

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

**Genetisches Screening nach *LRRK2*-Mutationen
bei MSA- und PSP-Patienten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Dominik Madžar

aus

Hechingen

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. T. Gasser

2. Berichterstatter:

Professor Dr. O. Rieß

Den Menschen, die mir nahestehen

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Klassifikation der Parkinson-Syndrome	1
1.2	Diagnose atypischer Parkinson-Syndrome	3
1.3	Multisystematrophie (MSA).....	4
1.3.1	Definition.....	4
1.3.2	Klinik	4
1.3.3	Neuropathologie.....	5
1.3.4	Diagnostik	6
1.3.5	Epidemiologie	6
1.3.6	Therapie.....	7
1.4	Progressive Supranukleäre Blickparese (PSP)	7
1.4.1	Definition.....	7
1.4.2	Klinik	8
1.4.3	Neuropathologie.....	9
1.4.4	Diagnostik	9
1.4.5	Epidemiologie	9
1.4.6	Therapie.....	10
1.5	Genetik des Parkinson-Syndroms.....	10
1.5.1	Eigenschaften monogenetischer Formen des idiopathischen Parkinson-Syndroms.....	13
1.5.1.1	PARK1/4: α -Synuklein.....	13
1.5.1.2	PARK2: <i>Parkin</i>	14
1.5.1.3	PARK 6: <i>PINK1</i> , Phosphatase- und Tensin-induzierte Kinase	115
1.5.1.4	PARK 7: <i>DJ-1</i>	15
1.5.1.5	PARK8: <i>LRRK2</i>	16
1.5.1.5.1	Entdeckung von <i>LRRK2</i>	16
1.5.1.5.2	Pleomorphe Pathologie.....	17
1.5.1.5.3	Molekularbiologischer Aufbau von <i>LRRK2</i>	18
1.5.1.5.4	Physiologische Funktion von <i>LRRK2</i>	18
1.5.1.5.5	Pathogene Mutationen, Einfluss der ethnischen Herkunft..	19
1.5.1.5.6	Unvollständige Penetranz von <i>LRRK2</i> -Mutationen	21
1.5.1.5.7	Pathomechanismus von <i>LRRK2</i> -Mutationen	22
1.6	Motivation der Arbeit	23
2	MATERIAL UND METHODEN, PATIENTENAUSWAHL.....	24
2.1	Material	24
2.1.1	Geräte.....	24
2.1.2	Reagenzien für die PCR	24
2.1.3	Reagenzien für die Sequenzierreaktion und Sequenzierung	25
2.1.4	Synthetische Oligonukleotide.....	25

2.1.5	Puffer	25
2.1.6	Weitere Reagenzien und Verbrauchsartikel.....	26
2.1.7	Verwendete Computerprogramme.....	26
2.1.8	Internetseiten	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	27
2.2.2	Verdünnung der DNA-Lösungen.....	28
2.2.3	Polymerasekettenreaktion	28
2.2.4	PCR-Protokolle	30
2.2.4.1	<i>LRRK2</i> Exon 31.....	30
2.2.4.2	<i>LRRK2</i> Exon 41.....	31
2.2.5	Ethanol-fällung und -aufreinigung der PCR- und Sequenzierreaktionsprodukte	32
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.2.7	Sequenzierung mittels Kettenabbruchverfahren nach Sanger....	34
2.2.8	Sequenzierreaktion	35
2.2.9	Ermittlung der Nukleotidsequenz mittels Kapillarsequenzierer ...	36
2.2.10	Auswertung der Sequenzen.....	37
2.3	Patientenauswahl.....	37
2.3.1	Herkunft der Patientenproben.....	37
2.3.2	Diagnosekriterien	39
2.3.2.1	Klinische Diagnose der Multisystematrophie nach Gilman.....	39
2.3.2.2	Klinische Diagnose der Progressiven Supranukleären Blickparese.....	42
3	ERGEBNISSE.....	45
3.1	Auswertung der Patientendaten	47
3.1.1	PSP-Patienten	47
3.1.1.1	Herkunft der Patientenproben	47
3.1.1.2	Verteilung: Alter bei Erkrankungsbeginn	48
3.1.1.3	H1/H2-Haplotyp.....	48
3.1.2	MSA-Patienten.....	49
3.1.2.1	Herkunft der Patientenproben	49
3.1.2.2	Verteilung: Alter bei Erkrankungsbeginn	51
3.1.2.3	Diagnosekategorien der MSA-Patienten	51
3.2	Mutationscreening	54
3.2.1	PSP-Patienten: Exon 31	54
3.2.1.1	Mutationscreening mit Gap4.....	56
3.2.1.1.1	Mutationsuche mittels Contig Editor.....	56
3.2.1.1.2	Visuelle Mutationsuche mittels Trace Display	56
3.2.1.1.3	Exemplarische Darstellung einer Sequenz mit R1441C-Mutation	57

3.2.1.1.4	Gap4-Funktion Trace Difference.....	58
3.2.1.2	Ergebnisse des Mutationsscreenings.....	58
3.2.2	MSA-Patienten: Exon 41.....	59
3.2.2.1	Mutationsscreening mit Gap4.....	61
3.2.2.1.1	Mutationssuche mittels Contig Editor.....	61
3.2.2.1.2	Mutationssuche mittels Trace Display.....	62
3.2.2.1.3	Darstellung einer Sequenz mit G2019S-Mutation.....	63
3.2.2.1.4	Darstellung einer Sequenz mit I2020T-Mutation.....	64
3.2.2.2	Ergebnisse des Mutationsscreenings.....	65
4	DISKUSSION.....	66
4.1	Einleitung.....	66
4.1.1	Argumente für die Konzeption der Studie.....	66
4.2	Diskussion der Methodik.....	68
4.2.1	Auswahl der Patienten.....	68
4.2.2	Aussagekraft der Ergebnisse.....	71
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	71
4.3.1	Zur Auswertung der Patientendaten.....	71
4.3.1.1	PSP-Patienten.....	71
4.3.1.2	MSA-Patienten.....	71
4.3.2	G2019S und MSA.....	72
4.3.3	I2020T und MSA.....	72
4.3.4	I2012T und MSA.....	73
4.3.5	R1441C/G/H und PSP.....	73
4.3.6	Vergleich der Ergebnisse mit vorangegangenen Publikationen.....	74
4.3.6.1	Prävalenzraten von <i>LRRK2</i> -Mutationen.....	74
4.3.6.1.1	Bisherige Datenlage: <i>LRRK2</i> und PSP.....	74
4.3.6.1.2	Bisherige Datenlage: <i>LRRK2</i> und MSA.....	77
4.3.6.1.3	<i>LRRK2</i> und weitere atypische Parkinson-Syndrome.....	79
4.3.6.1.4	<i>LRRK2</i> und weitere neurodegenerative Erkrankungen.....	80
4.4	Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Arbeit.....	81
4.4.1	Trotz fehlender Mutationen: Beitrag von <i>LRRK2</i> zum Verständnis der Ätiologie atypischer Parkinson-Syndrome.....	81
4.4.1.1	Vor <i>LRRK2</i>	81
4.4.1.1.1	Das <i>Tau</i> -Gen und PSP.....	81
4.4.1.1.2	α -Synuklein.....	82
4.4.1.1.3	<i>Parkin</i>	83
4.4.1.1.4	<i>DJ-1</i>	83
4.4.1.2	Was ändert sich mit <i>LRRK2</i> ?.....	83
4.4.2	<i>LRRK2</i> und beginnender Paradigmenwechsel.....	84
4.4.2.1	Beitrag von <i>LRRK2</i> zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen Tauo- und Synukleinopathien.....	84

4.4.2.1.1	Die Kinaseaktivität von <i>LRRK2</i> als potentieller Faktor in der Bildung von Proteinaggregaten.....	84
4.4.2.1.2	Ist die Aufteilung in Synukleino- und Tauopathien noch als sinnvoll anzusehen?	87
4.5	Ausblick.....	88
4.5.1	Diagnose atypischer Parkinson-Syndrome	88
4.5.2	Die Entwicklung neuer Therapiekonzepte.....	89
5	ZUSAMMENFASSUNG	91
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	93
7	TABELLENVERZEICHNIS	94
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	96
9	LITERATURVERZEICHNIS	99
10	DANKSAGUNG	113
11	LEBENS LAUF	114

1 EINLEITUNG

James Parkinson beschrieb in seinem Essay aus dem Jahre 1817 eine Erkrankung, die er als „shaking palsy“, also Schüttellähmung, bezeichnete und die seither seinen Namen trägt [133]. Morbus Parkinson wird heute als klinikopathologisches Konstrukt angesehen, das sich über klinische Symptome in variabler Kombination von Akinese, Rigor, Tremor und Standunsicherheit definiert. Neuropathologisch sind Betroffene charakterisiert durch eine Degeneration hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, dopaminerger Neurone der Substantia nigra sowie einem daraus resultierenden Mangel an Dopamin in den nigrostriatalen Projektionen [51]. Morbus Parkinson ist die nach Morbus Alzheimer zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung mit etwa 150.000 Betroffenen alleine in Deutschland [32].

Es gibt neben dem Morbus Parkinson als häufigster Ursache eine Reihe weiterer Erkrankungen, die zur Ausbildung eines Parkinson-Syndroms führen können und die in verschiedenen Gruppen zusammengefasst werden.

1.1 Klassifikation der Parkinson-Syndrome

Man unterscheidet die degenerativen Parkinson-Syndrome von denen, die entweder im Rahmen anderer neurologischer Erkrankungen auftreten oder als sekundär (symptomatisch) einzustufen sind [153]. Die degenerativen Parkinson-Syndrome werden weiter in zwei Klassen unterteilt: Synukleinopathien und Tauopathien. Sie sind jeweils charakterisiert durch die Bildung von Proteinaggregaten, die als Hauptbestandteil entweder α -Synuklein oder das mikrotubuliassoziierte Protein Tau (MAPT) enthalten. Zu den Synukleinopathien gehören das idiopathische Parkinson-Syndrom (Morbus Parkinson), die Multisystematrophie (MSA) und die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB). Tauopathien umfassen die Progressive Supranukleäre Blickparese (PSP) und die Kortikobasale Degeneration (CBD). Aufgrund zusätzlicher Symptome, dem generell schlechteren Ansprechen auf L-

Dopa und der rascheren Krankheitsprogression, werden PSP, MSA, DLB und CBD als atypische Parkinson-Syndrome bezeichnet [97, 99].

Parkinsonismus tritt bei einer Vielzahl weiterer neurologischer Erkrankungen auf und steht dabei mitunter nicht im Vordergrund der Symptomatik, spielt aber bei differentialdiagnostischen Überlegungen eine Rolle [153].

Sekundären (symptomatischen) Parkinson-Syndromen wiederum liegen ursächlich primär nicht-neurologische Störungen zu Grunde. Sie haben toxische, metabolische oder (para)infektiöse Ursachen [96, 153]. Tabelle 1 fasst das eben Gesagte mit Angabe einer Auswahl von Beispielen zusammen.

Tabelle 1: Überblick über die Klassifikation der Parkinson-Syndrome

Degenerative Parkinson-Syndrome	Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer Erkrankungen, z.B. bei	Sekundäre Parkinson-Syndrome
Synukleinopathien <ul style="list-style-type: none"> • idiopathisches Parkinson-Syndrom (M. Parkinson) • Multisystematrophie (MSA) • Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) 	<ul style="list-style-type: none"> • M. Huntington • Spinozerebelläre Ataxie • Frontotemporale Demenz • M. Alzheimer 	toxisch <ul style="list-style-type: none"> • MPTP • Kohlenmonoxid • Paraquat • Mangan
Tauopathien <ul style="list-style-type: none"> • Progressive Supranukleäre Paralyse (PSP) • Kortikobasale Degeneration (CBD) 		metabolisch <ul style="list-style-type: none"> • Hypothyreose • Hypoparathyreoidismus • Hämochromatose • M. Wilson
		medikamenteninduziert <ul style="list-style-type: none"> • Antidopaminergika • Ca-Kanal-Blocker • Lithium • α-Methyl-Dopa

MPTP = 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin

1.2 Diagnose atypischer Parkinson-Syndrome

Da sich die charakteristischen Symptome der jeweiligen atypischen Parkinson-Syndrome oftmals erst nach einigen Jahren im Krankheitsverlauf ausprägen, fällt die Diagnose vor allem zu Beginn der Erkrankung meist schwer, ist jedoch immens wichtig, da sich die Prognose und die Behandlung der verschiedenen

Erkrankungen grundlegend voneinander unterscheiden. Atypische Parkinson-Syndrome weisen im Gegensatz zum Morbus Parkinson einen schwereren und kürzeren Krankheitsverlauf mit häufigeren Komplikationen auf [7, 119, 120, 188, 192]. Das Fehlen biochemischer Marker sowie eindeutiger neuroradiologischer oder genetischer Veränderungen bei einer Vielzahl der Patienten führt dazu, dass die Diagnose der verschiedenen Syndrome rein klinisch gestellt werden muss [96, 99]. Auch wenn sich im Bereich der apparativen Diagnostik rapide Fortschritte ergeben haben, so sind Fehldiagnosen mit all ihren fatalen Konsequenzen häufig.

Im Folgenden wird näher auf die beiden atypischen Parkinson-Syndrome MSA und PSP eingegangen.

1.3 Multisystematrophie (MSA)

1.3.1 Definition

Die Multisystematrophie ist eine progrediente degenerative Erkrankung des zentralen und autonomen Nervensystems. Die Bezeichnung MSA wurde 1969 von Graham und Oppenheimer eingeführt [59]. Sie hatten diesen Überbegriff für eine neurologische Erkrankung vorgeschlagen, die zuvor je nach klinischem Erscheinungsbild mit vorherrschendem Parkinsonismus, zerebellärer Störung oder autonomem Versagen entweder als Striatonigrale Degeneration (SND), Olivopontozerebelläre Ataxie (OPCA) oder Shy-Drager-Syndrom (SDS) bezeichnet wurde [189]. Die spätere Entdeckung von glialen zytoplasmatischen Einschlüssen in Oligodendrozyten [1, 28, 131] bei MSA-Patienten erlaubte die Definition der Multisystematrophie als klinikopathologische Entität [186].

1.3.2 Klinik

Zu den Hauptsymptomen der Multisystematrophie gehören autonomes Versagen, Parkinsonismus, zerebelläre Ataxie und Pyramidenbahnzeichen [15, 52, 140]. Diese können in verschiedenen Variationen und Kombinationen auftreten. Klinisch werden zwei motorische Erscheinungsformen, MSA-P und MSA-C, unterschieden. Bei MSA-P steht das Parkinson-Syndrom, bei MSA-C

die zerebelläre Ataxie im Vordergrund der Symptomatik [52, 140]. Dabei kann es zu Überschneidungen in der klinischen Präsentation der beiden Subtypen oder auch zum Übergang von einem eher zerebellären zu einem Parkinson-geprägten MSA-Typen kommen [202]. Bei Kaukasiern tritt MSA-P insgesamt zwei- bis viermal häufiger auf als MSA-C [14, 22, 31, 52, 140, 187].

Das Parkinson-Syndrom bei MSA-Patienten ist durch progrediente asymmetrische [189] Akinese und Rigidität gekennzeichnet. Ein irregulärer und ruckartiger posturaler oder Intentionstremor kann zur Symptomatik hinzukommen [52]. Obwohl gelegentlich Ruhetremor beobachtet wird, unterscheidet sich dieser bei MSA meist deutlich vom klassischen Pillendreher-Tremor des idiopathischen Parkinson-Syndroms [186].

Autonome Dysfunktionen sind häufig und gehen mit Beeinträchtigungen der Blutdruckregulation sowie urologischen Symptomen einher [6, 140]. Urogenitale Beschwerden finden sich bei bis zu 96% der MSA-Patienten. Bei fast allen männlichen Betroffenen kommt es früh im Krankheitsverlauf zu erektiler oder ejakulatorischer Dysfunktion [77, 140].

Zerebelläre Ataxie äußert sich neben Gang- und Gliedmaßenataxien auch in Okulomotorikstörungen mit Nystagmus und sakkadierter Blickfolge [55] sowie Dysarthrie [52, 202], kann durch das begleitende Parkinson-Syndrom jedoch maskiert sein.

Mitunter werden Pyramidenbahnzeichen im Sinne von Hyperreflexie, positivem Babinski-Reflex und Spastik der Extremitäten beobachtet [189].

Des Weiteren kann es zu einer charakteristischen Veränderung der Stimme kommen [140]. Eine ausgeprägte Fehlhaltung des Kopfes in Form eines dysproportionalen Antecollis findet sich bei einem Teil der Patienten. Ist der gesamte Körperstamm von einer Lateraldeviation betroffen, spricht man hierbei vom Pisa-Syndrom [25]. Inspiratorischer Stridor kann auftreten und eine Beatmung notwendig machen.

1.3.3 Neuropathologie

Seitens des neuropathologischen Erscheinungsbildes ist MSA charakterisiert durch neuronalen Zelluntergang und Gliose in manchen oder allen der

folgenden Strukturen: Putamen, Nucleus caudatus, Globus pallidus, Locus coeruleus, Substantia nigra, pontine Nervenkerne, zerebellärer Kortex, inferiore Oliven, intermediolaterale Stränge des Myelon sowie Nucleus Onuf im Sakralmark [15, 29, 84, 202]. Typischerweise finden sich gliale zytoplasmatische Einschlüsse (GCI) in den Oligodendrozyten, die neben Ubiquitin und Tauprotein auch α -Synuklein enthalten [183, 187].

1.3.4 Diagnostik

Zur klinischen Diagnose der MSA werden die von Gilman et al. 1999 formulierten und im Material und Methoden-Teil beschriebenen Konsensuskriterien verwendet [55].

Apparative zusatzdiagnostische Maßnahmen wie autonome Funktionstests, Sphinkter-EMG und bildgebende Verfahren können laut Konsensuskonferenz zur Unterstützung der Diagnose und zum Ausschluss anderer Erkrankungen eingesetzt werden. Vor allem die Bildgebung gewinnt durch den raschen technischen Fortschritt der radiologischen Diagnostik zunehmend an Bedeutung.

Insgesamt gilt, dass die apparative Zusatzdiagnostik zum gegenwärtigen Zeitpunkt hilfreich bei der Unterscheidung zwischen idiopathischem und atypischem Parkinson-Syndrom ist, eine Differenzierung atypischer Parkinson-Syndrome untereinander aber nicht erlaubt [67, 150, 152].

1.3.5 Epidemiologie

Epidemiologische Studien ermittelten für die MSA eine Prävalenzrate von 2,4 bis 4,9/100.000 und eine Inzidenz von 0,6 bis 3/100.000 [14, 20, 151] pro Jahr. Männer und Frauen sind gleichermaßen von der Erkrankung betroffen, die sich in der Regel im 6. Lebensjahrzehnt manifestiert und progredient bis zum Tod etwa 9 Jahre nach Krankheitsbeginn fortschreitet. Bezüglich der Lebenserwartung gibt es jedoch eine große Variationsbreite. So werden mitunter Überlebenszeiten von bis zu 18 Jahren berichtet [81, 189]. Mehr als 50% der Betroffenen weisen 5 Jahre nach Beginn der Erkrankung ausgeprägte körperliche Behinderungen auf. Die Todesursache sind letztlich meist

plötzlicher HerzKreislaufstillstand, rezidivierende Harnwegsinfekte und deren Folgen oder Pneumonien, die durch wiederholte Aspirationen verursacht werden [130].

1.3.6 Therapie

Die Multisystematrophie kann nicht kausal behandelt werden und endet immer letal. Das therapeutische Vorgehen orientiert sich daher an den klinischen Symptomen und deren Einfluss auf die Lebensqualität.

Die symptomatische Therapie der orthostatischen Hypotonie bei MSA-Patienten beinhaltet medikamentöse und nichtpharmakologische Strategien. Die Anzahl der Medikamente, deren Nutzen bei MSA-Patienten ausreichend untersucht wurde, ist jedoch denkbar begrenzt [73, 105, 198].

Das Parkinson-Syndrom bei MSA-Patienten spricht bedeutend schlechter auf die Therapie mit L-Dopa an als dies beim idiopathischen Parkinson-Syndrom der Fall ist. Nur etwa 30% der Betroffenen profitieren von einer Therapie, die Wirksamkeit lässt schnell nach. Als Nebenwirkung treten Dyskinesien auf, die im Unterschied zu Morbus Parkinson hauptsächlich orofazial lokalisiert sind [11] und bei symmetrischer Ausprägung mitunter an den Risus sardonicus bei Tetanus erinnern [190]. Auch Dopaminagonisten helfen nur wenigen MSA-Patienten [87].

Medikamente wie Desmopressin oder Oxybutinin können die Miktionsfrequenz senken und die Dranginkontinenz lindern. Restharnbildung kann einen Blasenkatheter erforderlich machen. Die erektile Dysfunktion spricht u.a. auf Sildenafil an [69].

1.4 Progressive Supranukleäre Blickparese (PSP)

1.4.1 Definition

Die Progressive Supranukleäre Blickparese (PSP, auch Steele-Richardson-Olszewski-Syndrom) ist eine progrediente neurodegenerative Erkrankung, die 1963 von Richardson zum ersten Mal als klinikopathologische Entität vor der Amerikanischen Gesellschaft für Neurologie beschrieben wurde [142]. Die

Erkrankung zeichnet sich durch besondere neuropathologische Veränderungen im Gehirn und oft charakteristische klinische Symptomkomplexe aus.

1.4.2 Klinik

Zu den Hauptsymptomen der PSP gehören eingeschränkte Mobilität mit gehäuften Sturzereignissen, Parkinsonismus, Probleme mit dem Sehen, Demenz und bulbäre Symptome [120].

Das Parkinson-Syndrom wird in variabler Ausprägung bei 95% aller Betroffenen beobachtet und ist geprägt von symmetrisch verteilter Bradykinese und Rigidität vor allem der axialen Muskulatur. Ein feinschlägiger posturaler Tremor kann vorkommen. Der für das idiopathische Parkinson-Syndrom charakteristische Pillendreher-Tremor findet sich nur selten. Das Zusammenspiel von Parkinsonismus und Standunsicherheit schränkt die Mobilität der Patienten früh ein [9, 120, 185].

Nahezu alle PSP-Patienten zeigen im Laufe ihrer Erkrankung eine Verlangsamung der vertikalen Blicksakkaden, aus der sich eine vertikale Blickparese entwickelt [185]. Eine Apraxie der Lidöffnung kann die Patienten funktionell erblinden lassen [120]. Die Kombination von fazialer Dystonie und einer Überaktivierung des Nervus frontalis verleiht den Betroffenen einen charakteristischen, starrenden Gesichtsausdruck [95].

Bulbäre Symptome entwickeln sich früh im Krankheitsverlauf und können neben extrapyramidalen auch spastische Komponenten aufweisen [15]. Zu Beginn der Erkrankung unter Umständen in der Ausprägung noch sehr subtil, betreffen kognitive Störungen im Verlauf viele PSP-Patienten. Beeinträchtigungen des Frontallappens manifestieren sich in Persönlichkeitsveränderungen, Vergesslichkeit, depressiven Verstimmungen, Apathie oder Angststörungen. Eine überdies fakultativ vorhandene subkortikale Demenz äußert sich in verlangsamter verbaler Ausdrucksfähigkeit, eingeschränktem abstraktem Denken und gestörtem Planen und Ausführen von Tätigkeiten [38, 185].

1.4.3 Neuropathologie

Makroskopisch zeigt sich häufig eine Atrophie frontaler Hirnabschnitte, wobei das Gesamtgewicht des Gehirns mitunter normal sein kann. Oft fallen Atrophien des Mittelhirns, vor allem des Tectums und des Pedunculus cerebellaris superior, auf. Der dritte Ventrikel und der Aquädukt können vergrößert sein. Die Substantia nigra weist Pigmentverlust auf [38]. Der mikroskopische Befund beinhaltet neuronalen Zelluntergang, Gliose und Ansammlung von Tau-Protein in den Basalganglien, dem Diencephalon sowie dem Hirnstamm [38, 74, 94, 167]. Sowohl der zerebrale als auch der zerebelläre Kortex sind von pathologischen Veränderungen weitestgehend verschont [38].

1.4.4 Diagnostik

Die Diagnose der PSP erfolgt ausschließlich klinisch, wobei Labortests und bildgebende Verfahren helfen können, andere Erkrankungen auszuschließen [17, 95]. 1995 definierten das „National Institute of Neurological Disorders and Stroke“ (NINDS) und die „Society for PSP“ (SPSP) klinische Diagnosekriterien für die PSP, die im Material und Methoden-Teil aufgeführt werden [99].

Seitens der apparativen Diagnostik haben sich vor allem Fortschritte im Bereich der radiologischen Verfahren ergeben. Der Nachweis charakteristischer Veränderungen neuronaler Strukturen mittels MRT gelingt jedoch erst spät im Krankheitsverlauf, was den Nutzen in der Diagnosefindung, die sich ja vor allem zu Beginn der Erkrankung als am schwierigsten erweist, deutlich limitiert.

1.4.5 Epidemiologie

Die durch epidemiologische Studien ermittelte Prävalenz der PSP ist im Laufe der Jahre kontinuierlich nach oben korrigiert worden und wird von einigen Autoren weiterhin als unterschätzt angesehen [18]. Anfänglich ging man von etwa 1,39 Fällen pro 100.000 Menschen aus [58], neuere Studien ergaben jedoch Prävalenzraten von bis zu 6,5 Fällen pro 100.000 Menschen [121, 151]. Deutlich höher noch soll die altersangepasste Prävalenz liegen. Das mittlere Erkrankungsalter der Patienten beträgt zwischen 60 und 65 Jahre [17]. Ein zunächst postuliertes häufigeres Auftreten der Erkrankung bei Männern [14,

167] konnte nicht bestätigt werden [17, 120]. Die mittlere Überlebenszeit beträgt etwa 7 Jahre, wobei auch bedeutend längere Krankheitsverläufe mit bis zu 11 [9] bzw. 16 Jahren [94] vorkommen sollen. Die Patienten versterben letztlich meist an Komplikationen der Erkrankung, allen voran an Pneumonien [58, 94].

1.4.6 Therapie

Es gibt für PSP bis zum heutigen Tag keine kausale Therapie. Sie kann weder geheilt, noch kann das Fortschreiten der Erkrankung gebremst werden [206]. Erfolglos wurde versucht, den durch die multifokale Pathologie der Erkrankung verursachten Mangel an verschiedenen Neurotransmittern medikamentös zu substituieren [18]. Die Therapie der PSP bleibt folglich auf rein palliative Maßnahmen beschränkt.

1.5 Genetik des Parkinson-Syndroms

Seit der Erstbeschreibung vor annähernd 200 Jahren sind viele Theorien über die Ätiologie des Parkinson-Syndroms aufgestellt worden. Zunächst sprach grundsätzlich wenig für eine genetische Komponente in der Krankheitsentstehung, da zwar der Zusammenhang zwischen Umweltfaktoren oder infektiösen Ursachen und dem Auftreten der Erkrankung beobachtet wurden, Zwillingsstudien jedoch keine überzeugenden Konkordanzraten erbrachten [175, 197]. Trotz dieser wenig verheißungsvollen Ausgangslage sind in den letzten 10 Jahren Mutationen in verschiedenen Genen als Ursache von erblichen Varianten des Parkinson-Syndroms identifiziert worden [88, 137, 181, 209]. Insgesamt ist aber nur ein geringer Prozentsatz der Erkrankungsfälle auf Veränderungen in den bekannten Parkinson-Genen zurückzuführen [80]. Die genaue Beziehung dieser meist familiären zu den viel häufiger auftretenden sporadischen Fällen ist zurzeit noch unbekannt. Da es jeweils zu nigrostriataler Degeneration kommt, kann ein ähnlicher zugrunde liegender Pathomechanismus angenommen werden [61]. Die Entdeckung solcher Gene hat das Wissen über die klinischen, morphologischen und pathologischen Veränderungen beim idiopathischen Parkinson-Syndrom extrem erweitert. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bisher bekannten Loci. Im Anschluss

wird auf die 5 bisher als sicher pathogen geltenden Parkinson-Gene eingegangen, wobei besonderes Gewicht auf *LRRK2* gelegt wird.

Locus	Gen	Chromosom	Vererbungsmodus	Neuropathologie
PARK1	<i>α-Synuklein</i>	4q21	dominant	SN-Degeneration mit LB
PARK2	<i>Parkin</i>	6q25	rezessiv	SN-Degeneration ohne LB
PARK3	?	2p13	dominant	SN-Degeneration mit LB, gelegentlich Plaques und NFTs
PARK4	<i>α-Synuklein-Du- und Triplikationen</i>	4q21	dominant	SN-Degeneration mit LB, Vakuolen in Neuronen des Hippocampus
PARK5	<i>Ubiquitin-C-terminal Hydrolase L1</i>	4p14	dominant	unbekannt
PARK6	<i>PINK1</i>	1p35-37	rezessiv	unbekannt
PARK7	<i>DJ-1</i>	1p38	rezessiv	unbekannt
PARK8	<i>LRRK2</i>	12cen	dominant	α-Synuklein- und Tau-Pathologie
PARK9	<i>ATP13A2</i>	1p36	rezessiv	unbekannt
PARK10	?	1p32	dominant(?)	unbekannt
PARK11	?	2q34	dominant(?)	unbekannt
PARK12	?	Xq21	X-chromosomal	unbekannt
PARK13	<i>HTRA2</i>	2p12	dominant(?)	unbekannt

Tabelle 2: Zusammenfassung der PARK-Loci

SN: Substantia nigra, LB: Lewy-Körperchen, NFT: neurofibrilläre Bündel, cen: Zentromerregion, p, q: p- bzw. q-Arm des Chromosoms

1.5.1 Eigenschaften monogenetischer Formen des idiopathischen Parkinson-Syndroms

Etwa 10 - 15% der Patienten mit dem typischen klinischen Bild des idiopathischen Parkinson-Syndroms weisen eine Familienanamnese auf, die mit einem mendelschen Erbgang vereinbar ist. Meistens beginnt die Erkrankung bei diesen Patienten früher als bei sporadischen Fällen, wobei es in der Regel keine signifikanten Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild und der Ausprägung der Symptome gibt [51].

Mit *α -Synuklein* und *LRRK2* sind mindestens zwei Gene bekannt, in welchen Mutationen zu einem Parkinson-Syndrom mit autosomal-dominantem Erbgang führen. *Parkin*-, *PINK1*- und *DJ-1-Mutationen* hingegen können mit einem autosomal-rezessiv vererbten Parkinson-Syndrom in Verbindung gebracht werden. Autosomal-dominante Parkinson-Syndrome zeichnen sich durch den Neugewinn einer Funktion von Genprodukten aus (sog. gain-of-function-Mechanismus), während die autosomal-rezessiv vererbten Formen zu einer Reduktion in der Funktion der jeweiligen Proteine führen (sog. loss-of-function-Mechanismus).

1.5.1.1 PARK1/4: *α -Synuklein*

α -Synuklein war das erste Gen, das vor mehr als 10 Jahren eindeutig mit familiären Formen des idiopathischen Parkinson-Syndroms in Verbindung gebracht werden konnte [137]. Zusätzlich zu 3 entdeckten Punktmutationen [83, 137, 207] wies man bei einigen Familien mit autosomal-dominant vererbtem Parkinson-Syndrom Duplikationen und Triplikationen des Wildtypengens nach [123, 160]. Ein Vergleich der Befunde von Familien mit *α -Synuklein*-Duplikationen und -Triplikationen legt eine direkte Relation der Gendosis zum Erkrankungsbeginn, der Erkrankungsdauer sowie der Schwere des Verlaufes nahe [104].

Auch wenn *α -Synuklein*-Mutationen insgesamt nur sehr selten auftreten [8, 41], so war ihre Entdeckung dennoch für die Erforschung der Pathogenese des Parkinson-Syndroms von außerordentlicher Bedeutung. So erkannte man, dass das vom *α -Synuklein*-Gen kodierte Protein einen Bestandteil der Lewy-

Körperchen darstellt, also jener Strukturen, die schon seit beinahe 100 Jahren als das neuropathologische Kennzeichen von sporadischen und familiären Parkinson-Syndromen schlechthin gelten. Dieser Umstand, zusammen mit der Beobachtung, dass die Aggregationstendenz von α -Synuklein durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz zunehmen soll [165], legen eine Rolle von akkumuliertem α -Synuklein in der Entstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms nahe, auch wenn bis heute noch nicht geklärt ist, worin der neurotoxische Effekt dabei begründet ist [51].

α -Synuklein wird ausgesprochen stark in Neuronen exprimiert und soll dort eine Funktion in der Reifung präsynaptischer Vesikel ausüben und somit die Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt mitregulieren [182]. Des Weiteren soll ihm eine Rolle bei Lernprozessen, der synaptischen Plastizität und der Dopamin-Synthese zukommen [104, 156]. Warum *α -Synuklein*-Mutationen ausgerechnet dopaminerge Zellen schädigen, ist ungeklärt [51].

1.5.1.2 PARK2: *Parkin*

Parkin gehört zur Gruppe der RING-Finger-Proteine und fungiert wie andere Proteine dieser Klasse als E3 Ubiquitinligase [155]. Durch die Markierung missgefalteter Proteine mit Ubiquitin spielt es eine Rolle bei deren Degradation durch Proteasomen. Mutationen im *Parkin*-Gen führen zu einem autosomal-rezessiv vererbten Parkinson-Syndrom, das sich vor allem bei jungen Menschen manifestiert [78]. Die Patienten zeichnen sich neben dem frühen Erkrankungsalter durch gutes Ansprechen auf L-Dopa und ein allgemein langsames Fortschreiten der Erkrankung aus [102]. Mehrere physiologische Substrate von *Parkin* sind identifiziert worden, wobei deren Akkumulation neurotoxische Wirkung haben soll [31]. Darüber hinaus wurde postuliert, dass *Parkin* noch weitere Funktionen, u.a. bei intrazellulären Signalpfaden, ausübt [2]. Man kennt inzwischen mehr als 100 verschiedene *Parkin*-Mutationen, darunter mehr als 50 Punktmutationen, Duplikationen, Deletionen sowie ganze Umstrukturierungen von Exons. Die verschiedenen Arten von Mutationen im *Parkin*-Gen scheinen dabei zu unterschiedlichen neuropathologischen

Veränderungen führen zu können, mit zum Teil selektivem Verlust der dopaminergen Neurone der Substantia nigra ohne Auftreten von Lewy-Körperchen [139]. Insgesamt sollen *Parkin*-Mutationen für etwa 50% der familiären und etwa 70% der sporadischen, vor dem 20. Lebensjahr auftretenden Parkinsonfälle verantwortlich sein [108, 112, 135]. Beispiele von lediglich heterozygoten *Parkin*-Mutationsträgern, die dennoch Parkinsonsymptome entwickelten, sind beschrieben worden [40, 138] und haben zur Vermutung geführt, dass hierbei Haploinsuffizienz [173] das Risiko für die Entstehung eines Parkinson-Syndroms steigern könnte.

1.5.1.3 PARK 6: *PINK1*, Phosphatase- und Tensin-induzierte Kinase 1

Mutationen im *PINK1*-Gen führen, ähnlich wie *Parkin*-Mutationen, zu früh beginnendem Parkinson-Syndrom, scheinen aber mit 1 - 2% der Fälle deutlich seltener vorzukommen [62, 143, 144, 181]. *PINK 1* ist ein in den Mitochondrien lokalisiertes Protein, das sich überall im Gehirn nachweisen lässt [49] und neuroprotektive Wirkung haben soll [23, 132, 203]. Die meisten bisher bekannten Mutationen finden sich innerhalb der Serin/Threonin-Kinase-Domäne des Proteins und sollen eine Herunterregulierung der Kinaseaktivität zur Folge haben [157, 158]. Obwohl bisher noch kein Substrat der *PTEN*-Kinase 1 identifiziert worden ist, geht man davon aus, dass hauptsächlich mitochondriale Proteine von ihr phosphoryliert und somit in ihrer Funktion modifiziert werden [79]. Einige der getesteten Mutationen sollen zu einem Abnehmen mitochondrialen Membranpotentials unter Stresssituationen führen [3]. Der besondere Effekt von *PINK1* auf die Funktion von Mitochondrien konnte mittels Knockout-Modellen im Tierversuch demonstriert werden, bei denen Defekte in der mitochondrialen Morphologie beobachtet worden sind [23].

1.5.1.4 PARK 7: *DJ-1*

DJ-1-Mutationen stellen eine seltene Ursache für autosomal-rezessiv vererbten Parkinsonismus dar [12, 64, 65]. Es wird angenommen, dass sich nur 1% der Parkinson-Syndrome mit frühem Krankheitsbeginn durch Mutationen in *DJ-1* erklären lassen [24, 101]. Das klinische Bild mit Beginn der Erkrankung in

jungen Lebensjahren und langsamem Voranschreiten der Symptome ähnelt dem anderer rezessiver Parkinson-Syndrome [51]. Bisher sind nur wenige Mutationen in diesem Gen beschrieben worden [12, 64, 65]. Die normale Funktion von DJ-1 ist ebenso unbekannt wie seine Rolle beim Untergang dopaminerger Neurone. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung bei der Bewältigung oxidativen Stresses als intrazellulärer Sensor [19] und eine Mitregulation der Mitochondrienfunktion. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass das Wildtyp-DJ-1-Protein bei oxidativem Stress durch die Oxidation einer bestimmten Aminosäure in Mitochondrien hinein transloziert wird [76]. Weitere Hinweise auf seine neuroprotektive Funktion ergeben sich durch die Beobachtung, dass eine experimentell reduzierte Expression von DJ-1 in einer gesteigerten Anfälligkeit einer Zelle gegenüber Umweltgiften wie MPTP resultiert [76].

DJ-1 wird hauptsächlich in den Astrozyten exprimiert, was die Bedeutung der glial-neuronalen Interaktion beim Parkinson-Syndrom unterstreicht [5]. Die vermeintlich neuroprotektive Rolle von DJ-1 gegen oxidativen Stress spiegelt sich auch in erhöhter DJ-1-Konzentrationen im Liquor beim sporadischen Parkinson-Syndrom vor allem zu Beginn der Erkrankung wider [184].

1.5.1.5 PARK8: *LRRK2*

1.5.1.5.1 Entdeckung von *LRRK2*

LRRK2 ist ein Gen, das sich in der Zentromerregion von Chromosom 12 befindet. Kopplungen zu diesem Genort wurden zum ersten Mal bei einer sehr großen japanischen Familie (Sagamihara-Familie) mit autosomal-dominant vererbtem Parkinson-Syndrom beschrieben. Die Betroffenen zeigten dabei Zeichen eines typischen Parkinson-Syndroms, das gut auf L-Dopa-Therapie ansprach und im 6. Lebensjahrzehnt begonnen hatte [43].

Zwei Arbeitsgruppen konnten unabhängig voneinander durch Untersuchungen von Genen in der Kandidatenregion auf Chromosom 12 Mutationen in *LRRK2* als Ursache von mit PARK8 assoziiertem Parkinsonismus nachweisen [129, 209].

Inzwischen ist in einer Vielzahl von Studien gezeigt worden, dass *LRRK2*-Mutationen die häufigste genetische Ursache des idiopathischen Parkinson-Syndroms darstellen [51, 111], wodurch die Bedeutung, die dieses Gen in der Aufklärung der Entstehung von Parkinsonismus haben könnte, unterstrichen wird [114].

1.5.1.5.2 Pleomorphe Pathologie

LRRK2-Mutationsträger weisen ein besonderes und einzigartig weites Spektrum neuropathologischer Veränderungen auf. Selbst innerhalb ein und derselben Familie ließen sich so die verschiedensten Befunde erheben, die bislang unterschiedlichen Gruppen neurodegenerativer Erkrankungen zugeordnet wurden. Dies zeigte sich besonders bei der Autopsie von 4 Angehörigen der Familie D. Diese lieferte vom pathologischen Bild eines typischen Parkinson-Syndroms mit Lewy-Körperchen im Hirnstamm über eine diffuse Lewy-Körperchen-Pathologie bis hin zu einer Degeneration der Substantia nigra ohne charakteristische Einschlüsse die verschiedensten Ergebnisse. Besonders erstaunlich war hierbei, dass eines der autopsierten Familienmitglieder sogar Tau-immunoreaktive neuronale und gliale Einschlüsse aufwies, die in dieser Form vor allem für PSP charakteristisch sind [199]. Bei der neuropathologischen Untersuchung eines Individuums einer anderen Familie mit familiärem Parkinson-Syndrom und bestätigter Punktmutation in Exon 41 von *LRRK2* ließen sich ebenfalls 4R-Tau-positive Ablagerungen mit PSP-typischem Verteilungsmuster nachweisen. Das klinische Erscheinungsbild zeichnete sich dabei durch klassischen Parkinsonismus aus, der sehr schlecht auf L-Dopa-Substitution ansprach. Für das Vorliegen von PSP sprechende klinische Zeichen lagen nicht vor [141].

In einer weiteren Familie zeigte sich neben den Parkinson-typischen Veränderungen bei zwei Patienten klinisch eine Amyotrophie und neuropathologisch entsprechend ein Vorderhornzellverlust zusammen mit ALS-typischen axonalen Sphäroidstrukturen [201].

Bei einem Mitglied der Sagamihara-Familie mit nachgewiesener I2020T-Mutation in Exon 31 von *LRRK2* wurden bei der neuropathologischen

Untersuchung gliale zytoplasmatische Einschlüsse entdeckt, die für das Vorliegen einer Multisystematrophie sprechen [43, 44].

1.5.1.5.3 Molekularbiologischer Aufbau von *LRRK2*

LRRK2 ist ein außergewöhnlich großes Gen, das 51 Exons umfasst und für ein 2.527 Aminosäuren großes Protein kodiert, welches auch als „Dardarin“, nach dem baskischen Wort für Tremor, bezeichnet wird [129]. Es ist 280 kDa schwer und gehört zur Familie der vor einigen Jahren definierten Gruppe der ROCO-Proteine [13]. Sequenzanalysen zeigen, dass es multiple, voneinander unabhängige Domänen umfasst. Zu diesen gehören eine Roc-GTPase-Domäne (Roc = Ras of complex proteins), eine Protein-Kinase-Domäne der Familie der MAPKKK und außerdem je eine WD40- und eine Leucin-reiche-Repeat-Domäne. Die Funktion einer zusätzlichen Domäne, die sich C-terminal der GTPase befindet und COR (für carboxy-terminal of Ras) genannt wird, ist unbekannt.

Das Gen wird in allen Regionen des Gehirns sowie allen peripheren, bis heute untersuchten Geweben exprimiert [51]. Interessanterweise ist die Expressionsrate von *LRRK2* in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra überraschend niedrig, scheint aber in den striatalen Zielzellen dopaminergere Projektionen umso höher zu sein [48]. Auf intrazellulärer Ebene ist es vornehmlich im Zytoplasma lokalisiert, kann aber wohl Verbindungen mit Membranstrukturen wie etwa dem Golgi-Apparat, synaptischen Vesikeln, der Plasmamembran, Lysosomen und der äußeren Mitochondrienmembran eingehen [10, 48, 68, 159, 176].

1.5.1.5.4 Physiologische Funktion von *LRRK2*

Die genaue Beschreibung der zellbiologischen Funktion von *LRRK2* scheitert zurzeit noch weitestgehend an der Identifikation der physiologischen Substrate des Proteins. Erste Erfolge diesbezüglich sind jedoch erzielt worden. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass *LRRK2* bestimmte, in menschlichen Gehirnen vorkommende Substrate phosphoryliert. Zu diesen gehört Moesin, welches die Bindung zwischen Membranproteinen und dem Zytoskelett durch eine F-actin

bindende Domäne reguliert. Die genaue Bedeutung dieser Entdeckung ist noch unklar [72].

Insgesamt legt die Präsenz mehrerer funktioneller Domänen multiple Funktionen von LRRK2 nahe [209]. Kenntnisse über ähnliche Proteine mit vergleichbarem Aufbau erlauben Vermutungen hinsichtlich der physiologischen Funktion von LRRK2. So ist bekannt, dass Proteine mit LRR-Domänen verschiedene Aufgaben ausüben, zu denen Enzyminhibition, Zelladhäsion, Hormonrezeptor-Interaktionen oder auch die Ubiquitinierung von speziellen Substraten gehören. WD40-Domänen soll eine Rolle bei der Signaltransduktion, dem Prozessieren von pre-mRNA und dem Aufbau des Zytoskeletts zukommen [162], außerdem gelten LRR und WD40 als Protein-Interaktions-Domänen. Daraus lässt sich ableiten, dass LRRK2 womöglich als Gerüst bei der Zusammensetzung von Multiproteinkomplexen fungiert, deren Hauptfunktion in der Signaltransduktion liegen könnte [82].

Die durch die Präsenz der MAPKKK-Domäne implizierte Kinase-Aktivität von LRRK2 konnte in vitro nachgewiesen werden. Sie scheint durch die Bindung von GTP und/oder einer GTPase-Aktivität reguliert zu sein [71, 194]. Folglich ist es möglich, dass mehrere Signaltransduktionskaskaden einen Einfluss auf die Funktion von LRRK2 ausüben könnten [109]. Die Komponenten der einzelnen Signalpfade müssen nun jedoch noch entziffert werden.

Des Weiteren wurden experimentell Hinweise auf die Rolle von *LRRK2*, bzw. homologer Gene anderer Spezies, bei der Ausbildung und Verzweigung von Neuriten und der neuronalen Polarisation gefunden [110, 148].

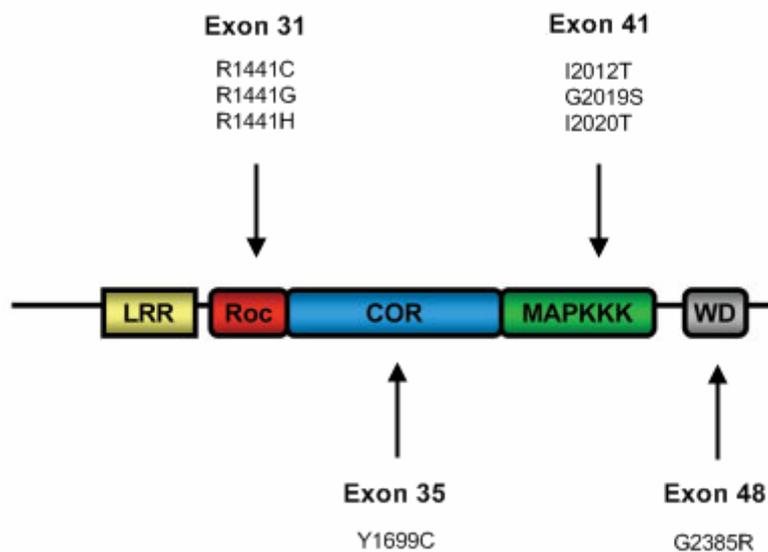
1.5.1.5.5 Pathogene Mutationen, Einfluss der ethnischen Herkunft

Bis zum heutigen Tag sind durch ausführliche Screeninguntersuchungen mehr als 20 Mutationen in *LRRK2* identifiziert worden, von denen mindestens 6 als pathogen gelten [114]. Die meisten der bekannten Mutationen liegen dabei in den für die verschiedenen funktionellen Domänen kodierenden Abschnitten des Gens. Abbildung 1 gibt eine schematische Übersicht, in welcher ausgewählte Mutationen eingetragen sind.

Der G2019S-Mutation kommt dabei besondere Bedeutung zu. In frühen Studien wurde das Vorkommen dieser Mutation bei 5 - 6% der familiären und etwa 1% der sporadischen Fälle berichtet [35, 54, 161, 170]. In der Folgezeit stellte sich jedoch heraus, dass die ethnische Herkunft einen signifikanten Einfluss auf die Häufigkeit des Auftretens der Mutation hat. So ist in 3 unabhängigen Studien mit mehr als 2.000 Parkinson-Fällen und Kontrollen in China kein einziger Patient mit der G2019S-Mutation entdeckt worden [45, 107, 128, 170, 205]. Außergewöhnlich hohe Prävalenzraten fanden sich hingegen bei askenasischen Juden (20%) und nordafrikanischen Arabern (30 bis 40%) [89, 90, 128]. Diese Mutationsträger teilen einen gemeinsamen Haplotyp [75, 91], was einen gemeinsamen Vorfahren nahe legt. Der Haplotyp scheint dabei älter zu sein als die G2019S-Mutation, da er auch in Populationsgruppen mit sehr niedriger Mutationsträgerrate gefunden wird [172].

Weitere Mutationen wiederum kommen bei bestimmten anderen Bevölkerungsgruppen gehäuft vor. So findet sich die R1441G-Mutation in Exon 31 besonders oft bei spanischen Parkinson-Patienten [113]. Eine G2385R-Mutation beobachtet man bei 9% der Patienten und 4% der gesunden Kontrollen in Japan, Singapur und Taiwan, jedoch nicht bei anderen ethnischen Gruppen [169]. I2020T-Mutationen werden gehäuft in Japan beobachtet [180]. Für das selektive Auftreten in bestimmten Populationen werden Gründereffekte (founder effects) verantwortlich gemacht [79].

Abbildung 1: Schematischer Aufbau von *LRRK2* mit ausgewählten Mutationen (modifiziert nach [51])



LRR	=	Leucine rich repeat domaine
MAPKKK	=	Mitogen activated kinase kinase kinase
Roc	=	Ras of complex proteins
WD	=	Beta-Propeller
COR	=	C-terminal of Ras

1.5.1.5.6 Unvollständige Penetranz von *LRRK2*-Mutationen

Auch wenn Mutationen in *LRRK2* als häufigste genetische Ursache für das Entstehen des idiopathischen Parkinson-Syndroms angesehen werden, scheint deren Penetranz nur unvollständig und vor allem altersabhängig zu sein [129, 209]. Für die G2019S-Mutation wurde demonstriert, dass sie in fast linearer Art und Weise von 17% im Alter von 50 auf 85% im Alter von 70 Jahren ansteigt [209]. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass sich die in Asien häufig gefundene G2385R-Mutation dort auch bei 4% der neurologisch unauffälligen Kontrollen nachweisen lässt [169]. Zusätzliche epigenetische bzw. Umweltfaktoren scheinen also für das Entstehen von neurologischen Symptomen von Bedeutung zu sein.

1.5.1.5.7 Pathomechanismus von *LRRK2*-Mutationen

Die mit *LRRK2*-Mutationen assoziierte pleomorphe Pathologie legt multiple Rollen des Genprodukts in zellulären Prozessen von Neuronen nahe. Sowohl die G2019S- als auch die I2020T-Mutation liegen beide im Aktivierungssegment der Kinase-Domäne. Der G2019S-Mutation kommt dabei wegen ihrer Häufigkeit eine besondere Bedeutung zu. Sie soll sich in einer evolutionär hoch konservierten Region der Kinase-Domäne befinden, die basierend auf Strukturhomologien mit anderen Proteinkinasen als Aktivierungsschleife (activation loop) bezeichnet wird [30]. Eine Zunahme der Kinaseaktivität für die G2019S- und die I2020T-Mutation wurde in vitro, dem postulierten gain-of-function-Mechanismus entsprechend, nachgewiesen [56, 193]. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die tatsächlichen in vivo-Verhältnisse gilt als nicht gesichert, da bisher hauptsächlich die Autophosphorylierung des Proteins nachgewiesen wurde. Ob dadurch die tatsächliche Funktion von *LRRK2* akkurat beschrieben werden kann, bleibt fraglich [27].

Die offensichtliche Besonderheit der Kinaseaktivität von *LRRK2* für das Verständnis der Funktion des Proteins wurde erkannt, als nachgewiesen wurde, dass Mutationen in *LRRK2* mit frühem Zelltod assoziiert sind, dieser jedoch durch das Unterbinden der Kinasefunktion verhindert werden kann, unabhängig davon, welche *LRRK2*-Mutation in der jeweiligen Zelle vorliegt. Man kann daraus ableiten, dass eine intakte Kinaseaktivität von *LRRK2* eine für den toxischen Effekt aller *LRRK2*-Mutationen notwendige Voraussetzung ist, auch wenn diese in anderen funktionellen Domänen des Proteins lokalisiert sind [60, 163].

Mutationen in den Roc-GTPase- und LRR-Domänen sollen die Oberflächenstruktur von *LRRK2* ändern und somit eine Protein-Protein-Interaktion behindern [114, 168].

Für die G2385R-Mutation wurde kürzlich in vitro gezeigt, dass Zellen mit dieser Mutation weniger resistent gegen oxidativen Stress sind [174].

Gendosiseffekte scheinen bei bestimmten *LRRK2*-Mutationen keine Rolle zu spielen. Dies legen Beschreibungen von homozygoten G2019S-Mutationsträgern nahe, die im Vergleich zu heterozygoten Trägern keinen

Unterschied in klinischer Erscheinung, Alter zu Beginn und Fortschreiten der Erkrankung aufweisen [70].

1.6 Motivation der Arbeit

Betrachtet man die Fortschritte im Bereich der Parkinsonforschung, wird klar, dass die größten Erfolge in der Aufklärung der molekularen Pathogenese hauptsächlich anhand genetischer Untersuchungen von Familien mit gehäuftem Vorkommen des idiopathischen Parkinson-Syndroms erzielt worden sind. Die Relevanz dieser Entdeckung für atypische Parkinson-Syndrome ist begründet in der Tatsache, dass es zwischen den unterschiedlichen klinisch, genetisch oder neuropathologisch definierten Formen der Parkinson-Syndrome zahlreiche Überlappungen gibt, welche somit auf eine komplexe Interaktion verschiedener, sich gegenseitig beeinflussender, pathogenetisch relevanter Stoffwechselwege hinweisen. Die einzelnen Parkinson-Gene scheinen dabei auf molekularbiologischer Ebene in einem komplexen Netzwerk zu interagieren, so dass Veränderungen in einem Gen zu Störungen in nachgeschalteten Mechanismen führen [173]. Andere Betrachtungsweisen sehen neurodegenerative Erkrankungen sogar als unterschiedliche Ausprägungen derselben zugrunde liegenden genetischen Veränderungen, wodurch die oft diskutierte Bedeutung von epigenetischen und Umweltfaktoren in ätiologische Überlegungen mit einbezogen wird. In der Summe ist somit zu erwarten, dass Fortschritte in der genaueren Aufklärung von in der Entstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms involvierten Pathomechanismen einen Nutzen haben werden, der nicht nur auf diese Form des Parkinsonismus beschränkt bleiben wird. Diese Annahme wird durch die Entdeckung, dass sowohl Tauo- als auch Synukleinopathien mit Veränderungen in *LRRK2* in Verbindung gebracht werden können, mehr als je zuvor gestützt.

Ziel dieser Arbeit ist es, basierend auf den Beschreibungen von pleomorphen neuropathologischen Veränderungen bei *LRRK2*-Mutationsträgern, zu ergründen, ob die bei diesen Patienten beschriebenen Mutationen auch bei MSA- bzw. PSP-Patienten beobachtet werden können.

2 MATERIAL UND METHODEN, PATIENTENAUSWAHL

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Abi Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Eismaschine ZBE	Ziegra Eismaschinen
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
Gelelektrophoresekammern	peqlab Biotechnologie
Magnetrührgerät MR300	Heidolph Instruments
Magnetrührstäbchen	neoLab®
Mikrowellenherd	Panasonic
Multipette® plus	Eppendorf
Photometer Ultraspec 2100 pro	Amersham Biosciences
Pipetten: 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Plexiglaskämme 16 (15 mm)	peqlab Biotechnologie
Spannungsquelle E835 (300 V - 500 mA)	Consort
Thermo-Cycler DNA-Engine DYAD™	Bio-Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage Explorer®	Ohaus
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

2.1.2 Reagenzien für die PCR

MgCl ₂ (25 mM)	Qiagen
Taq-Polymerase (5 units/µl)	Qiagen
PCR-Buffer, 10x (15 mM MgCl ₂)	Qiagen
dNTP-Mix (10 mM)	Qiagen

2.1.3 Reagenzien für die Sequenzierreaktion und Sequenzierung

BigDye® Terminator v3.1	Applied Biosystems
5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems
Hi-Di-Formamid	Applied Biosystems

2.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide wurde von der Firma Qiagen ausgeführt. Die Primersequenzen wurden unter Verwendung der Primer-Design-Software Primer3 (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>) bestimmt und sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Originalsequenzen der Exons 31 und 41 von *LRRK2* mit Teilen der umgebenden Introns und den Primer-Bindungsstellen sind im Ergebnisteil zu finden.

Tabelle 3: Sequenzen der Primer Exon 31 und Exon 41

Exon		Nukleotidsequenz (5'→3')	Fragmentlänge
31	F	AGCAGGCCAGTTTGAAG	332 bp
	R	GACATTTCTAGGCAGTTGAGAATC	
41	F	GCACAGAATTTTTGATGCTTG	331 bp
	R	GAGGTCAGTGGTTATCCATCC	

bp = Basenpaare, F = forward, R = reverse

2.1.5 Puffer

<u>10x TBE-Puffer:</u>	TrisBase	108 g
	Borat	55 g
	EDTA (0,5 M; pH 8)	40 ml

mit H₂O_{dd} auf 1 Liter auffüllen

<u>10x Bromphenolblau-Puffer:</u>	Glycerol	20 ml
	Bromphenolblau	0,04 ml
	Xylencynol	0,04 g

2.1.6 Weitere Reagenzien und Verbrauchsartikel

8er-Tube-Strips 0,2 ml und Deckel	peqlab Biotechnologie
96 Well Plates für Sequencer	Thermo SCIENTIFIC
Agarose SeaKem® LE	Lanza
Borat	Merck
Bromphenolblau	Merck
Combitips für Multipette ®	Eppendorf
Gene Ruler™ Mix 100 - 10.000 bp	Fermentas
EDTA	Merck
Einmal-Küvetten	Plastibrand®
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser)	Merck
Glycerol	Roth
H ₂ O _{dd}	Merck
Natriumacetat	Merck
Parafilm® M	Am. National Can Company
Pipettenspitzen	Eppendorf
Standard 96 Well PCR Plates und Deckel	peqlab Biotechnologie
TrisBase	Roth
Tubes: 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml	peqlab Biotechnologie
Xylencynol	Merck

2.1.7 Verwendete Computerprogramme

Bio Capt	Vilber Lourmat
Sequencing Analysis	Applied Biosystems
Staden-Package	Bonfield et al. 1995

2.1.8 Internetseiten

Helmholtz Center Munich, Institute for Human Genetics:

<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>

National Center of Biotechnology Information (NCBI):

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

University of California, Santa Cruz:

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

2.2 Methoden

2.2.1 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA-Moleküle haben ein Absorptionsmaximum bei Licht der Wellenlänge 260 nm. Diese Tatsache kann zur Konzentrationsbestimmung von in Wasser gelöster DNA verwendet werden. Eine DNA-Lösung mit einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl weist, gemessen in einer Standardküvette der Schichtdicke 1 cm, eine Extinktion von 1,0 auf.

Des Weiteren kann mittels Photometer der Reinheitsgrad von DNA-Lösungen bestimmt werden. Dazu wird zusätzlich zu 260 nm noch Licht der Wellenlängen 230 und 280 nm verwendet. Der Quotient der Extinktionswerte bei den Wellenlängen von 260 und 280 nm sollte >1,7 sein. Der Quotient der Extinktionswerte bei den Wellenlängen von 260 und 230 nm sollte >2,0 betragen. Trifft dies nicht zu, muss davon ausgegangen werden, dass die DNA-Lösung z.B. durch Proteine verunreinigt ist.

Vorgehen:

Zur Messung der DNA-Konzentration wurde die DNA-Lösung zunächst im Verhältnis 1:50 mit H₂O_{dd} verdünnt:

2 µl DNA-Lösung unbekannter Konzentration

98 µl H₂O_{dd}

Die Lösung wurde in eine Standardküvette pipettiert, mittels Vortexer vermenget und die Extinktion anschließend im Photometer gemessen.

2.2.2 Verdünnung der DNA-Lösungen

Für die Durchführung der PCR wurden anhand der zuvor photometrisch bestimmten DNA-Konzentrationen DNA-Lösungen der Konzentration 10 ng/µl erstellt. Zur Verdünnungsberechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

dabei: C_1 : photometrisch bestimmte DNA-Konzentration der ursprünglichen DNA-Lösung

V_1 : Volumen der ursprünglichen DNA-Lösung, das für die Verdünnung benötigt wird

C_2 : gewünschte Konzentration der verdünnten Probe

V_2 : gewünschtes Volumen der verdünnten Probe

In dieser Gleichung ist C_1 aus der zuvor durchgeführten photometrischen Messung bekannt. C_2 soll 10 ng/µl betragen. V_2 wird willkürlich auf 100 µl festgesetzt. Damit sind 3 der 4 in der Gleichung auftretenden Variablen bekannt. Das zur Herstellung von 100 µl DNA-Lösung der Konzentration 10 ng/µl benötigte Volumen der ursprünglichen DNA-Lösung berechnet sich folglich:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1}$$

2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) ist ein Verfahren, welches in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelt wurde und die enzymatische invitro-Amplifizierung einer bestimmten Sequenz eines DNA-Doppelstrangs ermöglicht. Notwendiger Bestandteil der Reaktion ist eine thermostabile DNA-Polymerase, die unter anderem aus dem thermophilen

Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert werden kann. Die DNA-Polymerase synthetisiert dabei, ausgehend von einem Startermolekül (Oligonukleotid oder auch Primer), einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäurematrize, die als Template-DNA bezeichnet wird. Das Prinzip der PCR besteht hierbei in der zyklischen Wiederholung dreier Reaktionsschritte.

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang durch Erhöhen der Temperatur auf über 90 °C thermisch denaturiert, wodurch einzelsträngige Template-DNA-Moleküle entstehen. Anschließend erfolgt eine Abkühlung des Reaktionsansatzes auf etwa 50 - 60 °C. In dieser Phase, die auch als Annealing bezeichnet wird, lagern sich die Oligonukleotide den komplementären Sequenzen der Template-DNA an und ermöglichen es, dass die DNA-Polymerase die beiden Einzelstränge im folgenden Schritt durch das Anbauen der passenden dNTPs von 5' nach 3' zum jeweiligen Doppelstrang komplettiert. Die dabei entstehenden Produkte dienen im nächsten Zyklus als neue Matrize für die DNA-Polymerase und folglich steigt die Konzentration der Zielsequenz mit jedem weiteren Durchgang an. Die zyklische Wiederholung der beschriebenen Schritte führt letztlich zu einer exponentiellen Vervielfältigung der gewünschten Zielnukleotidsequenz.

2.2.4 PCR-Protokolle

2.2.4.1 *LRRK2* Exon 31

Primer: Exon 31 F, Exon 31 R

Reaktionsansatz

Tabelle 4: Reaktionsansatz PCR *LRRK2* Exon 31

Bestandteil	Volumen
PCR-Buffer, 10x (15 mM MgCl ₂)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,4 µl
H ₂ O _{dd}	12,26 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 µl
Primer (10 pmol/µl) (Exon 31 F + Exon 31 R)	je 0,4 µl
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,14 µl
DNA (10 ng/µl)	4 µl

Temperaturschema

Tabelle 5: Temperaturschema PCR *LRRK2* Exon 31

Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	} 35 Zyklen
Annealing	30 s	62 °C	
Elongation	30 s	72 °C	
Finale Elongation	7 min	72 °C	
Kühlung	∞	12 °C	

2.2.4.2 *LRRK2* Exon 41

Primer: Exon 41 F, Exon 41 R

Reaktionsansatz

Tabelle 6: Reaktionsansatz PCR *LRRK2* Exon 41

Bestandteil	Volumen
PCR-Buffer, 10x (15 mM MgCl ₂)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
H ₂ O _{dd}	10,66 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 µl
Primer (10 pmol/µl) (Exon 41 F + Exon 41 R)	je 0,4 µl
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,14 µl
DNA (10 ng/µl)	4 µl

Temperaturschema

Tabelle 7: Temperaturschema PCR *LRRK2* Exon 41

Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	} 35 Zyklen
Annealing	30 s	60 °C	
Elongation	30 s	72 °C	
Finale Elongation	7 min	72 °C	
Kühlung	∞	12 °C	

Negativprobe

Zum Ausschluss einer Verunreinigung des Reaktionsansatzes wurde bei jeder PCR eine Negativprobe mitgeführt, bei welcher die DNA-Lösung durch 4 µl H₂O_{dd} ersetzt wurde.

2.2.5 Ethanolfällung und -aufreinigung der PCR- und Sequenzierreaktionsprodukte

Die Ethanolfällung und -aufreinigung dient dazu, die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente von den Resten der anderen Reaktionskomponenten zu reinigen. Hierbei kommt das Prinzip zum Tragen, dass Nukleinsäuren aus salzhaltigen wässrigen Lösungen präzipitiert werden.

Vorgehen:

1. Schritt: Zum Ausfällen der DNA wurden 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und 2,5 Volumina 100%igen Ethanols zu den PCR-Reaktionsprodukten hinzugegeben:

20 µl PCR-Produkt
48 µl 100%iges Ethanol
2 µl Natriumacetat (3M)

2. Schritt: Es folgte eine 45minütige Zentrifugation mit 3220 U/min. Anschließend wurden die Proben aus der Zentrifuge entnommen und der Überstand in den Reaktionsgefäßen vorsichtig abgekippt.
3. Schritt: Die entstandenen Pellets wurden anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei 3220 U/min 20 Minuten lang zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt.
4. Schritt: Nach Beendigung von Schritt 3 wurde der Überstand erneut abgekippt und die Proben zum Trocknen der Pellets kopfüber und mit Zellstoff unterlegt eine Minute lang bei 600 g zentrifugiert.
5. Schritt: Die fertig aufgereinigten Proben wurden in 15 µl H₂O_{dd} durch Vortexen auf geringer Stufe gelöst.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein molekularbiologisches Verfahren, welches es erlaubt, Moleküle unterschiedlicher Größe und Ladung unter Zuhilfenahme eines elektrischen Feldes zu trennen. Als Trägermatrix dient ein elektrisch neutrales Agarosegel. Die Geschwindigkeit, mit der DNA-Moleküle durch das Gel wandern können, nimmt proportional zu ihrer Größe ab, hängt jedoch auch mit der DNA-Konformation, der Gelkonzentration, dem Laufpuffer und der angelegten Spannung zusammen. Zur Darstellung der entstehenden Banden wird dem Agarosegel bei dessen Herstellung Ethidiumbromid zugegeben, welches zwischen die Basen der DNA interkaliert, was dazu führt, dass die DNA in ultraviolettem Licht fluoresziert und somit sichtbar wird.

Vorgehen:

Herstellung von Agarosegel

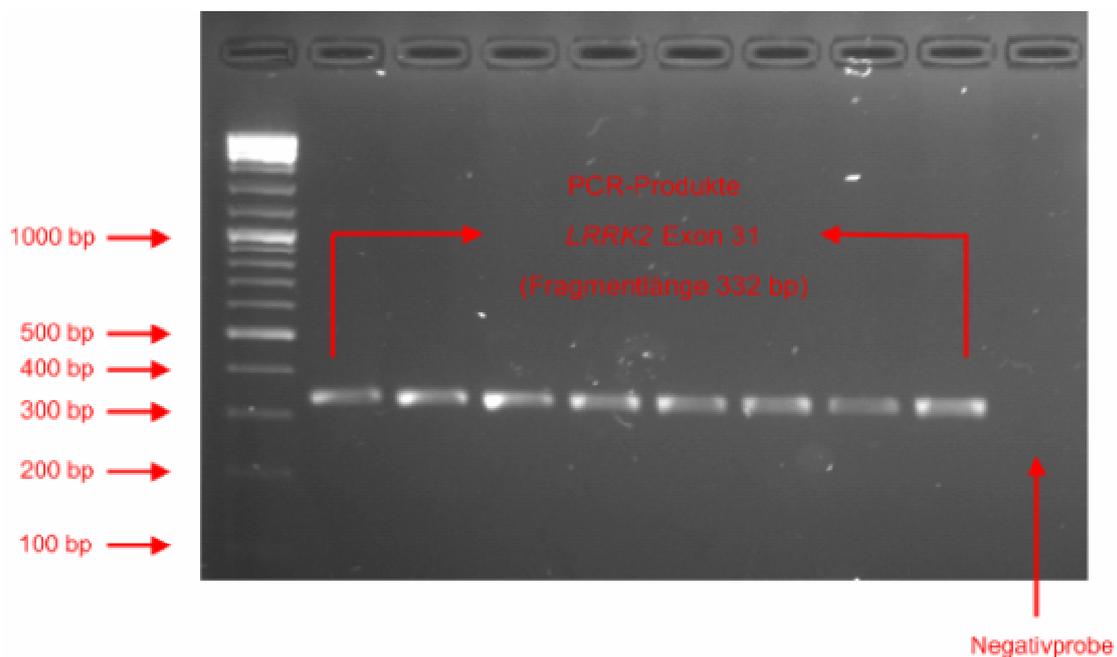
Es wurden 2%ige Agarose-Gele verwendet. Zur Herstellung wurden 2 g Agarose mit 100 ml 0,5x TBE-Puffer vermengt und in der Mikrowelle mehrere Minuten so lange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig im Puffer gelöst hatte. Die Lösung wurde anschließend unter Verwendung eines Magnetrührgerätes abgekühlt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 6 µl Ethidiumbromid. Nachdem sich das Ethidiumbromid gleichmäßig in der Lösung verteilt hatte, wurde das Gel zum Aushärten in eine Gelkammer gegossen und mit Plexiglaskämmen zur Ausbildung von Geltaschen bestückt. Dort wurde es etwa eine Stunde zum Auskühlen belassen, bevor die Kämmen wieder entfernt wurden.

Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Um das Gelingen der jeweiligen PCR nachzuweisen, fand stets eine Gelelektrophorese der PCR-Produkte statt. Es wurden dabei immer 5 µl amplifizierten PCR-Produktes mit etwa 1 µl Bromphenolblau-Puffer auf einem kleinen Stück Parafilm vermengt, durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette

gut durchmischt und schließlich in die Geltaschen pipettiert. Die erste Geltasche wurde zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente mit 5 µl DNA-Ladder, die letzte zum Ausschluss von Verunreinigungen mit der Negativprobe bestückt. An die Gelelektrophoresekammer wurde eine Spannung von 200 V angelegt und der Lauf nach etwa einer Stunde beendet. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht betrachtet und das Ergebnis mittels Geldokumentationssystem fotografiert.

Abbildung 2: Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit Negativprobe



bp = Basenpaare

2.2.7 Sequenzierung mittels Kettenabbruchverfahren nach Sanger

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten DNA-Sequenzierung liegt die Kettenabbruchmethode nach Sanger zu Grunde [149]. Wie bei einer gewöhnlichen PCR synthetisiert die DNA-Polymerase anhand der Vorlage eines DNA-Stranges (Template-DNA) einen basenkomplementären Gegenstrang. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht nun darin, die Entstehung des komplementären DNA-Stranges an einer bestimmten Stelle abubrechen und damit Rückschlüsse auf die zu bestimmende Sequenz zu bekommen.

Im Reaktionsansatz befinden sich bei der Sequenzierreaktion dabei für den Kettenabbruch neben 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs). Die vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) sind hierbei jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Wird nun im Verlauf der Sequenzierreaktion von der DNA-Polymerase anstelle eines dNTPs ein ddNTP in den entstehenden komplementären Gegenstrang eingebaut, so bricht die Kettenverlängerung an dieser Stelle ab, da dem ddNTP eine 3'-Hydroxylgruppe fehlt, die für die Bildung von Diesterbrücken zwischen den einzelnen Nukleotiden notwendig ist. Die Verwendung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter ddNTPs erlaubt die Durchführung der Sequenzierreaktion in nur einem Ansatz. Da die entstehenden, unterschiedlich langen Nukleotidketten jeweils mit einer der vier fluoreszenzmarkierten Basen enden, kann die Nukleotidsequenz mit Hilfe des laseroptischen Systems eines Kapillarsequenzierers ermittelt werden.

2.2.8 Sequenzierreaktion

Sequenzierprimer

Es wurden dieselben Primer wie bei den oben beschriebenen PCR-Ansätzen verwendet: Exon 31 F, Exon 31 R, Exon 41 F, Exon 41 R.

Reaktionsansatz

Tabelle 8: Reaktionsansatz Sequenzierreaktion

Bestandteil	Volumen
aufgereinigtes PCR-Produkt	4 µl
5x Sequencing Buffer	1 µl
entsprechender Primer	1 µl
BigDye®	2 µl
H ₂ O _{dd}	2 µl

Temperaturschema**Tabelle 9: Temperaturschema Sequenzierreaktion**

Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	} 35 Zyklen
Annealing	30 s	50 °C	
Elongation	30 s	72 °C	
Kühlung	∞	12 °C	

Damit beide DNA-Stränge des amplifizierten PCR-Produkts einzeln sequenziert werden können, wurden 2 separate Reaktionen jeweils entweder mit den forward- oder reverse-Primern angesetzt. Die entstehenden Sequenzierreaktionsprodukte wurden wie oben beschrieben aufgereinigt.

2.2.9 Ermittlung der Nukleotidsequenz mittels Kapillarsequenzierer

Die DNA-Fragmente werden durch die Kapillarelektrophorese gemäß ihrer Größe voneinander getrennt und schließlich an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Die verschiedenen ddNTPs am Ende der einzelnen Fragmente werden hierbei zur Emission von Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt, welches durch einen Sensor detektiert wird. Die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor registriert wird, gibt die Nukleotidfolge des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

Vorgehen:

Die Sequenzierung der aufgereinigten Sequenzierreaktionsprodukte erfolgte mit dem Abi Prism Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems), einem Gerät zur automatischen Sequenzierung fluoreszenzmarkierter Abbruchprodukte mittels Kapillarelektrophorese. Jeweils 7 µl aufgereinigten Sequenzierreaktionsproduktes wurden mit 15 µl Formamid zusammenpipettiert.

2.2.10 Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzanalyse erfolgte mit den Programmen Pregap4 und Gap4 aus dem Staden-Software-Paket. Die jeweiligen Patienten-Sequenzen wurden mit den Wildtyp-Sequenzen der Exons 31 und 41 von *LRRK2* abgeglichen. Zusätzlich zur softwareunterstützten Mutationsdetektion wurden sämtliche Sequenzen visuell vollständig auf Abweichungen in der Basensequenz untersucht. Die dazu benötigten *LRRK2*-Originalsequenzen wurden über die beiden oben genannten Internetseiten des NCBI und der UCSC bezogen.

2.3 Patientenauswahl

2.3.1 Herkunft der Patientenproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit DNA-Proben von Patienten gearbeitet, die entweder an PSP oder MSA erkrankt sind. Die Proben lagen dabei bereits fertig aufbereitet vor, so dass keine Extraktion der DNA aus Blutproben notwendig war. Die jeweilige DNA-Konzentration war in den meisten Fällen nicht bekannt, so dass diese zunächst bestimmt werden musste und eine entsprechende Verdünnung der Proben auf 10 ng/µl erfolgte.

Alle DNA-Proben der PSP-Patienten stammten aus dem eigenen Bestand der Abteilung für Neurodegeneration der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Die DNA-Proben der MSA-Patienten stammten aus insgesamt 5 europäischen Ländern: Dänemark, Italien, Deutschland, Österreich und Schweden. Tabelle 10 und 11 geben einen Überblick über Anzahl, Herkunft und Zentrum der verwendeten DNA-Proben.

Tabelle 10: Anzahl und Herkunft der PSP-Patienten

Zentrum	Anzahl an Patienten	Herkunft
Tübingen	88	deutsch

Tabelle 11: Anzahl und Herkunft der MSA-Patienten

Zentrum	Anzahl an Patienten	Herkunft
Innsbruck	22	österreichisch
Bonn	55	deutsch
Marburg	42	deutsch
Aarhus	9	dänisch
Lund	5	schwedisch
Mailand	8	italienisch
Tübingen	78	deutsch
gesamt	219	

2.3.2 Diagnosekriterien

MSA und PSP sind zwei Erkrankungen, deren Diagnose ante mortem nur rein klinisch unter Verwendung von Konsensuskriterien gestellt werden kann. Die Patienten, die in dieser Arbeit eingeschlossen wurden, hatten alle eine klinische Diagnose ihrer jeweiligen Erkrankung. Je nach beteiligtem Zentrum wurde nicht bei allen MSA-Patienten die exakte Gilman-Einteilung angegeben. Bei den PSP-Patienten erfolgte keine Unterteilung in mögliche und wahrscheinliche PSP. Des Weiteren wurde eine Unterteilung in PSP-Parkinsonismus und Richardson-Syndrom nicht vorgenommen.

2.3.2.1 Klinische Diagnose der Multisystematrophie nach Gilman

Zur klinischen Diagnose der MSA werden Konsensuskriterien verwendet, die 1999 von Gilman et al. formuliert wurden [55]. Dabei werden vier charakteristische Symptome der Krankheit betrachtet und deren Auftreten unterschiedlich stark gewichtet. Insgesamt werden 3 diagnostische Kategorien mit steigender Sicherheit definiert: möglich (possible), wahrscheinlich (probable) oder sicher (definite). Die Diagnosen der möglichen und wahrscheinlichen MSA beruhen auf dem Vorhandensein klinischer Symptome unter Berücksichtigung von Ausschlusskriterien. Eine sichere Diagnose kann nur neuropathologisch gestellt werden. Die Diagnosekriterien nach Gilman sind in folgender Tabelle zusammengefasst. Dabei sind unter A charakteristische Krankheitsmanifestationen aufgeführt. B bezeichnet die Kriterien, welche sich aus einem oder auch mehreren Symptomen aus A zusammensetzen.

Tabelle 12: Kriterien für die klinische Diagnose der MSA nach Gilman et al.

I. Autonome Dysfunktion und Blasenentleerungsstörung

A. Autonome und urologische Symptome

1. Orthostatische Hypotonie (≥ 20 mmHg systolisch oder ≥ 10 mmHg diastolisch)
2. Harninkontinenz oder Harnretention

B. Diagnostisches Kriterium

Orthostatischer Blutdruckabfall (≥ 30 mmHg systolisch oder ≥ 15 mmHg diastolisch) oder Harninkontinenz (persistierende, unwillkürliche, partielle oder komplette Blasenentleerung mit erektiler Dysfunktion) oder beides

II. Parkinson-Syndrom

A. Parkinson-Symptome

1. Bradykinese (Verlangsamung in der Initiation und Ausführung von Willkür- mit progredienter Verminderung der Geschwindigkeit und Amplitude repetitiver Bewegungen)
2. Rigor
3. Standunsicherheit (nicht durch primär visuelle, vestibuläre, zerebelläre oder propriozeptive Störungen verursacht)
4. Tremor (Haltetremor, Ruhetremor oder beides)

B. Diagnostisches Kriterium

Bradykinese und mindestens ein weiteres Parkinson-Symptom (2 - 4)

III. Zerebelläre Ataxie

A. Zerebelläre Symptome

1. Gangataxie (breitbasig, irreguläre Schrittlänge und Richtungsabweichung)
2. Ataktische Dysarthrie
3. Ataxie der Gliedmaßen
4. anhaltender Blickrichtungsnystagmus

B. Diagnostisches Kriterium

Gangataxie und mindestens ein weiteres zerebelläres Symptom (2 - 4)

IV. Pyramidenbahnläsionen

A. Pyramidenbahnzeichen, Babinski-Zeichen mit Hyperreflexie

B. Diagnostisches Kriterium

Es wird kein diagnostisches Kriterium definiert, Pyramidenbahnzeichen werden nicht zur Sicherung der Diagnose einer wahrscheinlichen MSA herangezogen.

Die Einteilung in die 3 diagnostischen Kategorien (möglich, wahrscheinlich, gesichert) wird unter Zuhilfenahme von Tabelle 12 wie folgt durchgeführt:

Tabelle 13: Diagnostische Kategorien der MSA nach Gilman et al.

I. Mögliche MSA

Ein Kriterium (I-B, II-B, III-B) und zwei weitere Symptome aus separaten Domänen

II. Wahrscheinliche MSA

Kriterium I-B und ein L-Dopa-refraktäres* Parkinson-Syndrom oder eine zerebelläre Ataxie

III. Gesicherte MSA

Histopathologisch hohe GCI-Dichte sowie Degeneration der nigrostriatalen und olivopontozerebellären Projektionen

*) Das Ansprechen auf L-Dopa soll über einen Zeitraum von 3 Monaten bei einer Tagesdosis bis zu 1 g beurteilt werden.

GCI: gliale zytoplasmatische Einschlüsse

Eine Reihe von Ausschlusskriterien für eine MSA-Diagnose sind definiert worden:

Tabelle 14: Ausschlusskriterien für die Diagnose MSA nach Gilman et al.

I. Anamnestisch

Beginn vor dem 30. Lebensjahr, positive Familienanamnese, sekundäre Ursachen, spontane Halluzinose

II. Neurologische Untersuchung

DSM IV-Kriterien für Demenz, Verlangsamung der vertikalen Sakkaden oder vertikale supranukleäre Blickparese, fokale kortikale Störungen wie Aphasie, „Alien-Limb“-Phänomen und partielle Dysfunktion

III. Labor

Metabolische, molekularbiologische und bildgebende Hinweise für eine andere Ursache der Krankheitssymptome, die in Tabelle 12 aufgeführt sind.

DSM IV: Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders

2.3.2.2 Klinische Diagnose der Progressiven Supranukleären Blickparese

1995 definierten das „National Institute of Neurological Disorders and Stroke“ (NINDS) und die „Society for PSP“ (SPSP) klinische Diagnosekriterien für die PSP [98], die 2003 überarbeitet wurden und seither eine Einteilung in mögliche (possible), wahrscheinliche (probable) oder gesicherte (definite) PSP erlauben [99].

Tabelle 15: NINDS-SPSP Diagnosekriterien für PSP

Mögliche PSP

- chronisch progrediente Erkrankung
- Alter > 40 Jahre zu Beginn der Erkrankung
- vertikale supranukleäre Blickparese
oder
- Verlangsamung vertikaler Blicksakkaden mit Haltungsinstabilität und Sturzereignissen innerhalb des ersten Jahres

Wahrscheinliche PSP

- chronisch progrediente Erkrankung
- Alter > 40 Jahre zu Beginn der Erkrankung
- vertikale supranukleäre Blickparese
und
- Verlangsamung vertikaler Blicksakkaden mit Haltungsinstabilität und Sturzereignissen innerhalb des ersten Jahres

Gesicherte PSP

- neuropathologischer Befund, der die mögliche oder wahrscheinliche Diagnose bestätigt

Überdies wurde eine Reihe von Ausschlusskriterien definiert, die in folgender Tabelle zusammengestellt sind und vor allem der Unterscheidung der PSP von anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie MSA, Morbus Pick oder Morbus Alzheimer dienen sollen:

Tabelle 16: Ausschlusskriterien der PSP nach Litvan et al. 2003

- Enzephalitis in der jüngsten Vergangenheit
- Alien-Limb Syndrom
- kortikale Sensibilitätsdefizite
- fokale frontale oder temporoparietale Atrophie
- Halluzinationen oder illusionäre Verkennungen, die nicht in Zusammenhang mit einer L-Dopa-Therapie stehen
- Kortikale Demenz vom Alzheimer-Typ
- im Vordergrund stehende zerebelläre Symptome oder unerwartete Dysautonomien
- Hinweise auf eine andere Erkrankung, die die klinischen Symptome erklären könnte

3 ERGEBNISSE

Um die Bedeutung, die *LRRK2* in der Ätiologie atypischer Parkinson-Syndrome haben könnte, zu ergründen, wurden im Rahmen dieser Arbeit DNA-Proben von PSP- und MSA-Patienten auf bereits bekannte, unterschiedlich häufig auftretende Mutationen des Gens gescreent.

88 Patienten mit klinisch gestellter PSP-Diagnose wurden durch direktes Sequenzieren auf Missensemutationen in der Nukleotidsequenz von Exon 31 untersucht. In diesem Bereich sind insgesamt 3 Punktmutationen bekannt, die jeweils zum Austausch der Aminosäure in Position 1441 von *LRRK2* führen (siehe Tabelle 17).

Die rationale Grundlage für die Screeninguntersuchung in diesem Exon bildet der neuropathologische Befund, den die Untersuchungen eines Patienten mit der *LRRK2*-Mutation R1441C erbrachte. Es fanden sich hierbei Tau-positive Ablagerungen in PSP-typischer Verteilung. Des Weiteren existiert die Beschreibung eines R1441H-Mutationsträgers, bei dem sich nach Jahren eines typischen Parkinson-Syndroms Symptome einer PSP entwickelt hatten.

Tabelle 17: Untersuchte Mutationen in Exon 31 von *LRRK2*

Exon	Nukleotidänderung	Aminosäureänderung
31	4321c>t	R1441C
	4321c>g	R1441G
	4322g>a	R1441H

Um festzustellen, inwiefern *LRRK2*-Mutationen in der Ätiologie der Multisystematrophie eine Rolle spielen, wurden 219 Patienten mit klinisch gestellter MSA-Diagnose hinsichtlich der 3 benachbarten Mutationen I2012T, G2019S und I2020T in Exon 41 gescreent. Die dazugehörigen Nukleotidänderungen sind in Tabelle 18 dargestellt und zusammengefasst.

Die Screeninguntersuchung wurde hierbei in Exon 41 durchgeführt, da ein Mitglied der Sagamihara-Familie mit nachgewiesener I2020T-Mutation eine neuropathologisch gesicherte MSA aufwies. Außerdem konnte aufgrund der bedeutenden Rolle, welche die G2019S-Mutation bei der Entstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms spielt, vermutet werden, dass überdies ätiologische Verbindungen zu weiteren Synukleinopathien wie MSA bestehen. Die I2012T-Variante tritt hingegen nur selten auf und wurde hauptsächlich wegen der Lokalisation in Exon 41 in diese Arbeit miteinbezogen.

Tabelle 18: Untersuchte Mutationen in Exon 41 von *LRRK2*

Exon	Nukleotidänderung	Aminosäureänderung
41	6044t>c	I2012T
	6055g>a	G2019S
	6059t>c	I2020T

Ziel der Untersuchung war es, durch den Nachweis von Mutationen in *LRRK2* bei MSA- und PSP-Patienten eine potentiell zentrale Rolle des Gens in der Entstehung neurodegenerativer, mit Parkinsonismus einhergehender Prozesse zu ergründen.

3.1 Auswertung der Patientendaten

3.1.1 PSP-Patienten

3.1.1.1 Herkunft der Patientenproben

Es wurden ausschließlich DNA-Proben von PSP-Patienten verwendet, die aus dem eigenen Bestand der Universität Tübingen stammten. Insgesamt wurden 88, meist deutschstämmige, Patientenproben untersucht. Tabelle 19 gibt eine Übersicht.

Tabelle 19: Zusammenfassung der klinischen Daten der PSP-Patienten

Zentrum	Patientenzahl	Geschlecht: männlich(%)/ weiblich(%)	Alter bei Erkrankungs- beginn (\pm SD) (range)	Herkunft
Tübingen	88	55 (51,1%)/ 53 (48,9%)	64,3 (\pm 6,4) (50 - 76) (bei 24 Patienten AaO unbekannt)	86 deutsch 1 indisch 1 südosteuro- päisch

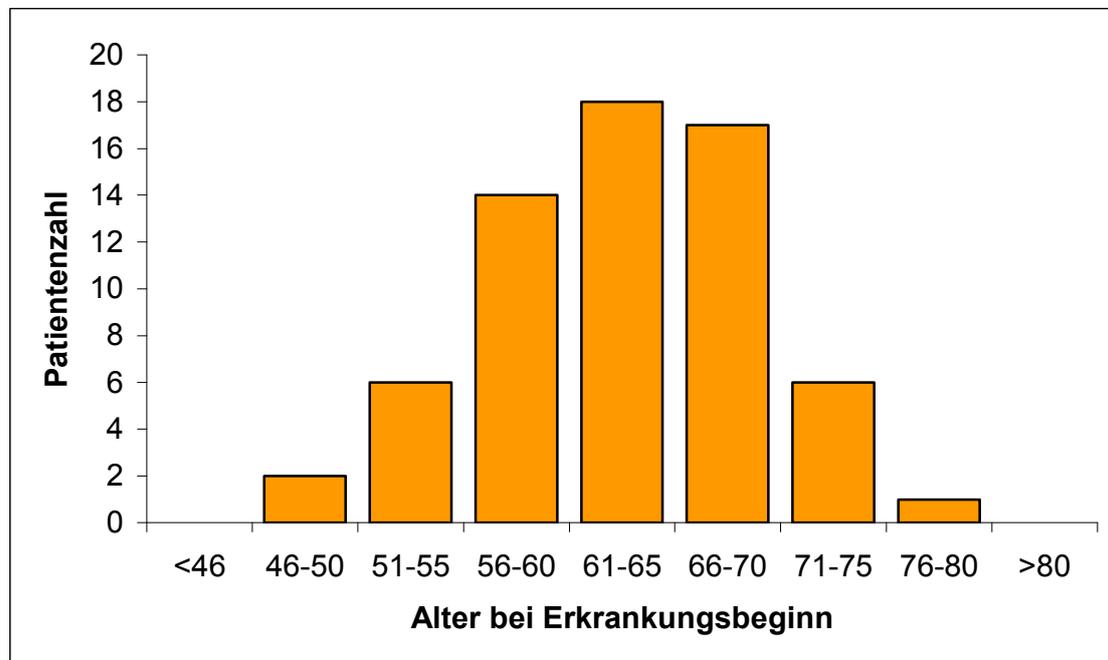
SD = Standard Deviation (= Standardabweichung)

range = Spannweite

AaO = Age at Onset (= Alter bei Erkrankungsbeginn)

3.1.1.2 Verteilung: Alter bei Erkrankungsbeginn

Abbildung 3: Verteilung Alter bei Erkrankungsbeginn der PSP-Patienten



Bei 24 der 88 PSP-Patienten waren keine Angaben zum Alter bei Erkrankungsbeginn verfügbar.

3.1.1.3 H1/H2-Haplotyp

Es waren Haplotyp-Daten zu 76 der 88 (86,4%) untersuchten PSP-Patienten vorhanden. 65 (85,5%) der Patienten wiesen den Genotyp H1/H1 auf, 11 (14,5%) den Genotyp H1/H2. Der Genotyp H2/H2 kam bei keinem Patienten vor. Daraus ergibt sich für das untersuchte Patientenkollektiv eine H2-Haplotypfrequenz von 92,8%. Tabelle 20 gibt eine Übersicht.

Tabelle 20: H1/H2-Haplotypdaten der PSP-Patienten

Patienten mit Haplotyp-Daten	76 (86,4%)
Genotypen-Verteilung:	
H1/H1	65 (85,5%)
H1/H2	11 (14,5%)
H2/H2	0
Haplotypen-Frequenzen:	
H1	92,8%
H2	7,2%

3.1.2 MSA-Patienten

3.1.2.1 Herkunft der Patientenproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Proben von Patienten aus 5 europäischen Staaten verwendet: Deutschland, Österreich, Italien, Dänemark und Schweden. Tabelle 21 gibt eine Übersicht über die Patientendaten.

Tabelle 21: Zusammenfassung der klinischen Daten der MSA-Patienten

Zentrum	Patientenzahl	Geschlecht: männlich(%)/ weiblich(%)	Alter bei Erkrankungs- beginn (\pm SD) (range)	Herkunft
Innsbruck	22	13 (59,1%)/ 9 (40,9%)	57,0 (\pm 5,8) (49 - 70)	österreichisch
Bonn	55	26 (47,3%) 29 (52,7%)	60,0 (\pm 8,6) (46 - 73)	deutsch
Marburg	42	20 (47,6%)/ 22 (52,4%)	61,2 (\pm 9,5) (42 - 78)	deutsch
Aarhus	9	3 (33,3%) 6 (66,7%)	55,5 (\pm 6,2) (43 - 63)	dänisch
Lund	5	4 (80,0%) 1 (20,0%)	60,8 (\pm 8,3) (55 - 75)	schwedisch
Mailand	8	4 (50,0%)/ 4 (50,0%)	57,4 (\pm 7,1) (49 - 68)	italienisch
Tübingen	78	45 (58,4%)/ 32 (41,6%) 1 x unbekannt	56,1 (\pm 7,7) (36 - 71)	deutsch
gesamt	219	115 (52,7%)/ 103 (47,3%) (1 x unbe- kannt)	58,0 (\pm 8,1) (36 - 78)	

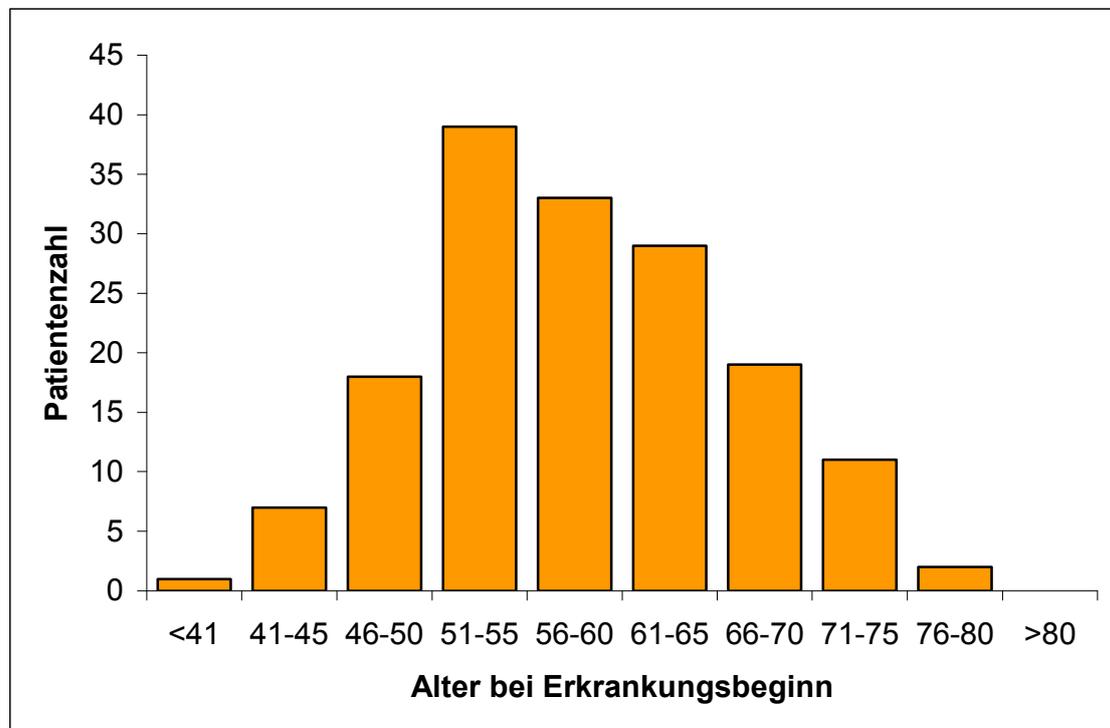
SD = Standard Deviation (= Standardabweichung)

range = Spannweite

AaO = Age at Onset (= Alter bei Erkrankungsbeginn)

3.1.2.2 Verteilung: Alter bei Erkrankungsbeginn

Abbildung 4: Verteilung Alter bei Erkrankungsbeginn der MSA-Patienten



Bei 65 der 224 Patienten waren keine Angaben zum Alter bei Erkrankungsbeginn verfügbar.

3.1.2.3 Diagnosekategorien der MSA-Patienten

Beim Großteil der in dieser Untersuchung eingeschlossenen MSA-Patienten lag die klinische Diagnose gemäß der Konsensuskriterien nach Gilman mit Unterteilung in possible und probable vor (definite entfiel hierbei, da keine pathologisch gesicherten MSA-Fälle vorlagen). Eine Unterteilung in MSA-P und MSA-C war bei 18 Patienten nicht möglich. 2 Fälle wurden als MSA-P und -C eingeordnet. Tabelle 22 gibt eine Übersicht, die Abbildungen 5 und 6 eine graphische Darstellung zur Verteilung der MSA-Subtypen.

Tabelle 22: Diagnosekategorien der MSA-Patienten

MSA-Subtyp	Patientenzahl
<i>ohne</i> Unterteilung in probable und possible nach Gilman:	47
<u>Diagnosen:</u>	
MSA	8
MSA-C	15
MSA-P	24
<i>mit</i> Unterteilung in probable und possible nach Gilman:	172
<u>Diagnosen:</u>	
MSA (probable)	3
MSA (possible)	7
MSA-C (probable)	44
MSA-C (possible)	28
MSA-P (probable)	56
MSA-P (possible)	32
MSA-C und P (probable)	2

Abbildung 5: Kreisdiagramm zur Verteilung der Diagnosekategorien der MSA-Patienten

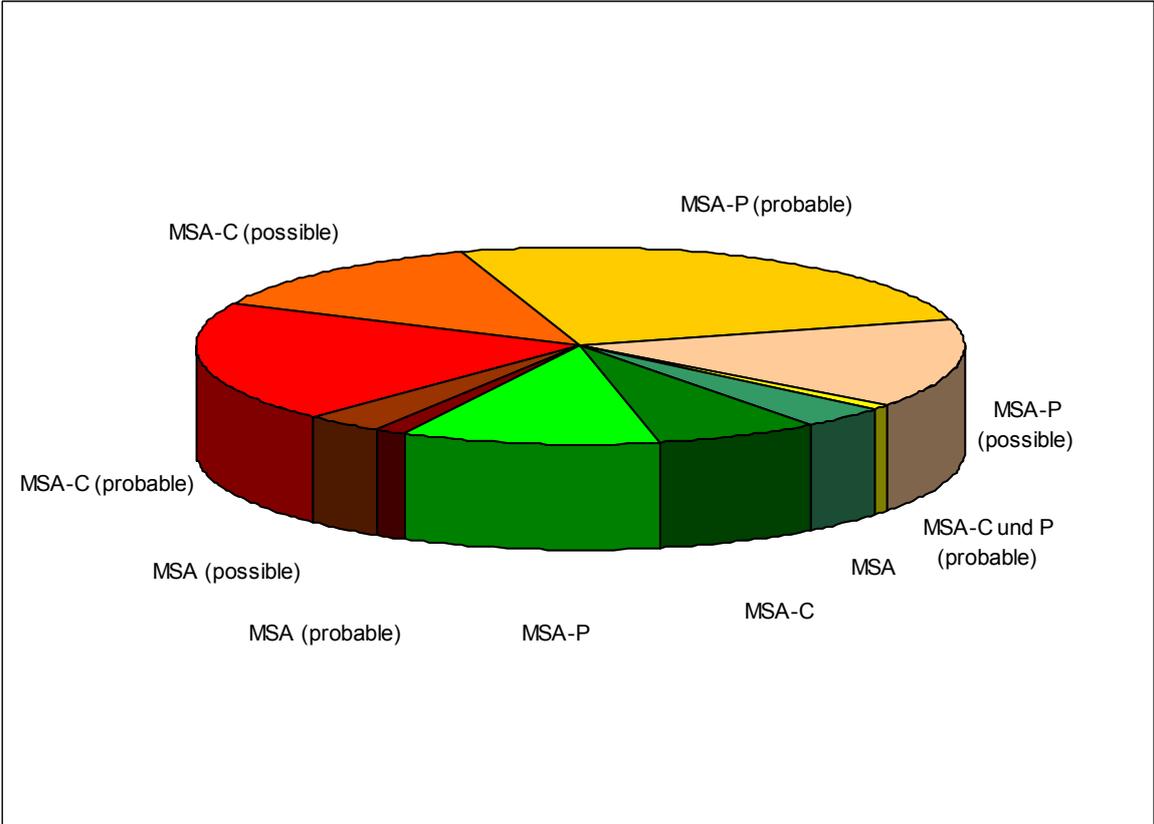
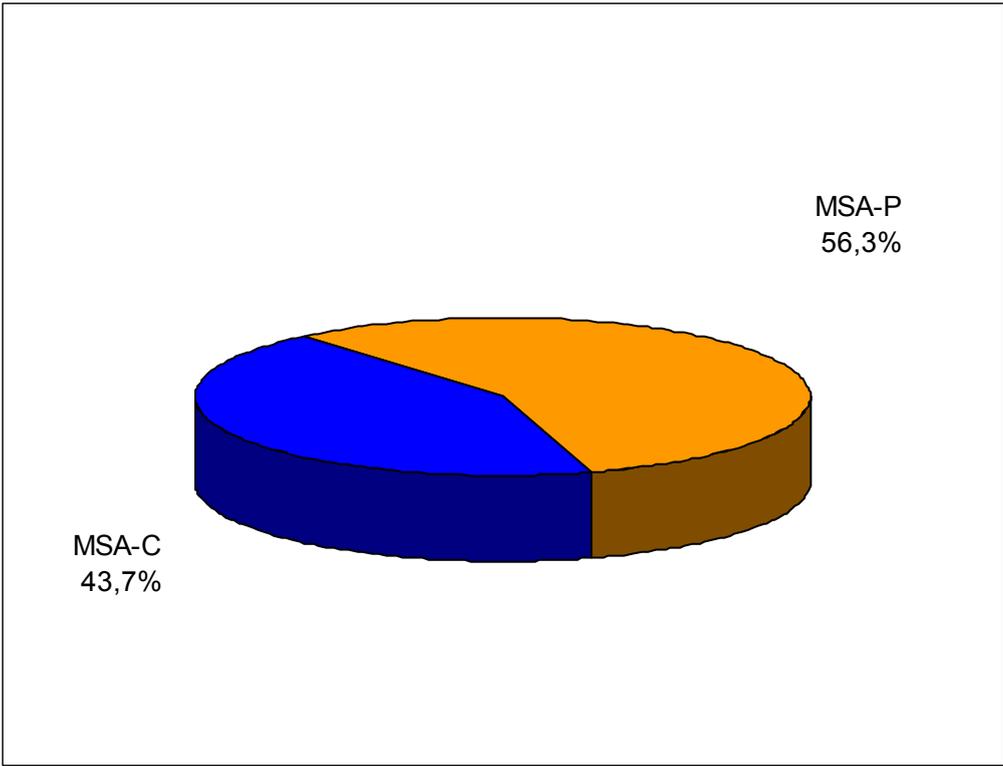


Abbildung 6: Kreisdiagramm zur prozentualen Verteilung von MSA-C- und MSA-P-Fällen im Patientenkollektiv



3.2 Mutationsscreening

3.2.1 PSP-Patienten: Exon 31

Die PCR mit den oben aufgeführten Primern lieferte Fragmente mit einer Länge von 332 Basenpaaren. Abbildung 7 gibt einen schematischen Überblick über das entstandene DNA-Fragment inklusive Primer-Annealing-Stellen, Nukleotiden und Aminosäuren mitsamt Nummerierung und den in Exon 31 bekannten Mutationen.

Abbildung 7: Schematische Darstellung des entstandenen Exon 31-Fragments

agcaggcccagtttgaaag caaacacaagagggtttgtgtctttccctccag

1440*	A	R	A	S	S	S	P	V	I	L	V	G	T
4317**	GCT	CGC	GCT	TCT	TCT	TCC	CCT	GTG	ATT	CTC	GTT	GGC	ACA
1453	H	L	D	V	S	D	E	K	Q	R	K	A	C
4356	CAT	TTG	GAT	GTT	TCT	GAT	GAG	AAG	CAA	CGC	AAA	GCC	TGC
1466	M	S	K	I	T	K	E	L	L	N	K	R	G
4395	ATG	AGT	AAA	ATC	ACC	AAG	GAA	CTC	CTG	AAT	AAG	CGA	GGG
1479	F	P	A	I	R	D	Y	H	F	V	N	A	T
4434	TTC	CCT	GCC	ATA	CGA	GAT	TAC	CAC	TTT	GTG	AAT	GCC	ACC
1492	E	E	S	D	A	L	A	K	L	R	K	T	I
4473	GAG	GAA	TCT	GAT	GCT	TTG	GCA	AAA	CTT	CGG	AAA	ACC	ATC
1505	I	N	E	S	L	N	F	K					
4512	ATA	AAC	GAG	AGC	CTT	AAT	TTC	AAG					

gtaacatggtaggctggtagagaaatgtaatttattg *attctcaactgcctagaaatgtc*

agcaggc ... : Primer-Annealing-Stelle; caaacac ... : umgebende Introns

*: Nummer Aminosäurecodon;

** : Nummer Nukleotid

F : Aminosäure

ATA : Basentriplett

CG : Lokalisation bekannter Mutationen auf Nukleotidebene

Pfeil : Lokalisation bekannter Mutationen auf Aminosäureebene

3.2.1.1 Mutationsscreening mit Gap4

3.2.1.1.1 Mutationssuche mittels Contig Editor

Im ersten Schritt der Mutationssuche wurden die gewonnenen Sequenzen mit der Wildtypsequenz von Exon 31 von *LRRK2* mit Hilfe des Contig Editors von Gap4 abgeglichen. Die Wildtypsequenz stammte von der Internetseite der University of California, Santa Cruz (siehe Material und Methoden). Abweichungen in der Basenfolge wurden vom Programm farbig unterlegt.

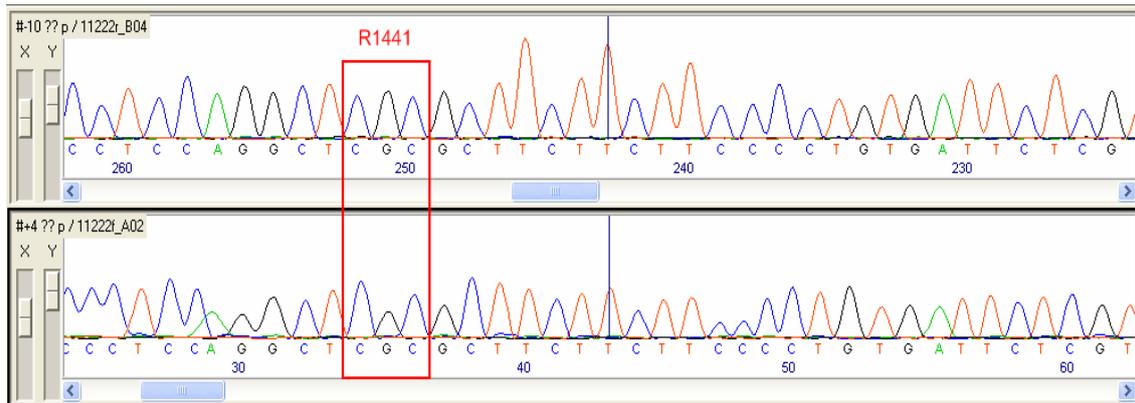
Abbildung 8: Mutationssuche mittels Contig Editor

	40	50	60	70	80	90	100	110
11310r_C04	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
12500r_B05	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
10672r_H03	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
11222r_B04	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
11292r_A04	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
11310f_B02	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
10672f_G01	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
11292f_H01	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
11222f_A02	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
12500f_A03	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
exon_31.txt			GCTCGCGCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	
CONSENSUS ---	AGGGTTTTGTGTC	TTCCCTCCAGGCT	CGCGCTTCTTCT	TCCCTGTGATTCT	CGTTGGCACAC	ATTTGGATGTTT	CTGA	

Das Aminosäurecodon R1441, in dem sich die in Exon 31 bekannten Mutationen befinden, ist farbig umrandet.

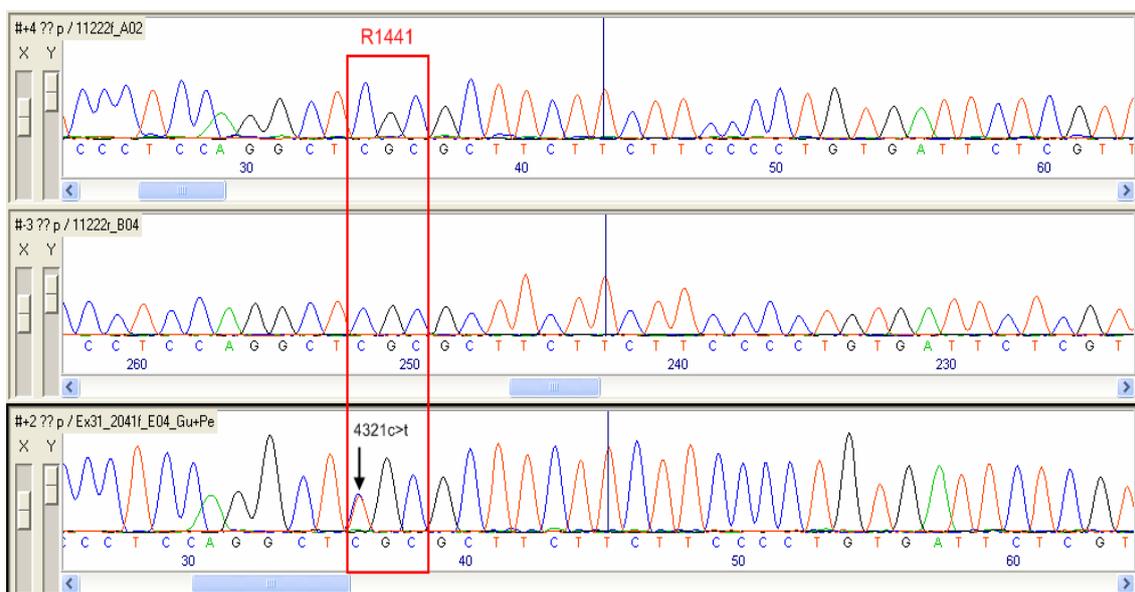
3.2.1.1.2 Visuelle Mutationssuche mittels Trace Display

Eine definitive Aussage über das Vorhandensein von Mutationen kann erst nach einer visuellen Auswertung der Basensequenzen mit dem Trace Display erfolgen, da vom Programm im Contig Editor mitunter die falschen Basen zugewiesen werden (dies gilt vor allem für heterozygote Mutationsträger). Im Folgenden ist dieses Vorgehen exemplarisch dargestellt.

Abbildung 9: Darstellung der visuellen Mutationssuche mittels Trace Display

Das Aminosäurecodon R1441 ist farbig umrandet.

3.2.1.1.3 Exemplarische Darstellung einer Sequenz mit R1441C-Mutation

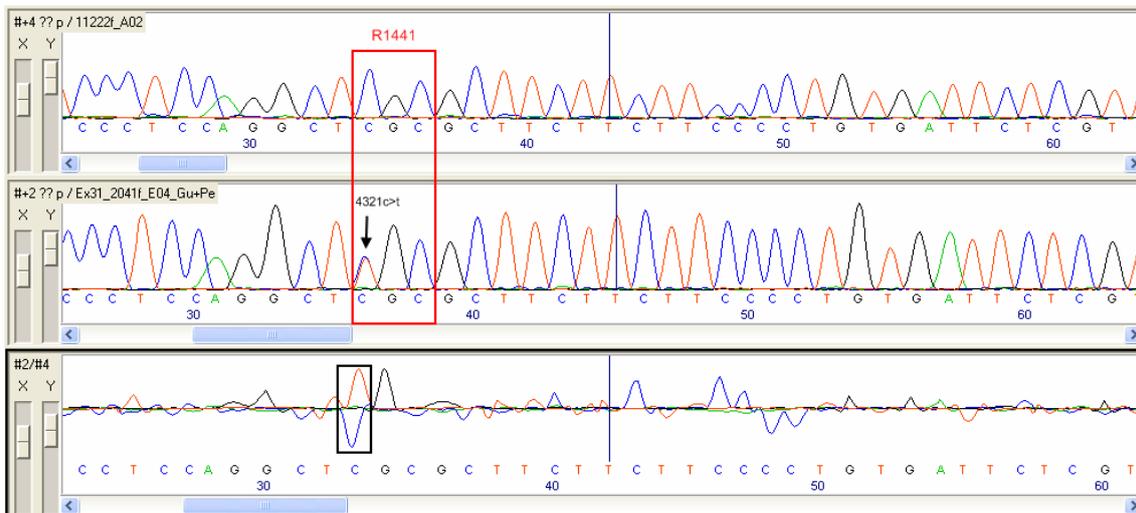
Abbildung 10: Darstellung einer Sequenz mit R1441C (4321c>t)-Mutation im Vergleich zur Wildtypsequenz

Die Sequenz mit der Mutation wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit erstellt und stammt auch nicht aus dem PSP-Patientenkollektiv.

3.2.1.1.4 Gap4-Funktion Trace Difference

Wie in Abbildung 10 ersichtlich ist, wird die Mutation vom Programm selber nicht erkannt und dieser Stelle der Nukleotidsequenz die Base Cytosin zugeordnet. Folglich wäre die Mutation auch im Abgleich mit der Wildtypsequenz mit dem Contig Editor nicht bemerkt worden. Zur besseren Visualisierung von Mutationen kann deshalb ein Peak-Subtraktions-Algorithmus verwendet werden, der Mutationen sichtbar macht, welche sich im Trace Display aufgrund der Überlagerung der Peaks an der Mutationsstelle mitunter nur sehr diskret darstellen. Dabei wird die Sequenz, die vermeintlich eine Mutation enthält, mit einer Standardsequenz verglichen und die Peaks der Chromatogramme werden voneinander subtrahiert. Zeigt sich danach an einer Stelle gleichzeitig ein nach oben und ein nach unten gerichteter Peak, so kann dort von einer Mutation ausgegangen werden.

Abbildung 11: Visualisierung einer R1441C (4321c>t)-Mutation mittels Trace Difference



Die Mutation ist schwarz umrandet.

3.2.1.2 Ergebnisse des Mutationsscreenings

Bei der Untersuchung der 88 PSP-Patienten konnte keine der 3 bekannten Mutationen im Aminosäurecodon R1441 entdeckt werden. Auch sonstige Variationen der Nukleotidsequenz von Exon 31 kamen nicht vor. Tabelle 23 gibt eine Übersicht.

Tabelle 23: Darstellung der Ergebnisse des Mutationsscreenings der PSP-Patienten

Anzahl untersuchter Patienten	88
Anzahl gefundener Mutationen im Aminosäurecodon R1441 (R1441C/G/H)	0
Anzahl sonstiger Veränderungen in der Nukleotidsequenz von Exon 31	0

3.2.2 MSA-Patienten: Exon 41

Durch die Verwendung der oben genannten Primer wurden DNA-Fragmente der Länge von 331 Basenpaaren erzeugt. Abbildung 12 gibt einen Überblick über das entstandene DNA-Fragment, die Primer-Annealing-Stellen und die bekannten Mutationen in Exon 41.

Abbildung 12: Schematische Darstellung des entstandenen Exon 41-Fragments

gcacagaattttgatgcttg acatagtgacatttatattaaggaaattaggacaaaaattattataatgta
atcacattgaataagatttcctgtgcattttctggcag

1984	Y L H S A M I I Y R D L K
5950	TAC CTC CAG TCA GCC ATG ATT ATA TAC CGA GAC CTG AAA
1997	P H N V L L F T L Y P N A
5989	CCC CAC AAT GTG CTG CTT TTC ACA CTG TAT CCC AAT GCT
	↓ ↓ ↓
2010	A I I A K I A D Y G I A Q
6028	GCC ATC ATT GCA AAG ATT GCT GAC TAC GGC ATT GCT CAG
2023	Y C C R M G I K T S E G T
6067	TAC TGC TGT AGA ATG GGG ATA AAA ACA TCA GAG GGC ACA
2036	P
6106	CCA

gtaggtgatcaggtctgtctcataattctatctca **ggatggataaccactgacctc**

gcacaga ... : Primer-Annealing-Stelle; *acatagt* ... : umgebende Introns

*: Nummer Aminosäurecodon;

** : Nummer Nukleotid

Y : Aminosäure

TAC : Basentriplett

T, G : Lokalisation bekannter Mutationen auf Nukleotidebene

Pfeile : Lokalisation bekannter Mutationen auf Aminosäureebene.

3.2.2.1 Mutationsscreening mit Gap4

3.2.2.1.1 Mutationssuche mittels Contig Editor

Die erstellten Sequenzen wurden mit der Wildtypsequenz des Exons 41 von *LRRK2* abgeglichen.

Abbildung 13: Darstellung der Mutationssuche in Exon 41 mittels Contig Editor

	190	200	210	220	230	240	250	260
msa6_1012r_C03	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
msa6_1008r_B03	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
msa6_1007r_A03	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
msa6_974r_GD2	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
msa6_1006r_H02	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
msa6_974f_AD1	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
msa6_1006f_B01	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
msa6_1008f_D01	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
msa6_1012f_E01	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
msa6_1007f_CD1	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
exon41.txt	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							
CONSENSUS ----	GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACAT							

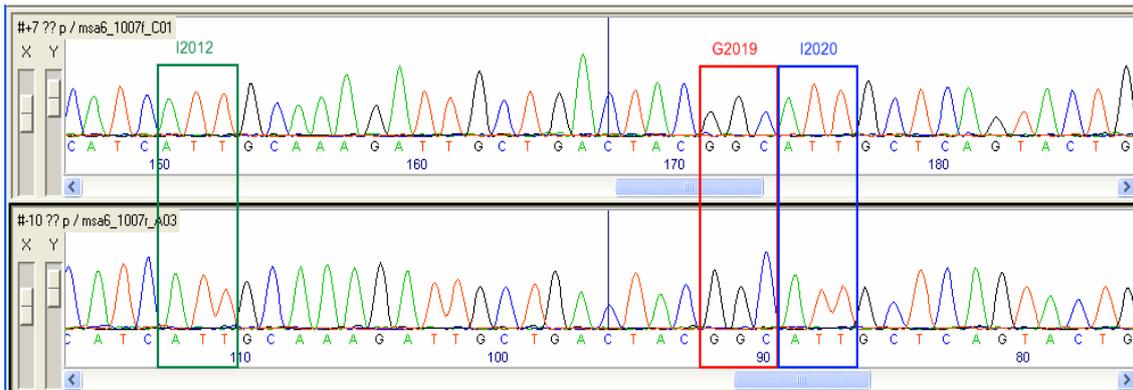
I2012 G2019
I2020

Die 3 Aminosäurecodons, in denen jeweils Mutationen auftreten, sind farbig umrandet.

3.2.2.1.2 Mutationssuche mittels Trace Display

Die visuelle Mutationssuche erfolgte wie unter 3.2.1.1.2 beschrieben.

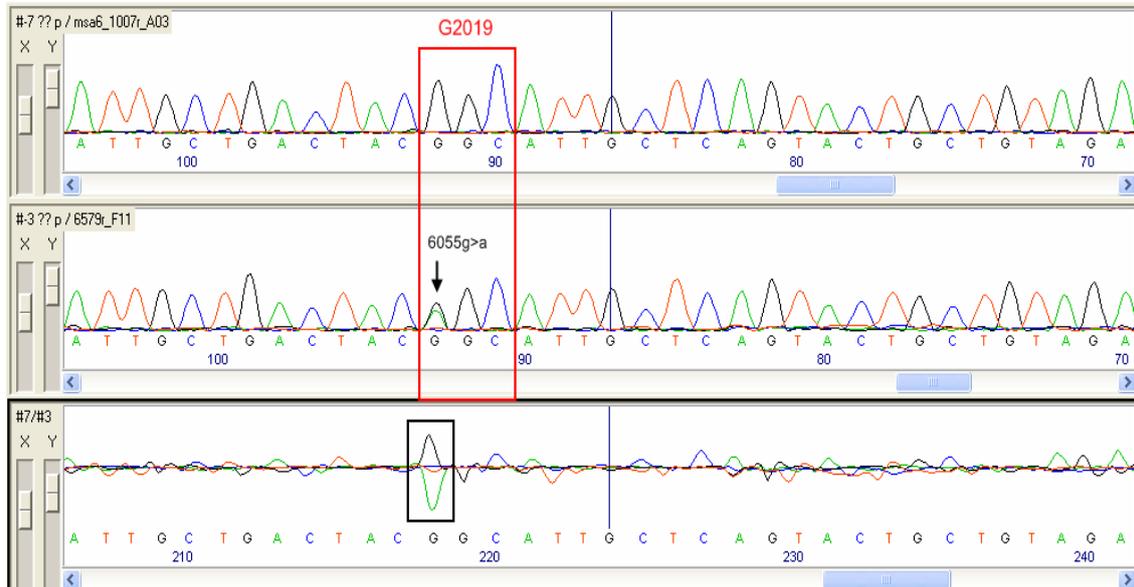
Abbildung 14: Darstellung des Ausschnitts von Exon 41, in dem sich die 3 bekannten Mutationen befinden



Die 3 Aminosäurecodons, in denen jeweils die bekannten Mutationen auftreten, sind verschiedenfarbig umrandet, oberhalb ist der Name des betreffenden Aminosäurecodons angegeben.

3.2.2.1.3 Darstellung einer Sequenz mit G2019S-Mutation

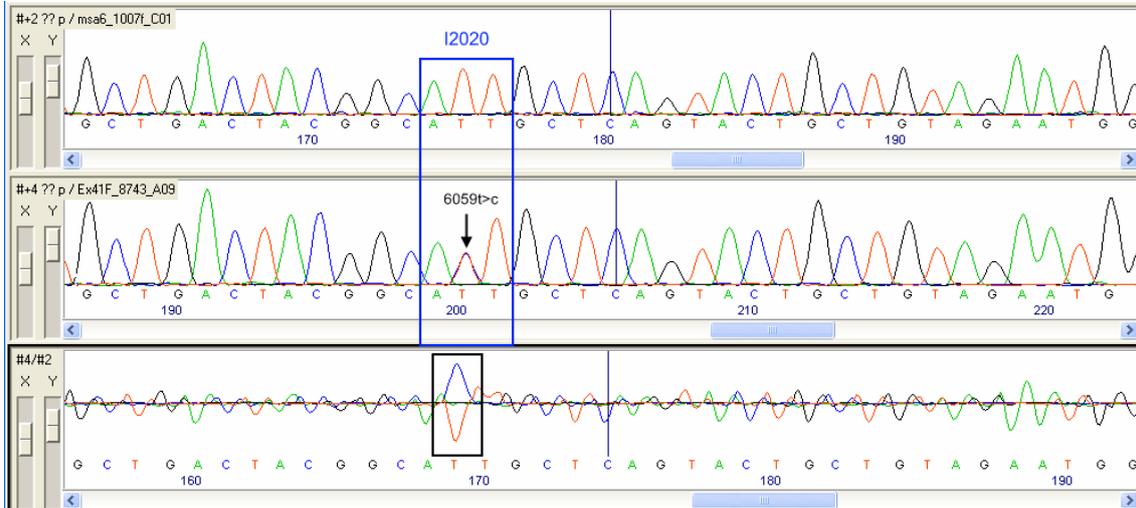
Abbildung 15: Exemplarische Darstellung einer G2019S (6055g>a)-Mutation



Die mutationstragende Sequenz wurde als Positivprobe im Rahmen dieser Arbeit selber erstellt, stammt jedoch nicht aus dem MSA-Patienten-Kollektiv. Daneben ist hierbei zum Vergleich eine Sequenz eines MSA-Patienten ohne Mutation abgebildet. Die Mutation ist mit einem Pfeil markiert. Zusätzlich abgebildet ist das mit Trace Difference erstellte Chromatogramm, in dem die Mutation schwarz umrandet ist.

3.2.2.1.4 Darstellung einer Sequenz mit I2020T-Mutation

Abbildung 16: Exemplarische Darstellung einer I2020T (6059t>c)-Mutation



Die mutationstragende Sequenz wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit erstellt und stammt auch nicht aus dem MSA-Patientenkollektiv. Die beiden Peaks an der Stelle 6059 überlappen sich annähernd deckungsgleich, so dass zur besseren visuellen Darstellung die Funktion Trace Difference angewendet wurde.

3.2.2.2 Ergebnisse des Mutationsscreenings

Bei der Untersuchung der 219 MSA-Patienten konnte keine der 3 bekannten Mutationen in Exon 41 entdeckt werden. Auch sonstige Variationen der Nukleotidsequenz kamen nicht vor. Tabelle 24 gibt eine Übersicht.

Tabelle 24: Ergebnisse des Mutationsscreenings der MSA-Patienten

Anzahl untersuchter Patienten	219
Anzahl gefundener I2012T-Mutationen	0
Anzahl gefundener G2019S-Mutationen	0
Anzahl gefundener I2020T-Mutationen	0
Anzahl sonstiger Veränderungen in der Nukleotidsequenz von Exon 41	0

4 DISKUSSION

4.1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Mutationen im Gen *LRK2*, die mit der Ätiologie sowohl familiärer als auch sporadischer Fälle des idiopathischen Parkinson-Syndroms in Verbindung gebracht werden konnten, auch eine Rolle in der Entstehung der atypischen Parkinson-Syndrome MSA und PSP spielen. Die Untersuchung beschränkte sich dabei auf bereits bekannte, unterschiedlich häufig auftretende Mutationen in den Exons 31 und 41.

Bei keinem der 88 untersuchten PSP-Patienten und keinem der 219 MSA-Patienten konnten dabei die bekannten oder neue Mutationen, bzw. Polymorphismen, gefunden werden. Bei allen Patienten lagen die Wildtypsequenzen der Exons vor.

4.1.1 Argumente für die Konzeption der Studie

Trotz intensiver Bemühungen im Bereich der Forschung bleibt die Ätiologie der Parkinson-Syndrome bis heute weitestgehend ungeklärt. Welche Mechanismen letztendlich zum häufig selektiven Untergang von dopaminergen Neuronen der Substantia nigra führen, ist ebenso unbekannt wie die potentielle Bedeutung von Umweltfaktoren in der Entstehung von Neurodegeneration. Das Parkinson-Syndrom galt lange Zeit als sporadisch auftretende Erkrankung ohne genetischen Hintergrund [175, 197]. Erst durch die Entdeckung genetisch bedingter Parkinson-Syndrome ist es gelungen, tiefere Einblicke in die beteiligten Pathomechanismen der Erkrankung zu bekommen. Wenn die monogenetisch bedingten Fälle auch selten sind, so kommt den durch sie gewonnen Erkenntnissen aufgrund der Übertragbarkeit auf sporadische Formen der Erkrankung große Bedeutung zu.

LRRK2 ist dabei gleich aus mehreren Gründen von besonderem Interesse. So finden sich Mutationen in diesem Gen abgesehen von familiären auch häufig bei sporadischen Fällen des idiopathischen Parkinson-Syndroms und führen bei den Betroffenen zu phänotypischen Erscheinungsbildern, die sich im Allgemeinen, auch das Erkrankungsalter betreffend, nicht vom idiopathischen Parkinson-Syndrom unterscheiden lassen.

Eine rationale Basis für eine Screeninguntersuchung bei Patienten mit atypischen Parkinson-Syndromen auf *LRRK2*-Mutationen stellen die pleomorphen neuropathologischen Veränderungen dar, die durch *LRRK2*-Mutationen verursacht werden können. Die Mutation R1441G in Exon 31 kann mit PSP-typischen neuropathologischen Befunden einhergehen und macht eine Screeninguntersuchung bei PSP-Patienten in diesem Exon somit sinnvoll [199, 209].

G2019S-Mutationen wiederum sind als häufigste genetische Ursache für die Entstehung der häufigsten Synukleinopathie, dem idiopathischen Parkinson-Syndrom, identifiziert worden. Logischerweise stellt sich die Frage, ob sie somit auch in Zusammenhang mit der zweithäufigsten Synukleinopathie [50], der Multisystematrophie, gebracht werden können. Des Weiteren lag bei einem Mitglied der Sagamihara-Familie mit neuropathologisch gesicherter MSA eine I2020T-Mutation vor.

Betrachtet man das äußerst begrenzte Wissen über die Ätiologie atypischer Parkinson-Syndrome zusammen mit den stark limitierten Therapieoptionen, die den Betroffenen derzeit angeboten werden können, wird der potentielle Nutzen der Entzifferung fassbarer Ursachen für die Entstehung dieser Erkrankungen ersichtlich. Auch auf diagnostischer Ebene bestehen erhebliche Defizite, da atypische Parkinson-Syndrome differentialdiagnostisch vor allem zu Beginn nur schwer von idiopathischen zu unterscheiden sind. Folglich führen Fehldiagnosen zur falschen Behandlung von Betroffenen und Fehlinformationen bezüglich Krankheitsprogression und Überlebenszeiten [97]. Die Schwierigkeit der korrekten Diagnose begründet sich im Fehlen sowohl biologischer Marker als auch konkreter neuroradiologischer oder anderweitiger Zusatzuntersuchungen, mit deren Hilfe früh eine sichere Diagnose gestellt werden

könnte [97]. Mit der Entdeckung einer genetischen Ursache für die Krankheitsentstehung würden sich schlagartig neue Optionen ergeben, die vom genetischen Screening bei Betroffenen und deren Angehörigen bis zur Etablierung von Biomarkern reichen könnten. Für die Erforschung von kausalen Therapieansätzen wäre erstmals eine rationale Basis gelegt.

Die Sammlung von Daten, die durch das Screenen verschiedener Patientenkohorten auf der ganzen Welt stetig erweitert wird, steigert das Wissen über die Prävalenz von *LRRK2*-Mutationen bei verschiedenen neurodegenerativen Krankheitsbildern. Da bekannt ist, dass die ethnische Herkunft bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom einen großen Einfluss auf die Prävalenz von *LRRK2*-Mutationen hat (siehe 1.5.1.5.5), erscheint die Untersuchung von Patientenkollektiven aus verschiedenen Teilen der Erde sinnvoll. Betrachtet man sich die Datenlage bezüglich *LRRK2*-Mutationen bei MSA- und PSP-Patienten, ist ersichtlich, dass bisher nur wenige Erkenntnisse über die Mutationsprävalenz bei Patienten aus Mitteleuropa gewonnen wurden (siehe 4.3) und dass diese durch die vorliegende Arbeit deutlich erweitert werden.

4.2 Diskussion der Methodik

4.2.1 Auswahl der Patienten

Alle in dieser Arbeit nach Mutation im Gen *LRRK2* gescreenten DNA-Proben stammten von Patienten, die in speziellen Zentren von mindestens einem Spezialisten auf dem Gebiet der Basalganglienerkrankungen untersucht worden waren. Die klinische Diagnose erfolgte gemäß den international gültigen Konsensuskriterien.

Eine sichere Diagnose der atypischen Parkinson-Syndrome PSP und MSA lässt sich jedoch erst post mortem durch den Nachweis spezifischer neuropathologischer Veränderungen stellen. Für keinen der in dieser Arbeit untersuchten Patienten lag eine definitive Krankheitsdiagnose vor.

Wie präzise eine rein klinische Diagnose anhand der international gültigen Konsensuskriterien für PSP oder MSA gestellt werden kann, ist in mehreren

Studien untersucht worden. Die dabei ermittelten Prozentzahlen für die Sensitivität und Spezifität sowie den positiv und negativ prädiktiven Wert zeigen, dass eine 100%ige Diagnosesicherheit nicht gegeben ist. Tabelle 25 und 26 geben diesbezüglich einen Überblick über die derzeitige Studienlage.

Tabelle 25: Überblick über Studien, die die Exaktheit der Diagnose der PSP unter Verwendung der NINDS-SPSP-Kriterien untersuchten

Referenz	Kriterien	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW
Litvan et al. [100]	NINDS-SPSP possible	83%	93%	83%	-
	NINDS-SPSP probable	50%	100%	100%	-
Lopez et al. [103]	NINDS-SPSP possible	75%	99%	96%	95%
	NINDS-SPSP probable	62%	100%	100%	92%

NINDS-SPSP: National Institute of Neurological Disorders and Stroke - Society for Progressive Supranuclear Palsy,

PPW: positiv prädiktiver Wert, NPW: negativ prädiktiver Wert

Tabelle 26: Überblick über Studien, die die Exaktheit der Diagnose der MSA unter Verwendung der Gilman-Kriterien untersuchten

Referenz	Kriterien	Sensitivität	PPW
Osaki et al. [125] bei der ersten Untersuchung	Gilman possible	28%	93%
	Gilman probable	16%	100%
Osaki et al. [117]: bei der letzten Untersuchung	Gilman possible	92%	86%
	Gilman probable	63%	91%

PPW: positiv prädiktiver Wert

Wie ersichtlich, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Patienten irrtümlicherweise in Arbeiten wie dieser, bei der sich die Rekrutierung der Patientenkohorte ausschließlich auf klinische Diagnosen stützt, eingeschlossen werden und somit die Ergebnisse der Studie zu verfälschen vermögen.

Die begrenzte Verfügbarkeit pathologisch bestätigter MSA- und PSP-Fällen erlaubt jedoch Arbeiten, die, wie in diesem Fall, aufgrund der mitunter sehr niedrigen Prävalenzraten der Mutationen auf eine relativ großen Patientenzahlen angewiesen sind, nur dann, wenn rein klinisch diagnostizierte Patienten in die Screeninguntersuchung miteinbezogen werden können. Aufgrund der Expertise der betreuenden Ärzte und der zusätzlichen Steigerung der Diagnosesicherheit durch mehrjährige Betreuung der Patienten, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich die Zahl der fälschlicherweise in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten in äußerst engen Grenzen hält. Dafür spricht im Falle der PSP-Patienten auch die, für diese Erkrankung typische, nachgewiesene hohe H1-Haplotyp-Frequenz.

4.2.2 Aussagekraft der Ergebnisse

LRRK2 ist ein außergewöhnlich großes Gen und umfasst insgesamt 51 Exons. In dieser Arbeit wurden 2 Exons auf diejenigen Punktmutationen untersucht, die mit der Entstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms in Zusammenhang gebracht werden konnten und mitunter zu neuropathologischen Veränderungen führen, die eher charakteristisch für atypische Parkinson-Syndrome sind.

Direktes Sequenzieren erlaubt den Nachweis von Punktmutationen mit großer Sicherheit, insbesondere wenn, wie hier geschehen, sowohl der forward- als auch der reverse-Strang separat sequenziert und begutachtet werden. Da die Untersuchung auf wenige *LRRK2*-Mutationen begrenzt war, ist nur ein kleiner Ausschnitt des Gens beurteilt worden. Somit kann die Existenz von ätiologisch mit atypischen Parkinson-Syndromen assoziierten *LRRK2*-Mutationen irgendwo sonst in diesem großen Gen keinesfalls ausgeschlossen werden. Denkbar wären auch intronische Mutationen, Gendosis- und epigenetischen Effekte.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Zur Auswertung der Patientendaten

4.3.1.1 PSP-Patienten

Das mittlere Erkrankungsalter der PSP-Patienten in dieser Arbeit liegt mit 64,3 ($\pm 6,4$) Jahren in dem Bereich, der auch in früheren Studien beschrieben wurde [17]. Das Geschlechterverhältnis stellt sich mit 51,1% männlichen und 48,9% weiblichen Patienten gleichmäßig verteilt dar, was die Vermutung früherer Untersuchungen stützt, dass Männer und Frauen von der Erkrankung gleich häufig betroffen sind [17, 120].

4.3.1.2 MSA-Patienten

Wie beim PSP-Kollektiv stellt sich die Geschlechterverteilung auch bei den MSA-Patienten mit 52,7% männlichen und 47,3% weiblichen Betroffenen ausgewogen dar und bestätigt diesbezüglich die gängige Studienlage. Auch das mittlere Erkrankungsalter liegt mit 58,0 ($\pm 8,1$) Jahren in dem Bereich, den

man für den Erkrankungsbeginn der Multisystematrophie als üblich ansieht [81, 178, 189].

Die prozentuale Verteilung von MSA-P und -C-Patienten erscheint jedoch in Anbetracht der gängigen Datenlage ungewöhnlich. Man geht davon aus, dass MSA-P in kaukasischen Bevölkerungsgruppen zwei- bis viermal häufiger auftritt als MSA-C [14, 22, 31, 52, 140, 187]. Ein häufigeres Auftreten von MSA-C scheint es indes in Japan zu geben [202]. Die MSA-Patienten-Kohorte, die in dieser Arbeit untersucht wurde, weist mit 56,3% MSA-P- und 43,7% MSA-C-Patienten eine annähernd gleichmäßige Verteilung der beiden MSA-Subtypen auf. Dies kann mitunter darauf zurückgeführt werden, dass ein Teil der DNA-Proben aus speziellen Ataxie-Ambulanzen stammt, in denen naturgemäß mehr MSA-C als MSA-P-Patienten behandelt werden. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass diesbezüglich in dieser Arbeit kein für die Allgemeinbevölkerung repräsentatives MSA-Patientenkollektiv untersucht wurde.

4.3.2 G2019S und MSA

Die G2019S-Mutation gilt heute als die häufigste genetische Ursache für die Entstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms sowohl bei sporadischen als auch familiären Fällen [51]. Würde diese Mutation bei der Entstehung der Multisystematrophie eine ähnlich bedeutende Rolle einnehmen, wäre bei einer Studienpopulation von 219 Patienten mit etwa 2 bis 4 Mutationsträgern zu rechnen gewesen [127]. Da jedoch kein einziger der untersuchten Patienten die Mutation aufwies, muss davon ausgegangen werden, dass die G2019S-Mutation bei MSA-Patienten, falls überhaupt, deutlich seltener auftritt als dies für das idiopathische Parkinson-Syndrom der Fall ist.

4.3.3 I2020T und MSA

Im Jahre 2002 war es die Untersuchung von Mitgliedern der Sagamihara-Familie, die zum ersten Mal Hinweise auf die Lokalisation eines mit der Entstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms in Verbindung stehenden Genortes auf Chromosom 12 lieferte [43]. Nach der Entdeckung von *LRRK2*

konnte nachgewiesen werden, dass bei den betroffenen Familienmitgliedern die I2020T-Mutation in Exon 41 vorliegt [44]. Interessanterweise konnte bei einem der Mutationsträger eine neuropathologisch gesicherte MSA-Diagnose gestellt werden, was die Bedeutung dieser Mutation in der Entstehung der Erkrankung nahe legte. Da jedoch kein einziger der in dieser Arbeit untersuchten Patienten die Mutation aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass sie, zumindest bei Mitteleuropäern, keine bedeutende Ursache für die Entstehung von MSA darstellt.

4.3.4 I2012T und MSA

Die I2012T-Mutation stellt diejenige Veränderung in Exon 41 von *LRRK2* dar, die sich am seltensten nachweisen lässt. Auch im untersuchten MSA-Patientenkollektiv dieser Arbeit konnte sie bei keinem Individuum gefunden werden und scheint somit keine Rolle in der Entstehung von MSA bei Mitteleuropäern zu spielen.

4.3.5 R1441C/G/H und PSP

Mutationen im Aminosäurecodon R1441 von *LRRK2* finden sich bei Parkinson-Patienten deutlich seltener als die G2019S-Mutation und ihr Auftreten scheint noch stärker von der ethnischen Herkunft der Betroffenen abzuhängen [173]. Eine besondere Rolle spielen sie bei der Entstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms bei Menschen aus dem Baskenland und auch benachbarter spanischer Provinzen [113]. Des Weiteren sind sie in Belgien beschrieben worden [124].

Die in dieser Studie untersuchte Anzahl an PSP-Patienten ist mit 88 betroffenen Individuen relativ klein. Da sich Mutationen im Aminosäurecodon 1441 von *LRRK2* auch bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom viel seltener finden lassen als die G2019S-Variante, kann eine generelle Beteiligung der Mutation in der Ätiologie von PSP in Anbetracht der untersuchten Patientenzahl anhand dieser Arbeit nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse machen jedoch klar, dass Mutationen in Exon 31 von *LRRK2* bei PSP-Patienten,

falls überhaupt, sehr selten vorkommen und mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Hauptursache für das Entstehen der Erkrankung darstellen.

4.3.6 Vergleich der Ergebnisse mit vorangegangenen Publikationen

4.3.6.1 Prävalenzraten von *LRRK2*-Mutationen

Seit die Bedeutung von *LRRK2*-Mutationen für die Entstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms entdeckt worden ist, sind weltweit immense Bemühungen betrieben worden, die Prävalenzraten dieser Mutationen bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen zu bestimmen. Aufgrund der Tatsache, dass das idiopathische Parkinson-Syndrom die mit Abstand häufigste mit Parkinsonismus einhergehende Erkrankung darstellt, wurden hauptsächlich Patientenkohorten mit dieser Form des Parkinsonismus untersucht. Hierbei fand sich ein außergewöhnlich hoher Einfluss der ethnischen Herkunft auf das Auftreten von Mutationen. Wie erwähnt, scheinen manche Mutationen dabei nur in bestimmten Bevölkerungsgruppen aufzutreten. Insgesamt stellte sich heraus, dass *LRRK2*-Mutationen die mit Abstand häufigste genetische Ursache für die Entstehung des Parkinson-Syndroms darstellen [51].

Auch wenn sich das durch *LRRK2*-Mutationen bedingte klinische Erscheinungsbild nicht vom idiopathischen Parkinson-Syndrom unterscheiden lässt, so stellte sich aufgrund der großen Variabilität beobachteter neuropathologischer Befunde die Frage nach der Bedeutung des Gens für die Entstehung weiterer Synukleino- und Tauopathien.

4.3.6.1.1 Bisherige Datenlage: *LRRK2* und PSP

Ein Mitglied der großen Familie aus West-Nebraska, die auch als Familie D bezeichnet wird, entwickelte eine supranukleäre Blickparese 5 Jahre nachdem Symptome begonnen hatten, die in ihrer Form typisch für das idiopathische Parkinson-Syndrom waren und bis dato sehr gut auf L-Dopa angesprochen hatten. Abgesehen davon zeigte der Patient keine weiteren, für das Vorliegen von PSP sprechenden Zeichen. Auch die L-Dopa-Responsivität blieb weiterhin erhalten. Es war nun eben dieser Patient, bei dessen Autopsie neuropathologische Veränderungen gefunden wurden, die eher zum Bild der

PSP als zum idiopathischen Parkinson-Syndrom passten. Es fanden sich erstaunlicherweise Tau-positive Einschlüsse in PSP-typischer Verteilung. Bei einer genetischen Untersuchung konnte bei diesem Patienten die R1441C-Mutation nachgewiesen werden [209].

Ein weiterer Patient, der ebenfalls eine Mutation im Codon R1441 aufwies, entwickelte 8 Jahre nach dem Beginn eines idiopathischen Parkinson-Syndroms viele Symptome, die in ihrer Ausprägung charakteristisch für PSP waren. So kam es im Krankheitsverlauf zu einer supranukleären Blickparese, Fallneigung und kognitiven Defiziten [164].

Mit Ausnahme dieser beiden eben geschilderten Patienten sind in weltweit durchgeführten Studien bis zum heutigen Tag keine R1441-Mutationen bei PSP-Patienten nachgewiesen worden. Außerdem muss beachtet werden, dass der Krankheitsverlauf der beiden beschriebenen Fälle bei genauerer Betrachtung primär uncharakteristisch für eine klassische PSP erscheint. Die Entwicklung von PSP-typischen Symptomen nach Jahren eines vermeintlich idiopathischen Parkinson-Syndroms mit guter L-Dopa-Responsivität erinnert hierbei viel mehr an einen von Williams et al. definierten und als PSP-Parkinsonismus (PSP-P) bezeichneten Subtyp der Erkrankung [196].

Bei keinem der bisher etwa 300 weltweit auf R1441-Mutationen gescreenten PSP-Patienten wurde die von Williams postulierte Unterteilung in PSP-Parkinsonismus und Richardson-Syndrom explizit vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Arbeit fügen sich auch diesbezüglich nahtlos in die Reihe vorangegangener Untersuchungen ein und bestätigen und erweitern die bisherige Datenlage. Da unsere Kohorte mittels klinischer Diagnosekriterien rekrutiert wurde, die eine Diagnosefindung anhand typischer Symptome der PSP erlauben, ist es wahrscheinlich, dass die PSP-Patienten dieser Arbeit eher dem Subtyp Richardson-Syndrom als PSP-Parkinsonismus zugeordnet werden müssen. Man könnte also schlussfolgern, dass die Ergebnisse dieser Studie nahe legen, dass R1441C/G/H-Mutationen höchstwahrscheinlich keine Rolle in der Entstehung der klassischen PSP (d.h. des Richardson-Syndroms) spielen, eine ätiologische Beteiligung bei atypischen PSP-Fällen (d.h. beim Parkinson-Parkinsonismus) jedoch nicht ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 27: Zusammenstellung der bisherigen Datenlage bezüglich *LRRK2*-Mutationen bei PSP-Patienten

Referenz	Anzahl gescreenter PSP-Patienten	gesuchte Mutationen	Anzahl gefundener Mutationsträger
Ross et al., 2006 [146]	326	G2019S	0
Ross et al., 2006 [147]	242	R1441C/G/H	0
Tan et al., 2006 [171]	15	R1441C/G/H, G2019S, I2020T	0
Spanaki et al., 2006 [164]	13	R1441C/G/H, G2019S, I2020T	0
Gaig et al., 2008 [46]	21	G2019S, R1441C/G/H	0
Rajput et al., 2006 [141]	16	G2019S	0
Hernandez et al., 2005 [66]	186	G2019S	0
gesamt	291	R1441C/G/H, (teilweise auch G2019S und I2020T)	0
	528	ausschließlich G2019S	0

4.3.6.1.2 Bisherige Datenlage: *LRRK2* und MSA

MSA stellt als zweithäufigste Synukleinopathie nach dem idiopathischen Parkinson-Syndrom diejenige Erkrankung dar, bei der eine Screeninguntersuchung auf Mutationen in Exon 41 von *LRRK2* die rationalste Grundlage besitzt. Bis zum heutigen Tag haben solche Untersuchungen, mit Ausnahme des bereits erwähnten Mitgliedes der Sagamihara-Familie, noch keinen einzigen MSA-Fall direkt mit einer Mutation der Nukleotidsequenz von *LRRK2* in Verbindung bringen können. Die bisherige Datenlage auf diesem Gebiet ist jedoch dünn. Patienten aus Europa sind bisher kaum untersucht worden. Folglich wird die Zahl der auf I2012T-, G2019S- und I2020T-Mutationen untersuchten MSA-Patienten durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt und deutlich erweitert. Eine ätiologische Verbindung zwischen Mutationen in Exon 41 von *LRRK2* und dem Auftreten der Multisystematrophie erscheint in Anbetracht dieser Erkenntnisse als unwahrscheinlich. Wie der einzige beschriebene Fall eines MSA-Patienten aus Japan mit I2020T-Mutation einzuordnen ist, bleibt also unklar.

Tabelle 28: Bisherige Datenlage zur Prävalenz von *LRRK2*-Mutationen bei MSA-Patienten

Referenz	Anzahl gescreenter MSA-Patienten	gesuchte Mutationen	Anzahl gefundener Mutationsträger
Ozelius et al., 2007 [127]	136	G2019S	0
Tan et al., 2006 [171]	15	R1441C/G/H, G2019S, I2020T	0
Ross et al., 2006 [146]	43	G2019S	0
Rajput et al., 2006 [141]	11	G2019S	0
Gaig et al., 2008 [46]	8	G2019S, R1441C/G/H	0
Cho et al., 2009 [21]	199	G2019S	0
gesamt	412	G2019S, teilweise auch R1441C/G/H, I2020T	0

Tabelle 29: Studie aus China zur Prävalenz von G2385R-Mutationen bei MSA-Patienten

Referenz	Anzahl gescreenter MSA-Patienten	gesuchte Mutationen	Anzahl gefundener Mutationsträger
Lu et al., 2008 [106]	57	G2385R	3

Auch wenn 3 MSA-Patienten mit Mutationen identifiziert werden konnten, tritt diese nicht signifikant häufiger auf als bei gesunden Kontrollen.

4.3.6.1.3 *LRRK2* und weitere atypische Parkinson-Syndrome

In Untersuchungen ist damit begonnen worden, die Prävalenz der häufigsten *LRRK2*-Mutationen bei weiteren Synukleino- und Tauopathien zu bestimmen, wobei bisher nur wenige Daten erhoben worden sind.

Tabelle 30: Übersicht über *LRRK2*-Mutationsscreenings bei Kortikobasaler Degeneration

Referenz	Patientenzahl	gesuchte Mutationen	Anzahl gefundener Mutationsträger
Tan et al., 2006 [171]	4	14 <i>LRRK2</i> -Mutationen, u.a. R1441C/G/H, G2019S, I2020T	0
Gaig et al., 2008 [46]	3	G2019S, R1441C/G/H	0

Tabelle 31: Übersicht über *LRRK2*-Mutationsscreenings bei Demenz mit Lewy-Körperchen

Referenz	Patientenzahl	gesuchte Mutationen	Anzahl gefundener Mutationsträger
Gaig et al., 2008 [46]	25	G2019S, R1441C/G/H	0

4.3.6.1.4 *LRRK2* und weitere neurodegenerative Erkrankungen

Eine rationale Grundlage für die Annahme, *LRRK2*-Mutationen könnten auch bei weiteren neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen, bildet die Tatsache, dass es bei vielen dieser Syndrome zu klinischen und pathologischen Überschneidungen kommen kann. In diesem Zusammenhang wird immer wieder die Vorstellung diskutiert, dass es sich also nicht um eigenständige Krankheitsentitäten, sondern eher um Extreme in einem zusammenhängenden Spektrum von Erkrankungen handelt [47].

Darüber hinaus haben Kopplungsanalysen bei familiären Formen des Morbus Alzheimer Hinweise auf eine Region auf Chromosom 12 ergeben, in der sich auch der *PARK8*-Locus befindet [154]. Tabelle 32 gibt eine Übersicht über Screeninguntersuchung von Alzheimer- und ALS-Patienten auf *LRRK2*-Mutationen.

Tabelle 32: Übersicht über *LRRK2*-Mutations-Screenings bei weiteren neurodegenerativen Erkrankungen

Erkrankung	Patientenzahl	gesuchte Mutationen	Anzahl gefundener Mutationsträger
M. Alzheimer	>3.000*	G2019S	0
ALS	54**	R1441C/G/H, Y1699C, G2019S,I2020T	0

* : Referenzen: Toft et al. [179], Hernandez et al. [66], Tedde et al. [177], Lee et al. [85],
Zambietta et al.[204]

** : Referenz: Whittle et al. [195]

4.4 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Arbeit

4.4.1 Trotz fehlender Mutationen: Beitrag von *LRRK2* zum Verständnis der Ätiologie atypischer Parkinson-Syndrome

4.4.1.1 Vor *LRRK2*

Der bisherige Kenntnisstand über die genetische Komponente in der Entstehung atypischer Parkinson-Syndrome ist deutlich begrenzter als dies für das idiopathische Parkinson-Syndrom der Fall ist. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache begründet, dass letzteres die mit Abstand häufigste Form von Parkinsonismus darstellt und familiäre Fälle viel häufiger beobachtet werden als bei atypischen Parkinson-Syndromen. Aus diesem Grund war es auch primär die Untersuchung von Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom, die zur Entdeckung von genetischen Veränderungen in den in der Einleitung zusammengefassten PARK-Loci geführt hat. Eine potentielle Bedeutung von Mutationen in diesen Genen für das Verständnis neurodegenerativer Prozesse an sich ist seither weiter untersucht worden. In diesem Zusammenhang stellte sich konsequenterweise auch die Frage nach einer möglichen Verbindung zu atypischen Parkinson-Syndromen.

Im Fall der PSP haben wenige familiär gehäufte Fälle zur Untersuchung einer möglichen genetischen Komponente in der Ätiologie der Erkrankung geführt [16, 33]. Dabei lag das Hauptaugenmerk in den vergangenen Jahren hauptsächlich auf dem mikrotubuliassoziierten Protein Tau (MAPT). Bezüglich der weiteren PARK-Loci sind in den vergangenen Jahren mehrere Studien durchgeführt worden, die einen direkten Zusammenhang mit Mutationen in den bisher bekannten Parkinson-Genen meist nicht herstellen konnten.

4.4.1.1.1 Das *Tau*-Gen und PSP

Auch wenn die Progressive Supranukleäre Blickparese im Allgemeinen als sporadisch auftretende Erkrankung angesehen wird, können PSP-Fälle immer wieder mit Veränderungen bzw. bestimmten Varianten des Tau-Gens in Verbindung gebracht werden [117, 134, 166, 200], und somit gilt der Tau-Lokus auf Chromosom 17q21 inzwischen zumindest als Risikofaktor für die

Erkrankung [26]. Zunächst wurde ein Zusammenhang zwischen sporadisch auftretender PSP und einem bestimmten polymorphen Marker beschrieben, der aus Dinukleotiden aufgebaut ist und sich im Intron zwischen den Exons 9 und 10 befindet [26]. Ein weiterer, bei PSP-Patienten überzufällig häufig vorkommender und das gesamte *Tau*-Gen umfassender Haplotyp H1 ist in der Folge beschrieben worden [4]. Außerdem weisen 98% der PSP-Patienten noch einen weiteren, so genannten HapA-Haplotyp auf, der durch 4 single nucleotide polymorphisms (SNP) in den Exons 1, 4A und 8 charakterisiert ist.

Das Genprodukt Tau ist ein Phosphoprotein und gehört zur Familie der mikrotubulassozierten Proteine. Beim Menschen lassen sich davon 6 Isoformen nachweisen, die jeweils durch alternatives Splicen der Exons 2, 3 und 10 entstehen [57]. Die Besonderheit dieses Umstandes begründet sich in der Tatsache, dass es in Gehirnen PSP-Erkrankter zu einer selektiven Anreicherung spezieller Tau-Isoformen kommt (sog. 4R-Isoformen), die hyperphosphoryliert sind und sich neuropathologisch in bestimmten Abschnitten des Gehirns der Betroffenen finden lassen [36]. Die vermehrte Phosphorylierung der Tau-Proteine senkt dabei ihre Bindungsfähigkeit an Mikrotubuli und fördert die Bindung des Moleküls an sich selbst. In den Gehirnen gesunder Menschen lässt sich für gewöhnlich etwas mehr 3 R- als 4R-Tau finden. Bei PSP-Patienten verschiebt sich das Verhältnis jedoch zugunsten der 4R-Tau-Isoform [165].

4.4.1.1.2 α -Synuklein

α -Synuklein konnte als Bestandteil von Lewy-Körperchen aber auch von den für die MSA typischen glialen zytoplasmatischen Einschlüssen (GCI) nachgewiesen werden. Proteinanalysen bei MSA-Patienten führten zu der Erkenntnis, dass die GCIs dabei einen größeren Teil veränderter, unlöslicher α -Synuklein-Fractionen aufweisen [37]. Aus diesem Grund kam die Vermutung auf, dass Veränderungen im *α -Synuklein*-Gen ursächlich mit dem Entstehen der MSA zusammenhängen könnten und MSA-Patienten wurden in der Folge daraufhin untersucht. Mutationen wurden hierbei ebenso wenig wie bei PSP-Patienten entdeckt [118, 126].

4.4.1.1.3 *Parkin*

Anders als bei α -Synuklein konnte bei einem Patienten mit neuropathologisch gesicherter PSP eine zuvor nicht beschriebene Mutation im Parkin-Gen nachgewiesen werden [115]. Da der Zusammenhang zwischen Veränderungen im Tau-Gen und dem Auftreten von PSP bekannt ist, wurde eine potentielle Interaktion von Parkin und dem Tau-Protein postuliert. Wie nachgewiesen werden konnte, dient Tau Parkin tatsächlich als Substrat [136]. Diese Erkenntnisse wurden weiter gestützt durch die genetische Untersuchung von PSP-Patienten, bei der sich zwar keine Mutationen in Parkin finden ließen, ein Polymorphismus in dessen Nukleotidsequenz jedoch einen Risikofaktor für das Auftreten von PSP darzustellen scheint [145]. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Polymorphismus die Interaktion zwischen Parkin und Tau zu stören vermag und somit eine Änderung subzellulärer Tau-Konzentrationen verursacht [145].

4.4.1.1.4 *DJ-1*

In biochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass die Synthese von DJ-1 bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen gesteigert zu sein scheint, was die Vermutung einer neuroprotektiven Wirkung des Proteins weiter stützt. Tauhaltige Einschlüsse, sowohl in Neuronen als auch glialen Zellen, weisen DJ-1 auf. Es findet sich des Weiteren in den für die MSA charakteristischen GCIs. In neuronalen α -Synuklein-haltigen Einschlüssen, wie z.B. den Lewy-Körperchen, kommt es jedoch nicht vor [122].

4.4.1.2 Was ändert sich mit *LRRK2*?

Wie in dieser und weiteren Arbeiten gezeigt wurde, konnten weltweit bisher, mit der Ausnahme des Sagamihara-Familienmitgliedes und zweier atypischer PSP-Fälle, weder MSA- noch PSP-Patienten direkt mit *LRRK2*-Mutationen in Verbindung gebracht werden. Der bisher fehlende Zusammenhang zwischen atypischen Parkinson-Syndromen und Mutationen im Gen *LRRK2* wirkt zunächst ernüchternd, zumal die anfängliche Beschreibung der großen Spannbreite neuropathologischer Präsentationen bei *LRRK2*-Mutationsträgern

berechtigte Hoffnung weckte, hierbei eine bedeutende Ursache für die Entstehung von MSA und PSP gefunden zu haben [141]. Die potentielle Rolle, welche die Entschlüsselung der physiologischen Funktionen von LRRK2 für das weitere Verständnis neurodegenerativer Prozesse haben kann, darf dennoch nicht unterschätzt werden. Durch die Entdeckung des Gens wurde eine molekularbiologische Grundlage für die Vorstellung geschaffen, dass zwischen verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen Verbindungen bestehen [47]. Als Folge daraus entwickeln sich neue Betrachtungsweisen, so dass die strenge Einteilung der neurodegenerativen Prozesse in Synukleino- und Tauopathien allmählich einer neuen Ansicht Platz zu machen scheint, in der die Gemeinsamkeiten und nicht die Unterschiede der jeweiligen Erkrankungen in den Vordergrund rücken und nunmehr die Frage nach modifizierenden Faktoren aufkommt.

4.4.2 *LRRK2* und beginnender Paradigmenwechsel

4.4.2.1 Beitrag von *LRRK2* zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen Tauo- und Synukleinopathien

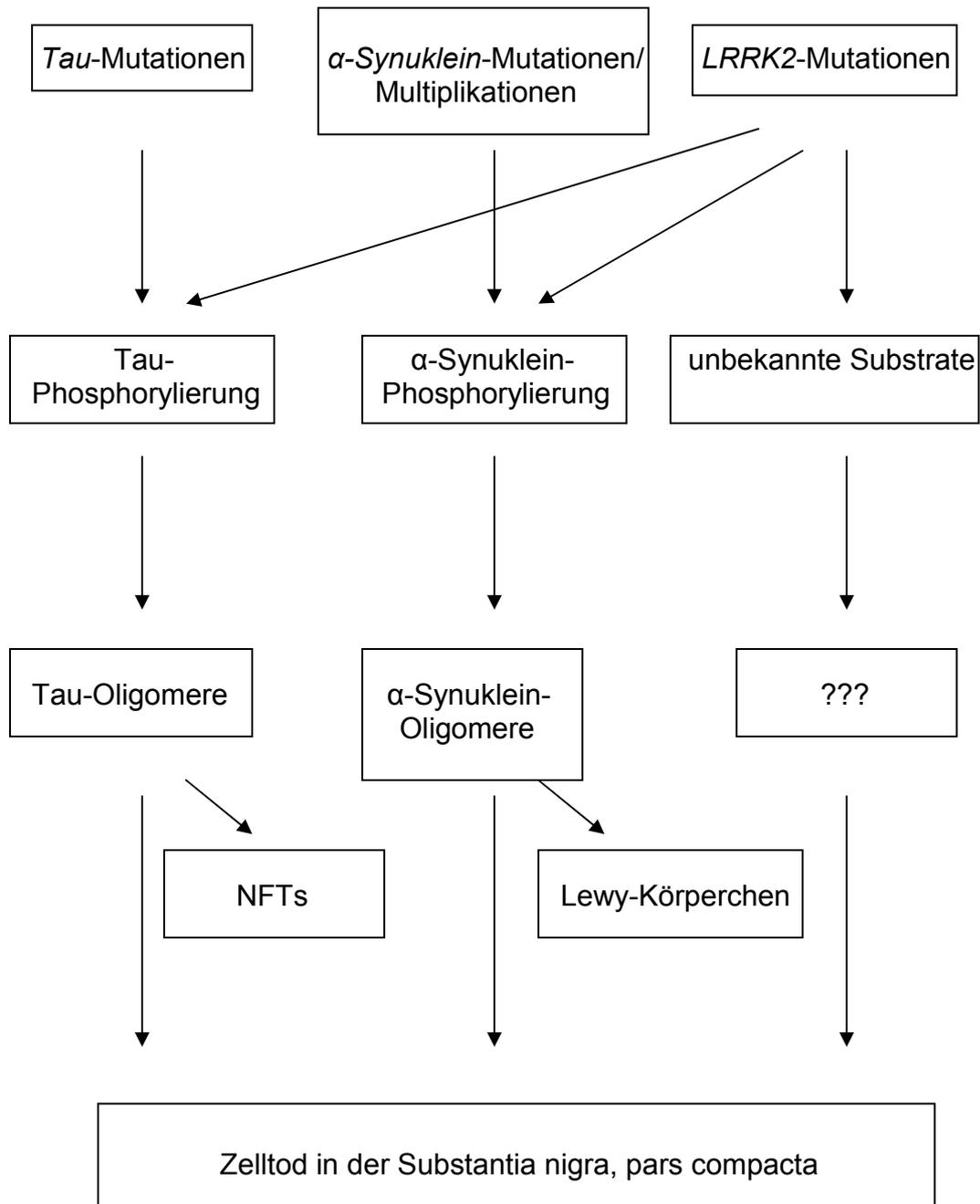
Die Tatsache, dass *LRRK2*-Mutationen zu neuropathologischen Veränderungen führen, die als kennzeichnend für verschiedene Tauo- und Synukleinopathien gelten, führte zu der Vorstellung, dass dieses Gen die Verbindung zwischen den Proteinen Tau und α -Synuklein darstellen und deren jeweiligen pathologischen Kaskaden vorgeschaltet agieren könnte [34]. Besonders gestützt wird diese Vermutung durch den Aufbau von *LRRK2* und dem Vorhandensein einer Kinase-Domäne im Protein.

4.4.2.1.1 Die Kinaseaktivität von *LRRK2* als potentieller Faktor in der Bildung von Proteinaggregaten

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass sowohl die Bildung von α -Synuklein- als auch Tau-Aggregaten durch Phosphorylierung der beiden Proteine gefördert wird. α -Synuklein besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen und Tau verliert durch Phosphorylierung seine Bindungsfähigkeit zu Mikrotubuli, wodurch Aggregationsvorgänge ausgelöst werden. Phosphoryliertes Tau wurde

als Bestandteil von NFTs, phosphoryliertes α -Synuklein als Bestandteil von Lewy-Körperchen nachgewiesen [42, 208]. Da *LRRK2*-Mutationsträger sowohl Synukleino- als auch Tauopathie-spezifische Läsionen aufweisen und *LRRK2* Kinaseaktivität besitzt, sind Zusammenhänge dieser Sachverhalte postuliert worden. Passend dazu erscheint, dass sowohl die G2019S- als auch die I2020T-Mutation jeweils in den für die Kinase-Domäne kodierenden Abschnitten von *LRRK2* liegen und die Kinase-Aktivität steigern [193]. Die R1441-Mutationen hingegen haben Auswirkungen auf die ROC-Domäne des Proteins und nehmen somit Einfluss auf die GTPase-Aktivität von *LRRK2* [92, 93]. Die GTPase scheint hierbei die Kinase-Aktivität zu regulieren und im Falle von R1441-Mutationen zu steigern [194]. Damit ist eine rationale, wenn auch weitgehend hypothetische Grundlage für das Verständnis der Interaktion von α -Synuklein, Tau und *LRRK2* gelegt, die in folgendem Schaubild graphisch veranschaulicht wird.

Abbildung 17: Zusammenhang zwischen der Kinase-Aktivität von LRRK2 und Zelluntergang in der Substantia nigra (nach [34])



4.4.2.1.2 Ist die Aufteilung in Synukleino- und Tauopathien noch als sinnvoll anzusehen?

Neurodegenerative Erkrankungen werden, wie oben geschildert, nach der Art des sich pathologischerweise im Gehirn akkumulierenden Proteins in Tauo- und Synukleinopathien unterteilt und in dieser Form als unterschiedliche klinische und pathologische Entitäten betrachtet. Fortschritte im Bereich der Neurogenetik und der Proteinbiochemie haben hierbei in den vergangenen Jahren jedoch verblüffende Überschneidungen auf klinischer, neuropathologischer und biochemischer Ebene aufzeigen können [47], was nicht zuletzt eindrucksvoll für *LRRK2*-Mutationen beschrieben worden ist. Als Konsequenz dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, ob die heute gültige und strikte Einteilung in zwei Erkrankungsklassen in allen Fällen den tatsächlichen Gegebenheiten Rechnung zu tragen vermag. Ungewöhnliche neuropathologische Veränderungen sind interessanterweise auch vor der Entdeckung von *LRRK2* immer wieder beschrieben worden. So weiß man, dass Mutationen in *α-Synuklein* oder *Parkin* mit Tau-haltigen Einschlüssen einhergehen können [39, 63]. Bei PSP-Patienten sollen hingegen Lewy-Körperchen beobachtet worden sein [116].

Diese Beobachtungen legten primär eine Interaktion von *α-Synuklein* und Tau auf Proteinebene nahe. Passend dazu konnte nachgewiesen werden, dass *α-Synuklein* und Tau *in vitro* die Polymerisation des jeweils anderen Proteins initiieren können [53]. Ein gemeinsamer Mechanismus der Fibrillenbildung scheint also logisch, wobei dessen genaue molekulare Mechanismen noch ungeklärt sind. *LRRK2* könnte die gesuchte Verbindung zwischen den beiden Proteinen sein.

Direkte Interaktionen zwischen *LRRK2* und Tau oder *α-Synuklein* konnten zunächst zwar nicht nachgewiesen werden, dennoch ist es wahrscheinlich, dass Tau, *α-Synuklein* und *LRRK2* allesamt Einfluss auf dieselben intrazellulären Ereignisse nehmen, dabei in ihrer Funktion voneinander abhängig sind und sich auf diese Art indirekt beeinflussen [141]. Wie bereits geschildert, scheint der Kinase-Aktivität von *LRRK2* hierbei eine entscheidende Bedeutung zuzukommen.

Wie wenig tatsächlich bezüglich der Akkumulation von Proteinen innerhalb neuronaler Zellen verstanden ist, legt die kontrovers geführte Diskussion nahe, ob intrazelluläre Proteinaggregate eher die Ursache oder Folge neurotoxischer Ereignisse darstellen [47]. Es wird auch als möglich angesehen, dass die Akkumulation der Proteine zunächst protektiven Charakter hat, jedoch ab einem gewissen Punkt zur Störung von Transportmechanismen führt und somit die Zellhomöostase negativ beeinflusst, wodurch andere Proteine des physiologischen Zellstoffwechsels in ihrer Funktion eingeschränkt werden könnten [86].

4.5 Ausblick

4.5.1 Diagnose atypischer Parkinson-Syndrome

MSA- und PSP-Diagnosen werden auch heute mangels Alternativen noch rein klinisch gestellt und können durch Zusatzuntersuchungen allenfalls gestützt werden. Bis zum heutigen Tag stehen unter anderem keine für die Erkrankung spezifischen Biomarker zur Verfügung. Mehrere Kandidatenproteine sind diesbezüglich in den vergangenen Jahren mit unbefriedigenden Ergebnissen bereits auf ihre Tauglichkeit hin untersucht worden [17].

Die Tatsache, dass viele der Betroffenen oftmals mehrere Jahre mit einer Fehldiagnose leben, unterstreicht die Bedeutung, die der Etablierung zusätzlicher diagnostischer Möglichkeiten zukommt. Angesichts der zentralen Rolle, die *LRRK2* bei neurodegenerativen Prozessen einzunehmen scheint, kann es durchaus als möglich angesehen werden, dass eine Vergrößerung des Verständnisses der physiologischen Funktionen von *LRRK2* auch bei atypischen Parkinson-Syndromen neue diagnostische Möglichkeiten eröffnen kann. Auch wenn PSP und MSA bis zum heutigen Tag, abgesehen von vereinzelten Ausnahmen, nicht mit Mutationen in *LRRK2* in Verbindung gebracht werden konnten, scheint immer klarer zu werden, dass die in der Entstehung von Parkinsonismus involvierten Prozesse in komplexen Netzwerken verflochten sind und somit die in atypischen Parkinson-Syndromen

resultierenden Pathomechanismen sehr wohl durch LRRK2 beeinflusst werden könnten.

Im Moment wird untersucht, in welchen Fällen genetisches Screenen nach *LRRK2*-Mutationen bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom als sinnvoll erachtet werden kann. Für atypische Parkinson-Syndrome, insbesondere MSA und PSP, liefert die momentane Studienlage hierfür noch keine rationale Basis.

Wie aus den weiter oben angegebenen Zusammenfassungen der derzeitigen Studienlage jedoch ersichtlich ist, haben sich Screeningunterfangen in der vergangenen Zeit meist lediglich auf einige wenige Mutationen begrenzt, die sich in wenigen ausgewählten Exons von *LRRK2* befinden. Es gilt nun abzuwarten, ob sich in der Zukunft durch Screeninguntersuchungen, die das gesamte Gen umfassen, neue Erkenntnisse ergeben und neue Mutationen gefunden werden und sich somit Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen atypischen Parkinson-Syndromen und *LRRK2*-Mutationen ergeben.

Überdies gilt es noch die potentielle Rolle modulierender Faktoren zu ergründen und somit die Entstehung verschiedener neuropathologischer Ausprägungen bei grundsätzlich gleicher zugrunde liegender Ursache zu erklären. Man kann aufgrund der Identifizierung vieler *LRRK2*-Mutationsträger anhand zahlreicher Studien in den letzten Jahren davon ausgehen, dass sich die Datenlage bezüglich der durch *LRRK2*-Mutationen verursachten neuropathologischen Veränderungen drastisch erweitern und eine Untersuchung der Lebensumstände der Betroffenen weitere Einblicke erlauben wird.

4.5.2 Die Entwicklung neuer Therapiekonzepte

Vielen neurodegenerativen Erkrankungen, die in ihrer klinischen Präsentation so unterschiedlich erscheinen wie MSA, PSP oder das idiopathische Parkinson-Syndrom, liegt ein gemeinsamer pathogenetischer Mechanismus zu Grunde, nämlich die Aggregation und Ablagerung mißgefalteter Proteine [191]. Sowohl Tau als auch α -Synuklein liegen in den Aggregaten in phosphorylierter Form vor. Führt man sich nun vor Augen, dass LRRK2 eine Phosphorylierungs-Domäne enthält, wird ein Zusammenhang erkennbar, der in der Zukunft für Therapie-

konzepte ausgenutzt werden könnte. Der durch die Mutationen vermeintlich verursachte gain-of-function-Mechanismus der Kinase-Aktivität von LRRK2 bietet ein mögliches Ziel für eine medikamentöse Therapie, wobei eine Kinasehemmung die logische Option darzustellen scheint [141]. In Anbetracht der zum jetzigen Zeitpunkt durchaus bestehenden Hinweise auf eine zentrale Rolle von LRRK2 in einem Netzwerk interagierender Proteine, in dem Störungen sowohl zu Tau- als auch α -Synuklein-Pathologie führen können, lässt sich daraus ableiten, dass ein und dasselbe Medikament einen positiven Effekt auf den Verlauf verschiedener Krankheitsbilder nehmen könnte, also sowohl auf das idiopathische Parkinson-Syndrom als auch auf atypische Parkinson-Syndrome wie MSA und PSP. Es bleibt nun abzuwarten, inwieweit die physiologische Funktion von LRRK2 in der Zukunft besser verstanden wird und wann erste therapeutische Versuche mit Kinasehemmern begonnen werden können. Sollten sich die aufgestellten Hypothesen bestätigen, würde sich dadurch zum ersten Mal die Möglichkeit der Etablierung einer kausalen Therapieoption für Parkinson-Syndrome ergeben. Insbesondere für die zum heutigen Zeitpunkt größtenteils als therapieresistent einzustufenden atypischen Parkinson-Syndrome wäre dies ein in seiner Bedeutung kaum zu beschreibender Durchbruch.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Jahr 2004 sind Mutationen im Gen *LRRK2* als Ursache für eine autosomal-dominant vererbte Form des Parkinsonismus identifiziert worden und gelten inzwischen als häufigste genetische Ursache sowohl familiärer als auch sporadischer Formen des idiopathischen Parkinson-Syndroms. Die Betroffenen zeichnen sich einerseits durch ein für Morbus Parkinson typisches klinisches Erscheinungsbild aus, weisen andererseits jedoch als besonderes, in dieser Form einzigartiges Merkmal die verschiedensten neuropathologischen Veränderungen auf, die bisher unterschiedlichen Gruppen neurodegenerativer Erkrankungen zugeordnet wurden. So beobachtet man neben neuronalem Zelluntergang in der Substantia nigra mit oder ohne Lewy-Körperchen sogar Tau-positive Einschlüsse in einer Ausprägung, welche die diagnostischen Kriterien einer Progressiven Supranukleären Blickparese erfüllt. In Anbetracht dieser Erkenntnisse kann eine zentrale Rolle von *LRRK2* in der Entstehung neurodegenerativer Prozesse vermutet und auf diese Weise eine rationale Grundlage für die Untersuchung seines Beitrags in der Entstehung weiterer neurodegenerativer Erkrankungen, u.a. der atypischen Parkinson-Syndrome, gelegt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Proben von MSA- und PSP-Patienten auf bereits bekannte *LRRK2*-Mutationen gescreent. Die Untersuchung der PSP-Proben beschränkte sich, gestützt auf der Beschreibung PSP-artiger neuropathologischer Veränderungen eines R1441C-Mutationsträgers, auf Exon 31 von *LRRK2*. Die MSA-Proben hingegen wurden auf Mutationen in Exon 41 von *LRRK2* untersucht, da bei einem Mitglied der Sagamihara-Familie mit neuropathologisch gesicherter MSA die I2020T-Mutation gefunden wurde. Des Weiteren legt die Häufigkeit der ebenfalls in Exon 41 lokalisierten G2019S-Mutation beim idiopathischen Parkinson-Syndrom deren besondere Bedeutung in der Entstehung von Synukleinopathien nahe.

Bei keinem Patienten konnten im Rahmen dieser Studie *LRRK2*-Mutationen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen und

erweitern diesbezüglich die derzeitige Datenlage. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es, bis auf vereinzelte, in ihrer Bedeutung schwer einzustufende Ausnahmen somit weder gelungen, MSA- noch PSP-Fälle direkt mit Mutationen in *LRRK2* in Verbindung zu bringen. Eine potentielle Rolle von *LRRK2* in der Entstehung dieser beiden Erkrankungen kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, zumal sich die bisherigen Studien meist auf wenige Abschnitte von *LRRK2* beschränkt haben und aus diesem Grund Aussagen über den Rest dieses riesigen Gens nicht getroffen werden können. Man kann erwarten, dass umfassendere Untersuchungen hierbei in Zukunft weitere Klarheit schaffen werden. Außerdem gibt es viele Hinweise darauf, dass *LRRK2* eine übergeordnete Position in einem Netzwerk interagierender Proteine einnimmt, in dem Störungen zu neurodegenerativen Prozessen führen können. *LRRK2*-Mutationen können folglich als auslösende Ereignisse in einer zu Neurodegeneration mit variablen pathologischen Veränderungen führenden Kaskade angesehen werden und somit in der Ätiologie verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen involviert sein. Aus diesem Grund ist es möglich, dass die genauere Erforschung von *LRRK2* Erkenntnisse erbringen wird, die auf verschiedene Erkrankungen übertragbar sind. Es bleibt zu hoffen, dass sich daraus in Zukunft neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten ergeben werden.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematischer Aufbau von <i>LRRK2</i> mit ausgewählten Mutationen (modifiziert nach [51])	21
Abbildung 2:	Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit Negativprobe	34
Abbildung 3:	Verteilung Alter bei Erkrankungsbeginn der PSP-Patienten	48
Abbildung 4:	Verteilung Alter bei Erkrankungsbeginn der MSA-Patienten	51
Abbildung 5:	Kreisdiagramm zur Verteilung der Diagnosekategorien der MSA-Patienten	53
Abbildung 6:	Kreisdiagramm zur prozentualen Verteilung von MSA-C- und MSA-P-Fällen im Patientenkollektiv	53
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des entstandenen Exon 31-Fragments	55
Abbildung 8:	Mutationssuche mittels Contig Editor	56
Abbildung 9:	Darstellung der visuellen Mutationssuche mittels Trace Display	57
Abbildung 10:	Darstellung einer Sequenz mit R1441C (4321c>t)-Mutation im Vergleich zur Wildtypsequenz	57
Abbildung 11:	Visualisierung einer R1441C (4321c>t)-Mutation mittels Trace Difference	58
Abbildung 12:	Schematische Darstellung des entstandenen Exon 41-Fragments	60
Abbildung 13:	Darstellung der Mutationssuche in Exon 41 mittels Contig Editor	61
Abbildung 14:	Darstellung des Ausschnitts von Exon 41, in dem sich die 3 bekannten Mutationen befinden	62
Abbildung 15:	Exemplarische Darstellung einer G2019S (6055g>a)-Mutation	63
Abbildung 16:	Exemplarische Darstellung einer I2020T (6059t>c)-Mutation ..	64
Abbildung 17:	Zusammenhang zwischen der Kinase-Aktivität von LRRK2 und Zelluntergang in der Substantia nigra (nach [34])	86

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Überblick über die Klassifikation der Parkinson-Syndrome	3
Tabelle 2: Zusammenfassung der PARK-Loci	12
Tabelle 3: Sequenzen der Primer Exon 31 und Exon 41.....	25
Tabelle 4: Reaktionsansatz PCR <i>LRRK2</i> Exon 31	30
Tabelle 5: Temperaturschema PCR <i>LRRK2</i> Exon 31	30
Tabelle 6: Reaktionsansatz PCR <i>LRRK2</i> Exon 41	31
Tabelle 7: Temperaturschema PCR <i>LRRK2</i> Exon 41	31
Tabelle 8: Reaktionsansatz Sequenzierreaktion	35
Tabelle 9: Temperaturschema Sequenzierreaktion.....	36
Tabelle 10: Anzahl und Herkunft der PSP-Patienten	38
Tabelle 11: Anzahl und Herkunft der MSA-Patienten.....	38
Tabelle 12: Kriterien für die klinische Diagnose der MSA nach Gilman et al....	40
Tabelle 13: Diagnostische Kategorien der MSA nach Gilman et al.	41
Tabelle 14: Ausschlusskriterien für die Diagnose MSA nach Gilman et al.	42
Tabelle 15: NINDS-SPSP Diagnosekriterien für PSP.....	43
Tabelle 16: Ausschlusskriterien der PSP nach Litvan et al. 2003	44
Tabelle 17: Untersuchte Mutationen in Exon 31 von <i>LRRK2</i>	45
Tabelle 18: Untersuchte Mutationen in Exon 41 von <i>LRRK2</i>	46
Tabelle 19: Zusammenfassung der klinischen Daten der PSP-Patienten	47
Tabelle 20: H1/H2-Haplotypdaten der PSP-Patienten.....	49
Tabelle 21: Zusammenfassung der klinischen Daten der MSA-Patienten.....	50
Tabelle 22: Diagnosekategorien der MSA-Patienten.....	52
Tabelle 23: Darstellung der Ergebnisse des Mutationsscreenings der PSP-Patienten	59
Tabelle 24: Ergebnisse des Mutationsscreenings der MSA-Patienten	65
Tabelle 25: Überblick über Studien, die die Exaktheit der Diagnose der PSP unter Verwendung der NINDS-SPSP-Kriterien untersuchten	69
Tabelle 26: Überblick über Studien, die die Exaktheit der Diagnose der MSA unter Verwendung der Gilman-Kriterien untersuchten.....	70

Tabelle 27: Zusammenstellung der bisherigen Datenlage bezüglich <i>LRRK2</i> -Mutationen bei PSP-Patienten.....	76
Tabelle 28: Bisherige Datenlage zur Prävalenz von <i>LRRK2</i> -Mutationen bei MSA-Patienten	78
Tabelle 29: Studie aus China zur Prävalenz von G2385R-Mutationen bei MSA-Patienten	79
Tabelle 30: Übersicht über <i>LRRK2</i> -Mutationsscreenings bei Kortikobasaler Degeneration	79
Tabelle 31: Übersicht über <i>LRRK2</i> -Mutationsscreenings bei Demenz mit Lewy-Körperchen	79
Tabelle 32: Übersicht über <i>LRRK2</i> -Mutations-Screenings bei weiteren neurodegenerativen Erkrankungen	80

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenosin
AaO	Age at Onset (Alter bei Erkrankungsbeginn)
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CBD	Kortikobasale Degeneration
COR	C-terminal of Ras
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DLB	Demenz mit Lewy-Körperchen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSM IV	Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMG	Elektromyelographie
g	Erdschwerebeschleunigung ($9,81 \frac{m}{s^2}$)
G	Guanin
GCI	Glial Cytoplasmatic Inclusions (gliale zytoplasmatische Einschlüsse)
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
kDa	Kilodalton
LB	Lewy Body (Lewy-Körperchen)

LRRK2	Leucine Rich Repeat Kinase 2
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MAPT	mikrotubuliassoziiertes Protein Tau
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	milimolar
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridin
mRNA	messenger Ribodesoxynukleinsäure
MSA	Multisystematrophie
MSA-C	Multisystematrophie mit prädominantem zerebellärem Syndrom
MSA-P	Multisystematrophie mit prädominantem Parkinson-Syndrom
NFT	Neurofibrillary Tangles (neurofibrilläre Bündel)
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
PSP	Progressive Supranukleäre Blickparese
Roc	Ras of complex proteins
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SN	Substantia nigra
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
U/min	Umdrehungen pro Minute
WD-40	Beta-Propeller

Aminosäuren wurden nach dem international gültigen Einbuchstabencode angegeben:

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

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe H, Yagishita S, Amano N, Iwabuchi K, Hasegawa K, Kowa K. Argyrophilic glial intracytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: immunocytochemical and ultrastructural study. *Acta neuropathologica* 1992; **84**: 273-277.
2. Abeliovich A, Flint Beal M. Parkinsonism genes: culprits and clues. *Journal of neurochemistry* 2006; **99**: 1062-1072.
3. Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 2003; **54**: 283-286.
4. Baker M, Litvan I, Houlden H, *et al.* Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Human molecular genetics* 1999; **8**: 711-715.
5. Bandopadhyay R, Kingsbury AE, Cookson MR, *et al.* The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* 2004; **127**: 420-430.
6. Beck RO, Betts CD, Fowler CJ. Genitourinary dysfunction in multiple system atrophy: clinical features and treatment in 62 cases. *The Journal of urology* 1994; **151**: 1336-1341.
7. Ben-Shlomo Y, Wenning GK, Tison F, Quinn NP. Survival of patients with pathologically proven multiple system atrophy: a meta-analysis. *Neurology* 1997; **48**: 384-393.
8. Berg D, Niwar M, Maass S, *et al.* Alpha-synuclein and Parkinson's disease: implications from the screening of more than 1,900 patients. *Mov Disord* 2005; **20**: 1191-1194.
9. Birdi S, Rajput AH, Fenton M, *et al.* Progressive supranuclear palsy diagnosis and confounding features: report on 16 autopsied cases. *Mov Disord* 2002; **17**: 1255-1264.
10. Biskup S, Moore DJ, Celsi F, *et al.* Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Annals of neurology* 2006; **60**: 557-569.
11. Boesch SM, Wenning GK, Ransmayr G, Poewe W. Dystonia in multiple system atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2002; **72**: 300-303.
12. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, *et al.* Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science (New York, N.Y)* 2003; **299**: 256-259.
13. Bosgraaf L, Van Haastert PJ. Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochimica et biophysica acta* 2003; **1643**: 5-10.
14. Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology* 1999; **52**: 1214-1220.

15. Brooks DJ. Diagnosis and management of atypical parkinsonian syndromes. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2002; **72 Suppl 1**: I10-I16.
16. Brown J, Lantos P, Stratton M, Roques P, Rossor M. Familial progressive supranuclear palsy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1993; **56**: 473-476.
17. Burn DJ, Lees AJ. Progressive supranuclear palsy: where are we now? *Lancet neurology* 2002; **1**: 359-369.
18. Burn DJ, Warren NM. Toward future therapies in progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2005; **20 Suppl 12**: S92-98.
19. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; **101**: 9103-9108.
20. Chio A, Magnani C, Schiffer D. Prevalence of Parkinson's disease in Northwestern Italy: comparison of tracer methodology and clinical ascertainment of cases. *Mov Disord* 1998; **13**: 400-405.
21. Cho J-W, Kim, S-Y, Park S-S, Beom, S. The G2019S LRRK2 Mutation is Rare in Korean Patients with Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *J Clin Neurol* 2009; **5**: 29-32.
22. Chrysostome V, Tison F, Yekhlef F, Sourgen C, Baldi I, Dartigues JF. Epidemiology of multiple system atrophy: a prevalence and pilot risk factor study in Aquitaine, France. *Neuroepidemiology* 2004; **23**: 201-208.
23. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, et al. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006; **441**: 1162-1166.
24. Clark LN, Afridi S, Mejia-Santana H, et al. Analysis of an early-onset Parkinson's disease cohort for DJ-1 mutations. *Mov Disord* 2004; **19**: 796-800.
25. Colosimo C. Pisa syndrome in a patient with multiple system atrophy. *Mov Disord* 1998; **13**: 607-609.
26. Conrad C, Andreadis A, Trojanowski JQ, et al. Genetic evidence for the involvement of tau in progressive supranuclear palsy. *Annals of neurology* 1997; **41**: 277-281.
27. Cookson MR, Dauer W, Dawson T, Fon EA, Guo M, Shen J. The roles of kinases in familial Parkinson's disease. *J Neurosci* 2007; **27**: 11865-11868.
28. Costa C, Duyckaerts C. Oligodendroglial and neuronal inclusions in multiple system atrophy. *Current opinion in neurology* 1993; **6**: 865-871.
29. Daniel S: **The neuropathology and neurochemistry of multiple system atrophy**. In: *Autonomic failure: a textbook of clinical disorders of the autonomic nervous system*. Oxford: Oxford University Press; 1992: 564 - 585.
30. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; **417**: 949-954.
31. Dawson TM. Parkin and defective ubiquitination in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* 2006: 209-213.

32. de Lau LM, Giesbergen PC, de Rijk MC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. *Neurology* 2004; **63**: 1240-1244.
33. de Yébenes JG, Sarasa JL, Daniel SE, Lees AJ. Familial progressive supranuclear palsy. Description of a pedigree and review of the literature. *Brain* 1995; **118 (Pt 5)**: 1095-1103.
34. Devine MJ, Lewis PA. Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: tangles, Lewy bodies and LRRK2. *The FEBS journal* 2008; **275**: 5748-5757.
35. Di Fonzo A, Rohe CF, Ferreira J, *et al.* A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 2005; **365**: 412-415.
36. Dickson DW. Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Journal of neurology* 1999; **246 Suppl 2**: I16-15.
37. Dickson DW, Lin W, Liu WK, Yen SH. Multiple system atrophy: a sporadic synucleinopathy. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 1999; **9**: 721-732.
38. Dickson DW, Rademakers R, Hutton ML. Progressive supranuclear palsy: pathology and genetics. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 2007; **17**: 74-82.
39. Duda JE, Giasson BI, Mabon ME, *et al.* Concurrence of alpha-synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred. *Acta neuropathologica* 2002; **104**: 7-11.
40. Farrer M, Chan P, Chen R, *et al.* Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Annals of neurology* 2001; **50**: 293-300.
41. Farrer M, Gwinn-Hardy K, Muenter M, *et al.* A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Human molecular genetics* 1999; **8**: 81-85.
42. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, *et al.* alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature cell biology* 2002; **4**: 160-164.
43. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Annals of neurology* 2002; **51**: 296-301.
44. Funayama M, Hasegawa K, Ohta E, *et al.* An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Annals of neurology* 2005; **57**: 918-921.
45. Fung HC, Chen CM, Hardy J, Hernandez D, Singleton A, Wu YR. Lack of G2019S LRRK2 mutation in a cohort of Taiwanese with sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; **21**: 880-881.
46. Gaig C, Ezquerro M, Martí MJ, *et al.* Screening for the LRRK2 G2019S and codon-1441 mutations in a pathological series of parkinsonian syndromes and frontotemporal lobar degeneration. *Journal of the neurological sciences* 2008; **270**: 94-98.
47. Galpern WR, Lang AE. Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins. *Annals of neurology* 2006; **59**: 449-458.

48. Galter D, Westerlund M, Carmine A, Lindqvist E, Sydow O, Olson L. LRRK2 expression linked to dopamine-innervated areas. *Annals of neurology* 2006; **59**: 714-719.
49. Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, *et al.* PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 2006; **129**: 1720-1731.
50. Gasser T: **Genetics of Atypical Parkinsonism.** In: *Atypical Parkinsonian Disorders: Clinical and Research Aspects.* Edited by Litvan I, vol. 1: Humana Press Inc., USA; 2005: 137 - 152.
51. Gasser T. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007; **22 Suppl 17**: S343-350.
52. Geser F, Wenning, G.K. Clinical Presentation and Therapy of Multiple System Atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2004; **5**: 56-62.
53. Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, *et al.* Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science (New York, N.Y)* 2003; **300**: 636-640.
54. Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, *et al.* A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005; **365**: 415-416.
55. Gilman S, Low PA, Quinn N, *et al.* Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Journal of the neurological sciences* 1999; **163**: 94-98.
56. Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, *et al.* The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Human molecular genetics* 2006; **15**: 223-232.
57. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989; **3**: 519-526.
58. Golbe LI, Davis PH, Schoenberg BS, Duvoisin RC. Prevalence and natural history of progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1988; **38**: 1031-1034.
59. Graham JG, Oppenheimer DR. Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1969; **32**: 28-34.
60. Greggio E, Jain S, Kingsbury A, *et al.* Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiology of disease* 2006; **23**: 329-341.
61. Hardy J, Cookson MR, Singleton A. Genes and parkinsonism. *Lancet neurology* 2003; **2**: 221-228.
62. Hatano Y, Li Y, Sato K, *et al.* Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Annals of neurology* 2004; **56**: 424-427.
63. Hayashi S, Wakabayashi K, Ishikawa A, *et al.* An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene. *Mov Disord* 2000; **15**: 884-888.
64. Healy DG, Abou-Sleiman PM, Valente EM, *et al.* DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2004; **75**: 144-145.

65. Hedrich K, Djarmati A, Schafer N, *et al.* DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2004; **62**: 389-394.
66. Hernandez D, Paisan Ruiz C, Crawley A, *et al.* The dardarin G 2019 S mutation is a common cause of Parkinson's disease but not other neurodegenerative diseases. *Neuroscience letters* 2005; **389**: 137-139.
67. Hierholzer J, Cordes M, Venz S, *et al.* Loss of dopamine-D2 receptor binding sites in Parkinsonian plus syndromes. *J Nucl Med* 1998; **39**: 954-960.
68. Higashi S, Moore DJ, Colebrooke RE, *et al.* Expression and localization of Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 in the mouse brain. *Journal of neurochemistry* 2007; **100**: 368-381.
69. Hussain IF, Brady CM, Swinn MJ, Mathias CJ, Fowler CJ. Treatment of erectile dysfunction with sildenafil citrate (Viagra) in parkinsonism due to Parkinson's disease or multiple system atrophy with observations on orthostatic hypotension. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2001; **71**: 371-374.
70. Ishihara L, Warren L, Gibson R, *et al.* Clinical features of Parkinson disease patients with homozygous leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutations. *Archives of neurology* 2006; **63**: 1250-1254.
71. Ito G, Okai T, Fujino G, *et al.* GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. *Biochemistry* 2007; **46**: 1380-1388.
72. Jaleel M, Nichols RJ, Deak M, *et al.* LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. *The Biochemical journal* 2007; **405**: 307-317.
73. Jankovic J, Gilden JL, Hiner BC, *et al.* Neurogenic orthostatic hypotension: a double-blind, placebo-controlled study with midodrine. *The American journal of medicine* 1993; **95**: 38-48.
74. Josephs KA, Dickson DW. Diagnostic accuracy of progressive supranuclear palsy in the Society for Progressive Supranuclear Palsy brain bank. *Mov Disord* 2003; **18**: 1018-1026.
75. Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, *et al.* Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *American journal of human genetics* 2005; **76**: 672-680.
76. Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, *et al.* Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; **102**: 5215-5220.
77. Kirchof K, Apostolidis AN, Mathias CJ, Fowler CJ. Erectile and urinary dysfunction may be the presenting features in patients with multiple system atrophy: a retrospective study. *International journal of impotence research* 2003; **15**: 293-298.
78. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; **392**: 605-608.
79. Klein C, Lohmann-Hedrich K. Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Current opinion in neurology* 2007; **20**: 453-464.

80. Klein C, Schlossmacher MG. Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder. *Neurology* 2007; **69**: 2093-2104.
81. Klockgether T, Ludtke R, Kramer B, *et al.* The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain* 1998; **121 (Pt 4)**: 589-600.
82. Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology* 2001; **11**: 725-732.
83. Kruger R, Kuhn W, Muller T, *et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature genetics* 1998; **18**: 106-108.
84. Lantos PL. Multiple System Atrophy. *Brain Pathology* 1997; **7**: 1293 - 1297.
85. Lee E, Hui S, Ho G, Tan EK, Chen CP. LRRK2 G2019S and I2020T mutations are not common in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; **141**: 549-550.
86. Lee VM, Giasson BI, Trojanowski JQ. More than just two peas in a pod: common amyloidogenic properties of tau and alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences* 2004; **27**: 129-134.
87. Lees A: **The treatment of the motor disorders of multiple system atrophy.** In: *Autonomic failure*. Edited by Mathias C, Bannister, R. . Oxford: Oxford University Press; 1999: 357 - 363.
88. Leroy E, Boyer R, Auburger G, *et al.* The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; **395**: 451-452.
89. Lesage S, Durr A, Tazir M, *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *The New England journal of medicine* 2006; **354**: 422-423.
90. Lesage S, Ibanez P, Lohmann E, *et al.* G2019S LRRK2 mutation in French and North African families with Parkinson's disease. *Annals of neurology* 2005; **58**: 784-787.
91. Lesage S, Leutenegger AL, Ibanez P, *et al.* LRRK2 haplotype analyses in European and North African families with Parkinson disease: a common founder for the G2019S mutation dating from the 13th century. *American journal of human genetics* 2005; **77**: 330-332.
92. Lewis PA, Greggio E, Beilina A, Jain S, Baker A, Cookson MR. The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis. *Biochemical and biophysical research communications* 2007; **357**: 668-671.
93. Li X, Tan YC, Poulou S, Olanow CW, Huang XY, Yue Z. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)/PARK8 possesses GTPase activity that is altered in familial Parkinson's disease R1441C/G mutants. *Journal of neurochemistry* 2007; **103**: 238-247.
94. Litvan I. Diagnosis and management of progressive supranuclear palsy. *Seminars in neurology* 2001; **21**: 41-48.
95. Litvan I. Update on progressive supranuclear palsy. *Current neurology and neuroscience reports* 2004; **4**: 296-302.
96. Litvan I: **Atypical Parkinsonian Disorders: Clinical and Research Aspects.** In: *Current Clinical Neurology*. vol. 1: Humana Press Inc., USA; 2005: 1.

97. Litvan I. Update of atypical Parkinsonian disorders. *Current opinion in neurology* 2007; **20**: 434-437.
98. Litvan I, Agid Y, Calne D, *et al.* Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology* 1996; **47**: 1-9.
99. Litvan I, Bhatia KP, Burn DJ, *et al.* Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Mov Disord* 2003; **18**: 467-486.
100. Litvan I, Campbell G, Mangone CA, *et al.* Which clinical features differentiate progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) from related disorders? A clinicopathological study. *Brain* 1997; **120 (Pt 1)**: 65-74.
101. Lockhart PJ, Lincoln S, Hulihan M, *et al.* DJ-1 mutations are a rare cause of recessively inherited early onset parkinsonism mediated by loss of protein function. *Journal of medical genetics* 2004; **41**: e22.
102. Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, *et al.* How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Annals of neurology* 2003; **54**: 176-185.
103. Lopez OL, Litvan I, Catt KE, *et al.* Accuracy of four clinical diagnostic criteria for the diagnosis of neurodegenerative dementias. *Neurology* 1999; **53**: 1292-1299.
104. Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nature reviews* 2002; **3**: 932-942.
105. Low PA, Gilden JL, Freeman R, Sheng KN, McElligott MA. Efficacy of midodrine vs placebo in neurogenic orthostatic hypotension. A randomized, double-blind multicenter study. Midodrine Study Group. *Jama* 1997; **277**: 1046-1051.
106. Lu CS, Chang HC, Weng YH, Chen RS, Bonifati V, Wu-Chou YH. Analysis of the LRRK2 Gly2385Arg variant in primary dystonia and multiple system atrophy in Taiwan. *Parkinsonism & related disorders* 2008; **14**: 393-396.
107. Lu CS, Simons EJ, Wu-Chou YH, *et al.* The LRRK2 I2012T, G2019S, and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 2005; **11**: 521-522.
108. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, *et al.* Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *The New England journal of medicine* 2000; **342**: 1560-1567.
109. Luzon-Toro B, Rubio de la Torre E, Delgado A, Perez-Tur J, Hilfiker S. Mechanistic insight into the dominant mode of the Parkinson's disease-associated G2019S LRRK2 mutation. *Human molecular genetics* 2007; **16**: 2031-2039.
110. MacLeod D, Dowman J, Hammond R, Leete T, Inoue K, Abeliovich A. The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron* 2006; **52**: 587-593.

111. Marongiu R, Ghezzi D, Ialongo T, *et al.* Frequency and phenotypes of LRRK2 G2019S mutation in Italian patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; **21**: 1232-1235.
112. Mata IF, Lockhart PJ, Farrer MJ. Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 2004; **13 Spec No 1**: R127-133.
113. Mata IF, Taylor JP, Kachergus J, *et al.* LRRK2 R1441G in Spanish patients with Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 2005; **382**: 309-311.
114. Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA. LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends in neurosciences* 2006; **29**: 286-293.
115. Morales B, Martinez A, Gonzalo I, *et al.* Steele-Richardson-Olszewski syndrome in a patient with a single C212Y mutation in the parkin protein. *Mov Disord* 2002; **17**: 1374-1380.
116. Mori H, Oda M, Komori T, *et al.* Lewy bodies in progressive supranuclear palsy. *Acta neuropathologica* 2002; **104**: 273-278.
117. Morris HR, Osaki Y, Holton J, *et al.* Tau exon 10 +16 mutation FTDP-17 presenting clinically as sporadic young onset PSP. *Neurology* 2003; **61**: 102-104.
118. Morris HR, Vaughan JR, Datta SR, *et al.* Multiple system atrophy/progressive supranuclear palsy: alpha-Synuclein, synphilin, tau, and APOE. *Neurology* 2000; **55**: 1918-1920.
119. Muller J, Wenning GK, Verny M, *et al.* Progression of dysarthria and dysphagia in postmortem-confirmed parkinsonian disorders. *Archives of neurology* 2001; **58**: 259-264.
120. Nath U, Ben-Shlomo Y, Thomson RG, Lees AJ, Burn DJ. Clinical features and natural history of progressive supranuclear palsy: a clinical cohort study. *Neurology* 2003; **60**: 910-916.
121. Nath U, Ben-Shlomo Y, Thomson RG, *et al.* The prevalence of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) in the UK. *Brain* 2001; **124**: 1438-1449.
122. Neumann M, Muller V, Gerner K, Kretschmar HA, Haass C, Kahle PJ. Pathological properties of the Parkinson's disease-associated protein DJ-1 in alpha-synucleinopathies and tauopathies: relevance for multiple system atrophy and Pick's disease. *Acta neuropathologica* 2004; **107**: 489-496.
123. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, *et al.* Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 2006; **59**: 298-309.
124. Nuytemans K, Rademakers R, Theuns J, *et al.* Founder mutation p.R1441C in the leucine-rich repeat kinase 2 gene in Belgian Parkinson's disease patients. *Eur J Hum Genet* 2008; **16**: 471-479.
125. Osaki Y, Wenning GK, Daniel SE, *et al.* Do published criteria improve clinical diagnostic accuracy in multiple system atrophy? *Neurology* 2002; **59**: 1486-1491.

126. Ozawa T, Takano H, Onodera O, *et al.* No mutation in the entire coding region of the alpha-synuclein gene in pathologically confirmed cases of multiple system atrophy. *Neuroscience letters* 1999; **270**: 110-112.
127. Ozelius LJ, Foroud T, May S, *et al.* G2019S mutation in the leucine-rich repeat kinase 2 gene is not associated with multiple system atrophy. *Mov Disord* 2007; **22**: 546-549.
128. Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *The New England journal of medicine* 2006; **354**: 424-425.
129. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, *et al.* Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; **44**: 595-600.
130. Papapetropoulos S, Tuchman A, Laufer D, Papatsoris AG, Papapetropoulos N, Mash DC. Causes of death in multiple system atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2007; **78**: 327-329.
131. Papp MI, Kahn JE, Lantos PL. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *Journal of the neurological sciences* 1989; **94**: 79-100.
132. Park J, Lee SB, Lee S, *et al.* Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 2006; **441**: 1157-1161.
133. Parkinson J: **An Essay on the Shaking Palsy**. London: Sherwood, Neely and Jones; 1817.
134. Pastor P, Pastor E, Carnero C, *et al.* Familial atypical progressive supranuclear palsy associated with homozygosity for the delN296 mutation in the tau gene. *Annals of neurology* 2001; **49**: 263-267.
135. Periquet M, Latouche M, Lohmann E, *et al.* Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 2003; **126**: 1271-1278.
136. Petrucelli L, Kehoe, K., Lockhardt, P. Tau is a parkin substrate; implications for neurodegenerative disease. *Mov Disord* 2002; **17**: e156.
137. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y)* 1997; **276**: 2045-2047.
138. Pramstaller PP, Kis B, Eskelson C, *et al.* Phenotypic variability in a large kindred (Family LA) with deletions in the parkin gene. *Mov Disord* 2002; **17**: 424-426.
139. Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, *et al.* Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Annals of neurology* 2005; **58**: 411-422.
140. Quinn NP. How to diagnose multiple system atrophy. *Mov Disord* 2005; **20 Suppl 12**: S5-S10.
141. Rajput A, Dickson DW, Robinson CA, *et al.* Parkinsonism, Lrrk2 G2019S, and tau neuropathology. *Neurology* 2006; **67**: 1506-1508.
142. Richardson JC, Steele J, Olszewski J. Supranuclear Ophthalmoplegia, Pseudobulbar Palsy, Nuchal Dystonia and Dementia. a Clinical Report

- on Eight Cases of "Heterogenous System Degeneration". *Transactions of the American Neurological Association* 1963; **88**: 25-29.
143. Rogaeva E, Johnson J, Lang AE, *et al.* Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. *Archives of neurology* 2004; **61**: 1898-1904.
144. Rohe CF, Montagna P, Breedveld G, Cortelli P, Oostra BA, Bonifati V. Homozygous PINK1 C-terminus mutation causing early-onset parkinsonism. *Annals of neurology* 2004; **56**: 427-431.
145. Ros R, Ampuero I, Garcia de Yébenes J. Parkin polymorphisms in progressive supranuclear palsy. *Journal of the neurological sciences* 2008; **268**: 176-178.
146. Ross OA, Toft M, Whittle AJ, *et al.* Lrrk2 and Lewy body disease. *Annals of neurology* 2006; **59**: 388-393.
147. Ross OA, Whittle AJ, Cobb SA, *et al.* Lrrk2 R1441 substitution and progressive supranuclear palsy. *Neuropathology and applied neurobiology* 2006; **32**: 23-25.
148. Sakaguchi-Nakashima A, Meir JY, Jin Y, Matsumoto K, Hisamoto N. LRK-1, a C. elegans PARK8-related kinase, regulates axonal-dendritic polarity of SV proteins. *Curr Biol* 2007; **17**: 592-598.
149. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; **74**: 5463-5467.
150. Sawle GV, Playford ED, Brooks DJ, Quinn N, Frackowiak RS. Asymmetrical pre-synaptic and post-synaptic changes in the striatal dopamine projection in dopa naive parkinsonism. Diagnostic implications of the D2 receptor status. *Brain* 1993; **116 (Pt 4)**: 853-867.
151. Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* 1999; **354**: 1771-1775.
152. Schulz JB, Klockgether T, Petersen D, *et al.* Multiple system atrophy: natural history, MRI morphology, and dopamine receptor imaging with 123IBZM-SPECT. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1994; **57**: 1047-1056.
153. Schwarz J, Storch, A.: **Klassifikation der Parkinson-Syndrome**. In: *Parkinson-Syndrome: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*. Stuttgart: Kohlhammer Verlag GmbH, Stuttgart; 2007: 16-18.
154. Scott WK, Grubber JM, Conneally PM, *et al.* Fine mapping of the chromosome 12 late-onset Alzheimer disease locus: potential genetic and phenotypic heterogeneity. *American journal of human genetics* 2000; **66**: 922-932.
155. Shimura H, Hattori N, Kubo S, *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature genetics* 2000; **25**: 302-305.
156. Sidhu A, Wersinger C, Moussa CE, Vernier P. The role of alpha-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; **1035**: 250-270.

157. Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, *et al.* Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Human molecular genetics* 2005; **14**: 3477-3492.
158. Sim CH, Lio DS, Mok SS, *et al.* C-terminal truncation and Parkinson's disease-associated mutations down-regulate the protein serine/threonine kinase activity of PTEN-induced kinase-1. *Human molecular genetics* 2006; **15**: 3251-3262.
159. Simon-Sanchez J, Herranz-Perez V, Olucha-Bordonau F, Perez-Tur J. LRRK2 is expressed in areas affected by Parkinson's disease in the adult mouse brain. *The European journal of neuroscience* 2006; **23**: 659-666.
160. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, *et al.* alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y)* 2003; **302**: 841.
161. Skipper L, Shen H, Chua E, *et al.* Analysis of LRRK2 functional domains in nondominant Parkinson disease. *Neurology* 2005; **65**: 1319-1321.
162. Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in biochemical sciences* 1999; **24**: 181-185.
163. Smith WW, Pei Z, Jiang H, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nature neuroscience* 2006; **9**: 1231-1233.
164. Spanaki C, Latsoudis H, Plaitakis A. LRRK2 mutations on Crete: R1441H associated with PD evolving to PSP. *Neurology* 2006; **67**: 1518-1519.
165. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; **95**: 6469-6473.
166. Stanford PM, Halliday GM, Brooks WS, *et al.* Progressive supranuclear palsy pathology caused by a novel silent mutation in exon 10 of the tau gene: expansion of the disease phenotype caused by tau gene mutations. *Brain* 2000; **123 (Pt 5)**: 880-893.
167. Steele JC, Richardson JC, Olszewski J. Progressive Supranuclear Palsy. a Heterogeneous Degeneration Involving the Brain Stem, Basal Ganglia and Cerebellum with Vertical Gaze and Pseudobulbar Palsy, Nuchal Dystonia and Dementia. *Archives of neurology* 1964; **10**: 333-359.
168. Stenmark H, Olkkonen VM. The Rab GTPase family. *Genome biology* 2001; **2**: REVIEWS3007.
169. Tan EK. The role of common genetic risk variants in Parkinson disease. *Clinical genetics* 2007; **72**: 387-393.
170. Tan EK, Shen H, Tan LC, *et al.* The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients. *Neuroscience letters* 2005; **384**: 327-329.
171. Tan EK, Skipper L, Chua E, *et al.* Analysis of 14 LRRK2 mutations in Parkinson's plus syndromes and late-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; **21**: 997-1001.
172. Tan EK, Skipper L, Tan L, Liu JJ. LRRK2 G2019S founder haplotype in the Chinese population. *Mov Disord* 2007; **22**: 105-107.

173. Tan EK, Skipper LM. Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Human mutation* 2007; **28**: 641-653.
174. Tan EK, Zhao Y, Skipper L, *et al.* The LRRK2 Gly2385Arg variant is associated with Parkinson's disease: genetic and functional evidence. *Human genetics* 2007; **120**: 857-863.
175. Tanner CM. Is the cause of Parkinson's disease environmental or hereditary? Evidence from twin studies. *Advances in neurology* 2003; **91**: 133-142.
176. Taymans JM, Van den Haute C, Baekelandt V. Distribution of PINK1 and LRRK2 in rat and mouse brain. *Journal of neurochemistry* 2006; **98**: 951-961.
177. Tedde A, Bagnoli S, Cellini E, Nacmias B, Piacentini S, Sorbi S. No association between the LRRK2 G2019S mutation and Alzheimer's disease in Italy. *Cellular and molecular neurobiology* 2007; **27**: 877-881.
178. Testa D, Monza D, Ferrarini M, Soliveri P, Girotti F, Filippini G. Comparison of natural histories of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy. *Neurol Sci* 2001; **22**: 247-251.
179. Toft M, Sando SB, Melquist S, *et al.* LRRK2 mutations are not common in Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development* 2005; **126**: 1201-1205.
180. Tomiyama H, Li Y, Funayama M, *et al.* Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries. *Mov Disord* 2006; **21**: 1102-1108.
181. Valente EM, Salvi S, Ialongo T, *et al.* PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Annals of neurology* 2004; **56**: 336-341.
182. Vekrellis K, Rideout HJ, Stefanis L. Neurobiology of alpha-synuclein. *Molecular neurobiology* 2004; **30**: 1-21.
183. Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuroscience letters* 1998; **249**: 180-182.
184. Waragai M, Wei J, Fujita M, *et al.* Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 2006; **345**: 967-972.
185. Warren NM, Burn DJ. Progressive supranuclear palsy. *Practical neurology* 2007; **7**: 16-23.
186. Watanabe H, Saito Y, Terao S, *et al.* Progression and prognosis in multiple system atrophy: an analysis of 230 Japanese patients. *Brain* 2002; **125**: 1070-1083.
187. Wenning GK, Ben-Shlomo Y, Hughes A, Daniel SE, Lees A, Quinn NP. What clinical features are most useful to distinguish definite multiple system atrophy from Parkinson's disease? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2000; **68**: 434-440.
188. Wenning GK, Ben-Shlomo Y, Magalhaes M, Daniel SE, Quinn NP. Clinicopathological study of 35 cases of multiple system atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1995; **58**: 160-166.

189. Wenning GK, Ben Shlomo Y, Magalhaes M, Daniel SE, Quinn NP. Clinical features and natural history of multiple system atrophy. An analysis of 100 cases. *Brain* 1994; **117 (Pt 4)**: 835-845.
190. Wenning GK, Geser F, Poewe W. The 'risus sardonicus' of multiple system atrophy. *Mov Disord* 2003; **18**: 1211.
191. Wenning GK, Jellinger KA. The role of alpha-synuclein and tau in neurodegenerative movement disorders. *Current opinion in neurology* 2005; **18**: 357-362.
192. Wenning GK, Litvan I, Jankovic J, *et al.* Natural history and survival of 14 patients with corticobasal degeneration confirmed at postmortem examination. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1998; **64**: 184-189.
193. West AB, Moore DJ, Biskup S, *et al.* Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; **102**: 16842-16847.
194. West AB, Moore DJ, Choi C, *et al.* Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Human molecular genetics* 2007; **16**: 223-232.
195. Whittle AJ, Ross OA, Naini A, *et al.* Pathogenic Lrrk2 substitutions and Amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm* 2007; **114**: 327-329.
196. Williams DR, de Silva R, Paviour DC, *et al.* Characteristics of two distinct clinical phenotypes in pathologically proven progressive supranuclear palsy: Richardson's syndrome and PSP-parkinsonism. *Brain* 2005; **128**: 1247-1258.
197. Wirdefeldt K, Gatz M, Schalling M, Pedersen NL. No evidence for heritability of Parkinson disease in Swedish twins. *Neurology* 2004; **63**: 305-311.
198. Wright RA, Kaufmann HC, Perera R, *et al.* A double-blind, dose-response study of midodrine in neurogenic orthostatic hypotension. *Neurology* 1998; **51**: 120-124.
199. Wszolek ZK, Pfeiffer RF, Tsuboi Y, *et al.* Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology. *Neurology* 2004; **62**: 1619-1622.
200. Wszolek ZK, Tsuboi Y, Uitti RJ, Reed L, Hutton ML, Dickson DW. Progressive supranuclear palsy as a disease phenotype caused by the S305S tau gene mutation. *Brain* 2001; **124**: 1666-1670.
201. Wszolek ZK, Vieregge P, Uitti RJ, *et al.* German-Canadian family (family A) with parkinsonism, amyotrophy, and dementia - Longitudinal observations. *Parkinsonism & related disorders* 1997; **3**: 125-139.
202. Yabe I, Soma H, Takei A, Fujiki N, Yanagihara T, Sasaki H. MSA-C is the predominant clinical phenotype of MSA in Japan: analysis of 142 patients with probable MSA. *Journal of the neurological sciences* 2006; **249**: 115-121.
203. Yang Y, Gehrke S, Imai Y, *et al.* Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; **103**: 10793-10798.

204. Zabetian CP, Lauricella CJ, Tsuang DW, Leverenz JB, Schellenberg GD, Payami H. Analysis of the LRRK2 G2019S mutation in Alzheimer Disease. *Archives of neurology* 2006; **63**: 156-157.
205. Zabetian CP, Samii A, Mosley AD, *et al.* A clinic-based study of the LRRK2 gene in Parkinson disease yields new mutations. *Neurology* 2005; **65**: 741-744.
206. Zampieri C, Di Fabio RP. Progressive supranuclear palsy: disease profile and rehabilitation strategies. *Physical therapy* 2006; **86**: 870-880.
207. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, *et al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of neurology* 2004; **55**: 164-173.
208. Zhu X, Rottkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA. Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2000; **59**: 880-888.
209. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, *et al.* Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; **44**: 601-607.

10 DANKSAGUNG

Ich möchte Prof. Gasser für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit und der Publikation eines Teils der Ergebnisse danken. Darüber hinaus bedanke ich mich für die stets schnelle Hilfe bei jedem meiner Anliegen, wobei diese oft auch über den Rahmen der Dissertation hinausgingen.

Des Weiteren möchte ich mich bedanken bei

Frau Dipl.-Biol. Claudia Schulte für die permanente Unterstützung in inhaltlichen und technischen Fragen, ohne die weder diese Arbeit noch die Publikation möglich gewesen wären,

Frau Petra Leitner für ihre Geduld bei meiner Einarbeitung in labortechnische Methoden und ihre ständige Hilfsbereitschaft,

allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Neurodegeneration des Hertie-Instituts für Klinische Hirnforschung in Tübingen für das angenehme Arbeitsklima,

Familie Reiner für das Korrekturlesen,

Martina, meinen Freunden und meiner Familie für ihre Unterstützung.

