

**Aus dem Zentrum für Neurologie
Neurologische Universitätsklinik Tübingen /
Hertie-Institut für klinische Hirnforschung
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt
Neurodegenerative Erkrankungen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. T. Gasser**

**Butyrylcholinesterase und Apolipoprotein E
bei Lewy-Körperchen-Erkrankungen**

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

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

**vorgelegt von
Stefanie Elisabeth Edith Keller
aus
Tuttlingen**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Berg

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Eschweiler

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Lewy-Körperchen-Erkrankungen (Lewy body diseases, LBD)	7
1.1.1. Begriffsklärung	7
1.1.2. Klinische Einteilung	7
1.1.3. Ätiologie und Pathogenese	9
1.2. Butyrylcholinesterase, Gen (<i>BCHE</i>) und Protein (BuChE)	15
1.2.1. Lokalisation und Struktur der Butyrylcholinesterase	16
1.2.2. Vorkommen der Butyrylcholinesterase	16
1.2.3. <i>BCHE</i> -Gen-Polymorphismen	16
1.2.4. Physiologische Funktionen der Butyrylcholinesterase	17
1.2.5. Butyrylcholinesterase und Neurodegeneration	18
1.3. Apolipoprotein E, Gen (<i>APOE</i>) und Protein (ApoE)	20
1.3.1. Lokalisation und Struktur des Apolipoproteins E	20
1.3.2. Vorkommen des Apolipoproteins E	20
1.3.3. Physiologie und Pathophysiologie des Apolipoproteins E	20
1.3.4. Apolipoprotein E-Gen-Polymorphismen	21
1.3.5. Apolipoprotein E und Neurodegeneration	21
1.4. Apolipoprotein E und Butyrylcholinesterase	22
1.5. Zielsetzung der Arbeit	23
2. Studienkollektiv, Material und Methoden	24
2.1. Studienkollektiv	24
2.1.1. Patienten	25
2.1.2. Kontrollen	25
2.2. DNA-, Liquor- und Serumgewinnung	25
2.2.1. DNA	25
2.2.2. Liquor	26
2.2.3. Serum	26
2.3. Material	26
2.3.1. Chemikalien und Enzyme	26
2.3.2. Puffer und Lösungen	26
2.3.3. Referenzsequenzen	28
2.3.4. Oligonukleotide (Primer)	28
2.3.5. DNA-Größenstandard	28

Inhaltsverzeichnis

2.3.6. Geräte und Hilfsmittel, Verbrauchsmaterialien	29
2.4. Methoden	30
2.4.1. Standardmethoden	30
2.4.2. SNaPshot-Genotypisierung der <i>BCHE</i> -SNPs	31
2.4.3. Bestimmung der BuChE-Aktivität	35
2.4.4. Bestimmung des <i>APOE</i> -Genotyps	37
2.4.5. Statistische Testverfahren	40
3. Ergebnisse	42
3.1. Alters- und Geschlechterverteilung in den untersuchten Gruppen . . .	42
3.2. BuChE-Aktivität in Beziehung zu Geschlecht und Alter	42
3.2.1. BuChE-Aktivität im Liquor	42
3.2.2. BuChE-Aktivität im Serum	42
3.3. BuChE-Aktivität: Vergleich der LBD-Gruppe mit der Kontrollgruppe . .	43
3.3.1. LBD-Patienten versus Kontrollen: BuChE-Aktivität im Liquor . .	43
3.3.2. LBD-Patienten versus Kontrollen: BuChE-Aktivität im Serum . .	43
3.4. BuChE-Aktivität innerhalb der LBD	43
3.4.1. LBD-Patienten: BuChE-Aktivität im Liquor	43
3.4.2. LBD-Patienten: BuChE-Aktivität im Serum	44
3.5. <i>BCHE</i> -Genotyp und Klinik	45
3.5.1. <i>BCHE</i> K-Variante und Klinik	45
3.5.2. <i>BCHE</i> A-Variante und Klinik	46
3.6. <i>BCHE</i> -Genotyp und BuChE-Aktivität	46
3.6.1. <i>BCHE</i> K-Variante und BuChE-Aktivität	46
3.6.2. <i>BCHE</i> A-Variante und BuChE-Aktivität	47
3.7. <i>APOE</i> -Genotyp und BuChE-Aktivität	47
3.7.1. <i>APOE</i> -Genotyp und BuChE-Aktivität im Liquor	47
3.7.2. <i>APOE</i> -Genotyp und BuChE-Aktivität im Serum	47
3.8. <i>BCHE</i> -Genotyp, <i>APOE</i> -Genotyp und Demenz	47
3.9. <i>APOE</i> -Genotyp, $A\beta_{42}$ und Demenz	48
4. Diskussion	49
4.1. BuChE-Aktivität: generelle Beobachtungen	49
4.1.1. BuChE-Aktivität im Liquor	49
4.1.2. BuChE-Aktivität im Serum	51
4.1.3. BuChE-Aktivität von Liquor und Serum im Vergleich	51
4.2. BuChE-Aktivität: Vergleich der LBD-Gruppe mit der Kontrollgruppe . .	52
4.2.1. LBD-Patienten versus Kontrollen: BuChE-Aktivität im Liquor . .	52

Inhaltsverzeichnis

4.2.2. LBD-Patienten versus Kontrollen: BuChE-Aktivität im Serum . . .	53
4.2.3. BuChE-Aktivität: Allgemeine Bemerkung	53
4.3. BuChE-Aktivität innerhalb der LBD	53
4.3.1. LBD-Patienten: BuChE-Aktivität im Liquor	53
4.3.2. LBD-Patienten: BuChE-Aktivität im Serum	56
4.4. <i>BCHE</i> K-Variante und Klinik	58
4.4.1. <i>BCHE</i> K-Variante und Parkinson-Syndrom	58
4.4.2. <i>BCHE</i> K-Variante und Demenz	58
4.5. <i>BCHE</i> K-Variante und BuChE-Aktivität	59
4.5.1. <i>BCHE</i> K-Variante und BuChE-Aktivität im Liquor	59
4.5.2. <i>BCHE</i> K-Variante und BuChE-Aktivität im Serum	60
4.6. <i>BCHE</i> A-Variante	60
4.7. <i>APOE</i> -Genotyp und BuChE-Aktivität	61
4.7.1. <i>APOE</i> -Genotyp und BuChE-Aktivität im Liquor	61
4.7.2. <i>APOE</i> -Genotyp und BuChE-Aktivität im Serum	62
4.8. <i>BCHE</i> -Genotyp, <i>APOE</i> -Genotyp und Demenz	62
4.9. <i>APOE</i> -Genotyp, $A\beta_{42}$ und klinische Symptome	63
4.10. Einschränkungen dieser Arbeit	64
5. Zusammenfassung	66
A. Abbildungsverzeichnis	68
A.1. Methodenteil	68
A.2. Ergebnisteil	72
B. Tabellenverzeichnis	79
B.1. Materialteil	79
B.2. Methodenteil	85
B.3. Ergebnisteil	88
C. Literaturverzeichnis	95
D. Abkürzungsverzeichnis	105
E. Veröffentlichung	108
F. Danksagung	109

1. Einleitung

1.1. Lewy-Körperchen-Erkrankungen (Lewy body diseases, LBD)

1.1.1. Begriffsklärung

Sowohl die Parkinson-Krankheit ohne Demenz (Parkinson disease without dementia, PDND) als auch die Parkinson-Krankheit mit Demenz (Parkinson disease with dementia, PDD) als auch die Demenz mit Lewy-Körperchen (dementia with Lewy bodies, DLB) weisen Proteinaggregate in Form von Lewy-Körperchen (Lewy bodies, LB) auf. Es liegt daher nahe, diese drei Krankheiten unter dem Überbegriff „Lewy-Körperchen-Erkrankungen“ (Lewy body diseases, LBD) zusammenzufassen (Lippa et al., 2007). Dies erscheint auch sinnvoll, um die z. T. identischen pathologischen Prozesse dieser Krankheiten besser nachvollziehen zu können und anhand eines verbesserten Krankheitsverständnisses neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

1.1.2. Klinische Einteilung

PDND, PDD

Die Parkinson-Krankheit (Parkinson disease, PD) wurde erstmals im Jahre 1817 von James Parkinson in „An Essay on the Shaking Palsy“ beschrieben (Parkinson, 2002), dessen Schilderung zum Teil bis heute ihre Gültigkeit hat. Die nach ihrem Erstbeschreiber benannte Erkrankung ist nach der Alzheimer-Demenz (AD) die zweithäufigste altersassoziierte neurodegenerative Erkrankung. Während die Prävalenz der PD in der Altersgruppe der 65- bis 69-jährigen noch bei 0.6 % liegt, steigt sie in der Altersgruppe der 85- bis 89-jährigen auf 3.5 % an (de Rijk et al., 1997). Angesichts der demographischen Entwicklung ist eine zunehmende Prävalenz der PD mit den sich daraus ergebenden sozioökonomischen Folgen zu erwarten.

Die PD tritt bei Männern häufiger als bei Frauen auf, wobei diese Geschlechtspräferenz insbesondere bei älteren Patienten (>70 Jahre) und in westlichen Populationen ausgeprägt ist (Taylor et al., 2007). Die Inzidenz der PD steigt ab dem 50. Lebensjahr stark an (Elbaz et al., 2002). Neben einer Akinese (hochgradige Bewegungsarmut

1. Einleitung

bis Bewegungslosigkeit) treten bei der PD die Kardinalsymptome Rigor (Erhöhung des Muskeltonus mit charakteristischem „wächsernen“ Widerstand bei passiver Bewegung), Ruhetremor (Zittern im Ruhezustand) und posturale Instabilität (mangelnde Stabilität der aufrechten Körperhaltung) in unterschiedlich starkem Ausmaß auf. An fakultativen Begleitsymptomen sind sensorische Symptome (Dysästhesien und Schmerzen), vegetative Störungen (Störungen von Blutdruck, Temperaturregulation, Harnblasenfunktion und sexuellen Funktionen), psychische Symptome (v. a. Depression) und kognitive Symptome (frontale Störungen, in fortgeschrittenen Stadien Demenz) zu nennen (Leitlinien der DGN 2008. Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie. <http://www.dgn.org/leitlinien-der-dgn-2008-96.html>)

Motorische Symptome werden klinisch manifest, wenn mindestens 50 % der Ganglienzellen in der Pars compacta der Substantia nigra (SN) zugrunde gegangen sind, was zu einer über 80%igen Reduktion der Dopamin-Spiegel im Striatum führt (Whitton, 2007). Die PD wird anhand der Stadien nach Hoehn & Yahr in fünf Schweregrade eingeteilt (Hoehn und Yahr, 1967). Die Einteilung berücksichtigt, ob die Symptomatik ein- oder beidseitig vorhanden ist, ob die Stellreflexe gestört sind und ob der Patient in seiner Mobilität eingeschränkt ist.

Zunehmend in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses ist die Tatsache gerückt, dass PD-Patienten nicht nur unter motorischen Symptomen leiden, sondern auch häufig von kognitiven Störungen betroffen sind. Studien haben gezeigt, dass im Querschnitt etwa 40 % der PD-Patienten von einer Demenz betroffen sind (Cummings, 1988) und das kumulative Risiko bei über 75 % liegt (Aarsland et al., 2003), da das Risiko für eine Demenz im Rahmen einer PD mit zunehmender Krankheitsdauer steigt. Die Diagnose PDD wird gestellt, wenn die Demenz-Symptome später als ein Jahr nach Entwicklung einer PD einsetzen. Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer Demenz gelten ein höheres Alter bei Erkrankung an PD, eine längere Dauer der Parkinson-Symptome, eine akinetisch-rigide Verlaufsform, eine axiale Beteiligung, das Vorhandensein von Halluzinationen, das Auftreten von Psychosen, ein niedrigerer Ausgangswert im Mini-Mental-Status-Test (MMST) und eine Verschlechterung im Sprachfluss (lexikalisch und semantisch) und in den exekutiven und visuell-räumlichen Fähigkeiten (Dodel et al., 2008).

DLB

Bei der DLB handelt es sich um eine progrediente degenerative Demenz-Erkrankung. Sie gilt als die zweithäufigste degenerative Demenzform im Alter, obgleich der angegebene Anteil der DLB an allen Demenz-Erkrankungen in verschiedenen Studien mit

1. Einleitung

0–30.5 % stark variiert (McKeith et al., 2004; Zaccai et al., 2005). Die Demenz kann zu deliranten Verwirrheitszuständen führen, welche vorrangig nach der Gabe von Neuroleptika auftreten. Weitere typische Merkmale sind visuelle Halluzinationen und starke Fluktuationen der Wachheit und der Aufmerksamkeit. DLB-Patienten zeigen im Vergleich zu PDD-Patienten eher symmetrische motorische Auffälligkeiten, während das Auftreten eines Tremors weniger typisch ist (Goldmann Gross et al., 2008). Im Unterschied zur PDD gilt als diagnostisches Kriterium für die DLB das frühzeitige Auftreten von Demenz-Symptomen vor oder mit dem Eintreten motorischer Symptome, oder zumindest innerhalb des ersten Jahres nach Entwicklung einer PD (McKeith et al., 2005). Da diese Einteilung der beiden Erkrankungen offensichtlich „künstlich“ ist und bisher keine biochemischen Unterscheidungsmerkmale identifiziert wurden, wurde vorgeschlagen, PDD und DLB nicht als eigenständige Entitäten zu betrachten, sondern als eine gemeinsame Entität unter dem Namen „PDD/DLB-Komplex“ zusammenzufassen (McGeer und McGeer, 2008).

1.1.3. Ätiologie und Pathogenese

Mithilfe von Studien, die sich auf ganz unterschiedliche Weise dem Thema genähert haben, sollen Ätiologie und Pathogenese der LBD dargelegt werden.

Neuropathologie

Die LBD (PDND, PDD, DLB) sind neuropathologisch durch einen Untergang von melaninhaltigen, Dopamin-produzierenden Zellen in der Pars compacta der SN, durch das Auftreten von LB außerhalb der SN und häufig durch eine begleitende AD-Pathologie (β -Amyloid- ($A\beta$)-Plaques und Neurofibrillenbündel) gekennzeichnet (Apaydin et al., 2002; Braak et al., 2003; Leech et al., 2001; Smith und Prayson, 1996). LB sind kugelförmige, eosinophile, zytoplasmatische Proteineinschlüsse, die aus α -Synuclein, Parkin, Ubiquitin, Synphilin, Neurofilamenten und vielen anderen Proteinen bestehen. Bis dato wurden mehr als 40 Proteine in LB nachgewiesen (Shults, 2006), wobei jedes Jahr weitere Proteine identifiziert werden. α -Synuclein stellt die Hauptkomponente der LB dar (Spillantini et al., 1998). Dieses Protein stammt aus der Familie der Synucleine und ist im normalen Gehirn reichlich an den synaptischen Endkolben vorhanden. Seine physiologische Funktion ist nicht restlich geklärt. In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl von kortikalen LB und dem Auftreten einer Demenz nachgewiesen werden (Aarsland et al., 2005; Hurtig et al., 2000). Es

1. Einleitung

wäre allerdings auch denkbar, dass es sich bei den LB um ein Epiphänomen handelt, welches durch den neuronalen Untergang induziert wird. Demnach wären nicht die α -Synuclein-Aggregate, sondern vielmehr die Vorstufen, lösliche Oligomere, toxisch und somit möglicherweise als ursächlich für die Neurodegeneration anzusehen (Conway et al., 2000).

Bei der PD zeigt sich über die Jahre folgendes Ausbreitungsmuster: Während der prämotorischen Periode breiten sich die LB zunächst vom Bulbus olfactorius und Vagusnerv in tiefer gelegene Hirnstammregionen aus. In der darauf folgenden motorischen Periode werden das Mittelhirn einschließlich der SN und später der Mesokortex sowie eventuell der Neokortex einbezogen (Alves et al., 2008; Braak et al., 2004). Dieses Ausbreitungsmuster kann bei der DLB abweichen. Nach einer vierstufigen Klassifikation nach Marui breitet sich die Krankheit von der Amygdala über das limbische System zum Neocortex hin aus (Buracchio et al., 2005). In fortgeschrittenen Krankheitsstadien kommt es zu Überlappungen der Einteilungen von Braak und Marui (Buracchio et al., 2005; Jellinger, 2008). Die Struktur der LB ist bei PDND, PDD und DLB nicht zu unterscheiden. Es existieren auch keine weiteren eindeutigen neuropathologischen Merkmale, um PDD und DLB voneinander zu unterscheiden (Lippa et al., 2007). Erwähnenswert ist allerdings, dass LB, welche im Hirnstamm lokalisiert sind, tendenziell mehr fibrilläre Strukturen aufweisen, während kortikal lokalisierte LB eher amorphes Material enthalten (Saito et al., 2003).

Studien zu monogenetischen Parkinson-Syndromen

Ungefähr 10–15 % der Patienten, welche das typische klinische Bild einer PD zeigen, haben eine positive Familienanamnese für eine nach den Mendel-Regeln (autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv) vererbte PD (Gasser, 2007). Mehrere Gene konnten den seltenen monogenetischen Formen familiärer Parkinson-Syndrome zugeordnet werden.

Mutationen im α -Synuclein-Gen (*SNCA*), welches für das gleichnamige Protein kodiert, führen zu einer autosomal-dominanten familiären PD mit frühem Beginn. Bei diesen Familien liegt eine Verdreifachung oder Verdopplung des *SNCA*-Gens vor, was impliziert, dass eine Überexpression von normalem α -Synuclein krankheitsverursachend sein kann (Wright, 2005). Es wird vermutet, dass die aberrierende Aggregation des Proteins zu einer Zellschädigung und schließlich zu einem Untergang der Neuronen führt. Der genaue Mechanismus ist allerdings bis heute nicht richtig verstanden (Pankratz und Foroud, 2007).

Mutationen im leucine-rich repeat kinase 2-Gen (*LRRK2*), das für das gleichnamige

1. Einleitung

Protein kodiert, verursachen ebenfalls eine autosomal-dominant erbliche Form der PD (Pankratz und Foroud, 2007). Es gibt Hinweise, dass LRRK2-Protein aggregieren und Zelleinschlüsse bilden kann (Devine und Lewis, 2008). Wird *LRRK2* in Zellen überexprimiert, kann es Einschlusskörperchen bilden. Diese bilden sich verstärkt, wenn das Protein mutiert ist (Devine und Lewis, 2008). *LRRK2*-Mutationen gelten nach heutigem Wissensstand als die häufigste genetische Ursache autosomal-dominant vererbter PD und spielen wahrscheinlich auch eine Rolle bei der typischen spät auftretenden Erkrankung (Gasser, 2007). Einen Hinweis darauf liefert der Nachweis von LRRK2 in LB von idiopathischen PD-Patienten (Devine und Lewis, 2008).

Mutationen im Parkin-Gen (*PRKN*), welches für das Protein Parkin kodiert, führen zu einer autosomal-rezessiv erblichen PD. Der komplette Verlust von Parkin aufgrund einer homozygoten Deletion im *PRKN*-Gen ist mit einem deutlichen Verlust von dopaminergen Neuronen in der SN und dem Locus coeruleus assoziiert, beachtenswerterweise fehlen i. d. R. allerdings LB (Wright, 2005). Parkin ist eine E3-Typ Ubiquitin-Protein-Ligase, die am Abbau von spezifischen Proteinen, einschließlich α -Synuclein, beteiligt ist. Es wird vermutet, dass Mutationen in *PRKN* diese wichtige E3-Aktivität stören und in einem Verlust der normalen Proteinabbaufunktion resultieren (Pankratz und Foroud, 2007).

Das *DJ-1*-Gen, welches bei einer seltenen autosomal-rezessiv erblichen Form der PD mutiert ist, kodiert für einen weiteren Bestandteil des Ubiquitin-Proteasomen-Systems, das Protein DJ-1. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit oxidativem Stress (Pankratz und Foroud, 2007). Oxidativer Stress wird durch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen, welche physiologischerweise im Rahmen verschiedener Stoffwechselforgänge entstehen, und der Fähigkeit des Körpers, diese zu entgiften oder den daraus resultierenden Schaden zu reparieren, verursacht. Es wird angenommen, dass eine Verbindung zwischen der neuronalen Degeneration bei den LBD und oxidativem Stress besteht (Schulz et al., 2000; Simonian und Coyle, 1996). DJ-1 fungiert normalerweise, sobald es oxidiert wird, als ein Chaperon für Proteine wie α -Synuclein, und beugt dadurch der Fibrillenbildung, Proteinaggregation und Proteinfehlfaltung von α -Synuclein vor (Pankratz und Foroud, 2007). Es ist daher anzunehmen, dass eine Mutation in einem gestörten Ablauf dieser Prozesse resultiert.

Eine weitere seltene autosomal-rezessiv erbliche Form des Parkinson-Syndroms beruht auf Mutationen im Phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1-Gen (*PINK1*). Dieses Gen ist insbesondere im Zusammenhang von PD mit mitochondrialer Dysfunktion und oxidativem Stress interessant, da *PINK1* für eine gleichnamige Proteinkinase kodiert, die v. a. in den Mitochondrien vorkommt (Biskup et al., 2008).

1. Einleitung

Es wird angenommen, dass PINK1 eine Rolle bei der Phosphorylierung von Proteinen spielt. PINK1-Protein könnte dabei Zellproteine, welche das Überleben von Neuronen steuern, entweder direkt phosphorylieren oder an diese binden. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass PINK1 die Parkin-Aktivität moduliert und so neuroprotektiv wirkt (Mills et al., 2008). Mutationen im *PINK1*-Gen könnten diese neuroprotektive Wirkung negativ beeinflussen.

Die häufigste monogenetische Ursache für ein Parkinson-Syndrom sind Mutationen im Glukozerebrosidase-Gen (*GBA*). Es konnte gezeigt werden, dass (je nach Kohorte) 1–33 % der PD-Patienten eine *GBA*-Mutation tragen (Neumann et al., 2009). Heterozygote Mutationsträger des *GBA*-Gens haben ein etwa 6-fach erhöhtes Risiko, an einem Parkinson-Syndrom zu erkranken (Sidransky et al., 2009; Goker-Alpan et al., 2006). Der pathogenetische Zusammenhang ist bis dato unklar. Bekannt ist, dass Mutationen beider Allele zu einer (lysosomalen) Lipidspeicherkrankheit, dem M. Gaucher, führen (Jmoudiak und Futerman, 2005).

Zusammenfassend ergeben sich somit aus den Erkenntnissen von monogenetischen Parkinson-Syndromen Hinweise, dass neben mitochondrialer Dysfunktion, lysosomaler Dysfunktion, Exzitotoxizität und oxidativem Stress auch Proteinfehlfaltung eine wesentliche pathogenetische Rolle spielt.

Studien zu Einzelnukleotid-Polymorphismen

Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) sind genetische Varianten, die durch den Austausch einer einzelnen Nukleotidbase der DNA-Sequenz durch eine andere entstehen. Sie machen ca. 90 % aller genetischen Varianten im menschlichen Genom aus. Es handelt sich um Mutationen, die sich mit einer Häufigkeit von >1 % in einer Population etabliert haben. Aufgrund ihrer Häufigkeit und individuellen Unterschiede definieren SNPs jeden gegebenen DNA-Abschnitt. Die verschiedenen Allele von SNPs sind i. d. R. nicht direkt krankheitsauslösend, sie können allerdings das Erkrankungsrisiko für bestimmte Krankheiten beeinflussen. SNPs werden daher häufig in Assoziationsstudien betrachtet, um die „genetische Suszeptibilität“ und somit ein verändertes Krankheitsrisiko einer Person zu untersuchen. Auch SNPs in nicht-kodierenden Abschnitten der DNA, wie Introns oder Promotor-Regionen, können die Genexpression verändern und sind damit von wissenschaftlichem Interesse. So wurde z. B. berichtet, dass Variationen in der Promotor-Region des *SNCA*-Gens die Suszeptibilität für die PD erhöhen und dass dieser Marker mit einem leicht, aber signifikant erhöhten Erkrankungsrisiko für die PD einhergeht (Pankratz und Foroud, 2007).

1. Einleitung

Im Zusammenhang mit der PD waren funktionale Polymorphismen im Tumornekrosefaktor α - (*TNF- α*) und im Interleukin 1 β - (*IL-1 β*) Gen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert. Bei *TNF- α* und *IL-1 β* handelt es sich um proinflammatorische Zytokine, welche von aktivierten Mikrogliazellen freigesetzt werden (Wersinger und Sidhu, 2006).

Zusammenfassend weisen SNP-Analysen somit auf eine wesentliche Beteiligung von Proteinfehlfaltung und Inflammation an der Entstehung von LBD hin. Die Rolle von Polymorphismen im Butyrylcholinesterase-Gen (*BCHE*) und im Apolipoprotein E-Gen (*APOE*) wird in den Kap. 1.2.3 und 1.3.4 detailliert beschrieben.

Epidemiologische, molekularbiologische und biochemische Studien

Verschiedene epidemiologische, molekularbiologische und biochemische Studien konnten zeigen, dass neben einem cholinergen Defizit und Proteinfehlfaltungsprozessen, die Inflammation eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von LBD spielt (Dubois und Pillon, 1997; Emre, 2004; Gandhi und Wood, 2005; Olanow, 2007; Tiraboschi et al., 2000). Als weitere pathogenetische Faktoren, auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden soll, wurden oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und Exzitotoxizität beschrieben (Gandhi und Wood, 2005; Olanow, 2007).

Cholinerges Defizit Der Ausdruck „cholinerg“ bezeichnet neuronale Signalwege, bei welchen Acetylcholin als Neurotransmitter freigesetzt wird. Dies ist in dem Zusammenhang von Relevanz, als ein cholinerges Defizit eine entscheidende Rolle bei der AD spielt (Frolich, 2002; Lane et al., 2006). Da Demenz eine häufige Begleiterscheinung der LBD ist, wird auch hier als mögliche Ursache eine Abnahme des Neurotransmitters Acetylcholin diskutiert. Tatsächlich weisen PDD- und DLB-Patienten neuropathologisch und bildgebend eine verminderte cholinerge Aktivität auf (Tiraboschi et al., 2000), welche sogar stärker als bei AD-Patienten ausgeprägt ist (Bohnen et al., 2003; Tiraboschi et al., 2000). Patienten mit AD werden seit längerer Zeit erfolgreich mit Cholinesterase-Inhibitoren (ChEI) behandelt, ebenso Patienten mit PDD (Emre et al., 2004). Bemerkenswerterweise besteht jedoch nicht nur bei PDD-Patienten, sondern auch bei PDND-Patienten ein cholinerges Defizit (Bohnen et al., 2006; Hilker et al., 2005). Dieses korreliert mit der Gedächtnis- und Aufmerksamkeitsleistung sowie mit den Exekutivfunktionen (Bohnen et al., 2006).

1. Einleitung

Proteinfehlfaltung und Proteinaggregation Wie bereits oben erwähnt, weisen verschiedene neurodegenerative Krankheiten im Gehirn charakteristische Amyloid-Läsionen auf, welche auf α -Synuclein-Pathologien beruhen. Da diese Krankheiten ähnliche Krankheitsmechanismen teilen, werden sie unter dem Begriff der „ α -Synucleinopathien“ zusammengefasst. Dazu gehören auch die PD und die DLB, bei welchen die α -Synuclein-Aggregate in Form von LB vorliegen. Die „proteolytische Hypothese“ besagt, dass der Neuronenverlust in der SN von PD-Patienten das Resultat einer toxischen Akkumulation von fehlgefalteten und aggregierten Proteinen wie α -Synuclein ist (Whitton, 2007). α -Synuclein wird dabei abnormal nitrirt, phosphoryliert und/oder ubiquitiniert (Trojanowski und Lee, 2003). Wie α -Synuclein-Aggregate auf Neurone des ZNS schädlich wirken, ist noch nicht ganz geklärt. Aufgrund von transgenen Tiermodellen für α -Synuclein wird vermutet, dass LB wahrscheinlich die Funktion bzw. die Lebensfähigkeit der betroffenen Neuronen beeinflussen (Trojanowski und Lee, 2003). α -Synuclein aktiviert Mikroglia, wahrscheinlich indem es durch diese phagozytiert wird (Whitton, 2007). Proteinfehlfaltung und Inflammation sind also nicht als separate Prozesse zu betrachten sondern vermutlich eng miteinander verbunden. Etwa ein Viertel der LBD-Patienten weisen neben LB auch AD-typische Amyloidablagerungen auf ($A\beta$). Für diese Form des Amyloids gelten ähnliche Annahmen (Finder und Glockshuber, 2007; Kar et al., 2004). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Proteinfehlfaltung einen der wesentlichen pathogenetischen Faktoren bei LBD darstellen dürfte.

Inflammation Das Gehirn galt aufgrund seines Schutzes durch die Blut-Hirn-Schranke vor schädlichen Agenzien lange als ein immunprivilegiertes Organ. Im Laufe der Zeit hat sich jedoch gezeigt, dass das Gehirn selbst zu einer Immunantwort imstande ist, welche in einer Schädigung der Wirtszellen resultieren kann. Das Gehirn könnte also anstatt ein besonders immunprivilegiertes, ein besonders vulnerables Organ sein, da es sich bei den Neuronen um postmitotische Zellen handelt, welche im Falle des Zelltods i. d. R. nicht mehr ersetzt werden können (McGeer et al., 2001). Grundsätzlich ist Inflammation eine physiologische Antwort des Körpers, um sich vor schädigenden Einflüssen zu schützen. Allerdings kann sich die Inflammation zu einem unkontrollierten chronischen Prozess entwickeln. Das Ausmaß der Inflammation hängt dabei vom Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren ab. Unter fast allen inflammatorischen Bedingungen erfolgt eine schnelle Hochregulation von MHC Klasse II-Molekülen bei parenchymalen Mikrogliazellen, was vermuten lässt, dass Mikrogliazellen an der Antigenpräsentation beteiligt sind, welche während des inflammatorischen Prozesses stattfindet (McGeer et al., 2001). Mikrogliazellen

1. Einleitung

zählen zu den wichtigsten Vertretern des Immunsystems im Gehirn (Becher et al., 2000). Sie ähneln Makrophagen aus der Körperperipherie und sind zur Phagozytose und zur Antigenpräsentation fähig. Desweiteren besitzen sie zytotoxische Eigenschaften. Bereits bei kleinsten pathologischen Veränderungen im ZNS werden Mikrogliazellen aktiviert. Aktivierte Mikrogliazellen setzen u. a. die inflammatorischen Zytokine IL- 1β und TNF- α frei, wodurch apoptotische Prozesse in dopaminergen Neuronen ausgelöst werden können (Wersinger und Sidhu, 2006). Es konnte nachgewiesen werden, dass inflammatorische Zytokine und Proteasen bei PD-Patienten in verschiedenen Bereichen des Gehirns, insbesondere in der SN, dem Striatum und im Liquor erhöht sind (Wersinger und Sidhu, 2006). Dass fehlgefaltetes α -Synuclein Mikroglia aktiviert (Whitton, 2007), könnte ein Hinweis darauf sein, dass Proteinfehlfaltungsprozesse die Inflammation fördern. Die Tatsache, dass Menschen, welche regelmäßig nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID) einnehmen, ein geringeres Erkrankungsrisiko für PD aufweisen als Menschen, die diese nicht regelmäßig einnehmen, deutet an, dass NSAID eine neuroprotektive Wirkung bei LBD haben könnten (Whitton, 2007).

1.2. Butyrylcholinesterase, Gen (*BCHE*) und Protein (BuChE)

Bei der Butyrylcholinesterase (BuChE; auch Pseudocholinesterase oder nicht-spezifische Cholinesterase genannt) handelt es sich um ein Glykoprotein, welches durch das gleichnamige Gen (*BCHE*) kodiert wird. Die Beobachtung, dass die Applikation des Muskelrelaxans Succinylcholin bei bestimmten Patienten eine stark verlängerte Apnoe verursacht, führte zu Experimenten, die das Vorhandensein verschiedener genetisch bedingter Enzymvarianten der BuChE aufzeigten (Bartels et al., 1992b). Auch heute, viele Jahrzehnte nach den ersten Studien zur Butyrylcholinesterase, hat das wissenschaftliche Interesse nicht nachgelassen. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass die Butyrylcholinesterase eine wichtige Rolle im ZNS spielt. So wird vermutet, dass eine Reduktion der BuChE-Aktivität – entweder durch die Behandlung mit ChEI oder aufgrund einer *BCHE*-Variante mit reduzierter Enzymaktivität – die kognitive Funktion von Patienten mit AD oder LBD beeinflussen kann.

1. Einleitung

1.2.1. Lokalisation und Struktur der Butyrylcholinesterase

Das *BCHE*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 3 (3q26) lokalisiert (Allderdice et al., 1991). Das Gen setzt sich aus vier Exons und drei Introns zusammen. Das Protein BuChE existiert in sechs polymeren Formen, die in die zwei Klassen „kugelförmig“ und „asymmetrisch“ eingeteilt werden können. Die kugelförmigen Formen bestehen aus einer, zwei und vier katalytischen Untereinheiten (G1, G2 und G4), während die asymmetrischen Formen Polymere aus einem, zwei oder drei Tetrameren sind, welche an einen kollagenartigen Schwanz angeheftet sind (A4, A8 und A12) (Massoulié und Bon, 1982).

1.2.2. Vorkommen der Butyrylcholinesterase

Die *BCHE* wird v. a. in der Leber exprimiert und das Proteinprodukt ins Serum sezerniert. Außerdem wird die *BCHE* im Darm, in der Lunge, im Herz, im Muskel und im Gehirn exprimiert. Kleine Mengen finden sich auch im Liquor. Dem Liquor gilt dabei aufgrund seiner engen Verbindung zum Gehirn besonderes Interesse. Die BuChE-Aktivität im Liquor trägt 10–20 % zur gesamten Cholinesterasenaktivität bei (Sirvio et al., 1989), die restlichen 80–90 % deckt die Acetylcholinesterase (AChE) ab. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der BuChE in mehreren ZNS-Regionen (Nucleus caudatus, Nucleus Meynert, SN, Zerebellum, Rückenmark, Hippocampus, temporaler und parietaler Kortex, Fornix) gleichmäßiger verteilt ist als die der AChE (Atack et al., 1986), was eine weiterreichende Funktion des Proteins im ZNS nahelegt. Das Verhältnis zwischen löslichen und membrangebundenen Formen der BuChE ist dabei ausgewogen (Atack et al., 1986). Es ist denkbar, dass sich die löslichen, hydrophilen Formen von den membrangebundenen, amphiphilen Formen bedingt durch ihre speziellen chemischen Eigenschaften auch in ihren Funktionen unterscheiden.

1.2.3. *BCHE*-Gen-Polymorphismen

***BCHE* K-Variante**

Die K-Variante der *BCHE*, benannt zu Ehren Kalows, wurde 1978 im Rahmen von Untersuchungen mit Dibucain durch Rubinstein und Kollegen entdeckt. In den Untersuchungen zeigte sich, dass die *BCHE* K-Variante mit einer um ein Drittel reduzierten Aktivität der BuChE im Serum assoziiert ist (Rubinstein et al., 1978). Ursächlich für

1. Einleitung

den *BCHE*-K-Phänotyp ist eine Punktmutation an der Nukleotidposition 1615 (GCA → ACA), welche zum Austausch der Aminosäure Alanin durch Threonin an Position 539 führt (Bartels et al., 1992a). Mit einer Homozygotenfrequenz von 1.5 % stellt die K-Variante die häufigste *BCHE*-Variante dar.

***BCHE* A-Variante**

Die atypische, Dibucain-resistente Variante der *BCHE* (A-Variante) wird durch eine Punktmutation im Nukleotid 209 verursacht (GAT → GGT). Die Mutation resultiert in einer Substitution von Aspartat durch Glycin als 70. Aminosäure. Wahrscheinlich begründet der Austausch der sauren Aminosäure durch eine neutrale Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms die reduzierte Affinität der atypischen BuChE zu Cholinestern (La Du et al., 1990). Die Homozygotenfrequenz der *BCHE* A-Variante liegt bei etwa 1:3000 bei weißen Nordamerikanern (Kalow und Gunn, 1959).

1.2.4. Physiologische Funktionen der Butyrylcholinesterase

Die BuChE ist eine Serin-Hydrolase, welche die Hydrolyse von Cholinestern katalysiert (Silver, 1974). Strukturell und funktionell ähnelt sie der AChE und hat daher auch die Fähigkeit, Acetylcholin zu spalten. Sie zeichnet sich jedoch dadurch aus, dass sie nicht nur spezifisch Acetylcholinester spaltet (Silver, 1974). Lange Zeit wurde die BuChE als ein unspezifisches, nicht-essentielles Enzym wahrgenommen, während die AChE aufgrund ihrer Spezifität und ihrer Funktion für die cholinerge Neurotransmission im Interesse der Forschung stand. Inzwischen ist die BuChE neben ihrer Funktion in der cholinergen Neurotransmission für die Regulation der zellulären Proliferation und des Neuritenwachstums bekannt (Darvesh et al., 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Neuronenverbände im Verlauf der Entwicklung *BCHE* exprimieren (Darvesh et al., 2003), und dass die Wachstumskegel von Neuriten von Zellen umgeben sind, welche Butyrylcholinesterase exprimieren und produzieren (Layer, 1991).

1.2.5. Butyrylcholinesterase und Neurodegeneration

Butyrylcholinesterase und cholinerges Defizit

In Abwesenheit der AChE kann die BuChE deren Funktionen als Cholinesterase weitgehend kompensieren: Bei AChE-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung cholinergischer Signalwege möglich ist und dass die BuChE die Hydrolyse von Acetylcholinestern katalysieren kann (Mesulam et al., 2002). Für die AD ist die Degeneration des cholinergen Systems des basalen Vorderhirns charakteristisch. Der Verlust von Neuronen, welche normalerweise in hohem Maße Acetylcholin und AChE exprimieren, führt gleichzeitig zu einer Verminderung des Neurotransmitters und seines hydrolysierenden Enzyms. Die BuChE-Aktivität im Bereich des Kortex steigt dahingegen signifikant an und ist mit neuritischen Plaques und Neurofibrillen assoziiert (Darvesh et al., 2003). Interessanterweise ähnelt die molekulare Form der BuChE, welche AD-Patienten exprimieren, jener Form, welche während der Embryonalentwicklung vorliegt, und nicht jener, welche typischerweise im Erwachsenenalter gefunden wird. Die embryonale Form der BuChE ist im zerebralen Kortex von AD-Patienten deutlich erhöht und eine Zunahme dieser BuChE-Form korreliert signifikant positiv mit der Anzahl an Plaques im Kortex dieser Patienten. Folglich ist es denkbar, dass eine Rückartung zu der embryonalen Form der BuChE mit deren veränderten biochemischen Eigenschaften, eine Rolle in diesem neurodegenerativen Prozess spielen könnte (Darvesh et al., 2003).

In einer Studie konnte eine hochsignifikante Assoziation zwischen niedrigeren BuChE-Aktivitätswerten in der grauen Substanz und einer langsameren kognitiven Verschlechterung bei DLB-Patienten nachgewiesen werden. Allerdings waren, im Gegensatz zu AD-Patienten, die BuChE-Aktivitätswerte bei DLB-Patienten gegenüber Kontrollpersonen nicht signifikant erhöht (Perry et al., 2003). Untersuchungen zeigten bei DLB-Patienten eine signifikant erhöhte Anzahl von homozygoten *BCHE* K-Allelträgern gegenüber Kontrollpersonen (Singleton et al., 1998). Besser untersucht ist der Zusammenhang zwischen *BCHE*-Gen-Polymorphismen und klinischen Symptomen bei der AD: Während eine Studie zeigen konnte, dass AD-Patienten mit einem Erkrankungsalter >65 Jahre signifikant häufiger ein *BCHE* K-Allel tragen als gesunde Kontrollpersonen (Lehmann et al., 1997), wiesen andere Studien kein gehäuftes Auftreten des *BCHE* K-Allels bei AD-Patienten gegenüber Kontrollpersonen nach (Alvarez-Arcaya et al., 2000; Singleton et al., 1998).

1. Einleitung

Butyrylcholinesterase und Proteinfehlfaltung/Proteinaggregation

Sowohl bei AD-Patienten als auch bei etwa einem Viertel der LBD-Patienten und der nicht-dementen Älteren finden sich im Hirngewebe $A\beta$ -Ablagerungen (Boller et al., 1980; Braak et al., 2005; Hughes et al., 1993; Mesulam und Geula, 1994; Jellinger et al., 2003; Maetzler et al., 2009). Es ist somit durchaus vorstellbar, dass $A\beta$ v. a. im Zusammenhang mit weiteren fehlgefalteten Proteinen – bei AD mit Neurofibrillenbündeln, bei LBD mit LB – schädlich ist (Maetzler et al., 2009). In den $A\beta$ -Plaques ist eine Aktivität der BuChE nachweisbar, wobei die Areale der $A\beta$ -Ablagerungen, welche die BuChE-Aktivität exprimieren, bei AD-Patienten verhältnismäßig größer als bei altersangepassten nicht-dementen Kontrollpersonen sind. Während in den frühen/benigen Stadien der Plaqueformation die BuChE-Reaktivität auf einen kleinen Teil der Oberfläche der Amyloid-Ablagerungen beschränkt ist, ist sie in fortgeschrittenen Stadien nahezu auf der kompletten Oberfläche nachweisbar (Mesulam und Geula, 1994). Die BuChE-Aktivität korreliert signifikant und positiv mit der Entwicklung der kennzeichnenden kortikalen und neokortikalen amyloidreichen neuritischen Plaques und Neurofibrillen (Das, 2007). Daher erscheint es möglich, dass die BuChE an der Maturation der Amyloid-Plaques von der diffusen Form in die kompakte, pathologische Form beteiligt ist (Darvesh et al., 2003). Eine Studie, welche die Amyloid-Fibrillenbildung *in vitro* untersuchte, konnte demonstrieren, dass die BuChE die Fibrillenbildung abschwächt: Die Zeitdauer bis zur Fibrillenbildung verlängerte sich und die Geschwindigkeit der Fibrillenbildung verlangsamt sich (Diamant et al., 2006). Diese Kenntnisse legen einerseits den Schluss nahe, dass die BuChE AD-typische Proteinfehlfaltungsprozesse bei LBD beeinflusst, was etwa ein Viertel der LBD-Patienten betreffen würde (Boller et al., 1980; Braak et al., 2005; Hughes et al., 1993; Jellinger et al., 2003; Maetzler et al., 2009), andererseits aber auch, dass die BuChE prinzipiell die Fähigkeit hat, Proteinfehlfaltung zu beeinflussen und damit auch einen Einfluss auf alle LBD-assoziierten Proteinfehlfaltungsprozesse haben könnte.

Butyrylcholinesterase und Inflammation

Verschiedene Laborparameter weisen darauf hin, dass bei AD eine geringgradige systemische Entzündung vorliegt (Das, 2007). Interessanterweise hemmt Acetylcholin, das Substrat der BuChE, die Synthese und Freisetzung von $TNF-\alpha$ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und zeigt somit eine antiinflammatorische Wirkung (Das, 2007). AD-Patienten weisen eine Verringerung des Neurotransmitters Acetylcholin und seines hydrolysierenden Enzyms AChE auf (Darvesh et al., 2003). Dahingegen nimmt die

1. Einleitung

BuChE-Aktivität mit dem Fortschreiten der AD zu (Das, 2007). Erhöhte Enzymaktivitäten von AChE und BuChE führen zu erniedrigten Spiegeln von Acetylcholin, wodurch dessen antiinflammatorische Wirkung abnimmt. Auch PD-Patienten weisen ein cholinerges Defizit auf, die Freisetzung von TNF- α kann daher vermutlich nur unzureichend durch Acetylcholin verhindert werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass apoptotische Prozesse in dopaminergen Neuronen, die durch TNF- α ausgelöst werden (Wersinger und Sidhu, 2006), nicht unterbunden werden können.

1.3. Apolipoprotein E, Gen (*APOE*) und Protein (ApoE)

1.3.1. Lokalisation und Struktur des Apolipoproteins E

Das Apolipoprotein E (*APOE*) ist im humanen Genom auf dem langen Arm des Chromosoms 19 (19q13.2) lokalisiert. Es enthält vier Exons, welche für das 299 Aminosäuren lange Protein kodieren, und drei Introns.

1.3.2. Vorkommen des Apolipoproteins E

ApoE ist ein weit verbreitetes Cholesterin-Transportprotein, das vor allem in der Leber, aber auch in der Milz, den Nieren und im Gehirn synthetisiert wird. Es ist das wichtigste Apolipoprotein des ZNS, wo es von Gliazellen, Makrophagen und Neuronen synthetisiert wird (Bedlack et al., 2000). Auch im PNS kommt ApoE vor. Dort erfolgt die Produktion durch Schwann-Zellen, Ganglien-Satellitenzellen und Makrophagen (Bedlack et al., 2000).

1.3.3. Physiologie und Pathophysiologie des Apolipoproteins E

ApoE ist Bestandteil von Lipoproteinen im Blut. Es spielt eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel, insbesondere in der Entfernung atherogener Überbleibsel von triglyzeridreichen Lipoproteinen (Mahley, 1988), aber auch im Bereich der Immunabwehr: ApoE bindet Lipid-Antigene und setzt sie über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus in CD1-haltige, endosomale Kompartimente von Antigen-präsentierenden Zellen frei, wodurch eine Aktivierung von T-Zellen erfolgt (van den Elzen et al., 2005). Zudem scheint ApoE eine wichtige Rolle im ZNS zu spielen: Abhängig von der Isoform stimuliert ApoE entweder das Aussprossen von Neuriten oder inhibiert dieses (Huang,

1. Einleitung

2006). ApoE nimmt Lipide auf, welche bei neuronaler Degeneration entstehen, und verteilt sie an diejenigen Zellen, die Lipide zur Proliferation, zur Membranreparatur oder zur Remyelinisierung neuer Axone benötigen (Huang, 2006).

1.3.4. Apolipoprotein E-Gen-Polymorphismen

Drei Allele ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$) kodieren für die Isoformen *APOE2*, *APOE3* und *APOE4*. Es existieren drei homozygote (*APOE* $\epsilon 2/2$, *APOE* $\epsilon 3/3$, *APOE* $\epsilon 4/4$) und drei heterozygote Phänotypen (*APOE* $\epsilon 2/3$, *APOE* $\epsilon 2/4$, *APOE* $\epsilon 3/4$). Die drei Isoformen unterscheiden sich durch den Austausch der Aminosäuren 112 und 158. *APOE2* besitzt an beiden Positionen Cystein, *APOE3* an Position 112 Cystein und an Position 158 Arginin, *APOE4* besitzt an beiden Positionen Arginin (Rall et al., 1982; Weisgraber et al., 1981). *APOE3* ist die häufigste („Wildtyp“) Isoform. Neben diesen Hauptvarianten wurden ca. 30 weitere Varianten beschrieben (de Knijff et al., 1994). Das *APOE* $\epsilon 4$ -Allel konnte als der wichtigste monogenetische Risikofaktor für AD identifiziert werden (Corder et al., 1993).

1.3.5. Apolipoprotein E und Neurodegeneration

Seit das *APOE* $\epsilon 4$ -Allel als Suszeptibilitätsgen für AD mit spätem Beginn identifiziert wurde (Strittmatter et al., 1993), wurden in zahlreichen Studien die *APOE*-Genotypen von AD-Patienten untersucht. Es zeigte sich, dass das *APOE* $\epsilon 4$ -Allel sowohl bei sporadischen AD-Fällen als auch bei familiären AD-Fällen gehäuft vorliegt (Corder et al., 1993; Deniz-Naranjo et al., 2007; Piccardi et al., 2007). In beiden Gruppen wurde das Vorhandensein eines Gen-Dosis-Effekts beobachtet. Jedes vorhandene *APOE* $\epsilon 4$ -Allel führt zu einem früheren Beginn des histopathologischen Prozesses (Corder et al., 1998; Richard und Amouyel, 2001). Der *APOE*-Polymorphismus ist sowohl mit der Plaque-Last als auch mit der Bildung von Neurofibrillen assoziiert (Corder et al., 1998; Huang, 2006).

Basierend auf diesen Ergebnissen und der Tatsache, dass AD und LBD beide altersabhängige Krankheiten mit vielen gemeinsamen Eigenschaften sind – beide Erkrankungen sind Amyloidosen, beide Erkrankungen weisen ein cholinerges Defizit und eine aktivierte Entzündungsreaktion auf –, stellte sich die Frage, inwiefern das *APOE* $\epsilon 4$ -Allel auch einen Risikofaktor für den Formenkreis der LBD darstellt. Verschiedene Studien haben die Assoziation zwischen dem *APOE* $\epsilon 4$ -Allel und einer Demenz bei PD untersucht und auch nach einem möglichen Zusammenhang zwi-

1. Einleitung

schen dem *APOE* ϵ 4-Allel und der PD an sich geforscht. Die Ergebnisse der Studien fielen dabei sehr unterschiedlich aus: Während Li und Kollegen keine Assoziation zwischen dem *APOE* ϵ 4-Allel und dem Risiko an PD mit kognitiver Verschlechterung zu erkranken feststellen konnten (Li et al., 2004), stand das *APOE* ϵ 4-Allel bei Pankratz und Kollegen mit einem signifikant erhöhten Risiko im Rahmen der PD an Demenz zu erkranken in Zusammenhang (Pankratz et al., 2006). Weitere Studien wiesen nach, dass das *APOE* ϵ 4-Allel bei PDD-Patienten signifikant häufiger als bei gesunden Kontrollpersonen vorliegt (Parsian et al., 2002), dass sich jedoch PDND-Patienten und PDD-Patienten hinsichtlich der Allelhäufigkeit nicht signifikant unterscheiden (Jasinska-Myga et al., 2007). Während einige Studien demonstrierten, dass das *APOE* ϵ 4-Allel sowohl mit dem Risiko an PD zu erkranken (Li et al., 2004) als auch mit einem jüngeren Erkrankungsalter assoziiert ist (Li et al., 2004; Pankratz et al., 2006), war in einer anderen Studie das *APOE* ϵ 4-Allel nicht mit dem Erkrankungsalter bei PD assoziiert (Parsian et al., 2002). In einer PET-Untersuchung der im Rahmen der vorliegenden Studie genetisch charakterisierten Patienten konnte gezeigt werden, dass LBD-Patienten mit zumindest einem *APOE* ϵ 4-Allel signifikant häufiger kortikale $A\beta$ -Ablagerungen haben (Maetzler et al., 2009).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass zumindest bei einem Teil der LBD-Patienten ein Zusammenhang zwischen dem *APOE*-Genotyp und klinischen Symptomen (z. B. einer Demenz) besteht, dass dieser mit den derzeitigen diagnostischen Möglichkeiten jedoch nicht sicher detektiert werden kann.

1.4. Apolipoprotein E und Butyrylcholinesterase

In der Literatur wird v. a. in Zusammenhang mit der AD diskutiert, inwiefern das gleichzeitige Vorliegen eines *APOE* ϵ 4-Allels und verschiedener *BCHE*-Genvarianten neuropathologische Vorgänge gegenüber dem singulären Vorliegen entweder einer *BCHE*-Variante oder eines *APOE* ϵ 4-Allels verstärken könnte. Diese Fragestellung muss aufgrund der ähnlichen neuropathologischen und biochemischen Aspekte auch für die LBD als relevant angesehen werden. Während einige Studien keinen Zusammenhang zwischen der *BCHE* K-Variante, dem *APOE* ϵ 4-Allel und der AD finden konnten (Alvarez-Arcaya et al., 2000; Singleton et al., 1998), konnte eine andere Studie nachweisen, dass Personen mit der Kombination aus *BCHE*-Wildtyp und *APOE* ϵ 4-Allel ein erhöhtes Risiko haben, an AD zu erkranken (Mattila et al., 2000). Andere Studien beschrieben, dass die Kombination aus *BCHE* K-Variante und *APOE* ϵ 4-Allel mit einem höheren Erkrankungsrisiko für AD assoziiert ist (Lehmann et al., 2000; Til-

1. Einleitung

ley et al., 1999). Es ist somit noch nicht abschließend geklärt, aber wahrscheinlich, dass das kombinierte Vorliegen eines *APOE* ϵ 4-Allels und eines *BCHE* K-Allels ein erhöhtes Risiko für neuropathologische Vorgänge wie sie z. B. bei der AD, aber bis zu einem gewissen Grad auch bei der LBD, vorkommen, darstellt.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Für diese Arbeit wurden bei LBD-Patienten und gesunden Kontrollpersonen die Aktivität der BuChE im Liquor und Serum, der *BCHE*-Genotyp und der *APOE*-Genotyp bestimmt.

Folgende Leitfragen sollten bei der Auswertung bearbeitet werden:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen der BuChE-Aktivität im Liquor/Serum und klinischen Symptomen (vorrangig motorisch/kognitiv)?
2. Sind die untersuchten genetischen Varianten bzw. deren kombiniertes Vorliegen mit der BuChE-Aktivität assoziiert?
3. Stehen die untersuchten genetischen Varianten im Bezug zu klinischen Symptomen?

2. Studienkollektiv, Material und Methoden

Für die Bestimmung der genetischen Varianten von *BCHE* und *APOE* sowie der BuChE-Aktivität in Liquor und Serum wurde auf die Biobank des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung in Tübingen zurückgegriffen. Die Aufgaben der Promovendin bestanden in der Rekrutierung weiterer Patienten für die bereits bestehende LBD-Kohorte, der Genotypisierung sowie der Bestimmung der BuChE-Aktivität. Für die Rekrutierung der Patienten wurden diese zunächst telefonisch kontaktiert, über den Ablauf der Studie informiert und um eine Teilnahme an der Studie gebeten. Abhängig von ihrer Mobilität und ihrem Gesundheitszustand wurden die Patienten zu einem Untersuchungstermin nach Tübingen eingeladen oder um ihre Einwilligung zu einer Blutabnahme durch den behandelnden Hausarzt gebeten. Waren die Patienten mit einer hausärztlichen Blutabnahme einverstanden, wurde die Bereitschaft der Hausärzte zur Mitarbeit am Telefon erfragt und nach deren Zustimmung die entsprechenden Röhrchen zusammen mit Aufklärungsbögen und frankierten Versandtaschen verschickt. Die Methoden zur Genotypisierung werden in Kap. 2.4.2 und Kap. 2.4.4 beschrieben, die BuChE-Aktivitätsbestimmung in Kap. 2.4.3 erläutert.

2.1. Studienkollektiv

Als Basis für diese Arbeit wurde ein Kollektiv von Patienten und Kontrollpersonen nach den unten beschriebenen Auswahlkriterien zusammengestellt. Alle Teilnehmer wurden von der Station und der Ambulanz der Abteilung für Neurologie am Universitätsklinikum Tübingen rekrutiert. Sie wurden über die Studie aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät Tübingen genehmigte die Studie.

Zunächst wurde bei den Teilnehmern eine Anamnese erhoben, bevor sie neurologisch und neuropsychologisch untersucht wurden. Die Diagnose wurde von erfahrenen Ärzten der Abteilung für Neurodegeneration der Universität Tübingen gestellt. Insgesamt wurden 117 Patienten und 31 Kontrollen in die Studie eingeschlossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich Patienten und Kontrollpersonen hinsichtlich Geschlecht und Alter nicht signifikant voneinander unterscheiden.

2. Studienkollektiv, Material und Methoden

2.1.1. Patienten

Die Charakterisierung der Patienten erfolgte nach den aktuell geltenden Diagnosekriterien. Alle PD-Patienten erfüllten die UKPDS Brain Bank Kriterien (Gibb und Lees, 1988). PDD-Patienten erfüllten zudem die DSM-IV Kriterien für Demenz (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV, Amerikanische Psychiatrische Vereinigung). Patienten mit einer DLB wurden nach den McKeith Kriterien für die klinische Diagnose einer wahrscheinlichen DLB identifiziert (McKeith et al., 2005).

Von den insgesamt 117 in die Studie eingeschlossenen Patienten hatten 55 Patienten eine PDND, 37 Patienten eine PDD und 25 Patienten eine DLB.

2.1.2. Kontrollen

In die Kontrollgruppe wurden 31 Personen aufgenommen. Zum Ausschluss aus der Kontrollgruppe führte der V.a. primär degenerative, entzündliche oder maligne Erkrankungen des ZNS.

Die Indikationen, die bei den Kontrollpersonen zur Lumbalpunktion führten, lauteten im Einzelnen: V.a. Blutung (8), Bandscheibenprolaps (13), funktionell, d.h. Patienten, bei denen eine somatische Erkrankung ausgeschlossen wurde (7), Kopfschmerzen (1) und Polyneuropathie (2).

2.2. DNA-, Liquor- und Serumgewinnung

2.2.1. DNA

Zur Aufnahme in die Biobank wurden Patienten und Kontrollen 2x9 ml EDTA-Blut durch Venenpunktion zur DNA-Isolierung entnommen. Die DNA-Isolierung erfolgte nach standardisierten Protokollen im Rahmen der Routinetätigkeit (abgeändert nach Miller et al. (1988)) am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in Tübingen. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt. Für die Experimente dieser Studie wurde die DNA auf eine Konzentration von 10 ng/ μ l eingestellt.

2.2.2. Liquor

Die Liquorgewinnung wurde nach standardisierten Protokollen durchgeführt. Die Lumbalpunktion erfolgte zwischen 8:00 und 10:00 Uhr morgens und die Studienteilnehmer wurden gebeten, hierzu nüchtern zu erscheinen. Nach der Liquorgewinnung wurden die Proben innerhalb von 30 min zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Für die Studie wurden nur Proben von Patienten und Kontrollen verwendet, welche normale Routine-Liquorwerte (Leukozytenzahl $<4 \times 10^6$, IgG-Index Liquor/Serum <0.6) und keinen Hinweis auf eine intrathekale IgG-Synthese zeigten. Die Routine-Liquorwerte (Albumin, IgG, Zellzahl, Zytologie) unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Untergruppen. Die routinemäßig im chemischen Labor der Neurologie durchgeführte Bestimmung der $A\beta_{42}$ -Konzentration im Liquor erfolgte mit ELISA-Kits der Firma Innogenetics NV.

2.2.3. Serum

Die Serumentnahme wurde in einer Sitzung mit der Liquorentnahme durchgeführt. Die Zentrifugation und Aliquotierung erfolgte ebenfalls nach etablierten Protokollen im Rahmen der Routineaufarbeitung. Im Anschluss wurden die Seren bei -80°C eingefroren.

2.3. Material

2.3.1. Chemikalien und Enzyme

Für diese Arbeit wurden die in Tab. B.1 auf S. 79 aufgelisteten Chemikalien und Enzyme eingesetzt.

2.3.2. Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

2. Studienkollektiv, Material und Methoden

Bromphenolblaumarker

20 ml Glycerol

0,04 ml Bromphenolblau

0,04 g Xylencynol

10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

108 g TrisBase

55 g Borat

40 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)

mit doppelt destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

Als Laufpuffer und für das Agarosegel wurde 0,5x TBE-Puffer eingesetzt.

0,1 M K_2HPO_4 , pH 8,0

1,7418 g K_2HPO_4

100 ml H_2O

pH mit 30%iger H_3PO_4 einstellen.

0,1 M NaH_2PO_4 , pH 7,0

1,3799 g NaH_2PO_4

100 ml H_2O

pH mit 1 N NaOH einstellen.

5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)

13 mg 3,3 mM DTNB

10 ml 0,1 M NaH_2PO_4 , pH 7,0

15 mg $NaHCO_3$

pH 7,0 mit 1 N NaOH einstellen.

2. Studienkollektiv, Material und Methoden

Acetylthiocholinjodid (ATCHJ; Substrat) 5,6 mM

16,2 mg Acetylthiocholinjodid (M = 289,2 g/mol)
10 ml 0,1 M K_2HPO_4 .

BW 284c51 (selektiver AChE-Inhibitor) 5,6 mM

15,86 mg BW 284c51 (M = 566,4 g/mol)
5 ml 0,1 M K_2HPO_4 pH 8,0.

Eserine (AChE- und BuChE-Inhibitor) 5,6 mM

9,08 mg Eserine (M = 324,4 g/mol)
5 ml 0,1 M K_2HPO_4 pH 8,0.

2.3.3. Referenzsequenzen

Die Referenzsequenzen für humane *BCHE* (NM_000055) und humanes *APOE* (NM_000041) wurden von UCSC unter der Internetadresse <http://genome.ucsc.edu/> bezogen. Die Sequenzen sind in Tab. B.2 auf S. 80, Tab. B.3 auf S. 81 und Tab. B.4 auf S. 82 dargestellt.

2.3.4. Oligonukleotide (Primer)

Die Primer wurden mithilfe der Primer-Design-Software Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) ausgewählt. Die gewünschten Primer wurden von der Firma Metabion GmbH synthetisiert. Tab. B.5 auf S. 83 zeigt die Sequenzen der Primer, welche zur *BCHE*- und *APOE*-Genotypisierung eingesetzt wurden.

2.3.5. DNA-Größenstandard

Als DNA-Größenstandard wurde eine 100 bp DNA-Leiter verwendet.

2.3.6. Geräte und Hilfsmittel, Verbrauchsmaterialien

Die für diese Arbeit verwendeten Geräte und Hilfsmittel sind in Tab. B.6 auf S. 84, die Verbrauchsmaterialien in Tab. B.7 auf S. 84 aufgelistet.

2.4. Methoden

Es war nicht möglich von allen Patienten und Kontrollpersonen DNA, Liquor und Serum für die im Folgenden beschriebenen Experimente einzusetzen, da nicht von allen Proben ausreichend große Volumina vorhanden waren. Dies liegt darin begründet, dass die Probenentnahme für die Tübinger DNA-, Liquor-, und Serumbank über mehrere Jahre erfolgte und laufend fortgesetzt wird und die Proben einiger Probanden z.T. bereits für andere Studien eingesetzt wurden. In diesen Fällen wurden nur diejenigen Untersuchungen durchgeführt, für die das entsprechende Material vorhanden war, es sei denn, die Patienten waren mit einer erneuten Probenentnahme einverstanden. Für die einzelnen Bestimmungen ergaben sich folgende Fallzahlen: BuChE-Aktivität im Liquor (LBD: 111 (PDND: 53; PDD: 34; DLB: 24); Kontrollen: 28), BuChE-Aktivität im Serum (LBD: 110 (PDND: 53; PDD: 35; DLB: 22); Kontrollen: 24), *BCHE*- und *APOE*-Genotypisierung (LBD: 86 (PDND: 44; PDD: 26; DLB: 16); Kontrollen: 31).

2.4.1. Standardmethoden

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) erlaubt es, bestimmte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen. Als Material benötigt man doppelsträngige, genomische DNA, ein passendes Primerpaar, Puffer, Nukleotide, eine thermostabile DNA-Polymerase sowie $MgCl_2$. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang durch Erhöhung der Temperatur auf $94\text{ }^\circ\text{C}$ in zwei Einzelstränge aufgeteilt (Denaturierung), welche im Folgenden als Matrizen dienen. Im zweiten, sog. Annealingschritt wird die Temperatur auf ca. $55\text{ }^\circ\text{C}$ gesenkt, sodass sich die Primer spezifisch anlagern können. Bei den Primern handelt es sich um zwei aus etwa 15–25 Basen bestehende Oligonukleotide, die zu den beiden Einzelsträngen der DNA komplementär sind. Die genaue Annealingtemperatur hängt von der Länge und Sequenz der Primer ab. Die hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend vom 3'-Ende der Primer je einen neuen DNA-Strang, indem sie den fehlenden Strang mit den Desoxynukleotiden dATP, dCTP, dGTP und dTTP auffüllt. So entstehen neue DNA-Doppelstränge. Für diesen Elongationsschritt wählt man eine Temperatur von $72\text{ }^\circ\text{C}$, bei welcher das Temperaturoptimum der hitzestabilen Taq-Polymerase liegt. Indem die Primer so gewählt werden, dass einer am *sense*-Strang und der andere am *antisense*-Strang bindet, kann gezielt die Länge des gewünschten DNA-Fragments bestimmt werden. Die jeweils gebildeten DNA-Produkte dienen selbst als Matrize in

2. Studienkollektiv, Material und Methoden

den weiteren Zyklen. Durch mehrfache Wiederholung der drei Zyklusschritte Denaturierung, Annealing und Elongation, ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA. In der Regel wird die Reaktionsabfolge 30–40 mal wiederholt.

In dieser Arbeit wurde die PCR zum einen für die *BCHE*-Genotypisierung, zum anderen für die *APOE*-Genotypisierung verwendet. Abb. A.1 auf S. 68 zeigt den Ablauf einer PCR.

Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente entsprechend ihrer Ladung in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb, durch das die verschiedenen DNA-Moleküle mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist dabei abhängig von ihrer Größe, der Beschaffenheit des Gels, vom pH-Wert des Trenngels und des Laufpuffers sowie von der angelegten Spannung. Da die DNA aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen ist, wandern die Moleküle im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Dem Agarosegel wird der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und emittiert nach Anregung durch UV-Licht Licht im orange-roten Bereich. Auf diese Weise können die DNA-Banden im Gel sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die verschiedenen Experimente Agarosegele unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Sie werden im Verlauf näher beschrieben.

2.4.2. SNaPshot-Genotypisierung der *BCHE*-SNPs

Die SNaPshot-Reaktion ist eine Einzelbasenextension, welche der Genotypisierung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) dient. SNPs sind Variationen von einzelnen Basenpaaren in einem DNA-Strang. Definitionsgemäß kommen SNPs mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % in der jeweiligen Population vor. Sie machen etwa 90 % der genetischen Unterschiede zwischen Individuen aus (s. Kap. 1.1.3). Mit der Einzelbasenextension kann bestimmt werden, welche Basen und damit welcher Genotyp in den untersuchten Proben jeweils vorliegt. Innerhalb des menschlichen Genoms konnten bisher zahlreiche SNPs identifiziert werden: Bereits im Jahr 2000 wurde eine Genkarte mit 1.42 Millionen SNPs veröffentlicht (Sachidanandam et al., 2001).

2. Studienkollektiv, Material und Methoden

Im Mittelpunkt der SNaPshot-Reaktion steht die sog. SNaPshot-PCR. Für diese PCR werden die Primer so gewählt, dass sie sich an einen spezifischen Bereich der DNA anlagern und genau eine Base vor dem SNP enden. Da für jeden SNP unterschiedlich lange SNP-Primer gewählt werden, können mehrere SNPs gleichzeitig in einer SNaPshot-Reaktion untersucht werden. Zur Primerverlängerung werden Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) eingesetzt, wodurch die Primer lediglich um eine Base verlängert werden. Den ddNTPs fehlt im Gegensatz zu den in der Natur vorkommenden dNTPs am 3'-Kohlenstoff-Atom die Hydroxylgruppe, an die normalerweise das nächste Nukleotid angeknüpft wird. Der Strang kann daher nicht weiter verlängert werden, es kommt zum Kettenabbruch. Anhand der Fluoreszenzmarkierung der ddNTPs, denen jeweils eine Farbe zugeordnet ist, kann bestimmt werden, mit welcher Base die neu synthetisierten DNA-Fragmente enden. Die SNaPshot-Fragmente werden hierfür im Sequenzierer kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Die fluoreszenzmarkierten Basen zeigen sich an den größen-spezifischen Positionen und können so den unterschiedlichen Polymorphismen zugeordnet werden. Eine schematische Darstellung der SNaPshot-Methode bietet Abb. A.2 auf S. 69.

Das SNaPshot-Verfahren läuft in mehreren Schritten ab:

1. PCR
2. Gelelektrophorese
3. Aufreinigung
4. SNaPshot-Reaktion
5. Post-Extensionsbehandlung
6. Elektrophorese im Sequenzierer

Die einzelnen Schritte sollen im Folgenden anhand der SNPs, welche in dieser Arbeit genotypisiert wurden, erläutert werden.

PCR

Zur Vorbereitung der SNaPshot-Reaktion wurde zunächst eine PCR durchgeführt, um die DNA-Abschnitte, welche die SNPs *BCHE* K-Variante (rs1803274) und *BCHE* A-Variante (rs1799807) enthielten, zu amplifizieren. Für beide SNPs wurde jeweils eine PCR mit eigenen Primern (*BCHE* A Forward/Reverse bzw. *BCHE* K Forward/Reverse) angesetzt.

In Tab. B.8 auf S. 85 ist der PCR-Ansatz beschrieben.

2. Studienkollektiv, Material und Methoden

Bei jeder PCR-Platte wurde als Negativkontrolle für eine Probe H₂O anstelle von DNA eingesetzt, um Verunreinigungen des PCR-Ansatzes auszuschließen.

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll im Thermo-Cycler durchgeführt:

1. 94 °C – 5 min.
2. 94 °C – 30 s.
3. 60 °C – 30 s.
4. 72 °C – 30 s.
5. Schritt 2–4 insgesamt 35 Zyklen.
6. 72 °C – 10 min.
7. 12 °C dauerhaft.

Das PCR-Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Gelelektrophorese

Um zu prüfen, ob die gewünschten DNA-Abschnitte in ausreichender Menge vervielfältigt worden waren und keine Verunreinigungen des PCR-Produkts vorlagen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde ein 1%iges Agarosegel durch Aufkochen der Agarose in 0,5x TBE-Puffer hergestellt. Vor Gießen des Agarosegels in die entsprechenden Schlitten wurde diesem Ethidiumbromid 1%ig in einer Konzentration von 5 µl Ethidiumbromid pro 200 ml Puffer hinzugefügt, um später die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar machen zu können. Für die Gelelektrophorese wurden je 4 µl des PCR-Produkts mit 1 µl Bromphenolblaumarker vermischt und anschließend in die Taschen des Gels hineinpipettiert. Der Bromphenolblaumarker ermöglicht es, die Lauffront am Gel zu verfolgen und enthält Glycerol, welches die Dichte der DNA erhöht, und so ein Herausdiffundieren der DNA aus den Geltaschen verhindert. Um die Größen der DNA-Fragmente korrekt bestimmen zu können, wurde in eine der Taschen eine 100 bp-Leiter als Größenstandard aufgetragen. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE-Puffer. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V über einen Zeitraum von 20–30 min durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Banden mit einer digitalen Fotodokumentationsanlage visualisiert und dokumentiert.

Aufreinigung

Nach Durchführung der PCR lag die DNA in einer Lösung mit nicht verbrauchten Primern, dNTPs, Enzymen und Puffern vor. Um diejenigen Bestandteile, die für die eigentliche SNaPshot-Reaktion störend waren, zu entfernen, wurde ein Verdau durchgeführt. Durch Zugabe der Enzyme „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP) 1 U/ μ l und Exonuclease I (Exo I) 2 U/ μ l wurden Primer und dNTPs zersetzt und so das PCR-Produkt gereinigt. Für die Aufreinigung wurden die PCR-Produkte beider SNPs (*BCHE* A- und K-Variante) in einen gemeinsamen Ansatz zusammengeführt. Tab. B.9 auf S. 85 stellt den Ansatz für die Aufreinigung dar.

Der Reaktionsansatz wurde im Thermo-Cycler bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme bei einer Temperatur von 75 °C über 15 min inaktiviert. Das gereinigte Produkt wurde bis zur Durchführung des nächsten Arbeitsschrittes bei 4 °C gelagert.

SNaPshot-Reaktion

Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte folgte in diesem Schritt die eigentliche SNaPshot-Reaktion, bei der das aufgereinigte PCR-Amplifikat, spezifische Primer und der SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix eingesetzt wurden. Im SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix sind ddNTPs, eine DNA-Polymerase und Puffer enthalten. Der genaue Reaktionsansatz ist in Tab. B.10 auf S. 85 beschrieben.

Für die SNaPshot-Reaktion wurde folgendes Programm im Thermo-Cycler verwendet:

1. 94 °C – 1 min.
2. 96 °C – 10 s.
3. 50 °C – 5 s.
4. 60 °C – 30 s.
5. Schritt 2–4 insgesamt 25 Zyklen.
6. 12 °C dauerhaft.

Auf diese Weise wurden die SNaPshot-Primer um genau eine fluoreszenzmarkierte Base verlängert.

Post-Extensionsbehandlung

In diesem Schritt erfolgte eine erneute Aufreinigung des PCR-Produktes. Durch Zugabe von 1 μl SAP 1 U/ μl zu 10 μl des SNaPshot-PCR-Produkts wurden die überschüssigen ddNTPs entfernt, um Störeffekte bei der Kapillarelektrophorese zu vermeiden. Der Reaktionsansatz wurde im Thermo-Cycler bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei einer Temperatur von 75 °C über 15 min inaktiviert. Das gereinigte Produkt wurde bis zur Durchführung des nächsten Arbeitsschrittes bei 4 °C gelagert.

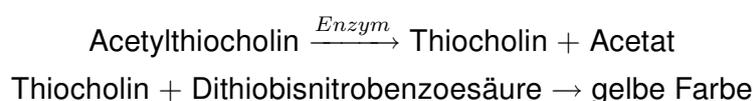
Elektrophorese im Sequenzierer

In diesem letzten Schritt wurden die SNaPshot-Fragmente im Abi Prism 3100 Genetic Analyzer kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurde je 1 μl des aufgereinigten SNaPshot-PCR-Produkts 1:20 mit Wasser verdünnt und mit 10 μl Formamid und 0,2 μl LIZ-Standard auf eine zur Sequenzierung geeignete Platte aufgetragen. Die Daten wurden mithilfe der Gene Mapper v3.5 Software analysiert und die Genotypen visuell der entsprechenden Farbkodierung zugeordnet. Eine Negativkontrolle wurde ebenfalls analysiert, um Verunreinigungen ausschließen zu können. Abb. A.3 auf S. 70 zeigt exemplarisch die Auswertung mehrerer Proben.

2.4.3. Bestimmung der BuChE-Aktivität

Die BuChE-Aktivität in Liquor und Serum wurde mit der kolorimetrischen Methode nach Ellman et al. (1961) bestimmt. Die Kolorimetrie ist ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von farbigen gelösten Stoffen. Der Gehalt an gelöster Substanz wird dabei über die Lichtabsorption der Lösung bestimmt. Man misst bei diesem Verfahren die Intensität eines Lichtstrahls einer definierten Wellenlänge vor und nach Passieren der Lösung. Die Farbigkeit der Lösung wird dabei mit einer Standardlösung definierter Konzentration verglichen. Die Farbe der Lösung muss daher in direktem Zusammenhang mit ihrer Konzentration stehen. Das gemessene Ergebnis ist die Extinktion.

Die Methode nach Ellman beruht auf folgender Reaktion:



2. Studienkollektiv, Material und Methoden

ATCHJ wird durch die Cholinesterasen in Thiocholin und Acetat gespalten. Thiocholin reagiert im Folgenden mit dem Ellman-Reagenz (DTNB = 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure), wobei das gelbe Anion der 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure entsteht. Im Photometer wird dabei die Extinktionsänderung gemessen.

Für die Bestimmung der BuChE-Aktivität von Patienten und Kontrollen wurde der Liquor unverdünnt, das Serum in einer Verdünnung von 1:10 mit H₂O eingesetzt. Dabei wurden pro Probe jeweils drei verschiedene Ansätze gemacht (s. Tab. B.11 auf S. 86 und Tab. B.12 auf S. 86): Der erste Ansatz enthielt keinerlei Hemmstoff und ermöglichte es, die Gesamtaktivität der Cholinesterasen im Liquor bzw. Serum zu messen. Dem zweiten Ansatz wurde der selektive AChE-Inhibitor BW 284c51 hinzugefügt, um die Aktivität der BuChE bestimmen zu können. Der dritte Ansatz wurde mit dem nicht-selektiven ChEI Eserine durchgeführt, welcher AChE und BuChE hemmt. Auf diese Weise konnte die Restaktivität, welche weder der Aktivität der AChE noch der Aktivität der BuChE zugeordnet werden konnte, bestimmt werden. Dieser „Blank“-Wert wurde von den Messwerten der beiden anderen Ansätze jeweils abgezogen. Um möglichst genaue Messwerte zu erhalten und eventuelle Messfehler aufzuspüren, wurde pro Ansatz jeweils eine Dreifachmessung durchgeführt und aus diesen drei Werten der Mittelwert berechnet. Um einen Vergleichsstandard zu haben und Auffälligkeiten bei den verschiedenen Messreihen zu detektieren, wurde bei jeder Platte eine Messreihe mit einem Standard-Liquor bzw. Standard-Serum durchgeführt. Hierfür wurden die Proben eines Normaldruckhydrozephalus-Patienten verwendet. Als Negativkontrolle wurde H₂O anstelle von Liquor bzw. Serum eingesetzt. Die Proben wurden für die Messungen auf Mikrotiterplatten (655 101) der Firma Greiner aufgetragen. Die Reagenzien wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Vor der Zugabe des Substrats wurde der bis dahin pipettierte Ansatz 2 min auf dem Micromix gemischt. Anschließend wurde das ATCHJ hinzugefügt und die Messung nach nochmaligem kurzen Schütteln im Kolorimeter sofort gestartet. Die Extinktionsänderung wurde über einen Zeitraum von 20 min in einem Intervall von jeweils 4 min bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der TECAN-Software easy-WIN kinetics E 5.0a. Aus der so bestimmten Extinktionsänderung wurde die *absolute* Aktivität der BuChE in U/l im Serum bzw. im Liquor berechnet. Diese wird im weiteren Verlauf der Arbeit aus Gründen der besseren Lesbarkeit nur mit BuChE-Aktivität bezeichnet.

2.4.4. Bestimmung des *APOE*-Genotyps

Das Gen für *APOE* beinhaltet zwei Polymorphismen an den Codonpositionen 112 und 158. Bei beiden Polymorphismen kommt es zum Austausch der Aminosäure Cystein durch Arginin. Hieraus resultieren die drei Allele $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$. Das $\epsilon 2$ -Allel weist sowohl an Position 112 als auch an Position 158 seiner Aminosäuresequenz Cystein auf (Cys¹¹²; Cys¹⁵⁸), das $\epsilon 3$ -Allel besitzt an Position 112 Cystein und an Position 158 Arginin (Cys¹¹²; Arg¹⁵⁸), während das $\epsilon 4$ -Allel an beiden Positionen Arginin besitzt (Arg¹¹²; Arg¹⁵⁸). Hieraus resultieren drei homozygote ($\epsilon 2/2$, $\epsilon 3/3$, $\epsilon 4/4$) und drei heterozygote Genotypen ($\epsilon 2/3$, $\epsilon 2/4$, $\epsilon 3/4$).

Zur Bestimmung des *APOE*-Genotyps wurde eine Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) durchgeführt. Bei RFLPs handelt es sich um Größenunterschiede von DNA-Fragmenten, die entstehen, wenn die DNA verschiedener Individuen mit demselben, spezifischen Restriktionsenzym geschnitten wird. Die unterschiedliche Größe der DNA-Fragmente liegt darin begründet, dass verschiedene Individuen bedingt durch DNA-Varianten mehr oder weniger spezifische Erkennungssequenzen und damit Schnittstellen für ein Restriktionsenzym aufweisen. Abhängig von der Anzahl an Schnittstellen entstehen unterschiedlich viele Fragmente verschiedener Längen. Diese DNA-Fragmente können mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die jeweiligen Allele anhand des Bandenmusters bestimmt werden.

Für die *APOE*-Genotypisierung wurde in dieser Arbeit das Restriktionsenzym Hha I eingesetzt. Hha I erkennt die Sequenz „GCGC“. Die Schnittstellen und die Längen der einzelnen Fragmente, welche sich dadurch für die amplifizierten Sequenzen ergeben, sind in Abb. A.4 auf S. 70 zu sehen. Eine exemplarische Darstellung des charakteristischen Bandenmusters, welches sich in der Gelelektrophorese zeigt, liefert Abb. A.5 auf S. 71.

Die Genotypisierung wurde mittels einer früher beschriebenen Methode nach Hixson und Vernier (1990) durchgeführt. Die vier Einzelschritte des Verfahrens sollen im Verlauf näher beschrieben werden.

1. PCR
2. Gelelektrophorese
3. Restriktionsverdau
4. Gelelektrophorese

PCR

Im ersten Schritt wurde der DNA-Abschnitt, welcher die beiden Polymorphismen enthielt, mittels PCR amplifiziert. Die DNA wurde in einer Konzentration von 10 ng/ μ l eingesetzt. Der PCR-Ansatz ist in Tab. B.13 auf S. 87 zu sehen.

Die Reaktion fand nach unten stehendem Programm im Thermo-Cycler statt.

1. 94 °C – 5 min.
2. 94 °C – 30 s.
3. 60 °C – 30 s.
4. 72 °C – 30 s.
5. Schritt 2–4 insgesamt 40 Zyklen.
6. 72 °C – 10 min.
7. 12 °C dauerhaft.

Gelelektrophorese

Um zu prüfen, ob die gewünschten DNA-Abschnitte in ausreichender Menge amplifiziert worden waren, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Um eventuelle Verunreinigungen aufzuspüren, wurde auch eine „amplifizierte“ Negativkontrolle, welche H₂O anstelle von DNA enthielt, auf das Gel aufgetragen. Es wurde ein Agarosegel in einer Konzentration von 1% verwendet, welches Ethidiumbromid enthielt. Die Herstellung des Gels wurde bereits in Kap. 2.4.2 auf S. 33 beschrieben. In die Taschen des Gels wurden 3,5 μ l des 100 bp-Größenstandards sowie jeweils 4 μ l des amplifizierten PCR-Produkts aufgetragen. In diesem Fall war kein Blaumarker erforderlich, da die PCR bereits mit grünem Puffer durchgeführt wurde. Die Laufzeit des Gels betrug 20–30 min bei einer Spannung von 100 V. Die Visualisierung und Dokumentation der DNA-Banden erfolgte mit der digitalen Fotodokumentationsanlage.

Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurde das Restriktionsenzym Hha I eingesetzt, welches aus dem Bakterium *Haemophilus haemolyticus* gewonnen wird. Tab. B.14 auf S. 87 zeigt den Reaktionsansatz.

2. Studienkollektiv, Material und Methoden

Die Reaktion erfolgte im Thermo-Cycler. Der Ansatz wurde zunächst für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde das Enzym bei 80 °C für 20 min deaktiviert, bevor das Produkt bis zur Durchführung des nächsten Schrittes bei 12 °C gelagert wurde.

Gelelektrophorese

Um das Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten aufzutrennen, welches durch den Restriktionsverdau gewonnen wurde und somit den *APOE*-Genotyp von Patienten und Kontrollpersonen zu bestimmen, wurde erneut eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für diese wurde ein mit Ethidiumbromid versetztes 4%iges Agarosegel hergestellt. Die deutlich höhere Agarosekonzentration war notwendig, um eine schärfere Darstellung der Banden zu ermöglichen. Diese war hier ausdrücklich gewünscht, um später die Größe der DNA-Fragmente exakt bestimmen zu können.

Für die Gelelektrophorese wurden in die Taschen des Gels 15 μ l des PCR-Produkts eingebracht. Zur Größenidentifizierung der DNA-Fragmente wurden in eine Tasche 3,5 μ l des 100 bp Standards hineinpipettiert. An das Gel wurde eine Spannung von 200 V angelegt und die Banden ab einer Laufzeit von 30 min in 15-minütigen Abständen bis zu einer Laufzeit von 105 min mithilfe der Fotodokumentationsanlage sichtbar gemacht und betrachtet. Anschließend erfolgte die visuelle Zuordnung der Banden zu den entsprechenden Genotypen. Abb. A.6 auf S. 71 zeigt ein entsprechendes Gel.

Sequenzierung

Zur Bestätigung der oben beschriebenen „visuellen“ Methode wurden einzelne Proben nach der Methode nach Sanger et al. (1977) sequenziert. Im Reaktionsansatz für dieses Verfahren sind neben einer DNA-Polymerase und dNTPs auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthalten. Die DNA-Polymerase verlängert einen neuen DNA-Strang nur solange bis es durch Einbau eines ddNTPs anstelle eines dNTPs zum Kettenabbruch kommt. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte, welche alle möglichen Längen der DNA-Vorlage haben, werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. In dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung kapillarelektrophoretisch mit dem Abi Prism 3100 Genetic Analyzer. Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde zunächst eine PCR (Ansatz s. Tab. B.13 auf S. 87) mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Fällung mit Ethanol. Das PCR-Produkt (Volumen 20 μ l) wurde dafür mit 48 μ l Ethanol 100 % sowie 2 μ l Natriumacetat vermischt und anschließend in der Zentrifuge bei 3220 g für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, dem Rest wurden 100 μ l Ethanol 70% beigemischt. Dieser Ansatz wurde

2. Studienkollektiv, Material und Methoden

über einen Zeitraum von 15 min bei 3220 g zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und das Produkt mit 100 μl Ethanol 70% versetzt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 3220 g. Noch einmal wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Produkt umgedreht 1 min bei 600 g zur vollständigen Entfernung des Ethanols zentrifugiert. Anschließend wurde es in 15 μl H₂O gelöst und für 30 min geschüttelt. Dann wurde eine PCR mit dem in Tab. B.15 auf S. 87 dargestellten Ansatz durchgeführt.

Folgendes Programm wurde für die PCR im Thermo-Cycler durchgeführt:

1. 94 °C – 1 min.
2. 94 °C – 10 s.
3. 50 °C – 5 s.
4. 60 °C – 4 min.
5. Schritt 2–4 insgesamt 30 Zyklen.
6. 12 °C dauerhaft.

Danach wurde eine erneute Ethanolfällung durchgeführt. Zuletzt wurden 7 μl der Probe und 15 μl Formamid auf eine zur Sequenzierung geeignete Platte aufgetragen und die Sequenzierung durchgeführt. Die Daten wurden mithilfe der Software Staden Package analysiert.

2.4.5. Statistische Testverfahren

Die statistische Auswertung erfolgte mit der JMP Software Version 7.0 (SAS International Inc.). Um der Tatsache gerecht zu werden, dass mehrere Parameter, wie die BuChE-Aktivität im Liquor bzw. Serum und der MMST nicht normalverteilt sind, wurden für die Auswertung nicht-parametrische Testverfahren (Kruskal-Wallis-Test, Spearman-Rangkorrelationskoeffizient sowie Wilcoxon-Rangsummen-Test) eingesetzt. In der statistischen Beschreibung werden Mediane und Spannweiten angegeben (in Boxplot-Darstellungen zusätzlich Quartile). Für kategoriale Daten wurden Kontingenztafeln erstellt. Zur Berechnung der Signifikanz wurden der exakte Test nach Fisher (2x2 Tafeln) bzw. der Pearson-Chi-Quadrat-Test (>2x2 Tafeln) durchgeführt. Confounder-Effekte wurden mit der Spearman-Partialkorrelation ausgewertet. Korrelationen wurden mittels einfacher Regressionsgeraden graphisch dargestellt. Signifikanztests erfolgten zweiseitig. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt. Da Männer im Gesamtkollektiv signifikant höhere BuChE-Aktivitätswerte im Liquor

2. Studienkollektiv, Material und Methoden

als Frauen aufwiesen, wurden bei der Auswertung die Liquor-Aktivitätswerte stets getrennt für Männer und Frauen untersucht. Für die Serum-BuChE-Aktivität wurde eine Alterskorrektur durchgeführt, da die BuChE-Aktivität im Serum im Gesamtkollektiv signifikant mit steigendem Lebensalter abnahm.

3. Ergebnisse

3.1. Alters- und Geschlechterverteilung in den untersuchten Gruppen

Da die Aussagekraft einer Fall-Kontroll-Studie im Wesentlichen davon abhängt, ob die untersuchten Personengruppen vergleichbar sind und sich nur hinsichtlich des Merkmals unterscheiden, welches anhand der Studie untersucht werden soll, wurden das LBD-Kollektiv (PDND, PDD, DLB) und die Kontrollgruppe auf ihre Strukturgleichheit überprüft. Sowohl im Bezug auf das Alter (Abb. A.7 auf S. 72) als auch im Bezug auf das Geschlecht (Exakter Test nach Fisher, $p=1.0$) wichen die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander ab. Einen Überblick über die demographischen und klinischen Daten, die im Rahmen dieser Studie bei LBD-Patienten und Kontrollen erhoben wurden, liefert Tab. B.16 auf S. 88.

3.2. BuChE-Aktivität in Beziehung zu Geschlecht und Alter

3.2.1. BuChE-Aktivität im Liquor

Männer der LBD- und Kontrollgruppe wiesen im Liquor signifikant höhere BuChE-Aktivitätswerte als Frauen beider Gruppen auf (Abb. A.8 auf S. 72, Tab. B.17 auf S. 88). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der BuChE-Aktivität im Liquor und dem Alter im Gesamtkollektiv festgestellt werden (Tab. B.18 auf S. 89).

3.2.2. BuChE-Aktivität im Serum

Im Serum war kein geschlechtsspezifischer Unterschied für die BuChE-Aktivität im Gesamtkollektiv nachweisbar (Tab. B.17 auf S. 88). Die BuChE-Aktivität nahm signifikant mit steigendem Lebensalter ab (Abb. A.9 auf S. 73, Tab. B.18 auf S. 89).

3.3. BuChE-Aktivität: Vergleich der LBD-Gruppe mit der Kontrollgruppe

3.3.1. LBD-Patienten versus Kontrollen: BuChE-Aktivität im Liquor

LBD-Patienten und Kontrollen unterschieden sich nicht signifikant im Hinblick auf die BuChE-Aktivität im Liquor (Abb. A.10 auf S. 73, Tab. B.19 auf S. 89). Da Männer bei der Untersuchung der BuChE-Aktivität im Kollektiv der beiden Gruppen signifikant höhere Werte aufwiesen (s. Kap. 3.2 auf S. 42), wurden die Aktivitätswerte beim Vergleich von LBD-Patienten und Kontrollen ebenfalls getrennt für das Geschlecht untersucht. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied war nicht nachweisbar (Tab. B.19 auf S. 89).

3.3.2. LBD-Patienten versus Kontrollen: BuChE-Aktivität im Serum

Bezüglich der BuChE-Aktivität im Serum unterschieden sich LBD-Gruppe und Kontrollgruppe nicht signifikant (Abb. A.11 auf S. 74, Tab. B.19 auf S. 89).

3.4. BuChE-Aktivität innerhalb der LBD

Innerhalb der LBD-Patienten wurden verschiedene Krankheitsparameter erhoben und deren Zusammenhang zur BuChE-Aktivität analysiert.

3.4.1. LBD-Patienten: BuChE-Aktivität im Liquor

BuChE-Aktivität im Liquor und Parkinson-Syndrom

Zunächst wurde überprüft, ob die BuChE-Aktivität im Liquor mit dem Erkrankungsalter für Parkinson bei LBD-Patienten korreliert. Hierfür zeigte sich kein Zusammenhang (Tab. B.20 auf S. 90). In der getrennten Analyse für Männer und Frauen war der Trend erkennbar, dass höhere BuChE-Aktivitätswerte im Liquor bei Männern mit einem jüngeren Erkrankungsalter einhergehen (Tab. B.20 auf S. 90). Bei Frauen war

3. Ergebnisse

dieser Trend nicht vorhanden (Tab. B.20 auf S. 90). Höhere BuChE-Aktivitätswerte im Liquor wiesen auf eine tendenziell länger andauernde Parkinson-Erkrankung hin, wobei sich dieser Trend nur in der gesamtgeschlechtlichen, doch nicht in der geschlechtsspezifischen Untersuchung zeigte (Tab. B.20 auf S. 90). Die Liquor-BuChE-Aktivitätswerte korrelierten nicht mit dem Hoehn & Yahr-Stadium bei PDND- und PDD-Patienten (Tab. B.20 auf S. 90).

BuChE-Aktivität im Liquor und Demenz

Beim Vergleich von dementen (PDD und DLB) mit nicht-dementen (PDND) LBD-Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die BuChE-Aktivität im Liquor (Tab. B.21 auf S. 91). PDD- und PDND-Patienten unterschieden sich nicht hinsichtlich der BuChE-Aktivität im Liquor (Tab. B.21 auf S. 91). Die BuChE-Aktivität im Liquor korrelierte weder mit dem Erkrankungsalter für Demenz (Tab. B.22 auf S. 91), noch mit der Dauer der Demenz bei PDD- und DLB-Patienten (Tab. B.22 auf S. 91), noch mit dem MMST in der LBD-Gruppe (Tab. B.22 auf S. 91). Bei LBD-Kranken korrelierten die BuChE-Aktivitätswerte im Liquor tendenziell positiv mit den $A\beta_{42}$ -Werten im Liquor (Abb. A.12 auf S. 74, Tab. B.22 auf S. 91).

3.4.2. LBD-Patienten: BuChE-Aktivität im Serum

BuChE-Aktivität im Serum und Parkinson-Syndrom

Es zeigte sich eine signifikant negative Korrelation zwischen der BuChE-Aktivität im Serum und dem Erkrankungsalter für Parkinson (Abb. A.13 auf S. 75, Tab. B.20 auf S. 90). Nach der Alterskorrektur (Partialkorrektur nach Spearman), die notwendig war, da im vorliegenden Kollektiv der Serumspiegel mit zunehmendem Alter abnahm (s. Kap. 3.2 auf S. 42), war dieser Effekt nicht länger nachweisbar.

Die BuChE-Aktivitätswerte im Serum korrelierten nicht mit der Dauer der Parkinson-Erkrankung (Tab. B.20 auf S. 90). Zwischen den BuChE-Aktivitätswerten im Serum und dem Hoehn & Yahr-Stadium (PDND und PDD) zeigte sich ein signifikant negativer Zusammenhang (Abb. A.14 auf S. 75, Tab. B.20 auf S. 90). Dieser war nach der Alterskorrektur nicht mehr vorhanden.

3. Ergebnisse

BuChE-Aktivität im Serum und Demenz

Beim Vergleich von dementen (PDD und DLB) mit nicht-dementen (PDND) LBD-Patienten zeigten sich im Serum tendenziell niedrigere BuChE-Aktivitätswerte für demente als für nicht-demente LBD-Patienten (Tab. B.21 auf S. 91). PDD-Patienten wiesen im Serum tendenziell niedrigere BuChE-Aktivitätswerte auf als PDND-Patienten (Tab. B.21 auf S. 91). Bei PDD- und DLB-Patienten korrelierte die BuChE-Aktivität im Serum weder mit dem Erkrankungsalter für Demenz (Tab. B.22 auf S. 91) noch mit der Dauer der Demenz (Tab. B.22 auf S. 91). Bei LBD-Patienten zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der BuChE-Aktivität im Serum und dem MMST (Abb. A.15 auf S. 76, Tab. B.22 auf S. 91). Dieser Effekt war auch nach Alterskorrektur sichtbar. Kein Zusammenhang war zwischen der Serum-BuChE-Aktivität und dem A β 42-Gehalt im Liquor bei LBD-Patienten feststellbar (Tab. B.22 auf S. 91).

3.5. BCHE-Genotyp und Klinik

Einen Überblick über die Verteilung der untersuchten *BCHE*-Varianten im LBD- und Kontrollkollektiv liefert Tab. B.23 auf S. 92.

3.5.1. BCHE K-Variante und Klinik

***BCHE* K-Variante und Parkinson-Syndrom**

Zuerst wurde die Verteilung der *BCHE* K-Variante bei LBD-Patienten und Kontrollpersonen analysiert (Tab. B.23 auf S. 92). Dabei zeigte sich keine Assoziation des *BCHE* K-Allels mit einer LBD ($p=0.61$). Das *BCHE* K-Allel war weder mit dem Erkrankungsalter (Tab. B.24 auf S. 92) noch mit der Dauer der Parkinson-Krankheit verknüpft (Tab. B.24 auf S. 92). Weiter bestand keine Assoziation mit dem Krankheitsstadium nach Hoehn & Yahr (Tab. B.24 auf S. 92).

***BCHE* K-Variante und Demenz**

Der *BCHE* K-Polymorphismus war nicht mit dem Vorliegen einer Demenz bei LBD-Patienten ($n=86$) assoziiert (Pearson-Chi-Quadrat-Test, $p=0.71$). Bei dementen LBD-Patienten (PDD, DLB) war das *BCHE* K-Allel weder mit dem Erkrankungsalter für

3. Ergebnisse

Demenz (Tab. B.24 auf S. 92), noch mit der Dauer der Demenz assoziiert (Tab. B.24 auf S. 92). Es zeigte sich keine Assoziation zwischen dem *BCHE* K-Allel und dem MMST bei allen LBD-Patienten (Tab. B.24 auf S. 92).

3.5.2. *BCHE* A-Variante und Klinik

Da sich bei der Auswertung der *BCHE*-SNaPshot-Reaktion zeigte, dass lediglich eine sehr kleine Anzahl der Patienten und Kontrollpersonen Träger des *BCHE* A-Allels waren (n=5), wurden für die A-Variante keine weiteren statistischen Berechnungen durchgeführt. Detaillierte Informationen zur Verteilung der *BCHE* A-Variante zeigt Tab. B.23 auf S. 92.

3.6. *BCHE*-Genotyp und BuChE-Aktivität

Einen Überblick über die Verteilung der untersuchten *BCHE*-Varianten im LBD- und Kontrollkollektiv gibt Tab. B.23 auf S. 92.

3.6.1. *BCHE* K-Variante und BuChE-Aktivität

BCHE K-Variante und BuChE-Aktivität im Liquor

Es zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen dem *BCHE* K-Allel und der BuChE-Aktivität im Liquor im Gesamtkollektiv (Tab. B.25 auf S. 93). Bei getrennter Untersuchung von LBD-Patienten und Kontrollen war kein Zusammenhang zwischen dem *BCHE* K-Allel und der BuChE-Aktivität im Liquor nachweisbar (Tab. B.25 auf S. 93).

BCHE K-Variante und BuChE-Aktivität im Serum

Bei der Betrachtung der BuChE-Aktivität im Serum im Gesamtkollektiv zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der *BCHE* K-Variante und der Höhe der BuChE-Aktivität. Träger mindestens eines K-Allels wiesen eine signifikant niedrigere BuChE-Aktivität im Serum auf als homozygote Träger des Wildtyp-Allels (Abb. A.16 auf S. 76, Tab. B.25 auf S. 93). Dieser Zusammenhang war auch bei der getrennten Analyse von LBD-Patienten und Kontrollpersonen signifikant (Tab. B.25 auf S. 93).

3.6.2. *BCHE* A-Variante und BuChE-Aktivität

Aufgrund der geringen Zahl von Trägern des *BCHE* A-Allels (n=5) wurde für die *BCHE* A-Variante keine weitere Statistik berechnet. Details zur Verteilung der *BCHE* A-Variante sind in Tab. B.23 auf S. 92 dargestellt.

3.7. *APOE*-Genotyp und BuChE-Aktivität

3.7.1. *APOE*-Genotyp und BuChE-Aktivität im Liquor

Bei der Untersuchung, ob sich Träger und Nichtträger des *APOE* ϵ 4-Allels im Gesamtkollektiv hinsichtlich ihrer BuChE-Aktivität im Liquor unterscheiden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Tab. B.26 auf S. 93). In der getrennten Analyse für LBD-Patienten und Kontrollen korrelierte das *APOE* ϵ 4-Allel nicht mit der BuChE-Aktivität im Liquor (Tab. B.26 auf S. 93).

3.7.2. *APOE*-Genotyp und BuChE-Aktivität im Serum

Im Kollektiv von LBD-Patienten und Kontrollpersonen war kein signifikanter Unterschied zwischen Trägern und Nichtträgern des *APOE* ϵ 4-Allels bezüglich der BuChE-Aktivität im Serum zu sehen (Tab. B.26 auf S. 93). Bei der getrennten Untersuchung von LBD-Patienten und Kontrollgruppe war kein signifikanter Unterschied nachweisbar (Tab. B.26 auf S. 93).

3.8. *BCHE*-Genotyp, *APOE*-Genotyp und Demenz

Die Kombination aus dem Vorliegen der *BCHE* K-Variante und eines *APOE* ϵ 4-Allels lieferte keinen Hinweis auf ein erhöhtes Demenzrisiko bei LBD (Exakter Test nach Fisher, $p=0.57$). Bei den untersuchten LBD-Patienten war kein signifikanter Zusammenhang zwischen der *BCHE* K-Variante, einem *APOE* ϵ 4-Allel und dem MMST ersichtlich (Abb. A.17 auf S. 77).

3.9. *APOE*-Genotyp, $A\beta_{42}$ und Demenz

Bei der Untersuchung, ob das *APOE* $\epsilon 4$ -Allel mit einem erhöhten Demenzrisiko bei LBD einhergeht, zeigte sich keine Assoziation (Exakter Test nach Fisher, $p=1.00$). Das Vorliegen von mindestens einem *APOE* $\epsilon 4$ -Allel stand bei LBD-Patienten in Zusammenhang mit dem $A\beta_{42}$ -Gehalt des Liquors. Träger des *APOE* $\epsilon 4$ -Allels wiesen signifikant niedrigere Werte als Nichtträger auf (Abb. A.18 auf S. 77). Bei LBD-Patienten korrelierte der $A\beta_{42}$ -Gehalt im Liquor signifikant positiv mit dem MMST (Abb. A.19 auf S. 78). Kein signifikanter Zusammenhang konnte zwischen dem *APOE* $\epsilon 4$ -Allel und dem MMST nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für die Betrachtung des Gesamtkollektivs (Tab. B.27 auf S. 94), als auch für die separate Untersuchung der LBD-Gruppe (Abb. A.20 auf S. 78, Tab. B.27 auf S. 94).

4. Diskussion

Obwohl AD und LBD ähnliche pathogenetische Aspekte aufweisen, wie Amyloidablagerungen und ein cholinerges Defizit, und obwohl ein Einfluss der Butyrylcholinesterase auf die AD angenommen wird, so ist die Rolle dieses Gens und seines gleichnamigen Proteins für die Pathologie der LBD noch relativ unbekannt. Einen Hinweis darauf, dass eine veränderte BuChE-Aktivität eine Rolle im Krankheitsprozess der LBD spielt, liefern klinische Studien. Diese konnten zeigen, dass Patienten mit PDD – gleichermaßen wie Patienten mit AD – von einer Behandlung mit ChEI profitieren (Darreh-Shori, 2006; Emre et al., 2004), welche neben dem Enzym AChE auch die BuChE hemmen und so den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin verlangsamen.

Um die Bedeutung der Butyrylcholinesterase für die LBD zu beleuchten, wurde in der vorliegenden Arbeit bei dementen (PDD und DLB) sowie nicht dementen (PDND) LBD-Patienten und bei gesunden Kontrollpersonen die BuChE-Aktivität in Liquor und Serum untersucht und die *BCHE* K- und A-Variante bestimmt. Weiter wurde eine *APOE*-Genotypisierung der Studienteilnehmer durchgeführt und die in der Routinemessung erhobenen $A\beta_{42}$ -Werte im Liquor berücksichtigt.

Im Folgenden werden zunächst die allgemeinen, die Epidemiologie betreffenden Ergebnisse diskutiert, daran anschließend erfolgt die Erörterung der Zusammenhänge von BuChE-Aktivität und klinischen Symptomen, von genetischen Varianten und deren Einfluss auf die BuChE-Aktivität sowie von genetischen Varianten und deren Bedeutung für die klinische Symptomatik.

4.1. BuChE-Aktivität: generelle Beobachtungen

4.1.1. BuChE-Aktivität im Liquor

Im vorliegenden Gesamtkollektiv wiesen Männer signifikant höhere Liquor-BuChE-Aktivitätswerte auf als Frauen ($p=0.007$). Zu dem gleichen Ergebnis kam eine Studie an AD-Patienten, welche bei Männern eine durchschnittlich 23 % höhere BuChE-Aktivität im Liquor ($p<0.03$) als bei Frauen nachwies (Darreh-Shori et al., 2006). Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, als dass AD und PD zwar viele Gemeinsamkeiten aufweisen, dass jedoch bei der AD in den meisten epidemiologischen Studien das weibliche Geschlecht als ein Risikofaktor beschrieben wurde (Darreh-Shori et al.,

4. Diskussion

2006), wohingegen von der PD Männer häufiger als Frauen betroffen sind (Taylor et al., 2007).

Mesulam und Geula zeigten, dass die BuChE an AD-Amyloidplaques bindet und dass Amyloidplaques im Gehirn von AD-Patienten gehäuft im Vergleich zu nicht-dementen, älteren Menschen vorkommen. Sie stellten die Hypothese auf, dass die BuChE an der Transformation von „benignen“ Plaques zu pathogenen Strukturen beteiligt ist (Mesulam und Geula, 1994).

Eine andere Arbeit demonstrierte, dass bei AD-Patienten eine niedrigere BuChE-Aktivität im Liquor mit schlechteren Resultaten in kognitiven Tests einhergeht (Darreh-Shori et al., 2006). Es wird vermutet, dass die niedrigere Liquor-BuChE-Aktivität auf einer Aufnahme des Enzyms in neuritische Plaques beruht, welche bei AD-Patienten mit einer schlechteren kognitiven Leistung in größerem Ausmaß vorhanden sind (Darreh-Shori et al., 2006).

Unsere Arbeitsgruppe konnte mittels einer PET-Studie zeigen, dass mehr weibliche als männliche LBD-Patienten AD-typische Veränderungen aufweisen (Maetzler et al., 2009). Vor diesem Hintergrund erscheint die erniedrigte BuChE-Aktivität im Liquor bei weiblichen LBD-Patienten stimmig. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass die BuChE-Aktivität im Liquor bei den LBD insgesamt einen geringeren Einfluss auf die (AD-typischen) Amyloidplaques als bei der AD hat, da Männer häufiger an der PD erkranken als Frauen (Taylor et al., 2007).

Es wäre ferner denkbar, dass die geschlechtsabhängige Höhe der BuChE-Aktivität im Liquor auf einer Mitregulation durch Geschlechtshormone beruht. Für diese Annahme spricht einerseits die unterschiedlich hohe Prävalenz der PD bei Männern und Frauen (Taylor et al., 2007), andererseits die Tatsache, dass Östrogene als neuroprotektiv gelten: Es konnte gezeigt werden, dass Östrogene protektive Effekte auf neuronale Zellen (in Zellkulturen) ausüben, die vermutlich zumindest teilweise auf die Fähigkeit der Östrogene zurückzuführen sind, die Produktion freier Radikale und/oder deren Wirkung auf Zellen zu beeinflussen (Markou et al., 2005).

Im vorliegenden Kollektiv war kein Zusammenhang zwischen der BuChE-Aktivität im Liquor und dem Alter nachweisbar. Auch Studien, welche eine Stichprobe von gesunden Personen bzw. ein Kollektiv aus PDND- und PDD-Patienten untersuchten, konnten keine Korrelation zwischen der Höhe der Liquor-BuChE-Aktivität und dem Alter der Studienteilnehmer nachweisen (Atack et al., 1988; Sirvio et al., 1987).

4.1.2. BuChE-Aktivität im Serum

Die BuChE-Aktivität im Serum nahm in der vorliegenden Untersuchung signifikant mit steigendem Lebensalter ab. Eine kroatische Studie, welche die BuChE-Aktivität im Serum bei 3239 gesunden Schulkindern und Erwachsenen untersuchte, beobachtete ebenfalls eine Abnahme der Serum-BuChE-Aktivität im Alter (Flegar-Mestric et al., 1999). Diese Ergebnisse deuten auf eine Altersabhängigkeit der BuChE-Aktivität im Serum hin. Mögliche Gründe für diese Abnahme der Serum-BuChE-Aktivität könnten eine reduzierte Expression der *BCHE* in der Peripherie im Alter sein bedingt durch niedrige zentrale Acetylcholin-Spiegel oder eine abnehmende Syntheseleistung der Zellen, welche die BuChE produzieren.

In der vorliegenden Arbeit war kein geschlechtsspezifischer Unterschied für die BuChE-Aktivität im Serum im Gesamtkollektiv nachweisbar. Anders in der erwähnten kroatischen Studie: Dort wurden bei erwachsenen Frauen signifikant niedrigere Serum-BuChE-Aktivitätswerte als bei erwachsenen Männern beschrieben. Allerdings näherten sich die Serum-BuChE-Aktivitätswerte bei Frauen >50 Jahren denen der männlichen Studienteilnehmer an (Flegar-Mestric et al., 1999). Da das Durchschnittsalter des hier untersuchten Gesamtkollektivs mit 68.7 Jahren deutlich höher lag als bei der erwähnten Studie, sind die Ergebnisse vergleichbar.

4.1.3. BuChE-Aktivität von Liquor und Serum im Vergleich

In der vorliegenden Arbeit waren die BuChE-Aktivität im Liquor und Serum nicht gleichermaßen abhängig von Geschlecht und Alter: Während sich die BuChE-Aktivität im Liquor als altersunabhängig erwies, nahm die BuChE-Aktivität im Serum signifikant mit steigendem Lebensalter ab. Dahingegen war der geschlechtsspezifische Unterschied nur im Liquor, jedoch nicht im Serum nachweisbar. Dies könnte darauf hinweisen, dass die periphere und zentrale BuChE-Aktivität unterschiedlich und voneinander unabhängig reguliert werden und daher auch unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Im Hinblick auf den Einsatz von ChEI zur Therapie der Demenz könnte somit neben der unterschiedlichen Selektivität der ChEI für AChE und BuChE auch eine unterschiedliche Selektivität der ChEI für die zentrale bzw. periphere BuChE eine bedeutende Rolle spielen.

Es gilt allerdings zu berücksichtigen, dass die relativ geringe Fallzahl die Einschätzung der Ergebnisse für die Untergruppen erschwert, und dass daher größere Studien zu deren Bestätigung durchgeführt werden sollten.

4.2. BuChE-Aktivität: Vergleich der LBD-Gruppe mit der Kontrollgruppe

4.2.1. LBD-Patienten versus Kontrollen: BuChE-Aktivität im Liquor

LBD-Patienten und Kontrollen unterschieden sich nicht signifikant im Hinblick auf die BuChE-Aktivität im Liquor. Mit der Einschränkung, dass das Liquorkompartiment zwar das nächste Kompartiment an den Nervenzellen ist, welches am lebenden Menschen untersucht werden kann, aber eine genaue Abbildung der neuronalen Prozesse damit natürlich nicht möglich ist, spricht dieses Ergebnis gegen einen ausgeprägten Einfluss der BuChE-Aktivität im Liquor auf die LBD. Entsprechende Ergebnisse finden sich in der Literatur für den Vergleich von PD-Patienten und Kontrollpersonen (Ruberg et al., 1986; Sirvio et al., 1987). Dabei gilt es jedoch zu klären, ob diese Aussage als allgemeingültig für alle LBD angesehen werden kann, oder ob eventuell einzelne Untergruppen von LBD-Patienten eine veränderte Liquor-BuChE-Aktivität aufweisen (die gesonderte Betrachtung der LBD-Patienten erfolgt in Kap. 4.3). Ein besonderes Augenmerk sollte dabei LBD-Patienten mit Demenz geschenkt werden, da nachgewiesen werden konnte, dass das cholinerge Defizit bei dieser Patientengruppe sogar stärker als bei AD-Patienten ausgeprägt ist (Bohnen et al., 2003; Tiraboschi et al., 2000).

Vorausgegangene Fall-Kontroll-Studien mit AD-Patienten lieferten unterschiedliche Ergebnisse: Während eine Studie keine signifikant unterschiedlichen Aktivitätswerte für AD-Patienten und Kontrollpersonen nachwies (Atack et al., 1988), wurden in anderen Studien sowohl tendenziell höhere BuChE-Aktivitätswerte im Liquor bei AD-Patienten als bei gesunden Kontrollen ermittelt (Arendt et al., 1984), als auch signifikant niedrigere BuChE-Aktivitätswerte im Liquor bei AD-Patienten gegenüber Kontrollpersonen beschrieben (Appleyard et al., 1987; Szilagyi et al., 1987).

In der vorliegenden Studie ergab auch die geschlechtsspezifische Analyse keinen signifikanten Unterschied der BuChE-Aktivität im Liquor von LBD-Patienten und Kontrollen, was den angenommenen geringen oder fehlenden Einfluss der Liquor-BuChE-Aktivität auf die LBD unterstreicht. Dies ist insofern überraschend, als bei Männern gegenüber Frauen zum einen im untersuchten Gesamtkollektiv signifikant höhere Liquor-BuChE-Aktivitätswerte nachgewiesen wurden, zum anderen auch eine Studie an AD-Patienten bei Männern höhere Liquor-BuChE-Aktivitätswerte als bei Frauen nachwies (Darreh-Shori et al., 2006).

4.2.2. LBD-Patienten versus Kontrollen: BuChE-Aktivität im Serum

Bezüglich der BuChE-Aktivität im Serum unterschieden sich LBD-Gruppe und Kontrollgruppe nicht signifikant. Dieses Ergebnis spricht gegen einen Zusammenhang von Serum-BuChE-Aktivität und dem klinisch fassbaren Krankheitsbild der LBD. Dies ist vergleichbar mit einer Studie, welche keinen Unterschied der Serum-BuChE-Aktivität zwischen dementen Patienten (Multiinfarktdemenz, AD) und Kontrollpersonen nachweisen konnte (Szilagy et al., 1987).

4.2.3. BuChE-Aktivität: Allgemeine Bemerkung

Es kann festgehalten werden, dass die Bestimmung der BuChE-Aktivitätswerte nicht geeignet ist, um LBD-Patienten von Kontrollpersonen zu unterscheiden. Dies ist interessant, da LBD-Patienten eine verminderte Aktivität des cholinergen Systems aufweisen (Bohnen et al., 2006; Hilker et al., 2005; Tiraboschi et al., 2000) und eine erhöhte BuChE-Aktivität mit der Abnahme der AChE-Aktivität im Verlauf von dementiellen neurodegenerativen Erkrankungen einhergehen könnte. Bei AD-Patienten konnte nachgewiesen werden, dass zwar die AChE-Aktivität mit Dauer der Erkrankung abnimmt, jedoch die BuChE-Aktivität mit Dauer der Erkrankung zunimmt (Perry et al., 1978).

4.3. BuChE-Aktivität innerhalb der LBD

4.3.1. LBD-Patienten: BuChE-Aktivität im Liquor

BuChE-Aktivität im Liquor und Parkinson-Syndrom

Sowohl in der gesamtgeschlechtlichen ($p=0.12$) als auch in der geschlechtsspezifischen Untersuchung (Männer: $p=0.07$; Frauen: $p=0.61$) zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der BuChE-Aktivität im Liquor und dem Parkinson-Erkrankungsalter bei LBD-Patienten. Auch die Korrelation zwischen BuChE-Aktivitätswerten im Liquor und der Dauer der Parkinson-Symptome war negativ. Dies ist gut mit der Tatsache vereinbar, dass für die motorischen Symptome der LBD der Untergang von dopaminergen Neuronen in der SN als Ursache angenommen wird (Whitton, 2007)

4. Diskussion

und diese nicht auf einer veränderten Aktivität des cholinergen Systems beruhen. Bezüglich der Dauer der Parkinson-Symptome konnte eine andere Studie – übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit – keinen Zusammenhang mit der BuChE-Aktivität im Liquor feststellen (Sirvio et al., 1987).

Dahingegen wies die genannte Studie eine signifikante Korrelation zwischen den Liquor-BuChE-Aktivitätswerten und dem Hoehn & Yahr-Stadium bei PD-Patienten nach (Sirvio et al., 1987). Dieser Zusammenhang war in dieser Studie nicht nachweisbar. Es wäre denkbar, dass diese gegensätzlichen Ergebnisse auf einer unterschiedlich weit fortgeschrittenen Erkrankung der Patienten in den beiden Studien beruhen. So war die durchschnittliche Dauer der Parkinson-Erkrankung (8 Jahre) in der zitierten Studie länger als die in der vorliegenden Arbeit (6.8 Jahre). Dies legt nahe, dass zudem das cholinerge System stärker betroffen war, da eine dementielle Entwicklung im Rahmen einer PD eher später im Verlauf auftritt: So zeigte eine prospektive Studie eine 4-Jahres-Prävalenz der Demenz im Rahmen einer PD von 51.6 % auf, wohingegen die 8-Jahres-Prävalenz bei 78.2 % lag (Aarsland et al., 2003).

BuChE-Aktivität im Liquor und Demenz

Beim Vergleich von dementen (PDD und DLB) mit nicht-dementen (PDND) LBD-Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied der BuChE-Aktivität im Liquor. Auch demente (PDD) und nicht-demente (PDND) Parkinson-Patienten unterschieden sich nicht hinsichtlich ihrer BuChE-Aktivität im Liquor. Übereinstimmend mit den hier dargestellten Ergebnissen wurde für PDD- und PDND-Patienten in einer anderen Arbeit keine unterschiedliche BuChE-Aktivität im Liquor beschrieben (Sirvio et al., 1987). Diese Befunde sind vor dem Hintergrund bemerkenswert, dass in der Literatur für demente LBD-Patienten ein stärker ausgeprägtes cholinerges Defizit beschrieben wurde als für nicht-demente LBD-Patienten (Bohnen et al., 2006; Hilker et al., 2005). Dabei liegt es nahe, die Abnahme des Neurotransmitters Acetylcholin im Gehirn mit einem vermehrten Abbau durch die BuChE in Verbindung zu bringen, weshalb bei dementen LBD-Patienten eine höhere Liquor-BuChE-Aktivität zu erwarten gewesen wäre. Für diese Annahme spricht eine Studie, welche bei PDD-Patienten signifikant höhere Liquor-BuChE-Aktivitätswerte als bei PDND-Patienten beschrieb (Ruberg et al., 1986). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch eine Studie, welche eine starke Korrelation zwischen der temporalen BuChE-Aktivität und dem Ausmaß der kognitiven Verschlechterung bei DLB-Patienten beschrieb (Perry et al., 2003). Eine interessante Frage ist somit sicherlich, inwiefern bestimmte Charakteristika der Demenz, wie deren Form, das Erkrankungsalter, die Dauer oder die Schwere, in diesem

4. Diskussion

Zusammenhang von Bedeutung sind.

In der vorliegenden Untersuchung korrelierte die BuChE-Aktivität im Liquor weder mit dem Erkrankungsalter für Demenz noch mit der Dauer der Demenz bei PDD- und DLB-Patienten. Eine andere Studie wies dahingegen eine signifikante Korrelation zwischen der Liquor-BuChE-Aktivität und der Dauer der Demenz bei PD-Patienten nach (Sirvio et al., 1987). Die gegensätzlichen Ergebnisse der beiden Studien lassen sich nicht durch eine unterschiedliche Dauer der Demenz der Patienten erklären, da die Patienten in der zitierten Studie im Durchschnitt seit 3 Jahren an einer Demenz erkrankt waren und die durchschnittliche Erkrankungsdauer in dieser Studie bei 2.5 Jahren lag.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich keine Korrelation zwischen der BuChE-Aktivität im Liquor und dem kognitiven Status (erhoben mit dem MMST) bei LBD-Patienten. Dagegen korrelierte die Liquor-BuChE-Aktivität bei PD-Patienten in der zitierten Studie signifikant positiv mit der Schwere der Demenz (erhoben mit der Skala nach Hughes) (Sirvio et al., 1987). Auch bei Betrachtung dieser Ergebnisse liefert die Dauer der Demenz keinen Aufschluss über deren Verschiedenheit. Die Vergleichbarkeit der beiden Studien wird allerdings durch unterschiedliche Tests zur Überprüfung des kognitiven Status eingeschränkt.

Anhand dieser Ergebnisse ist es somit momentan nicht möglich, endgültige Aussagen darüber zu treffen, welche Rolle die BuChE-Aktivität im Liquor bei neurodegenerativen dementiellen Erkrankungen einnimmt. Die oben angeführten Befunde deuten darauf hin, dass Veränderungen der BuChE-Aktivität im Liquor erst ab einem fortgeschrittenen Stadium der Demenz nachweisbar sind. Der mutmaßliche Einfluss der BuChE auf kognitive Symptome der LBD wird durch den erfolgreichen Einsatz des dualen ChEI Rivastigmin zur Therapie dementieller Symptome bei PD-Patienten unterstrichen (Emre et al., 2004; Poewe et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit korrelierten bei LBD-Patienten die BuChE-Aktivitätswerte im Liquor tendenziell positiv mit den A β 42-Werten im Liquor (p=0.08). Bei AD-Patienten wurde ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen diesen Parametern beschrieben (Darreh-Shori et al., 2006). Diese Ergebnisse sind vor dem Hintergrund interessant, als gezeigt werden konnte, dass die BuChE die Bildung von A β -Fibrillen beeinflusst: Während A β allein *in vitro* spontan polymerisiert, sofern das Protein in einer bestimmten Konzentration vorhanden ist, wird durch die Zugabe von BuChE die Bildung von Amyloidfibrillen verzögert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit verringert (Diamant et al., 2006; Podoly et al., 2008). Da Amyloid eine wesentliche Rolle bei den LBD spielen dürfte (sowohl das in LB abgelagerte α -Synuclein als auch das Alzheimer-assoziierte A β sind Amyloide), könnte dieser Befund somit

4. Diskussion

die Relevanz einer weiteren Funktion von BuChE betonen, eben der Interaktion mit fehlgefalteten Proteinen.

4.3.2. LBD-Patienten: BuChE-Aktivität im Serum

BuChE-Aktivität im Serum und Parkinson-Syndrom

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass PD-Patienten im Verlauf der Erkrankung zunehmend unter Störungen des autonomen Nervensystems leiden. Diese Störungen, wie Obstipation, eingeschränkte Herzfrequenzvariabilität und veränderte Baroreflex-Sensitivität, wurden auf einen möglichen Zusammenhang mit verschiedenen Parametern der PD untersucht (Friedrich et al., 2008; Holmberg et al., 2001; Korchounov et al., 2005). Da dem Neurotransmitter Acetylcholin eine tragende Rolle im autonomen Nervensystem zukommt, liegt die Frage nach einer veränderten Aktivität seiner hydrolysierenden Enzyme (AChE und BuChE) bei autonomer Dysfunktion nahe.

Eine Fall-Kontroll-Studie konnte zeigen, dass zwar neben PD-Patienten auch gesunde Kontrollen im Alter von autonomer Dysfunktion betroffen sind, dass PD-Patienten jedoch einen signifikant steileren Verlauf der autonomen Dysfunktion aufweisen und bereits in jüngeren Jahren stärker als gesunde Kontrollen betroffen sind (Korchounov et al., 2005). Die Autoren dieser Arbeit konnten zudem nachweisen, dass das Krankheitsstadium, die Dauer der Krankheit, das Erkrankungsalter sowie verschiedene Therapiekombinationen zwar signifikant mit dem Ausmaß der autonomen Dysfunktion in Zusammenhang stehen, dass diese jedoch keine unabhängigen Risikofaktoren darstellen und somit einzeln nicht als prädiktive Faktoren für eine autonome Dysfunktion im Rahmen einer PD gewertet werden können.

Eine andere Untersuchung zur Herzfrequenzvariabilität ergab sowohl während ruhi- ger als auch während forcierter Atmung keinen Unterschied zwischen PD-Patienten und Kontrollpersonen. Es zeigte sich jedoch, dass der mittlere arterielle Druck unter orthostatischer Provokation in der Patientengruppe signifikant stärker abfiel als in der Kontrollgruppe. Zudem waren die Blutdruckabfälle mit zunehmendem Alter und längerer Krankheitsdauer besonders ausgeprägt (Holmberg et al., 2001).

Bezüglich der Baroreflex-Sensitivität unterschieden sich in einer weiteren Untersuchung PD-Patienten nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Allerdings war in der Patientengruppe eine breite Streuung der Werte vorhanden und es konnte gezeigt werden, dass die Baroreflex-Sensitivität mit zunehmendem Krankheitsstadium nach Hoehn & Yahr abnimmt. Außerdem zeigten Patienten mit einer langen Krankheitsdauer eine pathologisch niedrige Baroreflex-Sensitivität (Friedrich et al., 2008).

4. Diskussion

Es kann somit festgehalten werden, dass eine Dysfunktion des autonomen Nervensystems bei PD-Patienten besteht und es zudem Hinweise darauf gibt, dass diese mit der Dauer und der Schwere der Erkrankung korreliert.

Die vorliegende Arbeit konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen der BuChE-Aktivität im Serum und dem Erkrankungsalter, der Dauer sowie dem Stadium nach Hoehn & Yahr der motorischen Symptome der LBD nachweisen. Möglicherweise sind diese Faktoren alleine betrachtet nicht aussagekräftig genug, sondern liefern nur bei Betrachtung in Kombination ein signifikantes Ergebnis. Ein weiterer, möglicher Ansatzpunkt für zukünftige Studien wäre zudem zu klären, inwiefern die BuChE-Aktivität im Serum mit verschiedenen Erscheinungsformen der autonomen Dysfunktion in Zusammenhang steht.

BuChE-Aktivität im Serum und Demenz

Sowohl demente LBD-Patienten (PDD, DLB) ($p=0.06$) als auch demente PD-Patienten (PDD) ($p=0.10$) wiesen tendenziell niedrigere BuChE-Aktivitätswerte im Serum auf als nicht-demente LBD- bzw. PD-Patienten (PDND). Bei diesen Ergebnissen stellt sich die Frage, welche Rolle die Serum-BuChE für die Demenz spielt. Es könnte sich um einen Schutzmechanismus des Körpers handeln, eine Progression des cholinergen Defizits über eine Senkung der peripheren Enzymaktivität zu verhindern. Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass bei PDD- und DLB-Patienten die BuChE-Aktivität im Serum weder mit dem Erkrankungsalter für Demenz noch mit der Dauer der Demenz korrelierte.

Bei LBD-Patienten zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Serum-BuChE-Aktivität und dem MMST, welche unabhängig von der Kovariable „Alter“ war. Dies kann vielleicht damit erklärt werden, dass ein niedriger MMST bei LBD-Patienten einen ausgedehnten Krankheitsprozess andeutet, der auch periphere Systeme miteinbezieht. Dies muss jedoch in weiteren Studien detaillierter untersucht werden.

Kein Zusammenhang war zwischen der BuChE-Aktivität im Serum und dem $A\beta_{42}$ -Gehalt im Liquor bei LBD-Patienten feststellbar. Damit erscheint es unwahrscheinlich dass die Interaktion von BuChE und $A\beta$ wie sie im zentralen Nervensystem möglicherweise besteht (s. Kap. 4.3.1 auf S. 54), auch in der Peripherie eine Rolle spielt.

4.4. *BCHE* K-Variante und Klinik

4.4.1. *BCHE* K-Variante und Parkinson-Syndrom

Das *BCHE* K-Allel war nicht mit einer LBD assoziiert. Daraus lässt sich ableiten, dass die *BCHE* K-Variante nicht als diagnostischer Parameter geeignet ist, um von diesem Genotyp auf klinische Aspekte der LBD zu schließen. Eine andere Arbeit, welche PD- bzw. DLB-Patienten mit Kontrollpersonen verglich, konnte ebenfalls keinen Unterschied bezüglich der Häufigkeit der *BCHE* K-Variante nachweisen. Jedoch war in beiden Patientengruppen die Zahl der homozygoten Allelträger gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Bei DLB-Patienten war dieser Effekt signifikant (Singleton et al., 1998). Bei der Auswertung der hier zugrunde liegenden Daten wurde nicht zwischen homozygoten und heterozygoten Allelträger der *BCHE* K-Variante unterschieden. Dies liegt darin begründet, dass die geringe Anzahl von homozygoten Trägern des *BCHE* K-Allels (n=5) keinen statistischen Vergleich zuließ.

In der vorliegenden Untersuchung war das *BCHE* K-Allel weder mit dem Erkrankungsalter noch mit der Dauer oder mit der Schwere der Parkinson-Symptome (Krankheitsstadium nach Hoehn & Yahr) assoziiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern somit keinen Hinweis darauf, dass das *BCHE* K-Allel die motorischen Symptome der LBD beeinflusst.

4.4.2. *BCHE* K-Variante und Demenz

Der *BCHE* K-Polymorphismus war nicht mit dem Vorliegen einer Demenz bei LBD-Patienten assoziiert. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der demente LBD-Phänotyp – gleichermaßen wie die motorischen Symptome der LBD – unabhängig vom Vorliegen eines *BCHE* K-Allels ist. Damit übereinstimmend zeigte eine post-mortem-Studie, dass die *BCHE* K-Variante keinen Risikofaktor für eine PD mit begleitender AD-Pathologie darstellt (Mattila et al., 2000).

Häufiger untersucht wurde die *BCHE* K-Variante im Zusammenhang mit der AD. Dabei war in verschiedenen Studien das *BCHE* K-Allel nicht mit einem erhöhten Risiko für AD assoziiert (Alvarez-Arcaya et al., 2000; Crawford et al., 1998; Deniz-Naranjo et al., 2007; Hiltunen et al., 1998; Ki et al., 1999; Mattila et al., 2000; Piccardi et al., 2007; Singleton et al., 1998). Auch bei Patienten mit leichter kognitiver Störung war das Vorliegen eines *BCHE* K-Allels nicht mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für AD assoziiert (Lane et al., 2008). Diesen Ergebnissen gegenüber steht eine Arbeit,

4. Diskussion

welche zeigte, dass AD-Patienten das *BCHE* K-Allel signifikant häufiger als alters- und geschlechtsangepasste Kontrollen tragen (Raygani et al., 2004).

Bei den hier untersuchten dementen LBD-Patienten (PDD, DLB) war das *BCHE* K-Allel nicht mit dem Erkrankungsalter für Demenz assoziiert. Anders in einer Studie mit AD-Patienten: Dort war das *BCHE* K-Allel mit einem höheren Alter bei Diagnosestellung verbunden (Deniz-Naranjo et al., 2007). Es stellt sich damit die Frage, ob diese gegensätzlichen Ergebnisse auf einen unterschiedlichen, genetisch bedingten Pathomechanismus von LBD und AD hindeuten.

Weiter zeigte sich in der vorliegenden Studie weder eine Assoziation des *BCHE* K-Allels mit der Dauer der Demenz noch mit der Schwere der Demenz (erhoben mit dem MMST) bei LBD-Patienten. Eine Follow-Up-Studie an AD-Patienten wies nach, dass das *BCHE* K-Allel nicht mit der durchschnittlichen Verschlechterung im MMST assoziiert ist, sofern es sich um eine leichte bis mittelschwere Form der AD handelt. Dagegen zeigte sich, dass Patienten mit Präsenz eines *BCHE* K-Allels, welche bereits bei Beginn der Studie an einer schweren Form der AD litten, eine signifikant langsamere kognitive Verschlechterung aufwiesen (Holmes et al., 2005).

Diese Ergebnisse könnten zur Planung weiterer Studien hilfreich sein, in der Hinsicht, dass eine genetische Diagnostik in Kombination mit einer differenzierten Betrachtung der Schwere der Demenz sinnvoll sein könnte, um Schlüsse auf den weiteren Verlauf des dementiven Prozesses ziehen zu können. Dabei gilt es außerdem zu klären, inwiefern diese Ergebnisse spezifisch für die AD sind oder ob diese ihre Gültigkeit auch für andere Demenzformen, wie z. B. die LBD-assoziierte Demenz, haben.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit auf keinen grundlegenden Effekt der *BCHE* K-Variante auf den mit den LBD assoziierten dementiven Prozess hinweisen.

4.5. *BCHE* K-Variante und BuChE-Aktivität

4.5.1. *BCHE* K-Variante und BuChE-Aktivität im Liquor

Es zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen dem *BCHE* K-Allel und der BuChE-Aktivität im Liquor im Gesamtkollektiv. Auch bei getrennter Untersuchung von LBD-Patienten und Kontrollen war kein Zusammenhang zwischen dem *BCHE* K-Allel und der BuChE-Aktivität im Liquor nachweisbar. Übereinstimmend mit dem Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit beschrieb eine kürzlich veröffentlichte Studie keinen Zusammenhang zwischen dem *BCHE* K-Allel und der Liquor-BuChE-Aktivität bei Pa-

4. Diskussion

tienten mit leichter kognitiver Störung (Lane et al., 2008). Dies deutet darauf hin, dass die zentrale BuChE-Aktivität nicht relevant durch die *BCHE* K-Variante beeinflusst wird.

4.5.2. *BCHE* K-Variante und BuChE-Aktivität im Serum

Die vorliegende Studie konnte den bereits beschriebenen Einfluss der *BCHE* K-Variante auf die BuChE-Aktivität im Serum (Bartels et al., 1992b) bestätigen: Träger mindestens eines K-Allels wiesen in der vorliegenden Arbeit eine signifikant niedrigere BuChE-Aktivität im Serum auf als homozygote Träger des Wildtyp-Allels. Dieser Zusammenhang war sowohl im Gesamtkollektiv ($p=0.0001$) als auch bei der getrennten Analyse von LBD-Patienten ($p=0.01$) und Kontrollpersonen ($p=0.04$) signifikant. Die Tatsache, dass sich die Serum-BuChE-Aktivität im Gegensatz zur Liquor-BuChE-Aktivität als abhängig von der *BCHE* K-Variante in dieser Arbeit zeigte, bestärkt die schon zuvor aufgestellte Hypothese dass die BuChE-Aktivität im Serum und im Liquor getrennt reguliert werden.

Bemerkenswert ist, dass die *BCHE* K-Variante zwar die BuChE-Aktivität im Serum beeinflusst, welche bei dementen LBD-Patienten tendenziell erniedrigt ist, dass jedoch die *BCHE* K-Variante nicht mit dem dementiven Prozess bei den LBD assoziiert ist. Damit wäre vorstellbar, dass systemische (periphere) Prozesse weitreichende Folgen für Parkinson-Patienten haben können.

4.6. *BCHE* A-Variante

In dieser Studie wurde keine statistische Berechnung für die *BCHE* A-Variante in Bezug zu klinischer Symptomatik und BuChE-Aktivität im Liquor bzw. Serum durchgeführt, da sich bei der Auswertung der *BCHE*-SNaPshot-Reaktion zeigte, dass lediglich eine sehr kleine Anzahl der Patienten und Kontrollpersonen Träger des *BCHE* A-Allels waren. Dies bekräftigt eine frühere Studie, in welcher die *BCHE* A-Variante als eine relativ seltene *BCHE*-Variante beschrieben wurde (Kalow und Gunn, 1959).

4.7. *APOE*-Genotyp und BuChE-Aktivität

Das kombinierte Vorliegen eines *APOE* ϵ 4-Allels und eines *BCHE* K-Allels wurde als Risikofaktor für die AD beschrieben (Lehmann et al., 1997). Aus diesem Grund scheint ein gegenseitiger Einfluss der Gene bzw. der dadurch kodierten Proteine denkbar. In der vorliegenden Arbeit wurde daher für die LBD untersucht, inwiefern das Vorliegen eines *APOE* ϵ 4-Allels die BuChE-Aktivität im Liquor bzw. Serum beeinflusst.

4.7.1. *APOE*-Genotyp und BuChE-Aktivität im Liquor

Für die AD wurde untersucht, inwiefern verschiedene *BCHE*-Genotypen und die BuChE-Aktivität, insbesondere in Kombination mit dem *APOE* ϵ 4-Allel, Risikofaktoren darstellen und inwiefern sie die Geschwindigkeit der kognitiven Verschlechterung beeinflussen. Trotz ähnlicher pathologischer (z. B. Amyloidablagerungen) und neurochemischer (z. B. cholinerges Defizit) Aspekte zwischen AD und LBD gibt es nur wenige Informationen zu diesem Thema über die LBD.

In dieser Studie unterschieden sich Träger und Nichtträger des *APOE* ϵ 4-Allels nicht hinsichtlich ihrer BuChE-Aktivität im Liquor. Dies galt sowohl für das Gesamtkollektiv als auch für die getrennte Analyse von LBD-Patienten und Kontrollen. Dieser Befund spricht dagegen, die vermutlich genetisch bedingte Suszeptibilität der LBD und die Liquor-BuChE-Aktivität als eine die Krankheit beeinflussende „Einheit“ zu betrachten. Demgegenüber steht eine vorausgegangene Studie mit AD-Patienten, in der Träger von mindestens einem *APOE* ϵ 4-Allel signifikant niedrigere BuChE-Aktivitätswerte zeigten als Nichtträger (Darreh-Shori et al., 2006). Im Rahmen der genannten Studie konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine niedrigere Liquor-BuChE-Aktivität mit einem schlechteren Abschneiden bei kognitiven Testverfahren (MMST) einhergeht. Das *APOE* ϵ 4-Allel steht somit bei AD-Patienten im Zusammenhang mit der Liquor-BuChE-Aktivität, welche ihrerseits wiederum einen Effekt auf klinische Symptome hat. Da etwa ein Viertel der LBD-Patienten neben LB auch AD-typische Gehirnveränderungen (Amyloidablagerungen) aufweisen (Boller et al., 1980; Braak et al., 2005; Hughes et al., 1993; Jellinger et al., 2003), ist es von Interesse zu klären, ob diese unterschiedlichen Ergebnisse auf verschiedenen Pathomechanismen der Krankheiten oder auf einem unterschiedlichen Studiendesign beruhen.

4.7.2. *APOE*-Genotyp und BuChE-Aktivität im Serum

Im Kollektiv von LBD-Patienten und Kontrollpersonen war kein signifikanter Unterschied zwischen Trägern und Nichtträgern des *APOE* ϵ 4-Allels bezüglich der Serum-BuChE-Aktivität zu sehen. Die getrennte Untersuchung von LBD-Patienten und Kontrollgruppe lieferte das gleiche Ergebnis. Dies spricht zum einen gegen einen Einfluss des *APOE*-Genotyps auf die Höhe der BuChE-Aktivität im Serum im Allgemeinen. Zum anderen deutet das Ergebnis darauf hin, dass auch bei LBD-Patienten das Vorhandensein mindestens eines *APOE* ϵ 4-Allels nicht als Risikofaktor für eine veränderte BuChE-Aktivität im Serum angesehen werden kann.

4.8. *BCHE*-Genotyp, *APOE*-Genotyp und Demenz

In einer Studie wurde bei AD-Patienten kein gehäuftes Vorkommen des *BCHE* K-Allels im Vergleich zu Kontrollpersonen beschrieben, wenn das Vorkommen des Risikofaktors für AD, das *APOE* ϵ 4-Allel, nicht mitberücksichtigt wurde (Lehmann et al., 1997). Anders verhielt es sich bei Betrachtung von Trägern des *APOE* ϵ 4-Allels: Dabei zeigte sich, dass bei AD-Patienten das *BCHE* K-Allel signifikant häufiger vorlag als bei den Kontrollen, was auf eine Interaktion zwischen *APOE* ϵ 4 und *BCHE* K hinweist (Lehmann et al., 1997). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit getestet, ob ein derartiger Zusammenhang auch bei LBD besteht.

Das kombinierte Vorliegen eines *BCHE* K-Allels und eines *APOE* ϵ 4-Allels lieferte dabei keinen Hinweis auf ein erhöhtes Demenzrisiko bei LBD. Es war kein signifikanter Zusammenhang zwischen der *BCHE* K-Variante, einem *APOE* ϵ 4-Allel und dem MMST bei LBD-Patienten ersichtlich. Dies deutet daraufhin, dass der dementive Prozess, welcher mit den LBD assoziiert ist, nicht durch die o. g. genetische Konstellation beeinflusst wird.

Der Zusammenhang zwischen dem gleichzeitigen Vorliegen der *BCHE* K-Variante sowie eines *APOE* ϵ 4-Allels und Symptomen der Demenz wurde v. a. für die AD untersucht. Mehrere Studien konnten – entsprechend den Ergebnissen dieser Studie – keinen Zusammenhang zwischen der *BCHE* K-Variante, dem *APOE* ϵ 4-Allel und der AD nachweisen (Alvarez-Arcaya et al., 2000; Singleton et al., 1998). Gegensätzlich zeigten andere Studien, dass die Kombination aus *BCHE* K-Variante und *APOE* ϵ 4-Allel mit einem höheren Erkrankungsrisiko für AD assoziiert ist (Lehmann et al., 2000; Tilley et al., 1999). Eine weitere Studie zeigte, dass Patienten mit leichter kognitiver Störung, welche die Kombination aus *BCHE* K-Variante und *APOE* ϵ 4-Allel tragen,

4. Diskussion

signifikant schlechter im MMST abschneiden als Patienten mit dem gleichen Krankheitsbild aber einer anderen Genotyp-Konstellation (Lane et al., 2008). Es ist daher vorstellbar, dass das kombinierte Vorliegen eines *BCHE* K-Allels und eines *APOE* ϵ 4-Allels ein erhöhtes Risiko für neurodegenerative Erkrankungen – wie die AD und die LBD – darstellt. Allerdings ist diese Genkombination nicht ausreichend, um das individuelle Erkrankungsrisiko zu bestimmen. Möglicherweise ist die Bestimmung weiterer genetischer Varianten, aber auch individueller Faktoren, wie Alter oder Geschlecht, nötig, um Rückschlüsse auf Erkrankungsmechanismen ziehen zu können.

4.9. *APOE*-Genotyp, $A\beta$ 42 und klinische Symptome

Das *APOE* ϵ 4-Allel war nicht mit einem erhöhten Demenzrisiko bei LBD assoziiert. Dieser Befund bestätigt frühere Studien an PD-Patienten, welche kein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Demenz bei *APOE* ϵ 4-Allelträgern nachweisen konnten (Li et al., 2004; Oliveri et al., 1999). Diesen Ergebnissen gegenüber steht eine Arbeit, die zeigte, dass das *APOE* ϵ 4-Allel bei PD-Patienten mit einem signifikant erhöhten Erkrankungsrisiko für Demenz einhergeht (Pankratz et al., 2006). Dabei gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass die letztgenannte Studie das Demenzrisiko von *APOE* ϵ 4-Allelträgern mit dem von homozygoten Trägern des *APOE* ϵ 3-Allels verglich, während die anderen Studien lediglich zwischen Trägern und Nichtträgern des *APOE* ϵ 4-Allels unterschieden. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang noch, dass das *APOE* ϵ 4-Allel zwar bei PDD-Patienten signifikant häufiger vorliegt als bei gesunden Kontrollpersonen (Parsian et al., 2002), dass es jedoch nicht geeignet ist, um PDND-Patienten und PDD-Patienten voneinander zu unterscheiden (Jasinska-Myga et al., 2007). Die Mehrzahl der Studienergebnisse spricht also gegen einen entscheidenden Einfluss des *APOE* ϵ 4-Allels auf ein erhöhtes Demenzrisiko bei den LBD.

Dennoch scheint das *APOE* ϵ 4-Allel von Bedeutung für die LBD zu sein: Eine Genassoziationsstudie zeigte, dass für *APOE* ϵ 4-Träger mit positiver Familienanamnese für PD das Risiko an PD zu erkranken stieg, und diese Personen auch früher erkrankten (Li et al., 2004). Das legt nahe, dass *APOE* ϵ 4 bei Menschen mit erhöhtem Risiko für LBD eine weitere Erhöhung des Risikos herbeiführt.

Das Vorliegen von mindestens einem *APOE* ϵ 4-Allel stand bei den hier untersuchten LBD-Patienten in Zusammenhang mit dem $A\beta$ 42-Gehalt des Liquors: Träger des *APOE* ϵ 4-Allels wiesen signifikant niedrigere Werte als Nichtträger auf. In einer PET-Untersuchung der im Rahmen der vorliegenden Studie genetisch charakterisierten Patienten konnte gezeigt werden, dass LBD-Patienten mit zumindest einem *APOE* ϵ 4-

4. Diskussion

Allel signifikant häufiger kortikale $A\beta$ -Ablagerungen aufweisen (Maetzler et al., 2009). Bei den hier untersuchten LBD-Patienten korrelierte der $A\beta_{42}$ -Gehalt im Liquor signifikant mit dem MMST. Kein signifikanter Zusammenhang konnte zwischen dem *APOE* $\epsilon 4$ -Allel und dem MMST nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für die Betrachtung des Gesamtkollektivs, als auch für die separate Untersuchung der LBD-Gruppe. Das könnte daran liegen, dass der MMST für die LBD nicht der geeignetste Test für die Messung von kognitiven Fähigkeiten sein dürfte. Allerdings unterschieden sich auch in einer Untersuchung von AD-Patienten Träger und Nichtträger des *APOE* $\epsilon 4$ -Allels nicht hinsichtlich der im MMST durchschnittlich erzielten Ergebnisse (Darreh-Shori et al., 2006).

4.10. Einschränkungen dieser Arbeit

Bei dieser Studie wurde nicht berücksichtigt, inwiefern die Studienteilnehmer einer chronischen Insektizidbelastung ausgesetzt sind. Diese Frage ist insofern bedeutend, als dass organophosphatische Insektizide, wie z. B. Parathion, zu einer irreversiblen Blockade der Cholinesterasen führen. Die Hemmung der Cholinesterasenaktivität führt zu einer Akkumulation von Acetylcholin an den Synapsen und verursacht so eine Überstimulation und Störung der Neurotransmission in ZNS und PNS (Namba et al., 1971). Allerdings ist es eher unwahrscheinlich, dass cholinesterasehemmende Wirkstoffe am Arbeitsplatz einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studie haben, da die meisten Patienten, welche sich im Universitätsklinikum Tübingen vorstellen, aufgrund demographischer Strukturen aus dem städtischen Bereich kommen.

Ein weiterer Kritikpunkt an dieser Studie könnte sein, dass nur die enzymatische BuChE-Aktivität, jedoch nicht der Proteingehalt bestimmt wurde. Allerdings scheint die unterschiedlich hohe BuChE-Aktivität zwischen den verschiedenen *BCHE*-Genvarianten nicht durch eine unterschiedliche Katalysationsgeschwindigkeit oder Substrataffinität bedingt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass der *BCHE*-Wildtyp und die *BCHE* K-Variante ähnliche Bindungs-Affinitätswerte und eine ähnliche Katalysationsgeschwindigkeit für die Substrate Butyrylthiocholin und Benzoylcholin aufweisen (Altamirano et al., 2000). Eine andere Arbeit wies eine starke Korrelation zwischen BuChE-Proteingehalt und BuChE-Aktivitätswerten nach (Spearman's $Rho = 0.63$, $p < 0.0001$) (Darreh-Shori et al., 2006). Wahrscheinlich sind diese Beobachtungen auf weniger zirkulierende BuChE-Moleküle (Altamirano et al., 2000) und/oder auf unterschiedliche Interaktionen mit Partner-Proteinen zurückzuführen (Darvesh et al., 2001).

4. Diskussion

Als ein weiterer limitierender Faktor ist die Größe des Studienkollektivs (n=148) zu nennen. Die relativ geringe Fallzahl erschwert die Einschätzung der Ergebnisse insbesondere für die Untergruppen bei Befunden, bei denen zwar eine Tendenz ersichtlich war, welche jedoch keine Signifikanz erreichten. Hierbei könnten weitere, größere Studien mit homogenen Patientenkollektiven Klarheit schaffen.

Desweiteren muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet wurde. Dies liegt darin begründet, dass in vielen Teilaspekten der Arbeit auf eine Formulierung einer konkreten Arbeitshypothese verzichtet werden musste, da keine adäquate Information aus der Literatur zu gewinnen war. Daher wurde vorrangig darauf Wert gelegt, β -Fehler (oder Falsch-Negativ-Entscheidungen) zu vermeiden.

5. Zusammenfassung

Bis heute ist die Ätiologie der LBD weitgehend unbekannt. Während für die AD in verschiedenen Studien *BCHE*-Genvarianten und die BuChE-Aktivität gründlich untersucht wurden und das *APOE* ϵ 4-Allel als bekannter Risikofaktor gilt, gibt es diesbezüglich nur wenige Daten zu den LBD, obwohl beide Erkrankungen Gemeinsamkeiten, wie Amyloidablagerungen und ein cholinerges Defizit teilen. Für diese Arbeit wurden daher in einem LBD-Kollektiv und einem strukturgleichen, gesunden Kontrollkollektiv die Häufigkeit der *BCHE* K- und A-Variante und die Höhe der BuChE-Aktivität in Liquor und Serum untersucht sowie der *APOE*-Genotyp bestimmt.

Männer wiesen im Gesamtkollektiv signifikant höhere Liquor-BuChE-Aktivitätswerte auf als Frauen. Die BuChE-Aktivität im Serum stellte sich als geschlechtsunabhängig heraus, sie nahm jedoch signifikant mit steigendem Lebensalter ab. LBD-Patienten und gesunde Kontrollpersonen unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der BuChE-Aktivitätswerte in Liquor und Serum. Dieses Ergebnis ist insofern erstaunlich, da bei dementen und nicht-dementen LBD-Patienten bekannterweise eine verminderte Aktivität des cholinergen Systems vorliegt und als mögliche Ursache eine veränderte BuChE-Aktivität diskutiert wird. Die BuChE-Aktivitätswerte in Liquor und Serum waren weder mit dem Erkrankungsalter noch mit der Dauer oder mit der Schwere (Stadium nach Hoehn & Yahr) der motorischen Symptome der LBD assoziiert. Gleiches galt für den Zusammenhang mit dem Erkrankungsalter und der Dauer dementieller Symptome im Rahmen einer LBD. Dagegen korrelierte die BuChE-Aktivität im Serum signifikant positiv mit dem MMST bei LBD-Patienten, was auf einen Einfluss der Serum-BuChE bei kognitiven Defiziten hinweisen könnte.

Die *BCHE* K-Variante war weder mit einer LBD noch mit dem Auftreten einer Demenz im Rahmen einer LBD assoziiert. Sowohl für die motorischen als auch für die dementiellen Symptome konnte keine Assoziation zwischen der *BCHE* K-Variante und dem Erkrankungsalter oder der Dauer oder der Schwere der LBD erfasst werden. Das *BCHE* K-Allel war nicht mit der Höhe der BuChE-Aktivität im Liquor assoziiert, wohingegen sich ein signifikanter Zusammenhang mit der BuChE-Aktivität im Serum darstellte. Dies galt sowohl für die Betrachtung des Gesamtkollektivs als auch für die separate Untersuchung von LBD-Patienten und Kontrollen. Diese Feststellung deutet auf einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus der zentralen und peripheren BuChE-Aktivität hin. Das *APOE* ϵ 4-Allel war in der vorliegenden Arbeit im Gesamtkollektiv (gleichermaßen für LBD-Patienten und Kontrollen) nicht mit den BuChE-Aktivitätswerten assoziiert. Sowohl das singuläre Vorliegen eines *APOE*

5. Zusammenfassung

ε4-Allels als auch die Kombination aus einem *BCHE* K-Allel und *APOE* ε4-Allel ging nicht mit einem erhöhten Demenzrisiko bei LBD-Patienten einher und beeinflusste nicht das Abschneiden im MMST. Träger des *APOE* ε4-Allels hatten einen signifikant niedrigen Aβ-Gehalt im Liquor als Nichtträger und der Aβ-Gehalt im Liquor korrelierte positiv mit dem MMST. Interessanterweise war das Abschneiden im MMST nicht vom Vorliegen eines *APOE* ε4-Allels abhängig.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen somit den bereits früher beschriebenen Zusammenhang zwischen der *BCHE* K-Variante und der Höhe der Serum-BuChE-Aktivität. Sie sprechen jedoch gegen einen grundlegenden Einfluss der Butyrylcholinesterase und des *APOE* ε4-Allels auf die LBD.

A. Abbildungsverzeichnis

A.1. Methodenteil

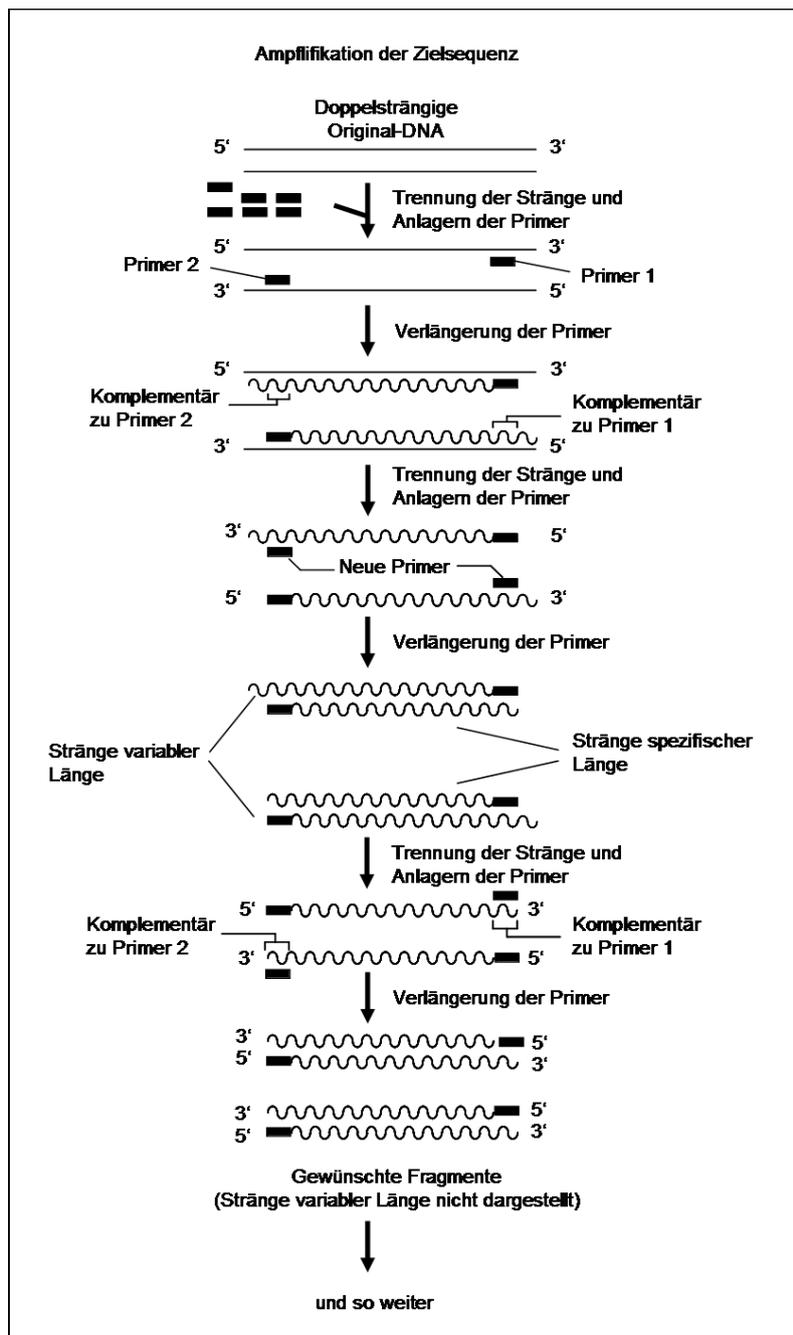


Abbildung A.1.: zu Kap. 2.4.1 auf S. 30. Schematische Darstellung einer PCR (nach Durieux M., Atlas of Anesthesia: Scientific Principles of Anesthesia).

A. Abbildungsverzeichnis

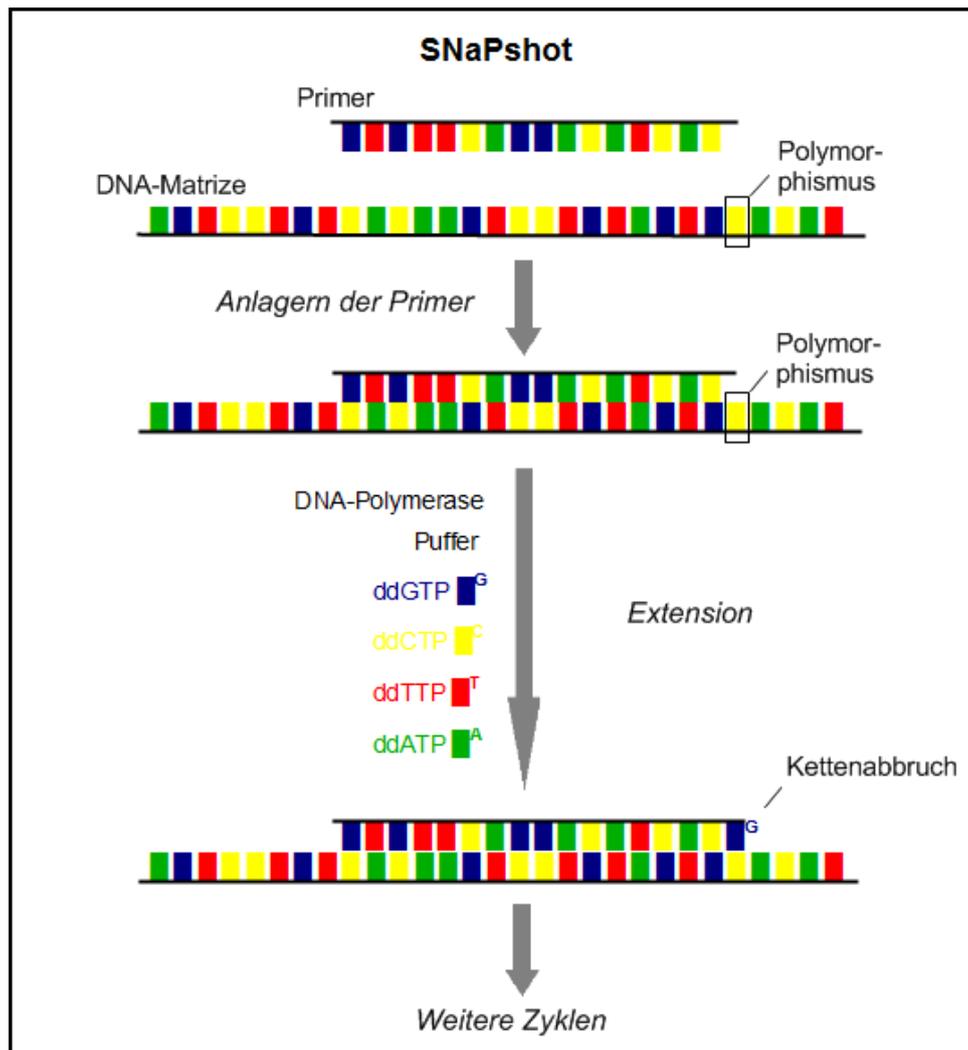


Abbildung A.2.: zu Kap. 2.4.2 auf S. 31. Schematische Darstellung der SNaPshot-Methode (nach Applied Biosystems, Product Bulletin, ABI Prism SNaPshot Multiplex System).

A. Abbildungsverzeichnis

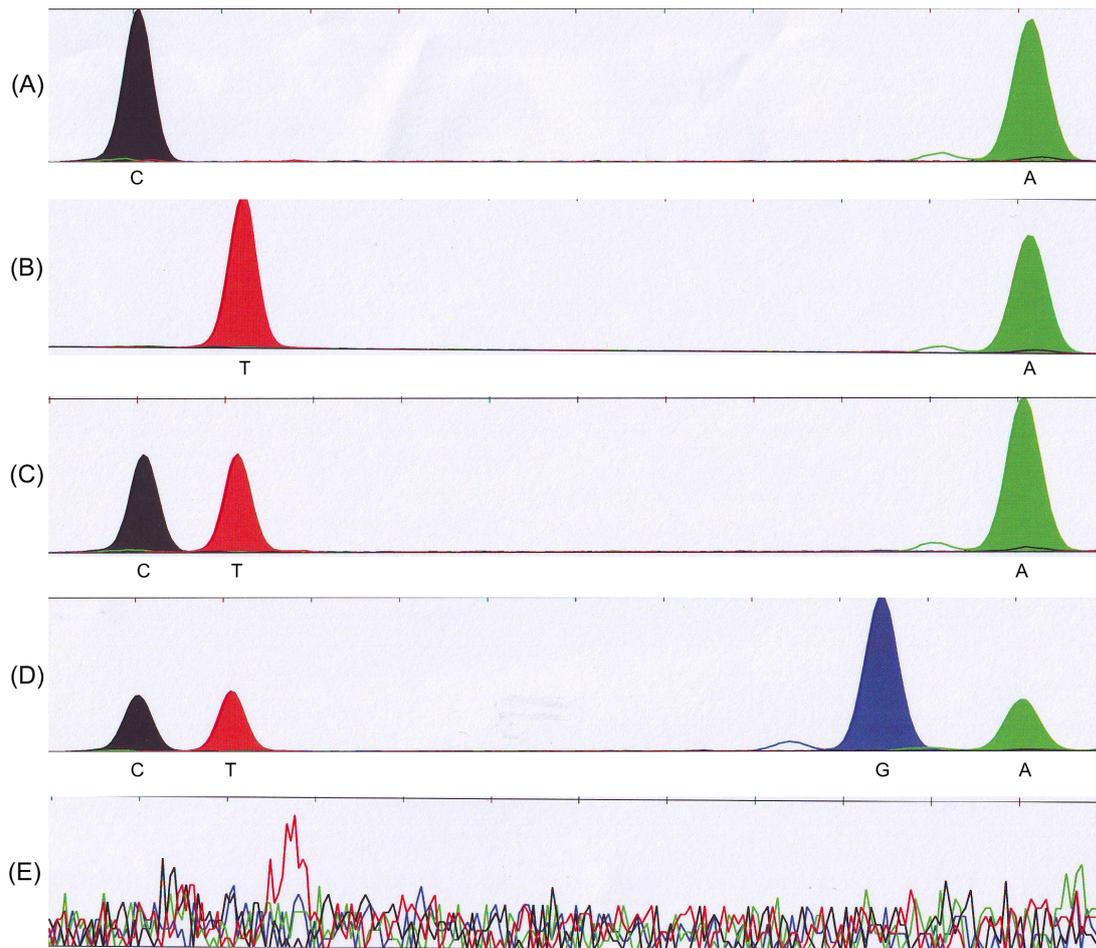


Abbildung A.3.: zu Kap. 2.4.2 auf S. 35. SNaPshot-Genotypisierung der *BCHE*-SNPs. Der linke Teil der Graphik zeigt die K-Variante, der rechte Teil die A-Variante der *BCHE*. Die Farbkodierung erlaubt die Bestimmung der Basen (bei (A)–(D) jeweils unter dem Peak angegeben) und damit des entsprechenden *BCHE*-Genotyps (K-Variante/A-Variante): (A): WW/WW; (B) KK/WW; (C): WK/WW; (D): WK/WA; (E) zeigt das typische Bild einer Negativkontrolle: Es zeigt sich keine auswertbare Sequenz, d. h. über dem Grundrauschen treten keine Peaks auf.

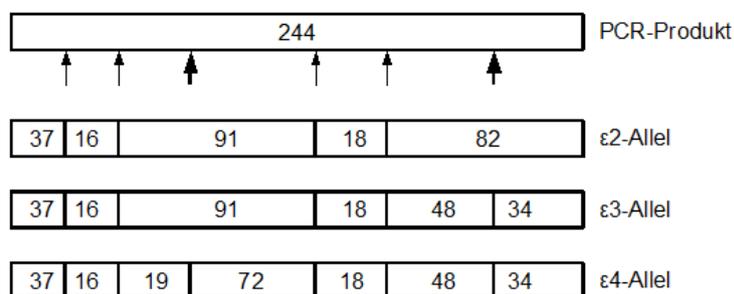


Abbildung A.4.: zu Kap. 2.4.4 auf S. 37. Schematische Darstellung der Schnittstellen von HhaI in der polymorphen Region von *APOE*. Die schmalen Pfeile kennzeichnen die konstanten Schnittstellen, die dicken Pfeile kennzeichnen die Schnittstellen, an welchen sich die einzelnen Allele unterscheiden (Codonpositionen 112 und 158). Die Zahlen geben die Länge der einzelnen Fragmente in Basenpaaren an.

A. Abbildungsverzeichnis

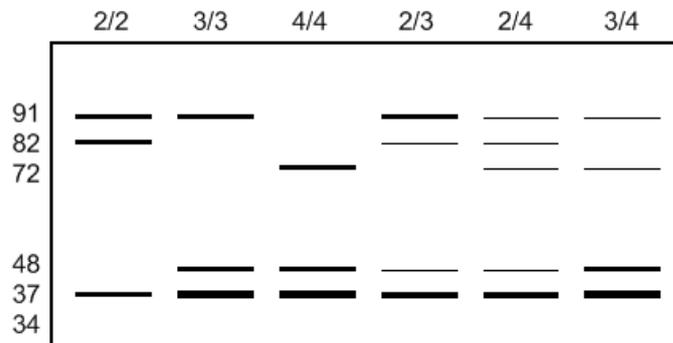


Abbildung A.5.: zu Kap. 2.4.4 auf S. 37. Exemplarische Darstellung des Bandenmusters von *APOE* in der Gelelektrophorese. Zu sehen sind die sechs verschiedenen Genotypen (über der Skizze angeschrieben), welche sich aus den drei Allelen $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ zusammensetzen. Die Zahlen links neben der Skizze geben die Größe der einzelnen Fragmente in Basenpaaren an.

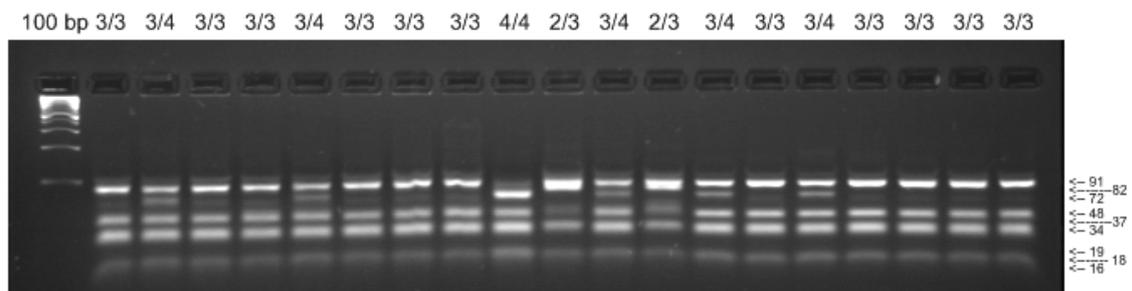


Abbildung A.6.: zu Kap. 2.4.4 auf S. 39. *APOE*-Genotypisierung. PCR-amplifiziertes *APOE* nach Verdau mit *Hha*I auf einem 4%igen Agarosegel. Dargestellt ist ein Gel nach 45 min Laufzeit. Die Fragmentgrößen (in bp) sind auf der rechten Seite des Gels angegeben.

A.2. Ergebnisteil

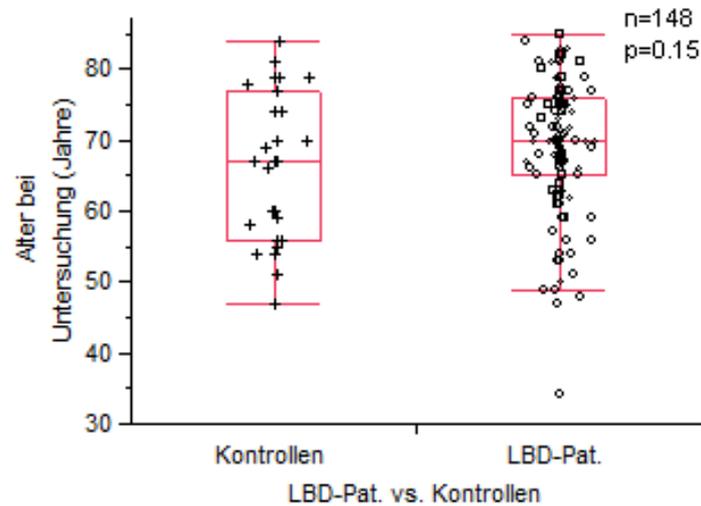


Abbildung A.7.: zu Kap. 3.1 auf S. 42. Altersvergleich von LBD-Patienten und Kontrollpersonen. Es zeigte sich kein signifikanter Altersunterschied zwischen den beiden Gruppen. Der p-Wert wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test berechnet. (+ Kontrollen, \circ PDND-Patienten, \diamond PDD-Patienten, \square DLB-Patienten).

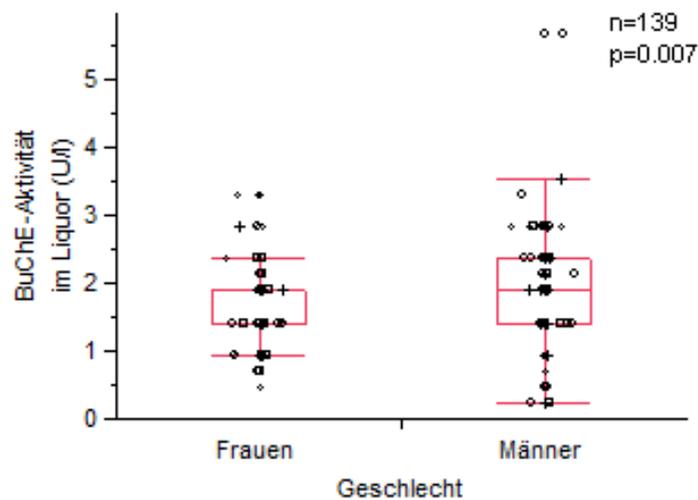


Abbildung A.8.: zu Kap. 3.2.1 auf S. 42. BuChE-Aktivität im Liquor von Männern und Frauen im Gesamtkollektiv. Männer wiesen signifikant höhere Werte auf als Frauen. Die Berechnung wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test durchgeführt. (+ Kontrollen, \circ PDND-Patienten, \diamond PDD-Patienten, \square DLB-Patienten).

A. Abbildungsverzeichnis

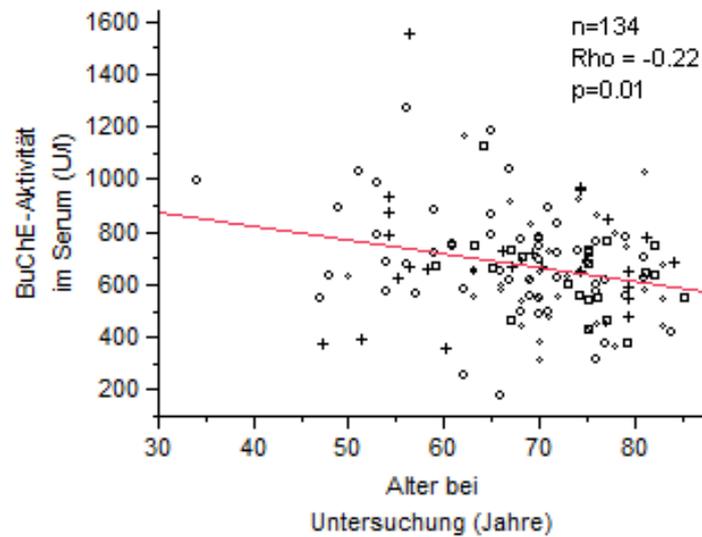


Abbildung A.9.: zu Kap. 3.2.2 auf S. 42. BuChE-Aktivität im Serum und Alter bei Untersuchung im Gesamtkollektiv. Die beiden Variablen korrelierten signifikant negativ miteinander. Die Berechnung wurde mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. (+ Kontrollen, o PDND-Patienten, \diamond PDD-Patienten, \square DLB-Patienten).

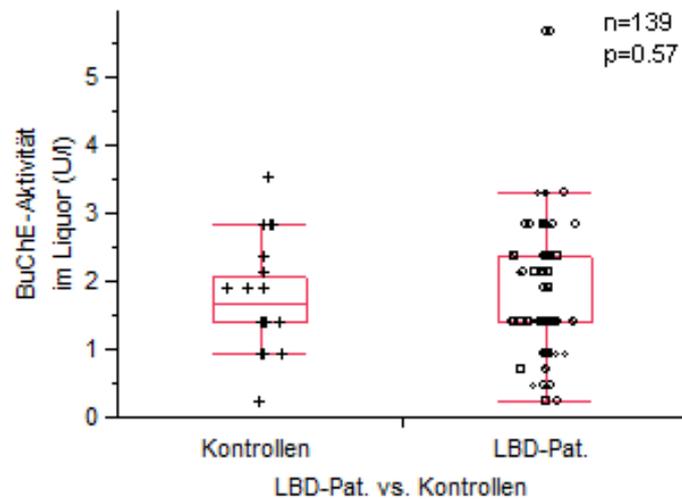


Abbildung A.10.: zu Kap. 3.3.1 auf S. 43. Vergleich der BuChE-Aktivität im Liquor von LBD-Patienten und Kontrollen. Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der BuChE-Aktivität im Liquor. Zur Kalkulation wurde der Wilcoxon-Rangsummen-Test eingesetzt. (+ Kontrollen, o PDND-Patienten, \diamond PDD-Patienten, \square DLB-Patienten).

A. Abbildungsverzeichnis

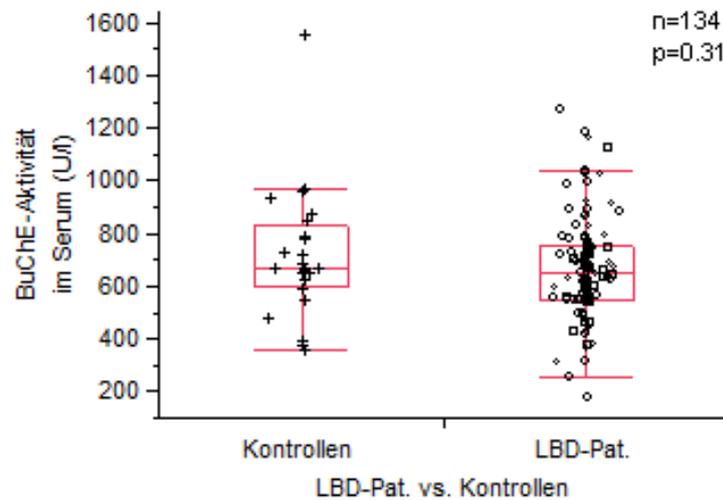


Abbildung A.11.: zu Kap. 3.3.2 auf S. 43. Vergleich der BuChE-Aktivität im Serum von LBD-Patienten und Kontrollen. Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der BuChE-Aktivität im Serum. Zur Kalkulation wurde der Wilcoxon-Rangsummen-Test eingesetzt. (+ Kontrollen, ○ PDND-Patienten, ◇ PDD-Patienten, □ DLB-Patienten).

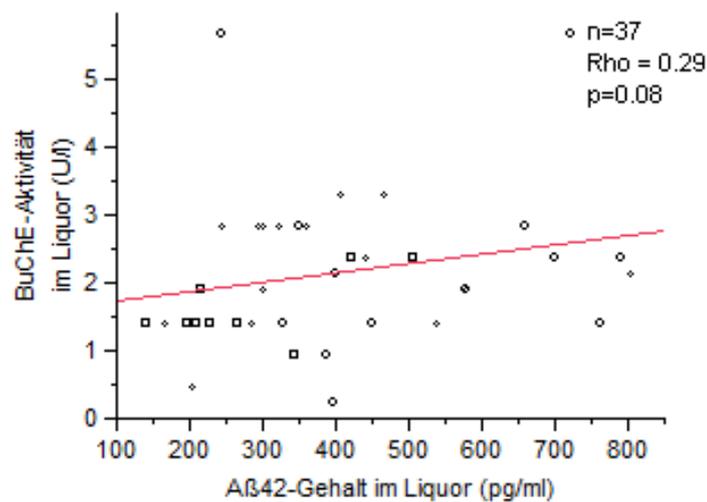


Abbildung A.12.: zu Kap. 3.4.1 auf S. 44. BuChE-Aktivität und Aβ42-Gehalt im Liquor von LBD-Patienten. Es zeigte sich eine tendenziell positive Korrelation. Zur Kalkulation wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient eingesetzt. (○ PDND-Patienten, ◇ PDD-Patienten, □ DLB-Patienten).

A. Abbildungsverzeichnis

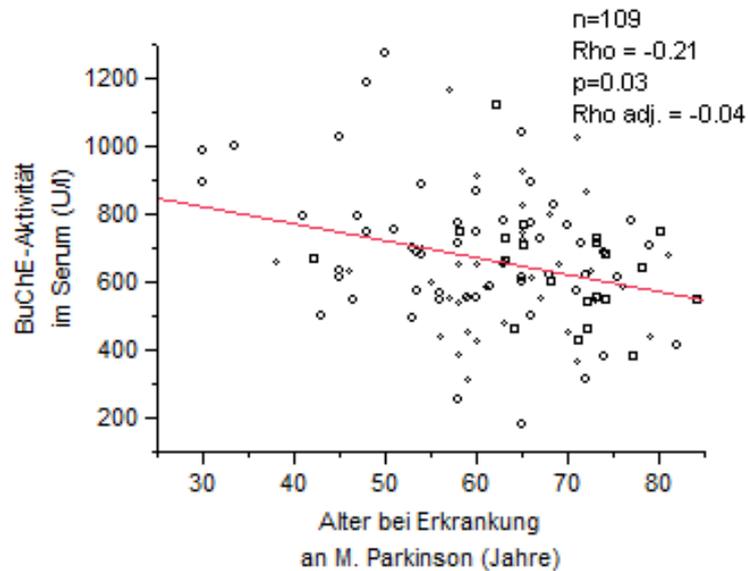


Abbildung A.13.: zu Kap. 3.4.2 auf S. 44. BuChE-Aktivität im Serum und Alter bei Erkrankung an M. Parkinson. Die zwei Variablen korrelierten signifikant negativ miteinander. Die Berechnung des p-Werts wurde mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. Der Effekt war stark durch die Kovariable „Alter“ beeinflusst. Rho adj. gibt den Rho-Wert nach Alterskorrektur an. (○ PDND-Patienten, ◇ PDD-Patienten, □ DLB-Patienten).

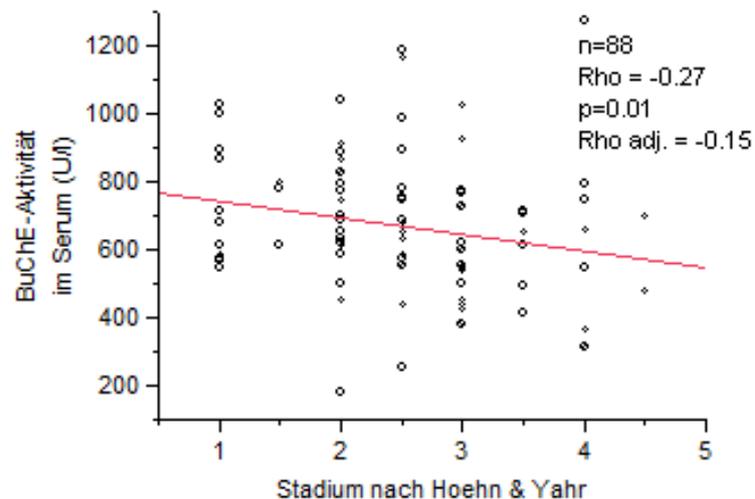


Abbildung A.14.: zu Kap. 3.4.2 auf S. 44. BuChE-Aktivität im Serum und Stadium nach Hoehn & Yahr bei Parkinson-Patienten. Die zwei Variablen korrelierten signifikant negativ miteinander. Der p-Wert wurde mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten berechnet. Dieser Effekt war stark durch die Kovariable „Alter“ beeinflusst. Rho adj. gibt den Rho-Wert nach Alterskorrektur an. (○ PDND-Patienten, ◇ PDD-Patienten).

A. Abbildungsverzeichnis

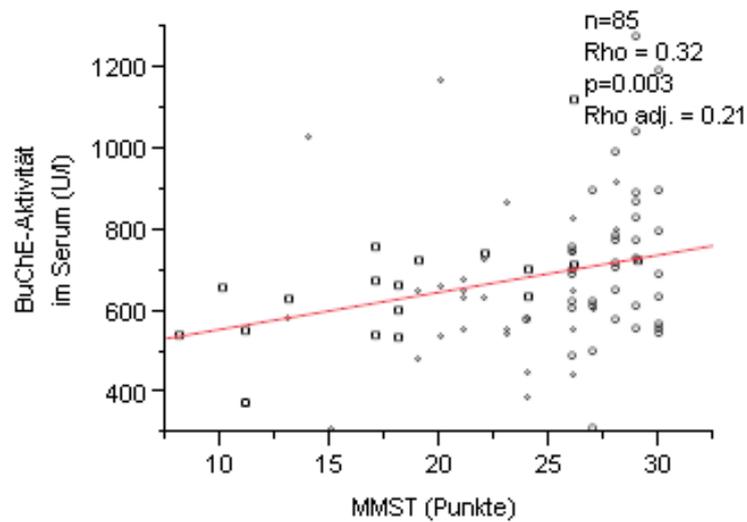


Abbildung A.15.: zu Kap. 3.4.2 auf S. 45. BuChE-Aktivität im Serum und MMST bei LBD-Patienten. Die zwei Variablen korrelierten signifikant positiv miteinander. Die Berechnung des p-Werts wurde mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. Dieser Zusammenhang war auch nach Alterskorrektur nachweisbar (Rho adj.). (○ PDND-Patienten, ◇ PDD-Patienten, □ DLB-Patienten).

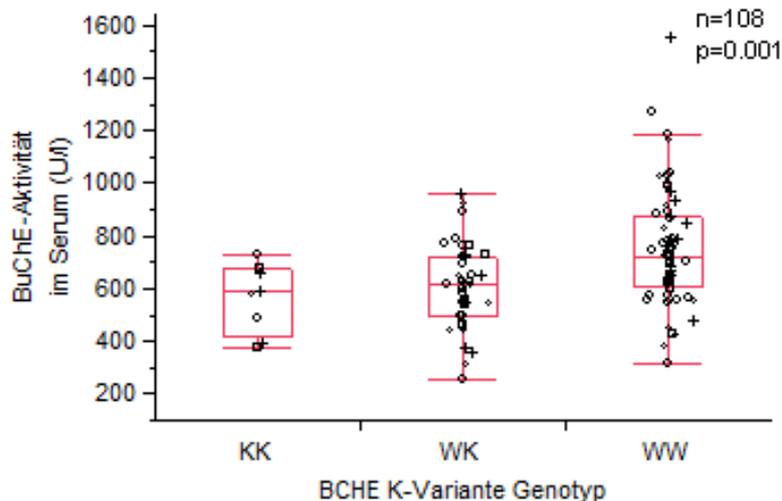


Abbildung A.16.: zu Kap. 3.6.1 auf S. 46. Assoziation zwischen *BCHE* K-Variante und BuChE-Aktivität im Serum im Gesamtkollektiv. Träger mindestens eines K-Allels wiesen eine signifikant niedrigere BuChE-Aktivität im Serum auf als homozygote Träger des Wildtyp-Allels. Für die Berechnung wurde der Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test verwendet. (+ Kontrollen, ○ PDND-Patienten, ◇ PDD-Patienten, □ DLB-Patienten).

A. Abbildungsverzeichnis

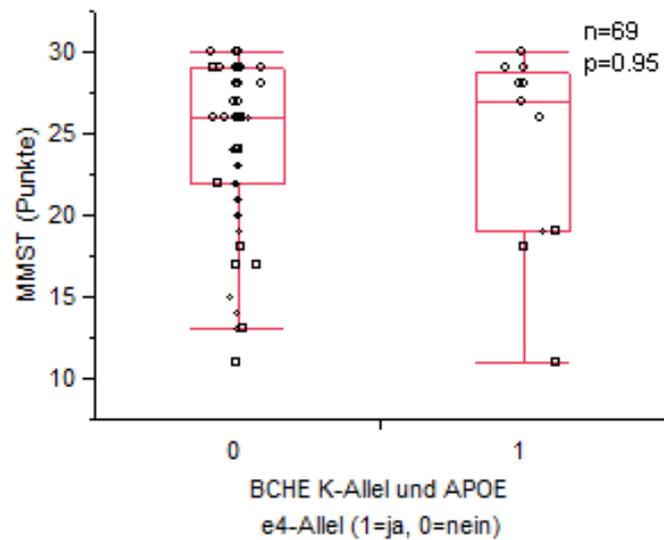


Abbildung A.17.: zu Kap. 3.8 auf S. 47. Keine Assoziation zwischen der Kombination aus *BCHE* K-Variante und *APOE* ϵ 4-Allel und dem MMST bei LBD-Patienten. Der p-Wert wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test berechnet. (○ PDND-Patienten, ◇ PDD-Patienten, □ DLB-Patienten).

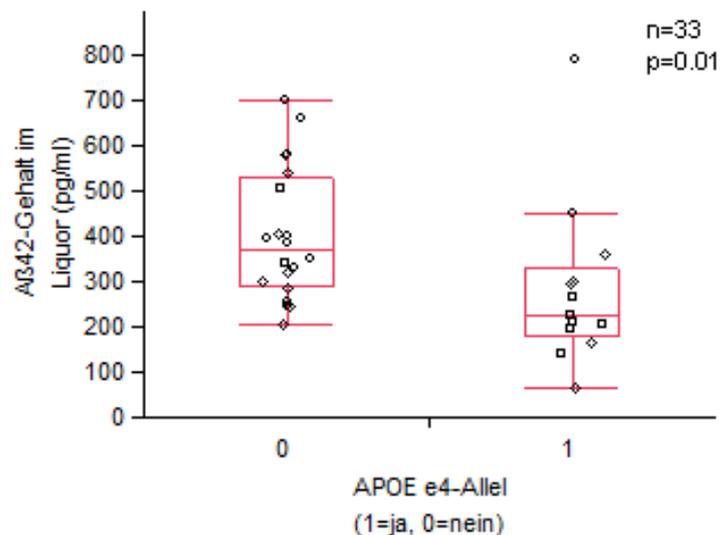


Abbildung A.18.: zu Kap. 3.9 auf S. 48. *APOE* ϵ 4-Allel und A β 42-Gehalt im Liquor bei LBD-Patienten. Träger von mindestens einem *APOE* ϵ 4-Allel wiesen signifikant niedrigere A β 42-Werte im Liquor auf als Nichtträger. Der p-Wert wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test berechnet. (○ PDND-Patienten, ◇ PDD-Patienten, □ DLB-Patienten).

A. Abbildungsverzeichnis

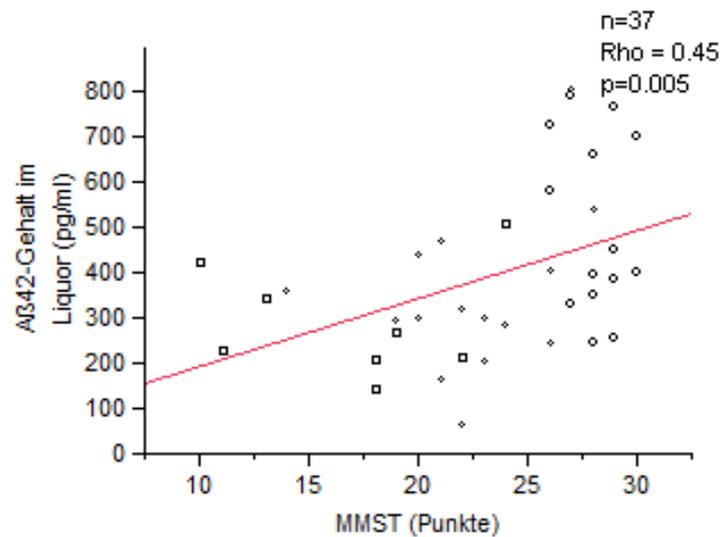


Abbildung A.19.: zu Kap. 3.9 auf S. 48. Korrelation zwischen Aβ42-Gehalt im Liquor und MMST bei LBD-Patienten. Der Aβ42-Gehalt im Liquor korrelierte signifikant positiv mit dem MMST. Die Kalkulation erfolgte mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten. (○ PDND-Patienten, ◇ PDD-Patienten, □ DLB-Patienten).

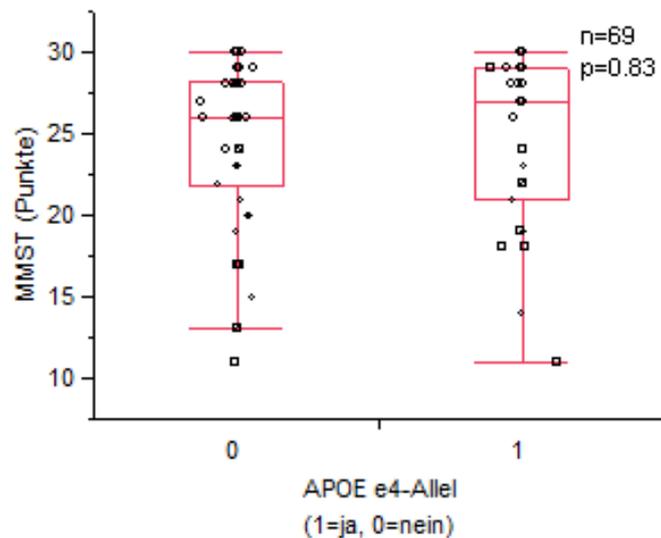


Abbildung A.20.: zu Kap. 3.9 auf S. 48. APOE ε4-Allel und MMST bei LBD-Patienten. Die beiden Variablen waren nicht signifikant miteinander assoziiert. Der p-Wert wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test berechnet. (○ PDND-Patienten, ◇ PDD-Patienten, □ DLB-Patienten).

B. Tabellenverzeichnis

B.1. Materialteil

Tabelle B.1.: zu Kap. 2.3.1 auf S. 26. Chemikalien, Enzyme und Hersteller.

1,5-Bis-(4-allyldimethylammoniumphenyl)- pentan-3-on-Dibromid (BW 284c51)	Sigma-Aldrich
Acetylthiocholinjodid (ATCHJ)	Sigma-Aldrich
Agarose SeaKem LE	Lanza
Aqua bidest Li Chrosolv	Merck
BigDye Terminator V3.1 cycle sequencing	Applied Biosystems
Borat	Merck
Bromphenolblau	Merck
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Promega
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich
DNA-Leiter 100 bp	Fermentas
DNA-Polymerase GoTaq 5 U/ μ l	Promega
EDTA	Merck
Eserine Hemisulfat Salz	Sigma-Aldrich
Ethanol p.a.	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Exonuclease I (Exo I) 20 U/ μ l	NEB
10x Exonuclease I-Puffer	NEB
Formamid	Applied Biosystems
Gene Scan-120 LIZ Size Standard	Applied Biosystems
Glycerol	Roth
Hha I 10 U/ μ l	Fermentas
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Promega
Natriumacetat	Roth
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
5x PCR-Puffer GoTaq farblos und grün	Promega
Phosphorsäure (H_3PO_4), 85%ig	Merck
5x Sequenzier-Puffer	Applied Biosystems
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) 1 U/ μ l	Promega

B. Tabellenverzeichnis

SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	Applied Biosystems
10x Tango-Puffer	Fermentas
TrisBase	Roth
Xylencynol	Merck

Tabelle B.2.: zu Kap. 2.3.3 auf S. 28. Ausschnitt aus der genomischen Sequenz reverse für humane BCHE (NM_000055). Zahlenangabe einfach durchnummeriert. Die Stellen, an welchen sich die Primer der *BCHE* K-Variante (rs1803274) anlagern, sind durch schräggestellte Buchstaben gekennzeichnet. Kleinbuchstaben stehen für Intron-Regionen, Großbuchstaben stehen für Exon-Regionen.

```
tataaactca ttttccattt tatatgttat acgttatata aattatatat 166974198
acattatgtg cattttcaca taatctgtaa agattttatt aaaatctctt 166974148
ttcaggcaaa gcgagctaata aacaaataat aaagaataaa taaagaaaat 166974098
aatgctgtac tgtgtagtta gagaaaatgg cttttgtatt cgaaattatt 166974048
tttcagttaa tgaaacagat aaaaattttg attaatacaa cttattccat 166973998
attttacagG AAATATTGAT GAAGCAGAAAT GGGAGTGGAA AGCA GGATTC 166973948
CATCGCTGGA ACAATTACAT GATGGACTGG AAAAAATCAAT TTAACGATTA 166973898
CACTAGCAAG AAAGAAAAGTT GTGTGGGTCT CTAATTAATA GATTTACCCCT 166973848
TTATAGAACA TATTTTCCTT TAGATCAAGG CAAAAATATC AGGAGCTTTT 166973798
TTACACACCT ACTAAAAAAG TTATTATGTA GCTGAAACAA AAATGCCAGA 166973748
AGGATAATAT TGATTCCTCA CATCTTTAAC TTAGTATTTT ACCTAGCATT 166973698
TCAAAACCCA AATGGCTAGA ACGTGTTTAA TTAAATTTCA CAATATAAAG 166973648
TTCTACAGTT AATTATGTGC ATATTA AAAAC AATGGCCTGG TTCAATTTCT 166973598
TTCTTTCCTT AATAAATTTA AGTTTTTCCC CCCAAAATTA TCAGTGCTCT 166973548
GCTTTTAGTC ACGTGATTTT TCATTACCAC TCGTAAAAAAG GTATCTTTTTT 166973498
TAAATGAATT AAATATTGAA ACACTGTACA CCATAGTTTA CAATATTATG 166973448
TTTCCTAATT AAAATAAGAA TTGAATGTCA ATATGAGATA TTAATAAAG 166973398
CACAGAAAAT CAttggtctc tttgtttttt atataaaggc aagaaagaat 166973348
cttaaaatga gaggctcagc cactttaaaa caccttataa tagaaacaga 166973298
atgctgctac ca
```

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.3.: zu Kap. 2.3.3 auf S. 28. Ausschnitt aus der genomischen Sequenz reverse für humane BCHE (NM_000055). Zahlenangabe einfach durchnummeriert. Die Stellen, an welchen sich die Primer der *BCHE* A-Variante (rs1799807) anlagern, sind durch schräggestellte Buchstaben gekennzeichnet. Kleinbuchstaben stehen für Intron-Regionen, Großbuchstaben stehen für Exon-Regionen.

gtaattatca	tcaataaagt	ataatatgct	atatgcagaa	ggcttataaa	167031548
acattatact	tacctctctt	tcagAAATCA	ATATGCATAG	CAAAGTCACA	167031498
ATCATATGCA	TCAGATTTCT	CTTTTGGTTT	CTTTTGCTCT	GCATGCTTAT	167031448
TGGGAAGTCA	CATACTGAAG	ATGACATCAT	AATTGCAACA	AAGAATGGAA	167031398
AAGTCAGAGG	GATGAACTTG	ACAGTTTTTG	GTGGCA ^{CGGT}	^{AA} CAG ^{CC} TTT	167031348
^{CTT} GGA ATTC	CCTATGCACA	GCCACCTCTT	GGTAGACTTC	GATTCAAAAA	167031298
GCCACAGTCT	CTGACCAAGT	GGTCTGATAT	TTGGAATGCC	ACAAAATATG	167031248
CAAATT ^{CTTG}	^{CTG} TCAGAAC	^{ATAG} ATCAAA	GTTTTCCAGG	CTTCCATGGA	167031198
TCAGAGAT ^{GT}	^{GGA} ACCCAAA	^{CACTG} ACCTC	AGTGAAGACT	GTTTATATCT	167031148
AAATGTATGG	ATTCCAGCAC	CTAAACCAAA	AAATGCCACT	GTATTGATAT	167031098
GGATTTATGG	TGGTGGTTTT	CAAACCTGGAA	CATCATCTTT	ACATGTTTAT	167031048
GATGGCAAGT	TTCTGGCTCG	GGTTGAAAGA	GTTATTGTAG	TGTCAATGAA	167030998
CTATAGGGTG	GGTGCCCTAG	GATTCTTAGC	TTTGCCAGGA	AATCCTGAGG	167030948
CTCCAGGGAA	CATGGGTTTA	TTTGATCAAC	AGTTGGCTCT	TCAGTGGGTT	167030898
CAAAAAAATA	TAGCAGCCTT	TGGTGGAAAT	CCTAAAAGTG	TAACCTCTCTT	167030848
TGGAGAAAGT	GCAGGAGCAG	CTTCAGTTAG	CCTGCATTTG	CTTTCTCCTG	167030798
GAAGCCATTC	ATTGTTCCACC	AGAGCCATTC	TGCAAAGTGG	ATCCTTTAAT	167030748
GCTCCTTGGG	CGGTAACATC	TCTTTATGAA	GCTAGGAACA	GAACGTTGAA	167030698
CTTAGCTAAA	TTGACTGGTT	GCTCTAGAGA	GAATGAGACT	GAAATAATCA	167030648
AGTGTCTTAG	AAATAAAGAT	CCCCAAGAAA	TTCTTCTGAA	TGAAGCATTT	167030598
GTTGTCCCCT	ATGGGACTCC	TTTGTGAGTA	AACTTTGGTC	CGACCGTGGA	167030548
TGGTGATTTT	CTCACTGACA	TGCCAGACAT	ATTACTTGAA	CTTGGACAAT	167030498
TTAAAAAAC	CCAGATTTTG	GTGGGTGTTA	ATAAAGATGA	AGGGACAGCT	167030448
TTTTTAGTCT	ATGGTGCTCC	TGGCTTCAGC	AAAGATAACA	ATAGTATCAT	167030398
AACTAGAAAA	GAATTCAGG	AAGGTTTAAA	AATATTTTTT	CCAGGAGTGA	167030348
GTGAGTTTGG	AAAGGAATCC	ATCCTTTTTT	ATTACACAGA	CTGGGTAGAT	167030298
GATCAGAGAC	CTGAAAATA	CCGTGAGGCC	TTGGGTGATG	TTGTTGGGGA	167030248
TTATAATTTT	ATATGCCCTG	CCTTGGAGTT	CACCAAGAAG	TTCTCAGAAT	167030198
GGGGAAATAA	TGCCTTTTTT	TACTATTTTG	AACACCGATC	CTCCAAACTT	167030148
CCGTGGCCAG	AATGGATGGG	AGTGATGCAT	GGCTATGAAA	TTGAATTTGT	167030098
CTTTGGTTTA	CCTCTGAAAA	GAAGAGATAA	TTACACAAAA	GCCGAGGAAA	167030048
TTTTGAGTAG	ATCCATAGTG	AAACGGTGGG	CAAATTTTGC	AAAATATGGg	167029998
taagtgctga	tttttgtcat	tgttctctgg	cttggtttga	tccgttttgc	167029948
ttagctttgc	ttggctctctg	gggtagactt	tagtataaag	acacagaaat	167029898

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.4.: zu Kap. 2.3.3 auf S. 28. Ausschnitt aus der genomischen Sequenz für humanes *APOE* (NM_000041). Zahlenangabe einfach durchnummeriert. Die Stellen, an welchen sich die Primer anlagern, sind durch schräggestellte Buchstaben gekennzeichnet. Kleinbuchstaben stehen für Intron-Regionen, Großbuchstaben stehen für Exon-Regionen.

ctgcatctgt	ctctgtctcc	ttctctcggc	ctctgccccg	ttccttctct	50103528
ccctcttggg	tctctctggc	tcatacccat	ctcgcccgcc	ccatcccagc	50103578
ccttctcccc	gcctcccact	gtgcgacacc	ctcccgcct	ctcggccgca	50103628
gGGCGTGAT	GGACGAGACC	ATGAAGGAGT	TGAAGGCCTA	CAAATCGGAA	50103678
CTGGAGGAAC	AACTGACCCC	GGTGGCGGAG	<i>GAGACGCGGG</i>	<i>CACGGCTGTC</i>	50103728
<i>CAAGGA</i> GCTG	CAGGCGGCGC	AGGCCCGGCT	GGGCGCGGAC	ATGGAGGACG	50103778
TGTGCGGCCG	CCTGGTGCAG	TACCGCGGCG	AGGTGCAGGC	CATGCTCGGC	50103828
CAGAGCACCG	AGGAGCTGCG	GGTGCGCCTC	GCCTCCCACC	TGCGCAAGCT	50103878
GCGTAAGCGG	CTCCTCCGCG	ATGCCGATGA	CCTGCAGAAG	CGCCTGGCA <i>G</i>	50103928
<i>TGTACCAGGC</i>	<i>CGGGGCCCGC</i>	<i>GAGGG</i> CGCCG	AGCGCGGCCT	CAGCGCCATC	50103978
CGCGAGCGCC	TGGGGCCCCT	GGTGAACAG	GGCCGCGTGC	GGGCCGCCAC	50104028
TGTGGGCTCC	CTGGCCGGCC	AGCCGCTACA	GGAGCGGGCC	CAGGCCTGGG	50104078
GCGAGCGGCT	GCGCGCGCGG	ATGGAGGAGA	TGGGCAGCCG	GACCCGCGAC	50104128
CGCCTGGACG	AGGTGAAGGA	GCAGGTGGCG	GAGGTGCGCG	CCAAGCTGGA	50104178
GGAGCAGGCC	CAGCAGATAC	GCCTGCAGGC	CGAGGCCTTC	CAGGCCCGCC	50104228
TCAAGAGCTG	GTTTCGAGCCC	CTGGTGAAG	ACATGCAGCG	CCAGTGGGCC	50104278
GGGCTGGTGG	AGAAGGTGCA	GGCTGCCGTG	GGCACCAGCG	CCGCCCCTGT	50104328
GCCCAGCGAC	AATCACTGAA	CGCCGAAGCC	TGCAGCCATG	CGACCCCACG	50104378
CCACCCCGTG	CCTCCTGCCT	CCGCGCAGCC	TGCAGCGGGA	GACCCTGTCC	50104428
CCGCCCAGC	CGTCTCCTG	GGGTGGACCC	TAGTTTAATA	AAGATTACCC	50104478
AAGTTTCACG	CActctgctgg	cctccccctg	tgatttcctc	taagccccag	50104528
cctcagtttc	tctttctgcc	cacatactgg	ccacacaatt	ctcagcccc	50104578
tcctctccat	ct				

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.5.: zu Kap. 2.3.4 auf S. 28. Sequenzen der PCR- und SNaPshot Primer für die *BCHE*- und die *APOE*-Genotypisierung. Der SNaPshot Primer der *BCHE* A-Variante wurde mit einem Poly-T-Schwanz versehen, um diesen im Sequenzierer besser vom SNaPshot Primer der *BCHE* K-Variante differenzieren zu können.

Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')	Fragmentlänge (bp)
<i>BCHE</i>		
K-Variante (rs1803274)		
Forward	TTC AGG CAA AGC GAG CTA A	241
Reverse	AAT TGA TTT TTC CAG TCC ATC A	
SNaP	TGC TTT CCA CTC CCA TTC TG	
<i>BCHE</i>		
A-Variante (rs1799807)		
Forward	CGG TAA CAG CCT TTC TTG GA	192
Reverse	GGT CAG TGT TTG GGT TCC AC	
SNaP	TTT TTT TTT TTT CTT GCT GTC AGA ACA TAG	
<i>APOE</i>		
Forward	TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A	244
Reverse	ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC	

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.6.: zu Kap. 2.3.6 auf S. 29. Geräte und Hilfsmittel.

Abi Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Digitales pH-Meter	WTW
Einfachpipetten	Gilson
Einfachpipetten	Eppendorf
Eismaschine ZBE	Ziegra Eismaschinen
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Erlenmeyer-Kolben	Schott
Feinwaage, Sartorius research	Sartorius GmbH
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	New Brunswick
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
Kolorimeter Spectra II	SLT
Kühlschrank	Bosch
Kühlschrank	Dometic Medical Systems
Kühlschrank	Liebherr
Magnetrührer MR3000	Heidolph
Mehrkanalpipette	SLT
Mikrowellenherd	Panasonic
Multipette	Eppendorf
Nanodrop Spectrophotometer ND1000	Peqlab Biotechnologie GmbH
Plexiglaskämme	Peqlab Biotechnologie GmbH
Rühr-, Heizgerät, Typ MR 02	Heidolph
Schüttler, Micromix 5	DPC Biermann GmbH
Spannungsquelle E835 (300 V – 500 mA)	Consort
Thermocycler DNA-Engine DYAD	Bio-Rad
UV-Tisch	Vilber Lourmat
Vortexer	Bender & Hobein AG
Waage Explorer	Ohaus
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

Tabelle B.7.: zu Kap. 2.3.6 auf S. 29. Verbrauchsmaterialien.

Combitips für Multipette	Eppendorf
Einmalküvetten	Plastibrand
Latexhandschuhe DermaClean TM	Ansell
Mikrotiterplatten Greiner 655 101	Greiner
Nitrilhandschuhe Safeskin Purple Nitrile	Kimberly Clark
Parafilm	Pechiney
Pipettenspitzen	Eppendorf
96-well PCR-Platten und Plattensepten	Peqlab Biotechnologie GmbH
96-well Platten für Sequenzierer	Thermo Scientific
Reaktionsgefäße	Eppendorf
8er-Tube-Strips 0,2 ml und Deckel	Peqlab Biotechnologie GmbH

B.2. Methodenteil

Tabelle B.8.: zu Kap. 2.4.2 auf S. 32. PCR-Ansatz *BCHE*.

DNA 10 ng/ μ l	2,0 μ l
Primer Forward A- oder K-Variante 10 μ M	0,4 μ l
Primer Reverse A- oder K-Variante 10 μ M	0,4 μ l
dNTPs jeweils 10 mM	0,4 μ l
MgCl ₂ 25 mM	2,4 μ l
Taq-Polymerase 5 U/ μ l	0,1 μ l
5x PCR-Puffer farblos	4,0 μ l
H ₂ O	10,3 μ l
Gesamtvolumen	20,0 μ l

Tabelle B.9.: zu Kap. 2.4.2 auf S. 34. Reaktionsansatz für die Aufreinigung des *BCHE*-PCR-Produkts.

PCR-Produkt <i>BCHE</i> A-Variante	4,0 μ l
PCR-Produkt <i>BCHE</i> K-Variante	4,0 μ l
SAP 1 U/ μ l	2,0 μ l
Exo I-Enzym 2 U/ μ l	0,1 μ l
Exo I-Puffer	0,4 μ l
H ₂ O	0,5 μ l
Gesamtvolumen	11,0 μ l

Tabelle B.10.: zu Kap. 2.4.2 auf S. 34. *BCHE*-SNaPshot-Reaktionsansatz.

Aufgereinigtes PCR-Produkt (DNA-Abschnitte mit SNP <i>BCHE</i> A und <i>BCHE</i> K)	3,0 μ l
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	2,0 μ l
SNaPshot-Primer <i>BCHE</i> A 4 μ M	0,5 μ l
SNaPshot-Primer <i>BCHE</i> K 4 μ M	0,5 μ l
H ₂ O	4,0 μ l
Gesamtvolumen	10,0 μ l

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.11.: zu Kap. 2.4.3 auf S. 35. Ansatz zur kolorimetrischen Bestimmung der BuChE-Aktivität im Liquor.

	well 1–3 Gesamtaktivität	well 4–6 BuChE-Aktivität	well 7–9 „Blank“
Liquor unverdünnt	20 μ l	20 μ l	20 μ l
Puffer (0,1 M K_2HPO_4)	160 μ l	110 μ l	110 μ l
DTNB	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Inhibitor	–	50 μ l BW 284c51	50 μ l Eserine
Substrat ATCHJ	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Gesamtvolumen	280 μ l	280 μ l	280 μ l

Tabelle B.12.: zu Kap. 2.4.3 auf S. 35. Ansatz zur kolorimetrischen Bestimmung der BuChE-Aktivität im Serum.

	well 1–3 Gesamtaktivität	well 4–6 BuChE-Aktivität	well 7–9 „Blank“
Serum 1:10	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Puffer (0,1 M K_2HPO_4)	170 μ l	120 μ l	120 μ l
DTNB	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Inhibitor	–	50 μ l BW 284c51	50 μ l Eserine
Substrat ATCHJ	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Gesamtvolumen	280 μ l	280 μ l	280 μ l

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.13.: zu Kap. 2.4.4 auf S. 38. PCR-Ansatz zur *APOE*-Genotypisierung.

DMSO	1,4 μ l
DNA 10 ng/ μ l	2,0 μ l
Primer Forward 10 μ M	0,4 μ l
Primer Reverse 10 μ M	0,4 μ l
dNTPs jeweils 10 mM	0,4 μ l
MgCl ₂ 25 mM	2,4 μ l
Taq-Polymerase	0,1 μ l
5x Puffer grün	4,0 μ l
H ₂ O	8,9 μ l
Gesamtvolumen	20,0 μ l

Tabelle B.14.: zu Kap. 2.4.4 auf S. 38. Reaktionsansatz für den *APOE*-Restriktionsverdau.

H ₂ O	1,8 μ l
Hha I 10 U/ μ l	0,7 μ l
10x Tango-Puffer	2,5 μ l
PCR-Produkt	20,0 μ l
Gesamtvolumen	25,0 μ l

Tabelle B.15.: zu Kap. 2.4.4 auf S. 39. Ansatz für die *APOE*-Sequenzierreaktion.

BigDye	1,5 μ l
Sequenzierpuffer	1,0 μ l
Primer (10 μ M)	1,0 μ l
PCR-Produkt	4,0 μ l
H ₂ O	2,5 μ l
Gesamtvolumen	10,0 μ l

B.3. Ergebnisteil

Tabelle B.16.: zu Kap. 3.1 auf S. 42. Demographische und klinische Daten von LBD-Patienten und Kontrollpersonen, Median (Spannweite). Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test bzw. dem Kruskal-Wallis-Test berechnet. *p<0.05 im Vergleich zu PDND, °p<0.05 im Vergleich zu Kontrollpersonen.

	PDND	PDD/DLB	Kontrollen	p-Wert
<i>Anzahl (männlich/weiblich)</i>	55 (37/18)	62 (33/29)	31 (18/13)	0.30
<i>Alter bei Untersuchung (Jahre)</i>	68 (34–84)	73.5 (50–85) *°	67 (47–84)	0.002
	← 70 (34–85) →		67 (47–84)	0.15
<i>Alter bei Erkrankung an M. Parkinson (Jahre)</i>	60 (30–82)	65.5 (38–84)	–	0.001
<i>Dauer der Parkinson- Erkrankung (Jahre)</i>	5 (0.5–25)	5 (0.5–25)	–	0.91
<i>Stadium nach Hoehn & Yahr</i>	2.5 (1–4)	3 (1–4.5)	–	0.03
<i>Alter bei Erkrankung an Demenz (Jahre)</i>	–	71 (42–84)	–	–
<i>Dauer der Demenz- krankheit (Jahre)</i>	–	2 (0.5–17)	–	–
<i>MMST (Punkte)</i>	28 (24–30)	21 (8–29)*°	30 (23–30)	<0.0001
<i>Aβ42-Gehalt im Liquor (pg/ml)</i>	425 (245–790)	300 (65–804)	–	0.001

Tabelle B.17.: zu Kap. 3.2.1 auf S. 42 und Kap. 3.2.2 auf S. 42. Assoziation zwischen BuChE-Aktivität im Liquor bzw. Serum und Geschlecht im Gesamtkollektiv, Median (Spannweite). Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test berechnet.

	Gesamtkollektiv		p-Wert
	Männer	Frauen	
<i>BuChE-Aktivität im Liquor (U/l)/ Anzahl</i>	1.89 (0.24–5.66)/ 82	1.41 (0.47–3.30)/ 57	0.007
<i>BuChE-Aktivität im Serum (U/l)/ Anzahl</i>	650.45 (179.11–1555.43)/ 77	669.31 (311.09–1187.78)/ 57	0.54

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.18.: zu Kap. 3.2.1 auf S. 42 und Kap. 3.2.2 auf S. 42. Korrelation zwischen BuChE-Aktivität im Liquor bzw. Serum und Alter bei Untersuchung im Gesamtkollektiv. Die p-Werte wurden mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten berechnet.

Gesamtkollektiv		Rho	p-Wert
<i>BuChE-Aktivität im Liquor (U/l)</i>	<i>Alter bei Untersuchung (Jahre)</i>	-0.05	0.58
<i>BuChE-Aktivität im Serum(U/l)</i>		-0.22	0.01

Tabelle B.19.: zu Kap. 3.3.1 auf S. 43 und Kap. 3.3.2 auf S. 43. Vergleich der BuChE-Aktivität im Liquor bzw. Serum von LBD-Patienten und Kontrollpersonen, Median (Spannweite). Da Männer bei der Untersuchung der BuChE-Aktivität im Liquor im Gesamtkollektiv signifikant höhere Werte aufwiesen, wurden die Liquor-Aktivitätswerte beim Vergleich von LBD-Patienten und Kontrollen ebenfalls getrennt für das Geschlecht untersucht. Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test berechnet.

	LBD-Patienten	Kontrollen	p-Wert
<i>BuChE-Aktivität im Liquor (U/l)/ Anzahl</i>			
Männer und Frauen	1.41 (0.24–5.66)/ 111	1.65 (0.24–3.54)/ 28	0.57
Männer	2.12 (0.24–5.66)/ 65	1.89 (0.24–3.54)/ 17	0.56
Frauen	1.41 (0.47–3.30)/ 46	1.41 (0.94–2.83)/ 11	0.70
<i>BuChE-Aktivität im Serum (U/l)/ Anzahl</i>			
Männer und Frauen	650.45 (179.11–1272.62)/ 110	669.31 (358.22–1555.45)/ 24	0.31

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.20.: zu Kap. 3.4.1 auf S. 43 und Kap. 3.4.2 auf S. 44. Korrelation zwischen BuChE-Aktivität im Liquor bzw. Serum und Klinik des Parkinson-Syndroms. Die p-Werte wurden mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten berechnet. $Rho_{adj.}$ gibt den Rho-Wert nach Alterskorrektur an.

LBD-Patienten		Rho ($Rho_{adj.}$)	p-Wert
<i>Alter bei Erkrankung an M. Parkinson (Jahre)</i>			
Männer und Frauen		-0.15	0.12
Männer		-0.23	0.07
Frauen		0.08	0.61
<i>BuChE-Aktivität im Liquor (U/l)</i>	<i>Dauer der Parkinson-Erkrankung (Jahre)</i>		
	Männer und Frauen	0.16	0.09
	Männer	0.16	0.20
	Frauen	0.09	0.56
<i>Hoehn & Yahr-Stadium</i>			
Männer und Frauen		0.01	0.93
<i>Alter bei Erkrankung an M. Parkinson (Jahre)</i>			
Männer und Frauen		-0.21 (-0.04)	0.03
<i>BuChE-Aktivität im Serum (U/l)</i>	<i>Dauer der Parkinson-Erkrankung (Jahre)</i>		
	Männer und Frauen	0.05	0.61
	<i>Hoehn & Yahr-Stadium</i>		
Männer und Frauen		-0.27 (-0.15)	0.01

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.21.: zu Kap. 3.4.1 auf S. 44 und Kap. 3.4.2 auf S. 45. Assoziation zwischen BuChE-Aktivität im Liquor bzw. Serum und Demenz bei LBD-Patienten. Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test berechnet.

	← LBD-Patienten →			p-Wert
	nicht-dement	← dement →		
	PDND	PDD	DLB	
<i>BuChE-Aktivität</i>	1.41 (0.24–5.66)	← 1.41 (0.24–3.30) →		0.53
<i>im Liquor (U/l)</i>	1.41 (0.24–5.66)	1.89 (0.47–3.30)	–	0.93
<i>BuChE-Aktivität</i>	688.16 (179.11–1272.62)	← 631.60 → (311.09–1168.93)		0.06
<i>im Serum (U/l)</i>	688.16 (179.11–1272.62)	612.75 (311.09–1168.93)	–	0.10

Tabelle B.22.: zu Kap. 3.4.1 auf S. 44 und Kap. 3.4.2 auf S. 45. Korrelation zwischen BuChE-Aktivität im Liquor bzw. Serum und Klinik/Markern der Demenz. Die p-Werte wurden mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten berechnet. $Rho_{adj.}$ gibt den Rho-Wert nach Alterskorrektur an.

Demente LBD-Patienten (PDD, DLB)		Rho ($Rho_{adj.}$)	p-Wert
<i>BuChE-Aktivität</i>	<i>Alter bei Erkrankung an Demenz (Jahre)</i>	-0.09	0.37
<i>im Liquor (U/l)</i>	<i>Dauer der Demenzkrankheit (Jahre)</i>	0.05	0.70
<i>BuChE-Aktivität</i>	<i>Alter bei Erkrankung an Demenz (Jahre)</i>	-0.11	0.42
<i>im Serum (U/l)</i>	<i>Dauer der Demenzkrankheit (Jahre)</i>	-0.05	0.71
Alle LBD-Patienten (PDND, PDD, DLB)			
<i>BuChE-Aktivität</i>	<i>MMST (Punkte)</i>	0.09	0.40
<i>im Liquor (U/l)</i>	<i>Aβ42-Gehalt im Liquor (pg/ml)</i>	0.29	0.08
<i>BuChE-Aktivität</i>	<i>MMST (Punkte)</i>	0.32 (0.21)	0.003
<i>im Serum (U/l)</i>	<i>Aβ42-Gehalt im Liquor (pg/ml)</i>	0.13	0.42

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.23.: zu Kap. 3.5 auf S. 45 und Kap. 3.6 auf S. 46. Genotyp- und Allelhäufigkeiten der *BCHE* K-Variante und der *BCHE* A-Variante bei LBD-Patienten und Kontrollen.

	LBD-Patienten	%	Kontrollen	%
<i>BCHE K-Variante</i>				
Allel W	130	76	47	76
Allel K	42	24	15	24
Gesamt	172	100	62	100
Genotyp WW	49	57	19	61
Genotyp WK	32	37	9	29
Genotyp KK	5	6	3	10
Gesamt	86	100	31	100
<i>BCHE A-Variante</i>				
Allel W	170	99	59	95
Allel A	2	1	3	5
Gesamt	172	100	62	100
Genotyp WW	84	98	28	90
Genotyp WA	2	2	3	10
Genotyp AA	0	0	0	0
Gesamt	86	100	31	100

Tabelle B.24.: zu Kap. 3.5.1 auf S. 45. Assoziation zwischen *BCHE* K-Variante und Klinik bei LBD-Patienten. Die Berechnungen erfolgten mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test.

	LBD-Patienten	p-Wert
<i>BCHE K-Allel</i>	<i>Alter bei Erkrankung an M. Parkinson (Jahre)</i>	0.1
	<i>Dauer der Parkinson-Erkrankung (Jahre)</i>	0.89
	<i>Stadium nach Hoehn & Yahr</i>	0.45
	<i>Alter bei Erkrankung an Demenz (Jahre)</i>	0.49
	<i>Dauer der Demenzkrankheit (Jahre)</i>	0.83
	<i>MMST (Punkte)</i>	0.24

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.25.: zu Kap. 3.6 auf S. 46. Assoziation zwischen *BCHE* K-Variante und BuChE-Aktivität im Liquor bzw. Serum im Gesamtkollektiv sowie bei separater Betrachtung von LBD-Patienten und Kontrollpersonen. Die p-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet.

	Gesamtkollektiv	p-Wert
BCHE K-Allel	<i>BuChE-Aktivität im Liquor (U/l)</i>	0.15
	<i>BuChE-Aktivität im Serum (U/l)</i>	0.0001
LBD-Patienten		
BCHE K-Allel	<i>BuChE-Aktivität im Liquor (U/l)</i>	0.36
	<i>BuChE-Aktivität im Serum (U/l)</i>	0.01
Kontrollen		
BCHE K-Allel	<i>BuChE-Aktivität im Liquor (U/l)</i>	0.12
	<i>BuChE-Aktivität im Serum (U/l)</i>	0.04

Tabelle B.26.: zu Kap. 3.7 auf S. 47. Assoziation von *APOE* Genotyp und BuChE-Aktivität im Gesamtkollektiv sowie bei LBD-Patienten und Kontrollpersonen, Median (Spannweite). Die Berechnungen wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test durchgeführt. Der p-Wert gibt das Signifikanzniveau der Assoziation an.

	<i>APOE</i> ε4-Allelträger	<i>APOE</i> ε4-Allel-Nichtträger	p-Wert
<i>BuChE-Aktivität im Liquor (U/l)/ Anzahl</i>			
Gesamtkollektiv	1.65 (0.24–2.83)/ 38	1.41 (0.24–5.66)/ 73	0.70
LBD-Patienten	1.41 (0.47–2.83)/ 31	1.41 (0.24–5.66)/ 52	0.77
Kontrollen	1.89 (0.24–2.36)/ 7	1.41 (0.94–3.54)/ 21	0.79
<i>BuChE-Aktivität im Serum (U/l)/ Anzahl</i>			
Gesamtkollektiv	650.45 (254.52–1187.78)/ 39	659.88 (311.09–1555.43)/ 69	0.84
LBD-Patienten	641.03 (254.52–1187.78)/ 33	650.45 (311.09–1272.62)/ 51	0.78
Kontrollen	721.15 (395.93–970.97)/ 6	669.31 (358.22–1555.43)/ 18	0.82

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle B.27.: zu Kap. 3.9 auf S. 48. *APOE* ϵ 4-Allel und MMST im Gesamtkollektiv bzw. bei LBD-Patienten. In beiden Gruppen zeigte sich keine Assoziation zwischen den Variablen. Die Berechnungen erfolgten mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test.

	<i>APOE</i> ϵ 4-Allelträger	<i>APOE</i> ϵ 4-Allel-Nichtträger	p-Wert
<i>MMST (Punkte)</i> <i>/ Anzahl</i>			
Gesamtkollektiv	27 (11–30)/ 30	26.5 (11–30)/ 52	0.87
LBD-Patienten	27 (11–30)/ 27	26 (11–30) /42	0.83

C. Literaturverzeichnis

- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A, Kragh-Sorensen P. Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. *Arch Neurol* 2003; 60: 387–92.
- Aarsland D, Perry R, Brown A, Larsen JP, Ballard C. Neuropathology of dementia in Parkinson's disease: a prospective, community-based study. *Ann Neurol* 2005; 58: 773–6.
- Allderdice PW, Gardner HA, Galutira D, Lockridge O, LaDu BN, McAlpine PJ. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics* 1991; 11: 452–4.
- Altamirano CV, Bartels CF, Lockridge O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme. *J Neurochem* 2000; 74: 869–77.
- Alvarez-Arcaya A, Combarros O, Llorca J, Sanchez-Guerra M, Berciano J, Fernandez-Viadero C, et al. The butyrylcholinesterase K variant is a protective factor for sporadic Alzheimer's disease in women. *Acta Neurol Scand* 2000; 102: 350–3.
- Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 2008; 255 Suppl 5: 18–32.
- Apaydin H, Ahlskog JE, Parisi JE, Boeve BF, Dickson DW. Parkinson disease neuropathology: later-developing dementia and loss of the levodopa response. *Arch Neurol* 2002; 59: 102–12.
- Appleyard ME, Smith AD, Berman P, Wilcock GK, Esiri MM, Neary D, et al. Cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer type. *Brain* 1987; 110 (Pt 5): 1309–22.
- Arendt T, Bigl V, Walther F, Sonntag M. Decreased ratio of CSF acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase activity in Alzheimer's disease. *Lancet* 1984; 1: 173.
- Atack JR, May C, Kaye JA, Kay AD, Rapoport SI. Cerebrospinal fluid cholinesterases in aging and in dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 1988; 23: 161–7.
- Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Candy JM, Perry RH. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J Neurochem* 1986; 47: 263–77.
- Bartels CF, James K, La Du BN. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. *Am J Hum Genet* 1992a; 50: 1104–14.
- Bartels CF, Jensen FS, Lockridge O, van der Spek AF, Rubinstein HM, Lubrano T, et al. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am J Hum Genet* 1992b; 50: 1086–103.

C. Literaturverzeichnis

- Becher B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 2000; 29: 293–304.
- Bedlack RS, Strittmatter WJ, Morgenlander JC. Apolipoprotein E and neuromuscular disease: a critical review of the literature. *Arch Neurol* 2000; 57: 1561–5.
- Biskup S, Gerlach M, Kupsch A, Reichmann H, Riederer P, Vieregge P, et al. Genes associated with Parkinson syndrome. *J Neurol* 2008; 255 Suppl 5: 8–17.
- Bohnen NI, Kaufer DI, Hendrickson R, Ivanco LS, Lopresti BJ, Constantine GM, et al. Cognitive correlates of cortical cholinergic denervation in Parkinson's disease and parkinsonian dementia. *J Neurol* 2006; 253: 242–7.
- Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanco LS, Lopresti B, Koeppe RA, Davis JG, et al. Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo positron emission tomographic study. *Arch Neurol* 2003; 60: 1745–8.
- Boller F, Mizutani T, Roessmann U, Gambetti P. Parkinson disease, dementia, and Alzheimer disease: clinicopathological correlations. *Ann Neurol* 1980; 7: 329–35.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 197–211.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 121–34.
- Braak H, Rub U, Jansen Steur EN, Del Tredici K, de Vos RA. Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. *Neurology* 2005; 64: 1404–10.
- Buracchio T, Arvanitakis Z, Gorbien M. Dementia with Lewy bodies: current concepts. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2005; 20: 306–20.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury J P T. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 571–6.
- Corder EH, Lannfelt L, Bogdanovic N, Fratiglioni L, Mori H. The role of APOE polymorphisms in late-onset dementias. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54: 928–34.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921–3.
- Crawford F, Fallin D, Suo Z, Abdullah L, Gold M, Gauntlett A, et al. The butyrylcholinesterase gene is neither independently nor synergistically associated with late-onset AD in clinic- and community-based populations. *Neurosci Lett* 1998; 249: 115–8.
- Cummings JL. Intellectual impairment in Parkinson's disease: clinical, pathologic, and biochemical correlates. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1988; 1: 24–36.

C. Literaturverzeichnis

- Darreh-Shori T. Molecular changes of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer patients during the natural course of the disease and treatment with cholinesterase inhibitors : Insight into neurochemical mechanisms affecting the progression of the disease. 2006.
- Darreh-Shori T, Brimijoin S, Kadir A, Almkvist O, Nordberg A. Differential CSF butyrylcholinesterase levels in Alzheimer's disease patients with the ApoE epsilon4 allele, in relation to cognitive function and cerebral glucose metabolism. *Neurobiol Dis* 2006; 24: 326–33.
- Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 131–8.
- Darvesh S, Kumar R, Roberts S, Walsh R, Martin E. Butyrylcholinesterase-Mediated enhancement of the enzymatic activity of trypsin. *Cell Mol Neurobiol* 2001; 21: 285–96.
- Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 2007; 13: RA214–21.
- de Knijff P, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum Mutat* 1994; 4: 178–94.
- de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, et al. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62: 10–5.
- Deniz-Naranjo MC, Munoz-Fernandez C, Alemany-Rodriguez MJ, del Carmen Perez-Vieitez M, Aladro-Benito Y, Irurita-Latasa J, et al. Butyrylcholinesterase, ApoE and Alzheimer's disease in a population from the Canary Islands (Spain). *Neurosci Lett* 2007; 427: 34–8.
- Devine MJ, Lewis PA. Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: tangles, Lewy bodies and LRRK2. *FEBS J* 2008; 275: 5748–57.
- Diamant S, Podoly E, Friedler A, Ligumsky H, Livnah O, Soreq H. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8628–33.
- Dodel R, Csoti I, Ebersbach G, Fuchs G, Hahne M, Kuhn W, et al. Lewy body dementia and Parkinson's disease with dementia. *J Neurol* 2008; 255 Suppl 5: 39–47.
- Dubois B, Pillon B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. *J Neurol* 1997; 244: 2–8.
- Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, et al. Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol* 2002; 55: 25–31.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres J V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88–95.

C. Literaturverzeichnis

- Emre M. Dementia in Parkinson's disease: cause and treatment. *Curr Opin Neurol* 2004; 17: 399–404.
- Emre M, Aarsland D, Albanese A, Byrne EJ, Deuschl G, De Deyn PP, et al. Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 2509–18.
- Finder VH, Glockshuber R. Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis* 2007; 4: 13–27.
- Flegar-Mestric Z, Surina B, Siftar Z. Biological variations of human serum butyrylcholinesterase activity in a population from Zagreb, Croatia. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120: 193–9.
- Friedrich C, Rudiger H, Schmidt C, Herting B, Prieur S, Junghanns S, et al. Baroreflex sensitivity and power spectral analysis in different extrapyramidal syndromes. *J Neural Transm* 2008; 115: 1527–36.
- Frolich L. The cholinergic pathology in Alzheimer's disease—discrepancies between clinical experience and pathophysiological findings. *J Neural Transm* 2002; 109: 1003–13.
- Gandhi S, Wood NW. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2749–55.
- Gasser T. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007; 22: S343–S350.
- Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51: 745–52.
- Goker-Alpan O, Giasson BI, Eblan MJ, Nguyen J, Hurtig HI, Lee VM, et al. Glucocerebrosidase mutations are an important risk factor for Lewy body disorders. *Neurology* 2006; 67: 908–10.
- Goldmann Gross R, Siderowf A, Hurtig HI. Cognitive impairment in Parkinson's disease and dementia with lewy bodies: a spectrum of disease. *Neurosignals* 2008; 16: 24–34.
- Hilker R, Thomas AV, Klein JC, Weisenbach S, Kalbe E, Burghaus L, et al. Dementia in Parkinson disease: functional imaging of cholinergic and dopaminergic pathways. *Neurology* 2005; 65: 1716–22.
- Hiltunen M, Mannermaa A, Helisalmi S, Koivisto A, Lehtovirta M, Ryyanen M, et al. Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 genes do not act in synergy in Finnish late-onset Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 1998; 250: 69–71.
- Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545–8.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; 17: 427–42.

C. Literaturverzeichnis

- Holmberg B, Kallio M, Johnels B, Elam M. Cardiovascular reflex testing contributes to clinical evaluation and differential diagnosis of Parkinsonian syndromes. *Mov Disord* 2001; 16: 217–25.
- Holmes C, Ballard C, Lehmann D, David Smith A, Beaumont H, Day IN, et al. Rate of progression of cognitive decline in Alzheimer's disease: effect of butyrylcholinesterase K gene variation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 640–3.
- Huang Y. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology* 2006; 66: S79–85.
- Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1993; 50: 140–8.
- Hurtig HI, Trojanowski JQ, Galvin J, Ewbank D, Schmidt ML, Lee VM, et al. Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 2000; 54: 1916–21.
- Jasinska-Myga B, Opala G, Goetz CG, Tustanowski J, Ochudlo S, Gorzkowska A, et al. Apolipoprotein E gene polymorphism, total plasma cholesterol level, and Parkinson disease dementia. *Arch Neurol* 2007; 64: 261–5.
- Jellinger KA. A critical reappraisal of current staging of Lewy-related pathology in human brain. *Acta Neuropathol* 2008; 116: 1–16.
- Jellinger KA, Seppi K, Wenning GK. Clinical and neuropathological correlates of Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 2003; 106: 188–9; author reply 190.
- Jmoudiak M, Futerman AH. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *Br J Haematol* 2005; 129: 178–88.
- Kalow W, Gunn DR. Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum. *Ann Hum Genet* 1959; 23: 239–50.
- Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci* 2004; 29: 427–41.
- Ki CS, Na DL, Kim JW, Kim HJ, Kim DK, Yoon BK. No association between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset Alzheimer's disease. *Am J Med Genet* 1999; 88: 113–5.
- Korchounov A, Kessler KR, Yakhno NN, Damulin IV, Schipper HI. Determinants of autonomic dysfunction in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol* 2005; 252: 1530–6.
- La Du BN, Bartels CF, Nogueira CP, Hajra A, Lightstone H, Van der Spek A, et al. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin Biochem* 1990; 23: 423–31.
- Lane R, Feldman HH, Meyer J, He Y, Ferris SH, Nordberg A, et al. Synergistic effect of apolipoprotein E epsilon4 and butyrylcholinesterase K-variant on progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18: 289–98.

C. Literaturverzeichnis

- Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2006; 9: 101–24.
- Layer PG. Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 1991; 11: 7–33.
- Leech RW, Brumback RA, Poduslo SE, Schiffer R, Adesina A. Dementia: the University of Oklahoma autopsy experience. *J Okla State Med Assoc* 2001; 94: 507–11.
- Lehmann DJ, Johnston C, Smith AD. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1933–6.
- Lehmann DJ, Nagy Z, Litchfield S, Borja MC, Smith AD. Association of butyrylcholinesterase K variant with cholinesterase-positive neuritic plaques in the temporal cortex in late-onset Alzheimer's disease. *Hum Genet* 2000; 106: 447–52.
- Li YJ, Hauser MA, Scott WK, Martin ER, Booze MW, Qin XJ, et al. Apolipoprotein E controls the risk and age at onset of Parkinson disease. *Neurology* 2004; 62: 2005–9.
- Lippa CF, Duda JE, Grossman M, Hurtig HI, Aarsland D, Boeve BF, et al. DLB and PDD boundary issues: diagnosis, treatment, molecular pathology, and biomarkers. *Neurology* 2007; 68: 812–9.
- Maetzler W, Liepelt I, Reimold M, Reischl G, Solbach C, Becker C, et al. Cortical PIB binding in Lewy body disease is associated with Alzheimer-like characteristics. *Neurobiol Dis* 2009; 34: 107–12.
- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622–30.
- Markou A, Duka T, Prelevic GM. Estrogens and brain function. *Hormones (Athens)* 2005; 4: 9–17.
- Massoulie J, Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 1982; 5: 57–106.
- Mattila KM, Rinne JO, Roytta M, Laippala P, Pietila T, Kalimo H, et al. Dipeptidyl carboxypeptidase 1 (DCP1) and butyrylcholinesterase (BCHE) gene interactions with the apolipoprotein E epsilon4 allele as risk factors in Alzheimer's disease and in Parkinson's disease with coexisting Alzheimer pathology. *J Med Genet* 2000; 37: 766–70.
- McGeer E, Yasojima K, McGeer PL. Inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *BCM J* 2001; 43: 138–141.
- McGeer PL, McGeer EG. The alpha-synuclein burden hypothesis of Parkinson disease and its relationship to Alzheimer disease. *Exp Neurol* 2008; 212: 235–8.
- McKeith I, Mintzer J, Aarsland D, Burn D, Chiu H, Cohen-Mansfield J, et al. Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol* 2004; 3: 19–28.

C. Literaturverzeichnis

- McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 2005; 65: 1863–72.
- Mesulam MM, Geula C. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann Neurol* 1994; 36: 722–7.
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 2002; 110: 627–39.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Mills RD, Sim CH, Mok SS, Mulhern TD, Culvenor JG, Cheng HC. Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J Neurochem* 2008; 105: 18–33.
- Namba T, Nolte CT, Jackrel J, Grob D. Poisoning due to organophosphate insecticides. Acute and chronic manifestations. *Am J Med* 1971; 50: 475–92.
- Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain* 2009; 132: 1783–94.
- Olanow CW. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease - 2007. *Mov Disord* 2007; 22: S335–S342.
- Oliveri RL, Nicoletti G, Cittadella R, Manna I, Branca D, Zappia M, et al. Apolipoprotein E polymorphisms and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1999; 277: 83–6.
- Pankratz N, Byder L, Halter C, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, et al. Presence of an APOE4 allele results in significantly earlier onset of Parkinson's disease and a higher risk with dementia. *Mov Disord* 2006; 21: 45–9.
- Pankratz N, Foroud T. Genetics of Parkinson disease. *Genet Med* 2007; 9: 801–11.
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002; 14: 223–36; discussion 222.
- Parsian A, Racette B, Goldsmith LJ, Perlmutter JS. Parkinson's disease and apolipoprotein E: possible association with dementia but not age at onset. *Genomics* 2002; 79: 458–61.
- Perry E, McKeith I, Ballard C. Butyrylcholinesterase and progression of cognitive deficits in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2003; 60: 1852–3.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1978; 4: 273–7.
- Piccardi M, Congiu D, Squassina A, Manconi F, Putzu PF, Mereu RM, et al. Alzheimer's disease: case-control association study of polymorphisms in ACHE, CHAT, and BCHE genes in a Sardinian sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007; 144B: 895–9.

C. Literaturverzeichnis

- Podoly E, Bruck T, Diamant S, Melamed-Book N, Weiss A, Huang Y, et al. Human recombinant butyrylcholinesterase purified from the milk of transgenic goats interacts with beta-amyloid fibrils and suppresses their formation in vitro. *Neurodegener Dis* 2008; 5: 232–6.
- Poewe W, Wolters E, Emre M, Onofrj M, Hsu C, Tekin S, et al. Long-term benefits of rivastigmine in dementia associated with Parkinson's disease: an active treatment extension study. *Mov Disord* 2006; 21: 456–61.
- Rall J S C, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982; 257: 4171–8.
- Raygani AV, Zahrai M, Soltanzadeh A, Doosti M, Javadi E, Pourmotabbed T. Analysis of association between butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2004; 371: 142–6.
- Richard F, Amouyel P. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2001; 412: 1–12.
- Ruberg M, Rieger F, Villageois A, Bonnet AM, Agid Y. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in frontal cortex and cerebrospinal fluid of demented and non-demented patients with Parkinson's disease. *Brain Res* 1986; 362: 83–91.
- Rubinstein HM, Dietz AA, Lubrano T. E1k, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J Med Genet* 1978; 15: 27–9.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 928–33.
- Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, Fujiwara H, Koyama S, Sawabe M, et al. Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 644–54.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463–7.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4904–11.
- Shults CW. Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 1661–8.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 1651–61.
- Silver A. *The biology of cholinesterases*. Amsterdam: North Holland: North-Holland Pub Co, 1974.
- Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 83–106.
- Singleton AB, Gibson AM, Edwardson JA, McKeith IG, Morris CM. Butyrylcholinesterase K: an association with dementia with Lewy bodies. *Lancet* 1998; 351: 1818.

C. Literaturverzeichnis

- Sirvio J, Kutvonen R, Soininen H, Hartikainen P, Riekkinen PJ. Cholinesterases in the cerebrospinal fluid, plasma, and erythrocytes of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1989; 75: 119–27.
- Sirvio J, Soininen HS, Kutvonen R, Hyttinen JM, Helkala EL, Riekkinen PJ. Acetyl- and butyrylcholinesterase activity in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1987; 81: 273–9.
- Smith TA, Prayson RA. Lewy body disease. *South Med J* 1996; 89: 1174–80.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6469–73.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1977–81.
- Szilagyi AK, Nemeth A, Martini E, Lendvai B, Venter V. Serum and CSF cholinesterase activity in various kinds of dementia. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 1987; 236: 309–11.
- Taylor KS, Cook JA, Counsell CE. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 905–6.
- Tilley L, Morgan K, Grainger J, Marsters P, Morgan L, Lowe J, et al. Evaluation of polymorphisms in the presenilin-1 gene and the butyrylcholinesterase gene as risk factors in sporadic Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 659–63.
- Tiraboschi P, Hansen LA, Alford M, Sabbagh MN, Schoos B, Masliah E, et al. Cholinergic dysfunction in diseases with Lewy bodies. *Neurology* 2000; 54: 407–11.
- Trojanowski JQ, Lee VM. Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies are brain amyloidoses. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 107–10.
- van den Elzen P, Garg S, Leon L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, et al. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* 2005; 437: 906–10.
- Weisgraber KH, Rall J S C, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 1981; 256: 9077–83.
- Wersinger C, Sidhu A. An inflammatory pathomechanism for Parkinson's disease? *Curr Med Chem* 2006; 13: 591–602.
- Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 2007; 150: 963–76.
- Wright AF. Neurogenetics II: complex disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 623–31.

C. Literaturverzeichnis

Zaccai J, McCracken C, Brayne C. A systematic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies. *Age Ageing* 2005; 34: 561–6.

D. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A β	β -Amyloid
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase-Protein
AD	Alzheimer disease = Alzheimer-Demenz
APOE	Apolipoprotein E-Gen
ApoE	Apolipoprotein E-Protein
ATCHJ	Acetylthiocholinjodid
BCHE	Butyrylcholinesterase-Gen
bp	Basenpaare
BuChE	Butyrylcholinesterase-Protein
BW284c51	1,5-Bis-(4-allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-on-Dibromid
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ChEI	Cholinesterase-Inhibitor(en)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d. h.	das heißt
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DLB	dementia with Lewy bodies = Demenz mit Lewy-Körperchen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
G	Guanin
H ₂ O	Wasser
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
i. d. R.	in der Regel
IL-1 β	Interleukin 1 β
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
Kap.	Kapitel
l	Liter
LB	Lewy body/Lewy bodies = Lewy-Körperchen
LBD	Lewy body disease(s) = Lewy-Körperchen-Erkrankung(en)

D. Abkürzungsverzeichnis

<i>LRRK2</i>	leucine-rich repeat kinase 2-Gen
M.	Morbus
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MMST	Mini-Mental-Status-Test
μl	Mikroliter
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs = nicht-steroidale Anti-phlogistika
PCR	polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PD	Parkinson disease = Parkinson-Krankheit
PDD	Parkinson disease with dementia = Parkinson-Krankheit mit Demenz
PDND	Parkinson disease without dementia = Parkinson-Krankheit ohne Demenz
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
<i>PINK1</i>	Phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1-Gen
PNS	peripheres Nervensystem
<i>PRKN</i>	Parkin-Gen
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
rpm	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
<i>SNCA</i>	α-Synuclein-Gen
SNP	single nucleotide polymorphism = Einzelnukleotid-Polymorphismus
sog.	sogenannt
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
U	Unit(s)
UV	ultraviolett

D. Abkürzungsverzeichnis

V. a.	Verdacht auf
v. a.	vor allem
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z. T.	zum Teil

E. Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits veröffentlicht:

Maetzler W, Keller S, Michelis J, Koehler N, Stransky E, Becker C, et al. No differences of butyrylcholinesterase protein activity and allele frequency in Lewy body diseases. *Neurobiol Dis.* 2009 Aug;35(2):296-301.

F. Danksagung

Frau Professor Dr. Daniela Berg danke ich sehr herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, diese Arbeit unter ihrer Anleitung anfertigen zu dürfen. Auch außerhalb der Arbeitsgruppentreffen hatte sie stets ein offenes Ohr für Fragen und Probleme und war um deren schnelle Lösung bemüht.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Walter Mätzler, dem ich einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit verdanke. Er hat mich in allen Phasen dieser Arbeit mit zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen unterstützt. Beim Schreiben der Dissertation hat er mich immer wieder ermutigt, eigene gedankliche Wege zu gehen. Sein zügiges und gründliches Korrekturlesen hat mir sehr weitergeholfen. Zudem ist es ihm immer wieder gelungen, mich auf's Neue zu motivieren.

Herrn Professor Dr. Thomas Gasser danke ich für die Bereitstellung der Mittel und die Ratschläge während der Laborbesprechungen.

Bei Frau Dipl. Biol. Claudia Schulte bedanke ich mich für die ausdauernde Hilfestellung bei meinen Experimenten im Hertie-Institut. Sie hat mich sehr freundlich und geduldig in die Laborarbeit eingelernt, war bei Fragen immer da und hat mich bei der Statistik sowie bei theoretischen Fragen zur Genetik maßgeblich unterstützt.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Elke Stransky. Obwohl ich nur zu Gast im Labor der Psychiatrie war, hat sie mich trotz Zeitknappheit bestmöglich unterstützt und mir das Gefühl gegeben, willkommen zu sein.

Frau Dr. Alexandra Gaenslen danke ich für die Einführung in die Rekrutierung von Patienten.

Frau Dr. Inga Liepelt danke ich für die Hilfe bei der Ergänzung fehlender Patientendaten durch die Recherche in unzähligen Studien-Ordern.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre während der letzten dreieinhalb Jahre.

Ich bedanke mich bei allen Menschen, die sich bereit erklärt haben, an der vorlie-

F. Danksagung

genden Studie teilzunehmen, mit dem Wissen, dass sich der Verlauf ihrer Krankheit dadurch nicht ändern wird, aber mit der Hoffnung, dass es für Menschen, welche zu einem späteren Zeitpunkt an der gleichen Krankheit erkranken, bessere therapeutische Möglichkeiten gibt.

Den niedergelassenen Kollegen gilt mein Dank für die Blutabnahmen und das Zusenden der Röhrchen. Ohne ihre Mithilfe wäre das Studienkollektiv deutlich kleiner ausgefallen.

Meinem Freund Nils Künstle und meinen Freunden danke ich ganz herzlich dafür, dass sie mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, indem sie mir immer wieder „das Ziel“ vor Augen geführt haben und für mich da waren. Besonderer Dank gilt Wiltrud Kessler für die Hilfe beim Textsatz sowie Teresa Schubert und Vera Siegert für die Korrektur der Arbeit.

Meinem Bruder Johannes gilt ein großes Dankeschön für die Hilfe bei Computerfragen jeglicher Art, aber ganz besonders auch dafür, dass ich mich immer auf ihn verlassen kann.

Meinen Eltern bin ich dankbar, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben.