

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt
Neurodegenerative Erkrankungen

**Das Langlebigkeitsgen Klotho und seine
Liquor-Proteinprofile:
Modifikator für die Parkinson Erkrankung?**

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

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

vorgelegt von

Köhler, Leonie Victoria

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Gasser
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. P. Fallier-Becker

Tag der Disputation: 25.03.2021

Meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Morbus Parkinson	1
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Klinisches Bild.....	3
1.1.2.1 Motorische Symptome.....	3
1.1.2.2 Nicht-motorische Symptome	3
1.1.3 Diagnostik der Parkinson Erkrankung.....	6
1.1.3.1 Unterschiedliche Verläufe der Parkinson Erkrankung.....	7
1.1.3.2 Differentialdiagnosen.....	9
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese	10
1.1.5 Genetik.....	13
1.1.5.1 Single nucleotide polymorphisms (SNPs)	13
1.2 Klotho.....	15
1.2.1 Allgemein	15
1.2.2 Funktion	16
1.2.3 Mutation L109R.....	19
1.2.4 KL-VS Variante (F352V)	20
1.3 Ziel der Studie und Fragestellung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien	23

2.1.2	Im Labor angesetzte Puffer.....	23
2.1.3	Oligonukleotide (Primer)	24
2.1.4	Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	25
2.1.5	Geräte	26
2.1.6	Software.....	26
2.1.7	Patientenkollektiv	27
2.1.7.1	Mutation L109R	27
2.1.7.2	KL-VS Variante.....	27
2.1.8	Klinische Untersuchung	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Statistik	30
2.2.1.1	Mutation L109R.....	30
2.2.1.2	KL-VS Variante.....	30
2.2.2	Theorie der Standardmethoden zur Analyse der Mutation L109R.....	32
2.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.2.2.2	Gelelektrophorese	33
2.2.2.3	Sanger-Sequenzierung	34
2.2.3	Durchführung der Standardmethoden zur Analyse der Mutation L109R	36
2.2.3.1	Verdünnung der DNA	36
2.2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion	36
2.2.3.3	Gelelektrophorese	39
2.2.3.4	Purifikation.....	42
2.2.3.5	Sequenzierreaktion	43
2.2.3.6	Kapillarsequenzierer zur Bestimmung der Nukleotidsequenz.....	44
2.2.3.7	Auswertung der Nukleotidsequenz.....	45

2.2.4	Genetische Analyse des Klotho-Genotyp KL-VS Variante	47
2.2.5	Messung der Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D Metaboliten im Liquor.....	48
2.2.6	Ethik.....	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Klotho L109R Mutation	49
3.2	KL-VS Variante	51
3.2.1	Tübinger Kohorte 1: Genetische Varianten im Klotho-Gen.....	51
3.2.1.1	Gruppenvergleich der Parkinson-Patienten aufgeteilt nach Genotyp	51
3.2.1.2	Beurteilung kognitiver Einschränkungen im longitudinalen Verlauf im Vergleich der Genotypen.....	53
3.2.2	PPMI-Kohorte: Genetische Varianten im Klotho-Gen.....	55
3.2.2.1	Gruppenvergleich der Parkinson-Patienten aufgeteilt nach Genotyp	55
3.2.2.2	Beurteilung kognitiver Einschränkungen im longitudinalen Verlauf im Vergleich der Genotypen.....	57
3.2.3	Tübinger Kohorte 2: Klotho-Genotyp und Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D-Metaboliten im Liquor.....	58
3.2.3.1	Vergleich der Liquor-Konzentrationen in gesunden Kontrollen und Parkinson-Patienten	58
3.2.3.2	Zusammenhänge zwischen Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D Metaboliten im Liquor und klinischen Charakteristika.....	63
3.2.3.3	Genotyp-spezifische Effekte auf Liquor-Konzentrationen	64
4	Diskussion.....	69
4.1	Klotho L109R Mutation	69
4.2	KL-VS Variante	71

4.2.1	Tübinger Kohorte 1 und PPMI-Kohorte: Beurteilung kognitiver Einschränkungen im Vergleich der Genotypen.....	72
4.2.2	Tübinger Kohorte 2: Klotho-Genotyp und Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D Metaboliten im Liquor.....	75
4.2.2.1	Vergleich der Liquor-Konzentrationen in gesunden Kontrollen und Parkinson-Patienten	75
4.2.3	Die Rolle von Klotho in Bezug auf beschleunigtes Altern und Neurodegeneration	77
4.2.3.1	Pathway 1: Klotho als Co-Rezeptor für FGF23 im Vitamin D Metabolismus.....	77
4.2.3.2	Pathway 2: Klotho als Faktor im Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies	80
4.2.4	Klotho-Genotyp KL-VS Variante spezifische Effekte der Liquor-Konzentrationen.....	83
4.3	Ausblick.....	84
4.4	Limitationen der Arbeit.....	85
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis.....	88
7	Erklärung zum Eigenanteil	96
8	Danksagung.....	97
9	Anlagen.....	99

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AAO	Erkrankungsalter
BDI	Beck's Depression Inventory
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
FGF	Fibroblast Growth Factor
GWAS	Genome-wide association study
HYS	Hoehn und Yahr Skala
MMST	Mini-Mental-Status-Test
MoCA	Montreal-Cognitive-Assessment
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PPMI	Parkinson's Progression Markers Initiative
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SNP	Single nucleotide polymorphism
UPDRS III	Unified Parkinson's disease Rating Scale

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der nicht-motorischen Symptome.....	4
Abbildung 2: Vitamin D Pathway.	17
Abbildung 3: Temperaturprofil der "touch-down PCR".	39
Abbildung 4: Ergebnis einer Gelelektrophorese.	41
Abbildung 5: Temperaturprofil des Thermocyclers (graphisch).	43
Abbildung 6: Darstellung der Auswertung mit Hilfe des Programms Finch TV..	45
Abbildung 7: Darstellung der Auswertung mit Hilfe des Programms Finch TV..	46
Abbildung 8: Software gPLINK für die Auswertung.	47
Abbildung 9: Kaplan-Maier-Kurve für weibliche Patienten der Tübinger Kohorte.	54
Abbildung 10: Kaplan-Maier-Kurve für männliche Patienten der PPMI-Kohorte.	57
Abbildung 11: Box-Plot Liquor (CSF) Klotho Konzentration.	60
Abbildung 12: Box-Plot Liquor (CSF) FGF23 Konzentration.	61
Abbildung 13: Box-Plot Klotho Konzentration im Liquor getrennt nach Genotyp.	67
Abbildung 14: Box-Plot 1,25 dihydroxycholecalciferol Konzentration im Liquor getrennt nach Genotyp.	68
Abbildung 15: Vitamin D Metabolismus und die Rolle von Klotho.	78
Abbildung 16: Klotho im ROS Metabolismus und der NO-Produktion.....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nukleotidsequenzen der Primer.....24

Tabelle 2: Mastermix-Ansatz37

Tabelle 3: Darstellung verschiedener Ansätze.37

Tabelle 4: Temperaturprofil der "touch-down PCR"38

Tabelle 5: Pipettierschema für NaAC + Ethanol-Gemisch.....42

Tabelle 6: Ablaufschema der Purifikation42

Tabelle 7: Pipettierschema für Ansatz der Sequenzierreaktion.....43

Tabelle 8: Temperaturprofil des Thermocyclers für die44

Tabelle 9: Pipettierschema für Sequenzierplatte44

Tabelle 10: Mutation L109R Vergleich des Genotyp Wildtyp und der Klotho L109R Mutation.50

Tabelle 11: Tübinger Kohorte 1. Vergleich zwischen dem Klotho-Genotyp Wildtyp und dem Klotho-Genotyp KL-VS Variante.52

Tabelle 12: PPMI-Kohorte. Vergleich zwischen dem Genotyp Wildtyp und dem Genotyp KL-VS Variante.56

Tabelle 13: Vitamin D und Protein Konzentrationen im Liquor (CSF) in gesunden Kontrollen und Parkinson-Patienten.59

Tabelle 14: Vitamin D und Protein Konzentrationen im Liquor (CSF) in gesunden Kontrollen und in Parkinson-Patienten, aufgeteilt nach Geschlecht. 62

Tabelle 15: Zusammenhänge zwischen Liquor (CSF) Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D Metaboliten mit klinischen Charakteristika bei Parkinson-Patienten.64

Tabelle 16: Vitamin D und Protein Konzentrationen im Liquor (CSF) in Genotyp Wildtyp vs. Genotyp KL-VS Variante.65

Tabelle 17: Vitamin D und Protein Konzentrationen im Liquor (CSF) in Genotyp Wildtyp vs. Genotyp KL-VS Variante nach Matching.....66

1 Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

Die Parkinson Erkrankung zählt heutzutage zu einer der häufigsten und bekanntesten Erkrankungen des Nervensystems. Erstmals wurden die Symptome der Erkrankung 1871 von James Parkinson in „An Essay on the Shaking Palsy“ (Parkinson, 2002) beschrieben und später dann als Parkinson Erkrankung oder auch Morbus Parkinson betitelt (Schulz et al., 2016).

Bei der Erkrankung handelt es sich um eine langsam fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, die vielzählige neuroanatomische Areale des Gehirns einschließt. Kennzeichnend ist das Absterben dopaminhaltiger Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra (Tibar et al., 2018).

Die Häufigkeit der Parkinson Erkrankung nimmt mit dem Alter zu, wodurch das Alter als wichtigster Risikofaktor angesehen werden kann (Reeve et al., 2014).

Während man früher davon ausging, dass die Erkrankung hauptsächlich durch Umweltfaktoren hervorgerufen wird, weiß man heute, dass es sich um ein komplexes Zusammenspiel zwischen genetischen Faktoren und Umweltfaktoren handelt (Kalia and Lang, 2015).

1.1.1 Epidemiologie

Die Parkinson Erkrankung zählt nach der Alzheimer Erkrankung zu der zweithäufigsten neurodegenerativen Erkrankung weltweit (Rizek et al., 2016).

Unter den neurodegenerativen Erkrankungen steigen die Prävalenzen dieser beiden häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen am schnellsten an.

Die Prävalenz der Parkinson Erkrankung beträgt aktuell weltweit 7 Millionen. Insbesondere in Nordamerika und Westeuropa zeigen sich die höchsten Prävalenzen. Aufgrund der Altersentwicklung der Bevölkerung ist mit einer weiteren Zunahme der Prävalenz zu rechnen. Man geht davon aus, dass es in den nächsten 20 Jahren zu einer Verdoppelung der Fallzahlen kommen wird: 14,2 Millionen Parkinson-Patienten im Jahr 2020 (Ferri et al., 2005) (Dorsey and Bloem, 2018).

Im typischen Verlauf entwickelt sich die Erkrankung bei Erwachsenen zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Alter zunimmt (ab dem 60. Lebensjahr stark ansteigend) (Van Den Eeden et al., 2003).

Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Baldereschi et al., 2000). In diesem Zusammenhang wird ein protektiver Effekt durch das weibliche Hormon Östrogen diskutiert (Lubomski et al., 2014). Der protektive Effekt von Östrogen besteht in diesem Fall durch seine neuroprotektive Wirkung auf das dopaminerge System (Koller et al., 1982). Dies könnte ebenfalls Grund für den späteren Beginn motorischer Symptomatik bei Frauen sein, was in epidemiologischen Studien herausgefunden werden konnte (Pavon et al., 2010).

Auch können in unterschiedlichen Ethnien ungleiche Inzidenzen beobachtet werden. Bei Europäern ist die Inzidenz deutlich höher als bei Afroamerikanern oder Asiaten (Van Den Eeden et al., 2003) (Mayeux et al., 1995).

1.1.2 Klinisches Bild

1.1.2.1 Motorische Symptome

Zu den vier Kardinalsymptomen der Parkinson Erkrankung gehören Ruhetremor, Bradykinese, Rigor und posturale Instabilität (Jankovic, 2008). Die Symptome beginnen meist einseitig, können dann jedoch im Verlauf der Erkrankung auch bilateral auftreten (Dexter and Jenner, 2013).

Je nach Konstellation und Ausprägung der Kardinalsymptome werden klinisch drei unterschiedliche Prädomanztypen unterschieden: Tremordominanztyp, akinetisch-rigider Typ oder Äquivalenztyp, wobei sich letzterer durch eine relativ gleichmäßige Ausprägung der Hauptmerkmale auszeichnet (Zhang et al., 2016).

Darüber hinaus ist zu beachten, dass die typischen motorischen Symptome erst in Erscheinung treten, wenn bereits 50-60% der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra untergegangen sind und 80-85% des Dopamingehalts des Striatums verbraucht ist (Lee and Marsden, 1994). Folglich geht der klinisch sichtbaren Phase eine prodromale Phase voraus, in welcher die Degeneration der dopaminergen Neurone zwar bereits begonnen hat, die Parkinson definierenden motorischen Zeichen jedoch noch nicht präsent sind.

Während dieser Periode berichten Parkinson-Patienten häufig über nicht-motorische Symptome, die sie in ihren alltäglichen Aufgaben beeinträchtigen (Tibar et al., 2018).

1.1.2.2 Nicht-motorische Symptome

Während lange Zeit diesen Symptomen keine große Bedeutung zugeschrieben wurde und der Fokus der Forschung fast ausschließlich auf die typischen motorischen Symptome gelegt wurde, weiß man heute, dass besonders die nicht-motorischen Symptome sehr einschränkend für die Lebensqualität der Parkinson-Patienten sind (Committee, 2002). Hinzu kommt, dass die nicht-

Einleitung

motorischen Symptome durch eine konventionelle dopaminerge Therapie meist nicht ausreichend therapiert werden können (Muzerengi et al., 2007).

In Abbildung 1 sind die Symptomgruppen dargestellt, aus denen sich die nicht-motorischen Symptome zusammensetzen.

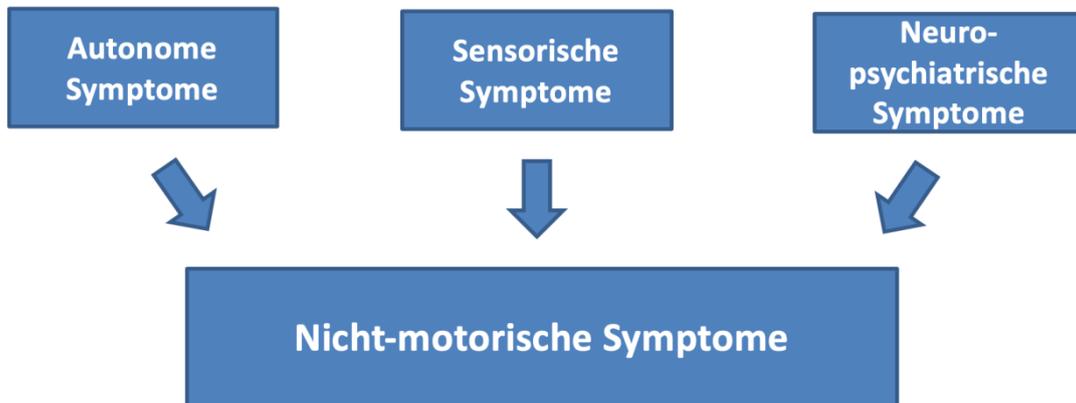


Abbildung 1: Übersicht der nicht-motorischen Symptome. Dargestellt sind die Symptomgruppen, aus welchen sich die nicht-motorischen Symptome zusammensetzen.

Zu den Symptomen der **autonomen Dysfunktionen** gehören REM-Schlaf-Verhaltensstörungen, Blutdruckschwankungen, insbesondere orthostatische Hypotonie, Blasenfunktionsstörung, sexuelle Funktionsstörungen, vermehrtes Schwitzen, trockene Augen oder auch Obstipationen (Berg et al., 2013) (Muzerengi et al., 2007). Sie zählen zu den häufigsten nicht-motorischen Symptomen (Chaudhuri et al., 2006).

Des Weiteren stellt man bei vielen Parkinson-Patienten **sensorische Symptome** fest, die besonders in Form von Parästhesien, Schmerzen und Riechfunktionsstörungen zum Ausdruck kommen (Muzerengi et al., 2007).

Der Bereich der **neuropsychiatrischen Symptome** umfasst eine Vielzahl variabler Symptome, die Depressionen, Angststörungen, Apathien, psychotische Störungen, visuelle Halluzinationen und kognitive Einschränkungen bis hin zu Demenz beinhalten.

Einleitung

Besonders eingegangen werden soll hier nochmals auf die kognitiven Einschränkungen, die durch ihre Alltagsrelevanz für Parkinson-Patienten von großer Bedeutung sind.

James Parkinson beschrieb 1817 in seinem Essay „An Essay on the Shaking Palsy“ ausschließlich die motorischen Symptome und war der Auffassung, dass die intellektuelle Funktion erhalten bleiben würde. Heute ist bekannt, dass kognitive Einschränkungen bei Parkinson-Patienten deutlich häufiger vorzufinden sind im Vergleich zu gesunden Individuen. Aarsland et al. beschreibt, dass Patienten mit einer Parkinson Erkrankung ein 6-fach höheres Risiko haben eine Demenz zu entwickeln, als Patienten ohne eine Parkinson Erkrankung (Aarsland et al., 2001).

Die Prävalenz einer Demenz bei Parkinson-Patienten liegt bei 31% (Aarsland and Kurz, 2010). Einer australischen Studie zufolge beträgt die Prävalenz sogar bis zu 80% (Hely et al., 2008).

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Parkinson-Patient innerhalb 12 Jahren eine Demenz entwickelt liegt bei 60%, mit zunehmendem Alter und Krankheitsdauer steigend (Buter et al., 2008) (Aarsland et al., 2001). Hinzu kommt, dass die Entwicklung einer Demenz das Mortalitätsrisiko bei Parkinson-Patienten verdoppelt (Levy et al., 2002).

Als prädiktive Faktoren zählen ein hohes Erkrankungsalter bei Erstmanifestation der Parkinson Erkrankung, eine längere Krankheitsdauer, ein geringer MMST (Mini-Mental-Status-Test) oder MoCA (Montreal Cognitive Assessment) bei Beginn der Erkrankung und Denkstörungen. Klinisch tritt die Parkinson assoziierte Demenz durch Aufmerksamkeitsstörungen, Gedächtnisstörungen, Störung der visuell-räumlichen Funktionen und Verhaltensveränderungen bezogen auf Halluzination, Affektivität und Apathie in Erscheinung (Emre et al., 2007). Halluzinationen stellen in diesem Fall sogar einen Prädiktor für die Entwicklung einer Demenz dar.

Außerdem haben Aarsland et al. eine höhere Quote an Depression bei Patienten beobachtet, die bereits zusätzlich an einer Demenz erkrankt waren (Aarsland et al., 2001).

1.1.3 Diagnostik der Parkinson Erkrankung

Die Diagnosestellung einer Parkinson Erkrankung basiert auf den klinisch-neurologischen Kriterien der „*United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank*“ (Hughes et al., 1992).

Die Diagnose der Parkinson Erkrankung wird demnach gestellt, wenn eine Bradykinese vorliegt plus mindestens ein weiteres Kardinalsymptom (Ruhetremor und/oder Rigor). Als diagnosestützende Kriterien zählen ein einseitiger Krankheitsbeginn, eine persistierende Seitenbetonung und eine Progredienz der Symptome im Verlauf der Erkrankung. Hinzu kommen Eigenschaften, die mit einer Bradykinese assoziiert sind wie beispielsweise Mikrographie, ein „schlürfendes“ Gangbild, Schwierigkeiten bei motorischen Tätigkeiten (vom Stuhl aufstehen, Marmeladengläser öffnen, eigenständiges Umdrehen im Bett) (Gazewood et al., 2013).

Bis heute konnten keine validen Biomarker gefunden werden, die die Diagnose unterstützen, weshalb sich eine sichere Diagnosestellung vor allem zu Beginn der Erkrankung schwierig gestaltet (Rajput et al., 1991).

Eine unterstützende Möglichkeit bieten bildgebende Verfahren. Während das CT und das MRT hauptsächlich zum differentialdiagnostischen Ausschluss von sekundären Parkinsonformen (bedingt durch vaskuläre, entzündliche oder tumoröse Läsionen) genutzt werden, (Lang and Lozano, 1998) stellen das DaTScan als funktionelle Bildgebung des präsynaptischen dopaminergen Systems sowie der transkranielle Ultraschall wichtige Instrumente zur Diagnoseunterstützung dar.

Durch histologische post-mortem Untersuchungen kann die Diagnose endgültig gesichert werden (Jankovic, 2008).

1.1.3.1 Unterschiedliche Verläufe der Parkinson Erkrankung

Die Parkinson Erkrankung ist eine stetig voranschreitende Erkrankung, die durch eine große phänotypische Variabilität gekennzeichnet ist. Die Unterschiede beziehen sich nicht nur auf die Manifestation motorischer und nicht-motorischer Symptome, sondern auch auf Unterschiede im Voranschreiten der Erkrankung und unterschiedlich frühem oder spätem Erreichen von Meilensteinen der Erkrankung, wie beispielsweise kognitiven Einschränkungen (Chang et al., 2017), (Halliday et al., 2011).

Parkinson-Patienten mit einer überwiegend akinetisch-rigiden Symptomatik zeigen beispielsweise häufiger einen schnelleren klinischen Progress, assoziiert mit erheblichen kognitiven Einschränkungen (Rajput et al., 2009).

Ebenfalls lassen sich geschlechtsspezifische Unterschiede feststellen, die sowohl das Erkrankungsrisiko beeinflussen, als auch den Verlauf der Parkinson Erkrankung (Haaxma et al., 2007). Männer zeigen demnach in Bezug auf kognitive Fähigkeiten eine schlechtere Entwicklung als Frauen.

Man kann davon ausgehen, dass unterschiedlichste Faktoren (Genetik, Geschlecht, Umwelteinflüsse, etc.) den Verlauf der Parkinson Erkrankung beeinflussen. Diese Faktoren werden auch *Modifier* genannt und modifizieren nicht nur das Erkrankungsrisiko, sondern wirken auch auf den Krankheitsverlauf und den Progress der Parkinson Erkrankung ein. So entwickeln manche Patienten sehr früh im Verlauf der Erkrankung kognitive Einschränkungen, wohingegen andere erst in weit fortgeschrittenen Stadien dementielle Entwicklungen zeigen (Jankovic, 2008) (Halliday et al., 2008).

Umso interessanter ist es, mehr über diese Faktoren und *Modifier* zu erfahren, die Einfluss auf den Progress der Parkinson Erkrankung nehmen.

Faktoren, die diese Unterschiede erklären könnten, sind genetische Variationen und entsprechend veränderte Proteinprofile.

Ein Ansatzpunkt für krankheitsmodifizierende genetische Variationen ist das Alters- und Langlebigkeitsgen Klotho. Da das Alter den größten Risikofaktor für

Einleitung

die Parkinson Erkrankung darstellt, könnte Klotho einen entscheidenden Einfluss auf die Progression und die individuellen Verläufe der Erkrankung nehmen.

Das Klotho-Gen ist ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit. Die Auswirkungen und Einflüsse einer pathogenen Mutation (L109R) sowie einer genetischen Risiko-Variante (KL-VS Variante) des Klotho-Gens auf den Phänotyp/Verlauf der Parkinson Erkrankung stehen dabei im Vordergrund.

1.1.3.2 Differentialdiagnosen

Von einer primären Parkinson Erkrankung müssen differentialdiagnostisch atypische Parkinsonsyndrome abgegrenzt werden. Zu diesen gehören unter anderem die Multisystematrophie, die Demenz mit Lewy-Körpern und die Frontotemporale Demenz.

Des Weiteren müssen sekundäre Parkinsonsyndrome unterschieden werden, die vaskuläre, toxische, metabolische, posttraumatische oder infektiöse Ursachen haben.

Auch können bestimmte Medikamente (Dopamin-Antagonisten wie beispielsweise typische Neuroleptika, Metoclopramid, Flunarizin) Parkinson Symptome auslösen, die von einer primären Parkinson Erkrankung abgegrenzt werden müssen (Duerr et al., 2012).

1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Ätiologisch lassen sich die Parkinson Syndrome in Untergruppen unterteilen. Etwa 90% aller Parkinson Erkrankungen treten sporadisch auf und lassen sich nicht auf genetische Ursachen zurückführen (de Lau and Breteler, 2006). Diese Gruppe wird als Idiopathisches Parkinson-Syndrom bezeichnet.

Etwa 10% aller Parkinson Erkrankungen erklären sich durch monogenetische Mutationen. Man geht davon aus, dass diese monogenetischen Gendefekte ursächlich verantwortlich sind.

Von großer Bedeutung ist in diesem Fall eine Unterscheidung zwischen direkten krankheitsauslösenden, pathogenen Mutationen und sogenannten Risikovarianten, die modulierend auf das Erkrankungsrisiko einwirken. Dieser Aspekt wird im folgenden Abschnitt *Genetik* nochmals detailliert aufgegriffen.

Trotz intensiver Forschung sind die genaue Ätiologie und Pathogenese der Neurodegeneration bei der Parkinson Erkrankung nicht ausreichend geklärt. Dabei wird eine multifaktorielle Genese diskutiert; diese inkludiert Alterungsprozesse, Umwelteinflüsse (z.B. Pestizide), neurotoxische Substanzen, lysosomale und mitochondriale Dysfunktionen, oxidativen Stress und Faktoren auf genetischer bzw. epigenetischer Ebene, die die o.g. Dysfunktionen mitverursachen bzw. verstärken (Warner and Schapira, 2003) (Dexter and Jenner, 2013).

Eine entscheidende Rolle beim Untergang der dopaminergen Neurone spielt oxidativer Stress. Ein Überwiegen von oxidativen Enzymen gegenüber antioxidativen Enzymen (SOD2, CAT) hat eine erhöhte ROS Produktion zur Folge (Dias et al., 2013), was zum Untergang von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra führt. Auch mitochondriale Dysfunktionen oder Defekte im Ubiquitin-Proteasom-Pathway sind von großer Bedeutung (Schon and Przedborski, 2011).

Man geht davon aus, dass der Untergang von dopaminergen Neuronen und der daraus resultierende Mangel an Dopamin verantwortlich für die typischen

Einleitung

motorischen Störungen bei Patienten mit einer Parkinson Erkrankung sind (Dexter and Jenner, 2013).

Dies lässt sich durch das Ungleichgewicht der Neurotransmitter zu Gunsten cholinergischer Einflüsse erklären, welches durch den Dopaminmangel entsteht. In der Folge kommt es zu einem Überwiegen des Nucleus subthalamicus, welcher auf Grund seines bewegungshemmenden Einflusses die motorischen Symptome wie die Bradykinese erklärt.

Auf histopathologischer Ebene spielen Lewy-Bodys eine entscheidende Rolle. Sie befinden sich nicht nur in der Substantia nigra, sondern auch im locus coeruleus, dem Nucleus basalis, im Hypothalamus, im cerebralen Kortex, in kranialen Motorneuronen und in zentralen und peripheren Anteilen des zentralen Nervensystems (Parkinson, 2002). Ein intraneuraler Einschluss von α -Synuclein als Hauptbestandteil der Lewy-Bodys und eine abnehmende Anzahl von überlebenden Neuronen wird als grundlegende Histopathologie angesehen (Alexander, 2004).

Diese Pathologie der Lewy-Bodys beginnt zunächst in den anterioren Nuclei olfactorii und im Bereich des unteren Hirnstammes (Kerne des N. glossopharyngeus und N. vagus) (Braak et al., 2003) und steigt dann kranialwärts den Hirnstamm auf, bis sie auch den Locus coeruleus, die Formatio reticularis und die Raphekerne, Frontalhirn und Amygdala einschließt. Man kann davon ausgehen, dass der Befall der diversen extranigralen Anteile ursächlich für das Auftreten der nicht-motorischen Symptome verantwortlich ist, die den typischen Leitsymptomen als Prodromalsymptome vorausgehen (Braak et al., 2004). Der weitere Befall von kortikalen Strukturen und dem Hirnstamm gilt als Ursache für das Auftreten von Demenzen und Halluzinationen im Rahmen einer Parkinson Erkrankung.

Lewy-Bodys beinhalten eine Vielzahl von molekularen Bestandteilen, wobei α -Synuclein den prominentesten Anteil darstellt (Eriksen et al., 2003). Die genauen Funktionen von α -Synuclein sind bisher noch nicht vollständig geklärt (Hardy et al., 2006), allerdings haben Fortin et al. gezeigt, dass α -Synuclein in der Lage ist an Membranen zu binden (Fortin et al., 2004).

Einleitung

Nach neueren Erkenntnissen ist es auch möglich, Defekte im Krümmungsverlauf von Lipiddoppelschichten zu stabilisieren (Nuscher et al., 2004).

1.1.5 Genetik

Wie im Kapitel *Ätiologie und Pathogenese* angedeutet, tritt die Parkinson Erkrankung in den meisten Fällen als eine sporadische Erkrankung auf mit einer unklaren Ätiologie und Pathogenese. Einige Fälle lassen sich jedoch auf Punktmutationen oder Multiplikationen in spezifischen Genen zurückführen (Polymeropoulos et al., 1997). Etwa 10-15% der Patienten mit einem typischen klinischen Bild einer Parkinson Erkrankung haben eine positive Familienanamnese, welche im Vererbungsverlauf den Mendelschen-Regeln folgt (Gasser, 2007).

Nach der Identifizierung von familiären Formen der Parkinson Erkrankung hat der genetische Aspekt an der Erkrankung immer mehr an Bedeutung gewonnen. Vielzahlige Gene sind bisher bekannt, die ursächlich mit einer familiären Parkinson Erkrankung in Verbindung gebracht werden können.

Von diesen monogenetischen Formen müssen genetische Varianten abgegrenzt werden, die zwar nicht als ursächlich für eine Erkrankung gelten, jedoch als Erkrankungsrisiko angesehen werden können (Brockmann and Gasser, 2010). Diese genetischen Varianten werden als sogenannte Suszeptibilitätsgene bezeichnet. Zu diesen zählen auch die SNPs (Single nucleotide polymorphisms), welche im folgenden Abschnitt behandelt werden.

1.1.5.1 Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

Unter SNPs versteht man Einzelnukleotid-Polymorphismen, welche auf einer veränderten Nukleotidbase beruhen (Cargill et al., 1999). Mit einer Häufigkeit von 1 auf 1000 Basenpaaren zählen die SNPs zu den häufigsten Sequenzvarianten und müssen von monogenetischen, ursächlichen Mutationen abgegrenzt werden. Eine Abgrenzung der SNPs von Mutationen ergibt sich außerdem durch die Allelfrequenz. Die Allelfrequenz der SNPs beträgt definitionsgemäß >1%. Weniger häufige Varianten, die zusätzlich meist mit

Einleitung

einem Verlust der Genfunktion einhergehen, werden dementsprechend als Mutationen bezeichnet.

SNPs können sowohl auf codierenden Abschnitten (Exon) lokalisiert sein, als auch auf nicht-codierenden Abschnitten (Intron).

In vielen Fällen befinden sich die SNPs auf nicht-codierenden Bereichen der DNA. Auch diese SNPs sind von großem wissenschaftlichem Interesse, da beispielsweise Promotorregionen Einfluss auf die Genexpression nehmen.

SNPs sind zwar in den meisten Fällen nicht direkt krankheitsauslösend, spielen aber eine entscheidende Rolle im Hinblick auf Krankheitsrisiken oder Krankheitsverläufe.

In Assoziationsstudien (*genome-wide association studies, GWAS*) kann die „genetische Suszeptibilität“, und das damit einhergehende veränderte Krankheitsrisiko verschiedener SNPs beurteilt werden (Karasik and Newman, 2015). In GWAS mit Patientenkollektiven mit Parkinson-Patienten konnten Parkinson Erkrankung spezifische SNPs und Loci identifiziert und mit einem Einfluss auf Entstehung, Entwicklung und Verlauf der Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden (Nalls et al., 2014).

Als Beispiel kann an dieser Stelle das Gen *SNCA* angeführt werden. Eine genetische Mutation in diesem Gen kann als ursächlich für eine familiär vererbte Parkinson Erkrankung angesehen werden. Ebenfalls erhöhen SNPs im Gen *SNCA* als Suszeptibilitätsgen das Risiko an einer sporadischen Parkinson Erkrankung zu erkranken.

1.2 Klotho

1.2.1 Allgemein

Das Klotho-Gen wurde 1997 erstmals entdeckt und nach der Schicksalsgöttin benannt, die in der griechischen Mythologie den Lebensfaden weiter spinnt (Kuro-o et al., 1997). Als „alters-supprimierendes Gen“ steht vor allem der das Alter beeinflussende Faktor im Vordergrund. Mäuse mit einer *loss of function* Mutation zeigen früher Alterungssymptome wie Muskel- und Hautatrophien, Osteoporose, Arteriosklerose, pulmonale Emphyseme und neuronale Degenerationen (Kuro-o et al., 1997).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des entsprechenden Gens den Alterungsprozess verlangsamt und eine lebensverlängernde Wirkung zeigt (Kurosuo et al., 2005).

Dazu passend beschreiben Yamazaki et al. eine Abnahme der Klotho-Konzentration im Serum gesunder Individuen mit zunehmendem Alter. Ab dem 40. Lebensjahr konnte in dieser Studie ein deutlicher Abfall der Konzentration festgestellt werden (Yamazaki et al., 2010).

Das Klotho-Gen als Altersgen ist somit sehr interessant für die Parkinsonforschung, da das Alter als entscheidender Risikofaktor für eine Parkinson Erkrankung angesehen werden kann.

Das humane Klotho-Gen befindet sich auf Chromosom 13q12, setzt sich aus fünf Exonen zusammen und umfasst eine Größe von über 50kb (Matsumura et al., 1998). Neben dem menschlichen Genom, konnte das Klotho-Gen auch in Mäusen, Ratten, dem Zebrafisch und im Genom des Fadenwurms nachgewiesen werden (Wang and Sun, 2009). Auffallend ist dabei, dass das Gen in den verschiedenen Spezies nahezu homolog ist. Insbesondere die α -Klotho Proteinsequenz bei Mäusen ist zu 98% deckungsgleich mit der humanen Form (Matsumura et al., 1998).

1.2.2 Funktion

Das Klotho-Protein ist ein 130 kDa großes *singel-pass transmembrane protein* mit einer kurzen cytoplasmatischen Domäne. Es existiert damit sowohl als transmembrane Form, als auch als sekretierte Form. Besonders hohe Expressionen des Proteins finden sich in der Niere (Kurosu et al., 2006) und dem Gehirn (Abraham et al., 2012). Allerdings findet man Klotho auch in vielen weiteren Geweben wie in den Ovarien, der Plazenta, in den Hoden, im Skelettmuskel, in der Blase und im Colon (Kuro-o et al., 1997), in epithelialen Zellen der Brust (Wolf et al., 2008), im Innenohr (Kamemori et al., 2002) und in hormonell wirkenden Geweben (Hypophyse und Nebenschilddrüsen) (Ben-Dov et al., 2007).

Die sekretierte Komponente des Proteins wird durch *ADAM17* (Richter et al., 2016) freigesetzt und zirkuliert als hormonähnliche Substanz im Blut (Kurosu et al., 2005).

Die transmembrane Form bildet Komplexe mit mehreren *fibroblast growth factor* (FGF) Rezeptoren und fungiert als obligatorischer Co-Rezeptor für FGF23. Klotho erhöht dabei die Bindungsfähigkeit von FGF23 an den entsprechenden Rezeptor und hilft damit bei der Interaktion mit der Zelloberfläche (Urakawa et al., 2006). Über mehrere Feedback-Schleifen greift Klotho somit zusammen mit FGFs in die Regulation des Phosphat-, Calcium- und Vitamin D Metabolismus ein (Kuro-o, 2009). Die meisten Studien fokussieren sich genau auf diesen Aspekt, wobei der Komplex aus Klotho und FGF23 zusammen die 1-alpha-Hydroxylase inhibiert. Dadurch kann weniger von der Vorstufe des Vitamin D in 1,25-dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (Calcitriol) umgewandelt werden. Ein Mangel an Klotho führt folglich zu höheren Calcitriol-Spiegeln und einer Anreicherung von Calcium-Phosphat-Komplexen, welche zu Ablagerungen führen und damit arteriosklerotische Veränderungen zur Folge haben können (Leibrock et al., 2016). In Abbildung 2 ist der beschriebene Mechanismus graphisch dargestellt.

Einleitung

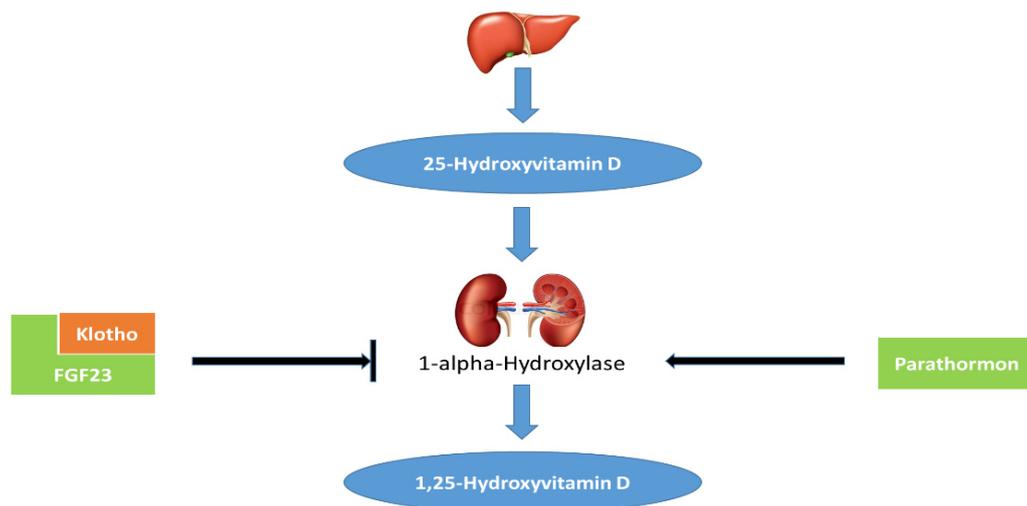


Abbildung 2: Vitamin D Pathway. In den Kreisen sind jeweils die Produkte des Vitamin D Pathway dargestellt. Auf der linken Seite ist der hemmende Komplex aus Klotho und FGF23 abgebildet.

Daran anknüpfend konnten Kosakai et al. in ihrer Studie mit Klotho defizienten Mäusen feststellen, dass eine Vitamin D Restriktion die Degeneration von Neuronen abschwächen kann (Kosakai et al., 2011). Im Gegensatz dazu berichten andere Studien über einen positiven Effekt von hohen Vitamin D Konzentrationen bei Patienten mit einer Alzheimer Erkrankung (Littlejohns et al., 2014) und einer Parkinson Erkrankung (Vinh Quoc Luong and Thi Hoang Nguyen, 2012).

Eine weitere entscheidende Rolle nimmt Klotho bei der Metabolisierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ein, was ebenfalls im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert wird (Dias et al., 2013). Der Komplex aus Klotho und FGF23 führt zu einer höheren Expression von SOD2 und CAT über FOXO3a, was eine Entgiftung von ROS bewirkt. Auf der anderen Seite wird ebenfalls die NADPH Oxidase aktiviert, die ihrerseits zur ROS-Produktion beiträgt. Unter physiologischen Bedingungen herrscht eine Balance der beiden Wege. Kommt es allerdings zu einem Klotho-Defizit, so verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Seite der ROS-Produktion, was zu einer Überproduktion führt (Richter et al., 2016).

Einleitung

In transgenen Mäusen mit überexprimiertem Klotho konnte gezeigt werden, dass diese eine höhere Expression von SOD2 im Muskel aufweisen und weniger phosphoryliertes FOXO, was mit reduziertem oxidativem Stress assoziiert werden kann (Yamamoto et al., 2005).

Darüber hinaus ist Klotho an der NO-Produktion beteiligt, reduziert damit die Vasokonstriktion und wirkt fördernd auf die Angiogenese (Fukino et al., 2002). Außerdem kann eine erhöhte Transkription der NMDA Untereinheit GluN2B beobachtet werden, was bessere kognitive Fähigkeiten erklärt (Saito et al., 1998) (Shimada et al., 2004). Zudem werden Glycosidase-Funktionen des Klotho-Proteins diskutiert, die AGEs (advanced glycosidation ends) reduzieren.

1.2.3 Mutation L109R

Neben der häufigen Klotho KL-VS Variante wird in dieser Arbeit außerdem eine seltene Mutation des Klotho-Gens untersucht. Die Mutation L109R befindet sich in Exon 1 auf dem Klotho-Gen.

Mit einer *Minor allele frequency* von 0,0089 handelt es sich um eine sehr seltene Mutation (Auton et al., 2015). In der Gesamtbevölkerung geht man von etwa 1%-2% Mutationsträgern aus, allerdings findet man nur sehr wenig Literatur und genaue Angaben zur Mutation, was eine genaue Beurteilung erschwert.

Die Mutation in dem Langlebigkeits-Gen Klotho könnte jedoch eine wichtige Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen spielen. Sollte eine Häufung von Mutationsträgern in großen Kohorten von Parkinson-Patienten und Parkinson-Familien im Vergleich zu gesunden Individuen festgestellt werden können, läge die Vermutung nahe, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Mutation L109R und der Entstehung der Parkinson Erkrankung besteht.

In diesem Fall würde das Klotho-Gen die Rolle eines „*disease causing Gens*“ einnehmen.

1.2.4 KL-VS Variante (F352V)

Die in dieser Arbeit untersuchte Klotho KL-VS Variante (F352V) ist durch sechs SNPs charakterisiert, die sich alle in Exon 2 und angrenzenden Sequenzen befinden. Der untersuchte SNP rs9527024 bzw. SNP rs9536314 der KL-VS Variante führt zu einem Aminosäureaustausch und beeinflusst dementsprechend den Klotho-Metabolismus.

Diese Variante tritt zu 25% heterozygot auf und zu ca. 2% homozygot (Arking et al., 2002).

Über die genaue Beeinflussung des Klotho-Metabolismus durch die Variante gibt es unterschiedliche Meinungen. In der Literatur finden sich oft kontroverse und widersprüchliche Ergebnisse. In Bezug auf kognitive Auswirkungen ist beispielsweise nicht abschließend geklärt, ob es sich um einen protektiven Effekt handelt oder ob kognitiver Abbau durch die Variante begünstigt wird.

Während de Vries et al. in ihren Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen heterozygoten Individuen und langsamerem kognitiven Abbau feststellen konnten (de Vries et al., 2017), beschreiben Mengel-From et al. gegensätzliche Tendenzen. In ihren Untersuchungen an einer dänischen Kohorte mit gesunden Individuen zwischen 92 und 100 Jahren, zeigten Heterozygote schlechtere kognitive Fähigkeiten als ‚non-carrier‘. Die Kohorte der homozygoten Individuen zeigte allerdings die höchsten kognitiven Fähigkeiten (Mengel-From et al., 2015). De Vries et al. untersuchten die Aberdeen Birth Cohorte von 1936 und schlossen homozygote Mutationsträger auf Grund deren geringen Anzahl aus der Analyse aus.

Weitere Veröffentlichungen diskutieren ähnliche Tendenzen, wobei Träger der Variante mit besserer Kognition in Zusammenhang gebracht werden können (Dubal et al., 2014).

Des Weiteren werden in der Literatur Zusammenhänge zwischen der KL-VS Variante und Blutdruckregulationen (Nzietchueng et al., 2011), arteriosklerotischen Veränderungen (Arking et al., 2003) oder auch Einflüsse auf den Cholesterinstoffwechsel diskutiert.

Einleitung

Daraus ergeben sich veränderte Risiken für kardiovaskuläre Erkrankungen und für das Auftreten eines Schlaganfalles (Arking et al., 2005) (Luce et al., 2015). In dieser kurzen Zusammenstellung der aktuellen Literatur ist ersichtlich, wie kontrovers und zugleich von welcher großer Bedeutung sowohl das Klotho-Gen selbst als auch die beschriebene KL-VS Variante sind.

1.3 Ziel der Studie und Fragestellung

Klotho als Altersgen ist für die Parkinsonforschung von großem Interesse, da das Alter den wichtigsten Faktor für eine Parkinson Erkrankung darstellt. In der folgenden Arbeit wurde sowohl die seltene Mutation L109R des Klotho-Gens näher betrachtet, als auch die häufige KL-VS Variante des Klotho-Gens.

Folgende Leitfragen wurden dabei bearbeitet:

1. Nimmt das Altersgen Klotho direkten Einfluss auf die Entstehung einer Parkinson Erkrankung und kann somit als krankheitsauslösendes Gen für die Parkinson Erkrankung angesehen werden?
2. Haben genetische Varianten im Klotho-Gen als *Modifier* Auswirkungen auf den Verlauf der Erkrankung oder das Erkrankungsrisiko einer Parkinson Erkrankung?
3. Lassen sich Proteinprodukte von Klotho selbst oder/und Kofaktoren als Proteinprofile im Liquor abbilden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
BigDye® Terminator, v3.1, 5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems, Woolston Warrington
Desoxynucleotidtriphosphate (dNTP)	Thermo Scientific, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co., USA
Betaine (B0300 – 5VL)	Sigma-Aldrich Co., USA
Ethanol (100%)	Merck KGaA, Deutschland
Gene Rule DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
MidoriGreen Advance DNA Stain	NIPPON Genetic EUROPE GmbH, Deutschland
MgCl ₂	Promega Madison, WI, USA
Natrium Acetat (3M)	Merck KGaA, Deutschland
goTaqR DNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems, Woolston Warrington
destilliertes Wasser	Merck KGaA, Deutschland

2.1.2 Im Labor angesetzte Puffer

10x TBE Puffer:	TrisBase	108g
	Borsäure	55g
	EDTA (0,5M; pH 8)	40ml

Mit doppelt destilliertem Wasser (H₂O_{dd}) wird der Ansatz auf 1 Liter aufgefüllt.
Für die Gelelektrophorese wird 10x TBE 1:20 mit Aqua dest. verdünnt.

2.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Die passenden Oligonukleotide für die Amplifikation der entsprechenden Sequenz wurden mit Hilfe der Website *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) erstellt. Dabei wurden, wie in der untenstehenden Tabelle aufgelistet, für die Etablierungs-PCR und die Sequenzier-PCR jeweils zwei verschiedene Primer verwendet.

Die Synthese der gewünschten Primer erfolgte durch die Firma Metabion GmbH.

	Nukleotidsequenz (5'→3')	Fragmentlänge
Etablierungs-PCR	forward CCGCCTACCAGACCGAGG	804 bp
	reverse AGAAATCCCTTAGTGGGCACA	
Sequenzier-PCR	forward ATACGTTACCCACCACCC	185 bp
	reverse ACTACCGCTTCTCCATCTCG	

Tabelle 1: Nukleotidsequenzen der Primer. Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der Primer für die Etablierungs-PCR und die Sequenzier-PCR.

2.1.4 Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

8er Tube Cap Strip	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
96-well PCR Platte	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
96-well Sequenzer-Matte	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
96-well Sequenzer-Platte	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Einfachpipette (2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Entsorgungsbeutel, autoklav.	Brand GmbH und Co KG, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Erlenmeyerkolben (500ml)	Schott AG, Deutschland
Falkonständer	Nalgene®
Frischhaltefolie	Fipp Handelsmarken, Hamburg, Deutschland
Magnetrührstäbchen	neolab®
Markierstift, permanent	Faber-Castell, Stein, Deutschland
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Messzylinder (100 und 250ml)	Brand GmbH und Co KG, Deutschland
Multipipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Parafilm®M	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Plexiglaskämme (20 well)	peqlab Biotechnologie GmbH
Skalpell	Aeskulap AG, Deutschland

2.1.5 Geräte

Eismaschine	Ziegra GmbH, Isernhagen, Deutschland
Feinwaage Explorer®	OHAUS Corporation, NJ, USA
Gelelektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Tief-Kühlschrank MF280, (-20 °C)	Dometic, B Medical Systems, Luxemburg
Kühlschrank ML402, (6°C)	Dometic, B Medical Systems, Luxemburg
Kühlschrank	Bosch GmbH, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Deutschland
Magnetrührgerät MR3000	Heidolph Instruments GmbH, Deutschland
Mikrowelle	Sharp K.K., Osaka, Japan
Spannungsquelle E835 (300V-500mA)	Consort, Turnhout, Belgien
Stoppuhr	Oregon Scientific, USA
Taschenrechner HL-820VER	CASIO, Shibuya, TKY, Japan
Thermocycler T100	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
UV-Tisch	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Vortexer (Vortex-Genie®)	Scientific Industries, Inc. , USA
Zentrifuge 5800R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Spectrafuge™ mini	Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA

2.1.6 Software

FinchTV	
Gene Mapper	Applied Biosystems Woolston Warrington
Sequencing Analysis	Applied Biosystems Woolston Warrington
Bio Capt (Geldokumentation)	Vilber Lourmat
SPSS®	IBM®, USA
PLINK	Autor: Shaun Purcell (Purcell et al., 2007)

2.1.7 Patientenkollektiv

2.1.7.1 Mutation L109R

Alle 370 in dieser Studie sequenzierten Patienten wurden zwischen 2001 und 2018 rekrutiert und untersucht. Die Untersuchung erfolgte entweder während eines stationären Aufenthaltes oder in der Parkinson-Ambulanz der Universitätsklinik in Tübingen (Kapitel 2.1.8). Einige der Patienten sind Teilnehmer von prospektiven longitudinalen Beobachtungsstudien der Abteilung für Neurodegeneration in Tübingen (Brockmann et al., 2011a) (Maetzler et al., 2015) (Brockmann et al., 2011b).

Von den 370 sequenzierten Parkinson-Patienten haben 262 Patienten eine vollständige 2 Jahresverlaufsuntersuchung, 156 eine 4-jährige, 74 eine 6-jährige, 34 eine 8-jährige, 21 eine 10-jährige und 9 Patienten 12-Jahresverlaufsuntersuchung.

Bei 103 der sequenzierten Patienten konnte auf Daten bezüglich der Konzentrationen von Klotho, und Vitamin D Metaboliten im Liquor zurückgegriffen werden. Angaben über Konzentrationen von FGF23 im Liquor lagen bei 99 Patienten vor.

2.1.7.2 KL-VS Variante

Tübinger Kohorte 1:

Die erste Kohorte umfasst ein Patientenkollektiv von 459 Patienten, die alle an Parkinson erkrankt sind. Die Patienten wurden alle zwischen 2001 und 2018 rekrutiert und untersucht. Die entsprechenden longitudinalen klinischen Daten stammen ebenfalls aus der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums in Tübingen. Es erfolgte eine Genotypisierung des SNP rs9527024 (KL-VS Variante) im Klotho-Gen mit Hilfe des NeuroChip DNA Arrays.

Material und Methoden

Aus der Kohorte wurden 2 homozygote Mutationsträger aufgrund der kleinen Fallzahl für die weitere Analyse ausgeschlossen.

Von den 459 Parkinson-Patienten haben 283 eine vollständige 2 Jahresverlaufsuntersuchung, 238 eine 4-jährige, 187 eine 6-jährige, 106 eine 8-jährige und 32 eine 10-Jahresverlaufsuntersuchung.

Tübinger Kohorte 2:

Die zweite Kohorte setzt sich aus 125 Parkinson-Patienten und 50 gesunden Kontrollen ohne Anzeichen auf neurodegenerative Erkrankungen zusammen. Neben genetischen Daten wurden sowohl bei den gesunden Kontrollen als auch bei den 125 Parkinson-Patienten, Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D Metaboliten im Liquor bestimmt.

PPMI-Kohorte:

Neben den beiden Tübinger Kohorten 1 und 2, die sich aus Parkinson-Patienten aus Tübingen zusammensetzen, wurde die internationale PPMI Kohorte (Parkinson's Progression Markers Initiative) als Validierungskohorte hinzugenommen. Die genetischen und klinischen Daten stammen aus der PPMI-Datenbank (www.ppmi-info.org/data).

Die multizentrische, longitudinale PPMI-Kohorte setzt sich aus 297 Parkinson-Patienten mit den entsprechenden Genotypen der KL-VS Variante des Klotho-Gens und den klinischen Längsschnittdaten zusammen. Die Beurteilung des SNP rs9536314 (KL-VS Variante) im Klotho-Gen erfolgte unter Verwendung des NeuroX-Arrays.

2.1.8 Klinische Untersuchung

Alle sequenzierten Patienten (Mutation L109R) und alle Patienten der Tübinger Kohorte 1 und 2 (KL-VS Variante) wurden von einem Arzt für Bewegungsstörungen untersucht und die Diagnose der Parkinson Erkrankung entsprechend der *UK Brain Bank criteria* gestellt (Hughes et al., 1992).

Neben den folgenden demographischen und klinischen Daten wie Alter, Geschlecht, Erkrankungsalter und Krankheitsdauer wurden weitere Daten zur genauen Beurteilung der Krankheitsausprägung bzw. des Verlaufes erhoben.

Zur Beurteilung der Ausprägung der motorischen Komponente wurde der Part III der *Unified Parkinson's disease Rating Scale* (UPDRS III) herangezogen: von 2000-2008 die alte Version und seit 2009 der *MDS-UPDRS* (Goetz et al., 2008).

Das Krankheitsstadium wurde durch die *Hoehn und Yahr Skala* (HYS) kategorisiert (Goetz et al., 2004) und die kognitiven Fähigkeiten wurden entweder mit dem MoCA (Nasreddine et al., 2005) und / oder der MMST (Folstein et al., 1975) getestet. Für die Patienten, welche lediglich einen MMST absolviert hatten, wurden die Werte in die entsprechend äquivalenten MoCA-Werte umgerechnet (van Steenoven et al., 2014).

In der vorliegenden Studie sind kognitive Einschränkungen durch einen MoCA Cut-off ≤ 25 definiert (Punkt der besten Sensitivität und Spezifität) (Hoops et al., 2009).

Um Stimmungsschwankungen beurteilen zu können, wurde Becks' Depression Inventory (BDI) (Beck, 1996) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Statistik

Für die Statistik wurde die Software IBM® SPSS® 22.0 für Windows verwendet (Inc, Chicago, IL, USA).

2.2.1.1 Mutation L109R

Die statistische Auswertung der seltenen Mutation L109R erfolgte auf Grund der geringen Fallzahlen ausschließlich unter deskriptiven Gesichtspunkten.

Die Referenzwerte zur Beurteilung der Prävalenz dieser Mutation in der gesamten Bevölkerung, wurde der *genom aggregation database* entnommen (<https://gnomad.broadinstitute.org>). Die Mutation L109R hat die rs-Nummer rs35239775.

2.2.1.2 KL-VS Variante

Tübinger Kohorte 1 und PPMI-Kohorte: Genetische Varianten im Klotho-Gen

1. Für einen Vergleich der Gruppen mit den unterschiedlichen Genotypen GG oder GA hinsichtlich demographischer und klinischer Charakteristiken wurde eine univariante Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt.
2. Kaplan Meier Überlebenskurven und *Cox proportional hazard models*, aufgeteilt nach dem Genotyp, stellen den Zeitraum bis zum Beginn kognitiver Einschränkungen dar. Kognitive Einschränkungen wurde in diesem Fall mit einem MoCA-Wert ≤ 25 definiert.

Material und Methoden

Das Risiko für die Entwicklung kognitiver Einschränkungen wurde mit Hilfe *Cox proportional hazard models* berechnet, um die Hazard Ratio (HR) mit einem Konfidenzintervall von 95% und p-Werte für paarweise Vergleiche abschätzen zu können.

Tübinger Kohorte 2: Klotho-Genotyp und Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D Metaboliten im Liquor

1. Der Gruppenvergleich hinsichtlich unterschiedlicher Konzentrationen im Liquor zwischen Kontrollen und Parkinson-Patienten erfolgte durch eine univariante Varianzanalyse mit dem Alter und dem Geschlecht als Variablen (ANCOVA).
2. Korrelationen und Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen Konzentrationen und klinischen Charakteristiken wurden mit Hilfe der *Pearson Korrelation* untersucht.

2.2.2 Theorie der Standardmethoden zur Analyse der Mutation L109R

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction oder kurz PCR) ist eine molekularbiologische Methode, um spezifische DNA-Abschnitte in vitro zu amplifizieren. Das Verfahren besteht aus drei aufeinanderfolgenden Schritten: Zu Beginn erfolgt eine Auftrennung des Doppelstrangs (Denaturierung), anschließend kommt es zur Anlagerung der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz (Annealing) und im letzten Schritt erfolgt die DNA-Synthese (Elongation). Diese drei Schritte werden als Amplifikationszyklus bezeichnet.

Um die DNA im ersten Schritt denaturieren zu können, muss diese auf 95°C erhitzt werden. Durch die hohe Temperatur werden die Matrizenstränge getrennt. Anschließend lagern sich Primer an die entsprechend komplementären Einzelstränge an. Dabei ist die optimale Temperatur für den Annealing-Prozess abhängig von der Länge und Struktur des jeweiligen Primers und variiert zwischen 40°C und 70°C.

Primer sind Oligonukleotide, welche aus circa 15-30 Nukleotiden bestehen und der DNA-Polymerase als Startpunkt für die Elongation dienen. Dies wird durch eine Hybridisierung der Primer mit dem jeweils komplementären Template ermöglicht.

Im letzten Schritt erfolgt eine Verlängerung der Primer und damit die Synthese eines neuen Matrizenstranges durch die hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase). Das Temperaturoptimum, bei welchem die DNA-Polymerase am effektivsten arbeiten kann, liegt bei etwa 72°C. Die Synthese kann dabei jeweils nur von 5'- in 3'- Richtung erfolgen, da die DNA-Polymerase das freie 3'OH-Ende braucht, um weitere Nukleotide anlagern zu können. Zusätzlich benötigen die meisten DNA-Polymerasen Magnesiumchlorid als Kofaktor.

Durch ständiges Wiederholen der oben beschriebenen drei Schritte kann das PCR-Produkt unter optimalen Umständen exponentiell amplifiziert werden, da

neben den Ausgangs-DNA-Strängen auch die bereits synthetisierten DNA-Sequenzen der Polymerase als Template dienen können.

Die Wiederholungen des Amplifikationszyklus sind allerdings normalerweise auf 25-40 Zyklen begrenzt, da mit zunehmenden Wiederholungen mit einer Reduktion der Stranglänge gerechnet werden muss.

Neben den zu amplifizierenden DNA-Proben wird eine weitere Probe mit H₂O als Negativprobe mitgeführt, um Verunreinigungen feststellen zu können. Verunreinigungen und Kontaminationen stellen eine der Hauptfehlerquellen der PCR dar. Dabei können sowohl kontaminierte Pipettenspitzen, unsauberes Arbeiten, oder das Zuführen von Fremd-DNA, die nicht zum entsprechenden Ansatz gehört, an der Entstehung von Verunreinigungen beteiligt sein.

2.2.2.2 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um ein Verfahren, welches zum Auftrennen von Makromolekülen (Proteine, DNA, RNA, etc.) genutzt wird. Dies geschieht mit Hilfe eines Agarosegels, das als Trägermedium dient und einem elektrischen Feld. Die Auftrennung ist dabei abhängig von der Struktur der aufzutrennenden Moleküle, deren Ladungsverhältnissen, der Porengröße und Viskosität des Trägermediums und der angelegten Feldstärke.

Da die DNA auf Grund von Phosphatresten negativ geladen ist, wandert sie durch das Gel von der Kathode in Richtung der Anode.

Das Agarosegel ist durch die dreidimensionale Struktur der Polysaccharid-Ketten in der Lage Poren zu bilden, die letztendlich die Funktion des Agarosegels als Sieb gewährleisten. Lange DNA-Stücke wandern langsamer, wohingegen kurze DNA-Fragmente schneller durch das Gel wandern können. Aus diesem Grund kommt es zu der gewünschten Auftrennung der DNA.

Zu Beginn müssen die vorgefertigten Gelkammern („Taschen“) mit den jeweiligen Proben befüllt werden. Anschließend wird eine Feldspannung

angelegt, die je nach Größe des Gels und der Apparaturen zwischen 150-200 V variiert.

Dem Gel wird zusätzlich bei der Herstellung ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt (Midori Green), welcher sich an die DNA anlagert. Somit können die entstandenen Banden unter UV-Licht visualisiert werden.

Die Gelelektrophorese ermöglicht es, die im vorherigen Verfahren entstandenen Amplifikationsprodukte auf ausreichende Menge, Spezifität des PCR-Produkts und Verunreinigungen hin untersuchen zu können. Verunreinigungen können mit Hilfe der aufgetragenen Negativprobe beurteilt werden.

2.2.2.3 Sanger-Sequenzierung

Bei der Sequenzierung nach Sanger handelt es sich um eine Methode, welche es ermöglicht, DNA-Abschnitte zu sequenzieren und damit deren Basenabfolge zu bestimmen.

Zunächst synthetisiert die Polymerase wie bei der PCR vom 3'-Ende eines Primers aus einen komplementären Strang. Als Matrizenstränge dienen die im Voraus synthetisierten Amplifikationsprodukte der PCR. Anders als bei der PCR wird bei der Sequenzierung jedem Ansatz nur ein Primer zugeführt, so dass die Sequenzierreaktion in zwei getrennten Ansätzen durchgeführt werden muss, nämlich eine für die Sequenz des Sense-Stranges und eine für die des Antisense-Stranges.

Folglich verläuft die Amplifikation dadurch nicht exponentiell, sondern linear.

Neben den entsprechenden Primern und den 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) finden sich im Reaktionsansatz 2', 3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) ddCTP, ddGTP, ddATP, ddTTP in kleineren Mengen. Diese ddNTPs sind mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert und lassen sich dadurch farblich unterscheiden. Da ddNTPs über keine 3' OH-Gruppe verfügen, die notwendig für die Bindung (Diesterbrücke) weiterer Nukleotide ist, kommt es

Material und Methoden

immer dann zum Strangabbruch, wenn ein ddNTP anstelle eines dNTPs in den entstehenden komplementären Strang eingebaut wird.

Dementsprechend entstehen unterschiedlich lange Fragmente, da die Synthese des komplementären Strangs immer an verschiedenen Stellen des Synthetisierungsprozesses durch den Einbau eines ddNTPs abgebrochen wird.

Dabei ist immer die letzte Base am 3'-Ende durch den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff erkennbar. Da basenspezifische Fluoreszenzstoffe verwendet werden, kann die Sequenzierung in einem Reaktionsansatz erfolgen und muss nicht in verschiedenen Ansätzen getrennt ausgewertet werden.

Die Ermittlung der Nukleotidsequenz erfolgt mit Hilfe des laseroptischen Systems eines Kapillarsequenzierers.

2.2.3 Durchführung der Standardmethoden zur Analyse der Mutation L109R

2.2.3.1 Verdünnung der DNA

Die vorhandene DNA muss im ersten Schritt entsprechend folgender Formel verdünnt werden:

$$\frac{\text{Endkonzentration} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) * \text{Endvolumen} (\mu\text{l})}{\text{Ausgangskonzentration} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right)} = \text{Menge an DNA} (\mu\text{l})$$

Daraus ergibt sich entsprechend folgender Subtraktion das benötigte Volumen an destilliertem Wasser für die Verdünnung:

$$\text{Endvolumen} (\mu\text{l}) - \text{Menge an DNA} (\mu\text{l}) = \text{Menge an Wasser} (\mu\text{l})$$

Als Endkonzentration wurde in diesem Fall eine 1:10 Verdünnung gewählt.

2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Sequenzierung und Untersuchung der Patienten-DNA-Proben auf das Vorhandensein der Mutation L109R im Klotho-Gen erfolgte eine PCR der entsprechenden DNA-Abschnitte zur Amplifikation. Spezifisch für den nötigen DNA-Abschnittes wurden mit Hilfe der Website *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) passende Primer erstellt. Diese ermöglichen eine Amplifikation der gesuchten DNA-Sequenz, in der sich die Mutation (sofern vorhanden) befindet. Für die Primer wurde eine Verdünnung von 10 μM gewählt.

Zunächst wurden acht Ansätze mit variierten Zusammensetzungen getestet, um anschließend mit Hilfe von Test-DNA und Auswertung mittels

Material und Methoden

Gelelektrophorese den idealen Mastermix für die entsprechenden Primer zu ermitteln.

Puffer (5X)	2,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,2 µl
Primer-F (10 µM)	0,2 µl
Primer-R (10 µM)	0,2 µl
Polymerase (5U/µl)	0,05 µl

Tabelle 2: Mastermix-Ansatz

Folgende Tabelle zeigt die acht verschiedenen Ansätze, die jeweils dem Mastermix-Ansatz zugefügt wurden, um die optimale Zusammensetzung ermitteln zu können.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
MgCl ₂ (25M)	1,2 µl	1,2 µl	/	/	/	1,2 µl	/	1,2 µl
H ₂ O	2,95 µl	3,45 µl	5,35 µl	4,15 µl	4,65 µl	4,15 µl	3,45 µl	2,25 µl
Betaine (5M)	1,2 µl	/	/	1,2 µl	/	/	1,2 µl	1,2 µl
DMSO	/	0,7 µl	/	/	0,7 µl	/	0,7 µl	0,7 µl

Tabelle 3: Darstellung verschiedener Ansätze. In der Tabelle sind die unterschiedlichen Ansätze und deren Zusammensetzung aufgelistet, die dem Mastermix jeweils zugefügt werden.

Es werden je 8 µl des entsprechenden Mastermixes und 2 µl DNA (10ng/µl) in jedes Well gegeben, womit sich eine Gesamtmenge von 10 µl für jeden Ansatz bzw. jedes Well ergibt.

Nach anschließender Überprüfung der Gelelektrophorese, konnte Ansatz 1 als optimalster unter den gegebenen Umständen (Primer, etc.) ausgewählt werden. Mit den folgenden Patienten-DNA-Proben wurde dementsprechend ausschließlich der Mastermix des Ansatzes 1 verwendet.

Material und Methoden

Alle Reagenzien wurden vor dem Pipettieren, mit Ausnahme der Polymerase, gevortext. Außerdem wurden sowohl die Ansätze, als auch die Reagenzien während des Pipettierens auf Eis gehalten.

Für jede Platte wurde eine Negativprobe wie oben bereits beschrieben mit 2 µl H₂O anstelle der 2 µl DNA eingesetzt, da Kontaminationen eine der Hauptfehlerquellen der PCR darstellen. Dadurch können im folgenden Schritt, der Gelelektrophorese, Verunreinigungen entdeckt und die Ansätze im Falle einer Kontamination verworfen werden.

In Abbildung 3 und Tabelle 4 ist das Temperaturprofil des Thermocyclers tabellarisch und graphisch dargestellt.

Um eine erfolgreiche Anlagerung der Primer gewährleisten zu können wurde in diesem Fall eine sogenannte „touch-down PCR“ verwendet. Wie in der untenstehenden Tabelle ersichtlich wird pro Wiederholungszyklus (Schritt 2 - 4) die Temperatur in step 3 um 0,5°C herabgesetzt. Somit kann ein breites Temperaturgefälle erzielt werden und eine optimale Anlagerung der Primer gewährleistet werden.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	3 min
2	95°C	30 s
3	64°C	30 s
-0,5°C in jedem Wiederholungszyklus		
4	72°C	30 s
5	go to Schritt 2 (19 mal)	
6	95°C	30 s
7	55°C	30 s
8	72°C	30 s
9	go to Schritt 6 (25 mal)	
10	72°C	7 min
11	12°C	∞

Tabelle 4: Temperaturprofil der "touch-down PCR". Dargestellt ist der Temperaturverlauf der verwendeten PCR.

Anschließend wurden die PCR-Produkte bis zur weiteren Verarbeitung in den folgenden Schritten bei 4°C gekühlt gelagert.

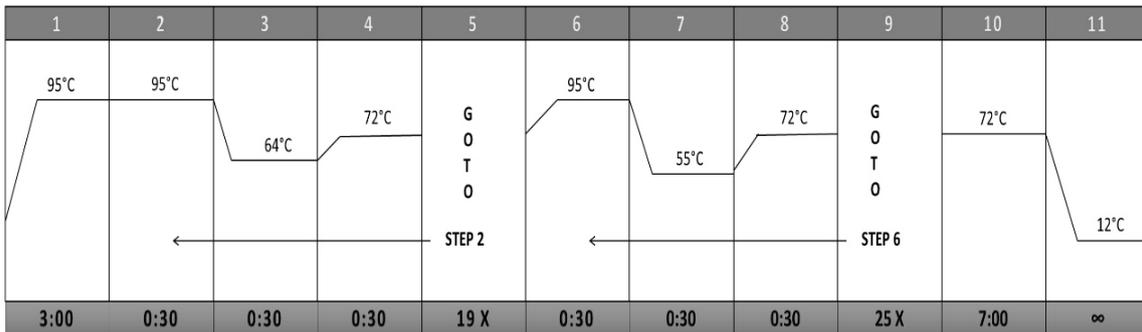


Abbildung 3: Temperaturprofil der "touch-down PCR". Die Abbildung zeigt das Temperaturprofil des Thermocyclers in graphischer Form.

2.2.3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in diesem Fall durchgeführt, um überprüfen zu können, ob eine ausreichende Amplifikation der DNA-Abschnitte stattgefunden hat und ob die PCR-Produkte in der erwarteten Größenordnung liegen. Außerdem lässt die mitgeführte Negativprobe, wie bereits erläutert, Rückschlüsse auf vorhandene Verunreinigungen zu.

Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels werden 5g Agarose abgewogen und 250ml TBE-Puffer hinzugegeben. Unter wiederholtem Erwärmen in der Mikrowelle und Schwenken des Gemisches, entsteht eine klare Flüssigkeit ohne Bläschen- oder Schlierenbildung. Unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührgerät kühlt das Gel ab und es werden 13 µl Midori Green hinzugegeben. Midori Green stellt eine Alternative zum krebserregenden Ethidiumbromid dar und dient ebenfalls der Sichtbarmachung der DNA im Agarosegel unter UV-Licht.

Das noch flüssige Gemisch kann in Plexiglas-Gelkammern mit Gelkämmen gegossen werden. Die Gelkämme ermöglichen die Ausbildung der notwendigen Geltaschen. Sie sind unterschiedlich groß, wodurch das Volumen der

Material und Methoden

Geltaschen variiert werden kann. Nach etwa 30 Minuten ist das Gel vollständig auspolymerisiert und die Gelkämme können entfernt werden.

Abschließend wird das Gel in eine Elektrophorese-Apparatur gelegt und mit TBE-Puffer bedeckt. Dabei befinden sich die Geltaschen auf der Seite der negativen Elektrode, damit eine „Wanderung“ der Banden in Richtung der Kathode erfolgen kann.

In die erste Tasche wird Gene Ruler DNA Ladder pipettiert, der als Längenmarker für die aufgetrennten DNA-Sequenzen dient. In die übrigen Taschen werden willkürlich ausgewählte PCR-Produkte pipettiert und in eine letzte Tasche die vorher angefertigte Negativprobe.

Material und Methoden

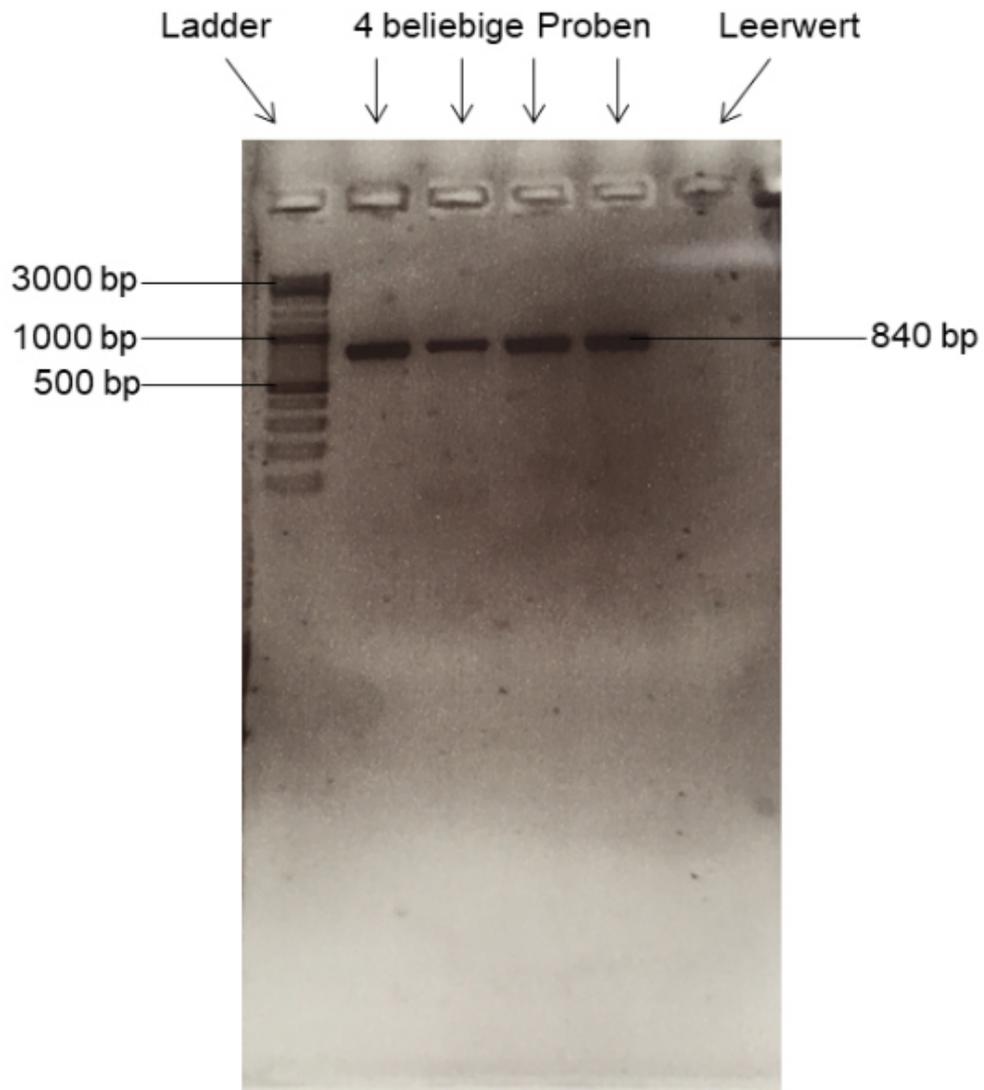


Abbildung 4: Ergebnis einer Gelelektrophorese. Dargestellt sind die vier Banden der vier Proben, links der Ladder und auf der rechten Seite keine Bande an der Stelle des Leerwerts, wodurch Verunreinigungen ausgeschlossen werden können.

2.2.3.4 Purifikation

Bei der Purifikation (Aufreinigung) der PCR-Produkte bzw. der Produkte der Sequenzierreaktion geht es darum, die amplifizierten DNA-Produkte zu reinigen und damit die anderen Reaktionskomponenten (Puffer, dNTPs, Primer, Enzyme, etc.) zu entfernen. Dementsprechend ist eine Purifikation sowohl nach der PCR, als auch nach der Sequenzierreaktion notwendig. Das Vorgehen hierbei ist identisch.

Dazu wurde nach dem folgenden Pipettierschema ein NaAC + Ethanol-Gemisch hergestellt und das 2,5-fache Volumen auf die Lösungen gegeben. Da sich in jedem Well 10 µl befinden, entspricht dies einem Volumen von 25 µl.

Ethanol (100%)	48 ml
Natrium-Acetat (3M)	2 ml

Tabelle 5: Pipettierschema für NaAC + Ethanol-Gemisch

Anschließend folgen fünf Schritte, bestehend aus Verwerfen der Lösung, Zugabe von 100 µl Ethanol (70%) und Zentrifugation.

Schritt 1:	45min zentrifugieren bei 3220 x g
Schritt 2:	Überstand verwerfen und Zugabe von 100 µl Ethanol, Zentrifugation 20 min bei 3220 x g
Schritt 3:	erneutes Verwerfen, Zugabe von 100 µl Ethanol, Zentrifugation 20 min bei 3220 x g
Schritt 4:	Überstand erneut verwerfen und 1 min bei 600 x g über Kopf zentrifugieren
Schritt 5:	Resuspendieren in 15 µl H ₂ O

Tabelle 6: Ablaufschema der Purifikation

Die aufgereinigten Proben können bis zur weiteren Bearbeitung erneut im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

2.2.3.5 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

H ₂ O	2,65 µl
Puffer (5X)	1,65 µl
Primer-F <u>oder</u> Primer-R (1,0 µM)	1,0 µl
BigDye	0,7 µl

Tabelle 7: Pipettierschema für Ansatz der Sequenzierreaktion.

Wie im Kapitel *Theorie der Standardmethoden zur Analyse der Mutation L109R* beschrieben, erfolgt die Sequenzierung in zwei Ansätzen, wobei einem Ansatz der Primer-F zugeführt wird und dem anderen der Primer-R. Die übrige Zusammensetzung ist identisch und entspricht dem oben aufgeführten Pipettierschema (Tabelle 7)

Im Folgenden werden je 6 µl des Mastermix in jedes Well gegeben und 4 µl des aufgereinigten PCR-Produkts hinzu pipettiert.

Folgende Garfik (Abbildung 5) zeigt das Temperaturprofil des Thermocyclers für die Sequenzier-PCR. In der untenstehenden Tabelle (Tabelle 8) ist das Temperaturprofil nochmals tabellarisch dargestellt.

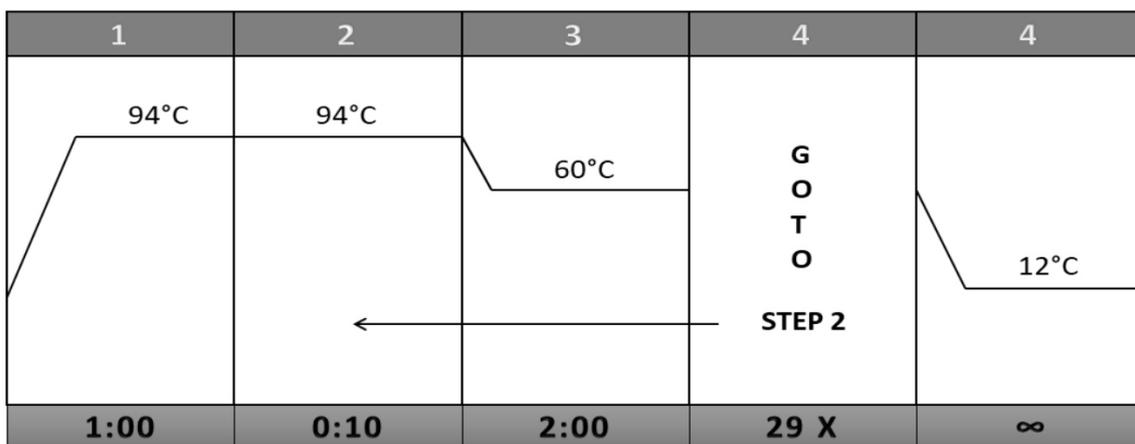


Abbildung 5: Temperaturprofil des Thermocyclers (graphisch). Die Abbildung stellt den Temperaturverlauf des Thermocyclers in graphischer Form dar. In der unteren Zeile ist die Zeit in Minuten angegeben.

Step	Temperatur	Zeit
1	94°C	1 min
2	94°C	10 s
3	60°C	2 min
4	go to step 2 (29 mal)	
5	12°C	∞

Tabelle 8: Temperaturprofil des Thermocyclers für die

2.2.3.6 Kapillarsequenzierer zur Bestimmung der Nukleotidsequenz

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz geschieht mittels Kapillarelektrophorese mit Hilfe eines Kapillarsequenzierers. Dieser ist in der Lage fluoreszenzmarkierte Abbruchprodukte automatisch zu sequenzieren. Durch die Kapillarelektrophorese werden die unterschiedlich langen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge voneinander getrennt und anschließend an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Anhand der fluoreszenzmarkierten ddNTPs kann die Nukleotidabfolge der DNA-Sequenz wiedergegeben werden.

Dazu werden 10 µl Formamid auf eine Sequenzier-Platte gegeben und jeweils 7 µl des aufgereinigten Sequenzier-Produktes hinzu pipettiert. Daraus ergibt sich folgendes Pipettierschema.

Formamid	10 µl
aufgereinigte Sequenzierung	7 µl

Tabelle 9: Pipettierschema für Sequenzierplatte

2.2.3.7 Auswertung der Nukleotidsequenz

Die sequenzierte Nukleotidsequenz wird mit Hilfe des Programms *Finch TV* analysiert und ausgewertet. Dabei wurde jeweils die Base an Position 326 der kodierenden Sequenz untersucht. Die gesuchte Mutation liegt dann vor, wenn neben der Thymin-Base ebenfalls eine Guanin-Base detektiert wird, bzw. Guanin sogar homozygot detektiert wird.

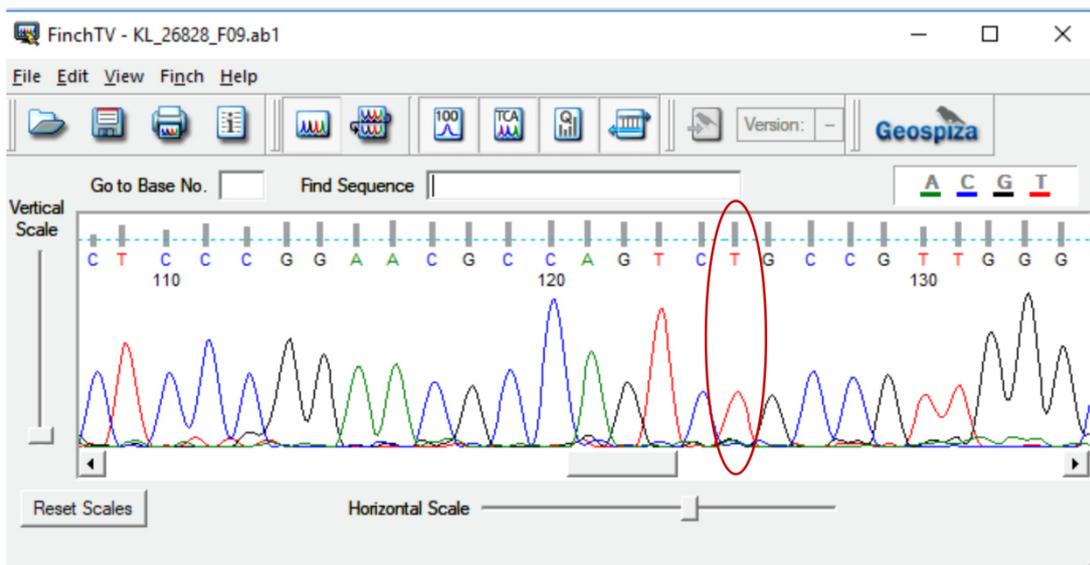


Abbildung 6: Darstellung der Auswertung mit Hilfe des Programms *Finch TV*. Der rot umkreiste Bereich zeigt die Base, die in diesem Fall das Bild eines Klotho-Wildtyps zeigt (Genotype TT).

Material und Methoden

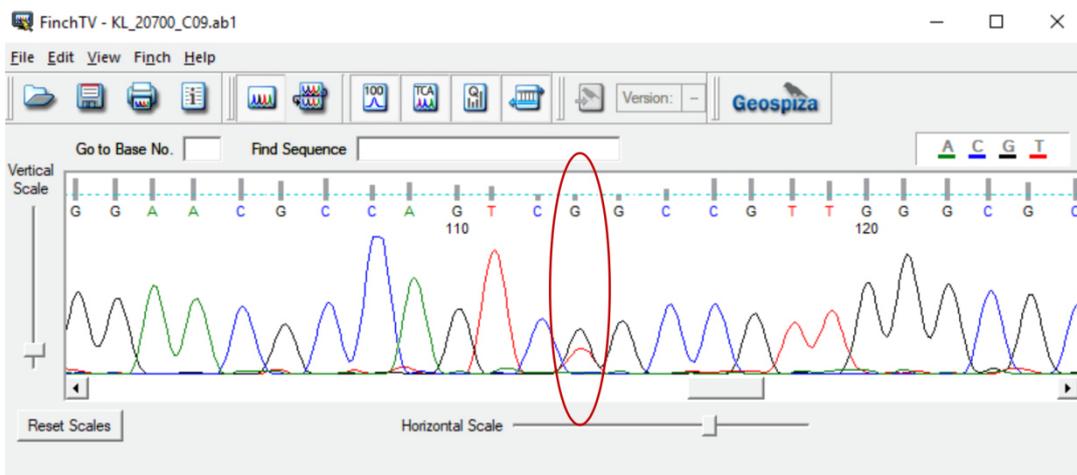


Abbildung 7: Darstellung der Auswertung mit Hilfe des Programms Finch TV. Der rot umkreiste Bereich zeigt die Base, die in diesem Fall das Bild eines heterozygoten Mutationsträgers zeigt (Genotyp TG).

2.2.4 Genetische Analyse des Klotho-Genotyp KL-VS Variante

In den Tübinger Kohorten 1 und 2 wurde der SNP rs9527024 im Klotho-Gen unter Verwendung des NeuroChip-Arrays beurteilt, während in der PPMI-Kohorte der NeuroX-Array zur Beurteilung des SNP rs9536314 (KL-VS Variante) im Klotho-Gen verwendet wurde.

Beide SNPs sind Teil der 6 Varianten, die den Klotho-KL-VS-Genotyp definieren und sich alle in einem hohen Bindungsungleichgewicht befinden.

Für die Auswertung wurde die Software gPLINK verwendet (Purcell et al., 2007). Mit Hilfe der Software gPLINK erfolgte eine Extraktion der Genotypen aus den gesamten Neurochip-Daten und im Anschluss die Extraktion der Parkinson-Patienten aus dem Gesamtkollektiv.

In diesem Rahmen wurden neben der Überprüfung des Genotyps, jeweils folgende Tests zur Qualitätskontrolle durchgeführt: *Callrate*, *Testung des Hardy-Weinberg-Equilibrium* und *Allelfrequenz*.

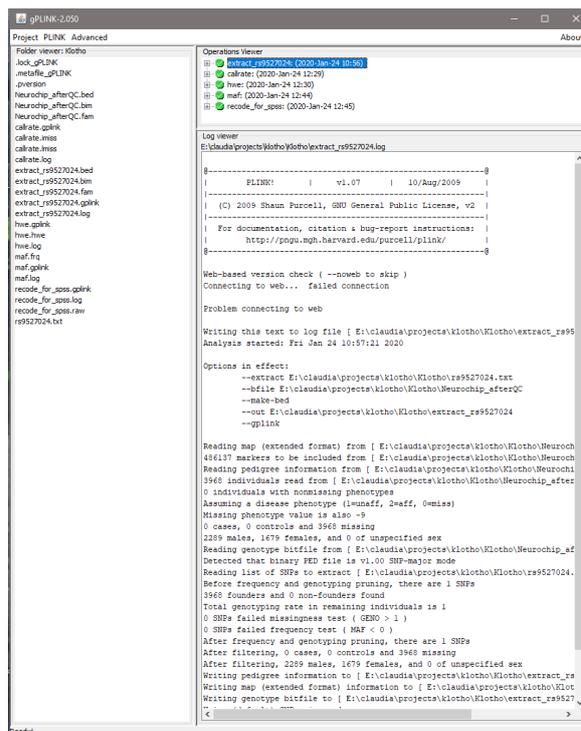


Abbildung 8: Software gPLINK für die Auswertung. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine Auswertung mit Hilfe der Software gPLINK, wie sie für die Klotho KL-VS Variante verwendet wurde.

2.2.5 Messung der Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D Metaboliten im Liquor

Für die quantitative Bestimmung der Konzentration von Klotho wurde ein humanes, lösliches α -Klotho Assay Kit verwendet. Die Assay Sensitivität beträgt in diesem Fall 6,15 pg/ml (IBL America, Minneapolis, USA).

Die Bestimmung der FGF23 (C-terminal) Konzentration wurde unter Verwendung eines zweiseitigen, humanen FGF23 (C-term) ELISA Kit quantifiziert, mit einer Sensitivität von 1,5 RU/ml (Immutopics, Inc., San Clemente, CA, USA).

Die Konzentration von 25-hydroxycholecalciferol und 1,25-hydroxycholecalciferol im Liquor (CFS) wurde mit Hilfe eines enzymatischen Immunoassay Kits (EIA) quantifiziert. Die Assay Sensitivität für 25-hydroxycholecalciferol beträgt 2,7 ng/ml und für 1,25-hydroxycholecalciferol 2,5 pg/ml.

Für die Datenerfassung wurde ein iMark™ Mikrotiterplatten-Absorbtionsmessgerät verwendet (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Die oben beschriebenen Quantifizierungen erfolgten im Zentrallabor der Universitätsklinik in Tübingen.

2.2.6 Ethik

Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen genehmigt. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

3 Ergebnisse

3.1 Klotho L109R Mutation

Für die Untersuchung der seltenen Mutation L109R wurden insgesamt 370 Patienten sequenziert (Eigenanteil 198 sequenzierte Patienten) und auf das Vorliegen der Mutation hin untersucht (männlich: 233 (62,97%)).

Von den 370 sequenzierten Patienten konnten 8 Individuen als Träger der Mutation L109R identifiziert werden (männlich: 6 (75%)), wobei einer davon einen homozygoten Genotyp der Mutation (GG) zeigt. Die übrigen Patienten zeigen den Wildtyp Genotyp (TT) (männlich: 227 (62,7%)).

Die 8 Mutationsträger in der untersuchten Kohorte, von insgesamt 370 Parkinson-Patienten, entsprechen 2,16%. Daten der *genome aggregation database* (<https://gnomad.broadinstitute.org>) zufolge geht man in der Gesamtbevölkerung von einer Prävalenz von ca. 1,1% aus.

Auf Grund des seltenen Auftretens der Mutation und der damit verbundenen niedrigen Fallzahl von Mutationsträgern wurden die sieben heterozygoten Mutationsträger und der homozygote Mutationsträger für die folgenden Auswertungen in einer Gruppe zusammengefasst.

Formal zeigt sich in der Gruppe der Mutationsträger das Bild einer typischen Parkinson Erkrankung. Die Parkinson-Patienten mit der Klotho Mutation L109R erkranken im Mittel mit 57,8 Jahren bei einer durchschnittlichen Erkrankungsdauer von 8,4 Jahren.

Auch in Bezug auf kognitive oder motorische Charakteristika der Parkinson Erkrankung unterscheidet sich die Gruppe der Mutationsträger nicht wesentlich vom typischen klinischen Bild einer Parkinson Erkrankung (MoCA: 25,5, HYS: 2,5, UPDRS: 24,5).

Im weiteren Schritt wurden die acht Mutationsträger auf deren Familienanamnese hin untersucht, um eventuelle Vererbungsmuster der Mutation aufzeigen zu können.

Ergebnisse

Vier der acht Mutationsträger (50%) gaben an, eine positive Familienanamnese für die Parkinson Erkrankung in 1. oder 2. Generation zu haben. Bei den übrigen vier Mutationsträgern konnte keine positive Familienanamnese nachvollzogen werden.

Die beschriebenen Ergebnisse und weitere Daten können der folgenden Tabelle (Tabelle 10) entnommen werden.

	Klotho L109R Mutation (n=8)	Klotho-Genotyp Wildtyp (n=362)
Alter (in Jahren)	66,2 (6,8)	65,8 (9,4)
Geschlecht (männlich)	6 (75%)	227 (62,7%)
Erkrankungsalter (in Jahren)	57,8 (4,5)	59,4 (9,7)
Erkrankungsdauer (in Jahren)	8,4 (4,6)	6,4 (4,7)
Intervall Krankheitsbeginn bis Beginn kognitiver Einschränkungen (50%) (in Jahren)	12,1	10,3
MoCA	25,5 (3,4)	24,9 (4,1)
UPDRS III	24,5 (9,0)	26,1 (11,6)
HYS	2,5 (0,5)	2,0 (0,7)
CSF Klotho(pg/ml)	880,0 (98,0) (n = 4)	846,0 (291,4) (n = 99)
CSF 1,25 dihydroxyvitamin D (pg/ml)	2,7 (n = 4)	3,6 (2,0) (n = 99)
CSF 25 hydroxyvitamin D (ng/ml)	8,7 (1,2) (n = 4)	8,5 (1,5) (n = 97)
CSF FGF23 (RU/ml)	9,6 (3,9) (n = 4)	14,6 (7,2) (n = 95)

Tabelle 10: Mutation L109R Vergleich des Genotyp Wildtyp und der Klotho L109R Mutation. Die Tabelle vergleicht die Kohorte der Mutationsträger (Genotyp TG oder GG) mit der Kohorte ohne Mutation (Genotyp TT). Auf Grund der geringen Fallzahl beschränkt sich die Auswertung auf eine deskriptive Statistik. In Klammern sind jeweils die entsprechenden Standardabweichungen angegeben. CSF (Cerebrospinalflüssigkeit = Liquor).

3.2 KL-VS Variante

3.2.1 Tübinger Kohorte 1: Genetische Varianten im Klotho-Gen

3.2.1.1 Gruppenvergleich der Parkinson-Patienten aufgeteilt nach Genotyp

Die Kohorte umfasst 459 Patienten, von denen 283 männlich sind (61,7%).

Der Klotho-Genotyp Wildtyp (GG) des analysierten SNP rs9527024 zeigte sich bei 351 (männlich: 63%) dieser Patienten. Die übrigen 108 (männlich: 58%) Patienten waren Träger der untersuchten Klotho KL-VS Variante (GA).

Zwischen den beiden Genotypen konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Alter oder Krankheitsdauer festgestellt werden.

Auch im Hinblick auf spezifische Charakteristika der Parkinson Erkrankung bestehen zwischen den beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede. Sowohl das Erkrankungsalter als auch der UPDRS III oder HYS zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Gruppen. Gleiches gilt auch für den MoCA und den BDI.

Um geschlechtsspezifische Unterschiede analysieren zu können erfolgte eine geschlechtergetrennte Analyse.

Genaue Werte und weitere Daten können der folgenden Tabelle (Tabelle 11) entnommen werden.

Ergebnisse

Geschlecht	Gesamt			weiblich			männlich		
	Wildtyp (n=351)	KL-VS (n=108)	p-Wert	Wildtyp (n=131)	KL-VS (n=45)	p-Wert	Wildtyp (n=220)	KL-VS (n=63)	p-Wert
Geschlecht (% männlich)	63%	58%	0,430						
Erkrankungsalter (in Jahren)	60 (11)	61 (10)	0,579	60 (11)	63 (9)	0,093	60 (11)	59 (10)	0,465
Alter (in Jahren)	65 (10)	66 (9)	0,514	65 (10)	67 (9)	0,232	66 (10)	65 (9)	0,874
Erkrankungsdauer (in Jahren)	5 (5)	5 (5)	0,918	5 (5)	4 (5)	0,210	5 (5)	6 (5)	0,212
MOCA	24 (5)	24 (4)	0,422	24 (5)	24 (4)	0,978	23 (5)	24 (4)	0,290
HYS	2 (0,7)	2 (0,7)	0,486	2,0 (0,7)	2,0 (0,6)	0,426	2,0 (0,7)	2,0 (0,7)	0,766
UPDRS III	22 (119)	24 (13)	0,279	21 (10)	23 (12)	0,534	23 (12)	25 (13)	0,401
Prävalenz kognitiver Einschränkungen	57%	60%	0,579	49%	58%	0,195	62%	62%	0,556
Intervall Krankheitsbeginn bis Beginn kognitiver Einschränkungen (50%) (in Jahren)	12	10	0,448	13	9	0,019	11	11	0,507

Tabelle 11: Tübinger Kohorte 1. Vergleich zwischen dem Klotho-Genotyp Wildtyp und dem Klotho-Genotyp KL-VS Variante. Dargestellt ist die gesamte Kohorte, sowie eine Aufteilung der Geschlechter. Für den Vergleich der Mittelwerte und der Standardabweichungen (in Klammern angegeben) wurde eine univariante Varianzanalyse verwendet. Ein qui-Quadrat-Test wurde für den Vergleich des Geschlechts und der Prävalenz kognitiver Einschränkungen angewandt.

3.2.1.2 Beurteilung kognitiver Einschränkungen im longitudinalen Verlauf im Vergleich der Genotypen

Hinsichtlich der Prävalenz kognitiver Einschränkungen konnten zwischen den beiden Klotho-Genotypen Wildtyp und KL-VS Variante keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Um geschlechtsspezifische Effekte untersuchen zu können, wurden Männer und Frauen im Folgenden getrennt untersucht.

Dabei konnte ein signifikanter Unterschied bei Betrachtung des zeitlichen Intervalls bis zum Auftreten kognitiver Einschränkungen beobachtet werden. In der Gruppe der Frauen mit dem Genotyp KL-VS Variante beträgt das Zeitintervall, bis 50% der Patienten kognitive Einschränkungen entwickelt haben, 8,8 Jahre. Bei Frauen mit dem Wildtyp Genotyp beträgt das Intervall 13,4 Jahre ($p= 0,021$). Dabei ist zu beachten, dass die Frauen mit dem Genotyp KL-VS Variante kürzer erkrankt waren als die Frauen mit dem Genotyp Wildtyp (Erkrankungsdauer: KL-VS Variante 4 Jahre; Wildtyp 5 Jahre, $p= 0,162$) und trotzdem früher eine dementielle Entwicklung zeigen.

Frauen mit dem Genotyp KL-VS Variante haben demnach im Vergleich zu Frauen mit dem Wildtyp Genotyp ein höheres Risiko früher im Verlauf der Erkrankung kognitive Einschränkungen zu entwickeln (HR (95% KI) = 1,721 (1,084-2,732); $p= 0,019$).

Der Status *kognitive Einschränkung* gilt dabei als erreicht, wenn der MoCA einen Wert ≤ 25 erreicht hat. Dieser Effekt ist in der folgenden Kaplan-Maier-Kurve ebenfalls ersichtlich (Abbildung 9).

Ergebnisse

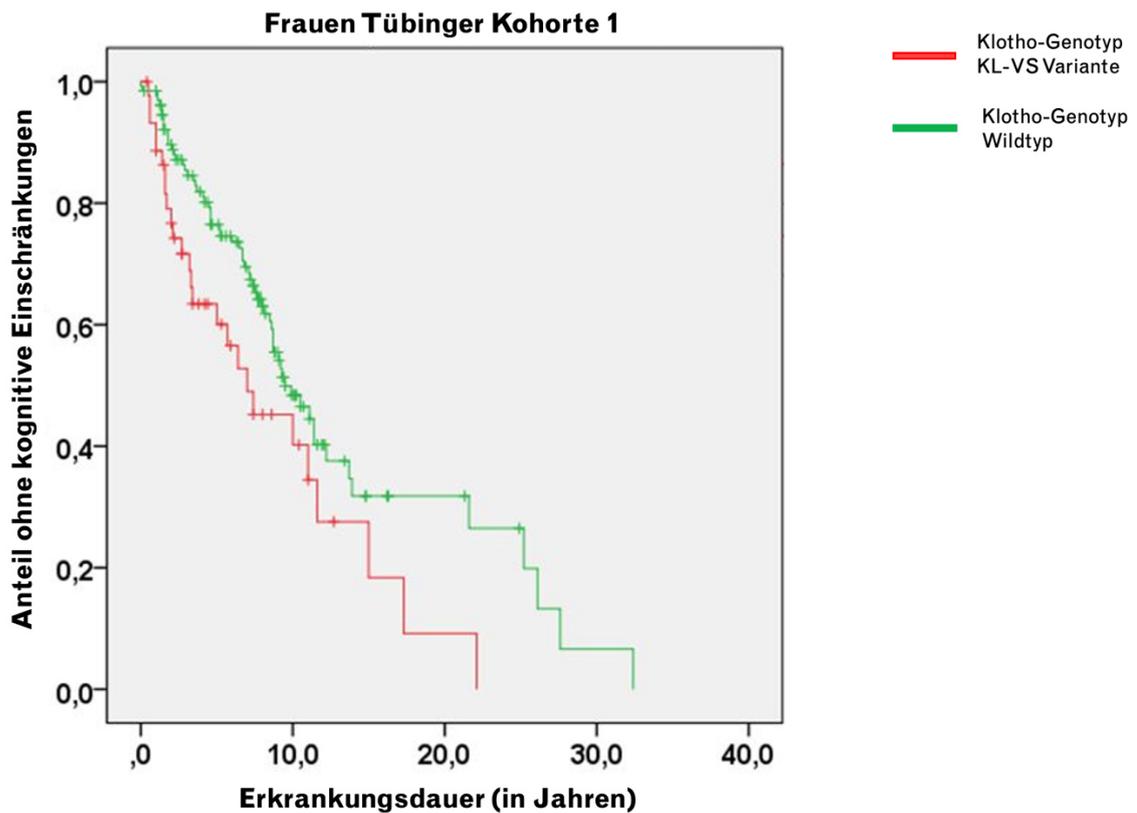


Abbildung 9: Kaplan-Maier-Kurve für weibliche Patienten der Tübinger Kohorte. Weibliche Patienten mit dem Genotyp KL-VS Variante erreichten den Meilenstein *kognitive Einschränkung* ($MoCA \leq 25$) nach 8,8 Jahren, Patienten mit dem Wildtyp GG nach 13,4 Jahren ($p = 0,019$).

Bei Betrachtung des gleichen Intervalls in der Gruppe der Männer zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen KI-VS Variante und dem Wildtyp Genotyp (KL-VS Variante 10,8 Jahre; Wildtyp 10,6 Jahre, $p = 0,509$).

Das gleiche Bild ergibt sich auch bei einer Analyse ohne Trennung der Geschlechter. Zwischen den beiden Genotypen konnte kein signifikanter Unterschied im Intervall bis zur Entwicklung kognitiver Einschränkungen festgestellt werden.

3.2.2 PPMI-Kohorte: Genetische Varianten im Klotho-Gen

3.2.2.1 Gruppenvergleich der Parkinson-Patienten aufgeteilt nach Genotyp

Neben der Kohorte, die sich aus Parkinson-Patienten aus Tübingen zusammensetzt, wurde eine weitere Kohorte aus der PPMI Datenbank als Validierungskohorte herangezogen.

Von den 297 Parkinson-Patienten dieser PPMI-Kohorte zeigten 218 Parkinson-Patienten den Klotho-Wildtyp-Genotyp (GG) (67% männlich) und 79 (70% männlich) trugen die Klotho KL-VS Variante (GA) des analysierten SNP rs9536314.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Alter zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung, dem Erkrankungsalter und der Krankheitsdauer zwischen den beiden Genotypen gefunden werden.

Parkinson-Patienten mit dem Genotyp KL-VS Variante zeigten allerdings höhere UPDRS III Werte als Patienten mit dem Klotho-Wildtyp (KL-VS Variante 27,7; Wildtyp 22,4, $p = 0,006$). Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch bei einer getrennten Analyse der Geschlechter (männlich: KL-VS Variante 29,0; Wildtyp 23,9; $p = 0,024$; weiblich: KL-VS Variante 24,4; Wildtyp 19,1; $p = 0,153$).

Bezüglich des MoCA und des HYS konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Weitere Daten und genaue Werte können der folgenden Tabelle entnommen werden (Tabelle 12)

Ergebnisse

Geschlecht	Gesamt			Weiblich			männlich		
	Wildtyp (n=218)	KL-VS (n=79)	p-Wert	Wildtyp (n=73)	KL-VS (n=24)	p-Wert	Wildtyp (n=145)	KL-VS (n=55)	p-Wert
Klotho Genotyp									
Geschlecht (% männlich)	67%	70%	0,360	-	-	-	-	-	-
Alter (in Jahren)	68 (10)	68 (8)	0,704	66 (9)	64 (8)	0,317	68 (10)	70 (8)	0,318
Erkrankungsalter (in Jahren)	59 (10)	60 (8)	0,464	58 (9)	57 (9)	0,490	60 (10)	62 (8)	0,213
Erkrankungsdauer (in Jahren)	8 (2)	8 (2)	0,115	9 (3)	8 (2)	0,331	8 (2)	8 (2)	0,211
MOCA	26 (4)	26 (4)	0,220	27 (4)	27 (3)	0,960	26 (4)	25 (5)	0,171
UPDRS III	22 (12)	28 (12)	0,006	19 (12)	24 (12)	0,153	24 (12)	29 (12)	0,024
HYS	2 (0,6)	2 (0,2)	0,344	2 (0,6)	2 (0,3)	0,339	2 (0,5)	2 (0,2)	0,674
Prävalenz kognitiver Einschränkungen	56 %	61 %	0,297	49 %	33 %	0,129	60 %	73 %	0,065
Intervall Krankheitsbeginn bis Beginn kognitiver Einschränkungen (50%) (in Jahren)	8	6	0,287	8	8	0,273	8	5	0,046

Tabelle 12: PPMI-Kohorte. Vergleich zwischen dem Genotyp Wildtyp und dem Genotyp KL-VS Variante. Dargestellt ist die PPMI-Kohorte gesamt und eine getrennte Darstellung der Geschlechter. Für den Vergleich der Mittelwerte und der Standardabweichungen (in Klammern angegeben) wurde eine univariante Varianzanalyse verwendet. Ein qui-Quadrat-Test wurde für den Vergleich des Geschlechts und der Prävalenz kognitiver Einschränkungen angewandt.

3.2.2.2 Beurteilung kognitiver Einschränkungen im longitudinalen Verlauf im Vergleich der Genotypen

In der PPMI-Kohorte konnte gezeigt werden, dass männliche Patienten mit dem Klotho-Genotyp KL-VS Variante früher im Verlauf der Erkrankung eine kognitive Einschränkung entwickeln als Patienten mit dem Klotho-Wildtyp. In der Gruppe der männlichen Patienten mit der KL-VS Variante beträgt das Zeitintervall, bis 50% der Patienten kognitive Einschränkungen entwickelt haben, 5,4 Jahre. Bei Männern mit dem Wildtyp Genotyp beträgt das Intervall 7,7 Jahre ($p=0,046$).

Männer mit der Genotyp KL-VS Variante haben demnach ein höheres Risiko früher im Verlauf der Erkrankung kognitive Einschränkungen zu entwickeln (HR (95% KI) = 1,463 (1,004-2,132); $p=0,046$).

Dieser Effekt ist in der folgenden Kaplan-Maier-Kurve (Abbildung 10) ebenfalls ersichtlich.

Der Status *kognitive Einschränkung* gilt dabei als erreicht, wenn der MoCA einen Wert ≤ 25 erreicht hat.

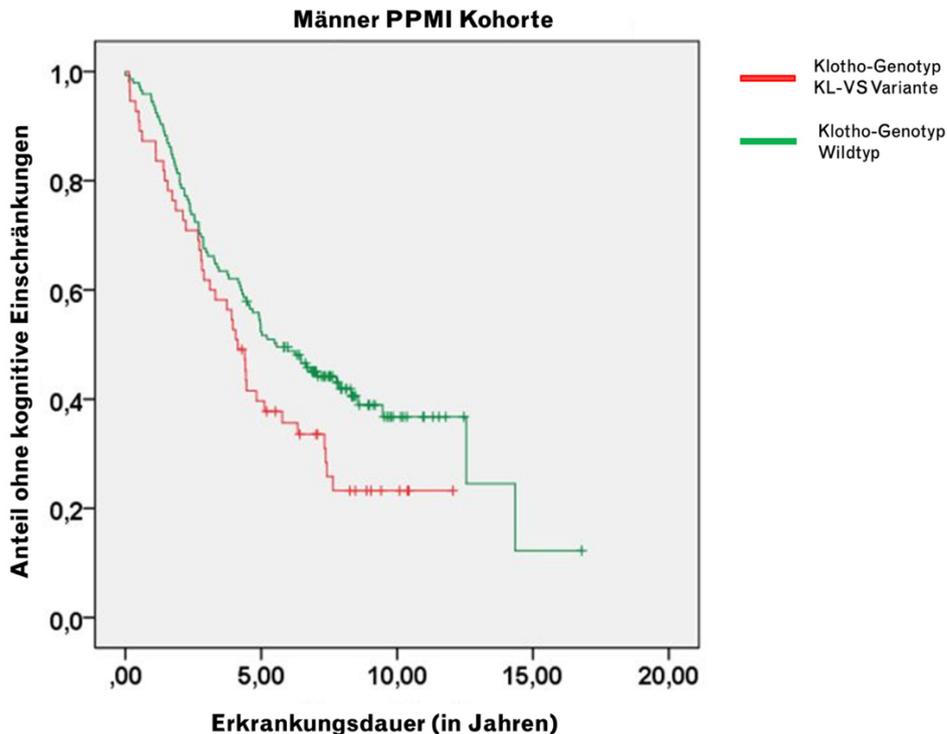


Abbildung 10: Kaplan-Maier-Kurve für männliche Patienten der PPMI-Kohorte. Patienten mit dem Klotho-Genotyp KL-VS Variante erreichten den Meilenstein *kognitive Einschränkung* (MoCA ≤ 25) nach 5,4 Jahren, Patienten mit dem Klotho-Genotyp Wildtyp nach 7,7 Jahren ($p=0,046$).

3.2.3 Tübinger Kohorte 2: Klotho-Genotyp und Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D-Metaboliten im Liquor

3.2.3.1 Vergleich der Liquor-Konzentrationen in gesunden Kontrollen und Parkinson-Patienten

Die zweite Kohorte mit insgesamt 175 Individuen setzte sich aus 50 gesunden Kontrollen und 125 Parkinson-Patienten zusammen.

Die Parkinson-Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung älter im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Parkinson-Patienten 67,5 Jahre; gesunde Kontrollen 60,0 Jahre; $p=0,001$). Außerdem war der Anteil der Männer in der Gruppe der Parkinson-Patienten höher (Parkinson-Patienten männlich: 86 (68%); gesunde Kontrollen männlich 24 (48%); $p=0,009$).

Die Parkinson-Patienten zeigten gegenüber gesunden Kontrollen signifikant niedrigere Konzentrationen von Klotho im Liquor (CSF) (Parkinson-Patienten 832,7 pg/ml; gesunde Kontrollen 980,9 pg/ml; $p= 0,001$). Außerdem zeigten sich ebenfalls signifikant niedrigere FGF23 Konzentrationen im Liquor der Parkinson-Patienten (Parkinson-Patienten 14,8 RU/ml; gesunde Kontrollen 31,3 RU/ml; $p\leq 0,001$).

Weitere Details können der Tabelle 13 entnommen werden.

Ergebnisse

	gesunde Kontrollen (n=50)	Parkinson- Patienten (n=125)	p-Wert
Alter (in Jahren)	60,0 (14,2)	67,5 (8,5)	≤ 0,001
Geschlecht (männlich)	24 (48%)	86 (68%)	0,009
Erkrankungsalter (in Jahren)	-	60,8 (9,2)	-
Erkrankungsdauer (in Jahren)	-	6,7 (5,2)	-
MoCA	-	24,8 (3,4)	-
UPDRS III	-	24,9 (10,7)	-
HYS	-	2,2 (0,7)	-
BDI	-	10,0 (7,0)	-
CSF Klotho (pg/ml)	980,9 (352,3)	832,7 (271,6)	0,001
CSF 1,25- dihydroxycholecalciferol (pg/ml)	3,3 (1,2)	3,6 (2,0)	0,143
CSF 25- hydroxycholecalciferol (ng/ml)	8,2 (1,7)	8,6 (1,5)	0,313
CSF FGF23 (RU/ml)	31,3 (22,3)	14,8 (8,5)	≤ 0,001

Tabelle 13: Vitamin D und Protein Konzentrationen im Liquor (CSF) in gesunden Kontrollen und Parkinson-Patienten. Angegeben sind die entsprechenden Mittelwerte und in Klammern aufgeführt die Standardabweichungen bzw. die Prävalenz in %. Für die Auswertung wurde eine univariante Varianzanalyse mit den Variablen „Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung“ und „Geschlecht“ als Ko-Faktoren angewendet. Der Vergleich des Geschlechts erfolgte mit Hilfe des qui-Quadrat-Tests. CSF (Cerebrospinalflüssigkeit = Liquor).

Ergebnisse

Die Zusammensetzung des Patientenkollektivs ist in den untenstehenden Box-Plots nochmals graphisch dargestellt (Abbildung 11 und Abbildung 12).

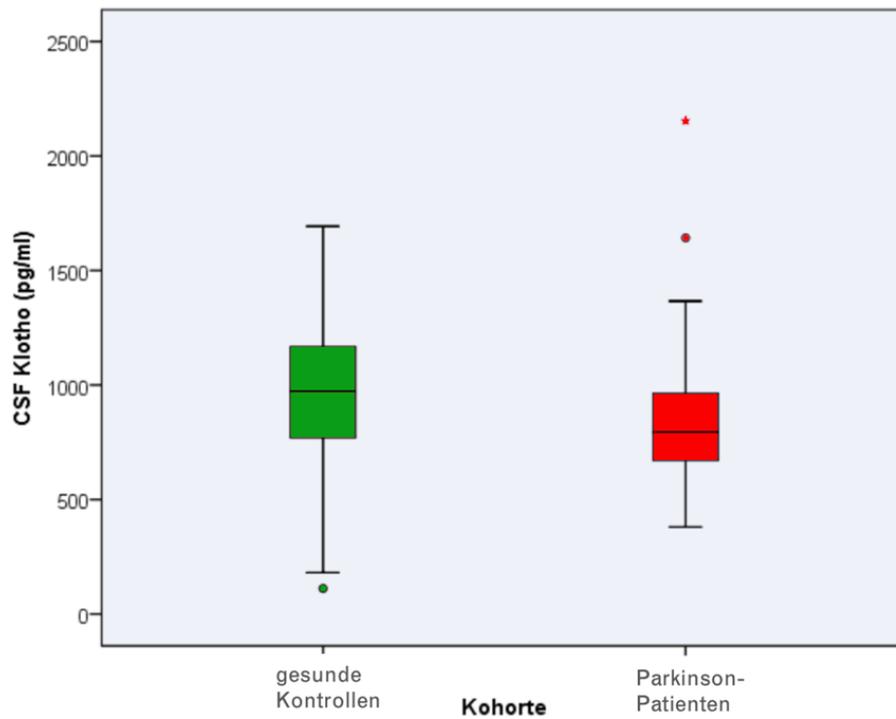


Abbildung 11: Box-Plot Liquor (CSF) Klotho Konzentration. Darstellung der CSF Klotho Konzentrationen bei Parkinson-Patienten und in gesunden Kontrollen. CSF (Cerebrospinalflüssigkeit = Liquor).

Ergebnisse

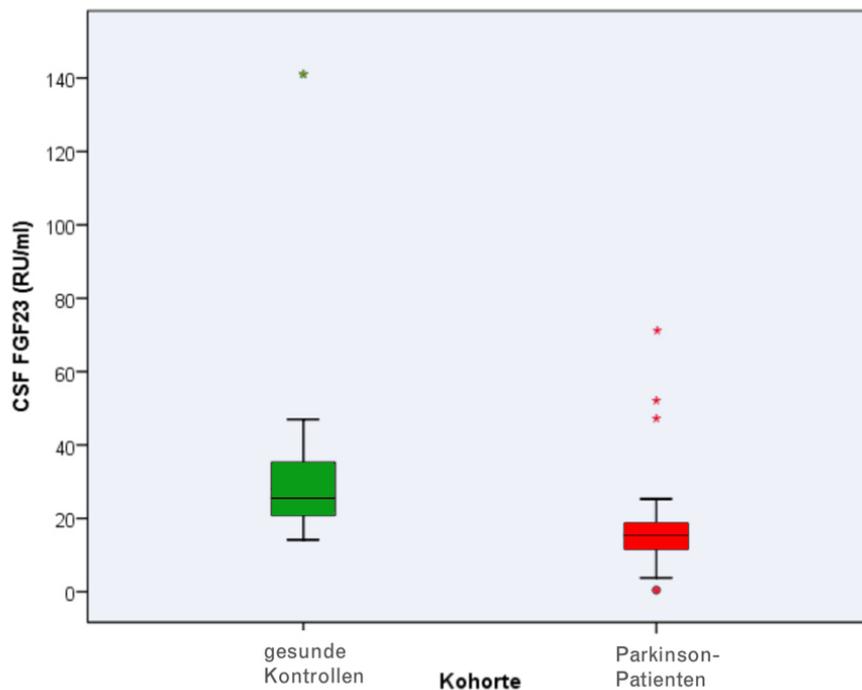


Abbildung 12: Box-Plot Liquor (CSF) FGF23 Konzentration. Darstellung der CSF FGF23 Konzentrationen bei Parkinson-Patienten und in gesunden Kontrollen. CSF (Cerebrospinalflüssigkeit = Liquor).

Um ausschließen zu können, dass Effekte ausschließlich von einem Geschlecht ausgelöst werden, erfolgte auch in diesem Fall eine geschlechtergetrennte Analyse. Dabei zeigten sich die gleichen Effekte wie in der gesamten Kohorte. Sowohl die Konzentrationen von Klotho im Liquor (Frauen: Parkinson-Patienten 16,5 pg/ml; gesunde Kontrollen 34,6 pg/ml, $p= 0,002$; Männer: Parkinson-Patienten 14,0 pg/ml; gesunde Kontrollen 26,8 pg/ml, $p\leq 0,001$), als auch die FGF23 Konzentration im Liquor (Frauen: Parkinson-Patienten 928,9 pg/ml; gesunde Kontrollen 1022,1 pg/ml, $p= 0,337$; Männer: Parkinson-Patienten 788,5 pg/ml; gesunde Kontrollen 925,0 pg/ml, $p=0,056$) zeigten bei Parkinson-Patienten geringere Werte. Weitere Ergebnisse sind in Tabelle 14 aufgelistet. Allerdings erreichen in diesem Fall nicht alle Werte die statistische Signifikanz. Die Tendenzen, die in der gesamten Kohorte als signifikant gewertet werden konnten, lassen sich jedoch auch in den geschlechtergetrennten Analysen abbilden.

Ergebnisse

Geschlecht	weiblich			Männlich		
	gesunde Kontrollen (n=26)	Parkinson-Patienten (n=39)	p-Wert	gesunde Kontrollen (n=24)	Parkinson-Patienten (n=86)	p-Wert
Alter (in Jahren)	58,6 (15,4)	67,8 (8,3)	≤ 0,001	61,5 (12,9)	67,4 (8,7)	≤ 0,001
Erkrankungs- alter (in Jahren)	-	62,0 (9,7)	-	-	60,3 (9,1)	-
Erkrankungs- dauer (in Jahren)	-	5,8 (3,5)	-	-	7,1 (5,8)	-
MoCA	-	24,6 (3,9)	-	-	24,8 (3,2)	-
UPDRS III	-	21,8 (12,0)	-	-	26,4 (9,8)	-
HYS	-	2,1 (0,8)	-	-	2,2 (0,6)	-
BDI	-	12,4 (9,1)	-	-	9,0 (5,7)	-
CSF Klotho(pg/ml)	1022,1 (375,9)	928,9 (262,2)	0,337	925,0 (322,5)	788,5 (265,8)	0,056
CSF 1,25- dihydroxy- cholecalciferol (pg/ml)	3,3 (1,5)	3,9 (2,5)	0,257	3,3 (0,9)	3,5 (1,7)	0,266
CSF 25- hydroxy- cholecalciferol (ng/ml)	8,1 (1,7)	8,4 (1,5)	0,793	8,3 (1,6)	8,7 (1,5)	0,586
CSF FGF23 (RU/ml)	34,6 (28,2)	16,5 (6,5)	0,002	26,8 (9,0)	14,0 (9,1)	≤ 0,001

Tabelle 14: Vitamin D und Protein Konzentrationen im Liquor (CSF) in gesunden Kontrollen und in Parkinson-Patienten, aufgeteilt nach Geschlecht. Angegeben sind die entsprechenden Mittelwerte und in Klammern aufgeführt die Standardabweichungen bzw. die Prävalenz in %. Für die Auswertung wurde eine univariante Varianzanalyse mit den Variablen „Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung“ und „Geschlecht“ als Ko-Faktoren angewendet. Der Vergleich des Geschlechts erfolgte mit Hilfe des qui-Quadrat-Tests. CSF (Cerebrospinalflüssigkeit = Liquor).

3.2.3.2 Zusammenhänge zwischen Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D Metaboliten im Liquor und klinischen Charakteristika

Ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Klotho im Liquor konnte sowohl mit dem UPDRS III, als auch mit dem HYS festgestellt werden. Demnach korrelieren niedrige Konzentrationen von Klotho im Liquor mit höheren Werten im UPDRS III (Koeffizient: -0,231; $p= 0,013$) und dem HYS (Koeffizient: -0,308; $p= 0,001$).

Keine signifikanten Korrelationen konnten sowohl zwischen der Klotho-Konzentration im Liquor und dem Alter der Individuen, als auch der Klotho-Konzentration und deren Erkrankungsalter gefunden werden.

Auch die Korrelationsanalyse nach einer Aufteilung der Geschlechter zeigt ähnliche Ergebnisse.

In der Gruppe der Männer und in der Gruppe der Frauen konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration von Klotho im Liquor und dem HYS (Frauen: Koeffizient -0,326; $p=0,049$; Männer: Koeffizient -0,303; $p=0,008$) festgestellt werden. Der Zusammenhang zwischen niedrigen Liquor Klotho Konzentrationen und höheren Werten im UPDRS III konnte in der Gruppe der Männer bestätigt werden (Koeffizient: -0,317; $p= 0,004$).

Außerdem wurde bei den Männern eine signifikante Korrelation zwischen Liquor 1,25-dihydroxycholecalciferol und dem UPDRS III (Koeffizient: 0,315; $p=0,037$) festgestellt.

Weitere Details können der Tabelle 15 entnommen werden.

Ergebnisse

		Parkinson-Patienten			
	Alter (Parkinson- Patienten / gesunde Kontrollen)	Erkran- kungs- dauer	UPDRS III	HYS	MoCA
CSF Klotho (pg/ml)	-0,171 / 0,52	-0,227**	-0,231**	-0,308***	0,126
CSF FGF23 (RU/ml)	0,175 / 0,193	-0,105	-0,023	0,038	-0,015
CSF 25- hydroxycholecalciferol (ng/ml)	0,056 / -0,147	-0,104	0,057	0,041	-0,074
CSF 1,25- dihydroxy- cholecalciferol (pg/ml)	-0,309** / 0,084	0,124	0,081	-0,087	0,302**

Tabelle 15: Zusammenhänge zwischen Liquor (CSF) Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D Metaboliten mit klinischen Charakteristika bei Parkinson-Patienten. Die Daten werden als Korrelationskoeffizienten (Pearson) angegeben. *p < 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001. CSF (Cerebrospinalflüssigkeit = Liquor).

3.2.3.3 Genotyp-spezifische Effekte auf Liquor-Konzentrationen

Im letzten Schritt der Analyse der KL-VS Variante sollten Genotyp-spezifische Effekte genauer untersucht werden. Dabei wurden ausschließlich die Parkinson-Patienten betrachtet und deren entsprechende Protein- bzw. Vitamin D-Konzentrationen im Liquor verglichen.

Von den 125 untersuchten Parkinson-Patienten der Tübinger Kohorte 2 zeigten 96 Patienten (76,8%) den Klotho-Genotyp Wildtyp (männlich: 65 (67,7%)).

Ergebnisse

Patienten mit dem Wildtyp Genotyp zeigten niedrigere Konzentrationen von Klotho im Liquor (Wildtyp 791,4 pg/ml; KL-VS Variante 968,0 pg/ml, $p= 0,009$). Auch die Konzentrationen des aktiven Metaboliten des Vitamin D (1,25-dihydroxycholecalciferol) im Liquor waren bei den Patienten mit dem Wildtyp Genotyp geringer (Wildtyp:3,4 pg/ml; KL-VS Variante 4,2 pg/ml, $p= 0,049$).

Weitere Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgelistet.

	Klotho KL-VS Variante (n=29)	Klotho Wildtyp (n=96)	p-Wert
Alter (in Jahren)	67,9 (8,6)	67,4 (8,5)	0,748
Geschlecht (männlich)	21 (72,4%)	65 (67,7%)	0,407
Erkrankungsalter (in Jahren)	60,5 (8,6)	60,9 (9,5)	0,704
Erkrankungsdauer (in Jahren)	7,4 (4,6)	6,4 (5,4)	0,215
MoCA	24,7 (2,7)	24,8 (3,6)	0,679
UPDRS III	23,5 (11,3)	25,4 (10,6)	0,299
HYS	2,1 (0,6)	2,2 (0,7)	0,357
BDI	12,5 (7,8)	9,3 (6,6)	0,052
CSF Klotho (pg/ml)	968,0 (355,8)	791,4 (226,8)	0,009
CSF 1,25-dihydroxycholecalciferol (pg/ml)	4,2 (1,8)	3,4 (2,0)	0,049
CSF 25-hydroxycholecalciferol (ng/ml)	8,4 (1,5)	8,7 (1,5)	0,559
CSF FGF23 (RU/ml)	16,1 (8,3)	14,4 (8,5)	0,131

Tabelle 16: Vitamin D und Protein Konzentrationen im Liquor (CSF) in Genotyp Wildtyp vs. Genotyp KL-VS Variante. Angegeben sind die entsprechenden Mittelwerte und in Klammern aufgeführt die Standardabweichungen. Die Auswertung der Mittelwerte erfolgte mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Tests und der Vergleich des Geschlechts erfolgte mit Hilfe des qui-Quadrat-Tests. CSF (Cerebrospinalflüssigkeit = Liquor).

Ergebnisse

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch ein unterschiedliches Alter oder Unterschiede bedingt durch das Geschlecht ausschließen zu können, wurde ein Matching durchgeführt. Die folgende Tabelle (Tabelle 17) zeigt die Ergebnisse dieses Matchings.

	Klotho KL-VS Variante (n=21)	Klotho-Genotyp Wildtyp (n=21)	p-Wert
Alter (in Jahren)	67,9 (8,2)	67,9 (8,2)	-
Geschlecht (männlich)	18 (85,7%)	18 (85,7%)	-
Erkrankungsalter (in Jahren)	60,5 (7,7)	60,3 (10,1)	0,930
Erkrankungsdauer (in Jahren)	7,8 (5,0)	9,9 (9,1)	0,399
MoCA	24,3 (3,0)	22,7 (4,1)	0,234
UPDRS III	27,3 (9,7)	29,9 (12,0)	0,550
HYS	2,2 (0,3)	2,6 (0,7)	0,025
BDI	11,6 (8,5)	10,8 (7,4)	0,925
CSF Klotho (pg/ml)	914,2 (348,8)	778,4 (244,5)	0,097
CSF 1,25-dihydroxycholecalciferol (pg/ml)	4,6 (2,0)	2,4 (1,1)	0,002
CSF 25-hydroxycholecalciferol (ng/ml)	8,7 (1,3)	9,0 (1,3)	0,642
CSF FGF23 (RU/ml)	15,5 (9,0)	14,7 (13,9)	0,218

Tabelle 17: Vitamin D und Protein Konzentrationen im Liquor (CSF) in Genotyp Wildtyp vs. Genotyp KL-VS Variante nach Matching. Das Matching erfolgte für die Variablen „Alter“ und „Geschlecht“. Angegeben sind die entsprechenden Mittelwerte und in Klammern aufgeführt die Standardabweichungen. Die Auswertung der Mittelwerte erfolgte mit Hilfe eines Mann-Whitney-U Tests und der Vergleich des Geschlechts erfolgte mit Hilfe des qui-Quadrat-Tests. CSF (Cerebrospinalflüssigkeit = Liquor).

Ergebnisse

Die Ergebnisse konnten auch nach dem Matching für „Alter“ und „Geschlecht“ bestätigt werden. Auch hier zeigten Patienten mit dem Wildtyp Genotyp geringere Konzentrationen von Klotho und 1,25 dihydroxycholecalciferol im Liquor (Liquor Klotho: Wildtyp 778,4 pg/ml; KL-VS Variante 914,2 pg/ml; $p=0,087$; Liquor 1.25 dihydroxycholecalciferol: Wildtyp 2,4 pg/ml; KL-VS Variante 4,6 pg/ml, $p=0,002$).

Die Verteilung der Daten aus der Matching-Analyse sind in den folgenden Box-Plots nochmals anschaulich graphisch dargestellt (Abbildung 13 und Abbildung 14).

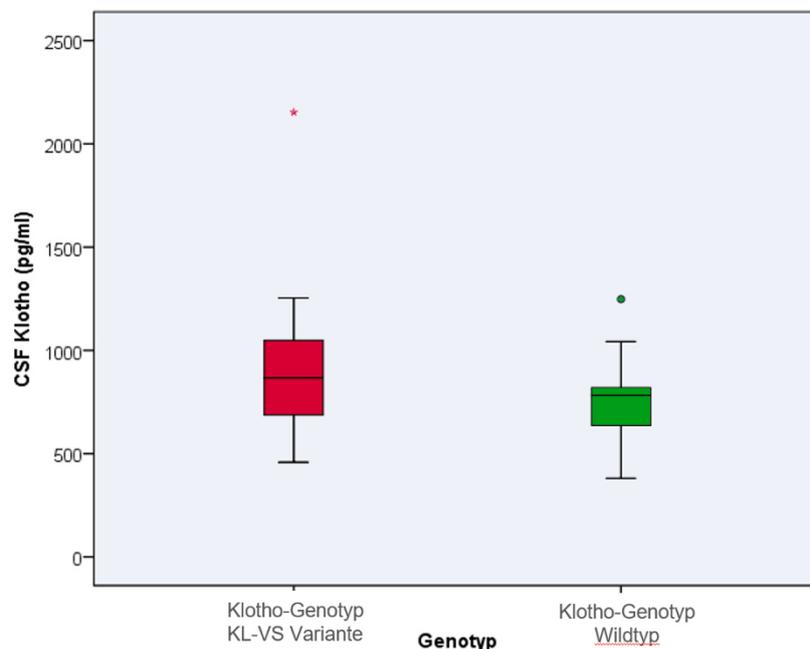


Abbildung 13: Box-Plot Klotho Konzentration im Liquor getrennt nach Genotyp. Darstellung der Verteilung der Daten der Klotho-Konzentration im Liquor in den Genotypen GG und GA. CSF (Cerebrospinalflüssigkeit = Liquor).

Ergebnisse

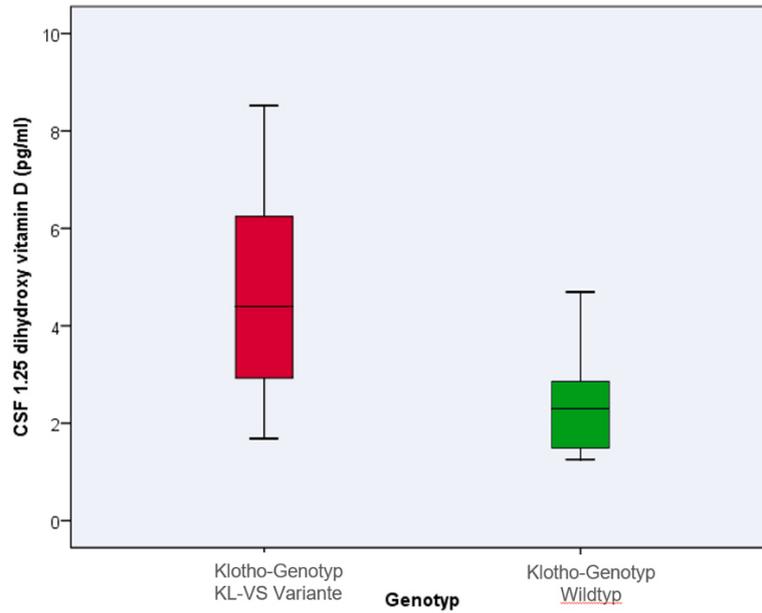


Abbildung 14: Box-Plot 1,25 dihydroxycholecalciferol Konzentration im Liquor getrennt nach Genotyp. Darstellung der Verteilung der Daten der 1,25-dihydroxycholecalciferol-Konzentrationen im Liquor in den Genotypen GG und GA. CSF (Cerebrospinalflüssigkeit = Liquor).

Die Ergebnisse der Analysen bezüglich der Klotho KL-VS Variante wurden im Rahmen einer Publikation im Januar 2021 in der Fachzeitschrift *European Journal of Neurology* veröffentlicht.

4 Diskussion

4.1 Klotho L109R Mutation

Bei der Analyse der seltenen Mutation L109R stand die Frage im Vordergrund, ob es sich tatsächlich um eine ursächliche Mutation handelt, welche direkt mit der Entwicklung einer Parkinson Erkrankung in Verbindung gebracht werden kann. In diesem Fall wäre Klotho ein sogenanntes „*disease causing Gen*“.

Insgesamt wurden 370 Parkinson-Patienten sequenziert und das Vorliegen der Mutation L109R geprüft. Lediglich 8 Parkinson-Patienten stellten sich als Träger der gesuchten Mutation heraus. Dieser geringen Gruppengröße geschuldet wurde ausschließlich eine deskriptive Statistik durchgeführt.

Formal zeigen die Parkinson-Patienten mit der Klotho L109R Mutation das klinische Bild einer typischen Parkinson Erkrankung. Sowohl in Bezug auf das Erkrankungsalter, als auch in Bezug auf die motorische und kognitive Komponente der Parkinson Erkrankung konnten, im Vergleich zum typischen Bild der Parkinson Erkrankung, keine Auffälligkeiten beobachtet werden.

Bezüglich eines möglichen Vererbungsmusters gaben 50% der Mutationsträger an, eine positive Familienanamnese für die Parkinson Erkrankung in 1. oder 2. Generation zu haben. Bei der typischen Parkinson Erkrankung liegt der Anteil der Patienten mit einer positiven Familienanamnese bei 10-15% (Gasser, 2007).

Der deutlich höhere Anteil an positiven Familienanamnesen unter den Patienten mit der Klotho L109R Mutation könnte ein Hinweis auf ein mögliches Vererbungsmuster sein. Dieser mögliche Zusammenhang der Mutation mit familiären Vererbungsmustern bezüglich der Parkinson Erkrankung und weiteren neurodegenerativen Erkrankungen, könnte in größeren Kohorten mit lückenlosen Familienanamnesen erneut untersucht werden.

Diskussion

Als weiterer Aspekt sollte die Prävalenz der Klotho L109R Mutation unter Parkinson-Patienten in größer angelegten Studien erneut aufgegriffen werden.

Die Prävalenz der Mutationsträgern in der untersuchten Kohorte von insgesamt 370 Parkinson-Patienten beträgt 2,16%.

Nach Angaben der Datenbank *genome aggregation database* (<https://gnomad.broadinstitute.org>) beträgt die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung nach aktuellem Stand etwa 1,1%.

Da das Auftreten der Mutation mit 2,16% in der sequenzierten Kohorte der Parkinson-Patienten nicht wesentlich höher ist als in der Gesamtbevölkerung, wurde auf eine weitere Sequenzierung von gesunden Kontrollen verzichtet.

Wenn in größeren angelegten Studien mit größeren Fallzahlen Abweichungen der prozentualen Häufigkeit der Mutation in Parkinson-Patienten auffallen würden, könnte der Gedanke erneut aufgegriffen werden, gesunde Individuen zu sequenzieren und auf das Vorhandensein der Mutation hin zu untersuchen. Interessant wäre in diesem Fall auch, Familien näher zu untersuchen, in denen eine Häufung von Parkinson Erkrankten vorliegt.

4.2 KL-VS Variante

Bei der Beurteilung des Einflusses der genetischen KL-VS Variante im Klotho-Gen und den zugehörigen Konzentrationen im Liquor konnte sowohl in der Tübinger Kohorte 1, als auch in der PPMI-Kohorte gezeigt werden, dass die Variante mit einem früheren Beginn kognitiver Einschränkungen im Verlauf der Parkinson Erkrankung assoziiert werden kann. In der PPMI-Kohorte geht die KL-VS Variante zudem mit höheren Werten im UPDRS III einher.

Dies legt den Schluss nahe, dass das Klotho-Gen und insbesondere die untersuchte KL-VS Variante einen großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Parkinson Erkrankung nimmt. In dieser Studie konnten Auswirkungen der Variante, sowohl auf die motorische Komponente der Erkrankung als auch deren Einfluss auf die kognitiven Einschränkungen, gezeigt werden.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass Parkinson-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen niedrigere Konzentrationen von Klotho und FGF23 im Liquor aufweisen und zudem ein Zusammenhang zwischen niedrigen Klotho-Konzentrationen im Liquor und schlechterem motorischen Abschneiden besteht.

Diese Ergebnisse konnten auch in geschlechtergetrennten Analysen bestätigt werden.

4.2.1 Tübinger Kohorte 1 und PPMI-Kohorte: Beurteilung kognitiver Einschränkungen im Vergleich der Genotypen

Um direkte Einflüsse der KL-VS Variante auf die Kognition und deren Einfluss auf den kognitiven Abbau beurteilen zu können, wurden die beiden Genotypen in der Tübinger Kohorte 1 und in der PPMI-Kohorte miteinander verglichen.

Dabei konnte festgestellt werden, dass in der Tübinger Kohorte 1 die KL-VS Variante des Langlebigkeitgens Klotho im Verlauf der Erkrankung in der Gruppe der Frauen zu einem früheren Beginn kognitiver Einschränkungen führt. Bemerkenswerterweise ist in der Tübinger Kohorte 1 die Gruppe mit dem Wildtyp Genotyp sogar etwas länger erkrankt im Vergleich zu der Gruppe mit dem Genotyp KL-VS Variante (Erkrankungsdauer: Wildtyp 5,7 Jahre; KL-VS Variante 4,4 Jahre), was den Effekt der früheren Entwicklung von kognitiven Einschränkungen durch die KL-VS Variante zusätzlich verstärkt.

In weiteren Vergleichspunkten (Alter, Erkrankungsdauer, Alter bei Erkrankungsbeginn) fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotyp-Gruppen, so dass diese als Einflüsse auf die Ergebnisse keine entscheidende Rolle zu spielen scheinen.

Diese Ergebnisse zeigen sich nicht nur in der Tübinger Kohorte 1, die sich aus Parkinson-Patienten des Universitätsklinikums in Tübingen zusammensetzt, sondern konnten auch in der PPMI-Kohorte, die als Validierungskohorte hinzugezogen wurde, bestätigt werden. In der PPMI-Kohorte konnte der Effekt des früheren Beginns kognitiver Einschränkungen in der Gruppe der Männer gezeigt werden.

Die beschriebenen Erkenntnisse zeigen ein ähnliches Profil wie bereits publizierte Studien in gesunden Älteren und bei Alzheimer Demenz.

Almeida et al. konnten in ihrer Studie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung kognitiver Einschränkungen bei Patienten mit dem Klotho-Genotyp KL-VS Variante nachweisen (Almeida et al., 2017). Allerdings setzte sich deren Patientenkollektiv lediglich aus Männern in höherem Alter zusammen, die darüber hinaus zum Zeitpunkt der Rekrutierung gesund waren. Auch Mengel-

Diskussion

From et al. konnten die KL-VS Variante mit einem stärkeren kognitiven Abbau in Zusammenhang bringen (Mengel-From et al., 2015). Ihre Studie setzte den Fokus allerdings ebenfalls auf Individuen im fortgeschrittenen Alter, die ansonsten als gesund eingestuft werden konnten.

Es existieren jedoch auch Studien, die von gegensätzlichen Ergebnissen berichten. De Vries et al. beschreiben beispielsweise in ihrer longitudinalen Studie mit der Aberdeen Birth Cohorte von 1936 eine langsamere dementielle Entwicklung bei Trägern der KL-VS Variante, verbunden mit einem langsameren kognitiven Abbau (de Vries et al., 2017).

In einer weiteren Studie untersuchten de Vries et al. Zusammenhänge zwischen dem Klotho-Genotyp KL-VS-Variante und der Kognition im Kindes- und Jugendalter in einer Kohorte von 1387 Probanden im Alter von 3 bis 21 Jahren. Kinder und Jugendliche mit dem Klotho-Genotyp KL-VS Variante hatten demnach vor dem 11. Lebensjahr bessere kognitive Fähigkeiten als die Gruppe mit dem Klotho-Genotyp Wildtyp, nach dem 11. Lebensjahr jedoch schlechtere kognitive Fähigkeiten (de Vries et al., 2018). Der Einfluss des Klotho-Gens scheint demnach auch vom Alter beeinflusst zu werden.

Man sollte allerdings beachten, dass die beschriebenen Studien sehr spezielle Patientenkollektive untersucht haben. Keine Studie hat sich bisher mit den genauen Einflüssen der KL-VS Variante auf die Parkinson Erkrankung und deren Krankheitsverlauf in jeglicher Hinsicht auseinandergesetzt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie ist somit eine der ersten Studien, die gezielte Einflüsse auf die Parkinson Erkrankung analysiert. Die komplett verschiedenen Patientenkollektive könnten eine mögliche Erklärung für konträre Ergebnisse, wie beispielsweise in der Studie von de Vries et al. beschrieben, darstellen.

Einen weiteren Diskussionspunkt stellt die Interaktion von Klotho mit dem Geschlecht dar, wie sie auch in den oben beschriebenen Kohorten (Tübinger Kohorte 1 und PPMI-Kohorte) festzustellen ist.

Diskussion

Während in der Tübinger Kohorte der Klotho-Genotyp KL-VS Variante nur bei Frauen mit einem frühzeitigeren Beginn kognitiver Einschränkungen assoziiert war, zeigten sich in der PPMI-Kohorte entgegengesetzte Effekte, wobei Männer mit der KL-VS Variante früher von kognitiver Einschränkungen betroffen waren.

Diesen Ergebnissen zufolge scheint die Wirkung des Klotho-Genotyps von vielen verschiedenen Aspekten abzuhängen, die in zukünftigen Untersuchungen unter Berücksichtigung von Geschlechts-, Alters- und Lebensstilfaktoren näher untersucht werden sollten.

4.2.2 Tübinger Kohorte 2: Klotho-Genotyp und Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Vitamin D Metaboliten im Liquor

4.2.2.1 Vergleich der Liquor-Konzentrationen in gesunden Kontrollen und Parkinson-Patienten

Wie in Kapitel 3.2.3.1 bereits erläutert, standen im zweiten Schritt der Analyse die Konzentrationen von Klotho, FGF23 und Metaboliten des Vitamin D im Liquor im Vordergrund. Dabei sollten Parkinson-Patienten mit gesunden Kontrollen verglichen werden, um Parkinson-spezifische Besonderheiten analysieren zu können.

Die Gruppe der Parkinson-Patienten zeigte signifikant niedrigere Konzentrationen von Klotho und FGF23 im Liquor im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Im Gegensatz dazu lag die Konzentration der Vitamin D-Metaboliten in der Gruppe der Parkinson-Patienten über den Konzentrationen der gesunden Kontrollen.

Die signifikanten Unterschiede in den gemessenen Liquor-Konzentrationen zwischen der Gruppe der Parkinson-Patienten und den gesunden Kontrollen legen den Schluss nahe, dass das Klotho-Gen insbesondere bei der Parkinson Erkrankung eine bedeutende Rolle einnimmt. Die niedrigeren Konzentrationen des Langlebigkeits- und *Antiaging*-Gens Klotho scheinen bei Parkinson-Patienten Einfluss auf Verlauf, Entwicklung oder auch auf das Krankheitsrisiko zu haben.

Guo et al. konnten ähnliche Tendenzen beschreiben (Guo et al., 2017). Sie untersuchten ein Patientenkollektiv von Parkinson-Patienten und Patienten mit einer Multi-System-Atrophie und konnten niedrigere Klotho-Werte bestätigen. Allerdings war die Fallzahl deutlich kleiner als in der vorliegenden Studie und die Konzentrationen wurden im Serum gemessen und nicht wie in der vorliegenden Studie im Liquor.

Diskussion

In Bezug auf den Zusammenhang niedriger Klotho-Konzentrationen im Liquor und den klinischen Charakteristika der Parkinson Erkrankung konnte in der vorliegenden Studie eine Assoziation zwischen Klotho-Konzentrationen und dem UPDRS III und dem HYS festgestellt werden. Niedrige Klotho-Konzentrationen korrelieren mit höheren Werten im UPDRS III und HYS. Demnach beeinflusst das Klotho-Protein insbesondere die Pathophysiologie der motorischen Symptome. Dies führt zu einem schlechteren Abschneiden in den Tests, welche die motorische Komponente der Erkrankung bewerten (UPDRS III und HYS).

Der genaue Pathway und die Rolle von Klotho in diesem Zusammenhang, sowie die Einflüsse des Vitamin D Metabolismus und die Funktion von FGF23 werden im folgenden Kapitel (Kapitel 4.2.3.1) detailliert diskutiert.

Da die niedrigeren Konzentrationen von Klotho und FGF23 im Liquor bei Parkinson-Patienten auch in geschlechtergetrennten Analysen bestätigt werden konnten, scheint das Geschlecht als Ursache für die signifikanten Unterschiede eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.2.3 Die Rolle von Klotho in Bezug auf beschleunigtes Altern und Neurodegeneration

4.2.3.1 Pathway 1: Klotho als Co-Rezeptor für FGF23 im Vitamin D Metabolismus

Von großem Interesse in Bezug auf beschleunigtes Altern und Neurodegeneration ist der Metabolismus von Vitamin D. Klotho spielt hierbei als Co-Rezeptor von FGF23 eine zentrale Rolle in der Regulation des Vitamin D Metabolismus (Urakawa et al., 2006). Die transmembrane Form des Klotho-Proteins ist in der Lage mit FGF23 einen Komplex zu bilden, welcher einen hemmenden Einfluss auf das Schlüsselenzym 1-alpha-Hydroxylase hat. Die 1-alpha-Hydroxylase katalysiert den letzten Schritt der Umwandlung der Vitamin D-Vorstufen in das metabolisch aktive 1,25-Dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) oder auch Calciferol genannt. Eine Hemmung der 1-alpha-Hydroxylase hat daher eine geringere Form des aktiven Vitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) zur Folge, da weniger Anteile der Vorstufe 25-Hydroxycholecalciferol in die aktive Form umgewandelt werden können.

Abbildung 15 zeigt nochmals graphisch den beschriebenen Vitamin D-Metabolismus und die Rolle von Klotho in diesem Zusammenspiel.

Interessanterweise konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Mäuse mit einem Klotho-Defizit eine vermehrte Degeneration nigrostrialer dopaminergere Neurone zeigen, was allerdings durch eine strikte Vitamin D-Restriktion wieder behoben werden konnte (Kosakai et al., 2011).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in der vorliegenden Studie, wobei in einer großen Kohorte von Parkinson-Patienten eine verminderte Konzentration von FGF23 und Klotho im Liquor gefunden werden konnte, im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Auch in weiteren neurodegenerativen Erkrankungen spielt das Klotho-Protein eine wichtige Rolle. In einer kleinen Studie mit Alzheimer Patienten konnte

Diskussion

gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu der Kontrollgruppe ebenfalls geringere Klotho-Konzentrationen im Liquor aufweisen (Semba et al., 2014).

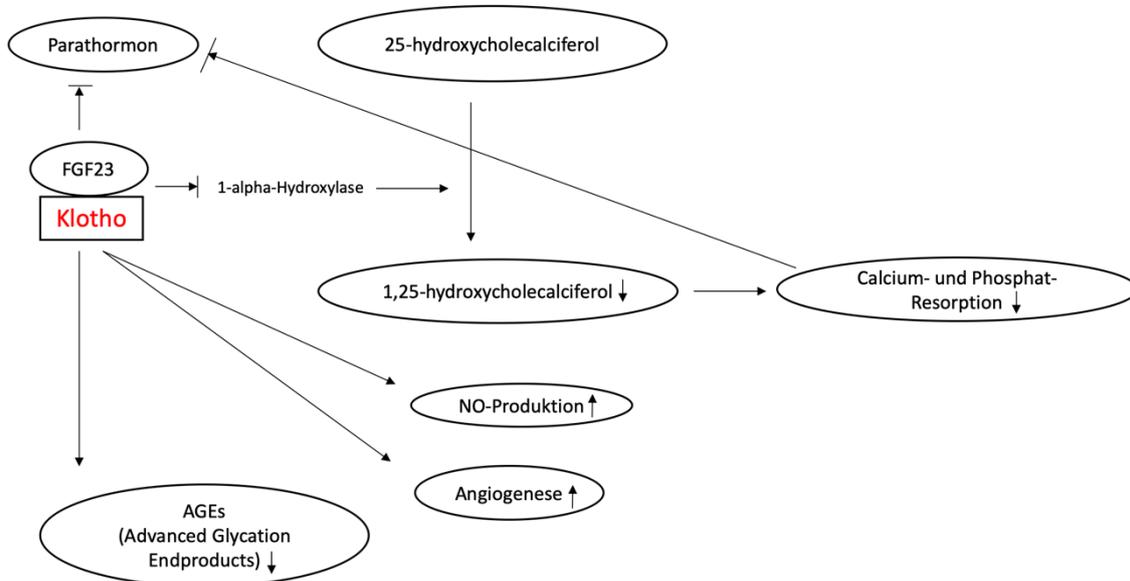


Abbildung 15: Vitamin D Metabolismus und die Rolle von Klotho. Der FGF23-Rezeptor bildet mit der transmembranen Form des Klotho-Proteins einen Komplex, welcher zu einer Hemmung der 1-alpha-Hydroxylase führt. Dies bewirkt eine verminderte Umwandlung von 25-hydroxycholecalciferol in die aktive Form 1,25-dihydroxycholecalciferol. Folgen sind eine gesteigerte Resorption von Calcium und Phosphat, was im Umkehrschluss die Freisetzung von Parathormon stimuliert. Die lösliche Komponente des Klotho-Proteins stimuliert die NO-Produktion, fördert Vasodilatationen und senkt die Bildung von AGEs (advanced glycation endproducts). © Milan Zimmermann

Im Zusammenhang mit dem schützenden Effekt einer Vitamin D-Restriktion (Kosakai et al., 2011) kann auch ein direkter pathogener Effekt von Vitamin D selbst diskutiert werden. Hohe Konzentrationen von 1,25-dihydroxycholecalciferol, verursacht durch eine unzureichende Hemmung der 1-alpha-Hydroxylase, führen zu einer vermehrten Resorption von Calcium und Phosphat, welche Ablagerungen an Gefäßwänden und im Umkehrschluss zusätzlich die Freisetzung von Parathormon aus den Nebenschilddrüsen stimuliert.

Allerdings werden die Rolle und die Bedeutung von Vitamin D in der Literatur kontrovers diskutiert. Besonders im Bereich der Alzheimer-Forschung

Diskussion

(Littlejohns et al., 2014), aber auch in Studien mit Parkinson-Patienten (Lv et al., 2014) wurden protektive Effekte des Vitamin D in Bezug auf die Erkrankung festgestellt. Jedoch wurde in der bisher veröffentlichten Literatur lediglich der Vitamin D-Wert isoliert betrachtet und die übrigen Komponenten (Klotho und FGF23), welche wie oben beschrieben ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf den Vitamin D-Metabolismus haben, außer Acht gelassen. Das bedeutet, dass lediglich der letzte Schritt eines langen Pathway betrachtet und in die Analyse eingeschlossen wurde. Andere Komponenten, wie beispielsweise das Klotho-Protein, als entscheidender Modulator des gesamten Pathway, wurden nicht berücksichtigt.

4.2.3.2 Pathway 2: Klotho als Faktor im Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies

Neben dem Vitamin D-Metabolismus spielt Klotho auch in dem Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine entscheidende Rolle (Dias et al., 2013). Der Komplex aus Klotho und FGF23 führt zu einer höheren Expression von SOD2 und CAT über FOXO3a. Durch die erhöhte Expression von SOD2 und CAT kann vermehrt ROS abgebaut werden.

Allerdings aktiviert der Komplex aus Klotho und FGF23 neben den beiden Enzymen des ROS-Abbaus auch die NADPH Oxidase, die ihrerseits zur ROS-Produktion beiträgt. Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen der ROS-Produktion und der ROS-Entgiftung. Kommt es jedoch zu einem Mangel an Klotho, so verlagert sich dieses Gleichgewicht. Der Weg über die Expression von SOD2 und CAT wird stärker gehemmt als die NADPH Oxidase, was eine Überproduktion von ROS zur Folge hat (Richter et al., 2016).

Ein weiterer Effekt von Klotho und dem FGF23 Rezeptor ist die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase, was folglich zu einer verstärkten NO-Produktion führt (Richter et al., 2016).

In der folgenden Abbildung (Abbildung 16) ist die Rolle des Klotho-Proteins im ROS-Metabolismus graphisch dargestellt.

Oxidativer Stress, der durch ein Ungleichgewicht zwischen ROS-Produktion und ROS-Abbau zustande kommt, spielt nicht nur bei der Pathophysiologie der Parkinson Erkrankung eine wichtige Rolle (Drechsel and Patel, 2008).

Viele Studien konnten auch Zusammenhänge des ROS-Metabolismus mit weiteren neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise der Alzheimer Erkrankung, finden (Tabner et al., 2001) (Manoharan et al., 2016).

Diese Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob Dysfunktionen im Klotho Pathway generell als Einflussfaktoren für einen beschleunigten Alterungsprozess und die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen bewertet werden können.

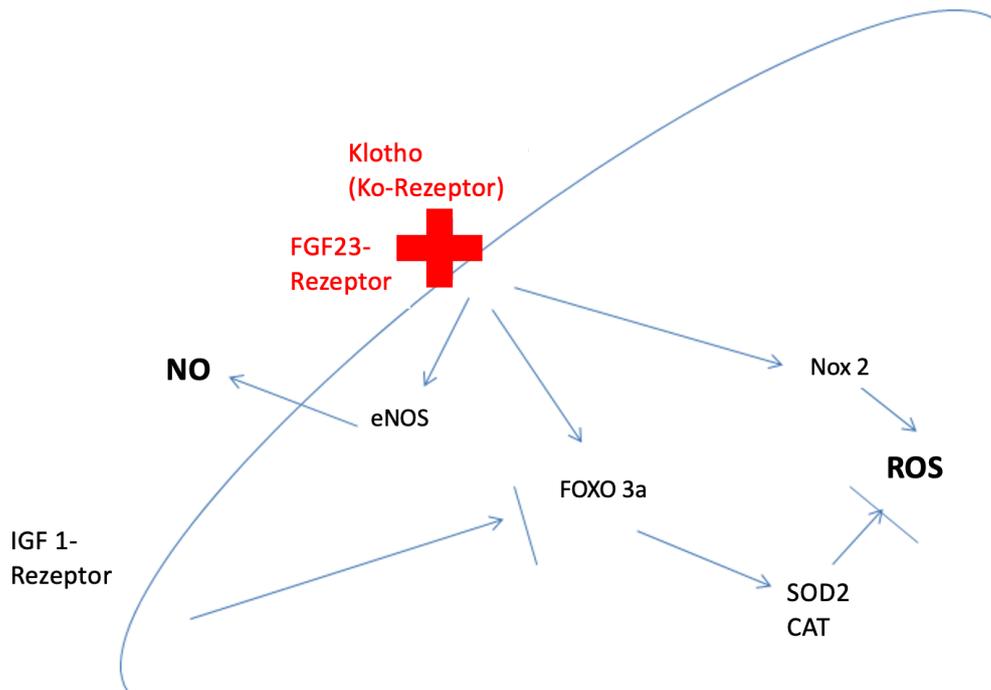


Abbildung 16: Klotho im ROS Metabolismus und der NO-Produktion. Der Komplex aus Klotho und FGF23 bewirkt eine erhöhte Expression von SOD2 und CAT über FOXO3a, was zu einer Entgiftung von ROS führt. Auf der anderen Seite wird ebenfalls die NADPH Oxidase durch den Komplex aus Klotho und FGF23 aktiviert, was eine erhöhte ROS-Produktion zur Folge hat. Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht, das allerdings durch einen Klotho-Mangel auf die Seite der ROS-Produktion verschoben wird. Die Folge ist eine Überproduktion von ROS. Außerdem ist die Aktivierung der NO-Synthase durch den Komplex aus FGF23 Rezeptor und Klotho in der Abbildung dargestellt. © Milan Zimmermann

In dieser Studie stand die Analyse von Auswirkungen gezielt auf die Parkinson Erkrankung im Vordergrund. Bei Betrachtung der beiden Pathways (ROS-Metabolismus, Vitamin D-Metabolismus), in denen Klotho eine regulatorische Schlüsselposition einnimmt, ist es naheliegend, dass sich dieses Muster auch auf weitere neurodegenerative Erkrankungen übertragen lässt.

Im Falle der Alzheimer Erkrankung wird die Rolle von Klotho und insbesondere die in dieser Studie untersuchte Klotho KL-VS Variante kontrovers diskutiert. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass der Klotho-Genotyp KL-VS Variante bei gesunden Probanden im Alter von 61 Jahren ohne kognitive Einschränkungen möglicherweise vor der Wirkung des APOE ε4-Genotyps

Diskussion

schützt. Der APOE ϵ 4-Genotyp gilt als wichtigster genetischer Risikofaktor für eine Alzheimer Erkrankung (Bajaj et al., 2018). Während bei Probanden mit dem Wildtyp-Genotyp das Vorhandensein von mindestens einem APOE ϵ 4-Allel zu einer erhöhten Amyloidbelastung führte, war dieser Effekt bei Trägern der KL-VS Variante deutlich reduziert (Erickson et al., 2019).

Im Gegensatz dazu konnte in einer ähnlichen Studie aus Australien mit kognitiv gesunden, älteren Probanden kein Zusammenhang zwischen dem Klotho-Genotyp KL-VS Variante, neokortikaler Amyloidbelastung und dem Vorhandensein eines APOE ϵ 4-Allels festgestellt werden (Porter et al., 2019).

Bei der Parkinson Erkrankung sind neben der α -Synuclein-Pathologie auch Pathologien der Alzheimer Erkrankung und vaskuläre Risikoprofile mit den kognitiven Einschränkungen verbunden.

Klotho scheint demnach eine entscheidende Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zu spielen. Denkbar ist sowohl eine Beeinflussung des Krankheitsrisikos als auch die Beeinflussung des Krankheitsverlaufes beispielsweise in Bezug auf die Entwicklung kognitiver Einschränkungen im Rahmen einer Parkinson Erkrankung.

4.2.4 Klotho-Genotyp KL-VS Variante spezifische Effekte der Liquor-Konzentrationen

Um eine Aussage über Genotyp-spezifische Effekte der KL-VS Variante treffen zu können, wurden die Parkinson-Patienten mit dem Wildtyp Genotyp mit den Trägern der KL-VS Variante verglichen.

Überraschenderweise zeigten Parkinson-Patienten, die Träger der KL-VS Variante waren, sowohl höhere Konzentrationen im Liquor von Klotho, als auch höhere 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Konzentrationen. Diese Ergebnisse konnten auch nach einem Matching für das Alter und das Geschlecht bestätigt werden. Damit scheinen diese Parameter als zusätzliche Einflussfaktoren keine bedeutende Rolle zu spielen.

Die Kombination von sowohl höheren Klotho- als auch höheren Vitamin D-Konzentrationen im Liquor stellt eine Besonderheit dar, da durch die Hemmung der 1-alpha-Hydroxylase auf Grund hoher Klotho- und FGF23 Konzentrationen, unter physiologischen Bedingungen weniger metabolisch aktives Vitamin D (1,25-dihydroxycholecalciferol) gebildet wird.

Denkbar wäre, dass dieser Kombination ein kompensatorischer Mechanismus zugrunde liegt, welcher trotz hohen Vitamin D-Konzentrationen zu einer Hochregulierung von Klotho führt. Insbesondere Veränderungen der Funktion des Klotho-Proteins könnten dabei eine entscheidende Rolle spielen.

Der Klotho-Genotyp KL-VS Variante könnte demnach die Fähigkeit des Klotho-Proteins beeinträchtigen, den FGF23-Rezeptor zu aktivieren, was eine geringere Gesamtaktivität des Komplexes aus Klotho und FGF23 zur Folge hätte. Dadurch ließe sich auch die verminderte Hemmung der 1-alpha-Hydroxylase erklären und die daraus resultierenden höheren Konzentrationen von 1,25-Dihydroxycholecalciferol.

Die Hochregulierung des Klotho-Proteins wäre demnach seiner eingeschränkten Fähigkeit, mit dem FGF23-Rezeptor zusammen die 1-alpha-Hydroxylase zu hemmen, geschuldet. Ähnliche Rückkopplungsmechanismen, die eine Hochregulierung in Folge der Rückkopplung bewirken, sind bereits für FGF23 beschrieben (Kolek et al., 2005).

4.3 Ausblick

Das Klotho-Gen ist von großer klinischer Bedeutung und sollte auch in zukünftigen Studien weiter untersucht werden. Viele Mechanismen, in denen Klotho eine zentrale Rolle einnimmt (Vitamin D Metabolismus (Abbildung 15), ROS Metabolismus (Abbildung 16)), sind nicht nur in der Parkinsonforschung von großer Bedeutung, sondern lassen sich auch auf weitere neurodegenerative Erkrankungen übertragen.

In dieser Studie wurde das Klotho-Gen sowohl in Bezug auf seine modifizierenden Einflüsse auf die Parkinson Erkrankung untersucht als auch die Frage gestellt, ob es sich um ein „*disease causing Gen*“ handeln könnte.

Ob ein direkter Zusammenhang zwischen dem Klotho-Gen und der Entstehung einer Parkinson Erkrankung besteht, konnte auf Grund der geringen Fallzahlen der Patienten mit der Klotho L109R Mutation nicht abschließend geklärt werden. Dass die Mutation in der untersuchten Kohorte an Parkinson-Patienten nur geringfügig häufiger zu finden war als in der Gesamtbevölkerung, spricht gegen einen direkten krankheitsauslösenden Zusammenhang. Allerdings könnte in zukünftigen Studien mit größeren Fallzahlen von Parkinson-Patienten und eventuell einer Sequenzierung von gesunden Kontrollen dieser Ansatz erneut untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Varianten des Klotho-Gens, wie die beschriebene KL-VS Variante, zusammen mit ihren entsprechenden Liquor-Konzentrationen mit dem Grad der motorischen und kognitiven Einschränkung durch die Parkinson Erkrankung assoziiert werden können.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Signalwege, die mit frühzeitigen Alterungsprozessen in Verbindung stehen, großen Einfluss auf die Erkrankung haben. Deren Einfluss auf die Ausprägung und den Verlauf einer Parkinson Erkrankung sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

In diesem Zusammenhang ist insbesondere die genaue Interaktion der beschriebenen Signalwege und der damit verbundenen Neurodegeneration von großem Interesse. Dieser Gesichtspunkt könnte neue Ansatzpunkte für eine gezielte Biomarker-Suche und zukünftige Behandlungsoptionen liefern.

4.4 Limitationen der Arbeit

Generell sollte angemerkt werden, dass longitudinale klinische Daten in der Auswertung verwendet wurden, um klinische Entwicklungen der Erkrankung beurteilen zu können. Der MoCA, der für die Klassifizierung dementer und nicht-dementer Patienten verwendet wurde, kann beispielsweise durch viele Störfaktoren beeinflusst werden. Durch minimal verschiedene Rahmenbedingungen, wie unterschiedliche Untersucher oder auch der Tagesform des Patienten geschuldet, kann es zu Verzerrungen der tatsächlichen kognitiven Fähigkeiten kommen. Dies kann eine fehlerhafte Klassifizierung eines Patienten zur Folge haben.

Ähnliches gilt auch für die Einschätzung der motorischen Beeinträchtigung des Patienten durch den UPDRS III und den HYS. Die Klassifizierung erfolgt nach genauen Leitlinien, kann allerdings dennoch zwischen unterschiedlichen Untersuchern leicht variieren, was sich ebenfalls auf die longitudinalen Daten auswirken kann.

Eine Einschränkung dieser Arbeit, die in zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollte, stellt die biochemische Bestimmung des ROS Metabolismus dar. Die Metaboliten, die in dieser Arbeit biochemisch bestimmt wurden, lassen nur indirekte Rückschlüsse auf Metaboliten des ROS Metabolismus zu. Interessant wäre eine direkte Bestimmung dieser Metaboliten, um die Beeinflussung des Pathway durch Klotho auch anhand abweichender Konzentrationen abbilden zu können.

Zusätzlich wäre es wünschenswert, in zukünftigen Studien auch die Liquor-Konzentrationen für die Validierungskohorte aus der PPMI Datenbank zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Auf Grund der großen phänotypischen Variabilität der Parkinson Erkrankung sind krankheitsbeeinflussende genetische Varianten und Mutationen von immer größerem wissenschaftlichem Interesse. Neben veränderten Genprodukten und Proteinen, scheinen auch Signalwege einen entscheidenden Einfluss auf die phänotypische Variabilität der Parkinson Erkrankung zu nehmen.

Da insbesondere das Alter als Risikofaktor der Parkinson Erkrankung bekannt ist, stellt das Alters- und Langlebigkeitsgen Klotho in diesem Zusammenhang einen vielversprechenden Ansatz dar.

Dementsprechend war das Ziel der durchgeführten Studie, Phänotyp-modifizierende Effekte von Varianten im Langlebigkeitsgen Klotho auf die Parkinson Erkrankung zu untersuchen und deren entsprechende Proteinprofile im Liquor abzubilden. Dabei wurde zum einen die Klotho L109R Mutation untersucht, wofür 370 Parkinson-Patienten sequenziert und das Vorliegen der Mutation L109R im Klotho-Gen überprüft wurde.

Zum anderen wurden Einflüsse der Klotho KL-VS Variante analysiert. Hierfür wurden drei Kohorten untersucht. In der einen Kohorte wurde bei 459 Parkinson-Patienten eine Genotypisierung der KL-VS Variante im Klotho-Gen durchgeführt. In der zweiten Kohorte wurden sowohl bei 125 Parkinson-Patienten als auch bei 50 gesunden Kontrollen biochemische Liquor-Analysen vorgenommen. Als Validierungskohorte wurde eine dritte Kohorte mit 297 Parkinson-Patienten aus der PPMI Datenbank (Parkinson's Progression Markers Initiative) hinzugezogen.

Der Einfluss der Klotho L109R Mutation auf die Parkinson Erkrankung konnte auf Grund der geringen Anzahl an Mutationsträgern in der untersuchten Kohorte nicht endgültig geklärt werden.

Im Falle der Klotho KL-VS Variante konnte allerdings gezeigt werden, dass Parkinson-Patienten mit dem Genotyp KL-VS Variante früher im Verlauf der Parkinson Erkrankung kognitive Beeinträchtigungen aufweisen und höhere Werte im UPDRS III zeigen.

Zusammenfassung

Bezüglich der Proteinkonzentrationen im Liquor wurden bei Parkinson-Patienten unabhängig vom Geschlecht im Vergleich zu gesunden Kontrollen niedrigere Klotho- und FGF23 Konzentrationen festgestellt. Außerdem konnte ein Zusammenhang von niedrigen Klotho-Werten im Liquor mit höheren Werten im UPDRS III und HYS gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass genetische Varianten im Klotho-Gen und deren entsprechende Proteinprofile im Liquor mit der Ausprägung der Parkinson Erkrankung assoziiert sind. Mit dem Alter verbundene Signalwege scheinen dementsprechend vielversprechende Ansätze für zukünftige Biomarkerforschung im Rahmen der Parkinson Erkrankung zu sein. Diese sollten auch Bestandteil weiterer multizentrischer und randomisierter Studien sein.

6 Literaturverzeichnis

- AARSLAND, D., ANDERSEN, K., LARSEN, J. P., LOLK, A., NIELSEN, H. & KRAGH-SØRENSEN, P. 2001. Risk of dementia in Parkinson's disease. *A community-based, prospective study*, 56, 730-736.
- AARSLAND, D. & KURZ, M. W. 2010. The epidemiology of dementia associated with Parkinson's disease. *Brain Pathol*, 20, 633-9.
- ABRAHAM, C. R., CHEN, C., CUNY, G. D., GLICKSMAN, M. A. & ZELDICH, E. 2012. Small-molecule Klotho enhancers as novel treatment of neurodegeneration. *Future medicinal chemistry*, 4, 1671-1679.
- ALEXANDER, G. E. 2004. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin Neurosci*, 6, 259-80.
- ALMEIDA, O. P., MORAR, B., HANKEY, G. J., YEAP, B. B., GOLLEDGE, J., JABLENSKY, A. & FLICKER, L. 2017. Longevity Klotho gene polymorphism and the risk of dementia in older men. *Maturitas*, 101, 1-5.
- ARKING, D. E., ATZMON, G., ARKING, A., BARZILAI, N. & DIETZ, H. C. 2005. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circulation research*, 96, 412-418.
- ARKING, D. E., BECKER, D. M., YANEK, L. R., FALLIN, D., JUDGE, D. P., MOY, T. F., BECKER, L. C. & DIETZ, H. C. 2003. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *The American Journal of Human Genetics*, 72, 1154-1161.
- ARKING, D. E., KREBSOVA, A., MACEK, M., ARKING, A., MIAN, I. S., FRIED, L., HAMOSH, A., DEY, S., MCINTOSH, I. & DIETZ, H. C. 2002. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 856-861.
- AUTON, A., BROOKS, L. D., DURBIN, R. M., GARRISON, E. P., KANG, H. M., KORBEL, J. O., MARCHINI, J. L., MCCARTHY, S., MCVEAN, G. A. & ABECASIS, G. R. 2015. A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526, 68-74.
- BAJAJ, T., RAMIREZ, A. & WAGNER-THELEN, H. 2018. Genetik der Alzheimer-Krankheit. *medizinische genetik*, 30, 259-266.
- BALDERESCHI, M., DI CARLO, A., ROCCA, W. A., VANNI, P., MAGGI, S., PERISSINOTTO, E., GRIGOLETTO, F., AMADUCCI, L. & INZITARI, D. 2000. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study. *Two-fold higher incidence in men*, 55, 1358-1363.
- BECK, A. S., RA.; BROWN GK. 1996. *Manual for the Beck Depression Inventory-II*, San Antonio, Psychological Corporation.
- BEN-DOV, I. Z., GALITZER, H., LAVI-MOSHAYOFF, V., GOETZ, R., KURO-O, M., MOHAMMADI, M., SIRKIS, R., NAVEH-MANY, T. & SILVER, J. 2007. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest*, 117, 4003-8.
- BERG, D., LANG, A. E., POSTUMA, R. B., MAETZLER, W., DEUSCHL, G., GASSER, T., SIDEROWF, A., SCHAPIRA, A. H., OERTEL, W., OBESO, J. A., OLANOW, C. W., POEWE, W. & STERN, M. 2013. Changing the research criteria for the diagnosis of Parkinson's disease: obstacles and opportunities. *Lancet Neurol*, 12, 514-24.
- BRAAK, H., DEL TREDICI, K., RUB, U., DE VOS, R. A., JANSEN STEUR, E. N. & BRAAK, E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24, 197-211.

- BRAAK, H., GHEBREMEDHIN, E., RUB, U., BRATZKE, H. & DEL TREDICI, K. 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*, 318, 121-34.
- BROCKMANN, K. & GASSER, T. 2010. WISSENSCHAFT-Genetische Hintergründe der Parkinsonerkrankung. *BIOspektrum*, 16, 260.
- BROCKMANN, K., GROGER, A., DI SANTO, A., LIEPELT, I., SCHULTE, C., KLOSE, U., MAETZLER, W., HAUSER, A. K., HILKER, R., GOMEZ-MANCILLA, B., BERG, D. & GASSER, T. 2011a. Clinical and brain imaging characteristics in leucine-rich repeat kinase 2-associated PD and asymptomatic mutation carriers. *Mov Disord*, 26, 2335-42.
- BROCKMANN, K., SRULIJES, K., HAUSER, A. K., SCHULTE, C., CSOTI, I., GASSER, T. & BERG, D. 2011b. GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics. *Neurology*, 77, 276-80.
- BUTER, T. C., VAN DEN HOUT, A., MATTHEWS, F. E., LARSEN, J. P., BRAYNE, C. & AARSLAND, D. 2008. Dementia and survival in Parkinson disease: a 12-year population study. *Neurology*, 70, 1017-22.
- CARGILL, M., ALTSHULER, D., IRELAND, J., SKLAR, P., ARDLIE, K., PATIL, N., SHAW, N., LANE, C. R., LIM, E. P., KALYANARAMAN, N., NEMESH, J., ZIAUGRA, L., FRIEDLAND, L., ROLFE, A., WARRINGTON, J., LIPSHUTZ, R., DALEY, G. Q. & LANDER, E. S. 1999. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*, 22, 231-8.
- CHANG, D., NALLS, M. A., HALLGRÍMSDÓTTIR, I. B., HUNKAPILLER, J., VAN DER BRUG, M., CAI, F., KERCHNER, G. A., AYALON, G., BINGOL, B. & SHENG, M. 2017. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nature genetics*, 49, 1511.
- CHAUDHURI, K. R., HEALY, D. G. & SCHAPIRA, A. H. 2006. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*, 5, 235-45.
- COMMITTEE, G. P. S. D. S. S. 2002. Factors impacting on quality of life in Parkinson's disease: results from an international survey. *Movement Disorders*, 17, 60-67.
- DE LAU, L. M. L. & BRETELER, M. M. B. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5, 525-535.
- DE VRIES, C. F., STAFF, R. T., HARRIS, S. E., CHAPKO, D., WILLIAMS, D. S., REICHERT, P., AHEARN, T., MCNEIL, C. J., WHALLEY, L. J. & MURRAY, A. D. 2017. Klotho, APOE ϵ 4, cognitive ability, brain size, atrophy, and survival: a study in the Aberdeen Birth Cohort of 1936. *Neurobiology of aging*, 55, 91-98.
- DE VRIES, C. F., STAFF, R. T., NOBLE, K. G., MUETZEL, R. L., VERNOOIJ, M. W., WHITE, T., WAITER, G. D. & MURRAY, A. D. 2018. Klotho gene polymorphism, brain structure and cognition in early-life development. *Brain imaging and behavior*, 1-13.
- DEXTER, D. T. & JENNER, P. 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132-144.
- DIAS, V., JUNN, E. & MOURADIAN, M. M. 2013. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*, 3, 461-91.
- DORSEY, E. R. & BLOEM, B. R. 2018. The Parkinson pandemic—a call to action. *JAMA neurology*, 75, 9-10.
- DRECHSEL, D. A. & PATEL, M. 2008. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 44, 1873-1886.
- DUBAL, D. B., YOKOYAMA, J. S., ZHU, L., BROESTL, L., WORDEN, K., WANG, D., STURM, V. E., KIM, D., KLEIN, E. & YU, G.-Q. 2014. Life extension factor klotho enhances cognition. *Cell reports*, 7, 1065-1076.

Literaturverzeichnis

- DUERR, S., WENNING, G., SEPPI, K. & POEWE, W. 2012. Atypische Parkinson-Syndrome–Aktuelles aus Diagnostik und Therapie. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*, 80, 492-500.
- EMRE, M., AARSLAND, D., BROWN, R., BURN, D. J., DUYCKAERTS, C., MIZUNO, Y., BROE, G. A., CUMMINGS, J., DICKSON, D. W., GAUTHIER, S., GOLDMAN, J., GOETZ, C., KORCZYN, A., LEES, A., LEVY, R., LITVAN, I., MCKEITH, I., OLANOW, W., POEWE, W., QUINN, N., SAMPAIO, C., TOLOSA, E. & DUBOIS, B. 2007. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord*, 22, 1689-707; quiz 1837.
- ERICKSON, C. M., SCHULTZ, S. A., OH, J. M., DARST, B. F., MA, Y., NORTON, D., BETTHAUSER, T., GALLAGHER, C. L., CARLSSON, C. M., BENDLIN, B. B., ASTHANA, S., HERMANN, B. P., SAGER, M. A., BLENNOW, K., ZETTERBERG, H., ENGELMAN, C. D., CHRISTIAN, B. T., JOHNSON, S. C., DUBAL, D. B. & OKONKWO, O. C. 2019. KLOTHO heterozygosity attenuates APOE4-related amyloid burden in preclinical AD. *Neurology*, 92, e1878-e1889.
- ERIKSEN, J. L., DAWSON, T. M., DICKSON, D. W. & PETRUCCELLI, L. 2003. Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease. *Neuron*, 40, 453-6.
- FERRI, C. P., PRINCE, M., BRAYNE, C., BRODATY, H., FRATIGLIONI, L., GANGULI, M., HALL, K., HASEGAWA, K., HENDRIE, H. & HUANG, Y. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The lancet*, 366, 2112-2117.
- FOLSTEIN, M. F., FOLSTEIN, S. E. & MCHUGH, P. R. 1975. "Mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*, 12, 189-198.
- FORTIN, D. L., TROYER, M. D., NAKAMURA, K., KUBO, S., ANTHONY, M. D. & EDWARDS, R. H. 2004. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J Neurosci*, 24, 6715-23.
- FUKINO, K., SUZUKI, T., SAITO, Y., SHINDO, T., AMAKI, T., KURABAYASHI, M. & NAGAI, R. 2002. Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene klotho. *Biochemical and biophysical research communications*, 293, 332-337.
- GASSER, T. 2007. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 22 Suppl 17, S343-50.
- GAZEWOOD, J. D., RICHARDS, D. R. & CLEBAK, K. 2013. Parkinson disease: an update. *Am Fam Physician*, 87, 267-73.
- GOETZ, C. G., POEWE, W., RASCOL, O., SAMPAIO, C., STEBBINS, G. T., COUNSELL, C., GILADI, N., HOLLOWAY, R. G., MOORE, C. G., WENNING, G. K., YAHR, M. D. & SEIDL, L. 2004. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations. *Mov Disord*, 19, 1020-8.
- GOETZ, C. G., TILLEY, B. C., SHAFTMAN, S. R., STEBBINS, G. T., FAHN, S., MARTINEZ-MARTIN, P., POEWE, W., SAMPAIO, C., STERN, M. B., DODEL, R., DUBOIS, B., HOLLOWAY, R., JANKOVIC, J., KULISEVSKY, J., LANG, A. E., LEES, A., LEURGANS, S., LEWITT, P. A., NYENHUIS, D., OLANOW, C. W., RASCOL, O., SCHRAG, A., TERESI, J. A., VAN HILTEN, J. J. & LAPELLE, N. 2008. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord*, 23, 2129-70.
- GUO, Y., ZHUANG, X. D., XIAN, W. B., WU, L. L., HUANG, Z. N., HU, X., ZHANG, X. S., CHEN, L. & LIAO, X. X. 2017. Serum Klotho, vitamin D, and homocysteine in combination predict the outcomes of Chinese patients with multiple system atrophy. *CNS Neurosci Ther*, 23, 657-666.

Literaturverzeichnis

- HAAXMA, C. A., BLOEM, B. R., BORM, G. F., OYEN, W. J., LEENDERS, K. L., ESHUIS, S., BOOIJ, J., DLUZEN, D. E. & HORSTINK, M. W. 2007. Gender differences in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 78, 819-824.
- HALLIDAY, G., HELY, M., REID, W. & MORRIS, J. 2008. The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*, 115, 409-415.
- HALLIDAY, G. M., HOLTON, J. L., REVESZ, T. & DICKSON, D. W. 2011. Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies. *Acta neuropathologica*, 122, 187-204.
- HARDY, J., CAI, H., COOKSON, M. R., GWINN-HARDY, K. & SINGLETON, A. 2006. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol*, 60, 389-98.
- HELY, M. A., REID, W. G., ADENA, M. A., HALLIDAY, G. M. & MORRIS, J. G. 2008. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Movement disorders*, 23, 837-844.
- HOOPS, S., NAZEM, S., SIDEROWF, A. D., DUDA, J. E., XIE, S. X., STERN, M. B. & WEINTRAUB, D. 2009. Validity of the MoCA and MMSE in the detection of MCI and dementia in Parkinson disease. *Neurology*, 73, 1738-45.
- HUGHES, A. J., DANIEL, S. E., KILFORD, L. & LEES, A. J. 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55, 181-4.
- JANKOVIC, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79, 368-76.
- KALIA, L. V. & LANG, A. E. 2015. Parkinson's disease. *Lancet*, 386, 896-912.
- KAMEMORI, M., OHYAMA, Y., KURABAYASHI, M., TAKAHASHI, K., NAGAI, R. & FURUYA, N. 2002. Expression of Klotho protein in the inner ear. *Hear Res*, 171, 103-110.
- KARASIK, D. & NEWMAN, A. 2015. Models to explore genetics of human aging. *Longevity Genes*. Springer.
- KOLEK, O. I., HINES, E. R., JONES, M. D., LESUEUR, L. K., LIPKO, M. A., KIELA, P. R., COLLINS, J. F., HAUSSLER, M. R. & GHISHAN, F. K. 2005. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289, G1036-42.
- KOLLER, W. C., BARR, A. & BIARY, N. 1982. Estrogen treatment of dyskinetic disorders. *Neurology*, 32, 547-9.
- KOSAKAI, A., ITO, D., NIHEI, Y., YAMASHITA, S., OKADA, Y., TAKAHASHI, K. & SUZUKI, N. 2011. Degeneration of mesencephalic dopaminergic neurons in klotho mouse related to vitamin D exposure. *Brain research*, 1382, 109-117.
- KURO-O, M. 2009. Klotho and aging. *Biochim Biophys Acta*, 1790, 1049-58.
- KURO-O, M., MATSUMURA, Y., AIZAWA, H., KAWAGUCHI, H., SUGA, T., UTSUGI, T., OHYAMA, Y., KURABAYASHI, M., KANAME, T., KUME, E., IWASAKI, H., IIDA, A., SHIRAKI-IIDA, T., NISHIKAWA, S., NAGAI, R. & NABESHIMA, Y. I. 1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390, 45-51.
- KUROSU, H., OGAWA, Y., MIYOSHI, M., YAMAMOTO, M., NANDI, A., ROSENBLATT, K. P., BAUM, M. G., SCHIAVI, S., HU, M.-C. & MOE, O. W. 2006. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *Journal of Biological Chemistry*.
- KUROSU, H., YAMAMOTO, M., CLARK, J. D., PASTOR, J. V., NANDI, A., GURNANI, P., MCGUINNESS, O. P., CHIKUDA, H., YAMAGUCHI, M., KAWAGUCHI, H., SHIMOMURA, I., TAKAYAMA, Y., HERZ, J., KAHN, C. R., ROSENBLATT, K.

Literaturverzeichnis

- P. & KURO-O, M. 2005. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*, 309, 1829-33.
- LANG, A. E. & LOZANO, A. M. 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, 339, 1044-53.
- LEE, M. S. & MARSDEN, C. D. 1994. Movement disorders following lesions of the thalamus or subthalamic region. *Mov Disord*, 9, 493-507.
- LEIBROCK, C. B., VOELKL, J., KURO-O, M., LANG, F. & LANG, U. E. 2016. 1, 25 (OH) 2 D 3 dependent overt hyperactivity phenotype in klotho-hypomorphic mice. *Scientific reports*, 6, 24879.
- LEVY, G., TANG, M. X., LOUIS, E. D., COTE, L. J., ALFARO, B., MEJIA, H., STERN, Y. & MARDER, K. 2002. The association of incident dementia with mortality in PD. *Neurology*, 59, 1708-13.
- LITTLEJOHNS, T. J., HENLEY, W. E., LANG, I. A., ANNWEILER, C., BEAUCHET, O., CHAVES, P. H., FRIED, L., KESTENBAUM, B. R., KULLER, L. H. & LANGA, K. M. 2014. Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Neurology*, 83, 920-928.
- LUBOMSKI, M., LOUISE RUSHWORTH, R., LEE, W., BERTRAM, K. L. & WILLIAMS, D. R. 2014. Sex differences in Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21, 1503-1506.
- LUCE, M., MARCAIS, C., MAUCORT-BOULCH, D., DRAI, J., JEAN, G. & FOUQUE, D. 2015. SaO025KLOTHO'S GENETIC VARIANTS IMPACTS ON SERUM KLOTHO AND CARDIOVASCULAR MORBIMORTALITY IN ADULT MAINTENANCE DIALYSIS PATIENTS. *Nephrology dialysis transplantation*, 30, iii34-iii34.
- LV, Z., QI, H., WANG, L., FAN, X., HAN, F., WANG, H. & BI, S. 2014. Vitamin D status and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci*, 35, 1723-30.
- MAETZLER, W., KARAM, M., BERGER, M. F., HEGER, T., MAETZLER, C., RUEDIGER, H., BRONZOVA, J., LOBO, P. P., FERREIRA, J. J., ZIEMSEN, T. & BERG, D. 2015. Time- and frequency-domain parameters of heart rate variability and sympathetic skin response in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 122, 419-25.
- MANOHARAN, S., GUILLEMIN, G. J., ABIRAMASUNDARI, R. S., ESSA, M. M., AKBAR, M. & AKBAR, M. D. 2016. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease: a mini review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- MATSUMURA, Y., AIZAWA, H., SHIRAKI-IIDA, T., NAGAI, R., KURO-O, M. & NABESHIMA, Y. 1998. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 242, 626-30.
- MAYEUX, R., MARDER, K., COTE, L. J., DENARO, J., HEMENEGILDO, N., MEJIA, H., TANG, M.-X., LANTIGUA, R., WILDER, D. & GURLAND, B. 1995. The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988–1993. *American journal of epidemiology*, 142, 820-827.
- MENGEL-FROM, J., SOERENSEN, M., NYGAARD, M., MCGUE, M., CHRISTENSEN, K. & CHRISTIANSEN, L. 2015. Genetic variants in KLOTHO associate with cognitive function in the oldest old group. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 71, 1151-1159.
- MUZERENGI, S., CONTRAFATTO, D. & CHAUDHURI, K. R. 2007. Non-motor symptoms: identification and management. *Parkinsonism Relat Disord*, 13 Suppl 3, S450-6.

Literaturverzeichnis

- NALLS, M. A., PANKRATZ, N., LILL, C. M., DO, C. B., HERNANDEZ, D. G., SAAD, M., DESTEFANO, A. L., KARA, E., BRAS, J. & SHARMA, M. 2014. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nature genetics*, 46, 989.
- NASREDDINE, Z. S., PHILLIPS, N. A., BÉDIRIAN, V., CHARBONNEAU, S., WHITEHEAD, V., COLLIN, I., CUMMINGS, J. L. & CHERTKOW, H. 2005. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*, 53, 695-699.
- NUSCHER, B., KAMP, F., MEHNERT, T., ODOY, S., HAASS, C., KAHLE, P. J. & BEYER, K. 2004. Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study. *J Biol Chem*, 279, 21966-75.
- NZIETCHUENG, R., EL SHAMIEH, S., BENACHOUR, H., LABAT, C., HERBETH, B., NDIAYE, N. C., MASSON, C., VISVIKIS-SIEST, S. & BENETOS, A. 2011. Klotho KL-VS genotype is involved in blood pressure regulation. *Clinica Chimica Acta*, 412, 1773-1777.
- PARKINSON, J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14, 223-36; discussion 222.
- PAVON, J. M., WHITSON, H. E. & OKUN, M. S. 2010. Parkinson's disease in women: a call for improved clinical studies and for comparative effectiveness research. *Maturitas*, 65, 352-8.
- POLYMEROPOULOS, M. H., LAVEDAN, C., LEROY, E., IDE, S. E., DEHEJIA, A., DUTRA, A., PIKE, B., ROOT, H., RUBENSTEIN, J., BOYER, R., STENROOS, E. S., CHANDRASEKHARAPPA, S., ATHANASSIADOU, A., PAPAPETROPOULOS, T., JOHNSON, W. G., LAZZARINI, A. M., DUVOISIN, R. C., DI IORIO, G., GOLBE, L. I. & NUSSBAUM, R. L. 1997. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*, 276, 2045-2047.
- PORTER, T., BURNHAM, S. C., MILICIC, L., SAVAGE, G., MARUFF, P., LIM, Y. Y., AMES, D., MASTERS, C. L., MARTINS, R. N., RAINEY-SMITH, S., ROWE, C. C., SALVADO, O., GROTH, D., VERDILE, G., VILLEMAGNE, V. L. & LAWS, S. M. 2019. Klotho allele status is not associated with A β and APOE epsilon4-related cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 76, 162-165.
- PURCELL, S., NEALE, B., TODD-BROWN, K., THOMAS, L., FERREIRA, M. A., BENDER, D., MALLER, J., SKLAR, P., DE BAKKER, P. I., DALY, M. J. & SHAM, P. C. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*, 81, 559-75.
- RAJPUT, A., VOLL, A., RAJPUT, M., ROBINSON, C. & RAJPUT, A. 2009. Course in Parkinson disease subtypes: a 39-year clinicopathologic study. *Neurology*, 73, 206-212.
- RAJPUT, A. H., ROZDILSKY, B. & RAJPUT, A. 1991. Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism--a prospective study. *Can J Neurol Sci*, 18, 275-8.
- REEVE, A., SIMCOX, E. & TURNBULL, D. 2014. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing research reviews*, 14, 19-30.
- RICHTER, B., HALLER, J., HAFFNER, D. & LEIFHEIT-NESTLER, M. 2016. Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 468, 1621-1635.
- RIZEK, P., KUMAR, N. & JOG, M. S. 2016. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *CMAJ*, 188, 1157-1165.
- SAITO, Y., YAMAGISHI, T., NAKAMURA, T., OHYAMA, Y., AIZAWA, H., SUGA, T., MATSUMURA, Y., MASUDA, H., KURABAYASHI, M., KURO-O, M.,

Literaturverzeichnis

- NABESHIMA, Y. & NAGAI, R. 1998. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, 248, 324-9.
- SCHON, E. A. & PRZEDBORSKI, S. 2011. Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron*, 70, 1033-53.
- SCHULZ, J. B., HAUSMANN, L. & HARDY, J. 2016. 199 years of Parkinson disease – what have we learned and what is the path to the future? *Journal of Neurochemistry*, 139, 3-7.
- SEMBA, R. D., MOGHEKAR, A. R., HU, J., SUN, K., TURNER, R., FERRUCCI, L. & O'BRIEN, R. 2014. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 558, 37-40.
- SHIMADA, T., TAKESHITA, Y., MUROHARA, T., SASAKI, K., EGAMI, K., SHINTANI, S., KATSUDA, Y., IKEDA, H., NABESHIMA, Y. & IMAIZUMI, T. 2004. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation*, 110, 1148-55.
- TABNER, B. J., TURNBULL, S., EL-AGANF, O. & ALLSOP, D. 2001. Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Current topics in medicinal chemistry*, 1, 507-517.
- TIBAR, H., EL BAYAD, K., BOUHOUCHE, A., AIT BEN HADDOU, E. H., BENOMAR, A., YAHYAOU, M., BENAZZOUZ, A. & REGRAGUI, W. 2018. Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease and Their Impact on Quality of Life in a Cohort of Moroccan Patients. *Front Neurol*, 9, 170.
- URAKAWA, I., YAMAZAKI, Y., SHIMADA, T., IJIMA, K., HASEGAWA, H., OKAWA, K., FUJITA, T., FUKUMOTO, S. & YAMASHITA, T. 2006. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*, 444, 770.
- VAN DEN EEDEN, S. K., TANNER, C. M., BERNSTEIN, A. L., FROSS, R. D., LEIMPETER, A., BLOCH, D. A. & NELSON, L. M. 2003. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*, 157, 1015-22.
- VAN STEENOVEN, I., AARSLAND, D., HURTIG, H., CHEN-PLOTKIN, A., DUDA, J. E., RICK, J., CHAHINE, L. M., DAHODWALA, N., TROJANOWSKI, J. Q., ROALF, D. R., MOBERG, P. J. & WEINTRAUB, D. 2014. Conversion between mini-mental state examination, montreal cognitive assessment, and dementia rating scale-2 scores in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 29, 1809-15.
- VINH QUOC LUONG, K. & THI HOANG NGUYEN, L. 2012. Vitamin D and Parkinson's disease. *J Neurosci Res*, 90, 2227-36.
- WANG, Y. & SUN, Z. 2009. Current understanding of klotho. *Ageing Res Rev*, 8, 43-51.
- WARNER, T. T. & SCHAPIRA, A. H. V. 2003. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 53, S16-S25.
- WOLF, I., LEVANON-COHEN, S., BOSE, S., LIGUMSKY, H., SREDNI, B., KANETY, H., KURO-O, M., KARLAN, B., KAUFMAN, B., KOEFFLER, H. P. & RUBINEK, T. 2008. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene*, 27, 7094-105.
- YAMAMOTO, M., CLARK, J. D., PASTOR, J. V., GURNANI, P., NANDI, A., KUROSU, H., MIYOSHI, M., OGAWA, Y., CASTRILLON, D. H., ROSENBLATT, K. P. & KURO-O, M. 2005. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem*, 280, 38029-34.
- YAMAZAKI, Y., IMURA, A., URAKAWA, I., SHIMADA, T., MURAKAMI, J., AONO, Y., HASEGAWA, H., YAMASHITA, T., NAKATANI, K., SAITO, Y., OKAMOTO, N., KURUMATANI, N., NAMBA, N., KITAOKA, T., OZONO, K., SAKAI, T., HATAYA, H., ICHIKAWA, S., IMEL, E. A., ECONS, M. J. & NABESHIMA, Y. 2010. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement:

Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects.
Biochem Biophys Res Commun, 398, 513-8.

ZHANG, T. M., YU, S. Y., GUO, P., DU, Y., HU, Y., PIAO, Y. S., ZUO, L. J., LIAN, T. H., WANG, R. D., YU, Q. J., JIN, Z. & ZHANG, W. 2016. Nonmotor symptoms in patients with Parkinson disease: A cross-sectional observational study. *Medicine (Baltimore)*, 95, e5400.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Im Folgenden wird der Eigenanteil an der Datengewinnung, Auswertung und Interpretation dargestellt.

Da die verwendeten Verfahren und Methoden zum Standard der Arbeitsgruppe gehören, konnten diese nach entsprechender Einarbeitung und Einweisung selbständig durchgeführt werden.

Im Rahmen der Untersuchung der seltenen Mutation L109R handelt es sich bei dieser Arbeit um ein Teilprojekt, wobei von 370 Proben 198 eigenständig sequenziert und ausgewertet wurden. Die genauen Schritte des Prozesses und die verwendeten Materialien sind im Methodenteil dargestellt. Die Vorbereitung und Aufarbeitung der Patientenprobe, wie beispielsweise die DNA-Extraktion, erfolgte durch Mitarbeiter des Hertie-Institutes für klinische Hirnforschung.

Für die Analyse des häufigeren SNPs rs9527024 / rs9536314 (F352V) wurde mit Hilfe des Programms *PLINK* die Genotypisierung der Patienten vorgenommen. Die Einarbeitung erfolgte hier ebenfalls durch erfahrene Mitarbeiter und konnte dann selbständig durchgeführt werden.

Die Tabellen der longitudinalen klinischen Daten wurde in Zusammenarbeit mit weiteren Mitarbeitern anhand von Arztbriefen vervollständigt. Die Bestimmung der Blutkonzentrationen der verschiedenen Laborparameter erfolgte im Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen unter Herrn Prof Dr. Schleicher.

Die Daten aus der PPMI Datenbank wurden mir freundlicherweise von Dr. Kathrin Brockmann zur Verfügung gestellt.

Statistisch ausgewertet wurden die Daten unter Anleitung durch Dr. Kathrin Brockmann und Dr. Stefanie Lerche und Dr. Milan Zimmermann.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und neben den von mir aufgelisteten Quellen keine weiteren Quellen hinzugezogen habe.

Tübingen, den

8 Danksagung

Ich möchte allen, die beim Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren und mich unterstützt haben, herzlichst danken. Die vielen konstruktiven Vorschläge und Hilfestellungen aller Beteiligten haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gasser danken, für die Möglichkeit, in dieser Abteilung promovieren zu können und für die Bereitstellung der Materialien und Mittel.

Mein besonderer Dank gilt Frau Kathrin Brockmann für die Betreuung und das spannende und vielseitige Promotionsthema. Ich hatte hierdurch die Möglichkeit, Einblicke in die aktuelle Forschung neurodegenerativer Erkrankungen zu bekommen und darüber hinaus neben der klinischen Forschungsarbeit auch die experimentelle Seite kennenzulernen.

Danken möchte ich auch meinen Betreuern während der experimentellen Arbeit im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in Tübingen: Claudia Schulte, Ann-Kathrin Hauser, Christian Deuschle und dem gesamten Team der Arbeitsgruppe. Nicht nur während der Einarbeitung im Labor, sondern auch während des gesamten Prozesses der Doktorarbeit standen sie mir in jeglicher Hinsicht unterstützend zur Seite. Ihre Unterstützung und Erfahrung haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Es war für mich eine große Freude, ein Teil dieser Arbeitsgruppe gewesen zu sein.

Im Rahmen der klinischen Arbeit möchte ich Milan Zimmermann, Stephanie Lerche, Isabel Wurster und Gerrit Machetanz danken, die für mich jederzeit Ansprechpartner waren und mich außerdem bei der statistischen Ausarbeitung unterstützt haben.

Danksagung

Ein weiterer Dank gilt allen Patienten und Probanden, die durch Ihre Teilnahme an unterschiedlichen Studien Forschung ermöglichen und damit einen gewaltigen Beitrag dafür leisten, neue Behandlungsmethoden entwickeln und Erkrankungen besser verstehen zu können.

Mein spezieller Dank gilt meiner Familie: meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichen, mir in jeder Situation tatkräftig zur Seite stehen und mich stets unterstützen; auch ganz besonders meinem Bruder, der für Problemstellungen jeglicher Art nicht nur ein offenes Ohr, sondern auch immer einen Lösungsvorschlag hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Freund bedanken, der mir geduldig, motivierend und hilfsbereit zur Seite stand.

9 Anlagen

- Unified Parkinson's disease Rating Scale (UPDRS III)
- Montreal-Cognitive-Assessment (MoCA)
- Mini-Mental-Status-Test (MMST)
- Beck's Depression Inventory (BDI)

Teil III: Motorische Untersuchung

Übersicht: Dieser Skalenabschnitt evaluiert die motorischen Symptome der Parkinson-Krankheit. Bei der Anwendung des Teils III der MDS-UPDRS soll der Untersucher folgende Richtlinien einhalten:

Auf der oberen Seite des Formulars notieren Sie bitte, ob der Patient Medikamente zur Behandlung der Symptome der Parkinson-Krankheit erhält. Falls Levodopa eingenommen wird, geben Sie bitte die Zeit seit der letzten Dosisgabe an.

Falls der Patient Medikamente zur Behandlung der Symptome der Parkinson-Krankheit erhält, notieren Sie bitte den klinischen Status des Patienten unter Verwendung folgender Begriffe:

ON ist der typische funktionelle Status, wenn die Patienten Medikamente bekommen und gut auf sie ansprechen.
OFF ist der typische funktionelle Status, wenn die Patienten trotz Medikamenteneinnahme schlecht auf sie ansprechen.

Der Untersucher soll genau das „bewerten, was er sieht“ („rate what you see“). Allerdings können einzelne Bereiche der motorischen Untersuchung durch gleichzeitig vorhandene medizinische Probleme wie Schlaganfall, Lähmung, Arthritis, Kontrakturen und orthopädische Probleme wie Hüftgelenks- oder Knie-Ersatz und Skoliose beeinflusst werden. In Situationen, in denen eine Bewertung absolut unmöglich ist (z.B. Amputationen, vollständige Lähmung, Extremität im Gipsverband), verwenden Sie bitte den Vermerk „UR“ für „Nicht zu Bewerten (unable to rate)“. Ansonsten bewerten Sie die Ausführung jeder Aufgabe so, wie sie der Patient im Kontext der Begleiterkrankungen verrichtet.

Alle Fragen müssen eine ganzzahlige Bewertung aufweisen (keine halben Punkte, keine fehlenden Werte).

Spezifische Instruktionen stehen für die Durchführung jedes Items zur Verfügung. Diese sollten in allen Fällen befolgt werden. Während der Untersuchung dem Patienten die Erklärung der zu erfüllenden Aufgaben vorliest, demonstriert er deren Ausführung. Die Funktionsbewertung erfolgt unmittelbar danach. Die Items zu „Globaler Spontanität der Bewegungen“ und „Ruhetremor“ (3.14 und 3.17) wurden absichtlich an das Ende der Skala gestellt, da die klinische Information, die für die Bewertung erforderlich ist, im Verlauf der gesamten Untersuchung erhoben wird.

Am Ende der Bewertung geben Sie bitte an, ob Dyskinesien (Chorea oder Dystonie) während der Untersuchung aufgetreten sind, und falls dem so ist, ob diese Bewegungen einen Einfluss auf die motorische Untersuchung hatten.

3a Erhält der Patient Medikamente zur Behandlung der Symptome der Parkinsonerkrankung?

Nein Ja

3b Falls der Patient Medikamente zur Behandlung der Symptome der Parkinson-Krankheit bekommt, geben Sie bitte den klinischen Status des Patienten unter Verwendung folgender Begriffe an:

ON: ON ist der typische funktionelle Status, wenn die Patienten Medikamente bekommen und gut auf sie ansprechen.

OFF: OFF ist der typische funktionelle Status, wenn die Patienten trotz Medikamenteneinnahme schlecht auf sie ansprechen.

3c Nimmt der Patient Levodopa ein? Nein Ja

3.C 1 Falls ja, geben Sie bitte die Minuten seit der letzten Levodopa-Dosis an: _____ Minuten

<p>3.1. SPRACHE</p> <p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Beurteilen Sie die spontane Sprachproduktion des Patienten und beginnen Sie, falls erforderlich, ein Gespräch. Mögliche Themenvorschläge: Fragen Sie nach der Arbeit des Patienten, Hobbys, Sport oder danach, wie er in die Arztpraxis gekommen ist. Beurteilen Sie Umfang, Modulation (Prosodie) und Deutlichkeit, einschließlich undeutlicher Artikulation, Palilalie (Silbenwiederholung) und Tachyphemie (Sprachbeschleunigung, Zusammenfassen von Silben).</p> <p>0: normal: Keine Sprachprobleme.</p> <p>1: angedeutet vorhanden: Verlust von Modulation, Diktion oder Lautstärke, alle Wörter sind aber noch leicht zu verstehen.</p> <p>2: leicht ausgeprägt: Verlust von Modulation, Diktion oder Lautstärke mit einigen unklaren Wörtern, aber insgesamt leicht verständlichen Sätzen.</p> <p>3: mäßig ausgeprägt: Sprache ist schwer zu verstehen, da einige, jedoch nicht die meisten Sätze schlecht zu verstehen sind.</p> <p>4: schwer ausgeprägt: Der Großteil des Gesprochenen ist schwer zu verstehen oder unverständlich.</p>	<p>Wert</p> <p><input type="checkbox"/></p>
--	--

<p>3.2. GESICHTSAUSDRUCK</p> <p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Beobachten Sie den in Ruhe sitzenden Patienten für 10 Sekunden sowohl wenn er nicht spricht als auch im Gespräch. Beobachten Sie die Frequenz seines Augenblinzeln, maskenhaften Gesichtsausdruck oder den Verlust der mimischen Expression, spontanes Lächeln und offenstehenden Mund.</p> <p>0: Normal: Normaler Gesichtsausdruck.</p> <p>1: angedeutet vorhanden: Minimaler maskenhafter Gesichtsausdruck, der sich nur durch die reduzierte Frequenz des Augenblinzeln manifestiert.</p> <p>2: leicht ausgeprägt: Zusätzlich zu der reduzierten Frequenz des Augenblinzeln zeigt sich ein maskenhafter Gesichtsausdruck auch im unteren Teil des Gesichts mit spärlichen Bewegungen im Mundbereich, wie etwa weniger spontanes Lächeln. Der Mund steht jedoch nicht offen.</p> <p>3: mäßig ausgeprägt: Maskenhafter Gesichtsausdruck mit zeitweise geöffnetem Mund, wenn nicht gesprochen wird.</p> <p>4: schwer ausgeprägt: Maskenhafter Gesichtsausdruck mit überwiegend geöffnetem Mund, wenn nicht gesprochen wird.</p>	<p>Wert</p> <p><input type="checkbox"/></p>
--	--

3.3. RIGOR	Wert
<p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Rigor wird bei langsamer passiver Bewegung der großen Gelenke geprüft, während sich der Patient in entspannter Position befindet und der Untersucher dabei Extremitäten und Nacken bewegt. Zu Beginn wird ohne ein Bahnungsmanöver geprüft. Prüfen und bewerten Sie Nacken und jede Extremität gesondert. An den Armen prüfen Sie gleichzeitig Hand- und Ellenbogengelenke. An den Beinen prüfen Sie gleichzeitig Hüft- und Kniegelenke. Falls Sie keinen Rigor feststellen, benutzen Sie ein Bahnungsmanöver wie Fingertippen, Faustöffnen/-schließen oder Fersentippen in der kontralateralen Extremität. Bitten Sie den Patienten, sich während der Rigorprüfung so gut wie möglich zu entspannen.</p>	<input type="checkbox"/> Nacken <input type="checkbox"/> ROE
<p>0: Normal: Kein Rigor.</p>	
<p>1: angedeutet vorhanden: Rigor lässt sich nur durch ein Bahnungsmanöver feststellen.</p>	<input type="checkbox"/> LOE
<p>2: leicht ausgeprägt: Rigor ist ohne Bahnungsmanöver feststellbar, der volle Bewegungsumfang ist jedoch erhalten.</p>	<input type="checkbox"/> RUE
<p>3: mäßig ausgeprägt: Rigor ist ohne Bahnungsmanöver feststellbar, voller Bewegungsumfang wird nur durch Anstrengung erreicht.</p>	<input type="checkbox"/> LUE
<p>4: schwer ausgeprägt: Rigor ist ohne Bahnungsmanöver feststellbar und ein voller Bewegungsumfang wird nicht erreicht.</p>	

3.4. FINGERTIPPEN	Wert
<p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Jede Hand wird einzeln geprüft. Führen Sie die Aufgabe vor, jedoch setzen Sie die Demonstration nicht fort, während der Patient getestet wird. Erklären Sie dem Patienten, dass er seinen Zeigefinger schnellstmöglich UND mit der größtmöglichen Amplitude 10 Mal gegen den Daumen führen soll. Bewerten Sie jede Seite gesondert, unter Berücksichtigung von Geschwindigkeit, Amplitude, Verzögerungen, Unterbrechungen und Amplitudendekrement.</p>	<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> L
<p>0: Normal: Keine Probleme.</p>	
<p>1: angedeutet vorhanden: Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) Regulärer Rhythmus ist gestört durch eine oder zwei Unterbrechungen oder Verzögerungen während des Fingertippens; b) angedeutete Verlangsamung; c) Amplitudendekrement kurz vor dem 10ten Tippen.</p>	
<p>2: leicht ausgeprägt: Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) 3 bis 5 Unterbrechungen beim Fingertippen; b) leichte Verlangsamung; c) Amplitudendekrement mitten in der 10er Tippsequenz.</p>	
<p>3: mäßig ausgeprägt: Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) mehr als 5 Unterbrechungen beim Fingertippen oder mindestens eine längere Pause („Einfrieren“) in der Ausführung; b) mäßige Verlangsamung; c) Amplitudendekrement bereits nach dem ersten Tippen.</p>	
<p>4: schwer ausgeprägt: Patient kann die Aufgabe nicht oder nur schwerlich durchführen aufgrund von Verlangsamung, Unterbrechungen oder Dekrement.</p>	

<p>3.5 HANDBEWEGUNGEN Instruktionen für den Untersucher: Jede Hand wird einzeln geprüft. Führen Sie die Aufgabe vor, jedoch setzen Sie die Demonstration nicht fort, während der Patient getestet wird. Erklären Sie dem Patienten, dass er seine Faust fest schließen muss, während sein Arm im Ellenbogen gebeugt ist, so dass die Handfläche zum Untersucher gerichtet ist. Fordern Sie den Patienten auf, die Hand 10 Mal mit größtmöglicher Amplitude UND schnellstmöglich zu öffnen. Falls der Patient die Faust nicht richtig ballt oder die Hand nicht vollständig öffnet, erinnern Sie ihn/sie an die korrekte Ausführung. Bewerten Sie jede Seite gesondert, unter Berücksichtigung von Geschwindigkeit, Amplitude, Verzögerungen, Unterbrechungen und Amplitudendekrement.</p> <p>0: Normal: Keine Probleme.</p> <p>1: angedeutet vorhanden: Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) Regulärer Rhythmus ist gestört durch eine oder zwei Unterbrechungen oder Bewegungsverzögerungen; b) angedeutete Verlangsamung; c) Amplitudendekrement zum Ende der Aufgabe.</p> <p>2: leicht ausgeprägt: Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) 3 bis 5 Bewegungsunterbrechungen; b) leichte Verlangsamung; c) Amplitudendekrement mitten in der Durchführung.</p> <p>3: mäßig ausgeprägt: Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) mehr als 5 Bewegungsunterbrechungen oder mindestens eine längere Pause („Einfrieren“) in der fortlaufenden Bewegung; b) mäßige Verlangsamung; c) Amplitudendekrement nach erster „Öffnen und Schließen“ - Sequenz.</p> <p>4: schwer ausgeprägt: Patient kann die Aufgabe nicht oder nur schwerlich durchführen aufgrund von Verlangsamung, Unterbrechungen oder Dekrement.</p>	<p>WERT</p> <p><input type="checkbox"/> R</p> <p><input type="checkbox"/> L</p>
---	--

<p>3.6 PRONATIONS- SUPINATIONSBEWEGUNGEN DER HÄNDE Instruktionen für den Untersucher: Jede Hand wird einzeln geprüft. Führen Sie die Aufgabe vor, jedoch setzen Sie die Demonstration nicht fort, während der Patient getestet wird. Erklären Sie dem Patienten, seinen Arm vor dem Körper mit der Handfläche nach unten auszustrecken und dann die Handfläche schnellstmöglich und mit größtmöglicher Amplitude alternierend 10 Mal nach oben und nach unten zu wenden. Bewerten Sie jede Seite gesondert, unter Berücksichtigung von Geschwindigkeit, Amplitude, Verzögerungen, Unterbrechungen und Amplitudendekrement.</p> <p>0: Normal: Keine Probleme.</p> <p>1: angedeutet vorhanden: Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) Regulärer Rhythmus ist gestört durch eine oder zwei Unterbrechungen oder Bewegungsverzögerungen; b) angedeutete Verlangsamung; c) Amplitudendekrement zum Ende der Aufgabe.</p> <p>2: leicht ausgeprägt: Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) 3 bis 5 Bewegungsunterbrechungen; b) leichte Verlangsamung; c) Amplitudendekrement mitten in der Übung.</p> <p>3: mäßig ausgeprägt: Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) mehr als 5 Bewegungsunterbrechungen oder mindestens eine längere Pause („Einfrieren“) in der fortlaufenden Bewegung; b) mäßige Verlangsamung; c) Amplitudendekrement nach erster „Supination-Pronation“ Sequenz.</p> <p>4: schwer ausgeprägt: Patient kann die Aufgabe nicht oder nur schwerlich durchführen aufgrund von Verlangsamung, Unterbrechungen oder Dekrement.</p>	<p>WERT</p> <p><input type="checkbox"/> R</p> <p><input type="checkbox"/> L</p>
---	--

3.7 VORFUSSTIPPEN		Wert
<p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Der Patient sitzt auf einem Stuhl mit gerader Rückenlehne, beide Füße stehen auf dem Boden. Prüfen Sie jeden Fuß gesondert. Führen Sie die Aufgabe vor, jedoch setzen Sie die Demonstration nicht fort, während der Patient getestet wird. Erklären Sie dem Patienten, die Ferse in bequemer Position auf den Boden zu stellen und dann mit den Zehen 10 Mal mit größtmöglicher Amplitude und schnellstmöglich auf den Boden zu tippen. Bewerten Sie jede Seite gesondert, unter Berücksichtigung von Geschwindigkeit, Amplitude, Verzögerungen, Unterbrechungen und Amplitudendekrement.</p>		<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> L
0: Normal:	Keine Probleme.	
1: angedeutet vorhanden:	Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) Regulärer Rhythmus ist gestört durch eine oder zwei Unterbrechungen oder Verzögerungen der Tippbewegungen; b) angedeutete Verlangsamung; c) Amplitudendekrement kurz vor dem 10ten Tippen.	
2: leicht ausgeprägt:	Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) 3 bis 5 Bewegungsunterbrechungen; b) leichte Verlangsamung; c) Amplitudendekrement mitten in der Übung.	
3: mäßig ausgeprägt:	Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) mehr als 5 Bewegungsunterbrechungen oder mindestens eine längere Pause („Einfrieren“) in der fortlaufenden Bewegung; b) mäßige Verlangsamung; c) Amplitudendekrement nach dem erstem Tippen.	
4: schwer ausgeprägt:	Patient kann die Aufgabe nicht oder nur schwerlich durchführen aufgrund von Verlangsamung, Unterbrechungen oder Dekrement.	

3.8 BEWEGLICHKEIT DER BEINE		Wert
<p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Der Patient sitzt auf einem Stuhl mit gerader Rückenlehne und Armlehnen. Die Füße des Patienten stehen bequem auf dem Boden. Prüfen Sie jedes Bein gesondert. Führen Sie die Aufgabe vor, jedoch setzen Sie die Demonstration nicht fort, während der Patient getestet wird. Erklären Sie dem Patienten, den Fuß in bequemer Position auf den Boden zu stellen und dann den Fuß 10 Mal mit größtmöglicher Amplitude und schnellstmöglich zu heben und auf den Boden zu stampfen. Bewerten Sie jede Seite gesondert, unter Berücksichtigung von Geschwindigkeit, Amplitude, Verzögerungen, Unterbrechungen und Amplitudendekrement.</p>		<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> L
0: Normal:	Keine Probleme.	
1: angedeutet vorhanden:	Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) Regulärer Rhythmus ist gestört durch eine oder zwei Unterbrechungen oder Bewegungsverzögerungen; b) angedeutete Verlangsamung; c) Amplitudendekrement zum Ende der Aufgabe.	
2: leicht ausgeprägt:	Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) 3 bis 5 Bewegungsunterbrechungen; b) leichte Verlangsamung; c) Amplitudendekrement mitten in der Übung.	
3: mäßig ausgeprägt:	Mindestens eine der folgenden Schwierigkeiten: a) mehr als 5 Bewegungsunterbrechungen oder mindestens eine längere Pause („Einfrieren“) in der fortlaufenden Bewegung; b) moderate Verlangsamung; c) Amplitudendekrement nach dem erstem Aufstampfen.	
4: schwer ausgeprägt:	Patient kann die Aufgabe nicht oder nur schwerlich durchführen aufgrund von Verlangsamung, Unterbrechungen oder Dekrement.	

3.9 AUFSTEHEN VOM STUHL	Wert
<p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Der Patient sitzt auf einem Stuhl mit gerader Rückenlehne und Armlehnen, beide Füße stehen auf dem Boden und der Rücken berührt die Stuhllehne (Letzteres nur falls der Patient nicht zu klein ist). Fordern Sie den Patienten auf, seine/ihre Arme vor der Brust zu verschränken und aufzustehen. Falls es dem Patienten nicht gelingt, wird der Versuch maximal zweimal wiederholt. Gelingt es dem Patienten immer noch nicht, bitten Sie den Patienten, sich auf die Stuhlkante zu setzen und mit vor der Brust verschränkten Armen aufzustehen. In diesem Fall erlauben Sie nur einen Versuch. Bleibt der Patient weiterhin erfolglos, erlauben Sie dem Patienten, sich an den Armlehnen aufzustützen. Dabei sind maximal drei Versuche erlaubt. Bleibt auch dieser Versuch erfolglos, helfen Sie dem Patienten aufzustehen. Nachdem der Patient aufgestanden ist, beobachten Sie die Körperhaltung für das Item 3.13</p> <p>0: Normal: Keine Schwierigkeiten. Patient kann schnell und ohne Verzögerung aufstehen.</p> <p>1: angedeutet vorhanden: Das Aufstehen erfolgt langsamer als normal oder es wird mehr als ein Versuch dazu benötigt; oder eine Bewegung zum Stuhlrand ist erforderlich, um aufstehen zu können. Benutzung der Armlehnen ist jedoch nicht nötig.</p> <p>2: leicht ausgeprägt: Patient drückt sich mit Hilfe der Armlehnen ohne Schwierigkeiten hoch.</p> <p>3: mäßig ausgeprägt: Patient drückt sich hoch, aber neigt zum Zurückfallen; oder er muss es mehrmals unter Benutzung der Armlehnen versuchen; Aufstehen ist jedoch ohne fremde Hilfe möglich.</p> <p>4: schwer ausgeprägt: Kann nicht ohne Hilfe aufstehen.</p>	<input type="checkbox"/>

3.10 GEHEN/GANGBILD	Wert
<p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Die Überprüfung des Gangs führt man am besten durch, indem man den Patienten vom Untersucher zuerst weg und dann wieder auf ihn/sie zu gehen lässt, so dass die rechte und linke Körperseite des Patienten gleichzeitig beobachtet werden können. Der Patient soll mindestens 10 Meter gehen, sich dann umdrehen und zum Untersucher zurückkehren. In diesem Item werden unterschiedliche Gangeigenschaften bewertet: Schrittlamplitude, Schrittgeschwindigkeit, Höhe der Fußhebung, Schlurfen beim Gehen, Umdrehen, Mitschwingen der Arme, jedoch nicht ein „Freezing“. Bewerten Sie das „Freezing“ beim Gehen für die nächste Frage 3.11. Beobachten Sie die Körperhaltung für das Item 3.13</p> <p>0: Normal: Keine Probleme.</p> <p>1: angedeutet vorhanden: Patient geht ohne Hilfe mit leichter Gangstörung.</p> <p>2: leicht ausgeprägt: Patient geht ohne Hilfe, jedoch mit erheblicher Gangstörung.</p> <p>3: mäßig ausgeprägt: Patient benötigt eine Gehhilfe für sicheres Gehen (Gehstock, Gehwagen). Ist aber in der Lage, ohne fremde Hilfe zu gehen.</p> <p>4: schwer ausgeprägt: Patient kann gar nicht gehen oder nur mit fremder Hilfe.</p>	<input type="checkbox"/>

3.11 BLOCKADEN BEIM GEHEN	Wert
<p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Während der Überprüfung des Gangbildes beurteilen Sie parallel das Auftreten von „Blockaden beim Gehen“-Episoden beim Gehen. Achten Sie auf das Auftreten von Starthemmung und Trippelschritten, insbesondere beim Umdrehen und am Ende der Prüfung. Soweit es die Sicherheit zulässt, dürfen die Patienten KEINE sensorischen Hilfestellungen bei der Untersuchung anwenden.</p> <p>0: Normal: Keine Blockade beim Gehen.</p> <p>1: angedeutet vorhanden: Eine Blockade beim Gehen tritt entweder beim Starten, Umdrehen oder Gehen durch den Türeingang auf und zeigt sich als nur eine Bewegungsunterbrechung bei einer dieser Bewegungsabläufe; danach werden fortlaufende fließende Bewegungen ohne Blockade beim Geradeausgehen ausgeführt.</p> <p>2: leicht ausgeprägt: Eine Blockade beim Gehen tritt beim Starten, Umdrehen oder Gehen durch den Türeingang auf, hierbei kommt es zu mehr als einer Bewegungsunterbrechung bei diesen Bewegungsabläufen, danach werden fortlaufende fließende Bewegungen ohne Blockaden beim Geradeausgehen ausgeführt.</p> <p>3: mäßig ausgeprägt: Eine Blockade tritt einmal beim Geradeausgehen auf.</p> <p>4: schwer ausgeprägt: Eine Blockade tritt mehrfach beim Geradeausgehen auf.</p>	<input type="checkbox"/>

3.12 POSTURALE STABILITÄT	Wert
<p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Es wird die Reaktion auf ein plötzliches Verlagern des Körpers durch ein <u>schnelles, kräftiges</u> Ziehen an den Schultern des Patienten geprüft. Der Patient steht dabei aufrecht mit geöffneten Augen und bequem leicht gespreizten und parallel ausgerichteten Beinen. Untersuchen Sie auch die Retropulsion. Stellen Sie sich hinter den Patienten und erklären Sie ihm, was passieren wird. Erklären Sie, dass er/sie einen Schritt nach hinten machen darf, um einen Sturz zu vermeiden. Hinter dem Untersucher soll sich in mindestens 1-2 Meter Entfernung eine feste Wand befinden, um die Schritte rückwärts bei Retropulsion zu beobachten. Das erste Ziehen soll als eine beispielhafte Vorführung dienen und wird absichtlich schwächer ausgeführt und wird nicht bewertet. Beim zweiten Mal zieht man schnell und kräftig an den Schultern zum Untersucher hin, die Kraft muss ausreichen, um den Körperschwerpunkt so zu verlagern, dass der Patient einen Schritt nach hinten machen MUSS. Der Untersucher sollte bereit sein, den Patienten aufzufangen, muss jedoch weit genug hinten stehen, damit der Patient ausreichend Platz hat, um einige Schritte zu machen und das Gleichgewicht selbst wiederzuerlangen. Lassen Sie den Patienten seinen Körper nicht absichtlich nach vorne beugen, in Vorbereitung auf den Zug. Beobachten Sie die Anzahl der Schritte oder die Fallneigung. Bis zu zwei Schritte rückwärts als Ausgleich werden als normal betrachtet, so dass die Bewertung als „nicht normal“ ab dem dritten Schritt beginnt. Wenn der Patient die Aufgabe nicht verstanden hat, kann der Untersucher den Versuch wiederholen, so dass die Bewertung auf demjenigen Eindruck des Untersuchers basiert, der die Einschränkungen des Patienten und nicht eine missverständliche oder unzureichende Vorbereitung als Ursache dafür darstellt. Beobachten Sie die Körperhaltung für das Item 3.13</p> <p>0: Normal: Keine Probleme: Patient fängt sich nach einem oder zwei Schritten auf.</p> <p>1: angedeutet vorhanden: 3-5 Schritte, Patient fängt sich jedoch ohne Hilfe auf.</p> <p>2: leicht ausgeprägt: Mehr als 5 Schritte, Patient fängt sich jedoch ohne Hilfe auf.</p> <p>3: mäßig ausgeprägt: Sicherer Stand, posturale Antwort ist jedoch nicht vorhanden; fällt, wenn er nicht vom Untersucher aufgefangen wird.</p> <p>4: schwer ausgeprägt: Sehr instabil; neigt dazu, das Gleichgewicht spontan bzw. auf ein leichtes Ziehen an den Schultern hin zu verlieren.</p>	<input type="checkbox"/>

<p>3.13 Körperhaltung</p> <p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Die Haltung wird an dem aufrecht stehenden Patienten beurteilt, nachdem er von einem Stuhl aufgestanden ist sowie beim Gehen und ebenso während der Untersuchung der posturalen Reflexe. Wenn Sie eine schlechte Körperhaltung bemerken, fordern Sie den Patienten auf, gerade zu stehen und beobachten Sie, ob sich die Körperhaltung bessert (siehe Punkt 2 unten). Bewerten Sie die schlechteste Körperhaltung, die Sie während dieser drei Beobachtungspunkte sehen. Beobachten Sie die Flexion und die Seitenneigung.</p> <p>0: Normal: Keine Probleme.</p> <p>1: Leicht: Nicht ganz aufrechte Haltung; die Körperhaltung könnte jedoch für eine ältere Person normal sein.</p> <p>2: Leicht ausgeprägt: Eindeutige Flexion, Skoliose oder Seitenneigung, aber der Patient kann die Haltung nach Aufforderung korrigieren.</p> <p>3: Mäßig ausgeprägt: Gebückte Haltung, Skoliose oder Seitenneigung, die vom Patienten willentlich zu einer aufrechten Haltung nicht korrigiert werden kann.</p> <p>4: Schwer ausgeprägt: Flexion, Skoliose oder Seitenneigung mit ausgeprägter Haltungsstörung.</p>	<p>Wert</p> <p><input type="checkbox"/></p>
--	--

<p>3.14 GLOBALE SPONTANITÄT DER BEWEGUNG (BRADYKINESIE DES KÖRPERS)</p> <p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Diese globale Bewertung kombiniert alle Beobachtungen von Langsamkeit, Verzögerungen, geringer Amplitude und allgemeiner Bewegungsarmut, einschließlich der Reduktion von Körpergestik und Überkreuzen der Beine. Die Beurteilung basiert auf dem Gesamteindruck des Untersuchers nach Beobachtung der spontanen Körpergestik beim Sitzen und wie der Patient aufsteht und läuft.</p> <p>0: Normal: Keine Probleme.</p> <p>1: Angedeutet vorhanden: Angedeutete globale Verlangsamung und Verarmung der Spontanbewegungen.</p> <p>2: Leicht ausgeprägt: Leichte globale Verlangsamung und Verarmung der Spontanbewegungen.</p> <p>3: Mäßig ausgeprägt: Mäßige globale Verlangsamung und Verarmung der Spontanbewegungen.</p> <p>4: Schwer ausgeprägt: Schwere globale Verlangsamung und Verarmung der Spontanbewegungen.</p>	<p>Wert</p> <p><input type="checkbox"/></p>
--	--

3.15 HALTETREMOR DER HÄNDE	Wert
<p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Alle Tremorarten, einschließlich des wieder auftretenden Ruhetremors, der nach einer Pause beim Hochnehmen der Arme mit Latenz auftritt werden in der Bewertung berücksichtigt. Beurteilen Sie jede Hand gesondert. Bewerten Sie die größte auftretende Amplitude. Fordern Sie den Patienten auf, die Arme vor seinem Körper mit den Handflächen nach unten auszustrecken. Die Handgelenke sollten dabei gerade ausgerichtet sein und die Finger bequem voneinander getrennt sein, so dass sie einander nicht berühren. Beobachten Sie diese Haltung für 10 Sekunden.</p> <p>0: Normal: Kein Tremor.</p> <p>1: Angedeutet vorhanden: Tremor ist vorhanden, die Amplitude ist jedoch geringer als 1 cm.</p> <p>2: Leicht ausgeprägt: Tremor mit einer Amplitude von mehr als 1 cm, aber geringer als 3 cm.</p> <p>3: Mäßig ausgeprägt: Tremor mit einer Amplitude von mindestens 3 cm, jedoch geringer als 10 cm.</p> <p>4: Schwer ausgeprägt: Tremor mit einer Amplitude von mindestens 10 cm.</p>	<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> L

3.16 BEWEGUNGSTREMOR DER HÄNDE	Wert
<p><u>Instruktionen für den Untersucher:</u> Die Prüfung erfolgt als Finger-Nase-Versuch. Der Patient beginnt den Versuch mit ausgestreckten Armen und führt den Finger-Nase-Versuch mit jeder Hand mindestens dreimal durch. Hierbei soll jede Hand so weit wie möglich gestreckt werden, um den Finger des Untersuchers zu berühren. Der Finger-Nase-Versuch soll langsam durchgeführt werden, um einen möglichen Tremor nicht durch zu schnelle Armbewegungen zu unterdrücken. Wiederholen Sie den Versuch mit der anderen Hand und beurteilen Sie jede Hand gesondert. Der Tremor kann durchgehend während der Bewegung vorhanden sein oder bei der Berührung des Ziels (Nase oder Finger) auftreten. Bewerten Sie die größte Amplitude.</p> <p>0: Normal: Kein Tremor.</p> <p>1: Angedeutet vorhanden: Tremor ist vorhanden, die Amplitude ist jedoch kleiner als 1 cm.</p> <p>2: Leicht ausgeprägt: Tremor mit einer Amplitude von mehr als 1 cm, aber geringer als 3 cm.</p> <p>3: Mäßig ausgeprägt: Tremor mit einer Amplitude von mindestens 3 cm, jedoch kleiner als 10 cm.</p> <p>4: Schwer ausgeprägt: Tremor mit einer Amplitude von mindestens 10 cm.</p>	<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> L

EINFLUSS DER DYSKINESIEN AUF TEIL III DER BEWERTUNG

A. Traten Dyskinesien (Chorea oder Dystonie) während der Untersuchung auf? Nein Ja

B. Falls ja, hatten diese Bewegungen Einfluss auf die Bewertung? Nein Ja

Hoehn und Yahr Stadium

0: Asymptomatisch.

1: Nur einseitige Beteiligung.

2: Beidseitige Beteiligung ohne Gleichgewichtsstörung.

3: Leichte bis mäßig ausgeprägte beidseitige Beteiligung; gewisse Haltungsinstabilität, jedoch körperlich unabhängig; braucht Unterstützung zum Ausgleich beim Zugtest.

4: Starke Behinderung; kann aber noch ohne Hilfe gehen oder stehen.

5: Ohne fremde Hilfe auf den Rollstuhl angewiesen oder bettlägerig.

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)

NAME :

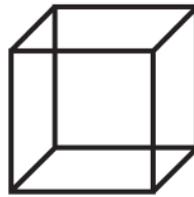
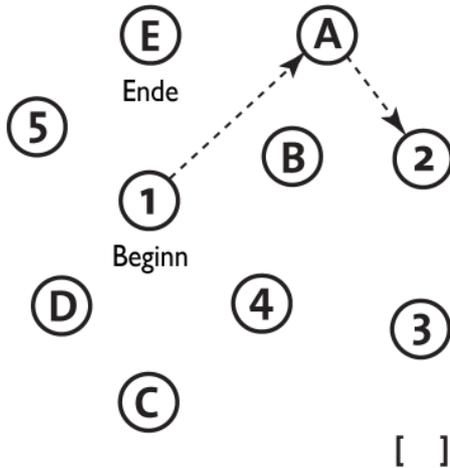
Ausbildung :

Geschlecht :

Geburtsdatum :

DATUM :

VISUOSPATIAL / EXEKUTIV



Würfel nachzeichnen

Eine Uhr zeichnen (Zehn nach elf)
(3 Punkte)

PUNKTE

[]

[]

[]

[]

[]

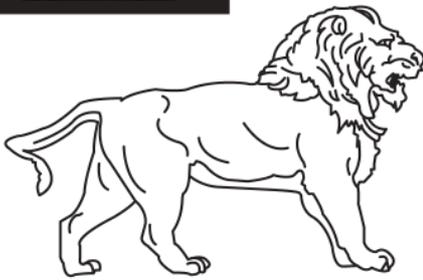
Kontur

Zahlen

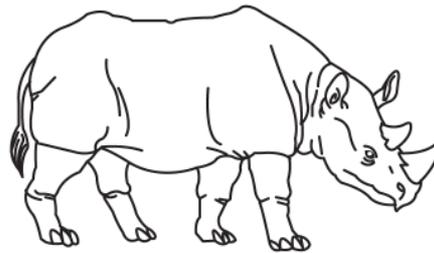
Zeiger

___/5

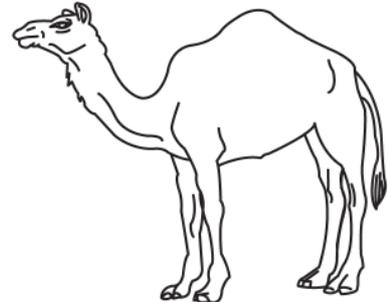
BENENNEN



[]



[]



[]

___/3

GEDÄCHTNIS

Wortliste vorlesen, wiederholen lassen.
2 Durchgänge. Nach 5 Minuten überprüfen (s.u.)

GESICHT SAMT KIRCHE TULPE ROT

1. Versuch

2. Versuch

Keine Punkte

AUFMERKSAMKEIT Zahlenliste vorlesen (1 Zahl/ Sek.)

In der vorgegebenen Reihenfolge wiederholen [] 2 1 8 5 4

Rückwärts wiederholen [] 7 4 2

___/2

Buchstabenliste vorlesen (1 Buchst./Sek.). Patient soll bei jedem Buchstaben „A“ mit der Hand klopfen. Keine Punkte bei 2 oder mehr Fehlern

[] FBACMNAAJKLBAFAKDEAAAJAMOF AAB

___/1

Fortlaufendes Abziehen von 7, mit 100 anfangen [] 93

[] 86

[] 79

[] 72

[] 65

4 oder 5 korrekte Ergebnisse: 3 P., 2 oder 3 korrekt: 2 P., 1 korrekt: 1 P., 0 korrekt: 0 P.

___/3

SPRACHE

Wiederholen: „Ich weiß lediglich, dass Hans heute an der Reihe ist zu helfen.“ []

„Die Katze versteckte sich immer unter der Couch, wenn die Hunde im Zimmer waren.“ []

___/2

Möglichst viele Wörter in einer Minute benennen, die mit dem Buchstaben F beginnen [] _____ (N ≥ 11 Wörter)

___/1

ABSTRAKTION

Gemeinsamkeit von z.B. Banane und Apfelsine = Frucht [] Eisenbahn - Fahrrad [] Uhr - Lineal

___/2

ERINNERUNG

Worte erinnern
OHNE HINWEIS

GESICHT []

SAMT []

KIRCHE []

TULPE []

ROT []

Punkte nur bei richtigem Nennen OHNE Hinweis

___/5

Optional

Hinweis zu Kategorie

Mehrfachauswahl

ORIENTIERUNG

[] Datum

[] Monat

[] Jahr

[] Wochentag

[] Ort

[] Stadt

___/6

Mini-Mental-Status-Test (MMST)

Der MMST erlaubt anhand eines einfachen Fragebogens eine Abschätzung der kognitiven Fähigkeiten eines älteren Menschen. Die Testdauer beträgt ca. 10 Minuten.

Ergebnisinterpretation: Bei weniger als 13 Punkten, werden globale kognitive Störungen angenommen und die Voraussetzungen für das Kompetenzzentrum können bejaht werden.

Testperson : Geburtsdatum:

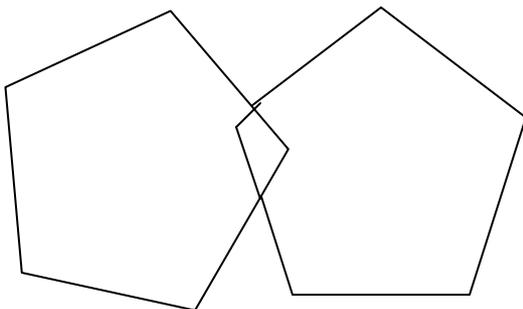
Datum der Erhebung: Erhebung wurde durchgeführt von _____

			Punkte		
I. Orientierung Zeit (z.B. Welchen Tag haben wir heute?) Ort (z.B. Wo sind wir jetzt?)	(1)	Datum	1	0	
	(2)	Jahr	1	0	
	(3)	Jahreszeit	1	0	
	(4)	Wochentag	1	0	
	(5)	Monat	1	0	
	(6)	Bundesland	1	0	
	(7)	Landkreis/Stadt	1	0	
	(8)	Stadt/Stadtteil	1	0	
	(9)	Klinik/Praxis/Pflegeheim	1	0	
	(10)	Station/Stockwerk	1	0	
	Summe (max. 10):				
II. Merkfähigkeit (Der Untersucher nennt die Gegenstände und fordert auf, diese zu wiederholen) maximal 6 Wiederholungen	(11)	Apfel	1	0	
	(12)	Pfennig	1	0	
	(13)	Tisch	1	0	
	Summe (max. 3):				
III. Aufmerksamkeit und Rechenfertigkeit Ziehen Sie von 100 jeweils 7 ab oder buchstabieren Sie "STUHL" rückwärts	(14)	>93 <	L	1	0
	(15)	>86 <	H	1	0
	(16)	>79 < oder	U	1	0
	(17)	>72 <	T	1	0
	(18)	>65 <	S	1	0
	Summe (max. 5):				
IV. Erinnerungsfähigkeit Was waren die Dinge, die Sie sich vorher gemerkt haben?	(19)	Apfel	1	0	
	(20)	Pfennig	1	0	
	(21)	Tisch	1	0	
	Summe (max. 3):				

V. Sprache			
Was ist das? (Der Untersucher zeigt zwei Gegenstände und fordert die Testperson auf diese zu benennen)	(22)	Armbanduhr	1 0
	(23)	Bleistift	1 0
	(24)	„Sie leiht ihm kein Geld mehr“ (max. 3 Wdh.)	1 0
	(25)	Nehmen Sie bitte das Papier in die Hand.	1 0
	(26)	Falten Sie es in der Mitte.	1 0
	(27)	Lassen Sie es auf den Boden fallen.	1 0
	(28)	Bitte schließen Sie die Augen!	1 0
	(29)	Schreiben Sie einen vollständigen Satz	1 0
	(30)	Fünfecke nachzeichnen (Alle 10 Ecken müssen wiedergegeben sein und 2 davon müssen sich überschneiden)	1 0
			Summe (max. 9):

Gesamtsumme:

Fünfeck



Abgezeichnetes Beispiel

Becks Depressions Inventar

Bitte lesen Sie jeweils die Aussagen einer Gruppe sorgfältig durch. Kreuzen Sie dann die Aussage an, die am besten beschreibt, wie Sie sich **im vergangenen Monat** gefühlt haben. Sie können auch mehrere Ziffern markieren. Lesen Sie bitte immer alle Aussagen einer Gruppe, bevor Sie Ihre Wahl treffen.

A

- 0 Ich bin nicht traurig.
- 1 Ich bin traurig.
- 2 Ich bin die ganze Zeit traurig und komme nicht davon los.
- 3 Ich bin so traurig oder unglücklich, dass ich es kaum noch ertrage.

B

- 0 Ich sehe nicht besonders mutlos in die Zukunft.
- 1 Ich sehe mutlos in die Zukunft.
- 2 Ich habe nichts, worauf ich mich freuen kann.
- 3 Ich habe das Gefühl, dass die Zukunft hoffnungslos ist und dass die Situation nicht besser werden kann.

C

- 0 Ich fühle mich nicht als Versager.
- 1 Ich habe das Gefühl, öfter versagt zu haben als der Durchschnitt.
- 2 Wenn ich auf mein Leben zurückblicke, sehe ich bloß eine Menge Fehlschläge.
- 3 Ich habe das Gefühl, als Mensch ein völliger Versager zu sein.

D

- 0 Ich kann die Dinge genauso genießen wie früher.
- 1 Ich kann die Dinge nicht mehr so genießen wie früher.
- 2 Ich kann aus nichts mehr eine echte Befriedigung ziehen.
- 3 Ich bin mit allem unzufrieden oder gelangweilt.

E

- 0 Ich habe keine Schuldgefühle.
- 1 Ich habe häufig Schuldgefühle.
- 2 Ich habe fast immer Schuldgefühle.
- 3 Ich habe immer Schuldgefühle.

F

- 0 Ich habe nicht das Gefühl, gestraft zu sein.
- 1 Ich habe das Gefühl, vielleicht bestraft zu werden.
- 2 Ich erwarte, bestraft zu werden.
- 3 Ich habe das Gefühl, bestraft zu sein.

G

- 0 Ich bin nicht von mir enttäuscht.
- 1 Ich bin von mir enttäuscht.
- 2 Ich finde mich fürchterlich.
- 3 Ich hasse mich.

H

- 0 Ich habe nicht das Gefühl, schlechter zu sein als alle anderen.
- 1 Ich kritisiere mich wegen meiner Fehler und Schwächen.
- 2 Ich mache mir die ganze Zeit Vorwürfe wegen meiner Mängel.
- 3 Ich gebe mir für alles die Schuld, was schief geht.

I

- 0 Ich denke nicht daran, mir etwas anzutun.
- 1 Ich denke manchmal an Selbstmord, aber ich würde es nicht tun.
- 2 Ich möchte mich am liebsten umbringen.
- 3 Ich würde mich umbringen, wenn ich die Gelegenheit hätte.

J

- 0 Ich weine nicht öfter als früher.
- 1 Ich weine jetzt mehr als früher.
- 2 Ich weine jetzt die ganze Zeit.
- 3 Früher konnte ich weinen, aber jetzt kann ich es nicht mehr, obwohl ich es möchte.

K

- 0 Ich bin nicht reizbarer als sonst.
- 1 Ich bin jetzt leichter verärgert oder gereizt
- 2 Ich fühle mich dauernd gereizt.
- 3 Die Dinge, die mich früher geärgert haben, berühren mich nicht mehr.

L

- 0 Ich habe nicht das Interesse an Menschen verloren.
- 1 Ich interessiere mich jetzt weniger für Menschen als früher.
- 2 Ich habe mein Interesse an anderen Menschen größten Teil verloren.
- 3 Ich habe mein ganzes Interesse an anderen Menschen verloren.

M

- 0 Ich bin so entschlossen wie immer.
- 1 Ich schiebe Entscheidungen jetzt öfter als früher auf.
- 2 Es fällt mir jetzt schwerer als früher, Entscheidungen zu treffen.
- 3 Ich kann überhaupt keine Entscheidungen mehr treffen.

N

- 0 Ich habe nicht das Gefühl, schlechter auszusehen als früher.
- 1 Ich mache mir Sorgen, dass ich alt oder unattraktiv aussehe.
- 2 Ich habe das Gefühl, dass Veränderungen in meinem Aussehen eintreten, die mich hässlich machen.
- 3 Ich finde mich hässlich.

O

- 0 Ich kann so gut arbeiten wie früher.
- 1 Ich muss mir einen Ruck geben, bevor ich eine Tätigkeit in Angriff nehme.
Ich muss mich zu jeder Tätigkeit zwingen.
- 3 Ich bin unfähig zu arbeiten.

P

- 0 Ich schlafe so gut wie sonst.
- 1 Ich schlafe nicht mehr so gut wie früher.
- 2 Ich wache 1 bis 2 Stunden früher auf als sonst, und es fällt mir schwer, wieder einzuschlafen.
- 3 Ich wache mehrere Stunden früher auf als sonst und kann nicht mehr einschlafen.

Q

- 0 Ich ermüde nicht stärker als sonst
- 1 Ich ermüde schneller als früher.
- 2 Fast alles ermüdet mich.
- 3 Ich bin zu müde, um etwas zu tun.

R

- 0 Mein Appetit ist nicht schlechter als sonst.
- 1 Mein Appetit ist nicht mehr so gut wie früher.
- 2 Appetit hat sehr stark nachgelassen.
- 3 Ich habe überhaupt keinen Appetit mehr.
Ich esse absichtlich weniger um abzunehmen
ja nein

S

- 0 Ich hab in letzter Zeit kaum abgenommen.
- 1 Ich habe mehr als 2 Kilo abgenommen.
- 2 Ich habe mehr als 5 Kilo abgenommen.
- 3 Ich habe mehr als 8 Kilo abgenommen.

T

- 0 Ich mache mir keine größeren Sorgen um meine Gesundheit als sonst.
- 1 Ich mache mir Sorgen über körperliche Probleme wie Schmerzen, Magenbeschwerden oder Verstopfung.
- 2 Ich mache mir so große Sorgen über gesundheitliche Probleme, dass es mir schwer fällt an etwas anderes zu denken.
- 3 Ich mache mir so große Sorgen über gesundheitliche Probleme, dass ich an nichts anderes mehr denken kann.

U

- 0 Ich habe in letzter Zeit keine Veränderung meines Interesses an Sex bemerkt.
- 1 Ich interessiere mich weniger für Sex als früher.
- 2 Ich interessiere mich jetzt viel weniger für Sex.
- 3 Ich habe das Interesse an Sex völlig verloren.

Gesamtwert (Punktsomme): _____