

Aus dem Zentrum für Neurologie
Hertie-Institut für klinische Hirnforschung
Universitätsklinikum Tübingen
Abteilung Neurodegenerative Erkrankungen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. T. Gasser

Analyse der relativen Genexpression
von LRRK2 und α -Synuclein in humanem Vollblut
mittels quantitativer *real time* RT-PCR
in einem heterogenen Probandenkollektiv
aus Parkinson-Patienten, symptomatischen
und asymptomatischen LRRK2-Mutationsträgern
und Kontrollen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Rebecca Barbara Gottorf

aus

Karlsruhe

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Gasser
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Krschek

*Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet*

INHALT

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Parkinson-Syndrom	1
1.1.1	Prävalenz und Symptomatik	1
1.1.2	Pathologie	1
1.1.3	Ätiologische Klassifikation	2
1.1.4	Die monogenen, familiären Formen	3
1.2	Biomarker für das Parkinson-Syndrom	9
1.3	Fragestellungen	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Verbrauchsgegenstände	12
2.1.3	Reagenziensets (<i>kits</i>)	12
2.1.4	Chemikalien	13
2.2	Methoden	13
2.2.1	Probandenkollektiv	13
2.2.2	RNA-Isolation	16
2.2.3	Quantitative <i>real time</i> RT-PCR mit dem <i>LightCycler</i> [®] 1.5 von Roche	17
2.2.4	Gelelektrophorese	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Relative Expression von LRRK2 bzw. SNCA pro Proband	26
3.2	Korrelation der relativen Expression von LRRK2 bzw. SNCA mit klinischen und genetischen Daten	27
3.2.1	LRRK2	28
3.2.2	SNCA	30

3.3	Korrelation der relativen Expression von LRRK2 bzw. SNCA mit Krankheitsdauer und Alter der Probanden	32
3.3.1	Krankheitsdauer	32
3.3.2	Alter	33
3.4	Intraindividuelle Korrelation der relativen Expression von LRRK2 und SNCA	35
3.4.1	Im gesamten Kollektiv	36
3.4.2	Bei Patienten	38
3.4.3	Bei Kontrollen	39
3.5	Verlaufsbeobachtung der relativen Expression von LRRK2 und SNCA anhand von fünf Probanden	39
4	Diskussion	41
4.1	Biomarker für das Parkinson-Syndrom	41
4.2	Ko-Regulation von LRRK2 und SNCA	42
5	Zusammenfassung	46
6	Literatur	48
7	Anhang	55
7.1	Einzelmesswerte	55
7.2	Verzeichnis der Abbildungen, Diagramme und Tabellen	58
7.3	Danksagung	60
7.4	Lebenslauf	61

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a	Jahr
A	Adenin
bp	<i>base pair</i>
BR-Puffer	Britton-Robinson-Puffer (pH-Puffer)
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cp	<i>crossing point</i>
Ct	<i>crossing threshold</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
FA	Familienanamnese
g	Gramm
G	Guanin
HKG	<i>housekeeping-Gen</i>
HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase
Hz	Hertz
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
kb	Kilobase
Log	Logarithmus auf der Basis 10
LRRK2	<i>leucine rich repeat kinase 2</i>
m	männlich
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Probanden
nm	Nanometer
PS	Parkinson-Syndrom

RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SNCA	α -Synuclein
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SNpc	Substantia nigra pars compacta
T	Thymin
TG	<i>target</i> -Gen
T _m	Schmelztemperatur
UV	Ultraviolett
V	Volt
w	weiblich
μ l	Mikroliter

Für Aminosäuren wird der Internationale Einbuchstabencode verwendet.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Parkinson-Syndrom

1.1.1 Prävalenz und Symptomatik

Der englische Arzt James Parkinson (1755 - 1824) beschrieb vor knapp 200 Jahren in seiner Monographie „*An Essay on the Shaking Palsy*“⁴⁵ erstmals jenen Symptomenkomplex, welcher heute als das Parkinson-Syndrom (PS), eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen, bekannt ist. Das Parkinson-Syndrom ist, nach der Alzheimer-Krankheit, die am zweithäufigsten auftretende neurodegenerative Erkrankung. Die Inzidenz steigt hierbei mit zunehmendem Alter an, es sind schätzungsweise 0,3 % der 50-jährigen und bis zu 4,3 % der 85-jährigen Menschen betroffen¹². In Deutschland liegt die Prävalenz derzeit bei 100 - 200 / 100.000 Einwohnern. Aufgrund der demographischen Entwicklung unserer Gesellschaft ist es vorauszusehen, dass die Anzahl der Betroffenen zunehmen wird.

Das Parkinson-Syndrom ist eine chronisch progrediente, derzeit nicht ursächlich behandelbare Erkrankung. Sie ist definiert durch das Vorhandensein einer Brady- bzw. Akinese (Verlangsamung der Bewegungen bis hin zur Bewegungsunfähigkeit) und mindestens einem der drei weiteren Kardinalsymptome: Rigor (Anstieg des Muskeltonus der quergestreiften Muskulatur), Ruhetremor (Zittern, von circa 4 - 6 Hz) und posturale Instabilität (Störung der Stellreflexe). Daneben existiert eine vielfältige, fakultative Begleitsymptomatik an vegetativen, sensorischen, psychischen und kognitiven Symptomen.

1.1.2 Pathologie

Das Parkinson-Syndrom ist in seiner Pathologie durch ein Zugrundegehen von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) des Mittelhirns charakterisiert. Histologisch zeigt sich der Verlust dieser

Zellen, welche Neuromelanin enthalten, durch eine Depigmentierung der SNpc. Die dopaminergen Neurone projizieren in das Striatum (Putamen und Nucleus caudatus), der Dopaminmangel führt dort zu einem Ungleichgewicht der inhibierenden und stimulierenden Transmitter der Basalganglien. Letztlich kommt es zu einer überschießenden Hemmung des Thalamus, wodurch die motorische Stimulierung des Großhirncortexes vermindert wird. Dies führt zu den charakteristischen Symptomen des Parkinson-Syndroms. Charakteristisch sind außerdem die sogenannten Lewy-Körperchen, zytoplasmatische, eosinophile Einschlusskörperchen, welche post mortem in den überlebenden dopaminergen Neuronen der SNpc und in geringerer Anzahl auch in anderen Regionen des Gehirns gefunden werden. Seit ihrer Erstbeschreibung durch Friedrich H. Lewy im Jahr 1912 werden sie als nahezu pathognomonisch für das Parkinson-Syndrom angesehen. Sie konnten außerdem noch bei der sogenannten Lewy-Körperchen-Demenz festgestellt werden. Lewy-Körperchen kommen sowohl bei der sporadischen als auch der familiären Form des Parkinson-Syndroms vor.

1.1.3 Ätiologische Klassifikation

Der Begriff Parkinson-Syndrom oder auch Morbus Parkinson fungiert als Überbegriff für verschiedene Parkinson-Syndrome, welche anhand ihrer Ätiologie klassifiziert werden:

- Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS):
Mit 75 % aller Parkinson-Syndrome die bei weitem häufigste Form.
- Familiäres Parkinson-Syndrom:
Monogen vererbte Formen des Parkinson-Syndroms, entweder autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv, circa 10 % der Fälle.
- Sekundäre (symptomatische) Parkinson-Syndrome:
Medikamenten- oder toxininduzierte, posttraumatische, entzündliche oder vaskulär bedingte Parkinson-Syndrome.
- Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen (sogenannte atypische Parkinson-Syndrome):

Multisystematrophie, Progressive supranukleäre Blickparese, Kortikobasale Degeneration und Lewy-Körperchen-Demenz.

1.1.4 Die monogenen, familiären Formen

Ungefähr 10 % der Parkinson-Patienten * weisen eine positive Familienanamnese (FA) auf, welche mit einem Mendel'schen Erbgang vereinbar ist. In diesen Familien konnte in den letzten Jahren eine wachsende Anzahl von Genen identifiziert werden, welche mit monogen vererbten Formen der Erkrankung assoziiert sind. Mutationen in diesen ‚Parkinson-Genen‘ verursachen mit unterschiedlicher Penetranz ein autosomal-dominantes oder autosomal-rezessives Parkinson-Syndrom.

Gegenwärtig sind 16 Genorte, genannt PARK1-16, bekannt, welche mit einem familiären Parkinson-Syndrom assoziiert sind (s. Tabelle 1, S. 4). Es ist zu beachten, dass nicht bei allen dieser Loci und Gene die pathogene Rolle bisher sicher bestätigt wurde.

* Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in diesem Text ausschließlich das generische Maskulinum verwendet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichwohl für beiderlei Geschlecht.

Tabelle 1: Loci und Gene beim familiären Parkinson-Syndrom (modifiziert nach ²⁰)

Locus	Gen	Chromosomale Lokalisation	Vererbungsmodus
PARK1	SNCA	4q21	Dominant
PARK2	Parkin	6q25	Rezessiv
PARK3	SPR (?)	2p13	Dominant
PARK4	SNCA	4q21	Dominant
PARK5	UCH L1	4p14	Dominant
PARK6	PINK1	1p35-37	Rezessiv
PARK7	DJ-1	1p38	Rezessiv
PARK8	LRRK2	12cen	Dominant
PARK9	ATP13A2	1p36	Rezessiv
PARK11	GIGYF2 (?)	2q34	Dominant
PARK13	OMI / HTRA2 (?)	2p12	Dominant (?)
PARK14	PLA2G6	22	Rezessiv
PARK15	FBXO7	?	Rezessiv
PARK16 ⁵⁰	?	1p32	komplex

Zwei Gene, welche ein dominantes Parkinson-Syndroms verursachen können, konnten bis heute sicher identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um das α -Synuclein (SNCA)⁴⁶ und die *leucine rich repeat kinase 2* (LRRK2)^{44, 62}. Das Hauptaugenmerk soll im Folgenden bei diesen beiden dominanten Genen liegen.

1.1.4.1 PARK1/4: α -Synuclein

a) Genetik und Klinik

SNCA ist das erste entdeckte ‚Parkinson-Gen‘. Es wurden sowohl Punktmutationen (PARK1) als auch Duplikationen und Triplikationen (PARK4)^{28, 53} des Wildtyps als kausale Faktoren für ein dominantes Parkinson-Syndrom identifiziert. Momentan sind drei pathogene Punktmutationen bekannt: A30P, E46K und A53T^{32, 46, 61}.

Das klinische und pathologische Bild des dominanten Parkinson-Syndroms mit SNCA-Punktmutationen unterscheidet sich kaum von dem des IPS. Der

Phänotyp stellt sich als ein schnell progredientes Parkinson-Syndrom mit relativ frühem Erkrankungsalter und einer hohen Prävalenz von Demenz und psychiatrischen und vegetativen Störungen dar²², allerdings gibt es auch Betroffene, deren Parkinson-Syndrom klinisch von einem IPS nicht zu unterscheiden ist. Punktmutationen in SNCA wurden bisher niemals bei IPS-Patienten gefunden⁴.

b) Pathophysiologie

SNCA wird hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, von neuronalen Zellen exprimiert und physiologisch in die Umgebung sezerniert¹⁵. Bei den Punktmutationen führen die Aminosäureaustausche zu einer geänderten Faltung im α -Synuclein, wodurch es zu einer gesteigerten intrazellulären Akkumulation und Ablagerung des Proteins in Form der Lewy-Körperchen, deren Hauptbestandteil das α -Synuclein ist⁵⁴, kommt. Wahrscheinlich wird durch die geänderte Faltung des Proteins dessen Abbau durch lysosomale und proteasomale Mechanismen reduziert. Auf welchem Wege genau die Proteinaggregate zu Neurotoxizität und Zelltod führen, ist noch unbekannt.

Die Pathogenität der Multiplikationen des Wildtyp-SNCA-Genes und somit der Erhöhung des Proteinlevels weisen auf eine Dosisabhängigkeit des neurotoxischen Mechanismus hin. So erkranken beispielsweise Patienten mit einer SNCA-Triplikation durchschnittlich früher als solche mit einer SNCA-Duplikation⁹.

1.1.4.2 PARK8: LRRK2

a) Genetik und Klinik

Mutationen in LRRK2 sind eine wesentlich häufigere Ursache eines dominanten Parkinson-Syndroms als solche in SNCA. Gegenwärtig sind sechs *missense*-Mutationen bekannt, deren Pathogenität als erwiesen angesehen werden kann: R1441C, R1441G, R1441H, Y1699C, G2019S und I2020T. Diese Mutationen segregieren in den betroffenen Familien klar mit der Erkrankung und konnten in mehreren hundert Kontrollen nicht gefunden werden. Am häufigsten ist hiervon die G2019S-Mutation^{13, 29, 43}. Ihre

Frequenz lässt sich anhand von Daten aus verschiedenen Studien weltweit auf 4 % der Patienten mit familiärem Parkinson-Syndrom schätzen²³. Sie findet sich allerdings auch bei 1 % der sporadischen Fälle²³, was vermuten lässt, dass die Penetranz dieser Mutationen erniedrigt ist. Tatsächlich wurde das Erkrankungsrisiko anhand von über 1.000 G2019S-Mutationsträgern berechnet und beträgt 28 % im Alter von 59 Jahren, 51 % im Alter von 69 Jahren und 74 % im Alter von 79 Jahren²³.

Die klinische Manifestation des LRRK2-assoziierten Parkinson-Syndroms ähnelt sehr der des IPS, sowohl bezüglich des Erkrankungsalters als auch der Symptomatik. Auffallend ist die Pathologie, welche sich sehr variabel darstellt. Die meisten Fälle zeigen den histopathologischen Befund einer typischen Parkinson-Pathologie mit Lewy-Körperchen⁴⁸, es wurden jedoch auch Befunde beschrieben, die anderen neurodegenerativen Pathologien entsprechen, wie einer Lewy-Körperchen-Demenz, einer Nigralen Degeneration ohne bestimmte Histopathologie oder sogar einer Tau-Aggregation¹¹. LRRK2-Mutationen könnten daher ein übergeordnetes Ereignis in der Entstehung verschiedener Pathologien sein.

b) Pathophysiologie

Über die physiologische Funktion von LRRK2 und die pathogenen Mechanismen der Mutationen ist momentan noch wenig bekannt. Das LRRK2-Protein ist ubiquitär vorhanden und zum Großteil im Zytosol lokalisiert wobei es mit einer Vielzahl vesikulärer und membranöser Strukturen assoziiert ist, wie beispielsweise der äußeren Mitochondrienmembran oder synaptischen Vesikeln⁵.

LRRK2 ist ein großes Gen von 144 kb mit 51 Exons, welche 2.527 Aminosäuren kodieren (s. Abbildung 1, S. 7).

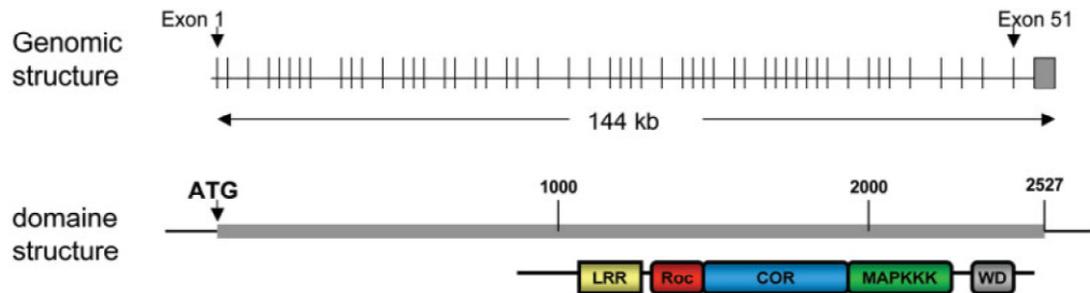


Abbildung 1: Genetische Struktur und funktionale Domänen von LRRK2¹⁹

Das Protein kann der Gruppe der kürzlich charakterisierten, sogenannten ROCO-Proteine⁷ zugeordnet werden und umfasst fünf Domänen, u.a. eine Proteinkinase-Domäne vom MAPKKK-Typ (*mitogen activated kinase kinase kinase*). Die MAPKKK spielt eine Rolle in verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden. Außerdem enthält LRRK2 eine LRR (*leucine rich repeat*) - Domäne, eine Roc (*Ras of complex proteins*) -Domäne, welche eine GTPase enthält, eine COR (*C-terminal of Roc*) -Domäne und WD40-Repetitionen.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Roc-Domäne die Kinaseaktivität intramolekular erhöhen kann³⁹. Einige der pathogenen LRRK2-Mutationen sind tatsächlich mit einer erhöhten Kinaseaktivität assoziiert^{21, 58}, was womöglich kausal zu Neurodegeneration führen kann.

1.1.4.3 Die autosomal-rezessiven Gene

Auf die juvenilen autosomal-rezessiven Parkinson-Syndrome soll hier der Vollständigkeit halber kurz eingegangen werden, da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bei den dominanten Formen liegt.

Mutationen in Parkin, DJ-1, PINK1 und ATP13A2 verursachen jeweils ein rezessives Parkinson-Syndrom^{6, 31, 47, 57}, wobei Mutationen in Parkin und PINK-1 am häufigsten vorkommen. Klinisch fallen die rezessiven Formen durch ein sehr niedriges Erkrankungsalter auf, Parkinson-assoziiertes Parkinsonismus manifestiert sich beispielsweise in der Mehrzahl der Fälle bereits in der vierten Lebensdekade. In einer europäischen Kohorte von 101 Erkrankten mit Parkin-Mutation lag das mittlere Erkrankungsalter bei 32 ± 11 Jahren³⁷. Patienten mit Parkin-Mutationen, welche eine negative

Familienanamnese aufweisen und daher idiopathisch zu sein scheinen, können durch ein niedriges Erkrankungsalter auffallen.

Die Pathogenität der rezessiv vererbten Mutationen beruht höchstwahrscheinlich auf einem *loss of function*-Mechanismus, was erahnen lässt, dass die Genprodukte der Wildtyp-Gene eine neuroprotektive Funktion gegen eine Vielzahl möglicher Schädigungen ausüben.

1.1.4.4 Die Relevanz der ‚Parkinson-Gene‘ für die sporadische Form der Erkrankung: genetische Risikovarianten

Diese familiären Formen sind zwar selten, aber dennoch von großer Relevanz für die Parkinson-Forschung. Es wird immer deutlicher, dass einige der pathogenen Mechanismen, welche bei den monogen determinierten Formen der Erkrankung charakterisiert wurden, auch eine Rolle in der Pathogenese des IPS spielen.

Generell wird angenommen, dass das Parkinson-Syndrom durch ein Zusammenspiel von verschiedenen, genetischen Suszeptibilitätsfaktoren und Umwelteinflüssen verursacht werden. Bei den beiden Genen SNCA und LRRK2 sind genetische Polymorphismen bekannt, welche als solche Suszeptibilitätsfaktoren fungieren. Es handelt sich hierbei vor allem um sogenannte *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Sie erhöhen das individuelle Risiko, ein IPS zu entwickeln, ohne jedoch wie die Mutationen obligat pathogen zu sein.

Im Falle des SNCA wurden mehrere polymorphe Genregionen charakterisiert, welche das relative Erkrankungsrisiko für ein IPS leicht erhöhen^{38, 41}. Hierbei scheint vor allem die 3'-Region des Gens interessant zu sein. Eine große Genom-weite Assoziationsstudie von Simón-Sánchez et al. mit über 3.000 Parkinson-Patienten und 4.000 Kontrollen fand ebenfalls ein starkes Assoziationssignal von vier SNPs im SNCA-Gen mit dem Parkinson-Syndrom, drei davon in der 3'-Region⁵².

Die Hypothese ist, dass diese Risikovarianten die Expressionslevel von SNCA beeinflussen und dadurch eine pathogenetische Wirkung entfalten. Für NACP-REP1, einer der Polymorphismen in der 3'-Region, konnte auch

bereits *in vitro* eine Beeinflussung der SNCA-Expression nachgewiesen werden¹⁰.

Auch für das LRRK2 wurden zwei Risikovarianten in asiatischen Populationen identifiziert: Die SNPs G2385R und R1628P erhöhen jeweils das relative Risiko um den Faktor 2^{14, 18, 36, 49, 55}.

Höchstwahrscheinlich sind diese genetischen Risikofaktoren relevanter als schädigende Umwelteinflüsse. Außer dem Alter, möchte man es denn als ‚äußeren‘ Faktor definieren, ließ sich kein weiterer, schädigender Umwelteinfluss finden, welcher von ähnlicher Bedeutung wäre wie die genetischen Faktoren²⁰.

Für die individuelle Risikovorhersage sind diese Polymorphismen nur von limitiertem Nutzen, allerdings könnten so in Zukunft Patientengruppen identifiziert werden, die einer spezifischen, auf die Pathomechanismen ihrer Polymorphismen zugeschnittenen Therapie zugeführt werden könnten.

1.2 Biomarker für das Parkinson-Syndrom

Biomarker sind objektive, biologische Parameter, welche mit der Präsenz (sogenannte *trait*-Biomarker) oder dem Stadium (sogenannte *state*-Biomarker) einer Krankheit korrelieren. Sie sollten leicht zugänglich, wie beispielweise in Blut, Liquor oder peripherem Gewebe, und einfach messbar sein.

Die Etablierung von Biomarkern für das Parkinson-Syndrom wäre vor allem aufgrund der langen präsymptomatischen Phase von Bedeutung. Erst wenn 70 % der dopaminergen Neuronen bereits degeneriert sind, treten erste Symptome auf und die Diagnose kann auf Grund von klinischen Kriterien gestellt werden. Diese präsymptomatischen Personen mit Hilfe eines Biomarkers zu identifizieren, eröffnet Möglichkeiten zur Testung von Medikamenten, welche den Krankheitsbeginn hinauszögern könnten.

Die genetischen Risikovarianten, also Mutationen oder Polymorphismen in den ‚Parkinson-Genen‘, können als *trait*-Biomarker interpretiert werden, da sie ein unveränderliches Merkmal eines Individuums repräsentieren. Sie

definieren das statistische Erkrankungsrisiko einer Person, welches des Weiteren hauptsächlich vom Alter der Person abhängig ist.

Als *state*-Biomarker würden Veränderungen im Transkriptom oder Proteom, welche mit dem Stadium der Erkrankung korrelieren, in Betracht kommen. Bisher war hierbei vor allem die Konzentration des SNCA-Proteins von Interesse. Es ist physiologisch in Blut und Liquor vorhanden^{1, 15}. Bezüglich einer Korrelation des Expressionslevels von SNCA im Blut und Liquor mit dem klinischen Status (Parkinson-Patienten im Vergleich zu Kontrollen) gibt es bisher widersprüchliche Daten. Einige Studien zeigen eine positive^{16, 30}, andere eine negative⁵⁶, wieder andere gar keine Korrelation¹⁷.

Wildtyp-LRRK2 wird von Leukozyten exprimiert⁶⁰ und könnte sich somit aufgrund der leichten Zugänglichkeit im peripheren Blut auch als Biomarker eignen.

Es konnte bisher jedoch noch kein verlässlicher *state*-Biomarker, mit welchem sich die Progression des Parkinson-Syndroms verfolgen ließe, etabliert werden.

1.3 Fragestellungen

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei verschiedene Fragestellungen verfolgt.

Primär wurden die Expressionslevel von LRRK2 und SNCA auf mRNA-Ebene in humanem Vollblut analysiert, und zwar in einem heterogenen Probandenkollektiv aus Parkinson-Patienten mit negativer Familienanamnese, sowie symptomatischen und asymptomatischen LRRK2-Mutationsträgern und neurodegenerativ gesunden Kontrollen. Hierbei wurde nach Hinweisen gesucht, ob die LRRK2- oder SNCA-Expressionslevel im peripheren Blut eventuell mit einem der verschiedenen demographischen, klinischen oder genetischen Charakteristika der Patienten korrelieren.

Die wichtigste Fragestellung hierbei war, ob die Expressionslevel mit der Klinik der Probanden korrelieren, also dem Vorhandensein eines Parkinson-Syndroms und der Krankheitsdauer (was hierfür mit einer Symptomprogression gleichgesetzt werden kann). Eine Korrelation könnte

wegweisend sein für die Etablierung eines *state*-Biomarkers. Die Miteinbeziehung von LRRK2-Mutationsträgern ermöglicht außerdem die Definierung von präsymptomatischen Personen, welche in Abhängigkeit von ihrem Alter und Penetranz der jeweiligen Mutation noch erkranken werden.

Der zweite Ansatz war, mehr über ein mögliches Zusammenspiel von LRRK2 und SNCA in Erfahrung zu bringen. Hierfür wurden im verwendeten humanen Vollblut die Expressionswerte dieser beiden Gene für jede Person des Kollektivs bestimmt und zueinander in Beziehung gesetzt. Analysen wie diese bringen, langfristig gesehen, sicherlich Licht in das Dunkel um die physiologische und pathologische Funktion dieser beiden wichtigen ‚Parkinson-Gene‘ und können somit zu einem besseren Verständnis der Ätiopathogenese des Parkinson-Syndroms beitragen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- RT-PCR-System: *LightCycler*[®] 1.5 mit *LightCycler*[®] Software V. 3.5 (Roche)
- Gelkammern: *PerfectBlue*[™] (Peqlab)
- Zentrifugen: *Centrifuge 5412 D* (Eppendorf), *Multifuge*[®] 3 S-R (Heraeus), *LightCycler*[®] *Carousel Centrifuge* (Roche)
- Spektralphotometer: *NanoDrop*[™] 1000 (Peqlab)
- Vortexer: *Vortex-Genie*[®] 2 (Scientific Industries)
- Pipetten: 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl (Gilson)
- Pipettierhilfe: *Pipetus*[®] (Hirschmann Laborgeräte)
- Schüttelinkubator: *Thermomixer comfort*[™] (Eppendorf)

2.1.2 Verbrauchsgegenstände

- *LightCycler*[®] *Capillaries* (Roche)
- *PAXgene*[™] *Blood RNA Tubes* (PreAnalytix)
- Pipettenspitzen: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl (Biozym)
- Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf); 15 ml, 50 ml (Greiner Bio-One)

2.1.3 Reagenziensets (*kits*)

- *PAXgene*[™] *Blood RNA Kit* (PreAnalytiX)
- *QuantiTect*[®] *SYBR*[®] *Green RT-PCR Kit* (Qiagen)

2.1.4 Chemikalien

- Agarose (Genaxxon Bioscience)
- Steriles Wasser (Gibco)
- DNA *loading dye* (Fermentas)
- DNA *ladder mix* (Fermentas)
- Ethanol (Merck)
- Ethidiumbromid (Merck)
- Primer für RT-PCR (Melbion)

2.2 Methoden

2.2.1 Probandenkollektiv

Sämtliche Patienten mit Parkinson-Syndrom, deren Blut bei dieser Arbeit verwendet wurde, waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Universitätsklinikum Tübingen, Zentrum für Neurologie, in stationärer oder ambulanter Behandlung. Bezüglich des klinischen Stadiums der Parkinson-Patienten wurden keine Ausschlusskriterien definiert.

Die Kontrollproben stammen entweder von Angehörigen der Patienten, Beschäftigten des Universitätsklinikums Tübingen oder aus dem privaten Umfeld der Autorin. Ausschlusskriterien für Kontrollpersonen waren neurodegenerative Erkrankungen. Generell wurde die Kontrollpopulation so gewählt, dass die Altersverteilung in etwa derjenigen des Patientenkollektives entspricht (s. Abschnitt 2.2.1.1, S. 15). Minderjährige Personen wurden generell ausgeschlossen.

Die Blutentnahmen wurden nach ärztlicher Aufklärung durchgeführt, schriftliche Einverständniserklärungen hinsichtlich der Studienteilnahme liegen vor.

Die Proben wurden im Zeitraum März 2008 bis Mai 2009 gesammelt.

Die Blutentnahmen erfolgten in *PAXgene™ Blood RNA Tubes* (PreAnalytix) mittels eines *BD Vacutainer®* Systems.

2. Material und Methoden

Tabelle 2: Gesamtes Probandenkollektiv (n = 33), dargestellt sind demographische, klinische und genetische Daten (FA = Familienanamnese, PS = Parkinson-Syndrom, m = männlich, w = weiblich)

Nr.	Geschlecht	Geburts-jahr	Path. Mutation in LRRK2?	Klinik	Krankheits-dauer [a]	Erkrankungs-alter
1	m	1963	G2019S	gesund		
2	m	1951	G2019S	gesund		
3	m	1968	R793M	gesund		
4	w	1947	FA neg.	gesund		
5	w	1947	FA neg.	gesund		
6	w	1944	FA neg.	gesund		
7	m	1964	FA neg.	gesund		
8	m	1965	FA neg.	gesund		
9	m	1945	FA neg.	gesund		
10	m	1938	FA neg.	gesund		
11	w	1929	FA neg.	gesund		
12	w	1931	FA neg.	gesund		
13	w	1929	FA neg.	gesund		
14	m	1958	FA pos.	PS	4	47
15	w	1944	FA pos.	PS	5	60
16	w	1946	FA pos.	PS	9	54
17	m	1939	FA pos.	PS	?	?
18	m	1937	FA pos.	PS	?	?
19	w	1958	G2019S	PS	?	?
20	w	1931	G2019S	PS	8	70
21	w	1945	I2020T	PS	7	57
22	m	1961	I2020T	PS	8	40
23	m	1966	N1437S	PS	5	38
24	m	1940	N1437S	PS	24	45
25	w	1947	R1441C	PS	23	39
26	m	1940	R793M	PS	27	42
27	w	1944	FA neg.	PS	3	62
28	w	1944	FA neg.	PS	3	62
29	m	1955	FA neg.	PS	5	49

30	m	1935	FA neg.	PS	5	69
31	m	1941	FA neg.	PS	6	62
32	w	1934	FA neg.	PS	?	?
33	w	1936	FA neg.	PS	?	?

2.2.1.1 Kohorten

Das gesamte Kollektiv aus 33 Probanden lässt sich nach klinischen und genetischen Kriterien folgendermaßen einteilen:

- 20 Patienten mit Parkinson-Syndrom, davon
 - 5 Patienten mit sicher pathogener LRRK2-Mutation (2 x G2019S, 2 x I2020T, 1 x R1441C).
 - 3 Patienten mit eventuell pathogener LRRK2-Mutation (2 x N1437S, 1 x R793M³). Für die Fragestellung mit genetischen Variablen (s. Abschnitt 3.2, S. 27) werden diese Mutationen, obwohl bisher unbestätigt, zu den pathogenen Mutationen hinzugezählt.
 - 7 Patienten mit negativer Familienanamnese (= IPS-Patienten), hierdurch lässt sich eine LRRK2-Mutation weitgehend ausschließen.
 - 5 Patienten mit einer positiven Familienanamnese. Diese Patienten werden lediglich bei Fragestellungen mit klinischen Variablen (‚PS ja / nein‘) eingeschlossen, nicht jedoch bei solchen mit genetischen Variablen (‚pathogene LRRK2-Mutation ja / nein‘).

- 13 neurodegenerativ gesunde Kontrollen, davon
 - 2 Kontrollen mit sicher pathogener LRRK2-Mutation (2 x G2019S).
 - 1 Kontrolle mit eventuell pathogener LRRK2-Mutation (1 x R793M).
 - 10 Kontrollen mit negativer Familienanamnese, wodurch sich bei dieser Kohorte LRRK2-Mutationen ebenfalls weitgehend ausschließen lassen, da die Altersstruktur der Kontrollen derjenigen der Parkinson-Patienten gleicht.

Die Altersverteilung der Patientenkohorte entspricht ungefähr derjenigen der Kontrollkohorte. Die 20 Patienten haben das mittlere Geburtsjahr 1945 ± 10 Jahre, die 13 Kontrollen 1948 ± 13 Jahre (arithmetische Mittelwerte einschließlich Standardabweichung).

2.2.2 RNA-Isolation

Zur Extraktion der RNA aus Vollblut wurde das *PAXgene™ Blood RNA Kit* (PreAnalytiX) verwendet.

Die *PAXgene™ Blood Tubes* enthalten bereits einen RNA-Stabilisator, zu welchem bei der Blutentnahme noch 2,5 ml Blut hinzugefügt werden.

Die *PAXgene™ Blood Tubes* werden zuerst für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert um eine komplette Zelllyse zu erreichen. Dann erfolgt eine erste Zentrifugation (10 min, 3.000 - 5.000 x g), eine Resuspension mit RNase-freiem Wasser und erneute Zentrifugation. Die zweite Resuspension erfolgt mit 350 µl BR1-Puffer, danach wird das Lysat in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 300 µl BR2-Puffer und 40 µl Proteinase K auf einem Schüttelinkubator inkubiert (10 min, 55 °C) um enthaltenes Protein zu entfernen. Anschließend wird das Zellmaterial durch Zentrifugation (3 min, > 20.000 x g) in einer *PAXgene™ Shredder-Säule* homogenisiert. Dem Überstand der durchgeflossenen Fraktion wird nun zur Optimierung der Bindungsbedingungen 350 µl Ethanol (96 - 100 %) zugesetzt. Nun wird die Probe fraktionsweise über die *PAXgene™ Spin-Säule* gegeben, wo sich die RNA während wiederholter, kurzer Zentrifugationsschritte (je 1 min, 8.000 - 20.000 x g) an eine Silikagel-Membran in der Säule bindet. Zur weiteren Aufreinigung erfolgen nun vier Waschschrte und ein DNase-Verdau, zwischen den ersten beiden Waschschrten, um Spuren von gebundener DNA zu entfernen. Der erste und zweite Waschschrte werden mit je 350 µl BR3-Puffer (je 1 min, 8.000 - 20.000 x g) durchgeführt, der dritte und vierte mit 500 µl BR-Puffer (1 bzw. 3 min, 8.000 - 20.000 x g).

Nun wird die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (1 min, 8.000 - 20.000 x g) in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße eluiert. Zuletzt wird

das Eluat noch einmal inkubiert (5 min, 65 °C, ohne zu schütteln) um die RNA zu denaturieren.

Die Eppendorf-Gefäße mit der gelösten RNA werden bei -80 °C tiefgefroren. Die Qualität der isolierten RNA wird mit dem Spektralphotometer *NanoDrop™ 1000* (Peqlab) überprüft. Hierbei stellt der Quotient zwischen den Werten bei 260 nm und 280 nm (A_{260} / A_{280}) ein Maß für die Verunreinigung der RNA durch Proteine dar. Bei allen Proben lag der A_{260} / A_{280} -Wert im optimalen Bereich zwischen 1,8 und 2,2.

2.2.3 Quantitative *real time* RT-PCR mit dem *LightCycler®*

1.5 von Roche

2.2.3.1 Prinzip

Die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine molekularbiologische Methode um die Genexpression von spezifischen Genen quantitativ zu bestimmen.

Sie basiert auf dem 1985 von Kary Mullis entwickelten Prinzip der konventionellen PCR⁴², welche den rein qualitativen Nachweis eines DNA-Abschnittes ermöglicht. Bei der konventionellen PCR wird eine exponentielle Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnittes (*target*-DNA), mittels flankierenden, komplementären Oligonukleotiden (Primern) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase durchgeführt. Sie verläuft in mehreren, sich wiederholenden Zyklen, je bestehend aus drei Temperaturschritten: Zunächst denaturiert die DNA, dann lagern sich die Primer zu beiden Enden des *target*-Gens an und schließlich wird der Komplementärstrang, von den Primern ausgehend, synthetisiert.

Eine Weiterentwicklung hiervon ist die *real time* PCR²⁴, welche die Quantifizierung eines DNA-Abschnittes möglich macht. Hierzu wird ein Fluoreszenzfarbstoff (Ethidiumbromid, *SYBR® Green I*²) verwendet, welcher sich in doppelsträngige DNA-Moleküle einlagert, die Fluoreszenz steigt somit proportional zur Menge des PCR-Produktes an. Die Messungen der

Fluoreszenz werden während des Laufes in Echtzeit (d.h. in *real time*) durchgeführt.

Auf dieser Basis wurde die *real time* RT-PCR zur Quantifizierung von RNA entwickelt. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche zuerst die RNA in cDNA umschreibt. Diese cDNA wird dann für eine *real time* PCR mit Fluoreszenzfarbstoff verwendet, um definierte Sequenzen zu quantifizieren. Diese Methode ermöglicht somit eine Messung der Genexpression bestimmter Gene anhand der Quantifizierung der mRNA. Alle Schritte werden in einem Gerät, dem *LightCycler*[®] 1.5, durchgeführt.

2.2.3.2 Der *LightCycler*[®] 1.5

Der *LightCycler*[®] 1.5 besteht im Wesentlichen aus vier Bestandteilen (s. Abbildung 2, S. 19),

- einer temperaturregulierbaren Reaktionskammer,
- einem rotierenden Probenkarussell, welches bis zu 32 Glaskapillaren fasst,
- einer Heiz- und Kühlvorrichtung, in Form einer Heizspirale und eines Ventilators,
- und einem Photometer, dessen LED-Lichtquelle den Fluoreszenzfarbstoff in den Kapillaren anregt, was anschließend von drei Detektionskanälen F1-F3 bei verschiedenen Wellenlängen (530 nm, 640 nm und 705 nm) gemessen werden kann.

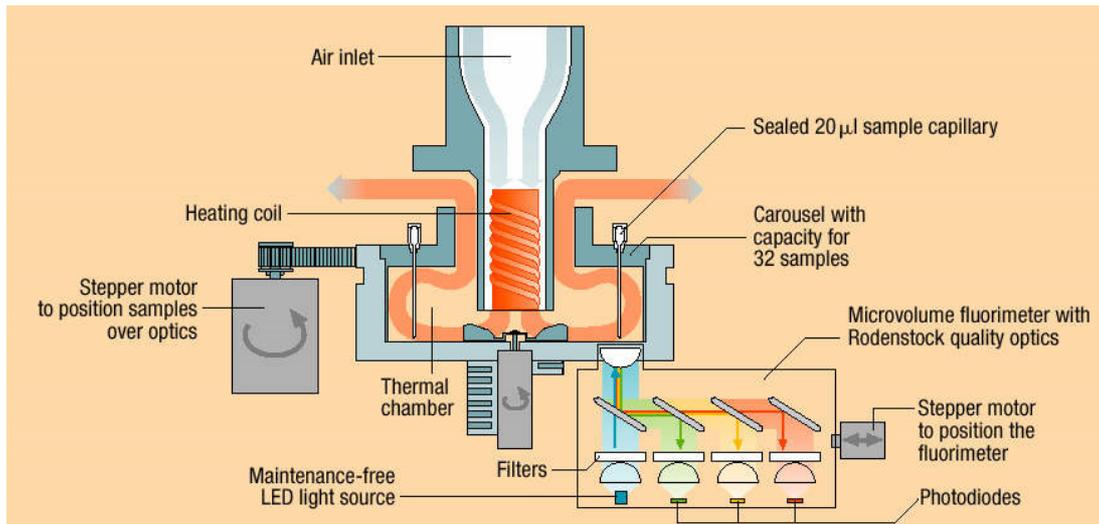


Abbildung 2: Schematische Darstellung des LightCyclers® 1.5²⁵

2.2.3.3 Quantifizierung

Der Reaktionsprozess wird in den drei Dimensionen Zeit [Zyklus], Fluoreszenz (für SYBR® Green I bei 520 nm, Kanal F1) und Temperatur [°C] aufgezeichnet.

Die Fluoreszenz wird am Ende eines jeden Zyklus gemessen. Somit steigt die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produktes an. Der Signalanstieg ist exponentiell und lässt sich im linearen Abschnitt (Log-Phase) der Wachstumskurve direkt mit der DNA-Menge korrelieren⁴⁰.

Der *cycle threshold* (Ct-Wert) bzw. *crossing point* (Cp-Wert) ist ein Werkzeug, um die Konzentration der *target*-DNA in jeder Probe zu bestimmen. Der Ct-Wert beschreibt denjenigen Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, also der Punkt, an welchem die Kurve den sogenannten *threshold* schneidet (s. Abbildung 3, S. 20). Je früher dies geschieht, desto höher ist die Konzentration der *target*-DNA.

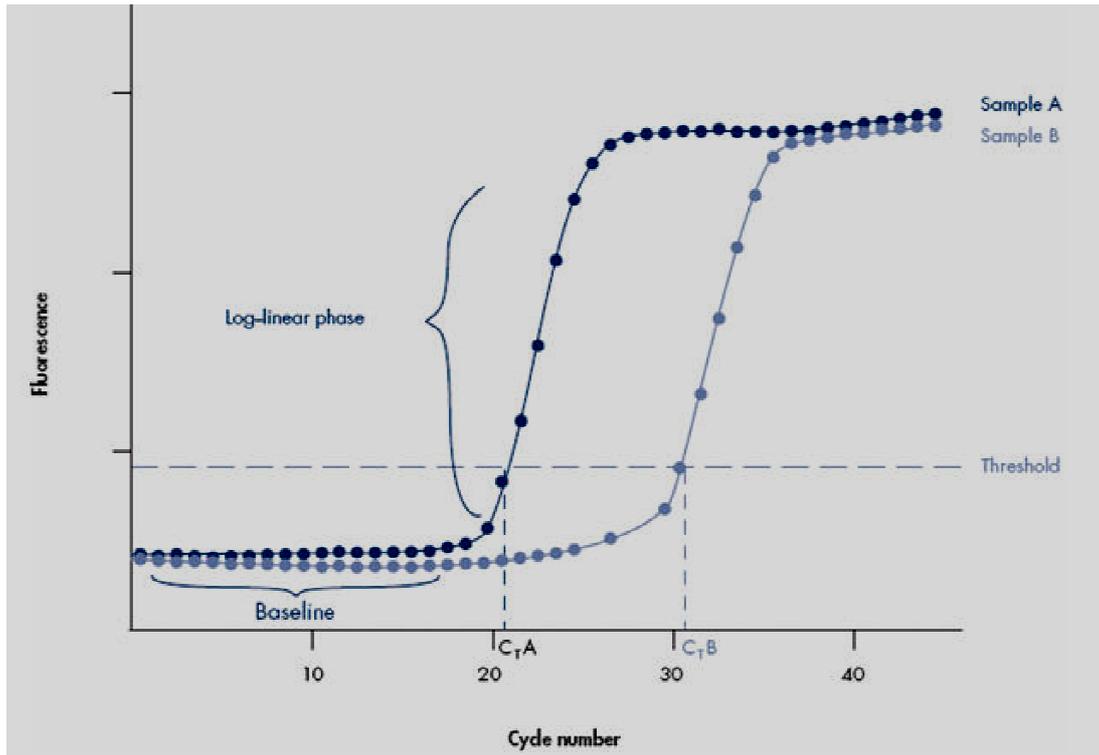


Abbildung 3: Typische Amplifikationskurven zweier Proben A und B²⁷

Beim *LightCycler*[®] kann zur Berechnung des C_p -Wertes die sogenannte *second derivative maximum*-Methode angewandt werden. Die Software berechnet hierbei die Zyklusnummer, bei welcher die Fluoreszenz maximal ansteigt, indem das Maximum der zweiten Ableitung (engl.: *second derivative maximum*) der Amplifikationskurve bestimmt wird. Diese Zyklusnummer ergibt somit den C_p -Wert.

Es wird eine relative Quantifizierung vorgenommen, wofür die Werte des *target*-Gens (TG) anhand einer internen Referenz, des sogenannten *housekeeping*-Gens (HKG), normalisiert werden. HKGs sind durch ihre konstante Expression charakterisiert, unabhängig von Zelltyp, Zellzyklus oder äußeren Einflüssen. Bei der vorliegenden Arbeit wurde als HKG die Hydroxymethylbilan-Synthase (HMBS) gewählt.

Die Berechnung der relativen Expression des TG erfolgt mittels der sogenannten $2^{-\Delta\Delta C_p}$ Methode³⁵:

$$\text{Relative Expression (TG)} = 2^{-(C_p(\text{TG}) - C_p(\text{HKG}))}$$

2.2.3.4 Produktspezifität

Um die Spezifität der PCR-Produkte zu verifizieren erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse. Jedes DNA-Fragment besitzt eine spezifische Schmelztemperatur T_m , welche als die Temperatur definiert ist, bei welcher 50 % der DNA einzelsträngig vorliegt. Das Erreichen der Schmelztemperatur zeigt sich in einem abrupten Abfall der Fluoreszenz, da die PCR-Produkte denaturieren und sich das *SYBR[®]-Green I* aus seiner Bindung löst.

Für die Darstellung der Schmelzkurve wird die Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen (s. Abbildung 4, S. 21). Die Software berechnet die erste Ableitung der Kurve, sodass die Schmelzpunkte als *peaks* dargestellt werden. Unspezifische Nebenprodukte oder Primer-*dimer* (miteinander hybridisierte Primer) stellen sich als diverse kleinere *peaks* dar.

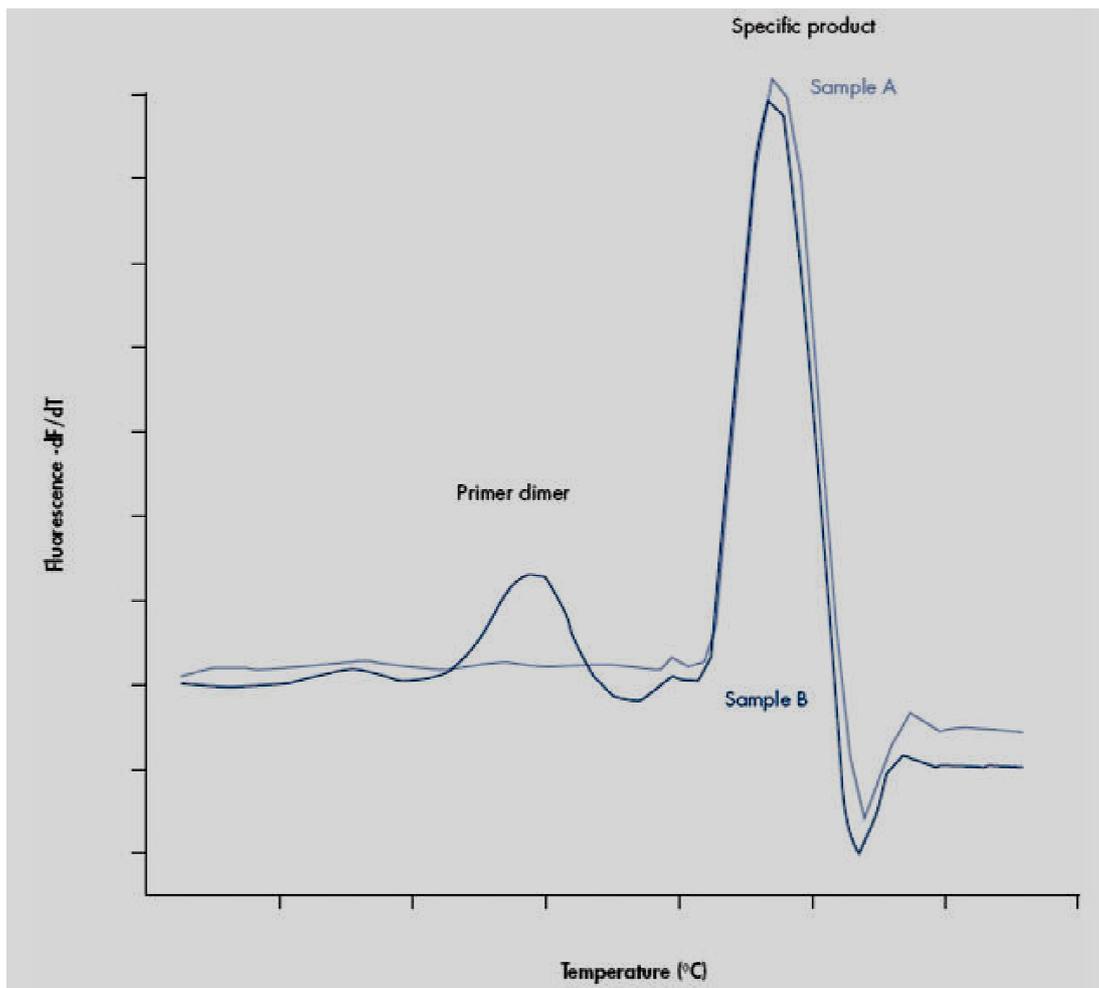


Abbildung 4: Exemplarische Schmelzkurvenanalyse zweier Proben A und B²⁶

Für die vorliegende Arbeit wurde die Schmelzkurve in einem Temperaturintervall von 55 - 95 °C aufgezeichnet.

Die Schmelzkurvenanalyse ist eine effiziente Alternative zur Gelelektrophorese. Anstatt die PCR-Produkte anhand ihrer Größe in einem Gel aufzutrennen, werden direkt während der PCR ihre Schmelzpunkte T_m bestimmt und zur Identifikation verwendet.

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten wurde dennoch einige Male eine Gelelektrophorese mit den PCR-Produkten durchgeführt um die Produktspezifität der RT-PCR zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren. Die Vorgehensweise bei der Gelelektrophorese wird weiter unten erläutert (s. Abschnitt 2.2.4, S. 25).

2.2.3.5 Reaktionsansatz

Die *real time* RT-PCR-Reaktionen wurden mit dem *QuantiTect[®] SYBR[®] Green RT-PCR Kit* (Qiagen) angesetzt.

Inhalt:

- *QuantiTect[®] SYBR[®] Green RT-PCR Master Mix*:
 - *HotStarTaq[®]* DNA Polymerase
 - *QuantiTect[®] SYBR[®] Green RT-PCR Buffer*
 - dNTP Mix
 - *SYBR[®] Green I*
 - ROX Farbstoff (Referenzfarbstoff)
 - $MgCl_2$
- *QuantiTect[®] RT Mix*:
 - *Omniscript[®] Reverse Transcriptase*
 - *Sensiscript[®] Reverse Transcriptase*
- RNase-freies Wasser

Die Glaskapillaren wurden nach folgendem Protokoll beschickt:

Tabelle 3: Real time RT-PCR-Reaktionsansatz pro Kapillare (fw. = forward, rev. = reverse)

Reagenz	Volumen / Kapillare
H ₂ O	8,3 µl
Primer Mix (fw. + rev.)	0,5 µl
RNA	1 µl
QuantiTect [®] RT Mix	0,2 µl
QuantiTect [®] SYBR [®] Green RT-PCR Master Mix	10 µl
Totales Reaktionsvolumen / Kapillare	20 µl

Zu Beginn werden die Reaktionsansätze in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen angesetzt, dabei wird pro Primer-Mix, d.h. pro Gen, ein Reaktionsansatz hergestellt. Die Ansätze bestehen zunächst aus allen oben genannten Reagenzien außer der RNA. Die RNA wird jeweils in die Kapillaren vorgelegt, welche dann mit dem jeweiligen Reaktionsansatz auf je 20 µl aufgefüllt werden.

Sämtliche Reaktionsansätze werden in gekühlten Glaskapillaren bzw. Eppendorf-Gefäßen angesetzt, um eine vorzeitige cDNA-Synthese zu verhindern.

2.2.3.6 Primer

- LRRK2:
fw.: 5'-TCC CTG CCA TAC GAG ATT ACC-3'
rev.: 5'-GCA CAT TTT TAC GCT CCG ATA-3'
- SNCA:
fw.: 5'-CAA GTG ACA AAT GTT GGA GGA G-3'
rev.: 5'-CAT TTC ATA AGC CTC ATT GTC AG-3'

- HMBS:

fw.: 5'-ATG CCC TGG AGA AGA ATG AAG T-3'

rev.: 5'-TTG GGT GAA AGA CAA CAG CAT C-3'

2.2.3.7 Temperaturprofil

Tabelle 4: Verwendetes Temperaturprofil bei der real time RT-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Prä-Inkubation		
Reverse Transkription:	50	1.500
Aktivierung der <i>HotStarTaq</i> [®] DNA Polymerase:	95	900
Amplifikationszyklus (x 45)		
Denaturierung:	94	15
Primer-Hybridisierung:	60	20
Extension:	72	30
Schmelzkurvenanalyse		
	95	60
	55	30
Kühlen		
	40	30

2.2.3.8 Runs

Es wurden mit sämtlichen Proben *runs*, d.h. RT-PCR-Läufe, mit der Primer-Kombination LRRK2, SNCA und HMBS durchgeführt. Alle Läufe wurden ein zweites Mal wiederholt.

Aus den Cp-Werten wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta C_p}$ Methode (s. Abschnitt 2.2.3.3, S. 19) pro Lauf und Probe die relative Expression von LRRK2 bzw. SNCA berechnet. Aus diesen Einzelwerten wurden dann wiederum pro Probe die arithmetischen Mittelwerte (arithm. MW) berechnet, das heißt, die Mittelwerte für LRRK2 und SNCA ergeben sich aus jeweils zwei Einzelmesswerten. Sämtliche Einzelmesswerte finden sich im Anhang (s. Abschnitt 7.1, S. 55) tabellarisch aufgeführt.

2.2.4 Gelelektrophorese

Mittels der Gelelektrophorese können DNA- oder RNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufgetrennt werden, außerdem kann die Länge der Fragmente anhand des Vergleiches mit einem mitgeführten DNA-Markern abgeschätzt werden.

Bei dieser Arbeit wurde zur Etablierung der RT-PCR die Produktspezifität der PCR-Produkte, zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse, mittels der Gelelektrophorese überprüft.

Hierzu werden 2-prozentige Agarosegele gegossen: 2 g Agarose werden zusammen mit 100 ml TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) in der Mikrowelle erhitzt, danach werden der abgekühlten Lösung 2 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Ethidiumbromid dient der Darstellung der DNA-Banden im fertigen Gel, da es in Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Das flüssige Gel wird nun in die Gelelektrophoresekammer gegossen, wo es auspolymerisiert.

Die PCR-Produkte werden per Zentrifugation aus den Kapillaren gelöst und in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen. Jeder Probe werden 2 µl DNA *loading dye* hinzugegeben. Die Taschen des Agarosegels werden mit den Proben und einem DNA-Marker, dem DNA *ladder mix*, beschickt. Nach Anlegen einer Spannung (je nach Größe des Gels 100 - 200 V) bewegen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente je nach Länge unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix, zum Pluspol. Danach werden die DNA-Banden im Gel unter UV-Licht dargestellt und fotografiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Relative Expression von LRRK2 bzw. SNCA pro Proband

Erhoben wurde die relative Genexpression (d.h. in Relation zu einem *housekeeping*-Gen, in dieser Arbeit immer das HMBS (s. Abschnitt 2.2.3.3, S. 19)) von LRRK2 und SNCA in humanem Vollblut. Tabelle 5 zeigt für jeden Probanden die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. Die Mittelwerte ergeben sich aus jeweils zwei RT-PCR-Läufen, d.h. aus jeweils zwei Einzelmesswerten (s. Abschnitt 7.1, S. 55).

Auffallend ist die große Streuung der Expressionswerte, sowohl bei LRRK2 als auch bei SNCA.

Tabelle 5: Relative Expression von LRRK2 bzw. SNCA. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte aus jeweils zwei Läufen sowie die Standardabweichungen (FA = Familienanamnese, PS = Parkinson-Syndrom, m = männlich, w = weiblich)

Nr.	m/w	Geb. jahr	Path. LRRK2-Mutation	Klinik	LRRK2	SNCA
1	m	1963	G2019S	gesund	41,74 ± 4,47	99,08 ± 2,75
2	m	1951	G2019S	gesund	83,49 ± 19,05	7,63 ± 0,26
3	m	1968	R793M	gesund	16,38 ± 1,13	248,24 ± 29,96
4	w	1947	FA neg.	gesund	27,64 ± 2,01	12,75 ± 2,49
5	w	1947	FA neg.	gesund	38,87 ± 1,08	142,06 ± 2,95
6	w	1944	FA neg.	gesund	13,60 ± 0,52	130,77 ± 4,53
7	m	1964	FA neg.	gesund	21,15 ± 3,27	51,97 ± 7,33
8	m	1965	FA neg.	gesund	35,35 ± 2,45	104,86 ± 10,50
9	m	1945	FA neg.	gesund	51,45 ± 0,18	9,23 ± 1,18
10	m	1938	FA neg.	gesund	63,14 ± 1,75	99,24 ± 6,18
11	w	1929	FA neg.	gesund	64,95 ± 2,70	6,57 ± 0,34
12	w	1931	FA neg.	gesund	31,72 ± 1,87	76,16 ± 15,61
13	w	1929	FA neg.	gesund	26,84 ± 7,94	6,05 ± 1,42

14	m	1958	FA pos.	PS	37,47 ± 2,20	13,25 ± 0,87
15	w	1944	FA pos.	PS	18,98 ± 2,87	199,49 ± 2,77
16	w	1946	FA pos.	PS	26,08 ± 2,16	40,67 ± 10,60
17	m	1939	FA pos.	PS	114,76 ± 15,03	8,39 ± 1,13
18	m	1937	FA pos.	PS	8,20 ± 0,31	124,11 ± 3,01
19	w	1958	G2019S	PS	19,94 ± 2,07	70,28 ± 5,83
20	w	1931	G2019S	PS	40,68 ± 16,60	2,92 ± 0,42
21	w	1945	I2020T	PS	7,71 ± 0,40	456,80 ± 11,08
22	m	1961	I2020T	PS	96,22 ± 15,21	18,31 ± 1,39
23	m	1966	N1437S	PS	4,80 ± 0,66	383,53 ± 97,51
24	m	1940	N1437S	PS	31,51 ± 3,26	10,58 ± 1,13
25	w	1947	R1441C	PS	84,48 ± 2,34	14,85 ± 2,30
26	m	1940	R793M	PS	67,43 ± 1,17	127,83 ± 8,41
27	w	1944	FA neg.	PS	18,75 ± 4,03	5,77 ± 1,05
28	w	1944	FA neg.	PS	68,12 ± 0,00	21,21 ± 2,71
29	m	1955	FA neg.	PS	26,45 ± 0,64	86,85 ± 7,51
30	m	1935	FA neg.	PS	32,20 ± 2,34	2,22 ± 0,15
31	m	1941	FA neg.	PS	15,67 ± 2,58	13,43 ± 0,70
32	w	1934	FA neg.	PS	126,42 ± 33,37	6,39 ± 0,24
33	w	1936	FA neg.	PS	20,82 ± 0,14	95,46 ± 9,23

3.2 Korrelation der relativen Expression von LRRK2 bzw. SNCA mit klinischen und genetischen Daten

Im Folgenden wurden die relativen Expressionswerte von LRRK2 bzw. SNCA mit den klinischen Daten („PS ja / nein“) und genetischen Daten („pathogene LRRK2-Mutation ja / nein“) der einzelnen Patienten bzw. Kontrollen korreliert.

Dafür wurden die 33 Probanden in folgende Kohorten sortiert (s. hierzu Abschnitt 2.2.1.1, S. 15):

- Alle Patienten mit Parkinson-Syndrom (n = 20)
 - davon Patienten mit pathogener LRRK2-Mutation (n = 8)
 - davon Patienten mit negativer Familienanamnese (IPS-Patienten) (n = 7)
 - ferner Patienten mit positiver Familienanamnese (n = 5)
- Alle neurodegenerativ gesunden Kontrollen (n = 13)
 - davon Kontrollen mit pathogener LRRK2-Mutationen (n = 3)
 - davon Kontrollen mit negativer Familienanamnese (n = 10)

Aus den Daten für jede einzelne Probe (s. Tabelle 5, S. 26) wurden pro Kohorte wiederum die arithmetischen Mittelwerte einschließlich der Standardabweichung berechnet.

3.2.1 LRRK2

Tabelle 6 zeigt die relative Expression von LRRK2 im Blut von Parkinson-Patienten und Kontrollen. Es wurden oben genannte Kohorten betrachtet. Dabei fand sich keine signifikante Korrelation der Expressionsdaten mit dem Vorhandensein eines Parkinson-Syndroms oder, weder bei Patienten noch bei Kontrollen, mit einer pathologischen LRRK2-Mutation.

Tabelle 6: Relative Expression von LRRK2 in Kohorten sortiert nach klinischen und genetischen Daten. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen (IPS = Idiopathisches Parkinson-Syndrom)

Kohorte	LRRK2
Alle Patienten mit Parkinson-Syndrom (n = 20)	43,34 ± 35,76
• davon mit path. LRRK2-Mutation (n = 8)	44,10 ± 32,62
• davon mit neg. Familienanamnese (IPS-Patienten) (n = 7)	44,06 ± 37,42
Alle Kontrollen (n = 13)	39,72 ± 20,02
• davon mit path. LRRK2-Mutation (n = 3)	47,20 ± 27,67
• davon mit neg. Familienanamnese (n = 10)	37,47 ± 16,42

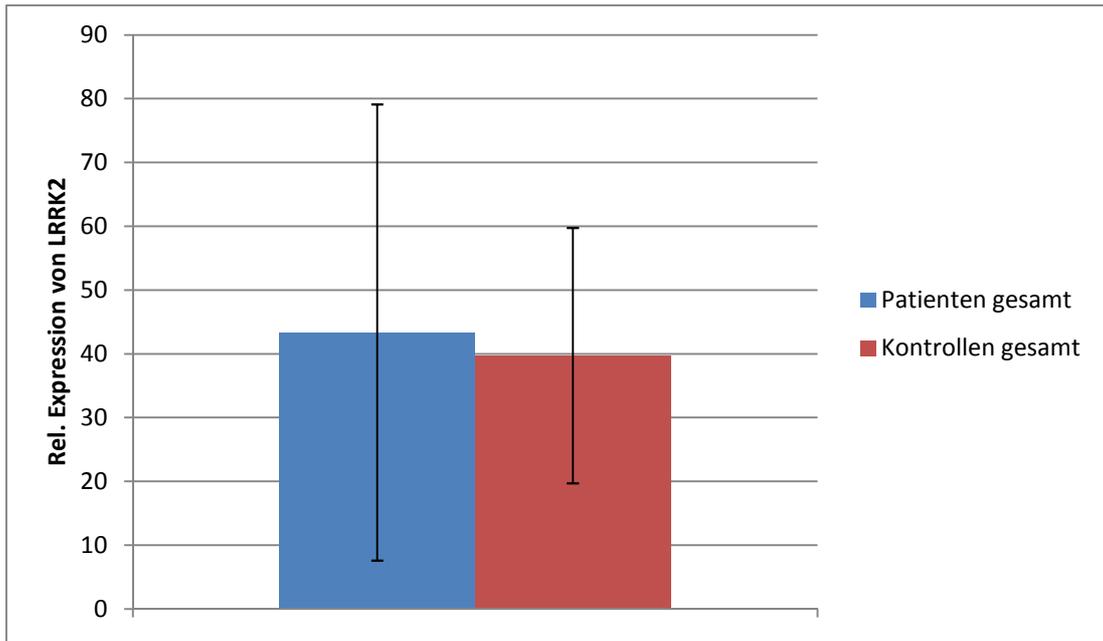


Diagramm 1: Relative LRRK2-Expression von Parkinson-Patienten und Kontrollen (Werte aus Tabelle 6, S. 28)

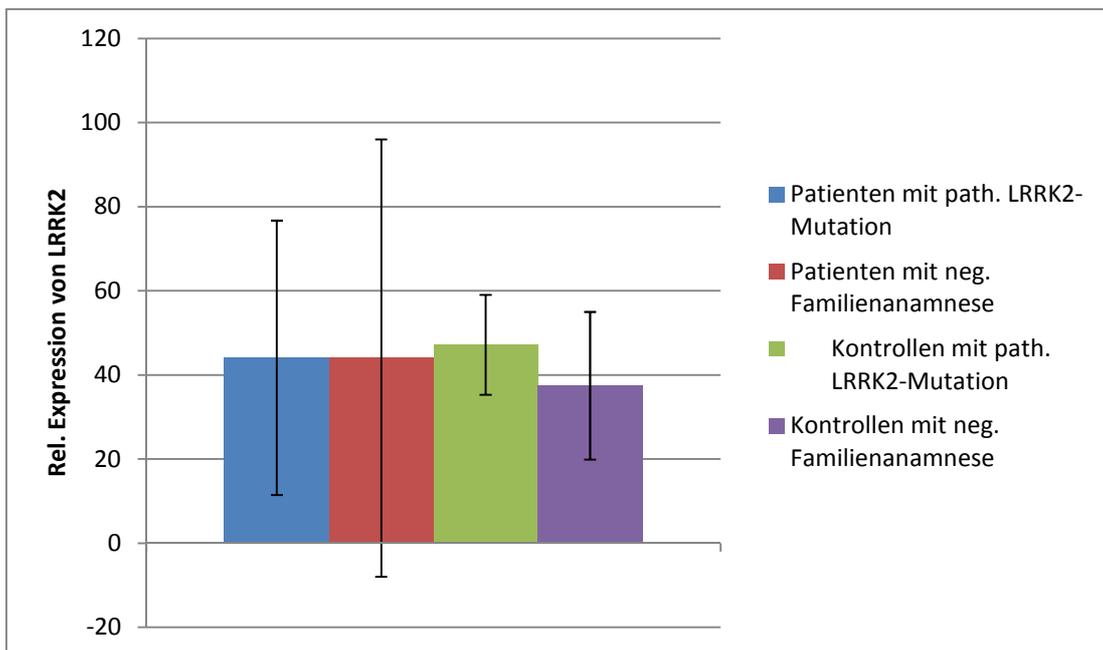


Diagramm 2: Relative LRRK2-Expression von Parkinson-Patienten und Kontrollen, je unterteilt in solche mit pathogener LRRK2-Mutation und solche mit negativer Familienanamnese (Werte aus Tabelle 6, S. 28)

3.2.2 SNCA

Tabelle 7 zeigt die relative Expression von SNCA im Blut von Parkinson-Patienten und Kontrollen. Es wurden, wie bei LRRK2, die oben genannten Kohorten betrachtet. Dabei fand sich ebenfalls keine signifikante Korrelation der Expressionsdaten mit dem Vorhandensein eines Parkinson-Syndroms oder, weder bei Patienten noch bei Kontrollen, mit einer pathologischen LRRK2-Mutation.

Tabelle 7: Relative Expression von SNCA in Kohorten sortiert nach klinischen und genetischen Daten. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen (IPS = Idiopathisches Parkinson-Syndrom)

Kohorte	SNCA
Alle Patienten mit Parkinson-Syndrom (n = 20)	85,12 ± 123,95
<ul style="list-style-type: none"> • davon mit path. LRRK2-Mutation (n = 8) • davon mit neg. Familienanamnese (IPS-Patienten) (n = 7) 	135,64 ± 169,76
Alle Kontrollen (n = 13)	76,51 ± 69,26
<ul style="list-style-type: none"> • davon mit path. LRRK2-Mutation (n = 3) • davon mit neg. Familienanamnese (n = 10) 	118,32 ± 99,17
	63,97 ± 51,03

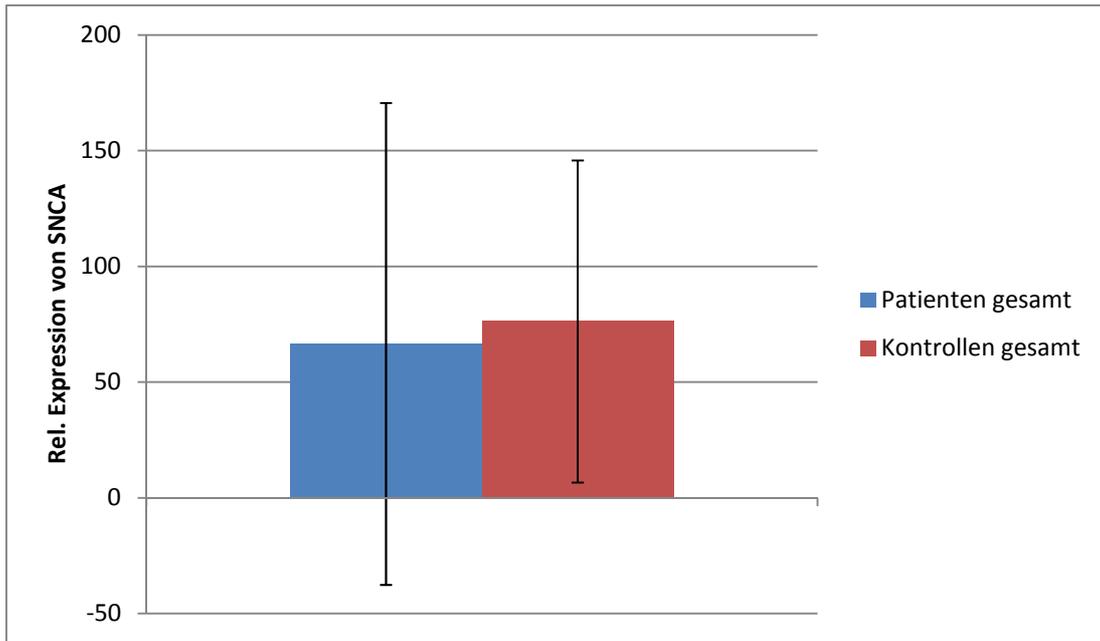


Diagramm 3: Relative SNCA-Expression von Parkinson-Patienten und Kontrollen (Werte aus Tabelle 7, S. 30)

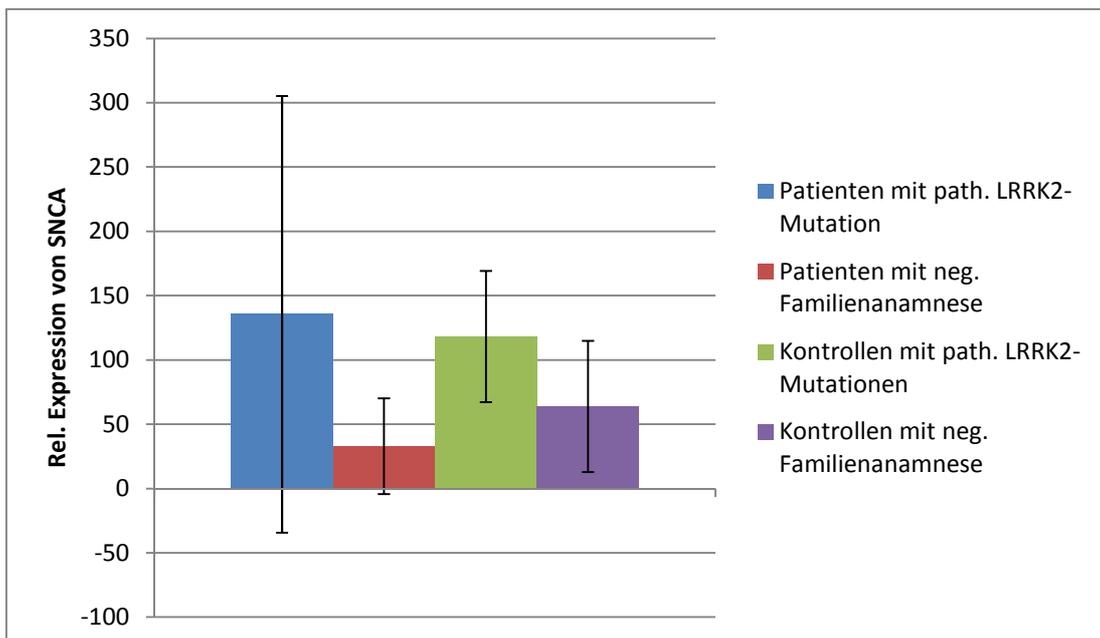


Diagramm 4: Relative LRRK2-Expression von Parkinson-Patienten und Kontrollen, je unterteilt in solche mit pathogener LRRK2-Mutation und solche mit negativer Familienanamnese (Werte aus Tabelle 7, S. 30)

3.3 Korrelation der relativen Expression von LRRK2 bzw. SNCA mit Krankheitsdauer und Alter der Probanden

Im Folgenden wurden die LRRK2- bzw. SNCA-Expressionsdaten der einzelnen Probanden hinsichtlich Korrelationen mit der jeweiligen Krankheitsdauer oder dem Alter betrachtet.

3.3.1 Krankheitsdauer

Diagramme 5 und 6 zeigen die relative LRRK2- bzw. SNCA-Expression der einzelnen Parkinson-Patienten in Korrelation zur jeweiligen Krankheitsdauer, d.h. Jahre seit Erstdiagnose. Die Krankheitsdauer war nur bei 15 der 20 Parkinson-Patienten bekannt.

Für keines der beiden Gene zeigte sich eine signifikante Korrelation der relativen Expression mit der Krankheitsdauer.

3.3.1.1 LRRK2

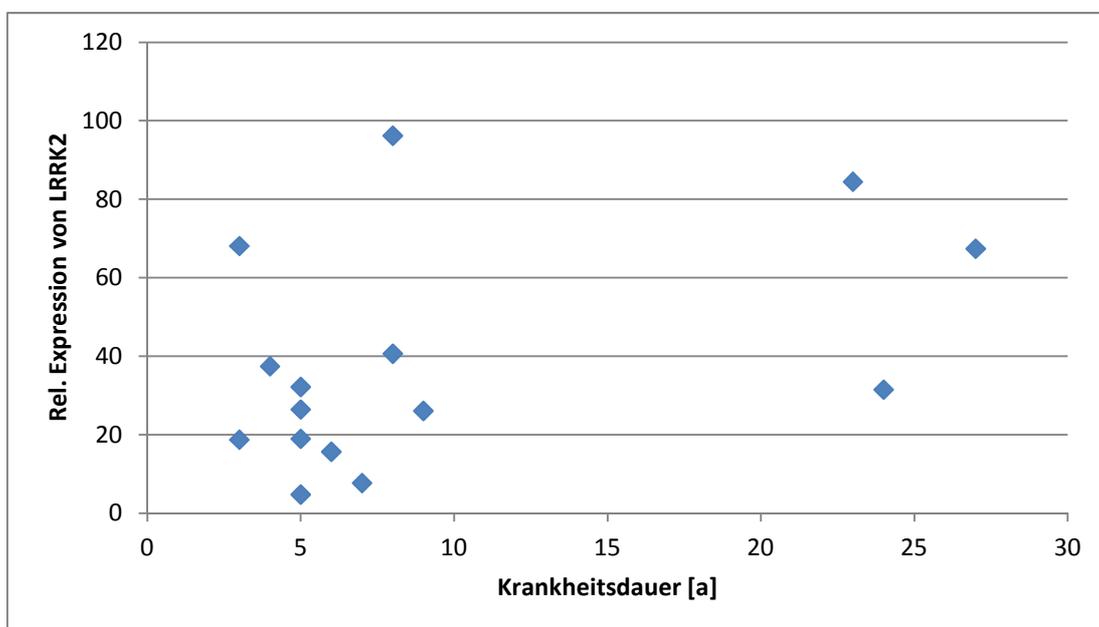


Diagramm 5: Relative LRRK2-Expression der einzelnen Parkinson-Patienten ($n = 15$), aufgetragen gegen die Krankheitsdauer [a] (Werte aus Tabelle 5, S. 26)

3.3.1.2 SNCA

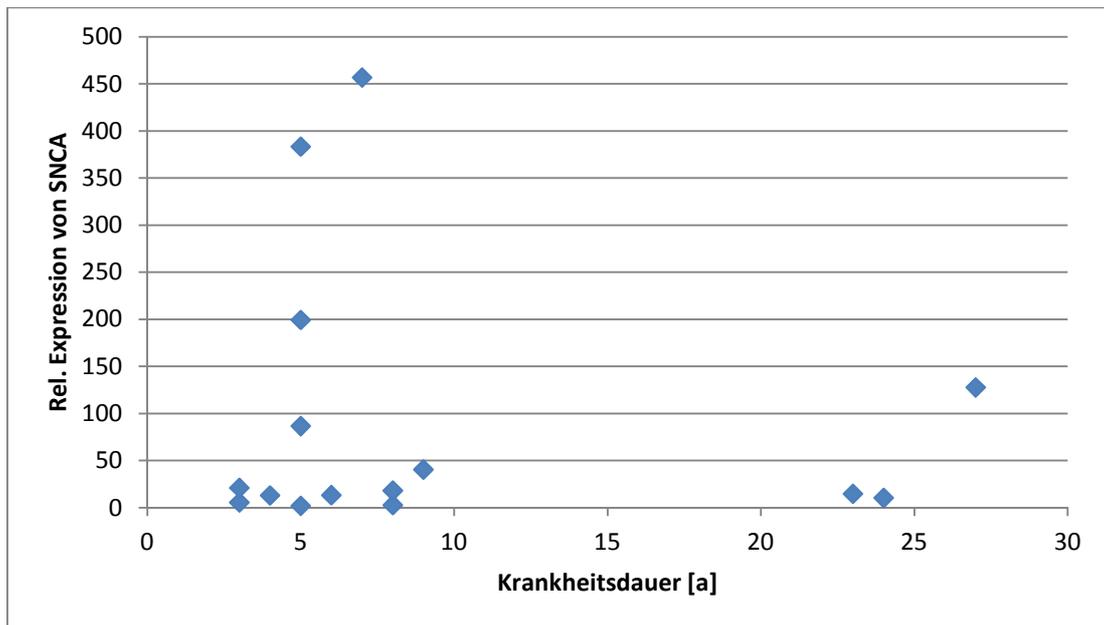


Diagramm 6: Relative SNCA-Expression der einzelnen Parkinson-Patienten ($n = 15$), aufgetragen gegen die jeweilige Krankheitsdauer [a] (Werte aus Tabelle 5, S. 26)

3.3.2 Alter

Diagramm 7 und 8 zeigen die relative LRRK2- bzw. SNCA-Expression der einzelnen Probanden ($n = 33$) in Korrelation zum jeweiligen Alter.

Für keines der beiden Gene zeigte sich eine signifikante Korrelation der relativen Expression mit dem Alter.

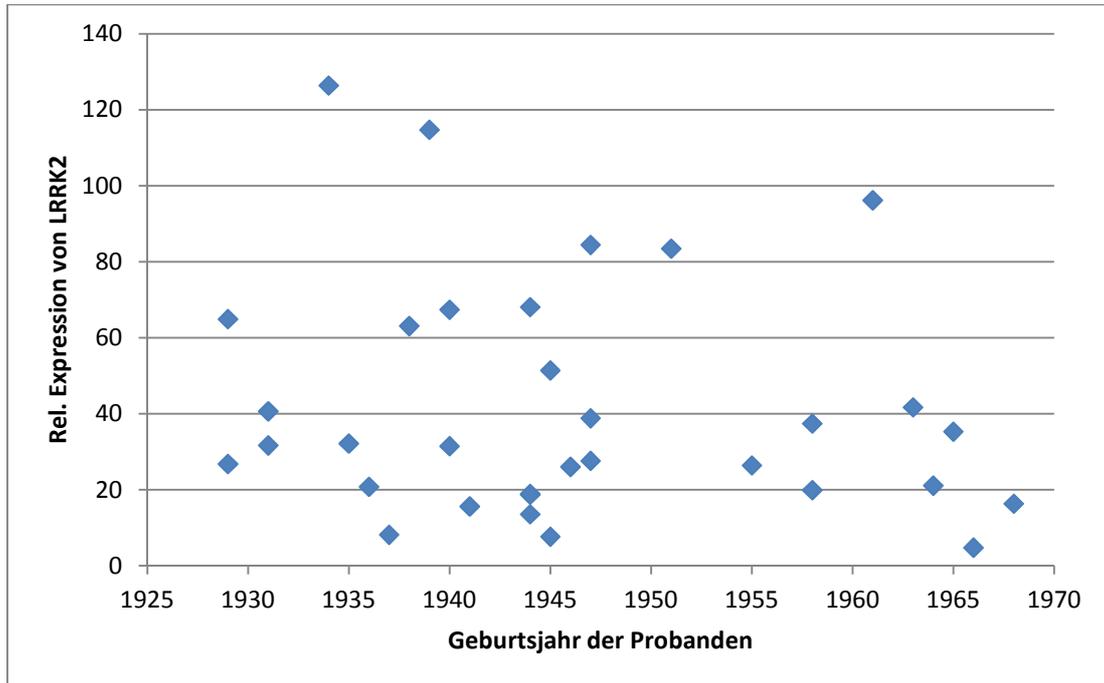
3.3.2.1 LRRK2

Diagramm 7: Relative LRRK2-Expression der einzelnen Probanden ($n = 33$), aufgetragen gegen das jeweilige Geburtsjahr (Werte aus Tabelle 5, S. 26)

3.3.2.2 SNCA

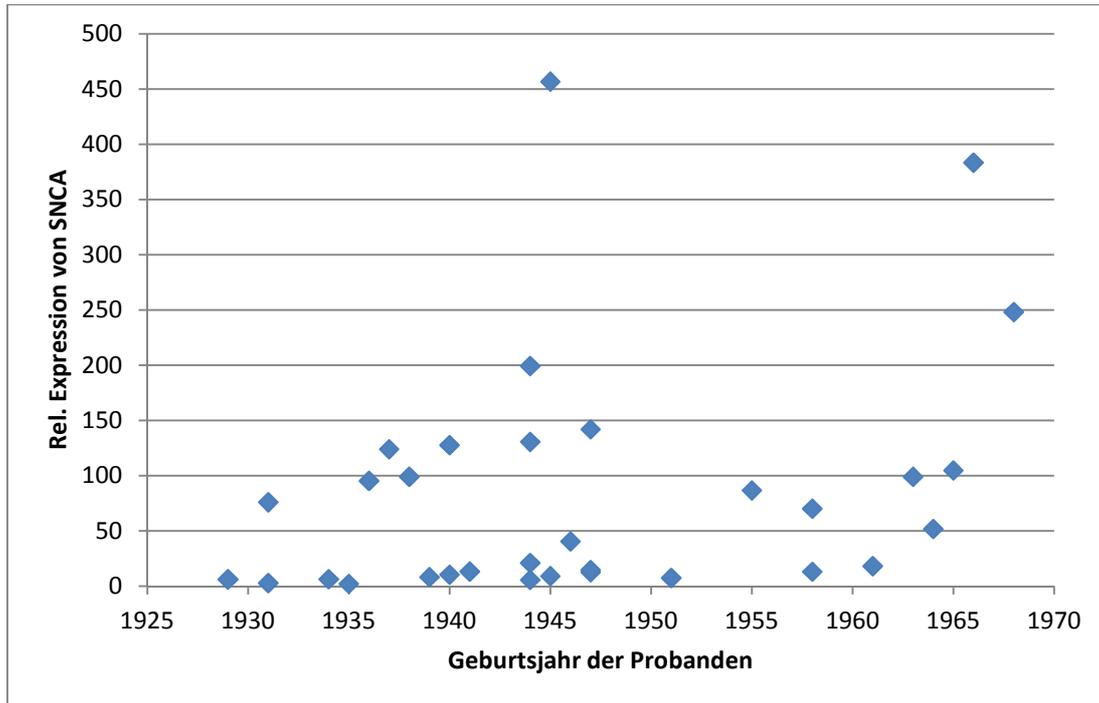


Diagramm 8: Relative SNCA-Expression der einzelnen Probanden ($n = 33$), aufgetragen gegen das jeweilige Geburtsjahr (Werte aus Tabelle 5, S. 26)

3.4 Intraindividuelle Korrelation der relativen Expression von LRRK2 und SNCA

Im Folgenden wurden innerhalb der einzelnen Individuen die relativen Expressionswerte von LRRK2 und SNCA miteinander verglichen. Zunächst wurde dieser Vergleich im gesamten Probandenkollektiv vorgenommen, dann jeweils in der Kohorte der Patienten und der Kontrollen.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen 9 - 12 dargestellt. Es zeigte sich bei allen Probanden, sowohl Patienten als auch Kontrollen, eine auffallende, intraindividuelle Korrelation der relativen Expressionswerte von SNCA und LRRK2. Die Expressionshöhen der beiden Gene verhalten sich reziprok proportional zueinander.

3.4.1 Im gesamten Kollektiv

Die beiden Diagramme 9 und 10 zeigen zwei verschiedene Möglichkeiten der graphischen Darstellung.

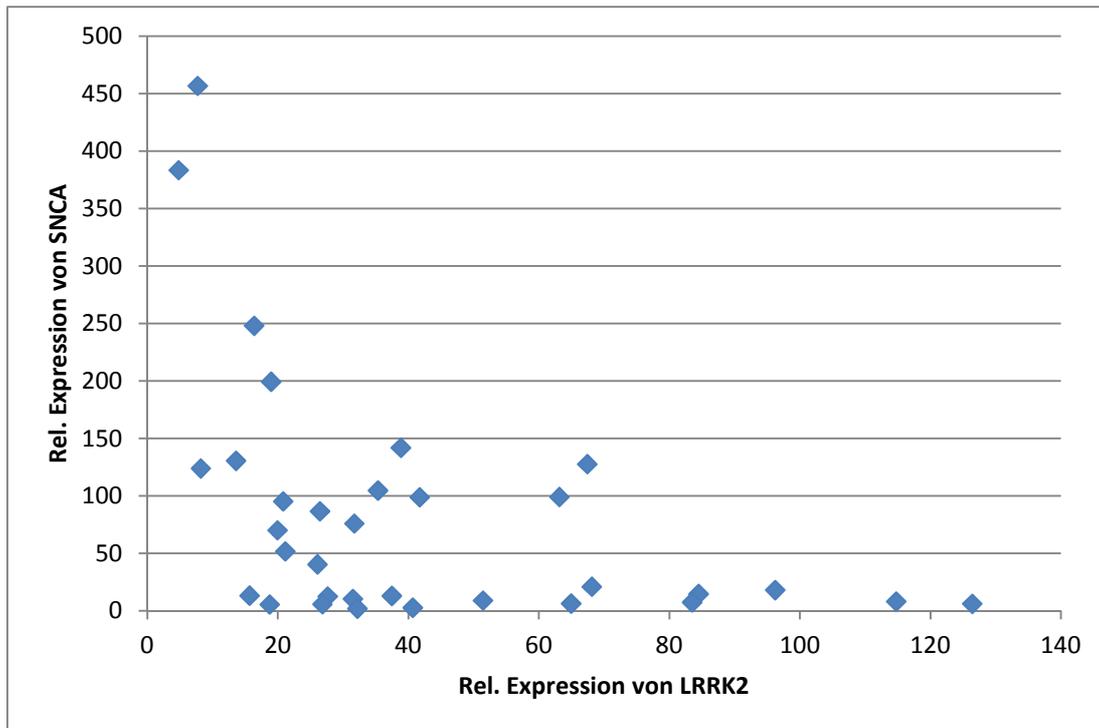


Diagramm 9: Relative SNCA-Expression der einzelnen Probanden ($n = 33$), aufgetragen gegen die jeweilige relative LRRK2-Expression (Werte aus Tabelle 5, S. 26)

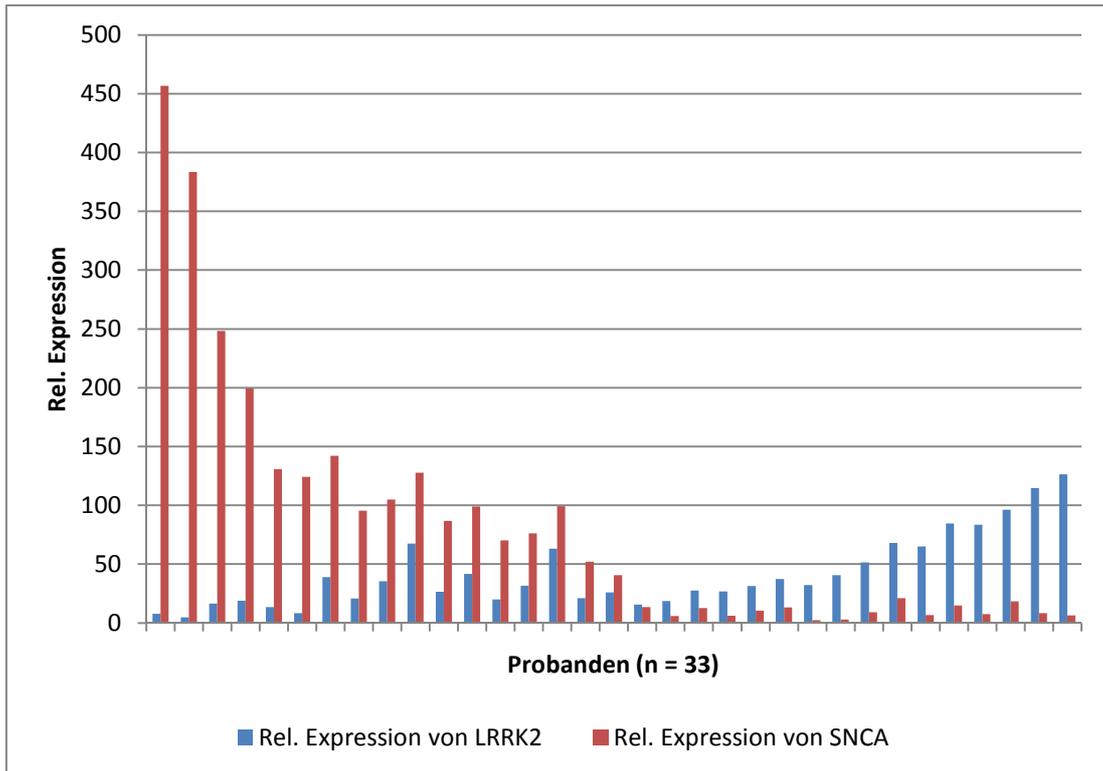


Diagramm 10: Relative LRRK2- und SNCA-Expression, aufgetragen gegen die einzelnen Probanden (n = 33) (Werte aus Tabelle 5, S. 26)

3.4.2 Bei Patienten

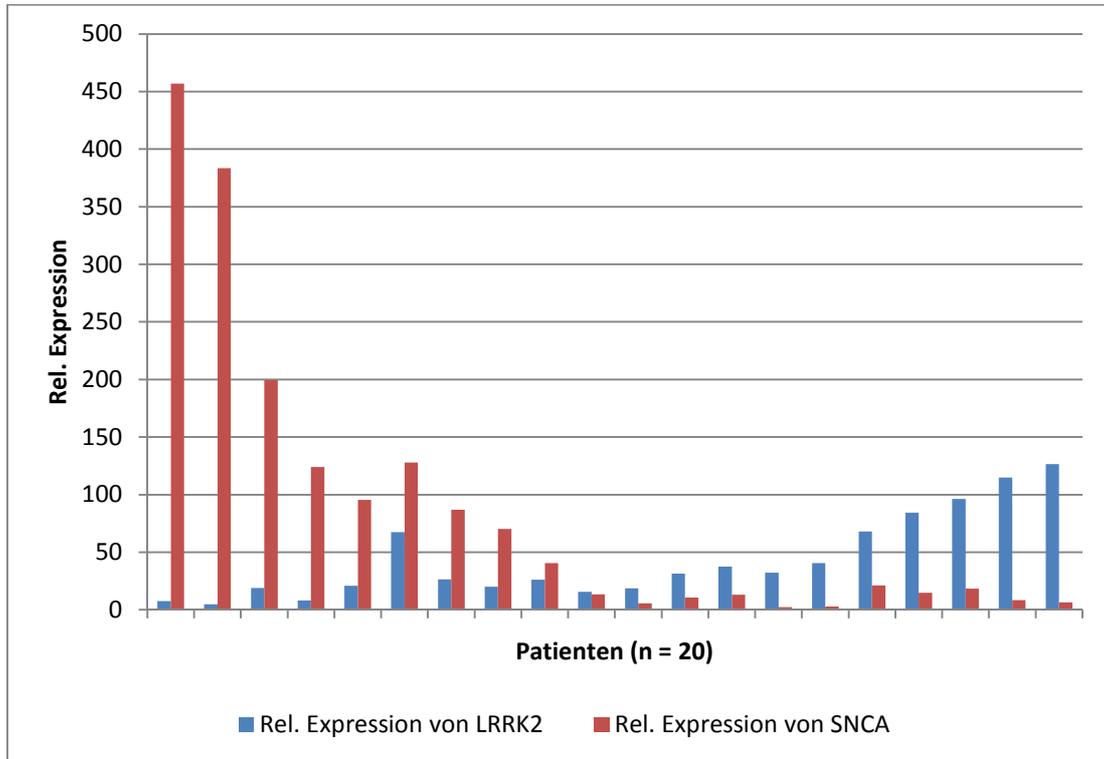


Diagramm 11: Relative LRRK2- und SNCA-Expression, aufgetragen gegen die einzelnen Parkinson-Patienten (n = 20) (Werte aus Tabelle 5, S. 26)

3.4.3 Bei Kontrollen

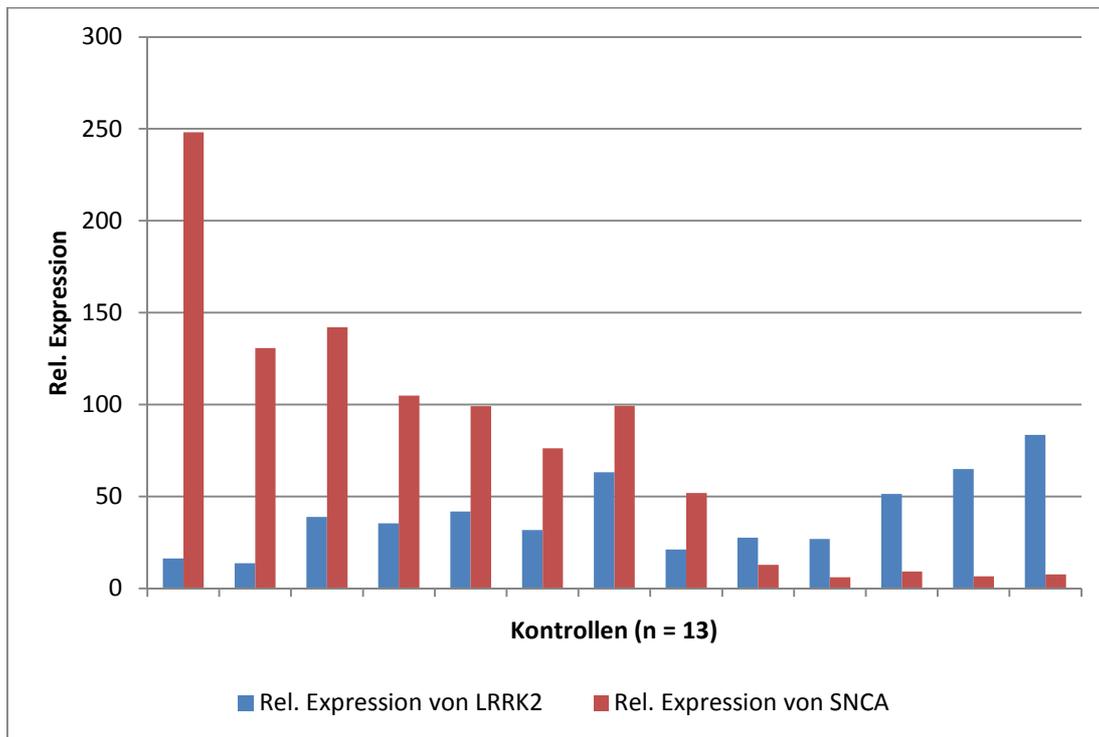


Diagramm 12: Relative LRRK2- und SNCA-Expression, aufgetragen gegen die einzelnen Kontrollen (n = 13) (Werte aus Tabelle 5, S. 26)

3.5 Verlaufsbeobachtung der relativen Expression von LRRK2 und SNCA anhand von fünf Probanden

Es kam die weiterführende Fragestellung auf, wie sich die Expressionslevel der beiden untersuchten Gene LRRK2 und SNCA in einer Verlaufsbeobachtung darstellen würden.

Zur ansatzweisen Beantwortung dieser Frage wurden bei fünf zufällig ausgewählten Probanden des Gesamtkollektives die Expressionswerte ein weiteres Mal anhand erneuter Blutentnahmen bestimmt. Diese Blutentnahmen (BEs) erfolgten ein bis sechs Monate nach der ersten Entnahme, im Folgenden Zeitpunkt A (1. BE) und Zeitpunkt B (2. BE) genannt.

Bei den fünf zufällig ausgewählten Probanden handelt es sich um vier Kontrollen und einen Parkinson-Patienten.

Hierbei war vor allem von Interesse, ob die festgestellte, intraindividuelle Korrelation der relativen Expression von LRRK2 und SNCA (s. Abschnitt 3.4, S. 35) zu einem späteren Zeitpunkt gleichbleibend sein würde.

Tabelle 8 zeigt die Expressionsdaten der fünf Probanden zum Zeitpunkt A und Zeitpunkt B. Die Werte zum Zeitpunkt B sind ebenfalls arithmetische Mittelwerte, welche sich aus zwei Wiederholungen des RT-PCR-Laufes ergeben (s. Abschnitt 7.1, S. 55). Dargestellt sind außerdem die Standardabweichungen.

Es fand sich bei vier der fünf Probanden zum Zeitpunkt B das gleiche, reziprok proportionale Verhältnis der beiden Gene LRRK2 und SNCA zueinander wie zum Zeitpunkt A. Lediglich bei einem Probanden (Nr. 23) kehrt sich das Verhältnis der Expressionen um. Hierzu ist es sicherlich zumindest erwähnenswert, dass es sich bei diesem Probanden ausgerechnet um den einzigen Parkinson-Patienten in dieser kleinen Kohorte handelt.

Tabelle 8: Relative LRRK2- und SNCA-Expression zu einem Zeitpunkt A und B (n = 5). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen

Proband Nr.	Zeitpunkt A		Zeitpunkt B	
	LRRK2	SNCA	LRRK2	SNCA
2	83,49 ± 19,05	7,63 ± 0,26	43,58 ± 7,33	3,51 ± 0,49
8	35,35 ± 2,45	104,86 ± 10,50	16,74 ± 3,38	90,39 ± 12,14
10	63,14 ± 1,75	99,24 ± 6,18	14,44 ± 0,80	131,89 ± 33,53
12	31,72 ± 1,87	76,16 ± 15,61	30,05 ± 6,46	102,69 ± 5,69
23	4,80 ± 0,66	383,53 ± 97,51	46,12 ± 10,37	11,45 ± 5,00

4 DISKUSSION

4.1 Biomarker für das Parkinson-Syndrom

Bisher existiert noch kein verlässlicher und praktikabler *state*-Biomarker, mit welchem sich die Krankheitsprogression des Parkinson-Syndroms verfolgen ließe. In der vorliegenden Arbeit wurden zur möglichen Etablierung eines solchen Biomarkers die beiden zentralen Parkinson-Gene, LRRK2 und SNCA, herangezogen und ihre Expression in humanem Vollblut betrachtet. Peripheres Blut eignet sich aufgrund seiner leichten Zugänglichkeit besonders für die Etablierung von Biomarkern.

Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Expressionslevel von LRRK2 und SNCA mit dem klinischen Status der Probanden, in diesem Fall dem Vorhandensein eines Parkinson-Syndroms, oder genetischen Eigenschaften, hier die pathogenen LRRK2-Mutationen, korrelieren.

Eine signifikante Korrelation der Expressionslevel von LRRK2 oder SNCA im peripheren Blut mit dem klinischen Status der Probanden (Parkinson-Patienten im Vergleich zu Kontrollen) konnte nicht festgestellt werden.

Bezüglich des SNCA bestätigt dies die Daten einer Studie von Fuchs et al., bei welcher SNCA Protein- und mRNA-Level in mononukleären Blutzellen bei Parkinson-Patienten und Kontrollen bestimmt wurden und ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde¹⁷. Es existieren aktuell jedoch auch andere Arbeiten, welche in diesem Punkt den Ergebnissen der vorliegenden Studie widersprechen: El-Agnaf et al. konnten im Plasma von Parkinson-Patienten erhöhte SNCA-Protein-Level feststellen¹⁶, ähnlich so Kim et al., die erhöhte SNCA-Expressionslevel bei Parkinson-Patienten beobachteten, und zwar in peripheren, mononukleären Blutzellen³⁰.

Die Betrachtung der Expressionslevel in Beziehung zur Krankheitsdauer und dem Alter der Probanden war desweiteren interessant, da sich so möglicherweise eine Korrelation der Expression mit der Krankheitsprogression finden ließe.

Es ergab sich jedoch bezüglich Krankheitsdauer und Alter ebenfalls keine signifikante Korrelation mit den Expressionslevels von LRRK2 oder SNCA. Dies widerspricht sich mit den Ergebnissen der zuvor genannten Studie von Fuchs et al., in welcher eine positive Korrelation der Krankheitsdauer mit SNCA-Proteinlevels in mononukleären Blutzellen dargestellt wurde¹⁷.

Ein weiterer Ansatz war, LRRK2-Mutationsträger gesondert zu betrachten. Hierbei lag die Idee zugrunde, mittels der Expressionsdaten von präsymptomatischen LRRK2-Mutationsträgern eventuell charakteristische Veränderungen für diese sehr frühe Phase der Erkrankung darstellen zu können. Die Expression von LRRK2 oder SNCA unterscheidet sich bei LRRK2-Mutationsträgern jedoch nicht signifikant von derjenigen der IPS-Patienten oder Kontrollen. Hinsichtlich der Expressionswerte des SNCA ließe sich eventuell ein schwacher Trend herauslesen, wonach die SNCA-Expressionslevel bei LRRK2-Mutationsträgern, gleich ob erkrankt oder nicht, im Vergleich zu denjenigen Probanden ohne pathogene LRRK2-Mutation tendenziell höher ausfallen. Dies ist jedoch aufgrund der großen Bandbreite der Werte keinesfalls signifikant.

Bezüglich des SNCA lässt sich letztlich sagen, dass seine Expressionslevel höchstwahrscheinlich hauptsächlich von genetischen Risikovarianten und Polymorphismen beeinflusst werden anstatt von klinischen Charakteristika.

Außerdem scheint die Analyse des kompletten Transkriptoms der einzelner Gene und deren Expression überlegen zu sein, da dies wahrscheinlich den Krankheitsstatus umfassender wiedergibt. Dies zeigte sich bereits bei einer Studie von Scherzer et al., welche mittels einer Transkriptom-Analyse in Leukozyten zeigen konnten, dass sich 22 Gene bei Parkinson-Patienten und Kontrollen in ihrem Expressionsmuster signifikant unterscheiden⁵¹.

4.2 Ko-Regulation von LRRK2 und SNCA

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beinhalten die Beobachtung einer höchst interessanten Korrelation der Expressionslevel von SNCA und LRRK2 in peripherem Vollblut: die Werte innerhalb eines Individuums verhalten sich reziprok proportional zueinander.

Dies trifft sowohl bei den Parkinson-Patienten als auch den Kontrollen zu. Welcher der beiden Werte, SNCA oder LRRK2, der Höhere ist, steht in keinem erkennbaren Zusammenhang mit den klinischen oder genetischen Daten der Probanden. Es scheint ‚LRRK2-Personen‘ und ‚SNCA-Personen‘ zu geben, wobei das Verhältnis zwischen beiden Gruppen ausgeglichen ist. Desweiteren wurde eine Verlaufsbeobachtung dieser Werte angestrengt: bei fünf zufällig ausgewählten Probanden wurden die Expressionslevel zu einem zweiten Zeitpunkt ein bis sechs Monate später bestimmt. Hierbei bestätigte sich das jeweilige intraindividuelle Verhältnis der Expression von LRRK2 und SNCA bei vier der fünf Probanden. Lediglich bei einem Probanden dieser Gruppe hatte sich das Verhältnis umgedreht.

Diese Beobachtungen legen ein pathophysiologisches Zusammenspiel der beiden Gene nahe. Auch verschiedene andere Arbeitsgruppen konnten bereits Hinweise für eine Ko-Regulation von LRRK2 und SNCA darstellen:

Die Gruppe um Dagmar Galter in Stockholm konnte anhand von Studien mit Ratten- und Mausmodellen zeigen, dass LRRK2 und SNCA auf mRNA-Ebene möglicherweise ko-reguliert sind⁵⁹. Sie beschrieben ein direkt proportionales Verhältnis: Ein Anstieg von α -Synuclein im Striatum der Nagetiere führt zu einem Anstieg der LRRK2-mRNA. Es wurde außerdem untersucht, ob ein Mangel an striatalem Dopamin die LRRK2- und SNCA-Expression beeinflusst, hierfür konnten allerdings keine starken Hinweise gefunden werden.

Carballo-Carbajal et al. konnten kürzlich ebenfalls eine Interaktion zwischen LRRK2 und SNCA darstellen: Anhand von LRRK2-überexprimierenden HEK-Zellen (*human embryonic kidney*) zeigte sich, dass das hochregulierte LRRK2 mittels einer Aktivierung des ERK-Signalweges (*extracellular signal-regulated kinase*) außerdem die Expression von SNCA induziert⁸.

Ähnliches zeigten Lin et al. anhand eines transgenen A53T-Mausmodelles: Überexprimiertes LRRK2 verstärkt den durch die A53T-Mutation in SNCA ausgelösten pathologischen Effekt, wobei es die abnorme Aggregation von α -Synuclein verstärkt sowie den Golgi-Apparat und die Funktion der Mikrotubuli beeinträchtigt³⁴.

Keine der genannten Studien befasste sich jedoch mit humanem Vollblut oder fand ein vergleichbares, reziprok proportionales Verhältnis von LRRK2 und SNCA. Diese kontroversen Zusammenhänge werfen daher einige interessante, weiterführende Fragestellungen auf.

Der nächste Schritt könnte sein, die Expressionslevel von LRRK2 und SNCA in den verschiedenen Zellpopulationen des Blutes gesondert zu erheben. Bei der vorliegenden Arbeit wurde lediglich Vollblut verwendet, es lässt sich daher keine Aussage darüber treffen, welche Zellfraktionen für die dargestellten Expressionshöhen von LRRK2 und SNCA verantwortlich sind.

Eine interessante Frage wäre, ob der beschriebene Zusammenhang überhaupt in derselben Zelle d.h. Zellpopulation des Blutes stattfindet. Wahrscheinlich ist dies jedoch nicht der Fall, denn laut aktuellem Stand der Literatur verteilen sich die im Blut vorhandenen Mengen an α -Synuclein und LRRK2 ungleich auf die verschiedenen Zellpopulationen: Nahezu das gesamte, im Blut vorliegende α -Synuclein befindet sich in den Erythrozyten¹. Allerdings bedeutet dies nicht, dass die absolute α -Synuclein-Proteinmenge pro Erythrozyt größer wäre als diejenige pro Leukozyt oder Thrombozyt, die roten Blutkörperchen sind lediglich zahlenmäßig weit überlegen. Bezieht man die α -Synuclein-Menge auf die jeweilige zelluläre Proteinmasse in Milligramm, zeigt sich interessanterweise die höchste Quantität in den Thrombozyten. Die Verteilung des Proteins in den Zellfraktionen lässt jedoch nicht zwangsläufig auf die Verteilung der mRNA rückschließen. In welcher Zellpopulation des Blutes die größte Menge an SNCA-mRNA vorliegt ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch gänzlich unbekannt.

Bezüglich des LRRK2 wissen wir, dass es im Blut hauptsächlich von den mononukleären Zellen, d.h. Leukozyten exprimiert wird⁶⁰. Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass innerhalb der Population der Leukozyten wiederum die Monozyten das höchste LRRK2-Expressionsniveau aufweisen³³.

Wenn jedoch LRRK2 und SNCA im Blut zum größten Teil wahrscheinlich nicht in derselben Zellpopulation exprimiert werden, auf welcher Ebene findet dann der dargestellte, reziprok proportionale Zusammenhang statt?

Eine weitere, sich anschließende Frage, welcher nachzugehen sich lohnen würde, wäre die Betrachtung der Expression der verschiedenen SNCA-Isoformen, d.h. *splice*-Varianten. Welche Isoform bzw. Isoformen machen die Expression im Blut quantitativ aus? Möglicherweise finden sich hier Korrelationen der Expression einer bestimmten SNCA-Isoform mit klinischen oder genetischen Charakteristika der Probanden. Diese Fragestellung ließe sich mit Isoform-spezifischen SNCA-Primern angehen. Die in dieser Arbeit verwendeten SNCA-Primer decken Exon 4 und 5 ab, erfassen also SNCA-140 und SNCA-126.

Generell bleibt zu bedenken, wie wenig noch über die physiologischen Funktionen von LRRK2 und α -Synuclein in peripherem, humanem Blut bekannt ist. Es stellt sich natürlich die Frage, in wieweit die mRNA-Konzentrationen im Blut die Vorgänge im Gehirn tatsächlich reflektieren und von welchen Einflüssen oder klinischen Eigenschaften diese zusätzlich beeinflusst werden. Variablen wie Ernährung, körperliche Aktivität und vor allem auch Medikation und Erkrankungsstadium der Parkinson-Patienten könnten sich ebenfalls in bisher unbekanntem Maße auf die mRNA- und Proteinlevel auswirken. Zukünftige Studiendesigns könnten diese potenziellen Einflussfaktoren mit einbeziehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Parkinson-Syndrom ist eine sehr häufige und stark einschränkende neurologische Erkrankung, für die bisher weder eine kausale Therapie noch ein verlässlicher Biomarker existieren. In den letzten Jahren wurden in einer zunehmenden Anzahl von Genen Mutationen entdeckt, welche für monogenetisch vererbare Formen dieser Erkrankung verantwortlich sind. So verursachen beispielsweise Punktmutationen in SNCA, ebenso wie Duplikationen und Triplikationen des Wildtyps, ein dominantes Parkinson-Syndrom. Die häufigste Ursache für ein autosomal-dominant vererbtes Parkinson-Syndrom sind jedoch Mutationen in LRRK2.

Es wird immer deutlicher, dass einige der ‚Parkinson-Gene‘ auch eine Rolle in der Pathogenese des Idiopathischen Parkinson-Syndroms spielen. Es sind genetische Risikovarianten in LRRK2 und SNCA bekannt, welche mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert und in erstaunlich großem Ausmaß mitverantwortlich sind für Fälle von sporadischem Parkinson-Syndrom. Pathophysiologisch scheint zudem in der abnormen Aggregation von α -Synuclein in Form der neuronalen Lewy-Körperchen einer der wichtigsten Signalwege hinsichtlich Neurotoxizität impliziert zu sein. Die Forschung an den eher seltenen, hereditären Formen der Erkrankung ist daher auch für die gesamte Parkinson-Forschung von immenser Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde die relative Genexpression von LRRK2 und SNCA in humanem Vollblut von Parkinson-Patienten, mit und ohne pathologischer LRRK2-Mutation, und neurodegenerativ gesunder Kontrollen, ebenfalls mit und ohne LRRK2-Mutation, mittels quantitativer *real time* RT-PCR mit dem *LightCycler 1.5* (Roche) analysiert. Primär wurde nach einer Korrelation von Expressionswerten mit dem klinischen Status, also dem Vorhandensein eines Parkinson-Syndroms, oder dem genetischen Status, hier die pathogenen LRRK2-Mutationen, gesucht, was eventuell als Ansatzpunkt zur Etablierung eines Biomarkers hätte fungieren können. Es fanden sich jedoch keinerlei signifikanten Korrelationen der LRRK2- oder SNCA-Expression im

Blut mit der Erkrankung oder eventueller LRRK2-Mutationen, ebenso weder mit der Krankheitsdauer oder dem Alter der Probanden.

Es zeigte sich stattdessen jedoch ein sehr interessanter, intraindividueller Zusammenhang zwischen den Expressionshöhen der beiden Gene: Die Werte innerhalb eines Individuums verhalten sich reziprok proportional zueinander, je höher der Expressionswert des einen Genes, desto niedriger der des anderen Gens, und umgekehrt. Dieser Zusammenhang fand sich sowohl bei Parkinson-Patienten als auch bei Kontrollen, ebenso unabhängig von eventuellen LRRK2-Mutationen. Bei einer erneuten Erhebung der Expressionswerte anhand von circa ein bis sechs Monaten später zum zweiten Mal entnommenen Blutproben bei fünf zufällig ausgewählten Probanden des ursprünglichen Gesamtkollektives bestätigten sich die Verhältnisse bei vier der fünf Probanden.

Diese Ergebnisse legen ein pathophysiologisches Zusammenspiel der beiden Gene LRRK2 und SNCA nahe. Ein ähnlicher Zusammenhang dieser beiden ‚Parkinson-Gene‘ im humanen Blut wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

In welcher Form und auf welcher Ebene die Regulationsmechanismen von LRRK2 und SNCA allerdings miteinander verwoben sind, lässt sich an dieser Stelle und mit dem gegenwärtigen Erkenntnisstand nur unzureichend erörtern. Es schließen sich einige weiterführende Fragen an, so könnte beispielsweise als einer der nächsten Schritte eine differenzierte Analyse der Genexpression von LRRK2 und SNCA in den verschiedenen Zellpopulationen des Blutes angestrengt werden, ebenso wie eine separate Darstellung der Expression der verschiedenen SNCA-Isoformen. Idealerweise sollten außerdem die klinischen Daten der Parkinson-Patienten in größerem Umfang mit einbezogen werden.

Abschließend gibt es zu sagen, dass sich die Ergebnisse dieser Arbeit gleichermaßen interessant wie enigmatisch präsentieren und daher einen verheißungsvollen Ausgangspunkt darstellen für sich weiterführend aufwerfende Fragestellungen und Ideen in der Forschung rund um die beiden ‚Parkinson-Gene‘ LRRK2 und α -Synuclein.

6 LITERATUR

1. Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, Diep L, Fox M, Goldstein JM, Soriano F, Seubert P, Chilcote TJ. Red Blood Cells Are the Major Source of Alpha-Synuclein in Blood. *Neurodegener Dis* 2008;5(2):55-59.
2. Becker A, Reith A, Napiwotzki J, Kadenbach B. A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Anal Biochem* 1996;237(2):204-207.
3. Berg D, Schweitzer KJ, Leitner P, Zimprich A, Lichtner P, Belcredi P, Brussel T, Schulte C, Maass S, Nagele T, Wszolek ZK, Gasser T. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease*. *Brain* 2005;128(12):3000-3011.
4. Berg D, Niwar M, Maass S, Zimprich A, Moller JC, Wuellner U, Schmitz-Hubsch T, Klein C, Tan EK, Schols L, Marsh L, Dawson TM, Janetzky B, Muller T, Woitalla D, Kostic V, Pramstaller PP, Oertel WH, Bauer P, Krueger R, Gasser T, Riess O. Alpha-synuclein and Parkinson's disease: implications from the screening of more than 1,900 patients. *Mov Disord* 2005;20(9):1191-1194.
5. Biskup S, Moore DJ, Celsi F, Higashi S, West AB, Andrabi SA, Kurkinen K, Yu S-W, Savitt JM, Waldvogel HJ, Faull RLM, Emson PC, Torp R, Ottersen OP, Dawson TM, Dawson VL. Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann Neurol* 2006;60(5):557-569.
6. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MCJ, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science* 2003;299(5604):256-259.
7. Bosgraaf L, Van Haastert PJM. Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 2003;1643(1-3):5-10.
8. Carballo-Carbajal I, Weber-Endress S, Rovelli G, Chan D, Wolozin B, Klein CL, Patenge N, Gasser T, Kahle PJ. Leucine-rich repeat kinase 2 induces alpha-synuclein expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cell Signal*; In Press, Uncorrected Proof.
9. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N,

- Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004;364(9440):1167-1169.
10. Chiba-Falek O, Kowalak JA, Smulson ME, Nussbaum RL. Regulation of alpha-synuclein expression by poly (ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1) binding to the NACP-Rep1 polymorphic site upstream of the SNCA gene. *Am J Hum Genet* 2005;76(3):478-492.
 11. Dächsel J, Ross O, Mata I, Kachergus J, Toft M, Cannon A, Baker M, Adamson J, Hutton M, Dickson D, Farrer M. Lrrk2 G2019S substitution in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-immunoreactive neuronal inclusions. *Acta Neuropathol* 2007;113(5):601-606.
 12. de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000;54(11 Suppl 5):21-23.
 13. Di Fonzo A, Rohé CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, Guedes L, Fabrizio E, Manfredi M, Vanacore N, Goldwurm S, Breedveld G, Sampaio C, Meo G, Barbosa E, Oostra BA, Bonifati V. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 2005;365(9457):412-415.
 14. Di Fonzo A, Wu-Chou Y-H, Lu C-S, van Doeselaar M, Simons E, Rohé C, Chang H-C, Chen R-S, Weng Y-H, Vanacore N, Breedveld G, Oostra B, Bonifati V. A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan. *Neurogenetics* 2006;7(3):133-138.
 15. El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DMA, Ikeda S-i, Cookson MR, Hardy J, Allsop D. Alpha-Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J.* 2003;17(13):1945-1947.
 16. El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, Schlossmacher MG, Allsop D. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.* 2006;20(3):419-425.
 17. Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, Munz M, Schweitzer KJ, Wolf B, Berg D, Mueller JC, Gasser T. Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J.* 2008;22(5):1327-1334.

18. Funayama M, Li Y, Tomiyama H, Yoshino H, Imamichi Y, Yamamoto M, Murata M, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. Leucine-rich repeat kinase 2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population. *Neuroreport* 2007;18(3):273-275.
19. Gasser T. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007;22(17):343-350.
20. Gasser T. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Rev Mol Med* 2009;11.
21. Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, Braun RJ, O'Neill E, Meitinger T, Kolch W, Prokisch H, Ueffing M. The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet* 2006;15(2):223-232.
22. Golbe LI, Di Iorio G, Sanges G, Lazzarini AM, La Sala S, Bonavita V, Duvoisin RC. Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *Ann Neurol* 1996;40(5):767-775.
23. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AHV, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 2008;7(7):583-590.
24. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11(9):1026-1030.
25. <http://www.pcr.at/sonstiges/bilder/mblcsa.jpg>, (12.10.2009)
26. <http://www.qiagen.com/resources/info/images/MeltingCurveAnalysis.jpg>, (12.10.2009)
27. <http://www.qiagen.com/resources/info/images/typicalamplificationplot.jpg>, (12.10.2009)
28. Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Durr A, Brice A. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004;364(9440):1169-1171.
29. Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Gibson JM, Ross OA, Lynch T, Wiley J, Payami H, Nutt J, Maraganore DM, Czyzewski K, Styczynska M, Wszolek ZK, Farrer MJ, Toft M. Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant

- parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet* 2005;76(4):672-680.
30. Kim S, Jeon BS, Heo C, Im PS, Ahn T-B, Seo J-H, Kim H-S, Park CH, Choi SH, Cho S-H, Lee WJ, Suh Y-H. Alpha-Synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocytes in Parkinson's disease. *FASEB J.* 2004;18(13):1615-1617.
 31. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392(6676):605-608.
 32. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18(2):106-108.
 33. Kukiolka T. Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen, AG Gasser. Bisher unveröffentlichte Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin.
 34. Lin X, Parisiadou L, Gu X-L, Wang L, Shim H, Sun L, Xie C, Long C-X, Yang W-J, Ding J, Chen ZZ, Gallant PE, Tao-Cheng J-H, Rudow G, Troncoso JC, Liu Z, Li Z, Cai H. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Regulates the Progression of Neuropathology Induced by Parkinson's-Disease-Related Mutant alpha-synuclein. *Neuron* 2009;64(6):807-827.
 35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
 36. Lu C-S, Wu-Chou Y-H, van Doeselaar M, Simons E, Chang H-C, Breedveld G, Di Fonzo A, Chen R-S, Weng Y-H, Lai S-C, Oostra B, Bonifati V. The LRRK2 Arg1628Pro variant is a risk factor for Parkinson's disease in the Chinese population. *Neurogenetics* 2008;9(4):271-276.
 37. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meo G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A, The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease, The French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Association between Early-Onset Parkinson's Disease and Mutations in the Parkin Gene. *N Engl J Med* 2000;342(21):1560-1567.
 38. Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin M-C, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert J-C, Lynch T,

- Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan E-K, Van Broeckhoven C, Consortium for the Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease. Collaborative Analysis of alpha-Synuclein Gene Promoter Variability and Parkinson Disease. *JAMA* 2006;296(6):661-670.
39. Marin I, van Egmond WN, van Haastert PJM. The Roco protein family: a functional perspective. *FASEB J.* 2008;22(9):3103-3110.
40. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998;24(6):954-958, 960, 962.
41. Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, Zimprich A, Lichtner P, Illig T, Berg D, Wüllner U, Meitinger T, Gasser T. Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005;57(4):535-541.
42. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
43. Nichols WC, Pankratz N, Hernandez D, Paisan-Ruiz C, Jain S, Halter CA, Michaels VE, Reed T, Rudolph A, Shults CW, Singleton A, Foroud T. Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet* 2005;365(9457):410-412.
44. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW, Singleton AB. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004;44(4):595-600.
45. Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. 1817.
46. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 1997;276(5321):2045-2047.
47. Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat A-L, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2,

- encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006;38(10):1184-1191.
48. Ross OA, Toft M, Whittle AJ, Johnson JL, Papapetropoulos S, Mash DC, Litvan I, Gordon MF, Wszolek ZK, Farrer MJ, Dickson DW. Lrrk2 and Lewy body disease. *Ann Neurol* 2006;59(2):388-393.
 49. Ross OA, Wu Y-R, Lee M-C, Funayama M, Chen M-L, Soto AI, Mata IF, Lee-Chen G-J, Chen CM, Tang M, Zhao Y, Hattori N, Farrer MJ, Tan E-K, Wu R-M. Analysis of Lrrk2 R1628P as a risk factor for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008;64(1):88-92.
 50. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 2009;41(12):1303-1307.
 51. Scherzer CR, Eklund AC, Morse LJ, Liao Z, Locascio JJ, Fefer D, Schwarzschild MA, Schlossmacher MG, Hauser MA, Vance JM, Sudarsky LR, Standaert DG, Growdon JH, Jensen RV, Gullans SR. Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(3):955-960.
 52. Simon-Sanchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Kruger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 2009;41(12):1308-1312.
 53. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003;302(5646):841.
 54. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. alpha-Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388(6645):839-840.
 55. Tan E, Zhao Y, Skipper L, Tan M, Di Fonzo A, Sun L, Fook-Chong S, Tang S, Chua E, Yuen Y, Tan L, Pavanni R, Wong M, Kolatkar P, Lu

- C, Bonifati V, Liu J. The LRRK2 Gly2385Arg variant is associated with Parkinson's disease: genetic and functional evidence. *Hum Genet* 2007;120(6):857-863.
56. Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, Locascio JJ, Schlossmacher MG, El-Agnaf OMA. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349(1):162-166.
57. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science* 2004;304(5674):1158-1160.
58. West AB, Moore DJ, Choi C, Andrabi SA, Li X, Dikeman D, Biskup S, Zhang Z, Lim K-L, Dawson VL, Dawson TM. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum Mol Genet* 2007;16(2):223-232.
59. Westerlund M, Ran C, Borgkvist A, Sterky FH, Lindqvist E, Lundstromer K, Pernold K, Brene S, Kallunki P, Fisone G, Olson L, Galter D. Lrrk2 and alpha-synuclein are co-regulated in rodent striatum. *Mol Cell Neurosci* 2008;39(4):586-591.
60. White LR, Toft M, Kvam SN, Farrer MJ, Aasly JO. MAPK-pathway activity, Lrrk2 G2019S, and Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2007;85(6):1288-1294.
61. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yébenes JG. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004;55(2):164-173.
62. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T. Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron* 2004;44(4):601-607.

7 ANHANG

7.1 Einzelmesswerte

a) Zu Tabelle 5, S. 26 (Relative Expression von LRRK2 und SNCA)

LRRK2:

Nr.	Messung 1	Messung 2	arithm. Mittelwert
1	37,27	46,21	41,74 ± 4,47
2	102,54	64,45	83,49 ± 19,05
3	15,24	17,51	16,38 ± 1,13
4	25,63	29,65	27,64 ± 2,01
5	37,79	39,95	38,87 ± 1,08
6	13,09	14,12	13,60 ± 0,52
7	17,88	24,42	21,15 ± 3,27
8	32,90	37,79	35,35 ± 2,45
9	51,27	51,63	51,45 ± 0,18
10	61,39	64,89	63,14 ± 1,75
11	62,25	67,65	64,95 ± 2,70
12	33,59	29,86	31,72 ± 1,87
13	18,90	34,78	26,84 ± 7,94
14	39,67	35,26	37,47 ± 2,20
15	21,86	16,11	18,98 ± 2,87
16	28,25	23,92	26,08 ± 2,16
17	129,79	99,73	114,76 ± 15,03
18	7,89	8,51	8,20 ± 0,31
19	22,01	17,88	19,94 ± 2,07
20	24,08	57,28	40,68 ± 16,60
21	7,31	8,11	7,71 ± 0,40
22	81,01	111,43	96,22 ± 15,21
23	5,46	4,14	4,80 ± 0,66
24	34,78	28,25	31,51 ± 3,26

25	86,82	82,14	84,48 ± 2,34
26	66,26	68,59	67,43 ± 1,17
27	14,72	22,78	18,75 ± 4,03
28	68,12	68,12	68,12 ± 0,00
29	27,10	25,81	26,45 ± 0,64
30	34,54	29,86	32,20 ± 2,34
31	13,09	18,25	15,67 ± 2,58
32	93,05	159,79	126,42 ± 33,37
33	20,68	20,97	20,82 ± 0,14

SNCA:

Nr.	Messung 1	Messung 2	arithm. Mittelwert
1	101,83	96,34	99,08 ± 2,75
2	7,89	7,36	7,63 ± 0,26
3	218,27	278,20	248,24 ± 29,96
4	10,27	15,24	12,75 ± 2,49
5	145,01	139,10	142,06 ± 2,95
6	126,24	135,30	130,77 ± 4,53
7	44,63	59,30	51,97 ± 7,33
8	115,36	94,35	104,86 ± 10,50
9	10,41	8,06	9,23 ± 1,18
10	105,42	93,05	99,24 ± 6,18
11	6,92	6,23	6,57 ± 0,34
12	91,77	60,55	76,16 ± 15,61
13	4,63	7,46	6,05 ± 1,42
14	12,38	14,12	13,25 ± 0,87
15	202,25	196,72	199,49 ± 2,77
16	51,27	30,06	40,67 ± 10,60
17	9,51	7,26	8,39 ± 1,13
18	127,12	121,10	124,11 ± 3,01
19	76,11	64,45	70,28 ± 5,83
20	2,50	3,34	2,92 ± 0,42
21	445,72	467,88	456,80 ± 11,08

22	19,70	16,91	18,31 ± 1,39
23	286,03	481,04	383,53 ± 97,51
24	11,71	9,45	10,58 ± 1,13
25	12,55	17,15	14,85 ± 2,30
26	119,43	136,24	127,83 ± 8,41
27	6,82	4,72	5,77 ± 1,05
28	18,51	23,92	21,21 ± 2,71
29	94,35	79,34	86,85 ± 7,51
30	2,38	2,07	2,22 ± 0,15
31	12,73	14,12	13,43 ± 0,70
32	6,15	6,63	6,39 ± 0,24
33	104,69	86,22	95,46 ± 9,23

b) Zu Tabelle 8, S. 40 (Relative Expression von LRRK2 und SNCA zu einem Zeitpunkt B)

LRRK2:

Nr.	Messung 1	Messung 2	arithm. Mittelwert
2	50,91	36,25	43,58 ± 7,33
8	20,11	13,36	16,74 ± 3,38
10	15,24	13,64	14,44 ± 0,80
12	36,50	23,59	30,05 ± 6,46
23	56,49	35,75	46,12 ± 10,37

SNCA:

Nr.	Messung 1	Messung 2	arithm. Mittelwert
2	4,00	3,01	3,51 ± 0,49
8	78,25	102,54	90,39 ± 12,14
10	98,36	165,42	131,89 ± 33,53
12	97,01	108,38	102,69 ± 5,69
23	16,45	6,45	11,45 ± 5,00

7.2 Verzeichnis der Abbildungen, Diagramme und Tabellen

a) Abbildungen	
• Abbildung 1: Genetische Struktur und funktionale Domänen von LRRK2 ¹⁹	7
• Abbildung 2: Schematische Darstellung des LightCyclers® 1.5 ²⁵	19
• Abbildung 3: Typische Amplifikationskurven zweier Proben A und B ²⁷	20
• Abbildung 4: Exemplarische Schmelzkurvenanalyse zweier Proben A und B ²⁶	21
b) Diagramme	
• Diagramm 1: Relative LRRK2-Expression von Parkinson-Patienten und Kontrollen (Werte aus Tabelle 6, S. 28)	29
• Diagramm 2: Relative LRRK2-Expression von Parkinson-Patienten und Kontrollen, je unterteilt in solche mit pathogener LRRK2-Mutation und solche mit negativer Familienanamnese (Werte aus Tabelle 6, S. 28)	29
• Diagramm 3: Relative SNCA-Expression von Parkinson-Patienten und Kontrollen (Werte aus Tabelle 7, S. 30)	31
• Diagramm 4: Relative LRRK2-Expression von Parkinson-Patienten und Kontrollen, je unterteilt in solche mit pathogener LRRK2-Mutation und solche mit negativer Familienanamnese (Werte aus Tabelle 7, S. 30)	31
• Diagramm 5: Relative LRRK2-Expression der einzelnen Parkinson-Patienten (n = 15), aufgetragen gegen die Krankheitsdauer [a] (Werte aus Tabelle 5, S. 26)	32
• Diagramm 6: Relative SNCA-Expression der einzelnen Parkinson-Patienten (n = 15), aufgetragen gegen die jeweilige Krankheitsdauer [a] (Werte aus Tabelle 5, S. 26)	33
• Diagramm 7: Relative LRRK2-Expression der einzelnen Probanden (n = 33), aufgetragen gegen das jeweilige Geburtsjahr (Werte aus Tabelle 5, S. 26)	34
• Diagramm 8: Relative SNCA-Expression der einzelnen Probanden (n = 33), aufgetragen gegen das jeweilige Geburtsjahr (Werte aus Tabelle 5, S. 26)	35

- Diagramm 9: Relative SNCA-Expression der einzelnen Probanden (n = 33), aufgetragen gegen die jeweilige relative LRRK2-Expression (Werte aus Tabelle 5, S. 26) 36
- Diagramm 10: Relative LRRK2- und SNCA-Expression, aufgetragen gegen die einzelnen Probanden (n = 33) (Werte aus Tabelle 5, S. 26)..... 37
- Diagramm 11: Relative LRRK2- und SNCA-Expression, aufgetragen gegen die einzelnen Parkinson-Patienten (n = 20) (Werte aus Tabelle 5, S. 26)..... 38
- Diagramm 12: Relative LRRK2- und SNCA-Expression, aufgetragen gegen die einzelnen Kontrollen (n = 13) (Werte aus Tabelle 5, S. 26).... 39
- c) Tabellen
- Tabelle 1: Loci und Gene beim familiären Parkinson-Syndrom (modifiziert nach ²⁰)..... 4
- Tabelle 2: Gesamtes Probandenkollektiv (n = 33), dargestellt sind demographische, klinische und genetische Daten (FA = Familienanamnese, PS = Parkinson-Syndrom, m = männlich, w = weiblich)..... 14
- Tabelle 3: Real time RT-PCR-Reaktionsansatz pro Kapillare (fw. = forward, rev. = reverse)..... 23
- Tabelle 4: Verwendetes Temperaturprofil bei der real time RT-PCR..... 24
- Tabelle 5: Relative Expression von LRRK2 bzw. SNCA. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte aus jeweils zwei Läufen sowie die Standardabweichungen (FA = Familienanamnese, PS = Parkinson-Syndrom, m = männlich, w = weiblich)..... 26
- Tabelle 6: Relative Expression von LRRK2 in Kohorten sortiert nach klinischen und genetischen Daten. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen (IPS = Idiopathisches Parkinson-Syndrom) 28
- Tabelle 7: Relative Expression von SNCA in Kohorten sortiert nach klinischen und genetischen Daten. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen (IPS = Idiopathisches Parkinson-Syndrom) 30
- Tabelle 8: Relative LRRK2- und SNCA-Expression zu einem Zeitpunkt A und B (n = 5). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen 40

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die an diesem Projekt beteiligt waren und mich unterstützt haben, meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gasser danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen. Die stete Gesprächsbereitschaft und konstruktiven Vorschläge haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuerinnen Frau Dr. med. Dr. rer. nat. Saskia Biskup und Frau Dr. rer. nat. Martina Wölfle, welche mich beide vom ersten Tag an uneingeschränkt unterstützten. Ohne ihre Geduld, Begeisterung und Vertrauen wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Ich danke außerdem dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Gasser, insbesondere Claudia Schulte, Katja Hesse, Kathrin Hauser und Benjamin Schmid, für die freundliche Hilfsbereitschaft im Laboralltag und die stets sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich außerdem bei allen Ärzten des Zentrums für Neurologie des UKT, die zusätzlich zum Klinikalltag Blutproben für meine Forschungsarbeit akquirierten. Ebenso bedanke ich mich natürlich bei allen Patienten und Probanden, die an dieser Studie beteiligt waren.

Meinen Eltern Barbara Gottorf und Dr. med. Thomas Gottorf gilt mein besonderer Dank, für alles.

7.4 Lebenslauf

Name	Rebecca Barbara Gottorf
Geburtsdatum	25.05.1986
Geburtsort	Karlsruhe

Hochschulstudium

WS 2005/06 - WS 2011/12	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen
----------------------------	---

03.09.2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
------------	---

25.11.2011	Ärztliche Prüfung
------------	-------------------

Schulische Ausbildung

1996 - 2005	Pestalozzi-Gymnasium Biberach a. d. Riß
-------------	---

21.06.2005	Allgemeine Hochschulreife
------------	---------------------------

1992 - 1996	Gaisental-Grundschule Biberach a. d. Riß
-------------	--