

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

**Evaluation der genetischen Marker  
*APOE ε4, MAPT, SNCA* und *LRRK2*  
sowie der Osteopontin-Plasmakonzentration  
als Demenz-Prädiktoren bei Morbus Parkinson  
in einem Kollektiv der DEMPARK-Studie**

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

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

**vorgelegt von**

**Fehlert, Ellen Vera**

**2018**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Berg
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Derntl

Tag der Disputation: 27.03.2018

*Meiner Familie*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b>	<b>9</b>
1.1	<b>Morbus Parkinson</b>	<b>9</b>
1.1.1	Einteilung der Parkinson-Syndrome	9
1.1.2	Klinik und Diagnose	11
1.1.2.1	Kardinalsymptome und Begleitsymptome	11
1.1.2.2	Parkinson-assoziierte Demenz (PDD)	13
1.1.2.3	Parkinson-assoziiertes <i>mild cognitive impairment</i> (PD-MCI)	15
1.1.2.4	Diagnose der Parkinson-Erkrankung	17
1.1.3	Neuropathologie	18
1.1.4	Ätiologie und Pathogenese	19
1.1.4.1	Genetik	20
1.1.4.2	Epigenetik	22
1.1.4.3	Proteininteraktionen	23
1.1.4.4	Alterung, mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress	24
1.1.4.5	Neuroinflammation	26
1.2	<b>Genvarianten</b>	<b>27</b>
1.2.1	$\alpha$ -Synuklein ( <i>SNCA</i> )	28
1.2.2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau ( <i>MAPT</i> )	29
1.2.3	Leucin-reiche Repeat Kinase 2 ( <i>LRRK2</i> )	30
1.2.4	Apolipoprotein E $\epsilon 4$ ( <i>APOE</i> $\epsilon 4$ )	31
1.3	<b>Osteopontin</b>	<b>32</b>
1.3.1	Struktur, Interaktionen und Varianten des Proteins Osteopontin	32
1.3.2	Osteopontin und Neurodegeneration	33
1.4	<b>Fragestellung</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>38</b>
2.1	<b>Patientenkollektiv</b>	<b>38</b>
2.1.1	DEMPARK-Studie (Longitudinale Kohortenstudie)	38
2.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien	39
2.1.3	Studienablauf: Screening und Baseline	39
2.1.4	Votum der Ethikkommission	41
2.2	<b>Material</b>	<b>41</b>
2.2.1	Chemikalien	41
2.2.2	Puffer und Lösungen	41
2.2.3	Enzyme, Antikörper und Kits	43

2.2.4	Oligonukleotide (Primer).....	44
2.2.5	Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien .....	44
2.2.6	Geräte .....	46
2.2.7	Software.....	47
<b>2.3</b>	<b>Klinische Untersuchungen.....</b>	<b>47</b>
2.3.1	Screening-Untersuchungen der DEMPARK-Studie .....	47
2.3.1.1	Mini-Mental State Examination (MMSE).....	47
2.3.1.2	Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment (PANDA) .....	48
2.3.1.3	<i>Hoehn &amp; Yahr</i> -Stadium.....	48
2.3.2	Baseline-Untersuchungen der DEMPARK-Studie.....	49
2.3.2.1	Epidemiologische Daten und allgemeine Anamnese .....	49
2.3.2.2	Neurologische und körperliche Untersuchung .....	50
2.3.2.3	Neuropsychologische Testung.....	50
2.3.2.4	Klassifikation kognitiver Subgruppen.....	53
2.3.3	Probenentnahme.....	56
<b>2.4</b>	<b>Analyse der Blutproben.....</b>	<b>57</b>
2.4.1	Standardmethoden.....	57
2.4.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	57
2.4.1.2	Gelelektrophorese .....	58
2.4.1.3	<i>Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Sandwich-ELISA).....	58
2.4.2	Genotypisierung der SNPs mithilfe des <i>SNaP-Shot®</i> -Verfahrens.....	59
2.4.3	Messung der Osteopontin-Konzentration im Plasma .....	70
<b>2.5</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>72</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1</b>	<b>Kohortenbeschreibung.....</b>	<b>74</b>
3.1.1	Datenerfassung.....	74
3.1.2	Charakteristika der untersuchten Kohorte.....	75
3.1.3	Einteilung in Untersuchungsgruppen.....	76
<b>3.2</b>	<b>Variablenbeschreibung .....</b>	<b>77</b>
3.2.1	Qualitative und quantitative Variablen .....	77
3.2.2	Variablenverteilung innerhalb der Subgruppen.....	78
3.2.2.1	Variablen der Screening-Untersuchung innerhalb der Subgruppen.....	78
3.2.2.2	Variablen der klinischen Baseline-Untersuchung innerhalb der Subgruppen	80
3.2.2.3	Kovariablen innerhalb der Subgruppen .....	81
3.2.2.4	Korrelation der Kovariablen.....	87

<b>3.3</b>	<b>Assoziationen der untersuchten Biomarker mit den Subgruppen .....</b>	<b>88</b>
3.3.1	Assoziationen der genetischen Marker mit den Subgruppen .....	88
3.3.2	Assoziation der Osteopontin-Konzentrationen mit den Subgruppen ...	99
3.3.3	Assoziationen der Biomarker und der Familienanamnese mit den Subgruppen nach Korrektur für Kovariablen .....	100
3.3.3.1	Assoziation der OPN-Konzentration mit der Gruppeneinteilung bei Korrektur für Kovariablen und den SNCA-Genotypen.....	104
3.3.4	Assoziationen der Variablen mit der OPN-Konzentration.....	104
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>107</b>
<b>4.1</b>	<b>Einzelnukleotid-Polymorphismen innerhalb des Patientenkollektivs ..</b>	<b>108</b>
4.1.1	<i>APOE ε4</i> .....	109
4.1.2	<i>MAPT</i> .....	110
4.1.3	<i>SNCA</i> .....	112
4.1.4	<i>LRRK2</i> .....	113
<b>4.2</b>	<b>Osteopontin-Konzentration.....</b>	<b>114</b>
4.2.1	Osteopontin-Konzentration und <i>LRRK2</i> .....	116
<b>4.3</b>	<b>Limitationen der Arbeit.....</b>	<b>119</b>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>120</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>126</b>
<b>6.1</b>	<b>Abbildungen.....</b>	<b>126</b>
6.1.1	Beispielbilder Gelelektrophorese .....	126
6.1.2	Histogramme der quantitativen Variablen.....	128
6.1.3	Variablenverteilungen innerhalb der Untersuchungsgruppen .....	138
<b>6.2</b>	<b>Tabellen .....</b>	<b>142</b>
6.2.1	Zeitverlauf der Identifikation der PD-assoziierten Genvarianten .....	142
6.2.2	Primer-Sequenzen des <i>Risk-Panels</i> .....	143
6.2.3	Kodierung der Allele .....	144
6.2.4	Thermocycler-Programme.....	145
6.2.5	Anteilig erhobene Daten der Variablen.....	146
<b>6.3</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>147</b>
<b>6.4</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>149</b>
<b>6.5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>150</b>

<b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>- 3 -</b>



## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -Syn	$\alpha$ -Synuklein
$\mu$ l	Mikroliter
A $\beta$	Amyloid $\beta$
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer-Demenz, <i>Alzheimer's disease</i>
AES	<i>Apathy Evaluation Scale</i>
ApoE	Apolipoprotein E
<i>APOE <math>\epsilon</math>4</i>	$\epsilon$ 4-Allel des Apolipoprotein E-Gens
bp	Basenpaar
BTA	<i>Brief Test of Attention</i>
CBD	Kortikobasale Degeneration, <i>Corticobasal Degeneration</i>
CD 44	<i>cluster of differentiation 44</i>
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
COX	Cyclooxygenase
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxyribonukleotidtriphosphate
DLB	Lewy-Körperchen-Demenz, <i>Dementia with Lewy bodies</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribunucleic acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DSM-5	5. Auflage des <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, <i>Enzyme Immunoassay</i>
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EQ-5D	EuroQol 5 Dimensionen
EXO	Exonuklease
FWIT	<i>Farbe-Wort-Interferenztest</i> , Stroop-Test

g	Gramm
GBA	Glucocerebrosidase
GDS	Geriatrische Depressionsskala, <i>Geriatric Depression Scale</i>
GWAS	genomweite Assoziationsstudie, <i>Genome-wide Association Study</i>
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems Version 10</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
LB	Lewy-Körperchen, <i>Lewy bodies</i>
LBD	Lewy-Körperchen-Erkrankungen, <i>Lewy-Body-Diseases</i>
LN	Lewy-Neuriten
LPS	<i>Leistungsprüfsystem</i>
Lrrk2	Leucin-reichen Repeat-Kinase 2
<i>LRRK2</i>	Gen der Leucin-reichen Repeat-Kinase 2
MAO-B	Monoaminoxidase B
<i>MAPT</i>	Gen des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex II, <i>major histocompatibility complex II</i>
MCI	leichte kognitives Defizit, <i>mild cognitive impairment</i>
MDS	<i>International Parkinson and Movement Disorder Society</i>
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloprotease
MMSE	Mini Mental State Examination
MPP <sup>+</sup>	aktivierte Form des 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MRT	Magnetresonanztomographie
MSA	Multisystematrophie
MCST	<i>Modified Wisconsin Card Sorting Test</i>
mtDNA	mitochondriale DNA

miRNA	microRNA
mRNA	messengerRNA
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, <i>inducible NO-synthase</i>
NOX	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase
OPN	Osteopontin
iOPN	intrazelluläres Osteopontin, <i>intracellular osteopontin</i>
sOPN	sezerniertes oder lösliches Osteopontin, <i>secreted osteopontin</i>
OPN-SI	Osteopontin Splicing-Isoformen
OPN-FL	Osteopontin voller Länge, <i>full length osteopontin</i>
OPN-R	proteolytisch gespaltenes <i>Osteopontin-Arginin</i>
p	statistische Signifikanz
PANDA	<i>Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Parkinson-Erkrankung, Morbus Parkinson, <i>Parkinson's Disease</i>
PDD	Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, <i>Parkinson's Disease with Dementia</i>
PD-MCI	Parkinson-Erkrankung im MCI-Stadium
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PDQ-39	<i>Parkinson's Disease Questionnaire</i>
PSP	Progressive Supranukleäre Blickparese
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SD	Standardabweichung, <i>standard deviation</i>
SIBLINGs	<i>Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins</i>
SNCA	Gen des $\alpha$ -Synuklein
SN	Substantia nigra

SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus, <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SOD	Superoxiddismutase
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Tomographie
Tab.	Tabelle
TCS	transkranieller Ultraschall, <i>transcranial sonography</i>
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TE	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UPDRS	<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>
UK PDSBB	<i>United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank</i>
V	Volt
vs.	versus
WMS-R	<i>Wechsler Memory Scale revised</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Morbus Parkinson

Erstmalig wurde die Parkinson-Erkrankung (Morbus Parkinson, *Parkinson's Disease*, PD) im Jahre 1817 von dem britischen Chirurgen James Parkinson unter dem Namen *Paralysis agitans* beschrieben (Parkinson, 2002). Im 19. Jahrhundert etablierte Jean-Martin Charcot dann den Namen *Morbus Parkinson* zu Ehren des Erstbeschreibers (Jankovic, 2008).

Die Erkrankung ist nach der Alzheimer-Demenz (AD) die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung in Industrieländern. Die Prävalenz beträgt etwa 0,3 % in der Gesamtbevölkerung mit steigender Inzidenz im Alter. In Abhängigkeit von diagnostischen Kriterien und ethnischem Hintergrund liegt diese ab dem sechzigsten Lebensjahr bereits bei etwa 1 %, ab dem achtzigsten Lebensjahr sind 4 % der Bevölkerung betroffen (de Lau and Breteler, 2006).

Aufgrund des zunehmenden Durchschnittsalters der Bevölkerung in Industrienationen wird auch eine entsprechende Zunahme der Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen wie der PD in den kommenden Jahrzehnten erwartet (Wirdefeldt et al., 2011, Dorsey et al., 2007). Bei der historisch als reine Bewegungsstörung beschriebenen Erkrankung rücken begleitende nicht-motorische Symptome – wie die einer Demenz – aufgrund ihrer die Selbstständigkeit, Lebensqualität und Mortalität des Betroffenen wesentlichen Beeinflussung zunehmend in den Fokus (Janvin et al., 2006, Seto-Salvia et al., 2011, Kasten et al., 2010). Hierdurch bedingt wird die PD zu einem immer zentraleren Thema der Gesellschaft und der medizinischen Forschung.

### 1.1.1 Einteilung der Parkinson-Syndrome

Die Einteilung der Parkinson-Syndrome erfolgt in drei Hauptkategorien (siehe Tab. 1). Die Unterscheidung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Ätiologie,

dem zeitlichen Auftreten der Symptome und sich hieraus ergebenden prognostischen und unter Umständen therapeutischen Konsequenzen.

**Tab. 1 Einteilung der Parkinson-Syndrome**

Parkinson-Syndrome		
typisch		atypisch
primär	sekundär	
Morbus Parkinson (PD)/ Idiopathisches Parkinson- Syndrom (IPS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• metabolisch</li> <li>• inflammatorisch</li> <li>• toxisch/medikamentös</li> <li>• vaskulär</li> <li>• traumatisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multisystematrophie (MSA)</li> <li>• Progressive supranukleäre Blickparese (PSP)</li> <li>• Lewy-Körperchen-Demenz (DLB)</li> <li>• Kortikobasale Degeneration (CBD)</li> </ul>
hereditär/monogenetisch		

**Idiopathisches Parkinson-Syndrom:** Dieses wird auch als Parkinson-Erkrankung (PD) oder Morbus Parkinson bezeichnet und stellt die häufigste Variante der Parkinson-Syndrome dar (de Lau and Breteler, 2006). Die Ätiologie dieser sporadischen Form wird als multifaktoriell gesehen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt etwa 60 Jahre (Dexter and Jenner, 2013). Einige Studien zeigen, dass Männer etwas häufiger als Frauen betroffen zu sein scheinen (Wirdefeldt et al., 2011).

Familiäre Parkinson-Syndrome treten durch monogenetische Vererbung auf. Bei zunehmendem Verständnis der genetischen Ätiologie werden auch sie als Sondergruppe der PD gesehen, da einige der identifizierten genetischen Varianten auch bei der sporadischen Form als Risikofaktoren Einfluss nehmen. Monogenetische Parkinson-Syndrome machen weniger als 10 % der Erkrankungsfälle aus (Schulte and Gasser, 2011).

**Sekundäre Parkinson-Syndrome:** Es handelt sich hierbei um einen symptomatisch auftretenden Parkinsonismus, der unter anderem durch vaskuläre Veränderungen, Umweltgifte oder Medikamente als Auslöser bedingt sein kann (Gupta and Kuruvilla, 2011, Betarbet et al., 2000, Savica et al., 2016).

**Atypische Parkinson-Syndrome:** Als atypisch werden Parkinson-Syndrome dann bezeichnet, wenn sie im Rahmen einer neurodegenerativen Erkrankung auftreten, aber bezüglich der auftretenden Symptome über die idiopathische Form hinausgehen und weniger gut auf eine symptomatische Therapie ansprechen. Zu ihnen gehören die Multisystematrophien (MSA), die progressive supranukleäre Blickparese (PSP) und auch die Lewy-Körperchen-Demenz (DLB) (Levin et al., 2016).

Aufgrund seiner charakteristischen pathognomonischen Einschlüsse in Nervenzellen wird die PD auch zu den Lewy-Körperchen-Erkrankungen (*Lewy-Body-Diseases*, LBD) gezählt. Innerhalb dieser Gruppe erfolgt die Abgrenzung zur Demenz mit Lewy-Körperchen (*Dementia with Lewy bodies*, DLB), welche eine eigenständige Krankheitsentität darstellt (siehe auch Kapitel 1.1.2.2) (Hepp et al., 2016).

Nur Patienten mit einer Parkinson-Erkrankung im Sinne eines idiopathischen Parkinson-Syndroms, hier als PD abgekürzt, sind Teil des Patientenkollektivs dieser Arbeit.

## **1.1.2 Klinik und Diagnose**

### **1.1.2.1 Kardinalsymptome und Begleitsymptome**

Die vier Kardinalsymptomen der PD sind Bradykinese, Ruhetremor, Rigor und eine posturale Instabilität. Diese motorischen Symptome beginnen meist einseitig und können im Verlauf der Erkrankung bilateral auftreten (Dexter and Jenner, 2013).

Bradykinese steht für eine Verlangsamung der Bewegungsinitiierung und der Bewegungsausführung, begleitet von Bewegungsarmut (Hypokinese) bis hin zur vollkommenen Unbeweglichkeit (Akinese) (Rodriguez-Oroz et al., 2009). Im Zusammenhang hiermit werden auch das veränderte Gangbild, welches sich häufig als kleinschrittig mit unilateral betont reduziertem Armmitschwingen sowie – vor allem in späteren Phasen der Erkrankung – einem plötzlichen Erstarren (sogenanntes *Freezing*) darstellt, gesehen. Weitere assoziierte motorische Symptome sind eine Hypomimie, Sprech- und Schluckstörungen und ein verändertes Schriftbild mit einer typischen Mikrographie (Jankovic, 2008).

Bei dem für die PD typischen Tremor – also unwillkürlichen, rhythmischen, alternierenden Bewegungen – handelt es sich um einen Ruhetremor von 4-6 Hz distaler Extremitäten (Helmich et al., 2012). Dieser kann sich auch als sogenanntes „Pillendreher-Phänomen“ darstellen, ein kontinuierliches gegeneinander Reiben des Daumens und Zeigefingers (Jankovic, 2008). Weitere, jedoch seltenere Tremorformen im Rahmen der PD wurden ebenfalls beschrieben (Helmich et al., 2012).

Zusätzlich kann eine vermehrte Steifigkeit, der sogenannte Rigor, durch passive Bewegung der Gelenke in der klinischen Untersuchung festgestellt werden. Ihm liegt ein erhöhter Muskeltonus zugrunde (Samii et al., 2004).

Viertes Kardinalsymptom ist die posturale Instabilität. Durch die verminderte Balance der Körperhaltung kommt es zu einer vermehrten Fallneigung mit konsekutiven Stürzen (Samii et al., 2004).

Die Kardinalsymptome sind nicht bei allen Erkrankten gleich ausgeprägt, weshalb ein tremordominanter, ein akinetisch-rigider und ein Äquivalenz-Typ unterschieden werden (Schiess et al., 2000).

Außerdem kann es zu einem Wiederauftreten von primitiven Reflexen, wie dem Glabellareflex, kommen (Jankovic, 2008). Im Verlauf können motorische Komplikationen durch Wirkungsfluktuationen der Medikation mit sogenannten *off*-Phasen, gekennzeichnet durch fehlendes Ansprechen auf die Medikation, und medikamenteninduzierten Dyskinesien auftreten (Warren Olanow et al., 2013).



Neben den motorischen Kardinalsymptomen sind auch nicht-motorische Begleitsymptome von großer klinischer Relevanz. Diese können unterteilt werden in autonome Dysfunktionen (orthostatische Hypotension, veränderte Schweißproduktion, Sphinkterfunktionsstörungen, erektile Dysfunktion), sensorische Veränderungen (Riechverlust, Parästhesien, Schmerzen), Schlafstörungen und kognitive, neurobehaviorale Veränderungen (Depressionen, Apathie, Angststörungen, Halluzinationen, Verhaltens- und Wesensänderungen, Reduktion der kognitiven Leistungsfähigkeit) (Jankovic, 2008). Auch diese Begleitsymptome können in unterschiedlichem Ausmaß auftreten und die Lebensqualität, Selbstständigkeit der betroffenen Patienten und Mortalität wesentlich beeinflussen (Schrag et al., 2000, Duncan et al., 2014, Aarsland et al., 2000).

Bezüglich der kognitiven Einschränkungen lässt sich eine weitere Schweregradeinteilung vornehmen. Man unterscheidet die *Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit* (PD) von der Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, sogenanntes *mild cognitive impairment* (PD-MCI), und von solcher, bei der eine Demenz vorliegt (PDD) (Poewe et al., 2008).

#### 1.1.2.2 Parkinson-assoziierte Demenz (PDD)

Das Risiko im Rahmen der PD eine Demenz zu entwickeln ist sechsmal höher im Vergleich zu nicht erkrankten Gleichaltrigen (Aarsland et al., 2001), betrifft durchschnittlich etwa 30 % (Emre et al., 2007) und in hohem Alter bis zu 80 % der PD-Patienten (Muslimovic et al., 2009). Neuropsychologische Veränderungen, wie die Entwicklung einer Demenz, sind ein wesentlicher Prädiktor für die Mortalität bei der PD (Hughes et al., 2004).

Das Risiko eine PDD zu entwickeln, erhöht sich durch fortgeschrittenes Alter, ausgeprägtere motorische Symptomatik, insbesondere bezüglich Rigor, posturale Instabilität und Gangstörungen, männliches Geschlecht, Depression, geringes Bildungsniveau und bereits bestehendes MCI-Stadium (Poewe et al., 2008).

Nach aktueller *internationaler statistischer Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme* (ICD-10) kann die Diagnose einer Demenz gestellt werden, wenn es zu einer Abnahme der Gedächtnisleistung und anderer kognitiver Fähigkeiten ohne Trübung des Bewusstseins für mindestens sechs Monate kommt. Dies kann von Veränderungen des Affekts, Antriebs und Sozialverhaltens begleitet sein (Dilling, 2012). Die aktuelle Auflage des *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-5) gibt für eine *major cognitive disorder* neben dem Auftreten eines neuen Kognitionsdefizits, basierend auf Beobachtungen des Betroffenen selbst oder anderer Personen und objektiviert durch einen standardisierten Test, den Verlust der Fähigkeit zur eigenständigen Bewältigung der Alltagsaktivitäten als Diagnosebedingung an. Das Kognitionsdefizit darf nicht nur im Rahmen eines Deliriums auftreten und nicht durch eine andere psychische Störung besser erklärbar sein (American Psychiatric Association, 2013). Um die Etablierung einer international einheitlichen Richtlinie bezüglich der Diagnose einer Demenz im Rahmen der PD zu ermöglichen, hat die *International Parkinson and Movement Disorder Society* (MDS) 2007 eine Übersichtsarbeit veröffentlicht, welche eine Empfehlung für nötige diagnostische Schritte beschreibt (Emre et al., 2007). Das vorausgesetzte Merkmal ist die Entwicklung einer Demenz im Rahmen einer etablierten PD entsprechend des Diagnosealgorithmus der *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank* (UK PDSBB) (Hughes et al., 1992). Die Diagnose einer Demenz kann dann bei Vorliegen von Defiziten in mindestens zwei von vier Kerndomänen der Kognition (Aufmerksamkeit, Merkfähigkeit, exekutive und visuospatiale Funktionen) und der Beeinträchtigung der Ausführung von Alltagsaktivitäten aufgrund der kognitiven Einschränkungen gestellt werden (Emre et al., 2007, Dubois et al., 2007).

Wichtig bei der Diagnosestellung ist außerdem die Abgrenzung zu anderen Demenzformen, im Besonderen zur Lewy-Körperchen-Demenz (DLB), bei der ebenfalls ein Parkinson-Syndrom mit einer Demenz einhergeht (Hepp et al., 2016). Die Unterscheidung erfolgt in erster Linie über den Krankheitsverlauf. Die Diagnose der DLB wird definitionsgemäß gestellt, wenn eine Demenz vor oder innerhalb des ersten Jahres nach Auftreten der ersten motorischen Symptome

auftritt, bei späterem Auftreten wird die Diagnose einer PDD gestellt (McKeith et al., 2005, Emre et al., 2007).

In der neuropsychologischen Testung zeigen sich bei der PDD typischerweise Einschränkungen in den Bereichen der psychomotorischen Geschwindigkeit und Aufmerksamkeit. Zusätzlich können Veränderungen der Merkfähigkeit, sowie der visuospatialen und exekutiven Funktionen beobachtet werden (Muslimovic et al., 2009). Während vor allem Exekutivfunktionen bei der PDD beeinträchtigt sind, scheinen Gedächtnis, Sprache und Praxie (zielgerichtete Bewegungsausführungen) bei PDD-Patienten weniger betroffen zu sein als bei AD-Patienten (Emre, 2003, Emre et al., 2007). Im Vergleich zur DLB sind diese Unterschiede weniger eindeutig. Insgesamt lassen sich Unterschiede im Profil der kognitiven Einschränkungen deutlicher in frühen oder mittleren als in späten, fortgeschrittenen Stadien der Demenz nachweisen. Eine sichere Zuordnung und Diagnose der zugrundeliegenden neurodegenerativen Erkrankung anhand des kognitiven Profils ist jedoch aufgrund der interindividuellen Varianz nicht möglich (Emre et al., 2007).

Begleitet werden kann die PDD gehäuft von neuropsychiatrischen Auffälligkeiten wie Halluzinationen, wahnhaften Gedanken, Stimmungsschwankungen und Apathie (Emre et al., 2007).

#### 1.1.2.3 Parkinson-assoziiertes *mild cognitive impairment* (PD-MCI)

MCI beschreibt ein Stadium, das weder dem kognitiv-unbeeinträchtigten, noch dem Stadium einer Demenz zugeordnet werden kann. Die kognitive Einschränkung geht über das dem Alter entsprechende Maß hinaus, die Fähigkeit der Alltagsbewältigung ist jedoch erhalten (Litvan et al., 2011).

Veränderungen der Kognition können bei Patienten mit einer neu-diagnostizierten PD bereits etwa doppelt so häufig wie bei gesunden Gleichaltrigen gefunden werden (Aarsland et al., 2009). Bei etwa einem Viertel der Patienten mit einer PD liegt eine PD-MCI vor, mit steigender Prävalenz in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung (Kalbe et al., 2016). PD-MCI wird als Risikofaktor für das Auftreten einer PDD gesehen (Janvin et al., 2006). Die

dokumentierten Häufigkeiten einer PD-MCI und der Einfluss auf die Entwicklung einer PDD in der Literatur sind jedoch uneinheitlich aufgrund unterschiedlicher Testverfahren und *Cut-Off*-Werte zur Diagnosestellung (Liepelt-Scarfone et al., 2011).

In der ICD-10 existiert eine allgemeine Definition der sogenannten *leichten kognitiven Störung*, die definiert ist durch Schwierigkeiten in einem der Bereiche *Gedächtnis, Aufmerksamkeit oder Konzentration, Denken, Sprache oder visuell-räumliche Funktionen* über mehr als 12 Wochen, die sich in einer neuropsychologischen Testung objektivieren lassen. Die kognitive Beeinträchtigung ist nicht schwerwiegend genug, zum Beispiel die Diagnose einer Demenz zuzulassen (Dilling, 2012). Nach DSM-5 wird die *mild cognitive disorder* von einer *major cognitive disorder* nur durch eine weiterhin ungestörte Alltagsbewältigung unterschieden (American Psychiatric Association, 2013). Zur Vereinheitlichung der Diagnosestellung eines MCI-Stadiums im Rahmen einer PD (PD-MCI) hat die MDS 2012 ebenfalls – entsprechend derer für die PDD – eine Leitlinie veröffentlicht. Vorausgesetzt wird auch hierin die vorangegangene Diagnosestellung einer PD basierend auf den UK PDSBB-Kriterien (siehe Kapitel 1.1.2.4). Nachdem ein Kognitionsdefizit durch den Patienten selbst, seine Angehörigen oder einen behandelnden Arzt vermutet wurden, wird eine neuropsychologische Testung empfohlen. Zur Diagnosestellung im klinischen Alltag eignet sich eine abgekürzte Testung („Level I“). Hierbei zeigen sich Defizite in mindestens zwei von fünf Kognitionsdomänen (*Aufmerksamkeit, Exekutivfunktionen, Sprache, Gedächtnis, visuospatiale Funktionen*) im Rahmen einer begrenzten neuropsychologischen Testung oder in einem für PD-Patienten validierten, skalenbasierten Testverfahren für globale kognitive Fähigkeiten (Litvan et al., 2012). Vor allem im Rahmen von Studien wird eine umfassendere, ausführlichere neuropsychologische Testung empfohlen („Level II“). Die genauere Diagnostik beinhaltet dann mindestens zwei unterschiedliche Tests in jedem der fünf Kognitionsdomänen. Eine Einschränkung muss dann in mindestens zwei Tests entweder innerhalb eines einzigen oder zwei verschiedenen Kognitionsdomänen nachweisbar sein. Die kognitive Einschränkung liegt entweder eine bis zwei Standardabweichungen (SD)

unterhalb der entsprechenden Norm, oder es kann eine signifikante Abnahme der kognitiven Fähigkeiten durch serielle Testungen gezeigt werden, oder es zeigt sich eine Abnahme kognitiver Fähigkeiten ausgehend von einem bereits prämorbidem Level (Litvan et al., 2012). Die Ausprägungen einer PD-MCI sind sehr heterogen. Sowohl in den betroffenen Kognitionsdomänen als auch bezogen auf die Ausprägung des Verlustes der Merkfähigkeit können deutliche Unterschiede festgestellt werden (Petersen, 2004). Daher kann zusätzlich auch für vorrangig wissenschaftliche Fragestellungen eine Unterscheidung von MCI-Subtypen (MCI *amnestic* versus *non-amnestic* oder MCI *single-domain* versus MCI *multiple-domain*) vorgenommen werden (Litvan et al., 2012).

Im Gegensatz zur PDD darf für die Diagnosestellung eine Einschränkung der funktionellen Unabhängigkeit durch die kognitiven Defizite nicht gegeben sein (Litvan et al., 2012).

#### 1.1.2.4 Diagnose der Parkinson-Erkrankung

Die Diagnose der PD wird trotz vieler innovativer diagnostischer Verfahren weiterhin in erster Linie klinisch gestellt. Historisch erfolgte die Diagnosestellung aufgrund des Auftretens von mindestens zwei der motorischen Kardinalsymptome (Bradykinesie mit Ruhetremor oder Rigor oder beiden). Diese erlauben jedoch keine Abgrenzung zu anderen Erkrankungen, die mit einem Parkinson-Syndrom einhergehen (Berg et al., 2013). Daher hat sich im klinischen Alltag die Diagnosestellung anhand der neuropathologisch validierten UK PDSBB-Kriterien in drei Schritten etabliert (Hughes et al., 1992). Zunächst wird die Diagnose eines Parkinson-Syndroms anhand des Vorliegens einer Bradykinesie zusammen mit mindestens einem weiteren motorischen Kardinalsymptom gestellt. Im zweiten Schritt werden andere Ursachen für die Symptomatik, die auf ein sekundäres oder atypisches Parkinson-Syndrom hinweisen können, ausgeschlossen. Im letzten Schritt sollen die Diagnose stützende Symptome (einseitiger Symptombeginn, Ruhetremor, voranschreitende Erkrankung, persistierende Asymmetrie des bei Krankheitsbeginn einseitigen Symptoms, sehr gutes Ansprechen (70-100 %) auf

Levodopa, ausgeprägte Levodopa-induzierte Chorea, Ansprechen auf Levodopa für mindestens fünf Jahre, klinischer Verlauf bereits mindestens zehn Jahre) identifiziert werden. Sind die ersten beiden Schritte erfüllt und liegen drei oder mehr stützende Symptome vor, kann in Zusammenschau die Diagnose einer PD gestellt werden (Hughes et al., 1992).

Bildgebende Verfahren dienen vor allem dem Ausschluss von Differenzialdiagnosen (Lang and Lozano, 1998).

Letztendlich kann die im klinischen Alltag gestellte Diagnose durch histologische Untersuchungen post mortem gesichert werden (Jankovic, 2008).

### **1.1.3 Neuropathologie**

Als morphologisches Korrelat für die motorischen Symptome des Morbus Parkinson wird der Verlust von melaninhaltigen Neuronen der Pars compacta der Substantia nigra (SNpc) gesehen (Dickson et al., 2009). Im Rahmen der Erkrankung kommt es dadurch zu einem Dopamin-Defizit im Innervationsgebiet der Neuronen, insbesondere im Striatum, das für die Bahnung und Hemmung von Bewegungsabläufen verantwortlich ist. Zum Auftreten der PD-Symptome kommt es allerdings erst dann, wenn mehr als die Hälfte der Neurone zugrunde gegangen ist (Dickson et al., 2009).

Ein weiteres neuropathologisches Kennzeichen ist der Nachweis von Lewy-Körperchen (LB). LB sind eosinophile, intrazelluläre Proteineinschlüsse, deren dichter Kern von einem blassen Halo umgeben wird (LBs vom Hirnstamm-Typ) oder seltener keinen Halo besitzen (LBs vom kortikalen Typ) (Goedert et al., 2013). Bei Auftreten von Proteineinschlüssen in Axonen und Dendriten von Nervenzellen werden diese als Lewy-Neuriten (LN) bezeichnet (Goedert et al., 2013).

LBs und LNs setzen sich aus verschiedenen fehlgefalteten Proteinen zusammen. Zum großen Teil bestehen diese pathologischen Proteinaggregationen aus fehlgefaltetem  $\alpha$ -Synuklein ( $\alpha$ -Syn) (Spillantini et al., 1997), weshalb die PD zur Gruppe der Synukleinopathien gezählt wird. Weitere Proteine, die nachweisbar

sein können, sind die für die AD pathognomonischen Tau und Amyloid- $\beta$  (Kotzbauer et al., 2012).

Der Nachweis von LBs beziehungsweise aggregiertem  $\alpha$ -Syn gelang nicht nur im zentralen Nervensystem (ZNS), sondern auch im peripheren Nervensystem wie dem Plexus myentericus oder Nervus vagus (Kalia and Lang, 2015). Die Regionen mit betroffenen Neuronen korrelieren mit motorischen wie auch nicht-motorischen Symptomen der Erkrankung und lassen ein typisches Ausbreitungsmuster von peripher nach zentral vermuten (Hawkes et al., 2010, Del Tredici et al., 2010, Braak et al., 2005). Die Ausprägung der LB-Pathologie wird auch mit dem Auftreten einer PDD in Zusammenhang gebracht (Irwin et al., 2012, Hurtig et al., 2000, Mattila et al., 2000).

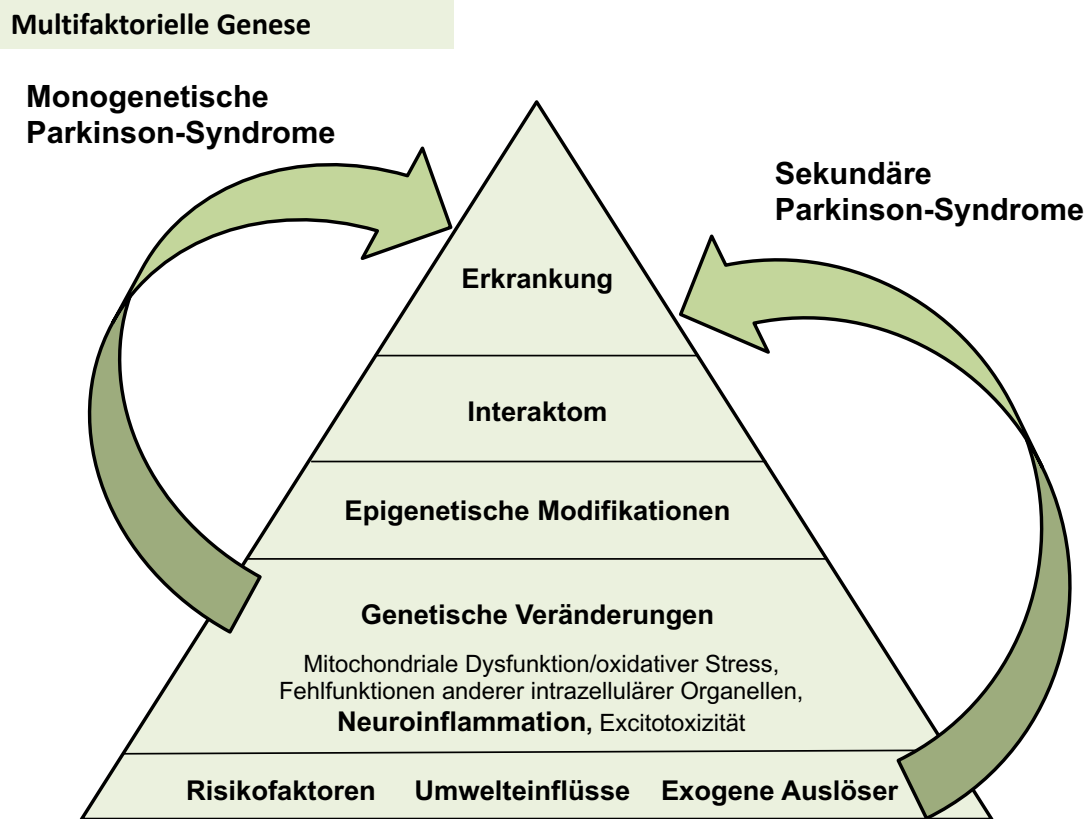
Autoptisch konnten LBs auch bei klinisch gesunden Patienten ohne diagnostizierte PD beobachtet werden und könnten auf eine Frühform der Erkrankung hinweisen (DelleDonne et al., 2008).

#### **1.1.4 Ätiologie und Pathogenese**

Die vermutete Pathogenese der PD ist in den meisten Fällen multifaktoriell und ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. Die bekanntesten Risikofaktoren sind Alter, Umwelteinflüsse und Genetik (Dexter and Jenner, 2013).

Weitere Hinweise für einen ätiologischen Zusammenhang mit dem Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen gibt es für Fehlfunktionen intrazellulärer Organellen (Bose and Beal, 2016), oxidativen Stress (Niedzielska et al., 2016) und inflammatorische Prozesse im ZNS (Le et al., 2016). Als assoziierte Pathomechanismen werden außerdem ein gestörter Ceramidmetabolismus, die sogenannte *unfolded protein response* und Excitotoxizität diskutiert (Hoozemans et al., 2012, Obal et al., 2014, Bras et al., 2008). Nach heutigem Kenntnisstand wird meist ein Zusammenwirken mehrerer dieser Faktoren als ursächlich für die Entwicklung einer PD angesehen. Ihre Rolle im Rahmen der Krankheitsentstehung soll im Folgenden näher beschrieben werden.

Zum Verständnis der Komplexität der Pathogenese werden neben dem direkten genetischen Einfluss auf die Krankheitsentstehung auch die epigenetischen Faktoren und die Interaktion von Genprodukten dargestellt (siehe Abb. 1).



**Abb. 1 Multifaktorielle Genese der Parkinson-Erkrankung**

Schematisch ist dargestellt, dass eine Population verschiedensten begünstigenden Faktoren ausgesetzt ist. Jedoch tritt die PD nur bei einem kleinen Teil einer Population auf, wobei unterschiedliche Einflüsse zum Tragen kommen. Monogenetische sowie sekundäre Parkinson-Syndrome hingegen sind ätiologisch unmittelbar auf ein verändertes Gen oder einen exogenen Auslöser zurückzuführen.

#### 1.1.4.1 Genetik

Auf genetischer Ebene konnten eine Reihe von Genmutationen, die zu einer erblichen Form der PD führen, identifiziert werden. Von den monogenetischen, pathogenen Mutationen müssen die Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single-*



*nucleotide polymorphisms*, SNPs), die zu einer Prädisposition für eine PD führen, hinsichtlich ihrer Wirkung unterschieden werden. Bei Letzteren wird ein Zusammenwirken genetischer Risiko- und Umweltfaktoren bei der Krankheitsentstehung vermutet (Soldner et al., 2016).

SNPs beruhen auf der Veränderung einer einzelnen Nukleotidbase in einem DNA-Abschnitt (Cargill et al., 1999). Zum größten Teil liegen die Variationen auf nicht-kodierenden DNA-Abschnitten, können aber auch direkt in kodierenden Regionen vorkommen, und dort zu einem veränderten Genprodukt führen (McClellan and King, 2010). SNPs sind in der Regel nicht direkt krankheitsauslösend, können aber zu einer erhöhten Suszeptibilität für Krankheiten und auch exogenen Schädigungen, wie durch Toxine, führen. Durch genomweite Assoziationsstudien (*genome-wide association studies*, GWAS) werden in einer Population mit derselben Krankheit häufig veränderte Allele innerhalb des gesamten Genoms identifiziert (Karasik and Newman, 2015). GWAS wurden auch bei PD-Patientenkollektiven durchgeführt, wodurch mindestens 11 Loci identifiziert werden konnten (Nalls et al., 2011). Von diesen Veränderungen gehören zu den häufigsten und auch reproduzierbaren Polymorphismen solche im  $\alpha$ -Syn-Gen (*SNCA*) und im Gen für das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau (*MAPT*) (Sharma et al., 2012). Diese Proteine können in den krankheitstypischen Proteinaggregaten gefunden werden. Ebenso konnten Polymorphismen im auch für monogenetische Vererbung bekannten Gen der Leucin-reiche Repeat-Kinase (*LRRK2*) wiederholt nachgewiesen werden (Simon-Sanchez et al., 2009, Edwards et al., 2010).

Hinweise auf eine Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese der PD konnten auf diesem Weg ebenfalls aufgezeigt werden. Auch für das Gen des mit immunologischen Prozessen in Verbindung stehenden Osteopontins (*OPN*) sind prädisponierende SNPs bekannt und konnten mit einer erhöhten Suszeptibilität für Lewy-Körperchen-Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden (Maetzler et al., 2009).

Die Bedeutung der in dieser Arbeit untersuchten genetischen Varianten sollen im Kapitel 1.2 weiter erläutert werden.

#### 1.1.4.2 Epigenetik

Zusätzliche epigenetische Modifikationen scheinen für die Hirnfunktion eine bedeutende Rolle zu spielen und damit eine mögliche Schnittstelle zwischen Genetik und Umwelt bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zu bilden (Dulac, 2010, Iraola-Guzman et al., 2011, Coppede, 2012). Epigenetische Prozesse umfassen DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und Ribonukleinsäure (RNA)-basierte Mechanismen (Labbe et al., 2016). Insbesondere Mechanismen, die die Genexpression beeinflussen sind in diesem Zusammenhang von Bedeutung.

Die Aktivität von Genen wird unter anderem über ihren Methylierungsstatus gesteuert, wobei ein hoher Methylierungsgrad über Konformationsänderung der DNA zu einer niedrigen Genaktivität führt (Labbe et al., 2016). In Tiermodellen aber auch in post mortem Untersuchungen von menschlichen Gehirnen und in humanen DNA-Untersuchungen hat sich für einzelne PD-Gene, *LRRK2*, *SNCA*, *Parkin*, *Park 16*, ein geringerer Methylierungsstatus nachweisen lassen (Landgrave-Gomez et al., 2015, Schmitt et al., 2015), der entsprechend mit einer höheren Genexpression einhergeht und infolgedessen zu einer vermehrten Produktion von Proteinen wie SNCA oder Tau führt. Hinweise auf eine Veränderung der  $\alpha$ -Syn-DNA-Methylierung konnten bei PD-Patienten gefunden werden und eine Steigerung dieser mit höheren L-Dopa-Dosen (Schmitt et al., 2015).

Ein Mechanismus, die Genexpression zu reduzieren, sind spezifische microRNAs (miRNAs). Diese sind kleine, nicht-codierende RNA-Stränge, die sich komplementären Sequenzen anlagern, deren Translation verhindern und über diesen Mechanismus auch Differenzierung und Überleben von dopaminergen Neuronen beeinflussen können (Kim et al., 2007). Für einzelne miRNAs hat sich eine Reduktion bei PD-Patienten oder in PD-Modellen zeigen lassen, die mit einer Überexpression von *SNCA* assoziiert waren (Minones-Moyano et al., 2011).

#### 1.1.4.3 Proteininteraktionen

Wechselwirkungen zwischen Proteinen innerhalb eines Organismus können in ihrer Gesamtheit als Interaktom bezeichnet werden; vereinzelt wird jedoch auch vom Interaktom eines einzelnen Proteins gesprochen (Cusick et al., 2005). Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen eine Adaptation an Umwelteinflüsse, können jedoch auch schädigende Einflüsse entfalten (Snider et al., 2015).

Unter den Proteinen nehmen die *Intrinsically Disordered Proteins*, zu denen auch das SNCA-Genprodukt gehört, eine Sonderstellung ein, da sie besonders viele Interaktionen mit anderen Molekülen eingehen können (Theillet et al., 2016). Sie besitzen keine festgelegte Tertiärstruktur, sondern nehmen ihre räumliche Struktur in Abhängigkeit von der Interaktion mit ihren jeweiligen Bindungspartnern ein (Santamaria et al., 2016). Ihre Aktivität wird zusätzlich wesentlich durch posttranslationale Modifikationen und alternatives Splicen reguliert (Uversky, 2015). Proteinfehlfaltung und -aggregation sind bei *Intrinsically Disordered Proteins* häufiger als bei Proteinen mit festgelegter Tertiärstruktur zu finden und wurden mit der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie der PD in Zusammenhang gebracht (Uversky, 2015).

Eine Recherche in der *BioGrid Database* (Chatr-Aryamontri et al., 2015) ergab im August 2015 beim Menschen für SNCA 469, für LRRK2 260, für MAPT 188 und für OPN 81 Proteininteraktionen. Folgende Interaktionen zwischen den Produkten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genen sind nachgewiesen worden:

- Lrrk2-Varianten phosphorylieren  $\alpha$ -Syn und das Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau (Qing et al., 2009, Kawakami et al., 2012)
- Bindung und Interaktion zwischen  $\alpha$ -Syn und Tau verändern sich im Fall von Mutationen (Benussi et al., 2005, Qureshi and Paudel, 2011, Esposito et al., 2007, Jensen et al., 1999, Kawakami et al., 2011)
- ApoE zeigt eine isoformabhängige Bindung an Tau (Huang et al., 1995, Fleming et al., 1996)

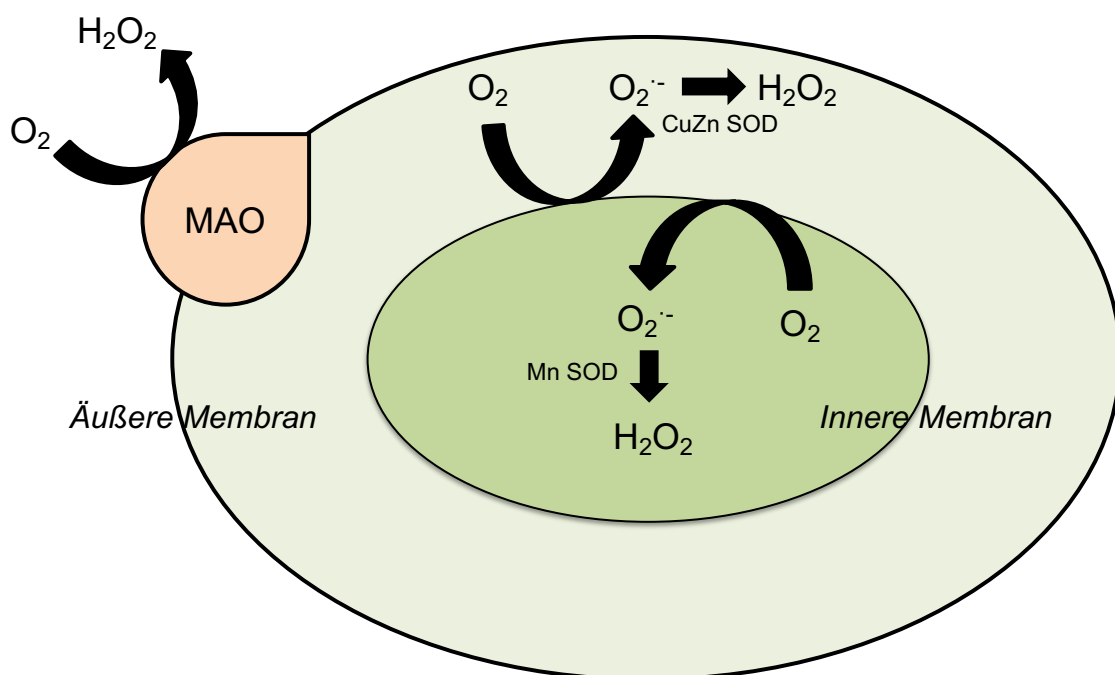
- Für das Protein OPN wurde keine Interaktion mit einem der anderen untersuchten Marker beschrieben.

#### 1.1.4.4 Alterung, mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress

Das Alter stellt den größten Risikofaktor für Neurodegeneration dar (Dexter and Jenner, 2013). Sowohl im menschlichen Alterungsprozess als auch im Rahmen der Neurodegeneration spielt nach heutigen Erkenntnissen oxidativer Stress eine wichtige Rolle. Diesem liegt ein Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und antioxidativen Schutzmechanismen (Vitamin C, Coenzym Q, Superoxyddismutasen (SOD), u.a.) zugrunde, das zu neuronaler Dysfunktion, Apoptose und Mutationen mitochondrialer DNA (mtDNA) führen kann (Yan et al., 2013).

Mehr als 90 % der ROS, zu denen  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  und  $\cdot OH$  gehören, entstehen in Mitochondrien (siehe Abb. 2) und werden dort vermehrt unter Bedingungen gestörter mitochondrialer Atmung, im Speziellen durch Komplex-I-Blockade der Atmungskette an der inneren mitochondrialen Membran, freigesetzt (Yan et al., 2013). Unter physiologischen Bedingungen werden ROS in der Zelle gebildet, aber kontrolliert auf einem nicht-zellschädigenden Niveau gehalten. Ein Ungleichgewicht zwischen Bildung und Elimination von ROS kann zu Störungen der Atmungskette, mitochondrialer Schwellung und schließlich zu Apoptose der Zelle führen (Perier and Vila, 2012, Yan et al., 2013). Für  $H_2O_2$  konnte, neben seiner Rolle als Produkt in der Atmungskette, eine Funktion als intrazellulärer Transmitter (*second messenger*) nachgewiesen werden, welcher an verschiedenen zellulären Prozessen wie Wachstum und Apoptose (Giorgio et al., 2007, Boveris and Cadenas, 2000), synaptischer Plastizität und Gedächtnisbildung beteiligt ist (Kishida and Klann, 2007). Weiterhin aktiviert es Adenosintriphosphat-(ATP)-sensitive Kalium-Kanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle), welche innerhalb des ZNS in der SN und dem Striatum die höchste Dichte aufweisen, und für die Inhibierung der Dopamin-Freisetzung mit verantwortlich sind (Chen et al., 2001, Avshalumov et al., 2005).

Dopaminerge Neurone der SNpc können durch oxidativen Stress besonders leicht geschädigt werden, da sie zum einen in hohem Maße oxidierendes Eisen und niedrige Level antioxidativ wirkenden Glutathions besitzen, zum anderen dadurch, dass beim Abbau von Dopamin durch das Enzym Monoaminoxidase B (MAO-B) zusätzliches  $H_2O_2$  anfällt (siehe Abb. 2) (Yan et al., 2013, Cohen et al., 1997). Eine gestörte Funktion des Komplex-I der Atmungskette konnte bei PD-Patienten nachgewiesen werden (Schapira et al., 1989).



**Abb. 2 Wasserstoffperoxid-Entstehung in der mitochondrialen Atmungskette nach Boveris et al, 2000**

Abkürzungen: MAO: Monoaminoxidase B, SOD: Superoxyddismutase

Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung von oxidativem Stress liefern Toxine, von denen bekannt ist, dass sie ein Parkinson-Syndrom hervorrufen können. Das wohl bekannteste Neurotoxin, welches ein Parkinson-Syndrom verursachen kann, ist 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) (Burns et al., 1983). Nach Aufnahme in den Körper wird es über die MAO-B in  $MPP^+$ , den aktiven Metaboliten des MPTP, umgewandelt und in dopaminerge Neurone der

SN eingeschleust (Blesa et al., 2012). Dort führt es über Blockierung des Komplex-I der mitochondrialen Atmungskette zur Apoptose der Zellen. Die Substanz wird im Parkinson-Tiermodell zur Erzeugung eines Parkinson-Syndroms genutzt (Ransom et al., 1987, Blesa et al., 2012). Andere bekannte Verursacher der Symptomatik sind Pflanzenschutzmittel wie Rotenon und Paraquat. Paraquat besitzt strukturelle Ähnlichkeit zu MPP<sup>+</sup> und führt ebenfalls zu oxidativem Stress (Berry et al., 2010). Auch Paraquat wird im Tiermodell eingesetzt, da es hierdurch zur Bildung von parkinsonstypischen  $\alpha$ -Syn und LB-Formationen kommt (Blesa et al., 2012).

#### 1.1.4.5 Neuroinflammation

Eine Beteiligung neuroinflammatorischer Prozesse bei der PD konnte wiederholt gezeigt werden, unklar bleibt jedoch, ob es sich um den Auslöser oder eine Folge des Neuronenunterganges handelt (Le et al., 2016).

Bereits vor 25 Jahren wurden aktivierte Mikroglia in den Gehirnen verstorbener PD-Patienten beschrieben (McGeer et al., 1988). In den darauffolgenden Jahren konnte dies auch in MPTP-Modellen am Tier nachgewiesen und Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Untersuchungen am Menschen bestätigt werden (McGeer et al., 2003, Gerhard et al., 2006). Mikroglia gehören, neben Oligodendrozyten und Astrozyten, zu den Gliazellen und machen 5-20 % der Zellen des ZNS aus (Le et al., 2016). Sie besitzen Makrophagen-ähnliche Eigenschaften. In dem sonst durch die Bluthirnschranke vor im Blut zirkulierenden Immunzellen geschützten Gehirn zählen die Phagozytose von Zellresten (*Debris*) nach Apoptose, die Erregerabwehr und die T-Zell-Antigen-Präsentation zu ihren Aufgaben (Aguzzi et al., 2013). Residente Mikroglia werden schon bei geringfügigen pathologischen Veränderungen aktiviert, proliferieren und exprimieren Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Osteopontin, excitotoxisches Glutamat und Aspartat. Zusätzlich kann es zum sogenannten *oxidative burst*, mit Freisetzung von ROS und Stickstoffmonoxid (NO), und damit zu oxidativem Stress und Apoptose kommen (Tansey and Goldberg, 2010, Maetzler et al., 2007).

Bemerkenswerterweise korreliert die  $\alpha$ -Syn-Expression mit Haupthistokompatibilitätskomplex II (*MHC II, major histocompatibility complex II*)-positiven Mikroglia, jedoch lässt sich keine Assoziation zu Erkrankungsdauer, Progression oder klinischen Befunden herstellen (Croisier et al., 2005).

Neben aktivierten Mikroglia sind auch durch OPN-vermittelte Chemotaxis eingewanderte T-Lymphozyten in der Substantia nigra von Patienten mit einer PD nachgewiesen worden (Brochard et al., 2009, Ashkar et al., 2000). Auch im Liquor und Serum zeigen sich veränderte Level von Zytokinen und Immunzellen im Vergleich zu Gesunden (Reale et al., 2009, Funk et al., 2013).

Einen zusätzlichen Hinweis auf die inflammatorische Komponente der Neurodegeneration geben entzündungshemmende Medikamente, wie Cyclooxygenase-(COX)-Hemmer und TNF- $\alpha$ -Synthese-Hemmer und -Blocker, die protektiv wirken können und sogar zu einer messbaren Verbesserung der Kognition führten (Pettit et al., 2013, Belarbi et al., 2012, Tobinick and Gross, 2008).

## 1.2 Genvarianten

Zu den wohl bekanntesten SNPs, die bei Menschen kaukasischer Abstammung mit einer erhöhten Suszeptibilität für ein Parkinson-Syndrom einhergehen, gehören *SNCA*, *MAPT* und *LRRK2*. Zunächst konnten 1997 im *SNCA*-Gen und 2004 im *LRRK2*-Gen Mutationen bei familiären Parkinson-Erkrankungen durch Kopplungsstudien gefunden werden (Polymeropoulos et al., 1997, Zimprich et al., 2004). In den folgenden Jahren wurde auch in Kandidatengenstudien für Polymorphismen im *SNCA*- und *MAPT*-Gen ein attributives Risiko nachgewiesen (Gasser et al., 2011). Dies bestätigte sich schließlich für die drei SNPs in GWAS, mithilfe derer große Patientenkollektive untersucht werden können (siehe Tab. 21) (Simon-Sanchez et al., 2009, Lin and Farrer, 2014).

Bezüglich einer Demenzentwicklung im Rahmen der PD konnte bisher kein valider SNP identifiziert werden. Anders ist dies allerdings bei der der PDD

pathologisch ähnlichen AD, deren bekanntester genetischer Risikofaktor der *APOE ε4*-Genotyp ist (siehe Einleitung Kapitel 1.2.4.) (Coon et al., 2007).

### 1.2.1 $\alpha$ -Synuklein (*SNCA*)

Das *SNCA*-Gen auf Chromosom 4q21 kodiert für das Protein  $\alpha$ -Syn. Kurze Zeit nach der Entdeckung, dass pathogene Mutationen in diesem Gen der Auslöser einer autosomal-dominanten PD sind, wurde  $\alpha$ -Syn als Hauptbestandteil in LBs identifiziert, wodurch für die Genvariation ein direktes morphologisches Korrelat gefunden werden konnte (Spillantini et al., 1997). Duplikationen und Triplikationen des gesamten Gens sind mittlerweile als monogenetische Ursachen für die PD identifiziert worden (Farrer et al., 2004). Triplikationen sind für PD-Krankheitsverläufe mit einer höheren Prävalenz von Demenz bekannt (Obi et al., 2008, Elia et al., 2013). Hinzu kommen einzelne Mutationen, wie die E46K-Mutation, die ebenfalls mit einem gehäuften Auftreten kognitiver Beeinträchtigung und autonomen Dysfunktionen in Zusammenhang gebracht werden konnten (Somme et al., 2011). Weder die physiologische noch die pathologische Bedeutung des Proteins sind bis heute vollständig aufgeklärt.

Alpha-Syn kommt physiologisch im ZNS als neuronales, zytoplasmatisches Protein vor allem an präsynaptischen Neuronenenden vor und scheint ein negativer Regulator für Erregungsübertragung dopaminergischer Neurone zu sein (Abeliovich et al., 2000, Maroteaux et al., 1988).

Bei Mutationen im Gen kommt es zu Fehlfaltungen, Aggregationen oder durch Überexpression des Gens vermehrter  $\alpha$ -Syn-Produktion und Bildung von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten (Lee and Trojanowski, 2006). Es kann jedoch auch direkt über spezifische Bindung an mitochondriale Membranen zu mitochondriale Dysfunktion und Bildung von oxidativem Stress im Rahmen der PD führen (Liu et al., 2009, Junn and Mouradian, 2002, Dryanovski et al., 2013). Der Nachweis von  $\alpha$ -Syn in Mitochondrien-assoziierten Membranen von Neuronen (Nakamura et al., 2011), die subzelluläre Verbindungen zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien darstellen, haben zu Überlegungen hinsichtlich eines Zusammenhangs von  $\alpha$ -Syn mit



Calciumhomöostase, Lipid- und Cholesterinstoffwechsel geführt (Devi et al., 2008, Guardia-Laguarta et al., 2015).

### **1.2.2 Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau (*MAPT*)**

Das primär durch Neuronen exprimierte Protein Tau spielt eine zentrale Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts und bei Transportvorgängen innerhalb der Nervenzelle (Mietelska-Porowska et al., 2014). Das hierfür kodierende Gen *MAPT* auf Chromosom 17q21 besitzt in der kaukasischen Bevölkerung die zwei Haplotypen H1 und H2 (Caffrey and Wade-Martins, 2007). Die Verteilung der Haplotypen zeigt deutliche geographische Unterschiede. Der H2-Haplotyp ist selten bei Menschen afrikanischen oder ostasiatischen Ursprungs und amerikanischen Ureinwohnern, aber mit einer Häufigkeit von etwa 20 % in der kaukasischen Bevölkerung zu finden (Stefansson et al., 2005). Auch innerhalb Europas konnte ein geographisches Verteilungsmuster (5 % – 37,5 %) identifiziert werden (Donnelly et al., 2010).

Der weltweit häufigere H1-Haplotyp konnte bei Homozygotie (H1/H1) mit der Entwicklung verschiedener Demenzformen und dem Auftreten einer PD reproduzierbar in Zusammenhang gebracht werden (Edwards et al., 2010, Zhang et al., 2005, Samaranch et al., 2010).

Das exprimierte Protein Tau wird vor allem bei sogenannten Tauopathien, wie der AD, der frontotemporalen Demenz und der progressiven supranukleären Blickparese, aber zum Teil auch, als pathomorphologisches Korrelat zur Mutation, bei Patienten mit einer PD im ZNS gefunden (Horvath et al., 2013). In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Tau bei Alterungsvorgängen und neurodegenerativer Tauopathie am Zusammenbruch des Zytoskeletts beteiligt ist. Hochgradig phosphoryliertes Tau löst sich von seiner Bindung an Mikrotubuli und wird retrograd in das Perikaryon transportiert, wo seine Aggregate zur Ausbildung der AD-pathognomonischen *neurofibrillary tangles* führen (Mietelska-Porowska et al., 2014).

### 1.2.3 Leucin-reiche Repeat Kinase 2 (*LRRK2*)

Das Gen *LRRK2* ist auf Chromosom 12q12 lokalisiert. Die von ihm kodierte Kinase (*Lrrk2*) wird in besonderem Maße in Hirnarealen mit Dopamin-Rezeptoren wie Hippocampus und Striatum exprimiert (Melrose et al., 2006, Galter et al., 2006). Ihre physiologische Funktion ist noch nicht hinreichend gesichert, ein Zusammenhang mit intrazellulären Signalwegen und vesikulärem Transport konnte allerdings nachgewiesen werden (Migheli et al., 2013).

Insgesamt können *LRRK2*-Mutationen bei etwa 5 – 15 % der Fälle mit familiärer PD und bei 1 % der Fälle mit sporadischer PD bei Kaukasiern nachgewiesen werden (Schulte and Gasser, 2011). Die G2019S-Missense-Mutation des Gens ist mit 4 % der Fälle die häufigste Ursache für die familiäre PD und folgt dabei einem autosomal dominanten Erbgang (Zimprich et al., 2004, Gasser et al., 2011, Berg et al., 2005). Einzelnukleotid-Polymorphismen des Gens machen etwa 1 % der sporadischen PD aus (Healy et al., 2008). Daneben konnten weitere Varianten, die mit einem erhöhten Risiko für eine PD einhergehen, gefunden werden (Simon-Sanchez et al., 2009).

Patienten mit einem monogenetischen Erbgang zeigen einen vergleichsweise milden Krankheitsverlauf mit oftmals unveränderter kognitiver Leistung (Estanga et al., 2014, Ben Sassi et al., 2012) oder sogar geringerer Auftretswahrscheinlichkeit einer Demenz im Vergleich zur sporadischen Variante (Healy et al., 2008, Somme et al., 2015). Dennoch gibt es Hinweise, die einen Zusammenhang mit einem vermehrten Auftreten kognitiver Einschränkungen möglich scheinen lassen. So konnte gezeigt werden, dass *Lrrk2* und Tau interagieren und unter dem Einfluss von *Lrrk2* eine höhere Menge intrazellulären Taus entstehen kann (Guerreiro et al., 2016). Im Tiermodell führte die monogenetische Mutation zu einer Störung der Kalziumhomöostase, mitochondrialem Untergang mit vermehrter Mitophagie und Verkürzung von Dendriten (Cherra et al., 2013). *Lrrk2* konnte in LBs gefunden werden, sodass man von einer Interaktion mit  $\alpha$ -Syn im Krankheitsgeschehen ausgeht (Hyun et al., 2013). Hierzu passend fanden Linnertz et al. 2014, dass eine signifikant höhere *Lrrk2*-Menge in menschlichen Gehirnen mit LB-Pathologie im Vergleich

zu solchen ohne LB-Pathologie gefunden werden konnte. Der auch hier untersuchte SNP rs1491923 ließ über eine Interaktion mit *SNCA* einen Zusammenhang mit der Entstehung der LB-Pathologie bei AD-Patienten vermuten (Linnertz et al., 2014).

#### **1.2.4 Apolipoprotein E $\epsilon$ 4 (*APOE* $\epsilon$ 4)**

Das Gen *APOE* ist auf Chromosom 19q13 lokalisiert und besitzt die Allelvarianten  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 und  $\epsilon$ 4. Das Genprodukt ist das ApoE mit den entsprechenden Isoformen E2, E3 und E4 (Zannis et al., 1982). Der Unterschied zwischen den Isoformen liegt in einem Aminosäureaustausch von Cystein und Arginin an Position 112 und 158 (E2: Cys112; Cys158, E3 Cys112; Arg158 und E4 Arg112; Arg158) (Singh et al., 2006).

Apolipoproteine sind amphiphile Proteine, die am Transport von Lipiden im Körper beteiligt sind. ApoE wird physiologisch in Leber, Gehirn und Makrophagen exprimiert (Mahley, 2016). Im ZNS wird es vor allem durch Astrozyten, gefolgt von Mikroglia und in geringerem Umfang von Neuronen produziert. Auch im Gehirn reguliert es den Transport und Verteilung von Lipiden (Kim et al., 2009). *APOE*  $\epsilon$ 3 ist das in der Bevölkerung weltweit am häufigsten vorkommende Allel (60-90 %), gefolgt von  $\epsilon$ 4 (10-20 %) und  $\epsilon$ 2 (0-20 %) (Singh et al., 2006). Das Risiko, an einer AD zu erkranken, ist assoziiert mit den *APOE*-Allelen. Für das Allel *APOE*  $\epsilon$ 4 konnte ein eindeutiger Einfluss auf die Entwicklung einer AD nachgewiesen werden; eine oder sogar zwei Kopien des  $\epsilon$ 4-Allels erhöhen das Risiko an einer AD zu erkranken um das etwa 3- bzw. 12-fache im Vergleich zu Nicht-Allelträgern (Sadigh-Eteghad et al., 2012, Kim et al., 2009, Samaranch et al., 2010). Auch eine Assoziation mit einem generellen kognitiven Defizit konnte in GWAS gezeigt werden (Davies et al., 2014).

Die Rolle des ApoE im Rahmen der AD wird in der Degradierung des für die Erkrankung pathognomonischen Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) durch Mikroglia gesehen. Die ApoE-Isoform E4, kodiert durch *APOE*  $\epsilon$ 4, führt zu einem verminderten Abbau und fördert somit die Entstehung von Alzheimer-Plaques (Jiang et al., 2008).

Bei Untersuchungen zur Korrelation einer PD-assoziierten Demenz mit dem Risikoallel gibt es keine klare Studienlage. Einige, aber nicht alle Untersuchungen konnten eine Assoziation mit Demenzentwicklung aufzeigen (Morley et al., 2012, Ezquerro et al., 2008).

## 1.3 Osteopontin

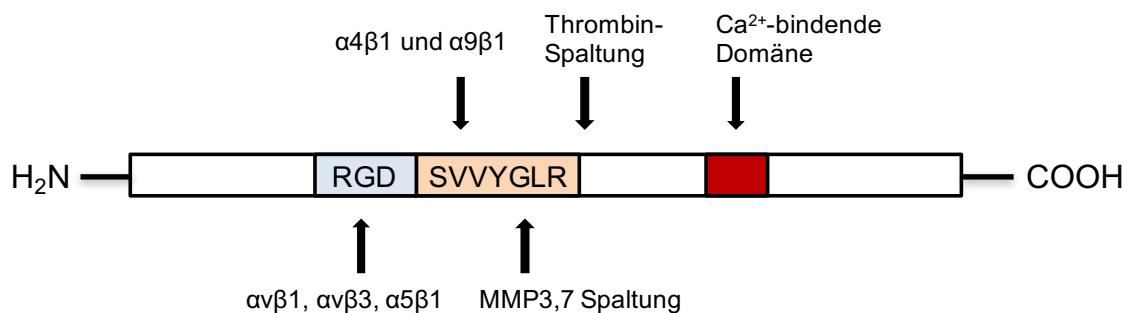
### 1.3.1 Struktur, Interaktionen und Varianten des Proteins Osteopontin

OPN ist ein ubiquitär im Organismus vorkommendes Glykoprotein aus der Familie der **Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins** (SIBLINGs). Sein Gen ist auf Chromosom 4 lokalisiert (Fisher et al., 2001).

OPN liegt in zwei Isoformen, als *secreted Osteopontin* (sOPN) und *intracellular Osteopontin* (iOPN) vor (Zohar et al., 1997). Im Folgenden soll auf die Struktur und Interaktionen des sOPN, welches in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde und zur Vereinfachung als OPN bezeichnet wird, eingegangen werden.

Der prinzipielle Aufbau des OPN-Moleküls ist in Abb. 3 dargestellt. Zentral gelegen im Protein befindet sich ein Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD)-Sequenz, die als Integrinbindungsstelle zelluläre Funktionen regulieren kann (Barry et al., 2000, Hu et al., 1995, Liaw et al., 1995). Über RGD-bindende Integrine vermittelt OPN auch die Hemmung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible NO-synthase*, iNOS) und damit die Bildung von NO (Guo et al., 2001). Neben der RGD-Domäne befindet sich innerhalb des Proteins ein Abschnitt, an dem es durch Thrombin gespalten werden kann, die *Thrombin Cleavage Site* (Senger et al., 1994). Durch die proteolytische Spaltung wird das Osteopontin voller Länge (OPN-FL, *full length osteopontin*) zu dem *Osteopontin-Arginin* (OPN-R), welches mit einer Serin-Valin-Valin-Tyrosin-Glycin-Leucin-Arginin (SVVYGLR)-Sequenz endet. An diese Sequenz binden die Integrine  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 9\beta 1$ , auch bezeichnet als *non-RGD-recognizing integrins* (Bayless et al., 1998, Yokosaki et al., 1999). Die Spaltung durch Plasmin und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) kann die

Bindungseigenschaften des OPN an Integrine ebenfalls verändern (Agnihotri et al., 2001, Yokosaki et al., 2005, Christensen et al., 2010). In der Nähe des C-Terminus ist eine ionisiertes Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-bindende Domäne mit niedriger Affinität aber hoher Kapazität für Calciumionen (Chen et al., 1992). Auch *cluster of differentiation 44* (CD44)-Varianten können an OPN binden, wodurch Interaktionen mit Lymphozyten, wie deren Aktivierung, stattfinden können (Weber et al., 1996).



**Abb. 3 Osteopontin-Struktur und -Bindestellen nach Uede, 2011**

Abkürzungen:  $\text{Ca}^{2+}$ : ionisiertes Calcium, COOH: Carboxygruppe,  $\text{H}_2\text{N}$ : Aminogruppe, MMP3,7: Matrix-Metalloproteasen 3 und 7, RGD: Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz, SVVYGLR: Serin-Valin-Valin-Tyrosin-Glycin-Leucin-Arginin-Sequenz

### 1.3.2 Osteopontin und Neurodegeneration

OPN besitzt eine wichtige Rolle im Rahmen immunologischer Prozesse, wie zellvermittelter Immunität, Entzündung, Allergien und Autoimmunerkrankungen (Rittling and Singh, 2015).

OPN wird sowohl von Zellen der angeborenen, als auch der erworbenen Immunantwort exprimiert, wirkt auf sie chemotaktisch oder führt zu ihrer Aktivierung (Wang and Denhardt, 2008).

Bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen einschließlich Multipler Sklerose konnten erhöhte OPN-Werte im Serum festgestellt werden (Sharif et al., 2009, Kariuki et al., 2009, Shimizu et al., 2013). Dies ist insofern relevant, als dass bei

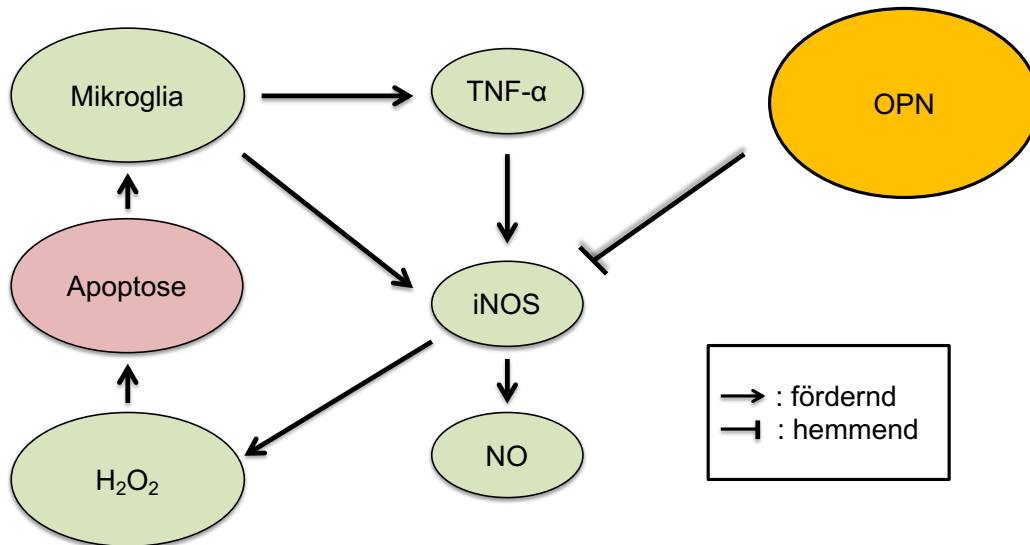
der PD die Vermutung besteht, dass zirkulierende Entzündungszellen oder -mediatoren durch eine gestörte Bluthirnschranke ins ZNS gelangen und auf diese Weise eine beginnende Degeneration der Neuronen vorantreiben (Hernandez-Romero et al., 2012).

Im ZNS wird OPN gemeinsam mit TNF- $\alpha$  von aktivierten Mikroglia exprimiert, wobei TNF- $\alpha$  wiederum selbst die Genexpression von OPN fördert (siehe Abb. 4) (Maetzler et al., 2007, Nagasaki et al., 1997, Nagasaki et al., 1999).

Eine weitere Funktion im Immunsystem sind seine anti-apoptischen Eigenschaften, die eine prolongierte Immunreaktion bedingen können (Wang and Denhardt, 2008, Hsieh et al., 2006).

Durch die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase (NOX)-abhängige ROS-Produktion und damit Entstehung von oxidativem Stress kann Neurodegeneration induziert werden. Hinweise auf diesen Mechanismus konnten durch Modelle mit PD-induzierenden Toxinen in murinen Neuronen der SN und ebenso in Gehirnen verstorbener PD-Patienten im Vergleich zu Nicht-Erkrankten gefunden werden. Die dort entstandenen ROS können dann über Schädigung der DNA zu mitochondrialer Dysfunktion und Untergang der Neuronen führen (Choi et al., 2012). Auch OPN kann über eine NOX-abhängige ROS-Produktion Neurodegeneration induzieren (Lai et al., 2006, Hernandes and Britto, 2012).

Des Weiteren besitzt OPN eine hemmende Wirkung auf die iNOS und damit auf die Bildung von NO. Allerdings konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass im Alter genau diese Wirkung vermindert ist (Rollo and Denhardt, 1996). Das iNOS-Produkt NO ist in niedrigen Konzentrationen ein wichtiger Signaltransduktor, zum Beispiel im Rahmen der Regulation des Gefäßtonus, in hohen Konzentrationen jedoch ist es zytotoxisch. Da NO auch in der Lage ist die mitochondriale Atmungskette zu inhibieren, könnte es so zu dem bei der PD postulierten Pathomechanismus über oxidativen Stress (siehe Kapitel 1.1.4.4) beitragen (Cleeter et al., 1994). Zum besseren Verständnis sind die Zusammenhänge in Abb. 4 graphisch dargestellt.



**Abb. 4 OPN-Interaktionen und die dadurch bedingte prolongierte Reaktionsfolge, z. B. bei Entzündungsprozessen**

Durch erhöhte Konzentrationen von  $H_2O_2$  kommt es zum Untergang von Zellen (Boveris and Cadenas, 2000). Infolgedessen werden Mikroglia aktiviert, wodurch es zur vermehrten Expression von  $TNF-\alpha$  und der iNOS mit Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies kommt (Park and Bowers, 2010, More et al., 2013).  $TNF-\alpha$  wiederum bewirkt eine Erhöhung von OPN (Nagasaki et al., 1999). Für OPN konnte gezeigt werden, dass dieses die iNOS hemmt und damit diese Reaktionsfolge zumindest abschwächen könnte (Hwang et al., 1994, Guo et al., 2001). Im Alter ist diese hemmende Wirkung des OPN allerdings vermindert (Rollo and Denhardt, 1996). Dies könnte zu einem prolongierten Ablauf beitragen mit zusätzlichem Anfall von oxidativem Stress. Dopaminerge Neurone der SNpc sind für eine Schädigung durch den dadurch vermehrten oxidativen Stress besonders anfällig.

Abkürzungen:  $H_2O_2$ : Wasserstoffperoxid, iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, OPN: Osteopontin,  $TNF-\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$

OPN-Expression findet sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem statt (Kunii et al., 2009). Sie ist unter pathologischen Bedingungen, wie einem Trauma, Schlaganfall oder neuroimmunologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Multiplen Sklerose, erhöht (Suzuki et al., 2011, Shin et al., 2011, Shimizu et al., 2013). Bei neurodegenerativen Erkrankungen konnte eine zusätzliche Erhöhung von OPN-Werten im Liquor und im Serum verzeichnet werden, zum Teil insbesondere dann, wenn diese Erkrankungen mit kognitiver Beeinträchtigung einhergehen. Zu diesen gehören die PD (Maetzler et al., 2007), AD (Comi et al., 2010, Sun et al., 2013), DLB (Heywood et al., 2015) und eine Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) mit ZNS-Beteiligung (Brown et al., 2011, Burdo et al., 2008).

Im Rahmen einer AD ließen sich wichtige Hinweise für die Beteiligung von OPN an der Erkrankung finden. So konnte gezeigt werden, dass intrazelluläres OPN in Pyramidenzellen des menschlichen Hippocampus positiv mit der Amyloid- $\beta$ -Menge korreliert (Wung et al., 2007). Auch lösliches OPN beziehungsweise ein C-Terminus-Fragment waren vermehrt im Liquor betroffener Patienten, insbesondere bei Beginn und Fortschreiten des Kognitionsdefizits, zu detektieren (Comi et al., 2010, Simonsen et al., 2007, Sun et al., 2013).

Beim Morbus Parkinson konnte außerdem gezeigt werden, dass OPN nicht nur mit der Kognition, sondern auch mit der motorischen Beeinträchtigung, gemessen in *Hoehn & Yahr*-Stadien im Serum korreliert. In der SN wird es von Mikroglia und Neuronen exprimiert und ist auch Bestandteil der LB (Maetzler et al., 2007).

Nach akut-traumatischen Geschehnissen wird ein positiver Effekt bezogen auf Schutz der Blut-Hirn-Schranke und Aussprossung von Neuriten beobachtet. Bei Fehlen des Proteins kommt es zu Schädigungen mit sekundärer Mikrokalzifikation der zentralnervösen Gefäße und konsekutiver Neurodegeneration (Suzuki et al., 2011, Plantman, 2012, Maetzler et al., 2010, Schroeter et al., 2006). Hingegen scheint OPN ein schädigender Faktor bei chronischer Expression im ZNS zu sein (Maetzler et al., 2007). Dies entspricht der allgemeinen Ansicht, dass akute Neuroinflammation Schutz- und Reparaturfunktionen erfüllt, chronische Entzündung hingegen eine die Akutsituation überdauernden Produktion von Entzündungsmediatoren mit Verlust der ursprünglichen Funktion darstellt (Rao et al., 2012).

## 1.4 Fragestellung

Eine Vielzahl von Einzelnukleotid-Polymorphismen konnte im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien mit einem erhöhten Risiko für eine PD in Zusammenhang gebracht werden. Zu diesen gehören Einzelnukleotid-Polymorphismen der Gene *SNCA*, *MAPT* und *LRRK2*. Bisher gibt es jedoch



keinen etablierten genetischen Marker, der das Risiko eines kognitiven Defizits im Rahmen der PD nachweislich sicher erhöht. Das als Risikofaktor für eine AD bekannte *APOE*-Allel  $\epsilon 4$  wurde bezüglich des Zusammenhangs mit einer PDD bereits untersucht (Huang et al., 2006), es fanden sich jedoch widersprüchliche Befunde.

Neben genetischen Markern konnte OPN in Zusammenhang mit einer PD-assoziierten Neurodegeneration gebracht werden (Maetzler et al., 2007). Ob es eine Assoziation zwischen OPN-Spiegeln im Plasma und dem Auftreten einer PDD gibt, ist bisher jedoch ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation der Assoziation zwischen dem Auftreten und der Schwere kognitiver Störungen mit den Markern *SNCA*, *MAPT*, *LRRK2* und *APOE- $\epsilon 4$*  und des OPN-Plasmaspiegels. Hierfür wurden Daten der neuropsychologisch gut charakterisierten „Parkinson-Krankheit und Demenz: eine longitudinale Studie“ (DEMPARK)-Kohorte analysiert.

Die folgenden Fragestellungen wurden dahingehend untersucht:

1. Zeigen die aus genomweiten Assoziationsstudien zur PD bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismen der Gene *SNCA*, *MAPT* und *LRRK2* einen Zusammenhang zum Vorliegen und der Schwere kognitiver Störungen bei einer PD?
2. Stellt das *APOE*-Allel  $\epsilon 4$  auch bei Patienten mit einer PD einen Risikofaktor für eine PD-assoziierte Demenz (PDD) dar? Findet sich dieses Allel häufiger bei Patienten mit PDD oder leichten kognitiven Störungen (PD-MCI) im Vergleich zu Patienten ohne kognitive Störungen?
3. Zeigen OPN-Spiegel im Plasma eine Assoziation zum Auftreten und der Schwere kognitiver Störungen bei den untersuchten PD-Patienten?
4. Ist die OPN-Konzentration mit dem Vorliegen eines der untersuchten genetischen Marker assoziiert?

## 2 Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Die verwendeten Daten wurden im Rahmen der Baseline-Untersuchung der DEMPARK-Studie erhoben. Hierbei wurden die Probanden rekrutiert und sowohl biometrische Daten erhoben, eine neuropsychologische Untersuchung durchgeführt, als auch Plasma- und Serumproben genommen. Die Untersuchungen erfolgten in der Parkinson-Ambulanz der Neurologie am Universitätsklinikum in Tübingen oder im Rahmen von Hausbesuchen.

#### 2.1.1 DEMPARK-Studie (Longitudinale Kohortenstudie)

Die „Parkinson-Krankheit und Demenz: eine longitudinale Studie“ (DEMPARK) ist eine deutschlandweite Studie mit acht Zentren, in Aachen, Bonn, Dresden, Frankfurt, Kassel, Kiel, Marburg und Tübingen. Das Referenzzentrum ist die neurologische Abteilung des Universitätsklinikums in Marburg. In die Studie konnten über 700 Probanden verteilt auf die Zentren in die Studie eingeschlossen werden (Balzer-Geldsetzer et al., 2011).

Ziel der DEMPARK-Studie ist es, durch neuropsychologische Tests und molekulargenetische Untersuchungen die Zusammenhänge vermehrten Auftretens von Demenz bei Parkinson-Patienten weiter aufzuklären.

Die Kohorte wird im Verlauf der longitudinalen Studie (Baseline, 6-Monats-Follow-Up, 12-Monats-Follow-Up) mehrfach klinisch allgemein-körperlich, neurologisch und neuropsychologisch untersucht.

Im Folgenden soll Bezug auf die Daten der Screening- und Baseline-Untersuchung aus dem Zentrum in Tübingen genommen werden, die bei den Folgeuntersuchungen gewonnen Daten sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### **2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte aus der Parkinson-Ambulanz des Universitätsklinikums Tübingen anhand der nachfolgend dargestellten Ein- und Ausschlusskriterien der DEMPARK-Studie.

Einschlusskriterien:

- (1) Alter  $\geq 45$  und  $\leq 80$  Jahre
- (2) Idiopathisches Parkinson-Syndrom entsprechend den klinischen Diagnosekriterien der UK Brain Bank (Hughes et al., 1992)
- (3) Idiopathisches Parkinson-Syndrom mit Demenz entsprechend den Konsensus-Guidelines (Emre et al., 2007)
- (4) Schriftliches Einverständnis des Patienten
- (5) Ergebnis des initialen Screenings: MMSE  $\leq 17$  bis 28 Punkte und PANDA  $\leq 17$  Punkte (entfällt bei nicht beeinträchtigten Patienten)

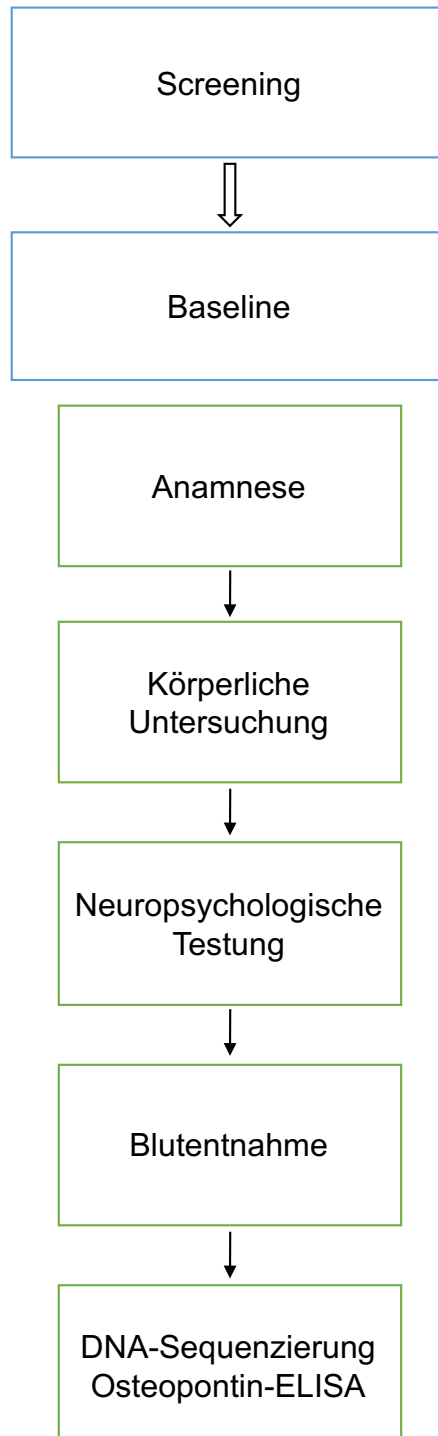
Ausschlusskriterien:

- (1) Atypisches Parkinson-Syndrom (MSA, PSP, CBD, und andere)
- (2) Demenz vom Lewy-Körper-Typ entsprechend den Konsensus-Guidelines (McKeith et al., 2005)
- (3) Andere Ursachen der Demenz (Morbus Alzheimer, Creutzfeld-Jakob-Erkrankung, vaskuläre Demenz, frontotemporale Demenz, und andere)
- (4) Nicht einwilligungsfähiger Patient
- (5) Schwangere Patientin

### **2.1.3 Studienablauf: Screening und Baseline**

Nach Erfüllung der Ein- und Ausschlusskriterien und Durchlaufen der Screening-Untersuchung wurden die Patienten in die DEMPARK-Studie eingeschlossen. Im Rahmen der Baseline-Untersuchung (siehe Abb. 5) erfolgten dann eine detaillierte Anamnese und körperliche Untersuchung, denen sich eine ausführliche neuropsychologische Testung anschloss. Die hierbei entnommenen

Blutproben wurden für genetische und antikörperbasierte Nachweisverfahren der untersuchten Biomarker analysiert.



**Abb. 5 Studienablauf**

*Abkürzungen: DNA: Desoxyribonucleinsäure, ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

#### 2.1.4 Votum der Ethikkommission

Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki (2004) durchgeführt. Alle Probanden haben nach ärztlicher Aufklärung vor der Studienteilnahme sowohl ihr mündliches als auch schriftliches Einverständnis erklärt.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg (Antragsnummer 178/07) im März 2009 als positiv bewertet (Balzer-Geldsetzer et al., 2011). Im Anschluss erfolgte 2009 auch die positive Bewertung der Universität Tübingen.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Chemikalien

In dieser Arbeit wurden die folgenden Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge verwendet:

Aqua bi dest (LiChrosolv®, ddH <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O) absolute for analysis	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formamid (CH <sub>3</sub> NO)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
SeaKem® LE Agarose ((C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> ) <sub>x</sub> )	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz

### 2.2.2 Puffer und Lösungen

In dieser Arbeit wurden die folgenden Puffer und Lösungen verwendet:

A) Im Labor angesetzte Puffer und Lösungen:

**Tris-EDTA-(TE)-Puffer (10X)**

- 6,057g Tris Base
- 20ml EDTA

Mit ddH<sub>2</sub>O auf 0,5l aufgefüllt.

**Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer**

- 108g Tris Base
- 55g Borsäure
- 40ml EDTA

Mit ddH<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt.

Für die Verwendung bei der Agarose-Gelelektrophorese wurde 0,5X TBE-Puffer verwendet.

**Bromphenolblau-Puffer**

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

B) Vorgefertigte Puffer und Lösungen:

dNTPs (10mM)	Fermentas/ Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
EIA-Puffer	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan
GeneRuler DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
goTaq® Buffer Colorless	Promega, Madison, WI, USA
LIZ® GeneScan Size Standard	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Lösung für <i>Labeled Antibody</i>	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan

MgCl <sub>2</sub> -Solution 25mM	Promega, Madison, WI, USA
Multiplex Ready Reaction Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
OPN-Standard	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan
Schwefelsäure-(H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )-Lösung	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan
Tetramethylbenzidin-(TMB)- Lösung	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan
Wasch-Puffer, konz.	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan

### 2.2.3 Enzyme, Antikörper und Kits

In dieser Arbeit wurden die folgenden Enzyme, Antikörper und Kits in alphabetischer Reihenfolge verwendet:

Coating Antibody	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan
Exonuklease I (EXO I) 20.000U/l	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
goTaq® DNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
Labeled Antibody	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan
Osteopontin-ELISA-Kit	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan
SAP 1U/μl	Fermentas/ Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
SNaPSHOT® Multiplex Read Reaction	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

#### 2.2.4 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide wurden zunächst mit der Software Primer3 der Homepage [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) erstellt (siehe Tab. 22 und Tab. 23). Zur Kontrolle der Sequenzspezifität wurden die Datenbanken von UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) und NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/reverse.cgi>) verwendet. Die Synthese der gewählten Primer führte die Firma Metabion International AG in Martinsried durch.

#### 2.2.5 Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Die folgenden Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien wurden verwendet:

1er Tube	Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland
8er Tube Cap Strip	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
8er Tube-Strip (0,2ml)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
96-well PCR-Platte	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
96-well Sequenzer-Matte	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
96-well Sequenzer-Platte	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Avant Genetic Analyzer 3100	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Elektrophorese-Gießsystem	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Entsorgungsbeutel, autoklav.	Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland
Erlenmeyerkolben (500ml)	Schott Duran, Wertheim/Main, Deutschland
Transparente Folie	Peclan, Kały Wrocławskie, Polen
Glaspipetten (5 und 25ml)	Corning Incorporated, Corning, NY, USA



Handschuhe (Latex)	Ansell, Richmond, VIC, Australien
Handschuhe (Nitril)	Kimberly-Clark, Irving, TX, USA
Hitzeschutzhandschuhe	North by Honeywell, Smithfield, RI, USA
Kälteschutzhandschuhe	Tempshield Cryo-Protection™, Mount Desert, ME, USA
Label Tape Write-On™	Bel-Art Scienceware, Wayne, NJ, USA
Laborflasche (1000ml)	Schott Duran, Wertheim/Main, Deutschland
Markierstift, permanent	Faber-Castell, Stein, Deutschland
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Messzylinder (100 und 250ml)	Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß (0,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatte, Antikörper-beschichtet	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan
Parafilm®M	Pechiney Plastic Packing, Inc., Chicago, IL, USA
Pipette (2,5µl-1ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette pipetman® (2µl-100µl)	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipettenspitze (2,5µl-1ml)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze mit Filter (2,5µl-1ml)	StarLab, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer, macro	Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäß (15ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäß (50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Schere	Lyreco, Marly, Frankreich
Skalpell	Aeskulap AG, Tuttlingen, Deutschland
Uniwire Test Tube Racks	Nalgene/ Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Wischtücher, Kimtech Science	Kimberly-Clark, Irving, TX, USA

## 2.2.6 Geräte

In dieser Arbeit wurden die folgenden Geräte verwendet:

ABI PRISM® Avant Genetic Analyzer 3100	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Eismaschine	Ziegra GmbH, Isernhagen, Deutschland
Electrophoresis Power Supply E835	Consort, Turnhout, Belgien
Elektrophorese, horizontal	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Feinwaage Explorer®	OHAUS Corporation, Parsippany, NJ, USA
Freezer Innova® U725-G -84 °C	New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Inkubator 37 °C	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, Deutschland
Kühlschrank ML402 4 °C	Domestic Medical Systems, Hosingen, Luxemburg
Kühlzelle	Thalheimer Kühlung GmbH, Ellwangen, Deutschland
Magnetrührer MR3000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Microplate Reader Model 680	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Mikrowelle NW-E202W	Panasonic, Kadoma, Japan
Stoppuhr	Oregon Scientific, Tualatin, OR, USA
Taschenrechner SL-300ER	Casio, Shibuya, TKY, Japan
Thermocycler – DNA Engine DYAD™	MJ Research, USA
- mit Alpha Unit Block Assembly	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Tiefkühlschrank -25 °C	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Vortexer – Vortex Genie® 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
Wasseraufbereitung Milli-Q Synth.	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

- Filter Millipak®40 (0,22 µm)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Spectrafuge™ mini	Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA

## 2.2.7 Software

In dieser Arbeit wurde die folgende Software in alphabetischer Reihenfolge verwendet:

Bio-Capt (Fotodokumentation)	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Gene Mapper® 5	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Microplate Manager™ 5.2	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
SPSS-Statistics 21	IBM, Armonk, NY, USA

## 2.3 Klinische Untersuchungen

### 2.3.1 Screening-Untersuchungen der DEMPARK-Studie

Zum Screening gehörte die Durchführung des Mini-Mental-State-Test (MMSE) und Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment (PANDA) sowie die Zuordnung zu einem *Hoehn & Yahr*-Stadium (Hoehn and Yahr, 1967).

#### 2.3.1.1 Mini-Mental State Examination (MMSE)

Der MMSE nach Folstein et al. ist ein weltweit etablierter Screening-Test zur Früherkennung, Verlaufsbeurteilung und Abschätzung der Schwere kognitiver Beeinträchtigungen (Folstein et al., 1975, Lancu and Olmer, 2006). Er ist auch Bestandteil der *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD)-Testbatterie.

Der Test beinhaltet Fragen und Aufgabenstellungen zu fünf Kategorien: zeitliche und örtliche Orientierung, Merkfähigkeit, Aufmerksamkeit und Rechnen, Erinnerung und Sprache. Für jede korrekt durchgeführte Teilaufgabe wird ein

Punkt vergeben, durch Addition kann eine Gesamtpunktzahl von maximal 30 erreicht werden.

Normalwerte liegen im Bereich von 24-30 Punkten. 18-23 Punkte deuten auf ein leichtes, 0-17 Punkte auf ein schweres kognitives Defizit hin (Weyer, 2005).

### 2.3.1.2 Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment (PANDA)

Der PANDA nach Calabrese und Kalbe ist ein für das Screening bei Verdacht auf Demenz im Rahmen einer Parkinson-Erkrankung speziell entwickelter Test. Er beinhaltet außerdem einen kurzen Frageteil zu depressiver Stimmungslage. Zur Einschätzung kognitiver Defizite im Rahmen einer Parkinson-Erkrankung konnte eine höhere Sensitivität (90 % versus 68 %) im Vergleich zum MMSE nachgewiesen werden (Kalbe et al., 2008, Kessler et al., 2007).

### 2.3.1.3 Hoehn & Yahr-Stadium

Die klinische Beurteilung des Ausprägungsgrades der motorischen Symptomatik erfolgte im Rahmen des Screening nach *Hoehn & Yahr*-Stadien (siehe Tab. 2) (Hoehn and Yahr, 1967).

Tab. 2 *Hoehn & Yahr*-Stadien

Stadium	Klinische Beschreibung
0	Kein Anzeichen der Erkrankung
1	Unilaterale Erkrankung
2	Bilaterale Erkrankung, keine Beeinträchtigung der posturalen Reflexe
3	Milde bis moderate, bilaterale Erkrankung; Beeinträchtigung der posturalen Reflexe; unabhängig
4	Schwere Beeinträchtigung; noch fähig, ohne Hilfe zu gehen und zu stehen
5	Ohne Hilfe an Rollstuhl oder Bett gebunden

### 2.3.2 Baseline-Untersuchungen der DEMPARK-Studie

Die DEMPARK-Baseline-Untersuchung erfolgte nach einem vom Zentrum in Marburg vorgegebenen Untersuchungsprotokoll. Dieses umfasste die Erhebung epidemiologischer Daten, eine allgemeine Anamnese, eine umfangreiche neurologische Untersuchung, eine Patientenbefragung bezüglich Depression und Einschränkungen des Alltagslebens sowie eine ausführliche neuropsychologische Testung.

#### 2.3.2.1 Epidemiologische Daten und allgemeine Anamnese

Die im Rahmen der Baseline-Untersuchung erfassten epidemiologischen Daten beinhalteten die Frage nach Alter, Geschlecht, Ethnie und demographischen Daten. In der allgemeinen Anamnese wurden detailliert Beginn der motorischen und kognitiven Symptome, Erstdiagnose und Verlauf der Erkrankung erfragt. Des Weiteren wurden alle bekannten Nebendiagnosen, aktuelle Medikation und die Familienanamnese dokumentiert. Aus den Angaben der Probanden zur schulischen und beruflichen Ausbildungsdauer konnten die kumulierten Gesamtbildungsjahre, die zur Beurteilung der neuropsychologischen Testung und Einteilung in die Subgruppen benötigt wurden, errechnet werden.

Ergänzend wurden Fragebögen zur Evaluation von Depression, Apathie, Lebensqualität und Gesundheitsstatus erhoben. Die Geriatrische Depressionsskala (GDS, *Geriatric Depression Scale*) wurde zum Screening einer depressiven Stimmungslage verwendet. Zur Detektion einer Apathie wurde die *Apathy Evaluation Scale* (AES) genutzt. Lebensqualität und Gesundheitsstatus wurden mittels *Parkinson's Disease Questionnaire* (PDQ-39) und *EuroQol* (EQ-5D) bewertet.

### 2.3.2.2 Neurologische und körperliche Untersuchung

Die körperliche Untersuchung beinhaltete eine allgemeinmedizinische und eine neurologische Untersuchung. Im Rahmen der DEMPARK-Studie wurde eine Beurteilung nach der *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) durchgeführt (Martinez-Martin et al., 1994).

Die UPDRS ist eine mehrdimensionale Fremdbeurteilungsskala, welche aus sechs Subskalen besteht (siehe Tab. 3). Die Beurteilung erfolgt anhand eines definierten Punktevergabesystems mit niedrigen Werten für geringe und hohen Werten für ausgeprägte Beeinträchtigungen (Gancher, 2002).

In die Datenanalyse dieser Arbeit wurden die Werte der Skala III und V zur Einschätzung der motorischen Defizite einbezogen.

**Tab. 3 *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS)-Subskalen**

<b>Subskala</b>	<b>Untersuchte Funktion</b>	<b>Bewertungsspanne</b>
I	Denken, Verhalten, Stimmung	0-4
II	Alltagsaktivitäten	0-4
III	Motorik	0-4
IV	Nebenwirkungen der Therapie	0-4
V	<i>Hoehn &amp; Yahr</i> -Stadium	0-5
VI	Alltagsaktivitäten nach Schwab & England	0-100 %

### 2.3.2.3 Neuropsychologische Testung

Die Einteilung in die Gruppen PD, PD-MCI und PDD erfolgte mittels einer neuropsychologischen Testung (siehe Tab. 4). Diese enthielt die CERAD-Plus-Testbatterie, *Modified Wisconsin Card Sorting Test* (MCST), *Wechsler Memory Scale revised: Zahlenspanne* (WMS-R), *Leistungsprüfsystem 50+ 7 und 9* (LPS 7+9), *Farbe-Wort-Interferenztest* (FWIT, Stroop-Test) und der *Brief Test of Attention* (BTA).

### ***Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease Plus (CERAD-Plus)***

Die CERAD-Testbatterie wurde 1986 ursprünglich zur Detektion der AD entwickelt, hat sich allerdings als Screening-Methode anderer Demenzen, so auch Demenzen mit Lewy-Körperchen, etabliert (Morris et al., 1988, Karrasch et al., 2013, Wolfsgruber et al., 2013). Durch die unterschiedlichen Testungen können Aussagen über Gedächtnis, Orientierung, Sprache und konstruktive Praxis getroffen werden (Satzger et al., 2001).

Der CERAD-Plus beinhaltet die Tests *Verbale Flüssigkeit (Tiere)*, *Boston Naming Test*, *Mini Mental State Examination*, *Wortliste Lernen/Abrufen/Wiedererkennen*, *Figuren Abzeichnen/Abrufen* und in der Erweiterung den *Trail Making Test (TMT) A und B* und *Semantische Wortflüssigkeit (S-Wörter)*.

### ***Modified Wisconsin Card Sorting Test (MCST)***

Der MCST wurde zur Untersuchung von Exekutivfunktionen entwickelt (Nelson, 1976). Der Testperson werden Karten, deren abgebildete Muster sich in Form, Farbe und Anzahl unterscheiden, vorgelegt. Diese sollen nach einer zu Beginn unbekanntem Regel geordnet werden. Durch Rückmeldung des Untersuchers bei falschem Vorgehen soll eine andere Sortierung ausprobiert werden. Ziel ist es also, so schnell wie möglich die korrekte Sortierregel zu erkennen und fortzuführen. In die Bewertung gehen die Anzahl der komplettierten Kategorien, nicht-perseverative und perseverative Fehler ein (Lineweaver et al., 1999).

### ***Wechsler Memory Scale revised: Zahlenspanne (WMS-R)***

Bei dem Subtest *Zahlenspanne* aus der WMS-R sollen Zahlenfolgen in zunehmender Länge, unmittelbar nachdem sie dem Probanden vorgelesen wurden, vorwärts und später auch rückwärts wiedergegeben werden (Härting and Wechsler, 2000). In die Auswertung gehen die Perzentilenäquivalente der Rohwerte korrekt wiedergegebener Zahlenspannen ein. Durch die Verwendung des Tests sollen Pathologien des Kurzzeitgedächtnisses, Aufmerksamkeit und Konzentration erkannt werden (Engel and Hennig-Fast, 2011).

### **Leistungsprüfsystem 50+ 7 und 9 (LPS 7 und 9)**

Im Untertest 7 des *Leistungsprüfsystem 50+* (LPS 50+) (Sturm et al., 1993) sind in Reihen fünf Zahlen oder Buchstaben abgebildet, wovon sich eine in ihrer Ausrichtung von den anderen unterscheidet und so schnell wie möglich markiert werden soll. Für die Bewertung wurden die korrekt detektierten Antworten innerhalb von zwei Minuten gezählt.

Bei dem Untertest 9 des LPS 50+ werden geometrische Formen vorgelegt, bei denen die Seitenränder so schnell wie möglich gezählt werden sollen. Die korrekte Antwort wird unter fünf Antwortmöglichkeiten markiert. Nach drei Minuten Testzeit wurden die korrekten Antworten für die Bewertung gezählt.

Beide Tests dienen der Untersuchung visuospatialer Funktionen (Engel and Hennig-Fast, 2011).

### **Farbe-Wort-Interferenztest (FWIT, Stroop-Test)**

Mithilfe des Stroop-Tests sollen exekutive Hirnfunktionen objektivierbar gemacht werden (Engel and Hennig-Fast, 2011). Der Test besteht aus drei Subtests: Farbwörterlesen, Farbstriche benennen und Interferenzversuch. Im ersten Subtest soll der Proband die in schwarzen Lettern gedruckten Worte *rot*, *gelb*, *grün* und *blau* verlesen. Im zweiten Teil geht es um die Benennung der Farbe von Strichen, welche rot, gelb, grün und blau gedruckt sind. Im dritten Subtest soll die Druckfarbe der Wörter *rot*, *gelb*, *grün* und *blau* so schnell wie möglich fehlerfrei wiedergegeben werden, Wortinhalt und Druckfarbe sind jedoch nicht identisch. Der Untersucher misst für alle drei Subtests die hierfür benötigte Zeit. Der Test wird dreimal hintereinander durchgeführt (Stroop, 1935). Die mittlere Durchführungszeit wurde für die Auswertung verwendet.

### **Brief Test of Attention (BTA)**

Der BTA wird zur Einschätzung der Aufmerksamkeit genutzt. Dem Probanden werden nacheinander Folgen von Zahlen gemischt mit Buchstaben vorgelesen. Beginnend bei vier *Items*, bis zu 18 *Items* pro Folge soll der Proband ohne physische Hilfestellungen zählen, wie viele Buchstaben beziehungsweise wie



viele Zahlen genannt wurden (Schretlen, 1989). Die Anzahl korrekter Lösungen wurde für die kognitive Klassifikation herangezogen.

#### 2.3.2.4 Klassifikation kognitiver Subgruppen

##### **Klassifikation der PD**

Für die Zuordnung zur PD-Gruppe wurden folgende Kriterien verwendet:

1. Parkinson-Erkrankung nach den UK PDSBB-Kriterien (Hughes et al., 1992)
2. Anamnestisch keine signifikanten Beeinträchtigungen bei Alltagsaktivität im sozialen und/oder beruflichen Umfeld oder in der Körperpflege, die auf neuropsychologische Beeinträchtigungen zurückführbar sind
3. Keine Hinweise auf kognitive Beeinträchtigungen in neuropsychologischen Tests (siehe Tab. 4)

##### **Klassifikation der PD-MCI**

Für die Zuordnung zur PD-MCI-Gruppe wurden folgende Kriterien verwendet:

1. Parkinson-Erkrankung nach den UK PDSBB-Kriterien (Hughes et al., 1992)
2. Anamnestische Beschwerden einer kognitiven Beeinträchtigung vom Patienten selbst oder Angehörigen geäußert oder vom Untersucher beurteilt
3. Anamnestisch keine signifikanten Beeinträchtigungen bei Alltagsaktivität im sozialen und/oder beruflichen Umfeld oder in der Körperpflege, die auf neuropsychologische Beeinträchtigungen zurückführbar sind
4. In der neuropsychologischen Testung objektivierte kognitive Einschränkung in mindestens **einer** der fünf kognitiven Domänen *Aufmerksamkeit*, *Exekutivfunktion*, *Gedächtnis*, *Sprache* und *visuospatiale Funktion* (je Domäne reichen Beeinträchtigungen in einem der angezeigten Tests beziehungsweise Subtests) (siehe Tab. 4)

## **Klassifikation der PDD**

Für die Zuordnung zur PDD-Gruppe wurden folgende Kriterien verwendet:

1. Parkinson-Erkrankung nach den UK PDSBB-Kriterien (Hughes et al., 1992)
2. Anamnestisch schleichender Beginn und langsame Progression kognitiver Störungen
3. Anamnestisch signifikante Beeinträchtigungen bei Alltagsaktivität im sozialen und/oder beruflichen Umfeld oder in der Körperpflege, die auf neuropsychologische Beeinträchtigungen zurückführbar sind
4. In der neuropsychologischen Testung objektivierte kognitive Einschränkung in mindestens **zwei** der fünf kognitiven Domänen *Aufmerksamkeit*, *Exekutivfunktion*, *Gedächtnis*, *Sprache* und *visuospatiale Funktion* (je Domäne reichen Beeinträchtigungen in einem der angezeigten Tests beziehungsweise Subtests) (siehe Tab. 4)
5. Kognitive Beeinträchtigungen stellen eine signifikante Verschlechterung im Vergleich zum prämorbidem Funktionsniveau dar

## **Klassifikation einer beeinträchtigten kognitiven Domäne**

Eine kognitive Domäne wurde dann als beeinträchtigt klassifiziert, wenn mindestens ein Testergebnis  $\geq 1,5$  Standardabweichungen (SD) von publizierten Normwerten gesunder Kontrollen in der untersuchten Domäne abwich. Die Normwerte wurden den Handbüchern der jeweiligen Tests entnommen. Daten wurden entweder für Alter alleine oder für Alter und Ausbildung (CERAD, TMT, MCST) korrigiert.

**Tab. 4 Neuropsychologische Testungen**

\* Markierte Tests sind Teil der diagnostischen Zuordnung in die kognitiven Subgruppen

<b>Kognitive Domäne</b>	<b>Instrument/Test-Batterie</b>	<b>(Sub-)Test</b>
<b>Screening</b>	<i>Consortium for the Registry for Alzheimer's Disease</i> (CERAD-Plus)	<i>Mini-Mental State Examination</i> (MMSE)  <i>Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment</i> (PANDA)
<b>Aufmerksamkeit</b>	<b>Stroop-Test *</b>  <b>Brief Test of Attention (BTA) *</b>	Wörter benennen Farben benennen Interferenz  <i>Form Numbers</i> <i>Form Letters</i>
<b>Exekutivfunktionen</b>	<i>Consortium for the Registry for Alzheimer's Disease</i> (CERAD-Plus)  <b>Modified Wisconsin Card Sorting Test</b> (MCST) *	<b>Verbale Flüssigkeit: Kategorie 'Tiere' (semantisch) *</b>  <b>Verbale Flüssigkeit: S-Wörter (phonematisch) *</b> <i>Trail Making Test</i> Teil A <i>Trail Making Test</i> Teil B

Fortsetzung Tab. 4

<p><b>Gedächtnis</b></p>	<p><i>Consortium for the Registry for Alzheimer's Disease (CERAD-Plus)</i></p> <p><i>Wechsler Memory Scale Revised</i></p>	<p><b>Wortliste Gedächtnis *</b></p> <p><b>Wortliste Abrufen *</b></p> <p>Wortliste Wiedererkennen</p> <p>Konstruktive Praxis (Abrufen)</p> <p>Zahlenspanne vorwärts</p> <p>Zahlenspanne rückwärts</p>
<p><b>Sprache</b></p>	<p><i>Consortium for the Registry for Alzheimer's Disease (CERAD-Plus)</i></p>	<p><b>Boston Naming Test *</b></p>
<p><b>Visuospatiale Funktion</b></p>	<p><i>Consortium for the Registry for Alzheimer's Disease (CERAD-Plus)</i></p> <p><i>Leistungsprüfsystem (LPS 50+)</i></p>	<p><b>Konstruktive Praxis *</b></p> <p><b>Subtest 7 (Räumliches Rotieren) *</b></p> <p><b>Subtest 9 (Räumliches Vorstellungsvermögen) *</b></p>

### 2.3.3 Probenentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus einer peripheren Vene. Notiert wurden jeweils die Tageszeit und ob die Probe nüchtern entnommen wurde.

Die weitere Verarbeitung der Proben und DNA-Isolierung erfolgte im Hertie Institut für klinische Hirnforschung in Tübingen.

## 2.4 Analyse der Blutproben

### 2.4.1 Standardmethoden

#### 2.4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur in vitro Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Diese besteht aus drei Schritten: Strangtrennung (Denaturierung), Hybridisierung von Primern (*Annealing*) und DNA-Synthese (Elongation).

Im ersten Schritt der PCR wird die doppelsträngige DNA der Probe denaturiert. Die DNA wird auf etwa 95 °C erhitzt, um die beiden Matrizenstränge zu trennen. Im Folgenden werden Primer den komplementären Bereichen der DNA-Einzelstränge (*Templates*) angelagert (*Annealing*). Primer sind Oligonukleotide mit einer Länge von circa 15-30 Nukleotiden, die mit der Zielsequenz hybridisieren. Sie dienen als Startpunkt für die im nächsten Schritt zugegebene DNA-Polymerase. Die optimale Temperatur dieses Schritts hängt individuell von der Struktur der einzelnen Primer ab und liegt bei 40-70 °C. Im letzten Schritt wird eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase, aus *Thermophilus aquaticus* isoliert) zur Verlängerung der Primer und Generierung der neuen Matrize von 5'- in 3'-Richtung hinzugefügt. Dies erfolgt bei etwa 72 °C, der optimalen Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase, und zusammen mit dem dafür benötigten Kofaktor Magnesiumchlorid.

Nach Durchlaufen des beschriebenen Amplifikationszyklus kann unter optimalen Bedingungen mit dem Entstehen zweier neuer Matrizen aus einem ursprünglichen DNA-Doppelstrang gerechnet werden. Durch Wiederholung des Verfahrens ( $n$ ) ist eine exponentielle Zunahme der DNA-Stränge zu erzielen ( $2^n$ ), wobei die Wiederholungen auf etwa 30-40 Zyklen begrenzt sind, da es zu einer vermehrten Reduktion der Stranglänge kommt.

Bei jeder PCR wurde eine Negativprobe mit H<sub>2</sub>O anstelle von DNA mitgeführt. Die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Vorbereitung der Proben für das anschließende *SNaP-Shot*®-Verfahren genutzt.

#### 2.4.1.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Makromolekülen, wie Proteinen, DNA und RNA in einem elektrischen Feld. Die Laufgeschwindigkeit, und damit die Auftrennung, ist abhängig sowohl von Größe, Ladungsverhältnissen und Formation der Moleküle, als auch von Viskosität und Porenweite der Trägersubstanz und der angelegten Feldstärke. Als Träger für die kolloidalen Moleküle können unterschiedliche Substanzen verwendet werden. Im Folgenden soll Bezug auf die verwendete Agarose-Gelelektrophorese genommen werden.

Agarosegel besteht aus einem dreidimensionalen Netz aus Polysaccharid-Ketten. Sie bilden Poren, die die Moleküle passieren müssen, wodurch die „Siebfunktion“ erklärt wird.

Nach Befüllen der vorgefertigten Gelkammern mit Proben wird eine Spannung angelegt. Im elektrischen Feld wandern die DNA-Moleküle bedingt durch ihre negativ geladenen Phosphat-Reste von der Kathode in Richtung Anode. Je kürzer ein DNA-Molekül ist, desto schneller gelangt es Richtung Anode.

Durch dieses Verfahren lassen sich je nach Agarose-Konzentration Nukleinsäuren im Bereich von 50-50.000 bp auftrennen.

Die bei der vorausgegangenen PCR entstandenen DNA-Amplifikationsprodukte können mit diesem Verfahren weiter dahingehend analysiert werden, ob sie in ausreichender Menge und nicht verunreinigt vorliegen. Zur Beurteilung auf Verunreinigung wird die bei der PCR enthaltene Negativprobe mit H<sub>2</sub>O ebenfalls aufgetragen.

#### 2.4.1.3 Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Sandwich-ELISA)

*Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* ist ein gängiges laborchemisches Verfahren zur antikörperbasierten, photometrischen Konzentrationsbestimmung von Antigenen in einer Probe. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Sandwich-ELISA werden eine Standardreihe und die Proben in eine mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Diese primären Antikörper („Coating

Antibodies“) reagieren spezifisch auf ein Epitop des zu detektierenden Antigens und binden dieses während der ersten Inkubationszeit. Im Folgenden wird die Platte mit Waschpuffer gespült, um die überschüssigen, nicht gebundenen Bestandteile zu entfernen. In einer zweiten Inkubation binden die dazugegebenen sekundären Antikörper („Labeled Antibodies“) an ein anderes Epitop. Durch erneutes Auswaschen wird auch hier der ungebundene Überstand entfernt. Der entstandene Komplex aus Antigenen umgeben von den beiden Antikörpern erklärt die Namensgebung „Sandwich-ELISA“.

Im letzten Schritt erfolgt die Zugabe des Chromogens. Dieses erzeugt eine Farbreaktion, die der Konzentration des Substrats entspricht. Nach dritter Inkubation und Verwendung einer *Reaktionsstop*-Lösung kann eine extinktiometrische Konzentrationsbestimmung der Proben anhand einer durch die Standardreihe erstellten Standardkurve erfolgen.

Eine Standardreihe wird anhand von Verdünnungsstufen eines Standardproteins zur Kalibrierung ebenfalls photometrisch gemessen.

#### **2.4.2 Genotypisierung der SNPs mithilfe des *SNaP-Shot*®-Verfahrens**

Der nach dem Standardverfahren durchgeführten PCR schließt sich eine *SNaP-Shot*®-PCR (modifiziert nach Sanger, 1977) an. Bei dieser wird der Primer um ein Nukleotid verlängert. Aus diesem Grund wird hierbei auch nur ein einzelner Primer verwendet. Die DNA-Polymerase ist in dem verwendeten *SNaP-Shot*® *Ready Reaction Mix* enthalten, ebenso wie mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierte Didesoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTPs). Die an der 3'-Position der Ribose nicht vorhandene Hydroxylgruppe bei diesen Varianten führt dazu, dass keine Verbindung zum nächsten Nukleotid hergestellt werden kann, und es somit zu einem Kettenabbruch kommt.

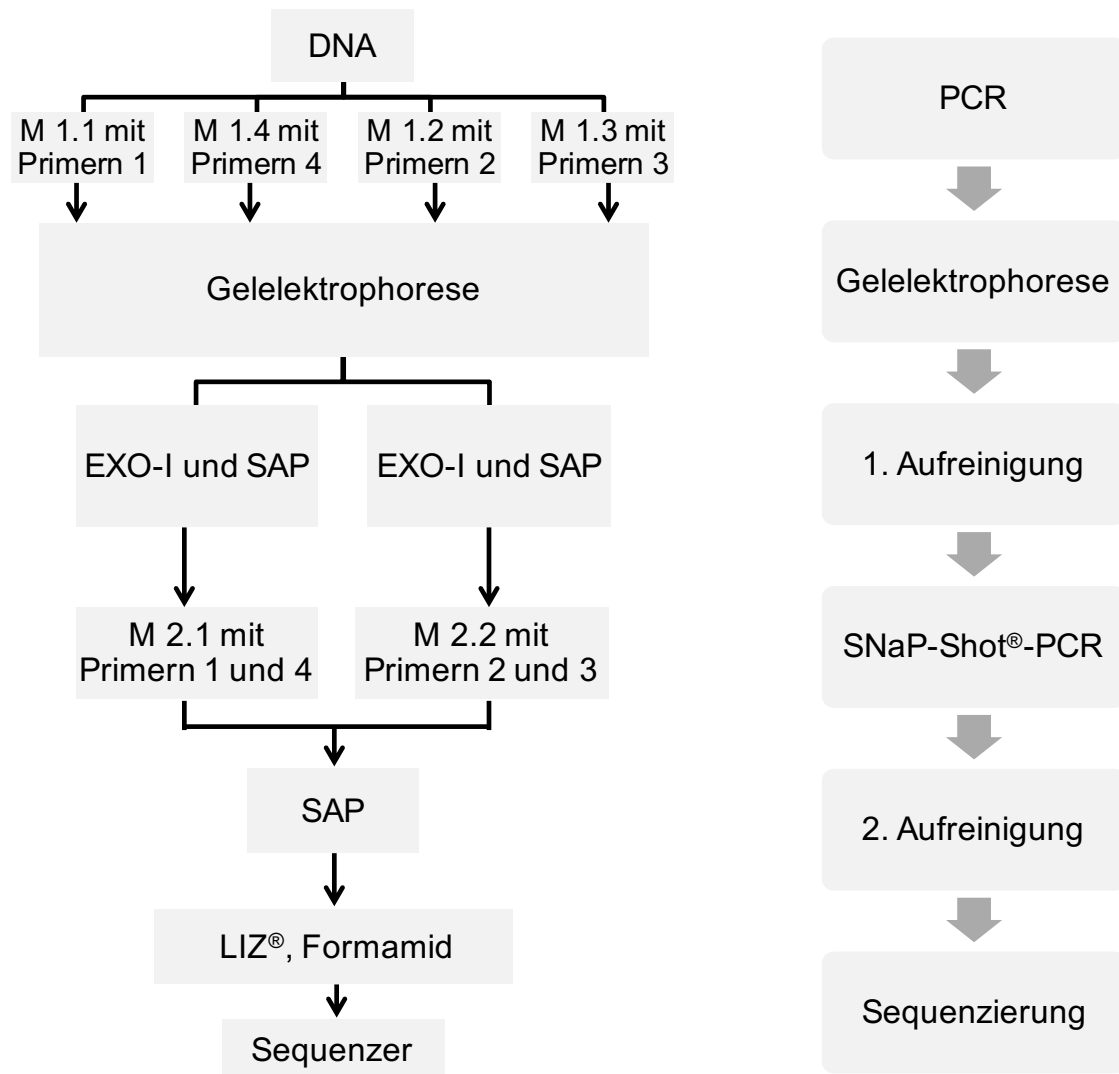
Der Nachweis der Nukleotidabfolge und damit des SNP-Genotyps im *SNaP-Shot*®-PCR-Amplifikat erfolgt mittels Kapillarelektrophorese im Sequenzer. Bei diesem Verfahren werden die Ketten unterschiedlicher Länge zunächst der Größe nach aufgetrennt. Jeder Fluoreszenzfarbstoff einer Base ist einer Farbe zugeordnet (Adenin = grün, Cytosin = schwarz, Guanin = blau, Thymin = rot).

Der Farbstoff der markierten ddNTPs am Ende einer Nukleotidkette wird mit einem Laser angeregt und die unterschiedlich emittierten Wellenlängen der Basen detektiert. Die Länge des eingebauten *SNaP-Shot*®-Primers bestimmt hierbei die Laufgeschwindigkeit (ähnlich der Gelelektrophorese, siehe Kapitel 2.4.1.2), so dass mehrere Fragmente verschiedener Genotypisierungen in einem Sequenzierlauf zusammengefasst werden können (sog. *Multiplex*). Voraussetzung hierfür ist, dass die jeweiligen *SNaP-Shot*®-Primer sich in ihrer Länge unterscheiden. Durch das Multiplex-Verfahren ist bei hohen Probenzahlen eine raschere Probenanalyse möglich.

Die einzelnen Schritte bis zur DNA-Sequenzierung sind zur Übersicht nachfolgend aufgeführt (siehe auch Abb. 6).

- a) PCR
- b) Gelelektrophorese
- c) Erste Aufreinigung (Purifikation)
- d) *SNaP-Shot*®-PCR
- e) Zweite Aufreinigung (Post-Extensionsbehandlung)
- f) Kapillarelektrophorese im *Sequencer*





**Abb. 6 Ablauf der DNA-Sequenzierung**

Abkürzungen: DNA: Desoxyribonukleinsäure, EXO-I: Exonuklease-I, M: Mastermix, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten PCR wurde ein komplettes *Risk-Panel* angefertigt. Das bedeutet, dass eine Reihe von bekannten genetischen Veränderungen gleichzeitig untersucht werden konnten. Nicht alle dieser Marker sind Gegenstand dieser Arbeit.

Vor Beginn der Versuche wurden die DNA-Proben durch Verdünnung mit TE-Puffer auf die gleiche Konzentration (10ng/µl) eingestellt.

a) PCR

Die Herstellung der Ansätze (*Mastermixe*) für die PCR erfolgte nach den folgenden, tabellarisch aufgeführten Schemata (siehe Tab. 5 und Tab. 6). Die Angaben beziehen sich auf je eine Probe.

**Tab. 5 Primer für die jeweiligen Mastermixe der Polymerase-Kettenreaktion**

\* Statistisch ausgewertete Einzelnukleotid-Polymorphismen sind markiert

Mastermix	1	2	3	4
Primer	CST3	MAPT-H1C	<b>MAPT*</b>	STK39
	<b>APOE*</b>	<b>LRRK2*</b>	PDXK	
		<b>SNCA*</b>	PITX3	
		BST1	LINGO1	
		MDR1	CCDC62	
		NEP		

Abkürzungen: APOE: Apolipoprotein E, BST1: bone marrow stromal cell antigen 1, CCDC62: coiled-coil domain containing 62, CST3: Cystatin C, LINGO1: Leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing nogo (neurite outgrowth inhibitor) receptor-interacting protein 1, LRRK2: Leucin-reiche Repeat-Kinase 2, MAPT: Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau, MAPT-H1C: H1C-Haplotyp des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, MDR1: Multidrug Resistance 1, NEP: Neprilysin, PDXK: Pyridoxalkinase, PITX3: paired like homeodomain 3, SNCA:  $\alpha$ -Synuklein, STK39: serine/threonine kinase 39

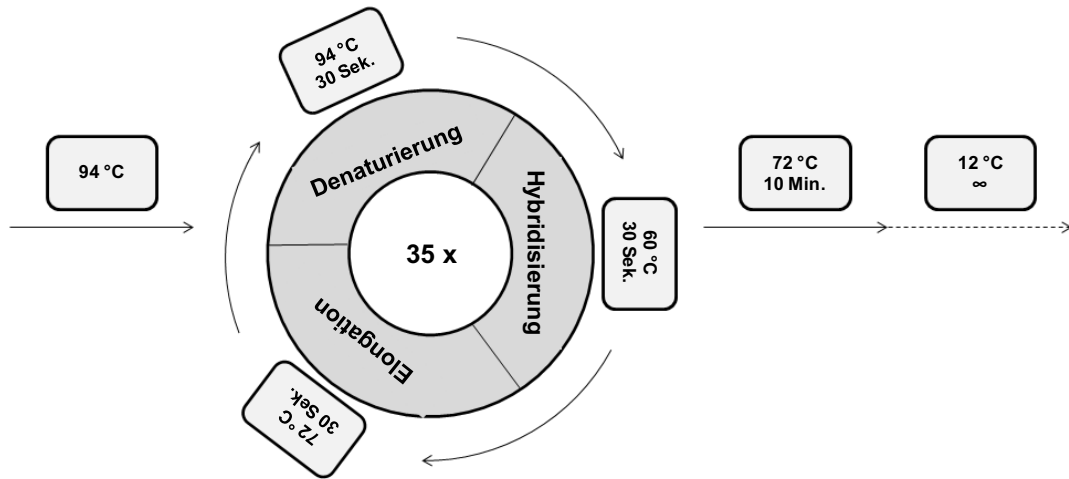
**Tab. 6 Pipettierschema der Polymerase-Kettenreaktion-Mastermixe**  
 siehe hierzu \* 2.2.1, \*\* 2.2.2 und \*\*\* 2.2.3

	<b>Mastermix 1 für Ansatz 1.1 [in µl]</b>	<b>Mastermix 2 für Ansatz 1.2 [in µl]</b>	<b>Mastermix 3 für Ansatz 1.3 [in µl]</b>	<b>Mastermix 4 für Ansatz 1.4 [in µl]</b>
<b>TE-Puffer (10X)**</b>	3,0	3,0	3,0	3,0
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)**</b>	0	1,8	1,8	0
<b>H<sub>2</sub>O</b>	6,4	3,2	3,8	8,0
<b>dNTPs (10 mM)**</b>	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>Primer <i>forward</i> jeweils (10 µM)</b>	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>Primer <i>reverse</i> jeweils (10 µM)</b>	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>Polymerase***</b>	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>DMSO*</b>	1,0	0	0	0

Abkürzungen: DMSO: Dimethylsulfoxid, dNTPs: Desoxyribonukleosidtriphosphate, H<sub>2</sub>O: Wasser, MgCl<sub>2</sub>: Magnesiumchlorid, TE-Puffer: Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer

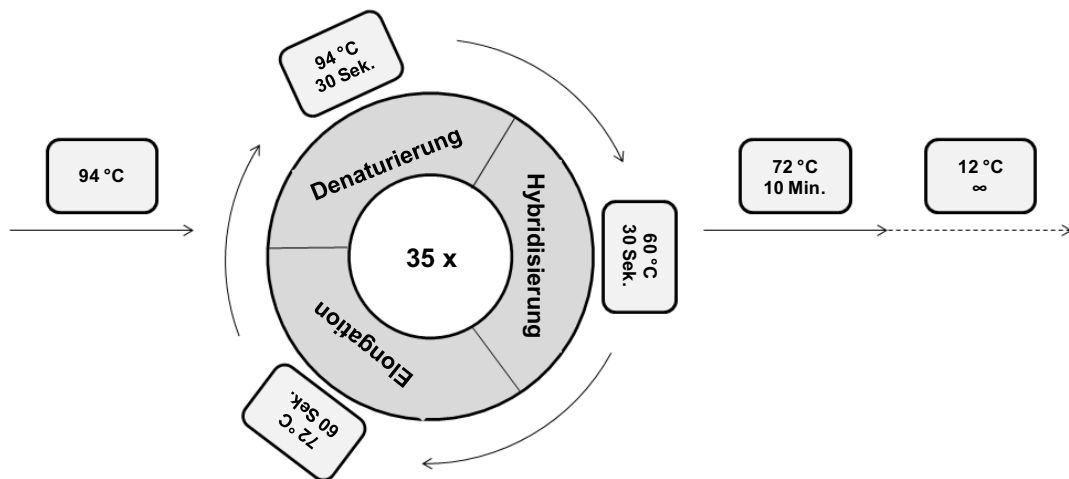
Zu jedem Mastermix wurden 3µl DNA-Probe gegeben, sodass vier Ansätze mit dem Volumen 12µl erhalten wurden. Dieses Vorgehen wurde für jede einzelne DNA-Probe des Kollektivs durchgeführt und einmalig pro PCR eine Leerprobe mit 3µl H<sub>2</sub>O angefertigt.

Anschließend durchliefen die Probenansätze den PCR-Prozess mit Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation im Thermocycler, siehe hierzu Abb. 7 und Abb. 8 sowie Tab. 24.



**Abb. 7 Polymerase-Kettenreaktion-Thermocycler-Programm für Ansatz 1.1, 1.2 und 1.3**

Abkürzungen: Min.: Minuten, Sek.: Sekunden



**Abb. 8 Polymerase-Kettenreaktion-Thermocycler-Programm für Ansatz 1.4**

Abkürzungen: Min.: Minuten, Sek.: Sekunden

## b) Gelelektrophorese

Zunächst erfolgte die Herstellung des 1%igen Agarosegels. Hierzu wurden 2g Agarose mit 200ml TBE-Puffer aufgekocht und anschließend 5µl Ethidiumbromid unter Rühren hinzugefügt. Ethidiumbromid ermöglicht die Sichtbarmachung der DNA-Banden unter UV-Licht. Diese noch flüssige Mischung wurde in die Form mit eingesteckten Kämmen gefüllt. Die durch Abkühlung entstandene Gelmatte wurde bis zur Nutzung bei 4 °C in transparenter Folie gelagert.

Die angefertigte Gelmatte wurde in die Elektrophorese-Apparatur eingelegt und mit TBE-Puffer bis zur Markierungslinie aufgefüllt. Vorhandene Luftblasen wurden ausgestrichen. In die erste Kammer der Gelmatte wurden 3,5µl des Längenmarkers (*GeneRuler DNA Ladder*) pipettiert, in jede weitere Kammer 3,5µl PCR-Produkt gemischt mit Bromphenolblau-Marker. In eine letzte Kammer wurde das PCR-Produkt der Negativkontrolle gemischt mit Bromphenolblau aufgetragen. Durch diese Färbung des Produkts ist eine visuelle Kontrolle der Laufweite während der Elektrophorese möglich, und das enthaltene Glycerol führt zu einem Absinken der Probe in die Geltasche.

Nach Anschließen einer Spannung von 150-200 V für etwa 30 Minuten konnten die Banden unter UV-Licht im Geldokumentationssystem sichtbar gemacht und abfotografiert werden. Beispiele hierfür finden sich im Anhang (siehe Abb. 29 und Abb. 30).

Das Vorhandensein von Banden in der Negativkontrolle spricht für eine Verunreinigung. In diesem Fall wurden die Proben verworfen und die PCR wiederholt.

c) Erste Aufreinigung (Purifikation)

Die erste Aufreinigung erfolgte zur Entfernung (Verdau) überschüssiger Primer und dNTPs. Zunächst wurde das Enzym Exonuklease (EXO)-I zehnfach verdünnt.

Verdünnung EXO-I (1:10)

0,1µl EXO-I

0,5µl Tris-Ethylendiamintetraessigsäure (TE)-Puffer

0,4µl H<sub>2</sub>O

Im Folgenden konnten jeweils zwei Ansätze nach dem folgenden Pipettierschema zusammengefügt werden.

- 1) 7,5µl PCR-Produkt Ansatz 1.1  
+ 7,5µl PCR-Produkt Ansatz 1.4

---

15µl PCR-Produkt (im Weiteren Ansatz 2.1 genannt)

- 2) 7,5µl PCR-Produkt Ansatz 1.2  
+ 7,5µl PCR-Produkt Ansatz 1.3

---

15µl PCR-Produkt (im Weiteren Ansatz 2.2 genannt)

Zu den beiden neuen PCR-Produkt-Ansätzen wurden jeweils 2µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und 1µl verdünnte EXO-I gegeben. Der Verdau der Ansätze 2.1 und 2.2 wurde im Thermocycler mit einstündiger Inkubation bei 37 °C und fünfzehnminütiger Inaktivierung bei 75 °C durchgeführt. Im Anschluss konnten die Proben bei 4 °C gelagert werden.

d) *SNaP-Shot*®-PCR

Für den Schritt der *SNaP-Shot*®-PCR wurden zwei Primer-Mixe vorbereitet. Diese wurden nach dem folgenden Schema pipettiert, wobei die Primer des ersten Mastermixes denen von Ansatz 1.1 und 1.4 und diejenigen des zweiten Mastermixes denen von Ansatz 1.2 und 1.3 zuzuordnen sind (siehe Tab. 7 und Tab. 8).

**Tab. 7 Primer-Mixe für die SNaP-Shot®-Polymerase-Kettenreaktion-Mastermixe**

\* Statistisch ausgewertete SNPs sind markiert

Primer-Mix 1		Primer-Mix 2	
Primer	Volumen [in µl]	Primer	Volumen [in µl]
<i>CST3</i>	0,5	<i>MAPT-H1C</i>	0,5
<b><i>APOE1*</i></b>	0,5	<b><i>LRRK2*</i></b>	1,0
<i>APOE2</i>	0,6	<b><i>SNCA*</i></b>	0,7
<i>STK39</i>	1,5	<i>BST1</i>	0,5
		<i>MDR1</i>	0,5
		<i>NEP</i>	0,5
		<b><i>MAPT*</i></b>	0,7
		<i>PDXK</i>	0,1
		<i>PITX3</i>	1,0
		<i>LINGO1</i>	0,5
		<i>CCDC62</i>	0,3

Abkürzungen: APOE: Apolipoprotein E, BST1: bone marrow stromal cell antigen 1, CCDC62: coiled-coil domain containing 62, CST3: Cystatin C, LINGO1: Leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing nogo (neurite outgrowth inhibitor) receptor-interacting protein 1, LRRK2: Leucin-reiche Repeat-Kinase 2, MAPT: Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau, MAPT-H1C: H1C-Haplotyp des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, MDR1: Multidrug Resistance 1, NEP: Neprilysin, PDXK: Pyridoxalkinase, PITX3: paired like homeodomain 3, SNCA:  $\alpha$ -Synuklein, STK39: serine/threonine kinase 39



Tab. 8 Pipettierschema Mastermixe der *SNaP-Shot*®-Polymerase-Kettenreaktion

	Mastermix 1 für Ansatz 2.1 [in µl]	Mastermix 2 für Ansatz 2.2 [in µl]
H <sub>2</sub> O	1,9	0
<b>Multiplex Ready Reaction Mix</b>	2,0	2,0
<b>Primer-Mix</b>	<i>Primer-Mix 1</i>	<i>Primer-Mix 2</i>

Der *SNaPShot*® *Multiplex Ready Reaction Mix* enthält eine Polymerase, ddNTPs und Puffer. Von ihm müssen 2µl im Mastermix enthalten sein, der Ansatz wurde entsprechend der Primervolumina mit Wasser aufgefüllt. Zu beiden Mastermixen wurden 3µl des einmalig aufgereinigten PCR-Produkts gegeben, woraus sich zwei Ansätze von 10µl ergaben.

Anschließend durchlaufen die Probenansätze den PCR-Prozess im Thermocycler, siehe Abb. 9 und Tab. 24.

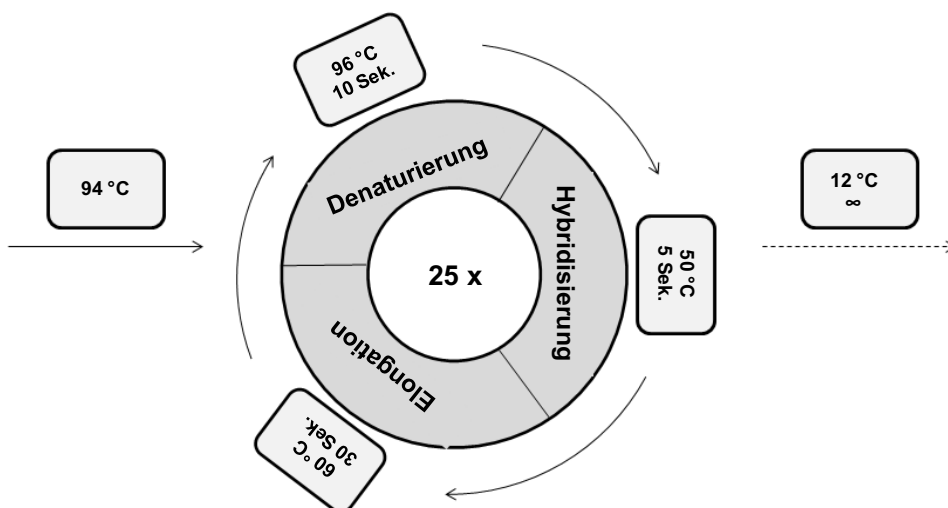


Abb. 9 *SNaP-Shot*®-Polymerase-Kettenreaktion-Thermocycler-Programm für Ansätze 2.1 und 2.2

Abkürzungen: Sek.: Sekunden

e) Zweite Aufreinigung

Für die zweite Aufreinigung wurden 5µl des Ansatzes 2.1 und 5µl des Ansatzes 2.2 zu 1µl SAP pipettiert und im Thermocycler erneut mit einstündiger Inkubation bei 37 °C und fünfzehnminütiger Inaktivierung bei 75 °C verdaut. Durch diese sogenannte „Post-Extensionsbehandlung“ sollen überschüssige ddNTPs entfernt werden.

f) DNA-Sequenzierung

1µl des aufgereinigten Amplifikats wurde mit 10µl Formamid und 0,2µl LIZ®-Standard in eine für Sequenzierungen geeignete 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und bis zur Sequenzierung selbst bei 4 °C weniger als 24 Stunden gelagert.

Die Sequenzierung erfolgte im *Avant Genetic Analyzer 3100*. Zur Auswertung wurden die Ergebnisse mit der *Gene Mapper Software* als Elektropherogramm dargestellt. Dabei werden Farbkurven manuell den verschiedenen Genotypisierungen des *Multiplex* zugeordnet.

### **2.4.3 Messung der Osteopontin-Konzentration im Plasma**

Die Messung der Osteopontin-Konzentration im Plasma erfolgte mit dem Sandwich-ELISA „Human Osteopontin Assay Kit“ der Firma IBL, Japan (siehe Kapitel 2.4.1.3). Dieses ist für Bestimmungen von humanem nativen und rekombinanten OPN in Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Plasma, Urin und Zellkulturmedien zugelassen.

Als primärer Antikörper diente „Anti-Human OPN (O-17) Rabbit IgG Affinity Purify“, der mit einem Teil des N-Terminus des humanen OPN reagiert.

Als sekundärer Antikörper diente „Anti-Human OPN (10A16) Mouse IgG MoAb Fab'-HRP“, welcher an einem Teil der rechten Seite der Thrombin-Spaltstelle des humanen OPN reagiert. Er ist mit Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*), einem Reporterenzym zur Signalverstärkung des Chromogens gekoppelt.

Als Chromogen wurde Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Diese lichtempfindliche Benzidin-Verbindung führt bei Zugabe zu dem antikörpergebundenen OPN der Proben zu einer Blaufärbung. Der Farbumschlag wird durch Oxidation durch das in der HRP enthaltene Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) hervorgerufen. Nach einer 30-minütigen lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die schwefelsäurehaltige Stop-Lösung hinzugefügt. Diese bewirkt einen gelben Farbumschlag, der proportional zur OPN-Konzentration ist. Im Anschluss können die Absorptionswerte im Spektralphotometer bei 450nm innerhalb von 30 Minuten gemessen werden.

Die Tests wurden nach der im Kit mitgelieferten Anleitung durchgeführt (<http://www.ibl-america.com/pdf/newIBLelisa/27158.pdf>).

In dieser Arbeit wurden die Proben zwanzigfach ( $12\mu l$  Plasma:  $228\mu l$  Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA, *Enzyme Immunoassay*)-Puffer) verdünnt. Dieses Verdünnungsverhältnis ergab sich aus der Durchführung eines Probelaufs und Anpassung an die Kalibrierungskurve des Standards. Ähnliche Werte sind in Versuchen vorangegangener Arbeiten mit dem Kit beschrieben worden.

Der Standard wurde nach Protokoll als Verdünnungsreihe mit den Werten 320 – 160 – 80 – 40 – 20 – 10 – 5 – 0 ng/ml angefertigt. Die spektralphotometrischen Messwerte des Standards wurden als logarithmische Kalibrierungskurve aufgezeichnet, anhand derer eine Umrechnung der Extinktionen der Proben in OPN-Konzentrationen möglich war. Als Negativkontrolle wurde ein *Well* der Mikrotiterplatte mit  $100\mu l$  EIA-Puffer befüllt, ohne dass nach der ersten Inkubation sekundäre Antikörper verwendet wurden. Der Messwert der Kontrolle wurde als Extinktion der Pufferlösung selbst gewertet und von den Standard- und Probenextinktionen abgezogen.

Standard, Negativkontrolle und Proben wurden jeweils zweifach pro ELISA aufgetragen. Durch diese Doppelbestimmung sollten Messfehler aufgedeckt werden. Der Mittelwert der beiden Proben wurde als Arbeitswert verwendet. Eine dritte Messung der Proben erfolgte, wenn sich die ersten beiden Messwerte um mehr als 30 % unterschieden.

## 2.5 Statistische Auswertung

Die Datenanalyse erfolgte mit der Statistik-Software *IBM SPSS Statistics 21*. Die statistische Auswertung erfolgte zur Überprüfung einer aufgestellten Alternativhypothese ( $H_1$ ). Eine Alternativhypothese beschreibt die Annahme eines vom bisherigen Wissensstand abweichenden oder nicht erfassten Zusammenhangs. Abzugrenzen hiervon gilt es die Nullhypothese ( $H_0$ ). Diese steht für die Annahme, dass sich kein signifikanter Unterschied zu bisherigen Erkenntnissen ergibt und damit die Alternativhypothese abgelehnt werden muss. Die *Gruppeneinteilung* erfolgte in PD, MCI und PDD. Die quantitativen Merkmale *OPN-Konzentration, Alter, Bildungsjahre, Alter bei Erkrankungsbeginn, Erkrankungsdauer*, die Ergebnisse der MMSE- und PANDA-Screening-Tests, *UPDRS-III, Hoehn und Yahr-Stadium* und *GDS* wurden initial ebenso wie die qualitativen Merkmale *Geschlecht, Familienanamnese* und *genetische Varianten* auf Normalverteilung durch Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests untersucht. Anschließend wurde die Assoziation mit der *Gruppeneinteilung* untersucht. Hierfür wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Hypothesentest zur Analyse unabhängiger Stichproben durchgeführt.

Die Variablen wurden auf statistisch signifikante Zusammenhänge beziehungsweise Unterschiede unter Verwendung von Hypothesentestungen analysiert. Zur Beurteilung, welche Faktoren Einfluss auf die *Gruppeneinteilung* haben, wurden sowohl der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (OPN-Level, Alter, Krankheitsdauer, Bildungsjahre) als auch der Mann-Whitney-U-Homogenitätstest (SNPs, Familienanamnese, Geschlecht) angewandt.

Im Folgenden wurde für die intervallskalierte Variable *OPN-Level* eine Beeinflussung durch andere intervallskalierte Variablen (Alter, Krankheitsdauer, Bildungsjahre) mithilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman und des Korrelationskoeffizienten nach Pearson beurteilt. Nominalskalierte Variablen (Geschlecht, SNPs, Familienanamnese) wurden unter Verwendung des t-test für unabhängige Stichproben und des Homogenitätstests nach Mann-Whitney-U überprüft.

Die Variable *Familienanamnese* wurde auf eine Assoziation mit den genetischen Varianten mit dem Chi<sup>2</sup>-Test untersucht.

Zuletzt wurden Regressionsanalysen ((multinominale) logistische Regression, ordinal logistische Regression, lineare Regression) zur Ermittlung der Unabhängigkeit der Einflüsse auf die Gruppeneinteilung und das OPN-Level angewandt.

Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ , also eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 5 \%$ , angenommen.

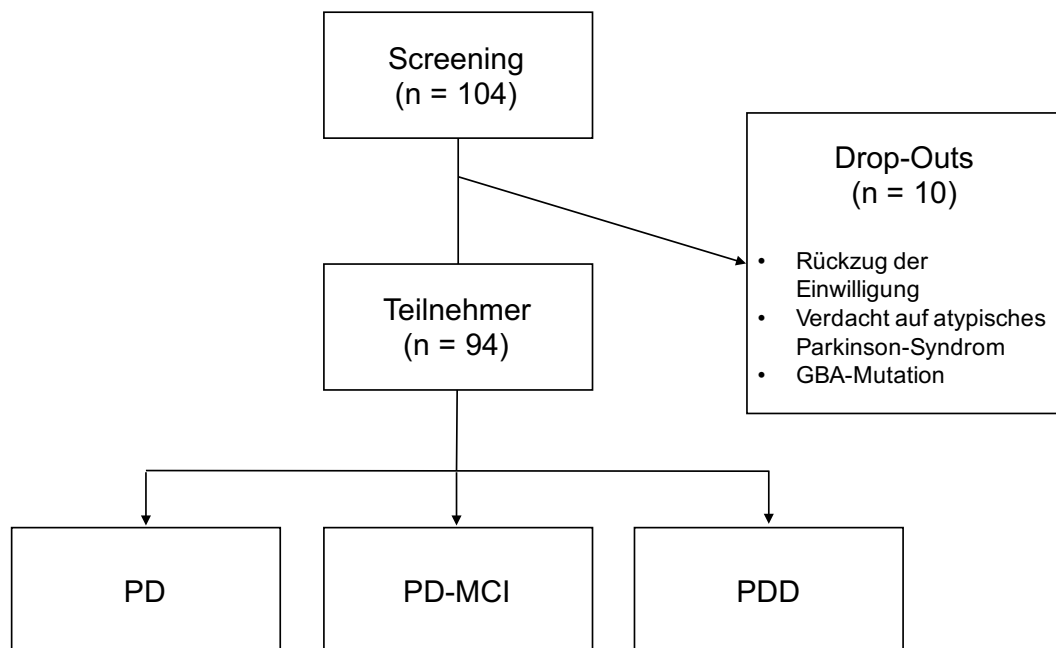
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kohortenbeschreibung

#### 3.1.1 Datenerfassung

Zur Baseline-Untersuchung in Tübingen konnten 104 Probanden rekrutiert werden, von denen 10 Probanden nachträglich ausgeschlossen werden mussten (*Drop-Outs*). 94 Teilnehmer konnten somit in die Studie eingeschlossen und untersucht werden.

Der Ausschluss der 10 Drop-Out-Patienten erfolgte bei nachträglichem Rückzug der Einwilligungserklärung der Patienten, Nachweis einer Glucocerebrosidase (*GBA*)-Mutation und bei klinisch-anamnestischem Verdacht auf ein atypisches Parkinson-Syndrom (siehe Abb. 10).



**Abb. 10 Flussdiagramm des Patienteneinschlusses**

Abkürzungen: *GBA*: Glucocerebrosidase, *n*: Anzahl, *PD*: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, *PDD*: Parkinson-Erkrankung mit Demenz, *PD-MCI*: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit

### 3.1.2 Charakteristika der untersuchten Kohorte

Bei allen Probanden handelte es sich um Kaukasier europäischer Herkunft. Gemessen zum Zeitpunkt der Untersuchung betrug das durchschnittliche Alter des Patientenkollektivs 68,8 Jahre. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 58,7 Jahren bei einer durchschnittlichen Erkrankungsdauer von 9,6 Jahren. Die Bildungsjahre lagen im Mittel bei 13,1 Jahren. Insgesamt wurden mehr männliche als weibliche Teilnehmer eingeschlossen. Das Geschlechterverhältnis von Frauen zu Männern war 1:2,8. Eine Zusammenfassung dieser Daten ist in Tab. 9 aufgeführt.

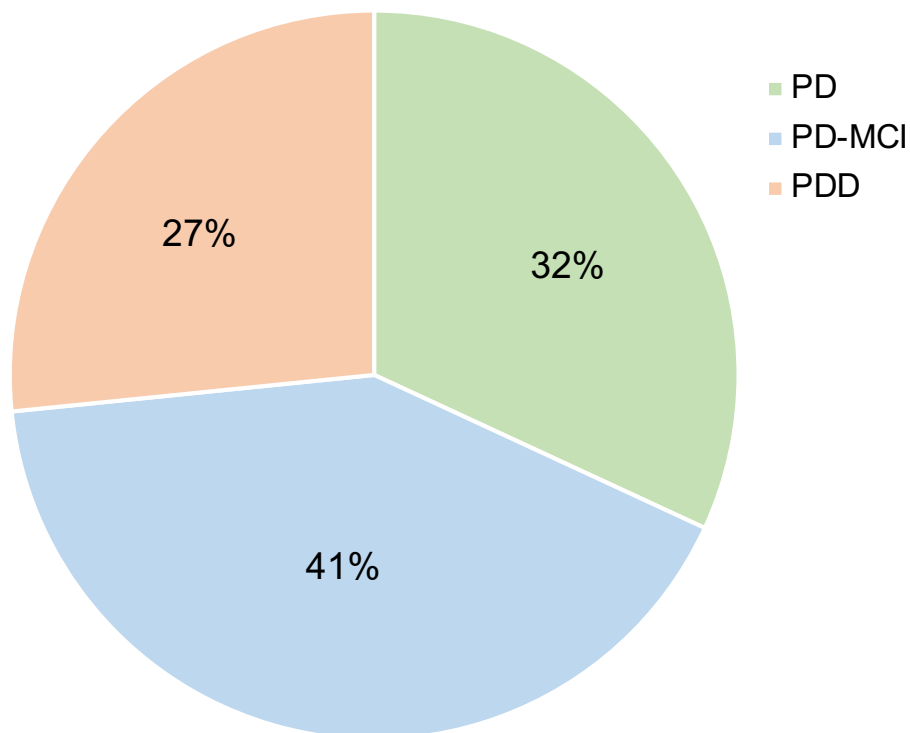
Tab. 9 Charakteristika der untersuchten Kohorte

Variable	
<b>Eingeschlossene Probanden</b> <i>Anzahl</i>	94
<b>Alter [a]</b> <i>Mittelwert ± SD</i>	68,8 ± 7,0
<b>Alter bei Krankheitsbeginn [a]</b> <i>Mittelwert ± SD</i>	58,7 ± 9,4
<b>Erkrankungsdauer [a]</b> <i>Mittelwert ± SD</i>	9,6 ± 6,6
<b>Bildungsjahre [a]</b> <i>Mittelwert ± SD</i>	13,1 ± 3,0
<b>Geschlecht</b> <i>Anzahl (Anteil am Gesamtkollektiv in %)</i>	
Geschlecht - weiblich	25 (26,6 %)
Geschlecht - männlich	69 (73,4 %)

Abkürzungen: a: Jahre, SD: Standardabweichung

### 3.1.3 Einteilung in Untersuchungsgruppen

Die insgesamt 94 untersuchten Patienten teilen sich nach Auswertung der Ergebnisse der neuropsychologischen Testung in 30 ohne kognitive Einschränkungen (PD), 39 mit leichtem kognitivem Defizit (PD-MCI) und 25 mit diagnostizierter Demenz (PDD) (siehe Abb.11).



**Abb. 11 Prozentuale Verteilung des Patientenkollektivs in kognitive Subgruppen**

*Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit Demenz*



## 3.2 Variablenbeschreibung

### 3.2.1 Qualitative und quantitative Variablen

Bei den Merkmalen *Geschlecht*, *Familienanamnese* und *Trägerschaft genetischer Veränderungen* handelt es sich um qualitative Variablen. *Alter*, *Bildungsjahre*, *Alter bei Erkrankungsbeginn*, *Erkrankungsdauer*, *OPN-Konzentration*, die Ergebnisse der MMSE- und PANDA-Screening-Tests, *UPDRS-III*, *Hoehn & Yahr-Stadium* und *GDS* hingegen sind quantitative Variablen, welche nicht normalverteilt waren (siehe Abb. 32-41); der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung war entsprechend für jede der Variablen signifikant (siehe Tab.10).

Tab. 10 Untersuchung der Variablen auf Normalverteilung

Variable	p-Wert
<b>Alter</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Bildungsjahre</b>	<b>0,002</b>
<b>Alter bei Erkrankungsbeginn</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Erkrankungsdauer</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Osteopontin-Konzentration</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Screening-MMSE</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Screening-PANDA</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b><i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale III (UPDRS-III)</i></b>	<b>0,003</b>
<b><i>Hoehn &amp; Yahr-Stadium</i></b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Geriatrische Depressionsskala (GDS)</b>	<b>&lt;0,001</b>

Abkürzungen: MMSE: Mini Mental State Examination, PANDA: Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment

### 3.2.2 Variablenverteilung innerhalb der Subgruppen

#### 3.2.2.1 Variablen der Screening-Untersuchung innerhalb der Subgruppen

Die beiden Screening-Tests MMSE und PANDA zeigten eine geringere Ergebnispunktzahl bei Zunahme des kognitiven Defizits (jeweils  $p < 0,001$ ). Die Ergebnisse sind in Tab. 11 dargestellt.

Der Mittelwert des Screening-MMSE aller Probanden lag bei 27,1 Punkten (Spannweite 15 Punkte, Standardabweichung  $\pm 2,8$  Punkte). Der Mittelwert der PDD-Gruppe lag unterhalb der mittleren Ergebnispunktzahl des Gesamtkollektivs bei 23,7 Punkten mit einer Standardabweichung von  $\pm 2,8$  Punkten (siehe Abb. 42). In der PD-MCI-Subgruppe lag der Mittelwert bei 28,0 Punkte (Standardabweichung  $\pm 1,6$  Punkte); in der PD-Subgruppe lag dieser bei 28,8 (Standardabweichung  $\pm 1,1$  Punkte).

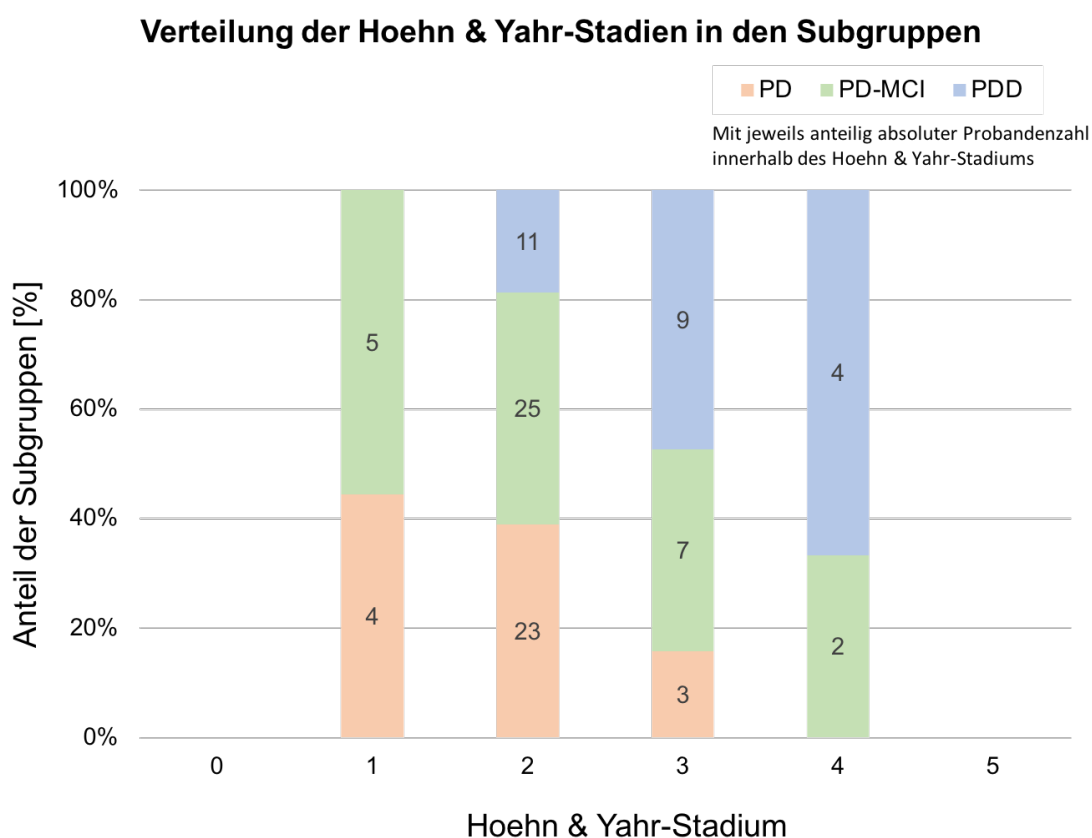
Der Mittelwert des Screening-PANDA lag bei 19,5 Punkten im Gesamtkollektiv (Spannweite 29 Punkte, Standardabweichung  $\pm 7,2$  Punkte). Der Mittelwert der PDD-Gruppe lag unterhalb der mittleren Ergebnispunktzahl des Gesamtkollektivs bei 11,2 Punkten mit einer Spannweite von 19 Punkten und einer Standardabweichung von  $\pm 5,1$  Punkten (siehe Abb. 43). In der PD-MCI-Subgruppe lag der Mittelwert des PANDA bei 20,7 Punkten (Standardabweichung  $\pm 5,6$  Punkte); in der PD-Subgruppe lag dieser bei 24,8 Punkten (Standardabweichung  $\pm 3,7$  Punkte).

Tab. 11 Ergebnisse der Screening-Testungen nach Subgruppen

Variable	Kohorte	PD	PD-MCI	PDD	p-Wert
<b>MMSE</b> <i>Mittelwert <math>\pm</math> SD</i>	27,1 $\pm$ 2,8	28,8 $\pm$ 1,1	28,0 $\pm$ 1,6	23,7 $\pm$ 2,8	<b>&lt;0,001</b>
<b>PANDA</b> <i>Mittelwert <math>\pm</math> SD</i>	19,5 $\pm$ 7,2	24,8 $\pm$ 3,7	20,7 $\pm$ 5,6	11,2 $\pm$ 5,1	<b>&lt;0,001</b>

Abkürzungen: MMSE: Mini Mental State Examination, PANDA: Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, PD-MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, SD: Standardabweichung

Das *Hoehn & Yahr*-Stadium zur Beurteilung des Ausprägungsgrades der motorischen Symptomatik (siehe Methodenteil Kapitel 2.3.1.3) lag bei Probanden mit einer PDD signifikant höher ( $p = 0,001$ ). Bei keinem der untersuchten PDD-Probanden lag eine nur geringe funktionelle Einschränkung mit unilateraler Beteiligung vor. Bei 46 % der untersuchten PDD-Patienten lag ein Stadium 2, bei 38 % ein Stadium 3 und bei 17 % ein Stadium 4 vor. Bei Probanden mit einer PD-MCI waren 5 % im Stadium 1, 18 % im Stadium 2, 64 % im Stadium 3 und 13 % im Stadium 4 während der Screening-Untersuchung. Bei den untersuchten PD-Patienten lag mit 77 % überwiegend ein Stadium 2 vor. 10 % waren im Stadium 1 nach Hoehn und Yahr, 13 % im Stadium 3. Bei keinem der kognitiv nicht beeinträchtigten Teilnehmer lag ein Stadium 4 oder 5 vor (siehe hierzu Abb. 12).



**Abb. 12** Verteilung der *Hoehn & Yahr*-Stadien in den Subgruppen

Abkürzungen: PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, PD-MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit

### 3.2.2.2 Variablen der klinischen Baseline-Untersuchung innerhalb der Subgruppen

In der Screening-Einschätzung mittels *Hoehn & Yahr*-Stadien-Einteilung zeigte sich eine ausgeprägtere motorische Einschränkung bei kognitiv beeinträchtigten Teilnehmern. Dies spiegelt sich auch in der detaillierteren Einschätzung des Schweregrades der motorischen Ausprägung anhand der UPDRS-Skala III wider. Eine hohe Punktzahl wird dort bei einem größeren motorischen Defizit erreicht (siehe Methodenteil Kapitel 2.3.2.2). Die durchschnittlich erreichte Punktzahl des Kollektivs lag bei 25,1 Punkten (Spannweite 48 Punkte, Standardabweichung  $\pm 11,6$  Punkte), bei vorliegender PDD bei durchschnittlich 33,3 Punkten (Spannweite 33 Punkte, Standardabweichung  $\pm 10,25$  Punkte) signifikant höher ( $p < 0,001$ ) (siehe Abb. 44).

In der geriatrischen Depressionsskala (GDS) zeigte sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der depressiven Symptomatik bei vorliegender Demenz ( $p = 0,001$ ). Der Mittelwert der Ergebnispunktzahl lag bei 3,9 Punkten im untersuchten Kollektiv. In der PDD-Gruppe wurde eine mittlere Punktzahl von 5,8 mit einer Spannweite von 12 Punkten und einer Standardabweichung von  $\pm 3,23$  Punkten erreicht (siehe Abb. 45). Die Ergebnisse der Subgruppen hinsichtlich motorischer Einschränkung und Depression sind zur Übersicht in Tab. 12 wiedergegeben.

Die Familienanamnese zeigte keine statistisch signifikante Assoziation zur Subgruppen-Einteilung.

Tab. 12 Durchschnittswerte und Verteilungen der Screening-Daten nach Subgruppen

Variable	Kohorte	PD	PD-MCI	PDD	p-Wert
<b>UPDRS-III</b> <i>Mittelwert ± SD</i>	25,1 ± 11,6	21,6 ± 7,8	22,6 ± 12,5	33,3 ± 10,3	<b>&lt;0,001</b>
<b>GDS</b> <i>Mittelwert ± SD</i>	3,9 ± 3,0	3,1 ± 2,3	3,2 ± 2,9	5,8 ± 3,2	<b>0,001</b>

Abkürzungen: GDS: Geriatrische Depressionsskala, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, PD-MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, SD: Standardabweichung, UPDRS-III: Unified Parkinson's Disease Rating Scale III

### 3.2.2.3 Kovariablen innerhalb der Subgruppen

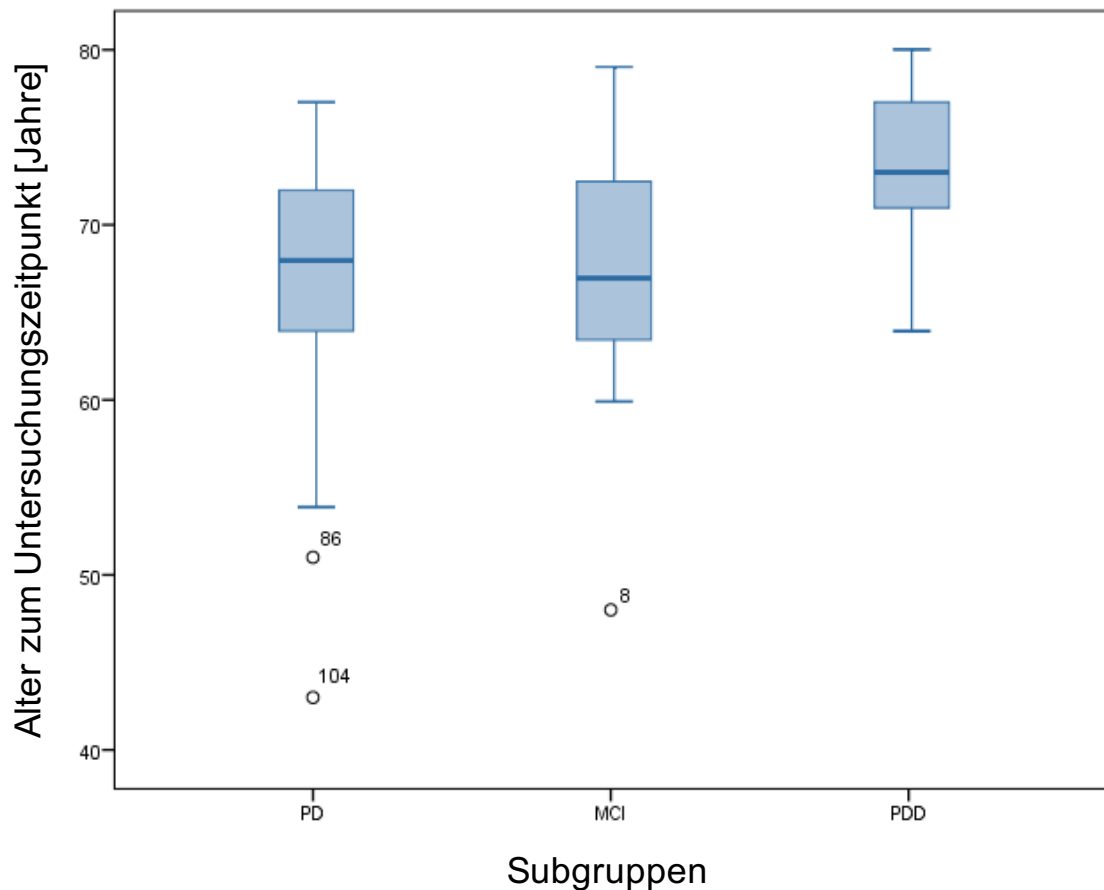
Zur Veranschaulichung der Verteilung innerhalb der Subgruppen PD, MCI und PDD, sind die epidemiologischen Daten für Alter, Bildungsjahre, Erkrankungsalter und Erkrankungsdauer in Boxplot-Diagrammen (siehe Abb. 13 - 16), die Geschlechterverteilung in einem Balkendiagramm (siehe Abb. 17) dargestellt. Diese werden im Folgenden auch als Kovariablen bezeichnet und bei signifikanter Assoziation zur Subgruppeneinteilung in die weiteren Analysen einbezogen. Eine genauere Übersicht über die erhobenen Kovariablen und deren Verteilung innerhalb Subgruppen PD, PD-MCI und PDD soll die folgende Tab. 13 geben.

Tab. 13 Kovariablen nach Subgruppen

Variable	PD	PD-MCI	PDD	p-Wert
<b>Alter [a]</b> <i>Mittelwert ± SD</i>	66,3 ± 8,1	67,9 ± 6,4	73,0 ± 4,3	<b>0,001</b>
<b>Bildungsjahre [a]</b> <i>Mittelwert ± SD</i>	13,9 ± 2,8	13,3 ± 3,0	11,9 ± 2,9	<b>0,023</b>
<b>Alter bei Krankheitsbeginn [a]</b> <i>Mittelwert ± SD</i>	57,5 ± 10,8	58,8 ± 8,7	60,1 ± 9,0	0,770
<b>Erkrankungsdauer [a]</b> <i>Mittelwert ± SD</i>	8,3 ± 5,9	8,6 ± 6,7	12,6 ± 6,7	<b>0,015</b>
<b>Geschlecht</b> <i>Anzahl (%)</i>				0,114
Geschlecht - weiblich	11 (36,7 %)	11 (28,2 %)	3 (12 %)	
Geschlecht - männlich	19 (63,3 %)	28 (71,8 %)	22 (88 %)	

Abkürzungen: a: Jahre, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, PD-MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, SD: Standardabweichung

Das Alter innerhalb der Subgruppen (siehe Abb. 13) war bei Probanden mit begleitender Demenz signifikant höher. Das mittlere Alter des gesamten Kollektivs betrug 68,8 Jahre (siehe Abb. 32). In der Gruppe mit PD ohne kognitives Defizit lag das mittlere Alter bei 66,3 Jahren mit einer Streuung von 43 bis 77 Jahren (Spannweite 34 Jahre). Der in der Abb. 13 dargestellte Median betrug 68 Jahre. In der PD-MCI-Gruppe lag das mittlere Alter bei 67,9 Jahre mit einer Streuung von 48 bis 79 Jahren (Spannweite 31 Jahre). Der Median betrug hier 67 Jahre. In der Gruppe der PDD-Erkrankten betrug das mittlere Alter 73,0 Jahre mit einer Streuung von 64 bis 80 Jahren (Spannweite 16 Jahre). Der Median lag bei 73 Jahren.

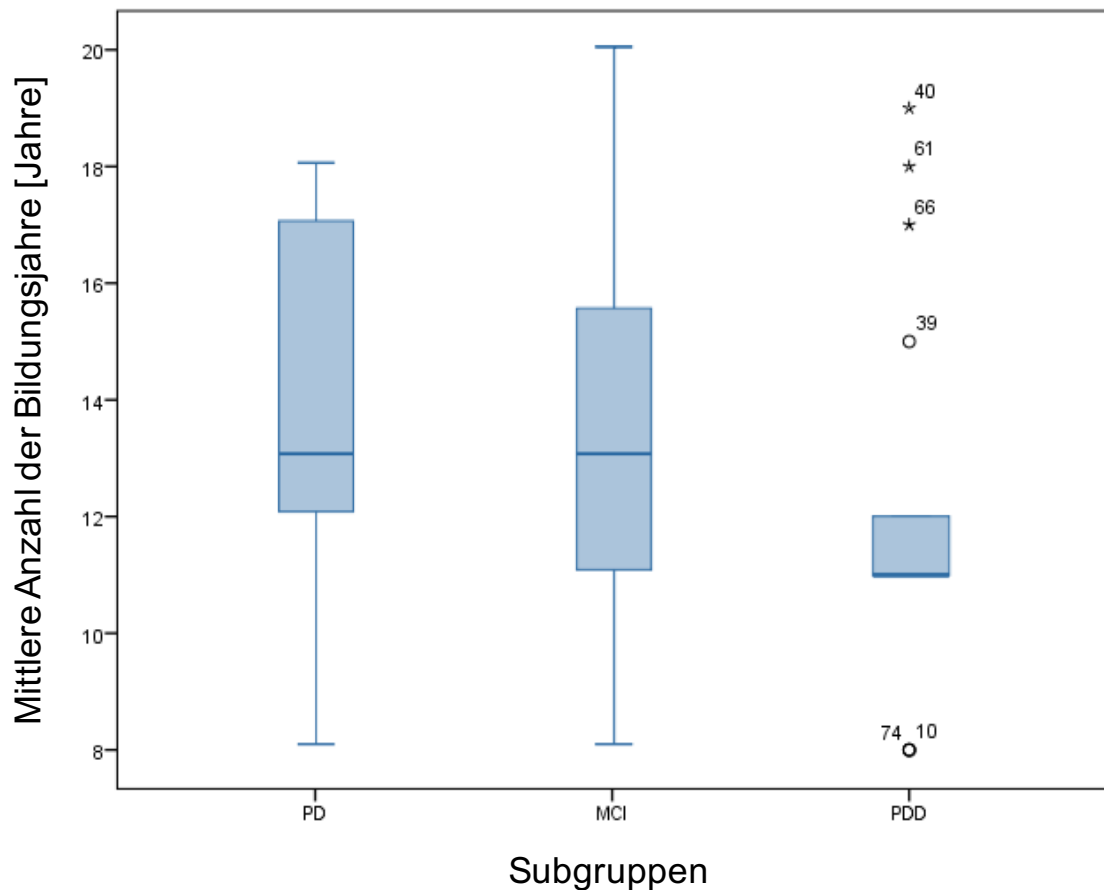


**Abb. 13 Altersverteilung innerhalb der Subgruppen**

Milde Ausreißer sind als ° mit Probandennummer gekennzeichnet.

Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz

Die mittlere Anzahl der Bildungsjahre innerhalb der Untersuchungsgruppen (siehe Abb. 14) war bei den untersuchten PDD-Patienten signifikant niedriger ( $p = 0,023$ ). Die mittlere Anzahl der Bildungsjahre des gesamten Kollektivs betrug 13,1 Jahre (siehe Abb. 33). In der Gruppe der Probanden mit PD betrug die Bildungsjahre im Mittel 13,9 Jahre mit einer Spannweite von 8 bis 18 Jahren (Standardabweichung  $\pm 2,8$  Jahre). In der PD-MCI-Gruppe lagen die Bildungsjahre im Mittel bei 13,3 Jahren mit einer Spannweite von 8 bis 20 Jahren (Standardabweichung  $\pm 3,0$  Jahre). In der Gruppe der PDD-Patienten lag die mittlere Anzahl der Bildungsjahre insgesamt niedriger bei 11,9 Jahren mit einer Spannweite von 8 bis 19 Jahren (Standardabweichung  $\pm 2,9$  Jahre).



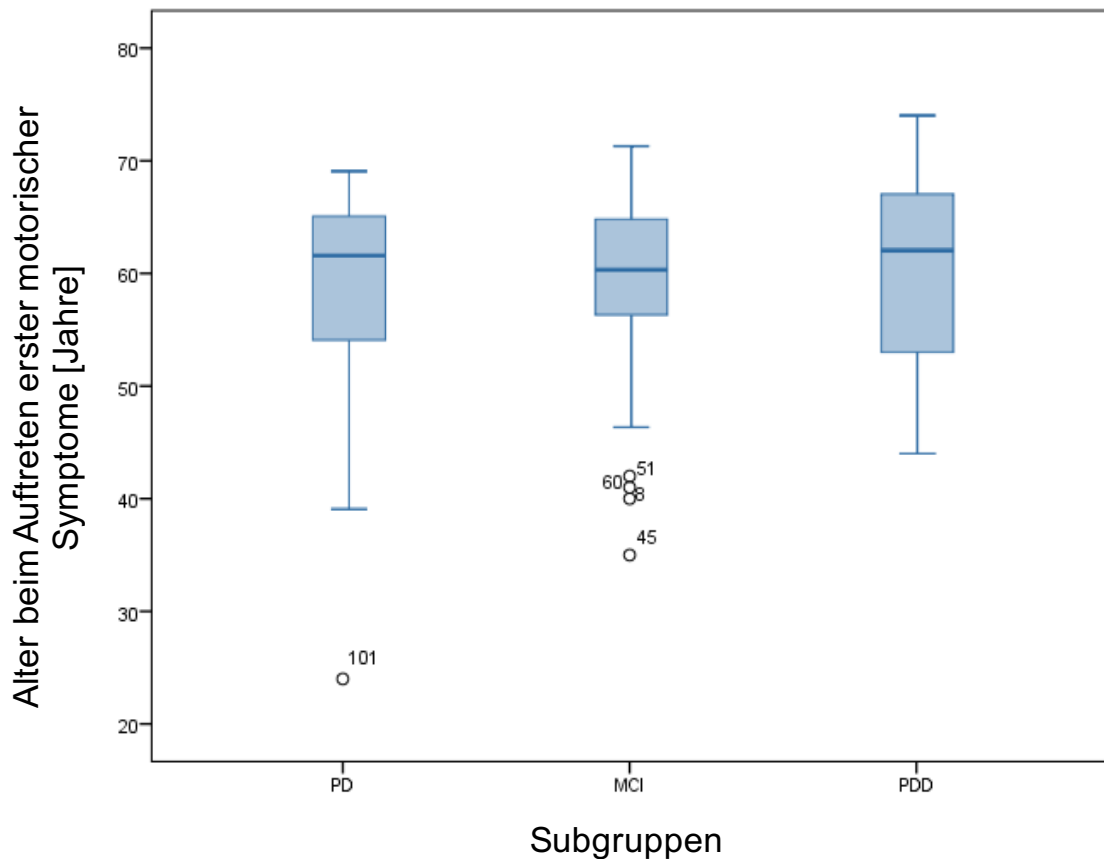
**Abb. 14 Mittlere Anzahl der Bildungsjahre innerhalb der Subgruppen**

Milde Ausreißer sind als °, extreme Ausreißer sind als \* mit Probandennummer gekennzeichnet.

Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz

Das Alter bei Erstmanifestation einer PD (Auftreten erster motorischer Symptome) in diesem Kollektiv betrug im Gesamtdurchschnitt 68,8 Jahre (siehe Abb. 34). Zwischen den drei Untersuchungsgruppen gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Erkrankungsalters. In der PD-Gruppe betrug das mittlere Erkrankungsalter 57,5 Jahre mit einer Spannweite von 24 – 69 Jahren (Standardabweichung  $\pm 10,8$  Jahre), in der MCI-Gruppe betrug der Mittelwert 58,8 Jahre mit einer Spannweite von 35 – 71 Jahren (Standardabweichung  $\pm 8,7$  Jahre), in der PDD-Gruppe betrug der Mittelwert 60,1 Jahre mit einer Spannweite von 44 – 74 Jahren (Standardabweichung  $\pm 9,0$  Jahre) (siehe Abb. 15).



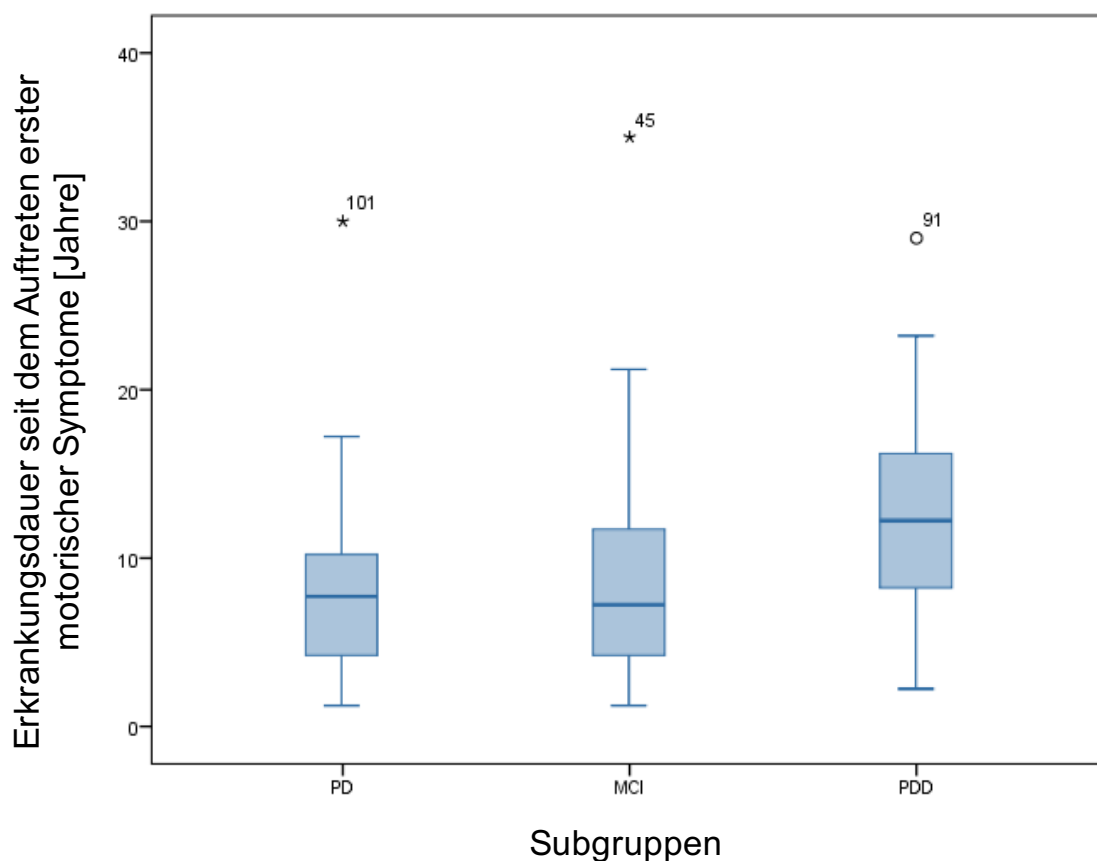


**Abb. 15 Alter beim Auftreten erster motorischer Symptome innerhalb der Subgruppen**  
Milde Ausreißer sind als ° gekennzeichnet.

Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz

Die Erkrankungsdauer innerhalb der Untersuchungsgruppen war bei PDD-Patienten signifikant höher ( $p = 0,015$ ). Die mittlere Erkrankungsdauer des gesamten Kollektivs betrug 13,1 Jahre (siehe Abb. 35). In der Gruppe der PD-Patienten lag die Erkrankungsdauer im Mittel bei 8,3 Jahren mit einer Spannweite von 1 bis 30 Jahren (Standardabweichung  $\pm 5,9$  Jahre). Der in der Abb. 16 dargestellte Median betrug 7,5 Jahre. In der PD-MCI-Gruppe lag die Erkrankungsdauer im Mittel bei 8,7 Jahren mit einer Spannweite von 1 bis 35 Jahren (Standardabweichung  $\pm 6,7$  Jahre). Der Median betrug hier 7 Jahre. In der Gruppe der PDD-Erkrankten lag die mittlere Erkrankungsdauer insgesamt

höher bei 12,6 Jahren mit einer Spannweite von 2 bis 29 Jahren (Standardabweichung  $\pm 6,7$  Jahre). Der Median betrug 12 Jahre.



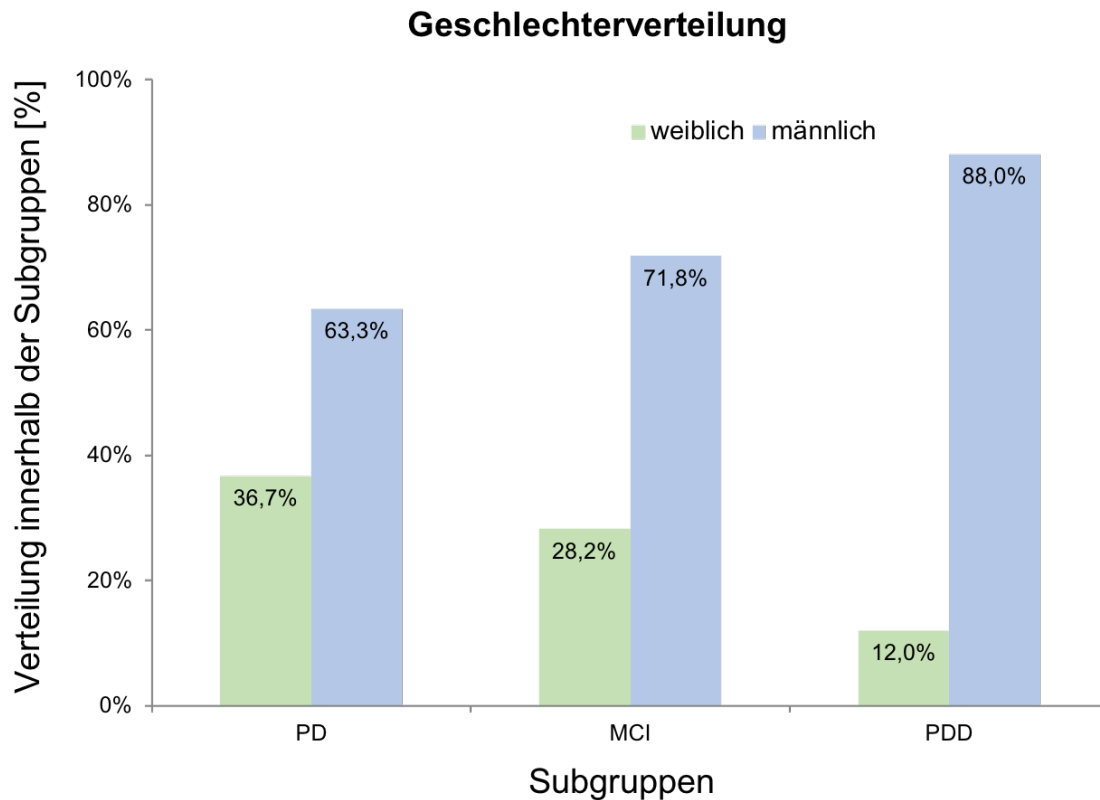
**Abb. 16 Erkrankungsdauer seit dem Auftreten der ersten motorischen Symptome innerhalb der Subgruppen**

Milde Ausreißer sind als °, extreme Ausreißer sind als \* mit Probandennummer gekennzeichnet.

Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz

Insgesamt wurden mehr männliche als weibliche Probanden in die Studie eingeschlossen mit einem Geschlechterverhältnis von weiblich zu männlich mit 1:2 bei Betrachtung des Gesamtkollektivs. Dieser Unterschied ist in der Gruppe der PDD-Probanden tendenziell größer (12 % versus 88 %) im Vergleich zu den beiden anderen Untersuchungsgruppen (siehe Abb. 17).

Bezüglich der Geschlechterverteilung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den analysierten Subgruppen im Chi<sup>2</sup>-Test.



**Abb. 17 Geschlechterverteilung innerhalb der Subgruppen**

Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz

#### 3.2.2.4 Korrelation der Kovariablen

Der Einfluss der Kovariablen *Geschlecht*, *Alter*, *Bildungsjahre*, *Alter bei Erkrankungsbeginn*, *Erkrankungsdauer* aufeinander wurde getestet. Die Variablen *Alter* und *Bildungsjahre* waren signifikant mit dem Geschlecht assoziiert. Ebenso waren *Alter* und *Erkrankungsdauer* signifikant mit dem *Alter bei Erkrankungsbeginn* assoziiert (siehe Tab. 14).

Tab. 14 Korrelation der Kovariablen

Kovariable 1	Kovariable 2	p-Wert
Geschlecht	Alter	0,011
Geschlecht	Bildungsjahre	<0,001
Geschlecht	Alter bei Erkrankungsbeginn	0,056
Geschlecht	Erkrankungsdauer	0,350
Alter	Bildungsjahre	0,304
Alter	Alter bei Erkrankungsbeginn	<0,001
Alter	Erkrankungsdauer	0,415
Bildungsjahre	Alter bei Erkrankungsbeginn	0,755
Bildungsjahre	Erkrankungsdauer	0,604
Alter bei Erkrankungsbeginn	Erkrankungsdauer	<0,001

### 3.3 Assoziationen der untersuchten Biomarker mit den Subgruppen

#### 3.3.1 Assoziationen der genetischen Marker mit den Subgruppen

Die Tab. 15 gibt einen Überblick über die Verteilung der Allele in der gesamten Kohorte und den einzelnen Subgruppen. Zur Veranschaulichung der Allelverteilung dienen auch Abb. 18 – 25.

Tab. 15 Verteilungen der Einzelnukleotid-Polymorphismen nach Subgruppen

Variable	Kohorte	PD	PD-MCI	PDD
<b>APOE ε4</b>	75 (79,8 %)	28 (37,3 %)	34 (45,3 %)	13 (17,3 %)
Anzahl (%)				
– 0 (TT)	58 (77,3 %)	21 (75,0 %)	26 (76,5 %)	11 (84,6 %)
– 1 (CT)	16 (21,3 %)	7 (25,0 %)	7 (20,6 %)	2 (15,4 %)
– 2 (CC)	1 (1,3 %)	0 (0 %)	1 (2,9 %)	0 (0 %)
<b>MAPT</b>	85 (90,4 %)	30 (35,3 %)	35 (41,2 %)	20 (23,5 %)
Anzahl (%)				
– 0 (GG)	4 (4,7 %)	1 (3,3 %)	1 (2,9 %)	2 (10,0 %)
– 1 (AG)	31 (36,5 %)	9 (30,0 %)	15 (42,9 %)	7 (35,0 %)
– 2 (AA)	50 (58,8 %)	20 (66,7 %)	19 (54,3 %)	11 (55,0 %)
<b>SNCA</b>	85 (90,4 %)	30 (35,3 %)	35 (41,2 %)	20 (23,5 %)
Anzahl (%)				
– 0 (AA)	32 (37,6 %)	10 (33,3 %)	21 (60,0 %)	1 (5,0 %)
– 1 (AG)	35 (41,2 %)	12 (40,0 %)	9 (25,7 %)	14 (70,0 %)
– 2 (GG)	18 (21,2 %)	8 (26,7 %)	5 (14,3 %)	5 (25,0 %)
<b>LRRK2</b>	84 (89,4 %)	29 (34,5 %)	35 (41,7 %)	20 (23,8 %)
Anzahl (%)				
– 0 (TT)	46 (54,8 %)	16 (55,2 %)	21 (60,0 %)	9 (45,0 %)
– 1 (CT)	33 (39,3 %)	10 (34,5 %)	13 (37,1 %)	10 (50,0 %)
– 2 (CC)	5 (6 %)	3 (10,3 %)	1 (2,9 %)	1 (5,0 %)

Abkürzungen: A: Adenin, APOE ε4: ε4-Allel des Apolipoprotein E-Gens, C: Cytosin, G: Guanin, LRRK2: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Gens der Leucin-reiche Repeat-Kinase2, MAPT: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau-Gens, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, PD-MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, SNCA: Einzelnukleotid-Polymorphismus des α-Synuklein-Gens, T: Thymin

Bei 75 Probanden erfolgte der Nachweis des APOE-Genotyps, bei 85 Probanden die Bestimmung der MAPT- und SNCA- und bei 84 Probanden der LRRK2-Variante (siehe Tab. 25). Trotz mehrfacher Wiederholung des Sequenzierungsprozesses war der Nachweis bei den übrigen Patienten nicht möglich. Bezüglich der getesteten genetischen Variationen stellt sich ein signifikanter Zusammenhang im Auftreten eines SNCA-Risikoallels (dominantes Modell) mit der Gruppeneinteilung dar ( $p < 0,001$ ). Eine Übersicht der Signifikanzen ist in Tab. 16 dargestellt.

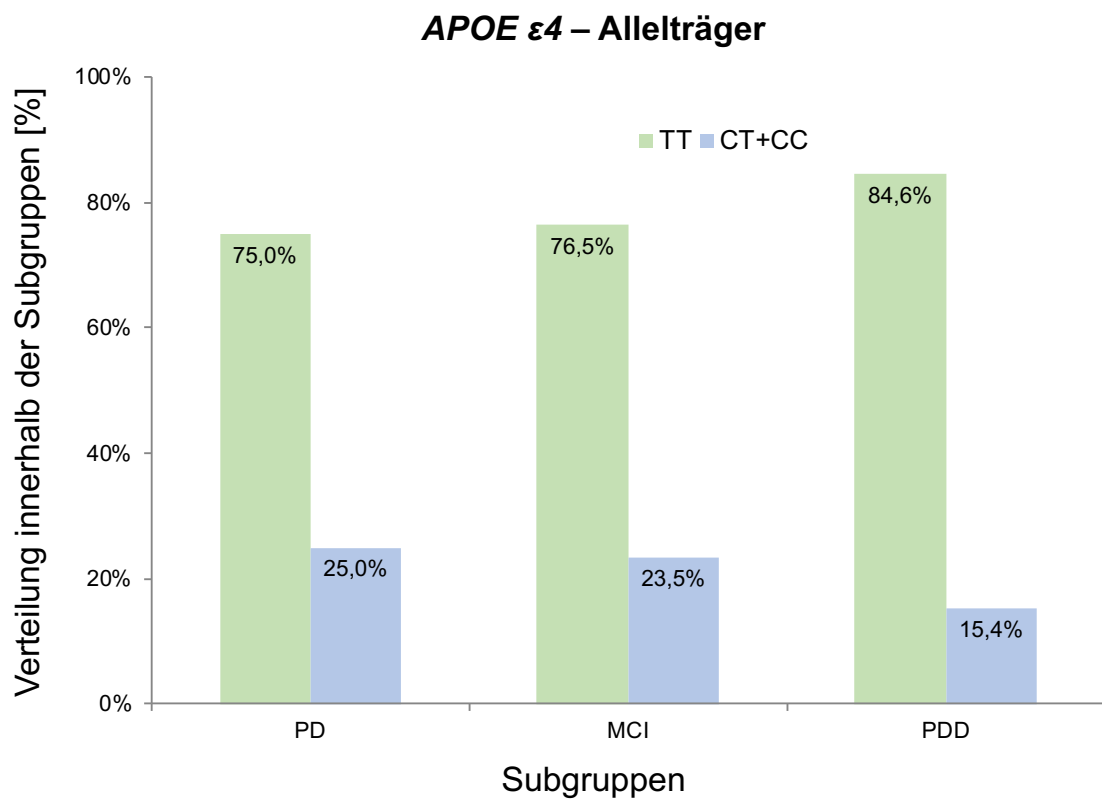
**Tab. 16 Assoziation der genetischen Marker mit den Subgruppen**

Dargestellt ist das jeweilige dominante und das rezessive Modell der Einzelnukleotid-Polymorphismen.

\*:  $p = 2,3 \times 10^{-4}$

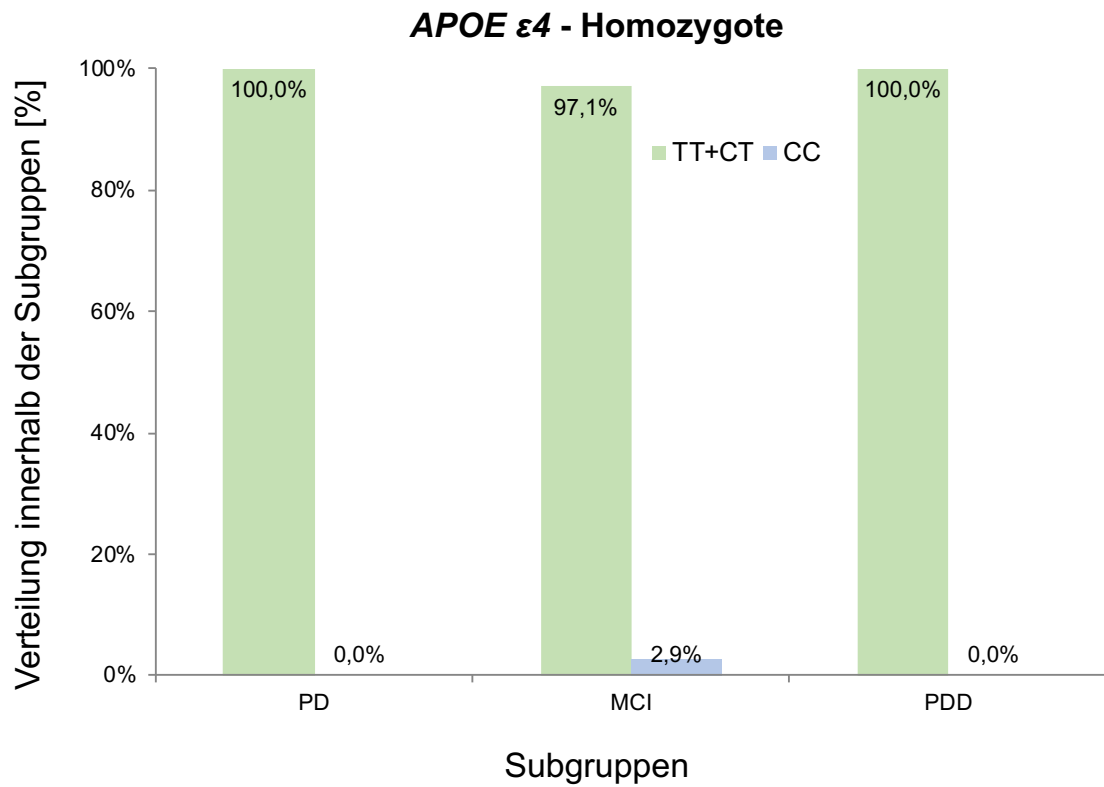
Variable	p-Wert
<b>APOE <math>\epsilon</math>4</b>	
dominantes Modell (TT <i>versus</i> CT+CC)	0,781
rezessives Modell (TT+CT <i>versus</i> CC)	0,543
<b>MAPT</b>	
dominantes Modell (GG <i>versus</i> AG+AA)	0,440
rezessives Modell (GG+AG <i>versus</i> AA)	0,554
<b>SNCA</b>	
dominantes Modell (AA <i>versus</i> AG+GG)	<b>&lt;0,001*</b>
rezessives Modell (AA+AG <i>versus</i> GG)	0,425
<b>LRRK2</b>	
dominantes Modell (TT <i>versus</i> CT+CC)	0,560
rezessives Modell (TT+CT <i>versus</i> CC)	0,442

Abkürzungen: A: Adenin, APOE  $\epsilon$ 4:  $\epsilon$ 4-Allel des Apolipoprotein E-Gens, C: Cytosin, G: Guanin, LRRK2: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Gens der Leucin-reichen Repeat-Kinase, MAPT: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau-Gens, SNCA: Einzelnukleotid-Polymorphismus des  $\alpha$ -Synuklein-Gens, T: Thymin



**Abb. 18 APOE  $\epsilon$ 4-Allelträger innerhalb der Subgruppen (dominantes Modell)**

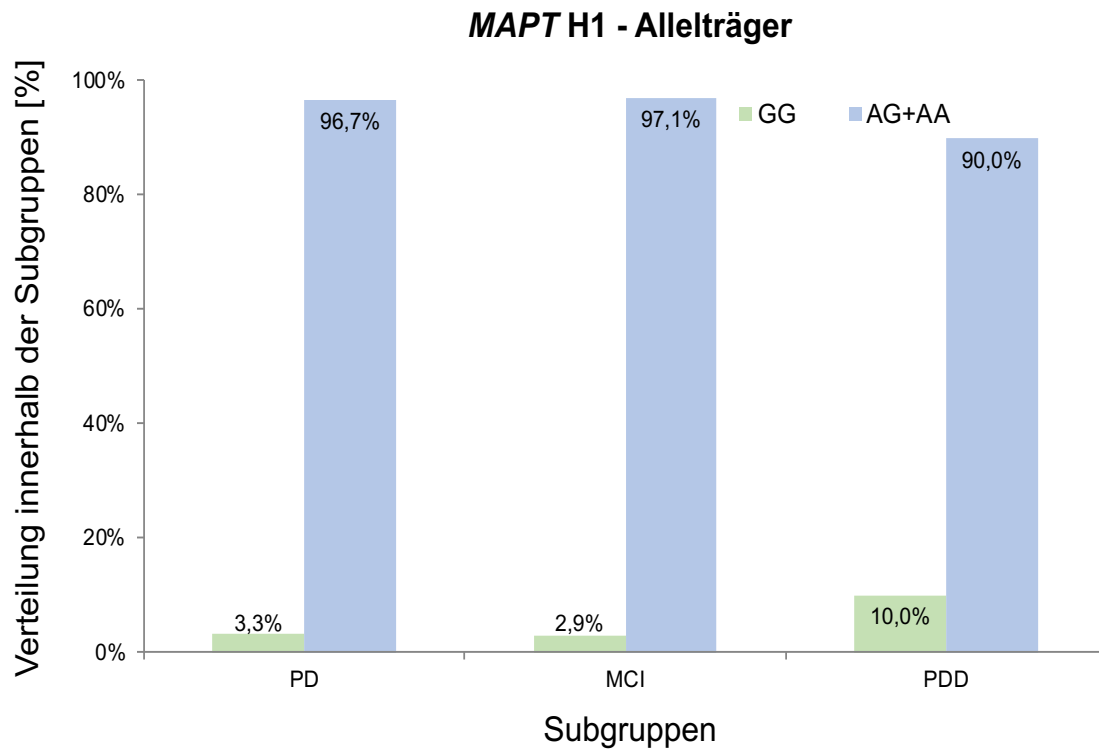
Abkürzungen: APOE  $\epsilon$ 4:  $\epsilon$ 4-Allel des Apolipoprotein E-Gens, C: Cytosin (Risikoallel), MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, T: Thymin



**Abb. 19 APOE  $\epsilon$ 4-Homozygote innerhalb der Subgruppen (rezessives Modell)**

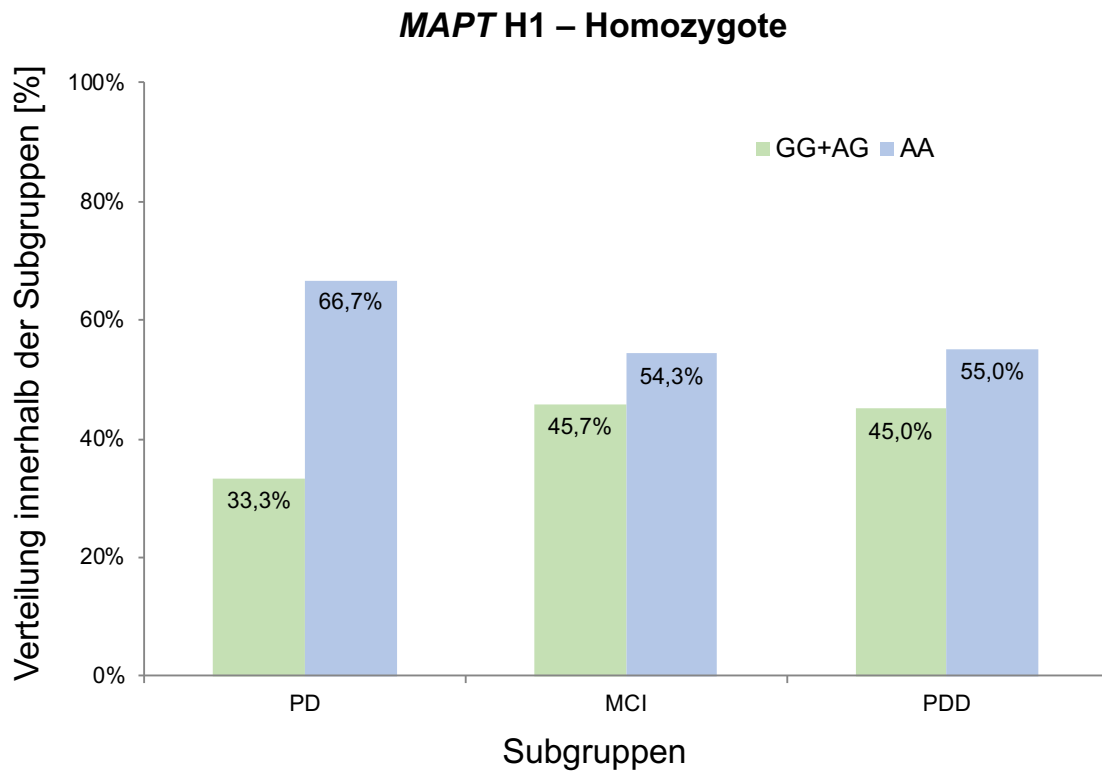
Abkürzungen: APOE  $\epsilon$ 4:  $\epsilon$ 4-Allel des Apolipoprotein E-Gens, C: Cytosin (Risikoallel), MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, T: Thymin





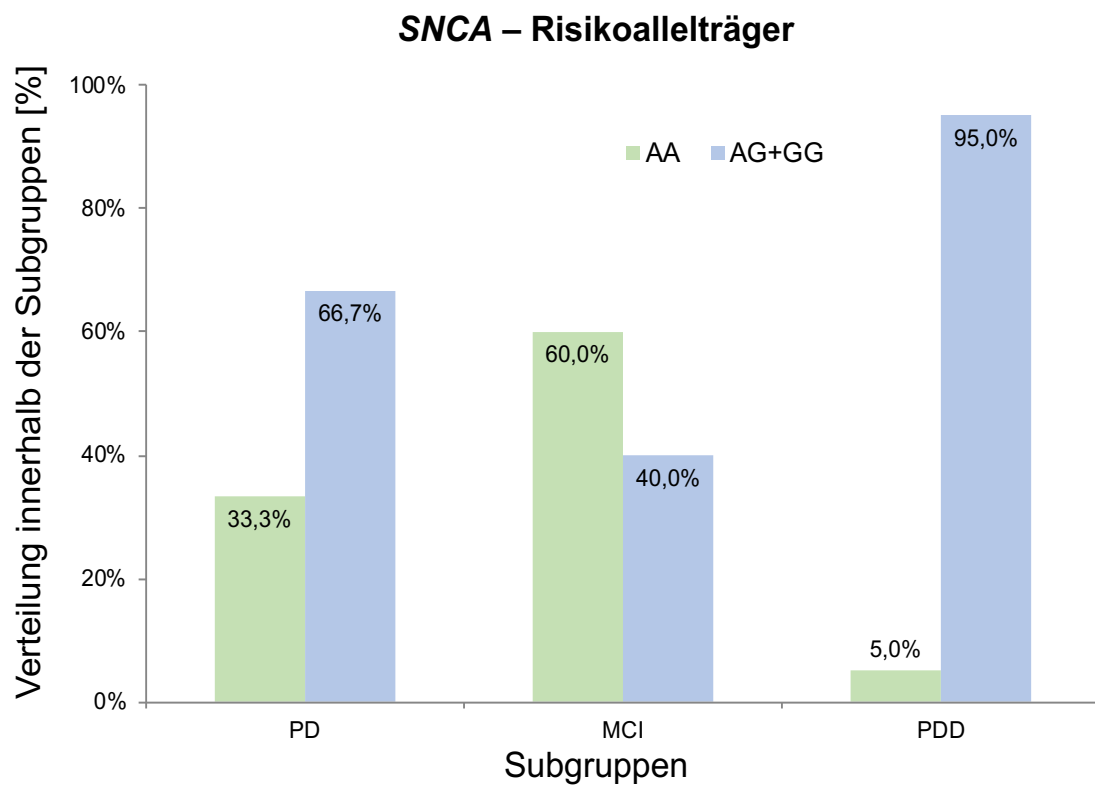
**Abb. 20 MAPT H1-Allelträger innerhalb der Subgruppen (dominantes Modell)**

Abkürzungen: A: Adenin (Risikoallele), G: Guanin, MAPT H1: H1-Haplotyp des Gens des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz



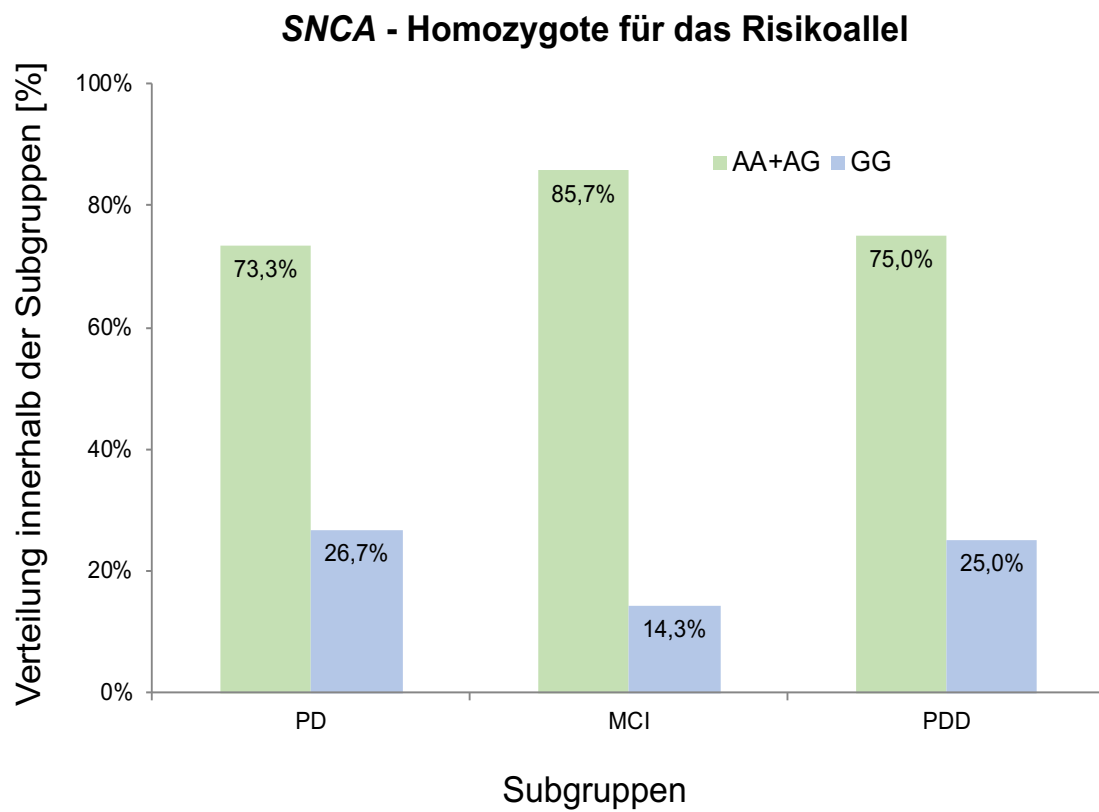
**Abb. 21 MAPT H1-Homozygote innerhalb der Subgruppen (rezessives Model)**

Abkürzungen: A: Adenin (Risikoallele), G: Guanin, MAPT H1: H1-Haplotyp des Gens des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz



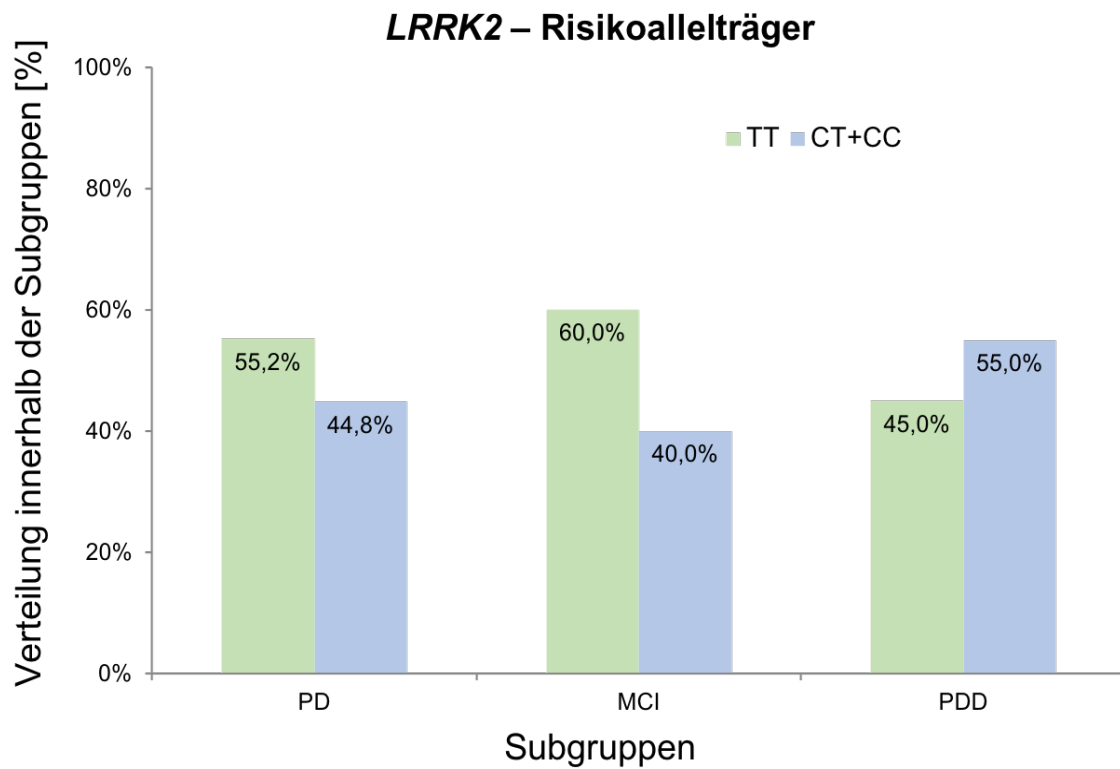
**Abb. 22 SNCA-Risikoallelträger innerhalb der Subgruppen (dominantes Modell)**

Abkürzungen: A: Adenin, G: Guanin (Risikoallel), MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, SNCA: Einzelnukleotid-Polymorphismus des  $\alpha$ -Synuklein-Gens



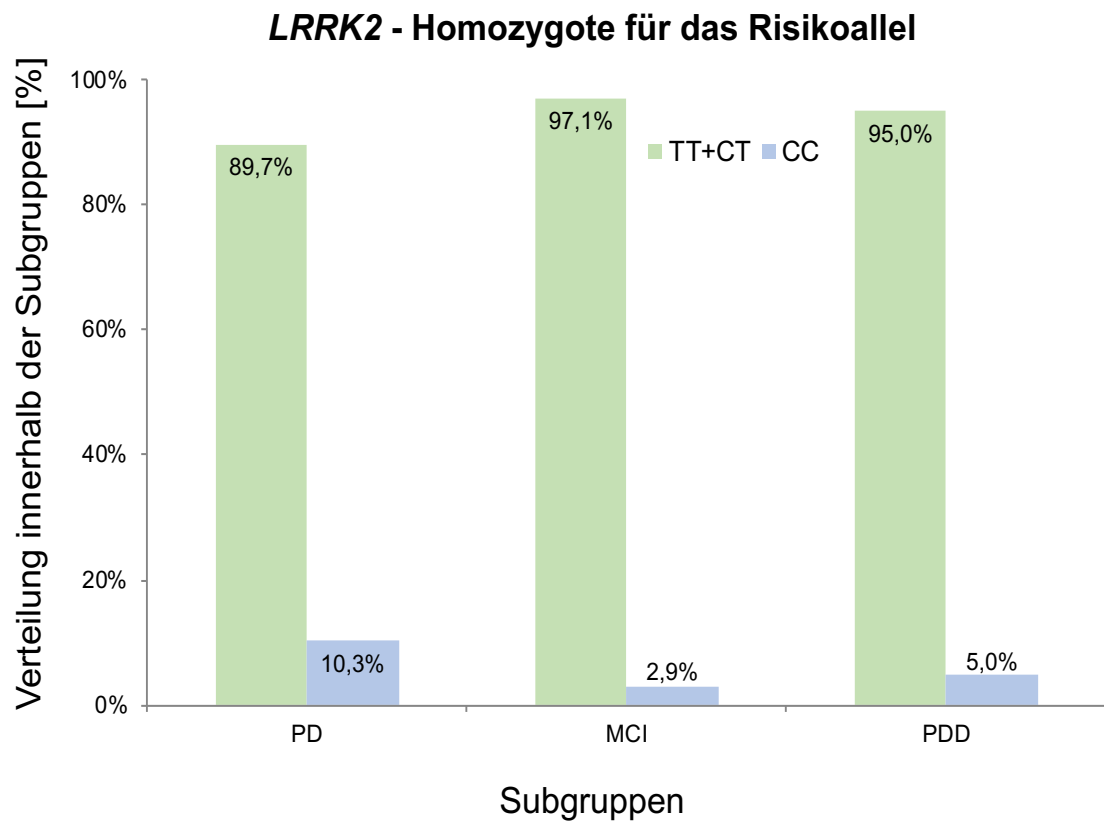
**Abb. 23 SNCA-Homozygote für das Risikoallel innerhalb der Subgruppen (rezessives Modell)**

Abkürzungen: A: Adenin, G: Guanin (Risikoallel), MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, SNCA: Einzelnukleotid-Polymorphismus des  $\alpha$ -Synuklein-Gens



**Abb. 24 LRRK2-Risikoallelträger innerhalb der Subgruppen (dominantes Modell)**

Abkürzungen: C: Cytosin (Risikoallel), LRRK2: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Gens der Leucinreichen Repeat-Kinase, MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, T: Thymin



**Abb. 25 LRRK2-Homozygote für das Risikoallel innerhalb der Subgruppen (rezessives Modell)**

Abkürzungen: C: Cytosin (Risikoallel), LRRK2: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Gens der Leucinreichen Repeat-Kinase, MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, T: Thymin

### 3.3.2 Assoziation der Osteopontin-Konzentrationen mit den Subgruppen

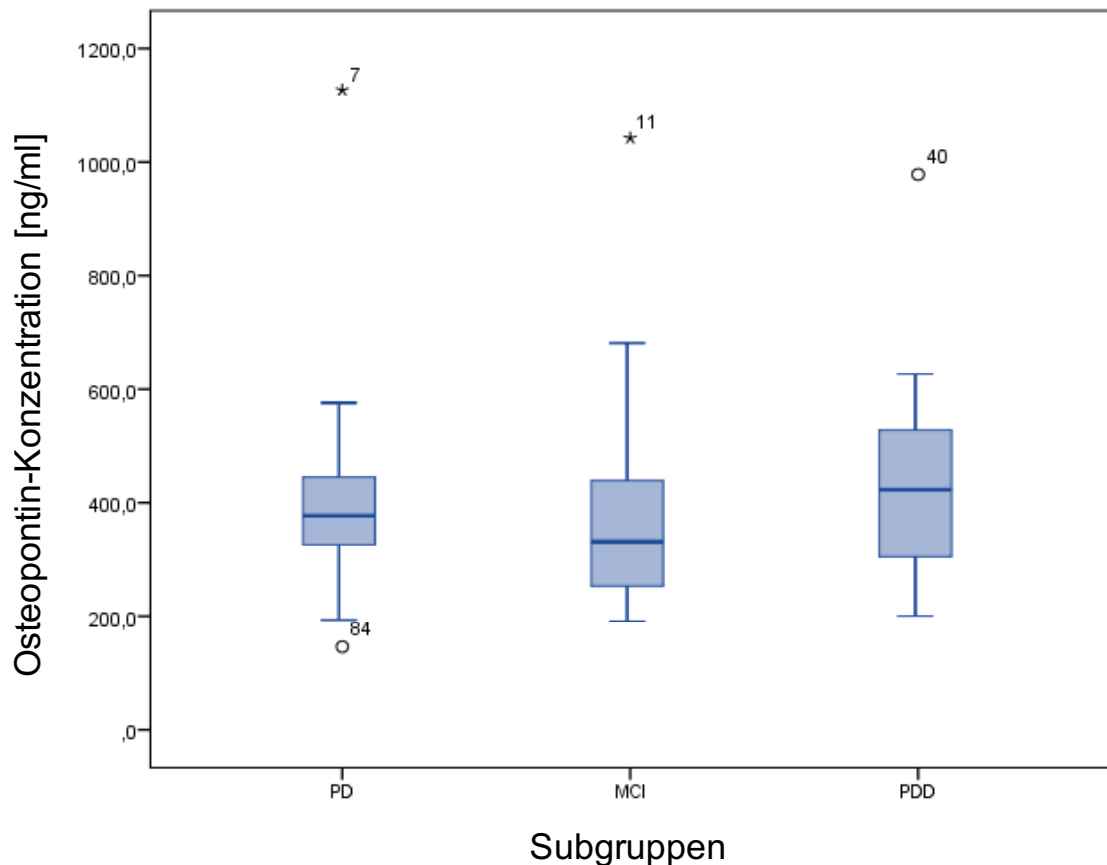
Die OPN-Konzentration im Plasma konnte bei insgesamt 65 der 104 Probanden bestimmt werden (siehe Tab. 25). Bei den weiteren Probanden lag eine entsprechende Plasmaprobe nicht vor oder die OPN-Konzentrationen lagen trotz wiederholter Bestimmung außerhalb der Toleranz der 30 %-Differenz.

Innerhalb der Kohorte betrug die mittlere OPN-Konzentration im Plasma 411,1ng/ml mit einer Standardabweichung von  $\pm 188,4$ ng/ml (siehe Tab. 17 und Abb. 36). Der Mittelwert betrug in der PD-Gruppe 411,1ng/ml bei einer Standardabweichung von 192,2ng/ml, in der PD-MCI-Gruppe 388,8ng/ml bei einer Standardabweichung von 190,8ng/ml und in der PDD-Gruppe 438,0ng/ml bei einer Spannweite von 187,4ng/ml. Die Abb. 26 zeigt die Verteilungen der OPN-Konzentration innerhalb der Untersuchungsgruppen. Die OPN-Spiegel waren nicht mit der Einteilung in die Subgruppen nach Kognition assoziiert.

Tab. 17 Osteopontinkonzentrationen in den Subgruppen

Variable	Kohorte	PD	PD-MCI	PDD	p-Wert
<b>Osteopontin</b> Anzahl (%)	65 (69,1 %)	23 (76,7 %)	23 (59,0 %)	19 (76,0 %)	0,555
MW $\pm$ SD [ng/ml]	411,1 $\pm$ 188,4	411,1 $\pm$ 192,2	388,8 $\pm$ 190,8	438,0 $\pm$ 187,4	

Abkürzungen: MW: Mittelwert, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, PD-MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, SD: Standardabweichung



**Abb. 26 Osteopontin-Konzentration innerhalb der Subgruppen**

Milde Ausreißer sind als °, extreme Ausreißer sind als \* mit Probandennummer gekennzeichnet.

Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz

### 3.3.3 Assoziationen der Biomarker und der Familienanamnese mit den Subgruppen nach Korrektur für Kovariablen

Bei weiteren Berechnungen wurde für die signifikant mit der Subgruppeneinteilung assoziierten Kovariablen *Alter*, *Bildungsjahre* und *Erkrankungsdauer* (siehe Tab. 13) korrigiert.

Die Testvariablen *OPN-Konzentration*, *Familienanamnese* und die einzelnen SNPs wurden auf Assoziation mit der Gruppeneinteilung mittels *multinomialer*



*Regression* getestet und dabei für die Kovariablen *Alter*, *Bildungsjahre* und *Erkrankungsdauer* korrigiert. Signifikant mit der Gruppeneinteilung assoziiert war nach Korrektur die Variable *SNCA* im dominanten Modell (*AA versus AG+GG*) (*PD versus MCI*:  $p = 0,048$ ; *PD versus PDD*:  $p = 0,021$ ; *MCI versus PDD*:  $p = 0,002$ ) (siehe Tab. 18). Das Vorliegen eines *SNCA*-Risikoallels war signifikant mit der Gruppeneinteilung nach Korrektur für die Kovariablen assoziiert. Eine Signifikanz zeigte sich sowohl in der Abgrenzung von PDD gegenüber MCI (*PDD: 5 % versus 95%*; *PD-MCI: 60 % versus 40 %*;  $p = 0,002$ ) als auch bei der Gegenüberstellung von Probanden ohne kognitives Defizit (*PD*) und Probanden im MCI-Stadium (*PD: 33,3 % versus 66,7 %*; *PD-MCI: 60 % versus 40 %*;  $p = 0,048$ ).

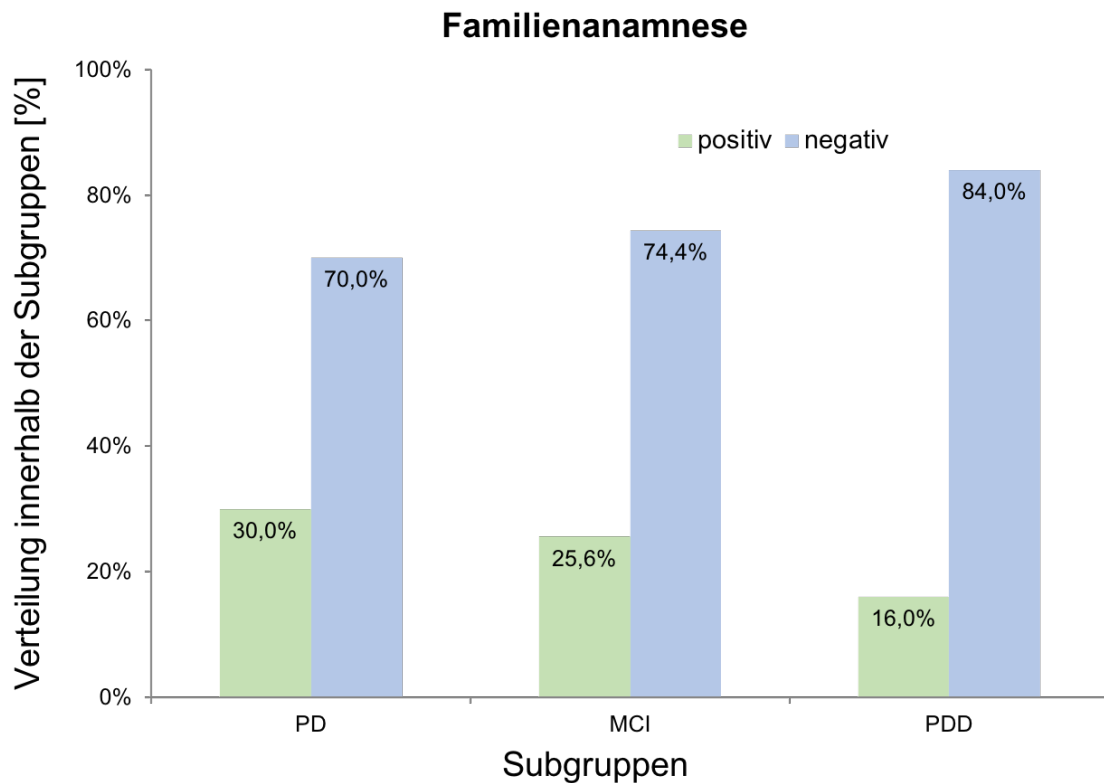
Weder für die *OPN*-Plasmakonzentration noch für andere genetische Varianten zeigte sich nach Korrektur für die Kovariablen ein signifikanter Zusammenhang zur kognitiven Klassifikation. Die *OPN*-Konzentration unterschied sich statistisch nicht zwischen den Subgruppen (*PD versus PD-MCI*:  $p = 0,700$ ; *PD versus PDD*:  $p = 0,226$ ; *PD-MCI versus PDD*:  $p = 0,131$ ).

**Tab. 18 Assoziationen der Variablen mit den Subgruppen nach Korrektur für Kovariablen**  
 \* nicht bewertet aufgrund der zu geringen Fallzahl

Variable	p-Wert		
	PD vs. PD-MCI	PD vs. PDD	PD-MCI vs. PDD
<b>Osteopontin-Konzentration</b>	0,700	0,226	0,131
<b>Familienanamnese</b>	0,741	0,127	0,163
<b>APOE ε4</b>			
dominant (TT vs. CT+CC)	0,940	0,610	0,624
rezessiv (TT+CT vs. CC)	0,994	*	*
<b>MAPT</b>			
dominant (GG vs. AG+AA)	0,960	0,082	0,084
rezessiv (GG+AG vs. AA)	0,296	0,213	0,584
<b>SNCA</b>			
dominant (AA vs. AG+GG)	<b>0,048</b>	<b>0,021</b>	<b>0,002</b>
rezessiv (AA+AG vs. GG)	0,281	0,759	0,266
<b>LRRK2</b>			
dominant (TT vs. CT+CC)	0,686	0,758	0,980
rezessiv (TT+CT vs. CC)	0,296	0,945	0,389

Abkürzungen: A: Adenin, APOE ε4: ε4-Allel des Apolipoprotein E-Gens, C: Cytosin, G: Guanin, LRRK2: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Gens der Leucin-reichen Repeat-Kinase 2, MAPT: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau-Gens, SNCA: Einzelnukleotid-Polymorphismus des α-Synuklein-Gens, T: Thymin, vs.: versus

Ergänzend wurde auch die Familienanamnese genauer untersucht. Die Verteilung der während der Anamnese erhobenen Angaben der Probanden sind nach Subgruppen aufgeteilt Abb. 27 dargestellt.



**Abb. 27 Familienanamnese innerhalb der Subgruppen**

*Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz*

Eine positive Familienanamnese für eine PD wurde eigenanamnestisch erhoben, war in der PDD-Gruppe (16 %) tendenziell seltener berichtet worden als in der PD-MCI (25 %) und der PD-Gruppe (30 %).

Dieser Zusammenhang zeigte sich jedoch statistisch nicht signifikant. Auch nach Korrektur für die Kovariablen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer positiven Familienanamnese und der kognitiven Subgruppe gezeigt werden (PD versus PDD  $p = 0,127$ ; PD-MCI versus PDD  $p = 0,163$ ).

### 3.3.3.1 Assoziation der OPN-Konzentration mit der Gruppeneinteilung bei Korrektur für Kovariablen und den SNCA-Genotypen

Die Testvariable *OPN-Konzentration* wurde auf eine Assoziation mit der Gruppeneinteilung getestet (siehe Kapitel 3.3.2) und hiernach für die Kovariablen *Alter*, *Bildungsjahre* und *Erkrankungsdauer* korrigiert (siehe Kapitel 3.3.3). Hierbei zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen der OPN-Konzentration und der Subgruppen-Einteilung. Es erfolgte anschließend die Korrektur für das als signifikant mit der Gruppeneinteilung getestete, dominante Modell des SNPs *SNCA* (TT *versus* CT+CC) zusätzlich zur Korrektur für die Kovariablen. Für die OPN-Konzentration konnte auch nach dieser weiteren Korrektur keine signifikante Assoziation gezeigt werden (siehe Tab. 19).

**Tab. 19** Assoziation der Osteopontin-Konzentration mit der Gruppeneinteilung nach Korrektur für Kovariablen und das dominante Modell des *SNCA*-Einzelnukleotid-Polymorphismus

Variable	p-Wert		
	PD vs. MCI	PD vs. PDD	MCI vs. PDD
<b>Osteopontin-Konzentration</b>	0,550	0,897	0,827

Abkürzungen: *MCI*: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, *PD*: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, *PDD*: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz, *vs.:* versus

### 3.3.4 Assoziationen der Variablen mit der OPN-Konzentration

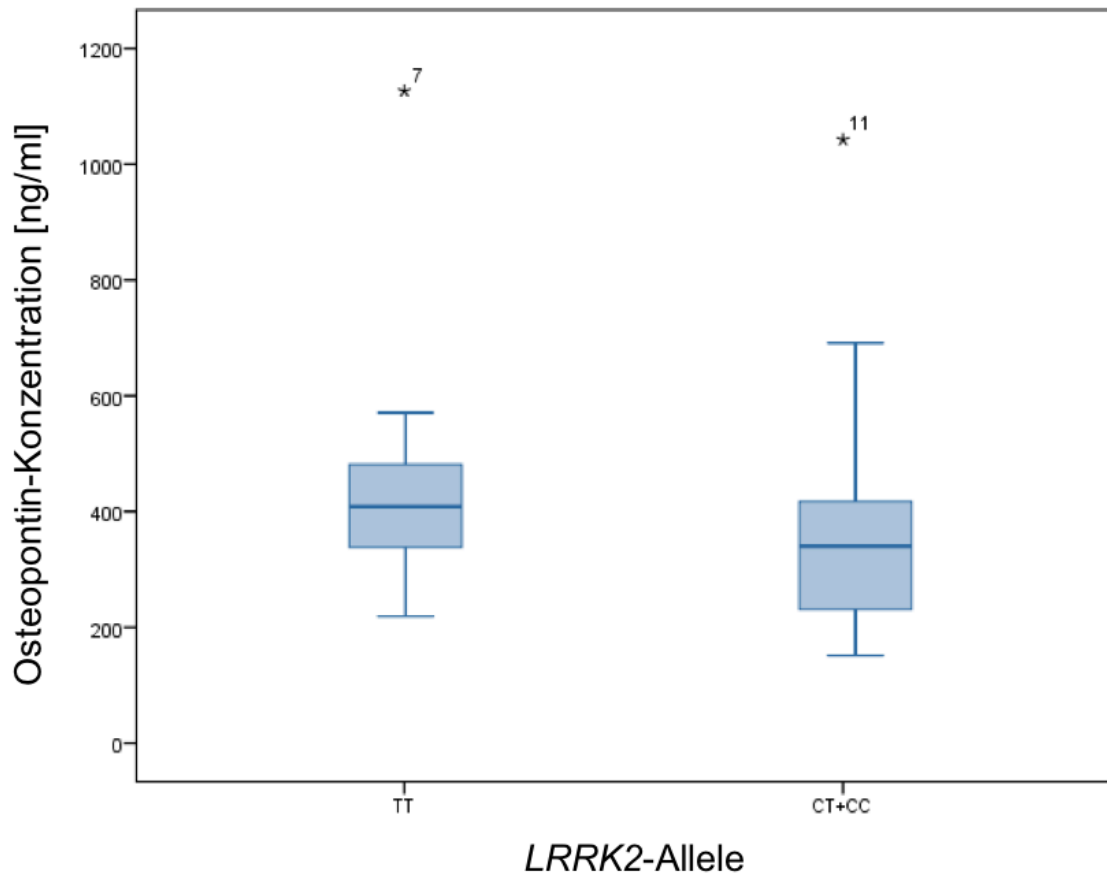
Das dominante Modell des *LRRK2*-SNPs war mit der OPN-Konzentration signifikant assoziiert ( $p = 0,047$ ). Für die anderen untersuchten Parameter konnte kein Zusammenhang mit der OPN-Konzentration festgestellt werden (siehe Tab. 20).

Tab. 20 Assoziationen der Variablen mit der Osteopontin-Konzentration

Variable	p-Wert
<b>Geschlecht</b>	0,493
<b>Alter</b>	0,809
<b>Bildungsjahre</b>	0,827
<b>Alter bei Erkrankungsbeginn</b>	0,990
<b>Erkrankungsdauer</b>	0,730
<b>Screening-MMSE</b>	0,286
<b>Screening-PANDA</b>	0,876
<b>Hoehn &amp; Yahr-Stadium</b>	0,202
<b>Unified Parkinson's Disease Rating Scale III (UPDRS-III)</b>	0,237
<b>Geriatrische Depressionsskala (GDS)</b>	0,304
<b>Familienanamnese</b>	0,523
<b>APOE <math>\epsilon</math>4</b>	
dominantes Modell (TT versus CT + CC)	0,755
rezessives Modell (TT + CT versus CC)	0,290
<b>MAPT</b>	
dominantes Modell (GG versus AG + AA)	0,141
rezessives Modell (GG + AG versus AA)	0,167
<b>SNCA</b>	
dominantes Modell (AA versus AG + GG)	0,271
rezessives Modell (AA + AG versus GG)	0,796
<b>LRRK2</b>	
dominantes Modell (TT versus CT + CC)	<b>0,047</b>
rezessives Modell (TT + CT versus CC)	0,387

Abkürzungen: A: Adenin, APOE  $\epsilon$ 4:  $\epsilon$ 4-Allel des Apolipoprotein E-Gens, C: Cytosin, G: Guanin, LRRK2: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Gens der Leucin-reichen Repeat-Kinase, MAPT: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau-Gens, SNCA: Einzelnukleotid-Polymorphismus des  $\alpha$ -Synuklein-Gens, T: Thymin

Bei Probanden mit einem LRRK2-Risikoallel konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der OPN-Konzentration nachgewiesen werden ( $p = 0,047$ ). Bei Risikoallelträgern war die OPN-Konzentration im Plasma geringer als bei PD-Patienten ohne das Risikoallel (siehe Abb. 28).



**Abb. 28 Osteopontin-Konzentration bei Probanden mit und ohne LRRK2-Risikoallel**  
Extreme Ausreißer sind als \* mit Probandennummer gekennzeichnet

Abkürzungen: C: Cytosin (Risikoallel), LRRK2: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Gens der Leucinreichen Repeat-Kinase, T: Thymin

## 4 Diskussion

Die Diagnosekriterien einer PD ebenso wie die einer PD-MCI oder PDD basieren in erster Linie auf der Einschätzung im Rahmen einer klinischen Untersuchung. Bisher konnte kein Biomarker identifiziert werden, der die Diagnose eines kognitiven Defizits im Rahmen einer PD ohne weitere klinische Untersuchungen verlässlich unterstützt oder sogar sichert. Ein solcher Risikomarker wäre nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern könnte für betroffene Patienten eine frühzeitige, individualisierte Versorgung ermöglichen und die Diagnosestellung für klinisch tätige Ärzte erleichtern.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Detektion eines genetischen oder serologischen Biomarkers, der durch eine einfache, im Klinikalltag leicht zu praktizierende periphere Blutentnahme die bisher klinisch gestellte Diagnose einer PDD oder PD-MCI unterstützt und die Genauigkeit der Diagnosestellung erhöhen könnte. Hierfür wurden Patienten des Tübinger PD-Kollektivs der DEMPARK-Studie im Rahmen der Baseline-Untersuchung neurologisch und neuropsychologisch genau charakterisiert. Anhand der erhobenen Daten im Rahmen der neuropsychologischen Testung erfolgte eine Einteilung in drei Subgruppen PD, PD-MCI und PDD.

Zur Durchführung einer explorativen Datenanalyse wurden mehrere genetische und ein serologischer Marker in dem untersuchten Kollektiv bestimmt. Die ausgewählten Einzelnukleotid-Polymorphismen *SNCA*, *MAPT* und *LRRK2* konnten in GWAS wiederholt als genetische Risikofaktoren für die Entwicklung einer PD bei kaukasischen Patienten identifiziert werden (Gasser et al., 2011). Neben diesen wurde die Häufigkeit des *APOE*  $\epsilon$ 4-Allels, bekannt als ein Risikomarker für eine Demenz vom Alzheimer-Typ (Farrer et al., 1997), untersucht. Ergänzend zu genetischen Risikovarianten wurde der Biomarker OPN quantitativ im Plasma bestimmt. Er spielt bei immunologischen Prozessen eine Rolle. Ein erhöhter Spiegel konnte in Zusammenhang mit neurodegenerativen Veränderungen gebracht werden (Maetzler et al., 2007). Eine Assoziation zu den Einzelnukleotid-Polymorphismen rs429358 (*APOE*  $\epsilon$ 4), rs1491923 (*LRRK2*) und rs393152 (*MAPT*) konnte nicht gefunden werden.

Bemerkenswerterweise zeigte sich für den Einzelnukleotid-Polymorphismus rs356219 (*SNCA*) für das Vorhandensein eines Risikoallels (*AA versus AG+GG*) eine signifikante Assoziation mit der Subgruppeneinteilung ( $p < 0,001$ ). Diese Assoziation blieb auch nach Korrektur für die Kovariablen *Alter*, *Bildungsjahre* und *Erkrankungsdauer* signifikant (PD vs. MCI:  $p = 0,048$ ; PD vs. PDD:  $p = 0,021$ ; MCI vs. PDD:  $p = 0,002$ ).

Ein Zusammenhang zwischen der OPN-Konzentration im Plasma und der Subgruppeneinteilung nach Kognition (PD, PD-MCI und PDD) ließ sich auch nach Korrektur für die Kovariablen *Alter*, *Bildungsjahre* und *Erkrankungsdauer* und den *SNCA*-Genotyp nicht nachweisen. Allerdings zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang des OPN-Levels mit *LRRK2*-Risikoallelträgern. Eine niedrigere OPN-Konzentration war signifikant mit dem Vorhandensein eines *LRRK2*-Risikoallels assoziiert ( $p = 0,047$ ).

#### **4.1 Einzelnukleotid-Polymorphismen innerhalb des Patientenkollektivs**

Die Variablen *Alter*, *Bildungsjahre*, *Erkrankungsdauer*, *Screening-MMSE* und *-PANDA*, *UPDRS-III*, *GDS*, *Hoehn & Yahr-Stadium* und das dominante Modell des *SNCA*-SNPs waren mit der Gruppeneinteilung signifikant assoziiert (siehe Tab. 11 – 13 und Tab. 16). Die PDD-Patienten dieses Kollektivs waren signifikant älter ( $p = 0,001$ ), hatten eine geringe Anzahl an Bildungsjahren ( $p = 0,023$ ) und eine längere Erkrankungsdauer ( $p = 0,015$ ) im Vergleich zu nicht dementen Probanden. Auch motorische Defizite ( $p = 0,001$ ) und eine depressive Symptomatik ( $p = 0,001$ ) waren bei PDD-Probanden signifikant ausgeprägter.



#### 4.1.1 *APOE ε4*

Das *APOE ε4*-Allel ist ein nachgewiesener Risikofaktor für die Entwicklung einer AD (Farrer et al., 1997), weshalb ein Zusammenhang mit einer kognitiven Beeinträchtigung in dem Kollektiv der aktuellen Studie untersucht wurde.

Die Häufigkeit der Risikoallelträger in der Normalbevölkerung wird mit circa 14,5 % beschrieben (Eisenberg et al., 2010). Es zeigte sich im Gesamtkollektiv dieser Studie mit 22,6 % Allelträgern eine über der Normalbevölkerung liegende Auftretshäufigkeit. In allen Gruppen lag sie dennoch deutlich unterhalb der Homozygoten-Häufigkeit von 51,7 % Patienten mit einer AD in Zentraleuropa (Ward et al., 2012). Diese Beobachtungen entsprechen denen einer Autopsie-basierten Studie von Tsuang et al. aus dem Jahr 2013, dort lag die Trägerhäufigkeit mit 19,1 % bei PDD-Patienten ebenfalls höher als bei der Kontrollgruppe (7,2 %) und niedriger als bei untersuchten AD-Patienten (38,1 %) (Tsuang et al., 2013).

Für das Auftreten eines kognitiven Defizits im Rahmen der PD wird ein Zusammenhang weiterhin kontrovers diskutiert. Zwei Metaanalysen zum Zusammenhang von *APOE*-Polymorphismus und PDD kamen zu dem Schluss, dass es zwar Hinweise auf einen solchen gibt, bis dahin durchgeführte und analysierte Studien jedoch konfliktbehaftet und heterogen seien. Die Durchführung weiterer, standardisierter Studien mit einheitlich verwendeten PDD-Diagnosekriterien wurde gefordert (Huang et al., 2006, Williams-Gray et al., 2009b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten keinen Zusammenhang zum Auftreten eines kognitiven Defizits (PD-MCI und PDD) im Rahmen der PD, auch nicht nach Korrektur für die Kovariablen *Alter*, *Bildungsjahre* und *Erkrankungsdauer*. Dieses Ergebnis entspricht den aktuellen Daten aus einer Veröffentlichung zur sich der DEMPARK-Studie anschließenden „Langzeitbeobachtung dementieller Symptome und cognitiver Parameter sowie Anwendbarkeit neuer prognostischer Marker bei der Parkinson-Erkrankung“ (LANDSCAPE)-Studie (Balzer-Geldsetzer et al., 2011). Hierin werden die multizentrischen Daten des präzise klinisch neurologisch und

neuropsychologisch charakterisierten Kollektivs dargestellt (Mengel et al., 2016). Longitudinale Daten waren jedoch weder in der aktuellen Studie noch in der Veröffentlichung von Mengel et al. 2016 beinhaltet. Gleiches gilt für die 2012 veröffentlichten Daten der „*Incidence of Cognitive Impairment in Cohorts with Longitudinal Evaluation–Parkinson’s Disease*“ (ICICLE-PD)-Studie. Zwischen den hierin untersuchten Subgruppen PD und PD-MCI zeigte sich ebenfalls kein Unterschied im *APOE*-Genotyp; eine longitudinale Datenerfassung bezüglich eines möglichen Auftretens oder Fortschreitens des kognitiven Defizits ist ebenfalls geplant (Yarnall et al., 2014).

In einer prospektiven Kohortenstudie von Morley et al. 2012 konnte im Rahmen der Baseline-Untersuchung ebenfalls kein Einfluss auf das Vorhandensein einer PDD nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich bei *APOE*  $\epsilon$ 4-Trägern eine statistisch signifikant raschere Abnahme der allgemeinen kognitiven Fähigkeiten in den longitudinalen Daten (Morley et al., 2012). In einer weiteren, in den letzten Jahren veröffentlichten longitudinalen Studie konnte ebenso ein Zusammenhang mit einer PDD gezeigt werden (Tsuang et al., 2013). Ein Nutzen als prädiktiver Marker des *APOE*  $\epsilon$ 4-Allels bezüglich der Entwicklung einer PDD wird daher diskutiert (Mata et al., 2014).

In Zusammenschau der bisherigen Studienlage ist die Frage eines Zusammenhanges zwischen dem Auftreten eines kognitiven Defizits im Rahmen einer PD und dem *APOE*-Genotyp nicht abschließend geklärt. Weitere, großangelegte longitudinale Studien mit einheitlichen Diagnosekriterien von PD, PD-MCI und PDD sowie sehr gut charakterisierten Patientenkollektiven sind notwendig um dieser Fragestellung weiter nachzugehen. Dahingehend werden erwartete Auswertungen der longitudinalen Daten der DEMPARK/LANDSCAPE-Studie einen wichtigen Beitrag leisten.

#### **4.1.2 MAPT**

Für *MAPT* wurde als ein Einzelnukleotid-Polymorphismus für eine PD in der kaukasischen Bevölkerung im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien und deren Metaanalysen nachgewiesen (Nalls et al., 2011). Einen

Zusammenhang zwischen dem Auftreten des H1/H1-Haplotyps und einer Demenzentwicklung legt vor allem die Assoziation des Risikoallels mit dementiellen Erkrankungen wie der frontotemporalen Demenz nahe (Rademakers et al., 2004). Des Weiteren konnten Hinweise auf einen genetischen Zusammenhang bezüglich des hier untersuchten SNP rs393152 (*MAPT*) mit einem erhöhten AD-Risiko gezeigt werden (Desikan et al., 2015). Auch wenn ein Zusammenhang auch mit einer PDD plausibel erscheint, konnte eine Assoziation bisher nur durch wenige Untersucher gezeigt werden (Williams-Gray et al., 2009a, Goris et al., 2007, Williams-Gray et al., 2013).

Innerhalb des hier untersuchten Kollektivs ist zu beobachten, dass nahezu alle Probanden mindestens ein H1-Allel tragen (95,3 %). 4,7 % des Kollektivs sind homozygot für den H2-Haplotyp (H2/H2), 36,5 % sind heterozygot (H1/H2) und 58,8 % sind homozygot für den mit Demenz assoziierten H1-Haplotyp (H1/H1). Dies entspricht tendenziell der Verteilung bei einer deutschstämmigen Kohorte von 265 PD-Patienten in der Literatur. Dort wurde eine Häufigkeit von 71,4 % für H1/H1-, 26,3 % für H1/H2- und 2,7 % für H2/H2-Träger angegeben (Winkler et al., 2007).

Zwischen dem Auftreten einer PD-MCI oder PDD und dem *MAPT*-Allel H1 ließ sich, auch nach Korrektur für die Kovariablen *Alter*, *Bildungsjahre* und *Erkrankungsdauer*, in dem in dieser Studie untersuchten Patientenkollektiv keine signifikante Assoziation nachweisen. Eine Homozygotie H1/H1 zeigte ebenfalls keine signifikante Assoziation zur Subgruppeneinteilung. Keinen Zusammenhang zwischen PDD und einer H1-Homozygotie konnten auch andere Studien in den letzten Jahren nachweisen (Ezquerria et al., 2008, Morley et al., 2012, Mata et al., 2014).

Bisher gibt es nur wenige Studien, die den Zusammenhang beleuchten. Die Ergebnisse sind ebenso wie die Studiendurchführung und Probandenauswahl uneinheitlich. Studien mit größeren Patientenkollektiven, einheitlichen Diagnosekriterien und *Follow-Up*-Untersuchungen sollten ergänzend angestrebt werden.

Da es innerhalb des H1-Haplotypen noch einzelne Subhaplotypen gibt, könnten folgende Untersuchungen die Bestimmung der H1-Subhaplotypen beinhalten,

um auf diese Weise eine differenzierte Aussage über das Risikoallel zu erhalten (Caffrey and Wade-Martins, 2007). Hinweise auf eine solche Assoziation ergaben sich für den H2a-Subhaplotyp mit einem möglichen protektiven Effekt und für den H1p-Subhaplotyp, der signifikant häufiger bei PDD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden konnte (Seto-Salvia et al., 2011). Aufgrund des regional deutlich unterschiedlichen Verteilungsmusters der Haplotypen-Häufigkeit könnten auch solche regionalen Unterschiede von Subhaplotypen eine Rolle in der Ätiologie der PDD spielen (Winkler et al., 2007, Donnelly et al., 2010).

#### **4.1.3 SNCA**

Mutationen des *SNCA*-Gens, welches für  $\alpha$ -Syn kodiert, führen zu einem familiär vererbten Parkinson-Syndrom. Für *SNCA*-Triplikationen konnte gezeigt werden, dass sie einen Einfluss auf die Entwicklung einer Demenz im Rahmen eines Morbus Parkinson haben (Farrer et al., 2004). SNPs des *SNCA*-Gens wurden in GWAS wiederholt mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Morbus Parkinson in Zusammenhang gebracht (Nalls et al., 2014). Zu den Risikovarianten gehört auch der hier untersuchte SNP rs356219 (Han et al., 2015).

Das für die PD pathognomonische Korrelat sind LBs und LNs. Dass ihre Verteilung im ZNS mit dem Krankheitsstadium einer PD und schlussendlich auch mit dem Auftreten von kognitiven Defiziten und einer Demenz korreliert, beobachteten Braak et al. im Jahre 2002, und auch andere Forschungsgruppen konnten diese Ergebnisse reproduzieren (Braak et al., 2002, Braak et al., 2006, Irwin et al., 2012). Den größten Anteil der LBs und LNs macht wiederum das  $\alpha$ -Syn aus (Spillantini et al., 1997). Der in dieser Arbeit untersuchte SNP rs356219 konnte mit einer vermehrten Expression des Genprodukts  $\alpha$ -Syn assoziiert werden (Mata et al., 2010). Die Menge von kortikalem  $\alpha$ -Syn korreliert positiv mit der Abnahme der kognitiven Fähigkeiten und dem Auftreten einer PDD (Hurtig et al., 2000), sodass ein Zusammenhang möglich scheint.

In dieser Arbeit konnte eine signifikante Assoziation des untersuchten SNPs rs356219 zum Auftreten einer PDD aufgezeigt werden, wenn mindestens ein

Risikoallel nachweisbar war. Dieses Ergebnis blieb auch nach Korrektur für die Kovariablen signifikant (PD vs. MCI:  $p = 0,048$ ; PD vs. PDD:  $p = 0,021$ ; MCI vs. PDD:  $p = 0,002$ ). Lediglich ein Proband der PDD-Subgruppe besaß kein Risikoallel.

Bisherige Daten konnten einen solchen Zusammenhang nicht zeigen (Goris et al., 2007, Mata et al., 2014, Williams-Gray et al., 2013). In diesen drei, diese Assoziation untersuchenden Studien wurden deutlich größere Patientenkollektive eingeschlossen, die Probanden zum Teil auch longitudinal untersucht. Eine Unterscheidung der Subgruppen erfolgte jedoch nur zwischen dementen und nicht-dementen PD-Patienten. Ein MCI-Stadium wurde nicht abgegrenzt.

Von Interesse wäre im Folgenden innerhalb der Kohorte eine Verlaufsbeobachtung der nicht an Demenz erkrankten Probanden, insbesondere derer mit einer PD-MCI, mit einem *SNCA*-Risikoallel. Für diese stellt sich die Frage, ob es zu einem häufigeren Übergang zur PDD im Krankheitsverlauf kommt.

Ein positives Resultat könnte einen potentiellen Marker zur Früherkennung einer Demenz aufzeigen. Bisher konnten jedoch in vorangegangenen Arbeiten meist keine Hinweise auf eine solche Assoziation gefunden werden, sodass die hier nachgewiesene Signifikanz mit Vorsicht zu betrachten ist und Schlussfolgerungen ein größeres Patientenkollektiv und Verlaufsbeobachtung erfordern.

#### **4.1.4 *LRRK2***

Mutationen von *LRRK2* sind vor allem als autosomal dominante Variante des familiären Parkinson-Syndroms bekannt. Zusätzlich konnte eine häufig vorkommende Variante als Risikofaktor bei der sporadischen PD in GWAS nachgewiesen werden (Simon-Sanchez et al., 2009). Diese wurde in der aktuellen Arbeit im Kollektiv der DEMPARK-Studie genotypisiert.

Eine Untersuchung zur Assoziation dieses hier untersuchten SNPs rs1491923 mit der Entwicklung einer PD-MCI oder PDD wurde bisher nicht beschrieben,

somit liegen hierüber bisher keine Erkenntnisse vor. Ein Zusammenhang des untersuchten Risikoallels mit dem Auftreten eines kognitiven Defizits konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis ist konform mit Beobachtungen bei monogenetischen Fällen, die in *LRRK2*-Mutationen keinen Risikofaktor für eine Demenzentwicklung fanden. Dort wurde ein vermehrtes Auftreten von Demenz nicht beobachtet, sondern meist eine geringere Häufigkeit eines kognitiven Defizits (Healy et al., 2008, Srivatsal et al., 2015, Somme et al., 2015). Hinweise auf einen protektiven Faktor bezüglich eines Kognitionsdefizits ergeben sich aus den Daten dieses Kollektivs jedoch ebenso nicht. Es ergibt sich hieraus somit ein Phänotyp ohne Beeinflussung der Kognition. Dieses Ergebnisses bedarf einer Überprüfung in größeren Kollektiven.

## **4.2 Osteopontin-Konzentration**

OPN ist in dieser Arbeit der einzige nicht-genetische Marker. Die Konzentration wurde im Plasma bestimmt. Es handelt sich um ein Protein mit bisher nur partiell geklärt Funktion, für welches aber ein Zusammenhang zu immunologischen Prozessen und Neurodegeneration nachgewiesen werden konnte (Sun et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des OPN-Spiegels im Liquor und Serum bei Parkinson-Erkrankten vorliegt, ebenso wie das Vorhandensein des Proteins in den für die Erkrankung pathognomonischen Lewy-Körperchen in der menschlichen Substantia nigra und tierexperimentell eine induzierte Expression des Proteins durch bekannte PD-verursachende Toxine (Maetzler et al., 2007, Iczkiewicz et al., 2007). Durch Auslösung einer Entzündung in der SN im Maus-Model konnte gezeigt werden, dass Integrin- und CD44-Rezeptoren, mit welchen OPN interagiert, auf den dortigen Zellen vermehrt exprimiert werden und es so zu einer Interaktion kommen kann (Ailane et al., 2013).

In einer Arbeit von Maetzler et al. konnte 2007 weiterhin ein Zusammenhang von Kognition zu OPN-Liquorkonzentrationen und von *Hoehn & Yahr*-Stadien zu OPN-Serumkonzentrationen nachgewiesen werden (Maetzler et al., 2007).

In dem in dieser Arbeit eingeschlossenen Patientenkollektiv zeigte die OPN-Serumkonzentration weder eine signifikante Assoziation zu der Einteilung der Probanden in die Subgruppen nach Kognition noch zu *Hoehn & Yahr*-Stadien.

In eben dieser obengenannten Untersuchung von Maetzler et al. wird auch die Einflussnahme von dopaminerger Medikation auf die OPN-Konzentration diskutiert und könnte auch bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv einen Einfluss auf die Messergebnisse gehabt haben. Die Annahme, dass erstens die dopaminerge Medikation die OPN-Level senkt, und dass zweitens demente Probanden aufgrund fortgeschrittenerer Krankheitsstadien eine höhere kumulative Medikamentendosis erhalten haben, könnte eine Erklärung für den fehlenden Zusammenhang bei den für die vorliegende Arbeit untersuchten Patienten sein (Maetzler et al., 2007). Für weitere Studien zu diesem Zusammenhang wäre eine Untersuchung mit medikamentennaiven Probanden oder zumindest die Berücksichtigung der Medikation als Kovariable von Interesse.

Insgesamt liegen die in dieser Arbeit gemessenen Mittelwerte der OPN-Konzentration in allen Gruppen tendenziell über denen des Referenzbereiches nach Angaben des Herstellers des OPN-Kits (<http://www.ibl-america.com/pdf/newIBLeLisa/27158.pdf>). Dies könnte auf das höhere Durchschnittsalter des untersuchten Patientenkollektivs zurückzuführen sein. Funktionell könnten die insgesamt höheren OPN-Werte durch eine chronische Entzündungsaktivität, prolongiert durch die im Alter abnehmende Hemmung der iNOS und damit die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (siehe Abb. 4), bedingt sein. OPN, als ein Marker für einen inflammatorischen Prozess, könnte eine akute Verschlechterung der Kognition und folglich den Übergang in ein MCI-Stadium oder eine PDD aufzeigen. Ein niedriger gemessener Wert würde somit eine geringere aktuelle Entzündungsaktivität aufzeigen, ein höherer OPN-Wert hingegen einen entzündlichen „Schub“ widerspiegeln. Eine vergleichbare OPN-Erhöhung tritt bei primär

neuroinflammatorischen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose in Phasen einer akuten Verschlechterung im Sinne eines „Schubs“ auf (Shimizu et al., 2013). Dies könnte ein Grund für den fehlenden Nachweis einer Assoziation zur Subgruppeneinteilung sein.

Diese These der OPN-Erhöhung in akuten Phasen der kognitiven Verschlechterung wird unterstützt durch den Nachweis eines phosphorylierten OPN-C-Terminus-Fragments im Liquor von AD-Patienten, das als Marker für den Übergang eines MCI-Stadiums in eine Demenz identifiziert werden konnte (Simonsen et al., 2007). Der Frage, ob sich das Fragment auch in Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel dem Plasma, von Parkinson-Patienten nachweisen lässt, sollte im Hinblick auf die Suche nach Biomarkern für Demenzentwicklung ebenfalls weiter nachgegangen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Differenzierung zwischen den Subgruppen könnte der Nachweis einer Verschiebung von Splicing-Varianten des OPNs sein. Durch alternatives Spleißen des OPN-Gens entstehen zwei weitere Varianten des OPNs, sog. *Osteopontin splicing isoforms* (OPN-SI). Diese sind *Osteopontin-b* (300 Aminosäuren) mit einer Deletion des Exons 5 oder *Osteopontin-c* (287 Aminosäuren) mit einer Deletion des Exons 4 (Young et al., 1990, He et al., 2006). Der mögliche Einfluss von Splicing-Varianten auf den Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen sollte geprüft werden. In der Onkologie konnten bereits derartige Verschiebungen nachgewiesen werden, die mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen assoziiert waren (Tilli et al., 2012).

#### **4.2.1 Osteopontin-Konzentration und *LRRK2***

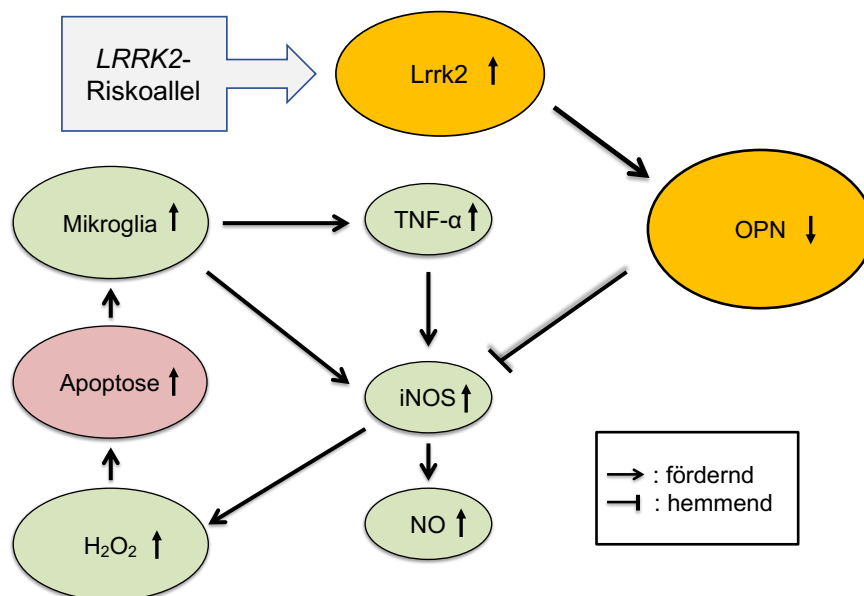
Lrrk2 ist ein Protein, das wiederholt in Zusammenhang mit immunologischen Prozessen gebracht werden konnte. Das *LRRK2*-Genprodukt scheint auch eine Rolle bei der Neuroinflammation im Rahmen einer PD zu spielen. So wird es von Zellen des Immunsystems exprimiert (Schapansky et al., 2015). Untersuchungen an humanen und murinen Gehirnen zeigen, dass das Protein und die *LRRK2*-messengerRNA (mRNA) für Mikroglia und Astrozyten in erhöhtem Maße detektierbar sind (Russo et al., 2014). Im Tiermodell konnte nachgewiesen



werden, dass Mikroglia mit einer inhibierten Lrrk2 verminderte TNF- $\alpha$ - und iNOS-Konzentrationen aufweisen (Moehle et al., 2012, Kim et al., 2012). Die genauen Zusammenhänge von *LRRK2* mit immunologischen Prozessen sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Hierin könnte aber ein Zusammenwirken mit OPN bestehen.

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv konnte für OPN eine signifikante Assoziation mit dem dominanten Modell des *LRRK2*-SNPs rs1491923 (TT versus CT+CC) nachgewiesen werden ( $p = 0,047$ ). Versuchspersonen mit dem Risikoallel wiesen niedrigere OPN-Plasmalevel auf als solche ohne dieses.

In der Literatur beschriebene *LRRK2*-Mutationsträger weisen einen typischen Krankheitsverlauf auf. Die hier niedrigeren OPN-Konzentrationen bei *LRRK2*-Risikoallelträgern könnten über ein vermehrtes Auftreten von oxidativem Stress mit dem Untergang von hierfür sensiblen Neuronen in der Substantia nigra in Zusammenhang stehen (siehe Abb. 29, vgl. Abb. 4) und so die Krankheitsentstehung begünstigen.



**Abb. 29 Hypothetisches Modell der Auswirkung einer erniedrigten Osteopontin-Konzentration durch die LRRK2-Mutation**

Abkürzungen: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid, iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, LRRK2: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Gens der Leucin-reichen Repeat-Kinase 2, Lrrk2: Leucin-reiche Repeat-Kinase 2, NO: Stickstoffmonoxid, OPN: Osteopontin, TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Bisher festgestellte biochemische Funktionen des *LRRK2*-Genprodukts legen einen Zusammenhang zu der OPN-Konzentration nahe. Dieses könnte in seiner Funktion als Kinase phosphorylierende Eigenschaften in Bezug auf den mTOR/4E-BP/eIF4E-Signalweg zu haben. Über diesen Signalweg wird auch die Translation von OPN beeinflusst. Da es zu diesem Zusammenhang bisher nur wenige Arbeiten gibt, deren Daten im Rahmen von Grundlagenforschung in Systemen wie embryonalen Nierenzellen und *Drosophila*, die nur eingeschränkt auf Verhältnisse im menschlichen Gehirn übertragbar scheinen, generiert wurden, sind die Zusammenhänge von OPN und *LRRK2* noch nicht hinreichend gesichert (Imai et al., 2008, Kumar et al., 2010). Beim Menschen wurden Interaktionen bisher nicht nachgewiesen (Chatr-Aryamontri et al., 2015). Dennoch ergeben sich interessante Hinweise zu der krankheitsbeeinflussenden Funktion von *LRRK2* als ein weiteres molekulares Target aus der Arbeit von Imai et al. (Imai et al., 2008). *LRRK2*-Mutationen führen über 4E-BP zu einer Beeinflussung von miRNAs (Gehrke et al., 2010). MiRNAs wurden 1993 entdeckt und sind seitdem von zunehmender Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese unterschiedlichster Erkrankungen (Lee et al., 1993). Sie sind nicht-kodierende RNA-Moleküle, die von eukaryoter nukleärer DNA abgelesen werden. Ihre biologische Bedeutung wird in der post-transkriptionellen, epigenetischen Regulation der Proteinbiosynthese gesehen (Garo and Murugaiyan, 2016).

Auch an murinen Zellkulturen und im Frontalhirn von Parkinson-Patienten haben sich Zusammenhänge zwischen miRNA-Verschiebungen und *LRRK2*-Mutationen zeigen lassen (Cho et al., 2013). Diesem Aspekt sollte auch im Zusammenhang mit PDD weiter nachgegangen werden.

Basierend auf der Tatsache, dass eine einzelne miRNA unterschiedliche Ziel-Gene beeinflussen kann, könnte eine einzelne miRNA auch potenziell einen Krankheitsverlauf modifizieren (Maciotta et al., 2013). Hierin könnte, im Sinne von sogenannten miRNA-Mimics und Anti-miRNAs, sogar ein neuer möglicher Therapieansatz für die Neurodegeneration im Rahmen der PD liegen.

### 4.3 Limitationen der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Kollektiv von 94 Probanden untersucht. Aufgeteilt nach der Kognition ergaben sich drei Gruppen von weniger als 40 Probanden. Eine geringe Gruppengröße könnte ein Grund für falsch negative Ergebnisse sein. Grundsätzlich kann aufgrund des relativ kleinen Kollektivs und der Komplexität der Erkrankung ein prognostischer Marker weder mit Sicherheit identifiziert noch ausgeschlossen werden, es ergeben sich lediglich Hinweise auf einen solchen. Analysen der longitudinalen Daten sind hierfür ergänzend notwendig. Insbesondere kleine Effekte der Einzelnukleotid-Polymorphismen können durch die geringe Patientenzahl unerkannt bleiben.

Bei den Probanden dieser Arbeit handelt es sich um Patienten, bei denen bereits eine medikamentöse Therapie der PD begonnen wurde. Sie waren zum Untersuchungszeitpunkt nicht mehr medikamentennaiv. Außerdem wiesen sie neben der untersuchten Erkrankung Komorbiditäten auf, die ebenso wie die deshalb eingenommene Medikation einen Einfluss auf Messergebnisse, zum Beispiel die OPN-Konzentration, haben konnten.

Die Patienten wurden hauptsächlich aus der neurologischen Ambulanz rekrutiert. Bei fortgeschrittener PD ist auch das Vorliegen einer PDD häufiger (Hely et al., 2008). Die Ausprägung der Erkrankung, bezogen auf ein motorisches wie auch kognitives Defizit und eine depressive Verstimmung, können dazu geführt haben, dass für diese Patienten eine ambulante Vorstellung nicht möglich war. Dies wiederum könnte bedingt haben, dass schwer betroffene Patienten nicht eingeschlossen werden konnten. Auch die Qualität der Eigenanamnese kann durch das Vorliegen einer fortgeschrittenen kognitiven Beeinträchtigung beeinflusst worden sein. Ein Beispiel könnte hier die mit zunehmendem kognitivem Defizit tendenziell häufiger als negativ benannte Familienanamnese sein.

Die Diagnose der PD wird in diesem Kollektiv anhand der UK PDSBB Kriterien gestellt (Hughes et al., 1992), die neuropathologisch validiert sind und bei Anwendung durch einen erfahrenen Neurologen mit Schwerpunkt für Bewegungsstörungen eine hohe Sensitivität und Spezifität zeigen (Hughes et al.,

2002). Allerdings kann die Diagnose des Morbus Parkinson mit letzter Sicherheit erst posthum rückwirkend gestellt werden, sodass die Diagnose der Erkrankung zum Zeitpunkt der Untersuchung auf einer Experteneinschätzung basiert (Postuma et al., 2015).

Weiterhin ist die Zuteilung zu den Subgruppen, insbesondere die Zuordnung zur Gruppe des MCI von individuell gesetzten *Cut-Off*-Werten abhängig (Liepelt-Scarfone et al., 2011). Hierbei wird eine Standardabweichung festgelegt, die die Zuordnung zu kognitiven Subgruppen aus den Ergebnissen der neuropsychologischen Testung ermöglicht.

Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine explorative Datenanalyse. Das gewählte Signifikanzniveau wurde entsprechend mit  $p < 0,05$  festgelegt, um Hinweise für bisher noch unbekannte Zusammenhänge aufzuzeigen. Diese müssen im Folgenden weiter untersucht werden. Zu beachten ist, dass anschließende, weiterführende Analysen dieser Zusammenhänge einer Korrektur für multiples Testen bedürfen, das  $\alpha$ -Niveau muss entsprechend angepasst werden.

#### **4.4 Ausblick**

Eine Stärke dieser Arbeit ist die genaue Klassifizierung der untersuchten PD-Patienten durch aufwändige neurologische und neuropsychologische Testungen entsprechend aktueller Leitlinien und Expertenmeinungen. Hierdurch war auch eine Abgrenzung der meist in der Literatur nicht unterschiedenen PD-MCI möglich. Bisherige Daten in der Literatur zeigen uneinheitliche Ergebnisse bezüglich Markern, die im Zusammenhang mit dem Auftreten eines kognitiven Defizits im Rahmen der PD stehen. Ein Grund hierfür ist unter anderem die uneinheitliche Klassifizierung des kognitiven Defizits. Diese reicht von einer Klassifizierung anhand einer Screening-Testung (zum Beispiel mittels MMSE) bis hin zu aufwändigen neuropsychologischen Untersuchungen mit mehrfach Testungen in den einzelnen Kognitionsdomänen. Des Weiteren erfolgt häufig

lediglich die Unterscheidung zwischen PD und PDD ohne Abgrenzung des PD-MCI-Stadiums. Hinzu kommen Unterschiede in der Auswahl von Tests und *Cut-Off*-Werten zur Unterteilung der kognitiven Subgruppen (Liepelt-Scarfone et al., 2011). Dahingehend wäre das Ziel, einheitliche Kriterien zur Diagnosestellung, insbesondere der PD-MCI, zu etablieren. Diese wurden bereits 2012 in den *Movement Disorder Society Task Force Guidelines* durch ein Expertengremium formuliert (Litvan et al., 2012). Durch eine einheitliche Verwendung könnte dann eine bessere Vergleichbarkeit der Studien geschaffen werden.

Hinzu kommt in diesem Zusammenhang die immer mehr an Bedeutung gewinnende Identifizierung von weiteren Subtypen der PD. Innerhalb der Patienten mit der Diagnose einer PD gibt es deutliche Unterschiede in der Ausprägung der motorischen Symptome, aber auch nicht-motorischen Symptome und deren Progress im Verlauf der Erkrankung. Manche PD-Patienten bleiben im gesamten Verlauf ihrer Erkrankung kognitiv unbeeinträchtigt, andere entwickeln eine PD-MCI ohne eine spätere PDD, wieder andere zeigen ein rasches Voranschreiten des Kognitionsdefizits mit einer frühzeitigen Entwicklung einer PDD (Pedersen et al., 2013). Auch bezüglich des kognitiven Defizits können unterschiedliche Ausprägungen der Einschränkungen in den Kognitionsdomänen gefunden werden. Beispielhaft sei hier die Unterscheidung von PD-MCI-„non-amnestic“ und PD-MCI-„amnestic“ genannt, die im Kollektiv der LANDSCAPE-Studie identifiziert werden konnten (Kalbe et al., 2016). Auch die Erkennung und Diagnostizierung einer Frühform der PD („Prodromal PD“) bietet weitere Optionen der Klassifizierung (Berg et al., 2015, Postuma and Berg, 2016). Durch die Früherkennung können sich weitere Erkenntnisse ergeben, Patienten zum Beispiel medikamentennaiv untersucht werden.

Anzustreben ist also eine genauere Klassifikation der Patienten und Identifikation von Subtypen. Dies würde nicht nur die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen verbessern, sondern könnte auch zur Früherkennung, Einschätzung der Prognose, Entwicklung individuellerer ärztlicher Patientenbetreuung und möglicherweise auch individueller therapeutischer Ansätze (zu Beispiel pharmakologisch *versus* nicht-pharmakologisch) führen können (Lawrence et al.,

2016). Bisher ist der Goldstandard der Diagnosestellung zu Lebzeiten die Expertenmeinung (Postuma et al., 2015). Ein mit vergleichbar geringem Aufwand und Kosten verfügbarer Marker könnte die Diagnosestellung auch für nicht im Bereich der Bewegungsstörungen erfahrene Ärzte erleichtern und stützen.

Bezüglich der hier untersuchten Marker sind ebenfalls genauere Analysen sinnvoll. Als Beispiel sind hier vor allem die Subhaplotypenidentifizierung des *MAPT* und die OPN-Splicing-Varianten zu nennen (Seto-Salvia et al., 2011, Tilli et al., 2012).

Ein valider Biomarker könnte in diesem Zusammenhang die bisher klinische Diagnosestellung erleichtern und stützen. Multizentrische Projekte, wie die „*Fox Investigation for New Discovery of Biomarkers in Parkinson's Disease*“ (BioFIND)-Studie oder das *Parkinson Disease Biomarkers Program* (PDBP), zur Etablierung von Biomaterial-Datenbanken großer Patientenkollektive soll in der Zukunft das Finden von prognostischen Markern vereinfachen (Kang et al., 2016, Rosenthal et al., 2016).

In dieser Studie untersuchte genetische Marker könnten, gemeinsam mit anderen in GWAS identifizierten SNPs durch Risikoallelsammierung oder Algorithmen- beziehungsweise Score-Bildung unter Einbeziehung anderer Untersuchungen (andere Bioproben, apparative Diagnostik) möglicherweise einen Zusammenhang zu kognitiven Defiziten aufzeigen. Eine Kombination von Biomarkern im Serum und anderen Bioproben (Liquor, Urin, Speichel, sonstige Gewebeproben), genetischer und epigenetischer Veränderungen (miRNAs), klinischer und bildgebender Untersuchungsverfahren (Magnetresonanztomographie (MRT), transkranialer Ultraschall (TCS), Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (SPECT)) könnte in einem großen, multizentrisch prospektiv untersuchten, wie hier neuropsychologisch genau charakterisierten Kollektiv zu neuem Erkenntnisgewinn führen.

All dies macht deutlich, wie heterogen die Erkrankung letztendlich ist, und dass dem großen Kollektiv der PD-Patienten unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde liegen, die das Finden eines einzelnen Markers erschweren. Es wäre möglich, dass die untersuchten Marker nur bei einem Subtyp der Erkrankung

einen Einfluss zeigen. Dahingehend sind weitere longitudinale Daten, wie aus der DEMPARK/LANDSCAPE-Studie, von großem Interesse für die Einschätzung von Markern zur Entwicklung eines kognitiven Defizits (Balzer-Geldsetzer et al., 2011, Kalbe et al., 2016).

## 5 Zusammenfassung

Nicht-motorische Symptome der neurodegenerativen Parkinson-Erkrankung, wie das Auftreten kognitiver Defizite, können Morbidität und Mortalität der Erkrankung wesentlich beeinflussen. Etwa knapp ein Drittel der Parkinson-Patienten leiden an einer Demenz im Rahmen ihrer Erkrankung.

Ein valider Biomarker, der die Diagnose einer Parkinson-assoziierten Demenz stützen kann, konnte bisher nicht identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die in genomweiten Assoziationsstudien als Risikofaktoren für die Parkinson-Erkrankung identifizierten Einzelnukleotid-Polymorphismen *SNCA* (rs356219), *MAPT* (rs393152) und *LRRK2* (rs1491923) (Simon-Sanchez et al., 2009, Lill et al., 2012) und das für die Alzheimer-Demenz bekannte *APOE*  $\epsilon$ 4-Allel (rs429358) (Bertram et al., 2008) eine Assoziation zu kognitiven Defiziten bei Parkinson-Patienten zeigen. Darüber hinaus wurde die Plasmakonzentration von Osteopontin, welches in experimentellen Modellen mit Parkinson-assoziiierter Neuroinflammation in Zusammenhang gebracht wurde (Maetzler et al., 2007), auf eine Assoziation mit den kognitiven Fähigkeiten von Parkinson-Patienten untersucht.

Im Rahmen der Baseline-Untersuchung der longitudinalen, multizentrischen DEMPARK-Studie am Zentrum für Neurologie des Universitätsklinikums Tübingen wurde ein Kollektiv von insgesamt 94 Parkinson-Patienten eingeschlossen und nach ausführlicher klinisch-neurologischer und neuropsychologischer Testung in Subgruppen nach Kognition mit 30 Probanden ohne eine kognitive Einschränkung (PD), 39 Probanden mit mildem kognitivem Defizit (PD-MCI) und 25 Probanden mit begleitender Demenz (PDD) unterteilt. Weiterhin erfolgten die Sequenzierung der Einzelnukleotid-Polymorphismen sowie die Bestimmung der Osteopontin-Konzentration im Plasma.

Für die *SNCA*-Risikoallelträgerschaft zeigte sich eine signifikante Assoziation mit einer Parkinson-assoziierten Demenz, welche auch nach Korrektur für die Kovariablen Alter, Bildungsjahre und Erkrankungsdauer signifikant blieb (PD *versus* MCI:  $p = 0,048$ ; PD *versus* PDD:  $p = 0,021$ ; MCI *versus* PDD:  $p = 0,002$ ). Kein Zusammenhang mit einer Kognitionseinschränkung konnte für die



untersuchten Einzelnukleotid-Polymorphismen *MAPT* und *LRRK2* sowie das *APOE*  $\epsilon 4$ -Allel und die Osteopontin-Plasmakonzentration gefunden werden. Bei Vorhandensein des *LRRK2*-Risikoallels war die Osteopontin-Konzentration im Plasma signifikant niedriger ( $p = 0,047$ ).

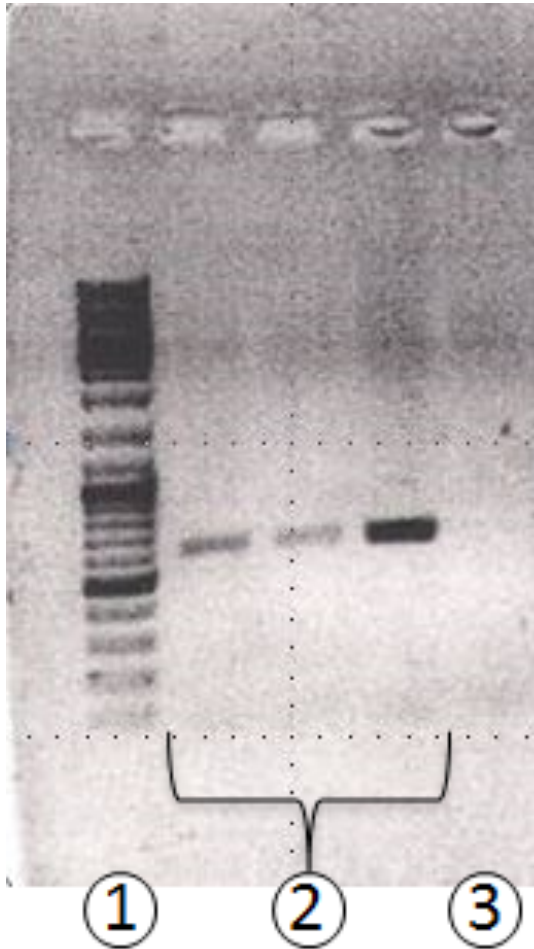
Die aktuellen Daten dieses neurologisch wie auch neuropsychologisch präzise klassifizierten Kollektivs konnten das Vorhandensein eines bisher uneinheitlich beschriebenen Zusammenhangs des *SNCA*-Einzelnukleotid-Polymorphismus und einer Demenz im Rahmen der Parkinson-Erkrankung stützen. Die Assoziation des *LRRK2*-Einzelnukleotid-Polymorphismus mit einer niedrigeren Osteopontin-Plasmakonzentration ebenso wie das Fehlen eines Zusammenhangs mit der Parkinson-assoziierten Demenz sind bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Weitere Untersuchungen in größeren Kollektiven mit longitudinalen Daten sind notwendig und könnten ergänzend die Differenzierung von *MAPT*-Subhaplotypen, Osteopontin-Splicing-Varianten und epigenetischen Veränderungen enthalten.

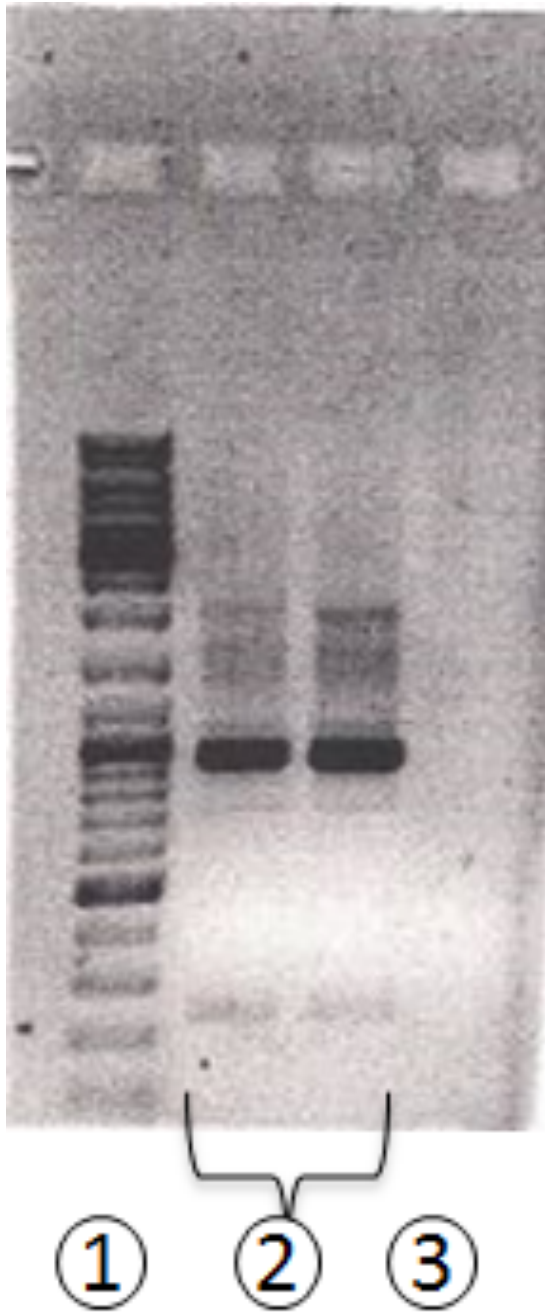
## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungen

#### 6.1.1 Beispielbilder Gelelektrophorese

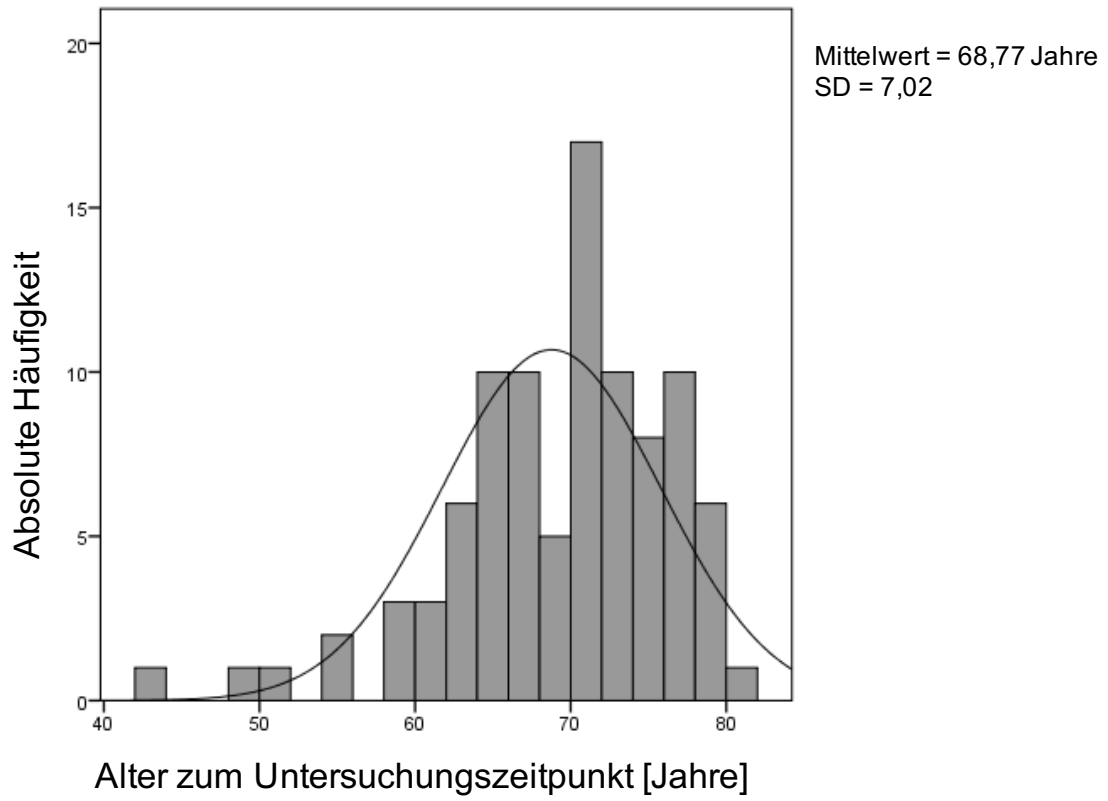


**Abb. 30 Beispiel Gelelektrophorese Mastermix 1**  
1 = Längenmarker, 2 = Proben 1-3, 3 = Negativkontrolle



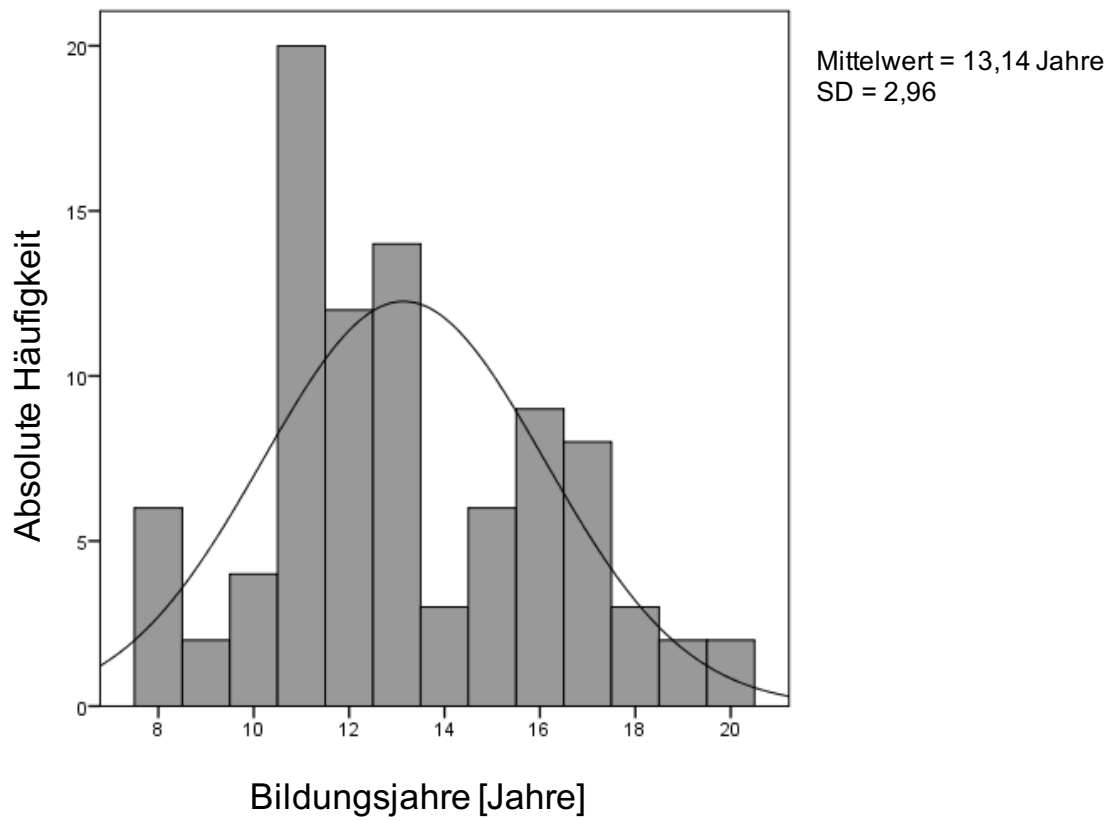
**Abb. 31 Beispiel Gelelektrophorese Mastermix 4**  
1 = Längenmarker, 2 = Proben 1-2, 3 = Negativkontrolle

### 6.1.2 Histogramme der quantitativen Variablen



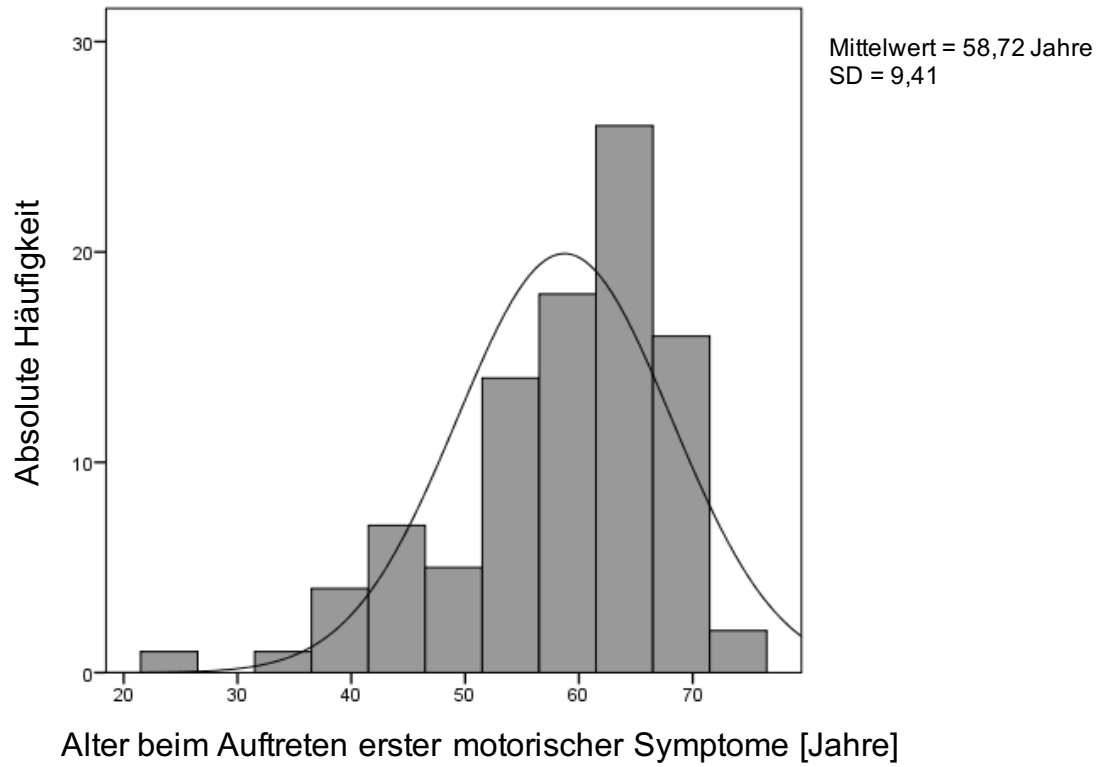
**Abb. 32** Altersverteilung im untersuchten Patientenkollektiv

Abkürzungen: SD: Standardabweichung



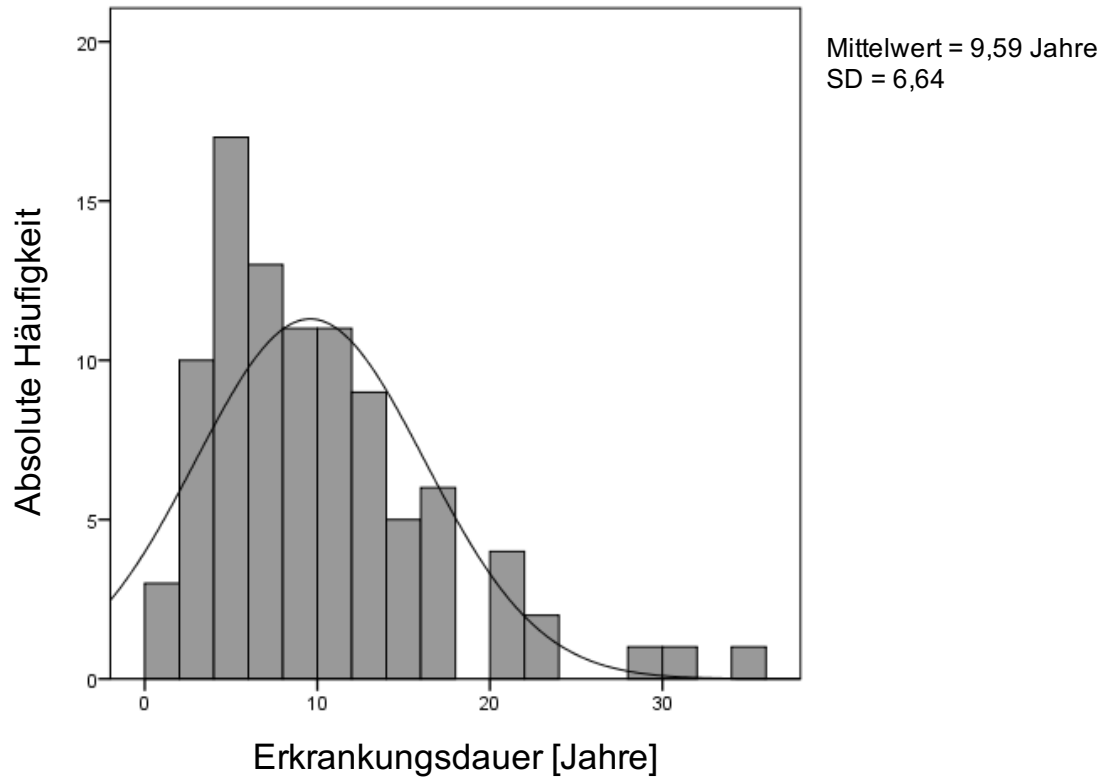
**Abb. 33 Verteilung der Bildungsjahre im untersuchten Patientenkollektiv**

*Abkürzungen: SD: Standardabweichung*



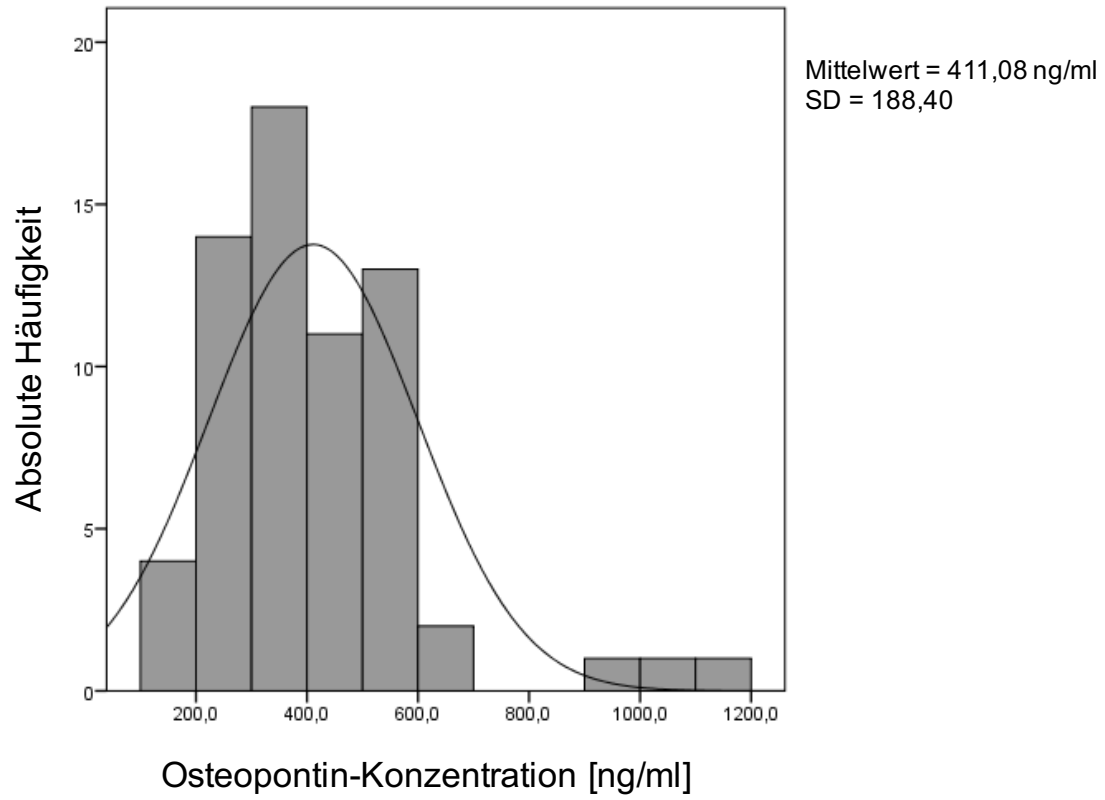
**Abb. 34** Verteilung des Alters bei Erstmanifestation im untersuchten Patientenkollektiv

Abkürzungen: SD: Standardabweichung



**Abb. 35** Verteilung der Erkrankungsdauer im Kollektiv

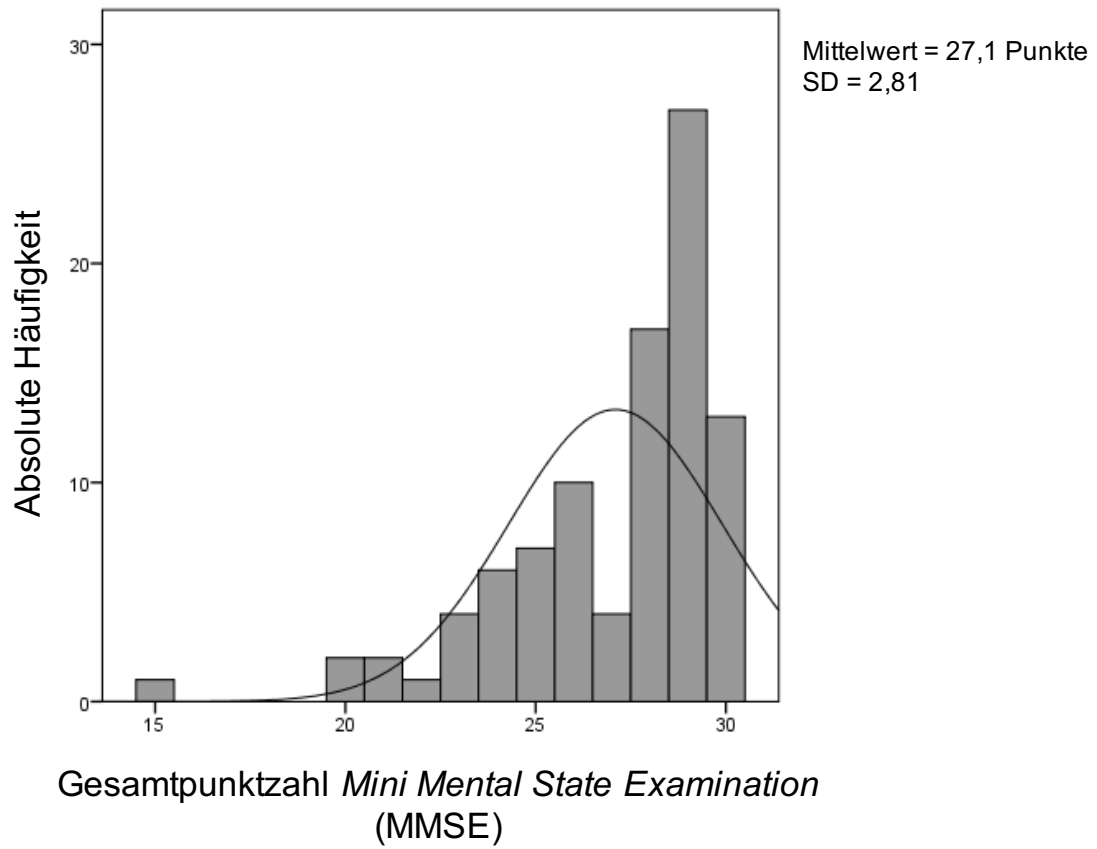
Abkürzungen: SD: Standardabweichung



**Abb. 36 Verteilung der Osteopontin-Konzentration im Kollektiv**

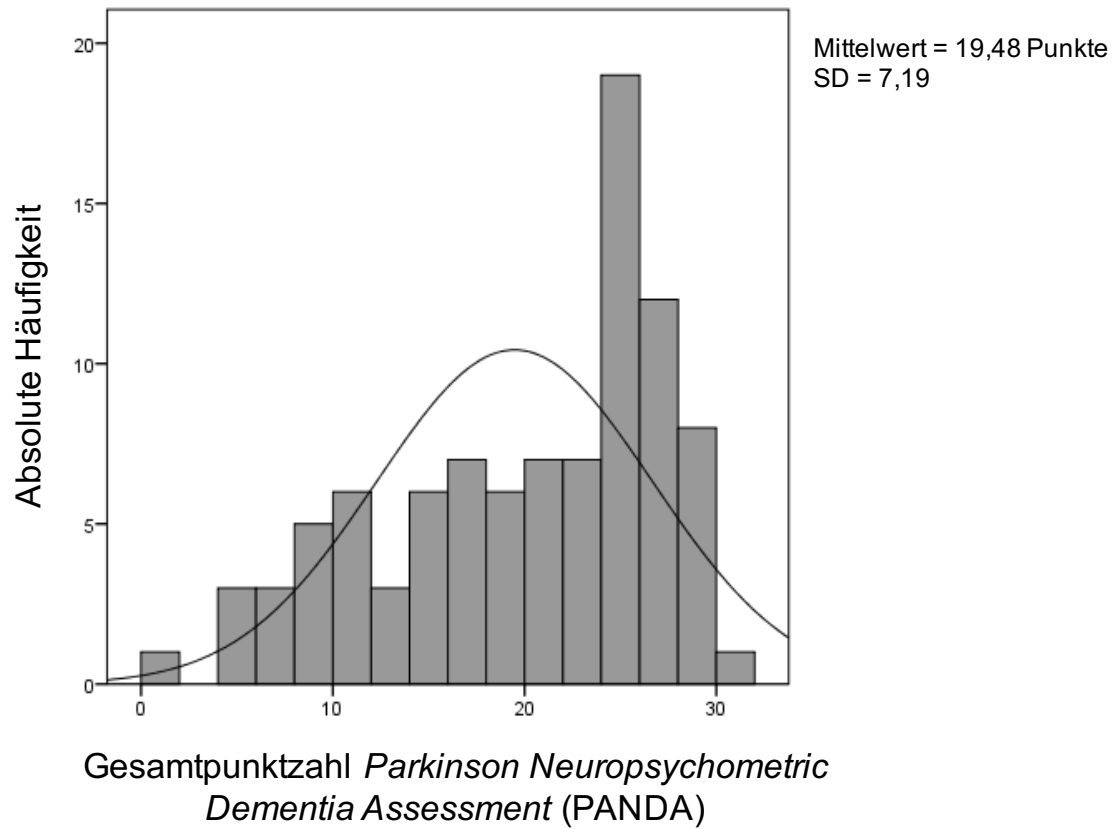
*Abkürzungen: SD: Standardabweichung*





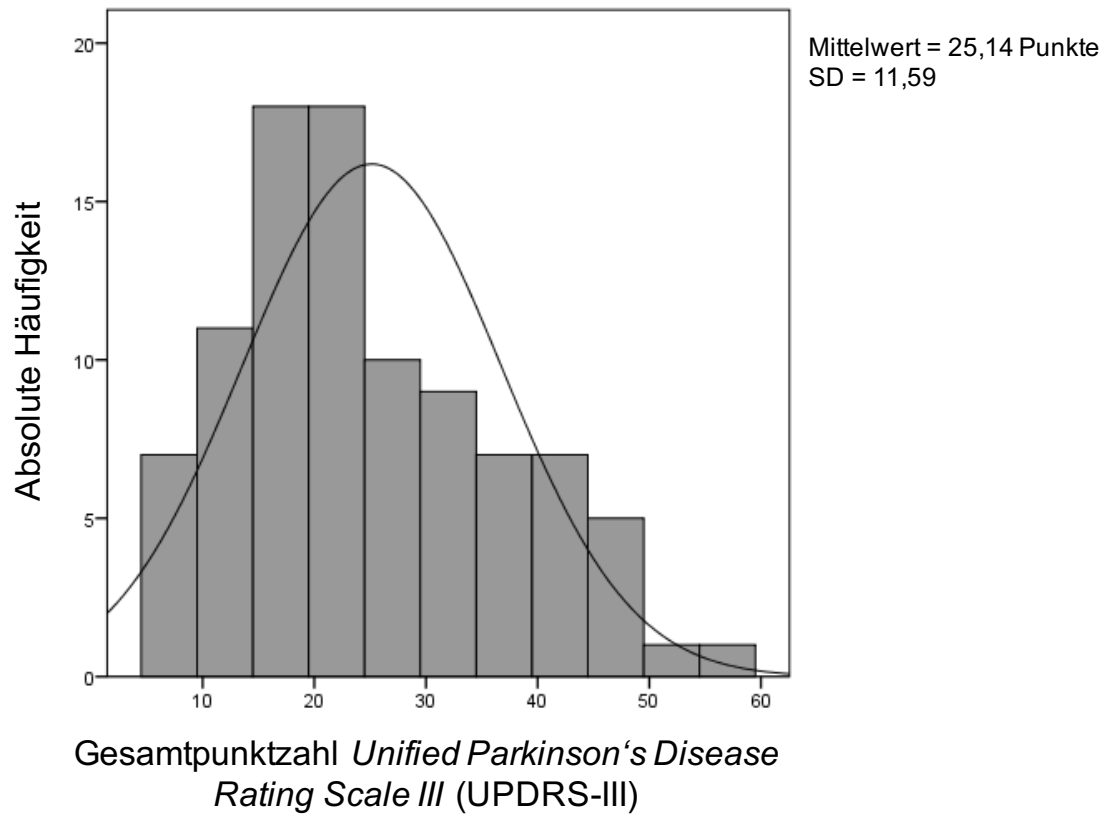
**Abb. 37** Verteilung der Screening-MMSE-Ergebnisse im Kollektiv

Abkürzungen: SD: Standardabweichung



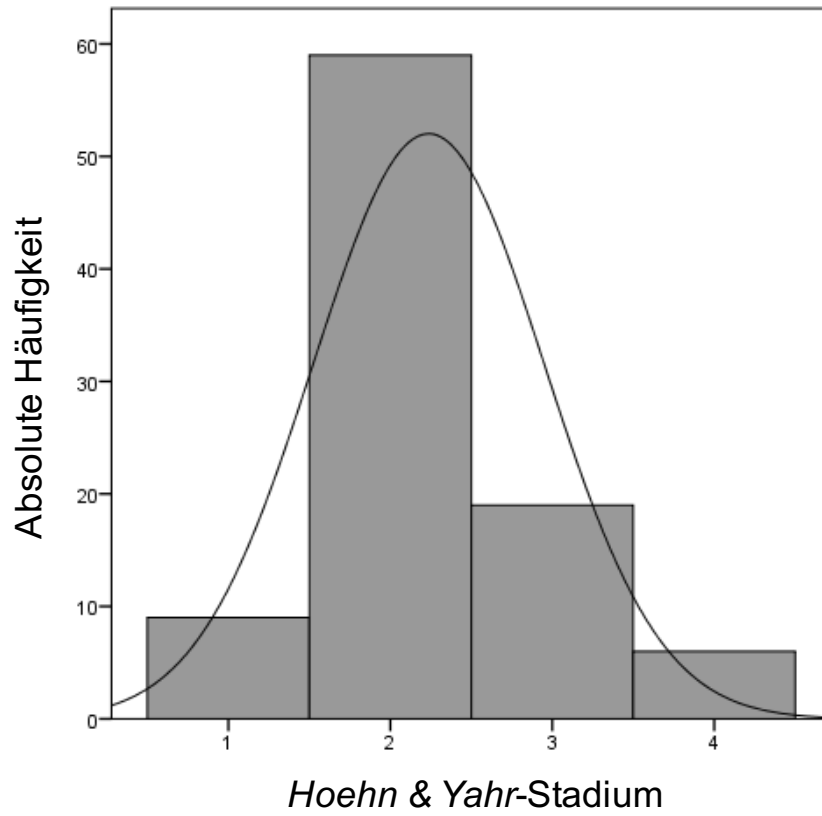
**Abb. 38** Verteilung der Screening-PANDA-Ergebnisse im Kollektiv

Abkürzungen: SD: Standardabweichung



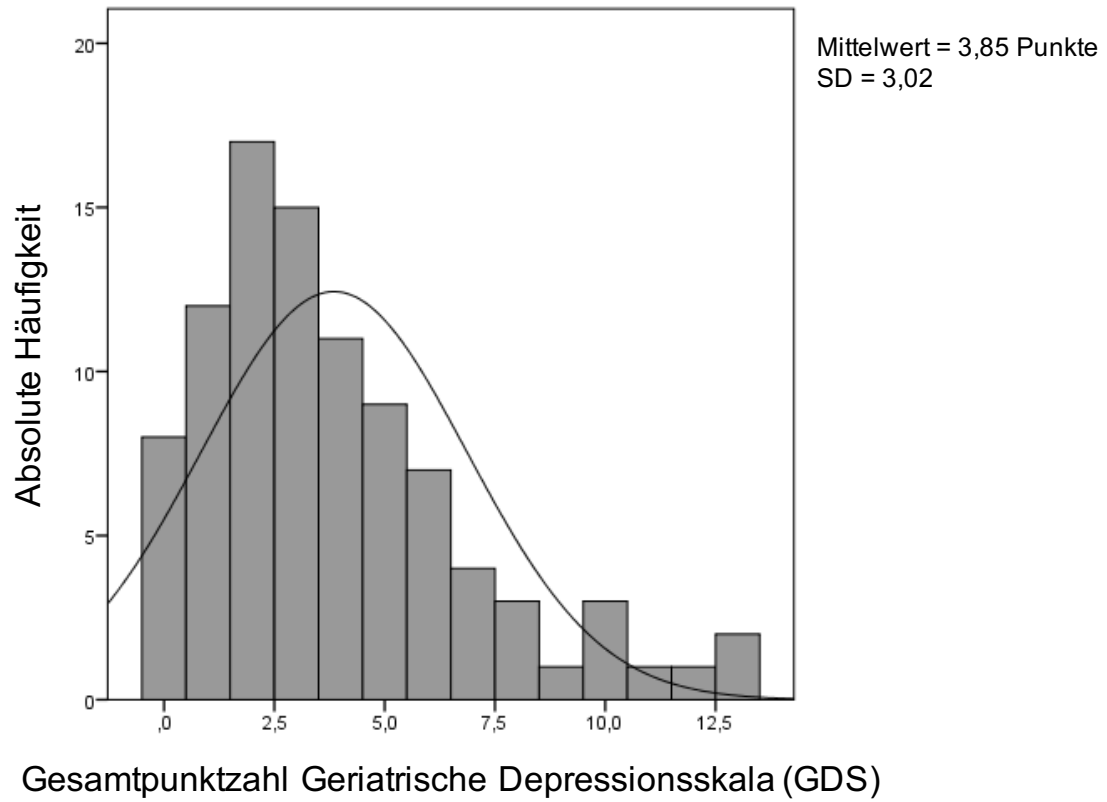
**Abb. 39** Verteilung der UPDRS-III-Ergebnisse im Kollektiv

Abkürzungen: SD: Standardabweichung



**Abb. 40** Verteilung der *Hoehn & Yahr*-Stadien im Kollektiv

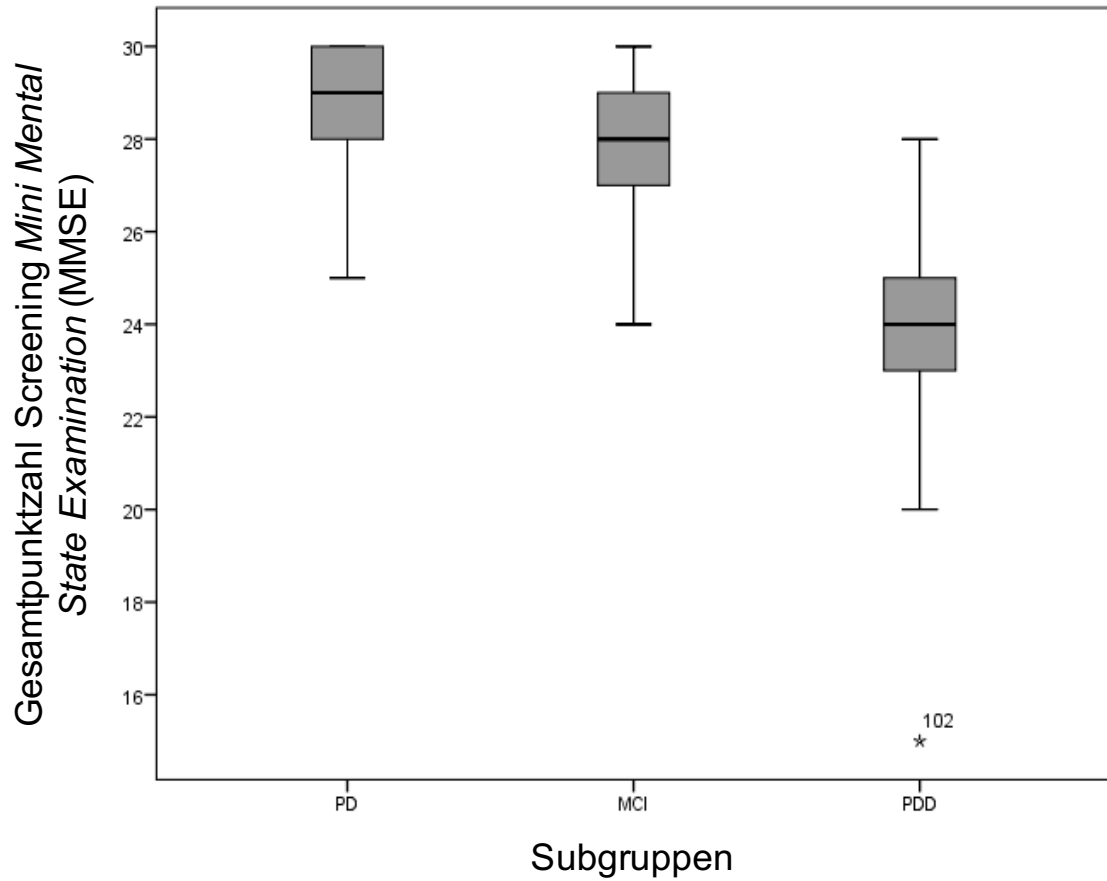
Abkürzungen: *SD*: Standardabweichung



**Abb. 41** Verteilung der GDS-Ergebnisse im Kollektiv

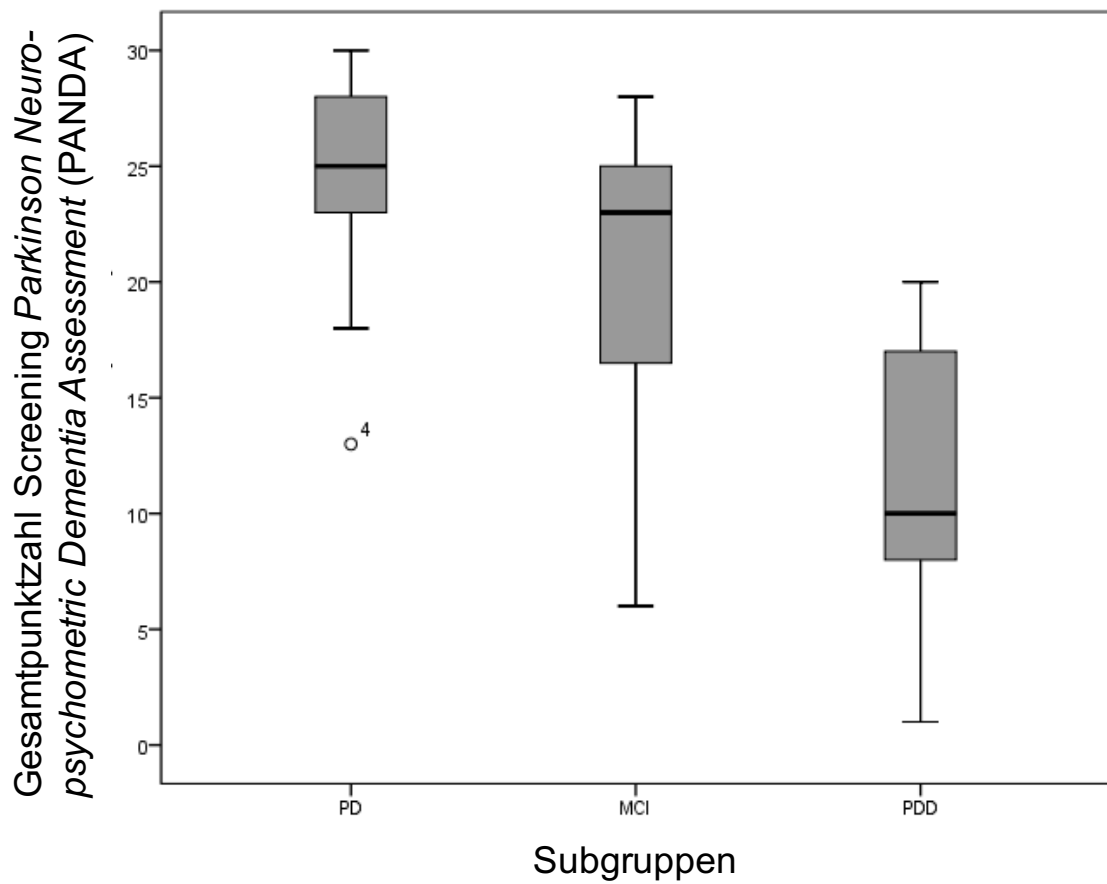
Abkürzungen: *SD*: Standardabweichung

### 6.1.3 Variablenverteilungen innerhalb der Untersuchungsgruppen



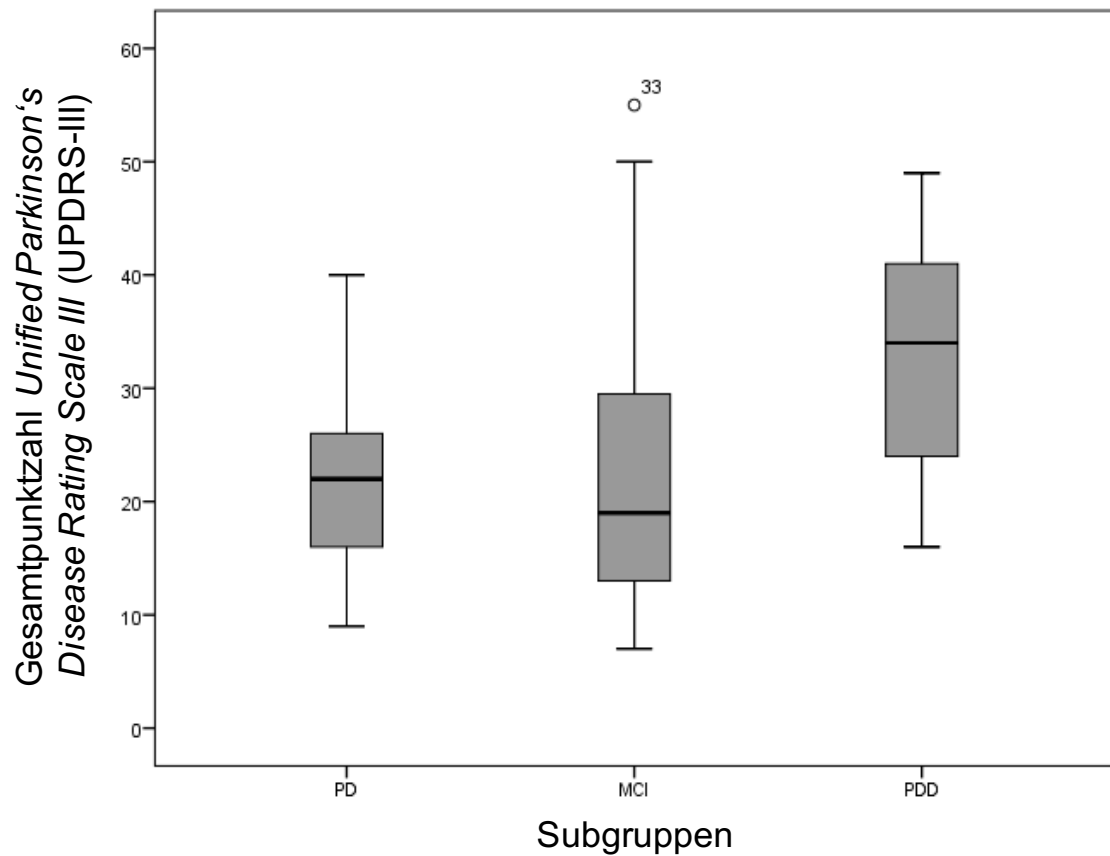
**Abb. 42 Ergebnisse des Screening-MMSE innerhalb der Subgruppen**  
Extreme Ausreißer sind als \* mit Probandennummer gekennzeichnet.

Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz



**Abb. 43 Ergebnisse des Screening-PANDA innerhalb der Subgruppen**  
 Milde Ausreißer sind als ° mit Probandennummer gekennzeichnet.

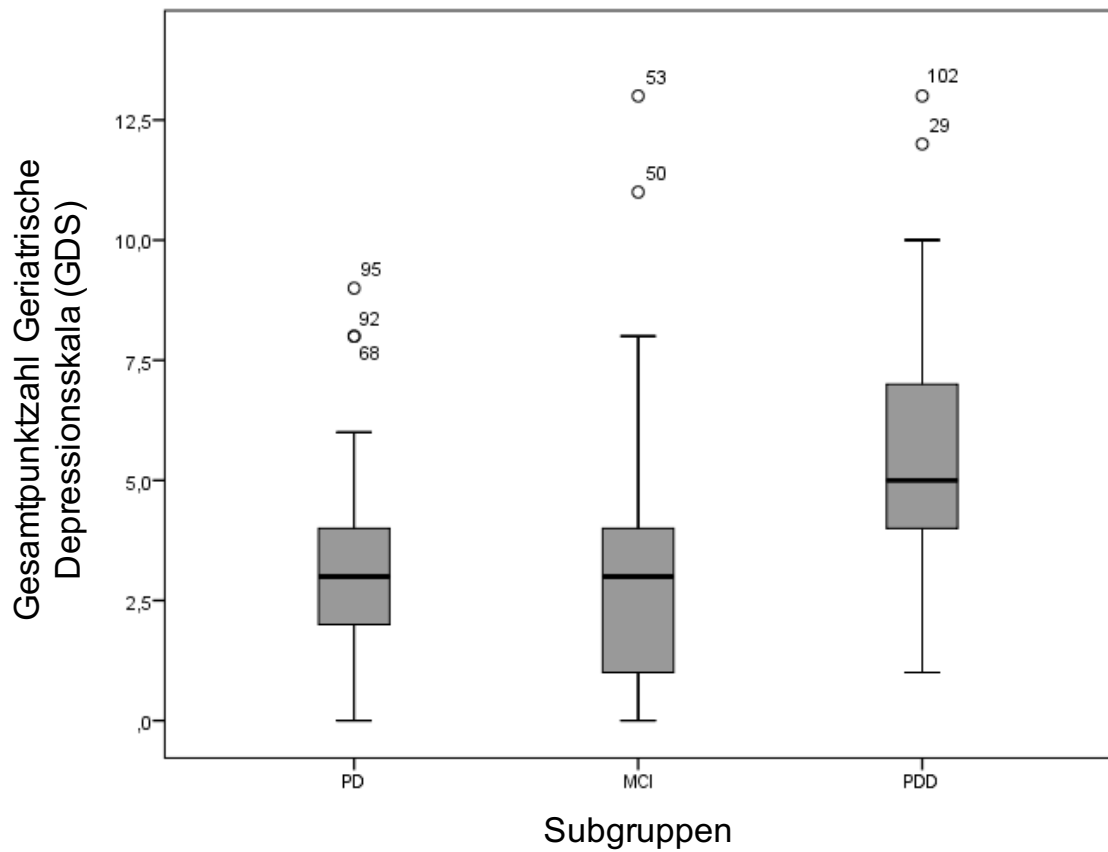
Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz



**Abb. 44 Ergebnisse der UPDRS III innerhalb der Subgruppen**  
 Milde Ausreißer sind als ° mit Probandennummer gekennzeichnet.

Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz





**Abb. 45 Ergebnisse der GDS innerhalb der Subgruppen**

Milde Ausreißer sind als °, extreme Ausreißer sind als \* mit Probandennummer gekennzeichnet.

Abkürzungen: MCI: Parkinson-Erkrankung mit einem leichten kognitiven Defizit, PD: Parkinson-Erkrankung ohne kognitives Defizit, PDD: Parkinson-Erkrankung mit einer Demenz

## 6.2 Tabellen

### 6.2.1 Zeitverlauf der Identifikation der PD-assoziierten Genvarianten

Tab. 21 Zeitverlauf Identifikation Genvarianten (Lin and Farrer, 2014)

Zeit	Studien
1997	Entdeckung einer pathogenen Mutation im $\alpha$ -Synuklein-Gen bei einer italienischen Familie ( <b>Kopplungsstudie</b> )
1999-2001	<b>Kandidatengen-Studien</b> zeigen die Rolle von <i>SNCA</i> und <i>MAPT</i> bei idiopathischem <i>late-onset</i> Parkinson auf
2003-2004	Identifizierte <i>SNCA</i> -Duplikationen und –Triplikationen lassen eine Abhängigkeit der Pathogenität von der Expressionsdosis erkennen
2004-2005	Bei <i>late-onset</i> Parkinson gelingt der Nachweis einer dominant vererbten Mutation im <i>LRRK2</i> -Gen
2009-2014	Mit Hilfe von <b>genomweiten Assoziationsstudien (GWAS)</b> lassen sich <i>SNCA</i> und <i>MAPT</i> sowie auch <i>LRRK2</i> neben anderen Loci bestätigen

Abkürzungen: *LRRK2*: Gen der Leucin-reichen Repeat-Kinase, *MAPT*: Gen des Mikrotubuli-assoziiertes Proteins Tau, *SNCA*: Gen des  $\alpha$ -Synukleins

## 6.2.2 Primer-Sequenzen des Risk-Panels

Tab. 22 Primer-Sequenzen des Risk-Panels

Die untersuchten Einzelnukleotid-Polymorphismen sind hervorgehoben.

SNP	Forward	Reverse	SNaPShot
rs1064039 CST3	GCACGGGTCTCTCTATCT	ACAGGGTCCGGTGAGAAG	GCCGTGAGCCCCGCG
rs429358 APOE (1)	CCGTTCTTCTCTCCCTCTT	CTGCCCATCTCCTCCATC	TCGCGGACATGGAGGACGTG
rs7412 APOE (2)	CCGTTCTTCTCTCCCTCTT	CTGCCCATCTCCTCCATC	GTTTTTTTTTGGTACACTGCCAGGC
rs34559912 BST1	GATTAACCCCTGTGATGCCAGTAT	GCTGGCTTGTCTCTGTAGTC	TTTTTTTTTTGTGCAGTGGTGTGATCATG
rs9652490 LINGO1	GGGAGGAAAGGAGGAGAA	CTGGAAGTCTACCCAGGAG	TTTTTTTTTTTTTTTTGTCAGAGTGAAGCTAGGC
rs2471738 MAPT-H1C	GAGGGAGGGAAGGAAGAA	GAACCGAATGAGGACTGGAA	TTTTTTTTTTTTTTTTTGGAAATAACTCACAGGTGAC
rs12817488 CCDC62/HIP1R	CTACTCGGGAGGCTGAAAGG	GGATGTGAAGTTGGCATGA	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGAGAATTGC TTGAACCC
rs1491923 LRRK2	ACTTCGGGTGCTCATAGC	CCCTCTTCCCAACACACAT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTT TGGCTTT TAGGAATC
rs2010795 PDXK	GAGGAGTAAGTCCCCCATC	CCTGTGAGGCTTTGGGAATC	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGCCTTATCCAGCACC
rs3758549 PITX3	GATGCCACCTGTTTCACT	CGGATGGTCTTTGGATGTCT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCT GGAAGT GAGAATG
rs393152 MAPT	AAGGAGGGAAGGAAGCAAAG	GCATCAAGGGTAGATCCAGGT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATGA GGA GAGGAT
rs365219 SNCA	TGATGTTGCACATTCATGC	TGCTCCTTGAGCCACTGTA	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAAACACAAAATTCCA
chr2:168800545 STK39	CAAAAAGTGGCGAAGGATA	ACATCTGCCTTCCACCAAC	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACAAAAGGACATGAACTCATC
rs1045642 (MDR1) ABCB1	TTCAAAGTGTCTGGTCTCTG	AAGGGTGTGATTTTGTGCT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTGTACAGGAAGAGAT
rs6776185 (NEP) MME	TGGCGACAGAGTGAGACT	CATCTGATTATAACCTACATTCTCC	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGTTCATCAGCTTATTCCT

Abkürzungen: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, SNP: Einzelnukleotid-Polymorphismus, T: Thymin

### 6.2.3 Kodierung der Allele

Tab. 23 Kodierung der Allele (Risikoallel und protektives Allel)

Nächst-gelegenes Gen	0	1	2	SNP	Risiko-allel	Protektives Allel
<b>SNCA</b>	AA	AG	GG	rs356219	G	A
dominantes Modell	AA	AG + GG				
rezessives Modell	AA + AG	GG				
<b>LRRK2</b>	TT	CT	CC	rs149192 3	C	T
dominantes Modell	TT	CT + CC				
rezessives Modell	TT + CT	CC				
<b>APOE ε4</b>	TT	CT	CC	rs429358	C = E4	T = nonE4
dominantes Modell	TT	CT + CC				
rezessives Modell	TT + CT	CC				
<b>MAPT</b>	GG	AG	AA	rs393152	A	G
dominantes Modell	GG	AG + AA				
rezessives Modell	GG + AG	AA				

Abkürzungen: A: Adenin, APOE ε4: ε4-Allel des Apolipoprotein E-Gens, C: Cytosin, G: Guanin, LRRK2: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Gens der Leucin-reichen Repeat-Kinase, MAPT: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau-Gens, SNCA: Einzelnukleotid-Polymorphismus des α-Synuklein-Gens, T: Thymin

## 6.2.4 Thermocycler-Programme

Tab. 24 Thermocycler-Programme

Programm	Prozess
Thermocycler-Programm für Ansatz 1.1, 1.2 und 1.3:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rasche thermische Regulation auf 94 °C</li> <li>2. Inkubation bei 94 °C für 30 Sekunden</li> <li>3. Rasche thermische Regulation auf 60 °C</li> <li>4. Inkubation bei 60 °C für 30 Sekunden</li> <li>5. Rasche thermische Regulation auf 72 °C</li> <li>6. Inkubation bei 72 °C für 30 Sekunden</li> <li>7. Wiederholung 34 weitere Male (<i>Schritte 2-6</i>)</li> <li>8. Inkubation bei 72 °C für 10 Minuten</li> <li>9. Inkubation bei 12 °C dauerhaft</li> </ol>
Thermocycler-Programm für Ansatz 1.4:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rasche thermische Regulation auf 94 °C</li> <li>2. Inkubation bei 94 °C für 30 Sekunden</li> <li>3. Rasche thermische Regulation auf 60 °C</li> <li>4. Inkubation bei 60 °C für 30 Sekunden</li> <li>5. Rasche thermische Regulation auf 72 °C</li> <li>6. Inkubation bei 72 °C für 60 Sekunden</li> <li>7. Wiederholung 34 weitere Male (<i>Schritte 2-6</i>)</li> <li>8. Inkubation bei 72 °C für 10 Minuten</li> <li>9. Inkubation bei 12 °C dauerhaft</li> </ol>
Thermocycler-Programm für Ansatz 2.1 und 2.2:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rasche thermische Regulation auf 94 °C</li> <li>2. Inkubation bei 96 °C für 10 Sekunden</li> <li>3. Rasche thermische Regulation auf 50 °C</li> <li>4. Inkubation bei 50 °C für 5 Sekunden</li> <li>5. Rasche thermische Regulation auf 60 °C</li> <li>6. Inkubation bei 60 °C für 30 Sekunden</li> <li>7. Wiederholung 24 weitere Male (<i>Schritte 2-6</i>)</li> <li>8. Inkubation bei 12 °C dauerhaft</li> </ol>

## 6.2.5 Anteilig erhobene Daten der Variablen

Tab. 25 Anteilig erhobene Daten der Variablen

Variable	Erhobene Daten
<b>Eingeschossene Probanden</b>	94 (100 %)
<b>Alter</b>	94 (100 %)
<b>Bildungsjahre</b>	91 (96,8 %)
<b>Alter bei Erkrankungsbeginn</b>	94 (100 %)
<b>Erkrankungsdauer</b>	94 (100 %)
<b>Osteopontin-Konzentration</b>	65 (69,1 %)
<b>Screening-MMSE</b>	94 (100 %)
<b>Screening-PANDA</b>	94 (100 %)
<b><i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale III (UPDRS-III)</i></b>	94 (100 %)
<b><i>Hoehn &amp; Yahr-Stadium</i></b>	93 (98,9 %)
<b>Geriatrische Depressionsskala (GDS)</b>	94 (100 %)
<b>Geschlecht</b>	94 (100 %)
<b>Familienanamnese</b>	94 (100 %)
<b><i>APOE ε4</i> (rs429358)</b>	75 (79,8 %)
<b><i>MAPT</i> (rs393152)</b>	85 (90,4 %)
<b><i>SNCA</i> (rs356219)</b>	85 (90,4 %)
<b><i>LRRK2</i> (rs1491923)</b>	84 (89,4 %)

Abkürzungen: *APOE ε4*: ε4-Allel des Apolipoprotein E-Gens, *LRRK2*: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Gens der Leucin-reichen Repeat-Kinase, *MAPT*: Einzelnukleotid-Polymorphismus des Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau-Gens, *MMSE*: Mini Mental State Examination, *PANDA*: Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment, *SNCA*: Einzelnukleotid-Polymorphismus des α-Synuklein-Gens

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Multifaktorielle Genese der Parkinson-Erkrankung .....	20
Abb. 2 Wasserstoffperoxid-Entstehung in der mitochondrialen Atmungskette nach Boveris et al, 2000 .....	25
Abb. 3 Osteopontin-Struktur und -Bindestellen nach Uede, 2011.....	33
Abb. 4 OPN-Interaktionen und die dadurch bedingte prolongierte Reaktionsfolge, z. B. bei Entzündungsprozessen .....	35
Abb. 5 Studienablauf .....	40
Abb. 6 Ablauf der DNA-Sequenzierung .....	61
Abb. 7 Polymerase-Kettenreaktion-Thermocycler-Programm für Ansatz 1.1, 1.2 und 1.3.....	64
Abb. 8 Polymerase-Kettenreaktion-Thermocycler-Programm für Ansatz 1.4....	64
Abb. 9 <i>SNaP-Shot</i> ®-Polymerase-Kettenreaktion-Thermocycler-Programm für Ansätze 2.1 und 2.2.....	69
Abb. 10 Flussdiagramm des Patienteneinschlusses.....	74
Abb. 11 Prozentuale Verteilung des Patientenkollektivs in kognitive Subgruppen .....	76
Abb. 12 Verteilung der <i>Hoehn &amp; Yahr</i> -Stadien in den Subgruppen .....	79
Abb. 13 Altersverteilung innerhalb der Subgruppen .....	83
Abb. 14 Mittlere Anzahl der Bildungsjahre innerhalb der Subgruppen.....	84
Abb. 15 Alter beim Auftreten erster motorischer Symptome innerhalb der Subgruppen .....	85
Abb. 16 Erkrankungsdauer seit dem Auftreten der ersten motorischen Symptome innerhalb der Subgruppen .....	86
Abb. 17 Geschlechterverteilung innerhalb der Subgruppen.....	87
Abb. 18 <i>APOE</i> $\epsilon$ 4-Allelträger innerhalb der Subgruppen (dominantes Modell) .	91
Abb. 19 <i>APOE</i> $\epsilon$ 4-Homozygote innerhalb der Subgruppen (rezessives Modell) .....	92
Abb. 20 <i>MAPT</i> H1-Allelträger innerhalb der Subgruppen (dominantes Modell) 93	
Abb. 21 <i>MAPT</i> H1-Homozygote innerhalb der Subgruppen (rezessives Model) .....	94

Abb. 22 <i>SNCA</i> -Risikoallelträger innerhalb der Subgruppen (dominantes Modell) .....	95
Abb. 23 <i>SNCA</i> -Homozygote für das Risikoallel innerhalb der Subgruppen (rezessives Modell).....	96
Abb. 24 <i>LRRK2</i> -Risikoallelträger innerhalb der Subgruppen (dominantes Modell) .....	97
Abb. 25 <i>LRRK2</i> -Homozygote für das Risikoallel innerhalb der Subgruppen (rezessives Modell).....	98
Abb. 26 Osteopontin-Konzentration innerhalb der Subgruppen.....	100
Abb. 27 Familienanamnese innerhalb der Subgruppen.....	103
Abb. 28 Osteopontin-Konzentration bei Probanden mit und ohne <i>LRRK2</i> - Risikoallel.....	106
Abb. 29 Hypothetisches Modell der Auswirkung einer erniedrigten Osteopontin- Konzentration durch die <i>LRRK2</i> -Mutation.....	117
Abb. 30 Beispiel Gelelektrophorese Mastermix 1 .....	126
Abb. 31 Beispiel Gelelektrophorese Mastermix 4 .....	127
Abb. 32 Altersverteilung im untersuchten Patientenkollektiv.....	128
Abb. 33 Verteilung der Bildungsjahre im untersuchten Patientenkollektiv .....	129
Abb. 34 Verteilung des Alters bei Erstmanifestation im untersuchten Patientenkollektiv.....	130
Abb. 35 Verteilung der Erkrankungsdauer im Kollektiv .....	131
Abb. 36 Verteilung der Osteopontin-Konzentration im Kollektiv.....	132
Abb. 37 Verteilung der Screening-MMSE-Ergebnisse im Kollektiv .....	133
Abb. 38 Verteilung der Screening-PANDA-Ergebnisse im Kollektiv .....	134
Abb. 39 Verteilung der UPDRS-III-Ergebnisse im Kollektiv .....	135
Abb. 40 Verteilung der <i>Hoehn &amp; Yahr</i> -Stadien im Kollektiv .....	136
Abb. 41 Verteilung der GDS-Ergebnisse im Kollektiv .....	137
Abb. 42 Ergebnisse des Screening-MMSE innerhalb der Subgruppen .....	138
Abb. 43 Ergebnisse des Screening-PANDA innerhalb der Subgruppen.....	139
Abb. 44 Ergebnisse der UPDRS III innerhalb der Subgruppen.....	140
Abb. 45 Ergebnisse der GDS innerhalb der Subgruppen .....	141



## 6.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Einteilung der Parkinson-Syndrome .....	10
Tab. 2 <i>Hoehn &amp; Yahr</i> -Stadien.....	48
Tab. 3 <i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i> (UPDRS)-Subskalen.....	50
Tab. 4 Neuropsychologische Testungen .....	55
Tab. 5 Primer für die jeweiligen Mastermixe der Polymerase-Kettenreaktion...	62
Tab. 6 Pipettierschema der Polymerase-Kettenreaktion-Mastermixe .....	63
Tab. 7 Primer-Mixe für die <i>SNaP-Shot®</i> -Polymerase-Kettenreaktion-Mastermixe .....	68
Tab. 8 Pipettierschema Mastermixe der <i>SNaP-Shot®</i> -Polymerase- Kettenreaktion.....	69
Tab. 9 Charakteristika der untersuchten Kohorte .....	75
Tab. 10 Untersuchung der Variablen auf Normalverteilung .....	77
Tab. 11 Ergebnisse der Screening-Testungen nach Subgruppen .....	78
Tab. 12 Durchschnittswerte und Verteilungen der Screening-Daten nach Subgruppen .....	81
Tab. 13 Kovariablen nach Subgruppen .....	82
Tab. 14 Korrelation der Kovariablen .....	88
Tab. 15 Verteilungen der Einzelnukleotid-Polymorphismen nach Subgruppen	89
Tab. 16 Assoziation der genetischen Marker mit den Subgruppen.....	90
Tab. 17 Osteopontinkonzentrationen in den Subgruppen.....	99
Tab. 18 Assoziationen der Variablen mit den Subgruppen nach Korrektur für Kovariablen.....	102
Tab. 19 Assoziation der Osteopontin-Konzentration mit der Gruppeneinteilung nach Korrektur für Kovariablen und das dominante Modell des <i>SNCA</i> - Einzelnukleotid-Polymorphismus .....	104
Tab. 20 Assoziationen der Variablen mit der Osteopontin-Konzentration.....	105
Tab. 21 Zeitverlauf Identifikation Genvarianten (Lin and Farrer, 2014).....	142
Tab. 22 Primer-Sequenzen des <i>Risk-Panels</i> .....	143
Tab. 23 Kodierung der Allele (Risikoallel und protektives Allel).....	144
Tab. 24 Thermocycler-Programme .....	145
Tab. 25 Anteilig erhobene Daten der Variablen .....	146

## 6.5 Literaturverzeichnis

- AARSLAND, D., ANDERSEN, K., LARSEN, J. P., LOLK, A., NIELSEN, H. & KRAGH-SORENSEN, P. 2001. Risk of dementia in Parkinson's disease: a community-based, prospective study. *Neurology*, 56, 730-6.
- AARSLAND, D., BRONNICK, K., LARSEN, J. P., TYSNES, O. B. & ALVES, G. 2009. Cognitive impairment in incident, untreated Parkinson disease: the Norwegian ParkWest study. *Neurology*, 72, 1121-6.
- AARSLAND, D., LARSEN, J. P., TANDBERG, E. & LAAKE, K. 2000. Predictors of nursing home placement in Parkinson's disease: a population-based, prospective study. *J Am Geriatr Soc*, 48, 938-42.
- ABELIOVICH, A., SCHMITZ, Y., FARINAS, I., CHOI-LUNDBERG, D., HO, W. H., CASTILLO, P. E., SHINSKY, N., VERDUGO, J. M., ARMANINI, M., RYAN, A., HYNES, M., PHILLIPS, H., SULZER, D. & ROSENTHAL, A. 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25, 239-52.
- AGNIHOTRI, R., CRAWFORD, H. C., HARO, H., MATRISIAN, L. M., HAVRDA, M. C. & LIAW, L. 2001. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem*, 276, 28261-7.
- AGUZZI, A., BARRES, B. A. & BENNETT, M. L. 2013. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science*, 339, 156-61.
- AILANE, S., LONG, P., JENNER, P. & ROSE, S. 2013. Expression of integrin and CD44 receptors recognising osteopontin in the normal and LPS-lesioned rat substantia nigra. *Eur J Neurosci*, 38, 2468-76.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION 2013. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5*, Washington, DC [u.a.], American Psychiatric Assoc.
- ASHKAR, S., WEBER, G. F., PANOUTSAKOPOULOU, V., SANCHIRICO, M. E., JANSSON, M., ZAWAIDEH, S., RITTLING, S. R., DENHARDT, D. T., GLIMCHER, M. J. & CANTOR, H. 2000. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*, 287, 860-4.
- AVSHALUMOV, M. V., CHEN, B. T., KOOS, T., TEPPER, J. M. & RICE, M. E. 2005. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci*, 25, 4222-31.
- BALZER-GELDSETZER, M., COSTA, A. S., KRONENBURGER, M., SCHULZ, J. B., ROSKE, S., SPOTTKE, A., WULLNER, U., KLOCKGETHER, T., STORCH, A., SCHNEIDER, C., RIEDEL, O., WITTCHEN, H. U., SEIFRIED, C., HILKER, R., SCHMIDT, N., WITT, K., DEUSCHL, G., MOLLENHAUER, B., TRENKWALDER, C., LIEPELT-SCARFONE, I., GRABER-SULTAN, S., BERG, D., GASSER, T., KALBE, E., BODDEN, M., OERTEL, W. H. & DODEL, R. 2011. Parkinson's disease and dementia: a longitudinal study (DEMPARK). *Neuroepidemiology*, 37, 168-76.

- BARRY, S. T., LUDBROOK, S. B., MURRISON, E. & HORGAN, C. M. 2000. A regulated interaction between alpha5beta1 integrin and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*, 267, 764-9.
- BAYLESS, K. J., MEININGER, G. A., SCHOLTZ, J. M. & DAVIS, G. E. 1998. Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin. *J Cell Sci*, 111 ( Pt 9), 1165-74.
- BELARBI, K., JOPSON, T., TWEEDIE, D., ARELLANO, C., LUO, W., GREIG, N. H. & ROSI, S. 2012. TNF-alpha protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 9, 23.
- BEN SASSI, S., NABLI, F., HENTATI, E., NAHDI, H., TRABELSI, M., BEN AYED, H., AMOURI, R., DUDA, J. E., FARRER, M. J. & HENTATI, F. 2012. Cognitive dysfunction in Tunisian LRRK2 associated Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 18, 243-6.
- BENUSSI, L., GHIDONI, R., PATERLINI, A., NICOSIA, F., ALBERICI, A. C., SIGNORINI, S., BARBIERO, L. & BINETTI, G. 2005. Interaction between tau and alpha-synuclein proteins is impaired in the presence of P301L tau mutation. *Exp Cell Res*, 308, 78-84.
- BERG, D., LANG, A. E., POSTUMA, R. B., MAETZLER, W., DEUSCHL, G., GASSER, T., SIDEROW, A., SCHAPIRA, A. H., OERTEL, W., OBESO, J. A., OLANOW, C. W., POEWE, W. & STERN, M. 2013. Changing the research criteria for the diagnosis of Parkinson's disease: obstacles and opportunities. *Lancet Neurol*, 12, 514-24.
- BERG, D., POSTUMA, R. B., ADLER, C. H., BLOEM, B. R., CHAN, P., DUBOIS, B., GASSER, T., GOETZ, C. G., HALLIDAY, G., JOSEPH, L., LANG, A. E., LIEPELT-SCARFONE, I., LITVAN, I., MAREK, K., OBESO, J., OERTEL, W., OLANOW, C. W., POEWE, W., STERN, M. & DEUSCHL, G. 2015. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord*, 30, 1600-11.
- BERG, D., SCHWEITZER, K. J., LEITNER, P., ZIMPRICH, A., LICHTNER, P., BELCREDI, P., BRUSSEL, T., SCHULTE, C., MAASS, S., NAGELE, T., WSZOLEK, Z. K. & GASSER, T. 2005. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease\*. *Brain*, 128, 3000-11.
- BERRY, C., LA VECCHIA, C. & NICOTERA, P. 2010. Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ*, 17, 1115-25.
- BERTRAM, L., LANGE, C., MULLIN, K., PARKINSON, M., HSIAO, M., HOGAN, M. F., SCHJEIDE, B. M., HOOLI, B., DIVITO, J., IONITA, I., JIANG, H., LAIRD, N., MOSCARILLO, T., OHLSEN, K. L., ELLIOTT, K., WANG, X., HU-LINCE, D., RYDER, M., MURPHY, A., WAGNER, S. L., BLACKER, D., BECKER, K. D. & TANZI, R. E. 2008. Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am J Hum Genet*, 83, 623-32.
- BETARBET, R., SHERER, T. B., MACKENZIE, G., GARCIA-OSUNA, M., PANOV, A. V. & GREENAMYRE, J. T. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3, 1301-6.

- BLESA, J., PHANI, S., JACKSON-LEWIS, V. & PRZEDBORSKI, S. 2012. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 845618.
- BOSE, A. & BEAL, M. F. 2016. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 139 Suppl 1, 216-231.
- BOVERIS, A. & CADENAS, E. 2000. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB Life*, 50, 245-50.
- BRAAK, H., DEL TREDICI, K., BRATZKE, H., HAMM-CLEMENT, J., SANDMANN-KEIL, D. & RUB, U. 2002. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol*, 249 Suppl 3, III/1-5.
- BRAAK, H., RUB, U. & DEL TREDICI, K. 2006. Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 248, 255-8.
- BRAAK, H., RUB, U., JANSEN STEUR, E. N., DEL TREDICI, K. & DE VOS, R. A. 2005. Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. *Neurology*, 64, 1404-10.
- BRAS, J., SINGLETON, A., COOKSON, M. R. & HARDY, J. 2008. Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: Potential role of ceramide metabolism in Lewy body disease. *FEBS J*, 275, 5767-73.
- BROCHARD, V., COMBADIÈRE, B., PRIGENT, A., LAOUAR, Y., PERRIN, A., BERAY-BERTHAT, V., BONDUËLLE, O., ALVAREZ-FISCHER, D., CALLEBERT, J., LAUNAY, J. M., DUYCKAERTS, C., FLAVELL, R. A., HIRSCH, E. C. & HUNOT, S. 2009. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest*, 119, 182-92.
- BROWN, A., ISLAM, T., ADAMS, R., NERLE, S., KAMARA, M., EGER, C., MARDER, K., COHEN, B., SCHIFITTO, G., MCARTHUR, J. C., SACKTOR, N. & PARDO, C. A. 2011. Osteopontin enhances HIV replication and is increased in the brain and cerebrospinal fluid of HIV-infected individuals. *J Neurovirol*, 17, 382-92.
- BURDO, T. H., ELLIS, R. J. & FOX, H. S. 2008. Osteopontin is increased in HIV-associated dementia. *J Infect Dis*, 198, 715-22.
- BURNS, R. S., CHIUEH, C. C., MARKEY, S. P., EBERT, M. H., JACOBOWITZ, D. M. & KOPIN, I. J. 1983. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 4546-50.
- CAFFREY, T. M. & WADE-MARTINS, R. 2007. Functional MAPT haplotypes: bridging the gap between genotype and neuropathology. *Neurobiol Dis*, 27, 1-10.
- CARGILL, M., ALTSHULER, D., IRELAND, J., SKLAR, P., ARDLIE, K., PATIL, N., SHAW, N., LANE, C. R., LIM, E. P., KALYANARAMAN, N., NEMESH, J., ZIAUGRA, L., FRIEDLAND, L., ROLFE, A., WARRINGTON, J., LIPSHUTZ, R., DALEY, G. Q. & LANDER, E. S. 1999. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*, 22, 231-8.

- CHATR-ARYAMONTRI, A., BREITKREUTZ, B. J., OUGHTRED, R., BOUCHER, L., HEINICKE, S., CHEN, D., STARK, C., BREITKREUTZ, A., KOLAS, N., O'DONNELL, L., REGULY, T., NIXON, J., RAMAGE, L., WINTER, A., SELLAM, A., CHANG, C., HIRSCHMAN, J., THEESFELD, C., RUST, J., LIVSTONE, M. S., DOLINSKI, K. & TYERS, M. 2015. The BioGRID interaction database: 2015 update. *Nucleic Acids Res*, 43, D470-8.
- CHEN, B. T., AVSHALUMOV, M. V. & RICE, M. E. 2001. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a novel, endogenous modulator of synaptic dopamine release. *J Neurophysiol*, 85, 2468-76.
- CHEN, Y., BAL, B. S. & GORSKI, J. P. 1992. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem*, 267, 24871-8.
- CHERRA, S. J., 3RD, STEER, E., GUSDON, A. M., KISELYOV, K. & CHU, C. T. 2013. Mutant LRRK2 elicits calcium imbalance and depletion of dendritic mitochondria in neurons. *Am J Pathol*, 182, 474-84.
- CHO, H. J., LIU, G., JIN, S. M., PARISIADOU, L., XIE, C., YU, J., SUN, L., MA, B., DING, J., VANCRAENENBROECK, R., LOBBESTAEL, E., BAEKELANDT, V., TAYMANS, J. M., HE, P., TRONCOSO, J. C., SHEN, Y. & CAI, H. 2013. MicroRNA-205 regulates the expression of Parkinson's disease-related leucine-rich repeat kinase 2 protein. *Hum Mol Genet*, 22, 608-20.
- CHOI, D. H., CRISTOVAO, A. C., GUHATHAKURTA, S., LEE, J., JOH, T. H., BEAL, M. F. & KIM, Y. S. 2012. NADPH oxidase 1-mediated oxidative stress leads to dopamine neuron death in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 16, 1033-45.
- CHRISTENSEN, B., SCHACK, L., KLANING, E. & SORENSEN, E. S. 2010. Osteopontin is cleaved at multiple sites close to its integrin-binding motifs in milk and is a novel substrate for plasmin and cathepsin D. *J Biol Chem*, 285, 7929-37.
- CLEETER, M. W., COOPER, J. M., DARLEY-USMAR, V. M., MONCADA, S. & SCHAPIRA, A. H. 1994. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, 345, 50-4.
- COHEN, G., FAROOQUI, R. & KESLER, N. 1997. Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4890-4.
- COMI, C., CARECCHIO, M., CHIOCCHETTI, A., NICOLA, S., GALIMBERTI, D., FENOGLIO, C., CAPPELLANO, G., MONACO, F., SCARPINI, E. & DIANZANI, U. 2010. Osteopontin is increased in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and its levels correlate with cognitive decline. *J Alzheimers Dis*, 19, 1143-8.
- COON, K. D., MYERS, A. J., CRAIG, D. W., WEBSTER, J. A., PEARSON, J. V., LINCE, D. H., ZISMANN, V. L., BEACH, T. G., LEUNG, D., BRYDEN, L., HALPERIN, R. F., MARLOWE, L., KALEEM, M., WALKER, D. G., RAVID, R., HEWARD, C. B., ROGERS, J., PAPASSOTIROPOULOS, A., REIMAN, E. M., HARDY, J. & STEPHAN, D. A. 2007. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major

- susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*, 68, 613-8.
- COPPEDE, F. 2012. Genetics and epigenetics of Parkinson's disease. *ScientificWorldJournal*, 2012, 489830.
- CROISIER, E., MORAN, L. B., DEXTER, D. T., PEARCE, R. K. & GRAEBER, M. B. 2005. Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *J Neuroinflammation*, 2, 14.
- CUSICK, M. E., KLITGORD, N., VIDAL, M. & HILL, D. E. 2005. Interactome: gateway into systems biology. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No. 2, R171-81.
- DAVIES, G., HARRIS, S. E., REYNOLDS, C. A., PAYTON, A., KNIGHT, H. M., LIEWALD, D. C., LOPEZ, L. M., LUCIANO, M., GOW, A. J., CORLEY, J., HENDERSON, R., MURRAY, C., PATTIE, A., FOX, H. C., REDMOND, P., LUTZ, M. W., CHIBA-FALEK, O., LINNERTZ, C., SAITH, S., HAGGARTY, P., MCNEILL, G., KE, X., OLLIER, W., HORAN, M., ROSES, A. D., PONTING, C. P., PORTEOUS, D. J., TENESA, A., PICKLES, A., STARR, J. M., WHALLEY, L. J., PEDERSEN, N. L., PENDLETON, N., VISSCHER, P. M. & DEARY, I. J. 2014. A genome-wide association study implicates the APOE locus in nonpathological cognitive ageing. *Mol Psychiatry*, 19, 76-87.
- DE LAU, L. M. & BRETELER, M. M. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 5, 525-35.
- DEL TREDICI, K., HAWKES, C. H., GHEBREMEDHIN, E. & BRAAK, H. 2010. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 119, 703-13.
- DELLEDONNE, A., KLOS, K. J., FUJISHIRO, H., AHMED, Z., PARISI, J. E., JOSEPHS, K. A., FRIGERIO, R., BURNETT, M., WSZOLEK, Z. K., UITTI, R. J., AHLKOG, J. E. & DICKSON, D. W. 2008. Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch Neurol*, 65, 1074-80.
- DESIKAN, R. S., SCHORK, A. J., WANG, Y., WITOELAR, A., SHARMA, M., MCEVOY, L. K., HOLLAND, D., BREWER, J. B., CHEN, C. H., THOMPSON, W. K., HAROLD, D., WILLIAMS, J., OWEN, M. J., O'DONOVAN, M. C., PERICAK-VANCE, M. A., MAYEUX, R., HAINES, J. L., FARRER, L. A., SCHELLENBERG, G. D., HEUTINK, P., SINGLETON, A. B., BRICE, A., WOOD, N. W., HARDY, J., MARTINEZ, M., CHOI, S. H., DESTEFANO, A., IKRAM, M. A., BIS, J. C., SMITH, A., FITZPATRICK, A. L., LAUNER, L., VAN DUIJN, C., SESHADRI, S., ULSTEIN, I. D., AARSLAND, D., FLADBY, T., DJUROVIC, S., HYMAN, B. T., SNAEDAL, J., STEFANSSON, H., STEFANSSON, K., GASSER, T., ANDREASSEN, O. A. & DALE, A. M. 2015. Genetic overlap between Alzheimer's disease and Parkinson's disease at the MAPT locus. *Mol Psychiatry*, 20, 1588-95.
- DEVI, L., RAGHAVENDRAN, V., PRABHU, B. M., AVADHANI, N. G. & ANANDATHEERTHAVARADA, H. K. 2008. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem*, 283, 9089-100.
- DEXTER, D. T. & JENNER, P. 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 62, 132-44.

- DICKSON, D. W., BRAAK, H., DUDA, J. E., DUYCKAERTS, C., GASSER, T., HALLIDAY, G. M., HARDY, J., LEVERENZ, J. B., DEL TREDICI, K., WSZOLEK, Z. K. & LITVAN, I. 2009. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*, 8, 1150-7.
- DILLING, H. 2012. *Taschenführer zur ICD-10-Klassifikation psychischer Störungen : mit Glossar und diagnostischen Kriterien sowie Referenztabelle ICD-10 vs. ICD-9 und ICD-10 vs. DSM-IV-TR; ... unter Berücksichtigung der Änderungen entsprechend ICD-10-GM (German Modifikation)*, Bern, Huber.
- DONNELLY, M. P., PASCHOU, P., GRIGORENKO, E., GURWITZ, D., MEHDI, S. Q., KAJUNA, S. L., BARTA, C., KUNGULILO, S., KAROMA, N. J., LU, R. B., ZHUKOVA, O. V., KIM, J. J., COMAS, D., SINISCALCO, M., NEW, M., LI, P., LI, H., MANOLOPOULOS, V. G., SPEED, W. C., RAJEEVAN, H., PAKSTIS, A. J., KIDD, J. R. & KIDD, K. K. 2010. The distribution and most recent common ancestor of the 17q21 inversion in humans. *Am J Hum Genet*, 86, 161-71.
- DORSEY, E. R., CONSTANTINESCU, R., THOMPSON, J. P., BIGLAN, K. M., HOLLOWAY, R. G., KIEBURTZ, K., MARSHALL, F. J., RAVINA, B. M., SCHIFITTO, G., SIDEROW, A. & TANNER, C. M. 2007. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68, 384-6.
- DRYANOVSKI, D. I., GUZMAN, J. N., XIE, Z., GALTERI, D. J., VOLPICELLI-DALEY, L. A., LEE, V. M., MILLER, R. J., SCHUMACKER, P. T. & SURMEIER, D. J. 2013. Calcium entry and alpha-synuclein inclusions elevate dendritic mitochondrial oxidant stress in dopaminergic neurons. *J Neurosci*, 33, 10154-64.
- DUBOIS, B., BURN, D., GOETZ, C., AARSLAND, D., BROWN, R. G., BROE, G. A., DICKSON, D., DUYCKAERTS, C., CUMMINGS, J., GAUTHIER, S., KORCZYN, A., LEES, A., LEVY, R., LITVAN, I., MIZUNO, Y., MCKEITH, I. G., OLANOW, C. W., POEWE, W., SAMPAIO, C., TOLOSA, E. & EMRE, M. 2007. Diagnostic procedures for Parkinson's disease dementia: recommendations from the movement disorder society task force. *Mov Disord*, 22, 2314-24.
- DULAC, C. 2010. Brain function and chromatin plasticity. *Nature*, 465, 728-35.
- DUNCAN, G. W., KHOO, T. K., YARNALL, A. J., O'BRIEN, J. T., COLEMAN, S. Y., BROOKS, D. J., BARKER, R. A. & BURN, D. J. 2014. Health-related quality of life in early Parkinson's disease: the impact of nonmotor symptoms. *Mov Disord*, 29, 195-202.
- EDWARDS, T. L., SCOTT, W. K., ALMONTE, C., BURT, A., POWELL, E. H., BEECHAM, G. W., WANG, L., ZUCHNER, S., KONIDARI, I., WANG, G., SINGER, C., NAHAB, F., SCOTT, B., STAJICH, J. M., PERICAK-VANCE, M., HAINES, J., VANCE, J. M. & MARTIN, E. R. 2010. Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet*, 74, 97-109.
- EISENBERG, D. T., KUZAWA, C. W. & HAYES, M. G. 2010. Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history. *Am J Phys Anthropol*, 143, 100-11.

- ELIA, A. E., PETRUCCI, S., FASANO, A., GUIDI, M., VALBONESI, S., BERNARDINI, L., CONSOLI, F., FERRARIS, A., ALBANESE, A. & VALENTE, E. M. 2013. Alpha-synuclein gene duplication: marked intrafamilial variability in two novel pedigrees. *Mov Disord*, 28, 813-7.
- EMRE, M. 2003. Dementia associated with Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 2, 229-37.
- EMRE, M., AARSLAND, D., BROWN, R., BURN, D. J., DUYCKAERTS, C., MIZUNO, Y., BROE, G. A., CUMMINGS, J., DICKSON, D. W., GAUTHIER, S., GOLDMAN, J., GOETZ, C., KORCZYN, A., LEES, A., LEVY, R., LITVAN, I., MCKEITH, I., OLANOW, W., POEWE, W., QUINN, N., SAMPAIO, C., TOLOSA, E. & DUBOIS, B. 2007. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord*, 22, 1689-707; quiz 1837.
- ENGEL, R. R. & HENNIG-FAST, K. 2011. Klinisch-psychologische und neuropsychologische Testdiagnostik. In: MÖLLER, H. J., LAUX, G. & KAPFHAMMER, H. P. (eds.) *Psychiatrie, Psychosomatik, Psychotherapie: Band 1: Allgemeine Psychiatrie, Band 2: Spezielle Psychiatrie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- ESPOSITO, A., DOHM, C. P., KERMER, P., BAHR, M. & WOUTERS, F. S. 2007. alpha-Synuclein and its disease-related mutants interact differentially with the microtubule protein tau and associate with the actin cytoskeleton. *Neurobiol Dis*, 26, 521-31.
- ESTANGA, A., RODRIGUEZ-OROZ, M. C., RUIZ-MARTINEZ, J., BARANDIARAN, M., GOROSTIDI, A., BERGARECHE, A., MONDRAGON, E., LOPEZ DE MUNAIN, A. & MARTI-MASSO, J. F. 2014. Cognitive dysfunction in Parkinson's disease related to the R1441G mutation in LRRK2. *Parkinsonism Relat Disord*, 20, 1097-100.
- EZQUERRA, M., CAMPDELACREU, J., GAIG, C., COMPTA, Y., MUNOZ, E., MARTI, M. J., VALLDEORIOLA, F. & TOLOSA, E. 2008. Lack of association of APOE and tau polymorphisms with dementia in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 448, 20-3.
- FARRER, L. A., CUPPLES, L. A., HAINES, J. L., HYMAN, B., KUKULL, W. A., MAYEUX, R., MYERS, R. H., PERICAK-VANCE, M. A., RISCH, N. & VAN DUIJN, C. M. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama*, 278, 1349-56.
- FARRER, M., KACHERGUS, J., FORNO, L., LINCOLN, S., WANG, D. S., HULIHAN, M., MARAGANORE, D., GWINN-HARDY, K., WSZOLEK, Z., DICKSON, D. & LANGSTON, J. W. 2004. Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol*, 55, 174-9.
- FISHER, L. W., TORCHIA, D. A., FOHR, B., YOUNG, M. F. & FEDARKO, N. S. 2001. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*, 280, 460-5.
- FLEMING, L. M., WEISGRABER, K. H., STRITTMATTER, W. J., TRONCOSO, J. C. & JOHNSON, G. V. 1996. Differential binding of apolipoprotein E isoforms to tau and other cytoskeletal proteins. *Exp Neurol*, 138, 252-60.



- FOLSTEIN, M. F., FOLSTEIN, S. E. & MCHUGH, P. R. 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 12, 189-98.
- FUNK, N., WIEGHOFER, P., GRIMM, S., SCHAEFER, R., BUHRING, H. J., GASSER, T. & BISKUP, S. 2013. Characterization of peripheral hematopoietic stem cells and monocytes in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 28, 392-5.
- GALTER, D., WESTERLUND, M., CARMINE, A., LINDQVIST, E., SYDOW, O. & OLSON, L. 2006. LRRK2 expression linked to dopamine-innervated areas. *Ann Neurol*, 59, 714-9.
- GANCHER, S. 2002. The Unified Parkinsons Disease Rating Scale. In: FACTOR, S., WEINER, WJ (ed.) *Parkinson's Disease: Diagnosis and Clinical Management*.
- GARO, L. P. & MURUGAIYAN, G. 2016. Contribution of MicroRNAs to autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci*, 73, 2041-51.
- GASSER, T., HARDY, J. & MIZUNO, Y. 2011. Milestones in PD genetics. *Mov Disord*, 26, 1042-8.
- GEHRKE, S., IMAI, Y., SOKOL, N. & LU, B. 2010. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature*, 466, 637-41.
- GERHARD, A., PAVESE, N., HOTTON, G., TURKHEIMER, F., ES, M., HAMMERS, A., EGGERT, K., OERTEL, W., BANATI, R. B. & BROOKS, D. J. 2006. In vivo imaging of microglial activation with [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 21, 404-12.
- GIORGIO, M., TRINEI, M., MIGLIACCIO, E. & PELICCI, P. G. 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 722-8.
- GOEDERT, M., SPILLANTINI, M. G., DEL TREDICI, K. & BRAAK, H. 2013. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol*, 9, 13-24.
- GORIS, A., WILLIAMS-GRAY, C. H., CLARK, G. R., FOLTYNIE, T., LEWIS, S. J., BROWN, J., BAN, M., SPILLANTINI, M. G., COMPSTON, A., BURN, D. J., CHINNERY, P. F., BARKER, R. A. & SAWCER, S. J. 2007. Tau and alpha-synuclein in susceptibility to, and dementia in, Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 62, 145-53.
- GUARDIA-LAGUARTA, C., AREA-GOMEZ, E., SCHON, E. A. & PRZEDBORSKI, S. 2015. Novel subcellular localization for alpha-synuclein: possible functional consequences. *Front Neuroanat*, 9, 17.
- GUERREIRO, P. S., GERHARDT, E., LOPES DA FONSECA, T., BAHR, M., OUTEIRO, T. F. & ECKERMANN, K. 2016. LRRK2 Promotes Tau Accumulation, Aggregation and Release. *Mol Neurobiol*, 53, 3124-35.
- GUO, H., CAI, C. Q., SCHROEDER, R. A. & KUO, P. C. 2001. Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages. *J Immunol*, 166, 1079-86.
- GUPTA, D. & KURUVILLA, A. 2011. Vascular parkinsonism: what makes it different? *Postgrad Med J*, 87, 829-36.
- HAN, W., LIU, Y., MI, Y., ZHAO, J., LIU, D. & TIAN, Q. 2015. Alpha-synuclein (SNCA) polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 168B, 123-34.

- HÄRTING, C. & WECHSLER, D. 2000. *Wechsler-Gedächtnistest-revidierte Fassung: WMS-R; deutsche Adaptation der revidierten Fassung der Wechsler Memory scale von David Wechsler*, Huber.
- HAWKES, C. H., DEL TREDICI, K. & BRAAK, H. 2010. A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 16, 79-84.
- HE, B., MIRZA, M. & WEBER, G. F. 2006. An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells. *Oncogene*, 25, 2192-202.
- HEALY, D. G., FALCHI, M., O'SULLIVAN, S. S., BONIFATI, V., DURR, A., BRESSMAN, S., BRICE, A., AASLY, J., ZABETIAN, C. P., GOLDWURM, S., FERREIRA, J. J., TOLOSA, E., KAY, D. M., KLEIN, C., WILLIAMS, D. R., MARRAS, C., LANG, A. E., WSZOLEK, Z. K., BERCIANO, J., SCHAPIRA, A. H., LYNCH, T., BHATIA, K. P., GASSER, T., LEES, A. J. & WOOD, N. W. 2008. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*, 7, 583-90.
- HELMICH, R. C., HALLETT, M., DEUSCHL, G., TONI, I. & BLOEM, B. R. 2012. Cerebral causes and consequences of parkinsonian resting tremor: a tale of two circuits? *Brain*, 135, 3206-26.
- HELY, M. A., REID, W. G., ADENA, M. A., HALLIDAY, G. M. & MORRIS, J. G. 2008. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord*, 23, 837-44.
- HEPP, D. H., VERGOOSSEN, D. L., HUISMAN, E., LEMSTRA, A. W., BERENDSE, H. W., ROZEMULLER, A. J., FONCKE, E. M. & VAN DE BERG, W. D. 2016. Distribution and Load of Amyloid-beta Pathology in Parkinson Disease and Dementia with Lewy Bodies. *J Neuropathol Exp Neurol*, 75, 936-945.
- HERNANDES, M. S. & BRITTO, L. R. 2012. NADPH oxidase and neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*, 10, 321-7.
- HERNANDEZ-ROMERO, M. C., DELGADO-CORTES, M. J., SARMIENTO, M., DE PABLOS, R. M., ESPINOSA-OLIVA, A. M., ARGUELLES, S., BANDEZ, M. J., VILLARAN, R. F., MAURINO, R., SANTIAGO, M., VENERO, J. L., HERRERA, A. J., CANO, J. & MACHADO, A. 2012. Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. *Neurotoxicology*, 33, 347-60.
- HEYWOOD, W. E., GALIMBERTI, D., BLISS, E., SIRKA, E., PATERSON, R. W., MAGDALINOU, N. K., CARECCHIO, M., REID, E., HESLEGRAVE, A., FENOGLIO, C., SCARPINI, E., SCHOTT, J. M., FOX, N. C., HARDY, J., BHATIA, K., HEALES, S., SEBIRE, N. J., ZETTERBERG, H. & MILLS, K. 2015. Identification of novel CSF biomarkers for neurodegeneration and their validation by a high-throughput multiplexed targeted proteomic assay. *Mol Neurodegener*, 10, 64.
- HOEHN, M. M. & YAHR, M. D. 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 17, 427-42.
- HOOZEMANS, J. J., VAN HAASTERT, E. S., NIJHOLT, D. A., ROZEMULLER, A. J. & SCHEPER, W. 2012. Activation of the unfolded protein response

- is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*, 10, 212-5.
- HORVATH, J., HERRMANN, F. R., BURKHARD, P. R., BOURAS, C. & KOVARI, E. 2013. Neuropathology of dementia in a large cohort of patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 19, 864-8; discussion 864.
- HSIEH, Y. H., JULIANA, M. M., HICKS, P. H., FENG, G., ELMETS, C., LIAW, L. & CHANG, P. L. 2006. Papilloma development is delayed in osteopontin-null mice: implicating an antiapoptosis role for osteopontin. *Cancer Res*, 66, 7119-27.
- HU, D. D., LIN, E. C., KOVACH, N. L., HOYER, J. R. & SMITH, J. W. 1995. A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins alpha v beta 1 and alpha v beta 5. *J Biol Chem*, 270, 26232-8.
- HUANG, D. Y., WEISGRABER, K. H., GOEDERT, M., SAUNDERS, A. M., ROSES, A. D. & STRITTMATTER, W. J. 1995. ApoE3 binding to tau tandem repeat I is abolished by tau serine262 phosphorylation. *Neurosci Lett*, 192, 209-12.
- HUANG, X., CHEN, P., KAUFER, D. I., TROSTER, A. I. & POOLE, C. 2006. Apolipoprotein E and dementia in Parkinson disease: a meta-analysis. *Arch Neurol*, 63, 189-93.
- HUGHES, A. J., DANIEL, S. E., BEN-SHLOMO, Y. & LEES, A. J. 2002. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain*, 125, 861-70.
- HUGHES, A. J., DANIEL, S. E., KILFORD, L. & LEES, A. J. 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55, 181-4.
- HUGHES, T. A., ROSS, H. F., MINDHAM, R. H. & SPOKES, E. G. 2004. Mortality in Parkinson's disease and its association with dementia and depression. *Acta Neurol Scand*, 110, 118-23.
- HURTIG, H. I., TROJANOWSKI, J. Q., GALVIN, J., EWBANK, D., SCHMIDT, M. L., LEE, V. M., CLARK, C. M., GLOSSER, G., STERN, M. B., GOLLOMP, S. M. & ARNOLD, S. E. 2000. Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology*, 54, 1916-21.
- HWANG, S. M., LOPEZ, C. A., HECK, D. E., GARDNER, C. R., LASKIN, D. L., LASKIN, J. D. & DENHARDT, D. T. 1994. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells. *J Biol Chem*, 269, 711-5.
- HYUN, C. H., YOON, C. Y., LEE, H. J. & LEE, S. J. 2013. LRRK2 as a Potential Genetic Modifier of Synucleinopathies: Interlacing the Two Major Genetic Factors of Parkinson's Disease. *Exp Neurol*, 22, 249-257.
- ICZKIEWICZ, J., ROSE, S. & JENNER, P. 2007. Osteopontin expression in activated glial cells following mechanical- or toxin-induced nigral dopaminergic cell loss. *Exp Neurol*, 207, 95-106.
- IMAI, Y., GEHRKE, S., WANG, H. Q., TAKAHASHI, R., HASEGAWA, K., OOTA, E. & LU, B. 2008. Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *EMBO J*, 27, 2432-43.

- IRAOLA-GUZMAN, S., ESTIVILL, X. & RABIONET, R. 2011. DNA methylation in neurodegenerative disorders: a missing link between genome and environment? *Clin Genet*, 80, 1-14.
- IRWIN, D. J., WHITE, M. T., TOLEDO, J. B., XIE, S. X., ROBINSON, J. L., VAN DEERLIN, V., LEE, V. M., LEVERENZ, J. B., MONTINE, T. J., DUDA, J. E., HURTIG, H. I. & TROJANOWSKI, J. Q. 2012. Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia. *Ann Neurol*, 72, 587-98.
- JANKOVIC, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79, 368-376.
- JANVIN, C. C., LARSEN, J. P., AARSLAND, D. & HUGDAHL, K. 2006. Subtypes of mild cognitive impairment in Parkinson's disease: progression to dementia. *Mov Disord*, 21, 1343-9.
- JENSEN, P. H., HAGER, H., NIELSEN, M. S., HOJRUP, P., GLIEMANN, J. & JAKES, R. 1999. alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem*, 274, 25481-9.
- JIANG, Q., LEE, C. Y., MANDREKAR, S., WILKINSON, B., CRAMER, P., ZELCER, N., MANN, K., LAMB, B., WILLSON, T. M., COLLINS, J. L., RICHARDSON, J. C., SMITH, J. D., COMERY, T. A., RIDDELL, D., HOLTZMAN, D. M., TONTONOZ, P. & LANDRETH, G. E. 2008. ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron*, 58, 681-93.
- JUNN, E. & MOURADIAN, M. M. 2002. Human alpha-synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. *Neurosci Lett*, 320, 146-50.
- KALBE, E., CALABRESE, P., KOHN, N., HILKER, R., RIEDEL, O., WITTCHEN, H. U., DODEL, R., OTTO, J., EBERSBACH, G. & KESSLER, J. 2008. Screening for cognitive deficits in Parkinson's disease with the Parkinson neuropsychometric dementia assessment (PANDA) instrument. *Parkinsonism Relat Disord*, 14, 93-101.
- KALBE, E., REHBERG, S. P., HEBER, I., KRONENBUERGER, M., SCHULZ, J. B., STORCH, A., LINSE, K., SCHNEIDER, C., GRABER, S., LIEPELT-SCARFONE, I., BERG, D., DAMS, J., BALZER-GELDSETZER, M., HILKER, R., OBERSCHMIDT, C., WITT, K., SCHMIDT, N., MOLLENHAUER, B., TRENKWALDER, C., SPOTTKE, A., ROESKE, S., WITTCHEN, H. U., RIEDEL, O. & DODEL, R. 2016. Subtypes of mild cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: evidence from the LANDSCAPE study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 87, 1099-105.
- KALIA, L. V. & LANG, A. E. 2015. Parkinson's disease. *Lancet*, 386, 896-912.
- KANG, U. J., GOLDMAN, J. G., ALCALAY, R. N., XIE, T., TUIE, P., HENCHCLIFFE, C., HOGARTH, P., AMARA, A. W., FRANK, S., RUDOLPH, A., CASACELI, C., ANDREWS, H., GWINN, K., SUTHERLAND, M., KOPIL, C., VINCENT, L. & FRASIER, M. 2016. The BioFIND study: Characteristics of a clinically typical Parkinson's disease biomarker cohort. *Mov Disord*, 31, 924-32.
- KARASIK, D. & NEWMAN, A. 2015. Models to explore genetics of human aging. *Adv Exp Med Biol*, 847, 141-61.
- KARIUKI, S. N., MOORE, J. G., KIROU, K. A., CROW, M. K., UTSET, T. O. & NIEWOLD, T. B. 2009. Age- and gender-specific modulation of serum

- osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*, 10, 487-94.
- KARRASCH, M., LAATU, S., MARTIKAINEN, K. & MARTTILA, R. 2013. CERAD test performance and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*.
- KASTEN, M., KERTELGE, L., BRUGGEMANN, N., VAN DER VEGT, J., SCHMIDT, A., TADIC, V., BUHMANN, C., STEINLECHNER, S., BEHRENS, M. I., RAMIREZ, A., BINKOFSKI, F., SIEBNER, H., RASPE, H., HAGENAH, J., LENCER, R. & KLEIN, C. 2010. Nonmotor symptoms in genetic Parkinson disease. *Arch Neurol*, 67, 670-6.
- KAWAKAMI, F., SUZUKI, M., SHIMADA, N., KAGIYA, G., OHTA, E., TAMURA, K., MARUYAMA, H. & ICHIKAWA, T. 2011. Stimulatory effect of alpha-synuclein on the tau-phosphorylation by GSK-3beta. *FEBS J*, 278, 4895-904.
- KAWAKAMI, F., YABATA, T., OHTA, E., MAEKAWA, T., SHIMADA, N., SUZUKI, M., MARUYAMA, H., ICHIKAWA, T. & OBATA, F. 2012. LRRK2 phosphorylates tubulin-associated tau but not the free molecule: LRRK2-mediated regulation of the tau-tubulin association and neurite outgrowth. *PLoS One*, 7, e30834.
- KESSLER, J., CALABRESE, P., KOHN, N. & KALBE, E. 2007. PANDA versus MMST: Sensitivität und Spezifität zweier Screenings in der Demenzdiagnostik bei Parkinson. *Akt Neurol*, 34, P670.
- KIM, B., YANG, M. S., CHOI, D., KIM, J. H., KIM, H. S., SEOL, W., CHOI, S., JOU, I., KIM, E. Y. & JOE, E. H. 2012. Impaired inflammatory responses in murine Lrrk2-knockdown brain microglia. *PLoS One*, 7, e34693.
- KIM, J., BASAK, J. M. & HOLTZMAN, D. M. 2009. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63, 287-303.
- KIM, J., INOUE, K., ISHII, J., VANTI, W. B., VORONOV, S. V., MURCHISON, E., HANNON, G. & ABELIOVICH, A. 2007. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*, 317, 1220-4.
- KISHIDA, K. T. & KLANN, E. 2007. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*, 9, 233-44.
- KOTZBAUER, P. T., CAIRNS, N. J., CAMPBELL, M. C., WILLIS, A. W., RACETTE, B. A., TABBAL, S. D. & PERLMUTTER, J. S. 2012. Pathologic accumulation of alpha-synuclein and Abeta in Parkinson disease patients with dementia. *Arch Neurol*, 69, 1326-31.
- KUMAR, A., GREGGIO, E., BEILINA, A., KAGANOVICH, A., CHAN, D., TAYMANS, J. M., WOLOZIN, B. & COOKSON, M. R. 2010. The Parkinson's disease associated LRRK2 exhibits weaker in vitro phosphorylation of 4E-BP compared to autophosphorylation. *PLoS One*, 5, e8730.
- KUNII, Y., NIWA, S., HAGIWARA, Y., MAEDA, M., SEITOH, T. & SUZUKI, T. 2009. The immunohistochemical expression profile of osteopontin in normal human tissues using two site-specific antibodies reveals a wide distribution of positive cells and extensive expression in the central and peripheral nervous systems. *Med Mol Morphol*, 42, 155-61.

- LABBE, C., LORENZO-BETANCOR, O. & ROSS, O. A. 2016. Epigenetic regulation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 132, 515-30.
- LAI, C. F., SESHADRI, V., HUANG, K., SHAO, J. S., CAI, J., VATTIKUTI, R., SCHUMACHER, A., LOEWY, A. P., DENHARDT, D. T., RITTLING, S. R. & TOWLER, D. A. 2006. An osteopontin-NADPH oxidase signaling cascade promotes pro-matrix metalloproteinase 9 activation in aortic mesenchymal cells. *Circ Res*, 98, 1479-89.
- LANCU, I. & OLMER, A. 2006. [The minimal state examination--an up-to-date review]. *Harefuah*, 145, 687-90, 701.
- LANDGRAVE-GOMEZ, J., MERCADO-GOMEZ, O. & GUEVARA-GUZMAN, R. 2015. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*, 9, 58.
- LANG, A. E. & LOZANO, A. M. 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, 339, 1044-53.
- LAWRENCE, B. J., GASSON, N. & LOFTUS, A. M. 2016. Prevalence and Subtypes of Mild Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. *Sci Rep*, 6, 33929.
- LE, W., WU, J. & TANG, Y. 2016. Protective Microglia and Their Regulation in Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci*, 9, 89.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.
- LEE, V. M. & TROJANOWSKI, J. Q. 2006. Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. *Neuron*, 52, 33-8.
- LEVIN, J., KURZ, A., ARZBERGER, T., GIESE, A. & HOGLINGER, G. U. 2016. The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Dtsch Arztebl Int*, 113, 61-9.
- LIAW, L., SKINNER, M. P., RAINES, E. W., ROSS, R., CHERESH, D. A., SCHWARTZ, S. M. & GIACHELLI, C. M. 1995. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest*, 95, 713-24.
- LIEPELT-SCARFONE, I., GRAEBER, S., FESEKER, E., BAYSAL, G., GODAU, J., GAENSLER, A., MAETZLER, W. & BERG, D. 2011. Influence of Different Cut-Off Values on the Diagnosis of Mild Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, 2011.
- LILL, C. M., ROEHR, J. T., MCQUEEN, M. B., KAVVOURA, F. K., BAGADE, S., SCHJEIDE, B. M., SCHJEIDE, L. M., MEISSNER, E., ZAUFT, U., ALLEN, N. C., LIU, T., SCHILLING, M., ANDERSON, K. J., BEECHAM, G., BERG, D., BIERNACKA, J. M., BRICE, A., DESTEFANO, A. L., DO, C. B., ERIKSSON, N., FACTOR, S. A., FARRER, M. J., FOROUD, T., GASSER, T., HAMZA, T., HARDY, J. A., HEUTINK, P., HILL-BURNS, E. M., KLEIN, C., LATOURELLE, J. C., MARAGANORE, D. M., MARTIN, E. R., MARTINEZ, M., MYERS, R. H., NALLS, M. A., PANKRATZ, N., PAYAMI, H., SATAKE, W., SCOTT, W. K., SHARMA, M., SINGLETON, A. B., STEFANSSON, K., TODA, T., TUNG, J. Y., VANCE, J., WOOD, N. W., ZABETIAN, C. P., YOUNG, P., TANZI, R. E., KHOURY, M. J., ZIPP, F.,

- LEHRACH, H., IOANNIDIS, J. P. & BERTRAM, L. 2012. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet*, 8, e1002548.
- LIN, M. K. & FARRER, M. J. 2014. Genetics and genomics of Parkinson's disease. *Genome Med*, 6, 48.
- LINEWEAVER, T. T., BOND, M. W., THOMAS, R. G. & SALMON, D. P. 1999. A normative study of Nelson's (1976) modified version of the Wisconsin Card Sorting Test in healthy older adults. *Clin Neuropsychol*, 13, 328-47.
- LINNERTZ, C., LUTZ, M. W., ERVIN, J. F., ALLEN, J., MILLER, N. R., WELSH-BOHMER, K. A., ROSES, A. D. & CHIBA-FALEK, O. 2014. The genetic contributions of SNCA and LRRK2 genes to Lewy Body pathology in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 23, 4814-21.
- LITVAN, I., AARSLAND, D., ADLER, C. H., GOLDMAN, J. G., KULISEVSKY, J., MOLLENHAUER, B., RODRIGUEZ-OROZ, M. C., TROSTER, A. I. & WEINTRAUB, D. 2011. MDS Task Force on mild cognitive impairment in Parkinson's disease: critical review of PD-MCI. *Mov Disord*, 26, 1814-24.
- LITVAN, I., GOLDMAN, J. G., TROSTER, A. I., SCHMAND, B. A., WEINTRAUB, D., PETERSEN, R. C., MOLLENHAUER, B., ADLER, C. H., MARDER, K., WILLIAMS-GRAY, C. H., AARSLAND, D., KULISEVSKY, J., RODRIGUEZ-OROZ, M. C., BURN, D. J., BARKER, R. A. & EMRE, M. 2012. Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord*, 27, 349-56.
- LIU, G., ZHANG, C., YIN, J., LI, X., CHENG, F., LI, Y., YANG, H., UEDA, K., CHAN, P. & YU, S. 2009. alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci Lett*, 454, 187-92.
- MACIOTTA, S., MEREGALLI, M. & TORRENTE, Y. 2013. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*, 7, 265.
- MAETZLER, W., BERG, D., FUNKE, C., SANDMANN, F., STUNITZ, H., MAETZLER, C. & NITSCH, C. 2010. Progressive secondary neurodegeneration and microcalcification co-occur in osteopontin-deficient mice. *Am J Pathol*, 177, 829-39.
- MAETZLER, W., BERG, D., SCHALAMBERIDZE, N., MELMS, ARTHUR, SCHOTT, K., MUELLER, J. C., LIAW, L., GASSER, T. & NITSCH, C. 2007. Osteopontin is elevated in Parkinson's disease and its absence leads to reduced neurodegeneration in the MPTP model. *Neurobiology of Disease*, 25, 473-482.
- MAETZLER, W., MICHELIS, J., TOMIUK, J., MELMS, A., BECKER, C., GASSER, T., SCHULTE, C. & BERG, D. 2009. A single-nucleotide polymorphism of the osteopontin gene may contribute to a susceptibility to Lewy body disease. *J Neural Transm*, 116, 599-605.
- MAHLEY, R. W. 2016. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J Mol Med (Berl)*, 94, 739-46.
- MAROTEAUX, L., CAMPANELLI, J. T. & SCHELLER, R. H. 1988. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, 8, 2804-15.

- MARTINEZ-MARTIN, P., GIL-NAGEL, A., GRACIA, L. M., GOMEZ, J. B., MARTINEZ-SARRIES, J. & BERMEJO, F. 1994. Unified Parkinson's Disease Rating Scale characteristics and structure. The Cooperative Multicentric Group. *Mov Disord*, 9, 76-83.
- MATA, I. F., LEVERENZ, J. B., WEINTRAUB, D., TROJANOWSKI, J. Q., HURTIG, H. I., VAN DEERLIN, V. M., RITZ, B., RAUSCH, R., RHODES, S. L., FACTOR, S. A., WOOD-SIVERIO, C., QUINN, J. F., CHUNG, K. A., PETERSON, A. L., ESPAY, A. J., REVILLA, F. J., DEVOTO, J., HU, S. C., CHOLERTON, B. A., WAN, J. Y., MONTINE, T. J., EDWARDS, K. L. & ZABETIAN, C. P. 2014. APOE, MAPT, and SNCA genes and cognitive performance in Parkinson disease. *JAMA Neurol*, 71, 1405-12.
- MATA, I. F., SHI, M., AGARWAL, P., CHUNG, K. A., EDWARDS, K. L., FACTOR, S. A., GALASKO, D. R., GINGHINA, C., GRIFFITH, A., HIGGINS, D. S., KAY, D. M., KIM, H., LEVERENZ, J. B., QUINN, J. F., ROBERTS, J. W., SAMII, A., SNAPINN, K. W., TSUANG, D. W., YEAROUT, D., ZHANG, J., PAYAMI, H. & ZABETIAN, C. P. 2010. SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch Neurol*, 67, 1350-6.
- MATTILA, P. M., RINNE, J. O., HELENIUS, H., DICKSON, D. W. & ROYTITA, M. 2000. Alpha-synuclein-immunoreactive cortical Lewy bodies are associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 100, 285-90.
- MCCLELLAN, J. & KING, M. C. 2010. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell*, 141, 210-7.
- MCGEER, P. L., ITAGAKI, S., BOYES, B. E. & MCGEER, E. G. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-91.
- MCGEER, P. L., SCHWAB, C., PARENT, A. & DOUDET, D. 2003. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol*, 54, 599-604.
- MCKEITH, I. G., DICKSON, D. W., LOWE, J., EMRE, M., O'BRIEN, J. T., FELDMAN, H., CUMMINGS, J., DUDA, J. E., LIPPA, C., PERRY, E. K., AARSLAND, D., ARAI, H., BALLARD, C. G., BOEVE, B., BURN, D. J., COSTA, D., DEL SER, T., DUBOIS, B., GALASKO, D., GAUTHIER, S., GOETZ, C. G., GOMEZ-TORTOSA, E., HALLIDAY, G., HANSEN, L. A., HARDY, J., IWATSUBO, T., KALARIA, R. N., KAUFER, D., KENNY, R. A., KORCZYN, A., KOSAKA, K., LEE, V. M., LEES, A., LITVAN, I., LONDOS, E., LOPEZ, O. L., MINOSHIMA, S., MIZUNO, Y., MOLINA, J. A., MUKAETOVA-LADINSKA, E. B., PASQUIER, F., PERRY, R. H., SCHULZ, J. B., TROJANOWSKI, J. Q. & YAMADA, M. 2005. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology*, 65, 1863-72.
- MELROSE, H., LINCOLN, S., TYNDALL, G., DICKSON, D. & FARRER, M. 2006. Anatomical localization of leucine-rich repeat kinase 2 in mouse brain. *Neuroscience*, 139, 791-4.
- MENGEL, D., DAMS, J., ZIEMEK, J., BECKER, J., BALZER-GELDSETZER, M., HILKER, R., BAUDREXEL, S., KALBE, E., SCHMIDT, N., WITT, K.,



- LIEPELT-SCARFONE, I., GRABER, S., PETRELLI, A., NEUSER, P., SCHULTE, C., LINSE, K., STORCH, A., WITTCHEN, H. U., RIEDEL, O., MOLLENHAUER, B., EBENTHEUER, J., TRENKWALDER, C., KLOCKGETHER, T., SPOTTKE, A., WULLNER, U., SCHULZ, J. B., REETZ, K., HEBER, I. A., RAMIREZ, A. & DODEL, R. 2016. Apolipoprotein E epsilon4 does not affect cognitive performance in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 29, 112-6.
- MIETELSKA-POROWSKA, A., WASIK, U., GORAS, M., FILIPEK, A. & NIEWIADOMSKA, G. 2014. Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction. *Int J Mol Sci*, 15, 4671-713.
- MIGHELI, R., DEL GIUDICE, M. G., SPISSU, Y., SANNA, G., XIONG, Y., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., GALIOTO, M., ROCCHITTA, G., BIOSA, A., SERRA, P. A., CARRI, M. T., CROSIO, C. & IACCARINO, C. 2013. LRRK2 affects vesicle trafficking, neurotransmitter extracellular level and membrane receptor localization. *PLoS One*, 8, e77198.
- MINONES-MOYANO, E., PORTA, S., ESCARAMIS, G., RABIONET, R., IRAOLA, S., KAGERBAUER, B., ESPINOSA-PARRILLA, Y., FERRER, I., ESTIVILL, X. & MARTI, E. 2011. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet*, 20, 3067-78.
- MOEHLE, M. S., WEBBER, P. J., TSE, T., SUKAR, N., STANDAERT, D. G., DESILVA, T. M., COWELL, R. M. & WEST, A. B. 2012. LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses. *J Neurosci*, 32, 1602-11.
- MORE, S. V., KUMAR, H., KIM, I. S., SONG, S. Y. & CHOI, D. K. 2013. Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm*, 2013, 952375.
- MORLEY, J. F., XIE, S. X., HURTIG, H. I., STERN, M. B., COLCHER, A., HORN, S., DAHODWALA, N., DUDA, J. E., WEINTRAUB, D., CHEN-PLOTKIN, A. S., VAN DEERLIN, V., FALCONE, D. & SIDEROWF, A. 2012. Genetic influences on cognitive decline in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 27, 512-8.
- MORRIS, J. C., MOHS, R. C., ROGERS, H., FILLENBAUM, G. & HEYMAN, A. 1988. Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD) clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Psychopharmacol Bull*, 24, 641-52.
- MUSLIMOVIC, D., POST, B., SPEELMAN, J. D., DE HAAN, R. J. & SCHMAND, B. 2009. Cognitive decline in Parkinson's disease: a prospective longitudinal study. *J Int Neuropsychol Soc*, 15, 426-37.
- NAGASAKI, T., ISHIMURA, E., KOYAMA, H., SHIOI, A., JONO, S., INABA, M., HASUMA, T., YOKOYAMA, M., NISHIZAWA, Y., MORII, H. & OTANI, S. 1999. Alpha5 integrin regulates TNF-alpha-induced nitric oxide synthesis in rat mesangial cells--possible role of osteopontin. *Nephrol Dial Transplant*, 14, 1861-6.
- NAGASAKI, T., ISHIMURA, E., SHIOI, A., JONO, S., INABA, M., NISHIZAWA, Y., MORII, H. & OTANI, S. 1997. Osteopontin gene expression and protein synthesis in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 233, 81-5.

- NAKAMURA, K., NEMANI, V. M., AZARBAL, F., SKIBINSKI, G., LEVY, J. M., EGAMI, K., MUNISHKINA, L., ZHANG, J., GARDNER, B., WAKABAYASHI, J., SESAKI, H., CHENG, Y., FINKBEINER, S., NUSSBAUM, R. L., MASLIAH, E. & EDWARDS, R. H. 2011. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 286, 20710-26.
- NALLS, M. A., PANKRATZ, N., LILL, C. M., DO, C. B., HERNANDEZ, D. G., SAAD, M., DESTEFANO, A. L., KARA, E., BRAS, J., SHARMA, M., SCHULTE, C., KELLER, M. F., AREPALLI, S., LETSON, C., EDSALL, C., STEFANSSON, H., LIU, X., PLINER, H., LEE, J. H., CHENG, R., IKRAM, M. A., IOANNIDIS, J. P., HADJIGEORGIOU, G. M., BIS, J. C., MARTINEZ, M., PERLMUTTER, J. S., GOATE, A., MARDER, K., FISKE, B., SUTHERLAND, M., XIROMERISIOU, G., MYERS, R. H., CLARK, L. N., STEFANSSON, K., HARDY, J. A., HEUTINK, P., CHEN, H., WOOD, N. W., HOULDEN, H., PAYAMI, H., BRICE, A., SCOTT, W. K., GASSER, T., BERTRAM, L., ERIKSSON, N., FOROUD, T. & SINGLETON, A. B. 2014. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet*, 46, 989-93.
- NALLS, M. A., PLAGNOL, V., HERNANDEZ, D. G., SHARMA, M., SHEERIN, U. M., SAAD, M., SIMON-SANCHEZ, J., SCHULTE, C., LESAGE, S., SVEINBJORNSDOTTIR, S., STEFANSSON, K., MARTINEZ, M., HARDY, J., HEUTINK, P., BRICE, A., GASSER, T., SINGLETON, A. B. & WOOD, N. W. 2011. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet*, 377, 641-9.
- NELSON, H. E. 1976. A modified card sorting test sensitive to frontal lobe defects. *Cortex*, 12, 313-24.
- NIEDZIELSKA, E., SMAGA, I., GAWLIK, M., MONICZEWSKI, A., STANKOWICZ, P., PERA, J. & FILIP, M. 2016. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*, 53, 4094-125.
- OBAL, I., MAJLATH, Z., TOLDI, J. & VECSEI, L. 2014. Mental disturbances in Parkinson's disease and related disorders: the role of excitotoxins. *J Parkinsons Dis*, 4, 139-50.
- OBI, T., NISHIOKA, K., ROSS, O. A., TERADA, T., YAMAZAKI, K., SUGIURA, A., TAKANASHI, M., MIZOGUCHI, K., MORI, H., MIZUNO, Y. & HATTORI, N. 2008. Clinicopathologic study of a SNCA gene duplication patient with Parkinson disease and dementia. *Neurology*, 70, 238-41.
- PARK, K. M. & BOWERS, W. J. 2010. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal*, 22, 977-83.
- PARKINSON, J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14, 223-36; discussion 222.
- PEDERSEN, K. F., LARSEN, J. P., TYSNES, O. B. & ALVES, G. 2013. Prognosis of mild cognitive impairment in early Parkinson disease: the Norwegian ParkWest study. *JAMA Neurol*, 70, 580-6.
- PERIER, C. & VILA, M. 2012. Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a009332.

- PETERSEN, R. C. 2004. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med*, 256, 183-94.
- PETTIT, L. K., VARSANYI, C., TADROS, J. & VASSILIOU, E. 2013. Modulating the inflammatory properties of activated microglia with Docosahexaenoic acid and Aspirin. *Lipids Health Dis*, 12, 16.
- PLANTMAN, S. 2012. Osteopontin is upregulated after mechanical brain injury and stimulates neurite growth from hippocampal neurons through beta1 integrin and CD44. *Neuroreport*, 23, 647-52.
- POEWE, W., GAUTHIER, S., AARSLAND, D., LEVERENZ, J. B., BARONE, P., WEINTRAUB, D., TOLOSA, E. & DUBOIS, B. 2008. Diagnosis and management of Parkinson's disease dementia. *Int J Clin Pract*, 62, 1581-7.
- POLYMEROPOULOS, M. H., LAVEDAN, C., LEROY, E., IDE, S. E., DEHEJIA, A., DUTRA, A., PIKE, B., ROOT, H., RUBENSTEIN, J., BOYER, R., STENROOS, E. S., CHANDRASEKHARAPPA, S., ATHANASSIADOU, A., PAPAPETROPOULOS, T., JOHNSON, W. G., LAZZARINI, A. M., DUVOISIN, R. C., DI IORIO, G., GOLBE, L. I. & NUSSBAUM, R. L. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 2045-7.
- POSTUMA, R. B. & BERG, D. 2016. Advances in markers of prodromal Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*, 12, 622-634.
- POSTUMA, R. B., BERG, D., STERN, M., POEWE, W., OLANOW, C. W., OERTEL, W., OBESO, J., MAREK, K., LITVAN, I., LANG, A. E., HALLIDAY, G., GOETZ, C. G., GASSER, T., DUBOIS, B., CHAN, P., BLOEM, B. R., ADLER, C. H. & DEUSCHL, G. 2015. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 30, 1591-601.
- QING, H., WONG, W., MCGEER, E. G. & MCGEER, P. L. 2009. Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications. *Biochem Biophys Res Commun*, 387, 149-52.
- QURESHI, H. Y. & PAUDEL, H. K. 2011. Parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and alpha-synuclein mutations promote Tau protein phosphorylation at Ser262 and destabilize microtubule cytoskeleton in vitro. *J Biol Chem*, 286, 5055-68.
- RADEMAKERS, R., CRUTS, M. & VAN BROECKHOVEN, C. 2004. The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Hum Mutat*, 24, 277-95.
- RANSOM, B. R., KUNIS, D. M., IRWIN, I. & LANGSTON, J. W. 1987. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP+. *Neurosci Lett*, 75, 323-8.
- RAO, J. S., KELLOM, M., KIM, H. W., RAPOPORT, S. I. & REESE, E. A. 2012. Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochem Res*, 37, 903-10.
- REALE, M., IARLORI, C., THOMAS, A., GAMBI, D., PERFETTI, B., DI NICOLA, M. & ONOFRJ, M. 2009. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun*, 23, 55-63.
- RITTLING, S. R. & SINGH, R. 2015. Osteopontin in Immune-mediated Diseases. *J Dent Res*, 94, 1638-45.
- RODRIGUEZ-OROZ, M. C., JAHANSHAHI, M., KRACK, P., LITVAN, I., MACIAS, R., BEZARD, E. & OBESO, J. A. 2009. Initial clinical

- manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol*, 8, 1128-39.
- ROLLO, E. E. & DENHARDT, D. T. 1996. Differential effects of osteopontin on the cytotoxic activity of macrophages from young and old mice. *Immunology*, 88, 642-7.
- ROSENTHAL, L. S., DRAKE, D., ALCALAY, R. N., BABCOCK, D., BOWMAN, F. D., CHEN-PLOTKIN, A., DAWSON, T. M., DEWEY, R. B., JR., GERMAN, D. C., HUANG, X., LANDIN, B., MCAULIFFE, M., PETYUK, V. A., SCHERZER, C. R., HILLAIRE-CLARKE, C. S., SIEBER, B. A., SUTHERLAND, M., TARN, C., WEST, A., VAILLANCOURT, D., ZHANG, J. & GWINN, K. 2016. The NINDS Parkinson's disease biomarkers program. *Mov Disord*, 31, 915-23.
- RUSSO, I., BUBACCO, L. & GREGGIO, E. 2014. LRRK2 and neuroinflammation: partners in crime in Parkinson's disease? *J Neuroinflammation*, 11, 52.
- SADIGH-ETEGHAD, S., TALEBI, M. & FARHOUDI, M. 2012. Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with sporadic late onset Alzheimer's disease. A meta-analysis. *Neurosciences (Riyadh)*, 17, 321-6.
- SAMARANCH, L., CERVANTES, S., BARABASH, A., ALONSO, A., CABRANES, J. A., LAMET, I., ANCIN, I., LORENZO, E., MARTINEZ-LAGE, P., MARCOS, A., CLARIMON, J., ALCOLEA, D., LLEO, A., BLESAS, R., GOMEZ-ISLA, T. & PASTOR, P. 2010. The effect of MAPT H1 and APOE epsilon4 on transition from mild cognitive impairment to dementia. *J Alzheimers Dis*, 22, 1065-71.
- SAMII, A., NUTT, J. G. & RANSOM, B. R. 2004. Parkinson's disease. *Lancet*, 363, 1783-93.
- SANTAMARIA, N., ALHOTHALI, M., ALFONSO, M. H., BREYDO, L. & UVERSKY, V. N. 2016. Intrinsic disorder in proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Life Sci*.
- SATZGER, W., HAMPEL, H., PADBERG, F., BÜRGER, K., NOLDE, T., INGRASSIA, G. & ENGEL, R. R. 2001. Zur praktischen Anwendung der CERAD-Testbatterie als neuropsychologisches Demenzscreening. *Der Nervenarzt*, 72, 196-203.
- SAVICA, R., GROSSARDT, B. R., BOWER, J. H., AHLKOG, J. E., MIELKE, M. M. & ROCCA, W. A. 2016. Incidence and time trends of drug-induced parkinsonism: A 30-year population-based study. *Mov Disord*.
- SCHAPANSKY, J., NARDOZZI, J. D. & LAVOIE, M. J. 2015. The complex relationships between microglia, alpha-synuclein, and LRRK2 in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 302, 74-88.
- SCHAPIRA, A. H., COOPER, J. M., DEXTER, D., JENNER, P., CLARK, J. B. & MARSDEN, C. D. 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*, 1, 1269.
- SCHIESS, M. C., ZHENG, H., SOUKUP, V. M., BONNEN, J. G. & NAUTA, H. J. 2000. Parkinson's disease subtypes: clinical classification and ventricular cerebrospinal fluid analysis. *Parkinsonism Relat Disord*, 6, 69-76.
- SCHMITT, I., KAUT, O., KHAZNEH, H., DEBONI, L., AHMAD, A., BERG, D., KLEIN, C., FROHLICH, H. & WULLNER, U. 2015. L-dopa increases alpha-synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients in vivo and in vitro. *Mov Disord*.

- SCHRAG, A., JAHANSHAHI, M. & QUINN, N. 2000. What contributes to quality of life in patients with Parkinson's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 69, 308-12.
- SCHRETLEN, D. 1989. Brief test of attention. *Baltimore: Psychological Assessment Resources*.
- SCHROETER, M., ZICKLER, P., DENHARDT, D. T., HARTUNG, H. P. & JANDER, S. 2006. Increased thalamic neurodegeneration following ischaemic cortical stroke in osteopontin-deficient mice. *Brain*, 129, 1426-37.
- SCHULTE, C. & GASSER, T. 2011. Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet*, 4, 67-80.
- SENGER, D. R., PERRUZZI, C. A., PAPADOPOULOS-SERGIU, A. & VAN DE WATER, L. 1994. Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol Biol Cell*, 5, 565-74.
- SETO-SALVIA, N., CLARIMON, J., PAGONABARRAGA, J., PASCUAL-SEDANO, B., CAMPOLONGO, A., COMBARROS, O., MATEO, J. I., REGANA, D., MARTINEZ-CORRAL, M., MARQUIE, M., ALCOLEA, D., SUAREZ-CALVET, M., MOLINA-PORCEL, L., DOLS, O., GOMEZ-ISLA, T., BLESA, R., LLEO, A. & KULISEVSKY, J. 2011. Dementia risk in Parkinson disease: disentangling the role of MAPT haplotypes. *Arch Neurol*, 68, 359-64.
- SHARIF, S. A., DU, X., MYLES, T., SONG, J. J., PRICE, E., LEE, D. M., GOODMAN, S. B., NAGASHIMA, M., MORSE, J., ROBINSON, W. H. & LEUNG, L. L. 2009. Thrombin-activatable carboxypeptidase B cleavage of osteopontin regulates neutrophil survival and synovocyte binding in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 60, 2902-12.
- SHARMA, M., IOANNIDIS, J. P., AASLY, J. O., ANNESI, G., BRICE, A., VAN BROECKHOVEN, C., BERTRAM, L., BOZI, M., CROSIERS, D., CLARKE, C., FACHERIS, M., FARRER, M., GARRAUX, G., GISPERT, S., AUBURGER, G., VILARINO-GUELL, C., HADJIGEORGIOU, G. M., HICKS, A. A., HATTORI, N., JEON, B., LESAGE, S., LILL, C. M., LIN, J. J., LYNCH, T., LICHTNER, P., LANG, A. E., MOK, V., JASINSKA-MYGA, B., MELLICK, G. D., MORRISON, K. E., OPALA, G., PRAMSTALLER, P. P., PICHLER, I., PARK, S. S., QUATTRONE, A., ROGAEVA, E., ROSS, O. A., STEFANIS, L., STOCKTON, J. D., SATAKE, W., SILBURN, P. A., THEUNS, J., TAN, E. K., TODA, T., TOMIYAMA, H., UITTI, R. J., WIRDEFELDT, K., WSZOLEK, Z., XIROMERISIOU, G., YUEH, K. C., ZHAO, Y., GASSER, T., MARAGANORE, D. & KRUGER, R. 2012. Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci. *Neurology*, 79, 659-67.
- SHIMIZU, Y., OTA, K., IKEGUCHI, R., KUBO, S., KABASAWA, C. & UCHIYAMA, S. 2013. Plasma osteopontin levels are associated with disease activity in the patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol*.
- SHIN, Y. J., KIM, H. L., CHOI, J. S., CHOI, J. Y., CHA, J. H. & LEE, M. Y. 2011. Osteopontin: correlation with phagocytosis by brain macrophages in a rat model of stroke. *Glia*, 59, 413-23.

- SIMON-SANCHEZ, J., SCHULTE, C., BRAS, J. M., SHARMA, M., GIBBS, J. R., BERG, D., PAISAN-RUIZ, C., LICHTNER, P., SCHOLZ, S. W., HERNANDEZ, D. G., KRUGER, R., FEDEROFF, M., KLEIN, C., GOATE, A., PERLMUTTER, J., BONIN, M., NALLS, M. A., ILLIG, T., GIEGER, C., HOULDEN, H., STEFFENS, M., OKUN, M. S., RACETTE, B. A., COOKSON, M. R., FOOTE, K. D., FERNANDEZ, H. H., TRAYNOR, B. J., SCHREIBER, S., AREPALLI, S., ZONOZI, R., GWINN, K., VAN DER BRUG, M., LOPEZ, G., CHANOCK, S. J., SCHATZKIN, A., PARK, Y., HOLLENBECK, A., GAO, J., HUANG, X., WOOD, N. W., LORENZ, D., DEUSCHL, G., CHEN, H., RIESS, O., HARDY, J. A., SINGLETON, A. B. & GASSER, T. 2009. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*, 41, 1308-12.
- SIMONSEN, A. H., MCGUIRE, J., HANSSON, O., ZETTERBERG, H., PODUST, V. N., DAVIES, H. A., WALDEMAR, G., MINTHON, L. & BLENNOW, K. 2007. Novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for the prediction of progression to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, 64, 366-70.
- SINGH, P. P., SINGH, M. & MASTANA, S. S. 2006. APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Ann Hum Biol*, 33, 279-308.
- SNIDER, J., KOTLYAR, M., SARAON, P., YAO, Z., JURISICA, I. & STAGLJAR, I. 2015. Fundamentals of protein interaction network mapping. *Mol Syst Biol*, 11, 848.
- SOLDNER, F., STELZER, Y., SHIVALILA, C. S., ABRAHAM, B. J., LATOURELLE, J. C., BARRASA, M. I., GOLDMANN, J., MYERS, R. H., YOUNG, R. A. & JAENISCH, R. 2016. Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of alpha-synuclein modulates target gene expression. *Nature*, 533, 95-9.
- SOMME, J. H., GOMEZ-ESTEBAN, J. C., MOLANO, A., TIJERO, B., LEZCANO, E. & ZARRANZ, J. J. 2011. Initial neuropsychological impairments in patients with the E46K mutation of the alpha-synuclein gene (PARK 1). *J Neurol Sci*, 310, 86-9.
- SOMME, J. H., MOLANO SALAZAR, A., GONZALEZ, A., TIJERO, B., BERGANZO, K., LEZCANO, E., FERNANDEZ MARTINEZ, M., ZARRANZ, J. J. & GOMEZ-ESTEBAN, J. C. 2015. Cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease patients with the G2019S and R1441G mutations of the LRRK2 gene. *Parkinsonism Relat Disord*, 21, 494-9.
- SPILLANTINI, M. G., SCHMIDT, M. L., LEE, V. M., TROJANOWSKI, J. Q., JAKES, R. & GOEDERT, M. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388, 839-40.
- SRIVATSAL, S., CHOLERTON, B., LEVERENZ, J. B., WSZOLEK, Z. K., UITTI, R. J., DICKSON, D. W., WEINTRAUB, D., TROJANOWSKI, J. Q., VAN DEERLIN, V. M., QUINN, J. F., CHUNG, K. A., PETERSON, A. L., FACTOR, S. A., WOOD-SIVERIO, C., GOLDMAN, J. G., STEBBINS, G. T., BERNARD, B., RITZ, B., RAUSCH, R., ESPAY, A. J., REVILLA, F. J., DEVOTO, J., ROSENTHAL, L. S., DAWSON, T. M., ALBERT, M. S., MATA, I. F., HU, S. C., MONTINE, K. S., JOHNSON, C., MONTINE, T. J.,

- EDWARDS, K. L., ZHANG, J. & ZABETIAN, C. P. 2015. Cognitive profile of LRRK2-related Parkinson's disease. *Mov Disord*, 30, 728-33.
- STEFANSSON, H., HELGASON, A., THORLEIFSSON, G., STEINTHORSDOTTIR, V., MASSON, G., BARNARD, J., BAKER, A., JONASDOTTIR, A., INGASON, A., GUDNADOTTIR, V. G., DESNICA, N., HICKS, A., GYLFASSON, A., GUDBJARTSSON, D. F., JONSDOTTIR, G. M., SAINZ, J., AGNARSSON, K., BIRGISDOTTIR, B., GHOSH, S., OLAFSDOTTIR, A., CAZIER, J. B., KRISTJANSSON, K., FRIGGE, M. L., THORGEIRSSON, T. E., GULCHER, J. R., KONG, A. & STEFANSSON, K. 2005. A common inversion under selection in Europeans. *Nat Genet*, 37, 129-37.
- STROOP, J. R. 1935. Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of Experimental Psychology*, 18, 643-662.
- STURM, W., WILLMES, K. & HORN, W. 1993. *Leistungsprüfungssystem für 50-90jährige (LPS 50+): Handanweisung*, Hogrefe, Verlag für Psychologie.
- SUN, Y., YIN, X. S., GUO, H., HAN, R. K., HE, R. D. & CHI, L. J. 2013. Elevated osteopontin levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Mediators Inflamm*, 2013, 615745.
- SUZUKI, H., AYER, R., SUGAWARA, T., CHEN, W., SOZEN, T., HASEGAWA, Y., KANAMARU, K. & ZHANG, J. H. 2011. Role of osteopontin in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Acta Neurochir Suppl*, 110, 75-9.
- TANSEY, M. G. & GOLDBERG, M. S. 2010. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*, 37, 510-8.
- THEILLET, F. X., BINOLFI, A., BEKEI, B., MARTORANA, A., ROSE, H. M., STUIVER, M., VERZINI, S., LORENZ, D., VAN ROSSUM, M., GOLDFARB, D. & SELENKO, P. 2016. Structural disorder of monomeric alpha-synuclein persists in mammalian cells. *Nature*, 530, 45-50.
- TILLI, T. M., THULER, L. C., MATOS, A. R., COUTINHO-CAMILLO, C. M., SOARES, F. A., DA SILVA, E. A., NEVES, A. F., GOULART, L. R. & GIMBA, E. R. 2012. Expression analysis of osteopontin mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Exp Mol Pathol*, 92, 13-9.
- TOBINICK, E. L. & GROSS, H. 2008. Rapid cognitive improvement in Alzheimer's disease following perispinal etanercept administration. *J Neuroinflammation*, 5, 2.
- TSUANG, D., LEVERENZ, J. B., LOPEZ, O. L., HAMILTON, R. L., BENNETT, D. A., SCHNEIDER, J. A., BUCHMAN, A. S., LARSON, E. B., CRANE, P. K., KAYE, J. A., KRAMER, P., WOLTJER, R., TROJANOWSKI, J. Q., WEINTRAUB, D., CHEN-PLOTKIN, A. S., IRWIN, D. J., RICK, J., SCHELLENBERG, G. D., WATSON, G. S., KUKULL, W., NELSON, P. T., JICHA, G. A., NELTNER, J. H., GALASKO, D., MASLIAH, E., QUINN, J. F., CHUNG, K. A., YEAROUT, D., MATA, I. F., WAN, J. Y., EDWARDS, K. L., MONTINE, T. J. & ZABETIAN, C. P. 2013. APOE epsilon4 increases risk for dementia in pure synucleinopathies. *JAMA Neurol*, 70, 223-8.
- UVERSKY, V. N. 2015. Intrinsically disordered proteins and their (disordered) proteomes in neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci*, 7, 18.

- WANG, K. X. & DENHARDT, D. T. 2008. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19, 333-45.
- WARD, A., CREAN, S., MERCALDI, C. J., COLLINS, J. M., BOYD, D., COOK, M. N. & ARRIGHI, H. M. 2012. Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, 38, 1-17.
- WARREN OLANOW, C., KIEBURTZ, K., RASCOL, O., POEWE, W., SCHAPIRA, A. H., EMRE, M., NISSINEN, H., LEINONEN, M. & STOCCHI, F. 2013. Factors predictive of the development of Levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 28, 1064-71.
- WEBER, G. F., ASHKAR, S., GLIMCHER, M. J. & CANTOR, H. 1996. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*, 271, 509-12.
- WEYER, G. 2005. *Internationale Skalen für Psychiatrie*, Göttingen, Beltz Test GmbH.
- WILLIAMS-GRAY, C. H., EVANS, J. R., GORIS, A., FOLTYNIE, T., BAN, M., ROBBINS, T. W., BRAYNE, C., KOLACHANA, B. S., WEINBERGER, D. R., SAWCER, S. J. & BARKER, R. A. 2009a. The distinct cognitive syndromes of Parkinson's disease: 5 year follow-up of the CamPaIGN cohort. *Brain*, 132, 2958-69.
- WILLIAMS-GRAY, C. H., GORIS, A., SAIKI, M., FOLTYNIE, T., COMPSTON, D. A., SAWCER, S. J. & BARKER, R. A. 2009b. Apolipoprotein E genotype as a risk factor for susceptibility to and dementia in Parkinson's disease. *J Neurol*, 256, 493-8.
- WILLIAMS-GRAY, C. H., MASON, S. L., EVANS, J. R., FOLTYNIE, T., BRAYNE, C., ROBBINS, T. W. & BARKER, R. A. 2013. The CamPaIGN study of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84, 1258-64.
- WINKLER, S., KONIG, I. R., LOHMANN-HEDRICH, K., VIEREGGE, P., KOSTIC, V. & KLEIN, C. 2007. Role of ethnicity on the association of MAPT H1 haplotypes and subhaplotypes in Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet*, 15, 1163-8.
- WIRDEFELDT, K., ADAMI, H. O., COLE, P., TRICHOPOULOS, D. & MANDEL, J. 2011. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol*, 26 Suppl 1, S1-58.
- WOLFSGRUBER, S., JESSEN, F., WIESE, B., STEIN, J., BICKEL, H., MOSCH, E., WEYERER, S., WERLE, J., PENTZEK, M., FUCHS, A., KOHLER, M., BACHMANN, C., RIEDEL-HELLER, S. G., SCHERER, M., MAIER, W. & WAGNER, M. 2013. The CERAD Neuropsychological Assessment Battery Total Score Detects and Predicts Alzheimer Disease Dementia with High Diagnostic Accuracy. *Am J Geriatr Psychiatry*.
- WUNG, J. K., PERRY, G., KOWALSKI, A., HARRIS, P. L., BISHOP, G. M., TRIVEDI, M. A., JOHNSON, S. C., SMITH, M. A., DENHARDT, D. T. & ATWOOD, C. S. 2007. Increased expression of the remodeling- and tumorigenic-associated factor osteopontin in pyramidal neurons of the Alzheimer's disease brain. *Curr Alzheimer Res*, 4, 67-72.



- YAN, M. H., WANG, X. & ZHU, X. 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, 62, 90-101.
- YARNALL, A. J., BREEN, D. P., DUNCAN, G. W., KHOO, T. K., COLEMAN, S. Y., FIRBANK, M. J., NOMBELA, C., WINDER-RHODES, S., EVANS, J. R., ROWE, J. B., MOLLENHAUER, B., KRUSE, N., HUDSON, G., CHINNERY, P. F., O'BRIEN, J. T., ROBBINS, T. W., WESNES, K., BROOKS, D. J., BARKER, R. A. & BURN, D. J. 2014. Characterizing mild cognitive impairment in incident Parkinson disease: the ICICLE-PD study. *Neurology*, 82, 308-16.
- YOKOSAKI, Y., MATSUURA, N., SASAKI, T., MURAKAMI, I., SCHNEIDER, H., HIGASHIYAMA, S., SAITOH, Y., YAMAKIDO, M., TAOOKA, Y. & SHEPPARD, D. 1999. The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem*, 274, 36328-34.
- YOKOSAKI, Y., TANAKA, K., HIGASHIKAWA, F., YAMASHITA, K. & EBOSHIDA, A. 2005. Distinct structural requirements for binding of the integrins alphavbeta6, alphavbeta3, alphavbeta5, alpha5beta1 and alpha9beta1 to osteopontin. *Matrix Biol*, 24, 418-27.
- YOUNG, M. F., KERR, J. M., TERMINE, J. D., WEWER, U. M., WANG, M. G., MCBRIDE, O. W. & FISHER, L. W. 1990. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*, 7, 491-502.
- ZANNIS, V. I., BRESLOW, J. L., UTERMANN, G., MAHLEY, R. W., WEISGRABER, K. H., HAVEL, R. J., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S., SCHONFELD, G., HAZZARD, W. R. & BLUM, C. 1982. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J Lipid Res*, 23, 911-4.
- ZHANG, J., SONG, Y., CHEN, H. & FAN, D. 2005. The tau gene haplotype h1 confers a susceptibility to Parkinson's disease. *Eur Neurol*, 53, 15-21.
- ZIMPRICH, A., BISKUP, S., LEITNER, P., LICHTNER, P., FARRER, M., LINCOLN, S., KACHERGUS, J., HULIHAN, M., UTTI, R. J., CALNE, D. B., STOESSL, A. J., PFEIFFER, R. F., PATENGE, N., CARBAJAL, I. C., VIEREGGE, P., ASMUS, F., MULLER-MYHSOK, B., DICKSON, D. W., MEITINGER, T., STROM, T. M., WSZOLEK, Z. K. & GASSER, T. 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44, 601-7.
- ZOHAR, R., LEE, W., ARORA, P., CHEIFETZ, S., MCCULLOCH, C. & SODEK, J. 1997. Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *J Cell Physiol*, 170, 88-100.



## Erklärung zum Eigenanteil

Der Eigenanteil an der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden dargestellt. Im klinischen Abschnitt der Arbeit wurden 38 der 94 Probanden in der Parkinson-Ambulanz der Abteilung für Neurologie des Universitätsklinikums Tübingen oder über Kontaktdaten ehemaliger Studienteilnehmer durch die Doktorandin rekrutiert. Hieraufhin wurden Screening-Daten erfasst und eine Anamnese entsprechend des Studienprotokolls durch die Doktorandin erhoben. Die anschließende neurologische Untersuchung führte ein Facharzt für Neurologie der Parkinson-Ambulanz der Abteilung für Neurologie des Universitätsklinikums Tübingen durch.

Im Anschluss erfolgte durch die Doktorandin die Blutentnahme zur Blutprobengewinnung und nach Einarbeitung durch Frau PD Dr. Inga Liepelt-Scarfone und Frau Dr. Susanne Gräber-Sultan die selbstständige Durchführung der neuropsychologischen Testung sowie Bearbeitung von Fragebögen mit diesen 38 Probanden. Zwei der 38 Probanden wurden im Rahmen von Hausbesuchen durch die Doktorandin untersucht.

Die erhobenen Daten dieser Probanden wurden selbstständig ausgewertet und in die DEMPARK-Datenbank eingegeben. Die Interpretation der Ergebnisse der neuropsychologischen Testung mit hieraus resultierender Einteilung in die Subgruppen (PD, PD-MCI und PDD) erfolgte durch Frau PD Dr. Inga Liepelt-Scarfone und Frau Dr. Susanne Gräber-Sultan der Abteilung für Neurodegeneration der Neurologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Die initiale Aufarbeitung und Archivierung der gewonnenen Blutproben erfolgte durch einen technischen Mitarbeiter des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung in Tübingen.

Vorhandene 85 Plasma-Proben des Kollektivs wurden durch die Doktorandin mittels Osteopontin-ELISA im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung nach Anleitung durch Herrn Christian Deuschle untersucht. Ebenso erfolgte eine Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels ELISA nach Etablierung der Methode nach Bradford, diese ist jedoch nicht Teil der Auswertung und daher nicht beschrieben.

Anschließend wurde durch die Doktorandin das *SNaP-Shot*®-Verfahren bei den Proben angewandt und die Sequenzierung durchgeführt. Hierbei wurde nach Einweisung durch Herrn Christian Deuschle und Frau Ann-Katrin Hauser ein

komplettes *Risk-Panel* untersucht, nur die statistisch ausgewerteten Einzelnukleotid-Polymorphismen wurden in der Arbeit genauer beschrieben. Die Interpretation der Sequenzierungs-Rohdaten erfolgte mithilfe von Frau Ann-Kathrin Hauser am Hertie-Institut.

Nach Erhebung der klinischen und experimentellen Daten wurden diese durch die Doktorandin unter Anleitung durch Frau Claudia Schulte statistisch ausgewertet.

Das Manuskript wurde durch Frau Claudia Schulte und Frau PD Dr. Inga Liepelt-Scarfone zur Korrektur gelesen.

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

Tübingen, den 12.03.2017

---

*Ellen Fehlert*

## **Danksagung**

Allen, die an diesem Projekt beteiligt waren und mich hierbei unterstützt haben, möchte ich meinen Dank aussprechen. Die stete Gesprächsbereitschaft und konstruktiven Vorschläge aller Beteiligten haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Frau Professor Dr. Daniela Berg danke ich herzlich für die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Promotionsthemas. Hierdurch konnte ich einen Einblick sowohl in klinische wie auch experimentelle Forschungsweisen und das spannende Themengebiet der Neurodegeneration gewinnen. Die hierbei erfahrenen wissenschaftlichen Aspekte werden mich in meinem weiteren Berufsleben als Ärztin immer begleiten. Ich bedanke mich für die Möglichkeit, in Ihrer Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen.

Mein Dank gilt außerdem meinen Betreuern im Rahmen der experimentellen Arbeit am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung Herrn Professor Dr. Walter Mätzler, Claudia Schulte, Christian Deuschle und Ann-Kathrin Hauser. Während der Labortätigkeit standen sie mir stets hilfsbereit zur Seite. Ohne ihr Fachwissen und ihr Können wäre ein Gelingen der Arbeit nicht möglich gewesen.

Im Rahmen der klinischen Arbeit gilt mein herzlicher Dank den Betreuerinnen Frau PD Dr. Inga Liepelt-Scarfone und Frau Dr. Susanne Gräber-Sultan, die mich vom ersten Tag an begleitet und unterstützt haben.

Ich bedanke mich außerdem bei allen Ärzten des Zentrums für Neurologie des Universitätsklinikums Tübingen, die die klinisch neurologische Einschätzung der Patienten vornahmen und weitere Blutproben für die experimentellen Untersuchungen akquirierten. Ebenso bedanke ich mich bei allen Probanden, die an dieser Studie teilgenommen haben und so einen Beitrag zur Forschung auf dem Gebiet der Parkinson-Erkrankung geleistet haben.

Im Speziellen möchte ich meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern sowie Johannes Kern dafür danken, dass sie während der Arbeit zu jeder Zeit für mich da waren mit all ihrem Wissen und ihrer Geduld, und mich immer motivierend und unterstützend begleitet haben.

Des Weiteren möchte ich meinen Dank der Nikolaus-Gercken-Stiftung für die Förderung während meines Studiums aussprechen.