alter bei Erkrankungsbeginn

Die Bestimmung des Erkrankungsalters birgt eine inhärente Subjektivität. Wie in der Einleitung beschrieben, werden Frühsymptome oft verkannt und es dauert oft einige Jahre, bis die Diagnose der Parkinson-Krankheit gestellt wird. Häufig wird

auch erst im Verlauf klar, dass es sich um Parkinson handelt. Daraus ergibt sich die Schwierigkeit, festzusetzen, wann die Erkrankung letzten Endes begonnen hat. Im Allgemeinen wird das Alter, in dem motorische Symptome aufgetreten sind, als Erkrankungsalter gewählt – oft auch erst rückblickend und unter Einbeziehung von Aussagen der Familie. Das ist auch ein Kompromiss, da motorische Symptome in der Regel erst auftreten, wenn rund 50 - 70 % der nigralen und striatalen dopaminergen Neuronen schon degeneriert sind [103]. Solange aber keine objektiven Marker zur Verfügung stehen, bleibt derweil die anamnestische Ermittlung des Erkrankungsalters, mit dem Beginn der motorischen Symptome als Startpunkt. Damit kann das Alter bei Erkrankungsbeginn auf ein bis zwei Jahre genau bestimmt werden.

Bei der Auswertung werden Mittelwerte des Erkrankungsalters für die einzelnen Genotyp-Gruppen gebildet; es kommt dadurch bis zu einem gewissen Grad zu einer Relativierung der einzelnen Werte und kleine Abweichungen gleichen sich aus. Nichtsdestotrotz müsste man bei signifikanten Unterschieden zwischen Genotyp-Gruppen von nur ein bis zwei Jahren sehr vorsichtig sein mit den Schlussfolgerungen, da diese Unterschiede auch durch die Ungenauigkeit der Angabe des Erkrankungsalters bedingt sein könnten.

4.1.2.3 Klinische Parameter

Klinische Beurteilungs- und Fragebögen dienen dazu, bestimmte Symptome und Merkmale zu quantifizieren. In der Regel können diese Tests ihr Merkmal kaum mit absoluter Sicherheit messen. Die in dieser Studie verwendeten Beurteilungs- und Fragebögen sind jedoch weit verbreitet und in einer Vielzahl von Studien erprobt und verwendet. Daher kann man davon ausgehen, dass sie ihr Merkmal für diese Studie suffizient messen. Des Weiteren wurden die Messwerte von Ärzten des Klinikums erhoben; man kann somit annehmen, dass die Tests sachgemäß ausgeführt wurden. Die erhobenen Daten durchlaufen mehrere Stationen, damit diese in Datenbanken eingetragen werden. Auch bei sorgfältigster Vorgehensweise kann

nicht ausgeschlossen werden, dass vereinzelt Fehler im Bearbeitungsprozess vorkommen und dadurch Werte irrtümlicherweise verfälscht werden. Für viele Patienten wurden jedoch Messwerte für einen Parameter aus verschiedenen Quellen bezogen, was eine gewisse Redundanz schaffte und die Richtigkeit der Werte festigte. Zudem wurden die Daten auf ihre Plausibilität überprüft. Daher ist die Zahl der verfälschten Messwerte vermutlich gering.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Studienkollektiv

Das mittlere Erkrankungsalter der Patienten in dieser Arbeit liegt in der Gesamtkohorte bei 58,2 (\pm 11,7) Jahren, mit einem mittleren Lebensalter von 69,4 (\pm 11,0) Jahren. Ferner setzte sich die Patientenkohorte aus 63,1 % männlichen und 36,9 % weiblichen Patienten zusammen. Diese Werte sind typisch für Parkinson-Patienten [3, 8] und sind gut mit den Daten von früheren Studien, die *Rep1* untersuchten, vereinbar [71, 76, 77, 81, 86, 87, 104-112].

4.2.2 Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten

Rep1 kommt im Allgemeinen in drei häufigen Ausprägungen vor. Da nun verschiedene Laboratorien *Rep1* häufig unterschiedlich messen, werden hier im Sinne der Vergleichbarkeit die Allele mit den Adjektiven *kurz*, *mittel* und *lang* beschrieben. Die Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten der vorliegenden Studie werden in Tabelle 27 und Tabelle 28 mit den Frequenzen in der Literatur verglichen. Tabelle 27 zeigt, dass sich die ermittelten Allelfrequenzen gut in die Reihe bisher publizierter Werte einfügen. Zu beachten ist hierbei, dass sich die Frequenzen von kaukasischen Patienten beträchtlich von den asiatischen unterscheiden. Allerdings berichten dort auch vergleichsweise wenige Studien über die Frequenzen von *Rep1*.

Tabelle 27: Allelfrequenzen von *Rep1* bei Parkinson-Patienten in der Literatur

Studie	Allelfrequenz (%)					Anzahl Patienten
	<	kurz	mittel	lang	>	
Diese Arbeit	0,2	25,2	67,9	6,7	0,0	1025
Patienten aus Europa, Australien, Kanada und den USA						
Parsian 1998 [111]	–	23,0	71,0	6,0	–	133
Krüger 1999 [79]	–	10,7	69,1	20,2	–	163
Tan 2000 [82]	–	21,0	70,0	9,0	–	100
Farrer 2001 [87]	0,2	20,6	70,3	8,8	0,2	306
Khan 2001 [104]	–	25,1	69,4	5,5	–	305
Spadafora 2003 [112]	0,3	26,2	66,1	7,4	0	189
Mellick 2005 [105]	0	22,1	69,7	8,1	0,1	369
Hadjigeorgiou 2006 [75]	1,1	21,3	60,4	16,6	0,6	178
Maraganore 2006 [71]	–	24,0	68,0	8,0	–	2692
Ross 2007 [81]	–	24,5	67,7	7,9	–	184
Kay 2008 [76]	0,2	25,3	66,6	7,7	0,2	1802
Pankratz 2009 [77]	–	25,0	65,8	9,2	–	461
Trotta 2012 [113]	–	27,3	67,5	5,2	–	857
Patienten aus Asien						
Izumi 2001 [110]	0,2	40,8	24,8	33,0	1,2	200
Mizuta 2002 [106]	0,9	51,8	25,5	20,0	1,8	165
Tan 2003 [83]	–	36,0	28,0	34,0	–	206

kurz = kurzes Allel (in dieser Studie 265 bp), mittel = mittleres Allel (in dieser Studie 267 bp), lang = langes Allel (in dieser Studie 269 bp), < = kürzer als die drei häufigsten Allele, > = länger als die drei häufigsten Allele

Die Genotyphäufigkeiten dieser Studie sind ebenfalls vereinbar mit den bisher publizierten Werten (siehe Tabelle 28). Dabei sei angemerkt, dass sie seltener pu-

bliziert wurden als die Allelfrequenzen, die Variabilität der Häufigkeiten unter den Studien größer und die Patientenzahl der meisten Studien geringer ist. Auch hier zeigt sich eine große Diskrepanz zwischen den Genotyphäufigkeiten der asiatischen und kaukasischen Patienten.

Tabelle 28: Genotyphäufigkeiten von *Rep1* bei Parkinson-Patienten in der Literatur

Studie	K / K	K / M	M / M	M / L	L / L	K / L	Anzahl Patienten
	Genotyphäufigkeit (%)						
Diese Arbeit	6,6	33,4	47,5	7,6	0,9	4,0	1025
Patienten aus Europa, Australien, Kanada und den USA							
Krüger 1999 [79]	2,4	14,1	47,9	28,3	4,3	2,4	163
Tan 2000 [82]	1,0	35,0	45,0	12,0	6,0	0,0	100
Spadafora 2003 [112]	5,8	37,6	41,3	11,6	0,0	3,2	189
Mellick 2005 [105]	4,9	30,6	49,1	10,3	1,1	3,8	369
Hadjigeorgiou 2006 [75]	6,9	27,7	39,9	16,2	7,5	1,7	178
Ross 2007 [81]	10,3	45,4	34,6	7,0	1,1	1,6	184
Kay 2008 [76]	6,6	34,2	44,0	10,8	0,7	3,1	1802
Pankratz 2009 [77]	6,7	32,1	44,5	10,7	1,6	4,4	461
Trotta 2012 [113]	9,7	32,9	47,4	7,4	0,4	2,3	857
Patienten aus Asien							
Izumi 2001 [110]	22,2	11,9	10,8	16,0	12,9	26,3	200
Tan 2003 [83]	16,0	17,0	11,0	18,0	13,0	25,0	206

K = kurzes Allel (in dieser Studie 265 bp), M = mittleres Allel (in dieser Studie 267 bp), L = langes Allel (in dieser Studie 269 bp)

Die Genotyphäufigkeiten dieser Studie weichen leicht vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab (siehe Kapitel 3.1.1), wobei die Kohorten 1 und 2 separat jeweils

das Gleichgewicht erfüllen. Biologisch gesehen können Abweichungen vom HWG durch Selektion, Inzucht oder durch Stratifizierung der Population entstehen [99]. Die Patienten in dieser Studie wurden nicht zufällig aus der Grundgesamtheit rekrutiert, sondern stellen Parkinson-Patienten dar, wodurch gewissermaßen eine Vorauswahl stattfand. Zusätzlich können durch Deletionspolymorphismen oder mutierte Primer-Bindungsstellen Abweichungen entstehen. Oft wird das HWG auch dazu verwendet, die Güte der Genotypisierung zu prüfen, wobei signifikante Abweichungen bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 10^{-3}$ bis 10^{-4} zum Ausschluss der Genotypen – vor allem unter Kontrollpersonen – führen sollten [99]. Im Gegensatz dazu sind leichte Abweichungen vom HWG unter Patienten häufig ein Zeichen für eine Krankheitsassoziation, im Sinne einer „Selektion“ von bestimmten Genotypen in den betroffenen Personen [99, 100].

Da die Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten dieser Arbeit mit den Werten der Literatur vereinbar sind, Parkinson-Erkrankte eine gewisse Vorauswahl aus der Grundgesamtheit darstellen und die Abweichung vom HWG bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ nur gering war, wird diese Abweichung wahrscheinlich nicht durch Genotypisierungsfehler begründet sein, sondern durch die oben genannten Faktoren.

4.2.3 *Rep1* und Alter bei Erkrankungsbeginn

Diese Arbeit untersuchte ein großes, homogenes Patientenkollektiv aus Deutschland. Es bildet damit gut die regionalen Genotypen ab, wodurch solide Aussagen über die hiesigen Patienten möglich sind. Es schloss Patienten aus, die bekannte krankheitsbedingende Mutationen tragen, im Gegensatz zu einigen Studien [74]. Darüber hinaus decken sich die Genotyphäufigkeiten mit denen aus anderen kaukasischen Populationen, wodurch die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der anderen Studien vergleichbar sind. Die vorliegende Arbeit konnte keinen Zusammenhang zwischen dem *Rep1*-Genotyp und dem Erkrankungsalter feststellen.

Unter den Patienten mit bekannter Mutation (*GBA*, siehe Kapitel 2.1) konnte auch kein Einfluss von *Rep1* auf das Erkrankungsalter festgestellt werden. Zudem waren auch die *Rep1*-Genotypen nicht signifikant verschieden verteilt als in den Patienten ohne diese Mutationen. Es muss aber festgehalten werden, dass es sich um lediglich 18 Patienten handelte. Hier ist es schwierig Aussagen zu treffen, die auf die Grundgesamtheit der Parkinson-Patienten übertragbar wären, wodurch dieses Ergebnis eine geringe Aussagekraft hat.

Betrachtet man die momentane Literatur (siehe Tabelle 29), wird ersichtlich, dass die Studienlage relativ zwiegespalten ist. Vier Studien berichten darüber, dass das lange *Rep1*-Allel mit einem früheren Erkrankungsbeginn einhergehe. Unter diesen schloss eine Studie über 4.000 Patienten in ihre Analysen ein [74]. Sechs weitere Studien fanden keinen Zusammenhang zwischen *Rep1* und dem Erkrankungsalter. Darunter eine Metaanalyse [71] und eine weitere Studie [76] mit hoher Patientenzahl und Aussagekraft. Insgesamt deuten der momentane Stand der Literatur und die vorliegende Arbeit eher darauf hin, dass kein Zusammenhang zwischen *Rep1* und dem Erkrankungsalter besteht. Aber trotz der beträchtlichen Teststärke einiger der in Tabelle 29 aufgeführten Studien, sind die Ergebnisse inkonsistent. Das nachfolgende Kapitel soll der Frage, weshalb die Untersuchungen von *Rep1* oft zu solch unterschiedlichen Ergebnissen führen, nachgehen.

Tabelle 29: Studienlage zur Assoziation von *Rep1* mit dem Erkrankungsalter

- a. Bezeichnet, wie viel früher Patienten erkranken, die mindestens ein langes Allel tragen, im Vergleich zu dem, was im Studien-Modell spezifiziert ist
 b. Bezeichnet den Vergleich der mittleren Erkrankungsalter in den einzelnen Genotyp-Gruppen
 c. Studie bezieht sich auf asiatische Patienten

Studie	Anzahl Patienten	Studien-Modell	Mittlerer Unterschied im Erkrankungsalter
langes <i>Rep1</i>-Allel assoziiert mit einem früheren Erkrankungsalter			
Hadjigeorgiou 2006 [75]	178	langes Allel vs. Rest	3,6 Jahre früher ^a p = 0,03
Pankratz 2009 [77]	461	langes Allel vs. Rest	3,8 bis 7,5 Jahre früher ^a p = 0,002
Rajput 2009 [78]	452	langes vs. kurzes Allel	6,7 Jahre früher ^a p = 0,007
Chung 2014 [74]	4190	Vergleich der Genotypen ^b	Erkrankungsalter abnehmend mit <i>Rep1</i> -Länge p = 0,01
<i>Rep1</i> <u>nicht</u> assoziiert mit dem Erkrankungsalter			
Diese Arbeit	1021	langes Allel vs. Rest (1); kurzes Allel vs. Rest (2)	Tendenz: Erkrankungsalter abnehmend mit <i>Rep1</i>-Länge (1) p = 0,34 (2) p = 0,39
Krüger 1999 [79]	146	Genotypenvergleich bei early vs. late onset Parkinson	p > 0,05
Tan 2000 [82]	263	Genotypenvergleich bei early vs. late onset Parkinson	p > 0,05
Tan 2003 [83] ^c	206	Genotypenvergleich bei early vs. late onset Parkinson	p = 1,0
Pals 2004 [80]	175	Vergleich verschiedener Haplotypen	p = 0,30
Maraganore 2006 [71]	2692	Vergleich der Genotypen ^b	p = 0,55
Kay 2008 [76]	1802	Vergleich der Genotypen ^b	Erkrankungsalter abnehmend mit <i>Rep1</i> -Länge (Trend) p = 0,055

4.2.3.1 Beurteilung der gegensätzlichen Ergebnisse in der Literatur

4.2.3.1.1 Mögliche Beeinflussung von *Rep1* durch SNPs

Aus der Literatur geht hervor, dass die Dinukleotidwiederholung *Rep1* mit einigen SNPs im Kopplungsungleichgewicht steht, diese also häufiger zusammen vererbt werden, als es durch zufällige Rekombination zu erwarten wäre [26, 77, 86, 114, 115]. Hier sind drei Studien hervorzuheben, die darüber berichten, dass das lange *Rep1*-Allel in etwa 90 % der Fälle zusammen mit dem Risiko-Allel des *rs356219* SNPs vererbt wird (siehe Abbildung 10). Dieses ist das „G“-Allel, welches in großen genomweiten Assoziationsstudien als ein Risikofaktor für die Parkinson-Krankheit identifiziert wurde [28]. In einer anderen Studie mit rund 1.400 Patienten wurde zudem festgestellt, dass Patienten mit diesem Allel ein signifikant niedrigeres Erkrankungsalter aufwiesen als diejenigen, die es nicht trugen (2,4 bis 2,9 Jahre früher) [85]. Nun kommt das Risikoallel des SNPs in 37 bis 41 % der Patienten vor [28, 113, 115], das Risikoallel von *Rep1* (langes Allel) lediglich in 7 bis 8 % (siehe Kapitel 4.2.2). Das bedeutet, dass zwar die 7 bis 8 % der Patienten mit dem *Rep1*-Risikoallel mit hoher Wahrscheinlichkeit auch das Risikoallel des SNPs tragen, umgekehrt ist das aber in den meisten Fällen nicht so. Die übrigen SNP-Risikoallele sind auf die kurzen und mittleren *Rep1*-Genotypen verteilt. Das wird durch den niedrigen r^2 -Wert ($r^2 = 0,09$) des LDs deutlich (siehe Abbildung 10); er besagt, dass die zwei Marker gering korreliert sind und somit die zwei Marker nicht reziprok ausgedrückt werden können, trotz des hohen LDs ($D' = 0,90-0,93$ [77, 86, 115]).

Im Endeffekt trägt so etwa ein Drittel der Patienten mit kurzem und mittlerem *Rep1*-Allel und fast alle Patienten mit dem langen Allel das SNP-Risikoallel. Da die Studienlage dafür spricht, dass dieser SNP das Erkrankungsalter herabsetzt und die Häufigkeit des SNPs hoch ist, wäre es durchaus möglich, dass dieser Effekt so stark ist, dass sich die Unterschiede im Erkrankungsalter bei den *Rep1*-Genotyp-Gruppen möglicherweise relativieren. Der Haupteffekt wäre also eher vom SNP

vermittelt und weniger von *Rep1*, was durchaus zu Inkonsistenzen bei Untersuchungen von *Rep1* führen könnte.

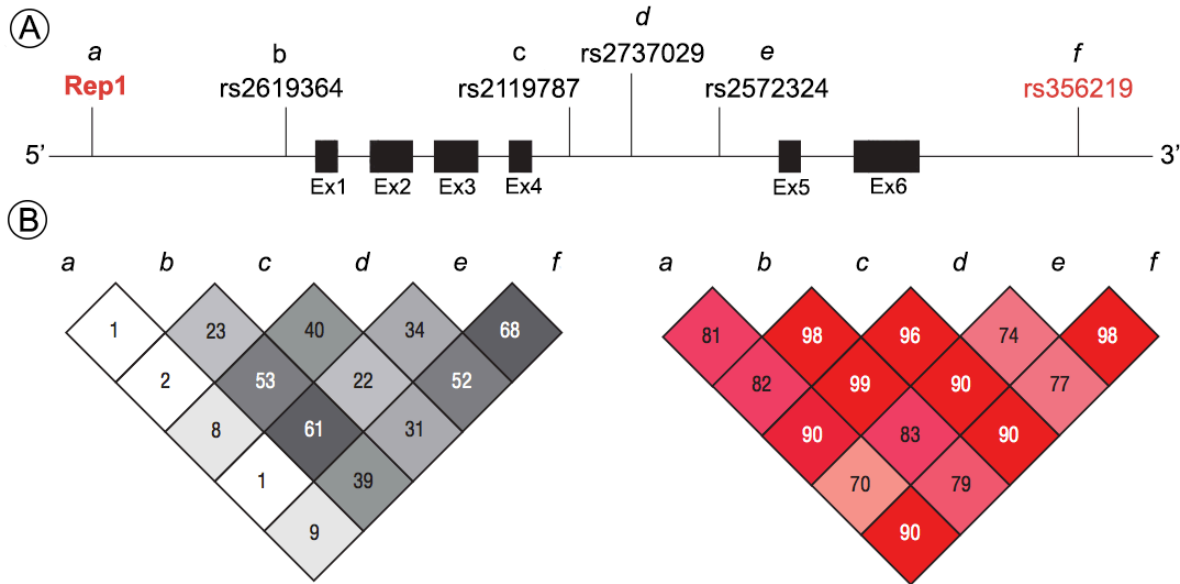


Abbildung 10: Schematische Darstellung des SNCA-Gens und die Struktur des Kopplungsungleichgewichts

A. Zeigt das SNCA-Gen mit *Rep1* am 5'-Ende und *rs356219* am 3' Ende des Gens

B. Zeigt das paarweise Kopplungsungleichgewicht zwischen *Rep1* (a) und je einem SNP (b-f), links angegeben mittels r^2 , rechts mittels D' . Dieser wird zwischen *Rep1* und *rs356219* beschrieben mit $r^2 = 0,09$ und $D' = 0,90$. Ex = Exon, rs = reference SNP

(Abbildung modifiziert aus [86])

Um das Ausmaß der Beeinflussung zu reduzieren, könnte man diesen SNP als Kovariate in die Berechnung mit einschließen. In der vorliegenden Arbeit wurde tatsächlich für zehn SNPs korrigiert, die auf das gesamte SNCA-Gen verteilt waren (Kapitel 3.3.3) und von welchen vier als Risikofaktoren für die Parkinson-Krankheit identifiziert wurden [26, 27, 113]. Einer dieser SNPs ist *rs356220*, welcher einen hohen LD zu *rs356219* aufweist ($D' = 0,99$; $r^2 = 0,97$ [77]). Da in den Analysen *rs356220* als Kovariate einfluss, korrigierte die Berechnung so indirekt auch für *rs356219* und weitere SNPs, die mit diesem im kompletten LD stehen – beispielsweise *rs356165* [77] –, dessen Risikoallel ebenfalls mit einem niedrigeren Erkrankungsalter assoziiert wurde [116]. Damit legt die Untersuchung nahe, dass *Rep1* das Erkrankungsalter auch dann nicht beeinflusst, wenn für den Effekt von

rs356219 korrigiert wird. Es ist aber durchaus sinnvoll, weiterführende Studien durchzuführen, um diesen Sachverhalt weiter zu prüfen, zumal nicht auszuschließen ist, dass weitere SNPs existieren, die möglicherweise auch das Erkrankungsalter beeinflussen.

4.2.3.1.2 Mögliche Beeinflussung des *Rep1*-Effekts durch Umweltfaktoren

Einige Autoren vertreten die Meinung, dass widersprüchliche Erkenntnisse bei der Erforschung der Assoziation zwischen einem Gen und der Parkinson-Krankheit teilweise darauf zurückzuführen sind, dass Studien häufig keine Gen-Umwelt-Interaktionen untersuchen [117, 118]. Die Inkonsistenzen in der bisherigen *Rep1*-Literatur könnten also zum Teil von Umweltfaktoren – wie zum Beispiel dem Rauchen oder Schädel-Hirn-Traumata – herrühren, welche durch bestimmte Mechanismen, die noch nicht ausreichend verstanden sind, Gen-Effekte modulieren.

Schädel-Hirn-Trauma (*traumatic brain injury*)

Es wurde festgestellt, dass Personen, die ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT) erlitten, in ihrem späteren Leben häufiger neurodegenerative Erkrankungen und eine Demenz entwickeln als Personen ohne SHT in der Anamnese [119]. Eine kürzlich veröffentlichte Meta-Analyse von Jafari et al. untersuchte den Zusammenhang zwischen einem SHT – definiert durch Bewusstseinsverlust oder Gehirnerschütterung oder postkommotionelles Syndrom (Amnesie, vestibuläre Symptome, motorische/sensorische Symptome) – und dem Risiko, Parkinson zu entwickeln. Dabei wurde ein leicht erhöhtes Risiko (Odds-Ratio von 1,57) festgestellt [120]. Mögliche Erklärungen könnten die Erkenntnisse von Uryu et al. liefern, die erhöhte alpha-Synuklein-Konzentrationen im Hirngewebe von Patienten mit SHT beschrieben [121]. Maus-Experimente zeigten zudem, dass axonale Schäden, wie sie nach einem SHT auftreten können, zu einer vorübergehenden Änderung in der alpha-Synuklein-Verteilung in Neuronen führen können, mit einer erheblichen Akkumula-

tion des Proteins in den geschädigten Axonen von alten Mäusen, aber nicht bei jungen [122, 123].

Wie der Zusammenhang zwischen SHT und der Akkumulation von alpha-Synuklein genau aussieht, ist bislang unklar, jedoch könnte *Rep1* in dem Prozess eine Rolle spielen. Zwei unabhängige Studien berichten, dass ein SHT signifikant mit der Erkrankung an Parkinson assoziiert sei bei Personen, die das lange *Rep1*-Allel tragen (Odds-Ratio zwischen 3 und 5), verglichen mit Personen, die kürzere *Rep1*-Allele tragen. Außerdem stellten sie kein höheres Risiko für Personen mit mindestens einem kurzen *Rep1*-Allel und einem SHT in der Anamnese fest [124, 125]. Es ist also denkbar, dass durch ein SHT Mechanismen in Gang gesetzt werden, die möglicherweise *Rep1* sowie Alterungsprozesse einschließen und letzten Endes eine leicht erhöhte alpha-Synuklein-Expression über Jahre hinweg bewirken könnten, was mit der Zeit zur Degeneration von Neuronen und zur Parkinson-Krankheit führt.

Interessanterweise fanden Goldman et al. zusätzlich, dass Parkinson-Patienten, die in ihrer Studie mindestens ein langes *Rep1*-Allel trugen und ein SHT in ihrer Anamnese aufwiesen, im Durchschnitt ein um etwa 4,9 Jahre früheres Erkrankungsalter aufwiesen, verglichen mit allen anderen Personen, unabhängig vom Genotyp und dem SHT Status [124]. Sicherlich werden weitere Studien benötigt, um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen. Wenn der Effekt, den ein SHT auf das lange *Rep1*-Allel vermittelt, tatsächlich so groß ist, wäre es möglich, dass in Studien, die einen Zusammenhang zwischen *Rep1* und dem Erkrankungsalter fanden, tendenziell mehr Patienten ein SHT erlitten haben, zumal die Inzidenz von SHTs relativ hoch ist.

Zigarettenrauchen

Neben Risikofaktoren, die mit der Parkinson-Krankheit assoziiert sind, existieren auch protektive Faktoren, die bis zu einem gewissen Maß die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung der Krankheit senken können. Zigarettenrauchen ist solch ein gut belegter Faktor [126]. Zwei Studien konnten ferner zeigen, dass Rauchen ei-

nen beeinflussenden Faktor für das über *Rep1* vermittelte Parkinson-Risiko darstellt. Rauchen schien dabei das erhöhte Risiko des langen *Rep1*-Allels zu „neutralisieren“. In der Studie hatten nur die Personen mit dem langen Allel, die Nichtraucher waren, ein erhöhtes Risiko. Das niedrigste Risiko zeigte die Kombination aus dem protektiven, kurzen Allel und einem positiven Raucherstatus [127, 128].

Wenn man davon ausgeht, dass Rauchen das Parkinson-Risiko des langen *Rep1*-Allels reduzieren kann, ist es auch möglich, dass eventuelle krankheitsmodifizierende Effekte von *Rep1* abgeschwächt werden. Dazu liegen jedoch bislang keine Studien vor.

Die Prävalenz des Rauchens in der Bevölkerung ist recht hoch. Es ist also möglich, dass ein relevanter beeinflussender Faktor vorliegt. Diese Arbeit hat den Raucherstatus, so wie die meisten anderen Studien, nicht als Kovariate in die Analysen mit einbezogen. Pankratz et al. fanden, dass bei ihren Patienten der Raucherstatus keinen Unterschied in der Signifikanz ihrer Ergebnisse machte [77]. Wahrscheinlich wäre es trotzdem erkenntnisreich, in weiterführenden Studien den Raucherstatus mit zu erheben und mit zu analysieren. Ein Hinweis dafür liefert die Studie von Chung et al., die einen Zusammenhang bei über 4.000 Patienten zwischen *Rep1* und dem Erkrankungsalter fanden und dabei für den Raucherstatus (in „pack years“) korrigierten [74].

4.2.4 *Rep1* und klinische Parameter

Die Untersuchungen zu den klinischen Parametern dieser Studie wurden einerseits als Querschnittsanalyse, andererseits als Longitudinalanalyse durchgeführt. Die Patientenzahlen in den Querschnittsuntersuchungen sind mit wenigen hundert relativ gering, um starke Aussagen über Assoziationen machen zu können, zumal das „Risikoallel“ von *Rep1* eine relativ geringe Frequenz aufweist. Solche Studien neigen dazu, aufgrund ihrer moderaten bis niedrigen Teststärke (*power*) falsch positive und falsch negative Ergebnisse zu liefern [129]. Die meisten anderen Stu-

dien, die über Zusammenhänge von *Rep1* und klinischen Parametern berichten, weisen ähnliche Patientenzahlen auf, wodurch die Untersuchungen dieser Arbeit aber durchaus die bisherige Studienlage bereichern können.

Querschnittsanalysen können inhärent nur „Momentaufnahmen“ liefern. Sie können also keine Aussagen darüber treffen, wie sich die einzelnen Parameter in Abhängigkeit von der Zeit verhalten. Um diese Progression zu untersuchen, bieten sich Longitudinalanalysen an. Die Längsschnittuntersuchungen dieser Studie gehen nur über ein bis zwei Jahre und weisen nur wenige Patienten auf (40 bis 150). Da sich die Teststärke als relativ gering darstellt, ist die Interpretation dieser Ergebnisse demnach mit großer Vorsicht vorzunehmen und die Aussagekraft ist dementsprechend limitiert.

4.2.4.1 Motorische Marker – UPDRS III

Die vorliegende Arbeit fand in der Querschnittsanalyse bei über 300 Patienten und einer mittleren Krankheitsdauer von 6,3 Jahren keinen Unterschied in den mittleren UPDRS III-Werten zwischen den verschiedenen *Rep1*-Genotypen. Eine Stärke dieser Analyse ist, dass für einige beeinflussende Variablen korrigiert wurde: Einerseits für das Alter, das den stärksten bekannten Risikofaktor für die Parkinson-Krankheit darstellt und Einfluss auf die Krankheitsprogression nimmt [130]. Andererseits für die Krankheitsdauer, da diese die motorischen (sowie nichtmotorischen) Fähigkeiten auch stark beeinflusst. Patienten mit längerer Krankheitsdauer zeigen im Durchschnitt eine schlechtere motorische Funktion. Bei Patienten, die unter Parkinson-Medikation untersucht wurden (ON), wurde in einer zusätzlichen Analyse auch für die tägliche L-Dopa-Äquivalenzdosis korrigiert. Das ist sinnvoll, wenn man betrachtet, dass zwei Patienten die gleichen UPDRS-Werte haben können, während der eine Patient aber wesentlich höhere L-Dopa-Dosen benötigt, um diesen motorischen Wert zu erreichen. Andererseits kann dieses Ergebnis, in Anbetracht der Patientenzahl und durch die in der Natur von Querschnittsanalysen liegenden Schwächen, die Frage sicherlich nicht abschließend beantworten.

Die longitudinale Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede in den motorischen Werten. Es wurde zwar hier darauf geachtet, dass die einzelnen Genotyp-Gruppen in Alter, Krankheitsdauer und L-Dopa-Äquivalenzdosis keine signifikanten Unterschiede zeigen – um homogene Versuchsgruppen zu erhalten –, die Patientenzahl ist aber mit 29 sehr klein und der Beobachtungszeitraum von nur einem Jahr kurz.

Es gibt nur wenige Studien zu der Frage, ob *Rep1* motorische Parameter beeinflussen könnte. Ritz et al. fanden in ihrer longitudinalen Analyse, mit 233 Patienten über einem Zeitraum von rund fünf Jahren, ein vierfach erhöhtes Risiko für Patienten mit dem langen *Rep1*-Allel für eine schnellere Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten (gemessen durch die Änderung des UPDRS III pro Zeiteinheit) [84]. Im Gegensatz dazu fanden Markopoulou et al. in ihrer Studie, mit 854 Patienten über einem Zeitraum von bis zu 15 Jahren, das Gegenteil. Das lange *Rep1*-Allel zeigte ein geringeres Risiko, motorische Beeinträchtigungen zu entwickeln (ein Hoehn & Yahr-Stadium von 4 oder 5 zu erreichen), wohingegen das kurze Allel mit einer Verdopplung dieses Risikos einherging (verglichen mit längeren *Rep1*-Allelen). Sie bildeten die Hypothese, dass das lange *Rep1*-Allel möglicherweise präklinisch das Risiko für Parkinson erhöhe, beim manifesten Parkinson hingegen einen eher protektiven Effekt ausübe [131].

Beide Studien fanden, dass *Rep1* motorische Parameter beeinflusst, allerdings waren es jeweils andere Allele und unterschiedliche Wirkungs-Richtungen. Es herrscht also noch Unklarheit, ob ein und welches Allel das Risiko vermitteln könnte. Die vorliegende Arbeit ist insofern schwer mit diesen Studien zu vergleichen, als dass die longitudinale Analyse eine zu geringe Anzahl an Patienten aufweist und die Querschnittsanalyse mit den longitudinalen Modellen der Literatur nur begrenzt vergleichbar ist. Es sind somit weitere Studien notwendig, um diese Frage befriedigender klären zu können.

4.2.4.2 Gedächtnisleistung

Diese Studie konnte weder in Querschnitts- noch in Längsschnittanalysen einen Einfluss von *Rep1* auf die kognitive Leistung zeigen. Die Analysebedingungen waren analog zu denen beim UPDRS (Korrektur für Kovariaten). Die Querschnittsanalyse des MMST schloss knapp 600 Patienten ein, weshalb die Aussagekraft um einiges höher ist als bei den motorischen Markern und der MoCA Analyse mit etwa 100 Patienten.

Der Anteil an Patienten in dieser Arbeit mit kognitivem Defizit war mit 10 % relativ gering, gemessen anhand des MMST. Im Vergleich dazu wurden Prävalenzen für eine Demenz bei Parkinson in der Literatur mit 30 - 50 % beschrieben [4, 14, 132]. Wahrscheinlich ist das bedingt durch Schwächen des sehr häufig verwendeten MMST, welcher einerseits einige kognitive Felder, die beim Parkinson beeinträchtigt sind, nicht erfasst – zum Beispiel die exekutive Dysfunktion. Zum anderen weist er einen Deckeneffekt auf (*ceiling effect*), weshalb Patienten mit normalen MMST-Werten trotzdem kognitive Einschränkungen oder eine Demenz aufweisen können [16]. Man kann aber davon ausgehen, dass die Patienten, welche beim MMST unter dem cut-off lagen, mit hoher Wahrscheinlichkeit kognitive Beeinträchtigungen hatten. Wenn also ein relevanter Zusammenhang zwischen *Rep1* und der Gedächtnisleistung bei Parkinson-Patienten bestünde, hätte sich das vermutlich in der Genotyp-Verteilung abgezeichnet. Der Anteil an Patienten mit kognitivem Defizit, wenn er mit Hilfe des MoCA gemessen wird, kommt mit 30 % den Angaben der Literatur relativ nahe, was wohl an der höheren Sensitivität dieses Tests liegt. Da auch hier keine Assoziation zu finden war, bekräftigt das nur das Ergebnis.

Die Studie lässt allerdings nicht zu, dass auf die Demenz als Ursache für ein kognitives Defizit geschlossen wird, da beispielsweise auch depressive Patienten schlecht im MMST oder MoCA abschneiden können (Pseudodemenz) [18].

Die Längsschnittuntersuchung leidet hier unter den gleichen Schwächen, die auch bei den motorischen Markern auftraten: eine kleine Patientenzahl und nur zwei Erhebungen in einem Abstand von lediglich einem Jahr.

De Marco et al. führten eine Studie durch, um den Zusammenhang von *Rep1* und Demenz zu untersuchen. Dabei verglichen sie die *Rep1*-Genotypen in 114 dementen und ebenso vielen nicht dementen Parkinson-Patienten. Die Frequenzen waren nicht signifikant verschieden [133]. Zusätzlich fanden Keri et al. keine Anzeichen dafür, dass der *Rep1*-Status das sequenzielle Lernen (cognitive sequence learning) in 204 gesunden Probanden beeinflussen würde [134]. Diese Studien waren Querschnittsanalysen und sind somit relativ gut vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Studie. Die vorliegende Arbeit ist mit diesen Studien im Einklang darüber, dass *Rep1* vermutlich keinen Einfluss auf kognitive Fähigkeiten ausübt.

Die Ergebnisse von Markopoulou et al. besagen auch hier das Gegenteil, sie sind aber konsistent mit ihren eigenen Berichten über die motorische Funktion (siehe Kapitel 4.2.4.1). Sie fanden bei ihren Patienten, dass das lange *Rep1*-Allel mit einem reduzierten Risiko verbunden war, ein kognitives Defizit zu entwickeln (MMST < 26 Punkte), wohingegen das kurze Allel mit einem höheren Risiko einherging [131]. In Anbetracht dieser Ergebnisse bleibt die Studienlage inkonsistent und es wird klar, dass weitere longitudinale Studien benötigt werden, um ein klareres Verständnis zu bekommen.

4.2.4.3 Depression

Diese Arbeit fand keine Assoziation zwischen *Rep1*-Status und Depression (gemessen anhand des BDI). Hierbei wurde auf die Korrektur für Alter und Krankheitsdauer verzichtet, da die klinische Erfahrung dafür spricht, dass eine Depression eher wenig von diesen Faktoren beeinflusst wird [18]. Der Anteil an Patienten, die in dieser Arbeit stark depressive Symptome zeigten (BDI > 18 Punkte), ist mit 10,2 % mit den Prävalenzen für eine Depression bei Parkinson-Patienten vergleichbar (je nach Land 4 - 50 %) [18]. Man kann also davon ausgehen, dass die Ergebnisse der Patienten repräsentativ sind. Jedoch kann diese Ar-

beit nur über depressive *Symptome* berichten (quantifiziert durch den BDI), da ein BDI-Wert über dem cut-off allein noch keine Diagnose einer Depression darstellt.

Es soll bemerkt werden, dass in der Analyse nicht für den Antidepressiva-Status – ob Patienten Antidepressiva einnahmen oder nicht – korrigiert wurde. Das ist eine Schwäche, da ein Patient mit einer diagnostizierten Depression durchaus normale BDI-Werte aufweisen kann, wenn dieser unter medikamentöser Therapie steht. Für die vorliegende Arbeit lag keine Information über den Antidepressiva-Status vor, so ist es auch schwierig, die Stärke der Beeinflussung abzuschätzen.

Da im Moment keine publizierten Studien vorliegen, welche den Zusammenhang zwischen Depression und dem *Rep1*-Status bei Parkinson-Patienten untersuchten, kann diese Arbeit als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen gesehen werden, möglichst mit longitudinalem Studiendesign. Unter Umständen wäre das erkenntnisreich, zumal die Studie von Lenz et al. fand, dass längere *Rep1*-Allele mit schlechteren BDI-Werten bei 213 gesunden Probanden assoziiert waren [135].

4.2.4.4 L-Dopa-Äquivalenzdosis

Tendenziell wiesen Patienten mit längeren *Rep1*-Genotypen höhere L-Dopa-Äquivalenzdosen auf, wobei die Ergebnisse nicht signifikant waren. Der Grund für die Testung der L-Dopa-Dosis ist einerseits, dass sie einen recht guten Marker für den allgemeinen Zustand (motorisch und teilweise auch nicht-motorisch) des Patienten darstellt. Andererseits existieren im Moment sehr wenige Parameter anhand derer man abschätzen kann, wie schnell die Krankheit voranschreiten und wie sich der L-Dopa-Bedarf des Patienten ändern wird.

Die Querschnittsanalyse war ähnlich wie beim UPDRS für Alter und Krankheitsdauer korrigiert und mit einer Patientenzahl von über 500 recht aussagekräftig. Die Längsschnittanalyse hatte zwar eine längere Laufzeit als die weiter oben beschriebenen (bis drei Jahre), die Patientenzahl ist aber auch hier vergleichsweise gering (unter 100 Patienten).

Bislang sind aus der Literatur keine Studien bekannt, die *Rep1* und die L-Dopa-Dosis untersuchten. Es wäre aber sinnvoll, den Sachverhalt weiter zu untersuchen, da die Erkenntnisse das Potenzial bergen könnten, die Patientenberatung zu verbessern.

4.2.4.5 Beurteilung der Erkenntnisse über klinische Parameter

Insgesamt ist die Studienlage, was die Assoziation von *Rep1* mit klinischen Markern angeht, ähnlich dem Erkrankungsalter, inkonsistent. Zu den Markern, die untersucht wurden, existieren einige Studien (wie diese Arbeit), die keinen Zusammenhang fanden; andere Studien hingegen widersprechen sich das Risikoallel betreffend. Es ist denkbar, dass auch diese Analysen durch SNPs und Umweltfaktoren (zum Beispiel Rauchen und Schädel-Hirn-Traumata) beeinflusst werden, analog wie im Kapitel 4.2.3.1 zum Erkrankungsalter ausgeführt wurde. Es ist aber auch denkbar, dass die Studien durch ihre relativ geringen Teststärken und dadurch bedingten möglichen falsch positiven und negativen Ergebnissen gegensätzlich sind [129]. Schließlich wurden auch ethnische Differenzen als mögliche Ursache für variable Ergebnisse beschrieben [133]. Es gibt Hinweise dafür, dass je nach genetischer Ausstattung Lokus-Heterogenitäten im *SNCA*-Gen auftreten können [114], also in verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedliche Genveränderungen eine Rolle spielen können. Außerdem sind beträchtliche Unterschiede in den *Rep1*-Allel- und Genotyphäufigkeiten zwischen asiatischen einerseits und europäischen, nordamerikanischen und australischen Patienten andererseits bekannt. Nun weisen einige Studien eine große ethnische Heterogenität unter ihren Patienten auf (zum Beispiel Chung et al. [74] und Ritz et al. [84]).

Es ist letzten Endes ersichtlich, dass weitere und größere Studien nötig sind, welche unter Beachtung der beeinflussenden Parameter möglicherweise mehr Klarheit in die bisherige Studienlage bringen können.

4.2.5 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Arbeit

Die Entdeckung, dass bestimmte *Rep1*-Genotypen einen Risikofaktor für die sporadische Parkinson-Krankheit darstellen, ließ die Idee entstehen, *Rep1* könnte auch krankheitsmodifizierend wirken. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten hingegen darauf hin, dass *Rep1* solche Effekte nicht ausübt.

Bezüglich des Erkrankungsalters spricht das Ergebnis, vor dem aktuellen wissenschaftlichen Hintergrund dieser Thematik, tatsächlich eher gegen einen Zusammenhang mit *Rep1*. Ferner ist es auch unwahrscheinlich, dass *Rep1* mit kognitiven Defiziten oder der täglichen L-Dopa-Dosis assoziiert wäre. Ob es sich bestätigt, dass kein Zusammenhang zu einer Depression besteht, bleibt abzuwarten. Die motorischen Fähigkeiten betreffend, lässt sich durch die Literatur und die Ergebnisse dieser Studie nicht abschließend klären, wie die Rolle von *Rep1* aussieht. Es ist biologisch möglich, dass *Rep1* motorische Fertigkeiten beeinflusst; ob das aber in Wirklichkeit so ist, oder welches Allel sich im Endeffekt als Risikoallel bestätigen könnte, ist noch unklar.

Schließlich existieren viele mögliche Faktoren, die Zusammenhänge zwischen *Rep1* und krankheitsmodifizierenden Effekten beeinflussen könnten, die in dieser Arbeit diskutiert werden. Unter diesen sind Umweltfaktoren wie Rauchen und Schädel-Hirn-Traumata, die genetische Heterogenität in verschiedenen ethnischen Gruppen und SNPs, die möglicherweise *Rep1* beeinflussen oder vielleicht sogar selbst größere Effektstärke zeigen.

4.3 Ausblick

Um die Ergebnisse dieser Studie zu validieren und mehr Klarheit in die inkonsistente Studienlage zu bringen, könnten die möglichen krankheitsmodifizierenden Effekte von *Rep1* in einer größeren Kohorte untersucht werden, die einen möglichst homogenen genetischen Hintergrund hat. Für das Erkrankungsalter wäre weiterhin eine Querschnittsstudie geeignet. Für die motorischen Symptome, Demenz, Depression und Parkinson-Medikation würde sich ein longitudinales Studiendesign

anbieten, mit einem adäquaten Beobachtungszeitraum. Dabei würde es sich empfehlen, ausgewählte Risiko-SNPs vom *SNCA*-Gen zusammen mit *Rep1* zu untersuchen. Es könnten so durch Bestimmung von Kopplungsungleichgewichten und Analyse der Haplotypen mehr Informationen darüber gewonnen werden, ob und welcher der genetischen Marker Effekte ausübt. Es wäre zudem sinnvoll, wenigstens den Raucherstatus in die Analyse miteinzubeziehen.

Ferner wäre es möglich den Pathomechanismus zu ergründen, wie *Rep1* zu einem erhöhten Parkinson-Risiko führt. Man könnte einerseits nach Transkriptionsfaktoren suchen, die durch die Interaktion mit *Rep1* in der Lage wären, die alpha-Synuklein-Expression zu modulieren. Es existieren schon Vorschläge, wonach das DNA-Bindungsprotein und Transkriptionsregulator *Poly-(ADP-ribose)-polymerase 1 (PARP-1)* durch unterschiedliche *Rep1*-Längen zur variablen Expression von alpha-Synuklein führen könnte [68]. Für die weiterführende Aufklärung dieser Zusammenhänge wären zum Beispiel Zellkultur-Analysen geeignet, bei denen man Transkriptionsfaktoren isolieren, mRNA und Proteinkonzentrationen bestimmen und in denen man den *Rep1*-Status festsetzen kann. Möglicherweise könnten Erkenntnisse gewonnen werden, die auch therapeutische Konsequenzen haben würden.

Andererseits könnte man den Beitrag der Epigenetik prüfen, da kürzlich veröffentlichte Studien zeigen, dass *SNCA*-Varianten wie *Rep1* und SNPs den Methylierungsstatus von Intron 1 beeinflussen können [136, 137] und der Methylierungsstatus von Intron 1 mit der Expression von alpha-Synuklein in Verbindung gebracht wurde [138]. Es könnten sich beispielsweise Post-mortem-Analysen und Tiermodelle anschließen, die das Ausmaß der Methylierung und die Konzentration der Methylierungsenzyme in verschiedenen Gehirnregionen bestimmen könnten (zusammen mit den *SNCA*-Varianten). In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant zu untersuchen, wie Schädel-Hirn-Traumata mit *Rep1* zusammenhängen, beziehungsweise wie es zu einer Erhöhung der alpha-Synuklein-Konzentration in dessen Folge im Gehirn kommt. Auch hier könnte die Epigenetik einen Beitrag leisten, da Schädel-Hirn-Traumata weit verbreitete epige-

netische Risikofaktoren für neurodegenerative Erkrankungen und für Demenz darstellen [119]. Falls sich die Epigenetik als ein Faktor in der Pathogenese bestätigen würde, könnten zum ersten Mal Medikamente entworfen werden (zum Beispiel Methylierungshemmer), die mehr oder minder kausal in das Krankheitsgeschehen der Parkinson-Krankheit eingreifen würden. Schließlich könnten die Erkenntnisse auch dazu führen, dass Krankheitsprozesse besser verstanden werden, was die Beurteilung des individuellen Krankheitsverlaufs von Patienten möglicherweise erleichtern könnte. Dies wäre sowohl aus der Sicht der Patienten als auch der behandelnden Ärzte wünschenswert.

Letztlich könnte man mit einem ähnlichen Studiendesign wie oben beschrieben nach ähnlichen krankheitsmodifizierenden Genvarianten in anderen vielversprechenden Genen suchen (zum Beispiel in *LRRK2* oder *MAPT*).

5 Zusammenfassung

Von der Feststellung ausgehend, dass Duplikationen und Triplikationen des *SNCA*-Gens seltene, familiäre Formen der Parkinson-Krankheit verursachen können, wurde die Hypothese abgeleitet, das Risiko für die Parkinson-Krankheit könnte mit der Translationsrate von *SNCA* steigen (Dosis-Effekt). Konsequenterweise wurden Regionen des Gens untersucht, welche für dessen Expression zuständig sind, sogenannte Promotor-Regionen. Es wurde jedoch schnell klar, dass die meisten genetischen Varianten lediglich die Empfänglichkeit für die sporadische Parkinson-Krankheit erhöhen, aber nicht direkt krankheitsverursachend wirken. *Rep1*, eine Dinukleotid-Wiederholungssequenz in der Promotor-Region von *SNCA*, wurde als vielversprechende genetische Variante entdeckt, welche das Risiko, an Parkinson zu erkranken, beeinflussen kann. Es kommt in der hiesigen Bevölkerung in drei häufigen Allelen vor (kurz, mittel, lang), wobei entdeckt wurde, dass das lange Allel das Parkinson-Risiko erhöhe und das kurze Allel dieses senke. Diese Erkenntnis führte zu weiteren Untersuchungen, die prüfen sollten, ob *Rep1* auch krankheitsmodifizierende Effekte haben könnte in der Hoffnung, den Krankheitsverlauf von Patienten individualisierter beurteilen zu können. Das Ziel dieser Arbeit war es, das Wissen über diese Effekte zu erweitern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu die *Rep1*-Genotypen von 1.025 Parkinson-Patienten mithilfe der DNA-Fragmentanalyse bestimmt. Anschließend wurde im ersten Teil der Analysen geprüft, ob die einzelnen Patientengruppen verschiedener Genotypen ein unterschiedliches Erkrankungsalter aufweisen. Der zweite Teil konzentrierte sich auf die Frage, ob es Hinweise darauf gibt, dass *Rep1* auch klinische Parameter beeinflussen kann. Dazu wurden die Punktwerte von Beurteilungs- und Fragebögen zu motorischen Fähigkeiten, Gedächtnisleistung, depressive Symptomatik sowie die Parkinson-Medikation unter den Genotypen verglichen, einerseits in Querschnittsuntersuchungen, andererseits in longitudinalen Analysen.

Diese Studie fand weder im Erkrankungsalter noch in den klinischen Parametern signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen *Rep1*-Genotypen. Mit diesen

Ergebnissen konnte mehr Klarheit in die bisherige Datenlage gebracht werden in der Hinsicht, dass die überwiegende Zahl der Hinweise nun darauf hindeutet, dass *Rep1* das Erkrankungsalter nicht beeinflusst. Auch ein kognitives Defizit und die Parkinson-Medikation scheinen nicht mit *Rep1* zusammenzuhängen. Hingegen bleibt aufgrund der Inkonsistenzen in der Literatur die Rolle von *Rep1* bezüglich der motorischen Fähigkeiten und der depressiven Symptomatik ungeklärt. Hierzu werden weitere Studien mit größeren Kohorten notwendig sein, um diese Fragen zu klären. Schließlich bietet diese Arbeit mögliche Erklärungen, weshalb es oft zu widersprüchlichen Ergebnissen in Studien zu *Rep1* kommt. Einerseits könnte das *Rep1*-Assoziationssignal wegen einem hohen Kopplungsungleichgewicht möglicherweise ein SNP-Signal reflektieren und keinen unabhängigen Effekt darstellen. Andererseits wäre es möglich, dass postulierte Effekte des *Rep1*-Repeats von Umweltfaktoren modifiziert werden, für die in Studien nicht kontrolliert wurde.

6 Anhang

6.1 UPDRS III (*Unified Parkinson's Disease Rating Scale III*)

18. Sprache

- 0 = Normal.
- 1 = Leichte Abnahme von Ausdruck, Diktion und/oder Volumen.
- 2 = Monoton, verwaschen, aber verständlich; mäßig beeinträchtigt.
- 3 = Deutliche Beeinträchtigung, schwer zu verstehen.
- 4 = Unverständlich.

19. Gesichtsausdruck

- 0 = Normal.
- 1 = Minimal veränderte Mimik, ein möglicherweise normales „Pokergesicht“.
- 2 = Leichte, aber eindeutig abnorme Verminderung des Gesichtsausdruckes.
- 3 = Mäßig verminderte Mimik; Lippen zeitweise geöffnet.
- 4 = Maskenhafte oder erstarrte Fazies mit stark oder völlig fehlendem Gesichtsausdruck; Lippenstehen mind. 7mm weit auseinander.

20. Ruhetremor (Gesicht, rechte und linke, obere und untere Extremität)

- 0 = Kein Ruhetremor.
- 1 = Leicht und intermittierend vorhandener Ruhetremor.
- 2 = Persistierend mit kleiner Amplitude. Oder intermittierend auftretende, mäßige Amplitude.
- 3 = Mäßige, die meiste Zeit vorhandene Amplitude.
- 4 = Ausgeprägte, die meiste Zeit vorhandene Amplitude.

21. Aktions- oder Haltungstremor (rechte und linke Hand)

- 0 = Nicht vorhanden.
- 1 = Leichtgradig; bei Bewegung vorhanden.
- 2 = Mäßige Amplitude, bei Bewegung vorhanden.
- 3 = Mäßige Amplitude, sowohl während des Haltens als auch bei Bewegung vorhanden.
- 4 = Ausgeprägte Amplitude; behindert die Nahrungsaufnahme.

22. Rigidität (Nacken, rechte und linke, obere und untere Extremität)

Prüfung bei passiver Bewegung der großen Gelenke am sitzenden Patienten ohne Berücksichtigung des Zahnradphänomens.

- 0 = Nicht vorhanden.
- 1 = Diskrete Tonuserhöhung oder nur bei gleichzeitig spiegelbildlich durchgeführten oder anderen Bewegungen detektierbar.
- 2 = Milde bis mäßige Tonuserhöhung.
- 3 = Deutliche Tonuserhöhung, das volle Bewegungsausmaß wird leicht erreicht.
- 4 = Starker Rigor, das volle Bewegungsausmaß wird nur mühsam erreicht.

23. Finger Tapping (rechts und links)

(Patient berührt mit der ausgestreckten Zeigefingerspitze so schnell und mit so großer Amplitude wie möglich die Daumenspitze)

- 0 = Normal.
- 1 = Leichte Verlangsamung und/oder Verringerung der Amplitude
- 2 = Mäßig eingeschränkt. Deutliche frühzeitige Ermüdung. Gelegentlich können Bewegungspausen auftreten.
- 3 = Stark eingeschränkt. Häufige Starthemmungen oder plötzliche Pausen während des Bewegungsablaufs.
- 4 = Patient kann die Aufgabe nicht ausführen.

24. Handbewegungen (recht und linke Hand)

(Patient öffnet und schließt die Hände in schneller Folge und mit größtmöglicher Amplitude)

- 0 = Normal.
- 1 = Leichte Verlangsamung und/oder Verringerung der Amplitude.
- 2 = Mäßig eingeschränkt. Deutliche und frühzeitige Ermüdung. Gelegentlich können Bewegungspausen auftreten.
- 3 = Stark eingeschränkt. Häufige Starthemmungen oder plötzliche Pausen während des Bewegungsablaufs.
- 4 = Patient kann die Aufgabe kaum ausführen.

25. Schnelle, wechselnde Handbewegungen (rechts und links)

(Patient wechselt in vertikaler oder horizontaler Richtung mit größtmöglicher Amplitude und Geschwindigkeit zwischen Pronation und Supination)

- 0 = Normal.
- 1 = Leichte Verlangsamung und/oder Verringerung der Amplitude.
- 2 = Mäßig eingeschränkt. Deutliche und frühzeitige Ermüdung. Gelegentlich können Bewegungspausen auftreten.
- 3 = Stark eingeschränkt. Häufige Starthemmungen oder plötzliche Pausen während des Bewegungsablaufs.
- 4 = Patient kann die Aufgabe kaum ausführen.

26. Agilität der Beine (rechts und links)

- 0 = Normal.
- 1 = Leichte Verlangsamung und/oder Verringerung der Amplitude.
- 2 = Mäßig eingeschränkt. Deutliche und frühzeitige Ermüdung. Gelegentlich können Bewegungspausen auftreten.
- 3 = Stark eingeschränkt. Häufige Starthemmungen oder plötzliche Pausen während des Bewegungsablaufs.
- 4 = Patient kann die Aufgabe kaum ausführen.

27. Aufstehen vom Stuhl

(Patient versucht, aus dem Sitz auf einem Stuhl mit aufrechter Rückenlehne mit vor der Brust verschränkten Armen aufzustehen.)

- 0 = Normal.
- 1 = Langsam; oder benötigt möglicherweise mehr als einen Versuch.

- 2 = Drückt sich an den Armlehnen nach oben.
- 3 = Tendiert, zurückzufallen und benötigt möglicherweise mehrere Versuche, kann jedoch ohne Hilfe aufstehen.
- 4 = Patient kann ohne Hilfe nicht aufstehen.

28. Haltung

- 0 = Normal aufrechte Haltung.
- 1 = Nicht ganz aufrechte, leicht vorgebeugte Haltung; könnte bei älteren Menschen normal sein.
- 2 = Mäßig vorgebeugte Haltung; eindeutig abnorm, ist möglicherweise leicht zur Seite geneigt.
- 3 = Stark vorgebeugte Haltung mit Kyphose; ist möglicherweise mäßig zur Seite geneigt.
- 4 = Schwer vornüber gebeugte Haltung extrem unnatürlichen Ausmaßes.

29. Gang

- 0 = Normaler Gang
- 1 = Geht langsam, möglicherweise mit kurzen, schlüpfenden Schritten, keine Festination oder Propulsion.
- 2 = Gehen mit Schwierigkeiten möglich, benötigt jedoch wenig oder keine Hilfe; eventuell leichte Festinationen, kurze Schritte oder Propulsion.
- 3 = Schwere Gangstörung, benötigt Hilfe.
- 4 = Patient kann auch mit Hilfe nicht gehen.

30. Posturale Stabilität

(Patient steht mit geöffneten Augen und leicht auseinander stehenden Füßen gerade vor dem Untersuchenden, ist auf die Testung vorbereitet; Reaktion auf plötzliche Schwerpunktverlagerung durch einen beidseitig kurzen, kräftigen Zug nach hinten an den Schultern des Patienten.)

- 0 = Normal.
- 1 = Retropulsion, Patient erlangt das Gleichgewicht ohne Hilfe wieder.
- 2 = Keine Haltungsreaktion vorhanden; Patient würde fallen, wenn er vom Untersuchenden nicht aufgefangen würde.
- 3 = Sehr instabil; neigt dazu, auch spontan das Gleichgewicht zu verlieren.
- 4 = Patient kann ohne Unterstützung nicht stehen.

31. Allgemeine Bradykinesie und Hypokinesie

(Gesamteindruck aus Langsamkeit, Zögern, verminderten Mitbewegungen der Arme, geringe Bewegungsamplitude und allgemeine Bewegungsarmut)

- 0 = Keine.
- 1 = Minimale Verlangsamung, Bewegungskführung wirkt bedächtig; könnte bei manchen Menschen normal sein. Möglicherweise geringeres Amplitudenausmaß.
- 2 = Leichte Verlangsamung und Bewegungsarmut, die eindeutig abnorm sind; oder Abnahme des Bewegungsausmaßes (Amplitude).
- 3 = Mäßige Verlangsamung, Bewegungsarmut oder nur noch kleine Bewegungsamplitude.

4 = Ausgeprägte Verlangsamung, Bewegungsarmut oder deutlich kleinere Bewegungsamplitude.

6.2 Beck-Depressions-Inventar (BDI)

Aus Beck et al. 1974 [139], deutsche Ausgabe: Hautzinger et al. 1994 [140]

- A [0] Ich bin nicht traurig.
[1] Ich bin traurig.
[2] Ich bin die ganze Zeit traurig und komme nicht davon los.
[3] Ich bin so traurig oder unglücklich, daß ich es kaum noch ertrage.
- B [0] Ich sehe nicht besonders mutlos in die Zukunft.
[1] Ich sehe mutlos in die Zukunft
[2] Ich habe nichts, worauf ich mich freuen kann.
[3] Ich habe das Gefühl, daß die Zukunft hoffnungslos ist, und daß die Situation nicht besser werden kann.
- C [0] Ich fühle mich nicht als Versager.
[1] Ich habe das Gefühl, öfter versagt zu haben als der Durchschnitt.
[2] Wenn ich auf mein Leben zurückblicke, sehe ich bloß eine Menge Fehlschläge.
[3] Ich habe das Gefühl, als Mensch ein völliger Versager zu sein.
- D [0] Ich kann die Dinge genauso genießen wie früher.
[1] Ich kann die Dinge nicht mehr so genießen wie früher
[2] Ich kann aus nichts mehr eine echte Befriedigung ziehen.
[3] Ich bin mit allem unzufrieden oder gelangweilt.
- E [0] Ich habe keine Schuldgefühle.
[1] Ich habe häufig Schuldgefühle.
[2] Ich habe fast immer Schuldgefühle.
[3] Ich habe immer Schuldgefühle.
- F [0] Ich habe nicht das Gefühl, gestraft zu sein.
[1] Ich habe das Gefühl, vielleicht bestraft zu werden.
[2] Ich erwarte, bestraft zu werden.
[3] Ich habe das Gefühl, bestraft zu sein.
- G [0] Ich bin nicht von mir enttäuscht.
[1] Ich bin von mir enttäuscht.
[2] Ich finde mich fürchterlich.
[3] Ich hasse mich.

- H [0] Ich habe nicht das Gefühl, schlechter zu sein als alle anderen.
[1] Ich kritisiere mich wegen kleiner Fehler und Schwächen.
[2] Ich mache mir die ganze Zeit Vorwürfe wegen meiner Mängel.
[3] Ich gebe mit für alles die Schuld, was schiefgeht.
- I [0] Ich denke nicht daran, mir etwas anzutun.
[1] Ich denke manchmal an Selbstmord, aber ich würde es nicht tun.
[2] Ich möchte mich am liebsten umbringen.
[3] Ich würde mich umbringen, wenn ich die Gelegenheit dazu hätte.
- J [0] Ich weine nicht öfter als früher.
[1] Ich weine jetzt mehr als früher.
[2] Ich weine jetzt die ganze Zeit.
[3] Früher konnte ich weinen, aber jetzt kann ich es nicht mehr, obwohl ich es möchte.
- K [0] Ich bin nicht reizbarer als sonst.
[1] Ich bin jetzt leichter verärgert oder gereizt als früher.
[2] Ich fühle mich dauernd gereizt.
[3] Die Dinge, die mich früher geärgert haben, berühren mich jetzt nicht mehr.
- L [0] Ich habe nicht das Interesse an Menschen verloren.
[1] Ich interessiere mich jetzt weniger für Menschen als früher.
[2] Ich habe mein Interessen an anderen Menschen zum größten Teil verloren.
[3] Ich habe mein ganzes Interesse an anderen Menschen verloren.
- M [0] Ich bin so entschlußfreudig wie immer.
[1] Ich schiebe Entscheidungen jetzt öfter als früher auf.
[2] Es fällt mir jetzt schwerer als früher, Entscheidungen zu treffen.
[3] Ich kann überhaupt keine Entscheidungen mehr treffen.
- N [0] Ich habe nicht das Gefühl, schlechter auszusehen als früher.
[1] Ich mache mir Sorgen, daß ich alt oder unattraktiv aussehe.
[2] Ich habe das Gefühl, daß Veränderungen in meinem Aussehen auftreten, die mich häßlich machen.
[3] Ich finde mich häßlich.
- O [0] Ich kann so gut arbeiten wie früher.
[1] Ich muß mir einen Ruck geben, bevor ich eine Tätigkeit in Angriff nehme.

- [2] Ich muß mich zu jeder Tätigkeit zwingen.
[3] Ich bin unfähig zu arbeiten.
- P [0] Ich schlafe so gut wie sonst.
[1] Ich schlafe nicht mehr so gut wie früher.
[2] Ich wache 1 bis 2 Stunden früher auf als sonst, und es fällt mir schwer, wieder einzuschlafen.
[3] Ich wache mehrere Stunden früher auf als sonst und kann nicht mehr einschlafen.
- Q [0] Ich ermüde nicht stärker als sonst.
[1] Ich ermüde schneller als früher.
[2] Fast alles ermüdet mich.
[3] Ich bin zu müde, um etwas zu tun.
- R [0] Mein Appetit ist nicht schlechter als sonst.
[1] Mein Appetit ist nicht mehr so gut wie früher.
[2] Mein Appetit hat stark nachgelassen.
[3] Ich habe überhaupt keinen Appetit mehr.
- S [0] Ich habe in der letzten Zeit kaum abgenommen.
[1] Ich habe mehr als 2 Kilo abgenommen.
[2] Ich habe mehr als 5 Kilo abgenommen.
[3] Ich habe mehr als 8 Kilo abgenommen.
Ich esse absichtlich weniger, um abzunehmen: Ja ____Nein ____
- T [0] Ich mache mir keine größeren Sorgen um meine Gesundheit als sonst.
[1] Ich mache mir Sorgen um körperliche Probleme, wie Schmerzen, Magenbeschwerden oder Verstopfung.
[2] Ich mache mir so große Sorgen um gesundheitliche Probleme, daß es mir schwerfällt, an etwas anderes zu denken.
[3] Ich mache mir so große Sorgen um gesundheitliche Probleme, daß ich an nichts anderes mehr denken kann.
- U [0] Ich habe in der letzten Zeit keine Veränderungen meines Interesses an Sex bemerkt.
[1] Ich interessiere mich weniger für Sex als früher.
[2] Ich interessiere mich jetzt viel weniger für Sex.
[3] Ich habe das Interesse an Sex völlig verloren.

6.3 Mini-Mental-Status-Test (MMST)

Aus Folsein et al. 1975 [141]

- | | | |
|-----|--|------|
| 1. | Was für ein Datum ist heute? | 1 P. |
| 2. | Welche Jahreszeit? | 1 P. |
| 3. | Welches Jahr haben wir? | 1 P. |
| 4. | Welcher Wochentag ist heute? | 1 P. |
| 5. | Welcher Monat? | 1 P. |
| 6. | Wo sind wir jetzt? welches Bundesland? | 1 P. |
| 7. | welcher Landkreis/welche Stadt? | 1 P. |
| 8. | welche Stadt/welcher Stadtteil? | 1 P. |
| 9. | welches Krankenhaus? | 1 P. |
| 10. | welche Station/welches Stockwerk? | 1 P. |
| 11. | Bitte merken Sie sich: Apfel | 1 P. |
| 12. | Pfennig | 1 P. |
| 13. | Tisch | 1 P. |

Anzahl der Versuche: (max. 5)

Ziehen Sie von 100 jeweils 7 ab und buchstabieren Sie
Stuhl rückwärts (die höhere der beiden Wertungen zählt).

- | | | | |
|-----|----|---|------|
| 14. | 93 | L | 1 P. |
| 15. | 86 | H | 1 P. |
| 16. | 79 | U | 1 P. |
| 17. | 72 | T | 1 P. |
| 18. | 65 | S | 1 P. |

Was waren die Dinge, die Sie sich vorher gemerkt haben ?

- | | | |
|-----|---------|------|
| 19. | Apfel | 1 P. |
| 20. | Pfennig | 1 P. |
| 21. | Tisch | 1 P. |

- | | | | |
|-----|---|--------------------------|------|
| 22. | Was ist das? | Uhr | 1 P. |
| 23. | | Bleistift/Kugelschreiber | 1 P. |
| 24. | Sprechen Sie bitte nach: "Kein wenn und oder aber." | | 1 P. |

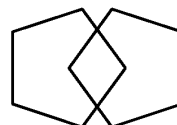
Machen Sie bitte folgendes:

- | | | |
|-----|---|------|
| 25. | Nehmen Sie bitte das Blatt in die Hand, | 1 P. |
| 26. | Falten Sie es in der Mitte und | 1 P. |
| 27. | Lassen Sie es auf den Boden fallen | 1 P. |

- | | | |
|-----|--|------|
| 28. | Lesen Sie und machen Sie es bitte ("Augen zu !") | 1 P. |
|-----|--|------|

- | | | |
|-----|--|------|
| 29. | Schreiben Sie bitte einen Satz
(mind. Subjekt und Prädikat) | 1 P. |
|-----|--|------|

- | | | |
|-----|---|------|
| 30. | Kopieren Sie bitte die Zeichnung
(zwei Fünfecke) | 1 P. |
|-----|---|------|



6.4 Montreal Cognitive Assessment (MoCA)

Aus Nasreddine et al. 2005 [96]

NAME : _____
 Ausbildung : _____
 Geschlecht : _____
 Geburtsdatum : _____
 DATUM : _____

VISUOSPATIAL / EXEKUTIV							PUNKTE
<p style="text-align: center;">[]</p>	<p style="text-align: center;">Würfel nach- zeichnen</p>	Eine Uhr zeichnen (Zehn nach elf) (3 Punkte)					
<input type="checkbox"/> Kontur <input type="checkbox"/> Zahlen <input type="checkbox"/> Zeiger							___/5
BENENNEN							
<p style="text-align: center;">[]</p>	<p style="text-align: center;">[]</p>	<p style="text-align: center;">[]</p>					___/3
GEDÄCHTNIS							
Wortliste vorlesen, wiederholen lassen. 2 Durchgänge. Nach 5 Minuten überprüfen (s.u.)		GESICHT	SAMT	KIRCHE	TULPE	ROT	Keine Punkte
		1. Versuch					
		2. Versuch					
AUFMERKSAMKEIT							
Zahlenliste vorlesen (1 Zahl/ Sek.)			In der vorgegebenen Reihenfolge wiederholen [] 2 1 8 5 4 Rückwärts wiederholen [] 7 4 2				___/2
Buchstabenliste vorlesen (1 Buchst./Sek.). Patient soll bei jedem Buchstaben „A“ mit der Hand klopfen. Keine Punkte bei 2 oder mehr Fehlern			[] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B				___/1
Fortlaufendes Abziehen von 7, mit 100 anfangen [] 93		[] 86	[] 79	[] 72	[] 65		___/3
4 oder 5 korrekte Ergebnisse: 3 P., 2 oder 3 korrekt: 2 P., 1 korrekt: 1 P., 0 korrekt: 0 P.							
SPRACHE							
Wiederholen: „Ich weiß lediglich, dass Hans heute an der Reihe ist zu helfen.“ [] „Die Katze versteckte sich immer unter der Couch, wenn die Hunde im Zimmer waren.“ []			___/2				
Möglichst viele Wörter in einer Minute benennen, die mit dem Buchstaben F beginnen [] _____ (N ≥ 11 Wörter)			___/1				
ABSTRAKTION							
Gemeinsamkeit von z.B. Banane und Apfelsine = Frucht [] Eisenbahn - Fahrrad [] Uhr - Lineal			___/2				
ERINNERUNG							
	Worte erinnern OHNE HINWEIS	GESICHT	SAMT	KIRCHE	TULPE	ROT	___/5
		[]	[]	[]	[]	[]	Punkte nur bei richtigem Nennen OHNE Hinweis
Optional	Hinweis zu Kategorie						
	Mehrfachauswahl						
ORIENTIERUNG							
	[] Datum	[] Monat	[] Jahr	[] Wochentag	[] Ort	[] Stadt	___/6
© Z Nasreddine MD Version 7. Nov. 2004 deutsche Übersetzung: SM Bartusch, SG Zipper							
Normal ≥ 26 / 30							
www.mocatest.org Untersucher: _____							
TOTAL _____/30 + 1 Punkt wenn ≤ 12 Jahre Ausbildung							

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des <i>SNCA</i> -Gens mit <i>Rep1</i> in der Promotorregion	26
Abbildung 2: DNA-Strang mit angelagertem Forward-Primer, der eine Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende aufweist.....	32
Abbildung 3: Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit DNA-Leiter und Negativkontrolle	40
Abbildung 4: Fragmentanalyse einer homozygoten Probe mit zwei 267bp- Allelen	43
Abbildung 5: Fragmentanalyse einer heterozygoten Probe mit einem 265bp- Allel und einem 269bp-Allel	44
Abbildung 6: Alter bei Erkrankungsbeginn in der Gesamtkohorte (ohne Mutationsträger).....	51
Abbildung 7: Alter bei Erkrankungsbeginn unter den Mutationsträgern	51
Abbildung 8: Mittelwerte des Erkrankungsalters mit 95 % Konfidenzintervallen (CI) für die Gesamtkohorte ohne Mutationsträger, verteilt auf die Genotyp-Gruppen mit 265, 267 und 269 Basenpaaren.....	58
Abbildung 9: Mittelwerte der L-Dopa-Äquivalenzdosen mit 95 % Konfidenzintervallen (CI), verteilt auf die Genotyp-Gruppen mit 265, 267 und 269 Basenpaaren	69
Abbildung 10: Schematische Darstellung des <i>SNCA</i> -Gens und die Struktur des Kopplungsungleichgewichts.....	84

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der monogenetischen Parkinson-Loci, modifiziert nach [5, 19, 24, 29].....	21
Tabelle 2: Studienkollektiv mit PD, aufgeteilt nach bekannten Mutationen	28
Tabelle 3: Die verwendeten SNPs mit den offiziell registrierten Identifizierungsnummern	29
Tabelle 4: Quellen, aus denen klinische Daten für die vorliegende Studie bezogen wurden	29
Tabelle 5: Sequenz der <i>NACP-Rep1</i> (<i>SNCA-Rep1</i>) Primer (accession no. U46895).....	32
Tabelle 6: Reaktionsansatz der PCR	37
Tabelle 7: Temperaturschema der PCR.....	37
Tabelle 8: Reaktionsansatz DNA-Fragmentanalyse	42
Tabelle 9: Zusammenfassung der Patientendaten aufgeteilt nach Kohorten 1 und 2 sowie nach Mutationsträgern.....	50
Tabelle 10: Zusammenfassung der klinischen Daten des Studienkollektivs (Gesamtkohorte ohne Mutationsträger).....	53
Tabelle 11: Zusammenfassung der Allelfrequenzen	54
Tabelle 12: Zusammenfassung der Genotyphäufigkeiten	55
Tabelle 13: Erkrankungsalter beim 269bp-Genotyp, verglichen mit den übrigen Genotypen	56
Tabelle 14: Erkrankungsalter beim 265bp-Genotyp, verglichen mit den übrigen Genotypen	57
Tabelle 15: Vergleich der Häufigkeiten der <i>Rep1</i> -Genotypen bei Mutationsträgern und der Gesamtkohorte mittels Chi-Quadrat-Test.....	59
Tabelle 16: p-Werte: Vergleich des Erkrankungsalters zwischen den <i>Rep1</i> -Genotypen, korrigiert für SNPs (Gesamtkohorte ohne Mutationsträger).....	60

Tabelle 17: Kovarianzanalyse von UPDRS III-Werten der <i>Rep1</i> -Genotypen, korrigiert für Krankheitsdauer und Alter	62
Tabelle 18: Vergleich von UPDRS-Werten (MDS-UPDRS III) der <i>Rep1</i> -Genotypen zum Zeitpunkt Null und nach einem Jahr.....	63
Tabelle 19: Kovarianzanalyse von MMST-Werten der <i>Rep1</i> -Genotypen, korrigiert für Krankheitsdauer und Alter	64
Tabelle 20: Kovarianzanalyse von MoCA-Werten der <i>Rep1</i> -Genotypen, korrigiert für Krankheitsdauer und Alter	65
Tabelle 21: Vergleich von MMST-Werten der <i>Rep1</i> -Genotypen zum Zeitpunkt Null und nach einem Jahr	66
Tabelle 22: Vergleich von BDI-Mittelwerten zwischen den <i>Rep1</i> -Genotyp-Gruppen.....	67
Tabelle 23: Vergleich der Patientenhäufigkeiten mit und ohne Hinweis auf eine klinisch relevante Depression unter den <i>Rep1</i> -Genotypen mittels Chi-Quadrat-Test.....	67
Tabelle 24: Kovarianzanalyse von L-Dopa-Äquivalenzdosen der <i>Rep1</i> -Genotypen, korrigiert für Krankheitsdauer und Alter	68
Tabelle 25: Vergleich von L-Dopa-Äquivalenzdosen zwischen 269bp-Genotyp und allen anderen mit Laufzeiten zwischen einem und drei Jahren zwischen Erst- und Nachfolgeerhebung	71
Tabelle 26: Vergleich von L-Dopa-Äquivalenzdosen zwischen 265bp-Genotyp und allen anderen mit Laufzeiten zwischen einem und drei Jahren zwischen Erst- und Nachfolgeerhebung	72
Tabelle 27: Allelfrequenzen von <i>Rep1</i> bei Parkinson-Patienten in der Literatur	78
Tabelle 28: Genotyphäufigkeiten von <i>Rep1</i> bei Parkinson-Patienten in der Literatur.....	79
Tabelle 29: Studienlage zur Assoziation von <i>Rep1</i> mit dem Erkrankungsalter	82

9 Literaturverzeichnis

1. Dexter DT and Jenner P. *Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms*. Free Radic Biol Med, 2013. **62**: p. 132-144.
2. Parkinson J. *An Essay on the Shaking Palsy*. 1817, London: Sherwood, Neely and Jones.
3. Lees AJ, Hardy J, Revesz T. *Parkinson's disease*. Lancet, 2009. **373**(9680): p. 2055-2066.
4. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. *Parkinson's disease*. The Lancet, 2004. **363**(9423): p. 1783-1793.
5. Gasser T. *Update on the genetics of Parkinson's disease*. Mov Disord, 2007. **22 Suppl 17**: p. S343-350.
6. Gerlach M, Reichmann H, Riederer P. *Die Parkinson-Krankheit*. 4 ed. 2007, Wien: Springer-Verlag.
7. de Lau LML and Breteler MMB. *Epidemiology of Parkinson's disease*. The Lancet Neurology, 2006. **5**(6): p. 525-535.
8. Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, et al. *Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity*. Am J Epidemiol, 2003. **157**(11): p. 1015-1022.
9. DeLong MR and Wichmann T. *Circuits and circuit disorders of the basal ganglia*. Arch Neurol, 2007. **64**(1): p. 20-24.
10. Braak H and Del Tredici K. *Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease*. Neurology, 2008. **70**(20): p. 1916-1925.
11. Braak H, Del Tredici K, Rub U, et al. *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
12. Davie CA. *A review of Parkinson's disease*. Br Med Bull, 2008. **86**: p. 109-127.
13. Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, et al. *Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease*. Brain, 2001. **124**(Pt 11): p. 2131-2146.
14. Jankovic J. *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008. **79**(4): p. 368-376.
15. Ponsen MM, Stoffers D, Booij J, et al. *Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2004. **56**(2): p. 173-181.
16. Berardelli A, Wenning GK, Antonini A, et al. *EFNS/MDS-ES/ENS [corrected] recommendations for the diagnosis of Parkinson's disease*. Eur J Neurol, 2013. **20**(1): p. 16-34.
17. Jost WH. *Autonomic dysfunctions in idiopathic Parkinson's disease*. J Neurol, 2003. **250 Suppl 1**: p. I28-30.
18. McDonald WM, Richard IH, DeLong MR. *Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease*. Biol Psychiatry, 2003. **54**(3): p. 363-375.
19. Gasser T. *Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression*. The Application of Clinical Genetics, 2011: p. 67.

20. Pahwa R and Lyons KE. *Early diagnosis of Parkinson's disease: recommendations from diagnostic clinical guidelines*. Am J Manag Care, 2010. **16 Suppl Implications**: p. S94-99.
21. Ferreira JJ, Katzenschlager R, Bloem BR, et al. *Summary of the recommendations of the EFNS/MDS-ES review on therapeutic management of Parkinson's disease*. Eur J Neurol, 2013. **20**(1): p. 5-15.
22. Connolly BS and Lang AE. *Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review*. JAMA, 2014. **311**(16): p. 1670-1683.
23. Farrer MJ. *Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(4): p. 306-318.
24. Gasser T. *Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies*. Expert Rev Mol Med, 2009. **11**: p. e22.
25. Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, et al. *Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease*. Nat Genet, 2014. **46**(9): p. 989-993.
26. Simon-Sanchez J, Schulte C, Bras JM, et al. *Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease*. Nat Genet, 2009. **41**(12): p. 1308-1312.
27. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, et al. *Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease*. Nat Genet, 2009. **41**(12): p. 1303-1307.
28. Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, et al. *Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies*. Lancet, 2011. **377**(9766): p. 641-649.
29. Houlden H and Singleton AB. *The genetics and neuropathology of Parkinson's disease*. Acta Neuropathol, 2012. **124**(3): p. 325-338.
30. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2045-2047.
31. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, et al. *Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23*. Science, 1996. **274**(5290): p. 1197-1199.
32. Touchman JW, Dehejia A, Chiba-Falek O, et al. *Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element*. Genome Res, 2001. **11**(1): p. 78-86.
33. Jensen PH, Nielsen MS, Jakes R, et al. *Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26292-26294.
34. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. *Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal*. J Neurosci, 1988. **8**(8): p. 2804-2815.
35. Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, et al. *Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein*. J Neurosci, 2002. **22**(20): p. 8797-8807.

36. Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, et al. *Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system.* Neuron, 2000. **25**(1): p. 239-252.
37. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, et al. *The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target.* Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(1): p. 38-48.
38. Stefanis L. *alpha-Synuclein in Parkinson's disease.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(2): p. a009399.
39. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al. *Alpha-synuclein in Lewy bodies.* Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-840.
40. Kruger R, Kuhn W, Muller T, et al. *Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease.* Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 106-108.
41. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, et al. *The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia.* Ann Neurol, 2004. **55**(2): p. 164-173.
42. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. *Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease.* Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1318-1320.
43. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, et al. *Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease.* Lancet, 2004. **364**(9440): p. 1167-1169.
44. Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, et al. *Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease.* Lancet, 2004. **364**(9440): p. 1169-1171.
45. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. *alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease.* Science, 2003. **302**(5646): p. 841.
46. Farrer M, Kachergus J, Forno L, et al. *Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications.* Ann Neurol, 2004. **55**(2): p. 174-179.
47. Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, et al. *Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism.* Ann Neurol, 2008. **63**(6): p. 743-750.
48. Jaleel M, Nichols RJ, Deak M, et al. *LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity.* Biochem J, 2007. **405**(2): p. 307-317.
49. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, et al. *Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study.* Lancet Neurol, 2008. **7**(7): p. 583-590.
50. West AB, Moore DJ, Biskup S, et al. *Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(46): p. 16842-16847.
51. Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, et al. *LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews.* N Engl J Med, 2006. **354**(4): p. 424-425.

52. Lesage S, Durr A, Tazir M, et al. *LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs*. N Engl J Med, 2006. **354**(4): p. 422-423.
53. Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al. *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 302-305.
54. Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, et al. *Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(6): p. 883-895.
55. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, et al. *Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease*. Autophagy, 2009. **5**(5): p. 706-708.
56. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, et al. *Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene*. N Engl J Med, 2000. **342**(21): p. 1560-1567.
57. Periquet M, Latouche M, Lohmann E, et al. *Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism*. Brain, 2003. **126**(Pt 6): p. 1271-1278.
58. Mori H, Kondo T, Yokochi M, et al. *Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q*. Neurology, 1998. **51**(3): p. 890-892.
59. Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, et al. *DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism*. Neurol Sci, 2003. **24**(3): p. 159-160.
60. Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, et al. *Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(4): p. 895-900.
61. Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, et al. *PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease*. Brain, 2006. **129**(Pt 7): p. 1720-1731.
62. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. *Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1*. Science, 2004. **304**(5674): p. 1158-1160.
63. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, et al. *The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 9103-9108.
64. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, et al. *Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA)*. Hum Mutat, 2008. **29**(5): p. 567-583.
65. Velayati A, Yu WH, Sidransky E. *The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2010. **10**(3): p. 190-198.
66. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, et al. *Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2009. **361**(17): p. 1651-1661.
67. Xia Y, Rohan de Silva HA, Rosi BL, et al. *Genetic studies in Alzheimer's disease with an NACP/alpha-synuclein polymorphism*. Ann Neurol, 1996. **40**(2): p. 207-215.

68. Chiba-Falek O, Kowalak JA, Smulson ME, et al. *Regulation of alpha-synuclein expression by poly (ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1) binding to the NACP-Rep1 polymorphic site upstream of the SNCA gene.* Am J Hum Genet, 2005. **76**(3): p. 478-492.
69. Chiba-Falek O and Nussbaum RL. *Effect of allelic variation at the NACP-Rep1 repeat upstream of the alpha-synuclein gene (SNCA) on transcription in a cell culture luciferase reporter system.* Hum Mol Genet, 2001. **10**(26): p. 3101-3109.
70. Chiba-Falek O, Touchman JW, Nussbaum RL. *Functional analysis of intra-allelic variation at NACP-Rep1 in the alpha-synuclein gene.* Hum Genet, 2003. **113**(5): p. 426-431.
71. Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, et al. *Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease.* JAMA, 2006. **296**(6): p. 661-670.
72. Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, et al. *Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain.* Faseb j, 2008. **22**(5): p. 1327-1334.
73. Linnertz C, Saucier L, Ge D, et al. *Genetic regulation of alpha-synuclein mRNA expression in various human brain tissues.* PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7480.
74. Chung SJ, Biernacka JM, Armasu SM, et al. *Alpha-synuclein repeat variants and survival in Parkinson's disease.* Mov Disord, 2014.
75. Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, Gourbali V, et al. *Association of alpha-synuclein Rep1 polymorphism and Parkinson's disease: influence of Rep1 on age at onset.* Mov Disord, 2006. **21**(4): p. 534-539.
76. Kay DM, Factor SA, Samii A, et al. *Genetic association between alpha-synuclein and idiopathic Parkinson's disease.* Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2008. **147b**(7): p. 1222-1230.
77. Pankratz N, Nichols WC, Elsaesser VE, et al. *Alpha-synuclein and familial Parkinson's disease.* Mov Disord, 2009. **24**(8): p. 1125-1131.
78. Rajput A, Vilarino-Guell C, Rajput ML, et al. *Alpha-synuclein polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Saskatchewan population.* Mov Disord, 2009. **24**(16): p. 2411-2414.
79. Kruger R, Vieira-Saecker AM, Kuhn W, et al. *Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype.* Ann Neurol, 1999. **45**(5): p. 611-617.
80. Pals P, Lincoln S, Manning J, et al. *alpha-Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease.* Ann Neurol, 2004. **56**(4): p. 591-595.
81. Ross OA, Gosal D, Stone JT, et al. *Familial genes in sporadic disease: common variants of alpha-synuclein gene associate with Parkinson's disease.* Mech Ageing Dev, 2007. **128**(5-6): p. 378-382.
82. Tan EK, Matsuura T, Nagamitsu S, et al. *Polymorphism of NACP-Rep1 in Parkinson's disease: an etiologic link with essential tremor?* Neurology, 2000. **54**(5): p. 1195-1198.

83. Tan EK, Tan C, Shen H, et al. *Alpha synuclein promoter and risk of Parkinson's disease: microsatellite and allelic size variability*. *Neurosci Lett*, 2003. **336**(1): p. 70-72.
84. Ritz B, Rhodes SL, Bordelon Y, et al. *alpha-Synuclein genetic variants predict faster motor symptom progression in idiopathic Parkinson disease*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e36199.
85. Brockmann K, Schulte C, Hauser AK, et al. *SNCA: Major genetic modifier of age at onset of Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2013.
86. Mata IF, Shi M, Agarwal P, et al. *SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level*. *Arch Neurol*, 2010. **67**(11): p. 1350-1356.
87. Farrer M, Maraganore DM, Lockhart P, et al. *alpha-Synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease*. *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(17): p. 1847-1851.
88. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. *Am J Hum Genet*, 2007. **81**(3): p. 559-575.
89. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. *The human genome browser at UCSC*. *Genome Res*, 2002. **12**(6): p. 996-1006.
90. Blake RD and Delcourt SG. *Thermodynamic effects of formamide on DNA stability*. *Nucleic Acids Res*, 1996. **24**(11): p. 2095-2103.
91. Hauge XY and Litt M. *A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR*. *Hum Mol Genet*, 1993. **2**(4): p. 411-415.
92. Lai Y and Sun F. *The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units*. *Mol Biol Evol*, 2003. **20**(12): p. 2123-2131.
93. Murray V, Monchawin C, England PR. *The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR*. *Nucleic Acids Res*, 1993. **21**(10): p. 2395-2398.
94. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, et al. *Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results*. *Mov Disord*, 2008. **23**(15): p. 2129-2170.
95. Tombaugh TN and McIntyre NJ. *The mini-mental state examination: a comprehensive review*. *J Am Geriatr Soc*, 1992. **40**(9): p. 922-935.
96. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, et al. *The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment*. *J Am Geriatr Soc*, 2005. **53**(4): p. 695-699.
97. Hautzinger M, Bailer M, Worall H, et al. *Beck-Depressions-Inventar (BDI). Bearbeitung der deutschen Ausgabe. Testhandbuch*. 2 ed. 1994, Bern: Verlag Hans Huber
98. Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, et al. *Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2010. **25**(15): p. 2649-2653.

99. Balding DJ. *A tutorial on statistical methods for population association studies*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(10): p. 781-791.
100. Ott J. *Association of genetic loci: Replication or not, that is the question*. Neurology, 2004. **63**(6): p. 955-958.
101. Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, et al. *The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service*. Brain, 2002. **125**(Pt 4): p. 861-870.
102. *DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis*. 2012, Applied Biosystems by Life Technologies.
103. Fearnley JM and Lees AJ. *Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity*. Brain, 1991. **114 (Pt 5)**: p. 2283-2301.
104. Khan N, Graham E, Dixon P, et al. *Parkinson's disease is not associated with the combined alpha-synuclein/apolipoprotein E susceptibility genotype*. Ann Neurol, 2001. **49**(5): p. 665-668.
105. Mellick GD, Maraganore DM, Silburn PA. *Australian data and meta-analysis lend support for alpha-synuclein (NACP-Rep1) as a risk factor for Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 2005. **375**(2): p. 112-116.
106. Mizuta I, Nishimura M, Mizuta E, et al. *Meta-analysis of alpha synuclein/NACP polymorphism in Parkinson's disease in Japan*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002. **73**(3): p. 350.
107. Oczkowska A, Kozubski W, Lianeri M, et al. *Mutations in PRKN and SNCA Genes Important for the Progress of Parkinson's Disease*. Curr Genomics, 2013. **14**(8): p. 502-517.
108. Parsian AJ, Racette BA, Zhao JH, et al. *Association of alpha-synuclein gene haplotypes with Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2007. **13**(6): p. 343-347.
109. Tan EK, Chai A, Teo YY, et al. *Alpha-synuclein haplotypes implicated in risk of Parkinson's disease*. Neurology, 2004. **62**(1): p. 128-131.
110. Izumi Y, Morino H, Oda M, et al. *Genetic studies in Parkinson's disease with an alpha-synuclein/NACP gene polymorphism in Japan*. Neurosci Lett, 2001. **300**(2): p. 125-127.
111. Parsian A, Racette B, Zhang ZH, et al. *Mutation, sequence analysis, and association studies of alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Neurology, 1998. **51**(6): p. 1757-1759.
112. Spadafora P, Annesi G, Pasqua AA, et al. *NACP-REP1 polymorphism is not involved in Parkinson's disease: a case-control study in a population sample from southern Italy*. Neurosci Lett, 2003. **351**(2): p. 75-78.
113. Trotta L, Guella I, Solda G, et al. *SNCA and MAPT genes: Independent and joint effects in Parkinson disease in the Italian population*. Parkinsonism Relat Disord, 2012. **18**(3): p. 257-262.
114. Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, et al. *Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2005. **57**(4): p. 535-541.
115. Myhre R, Toft M, Kachergus J, et al. *Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population*. Acta Neurol Scand, 2008. **118**(5): p. 320-327.

116. Cardo LF, Coto E, de Mena L, et al. *A search for SNCA 3' UTR variants identified SNP rs356165 as a determinant of disease risk and onset age in Parkinson's disease.* J Mol Neurosci, 2012. **47**(3): p. 425-430.
117. Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, et al. *Gene-environment interactions in parkinsonism and Parkinson's disease: the Geoparkinson study.* Occup Environ Med, 2007. **64**(10): p. 673-680.
118. Mellick GD. *CYP450, genetics and Parkinson's disease: gene x environment interactions hold the key.* J Neural Transm Suppl, 2006(70): p. 159-165.
119. Chauhan NB. *Chronic neurodegenerative consequences of traumatic brain injury.* Restor Neurol Neurosci, 2014. **32**(2): p. 337-365.
120. Jafari S, Etminan M, Aminzadeh F, et al. *Head injury and risk of Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis.* Mov Disord, 2013. **28**(9): p. 1222-1229.
121. Uryu K, Chen XH, Martinez D, et al. *Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans.* Exp Neurol, 2007. **208**(2): p. 185-192.
122. Smith DH, Uryu K, Saatman KE, et al. *Protein accumulation in traumatic brain injury.* Neuromolecular Med, 2003. **4**(1-2): p. 59-72.
123. Uryu K, Giasson BI, Longhi L, et al. *Age-dependent synuclein pathology following traumatic brain injury in mice.* Exp Neurol, 2003. **184**(1): p. 214-224.
124. Goldman SM, Kamel F, Ross GW, et al. *Head injury, alpha-synuclein Rep1, and Parkinson's disease.* Ann Neurol, 2012. **71**(1): p. 40-48.
125. Lee PC, Bordelon Y, Bronstein J, et al. *Head injury, alpha-synuclein genetic variability and Parkinson's disease.* Eur J Neurol, 2014.
126. Kiyohara C and Kusuvara S. *Cigarette smoking and Parkinson's disease: a meta-analysis.* Fukuoka Igaku Zasshi, 2011. **102**(8): p. 254-265.
127. Gatto NM, Rhodes SL, Manthripragada AD, et al. *alpha-Synuclein gene may interact with environmental factors in increasing risk of Parkinson's disease.* Neuroepidemiology, 2010. **35**(3): p. 191-195.
128. McCulloch CC, Kay DM, Factor SA, et al. *Exploring gene-environment interactions in Parkinson's disease.* Hum Genet, 2008. **123**(3): p. 257-265.
129. Abou-Sleiman PM, Hanna MG, Wood NW. *Genetic association studies of complex neurological diseases.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2006. **77**(12): p. 1302-1304.
130. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. *Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates.* Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(6): p. 359-366.
131. Markopoulou K, Biernacka JM, Armasu SM, et al. *Does alpha-synuclein have a dual and opposing effect in preclinical vs. clinical Parkinson's disease?* Parkinsonism Relat Disord, 2014. **20**(6): p. 584-589; discussion 584.
132. Emre M. *Dementia associated with Parkinson's disease.* Lancet Neurol, 2003. **2**(4): p. 229-237.

133. De Marco EV, Tarantino P, Rocca FE, et al. *Alpha-synuclein promoter haplotypes and dementia in Parkinson's disease*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2008. **147**(3): p. 403-407.
134. Keri S, Nagy H, Myers CE, et al. *Risk and protective haplotypes of the alpha-synuclein gene associated with Parkinson's disease differentially affect cognitive sequence learning*. Genes Brain Behav, 2008. **7**(1): p. 31-36.
135. Lenz B, Sysk C, Thuerauf N, et al. *NACP-Rep1 relates to Beck Depression Inventory scores in healthy humans*. J Mol Neurosci, 2011. **44**(1): p. 41-47.
136. Ai SX, Xu Q, Hu YC, et al. *Hypomethylation of SNCA in blood of patients with sporadic Parkinson's disease*. J Neurol Sci, 2014. **337**(1-2): p. 123-128.
137. Pihlstrom L, Berge V, Rengmark A, et al. *Parkinson's disease correlates with promoter methylation in the alpha-synuclein gene*. Mov Disord, 2014.
138. Jowaed A, Schmitt I, Kaut O, et al. *Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains*. J Neurosci, 2010. **30**(18): p. 6355-6359.
139. Beck AT and Beamesderfer A. *Assessment of depression: the depression inventory*. Mod Probl Pharmacopsychiatry, 1974. **7**(0): p. 151-169.
140. Hautzinger M, Bailer M, Worall H, et al. *Beck-Depressions-Inventar (BDI)*. 1 ed. 1994, Bern: Verlag Hans Huber
141. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. *"Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-198.

10 Erklärung zum Eigentel

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Professor Dr. Thomas Gasser, Dipl.-Biol. Claudia Schulte und mich.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dipl.-Biol. Claudia Schulte und Ann-Katrin Hauser von mir eigenständig durchgeführt.

Die klinischen Daten wurden aus Studien und anderen Quellen bezogen die in Kapitel 2.1 (Tabelle 4) aufgeführt sind. Das DEMPARK (LANDSCAPE) Konsortium, Professor Dr. Thomas Gasser, Professor Dr. Daniela Berg, Dr. Kathrin Brockmann und Dr. Inga Liepelt-Scarfone waren so freundlich die Daten zur Verfügung zu stellen.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Bei Fragestellungen zu den longitudinalen klinischen Daten wurde ich von Dr. Kathrin Brockmann beraten. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte nach Rücksprache mit Professor Dr. Thomas Gasser und Dipl.-Biol. Claudia Schulte.

Die Literaturrecherche erfolgte ausschließlich durch mich.

Ich versichere, das gesamte Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Die Korrektur des Manuskripts erfolgte durch Professor Dr. Thomas Gasser und Dipl.-Biol. Claudia Schulte.

11 Danksagung

In erster Linie danke ich herzlich Herrn Professor Dr. Thomas Gasser für die Möglichkeit dieses Thema bearbeiten zu dürfen. Sein entgegengebrachtes Vertrauen, seine stetige Unterstützung und Hilfe ermöglichten mir eine fachliche und persönliche Entfaltung für die ich sehr dankbar bin.

Sehr herzlich danke ich auch Frau Dipl.-Biol. Claudia Schulte für die sehr gute und freundliche Betreuung. Die stetige und kompetente Unterstützung in inhaltlichen und technischen Fragen sowie das gründliche Korrekturlesen waren eine große Hilfe, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein weiterer großer Dank gilt Frau Ann-Kathrin Hauser für die freundliche und geduldige Einarbeitung in die labortechnischen Methoden und ihre immer prompte Hilfsbereitschaft.

Ferner danke ich Frau Dr. Kathrin Brockmann für Ihre Hilfe bei der Auswertung der klinischen Daten und die stets sehr schnelle Beantwortung meiner Fragen zu klinischen Fragestellungen.

Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Neurodegeneration des Hertie-Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein herzlichster Dank gilt den Parkinson-Patienten, die sich bereit erklärt haben an der Studie teilzunehmen.

Schließlich danke ich in besonderer Weise meiner Familie für alles.

12 Lebenslauf