

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Genetische Varianten der Dopaminrezeptoren D1, D3 und D4 sowie  
des Dopamintransporters als Risikofaktoren für das idiopathische  
Parkinsonsyndrom und L-Dopa-induzierte Dyskinesien, Psychosen  
und Motorfluktuationen bei Parkinsonpatienten**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Anja Franziska Grapengiesser  
Hamburg

Magna cum laude

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. I. Roots
2. Prof. Dr. med. H.-P. Vogel
3. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Gerloff

Datum der Disputation: 23.04.07

Datum der Zeugnisübergabe: 22.06.07

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Geschichtlicher Überblick</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Pathogenese</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3</b>	<b>Klinisches Bild</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4</b>	<b>Therapie</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5</b>	<b>Probleme der medikamentösen Langzeittherapie</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6</b>	<b>Ätiologie und Erbllichkeit</b> .....	<b>10</b>
<b>1.7</b>	<b>Dopaminrezeptoren</b> .....	<b>10</b>
1.7.1	Untersuchte genetische Varianten der Dopaminrezeptoren.....	12
<b>1.8</b>	<b>Dopamintransporter (DAT)</b> .....	<b>14</b>
<b>1.9</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Patientenkollektiv und klinische Datenerhebung</b> .....	<b>17</b>
2.1.1	Einschluß- und Ausschlußkriterien.....	18
<b>2.2</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>19</b>
2.2.1	Geräte.....	19
2.2.2	Reagenzien.....	19
2.2.3	Puffer und Lösungen.....	20
<b>2.3</b>	<b>DNS-Extraktion</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>PCR der DRD3-, DRD4- und DAT-Varianten</b> .....	<b>21</b>
2.4.1	PCR-Ansatz der DRD3-Variante <i>BalI</i> .....	22
2.4.2	PCR-Ansatz der DRD3-Variante <i>MspI</i> .....	23
2.4.3	PCR-Ansatz der DRD4-Varianten (12-bp <i>repeat</i> und 13-bp Deletion).....	23
2.4.4	PCR-Ansatz des 40-bp VNTR des Dopamintransporters.....	23
<b>2.5</b>	<b>RFLP der DRD3-Varianten</b> .....	<b>24</b>
2.5.1	RFLP der DRD3-Variante <i>BalI</i> .....	24
2.5.2	RFLP der DRD3-Variante <i>MspI</i> .....	25
<b>2.6</b>	<b>Elektrophorese der DRD3-, DRD4- und DAT-Varianten</b> .....	<b>25</b>
2.6.1	Elektrophorese der DRD3-Variante <i>BalI</i> .....	26
2.6.2	Elektrophorese der DRD3-Variante <i>MspI</i> .....	26
2.6.3	Elektrophorese der DRD4-Varianten (12 bp <i>repeat</i> und 13 bp Deletion).....	27
2.6.4	Elektrophorese des 40-bp VNTR des Dopamintransporters.....	28
<b>2.7</b>	<b>Sequenzierungs-PCR des DRD1</b> .....	<b>29</b>

2.7.1	Sequenzierungs-PCR der langen Fragmente ( <i>long-PCR</i> ) .....	30
2.7.2	Sequenzierungs-PCR der kurzen Fragmente.....	31
2.7.3	Probenaufarbeitung zum Sequenzieren.....	33
<b>2.8</b>	<b>DRD1 A/G-94 RFLP (<i>Bfa</i>I) .....</b>	<b>33</b>
2.8.1	PCR der DRD1-Variante A/G-94 <i>Bfa</i> I.....	33
2.8.2	RFLP der DRD1-Variante G/A-94 <i>Bfa</i> I.....	34
2.8.3	Elektrophorese der DRD1-Variante G/A-94 <i>Bfa</i> I.....	35
<b>2.9</b>	<b>Statistische Methoden .....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Klinische Charakteristika der untersuchten Patienten .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Häufigkeit der Genotypen des DRD3-, DRD4- und DAT-Gens für alle Parkinsonpatienten .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>DRD3- und DRD4-Varianten und Dyskinesien.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>DRD3- und DRD4-Varianten und Psychosen.....</b>	<b>42</b>
<b>3.5</b>	<b>DRD3- und DRD4-Varianten und Motorfluktuationen .....</b>	<b>42</b>
<b>3.6</b>	<b>Signifikante Veränderungen am Dopamintransporter .....</b>	<b>43</b>
3.6.1	40bp-VNTR des Dopamintransportergens und Dyskinesien .....	43
3.6.2	40bp-VNTR des Dopamintransportergens und Psychosen.....	45
3.6.3	40bp-VNTR des Dopamintransportergens und Motorfluktuationen .....	46
3.6.4	Analyse der signifikanten Ergebnisse des 40-bp VNTR ( <i>DOT40</i> ).....	47
<b>3.7</b>	<b>Mutationsanalyse durch DNS-Sequenzierung des DRD1.....</b>	<b>49</b>
3.7.1	DRD1 A/G-48bp.....	49
3.7.2	DRD1 G/A-94bp.....	50
<b>3.8</b>	<b>Häufigkeit der Genotypen des DRD1 G/A-94 (<i>Bfa</i>I).....</b>	<b>51</b>
<b>3.9</b>	<b>DRD1 G/A-94 (<i>Bfa</i>I) und Dyskinesien, Psychosen oder Motorfluktuationen .....</b>	<b>51</b>
<b>3.10</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Pathogenese des Idiopathischen Parkinsonsyndroms.....</b>	<b>54</b>
4.1.1	Pharmakogenetische Risikofaktoren.....	54
4.1.2	40bp-VNTR des Dopamintransportergens und IPS .....	55
4.1.3	DRD3 <i>Bal</i> I und DRD3 <i>Msp</i> I und IPS .....	58
4.1.4	DRD4 12-bp <i>repeat</i> und 13-bp Deletion und IPS .....	60
4.1.5	DRD1 G/A-94 ( <i>Bfa</i> I) und IPS .....	61

<b>4.2</b>	<b>Weitere Risikofaktoren für die Pathogenese des IPS .....</b>	<b>62</b>
<b>4.3</b>	<b>Pathogenese der L-Dopa induzierte Dyskinesien .....</b>	<b>63</b>
4.3.1	Soziodemographische Risikofaktoren.....	63
4.3.2	Pharmakodynamische Risikofaktoren.....	63
4.3.3	Signifikante Assoziation des 40-bp VNTR des DAT mit Dyskinesien .....	64
4.3.4	DRD3-, DRD4-, DRD1- und DRD2-Genvarianten und Dyskinesien .....	64
<b>4.4</b>	<b>Pathogenese der L-Dopa induzierten Psychosen.....</b>	<b>65</b>
4.4.1	Soziodemographische Risikofaktoren.....	65
4.4.2	Pharmakodynamische Risikofaktoren.....	66
4.4.3	Signifikante Assoziation des 40bp-VNTR des DAT mit Psychosen .....	66
4.4.4	DRD3-, DRD4-, DRD1- und DRD2-Genvarianten und Psychosen .....	68
<b>4.5</b>	<b>Pathogenese der L-Dopa-induzierten Fluktuationen.....</b>	<b>71</b>
4.5.1	Soziodemographische Risikofaktoren.....	71
4.5.2	Pharmakodynamische Risikofaktoren.....	71
4.5.3	40bp-VNTR des DAT und Motorfluktuationen.....	72
4.5.4	DRD3-, DRD4-, und DRD2-Genvarianten und Motorfluktuationen.....	72
4.5.5	Signifikante Assoziation des DRD1 G/A-94 und Motorfluktuationen .....	73
<b>4.6</b>	<b>Bedeutung der genetischen Varianten des DAT.....</b>	<b>74</b>
<b>4.7</b>	<b>Weitere Riskofaktoren für L-Dopa-induzierte Dyskinesien, Psychosen und Motorfluktuationen.....</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>89</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>90</b>

## 6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
a	Jahr (anno)
Abb	Abbildung
Ala	Alanin
APOE4	Apolipoprotein E4
AS	Aminisäuren
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COMT	Catechyl-O-methyltransferase
CYP2D6	Debrisoquin Hydroxylase 2
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotidtriphosphate
DRD	Dopaminrezeptor
EPS	Extrapyramidales Symptom
Ex	Exon
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GDNF	<i>glial cell derived neurotrophic factor</i>
Gly	Glycin
GST	Gluthation Transferase
h	Stunde (hour)
HT	Hydroxytryptamin
Hz	Herz
Intr	Intron
IPS	Idiopathisches Parkinson Syndrom
KI	Konfidenzintervall
L-Dopa	Levodopamin
l	Liter

---

m	Monat (mens)
M	Mol/Liter
MAO A/B	Monoaminoxidase A oder B
mg	Milligramm
min	Minuten
µl	Mikroliter
MP	Morbus Parkinson
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium
NAT	N-Acetyl-Transferase
n.Chr.	nach Christi Geburt
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
o.g.	oben genannt
OR	<i>Odds Ratio</i>
p	Wahrscheinlichkeit für ein Ereignis ( $\chi^2$ )
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PET	Positronen Emissions Tomographie
r	Korrelationskoeffizient
RFLP	Restriktionslängenpolymorphismus
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	siehe (→)
sec	Sekunden
Ser	Serin
SD	Standarddeviation
SNP	<i>Single Nukleotide Polymorphism</i>
SOD1	Superoxid-Dismutase 1
SPECT	<i>Single Photon Computed Tomography</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
Tab	Tabelle
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
tRNAGlu	Glutamat-t-Ribonukleinsäure
U	Units
u.a.	unter anderem
U/min	<i>Units/minute</i> (Einheiten/Minute)

UKPD	<i>United Kingdom Parkinson Disease Brain Bank</i>
UPDRS	<i>Unified Parkinson`s Disease rating Scale</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> (nicht kodierender Abschnitt)
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
V	Volt
v. Chr.	vor Christi Geburt
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
Vol	Volumen
$\chi^2$	Chi Quadrat-Test
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem



## **7 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.



## 8 Erklärung

„Ich, Anja Franziska Grapengiesser, erkläre, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema:

*Genetische Varianten der Dopaminrezeptoren D1, D3 und D4 sowie des Dopamintransporters als Risikofaktoren für das idiopathische Parkinsonsyndrom und L-Dopa-induzierte Dyskinesien, Psychosen und Motorfluktuationen bei Parkinsonpatienten*

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **9 Danksagung**

Der Dank für diese Arbeit geht an alle Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben. Für die Betreuung der Promotion danke ich Dr. med. Rolf Kaiser und Prof. Dr. med. Jürgen Brockmüller und für die Bereitstellung des Themas und Korrektur der Arbeit PD Dr. med. Andreas Kupsch.

Besonderer Dank gilt dem Team des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité unter der Leitung von Prof. Dr. med. Ivar Roots für die Möglichkeit der Nutzung des Labors und der technischen Geräte. Die freundliche Aufnahme in das Team und die mir zugekommene Hilfe in der Theorie und Praxis, haben einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, dabei sind die Verdienste von Mark Goldammer und Dr. med. Laschinski, die zum erfolgreichen Abschluß der Arbeit wesentlich beigetragen haben, besonders hervorzuheben.

Mein Dank geht weiterhin an meine Eltern für die ausdauernde Unterstützung und Ermöglichung dieser Arbeit.