

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und klinische Datenerhebung

In diese retrospektive, nicht interventionelle Studie wurden insgesamt 183 nicht verwandte Patienten (107 Männer, 76 Frauen) mitteleuropäischer Abstammung mit IPS aus der neurologischen Klinik der Humboldt Universität zu Berlin (Charité) und der Ludwig Maximilians Universität München eingeschlossen. Die Diagnose basierte auf den klinischen Symptomen entsprechend den Kriterien der *United Kingdom Parkinson Disease Brain Bank (UKPDBB)* und dem positivem Ansprechen im Apomorphin- oder Dopamintest. Der Schweregrad der Erkrankung wurde von den Neurologen entsprechend der Hoehn-Yahr-Skala festgelegt. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Universitätsklinika der Humboldt-Universität zu Berlin (Charité) und der Ludwig Maximilians Universität München genehmigt. Die klinischen Daten der Patienten wurden anhand eines eigenständig erstellten Fragebogens erhoben.

Das mittlere Alter der Patienten betrug 67,0 +/-10,6 Jahre, das mittlere Alter bei Auftreten des IPS betrug 58,3 +/-11,4 Jahre. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung bestand die Krankheit seit 8,5 +/-5,5 Jahre, und die L-Dopa-Therapie lief über 54,7 (0,5 – 242,8) Monate. Die detaillierte Auflistung über die wesentlichen soziodemographischen Daten der Patienten ist der Tab. 16 zu entnehmen. Um ethnische Unterschiede zu vermeiden, waren nur Patienten mitteleuropäischen Ursprungs eingeschlossen.

Dyskinesien wurden definiert als L-Dopa-induzierte hyperkinetische und/oder dystone Bewegungen bzw. Haltungen oder durch einen Punktwert ≥ 32 in der *Unified Parkinson Disease Rating scale (UPDRS)* (Hagell 1999). *On-Off*-Phänomene waren als plötzliche, unvorhersehbare motorische Fluktuationen und *Wearing-Off*-Effekte waren als Wiederaufflackern von Parkinsonsymptomen nach einer L-Dopa-Dosis definiert. In der Analyse der Motorfluktuationen wurde nicht zwischen *On-Off*- und *Wearing-Off*-Phänomenen unterschieden. Psychotische Symptome wie Paranoia, Halluzinationen oder Delusionen wurden von den behandelnden Neurologen zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung dokumentiert und entsprechend der UPDRS Teil I (Teil I.2) mit einem Punktwert > 1 bewertet.

2.1.1 Einschluß- und Ausschlußkriterien

Die Diagnose des IPS wurde in der Sprechstunde für Bewegungsstörungen der Neurologie des Universitätsklinikums Rudolf Virchow der Charité Berlin und der Ludwig Maximilians Universität München gestellt oder verifiziert. Als Kriterien galten dabei:

- **Klinische Zeichen** wie einseitiger Beginn mit persistierender Asymmetrie, Ruhetremor, gutes Ansprechen auf L-Dopa-Substitution und langer Verlauf ohne zusätzliche neurologische Defizite wie Pyramidenbahnzeichen oder cerebelläre Symptome entsprechend den Kriterien der (*UKPDBB*) (Hughes 1992**).
- **Apomorphintest** (Applikation von 1-6 mg Apomorphin subcutan) mit konsekutiver Besserung der Symptomatik.
- **Ausschluß von nicht idiopathischen Parkinsonsyndromen** (Klinik, Bildgebung).

Von den ursprünglich 198 angenommenen Patienten wurden 15 wegen vorher definierter Kriterien wieder ausgeschossen, dazu gehörten Sekundäres Parkinsonsyndrom (n = 7), Fehldiagnosen (n = 3) und ungenügende Dokumentation (n = 5). Bei 165 Patienten konnte die genaue Therapiedauer mit L-Dopa und die kumulative Dosis vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum ersten Auftreten von Motorfluktuationen, Dyskinesien oder Psychosen dokumentiert und in dieser Studie ausgewertet werden. Bei einigen Patienten (n = 11) konnte nicht sicher bestimmt werden, ob unter der Therapie Episoden von Dyskinesien, Psychosen (n = 9) oder Motorfluktuationen (n = 10) aufgetreten waren oder nicht. Diese Patienten wurden von der jeweiligen Datenanalyse ausgeschlossen. Die genetische Variante des DRD1 (*BfaI*) konnte nur bei den Patienten aus der neurologischen Klinik der Humboldt Universität zu Berlin (Charité) untersucht (n = 158) werden, weil kein Material aus der Ludwig Maximilians Universität München vorlag.

Von den 165 Parkinsonpatienten wurden zwölf aufgrund ihrer besonders früh aufgetretenen schweren Dyskinesien und Psychosen unter der L-Dopa-Substitution zur Sequenzanalyse des kodierenden Bereich des DRD1 Rezeptors ausgewählt.

2.2 Materialien

Alle molekularbiologischen Experimente wurden mit hochreinen Chemikalien durchgeführt. Das Ansetzen der Lösungen erfolgte mit deionisierten und autoklaviertem Wasser.

2.2.1 Geräte

Geräte	Hersteller
DNS-Sequenzierer ABI 310A	Perkin Elmer/Applied Biosystem, USA
Elektrophoresekammern und Spannungsgeräte	Pharmacia, Biotech, Hoefer
Inkubationsschränke	Biometra
Thermocycler: Gene Amp PCR System 9600, 9700 und 310	Perkin Elmer/Applied Biosystem, USA
Videosystem <i>Eagleeye</i>	Stratgene
Zentrifugen	Eppendorf, Sigma, Beckmann

Tab. 3: Geräte und Hersteller

2.2.2 Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose ultrapure, Agarose (3:1)	Biozym, Biometra, Gibco BRL, Deutschland
Aqua destillata	
PCR-Puffer	New England Biolabs, Perkin Elmer, USA
<i>10x PCR Buffer II, Thermo Pol Buffer</i>	
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) 100 mM	MBI Fermentas, Litauen
DNS Molekulargewichtsmarker:	MBI Fermentas, Litauen
<i>V, VI, 100-bp ladder</i>	Gibco BRL, Deutschland
DNA Polymerasen:	Perkin Elmer, New England Biolabs, USA
<i>AmpliTaqTM, Vent(exo-)DNS-Polymerase</i>	
Enzym- und Reagenzienansatz für lange PCR:	Boehringer (Roche)
<i>ExpandTM Long Template PCR System</i>	
Ethanol, Chloroform, DMSO, Formamid	Merck, Deutschland
Phenol/Chloroform-Gemisch (Fertiglösung Nr.8)	Applied Biosystems, USA
EDTA, Natriumacetat etc.	Merck, Sigma, Pharmacia
MgCl ₂ -Lösung 25 mM	Perkin Elmer, USA
PCR-Primer, diverse (DNS-Oligonukleotide)	TIB MolBiol, Germany
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, Litauen
<i>(BamI/MscI, MspI, BfaI)</i>	New England Biolabs, USA
Sequenzierreagenzienansatz:	Perkin Elmer Applied Biosystem, USA
<i>Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing</i>	

Tab. 4: Reagenzien

2.2.3 Puffer und Lösungen

<u>10x Ery-Lysis-Puffer:</u>	1,55 M NH ₄ Cl	82,9 g
	0,1 M KHCO ₃	10,0 g
	1 mM EDTA	0,29 g oder 2 ml einer 0,5 M Lösung
	Aqua destillata	Auffüllen auf 1000 ml
	Konzentrierte HCl	Auf pH 7,4 einstellen
	Die Gebrauchslösung 1xEry-Lysis-Puffer wird mit dest. Wasser 1:10 verdünnt	
<u>10xNuclei-Lysis-Puffer:</u> (10x TEN Puffer)	0,2 M Tris/HCL pH 7,5	2,4 g
	0,2 M EDTA	400 µl einer 0,5 M Lösung
	Aqua destillata	Auffüllen auf 1000 ml
	Die Gebrauchslösung 1x Ery-Lysis-Puffer wird mit dest. Wasser 1:10 verdünnt	
<u>3 M Natriumacetat:</u>	CH ₃ COONa	40,8 mg
	Aqua destillata	Auf 100 ml auffüllen
	TrisHCl (Eisessig)	Auf pH 5,5 einstellen
<u>Proteinase Lsg.:</u>	Proteinase K	100 mg
	Aqua dest.	5 ml
	Endkonzentration: 20 mg/ml	
<u>Tris HCl-Puffer:</u>	Tris HCl	121,1 g
	Aqua dest.	Auf 800 ml auffüllen
	konzentrierter HCl	konzentrierter HCl
	Aqua dest.	Auf 1000 ml auffüllen
<u>10xTBE-Puffer:</u>	0,9 M Tris.Base	109 g
	0,9 M Borsäure	55 g
	EDTA	7,3 g
	Aqua dest.	Auf 1000 ml auffüllen
	NaOH/HCl	Auf pH 8,3 einstellen
	Als Laufmittel wird 5 %iger TBE-Puffer mit blauem Farbstoff gemischt	
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM TrisHCL	121 mg
	1 mM EDTA, pH 8,0	200 µl einer 0,5 M Lösung
<u>DNS-Molekulargewichtsmarker:</u>		
Marker V	Fragmentgemisch aus Spaltung des Plasmid pBR322-DNS mit Restriktionsendonuklease <i>HaeIII</i>	
Marker VI	Fragmentgemisch aus Spaltung des Plasmid pBR328-DNS mit Restriktionsendonuklease <i>BglI</i> und pBR328-DNS mit Restriktionsendonuklease <i>HinfI</i>	

2.3 DNS-Extraktion

Die DNS der untersuchten Individuen wurde aus ca. 10 ml EDTA-antikoaguliertem peripherem Blut durch Phenol/Chlorophorm-Extraktion extrahiert.

In 50-ml-Falconröhrchen wurde jeweils 1 Vol. Vollblut (versetzt mit EDTA) überführt, mit 3 Vol. 1x-Ery-Lysis-Puffer gemischt und für 15-30 min auf Eis gestellt, bis die Erythrozyten vollständig hämolysiert waren. Anschließend wurde der Ansatz kurz geschüttelt, 10 min bei 2000 *rounds/minute* (rpm) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Vorgang mit 2-4 ml 1x-Ery-Lysis-Puffer wiederholt. Nach dem Dekantieren konnten die gewonnenen Leukozyten-Pellets bei -80°C oder über Nacht bei -20°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet werden.

Das Leukozytensediment wurde mit 2 ml Nuclei-Lysis Puffer (1xTEN-Puffer) versetzt und in 15 ml Falconröhrchen überführt. Pro Probe wurden 1,5 mg Proteinase K, in 100 µl H₂O gelöst, dazugegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C im Brutschrank über Nacht gut geschüttelt. Dann wurden pro Probe 1,5 ml Phenol/Chloroform dazugegeben und für zwei Stunden in den Über-Kopf-Schüttler gestellt.

Die Mischung wurde anschließend für 5 min bei 2000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen und in 15-ml-Falconröhrchen überführt. Sie wurde dann mit jeweils 1,5 ml Chlorophorm (Chlorophorm/Isoamylalkohol 96:4) gemischt, für weitere 30 min in den Über-Kopf-Schüttler gestellt und danach 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (wäßrige Phase) wurde mit 6 ml 97 %-igem Ethanol und 100 µl 3 M Natriumacetat pH 5,5 in einem neuen Falconröhrchen versetzt und gut geschüttelt, bis die DNS als Konvolut ausfiel. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die präzipitierte DNS zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert, dekantiert und auf dem Kopf stehend 10 min leicht getrocknet. Die DNS wurde dann in 700 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) aufgenommen, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und über Nacht bei 55°C im Schüttelblock gelöst.

2.4 PCR der DRD3-, DRD4- und DAT-Varianten

In der Vorbereitung aller PCR-Ansätze wurde zunächst ein Mastermix von 24 µl pro Probe angesetzt, dem anschließend die DNS zugegeben wurde. In der Tab. 5 sind für jede der untersuchten Varianten Name und Sequenz der verwendeten Primer und ihre Richtung

dokumentiert. Anschließend werden die Proben in einen Thermozykler zur weiteren automatischen Bearbeitung gestellt. Das PCR-Programm wurde mittels eines Mastercyclers (Eppendorf) durchgeführt und beinhaltet 35-40 Zyklen, eine initiale Denaturierungsphase bei 95°C von 6 min und eine abschließende Extensionsphase bei 72°C. Die Zyklusbedingungen sind in den tabellarischen Reaktionsbedingungen der einzelnen genetischen Varianten jeweils aufgeführt. Der Mastermix wird in den nachfolgenden Tabellen jeweils für vier Proben angegeben. Wenn anschließend eine Restriktionsanalyse durchgeführt wurde, sind die Reaktionsbedingungen unter 2.5 aufgelistet.

Primer	Sequenz	Richtung
D1-3F	5'-GGG ATT GAC TTG GAT TGC-3'	f
D1-4G	3'-ACA GGC AGT GAG GAT ACG-5'	r
<i>BalI-Cr1D3</i>	5'-GCT CTA TCT CCA ACT CTC ACA-3'	f
<i>BalI-Cr2D3</i>	3'AAG TCT ACT CAC CTC CAG GTA-5'	r
D3- <i>MspI-1n</i>	5'-CTG TCT GGT ACA TAT TGG ATA-3'	f
D3- <i>MspI-2n</i>	3'-GAG ATG GAG TCT TGC TCT GTC-5'	r
D4.1.1.	5'-CGC CAT GGG GAA CCG CAG-3'	f
D4.1.2.	3'-CGG CTC ACC TCG GAG TAG A-5'	r
D4 <i>del Nö-1</i>	5'-GGG GGC GTG CTG CTC ATC-3'	f
DOT40 <i>RP1</i>	5'-TGT GGT GTA GGG AAC GGC CTG AGA-3'	f
DOT40 <i>neu</i>	3'-CTT CCT GGA GGT CAC GGC TCA AGG-5'	r

(f: forward primer, r: reverse Primer)

Tab. 5: Verwendeten Primer für die PCRs des DRD1, DRD3, DRD4 und Dopamintransporters

2.4.1 PCR-Ansatz der DRD3-Variante *BalI*

Ansatz:	2 µl	Forward primer (10 µM) <i>Bal-Cr1D3</i>
	2 µl	Reverse primer (10 µM) <i>Bal-Cr2D3</i>
	7 µl	d NTP (2 mM)
	10 µl	TrisHCl (100 mM) pH 8,3
	6 µl	MgCl ₂ (25 mM)
	43,2 µl	H ₂ O
	25 µl	200 mM KCl
	0,8 µl	<i>Taq</i> DNS-Polymerase
für 4 Proben à 24 µl:	96 µl	PCR-Mastermix + je 1 µl DNS
Zyklusbedingungen: 6 min 95°C – 35x (1 min 92°C-1 min 56°C-1 min 72°C)-7 min 72°C – 4°C ∞		
Restriktionsverdau:	4 µl	<i>BalI</i>
Für 4 Proben à 3,9 µl	11,6 µl	NE Puffer 1 (10 mM)
Inkubation für 16 Stunden bei 37°C. Auftrennung auf 2%-igem Agarose-Gel mit 120 V, 30 min.		

Tab. 6: PCR-Ansatz für die DRD3 *BalI* Variante (Methode modifiziert nach Lannfelt (1992))

2.4.2 PCR-Ansatz der DRD3-Variante *MspI*

Ansatz:	2	µl	<i>Forward</i> primer (10 µM) <i>D3MspI-1n</i>
modifiziert nach Griffon (1996)	2	µl	<i>Reverse</i> primer (10 µM) <i>D3MspI-2n</i>
	7	µl	d NTP (2 mM)
	10	µl	10 x Puffer
	3	µl	MgCl ₂ (25 mM)
	71,4	µl	H ₂ O
	0,6	µl	<i>Taq</i> DNS-Polymerase
für 4 Proben à 24µl:	96	µl	PCR-Mastermix + je 1µl DNS
Zyklusbedingungen: 35x (1 min 92°C-1 min 55°C-1 min 72°C)-7 min 72°C – 4°C ∞			
Restriktionsverdau:	1,2	µl	<i>MspI</i>
Für 4 Proben à 3,1 µl	11,2	µl	NE Puffer 2 (10 mM)
Inkubation für 16 Stunden bei 37°C. Auftrennung auf 2%-igem Agarose-Gel mit 120 V, 30 min.			

Tab. 7: PCR-Ansatz für die DRD3 *MspI* Variante

2.4.3 PCR-Ansatz der DRD4-Varianten (12-bp *repeat* und 13-bp Deletion)

Ansatz:	8	µl	Primer (10 µM) <i>4.1.1.</i>
adaptiert nach einer Methode	8	µl	Primer (10 µM) <i>4.1.2.</i>
von Catalano (1993) und	4	µl	Primer (10 mM) <i>D4 del Nö-1</i>
Nöthen (1994)	9	µl	d NTP (2 mM)
	25	µl	KCl 200 mM
	10	µl	TrisHCl 100 mM pH 8,0
	10	µl	100 % DMSO
	4	µl	MgCl ₂ (25 mM)
	16,8	µl	H ₂ O
	1,2	µl	<i>Taq</i> DNS-Polymerase
für 4 Proben à 24 µl:	96,0	µl	PCR-Mastermix + je 1 µl DNS
Zyklusbedingungen: 6 min 95°C- 40x (1 min 94°C-1 min 57°C-1 min 72°C)-7 min 72°C – 4°C ∞			
Auftrennung auf 5%-igem Ultrapure-Agarose-Gel mit 125 V, 80 min.			
(PCR für zwei Varianten gleichzeitig ohne Restriktionsverdau)			

Tab. 8: PCR-Ansatz für den DRD4 12-bp *repeat* und 13-bp Deletion Variante

2.4.4 PCR-Ansatz des 40-bp VNTR des Dopamintransporters

Ansatz:	2	µl	<i>Forward</i> primer (10 µM) <i>DOT RPI</i>
	2	µl	<i>Reverse</i> primer (10 µM) <i>DOTneu</i>
	7	µl	d NTP (2 mM)
	10	µl	10 x Puffer
	5	µl	MgCl ₂ (25 mM)
	69,2	µl	H ₂ O
	0,8	µl	<i>Taq</i> DNS-Polymerase
für 4 Proben à 24 µl:	96	µl	PCR-Mastermix + je 1 µl DNS
Zyklusbedingungen: 35x (1 min 93°C-1 min 60°C)-7 min 72°C –4°C ∞			
Auftrennung auf 3%-igem Agarose-Gel mit 130 V, 45 min.			

Tab. 9: PCR-Ansatz für die 40-bp VNTR Variante (modifiziert nach Persico (1995) und Sano (1993))

2.5 RFLP der DRD3-Varianten

Zur Durchführung eines RFLP wurde im Anschluß an die PCR ein weiterer Mastermix aus dem jeweiligen Restriktionsenzym und dem dazugehörigen Puffer hergestellt und auf die PCR-Proben verteilt. Die folgenden Angaben für Restriktionsenzyme und Puffer beziehen sich jeweils auf vier Proben. Anschließend wurden die Proben über Nacht oder für 16 h im Brutschrank bei 37°C im Dauerschüttler inkubiert.

Alle Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs geliefert. Die Verdauung wurde nach den Vorgaben der Firma New England Biolabs mit den auf die entsprechenden Enzyme abgestimmten Puffern (NEB 1 - 4), Temperaturen und Zeiten durchgeführt. Die genetischen Varianten des DRD4 und des Dopamintransporters wurden ohne Restriktionsanalyse untersucht.

2.5.1 RFLP der DRD3-Variante *BalI*

Das PCR-Produkt von 462-bp wird mit der Restriktionsendonuklease *BalI* verdaut. Daraus entstehen beim Vorliegen des Wildtyp (Serin) drei Fragmente (304-, 111- und 47-bp) und beim Vorliegen des mutierten Genotyps (Glycin) vier Fragmente (206-, 111-, 98- und 47-bp). Der heterozygote Genotyp weist alle genannten Banden auf. Die Abb.4 zeigt alle Varianten.

Das Enzym *BalI* hat folgende Schnittstellen:

$$5' \dots \text{TGG} \blacktriangledown \text{CCA} \dots 3'$$

$$3' \dots \text{ACC} \blacktriangledown \text{GGT} \dots 3'$$

Dem Mastermix incl. 1 µl DNS (insg. 25 µl) wird der Restriktionsansatz (3,9 µl) zugesetzt:

Restriktionsverdau (3,9 µl/Probe):	1	µl	<i>BalI</i>
	2,9	µl	NE Puffer 1 (10 mM)
	25	µl	Mastermix DRD3 <i>BalI</i>
	28,9	µl	

2.5.2 RFLP der DRD3-Variante *MspI*

Die *MspI* Variante ist eine polymorphe Region im Intron 5 des DRD3. Abhängig von An- oder Abwesenheit des *MspI* entsteht ein ungeschnittenes Fragment von 396 bp (Allel 1) oder zwei Fragmente von 252 und 144 bp (Allel 2). Die Abb.5 zeigt beide Varianten.

Das Enzym *MspI* hat folgende Schnittstellen: 5'.....C▼CGG...3'
3'....GGC▼C...5'

Dem Mastermix incl. 1 µl DNS (insg. 25 µl) wird der Restriktionsansatz (3,1 µl) zugesetzt:

Restriktionsverdau (3,1 µl/Probe):	0,3	µl	<i>MspI</i>
	2,8	µl	NE Puffer 2 (10 mM)
	25	µl	Mastermix DRD3 <i>MspI</i>
	28,1	µl	

2.6 Elektrophorese der DRD3-, DRD4- und DAT-Varianten

Für ein 2 %-iges Agarose-Gel von 250 ml wurden 5 g Agarose in 250 ml 1x-TBE-Puffer suspendiert und im Mikrowellenherd aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war und die Mischung klar sprudelte. Das Gemisch kühlte unter ständigem Rühren auf ca. 50°C ab, Ethidiumbromid (25 µl) wurde zugesetzt und das Gemisch in eine horizontale Gelkammer gegossen. Durch Einsetzen von Kämmen wurden Taschen (Volumen 40 µl) im Gel geformt. Wir benutzten 2 - 4 %-ige Agarose-Gele um Fragmente von einer zu erwartenden Länge zwischen 47- und 560-bp zu trennen.

Das fertige Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt, die mit 10x TBE Puffer (1000 ml) und Ethidiumbromid (100 µl) gefüllt war. Die PCR-Produkte wurden entweder direkt (*DOT40*, D4-13bp *repeat*, D4-12 bp Deletion) oder nach Verdau mit Restriktionsenzymen (*D3-BalI*, *D3-MspI*) auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Laufmittel wurde den Proben 10 µl TBE-Puffer zugegeben. In regelmäßigen Abständen wurden zusätzlich DNS-Molekulargewichtsmarker in die Geltaschen appliziert. Die Elektrophoresen erfolgten bei einer Spannung von 80 - 120 mV, bis der Farbstoff des Laufpuffers 5 - 6 cm weit gelaufen war.

Die Agarose-Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese unter dem UV-Transluminator unter Verwendung eines Rotfilters mit einer Polaroid MP-4 Kamera bei 1/100 sec Belichtungszeit und Blende 4,5 fotografiert.

2.6.1 Elektrophorese der DRD3-Variante *BalI*

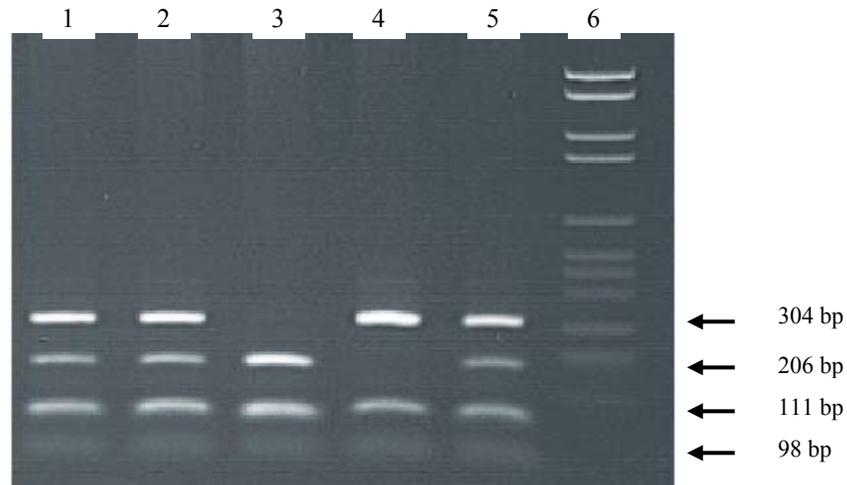


Abb. 4: Restriktionsfragmentlängenmuster zum Nachweis der DRD3 *BalI*-Variante

Spur 1, 2, 5: heterozygoter Genotyp (Ser/Gly) mit Fragmenten von 304bp-, 206bp- und 111bp-Länge, Spur 3: homozygoter Wildtyp (Ser/Ser) ohne Schnittstelle für *BalI* mit Fragmenten von 206bp- und 111bp-Länge, Spur 4: homozygoter Mutationstyp (Gly/Gly) mit Schnittstellen für *BalI* auf allen DNS-Strängen und Fragmenten von 304bp- und 111bp-Länge, Spur 6: DNS-Standard VI

2.6.2 Elektrophorese der DRD3-Variante *MspI*

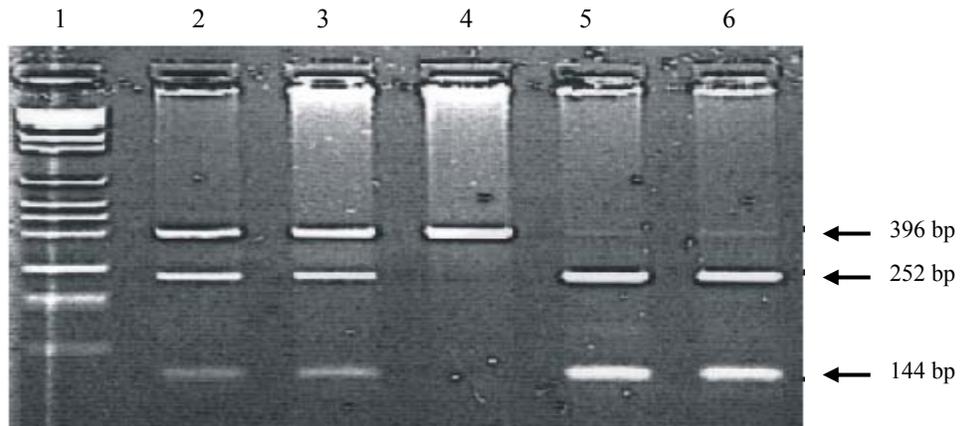


Abb. 5: Restriktionsfragmentlängenmuster zum Nachweis der DRD3 *MspI*-Variante

Spur 1: DNS-Standard VI, Spur 2-3: heterozygoter Genotyp mit Fragmenten von 396bp-, 252bp- und 111 bp-Länge, Spur 4: homozygoter Wildtyp ohne Schnittstelle für *MspI* mit einem Fragmenten von 396bp, Spur 5-6: homozygoter Mutationstyp mit Schnittstelle für *MspI* auf allen DNS-Strängen und Fragmenten von 252bp- und 144 bp-Länge.

2.6.3 Elektrophorese der DRD4-Varianten (12 bp repeat und 13 bp Deletion)

In diesem Versuch wurden ohne Restriktionsverdau zwei Varianten gleichzeitig untersucht. Die 12-bp Sequenz kommt beim Wildtyp zweimal vor (*repeat*). Das mutierte Allel wiederholt die Sequenz dagegen nicht. Die 13-bp Sequenz des DRD4 liegt beim Wildtyp einmal vor (Insertion) und fehlt beim mutierten Allel (Deletion). In Tab. 10 und Abb. 6 werden diese dargestellt:

	1 x 12-bp-Sequenz Allel 1	2 x 12-bp (<i>repeat</i>) Allel 2
13-bp-Sequenz Insertion	285/285 176	297/297 176
13-bp Deletion	272/272 163	284/284 163

Tab. 10: DRD4 Varianten und deren Fragmentlängen

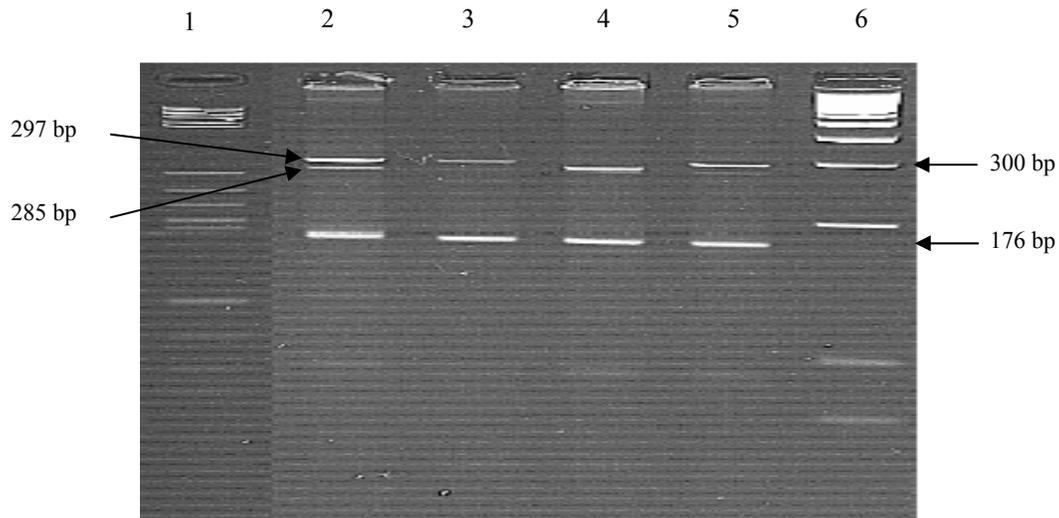


Abb. 6: Fragmentmuster der PCR zum Nachweis der DRD4 12-bp *repeat*, 13-bp Deletions Varianten

Spur 1: DNS-Standard VI, Spur 2 und 5: heterozygot 1x12 bp und 2x12 bp (*repeat*) ohne Deletion der 13 bp-Sequenz mit Fragmenten von 297bp-, 285bp- und 176bp-Länge, Spur 3: homozygot 2x12 bp (*repeat*) ohne 13bp-Deletion mit Fragmenten von 297bp- und 176bp-Länge, Spur 4: homozygot 1x12 bp (ohne *repeat*) ohne Deletion mit Fragmenten von 285bp- und 176bp-Länge

2.6.4 Elektrophorese des 40-bp VNTR des Dopamintransporters

Bei dem 40bp-VNTR des Dopamintransporters wiederholt sich eine 40-bp Sequenz zwischen ein- und zwölfmal. Das bedeutet, daß ein Allel bis zu zwölf Wiederholungen aufweisen kann. Das längste Fragment von 560bp-Länge entspricht der zwölffachen Wiederholung des 40-bp VNTR (12r-Allel), das kürzeste 320bp mit sechs *repeats* (6r-Allel):

	10r-Allel	9r-Allel	11r-Allel	7r-Allel	8r-Allel	12r-Allel	6r-Allel
Fragmentlänge:	480 bp	440 bp	520 bp	360 bp	400 bp	560 bp	320 bp

Tab. 11: Kodierung der Fragmente des 40bp-VNTR des DAT nach Anzahl der Wiederholungen

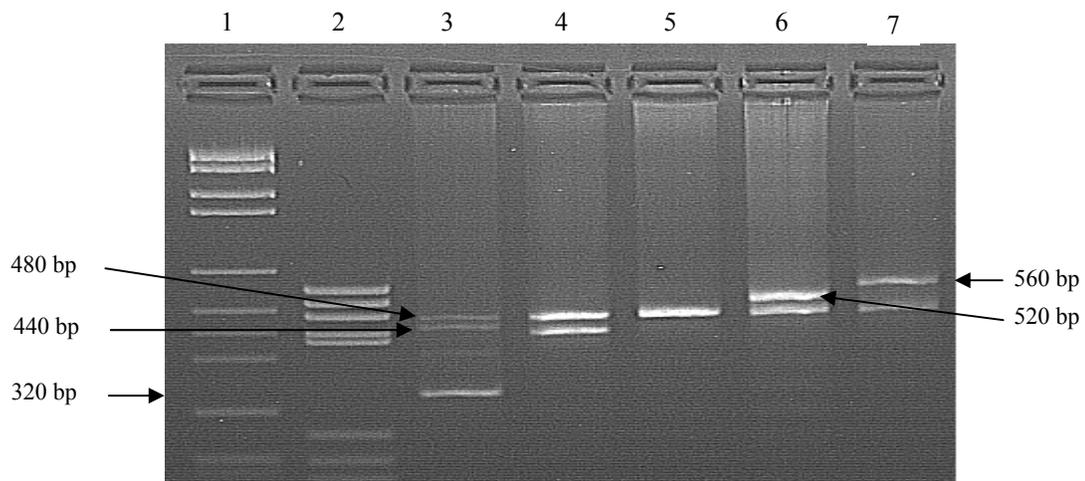


Abb. 7: Fragmentmuster der PCR zum Nachweis der 40bp-VNTR Variante des DAT

Spur 1: DNS-Standard VI, Spur 2: DNS-Standard V, Spur 3: heterozygoter Genotyp 10r/6r mit Fragmenten von 480bp-, 440bp- und 320bp-Länge, Spur 4: heterozygoter Genotyp 10r/9r mit Fragmenten von 480bp- und 440bp-Länge, Spur 5: homozygoter Genotyp 10r/10r mit einem Fragment von 480bp-Länge, Spur 6: heterozygoter Genotyp 10r/11r mit Fragmenten von 480bp- und 520bp-Länge, Spur 7: heterozygoter Genotyp 10r/12r mit Fragmenten von 480bp- und 560bp-Länge.

2.7 Sequenzierungs-PCR des DRD1

Als Vorbereitung zum Sequenzieren werden zunächst lange PCR-Abschnitte des DRD1 (*long* PCR) amplifiziert. Nachfolgend wurden aus den langen Fragmenten kürzere DNS-Abschnitte mittels PCR amplifiziert, die dann für den Sequenzierer aufgearbeitet wurden. Alle eingesetzten Primer sind in Tab. 12 sowie in Abb. 8 schematisch dargestellt.

DRD1 Primer	Sequenz	Richtung und Position		
Vorderer Bereich:				
D1-3.1	5'-CGG GCA TCT CCA ACC CTA GTT AG-3'	f	1043	1065
D1-4.1	5'-AGC CAA GGA GAT GAC AAA GAA GT-3'	r	2773	2751
D1-3A D1-4A	5'-TCG CCC GCA GAA CCA TCC AG-3'	f	1353	1372
	3'-GCT TGC CCT CCC TGG TTA C-5'	r	1326	1307
D1-3B D1-4B	5'-CGG CCT GTG CGC TTG CCTG-3'	f	1486	1501
	3'-CTG GGC AGC TTC TTT TCT TG-5'	r	1663	1644
D1-3C D1-4C	5'-GCC CTT TGA ACA ATC TC-3'	f	1735	1751
	3'-GCG GCA GCC CAC TTC CTT G-5'	r	1778	1759
D1-3D D1-4D	5'-AGG GGC TTT GAG AGA GAC-3'	f	1942	1959
	3'-AGC CCA ACC TAA TAA TTC-5'	r	2019	2001
D1-3E D1-4E	5'-CCA CCA GAA AAG CAA CAG-3'	f	2182	2199
	3'-GCC TCT GCT CTG CTA GTC-5'	r	2238	2221
D1-3F D1-4F	5'-GGG ATT GAC TTG GAT TGC-3'	f	2384	2401
	3'-CCC ACC AGG CAG CAC TTT G-5'	r	2484	2406
D1-3G D1-4G	5'-AGG GAC TTC TCT GTT CG-3'	f	2624	2640
	3'-ACA GGC AGT GAG GAT ACG-5'	r	2656	2639
Hinterer Bereich :				
D1-1	5'-GCT TAG GAA CTT GAG GGG -TG-3'	f	2521	2540
D1-2	3'-TGT GTG GCA GGA TTC ATC TG-5'	r	3938	3919
D1-1A	5'-TGC CGT TAT CAG GTT CCG AC-3'	f	2710	2730
D1-2A	3'-AGC CAA GGA GAT GAC AAA GA-5'	r	2773	2754
D1-1B	5'-CGG TAT GAG AGA AAG ATG AC-3'	f	2960	2979
D1-2B	3'-CTG GGA TGA AGG AGA AGA TGA GT-5'	r	3047	3028
D1-1C	5'-CCA TCT CAT CCT CTG TAA TA-3'	f	3156	3175
D1-2C	3'-CGC CGT ATT TGT TTC TGA GC-5'	r	3252	3233
D1-1D	5'-TTG GCT ACC TTT CTT CAT CT-3'	f	3424	3443
D1-2D	3'-CTC CCC AGA CCC ACA GA-5'	r	3478	3462
D1-1E	5'-TTT GCC CTG CGA CGA ATA AT-3'	f	3621	3640
D1-2E	3'-CCC CAT TGT TAT TGA TAC TC-5'	r	3674	3655

Tab. 12: Richtung und Position der verwendeten Primer der Sequenzierungs-PCRs des DRD1 Rezeptors

2.7.1 Sequenzierungs-PCR der langen Fragmente (*long-PCR*)

Für die Sequenzierung wurden die Exons 1 und 2 zunächst als lange PCR-Fragmente amplifiziert (Tab.12), indem die außen ansetzenden *forward*-Primer D1-3.1 und *reverse*-Primer D1-4.1 für den vorderen Bereich des DRD1 bzw. der *forward*-Primer D1-1 und *reverse*-Primer D1-2 für den hinteren Bereich des DRD1 der PCR-Reaktion zugegeben wurden. Dabei entstanden Fragmente von bis zu 1380-bp Länge.

Das PCR Sequenzierungsprogramm begann mit einer Denaturierungsphase bei 94°C, gefolgt von 25 Zyklen (Denaturierung, Anlagerung, Extension) und einer abschließenden Extensionsphase bei 72°C bzw. 68°C (Tab.13a und 13b). Die Ansätze der Sequenzier-PCRs sind für jeweils vier Proben angegeben. Eingesetzt wurde der *Expanded Long Template PCR System Kit* (Roche Diagnostics).

Ansatz:	2,0	µl	Primer (10 µM) <i>D1-3.1</i> .
	2,0	µl	Primer (10 µM) <i>D1-4.1</i> .
	10	µl	Puffer 3
	7,0	µl	dNTP (2 mM)
	74,2	µl	H ₂ O
	0,8	µl	Polymerase B
für 4 Proben à 24 µl:	96,0	µl	PCR-Mastermix + je 1 µl DNA
Zyklusbedingungen: 2 min 94°C - 35x (30 sec 94°C - 30 sec 50°C - 2 min 68°C) - 7 min 68°C-4°C ∞			

Tab. 13a: Amplifizierung der langen PCR Produkte im vorderen Bereich des DRD1

Ansatz:	2,0	µl	Primer (10 µM) <i>D1-1</i>
	2,0	µl	Primer (10 µM) <i>D1-2</i>
	10	µl	Puffer 2
	7,0	µl	d NTP (2 mM)
	74,2	µl	H ₂ O
	0,8	µl	Polymerase B
für 4 Proben à 24 µl:	96,0	µl	PCR-Mastermix + je 1 µl DNS
Zyklusbedingungen: 2 min 94°C- 35x (30sec 94°C - 30sec 63°C - 90sec 72°C) - 7min 72°C – 4°C ∞			

Tab. 13b: Amplifizierung der langen PCR Produkte im hinteren Bereich des DRD1

2.7.2 Sequenzierungs-PCR der kurzen Fragmente

Im Anschluß an die Amplifizierung der langen Fragmente wurde eine Sequenzierungs-PCR mit kürzeren PCR-Amplifikationen mit je einem *forward*- und *reverse*-Primer durchgeführt. Die entstandenen Fragmente waren etwa 300-bp lang und überlappten mit dem jeweils folgenden Fragment. Die Volumina werden nachfolgend für jeweils vier Proben angegeben.

Ansatz:	4	µl	Primer (10 µM)
	24	µl	Produkt aus Long-PCR
	10	µl	<i>Big dye reaction kit</i>
	2	µl	H ₂ O
für 4 Proben à 10µl:	40	µl	PCR-Mastermix + je 1 µl DNS
Zyklusbedingungen: 4 min 94°C- 25x(15sec 96°C-15sec 56,5°C-4min 60°C)-7 min 72°C-4°C ∞			

Tab. 14: Reaktion für die Sequenzierungs-PCR für jeweils vier Proben

In Abb. 8 sind die unterschiedlichen Reaktionen in einem Sequenzierungsschema des DRD1 dargestellt mit den *long*-PCR-Produkten und den überlappenden kürzeren Sequenzierreaktionen (PCR) unter Einbeziehung der bekannten und der neuen genetischen Varianten.

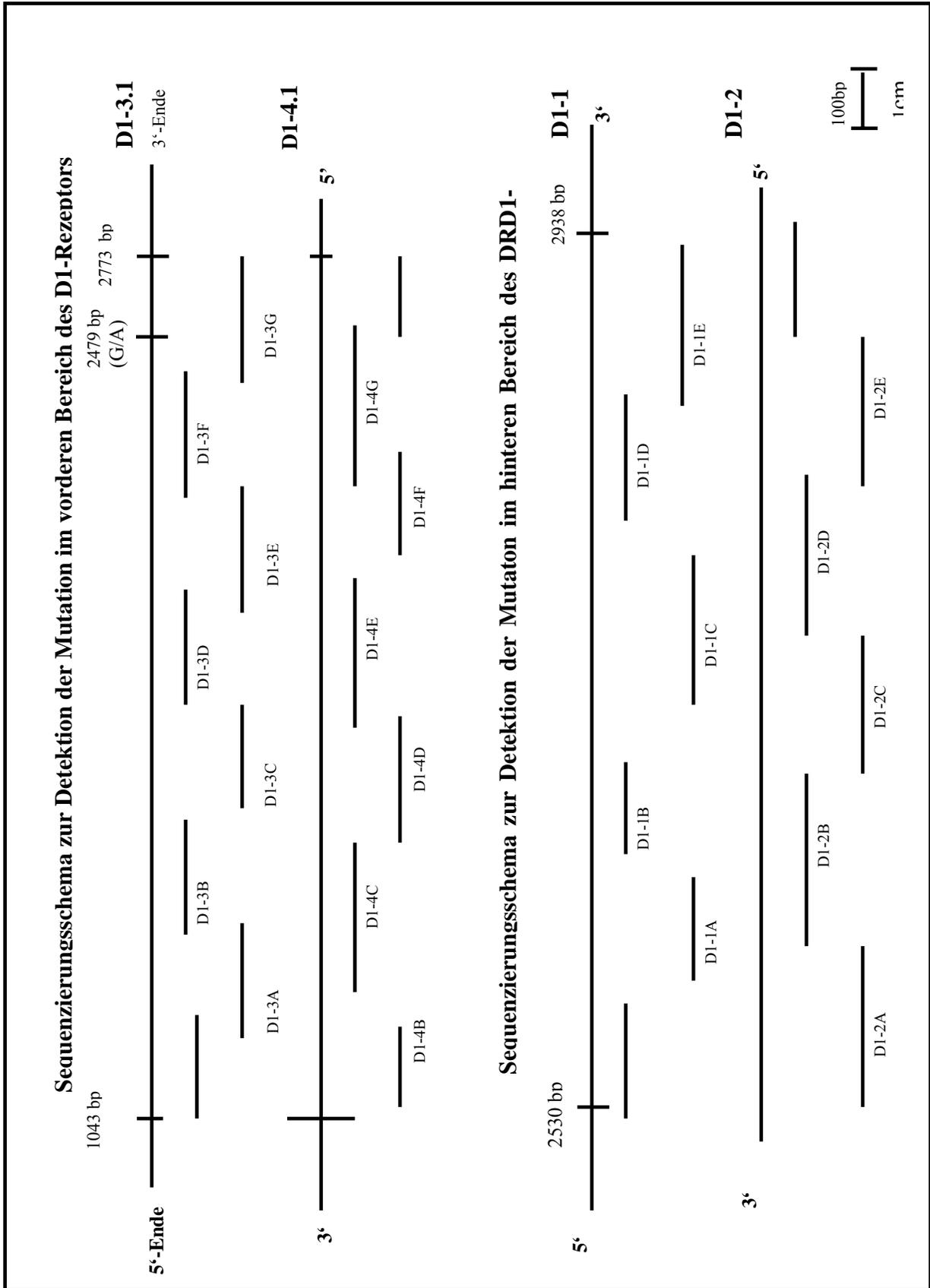


Abb. 8: Sequenzierungsschema zur Detektion der Mutationen des DRD1

2.7.3 Probenaufarbeitung zum Sequenzieren

Das Produkt der Sequenzierungs-PCR wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Jede Probe wurde jeweils mit 75 µl Aqua destillata, 10 µl Natriumacetat pH 5,5 und 300 µl 96 %-igem Ethanol versetzt, geschüttelt (im Vortexer) und bei 1500 U/min für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Pro Probe wurden 300 µl 70 %-iges Ethanol zugegeben und bei 1500 U/min erneut für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Eppendorfgefäße umgedreht auf einem Kimwipe-Tuch getrocknet. Im *Speed Vac* wurde der Restalkohol unter Vakuum 10 min eingedampft. Für den ABI 310-Sequenzierer wurde die DNS in 25 µl Formamid (100 %) aufgenommen und 2 min bei 95°C denaturiert. Dieser letzte Schritt war nicht notwendig, wenn die Proben sofort weiterverarbeitet wurden. Dann reichte die Aufnahme in 20 µl H₂O aus.

Die Sequenzierung erfolgte in einem ABI 310-Sequenzierer, einem automatischen Instrument zur Analyse von fluoreszierend markierten DNS Fragmenten mittels Kapillarelektrophorese. Die Daten wurden durch die Software des ABI 310-Sequenzierers gesammelt und analysiert. Es wurde ein *Big dye terminator kit* mit genspezifischen Primern von Applied Biosystems verwendet. Die Exons wurden in beide Richtungen sequenziert.

2.8 DRD1 A/G-94 RFLP (*Bfa*I)

In der Sequenzierungsanalyse trat der heterozygot mutierte Typ der DRD1 *Bfa*I Variante bei drei von zwölf Patienten auf dem Exon 2 des DRD1 auf. Diese genetische Variante wurde daraufhin für alle Parkinsonpatienten mittels RFLP-PCR untersucht.

2.8.1 PCR der DRD1-Variante A/G-94 *Bfa*I

Die Sequenzierungsprimer D1-3F und D1-4G, die die Variante in der Sequenzanalyse einrahmten, wurden als Primer der Reaktion zugesetzt. Die Probenverarbeitung erfolgt wie unter 2.4 beschrieben.

Ansatz:	2	µl	<i>Forward</i> primer (10 µM) 3F
	2	µl	<i>Reverse</i> primer (10 µM) 4G
	7	µl	d NTP (2 mM)
	10	µl	10 x Puffer
	4	µl	MgCl ₂ (25 mM)
	70,2	µl	H ₂ O
	0,8	µl	<i>Taq</i> DNS-Polymerase
für 4 Proben à 24 µl:	96	µl	PCR-Mastermix + je 1 µl DNS
Zyklusbedingungen: 2 min 94°C- 40x (30 sec 94°C-30 sec 54°C- 30 sec 72°C)-7 min 72°C-4°C ∞			
Restriktionsverdau:	4,25	µl	<i>Bfa</i> I
Für 4 Proben à 5 µl	15,75	µl	NE Puffer 4 (10 mM)
Inkubation für 16 Stunden bei 37°C. Auftrennung auf 3%-igem Agarose-Gel mit 120V, 30min.			

Tab. 15: PCR-Ansatz für den *Bfa*I RFLP

2.8.2 RFLP der DRD1-Variante G/A-94 *Bfa*I

Die Aufarbeitung der Proben erfolgt nach den unter 2.5 beschriebenen Grundsätzen. Als Restriktionsendonuklease wird *Bfa*I und als Puffer der 10xNE Puffer 4 eingesetzt. Die Proben werden bei 37°C für 16 h oder über Nacht inkubiert. Bei dieser Variante liegt beim Wildtyp die Sequenz 5'-CCTGG-3' vor. Bei der mutierten Form entsteht durch einen Nukleotidaustausch eine neue Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bfa*I. Das Enzym schneidet nur dann, wenn die mutierte Variante vorliegt. Bei den verwendeten Primern erwartet man beim Wildtyp ein ungeschnittenes Fragment von 274-bp Länge und bei der mutierten Variante zusätzlich zwei Banden von 94-bp und 178-bp Länge.

Das Enzym *Bfa*I hat folgende Schnittstellen:

5'...C▼TAG...3'

3'...GAT▼C...5'

Dem Mastermix incl. 1 µl DNS (insg. 25 µl) wird der Restriktionsansatz (5 µl) zugesetzt:

Restriktionsverdau (5µl/Probe):	4,25	µl	<i>Bfa</i> I
	15,75	µl	10 x NE Puffer 4 (10 mM)
	25	µl	Mastermix DRD1 <i>Bfa</i> I
	40	µl	

2.8.3 Elektrophorese der DRD1-Variante G/A-94 *Bfa*I

Die Elektrophorese erfolgte mit einem 3%-igen Agarosegel.

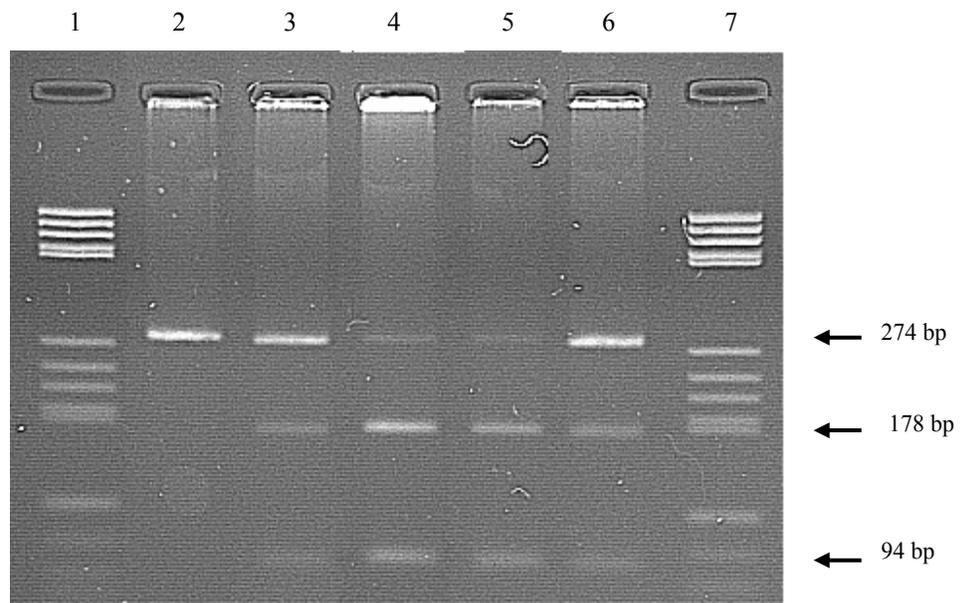


Abb. 9: Restriktionsfragmentmuster zum Nachweis der DRD1 G/A-94 (*Bfa*I) Variante

Spur 1, 7: DNS-Standard V, Spur 2: homozygoter Wildtyp ohne Schnittstelle für *Bfa*I mit einem Fragment von 274bp-Länge, Spur 3, 6: heterozygoter Genotyp mit Fragmenten von 274bp-, 178bp- und 94bp-Länge, Spur 4, 5: homozyoter Mutationstyp mit Schnittstelle für *Bfa*I und Fragmenten von 178bp- und 94bp-Länge.

2.9 Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SPSS, Version 8.01, durchgeführt. Die Signifikanz der Unterschiede in der Genotyphäufigkeit wurde mittels *Chi-Quadrat-Test* (χ^2) nach Pearson oder, falls die Zahlenwerte unter fünf auftraten, mittels des *Exakt Test* nach Fisher ermittelt. Die Tests wurden bei einem Signifikanzniveau von 0,05 durchgeführt.

Die mittlere kumulative L-Dopa-Dosis und die durchschnittliche Dauer der Erkrankung wurden für Patienten mit oder ohne Nebenwirkungen anhand des *Mann-Whitney-U-Test* verglichen. Zur Analyse der potentiellen Korrelation zwischen Dyskinesien, Psychosen und Motorfluktuationen und den klinischen Prädiktoren wurde der *Spearman rank Test* herangezogen. Die klinischen Charakteristika der Patienten wurden ebenfalls anhand des *Mann-Whitney-U-Test* miteinander verglichen.

Die Dauer der Therapie mit L-Dopa bis zum ersten Auftreten von Dyskinesien, Psychosen oder Motorfluktuationen wurde als *Kaplan-Meyer-Überlebenskurve* berechnet und im zeitlichen Verlauf dargestellt. Dabei war die zeitabhängige Variable die Dauer der L-Dopa-Behandlung in Tagen bis zum Auftreten der Nebenwirkungen bzw. bei Patienten ohne L-Dopa-Nebenwirkungen die Dauer der Behandlungszeit bis zum Ende der Studie. Ausgewertet wurden die jeweiligen Genotypen. Die statistische Signifikanz der kumulativen Wahrscheinlichkeiten in den Kaplan-Meyer-Überlebenskurven für Patienten, die unter der Therapie frei von Langzeitnebenwirkungen blieben, wurde im *log rank Test* ermittelt.