

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

**S100B als Marker für Lewy-Körper-Erkrankungen: Eine  
Fall-Kontroll-Studie mit Bestimmung von Einzelbasen-  
Polymorphismen und Serum- und Liquorwerten**

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

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

**vorgelegt von**

**Johannes Dominik Lang**

**aus**

**Ellwangen/Jagst**

**2014**

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

Für meinen Großvater  
25.10.1925 – 18.02.2013

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
AAO	Erkrankungsalter (engl.: <u>A</u> ge <u>a</u> t <u>o</u> nset)
A $\beta$	<u>A</u> myloid <u><math>\beta</math></u> Peptide
AD	Alzheimer-Krankheit (engl.: <u>A</u> lzheimer's <u>d</u> isease)
ADL	Skala für Aktivitäten des täglichen Lebens (engl.: <u>A</u> ctivity of <u>d</u> aily <u>l</u> iving)
APP	Amyloid Vorläufer Protein (engl.: <u>A</u> myloid <u>p</u> recursor <u>p</u> rotein)
AUC	Fläche unter der (ROC-)Kurve (engl.: <u>A</u> rea <u>u</u> nder the <u>c</u> urve)
$\beta$ -UE	$\beta$ -Untereinheit
CSF	Liquor (engl.: <u>C</u> erebrospinal <u>f</u> luid)
CT	<u>C</u> omputer <u>t</u> omographie
DA	<u>D</u> opamin/ <u>D</u> opaminerg
DLB	Lewy-Körper-Demenz (engl.: <u>D</u> ementia <u>w</u> ith <u>l</u> ewy <u>b</u> odies)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
EDTA	<u>E</u> thylendi <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> ccetat
EOPD	Parkinson-Krankheit mit frühem Beginn (engl.: <u>E</u> arly <u>o</u> nset <u>P</u> D)
EtBr	<u>E</u> thidium <u>b</u> romid
HC	Gesunde Kontrollpersonen (engl.: <u>H</u> ealthy <u>c</u> ontrols)
H&Y	<u>H</u> oehn& <u>Y</u> ahr-Stadium/Skala
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
iNOS	induzierbare <u>N</u> O <u>S</u> ynthase
IPD	Idiopathische Parkinson-Krankheit (engl.: <u>I</u> diopathic <u>p</u> arkinson's <u>d</u> isease)
IPS	<u>I</u> diopathisches <u>P</u> arkinson- <u>S</u> yndrom
JPD	Juvenile Parkinson-Krankheit (engl.: <u>J</u> uvenile <u>p</u> arkinson's <u>d</u> isease)
LB	Lewy-Körper (engl.: <u>L</u> ewy <u>b</u> odies)
LBD	Lewy-Körper-Erkrankung (engl.: <u>L</u> ewy <u>b</u> ody <u>d</u> isease)
LN	Lewy-Neuriten (engl.: <u>L</u> ewy <u>n</u> eurites)
LP	<u>L</u> umbalpunktion
MMST	<u>M</u> ini- <u>m</u> ental <u>S</u> tatus <u>T</u> est
MPTP	1- <u>M</u> ethyl-4- <u>P</u> henyl-1,2,3,6- <u>T</u> etrahydropyridin
mRNA	Boten-Ribonukleinsäuren (engl.: <u>m</u> essenger <u>R</u> ibo <u>n</u> ucleotide <u>a</u> cid)
MRT	<u>M</u> agnet- <u>R</u> esonanz- <u>T</u> omographie
NF- $\kappa$ B	Kernfaktor- $\kappa$ B (engl.: <u>N</u> uclear <u>f</u> actor <u><math>\kappa</math>B</u> )
NO	Stickstoffmonoxid (engl.: <u>N</u> itric <u>o</u> xide)
PARK	<u>P</u> arkinson-Genlocus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PD	Parkinson-Krankheit (engl.: <u>P</u> arkinson's <u>d</u> isease)

PDD	Parkinson-Krankheit <i>mit</i> Demenz (engl.: <u>PD with dementia</u> )
PDND	Parkinson-Krankheit <i>ohne</i> Demenz (engl.: <u>PD no dementia</u> )
PET	<u>Positronen-Emissions-Tomographie</u>
PS	<u>Parkinson-Syndrom</u>
RAGE	engl.: <u>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</u>
REM	Paradoxer Schlaf oder desynchronisierter Schlaf mit schnellen Augenbewegungen (engl.: <u>Rapid eye movement</u> )
ROC	Grenzwertoptimierungskurve (engl.: <u>Receiver operating characteristic</u> )
SAP	Eismeergarnelen-Phosphatase (engl.: <u>Shrimp Alkaline Phosphatase</u> )
S100B	S100, engl.: <u>Soluble in 100%</u> ammonium sulfat; B, Homodimer aus 2 $\beta$ -UE
SHT	<u>Schädel-Hirn-Trauma</u>
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl.: <u>Single nucleotide polymorphism</u> )
SN	<u>Substantia nigra</u>
SNC	<u>Substantia nigra pars compacta</u>
SNCA/B/-G	$\alpha$ -/ $\beta$ -/ $\gamma$ -Synuklein-Gen (engl.: <u>Synuclein alpha, beta, gamma</u> )
SNr	<u>Substantia nigra pars reticularis</u>
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-(Computer-)Tomographie (engl.: <u>Single photon emission computed tomography</u> )
TBE	<u>Tris-Borat-EDTA</u> ; TRIS = <u>Tris-hydroxymethyl-aminomethan</u>
TNF- $\alpha$	<u>Tumornekrosefaktor <math>\alpha</math></u>
UV	<u>Ultraviolett</u>
YOPD	Parkinson-Krankheit mit frühem Beginn (engl.: <u>Young onset PD</u> )
ZNS	<u>Zentrales Nervensystem</u>

---

## Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG .....	9
1.1. LEWY-KÖRPER-ERKRANKUNG .....	9
1.1.1. Begriffsklärung .....	9
1.1.2. Idiopathisches Parkinson-Syndrom .....	9
1.1.2.1. Epidemiologie.....	10
1.1.2.2. Ätiologie .....	11
1.1.2.3. Pathogenese, Neuropathologie .....	12
1.1.2.4. Symptome, Diagnosestellung .....	13
1.1.2.5. Parkinson-Krankheit und Demenz.....	15
1.1.3. Demenz mit Lewy-Körpern (DLB) .....	16
1.1.3.1. Epidemiologie.....	16
1.1.3.2. Ätiologie .....	16
1.1.3.3. Pathogenese, Neuropathologie .....	17
1.1.3.4. Symptome, Diagnosestellung .....	17
1.1.4. Beziehung von DLB und PD .....	18
1.2. S100B .....	20
1.2.1. S100-Proteine .....	20
1.2.2. S100B .....	20
1.2.3. Zur Rolle von Gliazellen in der PD-Pathogenese.....	21
1.2.4. Zur möglichen Rolle von S100B in der PD-Pathogenese .....	22
1.3. FRAGESTELLUNG .....	25
2. STUDIENKOLLEKTIV, MATERIAL UND METHODEN .....	26
2.1. STUDIENKOLLEKTIV .....	26
2.2. LIQUOR-, SERUM- UND DNA-PROBEN.....	27
2.2.1. Routineparameter.....	27
2.2.2. Aufklärung, Einverständnis und Datenschutz .....	27
2.3. MATERIAL .....	28
2.3.1. Chemikalien und Enzyme.....	28
2.3.2. Pufferlösungen.....	28
2.3.3. Liaison® S100-Reagenzien .....	29
2.3.4. DNA-Größenstandard.....	29
2.3.5. Oligonukleotide (Primer).....	29

2.3.6.	Referenzsequenzen .....	30
2.3.7.	Geräte und Hilfsmittel .....	31
2.3.8.	Verbrauchsmaterialien .....	32
2.3.9.	Software .....	32
2.4.	METHODEN .....	33
2.4.1.	Standardmethoden .....	33
2.4.1.1.	Polymerase-Kettenreaktion.....	33
2.4.1.2.	Agarose-Gelelektrophorese .....	34
2.4.2.	SNaPshot®-Genotypisierung der S100B-SNPs .....	35
2.4.2.1.	Einzelbasen-Polymorphismen, SNPs .....	35
2.4.2.2.	SNaPshot®-PCR.....	36
2.4.2.3.	SNaPshot®-Protokoll .....	37
2.4.2.4.	Erläuterung zum SNaPshot®-Protokoll .....	37
2.4.2.5.	PCR.....	37
2.4.2.6.	Gelelektrophorese .....	39
2.4.2.7.	Aufreinigung/Verdau .....	40
2.4.2.8.	Durchführung der SNaPshot®-PCR.....	41
2.4.3.	Immunoluminometrischer Assay .....	43
2.4.3.1.	Sandwichtest .....	43
2.4.3.2.	Chemolumineszenz.....	44
2.4.3.3.	Bestimmung der S100B-Konzentration in Serum und CSF .....	44
2.4.3.4.	Testprinzip und Durchführung .....	44
2.4.3.5.	Hinweis zur Interpretation der S100B-Werte in CSF .....	45
2.4.4.	Statistische Testverfahren .....	46
2.5.	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL .....	47
3.	ERGEBNISSE .....	49
3.1.1.	Demographische Daten.....	49
3.1.2.	Routineparameter in CSF und Serum .....	49
3.1.3.	Zusammenhang von S100B-Konzentration mit Alter und Geschlecht .....	49
3.1.4.	Zusammenhang von S100B-Konzentration und Diagnose.....	52
3.1.5.	Einfluss klinischer Parameter .....	54
3.1.6.	Genotypen.....	55
4.	DISKUSSION.....	56
4.1.1.	Verteilung und Verhältnisse der S100B-Konzentrationen .....	56

4.1.2.	Vergleich von LBD-Patienten und Kontrollen .....	57
4.1.3.	Hypothese zum Verlauf der S100B-Konzentrationen .....	58
4.1.4.	Zur Rolle von S100B in der Pathogenese der LBD.....	59
4.1.5.	S100B als diagnostischer und klinischer Marker .....	61
4.1.6.	Auswertung der SNPs.....	62
4.1.7.	Limitationen.....	63
4.1.8.	Weiterführende Perspektiven.....	63
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	65
6.	ANHANG .....	67
6.1.	ABBILDUNGEN .....	67
6.2.	TABELLEN .....	71
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	74
8.	DANKSAGUNG .....	78



---

# 1. Einleitung

---

## 1.1. Lewy-Körper-Erkrankung

### 1.1.1. Begriffsklärung

Der Begriff Lewy-Körper-Erkrankung (*Lewy-Body-Disorder*, LBD) ist ein Sammelbegriff für Erkrankungen, die durch das Vorkommen von Proteinaggregationen in Neuronen aus überwiegend  $\alpha$ -Synuklein (sog. *Lewy bodies*, LBs und *Lewy neurites*, LNs) charakterisiert sind (Baba et al. 1998). Zu den Lewy-Körper-Erkrankungen zählen Parkinson ohne Demenz (*Parkinson's disease no dementia*, PDND), Parkinson mit Demenz (*Parkinson's disease with dementia*, PDD) und Lewy-Körper-Demenz (*Dementia with lewy bodies*, DLB) (Lippa et al. 2007).

### 1.1.2. Idiopathisches Parkinson-Syndrom

Die Parkinson-Krankheit (*Parkinson's disease*, PD) ist eine chronisch progrediente degenerative Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Sie führt durch den Untergang dopaminhaltiger Neurone der Substantia nigra (SN) zu charakteristischen Symptomen, die unter dem Begriff „Parkinson-Syndrom“ (PS) zusammengefasst werden.

Ihren Namen verdankt die PD dem Englischen Arzt, Apotheker und Paläontologen James Parkinson (1755-1824). 1817 beschrieb er in seiner Abhandlung *An essay on the Shaking Palsy* erstmals die charakteristischen Symptome, der später nach ihm benannten Krankheit (Parkinson 2002). Aufgrund des mittel- bis feinschlägigen Ruhe- und Haltetremors (4-8 Hz) und der Bewegungsverarmung fasste Parkinson die Symptome unter dem Namen „*Paralysis agitans*“ (Schüttellähmung) zusammen. Der französische Neurologe Jean Marie Charcot (1825-1893) führte 1884 den Namen der „Parkinson-Krankheit“ ein.

### 1.1.2.1. *Epidemiologie*

Die PD ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen und nach der Alzheimer Demenz (AD) die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit. Die *Prävalenz* der PD variiert je nach Studie und Kohorte mitunter erheblich. In weltweit über 80 durchgeführten Studien, wurde sie mit Werten zwischen 31 und 5.703/100.000 Einwohner angegeben (Wirdefeldt 2011). In Deutschland beträgt sie in der Gesamtbevölkerung 100-200/100.000 Einwohner. Sie ist vor dem 40. Lebensjahr geringer und nimmt mit dem Alter zu. Bei den über 65-jährigen beträgt die Prävalenz 1.800/100.000 Einwohner (Diener et al. 2010).

Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 58. und 62. Lebensjahr. Dementsprechend nimmt die *Inzidenz* um das 60. Lebensjahr zu und in höherem Alter wieder ab. Es wird vermutet, dass in höherem Lebensalter häufig bestehende Komorbiditäten zu einer regelhaften Minderdiagnose führen (Wirdefeldt 2011). In den meisten Fällen liegt der Krankheitsbeginn zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr. Tritt die Erkrankung früher auf, spricht man vor dem 21. Lebensjahr von einer „Juvenilen PD“ (JPD) und zwischen dem 21. und 40. Lebensjahr von „PD mit frühem Beginn“ (*Early onset PD*, EOPD oder *young onset PD*, YOPD) (Schrag et al. 1998). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der altersabhängigen Diagnosebezeichnungen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Inzidenz</b>
Juvenile PD (JPD)	< 21	selten, < 1% d. PD-Fälle
PD mit frühem Beginn (EOPD)	21-40	ca. 4% d. PD-Fälle
Idiopathische PD (IPS)	> 40	> 95% d. PD-Fälle
	58-62	Erkrankungsgipfel
	> 85*	Abnahme der Inzidenz

Tabelle 1: Altersabhängige Diagnosebezeichnungen und Inzidenz der PD nach (Schrag et al. 1998; Van Den Eeden et al. 2003; Wirdefeldt 2011). \*Mehrere Studien berichten von einer mit dem Alter proportional zunehmenden Inzidenz. In hohem Lebensalter nimmt sie jedoch wieder ab. Eine detaillierte Übersichtsarbeit findet sich bei (Wirdefeldt 2011).

Die mittlere Inzidenz der PD fällt je nach Alter, Diagnosekriterien und Geschlecht unterschiedlich aus. Sie schwankt zwischen 9-22/100.000 Einwohner/Jahr (Wirdefeldt 2011) und wird in Industrienationen auf 14/100.000 Einwohner/Jahr geschätzt (Hirtz et al. 2007). Für Männer beträgt sie 11-31/100.000 Einwohner/Jahr und für Frauen wird

sie mit 8-13/100.000 Einwohner/Jahr beziffert (Van Den Eeden et al. 2003). Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis von 3:2 bis 4:2, welches um das 90. Lebensjahr bis zu 5:2 betragen kann (Van Den Eeden et al. 2003). Es ist denkbar, dass Lebensstil, höhere Inzidenz kleiner Schädeltraumata, eine rollen- oder berufsbedingt höhere Toxinexposition, mitochondriale Dysfunktion und eine rezessive Anfälligkeit der X-chromosomalen Gene zu dem rund 1,5- bis 2-fach erhöhten Risiko beim männlichen Geschlecht führen. Auch wird ein neuroprotektiver Effekt des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen diskutiert (Al Sweidi et al. 2012; Wooten et al. 2004).

#### 1.1.2.2. *Ätiologie*

Die Ätiologie der PD ist noch nicht geklärt, doch eine Vielzahl möglicherweise auslösender Faktoren ist Gegenstand intensiver Forschung. Hierzu bieten Wirdefeldt et al. eine Übersichtsarbeit (Wirdefeldt 2011). Die derzeit favorisierte Sichtweise ist, dass die PD durch ein komplexes Zusammenspiel aus genetischer Disposition, Umweltfaktoren und anderen pathologischen Prozessen hervorgerufen wird.

Fälle familiärer PD und solche mit frühem Krankheitsbeginn (EOPD) für eine genetische Komponente. 16 Genorte konnten bislang mit PD in Verbindung gebracht werden, darunter Gene, die für  $\alpha$ -Synuklein kodieren, antioxidativ wirkende Proteine, und solche mit Funktionen im Bereich der Proteindegeneration (Wirdefeldt 2011).

Als Umweltfaktoren stehen unter anderem Pestizide<sup>1</sup>, Metalle, aber auch Lebensstil und Genussmittel im Verdacht. Die europäische „Geoparkinsonstudie“ fand bei insgesamt 959 Patienten und 1989 Kontrollen eine Assoziation der PD mit einer anamnestischen Pestizidexposition (Dick et al. 2007). Das Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP), das strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Herbizid Paraquat besitzt, führt z.B. durch den Untergang dopaminerger Neurone der SN zu Symptomen, die von denen der PD nur schwer zu unterscheiden sind (Langston et al. 1983). Desweiteren werden Noxen wie eine postinfektiöse Genese und stattgehabte Schädel-Hirn-Traumata (SHT) als weitere Ursachen diskutiert. Als nach der Influenzapandemie von 1918 eine Häufung von Enzephalitis Fällen auftrat (Marttila und Rinne 1981) und

---

<sup>1</sup> Im Allgemeinen sind Pflanzenschutzmittel zur Schädlingsbekämpfung (Biozide: Insektizide, Herbizide, Fungizide) gemeint.

viele der Patienten im weiteren Verlauf PD Symptome entwickelten, wurde eine kausale Kadenz „Influenza-Enzephalitis-Parkinsonismus“ vermutet (Ravenholt und Foege 1982). Tatsächlich konnten Influenzaviren in Hypothalamus und Mittelhirn von Patienten mit postenzephalitischer PD, nicht jedoch bei anderen PD-Formen nachgewiesen werden (Gamboa et al. 1974). Dies führte zur Unterscheidung der postenzephalitischen Form und der Annahme, dass eine subklinische Infektion nach Jahren zur PD führen könnte (Poskanzer und Schwab 1963). Und die Untersuchung von 90 PD-Patienten und 90 Kontrollen ergab ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für stattgehabte Schädel-Hirn-Traumata (SHT) (Tsai et al. 2002).

#### 1.1.2.3. *Pathogenese, Neuropathologie*

Die PD ist eine progressive, multisystemische neurodegenerative Erkrankung. Das morphologische Korrelat der charakteristischen motorischen Symptome ist ein Pigmentverlust der SN. Dabei handelt es sich um einen Kernkomplex des Mesencephalons, der sich aus den zwei Anteilen Pars reticulata (SNr) und Pars compacta (SNc) zusammensetzt. Die Neurone der SNr haben einen hohen Eisengehalt, der dem Gewebe eine rötliche Färbung verleiht, besitzen aber nur wenig Dopamin (DA). Die melaninhaltigen Neurone der SNc weisen einen hohen Dopamingehalt auf und erscheinen deshalb im histologischen Bild dunkelbraun bis schwarz. Der Verlust überwiegend melaninhaltiger Neurone der SNc geht mit dem Auftreten von eosinophilen Einschlusskörperchen, sog. Lewy-Körpern (LBs) im Zytoplasma überlebender Neurone einher (Teismann und Schulz 2004). LBs sind Proteinaggregate, die überwiegend aus  $\alpha$ -Synuklein, sowie aus Ubiquitin, Neurofilament und mindestens 150-200 weiteren Proteinen bestehen (Baba et al. 1998). Die pathologische Bedeutung der LBs ist jedoch unklar (Jellinger 2009). Desweiteren gibt es Hinweise, dass Schädigungen und Fehlfunktionen von Mitochondrien, Golgiapparat, Lysosomen und synaptischer Vesikel durch Auslösung der Apoptose an der Pathogenese beteiligt sein könnten (Hashimoto et al. 2003). Außerdem scheinen oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion, Exotoxizität, Eisenablagerungen und Entzündungsreaktionen als pathogenetische Katalysatoren zu wirken (Licker 2009). Die Folge des Zelluntergangs in der SNc ist ein Mangel des Neurotransmitters Dopamin. Die damit verbundene verminderte Aktivität nigrostriataler Projektionen zieht eine veränderte Aktivität des

Striatums (Ncl. caudatus und Putamen) nach sich. In der Folge kommt es über die indirekte und direkte Basalganglienschleife zur Hemmung thalamokortikaler Projektionen und damit letztendlich zu einer verminderten Innervation des Kortex (siehe Abbildung 6, S.67). Im Rahmen der PDD kommt es zusätzlich zu einer Abnahme des Neurotransmitters Acetylcholin (cholinerges Defizit). Zudem kann die Konzentration fehlgefalteter Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ )<sup>2</sup> 1–42 Proteine bei PDD erhöht sein (Kalaitzakis et al. 2008), was die Akkumulation von  $\alpha$ -Synuklein beschleunigen kann (Hashimoto et al. 2003; Svenningsson et al. 2012).

#### 1.1.2.4. *Symptome, Diagnosestellung*

Den Kriterien der *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank* (UKPDS Brain Bank) zufolge, ist die PD definiert durch das klinische Bild einer Hypokinesie/Akinesie (Verarmung/Verlust der Willkürbewegungen) und eines der Kardinalsymptome Rigor (gesteigerter Muskeltonus), Tremor (oszillierende Muskelbewegungen) und Haltungsinstabilität (posturale Instabilität) (Bähr 2003; Diener et al. 2010) (siehe Tabelle 24, S.71). Aufgrund dieser Symptomkonstellation wird die PD als hyperton-hypokinetisches Syndrom bezeichnet.

Die Kardinalsymptome sind meist von nichtmotorischen Symptomen begleitet. Einen Erklärungsversuch für das charakteristische Fortschreiten der Erkrankung bietet das Konzept der aufsteigenden Lewy-Körper-Pathologie. Demnach schreitet die Schädigung durch Akkumulation von  $\alpha$ -Synuklein (in Form von LBs und LNs) abhängig von der Vulnerabilität verschiedener Hirnregionen nach einem sechsstufigen Schema voran (Braak et al. 2003). Der dorsale motorische Kern des N. glossopharyngeus, sowie Kerne des N. vagus und der anteriore olfaktorische Kern gehören zu den empfindlichsten und somit zuerst betroffenen Regionen. Aus diesem Grund können Störungen des Geruchsempfindens Vorboten einer PD sein (Diener et al. 2010). Mit dem Fortschreiten der Erkrankung, weitet sich die Störung in der Regel auf multiple Hirnregionen aus, auch sensorische Symptome

---

<sup>2</sup>  $A\beta$  ist ein abnormales proteolytisches Produkt des Amyloid Precursor Proteins (APP) das sich im endoplasmatischen Retikulum von Nervenzellen bei AD und in extrazellulären Plaques nachweisen lässt.

(Dysästhesien, Schmerzen) können auftreten. Erfasst die Erkrankung den unteren Hirnstamm, sind autonome und vegetative Funktionsstörungen wie die Regulation von Blutdruck, Temperatur, Harnblasenfunktion, Schlaf und sexueller Funktionen die Folge (Ziemssen et al. 2006). Die Ausweitung auf Kerngebiete des Mesencephalons führt wie beschrieben (siehe 1.1.2.3, S.12) durch Affektion der SN zu den typischen motorischen Symptomen, einem kleinschrittigen Gangbild bei gleichzeitiger vornüber gebeugter Rumpfhaltung, vermindertem Mitbewegen der Arme und Hypomimie (Maskengesicht). Ist das limbische System betroffen, sind psychische Symptome wie Angst und Depression die Folge. Die Affektion der Amygdala ist häufig mit milden kognitiven Einschränkungen assoziiert, bis letztendlich der Befall des Kortex zu Störungen der Kognition und in fortgeschrittenen Stadien zum klinischen Bild der Demenz und zum Abbau visuospatialer Fähigkeiten führt. Einer deutschen Studie mit 1449 ambulanten PD-Patienten zufolge sind rund 70% der Erkrankten von neuropsychiatrischen Symptomen betroffen, davon 30% von Demenz und 25% von einer Depression. Weitere Symptome sind Halluzinationen in 11% der Fälle, 4% weisen paranoide und 2% wahnhaftige Symptome auf. In etwa 50% manifestiert sich eine Schlafstörung und 20% der Patienten leiden unter Angstzuständen (Riedel et al. 2010).

Die neurodegenerativen Prozesse setzen vermutlich bereits viele Jahre vor der klinischen Diagnosestellung ein. Erst bei einem Verlust von etwa 50-60% der DA Neurone der SNc werden die Kardinalsymptome klinisch apparent (Lippa et al. 2007).

Eine histopathologische Untersuchung (Autopsie) besitzt nach wie vor die höchste diagnostische Sicherheit. Die am weitesten verbreiteten diagnostischen Kriterien sind die der UKPDS *Brain Bank* (Bhidayasiri und Reichmann 2013). Mit ihrer Hilfe können rund 76% der durch Autopsie gesicherten PD-Fälle identifiziert werden (Gibb und Lees 1988; Hughes et al. 1992). Durch die Anpassung dieser Kriterien, z.B. durch Einbeziehung eines asymmetrischen Beginns der motorischen Symptome, kann eine diagnostische Sicherheit von bis zu über 90% erreicht werden (Bhidayasiri und Reichmann 2013). Weiterhin können ebenfalls pharmakologische oder klinische Tests zur Erhöhung der Diagnosesicherheit hilfreich sein. Mithilfe des L-Dopa-Tests (und seltener des Apomorphin-Tests) kann untersucht werden, ob klinisch erhobene motorische Symptome eine nigrostriatale Funktionsstörung zur Ursache haben. Ein Riechtest mit standardisierten Riechstiften kann Auskunft über den Funktionszustand

des Geruchssinns geben. Der Schellong-Test dient zur Funktionsprüfung der Orthostase. Bei Blasenfunktionsstörungen kann eine urodynamische Untersuchung indiziert sein, und REM-Schlafstörungen können im Schlaflabor mittels einer Polysomnographie nachgewiesen werden (Diener et al. 2010). Eine Hyperechogenität der SN in der transkraniellen Sonographie liegt bei etwa 90% der PD-Patienten aber nur bei etwa 10% der Gesunden vor, und trägt ebenfalls zur Frühdiagnostik bei (Berg et al. 2011). Im Unterschied zu den genannten klinischen Symptomen handelt es sich hierbei nicht um ein Frühzeichen des neurodegenerativen Prozesses, sondern um einen Risikomarker für die Erkrankung. Tomographische Verfahren, wie die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT), werden meist zum Ausschluss relevanter Differentialdiagnosen verwendet. Einzel(Single)photonen-Emissions-Tomographie (SPECT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) können zur Untersuchung der dopaminergen Neurotransmitter in frühen Krankheitsstadien hilfreich sein.

Nach klinischen Gesichtspunkten lässt sich die PD in den Tremordominanz-, den Rigordominanz- und den Äquivalenztyp einteilen. Eine Einteilung nach Schweregrad der Erkrankung erlaubt die Skala nach Hoehn und Yahr (H&Y) (Hoehn und Yahr 1967), siehe Tabelle 26, S.73).

#### 1.1.2.5. *Parkinson-Krankheit und Demenz*

Die Prävalenz der Demenz unter PD-Patienten beträgt 24-31%. Das entspricht einem Anteil von 3-4% der Demenzfälle (Aarsland et al. 2005). Sie ist von Ethnizität und Geschlecht abhängig. Menschen weißer Hautfarbe sind häufiger betroffen als nicht-weiße, und Männer häufiger als Frauen. Außerdem besteht eine Assoziation mit dem Alter (Reid et al. 1996). Verglichen mit Kontrollprobanden haben PD-Patienten ein bis zu 6-fach erhöhtes Risiko an einer Demenz zu erkranken. Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören fortgeschrittenes Alter und Schwere der motorischen Symptome (Emre et al. 2007).

### 1.1.3. Demenz mit Lewy-Körpern (DLB)

Die Demenz mit Lewy-Körpern (DLB) ist eine progrediente neurodegenerative Demenzform (McKeith et al. 2005). Der Begriff wurde im Jahr 1996 durch die erste internationale Arbeitsgemeinschaft des DLB-Konsortiums geprägt (McKeith et al. 1996). Davor war die Erkrankung unter verschiedenen Namen bekannt, wie beispielsweise *diffuse Lewy-Körpererkrankung*, *Lewy-Körper-Variante der AD*, *senile Demenz vom LB-Typ* oder *AD mit konkominanten LBs* (Zaccai et al. 2005). Aufgrund der großen Überschneidung von DLB und PD wird diskutiert, ob es sich bei der DLB um eine Unterform der PD - anstatt um eine vollkommen eigenständige Erkrankung - handelt (Lippa et al. 2007). Um diesen beiden Möglichkeiten Rechnung zu tragen, soll im Folgenden zunächst die Charakteristik der DLB dargestellt werden, bevor die Beziehung von DLB und PD weiter diskutiert wird (siehe [1.1.4](#), S.18).

#### 1.1.3.1. *Epidemiologie*

Die DLB ist nach der AD die zweithäufigste Ursache für eine degenerative Demenzform. Der Anteil der DLB an der Gesamtzahl der Demenzerkrankungen wird auf bis zu 30% geschätzt. In Autopsiestudien machen sie zwischen 15-25% der Demenzerkrankungen aus (Zaccai et al. 2005). Die Inzidenz der DLB beträgt 0,1% der Gesamtbevölkerung/Jahr und 3,2% aller Demenzerkrankungen/Jahr. Über den Einfluss von Alter, Geschlecht und ethnischen Hintergrund ist nur wenig bekannt. Insgesamt scheinen Männer aber häufiger betroffen zu sein als Frauen. Das Erkrankungsalter liegt zwischen dem 50. und 83. Lebensjahr. Der Tod tritt meist im Alter von 68-92 Jahren ein. Selten zeigt sich ein fulminanter Krankheitsverlauf mit rapider Verschlechterung und Tod innerhalb von 1-2 Jahre nach Krankheitsbeginn (McKeith 2002; Zaccai et al. 2005).

#### 1.1.3.2. *Ätiologie*

Über die Ätiologie der DLB ist wenig bekannt. Aufgrund der Überschneidungen der pathologischen Merkmale der DLB mit denen von AD und PD wurde vermutet, dass der Erkrankung eine ähnliche Ätiologie wie PD und/oder AD zugrunde liegen könnte (McKeith 2002). Darüber hinaus gibt es Hinweise für eine genetische Mitbeteiligung.



Im Verdacht stehen insbesondere AD- und PD-assoziierte Gene (Huang und Halliday 2013) wie z.B. das *PARK11*-Gen (Bogaerts et al. 2007). Variationen der Gene, die für  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Synuklein kodieren (*SNCA*, *SNCB* und *SNCG*), wurden mit der diffusen Form der DLB in Verbindung gebracht (Nishioka et al. 2010).

#### 1.1.3.3. *Pathogenese, Neuropathologie*

Die Pathogenese der DLB ist noch unklar. Vermutet wird ein Zusammenhang mit den charakteristischen neuronalen Einschlusskörperchen, den namensgebenden LBs (McKeith et al. 1996) (siehe 1.1.2.3, S.12). In präsynaptischen Endigungen werden die Proteinaggregate als LNs bezeichnet. LBs und LNs treten vor allem in Neuronen und Gliazellen des zentralen, peripheren und autonomen Nervensystems auf (Jellinger 2009).

Bei der DLB kommt es wie auch bei der PDD zu einer Abnahme des Neurotransmitters Acetylcholin in kortikalen Bereichen (cholinerges Defizit). Ebenso kann auch bei der DLB die A $\beta$ -Konzentration erhöht sein (vgl. 1.1.2.3, S.12). In etwa 30% der Fälle können leichtgradige Zeichen einer neurovaskulären Erkrankung nachgewiesen werden (McKeith et al. 2000).

#### 1.1.3.4. *Symptome, Diagnosestellung*

Eine fortschreitende Demenz ist die Grundvoraussetzung für die Diagnose. Typische Symptome sind Beeinträchtigungen der Gedächtnisleistung, sowie Störungen von Aufmerksamkeit, Exekutivfunktionen und visuospatialen Fähigkeiten (McKeith et al. 1996). Als Kernsymptome gelten Fluktuationen des Bewusstseins mit Veränderung von Wachheit und Aufmerksamkeit, sowie Parkinsonismus und (visuelle) Halluzinationen. Von den visuellen Halluzinationen sind ungefähr 2/3 der Patienten betroffen, 40% leiden zusätzlich an einer Depression. Einen hinweisenden Charakter haben z.B. Schlaf-Verhaltensstörungen in der *Rapid-Eye-Movement-Phase* (REM-Phase), schwere neuroleptische Sensitivität und ein geringer Dopaminspiegel im SPECT oder PET-CT im Bereich der Basalganglien (McKeith et al. 2005) (siehe Tabelle 25, S.72). Die Progression der Symptome entspricht dem Fortschreiten bei PD und AD, mit einem Abbau von rund 10%/Jahr (McKeith 2002).

Die Diagnose der DLB wird anhand der charakteristischen Symptome und unter Ausschluss von Differenzialdiagnosen getroffen. Von Bedeutung ist die Abgrenzung zu PD und vor allem AD, der häufigsten Fehldiagnose der DLB (McKeith et al. 2005). Die Symptome werden nach ihrem diagnostischen Stellenwert in essentielle Kernsymptome, sowie hinweisende und unterstützende Symptome eingeteilt (siehe Tabelle 25, S.72) (McKeith et al. 2005).

Klinische Quantifizierungstests, wie der Mini-Mental Status Test (MMST), geben erste Hinweise zur Quantifizierung eines dementiellen Syndroms, sind jedoch keine verlässlichen Hilfsmittel zur Unterscheidung von DLB und anderen Demenzsyndromen. Anders als bei der AD besteht bei der DLB häufig ein relativer Erhalt des Kurzzeitgedächtnisses. In der Bildgebung zeigen sich unspezifische strukturelle Veränderungen der generalisierten Hirnatrophie. Bei ungefähr 40% der Betroffenen kann im Unterschied zur AD ein Erhalt des Mediotemporallappens festgestellt werden. In der Dopamintransporter-Szintigraphie lässt sich im Gegensatz zur AD eine präsynaptische Schädigung feststellen (McKeith 2002).

#### 1.1.4. Beziehung von DLB und PD

PD und DLB weisen klinisch und pathologisch viele Ähnlichkeiten auf. Es wird daher angenommen, dass PDND, PDD und DLB unterschiedliche Stadien eines kontinuierlichen Krankheitsprozesses sind (Lippa et al. 2007). Entsprechend schwierig ist die Unterscheidung, vor allem von PDD und DLB: Beide können kognitive Fluktuationen, Parkinsonismus, psychische und autonome Symptome, sowie Störungen von Gedächtnis, Aufmerksamkeit, Sprache, Verhalten und des REM-Schlafes aufweisen. DLB-Patienten leiden jedoch häufiger an Halluzinationen und Psychosen. Während bei der DLB eher ein symmetrischer Parkinsonismus auftritt, zeigen PDD-Patienten häufiger eine Seitenbetonung der motorischen Symptome (Goldmann Gross et al. 2008). Der Beginn der kognitiven Symptome wird jedoch im Allgemeinen als hinreichendes Unterscheidungsmerkmal angesehen (McKeith et al. 1996). Demnach besteht eine DLB, wenn kognitive Symptome vor oder bis zu einem Jahr nach Manifestation von Parkinsonsymptomen auftreten. Andernfalls (mehr als ein Jahr nach Manifestation der PD-Symptome) spricht man von einer PDD (Lippa et al. 2007) (siehe Abbildung 7, S.67). Allerdings ist diese Einteilung willkürlich und bislang existiert kein

Marker, der eine zuverlässige Unterscheidung erlaubt. Deshalb wurde angeregt, PDD und DLB nicht als eigenständige Entitäten zu betrachten, sondern sie unter dem Namen „PDD/DLB-Komplex“ zusammenzufassen (McGeer und McGeer 2008).

## 1.2. **S100B**

### 1.2.1. S100-Proteine

S100-Proteine sind nicht ubiquitäre Vertreter der multigenen Familie Calcium-bindender Proteine. Ihren Namen verdanken sie ihrer biochemischen Eigenschaft, in 100%igem Ammoniumsulfat bei neutralem pH in Lösung zu bleiben (S100, engl.: *Soluble in 100% ammonium sulfate*) (Moore 1965). Mit einer Molekülmasse von 9-13 kDa (Monomer) bis 21 kDa (Dimer) zählen die Mitglieder der S100-Familie zu den niedermolekularen Proteinen. Sie sind saure, thermolabile Homo- oder Heterodimere, die über nicht-kovalente Bindungen aus den isomeren Untereinheiten  $\alpha$  (10,4 kDa) und  $\beta$  (10,5 kDa) zusammengesetzt sind. Demnach existieren drei Isoformen des Proteins: S100A1 ( $\alpha\alpha$ ), S100A ( $\alpha\beta$ ) und S100B ( $\beta\beta$ ). Die meisten S100-Proteine sind jedoch Homodimere. Die Isoformen weisen ein gewebsspezifisches Expressionsmuster auf (siehe Tabelle 27, S.73). Derzeit sind 21 Vertreter der S100-Familie bekannt, die ausschließlich in Vertebraten exprimiert werden und an Prozessen der zellulären Differenzierung, Proliferation und Regulation beteiligt sind (Donato 2003).

Alle S100-Proteine besitzen eine charakteristische  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle, deren Motiv (Helix-Schleife-Helix) als „EF-Hand“ bezeichnet wird und je nach Protein eine unterschiedliche Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Moleküle aufweist. Dimere S100-Proteine besitzen zwei dieser Bindungsstellen, die durch eine sog. Gelenkregion miteinander verbunden sind (Donato 2003) (siehe Abbildung 8, S.67). Das C-terminale EF-Hand-Motiv besitzt im Gegensatz zu dem N-terminalen eine ca. 100-fache Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Mitglieder der S100-Familie unterscheiden sich voneinander durch Sequenz und Länge der Gelenkregion und des C-terminalen Endes (Donato 2003; Marenholz et al. 2004). Aus diesem Grund wird die strukturelle Grundlage der unterschiedlichen Funktionen der S100-Proteine in diesen variablen Bereichen vermutet.

### 1.2.2. S100B

S100B ist ein Homodimer aus zwei Beta-Untereinheiten ( $\beta$ -UE), das überwiegend in Gliazellen, aber auch in Neuronen (Steiner et al. 2007), Melanomzellen, Adipozyten

und Langerhans-Zellen vorkommt (Thomas 2005). Im ZNS wird es vor allem in Astrozyten gebildet und von ihnen sezerniert (Sorci et al. 2010; Van Eldik und Zimmer 1987). S100B-Proteine sind gewebs-, aber nicht krankheitsspezifisch. Erhöhte Proteinkonzentrationen wurden im Zusammenhang mit einer Reihe von Erkrankungen und Konditionen beschrieben, darunter neurodestruktive (SHT, zerebrale Ischämie, hypoxische Hirnschäden), neuroinflammatorische (bakterielle und andere Meningitiden, Guillain-Barré-Syndrom (GBS), Creutzfeldt-Jakob-Krankheit) und neurodegenerative Erkrankungen (AD, Frontotemporale Lobätraprophie, Trimosmie 21) und andere Krankheiten (Schizophrenie, Depression, chronischer Alkoholismus, Gilles de la Tourette-Syndrom, Herzstillstand und kardiopulmonale Bypass-Operation) (Kleindienst et al. 2010; Petzold et al. 2003; Petzold et al. 2009; Rothermundt et al. 2003; Sorci et al. 2010; Steiner et al. 2006). Im Rahmen akuter Ereignisse im ZNS dient S100B darüber hinaus zur Beurteilung von Funktionseinschränkungen der Blut-Hirn-Schranke (Kanner et al. 2003). Die Konzentration des S100B-Proteins im Liquor und die Expression der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) korrelieren positiv mit dem Alter (Sheng et al. 1996). Die  $\beta$ -UE von S100-Proteinen im Serum korreliert zudem positiv mit der Invasionstiefe des metastasierten Melanoms (Jackel et al. 1999), für welches S100-Proteine als Marker für Differenzialdiagnose und Prognose verwendet werden (Brochez und Naeyaert 2000; Thomas 2005).

### 1.2.3. Zur Rolle von Gliazellen in der PD-Pathogenese

Gliazellen sind im Allgemeinen als Zellen bekannt, die eine unterstützende Funktion für Neurone ausüben. Einiges deutet jedoch darauf hin, dass die pathologischen Veränderungen der PD (Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein und Neuronenverlust) nicht allein durch neuronale Vorgänge erklärt werden können, sondern zusätzlich gliale Veränderungen voraussetzen. Beispielsweise endozytieren Astrozyten von Neuronen ausgeschiedenes  $\alpha$ -Synuklein, welches zunächst Einschlusskörperchen bildet und dann eine zelluläre Entzündungsantwort auslöst (Lee et al. 2011). Diese  $\alpha$ -Synuklein-positiven Astrozyten sind im ZNS begleitend zu den LBs nachweisbar (Braak et al. 2007). In frühen Krankheitsstadien scheinen die Aggregate zunächst zu einer gestörten Zellfunktion der Astrozyten zu führen. Im weiteren Verlauf kommt es durch zunehmende Aggregatbildung zur Rekrutierung phagozytotisch aktiver Mikroglia, die

Neuronen bestimmter Hirnregionen (z.B. SNc) angreifen, und durch deren Untergang zu den klinischen Symptomen der PD führen können (Halliday und Stevens 2011; Wu et al. 2002). Diese Hinweise auf eine gliale Beteiligung sind im Rahmen der vorgelegten Arbeit deshalb von Interesse, weil S100B im ZNS überwiegend in Astrozyten zu finden ist.

#### 1.2.4. Zur möglichen Rolle von S100B in der PD-Pathogenese

Die mögliche Rolle von S100B in der Pathogenese der PD kann am MPTP-Mausmodell erklärt werden: MPTP führt zum Untergang von Neuronen in der SN und ist in der Lage, Symptome hervorzurufen, die von denen der idiopathischen PD nur schwer zu unterscheiden sind (siehe 1.1.2.4, S.13) (Langston et al. 1983). Innerhalb eines Tages führt das Neurotoxin im Mittelhirn von Mäusen (Lokalisation der SNc) zu einem Anstieg der S100B mRNA und Proteinkonzentration. Die erhöhten S100B-Konzentrationen normalisieren sich anschließend innerhalb von 3 Wochen nach Applikation, während die mRNA im selben Zeitraum sogar unter das Ausgangsniveau fällt (Sathe et al. 2012). Dieser Mechanismus deutet auf die Fähigkeit des Mausorganismus hin, die Konzentrationen von S100B durch Regulierung der Expression anzupassen und im Normalbereich zu halten. Fraglich ist, ob dieser Mechanismus bei Patienten mit PD nicht oder nur in unzureichendem Ausmaß aktiv ist. Die beschriebenen Reaktionen verleiten zu der Annahme, dass S100B eine Rolle in der Pathogenese der LBD (bzw. PD) spielen könnte (Muramatsu et al. 2003; Sathe et al. 2012).

Weitere Hinweise für diese mögliche Rolle liefern Studien zellulärer Signalwege. Das Vorkommen des S100B-Proteins in Extrazellularraum, CSF und Serum ermöglicht parakrine, autokrine und endokrine Wirkungsweisen des Proteins (Donato 2001). Im Extrazellularraum des Gehirns findet sich S100B unter normalen Bedingungen in subnanomolaren und nanomolaren Konzentrationen. In diesem Konzentrationsbereich besitzt es neurotrophische und gliotrophische Eigenschaften, fördert neuronales Überleben und Neuritenwachstum während Entwicklungs- und unter Stresssituationen (Bianchi et al. 2007). Kommt es zu einer Ansammlung von S100B im extrazellulären Raum und zu einem Anstieg auf mikromolare Konzentrationen, vermittelt das Protein hingegen eine schädliche Wirkung (Donato 2003). Dies scheint vorrangig über den

RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*)-Rezeptor zu erfolgen. Der RAGE-Rezeptor ist ein Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie. Er ist ein Multiliganden-Rezeptor, der auf der Zelloberfläche von Neuronen und Mikroglia vorkommt und unter anderem von S100B gebunden werden kann (Bianchi et al. 2007; Donato 1999; Hofmann et al. 1999). RAGE vermittelt die Aktivierung des Kernfaktors NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B) (Yan et al. 1994) und führt zur Expression proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Basta et al. 2002). S100B führt zu einer Erhöhung der neuronalen RAGE-Expression, welche zumindest zu einem Teil die nanomolaren und mikromolaren Effekte von S100B bedingt (Hofmann et al. 1999; Villarreal et al. 2011). Die genetische Blockade von S100B hat hingegen eine verringerte RAGE- und TNF- $\alpha$ -Konzentration zur Folge (Sathe et al. 2012). Auch die Ansammlung der zytoplasmatischen S100B-Konzentration in Astrozyten bewirkt einen Anstieg von IL-6 in diesen Zellen. Auf diese Weise führt S100B über eine Zunahme von IL-6, Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und TNF- $\alpha$  letztlich auf direktem Wege in den Neuronen oder indirekt über die Aktivierung von Mikroglia zu neuronaler Apoptose (Kim et al. 2004; Li et al. 2000; Sorci et al. 2010; Zimmer et al. 1995). Umgekehrt induziert IL-1 $\beta$  die Expression von S100B (Anderson et al. 2009). Durch diesen Mechanismus ist eine wechselseitige Aktivierung im Sinne eines „Teufelskreises“ denkbar, der die beschriebene Kaskade beschleunigen und die Schädigung der Zellen begünstigen kann. Desweiteren bewirkt S100B die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und die Aktivierung der Caspase-3, welche nachfolgend ebenfalls zur Apoptose führen können (Hu et al. 1997; Iuvone et al. 2007). Die Zellschädigung erfolgt vermutlich zumindest zu einem Teil durch die induzierbare Stickstoffmonoxid (NO) Synthase (iNOS) und die nachfolgende Bildung von NO. Auch diese Signalkette mündet in astrozytärem und neuronalem Zelltod, der durch die gezielte Blockade mittels iNOS Inhibitoren *in vitro* verhindert werden kann (Hu et al. 1997) (siehe Abbildung 9, S.68).

Weitere – indirekte – Hinweise für eine Rolle von S100B in der Pathogenese der PD basieren auf genetischen Studien. Demnach bestehen Assoziationen des S100B-Gens (21q22.3) mit Schizophrenie (Liu et al. 2005) und Psychose bei bipolar affektiver Störung (Roche et al. 2007). Beiden Erkrankungen liegt ein Dopamin-Ungleichgewicht zugrunde. Der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs3788266 befindet sich in einer

Konsensus-Bindestelle für *Six-Family*-Transkriptionsfaktoren, weshalb er direkten Einfluss auf die Expression von S100B haben könnte (Roche et al. 2007). Ein weiterer SNP, rs2300403, der sich in Intron<sup>3</sup> 2 auf dem S100B-Gen befindet, ist mit verminderter kognitiver Funktion und einem erhöhten Risiko für Demenz assoziiert, einem häufigen Symptom der LBD (PDD, DLB). Zudem besteht bei Vorliegen des SNPs ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AD (Lambert et al. 2007).

---

<sup>3</sup> Intron (engl.: Intervening region) ist eine nicht kodierende DNA-Sequenz eines Gens



### 1.3. Fragestellung

Welcher Anteil dem  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Protein S100B in der Pathogenese der PD zukommt, ist bisher nicht ausreichend bekannt. Die beschriebenen Hinweise auf eine Verknüpfung des Proteins mit ursächlichen und krankheitsrelevanten Prozessen erhärten den Verdacht einer möglichen primären Rolle des S100B. Gleichzeitig sprechen die Ergebnisse einiger Studien eher für eine sekundäre Rolle (siehe 1.2.4, S.22). Ausgehend von der Hypothese, dass S100B an der Pathogenese der LBD beteiligt ist, führten wir eine Studie zur Bestimmung der S100B-Proteinkonzentrationen in CSF und Serum bei Patienten und Kontrollen durch und analysierten SNPs auf dem S100B-Gen (rs3788266 und rs2300403), die bereits mit einem DA-Ungleichgewicht in Verbindung gebracht werden konnten. Die Studie beschäftigt sich daher mit den folgenden Fragestellungen:

- Besteht eine Erhöhung der S100B-Konzentration in CSF und Serum von PD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen?
- Korreliert die Proteinkonzentration mit dem Alter der Probanden?
- Korrelieren die klinischen Parameter Erkrankungsalter (Parkinsonismus/Demenz) und Krankheitsdauer (Parkinsonismus/Demenz), H&Y-Stadien (Parkinsonismus) und MMST-Ergebnisse (Demenz) mit der gemessenen Konzentration in CSF und Serum?
- Sind die SNPs rs2300403 und rs3788266 mit dem Auftreten der LBD assoziiert?
- Besteht ein Zusammenhang der SNPs rs2300403 und rs3788266 mit den S100B-Konzentrationen in CSF und Serum oder klinischen Parametern?

---

## 2. Studienkollektiv, Material und Methoden

---

### 2.1. Studienkollektiv

Das Studienkollektiv wurde aus Patienten und Kontrollpersonen (Healthy controls, HCs) des Universitätsklinikums Tübingen gebildet. Alle Personen wurden von Spezialisten im Bereich neurologischer und neurodegenerativer Bewegungsstörungen über die Ambulanzen oder die Station der Abteilung Neurodegeneration des Universitätsklinikums Tübingen rekrutiert. Insgesamt konnten 196 Probanden in die Studie eingeschlossen werden, davon 101 LBD-Patienten und 95 HCs (siehe Tabelle 21, S.50).

Die Identifizierung der Patienten erfolgte anhand der aktuell gültigen Diagnosekriterien für PDND, PDD und DLB. Alle PDND- und PDD-Patienten erfüllten die klinischen Diagnosekriterien der UKPDS Brain Bank (Litvan et al. 2003). PDD-Patienten erfüllten zudem die Diagnosekriterien für Demenz der Amerikanischen Psychiatrischen Vereinigung (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV, DSM-IV). Die DLB-Patienten wurden nach den überarbeiteten McKeith-Kriterien identifiziert (McKeith et al. 2005). HCs durften keine Anzeichen für Erkrankungen aufweisen, die mit einer erhöhten Expression von S100B einhergehen oder mit einer erhöhten Konzentration des Proteins in Serum und Liquor assoziiert sind (siehe 1.2.2, S.20). Die Lumbalpunktionen (LP) erfolgten bei HCs aufgrund von Rückenschmerzen (lumbale Spinalstenose, lumbale Diskushernie oder Bandscheibenvorfall) und nichtspezifischen wahrscheinlich funktional bedingten Symptomen (Kopfschmerzen, Konzentrationsschwäche und Stimmungsschwankungen nach Ausschluss einer vaskulären Ursache, Entzündung und/oder Demenz). Weitere Probanden wurden bei nichtdiabetischer peripherer Neuropathien (Ausschluss einer entzündlichen Ursache) einer LP unterzogen.

Zusätzlich zu einer gründlichen neurologisch-klinischen Untersuchung der Probanden wurden alle Patienten in H&Y-Stadien eingestuft und mit dem MMST getestet. Weitere klinische Parameter wie z.B. Krankheitsbeginn und -dauer wurden in einer

ausführlichen Anamnese durch den behandelnden Arzt erhoben (weitere Informationen siehe [2.5](#), S. 47).

## 2.2. Liquor-, Serum- und DNA-Proben

Das in dieser Studie ausgewertete Probenmaterial wurde aus Liquor- (Cerebrospinal fluid, CSF), Serum- und DNA-Proben (Desoxyribonukleinsäure) der Biobank des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung zusammengestellt (<http://www.hih-tuebingen.de/biobank/>). Die Gewinnung und Aufbereitung der Proben erfolgten nach international geltenden Standards (Maetzler et al. 2011; Miller et al. 1988).

### 2.2.1. Routineparameter

In die Studie wurden nur Patienten und HCs eingeschlossen, deren Liquorparameter die folgenden Anforderungen erfüllten: Eine normale Zellzahl ( $<4$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ), ein normaler CSF/Serum Immunglobulin Index ( $<0,6$  ohne Hinweis auf intrathekale IgG<sup>4</sup>-Synthese) und eine CSF Albuminkonzentration  $<500$  mg/l. Die Serumparameter mussten normale Werte an C-reaktivem Protein und Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit aufweisen und durften keine Anzeichen einer chronisch entzündlichen Erkrankung zeigen. Bei zwei Probanden (1 Patient und 1 HC) war zu wenig CSF, aber ausreichend Probenmaterial aus dem Serum vorhanden. Da der Liaison® S100 Sandwichtest in diesen Fällen eine zu geringe Konzentration errechnet ( $0,01$   $\mu\text{g/l}$ ), wurden die beiden Personen aus der CSF-, nicht aber aus der Serum S100B-Statistik, ausgeschlossen.

### 2.2.2. Aufklärung, Einverständnis und Datenschutz

Alle Probanden erklärten schriftlich ihr informiertes Einverständnis zur Archivierung und Verwendung der Proben zu Forschungszwecken, sowie zur Sammlung, Speicherung, Auswertung und Publikation der klinischen Daten. Die Genehmigung zur Durchführung dieser retrospektiven Studie erfolgte durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen (Ethikantrag 343/3003).

---

<sup>4</sup> Immunoglobulin G

## 2.3. Material

### 2.3.1. Chemikalien und Enzyme

<i>Method</i>	<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
<b>PCR</b>	GoTaq® DNA-Polymerase 5 u/µl	Promega
	5x PCR-Puffer GoTaq® colorless	Promega
	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas
	Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) 25 mM	Promega
<b>Gelelektrophorese</b>	SeaKem® LE Agarose	Lonza
	Ethidiumbromid (1%ige Lsg. in H <sub>2</sub> O)	Merck
	GeneRuler™ DNA Ladder Mix 0,5 µg/µl	Fermentas
	6x DNA Loading Dye 1 ml	Fermentas
<b>Aufreinigung/ Verdau</b>	Exonuclease I (Exo I) Enzym 20 u/µl	BioLabs
	10x Exonuclease I (Exo I) Puffer	BioLabs
	Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) 1 u/µl	BioLabs
<b>SNaPshot®</b>	SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix	Applied Biosystems
<b>Sequencer</b>	Formamid	Applied Biosystems
	Gene Scan-120 LIZ Size Standard	Applied Biosystems

Tabelle 2: **Verwendete Chemikalien und Enzyme** sortiert nach Teilschritten der SNaPshot®-Genotypisierung (siehe 2.4.2, S.35).

### 2.3.2. Pufferlösungen

<i>Puffer</i>	<i>Bestandteil</i>	<i>Menge</i>
<b>Tris-Borat-EDTA (10x TBE-Puffer)</b>	Tris-Base	108 g (0,89 M)
	Borat	55 g (0,89 M)
	EDTA	40 ml (0,5 M, pH 8,0)
	mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> auf 1 Liter auffüllen	
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) Konzentration im Laufpuffer und Agarosegel: 0,5x TBE = 44,5 mM Tris-Base + 44,5 mM Borat + 1 mM EDTA		
<b>Bromphenolblau- Puffer (Gel-Lade- Puffer)</b>	Glycerol	50% (20 ml)
	Bromphenolblau	0,1% (0,04 g)
	Xylencyanol	0,1% (0,04 g)

Tabelle 3: **Pufferlösungen Tris-Borat-EDTA und Bromphenolblau-Puffer** für die Gelelektrophorese (siehe 2.4.1, S.33). Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser (aqua bidest, H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, LiChrosolv®, MERCK KGaA) angesetzt.

### 2.3.3. Liaison® S100-Reagenzien

#### **Reagenz Integral** (für 100 Bestimmungen)

Magnetpartikel beschichtet	2,3 ml
Diluent (für Liquor)	4,0 ml
Konjugat (anti-S100B mit Isoluminol markiert)	23,0 ml
Assaypuffer	14,0 ml
Stabilität: Geöffnet 2 Wochen, sonst laut Verfallsdatum bei Lagerung und 2-8 °C	

Tabelle 4: **Liaison® Reagenz Integral** zur immunoluminometrischen Bestimmung von S100B in Serum und Liquor. DiaSorin Deutschland GmbH.

#### **Starter** (2\*3 Fläschchen für je 1000 Bestimmungen)

Liaison® Starter 1: Katalysator in 4% NaOH	230 ml
Liaison® Starter 2: 0,12% Peroxidlösung	230 ml
Alle Reagenzien in gebrauchsfertiger Konzentration. Stabilität: Vor direkter Lichteinwirkung schützen, sonst laut Verfallsdatum bei Lagerung und 15-30°C	

Tabelle 5: **Liaison® Starter Kit** zur Initiierung der Lichtreaktion des Chemolumineszenztests Liaison® S100. DiaSorin Deutschland GmbH.

### 2.3.4. DNA-Größenstandard

100 bp DNA-Leiter (GeneRuler™ DNA Ladder Mix 0,5 µg/µl)

### 2.3.5. Oligonukleotide (Primer)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Fragmentlänge
rs2300403_F	CCT GTC TGC TCC ACT CTG AA	232 bp
rs2300403_R	CTC ACC AAG CCC TAT TCC AG	
rs2300403_SNAP	CAG CAG CAC GGC AGT CC	
rs3788266_F	CAG ATG TTG GAG GGA CCA TT	162 bp
rs3788266_R	CAC AGG TGT ACG GTC ATT GC	
rs3788266_SNAP	AAG GGT TAA TCC AGA GCT CAG G	

Tabelle 6: **Sequenzen der PCR- und SNaPshot®-Primer** für die Genotypisierung der SNPs rs2300403 und rs3788266. F = *Forward-Primer*, R = *Reverse-Primer*, SNAP = SNaPshot®-Primer. Ermittlung der Primersequenz: Primer 3 (<http://primer3.sourceforge.net/>)  
 Hersteller: metabion international AG. Synthesekala: 0.02 µmol; Reineitsgrad: „entsalzt“; Lieferungsform: „lyophilisiert“; Qualitätskontrolle: „DMT Monitoring“. Alle Primer wurden auf eine Konzentration vom 10 ng/µl verdünnt.

### 2.3.6. Referenzsequenzen

Die FASTA Sequenzen der beiden SNPs rs2300403 und rs3788266 wurden mithilfe von ENTREZ SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) identifiziert. Die Sequenzen sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt.

#### **FASTA Sequenz rs2300403**

---

```

TTAAGCACTG TCCCGCTTCA CCCTCACAAAC AGCCCTTGTT CAGAAGAAGA
ACCTGGGACT CTCAGATCAA GTCAGAAGGC AAGATTGGTG GAACTAGAAA
ACTGCATGTG TGAGTGGGAC TGCTGTCACT CTGTCGGCTT GAATGCCTGA
GAAAACCAGT CCTGGAATCA GATGTGGGGA CACCCTCTGC AAAGTTTCAG
GCCTGTCTGC TCCACTCTGA ACCATTACAG GTGGGGCAGT GTTTGGTGGG
AGTGGGGACA GGAGAACCAG CCAGCGCCCC CTCCCCCTGC CCTGAAAACA

```

Y

```

GGACTGCCGT GCTGCTGGAG CCAGGGCTTG CCGTCTTGCA CTGAGAGGCT
TGCCAGCTC AGGAGGGCAG CTCCCCGTCC CCATGCAGCA GAGCCCTGCC
CTGGTATTTA TCCTGGAATA GGGCTTGGTG AGACACTAGT GCGCTGGCTC
ATTGTCTGGT CATTATCCC GTTTGTGATT GTCATATCA GTGACCCAGG
AAGCCCTTCA CTACGTTTCA TATGTGCACA CCACTGGTGC TTCACTCTGG
CTCAAGGCGT GCCTCAAGCC AGCCTTGGTT CTAAGAGAGC ATCAGGTACC

```

---

**Tabelle 7: FASTA Sequenz des SNP rs2300403.** Name der Datenbank: dbSNP | refSNP rs#: rs2300403 | Position des variablen Allels (5' Ende plus 1): 301 | Gesamtzahl der Basen der FASTA Sequenz (5' nach 3' plus 1): 601 | NCBI Taxonomie ID: 9606 | SNP-Klasse: 1 | Allele: 'C/T' | Molekulare Quelle: genomisch.

#### **FASTA Sequenz rs3788266**

---

```

GTCTTGCGTG GCTCAGCCTG CCCAGCCTC CTGTGAGGAA CAGCCTGAGC
AGTGTGGTTG GCCCTCACTT CCTCATCGGC TTCACCACCC CTGGCTGTGG
TCTCTGCTGA AGGATCTGAC ACAGGCTTGC TCTGTGAAGC ACAGAGCTTG
CCCAGGCCCA AGGAAGGCAC AACTGTGCTC TGTGCCCTT CCTCGCTCAG
ATGTTGGAGG GACCATTCCCT GTAAGTGCTG ACCACTTCCC CAGAGTGGCA

```

R

```

CCTGAGCTCT GGATTAACCC TTCAGTGTCC ATAGAAAACG CTCTAGCCTG
CTCCTGCAGG GGTTAAAAAT AGTTTGAAAT CCACTCATGC AATGACCGTA
CACCTGTGCT TAGGGCACTG CGTTCAGCAG GAGGGCCCAG CCGGGCCTGC
CCTCTGCACA CTGCAGCTTC CTGGGATGGC AAGTGTGGGG CCGTGGGTCC
ACCCTGTTCC CAGGTCTTGG AAGCAGGCTG AGAGAGAGGA TCTGCCACAG

```

---

**Tabelle 8: FASTA Sequenz des SNP rs3788266.** Name der Datenbank: dbSNP | refSNP rs#: rs3788266 | Position des variablen Allels (5' Ende plus 1): 251 | Gesamtzahl der Basen der FASTA Sequenz (5' nach 3' plus 1): 501 | NCBI Taxonomie ID: 9606 | SNP-Klasse: 1 | Allele: 'A/G' | Molekulare Quelle: genomisch.

### 2.3.7. Geräte und Hilfsmittel

<b>Hilfsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Einfachpipetten	Eppendorf
Einfachpipetten, pipetman	Gilson
Eismaschine ZBE	Ziegra Eismaschinen
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Erlenmeyerkolben, 500 ml	Schott
Gefrierschrank premium -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	New Brunswick
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
Kolorimeter Spectra II	SLT
Kühlschrank	Bosch
Kühlschrank ML402	Dometic Medical Systems
Magnetrührer MR3000	Heidolph
Mehrkanalpipette research 0,5-10µl	Eppendorf
Mikrowellenherd NN E202W	Panasonic
Multipette® plus	Eppendorf
Nanodrop Spectrophotometer ND1000	Peqlab Biotechnologie GmbH
Plexiglaskämme 24 Well 1,5 mm	Peqlab Biotechnologie GmbH
Rühr-Heizgerät Typ MR 02	Heidolph
Skalpell 10	Braun
Spannungsquelle E835 (300V/500mA)	Consort
Thermocycler DNA-Engine DYAD	Bio-Rad
Tischzentrifuge, Spectrafuge Mini	Labnet International, Inc.
UV-Tisch	Vilber Lourmat
Videodrucker P91 schwarz/weiß	Mitsubishi
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage Explorer	Ohaus
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf

**Tabelle 9: Geräte und Hilfsmittel** in alphabetischer Reihenfolge. Zur Anwendung siehe [2.4.1](#), S.33 und [2.4.2](#), S.35.

### 2.3.8. Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
8er-Tube-Strips 0.2 ml und Deckel	Peqlab Biotechnologie GmbH
96-well PCR-Platten und Plattensepten	Peqlab Biotechnologie GmbH
ABgene® PCR Plates, 96-wells	Thermo Scientific
Aluminiumfolie	Universal
Cellstar® Tubes 50 ml	Greiner bio-one
Combitips plus 0,1 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml	Eppendorf
Eppendorf Tubes, 0,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Frischhalte-Folie, selbsthaftend	Toppits®
Latexhandschuhe DermaClean® M	Ansell
Mikrotiterplatte Greiner 655 101	Greiner
Nitrilhandschuhe Purple Nitrile* M	Kimberly-Clark
Pipettenspitzen 10 µl, farblos	Greiner bio-one
Pipettenspitzen 200 µl, gelb	Sarstedt
Pipettenspitzen 1000 µl, blau	Sarstedt
Pipettenspitzen Premium Tips, farblos, gestopft, Biozym Scientific GmbH DNase-, RNasefrei 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl	
Reaction tubes, 1.5 ml	Greiner bio-one

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge. Zur Anwendung siehe 2.4.1, S.33 und 2.4.2, S.35.

### 2.3.9. Software

<b>Software</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
Bio-Capt	12.5	Vilber Lourmat	UV-Geldokumentation
GeneMapper	3.5	Applied Biosystems	SNP-Genotypisierung
NanoDrop 1000	3.7.1	Thermo Scientific	DNA-Spetrophotometrie

Tabelle 11: Verwendete Software und Anwendungsgebiete.



## 2.4. Methoden

### 2.4.1. Standardmethoden

#### 2.4.1.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren, um DNA *in vitro* zu amplifizieren. Das dafür verwendete Enzym DNA-Polymerase amplifiziert gleich einer Kettenreaktion in jedem Zyklus die PCR-Produkte vorausgegangener Zyklen. Dadurch wird eine exponentielle Vervielfältigung der DNA ermöglicht. Jeder Zyklus besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Primerhybridisierung und Amplifikation. Als Ausgangssubstanz dient doppelsträngige DNA. Die komplementären DNA-Einzelstränge werden als Plusstrang (kodogener oder *sense*-Strang) und Minusstrang (Matrizenstrang oder *antisense*-Strang) bezeichnet. Der kodogene Strang entspricht in seiner Sequenz dem primären RNA-Produkt. Der Matrizenstrang dient der RNA-Polymerase bei der Transkription eines Proteins als Vorlage (Matrize). Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA bei einer Temperatur von 94 °C aufgeschmolzen (Denaturierung). Im zweiten Schritt wird die Temperatur gesenkt, wodurch die Anlagerung der *Primer* begünstigt wird (Hybridisierung). *Primer* sind spezifische Oligonukleotide aus 15-25 Basen, die zu einem bestimmten Abschnitt der DNA komplementär sind und sich deshalb an diesen anlagern. Es werden zwei *Primer* verwendet, die so gewählt werden, dass einer zum *sense*- und der andere zum *antisense*-Strang komplementär ist. Nach der Richtung, in der die Polymerisierung erfolgt, werden sie als vorwärts- und rückwärtsgerichtete Primer, engl.: *Forward*- und *Reverse-Primer* bezeichnet. Die optimale Anlagerungstemperatur (annealing) hängt von der Länge und der Basenzusammensetzung der *Primer* ab und muss daher experimentell ermittelt werden. Im vorliegenden Fall erwies sich eine Temperatur von 55 °C als optimal. Im dritten Schritt amplifiziert die hitzestabile taq-Polymerase<sup>5</sup> ausgehend vom 3'-Ende der hybridisierten *Primer* einen zur Matrize komplementären DNA-Strang (Amplifikation). Hierzu müssen dem PCR-Ansatz Desoxyribonukleotide hinzugefügt werden. Diese

---

<sup>5</sup> Benannt nach dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, aus dem sie gewonnen wird.

dienen als Bausteine für die Elongation und werden von der taq-Polymerase bei einem Temperaturoptimum von 72 °C an das wachsende 3'-Ende des *Primers* synthetisiert. Der Abstand der Sequenzen von *Forward-* und *Reverse-Primer* auf den komplementären Matrizensträngen bestimmt die Länge des amplifizierten DNA-Fragments. Dieser Zyklus wird in einem sog. *Thermocycler* mehrfach durchlaufen (siehe Tabelle 15, S.39). Die Anzahl der PCR-Produkte ist von der Anzahl der Zyklen abhängig (normalerweise 30-40). Im vorliegenden Fall wurde eine Zykluszahl von 35 Zyklen gewählt. Das entspricht eine Vervielfältigung von  $2^{(n+1)} = 2^{(35+1)} = 2^{36} = 68.719.476.736$  Kopien der Matrizen-DNA (siehe Abbildung 10, S.68).

#### 2.4.1.2. *Agarose-Gelelektrophorese*

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um Nukleinsäure-Fragmente (DNA und RNA) oder Proteine ihrer Größe nach zu trennen. Die Größe der Fragmente lässt sich durch den direkten Vergleich mit einer DNA-Leiter bestimmen. Dabei handelt es sich um einen Größenstandard bestehend aus Fragmenten bekannter Größe. Das Agarosegel wird durch Aufkochen von Agarose-Pulver in einem Puffer (z.B. Tris-Borat-EDTA) hergestellt. Agarose ist ein Polysaccharid aus glykosidisch verbundener D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose. Ein angelegtes elektrisches Feld sorgt dafür, dass im Gel befindliche negativ geladene Nukleinsäure-Fragmente (z.B. negative Phosphatgruppen) das Feld entsprechend ihrer Ladung von der Kathode zur Anode durchwandern. Das Netz aus Agarosepolymeren wirkt auf die Partikel wie ein Sieb. Kleine Fragmente wandern in der gleichen Zeit weiter als größere Fragmente. Je höher die Konzentration der Agarose ist, desto feiner wird das Netz aus Agarosepolymeren. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt neben der Beschaffenheit des Gels und der Molekülgröße auch vom pH-Wert des Trenngels und des Laufpuffers sowie der angelegten Spannung des elektrischen Feldes ab. Hochprozentige Gele erzielen eine bessere räumliche Auftrennung der Partikel. Gleichgroße Partikel durchwandern das Gel mit gleicher Geschwindigkeit und bilden sogenannte Banden. Um diese Banden aus unterschiedlich großen DNA-Fragmenten nach ihrer Auftrennung im Gel sichtbar zu machen, wird dem Agarosegel der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr) beigemischt. EtBr ist ein roter Phenanthridin-Farbstoff, der mit der doppelsträngigen DNA interkaliert und dabei sein Absorptionsspektrum verändert. Nach Anregung mit

UV-Licht emittiert der Farbstoff Licht im orange-roten Bereich. Da das Emissionsspektrum durch UV-Bestrahlung unverändert bleibt, nimmt die Intensität der Fluoreszenz-Emission sogar um den Faktor 50-100 gegenüber freiem EtBr zu.

#### 2.4.2. SNaPshot®-Genotypisierung der S100B-SNPs

Die SNaPshot®-Technik ist eine PCR-basierte Methode, mit der durch Einzelbasenelongation eines *Primers* SNPs identifiziert und deren zugrunde liegende Allele quantifiziert werden können.

##### 2.4.2.1. Einzelbasen-Polymorphismen, SNPs

Man geht heute davon aus, dass die Genome zweier randomisiert verglichener Individuen sich in ca. 0,1% ihrer Sequenzen unterscheiden. Diese Unterschiede heißen Polymorphismen und bestehen im einfachsten Fall aus der Variation einzelner Nukleotide (A, T, C, G), den sog. SNPs. Bislang konnten mehr als 3 Millionen dieser Variationen mit einer Frequenz von ca. 1/1000 bp über das gesamte Genom verteilt kartiert werden (Shastry 2009). Diese Polymorphismen stellen rund 90% der genetischen Variationen des menschlichen Genoms dar. Meist bestehen sie aus zwei Allelen, den beiden variablen Nukleotiden. Da nur rund 3-5% des menschlichen Erbguts für Proteine kodieren, befindet sich die Mehrzahl der SNPs außerhalb der kodierenden Sequenzen. Rund 50% der SNPs liegen in nicht-kodierenden Genregionen während 25% zu sinnveränderten, sog. *Missense*-Mutationen führen. Weitere 25% haben aufgrund des Triplet-Codes<sup>6</sup> synonyme Mutationen zur Folge (unveränderte Expression, sog. stille Mutation). Im Vergleich zu nichtsynonymen SNPs sind synonyme Mutationen mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit mit veränderten Proteinfunktionen assoziiert. Dennoch können sich Variationen in Intronsequenzen,

---

<sup>6</sup> Normale Schreibweise des genetischen Codes, in der eine Abfolge aus drei Nukleotiden eines DNA- oder RNA-Moleküls für eine spezifische Aminosäure in der Proteinbiosynthese kodiert (The New Oxford American Dictionary, 2005). Daher besteht aufgrund der vier Nukleotidbasen eine Kodierungspotenz von  $4^3 = 64$  Aminosäuren. Da lediglich 21 proteinogene Aminosäuren existieren, werden die meisten Aminosäuren durch mehrere Triplets kodiert, weshalb der genetische Code nicht eindeutig ist (Murken, 2006) und ein Basenaustausch zu der beschriebenen unveränderten Expression führen kann (synonymen Mutation).

beispielsweise durch alternatives *Splicing* oder eine veränderte Stabilität der mRNA auf das exprimierte Protein auswirken (Shastry 2009).

#### 2.4.2.2. SNaPshot®-PCR

Das Kernstück der SNaPshot®-Reaktion ist die SNaPshot®-PCR. Ihr Prinzip beruht auf der Extension eines *Primers* um eine einzige Base. Dabei wird der *Primer* so gewählt, dass er an einer spezifischen DNA-Sequenz bindet und direkt vor der zu untersuchenden Base endet. Um die Extension des *Primers* auf eine Base zu beschränken, werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) verwendet. An ihrem 3'-Kohlenstoffatom fehlt die zur weiteren Elongation notwendige Hydroxylgruppe, weshalb keine Phosphodiesterbrücken zu weiteren Nukleotiden ausgebildet werden können. Die Folge ist ein Synthesestop (Kettenabbruch nach Sanger). Um die synthetisierte Base identifizieren zu können und somit auf die gesuchte (komplementäre) Base des *Template*-Strangs zu schließen, werden für die unterschiedlichen Nukleotide (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) verschiedene Fluoreszenzmarkierungen verwendet. Sie werden im folgenden Farbcode dargestellt:

Adenin = grün, Cytosin = schwarz, Guanin = blau, Thymin = rot.

Durch die Synthese unterschiedlicher langer *Primer*, können mehrere SNPs gleichzeitig untersucht werden, da ihre unterschiedliche Länge eine kapillar-elektrophoretische Auftrennung der Fragmente und die größen-spezifische Zuordnung der SNPs ermöglicht (siehe Abbildung 11, S.69). Nach der Auftrennung werden die Basen mithilfe eines Lasers identifiziert und im beschriebenen Farbcode dargestellt (siehe Abbildung 12, S.69).

#### 2.4.2.3. SNaPshot®-Protokoll

- 1) PCR
- 2) Gelelektrophorese
- 3) Aufreinigung/Verdau
- 4) SNaPshot®
- 5) Posttextensionsbehandlung
- 6) Elektrophorese im *Sequencer*

#### 2.4.2.4. Erläuterung zum SNaPshot®-Protokoll

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden aus Gründen der Effektivität für zwei Studien am selben Kollektiv gemeinsam durchgeführt. Aus diesem Grund wurden alle Ansätze für die Analyse von fünf SNPs ausgelegt. Die für die vorliegende Arbeit relevanten SNPs sind rs2300403 und rs3788266. Die SNPs rs1165205, rs2231142 und rs16890979 sind Gegenstand der anderen Studie und werden hier nicht besprochen.

<b>SNP (rs-Nummer)</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Größe [in bp]</b>	
rs2300403	rs03	232	
rs3788266	rs66	162	
rs1165205	rs05	310	} *
rs2231142	rs42	443	
rs16890979	rs79	381	

Tabelle 12: **Bezeichnung der untersuchten SNPs.** Zur Verbesserung der Lesbarkeit, werden die SNPs im Folgenden mit den letzten beiden Zahlen ihrer rs-Nummer bezeichnet. Die Größe der Fragmente ist in Basenpaaren (bp) angegeben. \*Ähnliche Länge von rs42 und rs79. Die nicht relevanten SNPs sind grau hinterlegt.

#### 2.4.2.5. PCR

Vor Beginn der SNaPshot®-Reaktion wurden die relevanten DNA-Abschnitte mithilfe einer PCR amplifiziert. Für jeden SNP wurden spezifische PCR-Primern (*Forward* und *Reverse*) bestellt (siehe Tabelle 6, S.29). Um Verunreinigungen des Ansatzes anzuzeigen, wurde auf jeder Platte eine Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> anstelle von DNA eingesetzt.

Zur Ermittlung der Anlagerungstemperatur der *Primer* wurde eine Test-PCR mit 55°C, 60°C und 65°C durchgeführt und die Stärke der Banden in der nachfolgenden

Gelelektrophorese verglichen. Als optimale Temperatur wurde 55°C ermittelt. Jedoch ließ die ähnliche Größe der SNPs rs42 und rs79 keine zufriedenstellende Trennschärfe in der Gelelektrophorese zu (siehe Tabelle 12, oben). Deshalb wurde ein gesonderter PCR-Ansatz für den SNP rs79 (nicht Teil der vorgelegten Studie) erstellt, um die Amplifikation jedes SNPs kontrollieren zu können. Des Weiteren ergaben Versuchsreihen zur Optimierung der PCR, dass die Zugabe von 2 µl Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), zu dem Ansatz der SNPs rs03, rs66, rs05 und rs42, das PCR-Ergebnis verbesserte. Dies galt nicht für den Ansatz des SNPs rs79.

Tabelle 13 (siehe S.38) zeigt den PCR-Ansatz für die SNPs rs03, rs66, rs05 und rs42. Zur vollständigen Darstellung der PCR zeigt Tabelle 14 (siehe S.39) den PCR-Ansatz für den SNP rs79 (nicht Teil der vorgelegten Studie).

	<b>Menge [in µl]</b>	<b>Master Mix (x 110) [in µl]</b>
<b>DNA</b>	2	-
<b>Puffer</b>	4	440
<b>dNTPs</b>	0,4	44
<b>Primer</b>	0,4	44
rs03	Primer F1 + Primer R1	
rs66	Primer F2 + Primer R2	
rs05	Primer F3 + Primer R3	
rs42	Primer F4 + Primer R4	
<b>Primer gesamt</b>	3,2	352
<b>taq-Polymerase</b>	0,1	11
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></b>	8,3	913
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2	220
	<b>20</b>	<b>↳ 18 µl MM + 2 µl DNA</b>

Tabelle 13: **PCR-Ansatz für die SNPs rs2300403 (rs03) und rs3788266 (rs66)**, rs1165205 (rs05) und rs2231142 (rs42). Die SNPs rs05 und rs42 sind nicht Teil dieser Studie. F = *Forward-Primer* (vorwärts), R = *Reverse-Primer* (rückwärts), MM = Master Mix.

	<b>Menge [in µl]</b>	<b>Master Mix (x 110) [in µl]</b>
<b>DNA</b>	2	-
<b>Puffer</b>	4	440
<b>dNTPs</b>	0,4	44
<b>Primer</b>	0,4	44
rs79	Primer F5 + Primer R5	
<b>Primer gesamt</b>	0,8	88
<b>taq-Polymerase</b>	0,1	11
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></b>	12,7	1397
	<b>20</b>	<b>↳ 18 µl MM + 2 µl DNA</b>

Tabelle 14: **PCR-Ansatz für den SNP rs16890979 (rs79)** (nicht Teil dieser Studie).  
F = *Forward-Primer* (vorwärts), R = *Reverse-Primer* (rückwärts), MM = Master Mix.

Die PCR wurde nach dem folgenden Protokoll (siehe [Tabelle 15](#), S.39) im *Thermocycler* durchgeführt. Nach erfolgreicher PCR wurden die PCR-Produkte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

	<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit (hh:mm:ss)</b>
1)	Inkubation	bei 94 °C	00:05:00
2)	Inkubation	bei 94 °C	00:00:30
3)	Inkubation	bei 55 °C	00:00:30
4)	Inkubation	bei 72 °C	00:00:30
5)	34 Zyklen, beginnend bei Schritt 2)		
6)	Inkubation	bei 72 °C	00:20:00
7)	Inkubation	bei 12 °C	endlos

Tabelle 15: **Thermocycler Programm 5535**: 55 °C Anlagerungs-Temperatur (*Annealing*-Temperatur), 35 Zyklen.

#### 2.4.2.6. Gelelektrophorese

Um die Amplifikation der DNA-Abschnitte und den einwandfreien Ablauf der PCR zu kontrollieren, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Zur besseren Auftrennung der DNA-Fragmente wurde anstelle des normalerweise verwendeten 1%igen Gels ein 2%iges Gel angesetzt. Hierzu wurden 4 g Agarose-Pulver in einem Erlenmeyerkolben mit 200 ml 0,5x Tris-Borat-EDTA-Puffer unter Hitze suspendiert. Die Lösung wurde mit einer Mikrowelle (Leistungsstufe „Max Watt“) so oft bis zum Aufkochen erhitzt, bis eine klare Lösung entstanden war. Anschließend wurde die Gel-Lösung bei Zimmertemperatur unter Rühren mit einem Magnetrührer

abgekühlt und mit 5 µl EtBr versetzt. Danach wurde die Lösung auf einer mittels Wasserwaage ausbalancierten horizontalen Elektrophoresekammer blasenfrei ausgegossen und mit Kämme von 24 *Wells*, zu je 1,5 mm bestückt. Nach weiterem Abkühlen wurde das Gel in kleinere Stücke der benötigten Größe zerlegt, diese in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einem handelsüblichen Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Um die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aufzutrennen, wurde zunächst in jedes Well einer Vorlegeplatte je 1 µl Blaupuffer vorgelegt und anschließend mit 4 µl PCR-Produkt gemischt. Der verwendete Blaupuffer beinhaltet Glycin, das beim Beladen der Geltaschen zum Absinken des PCR-Produkt/Puffer-Gemischs führt. Anschließend wurden die Taschen des Gels mit dem PCR-Produkt/Puffer-Gemisch bestückt, wobei die erste Tasche mit 4 µl DNA-Größenstandard beladen wurde. An das so präparierte Gel wurde eine Spannung von 100 Volt über 30 Minuten angelegt. Die Kontrolle erfolgte mithilfe eines digitalen Geldokumentationssystems und der Software Bio-Capt (siehe Tabelle 11, S.32).

#### 2.4.2.7. *Aufreinigung/Verdau*

Nach Ablauf einer PCR verbleiben überschüssige *Primer*, Enzyme, dNTPs und Puffer in Lösung. Da diese Bestandteile den weiteren Reaktionsverlauf stören können, wurden sie mittels eines Aufreinigungsverfahrens (Purifikation) aus der Lösung entfernt. Hierzu wird die Exonukleasen I (Biolabs) verwendet, ein Enzym, das von *E. coli* Bakterien (Exo-I-Gen von *E. coli* NM554) gewonnen wird. Sie baut überschüssige *Primer* (Oligonukleotide) von 3' → 5' Richtung aus einem Reaktionsgemisch ab. Um die optimale Enzymfunktion zu gewährleisten, wird das Reaktionsgemisch mit einem Reaktionspuffer versetzt. Vor dem Beginn der Purifikation wurde deshalb ein entsprechender Mix, sog. ExoI-Verdünnung, aus Exonuklease I Enzym, Reaktionspuffer und Wasser (H<sub>2</sub>O) hergestellt (siehe Tabelle 16, unten).



	<b>Menge [in µl]</b>	<b>Master Mix (x 11) [in µl]</b>
<b>Exo 1 Enzym</b>	1	11
<b>Exo 1 Puffer</b>	4	44
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5	55
	<b>10</b>	<b>110</b>

Tabelle 16: **Ansatz der Exol-Verdünnung für die Purifikation der PCR-Produkte.** Exo 1 Enzym = Exonuklease I Enzym (BioLabs); Exo 1 Puffer = Reaktionspuffer (BioLabs) (siehe [Tabelle 2](#), S.28).

	<b>Menge [in µl]</b>	<b>für SNPs</b>
<b>PCR-Produkt 1</b>	10	rs03, rs66, rs05, rs42
<b>PCR-Produkt 2</b>	5	rs79
<b>SAP</b>	2	
<b>Exol</b>	1	
	<b>18</b>	

Tabelle 17: **Ansatz der Purifikation der PCR-Produkte.** SAP = alkalische Phosphatase (*Shrimp alkaline phosphatase*, BioLabs); Exol = Exol-Verdünnung (siehe [Tabelle 16](#), S.41). PCR-Produkt 1 = Produkt aus PCR für rs03, rs66, rs05 und rs42 (siehe [Tabelle 13](#), S.38); PCR-Produkt 2 = Produkt aus PCR für rs79 (siehe [Tabelle 14](#), S.39). Verwendete Chemikalien siehe [Tabelle 2](#) (S.28).

Im nächsten Schritt wurde diese Exolverdünnung zur Purifikation mit den PCR-Produkten gemischt. Zusätzlich wird dem Gemisch eine alkalische Phosphatase aus Eismeergarnelen (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, SAP) hinzugefügt. Diese ist in der Lage, das 5'-Phosphat von DNA oder RNA abzuspalten (5'-Dephosphorylierung). Für die Aufreinigung wurden die einzelnen PCR-Produkte (siehe [Tabelle 17](#), S.41).

#### 2.4.2.8. Durchführung der SNaPshot®-PCR

Die auf diese Weise aufgereinigten PCR-Produkte, werden mittels SNaPshot®-PCR auf SNPs untersucht (siehe [2.4.2.2](#), S.36). Hierzu wird zunächst ein Ansatz erstellt, in dem zu jedem PCR-Produkt die entsprechenden SNaPshot®-Primer hinzugefügt werden. PCR-Produkte und Primer werden zusammengeführt. In den Ansatz werden außerdem Wasser und der bereits reaktionsfertig gelieferte SNaPshot® Multiplex Mix (ABI) gegeben. In diesem Mix befinden sich die AmpliTaq® DNA-Polymerase, Fluoreszenzmarkierte ddNTPs zur Einzelbasenextension und -markierung und ein Reaktionspuffer (siehe [Tabelle 18](#), below).

	<b>Menge [in µl]</b>		<b>Master Mix (x 110) [in µl]</b>	
<b>PCR-Produkt 3</b>	3		-	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,9		209	
<b>Mix (ABI)</b>	2		220	
<b>Primer</b>				
rs05, rs42	2 x 0,8	1,6	2 x 88	176
rs03, rs66, rs79	3 x 0,5	1,5	3 x 55	165
	<b>10</b>		<b>7 µl MM + 3 µl DNA</b>	

Tabelle 18: **SNaPshot®-Ansatz**. Mix = ABI, SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix (enthält Fluoreszenzmarkierte ddNTPs); MM = Master Mix. PCR-Produkt 3 = Produkt aus PCR-Aufreinigung (siehe Tabelle 17, oben). Verwendete Chemikalien siehe Tabelle 2 (S.28).

	<b>Menge [in µl]</b>
<b>PCR-Produkt 4</b>	10
<b>SAP</b>	1
	<b>11</b>

Tabelle 19: **Aufreinigung/Verdau nach SNaPshot®**. PCR-Produkt 4 = Produkt aus SNaPshot®-PCR (siehe Tabelle 18, S.42), SAP = alkalische Phosphatase (*Shrimp alkaline phosphatase*, BioLabs) (siehe Tabelle 2, S.28).

Nach erfolgreicher SNaPshot®-Reaktion, wird das Reaktionsprodukt erneut aufgereinigt. Hierzu wird ein Purifikationsgemisch aus dem Produkt der SNaPshot®-Reaktion (PCR-Produkt 4) und alkalischer Phosphatase hergestellt (siehe Tabelle 19, S.42). Als letzter Schritt der SNP-Bestimmung folgt die Sequenz-Analyse. Hierzu wird ein Analysegemisch aus PCR-Produkt 5, Formamid und dem LIZ®-Standard<sup>120</sup> hergestellt. Das Formamid ist hochgradig deionisiert und dient dazu, Proben vor einer elektronischen Injektion in kapilläre Elektrophoresesysteme (wie bei der Fragmentgrößenbestimmung der Sequenzanalyse) zu resuspendieren. Der GeneScan™ LIZ® Größenstandard (LIZ®-Standard<sup>120</sup>), ist ein internationaler Längenstandard für DNA-Fragmente. Er wird in der automatisierten Fluoreszenzbasierten DNA-Elektrophorese eingesetzt, um Fragmente mit einer Länge von 15-120 Nukleotiden zu bestimmen. Er besteht aus 9 einzelsträngigen LIZ® farbig (Fluoreszenz-)markierten Fragmenten, die 15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110 und 120 Nukleotide lang sind und dem Größenvergleich mit den Fragmenten der Proben dienen.

Der *Sequencer* (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer) unterscheidet anhand dieser Vergleichsgröße und der Länge der Fragmente die PCR-Produkte (SNPs) mittels

kapillärer Elektrophorese. Anhand der in der SNaPshot®-PCR extendierten fluoreszenzmarkierten ddNTPs, können dann die Einzelbasen der SNPs identifiziert werden (siehe 2.4.2.2, S.36). Abbildung 12 auf Seite 69 zeigt das exemplarische Ergebnis der Sequenzanalyse.

	<b>Menge [in µl]</b>	<b>Master Mix (x 100) µl</b>
<b>PCR-Produkt 5</b>	1	-
<b>Formamid</b>	10	1000
<b>LIZ®-Standard<sup>120</sup></b>	0,3	30
	<b>11,3</b>	<b>10,3 µl MM + 1 µl DNA</b>

Tabelle 20: Sequencer-Ansatz. Formamid (Applied Biosystems); LIZ®-Standard<sup>120</sup> (Applied Biosystems); MM (Master Mix). PCR-Produkt 5 = Produkt aus der Aufreinigung nach dem SNaPshot® (siehe Tabelle 18, S.42). Verwendete Chemikalien siehe Tabelle 2, S.28.

### 2.4.3. Immunoluminometrischer Assay

#### 2.4.3.1. Sandwichtest

Bei einem Sandwichtest handelt es sich um einen heterogenen nicht-kompetitiven Immunoassay zur quantitativen Bestimmung eines Analyts. Das Prinzip des Sandwichtests basiert auf einer zweiseitigen immunologischen Detektion von Epitopen (antigene Determinanten), wie sie beispielsweise auf der Oberfläche eines Proteins zu finden sind. Eine Determinante ist ein Molekülabschnitt eines Analyts, an den ein spezifischer Antikörper binden kann. „Nicht-kompetitiv“ bedeutet, dass die verwendeten Antikörper im Überfluss vorliegen. „Zweiseitig“ bedeutet, dass der Analyt durch zwei Antikörper von zwei Seiten in einem Sandwich gebunden wird. Die erste Phase wird Festphase genannt, weil die monoklonalen Fängerantikörper an eine feste Phase (Antikörper-beschichtete Platte, Reagenzglaswand, Partikel) gebunden vorliegen. Die Moleküle (Proteine) binden im ersten Inkubationsschritt unter Ausbildung von Festphase-gebundenen Immunkomplexen an die Fängerantikörper. Anschließend werden ungebundene Probenbestandteile in einem Waschschrift entfernt. Im Reaktionsgefäß verbleiben also die durch Bindung an die Fängerantikörper immobilisierten Antigene. Nun folgt die Inkubation mithilfe von markierten Zweitantikörpern, die an ein weiteres Epitop des Moleküls binden und auf diese Weise das Sandwich vervollständigen. Wieder werden ungebundene Probenbestandteile durch einen Waschschrift entfernt. Die Markierung (*Label*) kann durch Radioaktivität,

Enzyme, fluoreszierende und lumineszierende Substanzen erfolgen. Sind die Antikörper der zweiten Phase nicht mittels Radioaktivität markiert, werden im letzten Reaktionsschritt Reagenzien hinzugefügt, welche die Konzentration der Antigene quantitativ messbar machen (Starterreagenz, Katalysator). Zuletzt erfolgt die Messung des Signals, je nach Art des *Labels* photometrisch, elektrochemisch, als Fluoreszenz- oder Lumineszenzmessung (Thomas 2005). Abbildung 13 auf Seite 70 zeigt die schematische Darstellung eines immunoluminometrischen Assays in Einzelschritten.

#### 2.4.3.2. *Chemolumineszenz*

Bei der Chemolumineszenz-Reaktion entsteht durch die chemische Oxidation der Reagenzien Licht. Für den Reaktionsstart sind Katalysatoren wie Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) notwendig. Abbildung 14 auf Seite 70 zeigt die Reaktionsgleichung der Chemolumineszenz-Reaktion mit Luminol und mittels Luziferin-Luziferase-System.

#### 2.4.3.3. *Bestimmung der S100B-Konzentration in Serum und CSF*

Die Bestimmung der S100B-Konzentration in Serum und Liquor erfolgte mit dem LIAISON® Analyzer und dem LIAISON® S100 Test der Firma DiaSorin S.p.A., Saluggia, Italien (REF 314701) (siehe Tabelle 28, S.73).

#### 2.4.3.4. *Testprinzip und Durchführung*

Der LIAISON® S100 ist ein zweiseitiger immunoluminometrischer *in vitro* Sandwichtest. Das Testprinzip basiert auf beschichteten paramagnetischen Partikeln (Festphase). Die Beschichtung der Partikel besteht aus zwei monoklonalen Antikörpern. In einem ersten Inkubationsschritt, werden die  $\beta$ -UE der S100-Proteine an die Festphase gebunden und überschüssiges Material in einem nachfolgenden Waschgang entfernt. Ein weiterer monoklonaler Antikörper dient als Indikator (*Tracer*), der mit einem Isoluminolderivat markiert ist. Im zweiten Inkubationsschritt binden die Indikatorantikörper an die, mithilfe der Festphase-Antikörper immobilisierten S100-Proteine. Überschüssige Indikator-Antikörper werden durch einen Waschgang entfernt. Die Zugabe des Starterreagenz zur Testlösung setzt anschließend die Lichtreaktion

(Chemolumineszenzreaktion) in Gang. Das daraufhin emittierte Lichtsignal, wird von einem Photoelektronenvervielfacher (*Photomultiplier*) in relativen Lichteinheiten gemessen. Das detektierte Lichtsignal ist zur Konzentration der S100-Proteine direkt proportional. Um die Lichtsignale jedoch in die exakte Konzentration der S100-Proteine umrechnen zu können, wird vor der eigentlichen Messung der Proben und Kontrollen eine Kalibrationskurve erstellt.

- 1) 100 µl Kalibrator, Proben, Kontrollen
- 2) 20 µl Magnetpartikel
- 3) 10 min Inkubation + Waschzyklus
- 4) 100 µl Konjugation
- 5) 10 min Inkubation + Waschzyklus
- 6) 3 sec Messung

Die Reagenzien sind in einer Testbatterie, dem sog. „Reagenz-Integral“, für die Menge von 100 Messungen zusammengestellt (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5, S.29).

Der Messbereich des LIAISON® S100 Tests liegt zwischen 0,02 und 30 µg/L. Der Referenzbereich im Serum wurde mit <0,15 µg/l (95% der Männer und Frauen) angegeben. In CSF wurde der Referenzbereich mithilfe unserer Kontrollkohorte mit ermittelt. Intra- und interassay Variationskoeffizienten sind mit 6,4% und 10,7% gemäß einer Konzentration von 0,11µg/L angegeben (siehe Tabelle 28, S.73).

Die Messungen wurden bei DiaSorin Deutschland GmbH (Von-Hevesy-Str. 3, 63128 Dietzenbach) im Rahmen einer Kooperation verblindet durchgeführt. Die Proben wurden in unserem Institut vorsortiert. Der Versand erfolgte in dafür vorgesehenen Styropor Transportkisten auf Trockeneis.

#### **2.4.3.5. Hinweis zur Interpretation der S100B-Werte in CSF**

Die monoklonalen Antikörper des Liaison® S100 Chemolumineszenztests binden, wie die meisten verfügbaren antikörperbasierten Testverfahren, an Epitope der  $\beta$ -UE und detektieren demnach neben S100B ( $\beta\beta$ ) auch S100A ( $\alpha\beta$ ). Aus diesem Grund sind anamnestische Angaben und diagnostische Hinweise bezüglich Erkrankungen, die mit

einer veränderten Konzentration der beiden Isoformen oder einer Störung der Blut-Hirn-Schranke einhergehen (siehe 1.2.2, S.20) zu beachten.

Da der Anteil von S100A in CSF nur 5% beträgt, kann dieser nach Ausschluss von Störungen der Blut-Hirn-Schranke, als vernachlässigbar angesehen werden (Thomas 2005).

#### 2.4.4. Statistische Testverfahren

Alle Daten wurden auf ihre Verteilung hin untersucht. Aufgrund nicht normalverteilter Messwerte und Parameter, wie beispielsweise Erkrankungsalter (AAO) bei Demenz, Krankheitsdauer von Parkinsonsymptomen und Demenz, H&Y-Stadien und MMST-Testergebnissen, wurden grundsätzlich nicht-parametrische Testverfahren angewandt. Lediglich die jährliche Zunahme der S100B-Konzentrationen wurde auf der Grundlage normalverteilter Daten berechnet, da diese Art der Berechnung eine Aussage über z.B. jährliche Veränderungen zulässt.

Korrelationen stetiger Daten wurden mittels Streudiagramm-Matrizen bestimmt, und deren Signifikanz mittels dem Spearman's rho Test ermittelt (z.B. S100B CSF- und Serum-Konzentrationen).

Zur Untersuchung der Zusammenhänge stetiger und kategorialer Daten (z.B. LBD/HC und S100B Konzentrationen in CSF) wurden einfaktorielle Analysen (Boxplot) vorgenommen und die Signifikanz mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummentest) bestimmt.

Kategorielle Daten wurden mit Kontingenztafeln und Fisher's exaktem Test, Pearson Test (z.B. Zusammenhang von LBD/HC und Geschlecht) und Chi-Quadrat-Test (z.B. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht) untersucht.

Da LBD-Patienten ein signifikant höheres Lebensalter als Kontrollpersonen aufwiesen, wurden die S100B-Werte für Alter mittels eines Regressionsmodells (Modelleffekte: LBD/HC und Alter) korrigiert.

Die Trennschärfe von S100B Konzentrationen im Hinblick auf die Diagnose LBD/HC wurde mittels einer *Receiver Operating Characteristic* (ROC) Kurve ermittelt.

Die Nullhypothese wurde bei  $p < 0,05$  verworfen (Signifikanzniveau).

Die Auswertung der erhobenen Daten und die Erstellung der Graphen erfolgten mithilfe der Statistik-Software JMP (Version 8.0, SAS).

## 2.5. Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, Johannes Lang (Doktorand) gemäß §6 der Promotionsordnung im Folgenden den Eigenanteil an meiner, hier vorgelegten Dissertation.

Die Studie wurde von Frau Professor Dr. Berg und Herrn PD Dr. Walter Mätzler konzipiert. Frau Professor Berg war meine Doktormutter, Herr Dr. Mätzler war mein Anleiter und Ansprechpartner.

Die Literaturrecherche habe ich eigenständig durchgeführt. Dabei wurde ich von Herrn Mätzler unterstützt und korrigiert.

Die klinischen Daten und Tests (H&Y und MMST) wurden im Rahmen der klinischen Untersuchung der Probanden bei deren Aufnahme in die Klinik und nicht als Teil der Dissertation erhoben. Die entsprechenden Daten wurden von mir aus digitalen Patientenakten und dem medizinischen Dokumentationssystem der Neurologischen Klinik zusammengetragen und in die Urliste integriert. Sofern die Daten bereits vorhanden waren, habe ich diese anhand derselben Quellen kontrolliert.

Die Durchführung der Messungen von S100B in Serum und Liquor erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit der Firma DiaSorin Deutschland GmbH (Von Hevesy-Straße 3, 63128 Dietzenbach). Den sachgerechten Transport der Proben übernahm Herr Zvonimir Vukovic mit einem Firmen-PKW. Als technischer Assistent hat Herr Peter Stahl mir die Bedienung des Liaison®-Testautomaten und die Messung erläutert, sowie die Durchführung derselben überwacht.

Für den genetischen Teil der Arbeit wurde ich von Frau Claudia Schulte am Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung eingewiesen. Die Laborversuche führte ich daraufhin selbstständig durch. Aus Gründen der Effektivität analysierte ich neben der für die vorliegende Arbeit relevanten SNPs gleichzeitig auch weiterer SNPs für eine Studie von Frau Anne Kathrin Schäfer (Doktorandin). Frau Schäfer half mir im Gegenzug bei der Optimierung des Analyse-Protokolls.

Die statistische Auswertung der Dissertation, führte ich nach Rücksprache mit und unter der Korrektur durch meinem Anleiter Herrn Mätzler selbstständig durch.

Auch die Erstellung meines Posters und dessen Präsentation auf dem 7. Jahreskongress der Gesellschaft für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin erfolgte durch mich.

Das Verfassen der vorgelegten Dissertation ist meine eigene Leistung, die von Herrn Mätzler und meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Daniela Berg formal und inhaltlich kommentiert und korrigiert wurde.



---

## 3. Ergebnisse

---

### 3.1.1. Demographische Daten

Das Altersspektrum der 196 Probanden (110 Frauen und 86 Männer) umfasste das 45. bis 86. Lebensjahr (Mittelwert 65,7 Jahre, Median 67 Jahre). LBD-Patienten waren signifikant älter als HCs ( $p < 0,001^*$ , siehe auch Tabelle 21, S.50) und demente Probanden (PDD/DLB) waren signifikant älter als nicht-demente (PDND/HC) ( $p < 0,001^*$ ). Zwischen Patienten und HCs bestand kein signifikanter Unterschied bei der Verteilung der Geschlechter (Fishers exakter Test 2-seitig  $p = 0,062$ ).

### 3.1.2. Routineparameter in CSF und Serum

Die Routine-Liquorwerte (Zellzahl, Zytologie, IgG-Index und Albuminkonzentration) unterschieden sich innerhalb der Kohorte (LBD/HC) nicht signifikant (nicht gezeigt).

In CSF waren die gemessenen S100B Konzentrationen 32-fach höher als in Serum (Median CSF/Serum=32,4). Die medianen CSF/Serum-Quotient von Patienten (36) und Kontrollen (32) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Median CSF/Serum-Quotient LBD 38; HC 46,1;  $p = 0,246$ ) (siehe Abbildung 1 b), S.51). Auch der Vergleich der LBD-Untergruppen ergab keinen Unterschied ( $p = 0,587$ ). S100B Serum- und CSF-Werte korrelierten schwach miteinander ( $\rho = 0,221$ ,  $p = 0,001^*$ ,  $N = 194$ ) (siehe Abbildung 1 a), S.51). Nach Aufteilung der Studienkohorte blieb diese Korrelation ausschließlich für Kontrollen erhalten ( $\rho = 0,467$ ,  $p = 0,005^*$ ,  $N = 194$ ), nicht aber für Patienten ( $\rho = 0,134$ ,  $p = 0,183$ ,  $N = 194$ ).

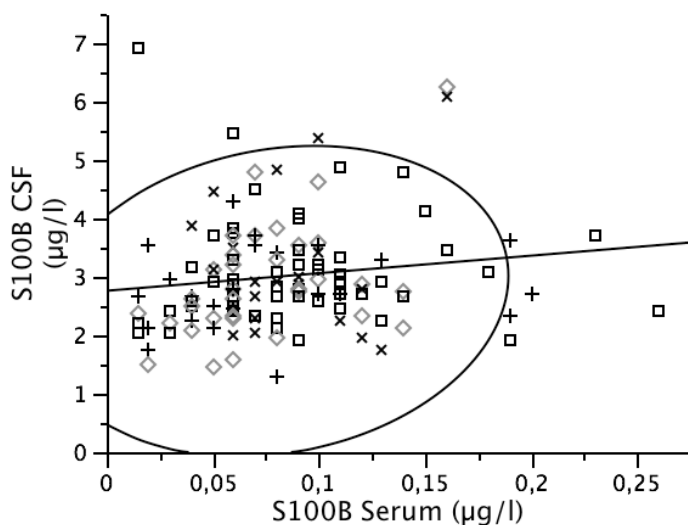
### 3.1.3. Zusammenhang von S100B-Konzentration mit Alter und Geschlecht

S100B Konzentrationen stiegen mit zunehmendem Alter bei Patienten und Kontrollen in CSF und Serum an (CSF:  $r = 0,30$ ,  $p < 0,001^*$ ; Serum:  $r = 0,20$ ,  $p = 0,004^*$ ). Im CSF nahm die Konzentration um  $0,035 \mu\text{g/l/Jahr}$  zu ( $p < 0,001^*$ ; LBD  $0,008 \mu\text{g/l/Jahr}$ ; HC  $0,023 \mu\text{g/l/Jahr}$ ), im Serum um  $0,001 \mu\text{g/l/Jahr}$  ( $p = 0,034^*$ ; LBD  $0,001 \mu\text{g/l/Jahr}$ ; HC  $0,001 \mu\text{g/l/Jahr}$ ) (siehe Abbildung 1 b) und -c), S.51).

	<b>PDD</b>	<b>PDND</b>	<b>DLB</b>	<b>LBD</b>	<b>Kontrollen</b>
Anzahl (w)	57 (27)	21 (12)	23 (11)	101 (50)	95 (60)
AAO [Jahre]	67 (51-82)	75 (62-84)	73 (50-83)	70 (50-84)	61 (45-86)*
AAO Parkinsonismus [Jahre]	62 (30-76)	63 (41-74)	68 (49-78)		
Krankheitsdauer Parkinson [Jahre]	4,3 (1,6-22,6)	11,0 (4,4-21,4)	3,2 (0,8-13,2)		
Hoehn&Yahr Stadium (0-5)	2 (1-4)	3 (2-4)	2 (1-4)		
AAO Demenz [Jahre]		72 (58-79)	68 (49-79)		
Krankheitsdauer Demenz [Jahre]		3,1 (0,4-6,1)	3,3 (0,5-12,2)		
MMST (0-30)	29 (23-30)	23 (14-29)	19 (10-27)	27 (10-30)	29 (27-30)*
CSF S100B [ $\mu\text{g/l}$ ]	2,90 (0,01-6,90)	2,93 (1,75-6,08)	2,69 (1,31-4,29)	2,89 (0,01-6,90)	1,91 (0,01-6,26)*
Serum S100B [ $\mu\text{g/l}$ ]	0,08 (0,02-0,26)	0,08 (0,04-0,50)	0,06 (0,02-0,20)	0,08 (0,02-0,50)	0,06 (0,02-0,16)

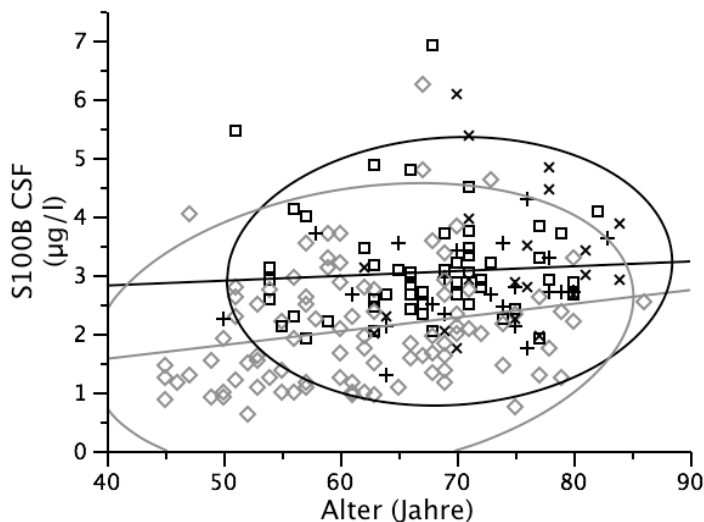
Tabelle 21: **Demographische Daten und klinische Parameter** von LBD-Patienten (PDD, PDND, DLB) und Kontrollpersonen. Medianwerte (Wertebereich). \*Werte mit signifikantem Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen. AAO = Erkrankungsalter (engl.: *Age at onset*); MMST=Minimenter Status Test; CSF=Liquor (engl.: *Cerebrospinal fluid*); Hoehn&Yahr-Stadien wurden im Off-Zustand bestimmt.

a)



N=194  
rho=0,221  
p=0,001\*

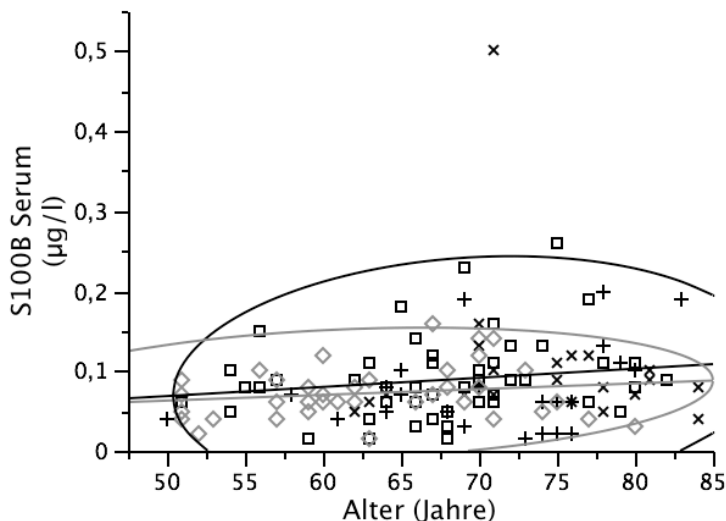
b)



N=194  
r=0,30  
p<0,001\*

Konzentrationsanstieg:  
Alle 0,035 µg/l/Jahr  
LBD 0,008 µg/l/Jahr  
HC 0,023 µg/l/Jahr

c)



N=196  
r=0,20  
p=0,004\*

Konzentrationsanstieg:  
Alle 0,001 µg/l/Jahr  
LBD 0,001 µg/l/Jahr  
HC 0,001 µg/l/Jahr

Abbildung 1: a) Korrelation der CSF- und Serum-S100B Werte. b) Assoziation von CSF S100B und Alter. c) Assoziation von Serum S100B und Alter. Lineare Anpassungen, Dichteelipsen 95% Wertebereich. HC grau, LBD schwarz. □ PDND, x PDD, + DLB, ◇ HC.

Es bestand demnach eine stärkere Zunahme der CSF-Konzentration bei gesunden HCs, als bei den Patienten (LBD 0,008 µg/l/Jahr < HC 0,023 µg/l/Jahr), dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Es konnte keine Assoziation zwischen Geschlecht und Probenart nachgewiesen werden (Serum p=0,09; CSF p=0,07) (nicht gezeigt).

#### 3.1.4. Zusammenhang von S100B-Konzentration und Diagnose

Im CSF fanden sich bei LBD-Patienten rund 1,5-fach höhere S100B Konzentrationen als bei HCs (Median LBD 2,89 µg/l zu HC 1,92 µg/l, p<0,001\*; LBD/HC=1,5; Wertebereich LBD 1,31-6,9 µg/l und HC 0,61-6,26) (siehe Abbildung 2 a), S.53). Auch nach Aufteilung in die diagnostischen Untergruppen blieb ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und HCs erhalten (Median PDND 2,90 µg/l, PDD 2,93 µg/l und DLB 2,69 µg/l zu HC 1,92 µg/l, p<0,001\*) (siehe Abbildung 2 b), S.53). Zwischen den LBD-Gruppen bestand dieser Unterschied nicht (p=0,774). Da LBD-Patienten ein signifikant höheres Lebensalter als HCs hatten, wurden die S100B-Werte mithilfe eines Regressionsmodells für die Einflussfaktoren (Modelleffekte) Alter und LBD/HC korrigiert. Auch nach Korrektur für Alter, blieb der Effekt signifikant (p<0,001\*) (siehe Abbildung 1 b), S.51).

Serumwerte von S100B unterschieden sich nicht signifikant zwischen Patienten und HCs (Median LBD 0,08 µg/l zu HC 0,06 µg/l, p=0,099; LBD/HC=1,3; LBD 0,015-0,5 µg/l und HC 0,015-0,16 µg/l) (nicht gezeigt). Auch nach Aufteilung in die Untergruppen (Median PDND 0,08 µg/l, PDD 0,08 µg/l und DLB 0,06 µg/l zu HC 0,06 µg/l, p=0,106) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (nicht gezeigt).

Die AUC zwischen LBD und Kontrollen erreichte 0,79 für CSF-Werte (siehe Abbildung 3, S.53). Für Serumwerte lag die AUC bei 0,59 (nicht gezeigt).

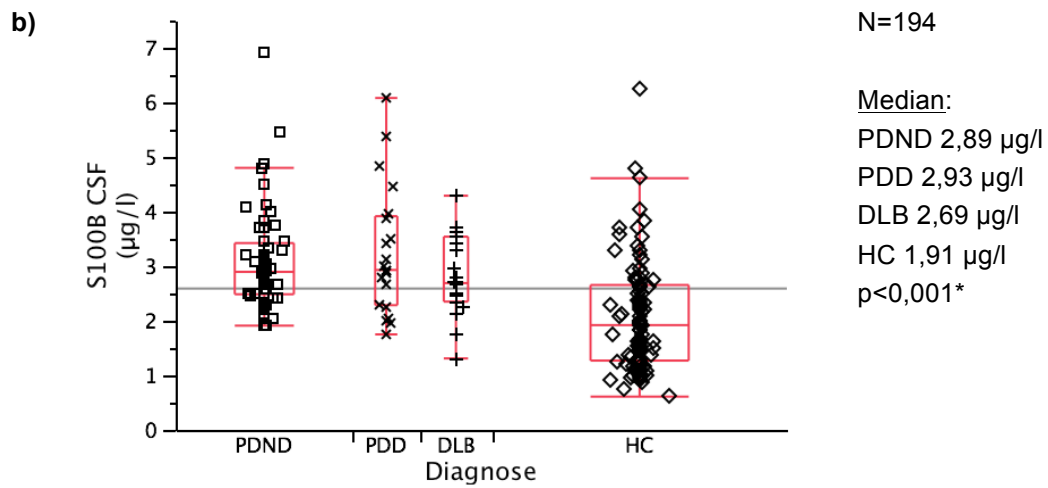
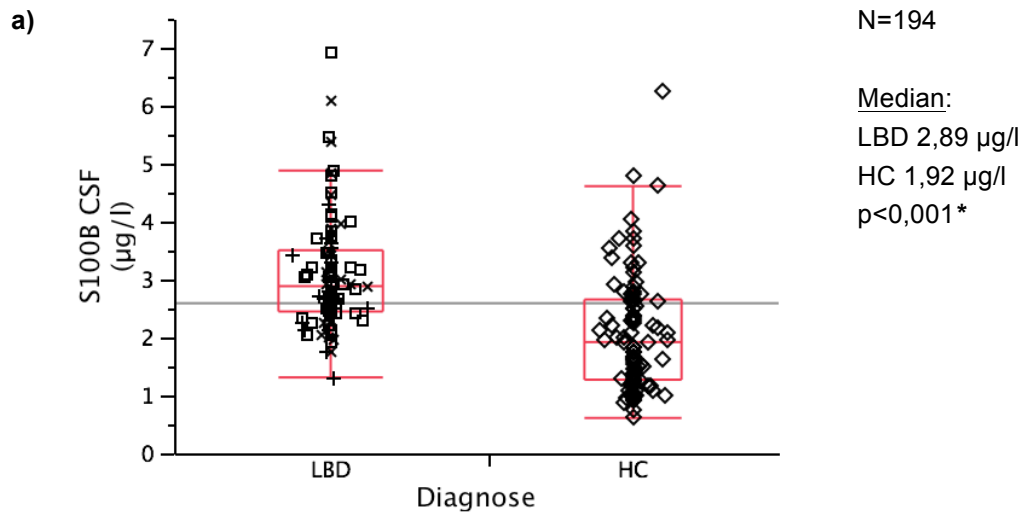
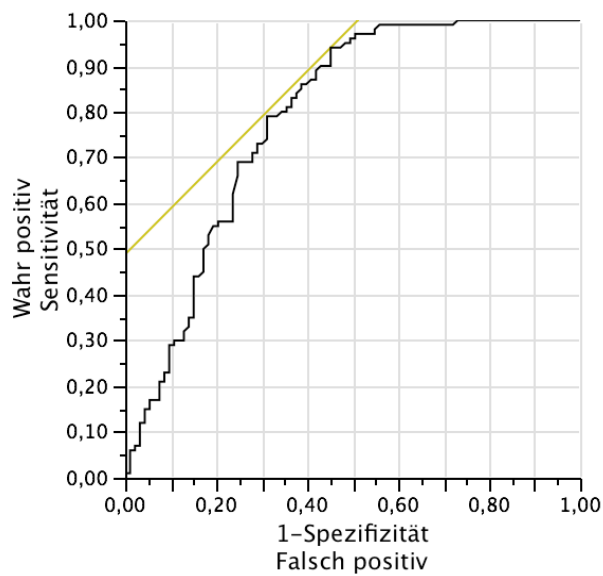


Abbildung 2: a) CSF S100B bei Patienten und Kontrollen. b) Serum S100B nach Einzeldiagnosen. □ PDND, x PDD, + DLB, ◇ HC



LBD: positive Stufe

AUC 0,79

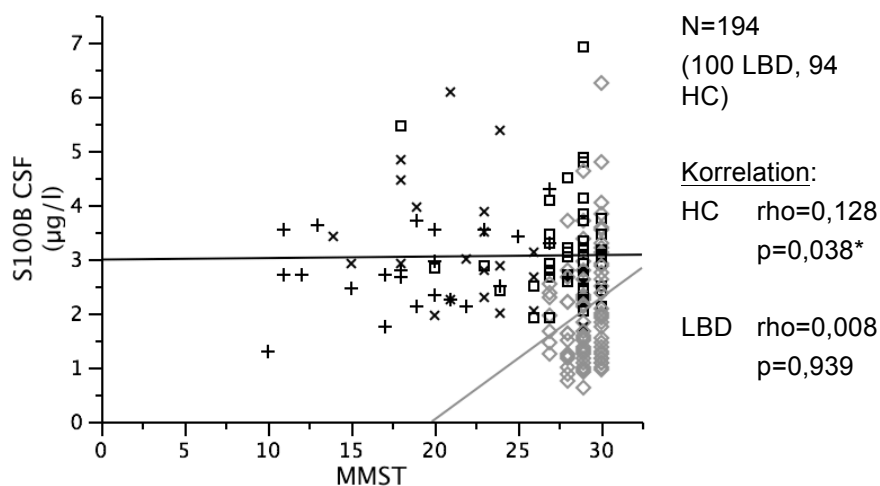
Abbildung 3: ROC Kurve für CSF S100B für Patienten und HC.

### 3.1.5. Einfluss klinischer Parameter

CSF S100B Werte korrelierten weder mit AAO oder Krankheitsdauer für Parkinsonismus und Demenz, noch mit H&Y-Stadien. Vergleichbare Ergebnisse fanden sich bei der Analyse der Untergruppen (PDD/DLB vs. PDND/HC und Einzeldiagnosen). Eine signifikante Korrelation bestand für CSF S100B und MMST-Werte ( $\rho=-0,187$ ,  $p=0,010^*$ ,  $N=194$ , siehe Tabelle 22, unten). Nach Aufteilung in die Untergruppen blieb dieser Effekt jedoch nur für die Kontrollen erhalten (HC  $\rho=0,128$ ,  $p=0,038^*$ ; LBD  $\rho=0,008$ ,  $p=0,939$ ;  $N=194$ ) (siehe Abbildung 4, S.54). S100B Serumwerte korrelierten mit keinem der klinischen Parameter, weder in der gesamten Kohorte noch bei dementen und nicht-dementen oder in den diagnostischen Untergruppen (nicht gezeigt).

	<i>Parkinsonismus</i>		<i>Demenz</i>	
	<i>CSF</i>	<i>Serum</i>	<i>CSF</i>	<i>Serum</i>
<b>AAO</b>	$\rho=0,094$ $p=0,356$	$\rho=0,078$ $p=0,443$	$\rho=0,267$ $p=0,088$	$\rho=0,255$ $p=0,104$
<b>Krankheitsdauer</b>	$\rho=0,187$ $p=0,065$	$\rho=0,156$ $p=0,124$	$\rho=0,004$ $p=0,979$	$\rho=-0,019$ $p=0,903$
<b>H&amp;Y-Stadien</b>	$\rho=-0,045$ $p=0,662$	$\rho=0,111$ $p=0,278$		
<b>MMST</b>			$\rho=-0,187$ $p=0,010^*$	$\rho=-0,010$ $p=0,913$

**Tabelle 22: Analyse der klinischen Parameter.** Multivariate Streudiagrammmatrix. Signifikanzniveau  $p<0,05$ . Analyse der diagnostischen Untergruppen (PDD/DLB vs. PDND/HC und PDD/DLB/PDND/HC) (Werte nicht gezeigt).  $N=194$ .



**Abbildung 4: Korrelation von CSF S100B und MMST.** □ PDND, × PDD, + DLB, ◇ HC0

### 3.1.6. Genotypen

Keiner der beiden untersuchten SNPs (rs2300403 und rs3788266) zeigte eine signifikante Assoziation mit Diagnosen (LBD vs. HC, PDD/DLB vs. PDND/HC und Einzeldiagnosen), CSF- oder Serum S100B-Werten (siehe Tabelle 23, unten). Ebenfalls konnte keine signifikante Assoziation mit klinischen Parametern gefunden werden (nicht gezeigt).

	<i>LBD vs. HC</i>	<i>PDD/DLB vs. PDND/HC</i>	<i>Einzeldiagnosen</i>	<i>CSF</i>	<i>Serum</i>
<b>rs03</b>	p=0,171	p=0,123	p=0,436	p=0,966	p=0,530
<b>rs66</b>	p=0,344	p=0,658	p=0,754	p=0,229	p=0,051

Tabelle 23: Analyse der Genotypen. Kontingenzanalyse für Kategoriale Daten (Diagnosen), Einfaktorielle Analyse (Wilcoxon-Test) für CSF- und Serumwerte; Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

---

## 4. Diskussion

---

In der vorliegenden Studie wurde die Konzentration von S100B in Serum und Liquor bei Patienten mit Lewy-Körper-Erkrankung und Kontrollpersonen mittels eines automatisierten Chemolumineszenztests gemessen. Die Messergebnisse wurden auf Zusammenhänge mit den klinischen Daten der Probanden und zwei bereits vorgeschriebenen Einzelbasenpolymorphismen auf dem Gen des Proteins untersucht.

Es konnten jedoch keine Hinweise auf eine Assoziation der S100B-Konzentration mit der Pathogenese der LBD erhoben werden. Zwischen den beiden Kompartimenten CSF und Serum bestand ein deutlicher Konzentrationsunterschied, und im CSF von Patienten konnte eine signifikant höhere S100B-Konzentration im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden. Außerdem korrelierten vor allem bei gesunden Probanden CSF- und Serum-Konzentrationen miteinander. Die S100B-Konzentrationen stiegen in beiden Kompartimenten mit dem Alter an. Interessanter Weise war die jährliche Anstiegsrate bei Kontrollpersonen größer als bei Patienten. Die Untersuchung der klinischen Parameter ergab eine Assoziation von CSF-Werten mit MMST-Testergebnissen. Darüber hinaus bestanden keine signifikanten Assoziationen. Ebenso wenig konnte eine unterschiedliche Verteilung der Genotypen beider SNPs innerhalb der Studienkohorte festgestellt werden. Im Folgenden soll die Bedeutung der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse anhand der bereits vorhandenen Erkenntnisse diskutiert werden.

### 4.1.1. Verteilung und Verhältnisse der S100B-Konzentrationen

Die Konzentration von S100B war in CSF um den Faktor 32,4 höher als in Serum. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da S100B vorwiegend in Astrozyten gebildet, und von ihnen sezerniert wird (Van Eldik und Zimmer 1987). Bei Patienten war der Faktor größer als bei Kontrollen ( $36 > 32$ ). Aufgrund der unspezifischen Erhöhung von S100B bei einer Vielzahl von Erkrankungen kann dieser Unterschied auch als Indikator für Stress oder Apoptose verstanden werden (Donato 2003; Sorci et al. 2010).

Erhöhte Serum-Konzentrationen und geringere Werte des CSF/Serum-Quotienten, können als Hinweis auf eine veränderte Funktion der Blut-Hirn-Schranke dienen



(Kanner et al. 2003). In der vorgelegten Studie zeigten Patienten zwar höhere Serum-Konzentrationen und geringere CSF/Serum-Quotienten, beide Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Auch zwischen den LBD-Untergruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Demnach zeigten LBD-Patienten keine Anzeichen einer abnormalen Funktion der Blut-Hirn-Schranke.

#### 4.1.2. Vergleich von LBD-Patienten und Kontrollen

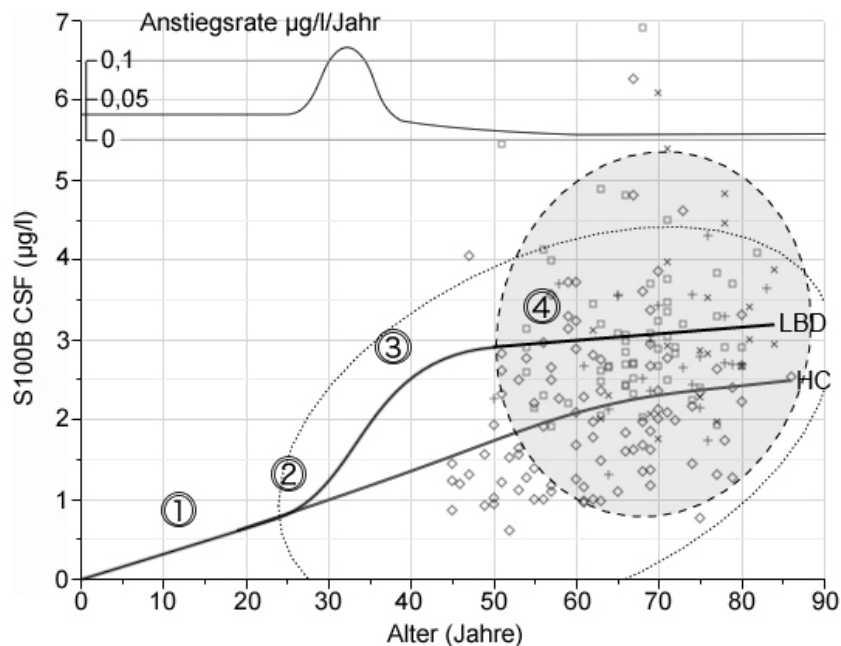
Die Serum-Konzentrationen von Patienten und Kontrollpersonen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,099$ ). Dieses Ergebnis stimmt mit einer anderen Studie überein, die bei jeweils 40 Patienten und Kontrollen von vergleichbaren S100B-Konzentrationen im Serum berichtete und ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen konnte (Schaf et al. 2005). Im Gegensatz dazu wiesen Patienten eine 1,5-fach höhere S100B-Konzentration als HCs im CSF auf (LBD/HC=1,51,  $p<0,001^*$ ). Auch nach Aufteilung in die diagnostischen Untergruppen und Korrektur für den Einflussfaktor Alter blieb dieser Unterschied erhalten. Da nur Probanden in die Studie eingeschlossen wurden, die keine Anzeichen für andere Erkrankungen mit Einfluss auf die S100B-Konzentration zeigten, müssen die erhöhten CSF-Konzentrationen bei Patienten durch die LBD bedingt sein. Bestätigt wird diese Schlussfolgerung durch immunhistochemische Bestimmungen von S100B in *post-mortem* Gehirnschnitten von Patienten, bei denen ebenfalls eine signifikant höhere Konzentration festgestellt wurde (Sathe et al. 2012).

Die signifikante Korrelation von CSF- und Serum-S100B Werten ausschließlich bei gesunden Probanden und nicht bei LBD Patienten lässt auf eine physiologische „Kommunikation“ zwischen den beiden Kompartimenten in Bezug auf das Protein schließen. Da bei Patienten keine Korrelation festgestellt werden konnte und die Serum-Werte mit denen von Gesunden vergleichbar waren, könnte bei LBD eine einseitige Dissoziation der CSF-Konzentrationen vorliegen. Dies legt den Schluss nahe, dass die S100B-Konzentrationen im Serum durch einen unbekanntem Mechanismus innerhalb enger Grenzen reguliert werden, wie bereits im Rahmen einer anderen Studie vorgeschlagen wurde (Sathe et al. 2012). In dieser Studie wurde aufgrund der Senkung der S100B mRNA in Hirngewebe unter den Ausgangswert nach Applikation von MPTP eine Regulierung der Proteinkonzentration durch Anpassung der Expression vermutet.

Die erhöhten CSF S100B-Konzentrationen bei Patienten könnten ein Hinweis darauf sein, dass ein solcher Mechanismus bei LBD nicht oder nur unzureichend aktiviert werden kann. Die hier diskutierten Ergebnisse geben daher auch Grund zu der Annahme, dass vor dem Eintritt schädigender Einflüsse kein Unterschied zwischen den Konzentrationen bei Patienten und Kontrollen besteht.

#### 4.1.3. Hypothese zum Verlauf der S100B-Konzentrationen

Unter der Annahme, dass vor dem Eintritt schädigender Einflüsse im Rahmen einer LBD (also vor Beginn der klinisch sichtbaren, „präklinischen“ Phase) kein Unterschied der S100B Konzentrationen zwischen Patienten und Kontrollen besteht, könnten die Ergebnisse dieser Studie in einem grafischen Verlauf der CSF-Konzentration wie folgt zusammengefasst und interpretiert werden (siehe Abbildung 5, S.58):



**Abbildung 5: Hypothese zum Verlauf der S100B-Konzentrationen in CSF.**

Bedingungen: CSF S100B Konzentrationen sind signifikant höher bei Patienten als bei Kontrollen, nehmen mit dem Alter zu und haben eine geringere Anstiegsrate verglichen mit Kontrollen. Die Wertebereiche von Patienten und Kontrollen überschneiden sich.

Bivariate Normalverteilungskonturen:  $P=0,95$ , LBD gestrichelt/grau hinterlegt, HC gepunktet;

Hinweis: Für die Berechnung des HC-Wertebereichs wurden jüngere Patienten, die aus Altersgründen nicht in die hier vorgelegte Studie eingeschlossen wurden aber im Rahmen der S100B Analysen mitgemessen wurden, mit einbezogen (nicht angezeigt).

Verlauf: Bis zum Einsetzen der Pathogenese ist die Konzentration bei Patienten und Kontrollen identisch (1). Mit dem Eintritt der schädigenden Wirkung (unabhängig ob primär oder sekundär) nimmt die S100B-Konzentration bei Patienten zu (2), noch bevor klinische Symptome erkennbar sind. Erst nachdem die Mehrheit der DA Neurone in der SNc zugrunde gegangen sind und das Defizit nicht mehr kompensiert werden kann, setzen die Symptome ein. Mit dem

progredienten Verlust von Nervenzellen nimmt die Anstiegsrate der CSF-Konzentration ab (3), bis nur noch ein geringfügiger oder kein Konzentrationsanstieg mehr zu verzeichnen ist (4). Gleichzeitig nimmt die Konzentration bei Gesunden mit dem Alter stetig zu. □ PDND, x PDD, + DLB, ◇ HC

Um diese Interpretation zu überprüfen, sind weitere Messungen von CSF-Konzentrationen notwendig. Beispielsweise muss geklärt werden, ob die Ausgangswerte bei Patienten und HCs vor Erkrankungsbeginn gleich sind. Hierzu ist eine Längsschnittstudie z.B. mit Personen mit erhöhtem Erkrankungsrisiko notwendig. Mithilfe dieses Vergleichs könnte eventuell auch geklärt werden, warum einige gesunde Probanden LBD-ähnliche und einige Patienten HC-ähnliche Konzentrationen aufweisen. Vielleicht würde dadurch auch geklärt, ob hohe Konzentrationen bei gesunden Probanden Vorboten einer bereits begonnenen neurodegenerativen Erkrankung (LBD, AD) sind. Andererseits könnte ein solcher Vergleich aber auch lediglich den unspezifischen Charakter von S100B-Konzentrationsanstiegen unterstreichen. In jedem Fall sind auch molekularbiologische Untersuchungen zu den Interaktionen von S100B notwendig, um die Rolle von S100B weiter aufzuklären.

#### 4.1.4. Zur Rolle von S100B in der Pathogenese der LBD

In dieser Studie stieg die Konzentration von S100B in CSF und in geringerem Maße in Serum bei der gesamten Kohorte mit zunehmendem Alter an. Dieser Anstieg wird durch frühere Studien bestätigt (Nygaard et al. 1997; Sheng et al. 1996). Mit dem Alter nimmt bekannter Weise auch die Inzidenz der LBD zu. Diese gleichsinnige Zunahme von Inzidenz und CSF S100B-Konzentration kann als Hinweis auf einen primären Zusammenhang des Proteins mit der Pathogenese der LBD verstanden werden. Denn es ist bekannt, dass S100B im (sub)nanomolaren Bereich (Normalwerte) neuroprotektive Effekte vermittelt (Bianchi et al. 2007), während es in mikromolaren Konzentrationen neurodegenerative Eigenschaften zeigt (Donato 2001; Zimmer et al. 1995). Zwar konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt kein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Inzidenz der LBD und der S100B-Konzentration nachgewiesen werden, doch existieren schlüssige Hinweise auf eine primäre Rolle des Proteins. Beispielsweise vermittelt die Erhöhung der neuronalen RAGE-Expression durch S100B die Aktivierung des Kernfaktors NF- $\kappa$ B (Villarreal et al. 2011), proinflammatorischer Zytokine und TNF- $\alpha$  (Basta et al.

2002). Auf diese Weise könnte eine erhöhte S100B-Konzentration zur Zellschädigung und damit Krankheitsentstehung beitragen. Dagegen spricht jedoch, dass auch bei Gesunden mikromolare, LBD-ähnliche S100B-Werte gemessen wurden. Im Falle einer ursächlichen Rolle von S100B durch eine erhöhte Proteinkonzentration, könnte es sich bei Letzteren auch um frühe Stadien einer klinisch noch inapparenten LBD (oder anderen Erkrankung) handeln. Andererseits wäre denkbar, dass neben der hohen S100B-Konzentration noch ein weiterer bislang unbekannter Faktor (oder Disposition) für die Manifestation einer LBD notwendig ist. In diesem Zusammenhang sind insbesondere genetische Mutationen und Variationen (SNPs) von großem Interesse (siehe [4.1.6](#), S. 62). Ebenfalls gegen eine primäre Rolle von S100B spricht der Anstieg der Proteinkonzentration mit dem Alter. Interessanter Weise bestand eine signifikante Korrelation bei HCs, nicht aber bei LBD-Patienten. Dieses Ergebnis deutet auf einen natürlichen Anstieg der S100B-Konzentrationen hin und könnte Ausdruck eines zellulären Alterungsprozesses sein oder aufgrund eines Zelluntergangs anderer Gene entstehen.

In beiden Fällen bestünde ein sekundärer Zusammenhang. Für eine sekundäre Rolle von S100B spricht die vielfach berichtete reaktive Erhöhung des Proteins im Rahmen anderer Erkrankungen (siehe [1.2.2](#), S.20). Ein starkes Argument für einen solchen Zusammenhang ist die Zunahme der S100B mRNA und der Proteinkonzentration nach Applikation von MPTP bei Mäusen (Sathe et al. 2012). Der Eindruck einer sekundären Rolle des S100B-Proteins könnte allerdings auch durch möglicherweise unterschiedliche pathophysiologische Prozesse der LBD bedingt sein.

Aufgrund der unterschiedlichen (primär und sekundär erscheinenden) Interaktionen von S100B, wäre außerdem eine Doppelrolle des Proteins denkbar. Einerseits führt es selbst zur Aktivierung zellschädigender Signalwege und Reaktionen (NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6, RAGE, etc.; primär), andererseits bedingen Zytokine und Entzündungsmediatoren eine Konzentrationserhöhung von S100B (sekundär). S100B könnte beispielsweise proinflammatorische Mediatoren aktivieren, die zu einer Schädigung von Neuronen und Gliazellen führen, die wiederum zu einer Erhöhung der S100B-Konzentration und dadurch zu einem Teufelskreis führen, in dem zellschädigende Signalwege weiter unterhalten werden (siehe [1.2.4](#), S.22).

Abschließend soll aber nicht unerwähnt bleiben, dass der Anstieg von S100B im CSF von LBD-Patienten nur eine von vielen unspezifischen Konzentrationserhöhungen bei pathologischen Zuständen und Erkrankungen sein könnte (Sorci et al. 2010) und die Möglichkeit besteht, dass die hier beschriebenen Ergebnisse eventuell lediglich diesen unspezifischen Charakter unterstreichen.

#### 4.1.5. S100B als diagnostischer und klinischer Marker

Da CSF S100B-Konzentrationen von Patienten signifikant höher waren als bei HCs, liegt der Verdacht nahe, das Protein könne sich als diagnostischer Marker erweisen. Tatsächlich deutet die AUC von 0,79 auf eine moderate Trennschärfe bei der Unterscheidung von Patienten und HCs hin. Demzufolge könnte die Bestimmung von S100B in CSF einen Hinweis auf das Vorliegen einer LBD geben. Für eine diagnostische Anwendung („Biomarker“) ist die Trennschärfe allerdings nicht ausreichend. Außerdem ist unklar, warum einige Patienten HC-ähnliche und einige Kontrollpersonen LBD-ähnliche Proteinkonzentrationen zeigten. Darüber hinaus konnten zwischen den LBD-Untergruppen keine signifikant unterschiedlichen S100B-Werte gemessen werden, weshalb das Protein auch zur Unterscheidung der Einzeldiagnosen ungeeignet ist. In der Diagnostik kann S100B im CSF deshalb lediglich eine hinweisende Rolle als Marker für den Verdacht auf eine unspezifische Schädigung einnehmen.

Schaf und Mitarbeiter fanden eine Korrelation von S100B-Konzentrationen mit H&Y-Stadien und der ADL-Skala (*Activity of daily living*) (Schaf et al. 2005). Es stellt sich demnach die Frage nach der Eignung von S100B als Verlaufsmarker. Die Auswertung der krankheitsrelevanten Parameter der vorliegenden Studie, ergab eine signifikante Assoziation von CSF-Werten mit MMST-Testergebnissen ( $\rho=-0,187$ ,  $p=0,010^*$ ). Wie die negative Korrelation verdeutlicht, besteht ein umgekehrter Zusammenhang zwischen der CSF S100B-Konzentration und den MMST-Werten. Demnach nimmt die CSF-Konzentration von S100B mit einer geringeren Punktzahl im MMST zu. Dieses Ergebnis entspricht der Korrelation von S100B-Konzentration und ADL-Skala bei Schaf et al.. Nach Aufteilung der Kohorte in die diagnostischen Untergruppen blieb die Korrelation mit den MMST-Ergebnissen jedoch lediglich für Kontrollpersonen bestehen. Da die Testergebnisse in dieser Gruppe 27-30 Punkte betragen, ist der Effekt

eher als Artefakt zu werten, da der MMST in diesem Bereich keine ausreichende Genauigkeit aufweist. Darüber hinaus wurde keine weitere Korrelation von S100B-Konzentration mit klinischen Parametern nachgewiesen, insbesondere nicht mit H&Y-Stadien. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie scheint das Protein deshalb auch als Verlaufsmarker und prognostischer Marker eher nicht geeignet zu sein.

#### 4.1.6. Auswertung der SNPs

Die in dieser Arbeit untersuchten S100B SNPs konnten bereits mit Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, die mit einem Dopamin-Ungleichgewicht einhergehen. Der SNP rs3788266 ist mit Psychose bei Bipolar affektiver Störung assoziiert und befindet sich in einer Konsensus-Bindestelle für *Six-Family*-Transkriptionsfaktoren. Aufgrund seiner Lokalisation wäre er theoretisch in der Lage direkten Einfluss auf die S100B-Expression zu nehmen (Roche et al. 2007). Bei der Analyse der CSF- und Serumwerte konnte kein Zusammenhang zwischen dem SNP und den ermittelten Konzentrationen festgestellt werden. Auch die klinischen Parameter waren nicht mit einem dem SNP assoziiert. Der SNP rs2300403 wurde im Zusammenhang mit Schizophrenie beschrieben (Liu et al. 2005). Im Gegensatz zu den Ergebnissen einer europäischen Studie, die eine Assoziation des SNPs mit kognitiven Leistungen und Demenzrisiko bei älteren Menschen beschrieb (Lambert et al. 2007), konnte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Assoziation mit der Diagnose Demenz beobachtet werden. Auch die relevanten klinischen Parameter (AAO, Krankheitsdauer, MMST) waren nicht mit Allelen des SNP assoziiert. Dies deutet darauf hin dass für beide SNPs keine relevante Assoziation zu LBD besteht. Allerdings ist die Anzahl der untersuchten Probanden insbesondere hinsichtlich genetischer Untersuchungen klein, und die Ergebnisse sollten vorsichtig interpretiert werden. Um ein umfassenderes Bild von dem Einfluss der SNPs auf die Genexpression und dem Zusammenhang mit LBD zu erhalten, müssten grössere Kohorten, aber evtl. auch weitere Kandidaten-SNPs identifiziert und analysiert werden.

#### 4.1.7. Limitationen

S100B-Proteine sind gewebs-, aber nicht krankheitsspezifisch. Erhöhte Proteinkonzentrationen kommen demnach nicht nur bei LBD, sondern auch im Zusammenhang mit einer Reihe von Erkrankungen und Konditionen vor (siehe [1.2.2](#), S.20). Diese Tatsache erschwert Aussagen zur Rolle des Proteins bei LBD (primär oder sekundär) und könnte lediglich ein weiterer Hinweis auf die unspezifische Konzentrationserhöhung bei Zellschäden im ZNS sein. Zudem nimmt die Proteinkonzentration vor allem bei HCs mit dem Alter zu, was die Interpretation der Rolle von S100B bei LBD zusätzlich erschwert. Zwar existieren mehrere Hinweise auf einen Zusammenhang von S100B und LBD, diese sind jedoch teils widersprüchlich und unterstützen sowohl den Ansatz einer primären, als auch einer sekundären Rolle (siehe [4.1.4](#), S.59). Selbst eine Doppelrolle ist denkbar. Solange daher keine weiterführenden Erkenntnisse über Interaktionen des Proteins oder die zugrunde liegenden Signalwege gewonnen werden, bleiben Schlussfolgerungen zur Rolle von S100B schwierig.

Weiterhin ist insbesondere über die Proteinkonzentration zum Zeitpunkt der frühen Erkrankung und im Übergang vom gesunden zum präklinischen Zustand nur wenig bekannt. Die signifikant erhöhten Konzentrationen, die in der vorliegenden Studie im CSF von Patienten festgestellt werden konnten, erlauben keine verlässlichen Schlussfolgerungen über die funktionellen Hintergründe dieser Zunahme. Die in [4.1.3](#) (S.58) dargestellte Hypothese zum Konzentrationsverlauf ist daher lediglich ein erster Versuch zur Deutung der hier erhobenen Ergebnisse unter Einbeziehung der bisherigen Erkenntnisse und bedarf der weiteren Abklärung.

Darüber hinaus wurden in dieser Studie lediglich die zum Zeitpunkt der Studienkonzeption im Zusammenhang mit einem DA-Ungleichgewicht beschriebenen SNPs untersucht. Eine vollständige Untersuchung aller SNPs auf dem S100B-Gen wäre aber notwendig, um den Einfluss genetischer Variationen auf die Proteinexpression und -konzentration zu klären.

#### 4.1.8. Weiterführende Perspektiven

Um die Rolle von S100B und den Zusammenhang Proteinkonzentration und dem Untergang von Nervenzellen weiter aufzuklären zu können, sind funktionelle Studien

zur Interaktion und Regulation des Proteins nötig. Vielversprechend erscheint beispielsweise die Untersuchung von Signalwegen, die RAGE-vermittelt sind oder eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B, proinflammatorischer Zytokine, TNF- $\alpha$  und RAGE zur Folge haben (Basta et al. 2002; Sathe et al. 2012; Villarreal et al. 2011) (siehe auch Abbildung 9, S.68).

Ebenso werden weitere Studien benötigt, um den Verlauf der Proteinkonzentrationen zu untersuchen. Hierzu könnten in einer Längsschnittstudie Personen mit erhöhtem und normalem Erkrankungsrisiko vergleichend untersucht werden. Auf diese Weise könnten die Konzentrationsverläufe vor Beginn der Erkrankung und vor allem in der präklinischen Phase aufgeklärt werden. Mithilfe solcher Messungen ließen sich dann die Ausgangswerte von Personen mit erhöhtem Risiko und HCs vergleichen, um festzustellen ob Patienten bereits vor Beginn der Erkrankung höhere Konzentrationen von S100B im CSF aufweisen oder ob die Proteinkonzentration während der präklinischen Phase der LBD ansteigt.

Um den Einfluss genetischer Variationen des S100B-Gens auf die Proteinexpression weiter zu untersuchen, wäre eine Analyse aller SNPs auf dem Gen hilfreich. Nur dann könnte eine abschließende Aussage darüber getroffen werden, ob die erhöhten Konzentrationen bei Patienten und HCs mit patientenähnlichen Messwerten genetisch bedingt sind und ebenso, ob es einen genetischen Grund für die HC-ähnlichen Messwerte gibt, die bei einigen wenigen Patienten festgestellt werden konnten.



---

## 5. Zusammenfassung

---

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, S100B-Konzentrationen in CSF und Serum auf Unterschiede bei LBD-Patienten und Kontrollen zu untersuchen. Desweiteren sollte eine Analyse von zwei ausgewählten SNPs, die in der Literatur bereits im Zusammenhang mit Erkrankungen mit Dopamin-Ungleichgewicht beschrieben wurden, Aufschluss über einen möglichen genetischen Einfluss der S100B-Expression bei LBD-Patienten geben. Das S100B-Protein unterliegt zwar einer gewebspezifischen Verteilung (Brochez und Naeyaert 2000), seine Konzentration ist jedoch in Bezug auf die zugrunde liegende Erkrankung unspezifisch (Sorci et al. 2010). Es ist bekannt, dass im Rahmen verschiedener neurodestruktiver und neurodegenerativer Erkrankungen erhöhte S100B-Konzentrationen auftreten können (siehe [1.2.2](#), S.20) und dass S100B mit neurotoxischen Signalwegen in Verbindung steht (Mrak et al. 1996; Rothermundt et al. 2003) (siehe [1.2.4](#), S.22). Seine Assoziation mit den neurodegenerativen Erkrankungen der LBD und mögliche Unterschiede zwischen dementen (PDD, DLB) und nicht-dementen Patienten (PDND) sind jedoch noch unbekannt. Ebenso wenig ist seine Assoziation mit klinischen Parametern von Parkinsonismus und Demenz in dieser Patientengruppe aufgeklärt. Nach unserem Wissen wurden diese Fragen bisher in keiner vergleichbaren Kohorte untersucht.

Die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse sprechen für eine Rolle von S100B in der Pathophysiologie der LBD. Hinweise auf eine Assoziation der S100B-Konzentration mit der Pathogenese der LBD sind einerseits der deutliche Konzentrationsunterschied zwischen den Kompartimenten, andererseits die signifikant höhere Konzentration von S100B im CSF von Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Außerdem korrelierten vor allem bei gesunden Probanden CSF- und Serum-Konzentrationen miteinander. Die Korrelation mit dem Alter könnte einen primären Zusammenhang abbilden. Aufgrund des höheren jährlichen Konzentrationsanstiegs bei Gesunden, könnte diese Korrelation auch das sekundäre Ergebnis eines physiologischen Alterungsprozesses sein.

In dieser Studie konnte kein sicherer Anhalt für eine Anwendung von S100B als (Bio-) Marker für Diagnose, Verlauf und Prognose gefunden werden. Auch die Analyse der

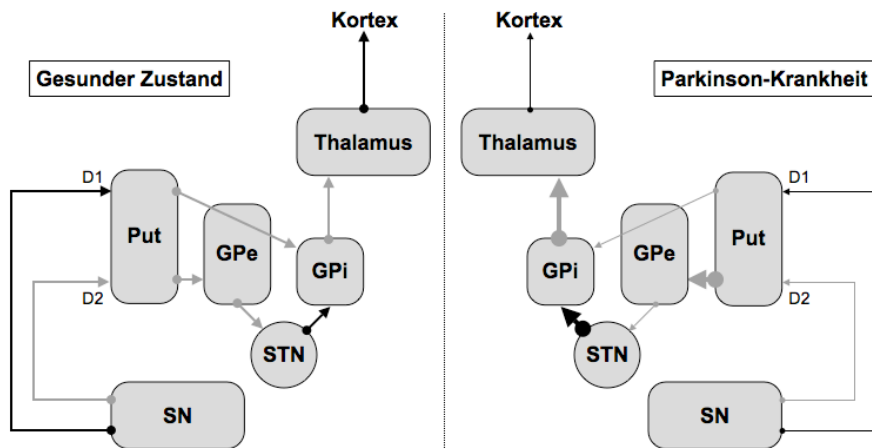
SNPs erbrachte keinen Hinweis auf eine genetische Alteration der Genexpression oder eine Assoziation mit Diagnosen und klinischen Parametern.

Die bekannte Doppelrolle bei unterschiedlichen Konzentrationen und die vielfältigen Interaktionen von S100B mit zellschädigenden Signalwegen machen das Protein weiterhin zu einem interessanten Kandidaten bei der Aufklärung der Pathogenese der LBD. Hierzu sind weitere Studien notwendig, um einerseits die Rolle von S100B und seiner Interaktionen und andererseits mögliche therapeutische Anwendungen zu erforschen. Ein vielversprechender Ansatz könnte beispielsweise die Blockade von S100B sein, die eine verringerte RAGE- und TNF- $\alpha$ -Konzentration zur Folge hat (Sathe et al. 2012).

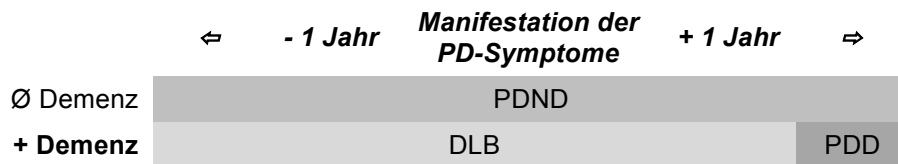
Die gesammelten Ergebnisse dieser Studie konnten zu einer Hypothese über den Verlauf der S100B-Konzentrationen im CSF von Patienten und Kontrollen zusammengefasst werden. Die Bestätigung dieser Hypothese bedarf weiterer Studien. Insbesondere der Konzentrationsunterschied vor Ausbruch der Erkrankung bei Risikopersonen und Kontrollen und der Verlauf (Erkrankungsrisiko) von HCs mit LBD-ähnlichen Konzentrationen, könnten zur weiteren Klärung des Verlaufs von S100B beitragen.

## 6. Anhang

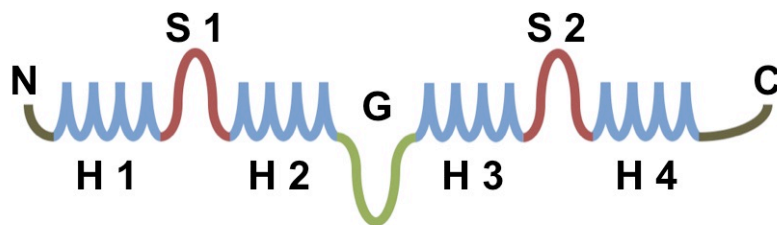
### 6.1. Abbildungen



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der direkten und indirekten Basalganglienschleife.** SN = Substantia nigra; GPe = Globus pallidus externus; GPi = Globus pallidus internus; STN = Nucleus subthalamicus; Put = Putamen; D1, D2 = Dopaminrezeptoren. Schwarz = exzitatorisch (Glutamat), Grau = inhibitorisch ( $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und Dopamin); Dicke Linien = vermehrte Aktivität, dünne Linien = verminderte Aktivität. Abbildung nach (Rohkamm 2008), S.299 und (Bähr 2003) Abb. 8.9, S.339.



**Abbildung 7: Unterscheidung der LBD-Untergruppen.** PDND = PD ohne Demenz; DLB = Auftreten einer Demenz vor oder bis zu einem Jahr nach Manifestation der PD-Symptome; PDD = Auftreten einer Demenz mehr als ein Jahr nach Manifestation der PD-Symptome.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur eines S100-Proteins** mit zwei charakteristischen EF-Hand-Motiven. Eine EF-Hand besitzt die Struktur Helix-Schleife-Helix (Helix, H 1,2,3,4; Schleife, S 1,2), die durch eine sog. Gelenkregion (G) miteinander verbunden sind. Die jeweils zwischen zwei  $\alpha$ -Helices liegenden Schleifen stellen die N-terminale und C-terminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen des Proteins dar. Abbildung nach (Donato 2001), Fig. 1, S.3.

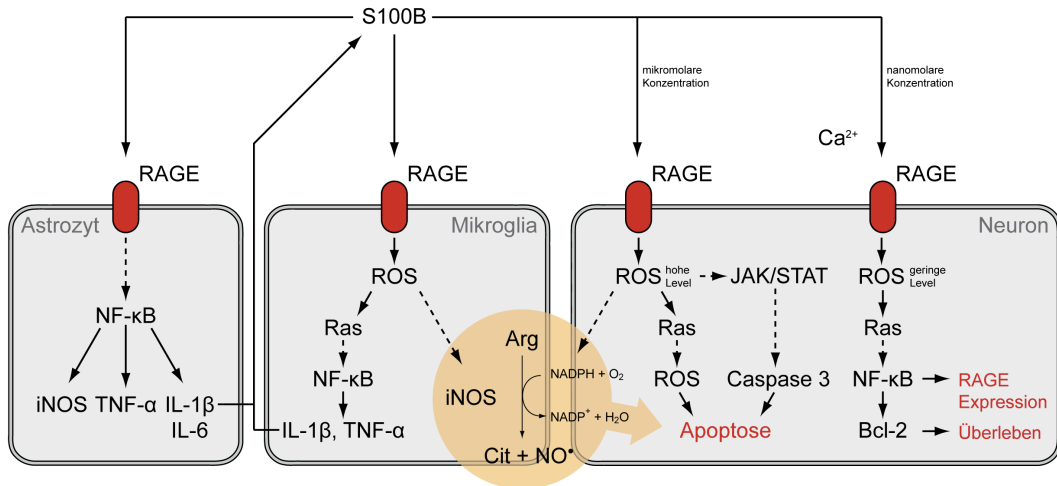


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Wirkung von S100B auf Glia- und Nervenzellen. Nach (Donato et al. 2009).

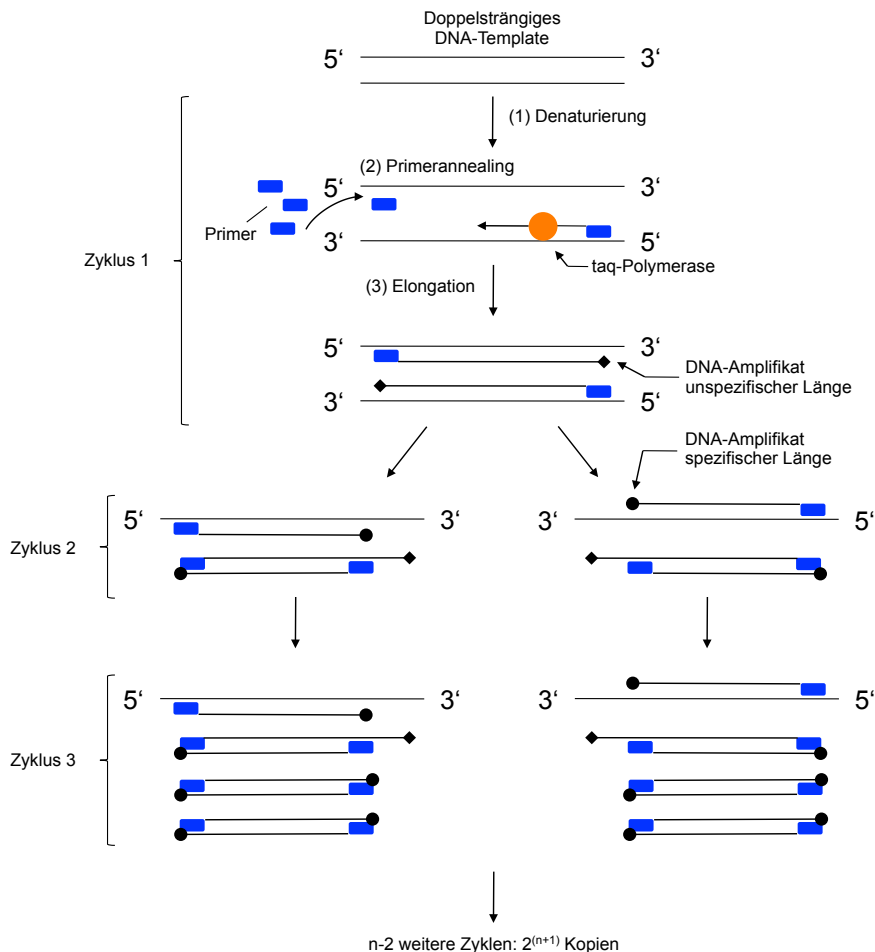
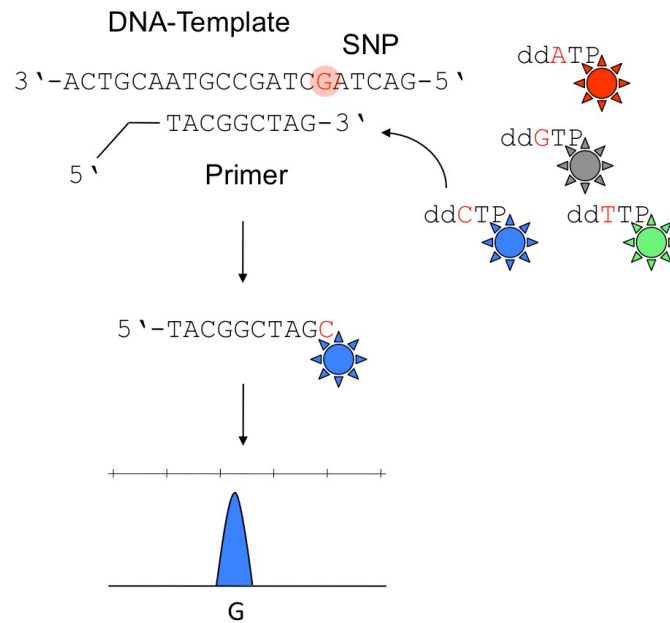
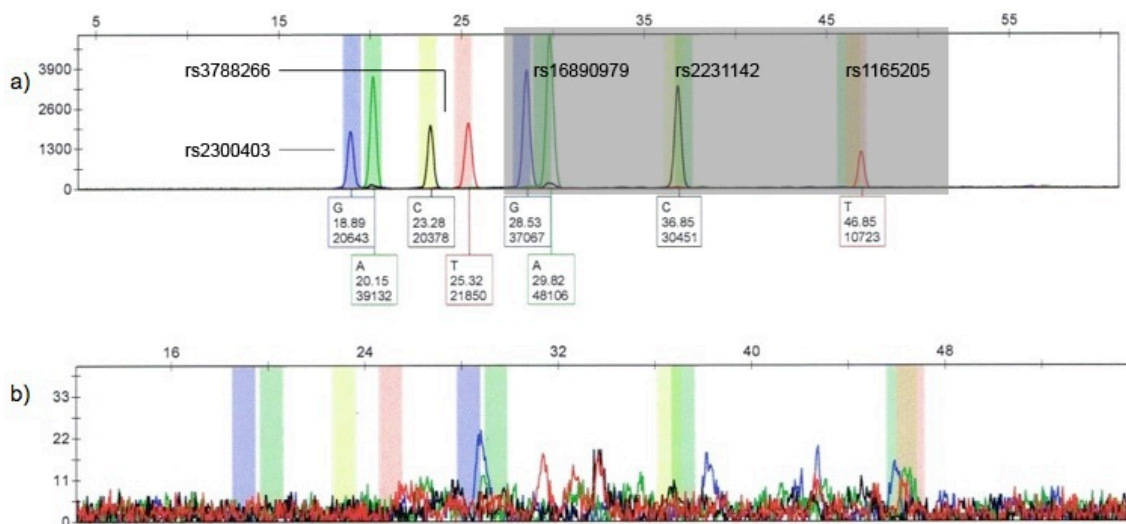


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer PCR-Reaktion. Ausgehend von einem doppelsträngigen DNA-Template werden in jedem Zyklus bestehend aus (1) Denaturierung, (2) Primerhybridisierung und (3) Elongation (exemplarisch gezeigt in Zyklus 1)  $2^{(n+1)}$  Kopien des DNA-Abschnitts amplifiziert. Im 1. Zyklus entstehen noch DNA-Fragmente unspezifischer

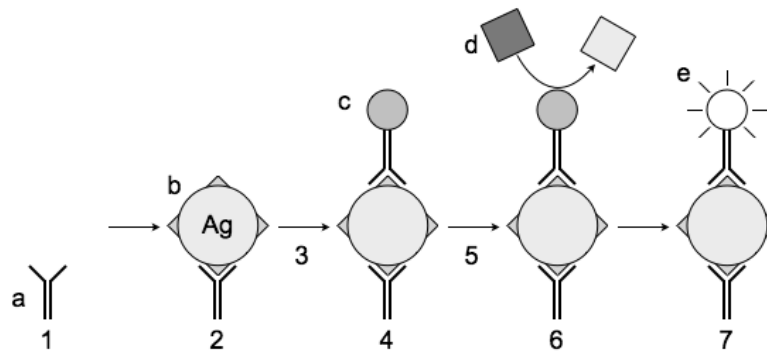
Länge, während ab dem 2. Zyklus nur noch DNA-Amplifikate spezifischer Länge synthetisiert werden nach (Griffiths 1999).



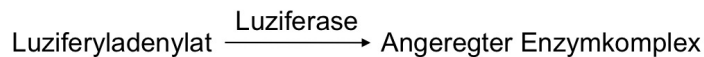
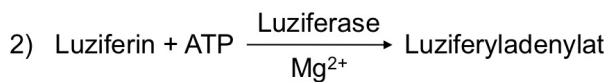
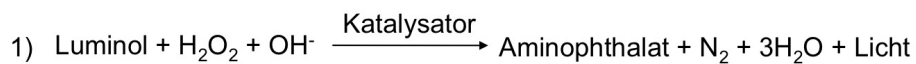
**Abbildung 11: Schematische Darstellung einer SNaPshot®-PCR.** Der SNaPshot®-Primer bindet an die komplementäre DNA-Sequenz des Template-Strangs. An das freie 3'-Ende des Primers lagern sich fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonucleoside (ddNTPs) an, die zum Kettenabbruch führen. Es entstehen DNA-Fragmente spezifischer Länge, die mittels Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und durch einen Laser identifiziert werden. Nach (Biosystems 2005).



**Abbildung 12: Beispielhafte Sequencer-Ergebnisse der SNaPshot®-Genotypisierung.** a) zeigt ein normales Ergebnis der Genotypisierung. b) zeigt eine typische Negativkontrolle. Die untenstehenden Basen geben die Allele der SNPs an. Die SNPs rs2300403 und rs3788266 liegen auf dem S100B-Gen. Die drei anderen SNPs (rs16890979, rs2231142, rs1165205) wurden im Rahmen einer anderen Studie an der selben Kohorte bestimmt (siehe 2.4.2.4, S.37).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung eines zweiseitigen immunoluminometrischen Assays (Sandwichtest).** (1) Zunächst werden die Fängerantikörper der Festphase (a) auf einer Platte, an der Reagenzglaswand oder mittels Magnetpartikeln immobilisiert. (2) Im ersten Inkubationsschritt binden die Epitope der Antigene (Ag) (b) an die Fängerantikörper. (3) Durch einen Waschschrift werden die ungebundenen Probenbestandteile entfernt. (4) An die immobilisierten Analyte binden im zweiten Inkubationsschritt markierte monoklonale Antikörper der zweiten Phase (c). (5) Wieder dient ein Waschschrift der Entfernung ungebundener Probenbestandteile. (6) Anschließend werden die Reagenzien für die Detektionsreaktion (d) hinzugegeben. (7) Diese werden je nach *Label* im abschließenden Schritt quantitativ bestimmt (e).



**Abbildung 14: Darstellung der Chemolumineszenz-Reaktion** durch die luminogene Substanz Luminol (1) und das Luziferin-Luziferase-System (2).

## 6.2. Tabellen

### **Diagnose des idiopathischen Parkinsonsyndroms (Parkinson's disease, PD)**

---

#### **Kardinalsymptome**

**Bradykinese** (Verlangsamung der Willkürmotorik, als Folge einer Störung der Basalganglien mit fortschreitender Reduktion von Geschwindigkeit und Amplitude repetitiver Bewegungen)

und

#### **1 Mindestens eines der drei Kardinalsymptome:**

1. Rigor
  2. Ruhetremor (4-6 Hz)
  3. Posturale Instabilität (nicht durch primäre visuelle, vestibuläre, verebellare oder propriozeptive Dysfunktion verursacht)
- 

#### **Ausschlusskriterien**

- 2
    - > wiederholte apoplektische Anfälle mit zunehmenden PD-Symptomen
    - > wiederholte Schädeltraumata
    - > gesicherte Enzephalitis
    - > okulomotorische Apraxie
    - > Neuroleptikatherapie bei Krankheitsbeginn
    - > mehr als eine betroffene Person in der Verwandtschaft
    - > anhaltende Remission
    - > streng einseitige Symptome nach drei und mehr Jahren
    - > progressive supranukleäre Blickparese
    - > Zeichen einer Kleinhirnbeteiligung
    - > frühe schwere autonome Dysfunktionen
    - > frühe schwere Demenz mit Störungen von Gedächtnis, Sprache und Praxis
    - > Babinski-Reflex
    - > Vorliegen eines Hirntumors oder kommunizierendem Hydrozephalus im CCT
    - > negative Antwort auf hohe L-Dopa-Dosis (nach Ausschluss Malabsorption)
    - > MPTP-Exposition
- 

#### **Einschlusskriterien**

**Mindestens 3** der folgenden Kriterien für die Diagnose einer **definitiven PD**:

- 3
    - > einseitiger Krankheitsbeginn
    - > Ruhetremor
    - > Fortschreiten der Erkrankung
    - > Fortbestehende Asymmetrie mit exzellentem Ansprechen auf L-Dopa
    - > Schwere L-Dopa-induzierte Chorea
    - > Ansprechen auf L-Dopa für mindestens 5 Jahre
    - > klinischer Verlauf von mindestens 10 Jahren.
- 

Tabelle 24: **Klinische Diagnosekriterien der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank** nach (Gibb und Lees 1988). Die diagnostische Sicherheit beträgt rund 75% (Hughes et al. 1992).

## Diagnose Demenz mit Lewy-Körpern (DLB)

---

- 1** **Essentielle Kriterien** für die Diagnose einer wahrscheinlichen oder möglichen DLB:
- > Demenz (mit Störungen der sozialen und professionellen Funktionen)
  - > Prominente/persistierende Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktionen
  - > Störungen von Aufmerksamkeit, exekutiven Funktionen und visuospatialen Fähigkeiten
- 
- 2** **Kernsymptome**
- Diagnose einer wahrscheinlichen DLB: 2 Kernsymptome  
Diagnose einer möglichen DLB: 1 Kernsymptom
- > Fluktuation der Kognition (Variationen von Aufmerksamkeit und Wachheit)
  - > Wiederkehrende visuelle Halluzinationen (gut ausgestaltet und detailliert)
  - > Spontane Merkmale von Parkinsonismus
- 
- 3** **Hinweisende Merkmale**
- Diagnose einer möglichen DLB: > 1 Merkmal  
Diagnose einer wahrscheinliche DLB: > 1 Merkmal + 1 Kernsymptom
- > REM-Schlaf Verhaltensstörung
  - > Schwere neuroleptische Sensitivität
  - > Niedriger Dopamintransporter-Uptake in SPECT oder PET der Basalganglien
- 
- 4** **Unterstützende Merkmale**
- Im Allgemeinen präsent, aber nicht nachweislich diagnostisch spezifisch:
- > Wiederholte Stürze und Synkopen
  - > Transiente, unerklärte Bewusstseinsverluste
  - > Schwere autonome Dysfunktion (z.B. orthostatische Hypotension)
  - > Halluzinationen in anderen Modalitäten
  - > Systematisierte Delusionen
  - > Depression
  - > CT/MRT: relativer Erhalt der mediotemporalen Lappenstruktur
  - > SPECT/PET: generalisierter geringer Uptake, reduzierte okzipitale Aktivität
  - > Abnormale myokardiale 123I-metaiodobenzylguanidine Szintigraphie
  - > EEG: Slow-Wave-Aktivität + transiente Sharp-Waves über Temporallappen
- 
- 5** **Unwahrscheinliche DLB**
- > Vorliegen zerebrovaskulärer Erkrankungen
  - > Vorliegen einer anderen physischen Erkrankung oder Gehirnerkrankung
  - > Erstmanifestation des Parkinsonismus im Stadium einer schweren Demenz
- 

Tabelle 25: **Überarbeitete Konsensuskriterien zur Diagnose der DLB** nach McKeith et al. (McKeith et al. 2005).



<b>Stadium 0</b>	<b>Keine Krankheitssymptomatik</b>
Stadium 1	Einseitige Symptomatik
Stadium 1,5	Einseitige und axiale (Stamm-)Symptome
Stadium 2	Beidseitige Erkrankung ohne Gleichgewichtsstörung
Stadium 2,5	Leichte beidseitige Symptomatik mit Ausgleich beim Zugtest
Stadium 3	Leichte bis mäßige beidseitige Symptomatik: leichte Haltungsinstabilität, körperlich unabhängig
Stadium 4	Schwere Symptomatik: Patient ist noch ohne Hilfe stand- und gangfähig
Stadium 5	Patient ist ohne Hilfe auf den Rollstuhl angewiesen oder bettlägerig

**Tabelle 26: Stadieneinteilung nach Hoehn & Yahr** (Hoehn und Yahr 1967), modifiziert nach <http://www.kompetenznetz-parkinson.de/Parkinson/leitskalen.html>

<b>Protein</b>	<b>S100A1 (<math>\alpha\alpha</math>)</b>	<b>S100A (<math>\alpha\beta</math>)</b>	<b>S100B (<math>\beta\beta</math>)</b>
<b>Vorkommen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Melanozyten</li> <li>- Keratinozyten</li> <li>- Skelettmuskelzellen</li> <li>- glatte Muskelzellen</li> <li>- Kardiomyozyten</li> <li>- Niere</li> <li>- Neuronen</li> <li>- Astroglia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- malignes Melanom*</li> <li>- Gliazellen (ZNS)**</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- malignes Melanom*</li> <li>- Astroglia (ZNS)</li> <li>- Schwannzellen (PNS)</li> <li>- Chondrozyten</li> <li>- Adipozyten</li> <li>- Langerhans-Zellen</li> </ul>

**Tabelle 27: Gewebespezifität von S100A, S100A1 und S100B** (Brochez und Naeyaert 2000)

\*Die  $\beta$ -Untereinheit korreliert positiv mit der Invasionstiefe und der Tumordicke (Jackel et al. 1999); \*\*5% der S100-Proteine im ZNS (Jackel et al. 1999).

#### **LIAISON® S100**

Anwendung	Für die quantitative Bestimmung von Protein S100B
Material	Reagenz Integral für 100 Bestimmungen
Methode	Zweischrittiger immunoluminometrischer Sandwichtest mit direkt beschichteten paramagnetischen Mikropartikeln
unterer Grenzmesswert	0,02 $\mu\text{g/l}$
Inkubation	20 min = 10 min (Testpuffer) + 10 min (Indikator-Konjugat)
Messwertebereich	0,02-30 $\mu\text{g/l}$
Probenart	Serum/CSF
Probenmenge	100 $\mu\text{l}$

**Tabelle 28: Liaison® S100 Testspezifikationen.** DiaSorin Deutschland GmbH.

---

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Aarsland, D., Zaccari, J., and Brayne, C. (2005), 'A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease', *Mov Disord*, 20 (10), 1255-63.
- Al Sweidi, S., et al. (2012), 'Oestrogen receptors and signalling pathways: implications for neuroprotective effects of sex steroids in Parkinson's disease', *J Neuroendocrinol*, 24 (1), 48-61.
- Anderson, P. J., et al. (2009), 'Differential effects of interleukin-1beta and S100B on amyloid precursor protein in rat retinal neurons', *Clin Ophthalmol*, 3, 235-42.
- Anonymous (2005) *The new Oxford American dictionary* [online text], Oxford University Press
- Baba, M., et al. (1998), 'Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies', *Am J Pathol*, 152 (4), 879-84.
- Bähr, Mathias; Frotscher, Michael (2003), *Duus' Neurologisch-topische Diagnostik* (8: Georg Thieme Verlag) 527.
- Basta, G., et al. (2002), 'Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses', *Circulation*, 105 (7), 816-22.
- Berg, D., et al. (2011), 'Enlarged substantia nigra hyperechogenicity and risk for Parkinson disease: a 37-month 3-center study of 1847 older persons', *Arch Neurol*, 68 (7), 932-7.
- Bhidayasiri, R. and Reichmann, H. (2013), 'Different diagnostic criteria for Parkinson disease: what are the pitfalls?', *J Neural Transm*, 120 (4), 619-25.
- Bianchi, R., et al. (2007), 'S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression', *J Leukoc Biol*, 81 (1), 108-18.
- Biosystems, Applied (2005), 'User Bulletin', in [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_042107.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_042107.pdf) (ed.), *Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers and 3130/3130xl Genetic Analyzers* (Applied Biosystems).
- Bogaerts, V., et al. (2007), 'A novel locus for dementia with Lewy bodies: a clinically and genetically heterogeneous disorder', *Brain*, 130 (Pt 9), 2277-91.
- Braak, H., Sastre, M., and Del Tredici, K. (2007), 'Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease', *Acta Neuropathol*, 114 (3), 231-41.
- Braak, H., et al. (2003), 'Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease', *Neurobiol Aging*, 24 (2), 197-211.
- Brochez, L. and Naeyaert, J. M. (2000), 'Serological markers for melanoma', *Br J Dermatol*, 143 (2), 256-68.
- Dick, F. D., et al. (2007), 'Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study', *Occup Environ Med*, 64 (10), 666-72.
- Diener, H. C., et al. (2010), 'S2-Leitlinie "Parkinson-Syndrom"', *AWMF online* (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN)).
- Donato, R. (1999), 'Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type', *Biochim Biophys Acta*, 1450 (3), 191-231.
- (2001), 'S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles', *Int J Biochem Cell Biol*, 33 (7), 637-68.
- (2003), 'Intracellular and extracellular roles of S100 proteins', *Microsc Res Tech*, 60 (6), 540-51.
- Donato, R., et al. (2009), 'S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal', *Biochim Biophys Acta*, 1793 (6), 1008-22.
- Emre, M., et al. (2007), 'Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease', *Mov Disord*, 22 (12), 1689-707; quiz 837.
- Gamboa, E. T., et al. (1974), 'Influenza virus antigen in postencephalitic parkinsonism brain. Detection by immunofluorescence', *Arch Neurol*, 31 (4), 228-32.
- Gibb, W. R. and Lees, A. J. (1988), 'The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51 (6), 745-52.

- Goldmann Gross, R., Siderowf, A., and Hurtig, H. I. (2008), 'Cognitive impairment in Parkinson's disease and dementia with lewy bodies: a spectrum of disease', *Neurosignals*, 16 (1), 24-34.
- Griffiths, Anthony J. F. (1999), 'Modern genetic analysis', in Figure 10-26 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21286/> (ed.), (New York: W. H. Freeman).
- Halliday, G. M. and Stevens, C. H. (2011), 'Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease', *Mov Disord*, 26 (1), 6-17.
- Hashimoto, M., et al. (2003), 'Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases', *Neuromolecular Med*, 4 (1-2), 21-36.
- Hirtz, D., Thurmman, D. J., and Gwinn-Hardy, K. A. (2007), 'How common are the "common" neurologic disorders?', *Neurology*.
- Hoehn, M. M. and Yahr, M. D. (1967), 'Parkinsonism: onset, progression and mortality', *Neurology*, 17 (5), 427-42.
- Hofmann, M. A., et al. (1999), 'RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides', *Cell*, 97 (7), 889-901.
- Hu, J., Ferreira, A., and Van Eldik, L. J. (1997), 'S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes', *J Neurochem*, 69 (6), 2294-301.
- Huang, Y. and Halliday, G. (2013), 'Can we clinically diagnose dementia with Lewy bodies yet?', *Transl Neurodegener*, 2 (1), 4.
- Hughes, A. J., et al. (1992), 'Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55 (3), 181-4.
- Iuvone, T., et al. (2007), 'Cannabinoid CB1 receptor stimulation affords neuroprotection in MPTP-induced neurotoxicity by attenuating S100B up-regulation in vitro', *J Mol Med (Berl)*, 85 (12), 1379-92.
- Jackel, A., et al. (1999), '[S-100 beta protein in serum, a tumor marker in malignant melanoma--current state of knowledge and clinical experience]', *Hautarzt*, 50 (4), 250-6.
- Jellinger, K. A. (2009), 'Formation and development of Lewy pathology: a critical update', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- Kalaitzakis, M. E., et al. (2008), 'Striatal beta-amyloid deposition in Parkinson disease with dementia', *J Neuropathol Exp Neurol*, 67 (2), 155-61.
- Kanner, A. A., et al. (2003), 'Serum S100beta: a noninvasive marker of blood-brain barrier function and brain lesions', *Cancer*, 97 (11), 2806-13.
- Kim, S. H., Smith, C. J., and Van Eldik, L. J. (2004), 'Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production', *Neurobiol Aging*, 25 (4), 431-9.
- Kleindienst, A., et al. (2010), 'Dynamics of S100B release into serum and cerebrospinal fluid following acute brain injury', *Acta Neurochir Suppl*, 106, 247-50.
- Lambert, J. C., et al. (2007), 'Evidence for the association of the S100beta gene with low cognitive performance and dementia in the elderly', *Mol Psychiatry*, 12 (9), 870-80.
- Langston, J. W., et al. (1983), 'Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis', *Science*, 219 (4587), 979-80.
- Lee, H. J., et al. (2011), 'Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies', *J Biol Chem*, 285 (12), 9262-72.
- Li, Y., et al. (2000), 'S100beta induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons', *J Neurochem*, 74 (1), 143-50.
- Licker, V. (2009), 'Proteomics in human Parkinson's disease research', *JOURNAL OF PROTEOMICS*, 73, 10-29.
- Lippa, C. F., et al. (2007), 'DLB and PDD boundary issues: diagnosis, treatment, molecular pathology, and biomarkers', *Neurology*, 68 (11), 812-9.
- Litvan, I., et al. (2003), 'Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders', *Mov Disord*, 18 (5), 467-86.
- Liu, J., et al. (2005), 'SNPs and haplotypes in the S100B gene reveal association with schizophrenia', *Biochem Biophys Res Commun*, 328 (1), 335-41.

- Maetzler, W., et al. (2011), 'Reduced but not oxidized cerebrospinal fluid glutathione levels are lowered in Lewy body diseases', *Mov Disord*, 26 (1), 176-81.
- Marenholz, I., Heizmann, C. W., and Fritz, G. (2004), 'S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature)', *Biochem Biophys Res Commun*, 322 (4), 1111-22.
- Marttila, R. J. and Rinne, U. K. (1981), 'Epidemiology of Parkinson's disease--an overview', *J Neural Transm*, 51 (1-2), 135-48.
- McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (2008), 'The alpha-synuclein burden hypothesis of Parkinson disease and its relationship to Alzheimer disease', *Exp Neurol*, 212 (2), 235-8.
- McKeith, I. G. (2002), 'Dementia with Lewy bodies', *Br J Psychiatry*, 180, 144-7.
- McKeith, I. G., et al. (2000), 'Prospective validation of consensus criteria for the diagnosis of dementia with Lewy bodies', *Neurology*, 54 (5), 1050-8.
- McKeith, I. G., et al. (1996), 'Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop', *Neurology*, 47 (5), 1113-24.
- McKeith, I. G., et al. (2005), 'Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium', *Neurology*, 65 (12), 1863-72.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988), 'A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells', *Nucleic Acids Res*, 16 (3), 1215.
- Moore, B. W. (1965), 'A soluble protein characteristic of the nervous system', *Biochem Biophys Res Commun*, 19 (6), 739-44.
- Mrak, R. E., Sheng, J. G., and Griffin, W. S. (1996), 'Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease', *J Neuropathol Exp Neurol*, 55 (3), 273-9.
- Muramatsu, Y., et al. (2003), 'Expression of S-100 protein is related to neuronal damage in MPTP-treated mice', *Glia*, 42 (3), 307-13.
- Murken (2006), *Taschenlehrbuch Humangenetik* (7 edn.; Stuttgart: Thieme).
- Nishioka, K., et al. (2010), 'Association of alpha-, beta-, and gamma-Synuclein with diffuse lewy body disease', *Arch Neurol*, 67 (8), 970-5.
- Nygaard, O., Langbakk, B., and Romner, B. (1997), 'Age- and sex-related changes of S-100 protein concentrations in cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurological disorder', *Clin Chem*, 43 (3), 541-3.
- Parkinson, J. (2002), 'An essay on the shaking palsy. 1817', *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14 (2), 223-36; discussion 22.
- Petzold, A., et al. (2003), 'Cerebrospinal fluid S100B correlates with brain atrophy in Alzheimer's disease', *Neurosci Lett*, 336 (3), 167-70.
- Petzold, A., et al. (2009), 'CSF protein biomarkers for proximal axonal damage improve prognostic accuracy in the acute phase of Guillain-Barre syndrome', *Muscle Nerve*, 40 (1), 42-9.
- Poskanzer, D. C. and Schwab, R. S. (1963), 'Cohort Analysis of Parkinson's Syndrome: Evidence for a Single Etiology Related to Subclinical Infection About 1920', *J Chronic Dis*, 16, 961-73.
- Ravenholt, R. T. and Foegen, W. H. (1982), '1918 influenza, encephalitis lethargica, parkinsonism', *Lancet*, 2 (8303), 860-4.
- Reid, W. G., et al. (1996), 'A longitudinal of Parkinson's disease: clinical and neuropsychological correlates of dementia', *J Clin Neurosci*, 3 (4), 327-33.
- Riedel, O., et al. (2010), 'Frequency of dementia, depression, and other neuropsychiatric symptoms in 1,449 outpatients with Parkinson's disease', *J Neurol*, 257 (7), 1073-82.
- Roche, S., et al. (2007), 'Candidate gene analysis of 21q22: support for S100B as a susceptibility gene for bipolar affective disorder with psychosis', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B (8), 1094-6.
- Rohkamm, Reinhard (2008), *Taschenatlas Neurologie* (Taschenatlas, 3; Stuttgart: Thieme Verlag) 533.
- Rothermundt, M., et al. (2003), 'S100B in brain damage and neurodegeneration', *Microsc Res Tech*, 60 (6), 614-32.

- Sathe, K., et al. (2012), 'S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF-alpha pathway', *Brain*, 135 (Pt 11), 3336-47.
- Schaf, D. V., et al. (2005), 'S100B and NSE serum levels in patients with Parkinson's disease', *Parkinsonism Relat Disord*, 11 (1), 39-43.
- Schrag, A., et al. (1998), 'Young-onset Parkinson's disease revisited--clinical features, natural history, and mortality.', *Mov Disord*, 13 (6), 885-94.
- Shastri, B. S. (2009), 'SNPs: impact on gene function and phenotype', *Methods Mol Biol*, 578, 3-22.
- Sheng, J. G., et al. (1996), 'Human brain S100 beta and S100 beta mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, 17 (3), 359-63.
- Sorci, G., et al. (2010), 'S100B Protein, A Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond', *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2010.
- Steiner, J., et al. (2006), 'Increased cerebrospinal fluid and serum levels of S100B in first-onset schizophrenia are not related to a degenerative release of glial fibrillar acidic protein, myelin basic protein and neurone-specific enolase from glia or neurones', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77 (11), 1284-7.
- Steiner, J., et al. (2007), 'Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain', *BMC Neurosci*, 8, 2.
- Svenningsson, P., et al. (2012), 'Cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: diagnosis, biomarkers, and treatment', *Lancet Neurol*, 11 (8), 697-707.
- Teismann, P. and Schulz, J. B. (2004), 'Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation', *Cell Tissue Res*, 318 (1), 149-61.
- Thomas, Lothar (2005), *Labor und Diagnose - Indikationen und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*, 9 vols. (6; Frankfurt/Main: TH-Books-Verlags-Gesellschaft) 2016.
- Tsai, C. H., et al. (2002), 'Environmental risk factors of young onset Parkinson's disease: a case-control study', *Clin Neurol Neurosurg*, 104 (4), 328-33.
- Van Den Eeden, S. K., et al. (2003), 'Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity', *Am J Epidemiol*, 157 (11), 1015-22.
- Van Eldik, L. J. and Zimmer, D. B. (1987), 'Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells', *Brain Res*, 436 (2), 367-70.
- Villarreal, A., et al. (2011), 'S100B alters neuronal survival and dendrite extension via RAGE-mediated NF-kappaB signaling', *J Neurochem*, 117 (2), 321-32.
- Wirdefeldt (2011), 'Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence', *Eur J Epidemiol*.
- Wooten, G. F., et al. (2004), 'Are men at greater risk for Parkinson's disease than women?', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75, 637-39.
- Wu, D. C., et al. (2002), 'Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease', *J Neurosci*, 22 (5), 1763-71.
- Yan, S. D., et al. (1994), 'Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins', *J Biol Chem*, 269 (13), 9889-97.
- Zaccai, J., McCracken, C., and Brayne, C. (2005), 'A systematic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies', *Age Ageing*, 34 (6), 561-6.
- Ziemssen, T., et al. (2006), 'Autonomic dysfunction in Parkinson's disease and multiple system atrophy', *Aktuelle Neurologie*, 33 (7), 385-93.
- Zimmer, D. B., et al. (1995), 'The S100 protein family: history, function, and expression', *Brain Res Bull*, 37 (4), 417-29.

---

## 8. Danksagung

---

An dieser Arbeit haben viele Menschen durch theoretische und praktische Hilfe ihren Anteil gehabt, weshalb ich mich an dieser Stelle herzlich und namentlich bei ihnen bedanken möchte:

Frau Prof. Dr. med. Daniela Berg danke ich für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe diese vorliegende Arbeit anfertigen zu dürfen und für ihre Hilfe, mich mit meinen persönlichen Interessen und Zielen wahrzunehmen und auf diesen Weg zu setzen.

Herrn PD. Dr. med. Walter Mätzler danke ich für seine hervorragende Betreuung und Anleitung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke ihm für seine Expertise und die vielen Ratschläge, für seine kostbare Zeit, seine unermüdliche Geduld und die Hilfe in vielen großen und kleinen Dingen.

Frau Claudia Schulte danke ich für ihre kompetente Einweisung in die Laborarbeit, für ihr Wissen und ihre Geduld, viele gute Ideen und Problemlösungsvorschläge und ihr offenes Ohr für Fragen zu jeder Zeit.

Frau Dr. med. Anne Kathrin Schäfer danke ich für die guten Erinnerungen an gemeinsame Tage und späte Abende im Labor, für ihre Hilfe und ihre immer gute Laune.

Frau Dr. Corinna Fleckenstein danke ich für die Kooperation und die freundliche Aufnahme in die DiaSorin Firmenlabors in Ditzgenbach. Danke für die Möglichkeit zur Präsentation eines Posters auf der 7. Jahrestagung der DGKL in Mannheim und gute Gespräche.

Herr Zvonimir Vukovic danke ich für Seine logistische Hilfe und die kurzweiligen Mitfahrgelegenheiten.

Herr Peter Stahl danke ich für die freundliche und kompetente Einweisung in die Bedienung des Liaison®-Analysator, für seine Erklärungen und seine Hilfe.

Diese Studie wurde teilweise durch die Robert Bosch Stiftung unterstützt (Nummer 32.5.1141.0019.0).