

Aus dem Zentrum für Neurologie der Universität Tübingen  
Neurologische Klinik und Hertie-Institut für klinische Hirnforschung  
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt Neurodegenerative  
Erkrankungen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. T. Gasser

**Polymorphismen im Osteopontin-Gen und quantitative  
Bestimmung des Genprodukts in Liquor und Serum  
von Patienten mit Lewy-Körperchen-Erkrankungen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Joan Philipp Michelis

aus

Köln

2010

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Frau Professor Dr. D. Berg
2. Berichterstatter:	Frau Professor Dr. C. Nitsch



## **Inhaltsverzeichnis**

- 1. Einleitung [8]
- 1.1. Lewy-Körperchen-Erkrankungen: klinische Einteilung [8]
  - 1.1.1. Parkinson ohne Demenz (PDND),  
Parkinson mit Demenz (PDD) [8]
  - 1.1.2. Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) [10]
- 1.2. Lewy-Körperchen-Erkrankungen: Neuropathologie [10]
- 1.3. Lewy-Körperchen-Erkrankungen: Ätiologie und Pathogenese [11]
  - 1.3.1. Erkenntnisse aus der Untersuchung monogenetischer  
Parkinsonsyndrome [11]
  - 1.3.2. Erkenntnisse aus der Untersuchung von  
Einzelnukleotidpolymorphismen [13]
  - 1.3.3. Erkenntnisse aus molekularbiologischen und  
biochemischen Studien [14]
    - 1.3.3.1. Inflammation [14]
      - 1.3.3.1.1. Mikroglia [14]
      - 1.3.3.1.2. Lymphozyten [15]
    - 1.3.3.2. Oxidativer/nitrosativer Stress, Störungen der Atmungskette,  
Exzitotoxizität [16]
      - 1.3.3.2.1. Oxidativer/nitrosativer Stress [16]
      - 1.3.3.2.2. Mitochondriale Dysfunktion [16]
      - 1.3.3.2.3. Exzitotoxizität [17]
- 1.4. Osteopontin [18]
  - 1.4.1. Struktur [18]
  - 1.4.2. Lokalisation [19]
  - 1.4.3. Physiologische und pathophysiologische Funktionen [19]
  - 1.4.4. OPN und Neurodegeneration [20]
    - 1.4.4.1. Neuroinflammation [20]
      - 1.4.4.1.1. OPN und Mikroglia [20]
      - 1.4.4.1.2. OPN und T-Lymphozyten [21]
      - 1.4.4.1.3. OPN und B-Lymphozyten [22]

1.4.4.2. OPN und oxidativer/nitrosativer Stress [22]

1.4.4.3. OPN und mitochondriale Dysfunktion [22]

1.4.4.4. OPN und Exzitotoxizität [23]

1.4.4.5. OPN und LRRK2 [23]

1.4.5. OPN-Gen-Polymorphismen [23]

2. Fragestellung [24]

3. Patienten, Material und Methoden [25]

3.1. Patienten und Kontrollen [25]

3.2. Material [27]

3.2.1. Chemikalien [27]

3.2.2. Puffer und Lösungen [27]

3.2.3. Enzyme, Antikörper und Kits [28]

3.2.4. Oligonukleotide [29]

3.3. Methoden [29]

3.3.1. Probenentnahme [29]

3.3.2. Standardmethoden [30]

3.3.2.1. Polymerasekettenreaktion [30]

3.3.2.2. Gelelektrophorese [30]

3.3.3. Genotypisierung der SNPs mithilfe des SNaPshot Verfahrens [31]

3.3.3.1. Vorgehen [32]

3.3.4. Messung der OPN-Konzentrationen in Liquor und Serum [36]

3.3.4.1. Vorgehen [37]

3.3.5. Statistische Auswertung [38]

4. Ergebnisse [40]

4.1. Epidemiologische Daten [40]

4.2. OPN-Spiegel und klinisch-/biografische Parameter [40]

4.2.1. OPN-Spiegel in der Gesamtgruppe [40]

4.2.2. OPN-Spiegel im Zusammenhang mit den biografischen

- Parametern Alter und Geschlecht [42]
- 4.2.3. OPN-Spiegel: Kontrollen versus Patienten [43]
- 4.2.4. OPN-Spiegel innerhalb der Patienten-Gruppe [44]
- 4.3. Polymorphismen im OPN-Gen [46]
  - 4.3.1. Polymorphismen im OPN-Gen: Assoziation mit dem Erkrankungsrisiko [46]
    - 4.3.1.1. SNP -66 (T/G) [46]
    - 4.3.1.2. SNP 1239 (A/C) [47]
  - 4.3.2. Polymorphismen im OPN-Gen in der Patientengruppe [47]
    - 4.3.2.1. SNP -66 (T/G) [47]
    - 4.3.2.2. SNP 1239 (A/C) [48]
- 4.4. Assoziation von SNP-66 und SNP 1239 mit OPN-Spiegeln im Liquor und Serum [48]
  - 4.4.1. SNP -66 (T/G) [48]
  - 4.4.2. SNP 1239 (A/C) [48]
- 4.5. Assoziation von SNP-66 und SNP 1239 mit IgG-Spiegeln [49]
  - 4.5.1. SNP -66 (T/G) [49]
  - 4.5.2. SNP 1239 (A/C) [50]
- 4.6. IgG-Spiegel und OPN-Spiegel [51]
  
- 5. Diskussion [52]
  - 5.1. Zielsetzung der Arbeit [52]
  - 5.2. OPN-Spiegel und klinisch-biografische Parameter [53]
    - 5.2.1. OPN-Spiegel sind bei LBD-Patienten signifikant erhöht [53]
    - 5.2.2. OPN-Spiegel im Zusammenhang mit Alter und Geschlecht [54]
    - 5.2.3. OPN-Spiegel innerhalb der Patienten-Gruppe [55]
  - 5.3. OPN-Gen und klinische Parameter; OPN-Gen und OPN-Protein: SNP -66 ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für LBD assoziiert, nicht jedoch mit OPN-Spiegeln [57]
  - 5.4. OPN-Gen, OPN-Protein und IgG-Spiegel: OPN und Neuroinflammation [58]

- 5.5. In welchem Kontext stehen die Ergebnisse dieser Arbeit und die gängigen Theorien zur Pathogenese von LBD? [60]
- 5.5.1. Neuroinflammation [60]
- 5.5.1.1. Könnte OPN zu einer Verstärkung der Mikroglia-Antwort führen? [62]
- 5.5.1.2. Interaktion zwischen OPN und dem spezifischen Immunsystem [64]
- 5.5.2. Oxidativer/nitrosativer Stress, Exzitotoxizität, mitochondriale Dysfunktion, LRRK2 [65]
- 5.6. Klinische Bedeutung von OPN für Lewy-Körperchen-Erkrankungen [67]
  
- 6. Zusammenfassung [69]
  
- 7. Anhang [71]
- 7.1. Abkürzungsverzeichnis [71]
- 7.2. Stadieneinteilung nach Hoehn und Yahr [71]
- 7.3. Abbildungen und Tabellen [73]
  
- 8. Literaturverzeichnis [84]
  
- 9. Danksagung [93]
  
- 10. Lebenslauf [95]

# 1. Einleitung

## 1.1. Lewy-Körperchen-Erkrankungen: klinische Einteilung

Die Erkrankungen „Parkinson ohne Demenz“ (PDND), „Parkinson mit Demenz“ (PDD) und „Demenz mit Lewy-Körperchen“ (DLB) lassen sich aufgrund ihrer gemeinsamen klinischen und pathologischen Merkmale unter dem Begriff "Lewy-Körperchen-Erkrankungen (Lewy-body-diseases, LBD)" zusammenfassen (Lippa, Duda et al. 2007). Da es keine eindeutigen klinischen oder histologischen Unterscheidungsmerkmale zwischen PDD und DLB gibt, wird die Trennung in zwei eigenständige Entitäten von manchen Autoren angezweifelt (McGeer and McGeer 2008). DLB-Patienten zeigen im Gegensatz zu PDD-Patienten eine eher unspezifische Verlangsamung der Motorik, die keine Seitenpräferenz zeigt. Das Auftreten eines Tremors ist bei DLB nicht typisch (McKeith, Mintzer et al. 2004). Die klinische und neuropathologische Ähnlichkeit von PDD, PDND und DLB spricht dafür, wissenschaftliche Untersuchungen über die Pathophysiologie von Parkinsonsyndromen an dem Gesamtkollektiv von Patienten mit LBD durchzuführen. Die Ätiologie dieser Erkrankungen ist bis heute unbekannt und viele pathogenetische Faktoren scheinen an der Entstehung der Erkrankung mitzuwirken. Unter anderem könnten dabei entzündliche Prozesse und Mikrogliaaktivierung, mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress, Eisenakkumulation, Proteinaggregation und Toxine eine Rolle spielen (Gotz, Freyberger et al. 1990; Jenner and Olanow 1996; Schulz, Lindenau et al. 2000; Orr, Rowe et al. 2002; Schober 2004; Gandhi and Wood 2005; Kim and Joh 2006; Wersinger and Sidhu 2006).

### 1.1.1. Parkinson ohne Demenz (PDND), Parkinson mit Demenz (PDD)

Die Nosologie von Parkinsonsyndromen trennt zwischen dem syndromatischen Oberbegriff und den verschiedenen Ätiologien (idiopathische Parkinsonsyndrome, nicht-idiopathische Parkinsonsyndrome). Die idiopathische Parkinsonerkrankung, inklusive der monogenetischen Formen, wird auch als Morbus Parkinson bezeichnet. Parkinsonsyndrome sind definiert durch das Vorliegen einer Hypo-/Bradykinese (oft zusammengefasst als Akinese) und

eines der folgenden, in unterschiedlicher Gewichtung auftretenden Kardinalsymptomen: Rigor, Ruhetremor, posturale Instabilität.

Fakultativ können folgende Begleitsymptome auftreten: sensorische Symptome (Dysästhesien und Schmerzen), vegetative Symptome (Störungen von Blutdruck, Temperaturregulation, Harnblasenfunktion und sexuellen Funktionen), psychische Symptome (vor allem Depression) und kognitive Symptome (frontale Störungen, in fortgeschrittenen Stadien Demenz; übernommen aus: Leitlinie Parkinsonsyndrome der Deutschen Gesellschaft für Neurologie <http://www.dgn.org/leitlinien-krankheitsbilder.html>). Eine Demenz entwickelt sich bei ca. 40% der Patienten (Parkinson mit Demenz, Parkinson disease with dementia, PDD). In dieser Arbeit werden PDD-Patienten abgegrenzt von Parkinson-Patienten ohne Demenz (Parkinson disease with no dementia, PDND).

Parkinsonsyndrome lassen sich klinisch in tremordominante und rigid-akinetische Parkinsonsyndrome sowie Parkinsonsyndrome vom Äquivalenztyp einteilen. Eine Einteilung in Schweregrade ermöglicht die Skalierung nach Hoehn & Yahr (ein-oder beidseitig, axial betont, posturale Instabilität, Mobilität; siehe Anhang 7.2).

Bei Parkinsonsyndromen treten motorische Symptome erst auf, wenn ca. 60-70% der Neurone der Substantia nigra (SN) untergegangen sind. Eine ursächliche Therapie ist bei Auftreten von motorischen Symptomen kaum noch möglich. Dies macht es notwendig, Marker zu finden, die eine Früherkennung von LBD ermöglichen.

Die Ursache des M. Parkinson ist bis auf ca. 5-10% der Fälle, die monogenetisch bedingt sind unbekannt. Dies ist anders bei den sekundären oder symptomatischen Parkinsonsyndromen, z.B. verursacht durch eine vaskuläre Enzephalopathie oder durch exogene Ursachen (Manganintoxikationen) (Belin and Westerlund 2008). Die Prävalenz der idiopathischen Parkinsonerkrankung steigt mit dem Alter an. Während sie in der Gruppe der 65- bis 69-Jährigen noch bei ca. 0.9% liegt, weisen 80- bis 85-Jährige eine Prävalenz von ca. 5% auf (de Rijk, Tzourio et al. 1997). Angesichts

der steigenden Lebenserwartung ist deshalb mit einer Zunahme der Prävalenz von Parkinsonsyndromen zu rechnen.

### **1.1.2. Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB)**

Die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) ist nach der Alzheimerdemenz (AD) die zweithäufigste neurodegenerative Demenzform (McKeith, Mintzer et al. 2004; Zaccai, McCracken et al. 2005). Neben dem dementiellen Syndrom sind Fluktuationen der Aufmerksamkeit und Wachheit sowie ausgestaltete visuelle Halluzinationen typisch. Ein Parkinson-Syndrom kann vor, mit oder nach Beginn des dementiellen Syndroms auftreten. Nach einem Konsens der "DLB/PDD-Arbeitsgruppe" (DLP/PDD Working Group, Lippa CF) spricht man von einer DLB, wenn die Demenz vor oder bis zu einem Jahr nach Beginn des Parkinson-Syndroms auftritt. Sonst spricht man definitionsgemäß von PDD (Lippa, Duda et al. 2007).

## **1.2. Lewy-Körperchen-Erkrankungen: Neuropathologie**

Das gemeinsame neuropathologische Kennzeichen der LBD (PDND, PDD, DLB) ist der Verlust von melaninhaltigen, dopaminergen Neuronen in der Pars compacta der SN sowie das Auftreten von Lewy-Körperchen (*Lewy-bodies*, LB) und Lewy-Neuriten in den noch verbleibenden Neuronen, sowie in anderen Bereichen des Gehirns. LB sind eosinophile, zytoplasmatische Einschlusskörperchen, die viele verschiedene, teilweise fehlgefaltete Proteine enthalten. Die Hauptkomponente stellt alpha-Synuclein dar (Windisch, Wolf et al. 2008).

Alpha-Synuclein ist ein zur Familie der Synucleine gehörendes, vor allem im Gehirn exprimiertes präsynaptisches Protein, dem eine essentielle Rolle bei der Entstehung von LBD zugeordnet wird.

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass LB keine neurotoxischen Eigenschaften haben, sondern die Sequestration schädigender Proteine, wie z.B. von in Protofibrillen organisiertem alpha-Synuclein, ermöglichen (Forno 1996; Gandhi and Wood 2005).

Neben der SN und dem dopaminergen System sind auch andere Regionen und Transmittersysteme vom fortschreitenden Neuronenverlust und dem Auftreten von LB betroffen. Nach derzeitigem wissenschaftlichem Stand kommt es, insbesondere bei PDND und PDD nach einem oft vorhersagbaren Muster zunächst in einem prämotorischen Stadium zu einer Degeneration unterer Hirnstammkerne und des Riechhirns.

Im Verlauf kommt es zu einem Befall des Mesenzephalons und der Substantia nigra, bis es bei fortgeschrittener Erkrankung zu einer Degeneration kortikaler Strukturen kommt (Braak, Ghebremedhin et al. 2004). Weitere bei LBD betroffene Regionen bzw. Systeme sind u.a. der noradrenerge Locus coeruleus, motorische und vagale Kerngebiete, serotonerge und cholinerge Systeme und der Kortex (Jellinger 2002).

Während Patienten mit PDND nur vereinzelt kortikale LB zeigen, kommt es bei DLB und PDD zu einem ausgeprägteren, kortikalen Befall. Bei PDD korrelieren kortikale LB mit dem Auftreten und der Schwere dementieller Symptome (Hurtig, Trojanowski et al. 2000; Aarsland, Perry et al. 2005).

### **1.3. Lewy-Körperchen-Erkrankungen: Ätiologie und Pathogenese**

Die Ätiologie und Pathogenese von LBD ist noch nicht eindeutig geklärt. Hinweise und Einblicke bieten jedoch einerseits Untersuchungen zu monogenetischen Parkinsonsyndromen und andererseits Ergebnisse aus epidemiologischen/molekularbiologischen/biochemischen Studien.

#### **1.3.1. Erkenntnisse aus der Untersuchung monogenetischer Parkinsonsyndrome**

Bis heute sind 13 Genloci bekannt, die mit dem Auftreten von autosomal-dominanten und autosomal-rezessiven Parkinsonsyndromen assoziiert sind (Belin and Westerlund 2008). Durch das Studium monogenetisch vererbter Parkinsonsyndrome ergeben sich Hinweise dafür, dass mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress und Proteinfehlfaltung eine zentrale Rolle bei der Entstehung von LBD spielen.

*PINK1* (*PTEN induced putative kinase 1*, mutmaßliche PTEN induzierte Kinase 1), *DJ-1* (Chaperonenpaar hsp40/hdj-1), *LRRK2* (*Leucine Rich Repeat Kinase 2*, Leucin-reiche Repeat-Kinase 2) und *HTRA2* (*HtrA serine peptidase 2*, HtrA Serin Peptidase 2) kodieren für Proteine, die unter anderem in Mitochondrien lokalisiert sind (Baron, Kudin et al. 2007; Bogaerts, Theuns et al. 2008). Mitochondriale Dysfunktion steht im Zusammenhang mit der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), und *DJ-1* ist wichtig für die Pufferung von ROS (Martinat, Shendelman et al. 2004). Auch *Parkin* (*PARK 2*) ist teilweise in der mitochondrialen Membran lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Transkription und Replikation mitochondrialer DNA (mtDNA) (Bogaerts, Theuns et al. 2008). *PINK1*, *Parkin* und *HTRA2* stehen im Zusammenhang mit der Regulation des mitochondrialen Weges der Apoptose- der ebenfalls auch bei sporadischen Parkinsonsyndromen aktiviert wird (van Loo, Saelens et al. 2002; Jiang, Ren et al. 2004; Valente, Abou-Sleiman et al. 2004) .

*LRRK2* scheint bei der Regulation des "PTEN/PI3K/Akt" (*phosphatase and tensin homolog*, Phosphatase und Tensin homolog/ Phosphoinositid 3-Kinase/ Proteinkinase B)- bzw. des "TSC/Rheb/TOR/4E-BP" (*Tuberous sclerosis complex*, Tuberöse Sklerose Komplex/ *Ras homolog enriched in brain*, im Gehirn angereichertes Ras Homologon/ *Target of Rapamycin*, Ziel des Rapamycins/ *Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*, eukaryotisches Translations-Initiationsfaktor-4E- bindendes Protein 1)

-Signalweges, welcher zu einer translationalen Aktivierung verschiedener Gene führt, eine Rolle zu spielen. Mutationen im *LRRK2*-Gen führten zu einer Entthemmung des "PTEN/PI3K/Akt"- bzw. "TSC/Rheb/TOR/4E-BP"- Signalweges, wodurch es zu einer gesteigerten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber ROS kam (Imai, Gehrke et al. 2008).

Es wird angenommen, dass Mutation des alpha-Synuclein-Gens "SNCA" zu einer verstärkten Aggregation von alpha-Synuclein führen (Pankratz and Foroud 2007).

### **1.3.2. Erkenntnisse aus der Untersuchung von Einzelnukleotidpolymorphismen**

Eine Möglichkeit, genetische Einflüsse auf das Risiko einer Erkrankung zu untersuchen, ist die Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNP). SNPs sind genetische Variationen, die eine Nucleotidbase betreffen. Sie machen ca. 90% der genetischen Diversität des Menschen aus. Die varianten Allele von SNPs sind meistens nicht direkt krankheitsauslösend. Sie können jedoch das Erkrankungsrisiko für bestimmte Krankheiten erhöhen und werden daher häufig auf Assoziationen mit bestimmten Erkrankungen hin untersucht. Auch SNPs aus nichtkodierenden Bereichen, wie Introns oder Promotorregionen, können für genetische Untersuchungen herangezogen werden, da sie durch Beeinflussung der Affinität von Transkriptionsfaktoren oder des Splice-Prozesses zu quantitativen Veränderungen in der Gen-Expression und damit z.B. zu höheren/niedrigeren Spiegeln von Biomolekülen führen können. Zusätzlich können sie im Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD) mit "krankmachenden" Polymorphismen in kodierenden Bereichen liegen und so zwar nicht selber Veränderungen des Proteins/ des Proteinstoffwechsels bedingen, aber trotzdem mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sein.

Im Zusammenhang mit LBD wurden u.a. genetische Variationen in den proinflammatorischen Zytokine TNF Alpha und IL1-beta untersucht, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert waren. Ein Teil der Risikoallele führte in Vorstudien ebenfalls zu einer verstärkten Expression von TNF-Alpha und IL 1-beta (Wahner, Sinsheimer et al. 2007; Wu, Feng et al. 2007). Auch SNPs im Zyklooxygenase(COX)-2-Gen und im Alpha-Synuclein-Gen waren mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für LBD assoziiert (Kobayashi, Ujike et al. 2006; Hakansson, Bergman et al. 2007). Nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand liefern SNP-Analysen im Zusammenhang mit LBD vor allem Hinweise für eine tragende Rolle von Entzündung bei der Pathogenese von LBD.

### **1.3.3. Erkenntnisse aus molekularbiologischen und biochemischen Studien**

Es bestehen Hinweise dafür, dass oxidativer Stress, Störungen der Atmungskette, Exzitotoxizität, Proteinaggregation bzw. Ubiquitin-Dysfunktion, Apoptose und Entzündung bei der Pathogenese von LBD eine entscheidende Rolle spielen (Gandhi and Wood 2005; Baron, Kudin et al. 2007; Olanow 2007; Fukui and Moraes 2008).

Nachfolgend wird auf die für diese Arbeit relevanten Pathomechanismen (Neuroinflammation, mitochondriale Störung, oxidativer Stress, Exzitotoxizität) näher eingegangen.

#### *1.3.3.1. Inflammation*

##### *1.3.3.1.1. Mikroglia*

Das Gehirn ist ein immunprivilegiertes Organ, welches durch die Bluthirnschranke (BHS) weitgehend vor dem Eindringen infektiöser Agenzien geschützt wird. Als Vertreter des Immunsystems finden sich hier vorrangig Mikrogliazellen (Becher, Prat et al. 2000). Sie sind den Makrophagen in der Körperperipherie morphologisch und funktionell ähnlich und besitzen phagozytotische, Antigen-präsentierende und zytotoxische Eigenschaften. Hirngewebe ist gegenüber schädigen Einflüssen sehr empfindlich, daher ist es die Aufgabe von Mikrogliazellen, eine Entzündungsreaktion möglichst schnell und effektiv einzuleiten und zu beenden. Um das zu ermöglichen, werden sie bereits durch kleinste pathologische Veränderungen wie Schwankungen der extrazellulären Kaliumkonzentration aktiviert (Kreutzberg 1996). Sie werden bei Auftreten von pathologischen Vorgängen aktiv, leiten die Entzündungsreaktion ein und verstärken sie durch Zytokinausschüttung und Antigen-Präsentation. Eine überschüssige und/oder verlängerte Aktivierung von Mikrogliazellen kann jedoch für das Parenchym schädigende Folgen haben.

So ist aktivierte Mikroglia z.B. in der Lage, Zellen durch den sog. "oxidative burst" (Freisetzung von NO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zu schädigen, durch die Freisetzung von Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF-Alpha) und Interleukin1-beta (IL1-beta) Apoptose auszulösen, oder durch Freisetzung von aktivierenden Aminosäuren (Glutamat) eine exzitotoxische Schädigung von Neuronen herbeizuführen (Wersinger and Sidhu 2006). In diesem Zusammenhang wird auch klar, dass

Inflammation, nitrosativer/oxidativer Stress und Exzitotoxizität überlappende pathogenetische Faktoren der LBD darstellen und nicht als „eigenständige“ Faktoren betrachtet werden können.

Nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand spielt die Entzündungsreaktion bei der Pathogenese von LBD eine essentielle Rolle. So gehören Infiltrate aktivierter Mikrogliazellen in der SN zum pathologischen Korrelat von LBD, MHC-Moleküle und proinflammatorische Zytokine sind bei LBD-Patienten hochreguliert und NSAR zeigen bei LBD eine neuroprotektive Wirkung (Wersinger and Sidhu 2006; Whitton 2007). Nach Aussage einiger Autoren ist die Entzündungsreaktion sogar das einzig konstant nachweisbare pathologische Korrelat der pathogenetisch heterogenen LBD (Whitton 2007).

#### *1.3.3.1.2. Lymphozyten*

In post mortem Untersuchungen von LBD-Patienten konnten in der SN meist nur wenig Lymphozyten nachgewiesen werden (Wersinger and Sidhu 2006). Daten aus Mausmodellen weisen jedoch auf eine Bedeutung von Lymphozyten bei der Pathogenese von LBD hin. So gingen in MPTP-Mausmodellen Lymphozyteninfiltrate dem Untergang von Neuronen voraus und das Ausmaß der Infiltrate korrelierte mit dem neuronalen Schaden (Kurkowska-Jastrzebska, Wronska et al. 1999; Kurkowska-Jastrzebska, Wronska et al. 1999; Wersinger and Sidhu 2006).

Des Weiteren, führen aktivierte Mikroglia-Zellen zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokinen (IL1, IL2, IL6, TNF-Alpha/beta, TGF-Alpha/beta), die aktivierend auf B- und T-Lymphozyten wirken. Zusätzlich setzen sie Chemokine und koloniestimulierende Faktoren frei, die wie das in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehende Osteopontin (OPN) zu einer Rekrutierung und zu einer Überlebens-Verlängerung von B- und T-Lymphozyten führen (Aloisi 2001). Lymphozyten tragen, wenn überschüssig bzw. verlängert aktiviert, zu einem neuronalen Schaden bei. So führen T-Killer-Lymphozyten zu einer Lyse von Neuronen, und T-Helfer-Zellen sind an der Koordination und Maximierung der Entzündungsreaktion beteiligt (Wersinger and Sidhu 2006).

Im Zusammenhang mit der B-Lymphozyten-Aktivierung ist zu erwähnen, dass bei LBD-Patienten Antikörper gegen durch Oxidation modifizierte Moleküle

nachgewiesen werden konnten (Rowe, Le et al. 1998; Whitton 2007). Zusätzlich führte die Injektion von Immunglobulinen aus LBD-Patientenseren in die SN von Ratten dort zu einem signifikant stärkeren Untergang von Neuronen als nach Injektion von Immunglobulinen aus Seren von gesunden Kontrollen (Chen, Le et al. 1998). B-Lymphozyten schädigen Neurone durch die Produktion von Antikörpern und die dadurch bedingte Opsonierung von Zelloberflächen.

### *1.3.3.2. Oxidativer/nitrosativer Stress, Störungen der Atmungskette, Exzitotoxizität*

#### *1.3.3.2.1. Oxidativer/nitrosativer Stress*

Das erste Modell, das zur Pathogenese des M. Parkinson in Betracht gezogen wurde, war das des oxidativen Stresses (Olanow 2007). Unter physiologischen Bedingungen fallen bei verschiedenen Stoffwechselprozessen radikale Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) an, denen Antioxidantien (Vitamin C, Vitamin E, Coenzym Q, Cystein) und detoxifizierende Enzyme wie Glutathion-Peroxidasen, Superoxid-Dismutasen und Katalasen gegenüberstehen. Bei Lewy-Körperchen-Erkrankungen ist dieses Gleichgewicht aus Bildung und Abpufferung von Radikalen gestört (Simonian and Coyle 1996; Schulz, Lindenau et al. 2000). Radikale Sauerstoffspezies, zu denen Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Stickstoffmonoxid (NO, nitrosativer Stress), Hydroxylradikale (OH<sup>•</sup>) und Superoxidradikale (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) gehören, sind hochreaktive Moleküle, die in der Lage sind, eine Reihe von Biomolekülen wie Membranlipide und DNA zu oxidieren und so zu schädigen (Gotz, Kunig et al. 1994). Hierbei hat die SN einen besonderen Stellenwert, da u.a. bei der Mono-Amino-Oxidase(MAO)-vermittelten Oxidation von Dopamin und dessen Abbauprodukten ROS entstehen (Olanow 1993).

#### *1.3.3.2.2. Mitochondriale Dysfunktion*

Eine weitere Quelle von ROS ist die mitochondriale Atmungskette. Da die Komplexe der Atmungskette auch eine radikalpuffernde Wirkung besitzen, kommt es besonders bei fehlerhafter Funktion einzelner Komplexe zu einer gesteigerten Entstehung von ROS (Min and Jian-xing 2007). Von verschiedenen Autoren wird angenommen, dass ROS wiederum zu Schädigungen der für Mutationen besonders anfälligen mitochondrialen DNA

führen und so weitere Defekte von Atmungskettenkomplexen entstehen können (Fukui and Moraes 2008). Auf eine Beteiligung von mitochondrialer Dysfunktion bei der Pathogenese von LBD weisen folgende Daten hin: bei LBD-Patienten konnte eine defiziente Aktivität von Komplex I nachgewiesen werden, die Menge deletierter mitochondrialer DNA war bei LBD-Patienten deutlich erhöht und verschiedene Gene die bei monogenetischen LBD mutiert sind kodieren für mitochondriale Proteine (Schapira, Cooper et al. 1990; Bender, Krishnan et al. 2006; Baron, Kudin et al. 2007) . Die Neurotoxine 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), Rotenon und Paraquat entfalten ihre Wirkung durch Hemmung des Komplex I der Atmungskette und werden zum Studium von LBD in Mausmodellen verwendet (Schober 2004). Da Mitochondrien die zentralen Energielieferanten der Zelle darstellen, führt mitochondriale Dysfunktion zu einem Mangel des Energieträgers ATP in der Zelle und zu einer damit verbundene Aktivierung  $Ca^{2+}$ -abhängiger, lytischer Enzyme. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt zu einer Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges (van Loo, Saelens et al. 2002).

#### *1.3.3.2.3. Exzitotoxizität*

Bei einer übermäßigen Erregung von Neuronen kommt zu einem gesteigerten Einstrom von  $Ca^{2+}$  in das Neuron und dadurch, wie bei einem ATP-Mangel, zu einer Aktivierung  $Ca^{2+}$ -abhängiger Enzyme, die zu einer Schädigung von Biomolekülen führen. Besonders mitochondriale Moleküle sind von dieser Schädigung betroffen, so dass es in Folge der Exzitotoxizität zu einer weiteren Bildung von ROS kommt. Der aus einer mitochondrialen Dysfunktion resultierende ATP-Mangel könnte die Anfälligkeit für Exzitotoxizität erhöhen. Eine ATP-abhängige Blockade des NMDA-Rezeptors wäre nicht mehr möglich, und es könnte zu einer Übererregung von Neuronen kommen. Von einigen Autoren wird angenommen, dass es durch den Untergang dopaminerge Neurone zusätzlich zu einer Disinhibition glutamaterger, exzitatorischer Neurone kommt (Olanow 2007). Des weiteren setzen auch aktivierte Mikroglia-Zellen aktivierende Aminosäuren frei und haben so exzitotoxisches Potential.

## 1.4. Osteopontin

Osteopontin (OPN, weitere Synonyme: early T-lymphocyte activation gene-1 (Eta-1), secreted phosphoprotein 1 (Spp1)) ist ein glykosyliertes Phosphoprotein, das seit seiner Entdeckung im Knochen in vielen Organen nachgewiesen wurde und eine Vielfalt von Funktionen hat (Mazzali, Kipari et al. 2002). Da OPN mit vielen der zu LBD führenden pathophysiologischen Faktoren assoziiert ist und eine Erhöhung von OPN bei Patienten mit LBD bereits gezeigt wurde, muss vermutet werden, dass es bei der Entstehung und/oder im Verlauf von LBD eine Rolle spielt.

### 1.4.1. Struktur

Das OPN-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 4 (4q13). Die OPN-DNA ist hochkonserviert. Post-translational wird das Protein durch Phosphorylierungen und Glykosylierungen, mit deutlichen lokalen und zeitlichen Unterschieden, stark modifiziert. Das OPN-Molekül besteht aus 314 Aminosäuren und ist 44-75 Kilo-Dalton (kDa) schwer (Sodek, Ganss et al. 2000). OPN besitzt eine Poly-Aspartat-Domäne, mit der es  $Ca^{2+}$ -Ionen binden kann. Eine RGD (Arginin-Glycin-Aspartat) -Sequenz und eine SVVYGLR (Serin-Valin-Valin-Tyrosin-Glutamat-Leucin-Arginin)-Sequenz ermöglichen die Bindung an verschiedene Integrin-Rezeptoren, welche bei der Anheftung von Zellen an Biomoleküle, sowie bei Zell-Zell-Kontakten eine entscheidende Rolle spielen (Bayless and Davis 2001). Diese Bindungsstellen sind für die Interaktion von OPN mit Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen von Bedeutung.

An mehreren Stellen kann OPN durch Thrombin gespalten werden. Die OPN-Spaltprodukte haben oft eine höhere Aktivität und beinhalten Domänen mit Funktionen, die sich möglicherweise von denen des nativen OPN unterscheiden (Scatena, Liaw et al. 2007). So ist auch die SVVYGLR-Sequenz, welche die Bindung an verschiedene Integrin-Rezeptoren ermöglicht, im OPN-Molekül versteckt und wird erst durch Thrombin-Spaltung aktiv. Am N-terminalen Ende von OPN befinden sich zwei Heparin-bindende Domänen, mit denen wahrscheinlich Heparansulfat-Proteoglykane gebunden werden können. OPN

interagiert mit Strukturen der extrazellulären Matrix auch durch Bindung von Fibronektin und Kollagen.

#### **1.4.2. Lokalisation**

OPN erhielt seinen Namen von seinem Erstbeschreiber, um auf die brückenbildende Funktion des Proteins zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix des Knochens hinzuweisen (Oldberg, Franzen et al. 1986). Der Name spiegelt jedoch nicht die weite Verbreitung des Proteins wider. Es wird in einer Vielzahl weiterer Zellen und Gewebe, wie den spezialisierten Epithelien von Brust-, Speichel- und Schweißdrüsen, Gallen- und Pankreasgängen, Darmschleimhaut und Nierentubuli sowie in vaskulärem Gewebe exprimiert (Sodek, Ganss et al. 2000). Es konnte in allen Körperflüssigkeiten einschließlich Liquor und Blut nachgewiesen werden (Maetzler, Berg et al. 2007). Auch in Ganglienzellen des Innenohrs, Gliazellen und Neuronen ist OPN unter physiologischen Bedingungen präsent (Sodek, Ganss et al. 2000; Iczkiewicz, Rose et al. 2004).

Bei Entzündungen wird OPN in aktivierten Makrophagen, Mikrogliazellen und Lymphozyten hochreguliert (Patarca, Freeman et al. 1989; Weber and Cantor 1996). Im Zusammenhang mit LBD konnte OPN als Bestandteil von LB identifiziert werden (Maetzler, Berg et al. 2007).

#### **1.4.3. Physiologische und pathophysiologische Funktionen**

OPN ist ein multifunktionales Molekül, das seine Funktion sowohl als „ortsständiges“ Matrixprotein wie auch als lösliches Zytokin erfüllt. Es ist an der Regulation verschiedener homöostatischer Prozesse wie der Wundheilung, der Entzündung, dem Knochenstoffwechsel und der Gewebe-Kalzifizierung beteiligt. OPN-Knockout-Mäuse haben unter physiologischen Bedingungen zwar einen unauffälligen Phänotyp, zeigen jedoch im Zusammenhang mit Krankheiten veränderte Reaktionsmuster (Rittling, Matsumoto et al. 1998; Miyazaki, Okada et al. 2008).

Im Knochen ist OPN an der Regulation des Kalziumstoffwechsels und am Knochenumbau ("bone remodelling") beteiligt. Es hemmt die Bildung von Hydroxylapatit sowie die Kalzifizierung und es führt durch Regulation der Differenzierung von Osteoklasten zu einer gesteigerten Knochenresorption. So

sind die Knochen von OPN-Knockout-Mäusen hypermineralisiert und fragiler als Knochen von Wildtyp-Mäusen (Boskey, Spevak et al. 2002; Ishijima, Tsuji et al. 2002). In der Niere wird OPN ebenfalls stark exprimiert und in den Harn sezerniert. Es hemmt dort die Bildung und Aggregation von Kalzium-Oxalat-Kristallen und schützt so vor der Entstehung von Nierensteinen (Mazzali, Kipari et al. 2002).

#### **1.4.4. OPN und Neurodegeneration**

OPN interagiert aufgrund seiner vielseitigen Eigenschaften mit einer Reihe der Pathomechanismen die bei LBD von Bedeutung sind. Im folgenden soll der Zusammenhang zwischen OPN und den allgemein anerkannten Krankheitsmechanismen Neuroinflammation, Exzitotoxizität, nitrosativer/oxidativer Stress und mitochondrialer Dyfunktion sowie einer möglichen Interaktion mit dem für eine monogenetische verursachte Parkinsonvariante (s.o.) bedeutsamen LRRK2-Protein dargestellt werden.

##### *1.4.4.1. Neuroinflammation*

Es gibt viele Hinweise dafür, dass OPN eine essentielle Rolle bei der Neuroinflammation spielt.

##### *1.4.4.1.1. OPN und Mikroglia*

OPN konnte in Mikroglia-Zellen des Gehirns nachgewiesen werden. Seine Expression stieg dort nach Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) signifikant an (Iczkiewicz, Rose et al. 2005). In einer Arbeit von Maetzler und Kollegen war bei OPN-Knockout-Mäusen die Zahl mikroglialer Zellen in der Substantia nigra nach MPTP-Injektion vermindert (Maetzler, Berg et al. 2007). In einer weiteren Arbeit zeigten OPN-Knockout-Mäuse nach *in vivo* Rückenmarksquetschung eine gegenüber Wildtyp-Mäusen verminderte Entzündungsreaktion, eine herabgesetzte Expression von TNF-Alpha, IL1-beta und IL6 und eine verminderte Zahl von Mikroglia-Zellen (Hashimoto, Sun et al. 2007). Im Gegensatz dazu kam es bei einer Arbeit von Schroeter et al. bei OPN-Knockout-Mäusen nach Okklusion der Arteria cerebri media zu einer gegenüber den Wildtyp-Mäusen gesteigerten Aktivierung von Mikroglia und Neurodegeneration im Thalamus (Schroeter, Zickler et al. 2006).

Aus den Daten kann geschlossen werden, dass OPN im Bezug auf Neuroinflammation weniger die Aufgabe hat Mikroglia-Zellen zu aktivieren, sondern vielmehr die Rekrutierung von Mikroglia-Zellen zu stimulieren und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen zu induzieren. Der Effekt der Rekrutierung könnte dadurch verstärkt werden, dass aktivierte Mikroglia-Zellen wiederum selbst OPN exprimieren (Iczkiewicz, Rose et al. 2005; Iczkiewicz, Rose et al. 2007).

In einem *in vitro* Modell für Neuro-AIDS konnte gezeigt werden, dass OPN die Rezirkulation sowie die Apoptose von Monozyten hemmt (Burdo, Wood et al. 2007). Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit von Mikroglia und Monozyten kann angenommen werden, dass OPN ähnliche Effekte auch auf Mikroglia-Zellen ausübt.

#### *1.4.4.1.2. OPN und T-Lymphozyten*

OPN induziert in Makrophagen die Bildung von TNF-Alpha, IL 12 und IFN-gamma. Diese Zytokinkonstellation führt zu einer Polarisierung von T-Lymphozyten in Typ1-Helfer-Zellen (Th1-Zellen), wodurch der sogenannte "Th1-Weg" gebahnt wird (Renkl, Wussler et al. 2005).

Der Th1-Weg führt zu einer zellulären Immunantwort und vermittelt so die Abwehr gegen die meisten intrazellulären Pathogene. Bei einer übermäßigen Aktivierung des Th1-Wegs kann es zu einer spezifischen, autoimmunen Zerstörungen von sessilen Zellen kommen.

Th1-Zellen wiederum sezernieren TNF-Alpha und IFN-gamma, beide Zytokine sind potente Aktivatoren von Mikroglia. So könnte OPN über die Bahnung des Th1-Weges indirekt, zu einer Mikroglia-Aktivierung beitragen (Aloisi 2001).

In der Frühphase nach Aktivierung von T-Lymphozyten ist OPN eines der dort am stärksten exprimierten Zytokine, weshalb es synonym auch als Eta-1 (Early T-cell activation gene -1) bezeichnet wird (Patarca, Freeman et al. 1989). Da OPN umgekehrt die Apoptose von T-Lymphozyten hemmt, könnte es als para- oder autokrines Zytokin das Überleben von T-Lymphozyten fördern und so zu einer gesteigerten Immunantwort führen (Steinman 1996; Ashkar, Weber et al. 2000). Einen weiteren proinflammatorischen Effekt zeigt OPN dadurch, dass es chemotaktisch auf Lymphozyten wirkt und auf diese Weise die Rekrutierung von

Lymphozyten zum Ort der Entzündung vermittelt (O'Regan, Chupp et al. 1999; Chiocchetti, Indelicato et al. 2004; Burdo, Wood et al. 2007).

#### *1.4.4.1.3. OPN und B-Lymphozyten*

Durch OPN rekrutierte Mikrogliazellen und Makrophagen setzen nach Aktivierung IL8 frei, das eine Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten bewirkt. OPN ist zusätzlich in der Lage, B-Lymphozyten direkt zu aktivieren und so die Bildung von Antikörpern stimulieren (Lampe, Patarca et al. 1991; Iizuka, Katagiri et al. 1998). Dies ist insofern interessant, als verschiedene Studien darauf hinweisen, dass bei LBD Antikörper gebildet werden, die gegen Strukturen der SN gerichtet sind (Chen, Le et al. 1998; Rowe, Le et al. 1998; Whitton 2007).

#### *1.4.4.2. OPN und oxidativer/nitrosativer Stress*

OPN besitzt die Eigenschaft, an der Pathogenese von LBD beteiligte, freie Radikale wie ROS abzupuffern und die Expression der iNOS zu hemmen (Hwang, Lopez et al. 1994). Bei der iNOS (inducible nitric oxide synthase, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) handelt es sich um eine NO-Synthase, die im Rahmen von Entzündungsreaktionen durch proinflammatorische Zytokine u.a. in Makrophagen induziert werden kann. In diesem Zusammenhang ließe sich auch die verstärkte sekundäre thalamische Neurodegeneration nach Okklusion der Arteria cerebri media in OPN-Knockout-Mäusen erklären, welche wahrscheinlich durch eine enthemmte Expression mikroglialer iNOS bedingt war (Schroeter, Zickler et al. 2006). Es muss hier jedoch berücksichtigt werden, dass die Eigenschaft von OPN, die NO-Produktion zu hemmen, mit dem Alter stark abnimmt und Alter ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von LBD ist (Rollo and Denhardt 1996).

#### *1.4.4.3. OPN und mitochondriale Dysfunktion*

In Mausmakrophagen hemmt OPN die Expression der mitochondrialen Cytochrom-C-Oxidase (Gao, Guo et al. 2003), was auf einen Einfluss von OPN auf mitochondriale Funktionen hinweist. Auf diese Weise könnte OPN zu einer Entstehung von ROS beitragen und so indirekt oxidativen Stress verstärken.

#### 1.4.4.4. *OPN und Exzitotoxizität*

OPN besitzt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle, so dass es durch Exzitotoxizität anfallendes  $\text{Ca}^{2+}$  möglicherweise binden kann und so neuroprotektiv wirken könnte (Schroeter, Zickler et al. 2006).

#### 1.4.4.5. *OPN und LRRK2*

Der durch LRRK2 beeinflusste "PTEN/PI3K/Akt" - bzw. "TSC/Rheb/TOR/4E-BP" -Signalweg führt zu einer translationalen Aktivierung von OPN (Larsson, Perlman et al. 2006; Shao, Washington et al. 2007). Mutationen im LRRK2-Gen resultieren in einer Aktivitätszunahme des Genprodukts und so zu einer gesteigerten Enthemmung des "PTEN/PI3K/Akt"- bzw. "TSC/Rheb/TOR/4E-BP"-Signalweges (Imai, Gehrke et al. 2008). Die Daten lassen vermuten, dass Mutationen im LRRK2-Gen zu einer gesteigerten Expression von OPN führen und so ein Risiko für LBD darstellen könnten.

Nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand kann die Frage, warum OPN-Spiegel bei PD-Patienten erhöht sind, noch nicht beantwortet werden. OPN interagiert mit verschiedenen, zu LBD führenden Pathomechanismen und lässt dort einerseits neurodegenerative (im Zhg. mit Entzündung und mitochondrialer Dysfunktion) und andererseits neuroprotektive (im Zhg. mit nitrosativem/oxidativem Stress) Effekte vermuten. Um zu prüfen, ob OPN eine primäre Rolle bei LBD spielen könnte, wurden in der vorliegenden Arbeit genetische Polymorphismen im OPN-Gen auf eine Assoziationen mit dem Erkrankungsrisiko, den OPN-Serum- und Liquor-Spiegeln und klinischen Daten von LBD-Patienten hin untersucht.

#### **1.4.5. OPN-Gen-Polymorphismen**

Die Online-Datenbank des nationalen Zentrums für Biotechnologie Information (National Center for Biotechnology Information, NCBI) listet derzeit 184 SNPs im humanen OPN-Gen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

Für diese Arbeit wurden SNP -66 und 1239 ausgewählt, da Vorarbeiten auf einen Einfluss dieser SNPs auf die OPN-Expression bzw. die Höhe der OPN-Spiegel und eine Assoziation mit Autoimmunerkrankungen hinweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur die SNP-Verteilung bestimmt, sondern es

wurden auch die OPN-Protein-Spiegel bei LBD-Patienten und Kontrollen gemessen und auf eine Assoziation mit SNPs hin untersucht.

SNP -66 (G/T) liegt in der Promotorregion. Das Allel T geht mit einer gesteigerten Affinität des Transkriptionsfaktors Sp1 einher und ist mit einer gesteigerten Promotoraktivität assoziiert (Giacopelli, Marciano et al. 2004; Hummelshoj, Ryder et al. 2006). Ein Zusammenhang von SNP -66 mit Typ I Diabetes, einer Autoimmunerkrankung, wurde aktuell gezeigt (Marciano, D'Annunzio et al. 2009).

SNP 1239 (A/C) liegt in der 3'UTR (*untranslated region*, untranslatierter Bereich). Das Allel C stellt einen Risikofaktor für die Autoimmunerkrankung "Dianzani autoimmune / lymphoproliferative disease (DALD)", sowie für den Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) dar (Chiocchetti, Indelicato et al. 2004; D'Alfonso, Barizzone et al. 2005). Es konnte zusätzlich eine Assoziation des Allels 1239C mit erhöhten Serum-OPN-Spiegeln gezeigt werden (Chiocchetti, Indelicato et al. 2004; D'Alfonso, Barizzone et al. 2005).

Arbeiten zu OPN-Gen-Polymorphismen im Zusammenhang mit LBD liegen unseres Wissens derzeit nicht vor.

## 2. Fragestellung

1. Kann das Ergebnis einer früheren Untersuchung (Maetzler, Berg et al. 2007), das eine Erhöhung von OPN-Spiegeln in Liquor und Serum von Parkinson-Patienten zeigte, an einem anderen Kollektiv mit größerer Patientenzahl reproduziert werden, das auch Patienten mit DLB einschließt?
2. Sind die genotypischen Variationen der beiden SNPs -66 und 1239 mit dem Auftreten von LBD assoziiert?
3. Gibt es eine Assoziation zwischen den genotypischen Variationen der beiden erwähnten SNPs und der Höhe der OPN-Spiegel im Liquor und/oder Serum?

4. Korrelieren klinische (Hoehn&Yahr-Stadium, Demenz, Alter bei Erkrankungsbeginn, Erkrankungsdauer) und biochemische (Immunglobulin-G-Spiegel in Liquor und Serum) Parameter mit OPN-Spiegeln und sind sie mit den genotypischen Variationen der beiden SNPs assoziiert?

### **3. Patienten, Material und Methoden**

#### **3.1. Patienten und Kontrollen**

Patienten und Kontrollen wurden aus einer am Universitätsklinikum Tübingen geführten Liquor- und Serumbank rekrutiert. Erfüllten Personen die Einschlusskriterien, wurde in einer getrennt geführten DNA-Datenbank überprüft, ob DNA vorhanden war. Studienteilnehmer, bei denen DNA-Proben fehlten, wurden angerufen, über die Studie aufgeklärt und gefragt, ob sie bereit wären, an der Studie teilzunehmen. Abhängig von der Mobilität und dem Zustand der Probanden wurden jeweils 2 EDTA-Röhrchen Blut (2x9ml), entweder durch die behandelnden Hausärzte oder durch Mitarbeiter der neurologischen Klinik der Uniklinik Tübingen abgenommen. Den Hausärzten wurden die Röhrchen zusammen mit Aufklärungsbögen und frankierten Versandtaschen zugesandt. Somit konnten 24 zusätzliche Probanden in die Studie aufgenommen werden.

Bei der Zusammenstellung der Patienten- und Kontrollgruppe wurde darauf geachtet, dass sich beide Gruppen im Durchschnittsalter und der Geschlechterverteilung entsprachen. Das Mindestalter von Kontrollen und Patienten wurde auf 45 Jahre festgesetzt, da LBD Erkrankungen des höheren Lebensalters sind.

#### *Patienten*

Insgesamt erfüllten 58 Parkinson-Patienten die Einschlusskriterien. Darunter waren 43 Patienten mit Parkinson ohne Demenz (PDND), 6 Patienten mit Parkinson und Demenz (PDD) sowie 9 Patienten mit Lewy-Körperchen-Demenz

(DLB). Alle PDND- und PDD-Patienten erfüllten die klinischen Diagnosekriterien der britischen Parkinson's Disease Society Brain Bank (Litvan, Bhatia et al. 2003). Zusätzlich erfüllten PDD-Patienten die Diagnosekriterien für Demenz, des Diagnostischen und Statistischen Handbuchs Psychischer Störungen IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV, DSM-IV; Amerikanische Psychiatrische Vereinigung). DLB-Patienten erfüllten die überarbeiteten Kriterien für DLB. Patienten mit positiver Familienanamnese oder mit Verdacht auf atypisches Parkinsonsyndrom (Progressive supranukleäre Blickparese, Multisystematrophie) wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Alle Krankheiten, an deren Pathogenese OPN nach bestehender Literatur beteiligt ist, führten ebenfalls zum Ausschluss aus der Studie - insbesondere Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis und Systemischer Lupus erythematodes sowie Malignome und Traumata in den letzten 3 Monaten (Petrow, Hummel et al. 2000; Chiocchetti, Indelicato et al. 2004; Chiocchetti, Comi et al. 2005; D'Alfonso, Barizzone et al. 2005; Braitch, Nunan et al. 2008; Johnston, Gunasekharan et al. 2008).

Auch Patienten mit stark erhöhten Entzündungsparametern (CRP, BSG) und Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wurden aus der Studie ausgeschlossen.

### *Kontrollen*

Bei den Kontrollen durften keine Erkrankungen bestehen, die nach bestehender Literatur die Expression oder die Serumkonzentrationen von OPN beeinflussen können (Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis, Systemischer Lupus erythematodes, chronisch entzündliche Erkrankungen, Malignome und Traumata in den letzten 3 Monaten). Weiter wurden keine Kontrollen eingeschlossen, bei denen ein Verdacht auf primär degenerative, entzündliche oder maligne Erkrankungen des ZNS bestand.

Bei den Kontrollen wurden die Lumbalpunktionen aufgrund folgender Indikationen durchgeführt: 14 hatten Rückenschmerzen (lumbale Spinalkanalstenose oder lumbaler Bandscheibenvorfall), 10 hatten unspezifische Symptome die wahrscheinlich funktional bedingt waren

(Konzentrationsdefizite, Stimmungsschwankungen, Ausschluss von vaskulären Ereignissen), 3 hatten Kopfschmerzen und 3 hatten nicht-inflammatorische periphere Neuropathien.

### **3.2. Material**

#### **3.2.1. Chemikalien**

In dieser Arbeit wurden folgende Chemikalien verwendet:

Agarose	Seakem® von Lonza, USA
Ethidiumbromid	Merck, Deutschland
Formamid	Applied Biosystems, UK
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Promega, USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	IBL, Takasaki, Japan;
Tetra Methyl Benzidin (TMD)	IBL, Takasaki, Japan;

#### **3.2.2. Puffer und Lösungen**

Alle Lösungen wurden in doppelt destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) angesetzt.

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

Tris-base 108g (0,89M)

Borsäure 55g (0,89M)

Disodium EDTA dihydrate 7,44g (0,02M) (zuvor mit NaOH auf pH8,0 eingestellt)

Verwendete Konzentration im Laufpuffer und Agarosegel:

0,5xTBE = 44,5mM Tris, 44,5mM Borsäure, 1mM EDTA pH 8

##### Bromphenolblau-Puffer (Gel-Lade-Puffer):

50 % Glycerol

0,1% Bromphenolblau

0,1% Xylencyanol

##### SNaPshot:

100 bp DNA Größenstandard	MBI Fermentas, Deutschland
dNTPs	Promega, USA
PCR -Puffer	Qiagen, Deutschland
120 LIZ GeneScan Size Standard	Applied Biosystems, USA

ELISA:

EIA Puffer / Assay Puffer	IBL, Takasaki, Japan
Wasch-Puffer, konzentriert	IBL, Takasaki, Japan
Lösung für markierten Antikörper	IBL, Takasaki, Japan
Substrat Puffer	IBL, Takasaki, Japan
Peroxid Lösung (0,01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O)	IBL, Takasaki, Japan
OPN Standard	IBL, Takasaki, Japan

1% Agarosegel:

Agarose	2 g
0,5 x TBE	200 ml
Laufpuffer:	0,5 x TBE
Laufbedingungen:	0,75 - 1 h bei 100 V

**3.2.3. Enzyme, Antikörper und Kits**

Taq - Polymerase 5U/μl	Qiagen, Deutschland
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) 1U/μl	Promega, USA
EXO I (Exonuklease I) 20 U/μl	New England Biolab, USA
SNaPshot MIX (incl. ddNTPs)	Applied Biosystems, USA
Taq - Polymerase	Promega, USA
markierter Antikörper	IBL, Takasaki, Japan
Coating Antikörper*	IBL, Takasaki, Japan

\*(96 well Mikrotiterplatte mit polyklonalen IgG-Antikörpern,

die spezifisch humanes OPN binden)

#### **3.2.4. Oligonukleotide**

Die Oligonukleotidsynthese wurde von der Firma Metabion International AG, Martinsried durchgeführt. Die Sequenzen der Oligonukleotide und die RNA-Sequenzen des OPN-Gens sind im Anhang zu finden (Abb. 1, Tab. 1). Der SNaPshot Primer von SNP 1239 wurde zur besseren Differenzierung vom SNaPshot Primer des SNP -66 im Sequenzer, mit einem Poly-T Schwanz versehen.

### **3.3. Methoden**

#### **3.3.1 Probenentnahme**

Es wurden Proben verwendet die zuvor in einem Zeitraum von 2 Jahren folgendermaßen gewonnen und aufgearbeitet wurden: Liquor wurde durch Lumbalpunktion zwischen 3. und 4. oder 4. und 5. Lendenwirbelkörper gewonnen und in Polypropylen-Röhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation wurden die Proben bei -70 °C aufbewahrt. Die Liquor-Routinediagnostik (Leukozyten-Zahl, Albumin- und IgG-Spiegel) wurde im Labor der Abteilung für Neurologie durchgeführt. Für die Studie wurden nur Proben verwendet, die normale Liquor-Routineparameter aufwiesen [Leukozytenzahl  $<4 \cdot 10^6/l$ , IgG index (Liquor/Serum)  $<0.65$ , kein Hinweis für lokale IgG-Synthese). Leichte Blut-Hirn-Schrankenstörungen mit Liquor-Albumin-Spiegeln bis 450 mg/l wurden toleriert. Serum-Proben (für die Bestimmung der OPN-Spiegel und zur Ergänzung der Liquor-Routinediagnostik) wurden unmittelbar nach der Liquorentnahme durch Venenpunktion gewonnen, in Polypropylen-Röhrchen aufgefangen und nach Zentrifugation bei -70°C gelagert.

Blut für die DNA-Gewinnung wurde in den meisten Fällen zu einem späteren Zeitpunkt durch Venenpunktion gewonnen und in EDTA-Röhrchen gesammelt. Die DNA wurde am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung nach einem Routineverfahren extrahiert.

Alle Patienten und Kontrollen wurden über die Art der Studie aufgeklärt und willigten ein, dass die Proben für Forschungszwecke verwendet werden dürfen (informed consent, Ethikantrag 343/03, Medizinische Fakultät der Universität Tübingen).

### **3.3.2. Standardmethoden**

#### *3.3.2.1. Polymerasekettenreaktion*

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) ist eine Standardmethode zur *in vitro* Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes. Sie besteht aus der zyklischen Wiederholung von 3 Schritten. Der erste Schritt ist die Denaturierung, in der der DNA-Abschnitt durch eine Temperaturerhöhung auf 92-98 ° C in Einzelstränge aufgeteilt wird. Der zweite Schritt beinhaltet das spezifische Anlagern (engl.: *Annealing*- anlassen, glühen) von Primern (Oligonukleotiden in der Länge von 15-30 Basen) an die DNA Einzelstränge. Die Temperatur dieses Schrittes wird durch den Schmelzpunkt der Primer festgelegt. Die Primer werden im darauf folgenden Elongationsschritt in 3'Richtung komplementär durch eine DNA-abhängige Polymerase (Taq-DNA-Polymerase) verlängert. Dieser Schritt läuft bei 72 ° C ab. Dies ist die Temperatur, bei der die Taq-Polymerase ihr Aktivitätsoptimum zeigt. So entsteht ein DNA-Fragment, das in seiner Länge durch die beiden Primer definiert ist. Bei jeder PCR läuft eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) mit.

Die PCR wurde in dieser Arbeit zur Vorbereitung und zur Durchführung der SnapShot Reaktion verwendet. Hierfür wurde ein Thermocycler von der Firma MJ Research (Peltier Thermal Cycler, MJ – Research, MA, USA) und ein Thermocycler der Firma Applied Biosystems (2720 Thermocycler von Applied Biosystems, Ansatz und Programm) verwendet.

#### *3.3.2.2. Gelelektrophorese*

Mithilfe der Gelelektrophorese können Moleküle aufgrund ihrer Ladung in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Als Trägermatrix dient ein elektrisch neutrales Gel, das aus einem dreidimensionalen Molekülgitter besteht. Dieses erlaubt es den Teilchen, sich dort mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten hindurch zu bewegen. Diese sind vor allem von ihrer Größe, aber auch von der DNA-Konformation, der Gelkonzentration, der Zusammensetzung des Laufpuffers und der Spannungshöhe abhängig. Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen wandert die DNA zur Anode.

In dieser Arbeit wurde eine Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Trennfähigkeit hängt hier von der Gelkonzentration ab. Ein 1-2% Agarosegel eignet sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 2kb. Zur Herstellung wurden zunächst 2g Agarosepulver in 200 ml TBE Puffer aufgeköcht, mit Ethidiumbromid vermischt und anschließend in Plexiglasformen gegossen. Das Ethidiumbromid lagert sich später in die DNA ein und lässt sie im UV-Licht in Form von Banden sichtbar werden.

Mithilfe der Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit geprüft, ob die PCR die gewünschten DNA-Abschnitte ausreichend amplifiziert hat und keine Verunreinigungen vorliegen. Letzteres wurde durch die "Amplifikation" der Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) kontrolliert, welche bei Verunreinigungen mit DNA oder RNA ebenfalls Banden zeigt.

Jeweils 5 µl des PCR-Produktes wurden mit Gel B-Puffer vermischt und in die Probenaschen des Gels eingebracht. Dieser Puffer verhindert das Diffundieren der DNA aus dem Gel und bietet durch seine Blaufärbung einen Anhaltspunkt für die Wanderung der DNA im Gel. Gleichzeitig mit den Proben wurde ein Standardreagenz aufgetragen, welches Nukleotidketten in aufsteigender Größe (100bp Schritte) enthält und als Referenz zur Identifizierung der DNA-Abschnitte diente. Die Gelelektrophorese wurde je nach Gerät entweder bei 100 oder 200 Volt, über eine Dauer von ca. 45-60 min. laufen gelassen. Die Visualisierung und Dokumentation der DNA-Banden erfolgte mit einer digitalen Fotodokumentationsanlage.

### **3.3.3. Genotypisierung der SNPs mithilfe des SNaPshot Verfahrens**

Mithilfe des SNaPshot Verfahrens lassen sich die Allele von Einzelnukleotidpolymorphismen bestimmen. Das Kernstück dieser Methode ist eine PCR, bei der ein Primer (SNaPshot Primer) verlängert wird, der genau bis zum letzten Nukleotid vor dem SNP reicht und zu dessen Verlängerung Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) verwendet werden. DdNTPs unterscheiden sich von den in der Natur vorkommenden Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP), durch das Fehlen der 3'OH-Gruppe. 3' OH Gruppen sind die Grundlage für die Ausbildung von Phosphordiesterbrücken, welche die einzelnen Nukleotide in der DNA miteinander verbinden. Der Einbau von ddNTPs führt also zu einem Syntheseabbruch (Kettenabbruch nach Sanger). Zusätzlich sind die ddNTPs fluoreszenzmarkiert, d.h. jedem der vier in der DNA vorkommenden Nukleotide ist eine Farbe zugeordnet (Adenin = grün, Cytosin = schwarz, Guanin = blau, Thymin = rot).

Das fertige Produkt besteht aus Primern, die jeweils um ein ddNTP verlängert sind. Diese werden aufgereinigt und anschließend durch eine Denaturierung mit Formamid für den Sequenzer vorbereitet.

Im Sequenzer (ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyser, Applied Biosystems) werden die Fragmente mittels Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und die farbig markierten Nukleotide von einem Laser identifiziert.

#### *3.3.3.1. Vorgehen*

Das SNaPshot Verfahren besteht aus fünf Einzelschritten (A.-E.) deren Durchführung im Folgenden beschrieben wird.

##### **A. PCR**

Im ersten Schritt wurden die beiden DNA Abschnitte, die die SNPs (-66, 1239) enthielten, mittels PCR amplifiziert.

Die DNA wurde zunächst auf 10 ng/µl verdünnt. Für jeden SNP (-66, 1239) wurde dann eine PCR angesetzt. Hierfür wurden die Primer „-66 f/r“ und „1239

f/r“ verwendet. Die Syntheseprodukte, waren Polynukleotide mit einer Länge von 248 (Primer -66) bzw. 308 (Primer 1239) Basenpaaren, die jeweils einen SNP enthielten.

PCR Ansatz (SNP -66):

2µl DNA

4 µl Puffer

0,4 µl dNTP

0,4 µl Primer -66 forward bzw. 0,4 µl Primer 1239 forward

0,4 µl Primer -66 reverse bzw. 0,4 µl Primer 1239 reverse

0,1 µl Taq Polymerase

1,2 µl MgCl<sub>2</sub>

1,5 µl H<sub>2</sub>O

---

= 20 µl pro Well

PCR Protokoll:

1. incubate at 94°C for 5 min.
2. incubate at 94°C for 0:30 sec
3. incubate at 60°C for 0:30 sec
4. incubate at 72°C for 0:30 sec
5. cycle to step 2 for 34 more times
6. incubate at 72°C for 10:00 min  
incubate at 12°C forever

Das PCR Produkt wurde dann bei 4°C gelagert.

B. Purifikation

Nach diesem Schritt befand sich das PCR Produkt in Lösung mit dNTPs, Primern, Enzymen und Puffern, also Bestandteilen, die bei der eigentlichen SNaPshot Reaktion nicht mehr benötigt wurden und im Gegenteil sogar mit ihr hätten interagieren können. Daher musste das PCR Produkt im zweiten Schritt durch Zugabe von 3U Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP 1U/µl) und 2 U Exonuclease I (EXO 1) pro Probe gereinigt werden (engl.: purification). Um eine Aktivität von 2 U /µl zu erhalten musste die EXO I 1:10 verdünnt werden. Für diese Reaktion wurden die PCR Produkte beider SNPs (-66, 1239) zusammen in einen gemeinsamen Ansatz gebracht.

Purification – Ansatz:

- 8 µl PCR Produkt SNP1239\*
- 7 µl PCR Produkt SNP -66\*
- 3 µl SAP (1U/µl)
- 2 µl EXO I (2U/µl)

---

= 20 µl pro Well

\*SNP -66 hatte in der Agarosegelelektrophorese wesentlich stärkere Banden als SNP 1239, es lag hier also mehr Produkt vor, sodass das Mischungsverhältnis in der weiterführenden Analyse etwas zugunsten von SNP 1239 verschoben wurde.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler, in dem der Ansatz bei 37°C für 1 h inkubiert wurde und dann die Enzyme bei 75°C für 15 min. deaktiviert wurden. Der gereinigte Ansatz wurde bei 4°C (<24 h) gelagert.

### C. SNaPshot Reaktion

Im dritten Schritt erfolgte die eigentliche SNaPshot Reaktion. Die gereinigten PCR-Produkte wurden nun zusammen mit einem speziellen SNaPshot Mix (Applied Biosystems), der ddNTPs, Taq-Polymerase und Puffer enthält, den SNaPshot Primern (für SNP -66 und 1239 je ein forward Primer) und H<sub>2</sub>O in

einen Ansatz gebracht. Die Reaktion fand nach unten stehendem Protokoll wieder in einem Thermocycler (Peltier Thermal Cycler, MJ – Research; 2720 Thermocycler, Applied Biosystems) statt.

#### SNaPshot - Ansatz

- 2µl SNaPshot Mix (ddNTPs, Taq-Polymerase, Puffer)
- 1µl SNaPshot Primer -66 f
- 1µl SNaPshot Primer 1239 f
- 3 µl PCR-Produkt (SNP -66 u. SNP 1239 enthaltende DNA-Abschnitte)
- 3 µl H<sub>2</sub>O dd

---

= 10 µl pro Well

#### PCR Protokoll:

- 1.rapid thermal ramp to 96°C
- 2.incubate at 96°C for 10 sec
- 3.rapid thermal ramp to 50°C
- 4.incubate at 50°C for 5 sec
- 5.rapid thermal ramp to 60°C
- 6.Incubate at 60°C for 30 sec.
- 7.repeat 24 more times

Produkt dieses Schrittes waren Primer, die jeweils mit dem ddNTP verlängert waren, das der Base im jeweiligen SNP entsprach.(s.a. 3.3.2).

#### D. Post Extension Treatment

Um zu verhindern, dass die nicht verwendeten ddNTPs, die sich noch in der Produktlösung befanden, bei der Kapillarelektrophorese zusammen mit den verlängerten Primern wandern, wurde jede Probe im Thermocycler (Peltier Thermal Cycler, MJ – Research; 2720 Thermocycler, Applied Biosystems) für 1

h bei 37°C mit 1U SAP inkubiert. Die Phosphatase entfernt die 5'Phosphorylgruppen der nicht eingebauten ddNTPs und verändert dadurch deren Wanderungsverhalten. Anschließend wurde das Enzym bei 75°C für 15 min deaktiviert und die Proben danach bei 4°C (< 24 h ) gelagert.

#### E. Elektrophorese im 3100 Avant Genetic Analyser (ABI)

Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurde jeweils 1 µl des o.g. Produkts mit 10 µl hoch deionisiertem Formamid ("Hi-Di Formamide;" Hi = *highly*- hoch; Di = *deionized*-deionisiert) denaturiert und zusammen mit 0,2 µl "GeneScan-120 LIZ" Größenstandard in eine zur Sequenzierung geeignete 96 Well Platte gebracht. Die Proben wurden im 3100 Avant Genetic Analyser (ABI) analysiert. Die Daten wurden mithilfe der Gene Mapper v3.5 Software analysiert und die Genotypen manuell der entsprechenden Farbkodierung zugeordnet.

Bei 20 Proben war das Signal des SNP 1239 so schwach das es nicht eindeutig vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden war. Um das Signal zu verstärken wurden diese Proben zunächst noch einmal unter höherer Spannung laufen gelassen. Da auch die Spannungserhöhung nicht effektiv war, wurde die PCR mit 40 Zyklen wiederholt, was schließlich zum Erfolg führte.

Um Kontaminationen oder unerwünschte Interaktionen auszuschließen, wurden mit den Proben Negativkontrollen gemessen.

#### **3.3.4. Messung der OPN-Konzentrationen in Liquor und Serum**

Der "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) ist ein gängiges immunologisches Verfahren zur Messung von Konzentrationen bestimmter Substanzen, z.B. OPN, in Körperflüssigkeiten. In dieser Arbeit wurden die OPN-Spiegel in Liquor und Serum von allen Patienten und Kontrollen mit einem Sandwich-ELISA gemessen. Die Methode verwendet zwei Antikörper, die beide gegen das gesuchte Molekül gerichtet sind, aber, um sich nicht gegenseitig zu behindern, an unterschiedlichen Stellen binden. Die sogenannten "Coating-Antikörper" (engl.: *coating* - Beschichtung, Überzug) sind in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte fixiert. Das Probenmaterial wird in die Vertiefungen pipettiert und das darin enthaltene OPN von den Antikörpern gebunden. Nach

mehreren Waschvorgängen, bei denen Probenmaterial und überschüssiges, ungebundenes OPN ausgewaschen wird, werden die Detektions-Antikörper ("Labeled Antibody") hinzugegeben. Diese sind an ein Enzym gekoppelt, in diesem Fall eine Horseradish Peroxidase (HRP), das einen später zugegebenen Farbstoff aktiviert. Durch erneutes Waschen werden alle ungebundenen Detektions-Antikörper entfernt und im nächsten Schritt Tetra Methyl Benzidin (TMD) als Farbstoff hinzu gegeben. Während einer dreißig-minütigen Inkubation wird dieser Farbstoff durch die HRP der markierten Antikörper aktiviert und färbt die Lösung blau. Anschließend wird die Reaktion mit einer schwefelsauren Lösung gestoppt (Stop solution H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, IBL). Es resultiert nun eine Gelbfärbung, deren, mit einem Photometer bei 450 nm gemessene Stärke, der Konzentration von OPN im Probenmaterial entspricht.

#### *3.3.4.1. Vorgehen*

Die Verdünnungsverhältnisse für die Liquor- und Serumproben wurden der Literatur entnommen (Maetzler, Berg et al. 2007) und im Verlauf der Messungen an die in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Kits angepasst. Liquor wurde in einem Verhältnis von 1:100 (1µl Liquor : 99µl Puffer) und Serum in einem Verhältnis von 1:15 (6,7µl Serum : 93,3µl Puffer) verdünnt. Es wurden dafür die in den Kits mitgelieferten Puffer von IBL verwendet.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits benutzen polyklonale "Coating-Antikörper" und monoklonale Detektions-Antikörper mit den gleichen Sequenzen und Bindungsstellen. Der "Coating-Antikörper" bindet am N-terminalen Ende von OPN (die mRNA-Sequenz von OPN befindet sich im Anhang), der Detektions-Antikörper hinter der Thrombin Spaltungsstelle (thrombin-cleavage site), beide Kits detektieren also nur ungespaltenes OPN.

Bei der Durchführung der ELISAs wurde nach den zugehörigen Protokollen verfahren

(IBL:[www.ibl-japan.co.jp/en/goods/newitem.php?uri=products03/3954.html](http://www.ibl-japan.co.jp/en/goods/newitem.php?uri=products03/3954.html)).

Um Fehlern vorzubeugen wurden je Probe zwei Messungen durchgeführt und dann die mittlere Konzentration errechnet. Lagen bei einer Probe zwei Werte um mehr als 30% auseinander, wurde diese 1x erneut gemessen und die

mittlere Konzentration aus den zwei näher beieinander liegenden der drei Werte errechnet.

Jede Messung enthielt jeweils zwei Verdünnungsreihen (5;10;20;40;80;160;320 ng/ml) eines rekombinanten OPN-Standards (Recombinant Human OPN, IBL), sowie zwei Negativkontrollen. Aus den Absorptionswerten dieser Verdünnungsreihen wurde eine Standardkurve erstellt. Mit dieser konnten aus den Absorptionswerten der Proben die entsprechenden OPN-Konzentrationen errechnet werden.

Als Negativkontrolle wurden 100µl Assay Puffer (EIA Buffer, IBL) und 100µl Assay Puffer + Detektions-Antikörper aufgetragen. Es zeigte sich, dass der Einsatz des Detektions-Antikörpers (ohne Substrat) in der Negativkontrolle die Absorption in den Bereich von Proben mit 2.5 bis 5 ng/ml anheb und damit deutlich über der der Negativkontrolle mit 100µl Assay Puffer lag. Aus diesem Grund wurde die Detektionsschwelle unserer Tests bei 5 ng/ml festgelegt. Allen Proben, deren Absorption unter dieser Schwelle lag, wurde der Wert 2,5ng/ml zugeordnet.

Die Messung und Auswertung der Absorptionswerte erfolgte mit einem Photometer von BioRad (Microplate Reader Model 680, BioRad) und der Software Microplate Manager 5.2.

### **3.3.5. Statistische Auswertung**

Mithilfe der statistischen Auswertung lässt sich die Frage klären, ob die in einer Arbeit aufgestellten Hypothesen (Alternativhypothesen) angenommen werden können. Der Alternativhypothese wird stets eine Nullhypothese gegenübergestellt. Diese nimmt an, dass zwischen den untersuchten Variablen, z.B. den OPN-Konzentrationen bei Parkinson-Patienten und Kontrollen, kein signifikanter Unterschied besteht. Alternativhypothesen wurden in der vorliegenden Arbeit angenommen, wenn der  $\alpha$ -Fehler kleiner als 5% war. D.h., wenn die Wahrscheinlichkeit, dass die Alternativhypothese bei wahrer Nullhypothese fälschlicherweise angenommen wird, kleiner 5 % ist. Das Signifikanzniveau wurde also auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm JMP (SAS Institute Inc, Copyright © 1989 - 2000, Version 4.0.0), dem Programm MedCalc® (Copyright Frank Schoonjans; [www.medcalc.be](http://www.medcalc.be), Version 9.6.4.0.), sowie einem Online-Statistikprogramm des Institutes für Humangenetik der Technischen Universität München ([www.ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl](http://www.ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl)).

Da die metrischen Daten in der vorliegenden Arbeit nicht normalverteilt waren, wurden zu deren Auswertung nonparametrische Testverfahren verwendet. Als Kenngrößen werden daher Mediane und Spannweiten (in Boxplot-Darstellungen zusätzlich Quartile) angegeben.

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman wurde verwendet, um metrische Daten (z. B. OPN und IgG in Liquor und Serum, Alter, Erkrankungsdauer, Alter bei Erkrankungsbeginn) auf Korrelationen hin zu untersuchen.

Für den Vergleich von metrischen Daten zwischen 2 Kategorien wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet (z. B. Erkrankung ja/nein, Geschlecht, Demenz ja/nein, SNP Allel). Wenn es sich um mehr als zwei Kategorien handelte (z. B. SNP Genotyp), wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet, die Post-hoc-Analyse erfolgte dann mit dem Wilcoxon-Test.

Für den Vergleich von kategorialen Daten untereinander (z.B. SNP Genotyp/Allel, Erkrankung ja/nein, Demenz ja/nein) wurden Kontingenztafeln erstellt. Der Fisher's Exact Test (2x2 Tafeln, z. B. Berechnung des Hardy-Weinberg Equilibriums für die SNP) und der Chi-Quadrat-Test nach Pearson (>2x2 Tafeln, z. B. für H&Y-Stadien) wurden für die Berechnung der Signifikanz verwendet. Quotenverhältnisse (Odds ratios) wurden mittels des Programms MedCalc® berechnet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Epidemiologische Daten**

Es konnten 58 Patienten und 30 Kontrollen in die Studie eingeschlossen werden. Von den 58 aus der Liquordatenbank ausgewählten Patienten, waren bei einem die Liquor- und Serumproben und bei einem weiteren ebenfalls die Serumproben in einer für die Untersuchung nicht mehr ausreichenden Menge vorhanden. Bei zwei Kontrollen waren jeweils die Serumproben in einer nicht mehr ausreichenden Menge vorhanden. In den beschriebenen Fällen war es nicht mehr möglich die Proben zu beschaffen, da die Studienteilnehmer entweder verstorben oder unter den gespeicherten Kontaktdaten nicht mehr erreichbar waren. Zwischen beiden Gruppen gab es bezüglich der Alters- und Geschlechterverteilung keine signifikanten Unterschiede. Im Patientenkollektiv war das Verhältnis von Männern zu Frauen 2.1:1, in der Kontrollgruppe 1.3:1 ( $p=0.36$ ). Innerhalb beider Gruppen gab es ein breites Altersspektrum, aber es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0.71$ ). Das Alter bei Erkrankung (Age of onset) lag im Median bei 62,5 Jahren. Eine Zusammenfassung der für diese Arbeit relevanten epidemiologischen Daten findet sich in Tabelle 2 (Anhang).

### **4.2. OPN-Spiegel und klinisch-/biografische Parameter**

#### **4.2.1. OPN-Spiegel in der Gesamtgruppe**

Liquor- und Serum-OPN-Spiegel waren nicht normalverteilt. Liquor-OPN-Spiegel (Median: 6261 ng/ml, Spannweite: 125-25405) waren gegenüber Serum-OPN-Spiegeln (588 ng/ml, 36.5-3520.8,  $p<0.0001$ ; Abb. 1) mehr als 10-fach erhöht. Liquor- und Serum-Spiegel korrelierten nicht miteinander (Abb. 2). Zur besseren Übersichtlichkeit wurden logarithmische Darstellungen gewählt.

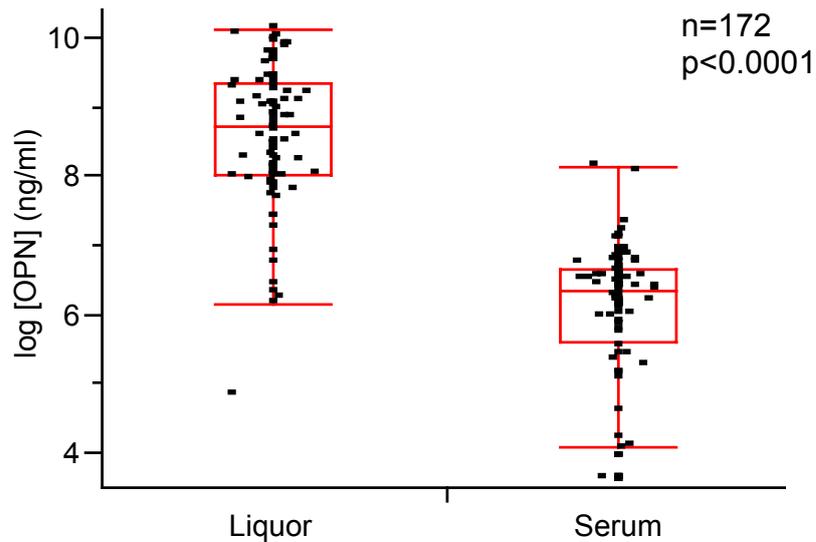


Abb. 1. OPN-Spiegel in Liquor und Serum der Gesamtgruppe (logarithmische Darstellung). Box- Plot: Median, oberes/unteres Quartil (=Box), Spannweite (=Fühler) und Ausreißer. Der P-Wert wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

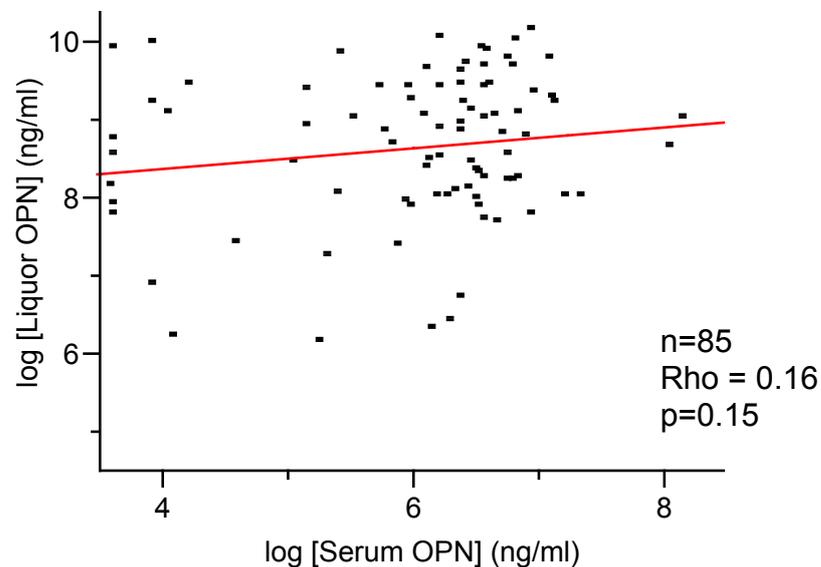


Abb. 2. Logarithmische Darstellung des Verhältnisses von Liquor- und Serum-OPN-Spiegeln in der Gesamtgruppe. Liquor und Serum-Spiegel korrelierten nicht signifikant. Der P-Wert wurde mit dem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ermittelt.

#### 4.2.2. OPN-Spiegel im Zusammenhang mit den biografischen Parametern Alter und Geschlecht

##### *Liquor-OPN-Spiegel*

Eine Korrelation von OPN-Spiegeln mit dem Alter zeigte sich nicht (Tab. 3). Auch zeigte sich keine Assoziation der Liquor-OPN-Spiegel mit dem Geschlecht (Tab. 4).

##### *Serum-OPN-Spiegel*

In der Patientengruppe korrelierten Serum-OPN-Spiegel mit dem Alter ( $Rho = 0.27$ ,  $p=0.031$ ; Tab. 3), nicht jedoch in der Gesamtgruppe ( $Rho = 0.18$ ,  $p=0.10$ ). In der Gesamt- und der Patientengruppe waren Serum-OPN-Spiegel bei Männern gegenüber Frauen erhöht (Abb. 3, Tab. 4).

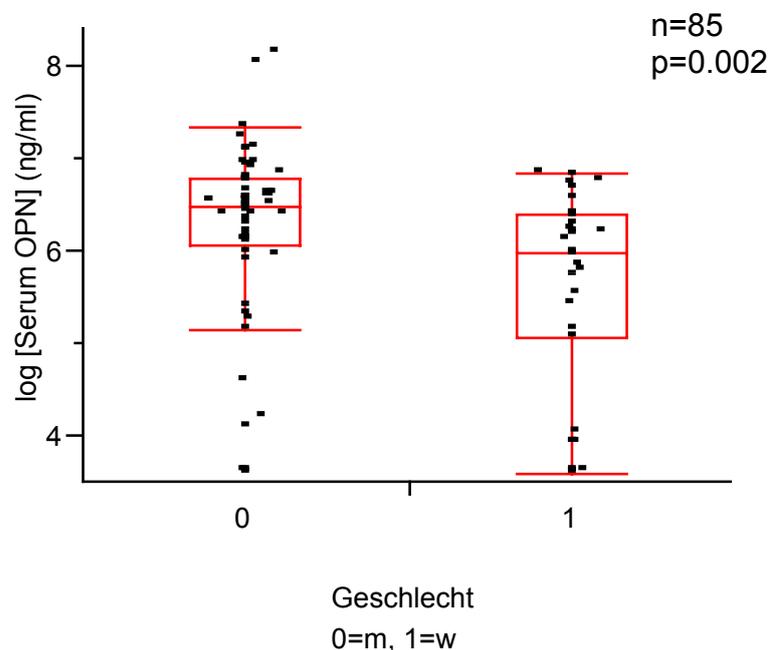


Abb. 3. Logarithmische Darstellung der Serum-OPN-Spiegel in Abhängigkeit vom Geschlecht in der Gesamtgruppe. Der P-Wert wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet. m, männlich; w, weiblich.

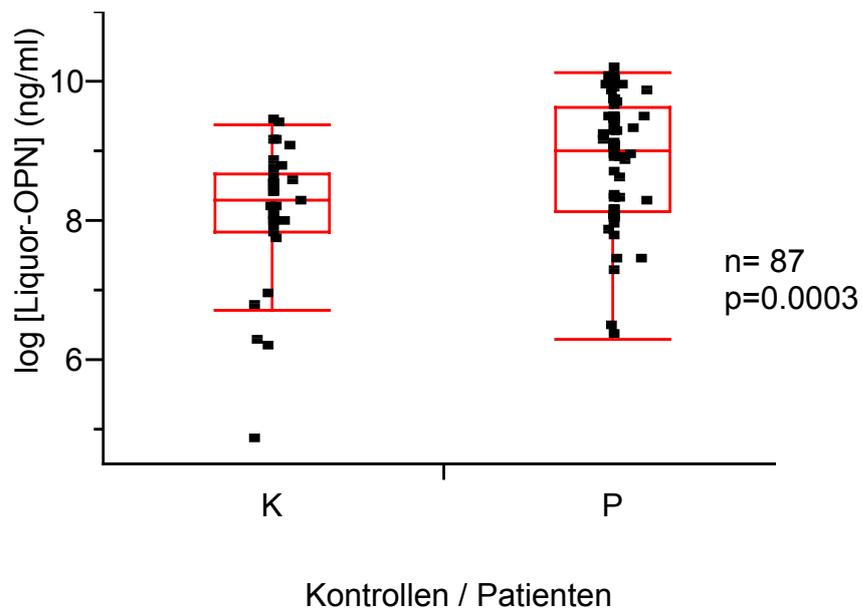
### 4.2.3. OPN-Spiegel: Kontrollen versus Patienten

#### *OPN-Spiegel im Liquor*

Liquor-OPN-Spiegel lagen bei Patienten signifikant über den Spiegeln von Kontrollen (Abb. 4, Tab. 2).

#### *OPN-Spiegel im Serum*

Die Serum-OPN-Spiegel waren in der Patientengruppe ebenfalls signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abb. 4, Tab 2).



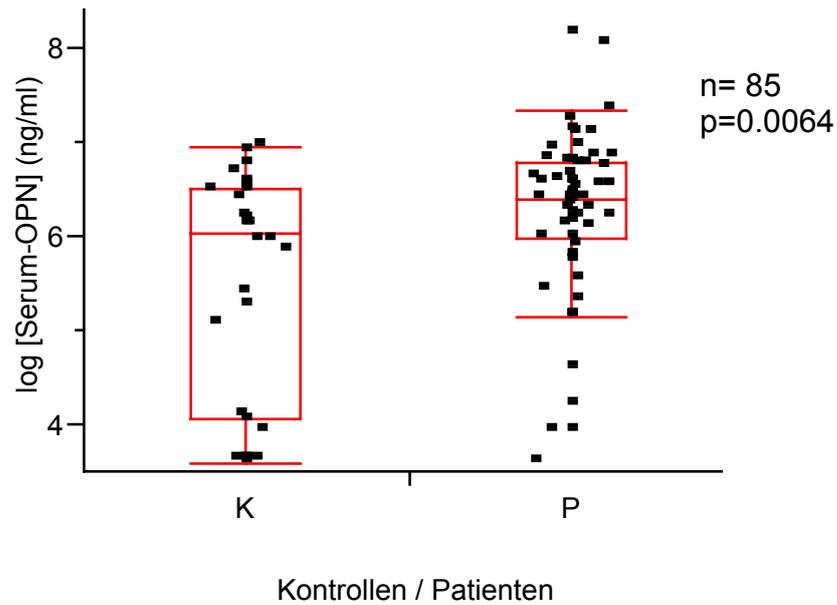


Abb. 4. Logarithmische Darstellung der OPN-Spiegel in Liquor und Serum von Kontrollen und Patienten. P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

#### 4.2.4. OPN-Spiegel innerhalb der Patienten-Gruppe

##### *OPN-Spiegel im Liquor*

Liquor-OPN-Spiegel korrelierten in der Patienten-Gruppe positiv mit der Erkrankungsdauer (Abb. 5, Tab. 3). Ein Zusammenhang zwischen dem Alter bei Erkrankungsbeginn, den Erkrankungsstadien nach Hoehn & Yahr und Liquor-OPN-Spiegel zeigte sich nicht (Tab. 3). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Liquor-OPN-Spiegeln von Patienten ohne Demenz und denen von Patienten mit Demenz ( $p=1.0$ ; Tab. 2).

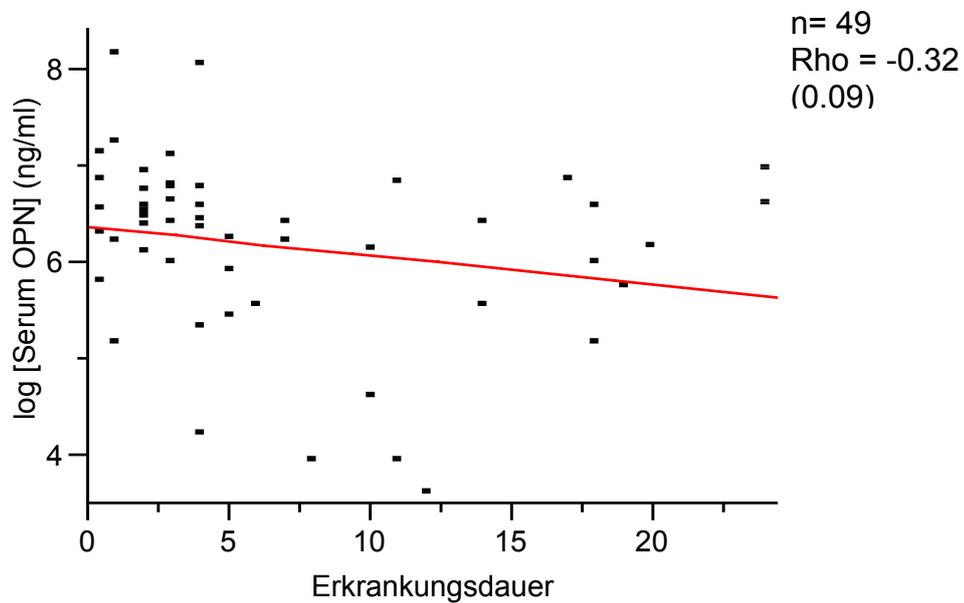
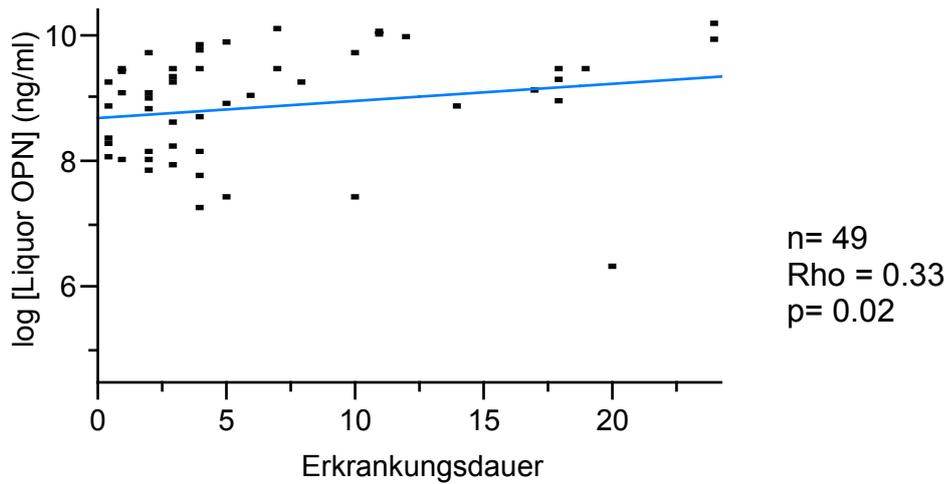


Abb. 5. Logarithmische Darstellung der OPN-Spiegel im Zusammenhang mit der Erkrankungsdauer. Liquor-OPN-Spiegel korrelierten positiv und Serum-OPN-Spiegel negativ mit der Erkrankungsdauer, wobei letztere Korrelation stark von der Co-Variablen „Alter“ beeinflusst wurde (Rho adjustiert auf Alter = 0.09). Der P-Wert wurde mit dem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ermittelt.

### *OPN-Spiegel im Serum*

Serum-OPN-Spiegel korrelierten signifikant mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn ( $Rho = 0.36$ ,  $p=0.01$ ; Age of onset, Tab. 3). Diese Korrelation war jedoch stark durch die Co-Variable „Alter“ beeinflusst ( $Rho$  adjustiert auf Alter: 0.12).

Serum-OPN-Spiegel korrelierten negativ mit der Erkrankungsdauer (Abb. 5, Tab. 3). Diese Korrelation war ebenfalls stark durch das Alter beeinflusst ( $Rho$  adjustiert auf Alter: 0.09 ) Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Serum-OPN-Spiegeln bei Patienten mit Demenz gegenüber Patienten ohne Demenz ( $p=0.009$ ; s. Tab. 2). Ein Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsstadium nach Hoehn & Yahr und Serum-OPN-Spiegeln zeigte sich nicht.

## **4.3. Polymorphismen im OPN-Gen**

### **4.3.1. Polymorphismen im OPN-Gen: Assoziation mit dem Erkrankungsrisiko**

#### *4.3.1.1. SNP -66 (T/G)*

SNP -66 lag in der Patienten- und der Kontrollgruppe im Hardy-Weinberg-Equilibrium.

Das T-Allel kam bei LBD-Patienten signifikant häufiger vor als bei Kontrollen (Abb. 6, Tab. 5). Träger des T-Allels wiesen eine Odds-ratio von 2.1 auf ( 95% CI= 1.03 - 4.1366,  $p=0.041$ , Tab. 6). Genotyp TT kam bei Patienten mit einer tendenziell höheren Frequenz vor als bei Kontrollen (Tab. 5). Träger des Genotyps TT wiesen eine Odds-ratio von 2.6 auf (95% CI =1.0684 - 6.5376,  $p=0.036$ ; Tab. 6).

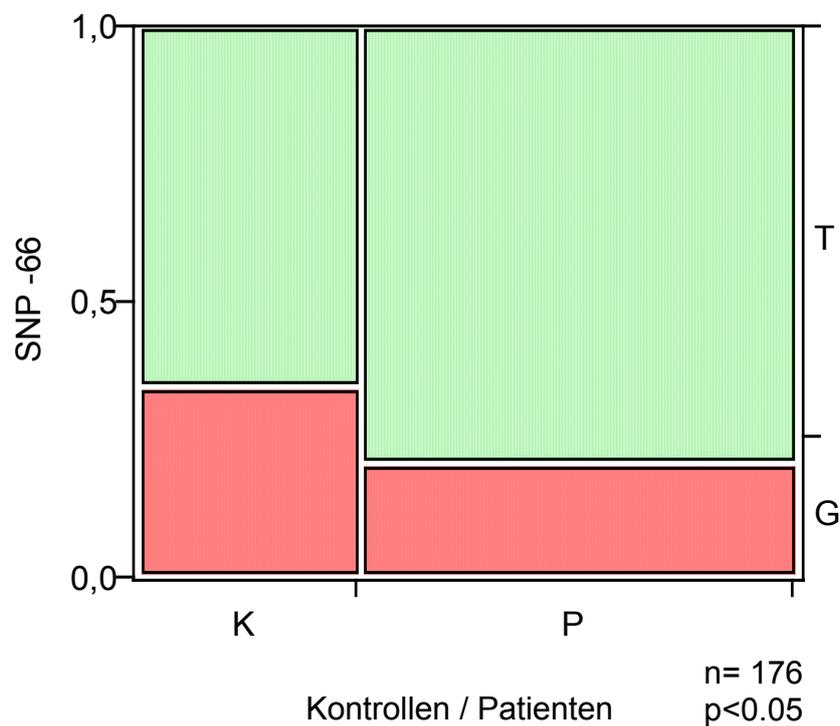


Abb. 6. Allelfrequenz von SNP-66 bei Kontrollen und LBD-Patienten. P-Werte wurden mit Fisher's Exact Test berechnet.

#### 4.3.1.2. SNP 1239 (A/C)

SNP 1239 lag in der Patienten und der Kontrollgruppe im Hardy-Weinberg-Equilibrium. Zwischen Patienten und Kontrollen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Allelfrequenz oder der Genotypenverteilung der varianten Allele (Tab. 5 und 6).

### 4.3.2. Polymorphismen im OPN-Gen in der Patientengruppe

#### 4.3.2.1. SNP -66 (T/G)

Allel T kam bei Patienten mit niedrigeren H&Y-Stadien ( $\leq 2$ ; T/G : 52/6) mit einer signifikant höheren Frequenz vor als bei Patienten mit fortgeschrittenen Stadien (T/G: 31/17,  $p=0.002$ ). Auch waren Patienten mit niedrigen H&Y-Stadien (TT/GT/GG: 23/6/0) signifikant häufiger homozygot für das Allel T als Patienten mit fortgeschrittenen Stadien (TT/GT/GG: 10/11/3,  $p=0.01$ , Tab. 7). SNP -66 war

nicht mit der Erkrankungsdauer und dem Alter bei Erkrankungsbeginn assoziiert (Tab. 7). Es bestand keine Assoziation zwischen den beiden varianten Allelen von SNP-66 und dem Auftreten von Demenz (Tab. 7).

#### 4.3.2.2. SNP 1239 (A/C)

SNP 1239 war mit keinem der hier untersuchten klinischen Parameter assoziiert (H&Y-Stadien, Demenz, Erkrankungsdauer, Alter bei Erkrankungsbeginn, Tab. 8).

### 4.4. Assoziation von SNP-66 und SNP 1239 mit OPN-Spiegeln im Liquor und Serum

#### 4.4.1. SNP -66 (T/G)

##### *OPN-Spiegel im Liquor*

Homozygote Träger des G-Allels hatten in der Patienten-Gruppe tendenziell höhere Liquor-OPN-Spiegel ( $p=0.07$ ; Tab. 9). In der Gesamtgruppe zeigte sich dieser Zusammenhang nicht.

##### *OPN-Spiegel im Serum*

Es zeigte sich keine Assoziation der varianten Allele von SNP-66 mit Serum-OPN-Spiegeln (Tab. 9).

#### 4.4.2. SNP 1239 (A/C)

##### *OPN-Spiegel im Liquor*

Es zeigte sich keine Assoziation der varianten Allele von SNP1239 mit Liquor-OPN-Spiegeln (Tab. 10)

##### *OPN-Spiegel im Serum*

Es zeigte sich keine Assoziation der varianten Allele von SNP1239 mit Serum-OPN-Spiegeln (Tab. 10)

## 4.5. Assoziation von SNP-66 und SNP 1239 mit IgG-Spiegeln

### 4.5.1. SNP -66 (T/G)

#### *IgG-Spiegel im Liquor*

Patienten mit dem Genotypen TT hatten signifikant erhöhte Liquor-IgG-Spiegel ( $p=0.032$ ; Tab. 11). In der Gesamtgruppe zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der Liquor-IgG-Spiegel bei Studienteilnehmern mit dem Genotypen TT ( $p=0.061$ ).

Träger des T-Allels hatten gegenüber Trägern des G-Allels in der Gesamtgruppe ( $p=0.021$ ) und in der Patientengruppe ( $p=0.019$ ) signifikant erhöhte Liquor-IgG-Spiegel (Abb. 7, Tab. 11).

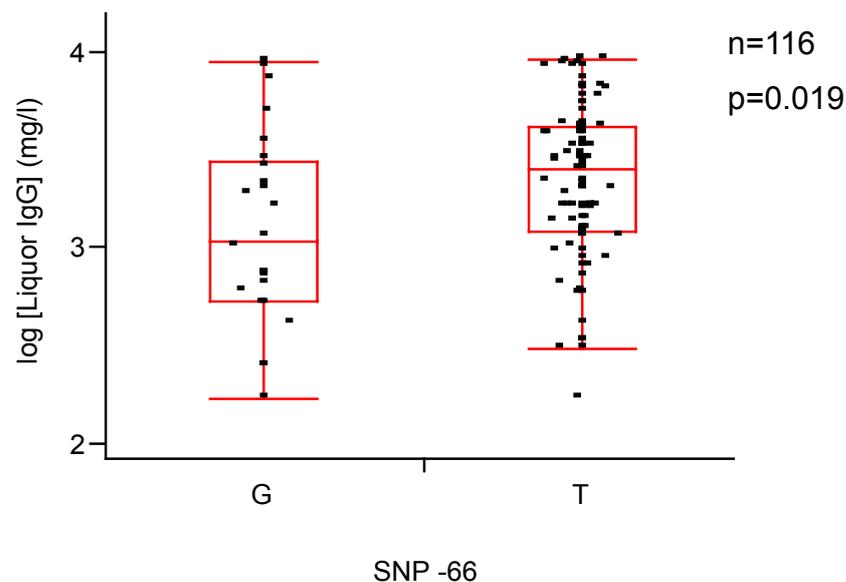


Abb. 7. Logarithmische Darstellung der Liquor-IgG-Spiegel bei Trägern des G bzw. des T-Allels von SNP-66 in der Patientengruppe. Der P-Wert wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

### *IgG-Spiegel im Serum*

In der Gesamtgruppe war das Allel T signifikant ( $p=0.023$ ), und der Genotyp TT tendenziell ( $p=0.065$ ) mit erhöhten Serum-IgG-Spiegeln assoziiert (Abb. 8, Tab. 11).

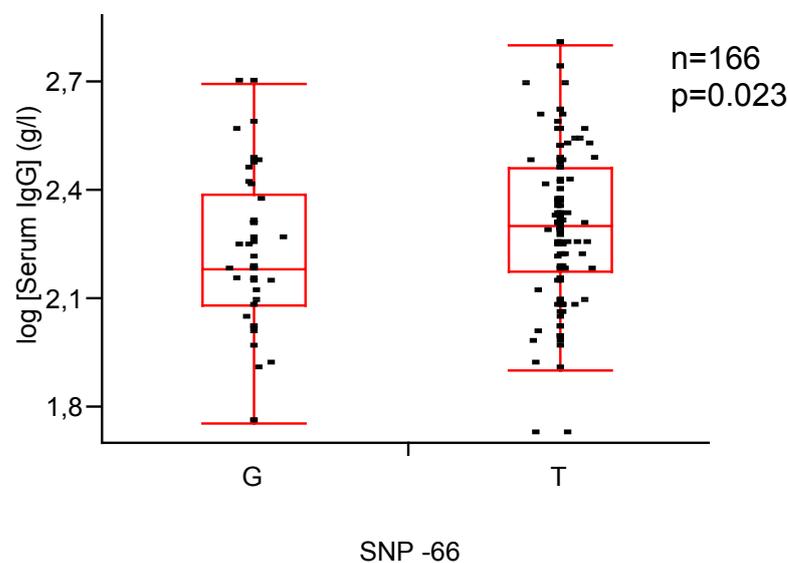


Abb. 8. Logarithmische Darstellung der Serum-IgG-Spiegel bei Trägern des G- bzw. T-Allels in der Gesamtgruppe. Der P-Wert wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

### **4.5.2. SNP 1239 (A/C)**

#### *IgG-Spiegel im Liquor*

Es zeigte sich kein statistischer Zusammenhang zwischen Liquor-IgG-Spiegeln und den varianten Allelen des SNP 1239 (Tab. 12).

#### *IgG-Spiegel im Serum*

Es zeigte sich keine Assoziation der varianten Allele des SNP 1239 mit Serum IgG-Spiegeln (Tab. 12).

#### **4.6. IgG-Spiegel und OPN-Spiegel**

##### *Liquor-OPN- und IgG-Spiegel*

Liquor-OPN- und Liquor-IgG-Spiegel korrelierten nicht miteinander (Rho = -0.15; p=0.18)

##### *Serum-OPN- und IgG-Spiegel*

Serum-OPN und Serum-IgG-Spiegel korrelierten nicht miteinander (Rho = 0.01; p=0.95).

## **5. Diskussion**

### **5.1. Zielsetzung der Arbeit**

Nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand spielt das mit einer Vielzahl von Erkrankungen im Zusammenhang stehende OPN auch bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle. So zeigen aktuelle Studien, dass OPN-Spiegel in Liquor und Serum von LBD-Patienten erhöht sind und dass OPN in der menschlichen SN als Bestandteil von Lewy-Körperchen nachgewiesen werden kann (Maetzler, Berg et al. 2007; Burdo, Ellis et al. 2008). Die Frage welche Eigenschaften von OPN bei LBD eher zum Tragen kommen, neurodegenerative mit OPN in der Rolle des Verursachers, neuroprotektive mit OPN in der Rolle des Schadensbegrenzers, oder eventuell beide, mit wechselndem Gewicht im Verlauf der Erkrankung, kann zur Zeit nicht beantwortet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Erhöhung von OPN-Spiegeln an einem von der ersten Untersuchung unabhängigen Kollektiv (Maetzler, Berg et al. 2007), mit dem zusätzlichen Einschluss von DLB Patienten, nachgewiesen werden kann.

Um die Rolle von OPN bei LBD besser verstehen zu können, wurde darüber hinaus untersucht ob die genetischen Variationen von SNP -66 und 1239 im OPN-Gen mit dem Auftreten von LBD und OPN-Spiegeln assoziiert sind.

Zusätzlich wurde getestet, ob klinische Parameter (Hoehn&Yahr-Stadium, Demenz, Alter bei Erkrankungsbeginn, Erkrankungsdauer) und biochemische Parameter (Immunglobulin-G-Spiegel in Liquor und Serum) mit OPN-Spiegeln korrelieren und ob sie mit den genotypischen Variationen der beiden SNPs assoziiert sind.

Eine Erhöhung von OPN-Spiegeln bei LBD-Patienten konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Zusätzlich zeigte sich eine Assoziation des T-Allels von SNP -66 mit dem Erkrankungsrisiko für LBD. SNP -66 war jedoch nicht mit der Höhe der OPN-Spiegel assoziiert. Des weiteren zeigten sich Assoziationen von OPN-Spiegeln mit verschiedenen klinisch-biografischen

Parametern. SNP -66 war zudem mit der Höhe der IgG-Spiegel in Serum und Liquor assoziiert.

Im folgenden werden diese Ergebnisse diskutiert und in Zusammenhang mit den gängigen Theorien zur Pathogenese von LBD gestellt. Detailliert wird auch die mögliche Bedeutung des Zusammenhangs von SNP -66 im OPN-Gen und den IgG-Spiegeln diskutiert.

## **5.2. OPN-Spiegel und klinisch-biografische Parameter**

### **5.2.1. OPN-Spiegel sind bei LBD-Patienten signifikant erhöht**

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung von OPN-Spiegeln in Liquor und Serum von Patienten mit LBD in einer von der ersten Untersuchung unabhängigen Gruppe bestätigt werden. Im Zusammenhang mit den proinflammatorischen Eigenschaften von OPN und der Hypothese, dass Neuroinflammation ein pathogenetischer Faktor bei LBD ist, könnten erhöhte OPN-Spiegel zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion führen und so einen Risikofaktor für LBD darstellen.

Die in dieser Arbeit gezeigte Erhöhung der Serumspiegel ist interessant vor dem Hintergrund, dass es aus anderen Arbeiten zunehmend Hinweise für eine systemische Beteiligung bei LBD gibt. So konnten Lewy-Körperchen (LB) auch in den enterischen Auerbach- und Meissner- Plexus sowie in Nebenieren und Hautnerven von Patienten mit LBD nachgewiesen werden (Wakabayashi, Takahashi et al. 1988; Ikemura, Saito et al. 2008). Zusätzlich kommt es bei LBD-Patienten im Zusammenhang mit Neuroinflammation als wichtigem pathogenetischem Faktor auch zu einer Veränderung der peripheren Zytokinspiegel im Sinne einer Rekrutierung des peripheren Immunsystems (Brodacki, Staszewski et al. 2008; Reale, Iarlori et al. 2008). In diesem Zusammenhang ist bedeutsam, dass es nach peritonealer Gabe von LPS in Mäusen zu einem Anstieg der Zytokinexpression im ZNS kommt (Vallieres and Rivest 1997). Das Chemokin OPN könnte also eine Rolle bei der Vermittlung zwischen peripherer und zentral-nervöser Immunantwort spielen.

In der hier untersuchten Kohorte lagen Liquor-OPN-Spiegel durchschnittlich etwa 10-fach über Serum-OPN-Spiegeln. Dies ist umso bemerkenswerter, als der Gesamtproteingehalt im Liquor etwa 10-fach niedriger ist als im Serum. Daraus lässt sich schließen, dass OPN auch unter physiologischen Bedingungen ein wichtiges Protein im Liquor darstellt und im zentralen Nervensystem andere Aufgaben zu erfüllen haben dürfte als in der Peripherie.

### **5.2.2. OPN-Spiegel im Zusammenhang mit Alter und Geschlecht**

In der vorliegenden Arbeit lagen Serum-OPN-Spiegel bei männlichen Patienten signifikant über den Spiegeln von weiblichen Patienten. Dieses Ergebnis ist interessant in Bezug darauf, dass die Inzidenz von Parkinsonsyndromen bei Männern höher ist und dass Östrogenen ein neuroprotektiver Effekt zugesprochen wird (de Rijk, Tzourio et al. 1997; Twelves, Perkins et al. 2003; Shulman and Bhat 2006; Shulman 2007). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass bei Mäusen und Schweinen OPN durch Östrogene induziert wird (White, Ross et al. 2005; White, Burghardt et al. 2006). Das Alter der 19 in dieser Arbeit untersuchten weiblichen Patienten betrug im Median 70 Jahre und nur 3 waren jünger als 60 Jahre. Daraus lässt sich schließen, dass sich ein großer Teil der Patientinnen zum Zeitpunkt der Studie (genauer: zum Zeitpunkt der Probenentnahme) in der Postmenopause befand. Da die Östrogenspiegel in der Postmenopause abfallen, würde auch ein möglicher OPN-induzierender Effekt abnehmen und könnte erklären, warum die Serum-OPN-Spiegel bei Patientinnen niedriger waren als bei Männern. Zur Überprüfung dieser Hypothese müssten OPN-Spiegel von prämenopausalen Frauen mit denen von gleichaltrigen Männern verglichen werden.

Des Weiteren zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation von Serum-OPN-Spiegeln mit dem Alter bei Patienten. Ähnliche Ergebnisse liegen aus anderen Studien vor, welche OPN in alternden glatten Muskelzellen von Ratten, in alternden murinen und humanen Nieren sowie in alternden murinen Makrophagen untersuchten (Giachelli, Bae et al. 1991; Lopez, Hoyer et al. 1993; Hwang, Wilson et al. 1994; Rollo and Denhardt 1996). Hier stieg OPN ebenfalls mit dem Alter an. Der Anstieg von OPN in alternden Geweben könnte damit zusammenhängen, dass z. B. die Empfindlichkeit von Makrophagen

gegenüber den iNOS-hemmenden Einflüssen von OPN mit dem Alter abnimmt. In der Folge könnte es zu einer reaktiven Hochregulation von OPN kommen (Rollo and Denhardt 1996).

### **5.2.3. OPN-Spiegel innerhalb der Patienten-Gruppe**

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Patienten mit Demenz gegenüber nichtdementen Patienten eine signifikante Erhöhung der Serum-OPN-Spiegel während Liquor-OPN-Spiegel nicht erhöht waren. Die Erhöhung der Serumspiegel bei dementen LBD-Patienten wäre z.B. dadurch erklärbar, dass diese auch im peripheren Nervensystem eine verstärkte Pathologie aufweisen (LB sind auch peripher nachweisbar). Eine mögliche Korrelation von kognitiven Störungen und Störungen des peripheren Nervensystems bei LBD-Patienten, konnte in den wenigen bisher dazu veröffentlichten Arbeiten, jedoch nicht nachgewiesen werden (Bassotti, Villanacci et al. 2007; Idiaquez, Benarroch et al. 2007).

Desweiteren ist anzumerken, dass LB bei DLB- und PDD-Patienten im zentralen Nervensystem in größerer Anzahl vorliegen als bei PDND-Patienten (Hurtig, Trojanowski et al. 2000; Goldmann Gross, Siderowf et al. 2008) und OPN als Bestandteil von LB identifiziert werden konnte (Maetzler, Berg et al. 2007). In einige Studien korrelierte die Anzahl von LB zusätzlich mit der Schwere der Demenz (Samuel, Galasko et al. 1996; Apaydin, Ahlskog et al. 2002), während diese Korrelation in anderen Studien nicht gezeigt werden konnte (Colosimo, Hughes et al. 2003). Bei Patienten mit Demenz wäre in der vorliegenden Arbeit also eine Erhöhung der Liquor-OPN-Spiegel zu erwarten gewesen, wie sie auch in der Arbeit von Maetzler et al. gezeigt werden konnte (Maetzler, Berg et al. 2007). Eine möglicherweise bestehende Erhöhung der Liquor-OPN-Spiegel könnte bei den hier eingeschlossenen Patienten durch die vielen Einflüsse, denen OPN ausgesetzt ist, überdeckt worden sein.

Wie auch in der Arbeit von Maetzler und Kollegen, korrelierten Liquor-OPN-Spiegel in der vorliegenden Arbeit positiv mit der *Erkrankungsdauer* (Maetzler, Berg et al. 2007). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die Zahl von Lewy-Körperchen, welche OPN enthalten, im Verlauf der Krankheit steigt. Hier ist anzumerken dass neuere Studien von drei LBD-Verlaufsformen ausgehen, bei

denen es zu Unterschieden in der Ausbreitung von LB kommt. So wurde in einer Autopsie-Studie mit 87 LBD-Patienten eine LBD-Form mit frühem Beginn, mildem Verlauf und allmählicher LB-Verteilung, eine frühe maligne Form mit raschem Auftreten von Demenz, und eine Form mit spätem Beginn, komplexem Krankheitsbild und schneller Verbreitung von Lewy-Körperchen, unterschieden (Halliday, Hely et al. 2008). Das Ausmaß des neuronalen Zellverlusts in der Substantia nigra nimmt ebenfalls mit der Erkrankungsdauer zu (Jellinger 2002). Da Liquor-OPN-Spiegel positiv mit der Erkrankungsdauer korrelieren, die Zahl der LB im Verlauf zu- und die Zahl der Neuronen abnimmt, ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit gezeigte Erhöhung der Liquor-OPN-Spiegel bei LBD-Patienten eher mit dem Auftreten von LB zusammenhängt, als das sie durch eine Expression in Neuronen bedingt ist. Wäre die Erhöhung der OPN-Spiegel durch Expression in nigralen Neuronen bedingt, würde es mit fortschreitendem Krankheitsverlauf eher zur einer Abnahme der OPN-Konzentration kommen.

Aus der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit Liquor-OPN-Spiegel, nicht aber Serum-OPN-Spiegel mit der Erkrankungsdauer korrelierten, könnte ebenfalls geschlossen werden, dass das OPN-Gen in verschiedenen Geweben und Kompartimenten unterschiedlich reguliert wird. Dies ist auch aufgrund des grossen Konzentrationsunterschiedes zwischen OPN-Protein im Liquor und OPN-Protein im Serum naheliegend.

Die in der Arbeit von Maetzler et al. beschriebene Korrelation von Serum-OPN-Spiegeln mit Erkrankungsstadien nach *H&Y*, konnte in der vorliegenden Arbeit weder für Serum- noch Liquorspiegel gezeigt werden (Maetzler, Berg et al. 2007). Es zeigte sich jedoch, dass das Allel T signifikant mit niedrigeren *H&Y*-Stadien assoziiert war. Dies könnte so interpretiert werden, dass das Risiko-Allel T zwar zu einem erhöhten Risiko für LBD führt, aber mit mildereren Erkrankungsverläufen assoziiert ist, ähnlich dem typischen Verlauf von monogenetischen Parkinsonsyndromen mit frühem Beginn und langsamer Krankheitsprogression.

### **5.3. OPN-Gen und klinische Parameter; OPN-Gen und OPN-Protein: SNP -66 ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für LBD assoziiert, nicht jedoch mit OPN-Spiegeln**

Wir konnten zeigen, dass Träger des Allels T bzw. des Genotyp TT von SNP -66 ein etwa 2,5 faches erhöhtes Risiko hatten, an LBD zu erkranken. Die Assoziation von SNP -66 mit dem Auftreten von LBD ist ein Hinweis dafür, dass OPN eine ursächliche Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankungen spielen könnte. Dass dieser Zusammenhang auf dem Einfluss des Proteins auf immunologische Prozesse beruhen könnte, legt eine aktuelle Arbeit nahe: Marciano und Kollegen (Marciano, D'Annunzio et al. 2009) zeigten eine Assoziation von SNP -66 mit dem Auftreten von Typ 1 Diabetes mellitus. SNP -66 liegt in der Promotorregion des OPN-Gens. Das Allel T des SNP -66 führte in einer Arbeit von Hummelshoj und Kollegen, *in vitro* zu einer höheren Affinität des Transkriptionsfaktors Sp1 und so zu einer gesteigerten Promotoraktivität (Hummelshoj, Ryder et al. 2006). In Anbetracht der Tatsache, dass das Allel T bzw. der Genotyp TT des SNP -66 signifikant mit dem Auftreten von LBD assoziiert ist, dass Patienten mit LBD signifikant erhöhte OPN-Spiegel haben und dass das Allel T den Transkriptionsfaktor Sp1 spezifisch bindet, wäre eine signifikante Erhöhung von OPN-Spiegeln bei Trägern des Genotyps TT zu erwarten gewesen. Entgegen dieser Annahme waren in der vorliegenden Arbeit Serum- und Liquor-OPN-Spiegel nicht mit SNP -66 assoziiert. Dies könnte folgende Gründe haben: (i) die Größe der Kohorte, welche durch die Verfügbarkeit von Liquor-Proben begrenzt war, könnte zu klein sein um bestehende Unterschiede zu zeigen; (ii) die komplexe transkriptionale und translationale Regulation von OPN könnte den Einfluss eines einzelnen SNPs auf die Höhe der Spiegel überdecken; (iii) das Allel T könnte im Kopplungsungleichgewicht mit exonischen SNPs liegen, die die Proteinaktivität beeinflussen; (iv) eine ursprüngliche, durch das Allel T bedingte Erhöhung der Spiegel könnte durch Epiphänomene überlagert werden. So könnten Rigor und Akinese als Leitsymptom einen Umbau der Knochensubstanz beeinflussen und zu erhöhten OPN-Spiegeln führen. OPN spielt eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel, indem es dort Osteoklasten aktiviert und die Bildung von

Hydroxylapatit hemmt. Ein Hinweis für den Einfluss von Epiphänomenen auf die Höhe von OPN-Spiegeln ist, dass in einer rezenten Arbeit Serum-OPN-Spiegel mit dem Schweregrad der motorischen Symptome korrelierten, während Liquor-Spiegel davon nicht beeinflusst waren (Maetzler, Berg et al. 2007). Dass, wie wir zeigen konnten, OPN-Spiegel auch bei Patienten, die für das protektive Allel G homozygot waren, signifikant über den Spiegeln von für das G-Allel homozygoten Kontrollen lagen, zeigt, dass das Risikoallel T nicht die alleinige Ursache für die Erhöhung, der OPN-Spiegel sein kann. Es handelt sich wahrscheinlich um eine Kombination aus einer reaktiven Erhöhung, einer epiphänomenbedingten Erhöhung und einer durch genetische Polymorphismen bedingten Erhöhung.

Epiphänome und eine divergierende posttranskriptionale Regulation von OPN zwischen ZNS und Peripherie könnten erklären, weshalb Liquor-OPN- und Serum-OPN-Spiegel in der vorliegenden Arbeit zwar jeweils bei Patienten erhöht waren, jedoch nicht miteinander korrelierten.

Da die varianten Allele des genetischen Polymorphismus SNP 1239 weder mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko, noch mit erhöhten OPN-Spiegeln assoziiert waren, ist den Ergebnissen dieser Arbeit zu folge nicht von einem relevanten Einfluss dieses SNP auf die Erkrankung aus zu gehen.

#### **5.4. OPN-Gen, OPN-Protein und IgG-Spiegel: OPN und Neuroinflammation**

Wir konnten zeigen das zwischen Patienten und Kontrollen kein signifikanter Unterschied in der Höhe der IgG-Spiegel besteht. Dies entspricht dem Ergebnis einer Arbeit von Marttila et al., in der Liquor-IgG-Spiegel bei Patienten ebenfalls nicht erhöht waren und deutet darauf hin, dass die Menge von IgG-Spiegel im Liquor nicht mit der Erkrankung assoziiert ist (Marttila, Rinne et al. 1982).

Im Bezug auf die proinflammatorischen Effekte von OPN ist bemerkenswert, dass in der vorliegenden Arbeit das Allel T bzw. der Genotyp TT des SNP -66 signifikant mit erhöhten Liquor-IgG-Spiegeln assoziiert waren. Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Assoziation von Allel T mit erhöhten Serum-IgG-Spiegeln, wenn auch keine direkte Korrelation von OPN und IgG-Spiegeln

vorhanden war. Dieses Ergebnis korrespondiert mit Ergebnissen anderer Arbeiten, in denen OPN die Proliferation, Differenzierung und IgG-Produktion von B-Lymphozyten stimuliert (Lampe, Patarca et al. 1991; Iizuka, Katagiri et al. 1998; Wang and Denhardt 2008). B-Lymphozyten-Aktivierung und Antikörperbildung scheinen bei der Pathogenese von Parkinsonsyndromen eine Rolle zu spielen. So konnten bei Patienten mit Parkinsonsyndromen Antikörper gegen durch Oxidation modifizierte Moleküle nachgewiesen werden und die Injektion von Immunglobulinen aus Patientenserum in die SN von Ratten führte dort zu einem signifikant stärkeren Untergang von Neuronen, als die Injektion von Immunglobulinen aus Serum von gesunden Kontrollen (Chen, Le et al. 1998; Whitton 2007).

Im Bezug darauf, dass das Allel T (SNP -66) zu einer gesteigerten Affinität des Transkriptionsfaktors Sp1 führt (Hummelshoj, Ryder et al. 2006) und OPN in verschiedenen Studien die IgG-Produktion stimuliert, könnte angenommen werden, dass die Assoziation von Allel T mit erhöhten IgG-Spiegeln durch eine Veränderung der OPN-Spiegel bedingt ist. In der vorliegenden Arbeit waren OPN-Spiegel jedoch nicht mit dem genetischen Polymorphismus SNP -66 assoziiert und korrelierten nicht mit IgG-Spiegeln. Das Fehlen dieses Zusammenhangs könnte durch die oben genannten Faktoren (begrenzte Kohortengröße, komplexe Regulation der OPN-Expression, Kopplung des SNP -66 mit SNPs in kodierenden Bereichen, Überlagerung durch Epiphänomene) bedingt sein.

Bei Mäusen konnte in einem MRL-Stamm (Murphy Roths Large-Mausstamm) ein Polymorphismus im OPN-Gen als Risikofaktor für die Entstehung von Lupus-Nephritiden identifiziert werden (Miyazaki, Ono et al. 2005). Mäuse mit dem Polymorphismus zeigten eine gesteigerte OPN-Expression. Zusätzlich war die Aktivität von OPN, welches aus DNA synthetisiert wurde, die den MRL-Polymorphismus enthielt, gesteigert und MRL-OPN induzierte eine gesteigerte Produktion von nephritogenen Immunglobulinen (Miyazaki, Ono et al. 2005).

Als Bindeglied zwischen genetischen Polymorphismen im OPN-Gen und der Erhöhung von Immunglobulin-Spiegeln kommen also eine Veränderung der OPN-Expression und eine Steigerung der OPN-Aktivität in Frage. In diesem

Zusammenhang wäre es sinnvoll, die Aktivität von OPN, das jeweils einen der drei Genotypen von SNP -66 enthält, im Bezug auf Zytokinexpression, Makrophagen-Aktivierung und IgG-Synthese hin zu untersuchen.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass Myiazaki und Mitarbeiter die OPN-Expression anhand der mRNA-Konzentration und nicht anhand des Genprodukts OPN bestimmten. So wurde der Einfluss der komplexen post-transkriptionalen Regulation von OPN ausgeblendet.

Auch im Bezug auf die vorliegende Arbeit müsste, um den Einfluss der post-transkriptionalen Regulation besser verstehen zu können, in weiteren Studien der Einfluss von SNP -66 auf die OPN-mRNA-Expression im Vergleich mit dem Einfluss auf die Höhe der OPN-Spiegel bestimmt werden. Hilfreich ist hier die Arbeit von Hummelshoj et al., welche eine gesteigerte Promotoraktivität bei Trägern des T Allels von SNP -66 nachweisen konnte (Hummelshoj, Ryder et al. 2006). Auf diesem Wege könnte der krankheitsbegünstigende Effekt des Allels T bzw. des Genotyps TT von SNP -66 genauer untersucht werden.

Zusammenfassend ist der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Einfluss von SNP -66 auf die Höhe der Immunglobulin-Spiegel auf der einen und die hier ebenfalls gezeigte Assoziation von SNP -66 mit LBD auf der anderen Seite als Hinweis dafür zu werten, dass OPN durch eine Beeinflussung der spezifischen Immunreaktion eine Rolle bei der Entstehung / dem Verlauf von LBD spielen könnte.

## **5.5. In welchem Kontext stehen die Ergebnisse dieser Arbeit und die gängigen Theorien zur Pathogenese von LBD?**

### **5.5.1. Neuroinflammation**

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, insbesondere aus der Assoziation von SNP -66 mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko sowie der Assoziation von SNP -66 mit erhöhten IgG-Spiegeln, lässt sich schliessen, dass OPN durch eine Beeinflussung der neurogenen Entzündungsreaktion an der Pathogenese von LBD beteiligt sein könnte.

Zunehmend wird klar, dass bei der Pathogenese von LBD auch Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen. Diese Hypothese wird durch die folgenden Befunde unterstützt: i) Infiltrate aktivierter Mikrogliazellen in der SN gehören zum pathologischen Korrelat von LBD, ii) MHC-Moleküle und proinflammatorische Zytokine sind bei LBD-Patienten hochreguliert, und genetische Polymorphismen in Zytokin-Genen beeinflussen das Erkrankungsrisiko von LBD, iii) NSAR zeigen bei LBD eine neuroprotektive Wirkung (Wersinger and Sidhu 2006; Esposito, Di Matteo et al. 2007; Wahner, Sinsheimer et al. 2007; Whitton 2007). Auch Arbeiten zu toxininduzierten LBD liefern Hinweise für die Bedeutung von Entzündungsreaktionen bei LBD. So entfaltet das zur Erzeugung von LBD in Tiermodellen verwendete MPTP seine toxische Wirkung zwar hauptsächlich durch Hemmung des Komplexes I der Atmungskette. In Tiermodellen, bei denen bestimmte pro-inflammatorische Zytokine ausgeschaltet waren, zeigte es jedoch eine wesentlich schwächere Wirkung als bei Wildtyp-Tieren. In post mortem Studien konnte in menschlichen SN noch bis zu 16 Jahre nach Applikation von MPTP (durch Verunreinigungen in Drogen) eine erhöhte Zahl aktivierter Mikroglia-Zellen nachgewiesen werden (Langston, Forno et al. 1999; Whitton 2007). Beides lässt vermuten, dass die Neurotoxizität von MPTP auch durch eine Interaktion mit Entzündungsreaktionen bedingt ist.

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein bakterielles Endotoxin, das ebenfalls zur Erzeugung von LBD in Tiermodellen eingesetzt wird. LPS zeigt keine direkte Schädigung dopaminergener Neurone, sondern es kommt nur in Anwesenheit von Mikrogliazellen zu einer Degeneration (Bronstein, Perez-Otano et al. 1995). LPS bindet dort an einen LPS-Membran-Rezeptorkomplex und initiiert die Aktivierung von Genen proinflammatorischer Zytokine (Orr, Rowe et al. 2002). In einer rezenten Arbeit stieg nach LPS-Applikation auch die Expression von OPN in Mikroglia-Zellen signifikant an (Iczkiewicz, Rose et al. 2005). Mikroglia-Zellen spielen bei der Entzündungsreaktion als Initiatoren, Regulatoren und Effektoren eine zentrale Rolle. Durch die Freisetzung von proinflammatorischen und neurotoxischen Faktoren sowie durch die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten sind sie in der Lage, pathologische Prozesse aufzuhalten. Bei

einer überschießenden Mikroglia-Antwort werden jedoch zusätzlich gesunde Neurone geschädigt und es kommt zu Neurodegeneration.

Die Pathophysiologie von Mikroglia-Zellen könnte einen Erklärungsansatz für die Frage bieten, warum es bei LBD gerade zu einem Untergang von Neuronen der Substantia nigra kommt. Neurone der Substantia nigra sind einerseits besonders anfällig für inflammatorische Noxen (Jenner and Olanow 1996). Auf der anderen Seite findet sich in keiner Region des Gehirns eine so große Zahl von Mikroglia-Zellen wie in der SN (Lawson, Perry et al. 1990; Kim, Mohny et al. 2000) und das nach Schädigung von dopaminergen Neuronen freigesetzte Neuromelanin führt zu einer Aktivierung von Mikroglia-Zellen (Wilms, Zecca et al. 2007). Dies lässt den Schluss zu, dass es bei LBD zu einer Art "Teufelskreis" aus Schädigung von Neuronen durch Mikroglia und Aktivierung von Mikroglia durch freigesetztes Neuromelanin kommen könnte.

#### *5.5.1.1. Könnte OPN zu einer Verstärkung der Mikroglia-Antwort führen?*

Viele unterschiedliche Faktoren (Zell-Debris, proinflammatorische Zytokine, Komplement, durch ROS modifizierte Oberflächenmoleküle, Infektionen, Alpha-Synuclein) sind in der Lage, Mikroglia-Zellen zu aktivieren. Warum eine durch diese Faktoren ausgelöste Entzündungsreaktion bei einigen Menschen verheerende Folgen hat bzw. chronifiziert und die Entstehung von Lewy-Körperchen-Krankheiten begünstigt, während sie bei anderen Menschen nicht auftritt oder blande verläuft, ist ungeklärt. OPN könnte hier eine Rolle spielen. So exprimieren und sezernieren Mikroglia-Zellen nach Aktivierung OPN, welches wiederum zu einer Rekrutierung und Akkumulation von Mikroglia-Zellen führt (Choi, Kim et al. 2007; Maetzler, Berg et al. 2007). Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ließe sich, im Zusammenhang mit den Daten aus der Literatur, folgender Mechanismus diskutieren:

Nach einer initialen Schädigung von Neuronen der SN kommt es zur Auslösung einer Entzündungsreaktion. Freigesetzter Zell-Debris, Neuromelanin und pathologisch modifizierte Moleküle führen zu einer Aktivierung von Mikroglia, welche neben proinflammatorischen Zytokinen auch OPN freisetzen. Bei Trägern des Risikoallels T (SNP -66), welches in der Arbeit von Hummelshoj et

al. (Hummelshoj, Ryder et al. 2006) zu einer gesteigerten Affinität des Transkriptionsfaktors Sp1 und so vermutlich zu einer gesteigerten OPN-Expression führte, kommt es möglicherweise zu erhöhten OPN-Spiegeln bzw. zu einer gesteigerten OPN-Aktivität. Dies führt zu einer verstärkten Mikroglia-Rekrutierung zum Ort der initialen Schädigung und so zu einer Verselbstständigung der Entzündungsreaktion.

Kritisch ist hier anzumerken, dass ein direkter Einfluss von SNP -66 auf die Höhe von OPN-Spiegeln bisher nicht gezeigt werden konnte, sondern lediglich eine gesteigerte Promotoraktivität des Allels T. Des Weiteren ist bezüglich des Einflusses von OPN auf die Aktivierung von Mikroglia-Zellen wenig bekannt und die Studienlage scheint in dieser Hinsicht widersprüchlich zu sein. So war in einer Arbeit von Hashimoto et al. die Expression von TNF-Alpha, IL1-beta und IL6 bei OPN-Knockout-Mäusen herabgesetzt (Hashimoto, Sun et al. 2007), während eine Arbeit von Schroeter et al. zeigte, dass es bei OPN-Knockout-Mäusen zu einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine und zu einer gesteigerten Aktivität der iNOS kam (Schroeter, Zickler et al. 2006). Hier ist folgender Unterschied zwischen den erwähnten Studien zu erwähnen: Hashimoto et al. untersuchten die Zytokinexpression nach mechanischer Schädigung des Rückenmarks während Schroeter et al. die Zytokinexpression nach artifizierter kortikaler Ischämie untersuchten. In der Arbeit von Schroeter et al. zeigten sich signifikante Unterschiede in der Zytokinexpression nur im sekundär degenerierenden Thalamus und nicht am Ort der Schädigung, was zusätzlich darauf hinweisen könnte, dass OPN in den verschiedenen Regionen des Zentralen Nervensystems zu unterschiedlichen Effekte führt.

Das Subjekt der Studien von Schroeter et al. und Hashimoto et al. war zwar zentralnervöses, aber nicht substantia nigrales Gewebe, welches besondere Eigenschaften im Bezug auf Entzündungsreaktionen hat (neuromelaninbedingte Mikroglia-Aktivierung, höchstes Mikrogliaaufkommen im Gehirn zeigt sich in der SN).

In Makrophagen, die mit Mikroglia-Zellen in vielerlei Hinsicht übereinstimmen, hemmt OPN einerseits Apoptose und Rezirkulation (Burdo, Wood et al. 2007). Andererseits führt es dort auch zu einer Hemmung des Komplex IV der

Atmungskette und ebenfalls zu einer Hemmung der iNOS, was gegen eine aktivierende Eigenschaft spricht (Gao, Guo et al. 2003; Wai, Guo et al. 2006). Durch die Hemmung der iNOS werden Gewebe vor Zytotoxizität durch NO geschützt. Die Fähigkeit von OPN, die Produktion von NO zu hemmen nimmt jedoch mit dem Alter ab und Alter ist ein wichtiger Risikofaktor bei der Entstehung von LBD (Rollo and Denhardt 1996). Daraus lässt sich schließen, dass mit zunehmenden Alter ein möglicher hemmender Einfluss von OPN auf Mikroglia-Zellen kleiner wird und dass der chemokinetische Einfluss, nicht zuletzt durch eine reaktive Erhöhung von OPN, in den Vordergrund rücken könnte. Da OPN eine Polarisierung von T-Lymphozyten in Typ1-Helfer-Zellen induziert und so zu einer Bahnung des "Th1-Weges" führt, bewirkt es zumindest indirekt eine Aktivierung von Makrophagen und möglicherweise auch Mikroglia-Zellen (Renkl, Wussler et al. 2005).

#### *5.5.1.2. Interaktion zwischen OPN und dem spezifischen Immunsystem*

Die Tatsache, dass aktivierte Mikroglia-Zellen OPN exprimieren und OPN aktivierend sowie chemokinetisch auf T- und B-Lymphozyten wirkt, lässt vermuten, dass OPN für eine Interaktion von unspezifischem und spezifischem Immunsystem von Bedeutung sein könnte (Lampe, Patarca et al. 1991; O'Regan, Chupp et al. 1999; O'Regan, Hayden et al. 2000; Iczkiewicz, Rose et al. 2007) . Bei Trägern des Risiko-Allels T könnte es durch erhöhte OPN-Spiegel bzw. erhöhte OPN-Aktivität auf diesem Weg zu einer gesteigerten Rekrutierung des spezifischen Immunsystem kommen. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit das Risiko-Allel T mit erhöhten IgG-Spiegeln in Liquor und Serum assoziiert war.

In T-Lymphozyten ist OPN in der Frühphase nach Aktivierung eines der am stärksten exprimierten Zytokine. Neben der aktivierenden und chemotaktischen Wirkung hemmt OPN die Apoptose von T-Lymphozyten. Von Hur et al. wurde angenommen, dass OPN so eine para- bzw. autokrine Selbstregulation von T-Lymphozyten vermittelt (Hur, Youssef et al. 2007). Chiochetti et al. konnten zeigen, dass die Eigenschaft von OPN, die T-Lymphozyten-Apoptose zu hemmen, einen essentiellen pathogenetischen Faktor bei der Entstehung der

Autoimmunkrankheit DALD darstellt (Chiocchetti, Indelicato et al. 2004) . Parallel zur vorliegenden Arbeit waren in der Arbeit von Chiocchetti et al. genetische Polymorphismen im OPN-Gen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für DALD und mit erhöhten OPN-Spiegeln assoziiert (Haplotyp B: 282 C, 750 T, 1083 A, 1239 C; Haplotyp C: 282 C, 750 T, 1083 G, 1239 C). Auch im Zusammenhang mit LBD wäre denkbar, dass erhöhte OPN-Spiegel bzw. eine gesteigerte OPN-Aktivität durch die Hemmung der T-Lymphozyten-Apoptose zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko führen.

Vor dem Hintergrund, dass Mikroglia-Zellen sowie T-Lymphozyten OPN exprimieren und OPN auf Mikrogliazellen chemokinetisch und auf T-Lymphozyten aktivierend, chemokinetisch sowie Apoptose-hemmend wirkt, kann angenommen werden, dass OPN zwischen beiden Zelltypen eine positive Wechselwirkung vermittelt.

Zusammenfassend wird deutlich, dass OPN auf Immunzellen proinflammatorisch wirkt, wenngleich unklar bleibt ob OPN auch aktivierend auf Mikroglia-Zellen wirkt. Im Bezug auf LBD wäre denkbar, dass es durch eine multifaktoriell bedingte Ursache zur Auslösung einer Entzündungsreaktion kommt, die sich unter dem Einfluss von OPN verselbstständigen bzw. chronifizieren kann. Träger von OPN-Gen-Variationen, die zu erhöhten OPN-Spiegeln bzw. zu einer Aktivitätssteigerung führen, könnten auf diese Weise ein erhöhtes Risiko für LBD haben.

### **5.5.2. Oxidativer/nitrosativer Stress, Exzitotoxizität, mitochondriale Dysfunktion, LRRK2**

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Erhöhung von OPN-Spiegeln bei LBD-Patienten könnte auch durch eine Interaktion von OPN mit weiteren, bei der Pathogenese von LBD eine Rolle spielenden Faktoren bedingt sein. So hat OPN die Eigenschaft, die Zytokin-vermittelte Induktion der iNOS zu hemmen und die Produktion von ROS zu unterdrücken (Rollo and Denhardt 1996; Weber and Cantor 1996). Zusätzlich suggeriert seine  $Ca^{2+}$ - bindende Eigenschaft einen möglichen protektiven Effekt im Zusammenhang mit Exzitotoxizität (Denhardt and Guo 1993). Im Bezug auf diese neuroprotektiven Eigenschaften von OPN könnte angenommen werden, dass die Erhöhung der OPN-Spiegel

bei Lewy-Körperchen-Patienten als Reaktion auf den anfallenden nitrosativen-/oxidativen Stress bzw. die gesteigerte Exzitotoxizität erfolgt und OPN als neuroprotektives Molekül zum Schutz von Neuronen sezerniert wird. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass auch Neurone selbst OPN exprimieren (Iczkiewicz, Jackson et al. 2006). Hinweise, die diese Hypothese unterstützen, finden sich in Arteriosklerose-Studien und in Untersuchungen an Maus-Makrophagen.

So führten ROS in Arteriosklerose-Studien *in vivo* sowie *in vitro* zu einer gesteigerten OPN-Expression (Partridge, Williams et al. 2005; San Martin, Du et al. 2007). Auch NO führte in Maus-Makrophagen zu einer gesteigerten Expression von OPN. Da OPN die Induktion von iNOS als Quelle von NO hemmt, wurde angenommen, dass OPN hier eine negative Rückkopplung vermittelt (Takahashi, Takahashi et al. 2000). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Korrelation von OPN-Spiegeln mit dem Alter könnte ebenfalls als Hinweis für eine mögliche reaktive Erhöhung der OPN-Spiegel gewertet werden. Aufgrund der mit dem Alter abnehmenden Empfindlichkeit der iNOS gegenüber den inhibitorischen Einflüssen von OPN, könnte im Alter mehr NO entstehen, welches wiederum die OPN-Expression induziert.

Nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand ist über den Einfluss von OPN auf Exzitotoxizität wenig bekannt. In einer Arbeit von Borges et al. zeigte OPN keinen Einfluss auf NMDA-induzierte Exzitotoxizität bei Mäusen (Borges, Gearing et al. 2008). Chidlow et al. zeigten, dass die OPN-Expression in retinalen Mikroglia-Zellen nach retinaler Ischämie sowie nach Induktion von Exzitotoxizität mittels NMDA und Kainsäure kurzfristig anstieg, um dann wieder abzufallen (Chidlow, Wood et al. 2008). Hier ist anzumerken, dass die OPN-Expression erst nach dem Untergang von retinalen Ganglienzellen anstieg. Zusätzlich stieg die OPN-Expression auch nach retinaler Ischämie an. Daraus lässt sich schließen, dass der beobachtete OPN-Anstieg weniger als direkte Reaktion auf die exzitotoxischen Noxen und die damit verbundene Erhöhung von  $Ca^{2+}$  zu werten ist, sondern eher aus dem Zelluntergang und der damit verbundenen Mikroglia-Aktivierung resultiert.

Gegen die Hypothese einer reaktiven und für die Hypothese einer primären Erhöhung von OPN-Spiegeln bei Patienten spricht auch, dass wir zeigen konnten, dass das zu einer gesteigerten Promotoraktivität führende Allel T (SNP -66) mit dem Auftreten von LBD assoziiert war. Zusätzlich konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass OPN in Maus-Makrophagen den Komplex IV der Atmungskette hemmt und Atmungskettendefizite im Zusammenhang mit der Entstehung von LBD stehen (Gao, Guo et al. 2003; Fukui and Moraes 2008). Störungen der Atmungskette führen ebenfalls zu einem gesteigerten Anfall von ROS. Gegen die Hypothese einer reaktiven Erhöhung von OPN könnten auch neue Erkenntnisse im Zusammenhang mit LRRK2 sprechen. Mutationen im LRRK2-Gen stellen die häufigste Ursache von monogenetischen Parkinsonsyndromen dar und verursachen ca. 1-2% der sporadischen Parkinsonsyndrome (Gasser 2007). Mutationen führen zu einer Zunahme der Kinaseaktivität von LRRK2, was in einer Disinhibition des "PTEN/PI3K/Akt"- bzw. "TSC/Rheb/TOR/4E-BP"-Signalweges und einer translationalen Aktivierung von Genen resultiert (Imai, Gehrke et al. 2008). Durch Mutationen des LRRK2-Gens kommt es zu einer gesteigerten Empfindlichkeit von Zellen gegenüber oxidativem Stress. Auch OPN wird über diesen Signalweg reguliert, und es wäre denkbar, dass der neurodegenerative Effekt von LRRK2-Mutationen durch einen Anstieg von OPN verursacht ist (Larsson, Perlman et al. 2006; Shao, Washington et al. 2007). Dieser mögliche Zusammenhang würde auch für eine Mitbeteiligung von OPN an der Entstehung von LBD sprechen. Ob LRRK 2 an der Regulation von OPN beteiligt ist, muss jedoch in weiteren Studien untersucht werden.

## **5.6. Klinische Bedeutung von OPN für Lewy-Körperchen-Erkrankungen**

Von klinischer Bedeutung für LBD könnte OPN als Ziel neuer Therapieansätze und als Marker-Molekül sein. Die Voraussetzung dafür ist in beiden Fällen ein besseres Verständnis der Rolle von OPN bei LBD. Da Mikroglia-Zellen im Zentrum der neuronalen Entzündung stehen und OPN auf der einen Seite die

Zytotoxizität von Mikroglia-Zellen hemmt (Hemmung der Induktion von iNOS) und auf der anderen Seite zu einer Rekrutierung von Mikroglia führt, müsste in zukünftigen Studien untersucht werden, ob OPN Mikroglia-Zellen auch aktiviert. Nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand werden Nicht-Steroidale-Antirheumatika (NSAR) wie Ibuprofen durch eine Abschwächung der Entzündungsreaktion bei LBD als neuroprotektiv diskutiert (Esposito, Di Matteo et al. 2007).

In diesem Zusammenhang wäre ein Therapie-Ansatz denkbar, der zu einer Hemmung von OPN und so zu einer Abschwächung der Entzündungsreaktion führt. Angiotensin II induzierte in verschiedenen Studien die Expression von OPN (Giachelli, Bae et al. 1993; Yu, Wu et al. 2000; Abe, Nakashima et al. 2008). *Angiotensin II Typ1* - Rezeptorantagonisten (AT 1 -Hemmer) und Hemmer des *Angiotensin-konvertierenden Enzyms* (Angiotensin-Converting Enzyme, ACE) führten zu einer signifikanten Reduktion der OPN-Expression und waren in einer Studie zu post-traumatischen Nierenerkrankungen bei Mäusen mit einer signifikanten Reduktion der Makrophagen-Infiltration und Krankheitsaktivität assoziiert (Yu, Wu et al. 2000; Zhang, Zhou et al. 2008). Auch die Kombination der Immunsuppressiva Mycophenolat mofetil und Prednison konnten die OPN-Expression hemmen (Ding, Zhao et al. 2004).

Im Zusammenhang mit einer möglichen Rolle von OPN als Marker für LBD ist von Bedeutung, dass OPN als Bestandteil von LB identifiziert werden konnte und dass OPN-Spiegel bei Patienten signifikant erhöht waren (Maetzler, Berg et al. 2007). Interessant wäre vor diesem Hintergrund, ob OPN-Spiegel auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Tauopathien (M. Alzheimer, Frontotemporale Demenz, Progressive Supranukleäre Paralyse, Corticobasale Degeneration, M. Pick) erhöht sind, da die klinische Abgrenzung dieser Erkrankungen von LBD in der Frühphase oft schwierig ist. Wung et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass die OPN-Expression in Pyramidenzellen von Alzheimerpatienten gesteigert war (Wung, Perry et al. 2007).

Aufgrund der Tatsache, dass OPN-Spiegel auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) wie der Multiplen Sklerose erhöht sind (Vogt, Floris et al. 2004; Comabella, Pericot et al. 2005; Braitch,

Nunan et al. 2008), könnte OPN als unspezifischer Marker für ZNS-Entzündungen im Allgemeinen dienen.

## **6. Zusammenfassung**

Die Ätiologie von LBD ist bis heute unbekannt. Gemeinsame pathologische Merkmale von LBD sind das Auftreten von Lewy-Körperchen, der Untergang dopaminerger Neurone sowie das Vorkommen von Entzündungszellen, die vor allem durch Mikrogliazellen repräsentiert sind. Im Bezug darauf und aufgrund der Tatsache, dass proinflammatorische Zytokine genetisch und biochemisch mit dem Auftreten LBD assoziiert sind, wird heute von vielen Autoren die These einer neuroinflammatorischen Beteiligung bei der Pathogenese von LBD unterstützt.

Das multifunktionale Zytokin und Matrixprotein OPN konnte als Bestandteil von LB identifiziert werden. Die Untersuchung der OPN-Spiegel und zweier SNPs bei LBD im Rahmen dieser Arbeit, zeigte eine signifikante Erhöhung von OPN-Spiegeln sowohl im Liquor als auch im Serum bei Patienten sowie die Assoziation des Allels T von SNP -66 mit einem erhöhten Krankheitsrisiko. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass OPN in pathophysiologische Prozesse bei LBD involviert sein könnte. Dafür spricht auch, dass OPN mit vielen der bei LBD relevanten Pathomechanismen interagieren kann. OPN hat in diesem Zusammenhang einerseits neurodegenerative und andererseits neuroprotektive Eigenschaften. Die Assoziation des Allels T von SNP -66 mit einem erhöhten Krankheitsrisiko lässt den Schluss zu, dass OPN zumindest bei einem Teil der Patienten eine ursächliche Rolle spielen könnte. Da das Risiko-Allel T mit erhöhten IgG-Spiegeln assoziiert ist und OPN proinflammatorische Eigenschaften besitzt, kann angenommen werden, dass das erhöhte Erkrankungsrisiko durch eine Verstärkung von Neuroinflammation bedingt ist.

Aufgrund der Tatsache, dass das Risiko-Allel T (SNP -66) in einer Vorarbeit mit einer gesteigerten Promotoraktivität assoziiert war, wäre in dieser Arbeit eine Erhöhung der OPN-Spiegel bei Trägern des T-Allels zu erwarten gewesen. Diese zeigte sich jedoch nicht.

Um besser verstehen zu können auf welchem Weg SNP -66 das Erkrankungsrisiko erhöht, müsste in zukünftigen Studien die Expression von OPN-mRNA im Bezug auf die Genotypen von SNP -66 untersucht werden. Zusätzlich müsste die Proteinaktivität von OPN, welches aus DNA synthetisiert wird, die das Risiko-Allel enthält, bestimmt werden.

Dass OPN-Spiegel unabhängig von den Genotypen des SNP -66 bei Patienten über den Spiegeln von Kontrollen lagen, zeigt, dass das Risikoallel T nicht die alleinige Ursache für die Erhöhung, der OPN-Spiegel ist. Es handelt sich wahrscheinlich um eine multifaktorielle Erhöhung. Zusammenfassend ist in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt worden, dass ein genetischer Polymorphismus im OPN-Gen mit dem Auftreten von LBD assoziiert ist. Dies ist im Zusammenhang mit der signifikanten Erhöhung von OPN-Spiegeln bei Patienten ein Hinweis dafür, dass OPN die Entstehung von LBD begünstigen könnte und dass das Potential von OPN als Marker für LBD weiter geprüft werden sollte.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

DJ-1	Chaperonenpaar hsp40/hdj-1
DLB	<i>dementia with Lewy bodies</i> , Demenz mit Lewy-Körperchen
HTRA2	<i>HtrA serine peptidase 2</i> , HtrA Serin Peptidase 2
IL	Interleukin
INF	Interferon
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> , induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LBD	Lewy body disease, Lewy-Körperchen Erkrankungen
LRRK2	<i>Leucine Rich Repeat Kinase 2</i> , Leucin-reiche Repeat-Kinase 2
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NO	Stickstoffmonoxid
PINK1	<i>PTEN induced putative kinase 1</i> , mutmaßliche PTEN induzierte Kinase 1
PD	<i>Parkinson´s disease</i> , M.Parkinson
PDD	<i>PD with dementia</i> , Parkinson mit Demenz
PDND	<i>PD non demented</i> , Parkinson ohne Demenz
PTEN/PI3K/Akt	<i>phosphatase and tensin homolog</i> , Phosphatase und Tensin homolog/ Phosphoinositid 3-Kinase/ Proteinkinase B)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
SN	Substantia nigra
TGF	<i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSC/Rheb/TOR/4E-BP	<i>Tuberous sclerosis complex</i> , Tuberöse Sklerose

Komplex/ *Ras homolog enriched in brain*, im Gehirn angereichertes Ras Homologon/ *Target of Rapamycin*, Ziel des Rapamycins/ Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, eukaryotisches Translations-Initiationsfaktor-4E-bindendes Protein 1

## 7.2. Stadieneinteilung nach Hoehn und Yahr

### Stadieneinteilung nach Hoehn und Yahr

- Stadium 0 Keine Anzeichen der Erkrankung.
- Stadium 1 Einseitige Erkrankung
- Stadium 1.5 Einseitige und axiale Beteiligung
- Stadium 2 Beidseitige Erkrankung ohne Gleichgewichtsstörung
- Stadium 2.5 Leichte beidseitige Erkrankung mit Ausgleich beim Zugtest
- Stadium 3 Leichte bis mäßige beidseitige Erkrankung: leichte Haltungsinstabilität; körperlich unabhängig
- Stadium 4 Starke Behinderung; kann noch ohne Hilfe laufen oder stehen
- Stadium 5 Ohne Hilfe an den Rollstuhl gefesselt oder bettlägerig

Quelle: Kompetenznetz Parkinson

(<http://www.kompetenznetz-parkinson.de/Parkinson/leitskalen.html>)

### 7.3. Abbildungen und Tabellen

Tab.1. Sequenzen der PCR- und SNaPshot-Primer(\*). Der SNaPshot-Primer von SNP1239 wurde zur besseren Unterscheidung von SNP-66 mit einem Poly-T Schwanz versehen.

SNP	Sequenz (5' → 3')	Fragmentlänge
-66	F AAAACCAGAGGGGGAAGTGT	248
	R CCCAGTAGCAAACCTGAAGCTG	
- 66 *	GCAGA AAACCTCATG ACACAATCTC	
1239	F GCTTCATGGAAACTCCCTGT	308
	R CCGTGGGAAAACAATAAGC	
1239* <sup>\$</sup>	TTTTTTTTTCTCA TGAATAGAAA TTTATGTAGA	

```

1 ctccctgtgt tgggtggagga tgtctgcagc agcatttaaa ttctgggagg gcttggttgt
61 cagcagcagc aggaggaggc agagcacagc atcgtcggga ccagactcgt ctcaggccag
121 ttgcagcctt ctcagccaaa cgccgaccaa ggaaaactca ctaccatgag aattgcagtg
181 atttgctttt gctcctcagg catcacctgt gccataccag ttaaaccaggc tgattctgga
241 agttctgagg aaaagcagct ttacaacaaa taccagatg ctgtggccac atggctaaac
301 cctgaccocat ctcagaagca gaatctccta gcccacaga atgctgtgtc ctctgaagaa
361 accaatgact ttaaacaaga gaccctcca agtaagtcca acgaaagcca tgaccacatg
421 gatgatatgg atgatgaaga tgatgatgac catgtggaca gccaggactc cattgactcg
481 aacgactctg atgatgtaga tgacactgat gattctcacc agtctgatga gtctcaccat
541 tctgatgaat ctgatgaact ggtcactgat tttcccacgg acctgccagc aaccgaagt
601 ttcactccag ttgtccccac agtagacaca tatgatggcc gaggtgatag tgtggtttat
661 ggactgaggt caaaatctaa gaagtttcgc agacctgaca tccagtacc tgatgctaca
721 gacgaggaca tcacctcaca catggaaagc gaggagtga atgggtcata caaggccatc
781 cccgttccc aggacctgaa cgcgccttct gattgggaca gccctgggaa ggacagttat
841 gaaacgagtc agctggatga ccagagtgtc gaaaccaca gccacaagca gtccagatta
901 tataagcgga aagccaatga tgagagcaat gagcattccg atgtgattga tagtcaggaa
961 ctttccaaag tcagccgtga attccacagc catgaatttc acagccatga agatatgctg
1021 gttgtagacc ccaaaaagtaa ggaagaagat aaacacctga aatttcgtat ttctcatgaa
1081 ttagatagtg catcttctga ggtcaattaa aaggagaaaa aatacaattt ctcaactttgc
1141 atttagtcaa aagaaaaaat gctttatagc aaaatgaaag agaacatgaa atgcttcttt
1201 ctcagtttat tggttgaatg tgtatctatt tgagtctgga aataactaat gtgtttgata
1261 attagtttag tttgtggctt catggaaact ccctgtaaac taaaagcttc agggttatgt
1321 ctatgttcat tctatagaag aatgcaaaac tatcactgta ttttaattat tgttattctc
1381 tcatgaatag aaatttatgt agaagcaaac aaaatacttt taccactta aaaagagaat
1441 ataacathtt atgtcactat aatcttttgt tttttaagtt agtgtatatt ttgttgtgat
1501 tatctttttg tgggtggaat aaatctttta tcttgaatgt aataagaatt tgggtggtgc
1561 aattgcttat ttgttttccc acggttgtcc agcaattaat aaaacataac ctttttact
1621 gcctaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

Abb. 1. mRNA-Sequenz von humanem OPN. Quelle:

[www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NM\\_001040058.1&dopt=gb](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NM_001040058.1&dopt=gb)

Tab. 2. Epidemiologische, klinische und biochemische Daten von Patienten- und Kontroll-Gruppen. \$ p<0.05 demente gegen nicht demente Patienten; \*p<0.01 demente gegen nicht demente Patienten; # p<0.01 Patienten gegen Kontrollen. Der P-Wert wurde mit dem Wilcoxon-Test oder dem Kruskal-Wallis-Test berechnet, die Post-hoc-Analyse erfolgte dann mit dem Wilcoxon-Test. Werte zwischen denen ein signifikanter Unterschied besteht sind fett gedruckt.

	Patienten			Kontrollen
	Alle Patienten	davon nicht-dement	davon dement	
Anzahl (W/M)	58 (19/39)	43 (15/28)	15 (4/11)	30 (13/17)
Alter (insgesamt)	70 (47-83)	<b>70 (47-83)</b>	<b>75 (63-77) \$</b>	67.5 (46-84)
Alter bei Erkrankung (Age of Onset)	62.5 (30-79)	<b>60 (30-79)</b>	<b>71 (39-76) *</b>	-
Erkrankungsdauer	4 (0.5-24)	4 (0.5-24)	3 (0.5-24)	-
Hoehn & Yahr Stadium	2 (1-4)	2 (1-4)	2 (2-4)	-
[Serum IgG] (g/l)	10.1(5,6-16.5)	10.0(5.6-16.5)	10.3 (5.8-13.7)	9.4 (6.7-13.2)
[Liquor IgG] (mg/l)	27.7 (9.3-52.8)	28.0 (12.1-52.8)	24.9 (9.3-51.9)	27.1 (13.3-54.7)
[Serum OPN] (ng/ml)	<b>601 (37-3520)</b>	<b>585(37-3146)</b>	<b>867.7 (206.9-3520.8) *</b>	<b>421.6 (36.5-1052) #</b>
[Liquor OPN] (ng/ml)	<b>8387 (550-25405)</b>	8465 (550-25405)	8303 (1385-20063)	<b>4026 (124.6-12125.9) #</b>

Tab. 3. Korrelationen zwischen OPN-Spiegeln und klinischen Parametern in der Gesamtgruppe und in der Patientengruppe sowie Korrelation zwischen Liquor- und Serum-OPN-Spiegeln in der Gesamtgruppe. P-Werte wurden mit dem Spearman- Rangkorrelationskoeffizienten (Rho) berechnet. ( ) = Rho Adjustiert auf Alter. P-Werte <0.05 sind fett gedruckt.

<b>Patienten und Kontrollen</b>		Rho	P-wert
Serum OPN Spiegel	Alter	0.18	0.10
Liquor OPN Spiegel	Alter	0.02	0.84
Liquor OPN Spiegel	Serum OPN Spiegel	0.16	0.15
<b>Lewy Körperchen Erkrankung</b>			
Serum OPN Spiegel	Alter	0.29	<b>0.03</b>
	Alter bei Erkrankungsbeginn (adjustiert für Alter)	0.36 (0.13)	<b>0.01</b>
	Erkrankungsdauer (adjustiert für Alter)	-0.32 (0.1)	<b>0.02</b>
	Hoehn&Yahr Stadium	0.09	0.53
Liquor OPN Spiegel	Alter	0.01	0.99
	Alter bei Erkrankungsbeginn	-0.14	0.33
	Erkrankungsdauer	0.33	<b>0.02</b>
	Hoehn&Yahr Stadium	0.07	0.64

Tab. 4. OPN- und IgG-Spiegel in der Gesamt-, der Patienten- und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit vom Geschlecht (Median;Spannweite).  
 \*  $p < 0.01$  = signifikante Unterschiede der Spiegel zwischen männlichen und weiblichen Studienteilnehmern. P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest berechnet. Werte zwischen denen ein signifikanter Unterschied besteht sind fett gedruckt.

	Gesamtgruppe	LBD-Patienten	Kontrollen
<hr/>			
Liquor-OPN (ng/ml)			
<i>männlich</i>	4905; 125-25405	7111; 550-25405	3506; 125-12126
<i>weiblich</i>	7068; 976-22307	11701; 2678-22307	4332; 976-8853
<hr/>			
Serum-OPN (ng/ml)			
<i>männlich</i>	<b>657; 37-3521</b>	<b>705; 67-3521</b>	527; 37-1052
<i>weiblich</i>	<b>401; 37-947 *</b>	<b>499; 37-947 *</b>	364; 37-866
<hr/>			

Tab. 5. Verteilung und Frequenz der Allele und Genotypen von SNP-66 und SNP 1239. \$ = p<0.05. P-Werte wurden mit dem Fisher's Exact Test und dem Chi-Square Test berechnet. Werte zwischen denen ein signifikanter Unterschied besteht sind fett gedruckt.

	LBD - Patienten	%	Kontrollen	%
<i>SNP-66</i>				
Allel T	\$ <b>92</b>	79	<b>39</b>	65
Allel G	<b>24</b>	21	<b>21</b>	35
Gesamt	116	100	60	100
Genotyp TT	37	64	12	40
Genotyp GT	18	31	15	50
Genotyp GG	3	5	3	10
Gesamt	58	100	30	100
<i>SNP 1239</i>				
Allel A	77	66	46	77
Allel C	39	34	14	23
Gesamt	116	100	60	100
Genotyp AA	26	45	17	57
Genotyp AC	25	43	12	40
Genotyp CC	7	12	1	3
Gesamt	58	100	30	100

Tab. 6. Zusammenhang zwischen der Verteilung von SNP -66 und des SNP 1239, und LBD. Der P-Wert wurde mit dem Fisher's Exact Test berechnet.

P-Werte <0.05 sind fett gedruckt.

	Odds ratio	95% Konfidenzintervall	p
SNP-66			
T/G	2.0641 ( <u>T</u> / G)	1.03 - 4.1366	<b>0.041</b>
TT/GT+GG	2.6429 ( <u>TT</u> /GT+GG)	1.0684 - 6.5376	<b>0.036</b>
SNP 1239			
A/C	0.6009	0.295-1.2241	0.1606
AA/AC+CC	3.9804	0.4663-33.9782	0.207

Tab. 7. Assoziation von SNP -66 mit klinischen Parametern. Bei kategorialen Parametern ist die Anzahl der Patienten (n) angegeben; p-Werte wurden mit dem Pearson-Chi-Square und dem Fisher's Exact Test berechnet. Erkrankungsdauer und Alter bei Erkrankungsbeginn sind in Jahren (a, Median und Spannweite) angegeben; p-Werte wurden mit dem Wilcoxon- und dem Kruskal-Wallis-Test berechnet. P-Werte <0.05 sind fett gedruckt.

SNP -66 klinische Para- meter	<i>Genotyp TT</i>	<i>Genotyp GT</i>	<i>Genotyp GG</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Allel T</i>	<i>Allel G</i>	<i>p-Wert</i>
<i>kategoriale Parameter</i>							
H&Y-Stadium ≤ 2 (n) / > 2 (n)	23/ 10	6/ 11	0/ 3	<b>0.01</b>	52/ 31	6/ 17	<b>0.018</b>
Demenz ja (n) / nein (n)	10/ 27	3/ 15	2/ 1	0.18	23/ 69	7/ 17	0.68
<i>metrische Parameter</i>							
Erkrankungs- dauer (a)	3; 0.5-19	5; 0.5-24	11; 2-24	0.21	4; 0.5-24	6; 0.5-24	0.063
Alter bei Erkrankungs- beginn (a)	63; 30- 79	61; 31- 74	59; 39- 73	0.86	63; 30- 79	60; 31- 74	0.58

Tab. 8 Assoziation von SNP 1239 mit klinischen Parametern. Bei kategorialen Parametern ist die Anzahl der Patienten (n) angegeben; p-Werte wurden mit dem Pearson-Chi-Square und dem Fisher's Exact Test berechnet. Erkrankungsdauer und Alter bei Erkrankungsbeginn sind in Jahren (a, Median und Spannweite) angegeben; p-Werte wurden mit dem Wilcoxon- und dem Kruskal-Wallis-Test berechnet

SNP 1239 klinische Parameter	Genotyp AA	Genotyp AC	Genotyp CC	p-Wert	Allel A	Allel C	p-Wert
<i>kategoriale Parameter</i>							
H&Y-Stadium ≤ 2 (n) / > 2 (n)	11/ 14	16/ 7	2/ 3	0.16	38/ 35	20/ 13	0.41
Demenz ja (n) / nein (n)	7/ 19	7/ 18	1/ 6	0.75	21/ 56	9/ 30	0.62
<i>metrische Parameter</i>							
Erkrankungs- dauer (a)	3; 0.5-24	4; 0.5-24	4; 2-18	0.29	3; 0.5-24	4; 0.5-24	0.14
Alter bei Erkrankungs- beginn (a)	61;31-79	65.5; 30- 74	57; 47- 72	0.73	61.5; 30- 79	63; 30- 74	0.69

Tab. 9. Assoziation von SNP-66 und OPN-Spiegeln in Serum und Liquor in Gesamt-, Patienten-, Kontroll- und Subgruppen (Median; Spannweite). Berechnungen wurden mit dem Wilcoxon und dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt \*n=1

SNP-66 OPN (ng/ml)	Genotyp <i>TT</i>	Genotyp <i>GT</i>	Genotyp <i>GG</i>	<i>p</i> -Wert	Allel <i>T</i>	Allel <i>G</i>	<i>p</i> -Wert
<i>OPN-Spiegel im Liquor</i>							
Gesamkollektiv (ng/ml)	5242; 836- 20493	6651; 125- 25405	10658; 509- 21730	0.58	5874; 125- 25405	6651; 125- 25405	0.81
LBD-Patienten (ng/ml)	8542; 1652- 20493	7174; 550- 25405	19549; 16076- 21730	0.07	8387; 550 - 25405	10486; 550 - 25405	0.20
Kontrollen (ng/ml)	3513; 836- 4945	5972;125 -12126	4332;509 -5240	0.40	3521; 125- 12126	4699; 125- 12126	0.47
<i>OPN-Spiegel im Serum</i>							
Gesamkollektiv (ng/ml)	609; 37- 3521	505; 37- 1052	256; 37- 725	0.28	595; 37 - 3521	490; 37 - 1052	0.13
LBD-Patienten (ng/ml)	634; 37- 3521	588; 207- 1042	708;51- 725	0.81	617; 37 - 3521	597; 51 - 1042	0.5
Kontrollen (ng/ml)	498; 37- 866	388; 37- 1052	60; 37- 452	0.44	474; 37 - 1052	364; 37 - 1052	0.46

Tab. 10. Assoziation von SNP 1239 und OPN-Spiegeln in Serum und Liquor (Median; Spannweite). Berechnungen wurden mit dem Wilcoxon und dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, \*n=1

SNP 1239	<i>Genotyp</i> AA	<i>Genotyp</i> AC	<i>Genotyp</i> CC	<i>p-Wert</i>	<i>Allel A</i>	<i>Allel C</i>	<i>p-Wert</i>
OPN (ng/ml)							
<i>OPN-Spiegel im Liquor</i>							
Gesamkollektiv (ng/ml)	5874; 509-22307	7773; 125-25405	5620, 2912-17925	0.54	5972; 125-25405	7351; 125-25405	0.31
LBD-Patienten (ng/ml)	7174;550-22307	10042; 1385-25405	7351; 2912-17925	0.42	8303; 550-25405	9952; 1385-25405	0.41
Kontrollen (ng/ml)	4332; 509-12126	3911; 125-11465	3752*	0.74	4316; 125-12126	3752; 125-11465	0.51
<i>OPN-Spiegel im Serum</i>							
Gesamkollektiv (ng/ml)	541; 37-3521	502; 37-1256	688; 173-1554	0.36	539; 37-3521	617; 37-1554	0.34
LBD-Patienten (ng/ml)	601; 51-3521	597; 37-1256	665; 173-1554	0.72	598; 37-3521	617; 37-1554	0.97
Kontrollen (ng/ml)	391; 37-989	326; 37-1052	866*	0.36	391; 37-1052	479; 37-1052	0.37

Tab. 11. Assoziation von SNP -66 und IgG-Spiegeln in Serum und Liquor (Median; Spannweite). Berechnungen wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test durchgeführt. P-Werte <0.05 sind fett gedruckt. \*n=1

SNP -66	<i>Genotyp TT</i>	<i>Genotyp GT</i>	<i>Genotyp GG</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Allel T</i>	<i>Allel G</i>	<i>p-Wert</i>
IgG							
<i>IgG-Spiegel im Liquor</i>							
Gesamkollekti v (mg/ml)	30.1; 12.1 - 54.7	26; 9.3 - 52	16.5; 11- 48.5	0.061	28.3; 9.3 - 54.7	24; 9.3 - 52	<b>0.021</b>
LBD-Patienten (mg/ml)	31.3; 12.1 - 52.8	27; 9.3 - 52	15.2; 11 - 17.7	<b>0.032</b>	30.1; 9.3 - 52.8	20.8; 9.3 - 52	<b>0.019</b>
Kontrollen (mg/ml)	29.8; 13.9- 54.7	25; 13.3 - 51.5	32.5; 16.5 - 48.5	0.40	27.9; 13.3 - 54.7	25; 13.3 - 51.5	0.40
<i>IgG-Spiegel im Serum</i>							
Gesamkollekti v (g/l)	10.2; 5.6 - 16.5	9.1; 6.7 - 13.2	8.9; 5.8 - 14.8	0.065	10; 5.6 - 16.5	8.9; 5.8 - 14.8	<b>0.023</b>
LBD-Patienten (g/l)	10.2; 5.6 - 16.5	9.8; 7.1 - 12	9.6; 5.8 - 14.8	0.521	10.2; 5.6 - 16.5	9.6; 5.8 - 14.8	0.31
Kontrollen (g/l)	10; 8.1 - 12.4	8.5; 6.7 - 13.2	8.2; 7.5 - 8.9	0.071	9.8; 6.7 - 13.2	8.5; 6.7 - 13.2	<b>0.038</b>

Tab. 12. Assoziation von SNP 1239 und IgG-Spiegeln in Serum und Liquor in Gesamt-, Patienten und Kontrollgruppe (Median; Spannweite). Berechnungen wurden mit dem Wilcoxon und dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. \*n=1

SNP1239	<i>Genotyp AA</i>	<i>Genotyp AC</i>	<i>Genotyp CC</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Allel A</i>	<i>Allel C</i>	<i>p-Wert</i>
IgG							
<i>IgG-Spiegel im Liquor</i>							
Gesamkollektiv (mg/ml)	27; 11-52	29; 9-55	36; 21-51	0.28	27; 9-55	31; 9-55	0.13
LBD-Patienten (mg/ml)	26; 11-52	31; 9-53	38; 21-51	0.17	27; 9-53	33; 9-53	0.056
Kontrollen (mg/ml)	27; 13-51	28; 14-55	27*	0.99	28; 13-55	27; 14-55	0.92
<i>IgG-Spiegel im Serum</i>							
Gesamkollektiv (g/l)	10; 6-15	10; 6-17	11; 9-13	0.23	10; 6-17	10; 6-17	0.33
LBD-Patienten (g/l)	10; 6-15	10; 6-17	11; 9-13	0.40	10; 6-17	11; 6-17	0.36
Kontrollen (g/l)	9; 7-13	9; 7-11	10*	0.79	9; 7-13	10; 7-11	0.75

## 8. Literaturverzeichnis

- Aarsland, D., R. Perry, et al. (2005). "Neuropathology of dementia in Parkinson's disease: a prospective, community-based study." Ann Neurol **58**(5): 773-6.
- Abe, K., H. Nakashima, et al. (2008). "Angiotensin II-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves Gq/11, Ras, ERK, Src and Ets-1." Hypertens Res **31**(5): 987-98.
- Aloisi, F. (2001). "Immune function of microglia." Glia **36**(2): 165-79.
- Apaydin, H., J. E. Ahlskog, et al. (2002). "Parkinson disease neuropathology: later-developing dementia and loss of the levodopa response." Arch Neurol **59**(1): 102-12.
- Ashkar, S., G. F. Weber, et al. (2000). "Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity." Science **287**(5454): 860-4.
- Baron, M., A. P. Kudin, et al. (2007). "Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1228-31.
- Bassotti, G., V. Villanacci, et al. (2007). "Apoptotic phenomena are not a major cause of enteric neuronal loss in constipated patients with dementia." Neuropathology **27**(1): 67-72.
- Bayless, K. J. and G. E. Davis (2001). "Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin." J Biol Chem **276**(16): 13483-9.
- Becher, B., A. Prat, et al. (2000). "Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells." Glia **29**(4): 293-304.
- Belin, A. C. and M. Westerlund (2008). "Parkinson's disease: a genetic perspective." Febs J **275**(7): 1377-83.
- Bender, A., K. J. Krishnan, et al. (2006). "High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease." Nat Genet **38**(5): 515-7.
- Bogaerts, V., J. Theuns, et al. (2008). "Genetic findings in Parkinson's disease and translation into treatment: a leading role for mitochondria?" Genes Brain Behav **7**(2): 129-51.
- Borges, K., M. Gearing, et al. (2008). "Characterization of osteopontin expression and function after status epilepticus." Epilepsia **49**(10): 1675-85.
- Boskey, A. L., L. Spevak, et al. (2002). "Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone." Calcif Tissue Int **71**(2): 145-54.
- Braak, H., E. Ghebremedhin, et al. (2004). "Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology." Cell Tissue Res **318**(1): 121-34.
- Braith, M., R. Nunan, et al. (2008). "Increased osteopontin levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis." Arch Neurol **65**(5): 633-5.

- Brodacki, B., J. Staszewski, et al. (2008). "Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism." Neurosci Lett **441**(2): 158-62.
- Bronstein, D. M., I. Perez-Otano, et al. (1995). "Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures." Brain Res **704**(1): 112-6.
- Burdo, T. H., R. J. Ellis, et al. (2008). "Osteopontin Is Increased in HIV-Associated Dementia." J Infect Dis **198**(5): 715-722.
- Burdo, T. H., M. R. Wood, et al. (2007). "Osteopontin prevents monocyte recirculation and apoptosis." J Leukoc Biol **81**(6): 1504-11.
- Chen, S., W. D. Le, et al. (1998). "Experimental destruction of substantia nigra initiated by Parkinson disease immunoglobulins." Arch Neurol **55**(8): 1075-80.
- Chidlow, G., J. P. Wood, et al. (2008). "Expression of osteopontin in the rat retina: effects of excitotoxic and ischemic injuries." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(2): 762-71.
- Chiocchetti, A., C. Comi, et al. (2005). "Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression." J Neuroimmunol **163**(1-2): 172-8.
- Chiocchetti, A., M. Indelicato, et al. (2004). "High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation." Blood **103**(4): 1376-82.
- Choi, J. S., H. Y. Kim, et al. (2007). "Transient microglial and prolonged astroglial upregulation of osteopontin following transient forebrain ischemia in rats." Brain Res **1151**: 195-202.
- Colosimo, C., A. J. Hughes, et al. (2003). "Lewy body cortical involvement may not always predict dementia in Parkinson's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(7): 852-6.
- Comabella, M., I. Pericot, et al. (2005). "Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **158**(1-2): 231-9.
- D'Alfonso, S., N. Barizzone, et al. (2005). "Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **52**(2): 539-47.
- de Rijk, M. C., C. Tzourio, et al. (1997). "Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **62**(1): 10-5.
- Denhardt, D. T. and X. Guo (1993). "Osteopontin: a protein with diverse functions." Faseb J **7**(15): 1475-82.
- Ding, L., M. Zhao, et al. (2004). "Mycophenolate mofetil combined with prednisone for diffuse proliferative lupus nephritis: a histopathological study." Lupus **13**(2): 113-8.
- Esposito, E., V. Di Matteo, et al. (2007). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease." Exp Neurol **205**(2): 295-312.
- Forno, L. S. (1996). "Neuropathology of Parkinson's disease." J Neuropathol Exp Neurol **55**(3): 259-72.

- Fukui, H. and C. T. Moraes (2008). "The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis?" Trends Neurosci **31**(5): 251-6.
- Gandhi, S. and N. W. Wood (2005). "Molecular pathogenesis of Parkinson's disease." Hum Mol Genet **14**(18): 2749-55.
- Gao, C., H. Guo, et al. (2003). "Osteopontin inhibits expression of cytochrome c oxidase in RAW 264.7 murine macrophages." Biochem Biophys Res Commun **309**(1): 120-5.
- Gasser, T. (2007). "Update on the genetics of Parkinson's disease." Mov Disord **22 Suppl 17**: S343-50.
- Giachelli, C., N. Bae, et al. (1991). "Molecular cloning and characterization of 2B7, a rat mRNA which distinguishes smooth muscle cell phenotypes in vitro and is identical to osteopontin (secreted phosphoprotein I, 2aR)." Biochem Biophys Res Commun **177**(2): 867-73.
- Giachelli, C. M., N. Bae, et al. (1993). "Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques." J Clin Invest **92**(4): 1686-96.
- Giacopelli, F., R. Marciano, et al. (2004). "Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity." Physiol Genomics **20**(1): 87-96.
- Goldmann Gross, R., A. Siderowf, et al. (2008). "Cognitive impairment in Parkinson's disease and dementia with lewy bodies: a spectrum of disease." Neurosignals **16**(1): 24-34.
- Gotz, M. E., A. Freyberger, et al. (1990). "Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease." J Neural Transm Suppl **29**: 241-9.
- Gotz, M. E., G. Kunig, et al. (1994). "Oxidative stress: free radical production in neural degeneration." Pharmacol Ther **63**(1): 37-122.
- Hakansson, A., O. Bergman, et al. (2007). "Cyclooxygenase-2 polymorphisms in Parkinson's disease." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **144B**(3): 367-9.
- Halliday, G., M. Hely, et al. (2008). "The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease." Acta Neuropathol **115**(4): 409-15.
- Hashimoto, M., D. Sun, et al. (2007). "Osteopontin-deficient mice exhibit less inflammation, greater tissue damage, and impaired locomotor recovery from spinal cord injury compared with wild-type controls." J Neurosci **27**(13): 3603-11.
- Hummelshoj, T., L. P. Ryder, et al. (2006). "A functional polymorphism in the Eta-1 promoter is associated with allele specific binding to the transcription factor Sp1 and elevated gene expression." Mol Immunol **43**(7): 980-6.
- Hur, E. M., S. Youssef, et al. (2007). "Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells." Nat Immunol **8**(1): 74-83.
- Hurtig, H. I., J. Q. Trojanowski, et al. (2000). "Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease." Neurology **54**(10): 1916-21.

- Hwang, S. M., C. A. Lopez, et al. (1994). "Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells." J Biol Chem **269**(1): 711-5.
- Hwang, S. M., P. D. Wilson, et al. (1994). "Age and development-related changes in osteopontin and nitric oxide synthase mRNA levels in human kidney proximal tubule epithelial cells: contrasting responses to hypoxia and reoxygenation." J Cell Physiol **160**(1): 61-8.
- Iczkiewicz, J., M. J. Jackson, et al. (2006). "Osteopontin expression in substantia nigra in MPTP-treated primates and in Parkinson's disease." Brain Res **1118**(1): 239-50.
- Iczkiewicz, J., S. Rose, et al. (2004). "Osteopontin (Eta-1) is present in the rat basal ganglia." Brain Res Mol Brain Res **132**(1): 64-72.
- Iczkiewicz, J., S. Rose, et al. (2005). "Increased osteopontin expression following intranigral lipopolysaccharide injection in the rat." Eur J Neurosci **21**(7): 1911-20.
- Iczkiewicz, J., S. Rose, et al. (2007). "Osteopontin expression in activated glial cells following mechanical- or toxin-induced nigral dopaminergic cell loss." Exp Neurol **207**(1): 95-106.
- Idiaquez, J., E. E. Benarroch, et al. (2007). "Autonomic and cognitive dysfunction in Parkinson's disease." Clin Auton Res **17**(2): 93-8.
- Iizuka, J., Y. Katagiri, et al. (1998). "Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies." Lab Invest **78**(12): 1523-33.
- Ikemura, M., Y. Saito, et al. (2008). "Lewy body pathology involves cutaneous nerves." J Neuropathol Exp Neurol **67**(10): 945-53.
- Imai, Y., S. Gehrke, et al. (2008). "Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in Drosophila." Embo J **27**(18): 2432-43.
- Ishijima, M., K. Tsuji, et al. (2002). "Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice." J Bone Miner Res **17**(4): 661-7.
- Jellinger, K. A. (2002). "Recent developments in the pathology of Parkinson's disease." J Neural Transm Suppl(62): 347-76.
- Jenner, P. and C. W. Olanow (1996). "Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease." Neurology **47**(6 Suppl 3): S161-70.
- Jiang, H., Y. Ren, et al. (2004). "Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis." Hum Mol Genet **13**(16): 1745-54.
- Johnston, N. I., V. K. Gunasekharan, et al. (2008). "Osteopontin as a target for cancer therapy." Front Biosci **13**: 4361-72.
- Kim, W. G., R. P. Mohney, et al. (2000). "Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia." J Neurosci **20**(16): 6309-16.
- Kim, Y. S. and T. H. Joh (2006). "Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease." Exp Mol Med **38**(4): 333-47.

- Kobayashi, H., H. Ujike, et al. (2006). "Identification of a risk haplotype of the alpha-synuclein gene in Japanese with sporadic Parkinson's disease." Mov Disord **21**(12): 2157-64.
- Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." Trends Neurosci **19**(8): 312-8.
- Kurkowska-Jastrzebska, I., A. Wronska, et al. (1999). "The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse." Exp Neurol **156**(1): 50-61.
- Kurkowska-Jastrzebska, I., A. Wronska, et al. (1999). "MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease." Acta Neurobiol Exp (Wars) **59**(1): 1-8.
- Lampe, M. A., R. Patarca, et al. (1991). "Polyclonal B cell activation by the Eta-1 cytokine and the development of systemic autoimmune disease." J Immunol **147**(9): 2902-6.
- Langston, J. W., L. S. Forno, et al. (1999). "Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure." Ann Neurol **46**(4): 598-605.
- Larsson, O., D. M. Perlman, et al. (2006). "Apoptosis resistance downstream of eIF4E: posttranscriptional activation of an anti-apoptotic transcript carrying a consensus hairpin structure." Nucleic Acids Res **34**(16): 4375-86.
- Lawson, L. J., V. H. Perry, et al. (1990). "Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain." Neuroscience **39**(1): 151-70.
- Lippa, C. F., J. E. Duda, et al. (2007). "DLB and PDD boundary issues: diagnosis, treatment, molecular pathology, and biomarkers." Neurology **68**(11): 812-9.
- Litvan, I., K. P. Bhatia, et al. (2003). "Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders." Mov Disord **18**(5): 467-86.
- Lopez, C. A., J. R. Hoyer, et al. (1993). "Heterogeneity of osteopontin expression among nephrons in mouse kidneys and enhanced expression in sclerotic glomeruli." Lab Invest **69**(3): 355-63.
- Maetzler, W., D. Berg, et al. (2007). "Osteopontin is elevated in Parkinson's disease and its absence leads to reduced neurodegeneration in the MPTP model." Neurobiol Dis **25**(3): 473-82.
- Marciano, R., G. D'Annunzio, et al. (2009). "Association of alleles at polymorphic sites in the osteopontin encoding gene in young type 1 diabetic patients." Clin Immunol.
- Martinat, C., S. Shendelman, et al. (2004). "Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: an ES- derived cell model of primary Parkinsonism." PLoS Biol **2**(11): e327.
- Marttila, R. J., U. K. Rinne, et al. (1982). "Virus antibodies in Parkinson's disease. Herpes simplex and measles virus antibodies in serum and CSF and their relation to HLA types." J Neurol Sci **54**(2): 227-38.
- Mazzali, M., T. Kipari, et al. (2002). "Osteopontin--a molecule for all seasons." Qjm **95**(1): 3-13.

- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2008). "The alpha-synuclein burden hypothesis of Parkinson disease and its relationship to Alzheimer disease." Exp Neurol **212**(2): 235-8.
- McKeith, I., J. Mintzer, et al. (2004). "Dementia with Lewy bodies." Lancet Neurol **3**(1): 19-28.
- Min, L. and X. Jian-xing (2007). "Detoxifying function of cytochrome c against oxygen toxicity." Mitochondrion **7**(1-2): 13-6.
- Miyazaki, K., Y. Okada, et al. (2008). "Corneal wound healing in an osteopontin-deficient mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(4): 1367-75.
- Miyazaki, T., M. Ono, et al. (2005). "Implication of allelic polymorphism of osteopontin in the development of lupus nephritis in MRL/lpr mice." Eur J Immunol **35**(5): 1510-20.
- Olanow, C. W. (1993). "A rationale for monoamine oxidase inhibition as neuroprotective therapy for Parkinson's disease." Mov Disord **8 Suppl 1**: S1-7.
- Olanow, C. W. (2007). "The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007." Mov Disord **22 Suppl 17**: S335-42.
- Oldberg, A., A. Franzen, et al. (1986). "Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 8819-23.
- O'Regan, A. W., G. L. Chupp, et al. (1999). "Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro." J Immunol **162**(2): 1024-31.
- O'Regan, A. W., J. M. Hayden, et al. (2000). "Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells." J Leukoc Biol **68**(4): 495-502.
- Orr, C. F., D. B. Rowe, et al. (2002). "An inflammatory review of Parkinson's disease." Prog Neurobiol **68**(5): 325-40.
- Pankratz, N. and T. Foroud (2007). "Genetics of Parkinson disease." Genet Med **9**(12): 801-11.
- Partridge, C. R., E. S. Williams, et al. (2005). "Novel genomic targets in oxidant-induced vascular injury." J Mol Cell Cardiol **38**(6): 983-96.
- Patarca, R., G. J. Freeman, et al. (1989). "Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection." J Exp Med **170**(1): 145-61.
- Petrow, P. K., K. M. Hummel, et al. (2000). "Expression of osteopontin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis: effects of osteopontin on the release of collagenase 1 from articular chondrocytes and synovial fibroblasts." Arthritis Rheum **43**(7): 1597-605.
- Reale, M., C. Iarlori, et al. (2008). "Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease." Brain Behav Immun.
- Renkl, A. C., J. Wussler, et al. (2005). "Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype." Blood **106**(3): 946-55.

- Rittling, S. R., H. N. Matsumoto, et al. (1998). "Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro." J Bone Miner Res **13**(7): 1101-11.
- Rollo, E. E. and D. T. Denhardt (1996). "Differential effects of osteopontin on the cytotoxic activity of macrophages from young and old mice." Immunology **88**(4): 642-7.
- Rowe, D. B., W. Le, et al. (1998). "Antibodies from patients with Parkinson's disease react with protein modified by dopamine oxidation." J Neurosci Res **53**(5): 551-8.
- Samuel, W., D. Galasko, et al. (1996). "Neocortical lewy body counts correlate with dementia in the Lewy body variant of Alzheimer's disease." J Neuropathol Exp Neurol **55**(1): 44-52.
- San Martin, A., P. Du, et al. (2007). "Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in Type 2 diabetes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(5): H2073-82.
- Scatena, M., L. Liaw, et al. (2007). "Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(11): 2302-9.
- Schapira, A. H., J. M. Cooper, et al. (1990). "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease." J Neurochem **54**(3): 823-7.
- Schober, A. (2004). "Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP." Cell Tissue Res **318**(1): 215-24.
- Schroeter, M., P. Zickler, et al. (2006). "Increased thalamic neurodegeneration following ischaemic cortical stroke in osteopontin-deficient mice." Brain **129**(Pt 6): 1426-37.
- Schulz, J. B., J. Lindenau, et al. (2000). "Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration." Eur J Biochem **267**(16): 4904-11.
- Shao, J., M. K. Washington, et al. (2007). "Heterozygous disruption of the PTEN promotes intestinal neoplasia in APC<sup>min</sup>/+ mouse: roles of osteopontin." Carcinogenesis **28**(12): 2476-83.
- Shulman, L. M. (2007). "Gender differences in Parkinson's disease." Gend Med **4**(1): 8-18.
- Shulman, L. M. and V. Bhat (2006). "Gender disparities in Parkinson's disease." Expert Rev Neurother **6**(3): 407-16.
- Simonian, N. A. and J. T. Coyle (1996). "Oxidative stress in neurodegenerative diseases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 83-106.
- Sodek, J., B. Ganss, et al. (2000). "Osteopontin." Crit Rev Oral Biol Med **11**(3): 279-303.
- Steinman, L. (1996). "Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system." Cell **85**(3): 299-302.
- Takahashi, F., K. Takahashi, et al. (2000). "Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells." IUBMB Life **49**(3): 217-21.
- Twelves, D., K. S. Perkins, et al. (2003). "Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease." Mov Disord **18**(1): 19-31.
- Valente, E. M., P. M. Abou-Sleiman, et al. (2004). "Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1." Science **304**(5674): 1158-60.

- Vallieres, L. and S. Rivest (1997). "Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta." J Neurochem **69**(4): 1668-83.
- van Loo, G., X. Saelens, et al. (2002). "The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet." Cell Death Differ **9**(10): 1031-42.
- Vogt, M. H., S. Floris, et al. (2004). "Osteopontin levels and increased disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis patients." J Neuroimmunol **155**(1-2): 155-60.
- Wahner, A. D., J. S. Sinsheimer, et al. (2007). "Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease." Arch Neurol **64**(6): 836-40.
- Wai, P. Y., L. Guo, et al. (2006). "Osteopontin inhibits macrophage nitric oxide synthesis to enhance tumor proliferation." Surgery **140**(2): 132-40.
- Wakabayashi, K., H. Takahashi, et al. (1988). "Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses." Acta Neuropathol **76**(3): 217-221.
- Wang, K. X. and D. T. Denhardt (2008). "Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses." Cytokine Growth Factor Rev.
- Weber, G. F. and H. Cantor (1996). "The immunology of Eta-1/osteopontin." Cytokine Growth Factor Rev **7**(3): 241-8.
- Wersinger, C. and A. Sidhu (2006). "An inflammatory pathomechanism for Parkinson's disease?" Curr Med Chem **13**(5): 591-602.
- White, F. J., R. C. Burghardt, et al. (2006). "Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) is expressed by stromal macrophages in cyclic and pregnant endometrium of mice, but is induced by estrogen in luminal epithelium during conceptus attachment for implantation." Reproduction **132**(6): 919-29.
- White, F. J., J. W. Ross, et al. (2005). "Steroid regulation of cell specific secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) expression in the pregnant porcine uterus." Biol Reprod **73**(6): 1294-301.
- Whitton, P. S. (2007). "Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease." Br J Pharmacol **150**(8): 963-76.
- Wilms, H., L. Zecca, et al. (2007). "Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications." Curr Pharm Des **13**(18): 1925-8.
- Windisch, M., H. Wolf, et al. (2008). "The role of alpha-synuclein in neurodegenerative diseases: a potential target for new treatment strategies?" Neurodegener Dis **5**(3-4): 218-21.
- Wu, Y. R., I. H. Feng, et al. (2007). "Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with the risk of Parkinson's disease." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **144B**(3): 300-4.
- Wung, J. K., G. Perry, et al. (2007). "Increased expression of the remodeling- and tumorigenic-associated factor osteopontin in pyramidal neurons of the Alzheimer's disease brain." Curr Alzheimer Res **4**(1): 67-72.

- Yu, X. Q., L. L. Wu, et al. (2000). "Osteopontin expression in progressive renal injury in remnant kidney: role of angiotensin II." Kidney Int **58**(4): 1469-80.
- Zaccai, J., C. McCracken, et al. (2005). "A systematic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies." Age Ageing **34**(6): 561-6.
- Zhang, Y. L., S. X. Zhou, et al. (2008). "Blockades of angiotensin and aldosterone reduce osteopontin expression and interstitial fibrosis infiltration in rats with myocardial infarction." Chin Med J (Engl) **121**(21): 2192-6.

## 9. Danksagung

Bei folgenden Personen möchte ich mich besonders bedanken:

Prof. Dr. Daniela Berg für die Überlassung des Themas, für die engagierte Supervision der Arbeit und für ihre Fähigkeit Menschen auch über den wissenschaftlichen Alltag hinaus zu motivieren und zu unterstützen.

Dr. Walter Mätzler für die unermüdliche Betreuung der Arbeit. Ohne dessen Gabe, das wissenschaftliche Potenzial seiner Doktoranden zu entdecken und zu fördern, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Dipl. biol. Claudia Schulte für die ausdauernde Beratung und Unterstützung im Labor und dafür, dass sie sich bei Fragen immer Zeit genommen hat.

Prof. Dr. Thomas Gasser für die Bereitstellung der Mittel und die Beratungen während der Laborbesprechungen.

Petra Leitner für die DNA-Extraktion und die Unterstützung bei der Einarbeitung in die Laborarbeit.

Prof. Dr. Jürgen Tomiuk für die statistische Beratung.

Allen Menschen die sich bereit erklärt haben an der Studie teilzunehmen, dafür dass sie zu ihren krankheitsbedingten Strapazen für diese Studie weitere auf sich genommen haben.

Den niedergelassenen Kollegen für die Blutabnahmen und das Zusenden der Röhrchen. Ohne sie wäre die Studienpopulation wesentlich kleiner ausgefallen.

Den Mitarbeitern des Liquorlabors der neurologischen Klinik für die Unterstützung bei der Rekrutierung von Studienteilnehmern.

Meinen Eltern und Brüdern dafür, dass sie immer für mich da sind und mich unermüdlich motivieren. Meinem Vater zusätzlich für das Korrigieren der Arbeit.

Meiner Freundin Carla und meinen Freunden.

## 10. Lebenslauf

Name: Joan Philipp Michelis  
Geboren: 12. Dezember 1979 in Köln  
Adresse: Ottostr. 36, 50823 Köln  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schullaufbahn

1986 - 2000 Grundschule Much, Paul-Klee-Gymnasium Overath

### Zivildienst

2000 - 2001 Johanniter Unfallhilfe

### Studium

10/2001-03/2005 Medizinstudium an der Universität Greifswald  
09/2004-03/2005 Medizinstudium an der Universität Leiden, Niederlande  
04/2005-06/2008 Medizinstudium an der Universität Tübingen  
27.05.2008 Ärztliche Prüfung

### Beruf

02/2009- Assistenzarzt an der neurologischen Klinik des Heilig Geist-Krankenhauses Köln