

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
Frankfurt am Main
Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie
Sektion Molekulare Neurogenetik
Direktor: Prof. Dr. med. Helmuth Steinmetz

Molekulargenetische Ansätze zur Untersuchung von Basalganglienerkrankungen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Nadine Abahuni
aus
Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2010

Dekan: Prof. Dr. med. Josef M. Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. med. Georg Auburger
Korreferent: Prof. Dr. med. R. König

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2010

*„Die eitle Einbildung, man verstehe alles,
kann ja nur daher kommen,
dass man nie etwas verstanden hat.*

*Denn wer nur ein einziges Mal das Verständnis
einer Sache erlebt hat, wer wirklich geschmeckt hat,
wie man zum Wissen gelangt, der weiß auch,
dass er von der Unendlichkeit der
übrigen Wahrheiten nichts weiß.“*

Galileo Galilei (1564-1642)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Torsionsdystonie	1
1.1.1. Klinische Aspekte	1
1.1.2. Genetisch determinierte Dystonien	4
1.1.3. Pathomechanismen	10
1.1.4. Therapie	11
1.1.5. Sequenzierung von vier Kandidatengenem auf Chromosom 18p11 in einer Familie mit fokaler Torsionsdystonie (DYT7)	12
1.2. Morbus Parkinson	18
1.2.1. Klinische Aspekte	18
1.2.2. Histopathologische Aspekte	19
1.2.3. Biochemische Aspekte	21
1.2.4. Genetik des M. Parkinson	25
1.2.5. Therapie	34
1.2.6. Parametrische Kopplungsanalyse von PARK5 in einer Familie mit autosomal dominant vererbtem Morbus Parkinson	36
1.2.6.1. Genetische Analyse	36
1.2.6.2. Charakterisierung des Kandidatengens <i>UCH-L1</i>	39
1.2.7. Assoziationsuntersuchung zweier Parkinson Kandidatengene anhand von <i>single nucleotide polymorphisms (SNPs)</i>	41
1.2.7.1. Methodenbetrachtung und Studiendesign	41
1.2.7.2. <i>MTIF3</i>	42
1.2.7.3. <i>NME4</i>	43
2. MATERIALIEN UND METHODEN	45
Teil A: Materialien	45
a) Chemikalien	45
b) Zusammensetzung selbst hergestellter Reagenzien	47
c) Geräte	49
d) Computerprogramme	50
e) Internetadressen	50
Teil B: Methoden	51
2.1. Sequenzierung von vier Kandidatengenem auf Chromosom 18p11 in einer Familie mit fokaler Torsionsdystonie (DYT7)	51
2.1.1. Patientenbeschreibung	51
2.1.2. Die Methode der Sequenzierung	52
2.1.3. Beschreibung der Kandidatengene	53
2.1.3.1. <i>ZFP161</i>	54
2.1.3.2. <i>LOC390828</i>	55
2.1.3.3. <i>NDUFV2</i>	56

2.1.3.4. PTPRM.....	57
2.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation des Exons.....	58
2.1.4.1. Materialien.....	59
2.1.4.2. Durchführung.....	59
2.1.5. Extraktion der PCR-Produkte.....	59
2.1.5.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	60
2.1.5.2. Extraktion direkt aus der PCR.....	61
2.1.5.3. DNA Extraktion aus dem Agarosegel.....	61
2.1.6. Bestimmung der DNA-Konzentration durch Gelelektrophorese.....	62
2.1.6.1. Materialien.....	62
2.1.6.2. Durchführung.....	62
2.1.7. Sequenzier-PCR mit Big Dye®.....	63
2.1.7.1. Materialien.....	63
2.1.7.2. Durchführung.....	64
2.1.8. Aufreinigung der Sequenzier-PCR.....	64
2.1.8.1. Materialien.....	64
2.1.8.2. Durchführung.....	64
2.1.9. Vorbereitung und Durchführung der Sequenzierung.....	65
2.1.9.1. Materialien.....	65
2.1.9.2. Durchführung.....	65
2.1.10. Restriktionsverdau.....	66
2.1.10.1. Materialien.....	67
2.1.10.2. Durchführung.....	67
2.1.11. Agarose-Gelelektrophorese.....	68
2.2. Parametrische Kopplungsanalyse von PARK5 in einer Familie mit autosomal dominant vererbtem Morbus Parkinson.....	68
2.2.1. Patientenbeschreibung.....	68
2.2.2. Parametrische Kopplungsanalyse.....	69
2.2.3. DNA Extraktion aus humanem Blut mit der Salzmethode.....	70
2.2.3.1. Materialien.....	70
2.2.3.2. Durchführung.....	70
2.2.4. Radioaktive Polymerase-Kettenreaktion.....	71
2.2.4.1. Materialien.....	71
2.2.4.2. Durchführung.....	72
2.2.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	72
2.2.5.1. Vorbereitung der Glasplatten.....	72
2.2.5.2. Materialien.....	73
2.2.5.3. Durchführung.....	73
2.2.6. Polymerase-Kettenreaktion.....	74
2.2.6.1. Materialien.....	74
2.2.6.2. Durchführung.....	74
2.2.7. Restriktionsverdau.....	74
2.2.7.1. Materialien.....	75
2.2.7.2. Durchführung.....	75
2.2.8. Agarose-Gelelektrophorese.....	75
2.2.8.1. Materialien.....	75
2.2.8.2. Durchführung.....	75

2.3. Assoziationsuntersuchung zweier Parkinson Kandidatengene anhand von <i>single nucleotide polymorphisms</i>	76
2.3.1. Assoziationsuntersuchung.....	76
2.3.2. Patientenbeschreibung.....	76
2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion.....	77
2.3.4. Restriktionsverdau.....	77
2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese.....	78
2.3.5.1. <i>Materialien</i>	78
2.3.5.2. <i>Durchführung</i>	78
3. ERGEBNISSE	79
3.1. Sequenzierung von vier Kandidatengen auf Chromosom 18p11 in einer Familie mit fokaler Torsionsdystonie (DYT7)	79
3.1.1. Zusammenstellung der Ergebnisse.....	79
3.1.2. Definition und Lokalisation der Polymorphismen.....	80
3.1.2.1. <i>LOC390828</i>	80
3.1.2.2. <i>ZFP161</i>	83
3.1.2.3. <i>NDUFV2</i>	84
3.1.2.4. <i>PTPRM</i>	85
3.1.3. Verteilung der Polymorphismen in der Patientengruppe.....	87
3.1.4. Frequenz der Polymorphismen in der Kontrollgruppe.....	89
3.2. Parametrische Kopplungsanalyse von PARK5 in einer Familie mit autosomal dominant vererbtem Morbus Parkinson	90
3.2.1. Zusammenstellung der Ergebnisse.....	90
3.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	90
3.2.3. Restriktionsverdau.....	91
3.2.4. Auswertung der Ergebnisse.....	92
3.3. Assoziationsuntersuchung zweier Parkinson Kandidatengene anhand von <i>single nucleotide polymorphisms</i>	94
3.3.1. Restriktionsverdau.....	94
3.3.2. Auswertung der Ergebnisse.....	96
4. DISKUSSION	98
4.1. Sequenzierung von vier Kandidatengen auf Chromosom 18p11 in einer Familie mit fokaler Torsionsdystonie (DYT7)	98
4.1.1. Analyse der Ergebnisse.....	98
4.1.2. Auswahl und Charakterisierung der Kandidatengene.....	101
4.1.3. Ausblick.....	103
4.2. Parametrische Kopplungsanalyse von PARK5 in einer Familie mit autosomal dominant vererbtem Morbus Parkinson	107
4.2.1. Analyse der Ergebnisse.....	107
4.2.2. Methodenbetrachtung.....	110
4.2.3. Ausblick.....	111

4.3. Assoziationsuntersuchung zweier Parkinson Kandidatengene anhand von <i>single nucleotide polymorphisms</i>	111
4.3.1. Analyse der Ergebnisse.....	111
4.3.2. Methodenbetrachtung und Studiendesign.....	115
4.3.3. Auswahl und Charakterisierung der Kandidatengene.....	117
4.3.3.1. <i>NME4</i>	117
4.3.3.2. <i>MTIF3</i>	118
4.3.4. Ausblick.....	120
4.4. Schlussfolgerung	120
5. ZUSAMMENFASSUNG	121
6. ABSTRACT: <i>Basic Approaches for the Molecular Genetic Analysis of Movement Disorders</i>	123
7. LITERATURVERZEICHNIS	125
8. PUBLIKATIONEN, KONGRESSTEILNAHMEN & SEMINARE	142
9. DANKSAGUNG	143
10. LEBENSLAUF	144
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	145

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin / Alanin
Abb.	Abbildung
Acta Neurol Scand	Acta Neurologica Scandinavica
Adv Neurol	Advances in Neurology
AFITD	adult onset focal idiopathic torsion dystonia
Ala	Alanin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Am J Hum Genet	American Journal of Human Genetics
Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet	American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics
Am J Physiol Cell Physiol	American journal of physiology. Cell physiology
Ann Neurol	Annals of Neurology
Annu Rev Biochem	Annual review of biochemistry
ApoE/Apoε4	Apolipoprotein E / Apolipoprotein ε4
APS	Ammoniumpersulfat
Arch Neurol	Archives of Neurology
AREP	autosomal recessive early onset parkinsonism
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatasen
Biochem J	The Biochemical Journal
Biochim Biophys Acta	Biochimica et biophysica acta
Biochem Biophys Res Commun	Biochemical and biophysical research communications
Biol Psychiatry	Biological psychiatry
Biophys J	Biophysical journal
BHS	Bluthirnschranke
bp	Basenpaare
Brain Res	Brain Research
Brain Res Mol Brain Res	Brain research. Molecular brain research
BRPK	PINK1 Homolog in der Maus
BSA	bovine serum albumine

C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium Ion
CBD	Kortikobasale Degeneration
Cl	Chlorid Ion
cM	centiMorgan
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CSE	Choreoathetose mit Spastizität und episodischer Ataxie
Cytogenet Cell Genet	Cytogenetics and cell genetics
D	Asparaginsäure
D _{1/2}	Dopaminrezeptortypen
D..S.....	Mikrosatelliten
DAT	Dopamintransporter
dCTPα ³² P	mit radioaktivem Phosphor markiertes dCTP
d(d)ATP	(Di)Desoxyadenosintriphosphat
d(d)CTP	(Di)Desoxycytosintriphosphat
DDP1	Diadenosine and Diphosphoinositol Polyphosphate Phosphohydrolase
d(d)GTP	(Di)Desoxyguanosintriphosphat
DJ-1	Protein des PARK7 Lokus
DLB	Lewy-Körperchen Demenz
DMSO	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonucleicacid
DNA Res	DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genome
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DRD	L-Dopa responsive Dystonie
Dtsch Z Nervenheilk	Deutsche Zeitschrift Nervenheilkunde
d(d)TTP	(Di)Desoxythymidintriphosphat
ddH ₂ O	zweidestilliertes Wasser
DYT	Chromosomaler Lokus für hereditäre Dystonien
E	Glutaminsäure

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Environ Health Perspect	Environmental health perspectives
EOPD	early onset Parkinson disease
EPB41L3	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3
Eur J Hum Genet	European Journal of Human Genetics
ex	Exon
Exp Neurol	Experimental neurology
F	Forward
FAD	Flavinadenindinukleotid
fMet-tRNA	Initiator transfer-RNA
g	Gramm
G	Glycin / Guanosin
gad	gracile axonal dystrophy
Genome Res	Genome research
GEO-PD	Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease
GIT	Gastrointestinaltrakt
Gly	Glycin
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTF3A	general transcription factor IIIA
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ⁺	Wasserstoff Ion
het	heterozygot
HNE	4-Hydroxynonenal
hom	homozygot
Hum Mol Genet	Human Molecular Genetics
Hum Mutat	Human Mutation
I	Isoleucin
INOS	inducible NO-Synthetase
Int J Biochem	International Journal of Biochemistry
Int J Dev Biol	The International journal of developmental biology

$^{123}\text{-I-FP-CIT-SPECT}$	[(123I)-2 beta-carbomethoxy-3beta-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)-nortropane Single Photon Emission Computertomographie
J Biol Chem (JBC)	Journal of biology
J Cell Biol	The Journal of biological chemistry
J Inherit Metab Dis	Journal of inherited metabolic disease
J Med Genet	Journal medical genetics
J Neural Transm	Journal of neural transmission
J Neurochem	Journal of neurochemistry
J Neurol Neurosurg Psychiat	Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry
J Neurosci	Journal of neuroscience
J Neurosci Res	Journal of neuroscience research
K	Lysin
K^+	Kalium Ion
kB	Kilobasen
KI	Konfidenzintervall
KRD	Kufor Rakeb Disease
L	Liter
LAMA1	Laminin
Lancet Neurol	Lancet neurology
L-Dopa	Levodopamin
LHON	Lebersche hereditäre Optikusneuroretinopathie
LOD	logarythm of the odds, Logarithmus der Chancen
LRRK2	leucine - rich repeat kinase 2
M	Methionin / Mol / Marker
M.	Morbus / Musculus
MAO	Monoaminoxidase
Mb	Megabasen
Med Hypotheses	Medical hypotheses
mg	Milligramm
Mg^{2+}	Magnesium Ion
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Magnesiumchlorid Hexahydrat
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimol
MMW	Münchener Medizinische Wochenschrift
µl	Microliter
Mol Cell Biol	Molecular and cellular biology
Mol Cell Neurosci	Molecular and cellular neurosciences
Molec Genet Metab	Molecular genetics and metabolism
Mol Pharmacol	Molecular pharmacology
Mov Disord	Movement Disorders
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridin
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridin Ion
MR-1	myofibrillogenesis regulator
mRNA	messenger Ribonucleicacid
MSA	Multisystematrophien
mtDNA	mitochondriale DNA
MTIF3	mitochondrial translation initiation factor 3
MTS	Mohr-Tranebjaerg Syndrom
MYOM1	Myomesin 1
N	Anzahl
Na ⁺	Natrium Ion
NaCl	Natriumchlorid
NADH	reduzierte Form des Nicotinamid Adenin Dinukleotid
NAD ⁺	oxidierte Form des Nicotinamid Adenin Dinukleotid
NaOH	Natronlauge
Nature Neurosci	Nature Neuroscience
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDP	Nukleosid Diphosphat Kinasen
NDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein
NEB1-4	Eigenname der Puffersubstanzen von New England Biolabs
N Engl J Med	New England Journal of Medicine
Neurol Sci	Neurological sciences

Neurosci Lett	Neuroscience Letters
ng	Nanogramm
NHGRI/NIH	National Human Genome Research Institute / National Institutes of Health
NLB (NL-Puffer)	Nuclei Lysis Buffer
nm	non-metastatic (Protein Gruppe)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NME4	non-metastatic cell expressing protein 4
NO•	Stickstoffmonoxid Radikal
NW	Nebenwirkungen
OH•	Hydroxylradikal
Omi/HtrA2	Omi stress-regulated endoprotease; high temperature requirement protein A2
ORF	open reading frame
P	Prolin
p	langer Arm eines Chromosoms
PACAP	Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARK	Chromosomaler Lokus für hereditären Parkinson
pc	pars compacta
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Parkinson's disease
PDC	paroxysmale dystone Choreoathetose
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGP 9,5	P-Glycoprotein 9,5
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
Phil Trans R Soc B	Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences
Phys Rev	Physiological review
PKAN	pantothenate kinase-associated neurodegeneration
PKC	paroxysmale kinesiogene Choreoathetose
pmol	Picomol
PNAS	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

PNKD	paroxysmale non-kinesigenic dyskinesia
PRKRA	protein activator of the interferon-induced protein kinase
PSP	Paroxysmale supranukleäre Blickparese
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTD	primäre Torsionsdystonie
PTPRM	Protein Tyrosin Phosphatase, Rezeptor Typ M
q	kurzer Arm des Chromosoms
R	Reversed
RDP	rapid-onset Dystonie-Parkinsonismus
REM	rapid eye movement
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RR	relatives Risiko
rRNA	ribosomale RNA
rs.....	Bezeichnung von SNPs
RT-PCR	real time PCR
s	Sekunde
S	Serin
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SCASI	Spinocerebelläre Ataxie mit Sakkaden
SDS	sodium dodecylsulfate polyacrylamide
Semin Cell Dev Biol	Seminars in cell & developmental biology
Seq	Sequenz
Ser	Serin
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SNP	single nucleotide polymorphism
SPR	Sepiapterin Reduktase
SSCP	single-strand conformation polymorphism
T	Threonin / Thymin
Taq-Polymerase	Thermophilus aquaticus Polymerase
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Lösung	TRIS-EDTA-Lösung

TEMED	N',N',N',N'-Tetramethyldiamin
TH	Tyrosinhydroxylase
Thr	Threonin
Tm	Annealing Temperatur
TMS	transkranielle Magnetstimulation
Trends Mol Med	Trends in molecular medicine
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
Ub	Ubiquitin
UCH-L1	Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
VIP	vasoaktive intestinale Peptide
W	Thryptophan
Wien Klin Wochenschr	Wiener klinische Wochenschrift
wt	Wildtyp
XDP	X-chromosomal vererbtes Dystonie-Parkinson Syndrom
Y	Tyrosin
ZFP161	Zink Finger Protein 161

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit genetischen Ansätzen zur Untersuchung zweier Basalganglienerkrankungen. Hierbei handelt es sich um den Morbus Parkinson und die fokale Torsionsdystonie. Mittels drei verschiedener molekulargenetischer Methoden soll die Pathogenese dieser zwei neuromotorischen Erkrankungen des extrapyramidalen Systems untersucht werden. Es handelt sich dabei als erstes um Mutationsstudien zur Identifizierung des DYT7-Gens in einer Familie mit autosomal dominanter fokaler Torsionsdystonie, zweitens um die Kopplungssuche nach dem chromosomalen Vererbungsloкус bei einer Familie mit autosomal dominantem M. Parkinson und drittens um die Analyse des Einflusses zweier Kandidatengene auf das Erkrankungsrisiko des M. Parkinson mittels allelischen Assoziationsstudien.

1.1. Torsionsdystonie

1.1.1. Klinische Aspekte

Die Dystonien gehören zu den neuromuskulären Erkrankungen mit heute noch unbekannter Ätiologie, und können durch Störungen der Basalganglien ausgelöst werden. Die Patienten zeigen repetitive Bewegungen und abnormale Haltungen, die ihren Ursprung in sich wiederholenden Muskelkontraktionen finden (Fahn et al. 1998). Die Erkenntnis, dass es sich bei diesem Symptomenkomplex um eine Basalganglienerkrankung handelt, resultiert aus elektrophysiologischen und nuklearmedizinischen Untersuchungen. Dabei führt wahrscheinlich die Enthemmung thalamokortikaler Rückkopplungsschleifen zur kortikalen Übererregbarkeit und zu den sich manifestierenden Symptomen (Naumann 1998).

Die Prävalenz dieser seltenen Erkrankungen liegt bei 330 / 1 Million Einwohner. Dazu zählen nicht die Dystonie-Varianten, die durch Geburtstraumen, degenerative Prozesse, Enzephalitis, M. Wilson und Nebenwirkungen von Medikamenten ausgelöst werden (Waddy et al. 1991).

Die Namensgebung dieser Erkrankung erfolgte 1911 von Oppenheim, der diesen Symptomen den Terminus „*dysbasia lordotica progressiva / dystonia musculorum deformans*“ zuschrieb. Mit größter Genauigkeit beschrieb Oppenheim Patienten, die gesund zur Welt gekommen waren und im Kindes- bzw. Jugendalter zuerst in den Füßen und dann auch im Becken, im Rumpf und in den Armen krampfartige Bewegungen durch Tonusänderungen der Muskulatur

zeigten, die nicht der Willkür unterlagen, aber in gewisser Weise von Emotionen abhängig zu sein schienen. Neben der Progressivität, die der Erstbeschreiber verdeutlichte, machte der Neurologe aus Berlin auch auf die Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung aufmerksam:

„In den ersten Fällen schwankte meine Diagnose gewöhnlich zwischen Hysterie, speziell hysterischer Skoliose oder Lordose und idiopathischer bilateraler Athetose; doch erkannte ich bald, dass keine dieser Diagnosen die zutreffende sei, und dass ein besonderes Zustandsbild, zum mindesten ein besonderer Typus vorliege“ (Oppenheim, 1911).

Schon Oppenheim stellte fest, dass es sich hier ausschließlich um Kinder jüdischer Eltern handelte, die aus Russland stammten. 80 Jahre später wurde diesem Krankheitsbild in jüdischen und nicht jüdischen Familien der DYT1 Locus auf Chromosom 9q32-34 zugeordnet (Ozelius et al. 1989).

Mit Zuweisung des DYT1 Locus begann die Dystonie wieder an Bedeutung zu gewinnen. Die familiären Häufungen der Dystonie legten den Fokus der Wissenschaft mehr und mehr auf eine genetische Ursache der Erkrankung. Studien, die Patienten und deren Verwandte einschlossen, widerlegten die Annahme, es handle sich hier um ein multifaktorielles oder polygenetisches Geschehen (Waddy et al. 1991). In einer Familie mit zervikaler Torsionsdystonie (Manifestation im Erwachsenenalter) konnte anhand von eineiigen Zwillingen der autosomal dominante Vererbungsweg und eine reduzierte Penetranz belegt werden (Uitti, Maraganore 1993).

Die beiden Autoren Schwalbe (1908) und Ziehen (1910), die schon vor Oppenheim von ähnlichen Krankheitsfällen berichteten, zogen Neurosen als Krankheitsursache vor (Grundmann 2005). Mendel, der 1919 den Terminus *Torsionsdystonie* prägte, fasste die Ergebnisse vieler Neurologen 1936 zusammen. Schlussfolgernd resümierte er ein Vorkommen bei allen Völkern, aber das häufigste Auftreten in der jüdischen Bevölkerungsgruppe mit osteuropäischer Herkunft, mit einem höheren Männeranteil und einer dominanten oder auch rezessiven Vererbung. Von neurotischen Zuständen der Patienten wurde nur äußerst selten berichtet (Mendel 1936). Heute ist der Begriff der *primären Torsionsdystonie (PTD)* in der Fachliteratur gebräuchlich.

Lange Zeit stiftete der Begriff „Dystonie“ Verwirrung, weil er ein Körpermerkmal, eine neurologische Erkrankung und gleichzeitig ein Symptom bezeichnet. Deswegen bemühen

sich die Neurologen seit jeher um eine korrekte Einteilung dieses Symptomenkomplexes (Quinn 1993):

1. Manifestationsalter

Die Dystonien, die sich im Kindes- und Jugendalter manifestieren, beginnen in den Extremitäten und neigen zur Generalisierung. Von den generalisierten Dystonien wird nur sehr selten der Übergriff auf die kraniozervikale Region berichtet. Dahingegen zeigen Dystonien mit Beginn im Erwachsenenalter keine Generalisierungstendenzen und treten gehäuft in der kraniozervikalen Region auf, aber auch in den oberen Extremitäten (Marsden et al. 1976).

2. Betroffene Körperregion

Wie in Punkt 1 erwähnt, gibt es generalisierte Dystonien mit Beginn im Kindesalter und fokale Dystonien mit Beginn im Erwachsenenalter. Dazwischen existiert ein breites Spektrum von Übergängen dieser beiden Formen: multifokale und segmentale Dystonien sowie die Hemidystonien (Marsden et al. 1976; Zeman et al. 1960). Die generalisierte Form ist zu 75-85% genetisch bedingt, wohingegen die fokalen Dystonien eine weit geringere positive Familienanamnese aufweisen (Marsden et al. 1976; Waddy et al. 1991). Allerdings schwanken die angegebenen Zahlen zwischen 9 und 25%.

Tab.1.1. Betroffene Körperregion: Die Tabelle ordnet dem Dystonietyp die jeweils betroffenen Körperregionen zu.

<i>Form der Dystonie</i>	<i>Beispiele für erkrankte Region</i>
Fokale Dystonien	Hals oder Hand oder Fuß etc.
Multifokale Dystonien	Hand und Fuß etc.
Segmentale Dystonien	Komplettes Hals- und Armsegment
Generalisierte Dystonien	Arm, Rumpf und untere Extremität

3. Ätiologie

Die Einteilung nach Krankheitsursache ist umfangreich und wird dem neusten Stand der Forschung angepasst. Nach dem Stand von 1998 werden die Dystonien - angelehnt an die Klassifikation beim M. Parkinson - in vier Untergruppen eingeteilt (Fahn et al. 1998).

- I. Primäre Dystonien
- II. Sekundäre Dystonien

- III. Dystonie-plus Syndrome
- IV. Heredodegenerative Dystonien

Seit 2004 wurde eine neue Einteilung vorgeschlagen, die neben den primären Dystonien nur noch die sekundären Dystonien beinhaltet. Dementsprechend werden die Dystonie-plus Syndrome und die heredodegenerativen Erkrankungen in die Gruppe der sekundären Dystonien eingeordnet (Bressman 2004). Die sekundären Krankheitsformen beinhalten auch die durch Rückenmarksverletzungen, Neuroleptika, zerebrovaskuläre Ereignisse, Hypoxie, Tumoren, Infektionen oder toxische Substanzen ausgelösten Dystonien (Fahn et al. 1998). Auch das Leigh Syndrom, das Lesch-Nyhan Syndrom, die Hallervorden-Spatz Erkrankung (heute: PKAN = *pantothenate kinase-associated neurodegeneration*) und der M. Wilson können Dystonien als Begleitsymptomatik aufweisen (Müller, Kupke 1990). Ob sich diese neue Einteilung durchsetzt, wird sich in Zukunft zeigen.

1.1.2. Genetische determinierte Dystonien

Alle bekannten genetischen Formen der primären Dystonie und der Dystonie-plus Syndrome werden nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit dem Terminus „DYT“ nummeriert.

DYT1

DYT1 ist die erste beschriebene generalisierte Dystonie, bei der durch das gehäuft familiäre Auftreten eine autosomal dominante Vererbung vermutet wurde. Genauer gesagt handelt es sich hier um die Krankheit, die Oppenheim 1911 in der aus Russland stammenden jüdischen Bevölkerungsgruppe beschrieb. Die Mutation ist auf Chromosom 9q34 lokalisiert und äußert sich in einer Deletion von drei Basenpaaren im Gen für das Protein **TorsinA**, einem ATP-Bindungsprotein (Ozelius et al. 1997). TorsinA, dem zuerst die Aufgabe eines Chaperons zugeschrieben wurde, zeigte in zellbiologischen Experimenten einen Einfluss auf die Lokalisation einiger transmembranärer Proteine, wie dem Dopamintransporter und G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese Funktion ließ sich auf die ATP-Bindungsfähigkeit zurückführen und war bei der TorsinA Deletion nicht nachzuweisen (Torres et al. 2004).

Die hohe Frequenz bei Ashkenazi Juden ist auf eine Gründermutation vor 350 Jahren in der Pale-Siedlungsregion (Litauen und Weißrussland) zurückzuführen. Durch die Isolation dieser Gruppe konnte sich die Mutation etablieren (Risch et al. 1995). Phänotypisch zeigen alle Patienten eine Krankheitsmanifestation in jungen Jahren in einer der vier Extremitäten mit

Tendenz zur Generalisierung. Dabei konnte in einigen Studien bei Patienten mit kraniozervikaler Beteiligung eine DYT1 Mutation ausgeschlossen werden (Bressman et al. 1994 und 1996), wobei andere Studien diese nachweisen konnten (Valente et al. 1998; Leube et al. 1999; Kabakci et al. 2004).

Da auch nicht-jüdische Bevölkerungsgruppen betroffen sind (Kramer et al. 1994), jedoch Mutation in TorsinA ausschließlich die oben genannte Deletion betreffen, kann dies global nicht auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen sein. Vielmehr scheint die deletierte Region im humanen Genom eine besondere Empfindlichkeit für *de novo* Mutationen vorzuweisen, was das hochfrequente Vorkommen dieser Deletion auch bei Nicht-Juden erklärt (Klein et al. 1998a). Die GAG Deletion verursacht unter der jüdischen Ashkenazi Population 90% der generalisierten Dystoniefälle, wohingegen bei Nicht-Juden 50-60% der Fälle in DYT1 eine genetische Zuordnung finden (Bandmann, Müller 2002).

DYT2

DYT2, dessen Existenz heute angezweifelt wird, wurde zuerst bei spanischen Zigeunerfamilien mit autosomal rezessiver generalisierter Dystonie beschrieben. Der Genlocus ist nicht bekannt, gilt aber als Synonym für alle rezessiven Dystonien (Németh 2002).

DYT3 (XDP, Lubag Syndrom)

Dieser Locus für das neurodegenerative Dystonie-Parkinson Syndrom befindet sich auf dem X-Chromosom und wird rezessiv vererbt. Auch hier handelt es sich um eine Gründermutation in einer isolierten Bevölkerungsgruppe. Betroffen ist die männliche Population auf der Philippinen-Insel Panay. Hier leidet jeder Viertausendste an Dystonie (Németh 2002), die innerhalb von fünf Jahren generalisiert und zusätzlich von Parkinsonismus begleitet wird. Bis zum 50. Lebensjahr erkrankt jeder Mutationsträger (100% Penetranz) (Müller, Graeber 1991). Trotz der Sequenzierung des kompletten transkribierten Teils des X-Chromosoms konnte die Mutation zunächst nicht identifiziert werden (Bandmann, Müller 2002), bis die Mutation in einem **multiplen Transkriptomsystem** (*multiple transcript system*) lokalisiert wurde. Die Genfunktion ist zwar nicht bekannt, aber jede Transkriptionsvariante enthält das Exon mit dieser Mutation (Nolte et al. 2003). Wichtig für die Klassifikation ist die Tatsache, dass es sich hier um eine neurodegenerative Erkrankung handelt. In die genetische Dystonieklassifikation haben die heredodegenerativen Erkrankungen nur über DYT3 Einzug gefunden.

DYT4

Bei DYT4 ist der Genlokus noch nicht bekannt. Es handelt sich hier um eine australische Familie mit autosomal dominanter fokaler (laryngealer und zervikaler) Dystonie, weswegen hier der Terminus *whispering dysphonia* zum Tragen kommt. Die Erkrankten zeigen Tendenz zur Generalisierung und sind psychisch auffällig. In zwei Familienmitgliedern hat sich der M. Wilson manifestiert (Parker 1985; Ahmad et al. 1993).

DYT5 (DRD, Segawa Syndrom)

DYT5 kodiert ein Protein im Dopaminsyntheseweg, die **GTP-Cyclohydrolase I** auf Chromosom 14. Die Patienten zeigen eine L-Dopa - responsive Dystonie (DRD) inklusive Parkinson Symptomen, die autosomal dominant vererbt wird (Nygaard, Duvoisin 1986; Ichinose et al. 1994). Eine rezessive Vererbung dieses Syndroms ist mit einer Mutation in der **Tyrosinhydroxylase** verbunden (Furukawa et al. 1996; Bandmann et al. 1996). Klinisch manifestieren die Patienten im Kindesalter hauptsächlich mit einer unilateralen Dystonie am Fuß und späterer Generalisierung. Auffällig ist die zirkadiane Rhythmik der Symptome, mit Verschlechterung im Tagesverlauf. Wichtig ist das extrem gute Ansprechen dieser Dystonievariante auf L-Dopa Therapie, mit der die Progression der Krankheit bis zum Rollstuhl verhindert werden kann, und durch die den Patienten ein weitgehend normales Leben ermöglicht wird.

DYT6

Diese Dystonie gehört zu den gemischten Typen, da die Patienten entweder fokale (kranial und zervikal) oder generalisierte Formen zeigen. Eine autosomal dominante Vererbung auf Chromosom 8 konnte in zwei Mennoniten-Familien mit deutschem Ursprung gefunden werden (Almasy et al. 1997).

DYT7

DYT7 ist das Thema der vorliegenden Arbeit. Der DYT7 Lokus befindet sich auf Chromosom 18p und überspannt eine Region von 30cM (centiMorgan). Anhand einer Genom-weiten Kopplungsuntersuchung wurde im Jahre 1996 diese Region auf Chromosom 18 als einzige Region definiert, zu der alle Patienten der betroffenen Familie Kopplung zeigten (Leube et al. 1997b). Wegen der Vielzahl von Genen in der DYT7 Region und dem Mangel an weiteren Familien wurde erst jetzt mit der Sequenzierung von Kandidatengenen

begonnen, nachdem zwei weitere Dystonie-Familien in Kanada (Grimes et al. 2002) und USA (Bhidayasiri et al. 2005) weitere Evidenz für die DYT7 Region erbrachten.

Es handelt sich bei der zu untersuchenden Familie um eine Familie deutscher Herkunft mit autosomal dominanter fokaler (zervikaler) Torsionsdystonie und dadurch resultierenden Nacken- und Kopfschmerzen. Der Stammbaum (vergl. Abb.2.1.) lässt auf reduzierte Penetranz schließen (Leube et al. 1996).

DYT8 (PDC, PNKD, Mount-Reback Syndrom)

DYT8 gehört zu den paroxysmalen (anfallsartigen) Dystonien mit autosomal dominanter Vererbung auf Chromosom 2. Diese Dystonie ist auch als Choreoathetose (PDC = paroxysmale dystone Choreoathetose, PNKD = *paroxysmale non-kinesigenic dyskinesia*) bekannt, die durch Koffein, Alkohol, Stress sowie Müdigkeit ausgelöst wird (Fink et al. 1996; Hofele et al. 1997). Die Anfälle können zwischen zehn Minuten und vier Stunden anhalten, und treten einmal pro Tag bis einmal pro Monat auf. Kürzlich wurde das mutierte Gen **MR-1** gefunden, das für den *myofibrillogenesis regulator*, ein Protein der zellulären Stressantwort, kodiert (Lee et al. 2004b; Chen et al. 2005).

DYT9 (CSE)

Die autosomal dominante Choreoathetose mit Spastizität und episodischer Ataxie (CSE) wird auf Chromosom 1p vererbt. Auch diese Krankheit kann durch Müdigkeit, körperliche Anstrengung und Alkohol ausgelöst werden. Einige Betroffene zeigten zwischen dem episodischen Auftreten der Erkrankung eine spastische Paraplegie (Auburger et al. 1996).

DYT10 (PKC)

Die Paroxysmale kinesigene Choreoathetose (PKC) auf Chromosom 16 wird autosomal dominant vererbt und ist Carbamazepin-responsiv (Tomita et al. 1999). Weil Carbamazepin Einfluß auf Natrium-Kanäle hat (Willow et al. 1985), wird eine Mutation in einem Ionenkanal vermutet. Interessant sind die auslösenden Faktoren: Plötzliche unerwartete Bewegungen, Positionsänderungen oder Beschleunigungsbewegungen führen zu den Anfällen, die nur für Sekunden anhalten, aber über den Tag verteilt vielfach auftreten können (Lance 1977).

DYT11

DYT11 ist der Locus auf Chromosom 7 für ein autosomal dominantes Myklonus-Dystonie Syndrom (Nygaard et al. 1999). Eine Mutation im ϵ -**Sarkoglykan** Gen löst die Krankheit aus;

maternales *Imprinting* beeinflusst die Penetranz. Das Gen kodiert für ein Protein, das Teil des Dystrophin Glykoprotein Komplexes ist und die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbindet (Zimprich et al. 2001). Die Erkrankung zeigt neben psychiatrischen Auffälligkeiten dramatische Besserung durch die Aufnahme von Alkohol (Nygaard et al. 1999).

DYT12

Autosomal dominante Vererbung zeigt der *rapid-onset* Dystonie-Parkinsonismus (RDP), ausgelöst durch Stress, Geburt, Fieber und andere körperliche Belastungen. Der plötzliche Beginn äußert sich in Dysarthrie, Dysphagie, dystonen Spasmen und posturaler Instabilität. Auf L-Dopa Therapie wird eine gute Ansprechbarkeit berichtet. Das mutierte Gen befindet sich auf Chromosom 19q13 (Kramer et al. 1999) und kodiert für die neuronale Na^+/K^+ -**ATPase Untereinheit Alpha3** der Zellmembran, die einen Ionengradienten aufrecht erhält (Carvalho Aguiar et al. 2004).

DYT13

DYT13 wurde in einer italienischen Familie mit autosomal dominanter kraniozervikaler Dystonie auf Chromosom 1 beschrieben. Die Region umfasst 22cM. Teilweise zeigen die Patienten fokale bis segmentale Dystonien, teilweise Generalisierung (Valente et al. 2001a).

DYT14

Dieser neue Locus auf Chromosom 14q kodiert für eine weitere Form der L-Dopa-responsiven Dystonie, wird autosomal dominant vererbt (Klein 2005) und wurde vor kurzem als identisch mit DYT5 identifiziert (Schmidt et al. 2008).

DYT15

DYT15 zeigt neben Dystonie auch Myoklonus. Der Locus auf Chromosom 18p11 überschneidet sich mit dem DYT7 Locus für zervikale Dystonie. Der Locus konnte nach neuen Erkenntnissen auf 3,18 Mb eingeschränkt werden. Die Sequenzierung der Kandidatengene ergab allerdings keine ursächliche Mutation in diesem Chromosomenabschnitt (Han et al. 2007). Es ist nur eine einzige Familie weltweit bekannt, die sich in ihrer klinischen Manifestation von der Klinik bei DYT15 nicht unterscheidet (Grimes et al. 2002).

DYT16

DYT16 wurde in drei brasilianischen Familien auf Chromosom 2q lokalisiert. Es handelt sich dabei um eine autosomal rezessiv vererbte generalisierte Torsionsdystonie mit gelegentlichem

Auftreten von Parkinsonismus. Das Stressantwortprotein **PRKRA**, eine Kinase, wahrscheinlich mit Einfluss auf die Proteinsynthese, trägt die Mutation (Camargos et al. 2008).

Die oben genannte Einteilung von genetischen Dystonien basiert weder auf klinischen, therapeutischen noch pathologischen Gemeinsamkeiten.

Mit DYT3 ist zum einen ein Vertreter der degenerativ bedingten Dystonien mit Parkinsonismus aufgelistet, zum anderen werden DYT8 bis 10 zu den paroxysmalen Dystonien zusammengefasst, die anfallsweise auftreten und zwischen den Anfällen symptomfrei bleiben. Nur Dystonie (auch Tremor ist als Symptom erlaubt) wird bei DYT 1/2/4/6/7/13 beobachtet, wohingegen DYT 5/11/12/15/16 Dystonie-plus Syndrome darstellen. Was alle diese Dystonien gemeinsam haben, ist die familiäre Häufung. Dies ist der Grund, warum sie sich von sporadischen Fällen abheben. Ob die sporadischen Fälle auf rezessiven Erbgängen oder dominanten Erbgängen mit reduzierter Penetranz beruhen, genetisch prädisponierende mono- oder multigenetische Faktoren vorliegen, die durch Umweltfaktoren moduliert werden, oder alleine die Umweltfaktoren Ursache der Erkrankungen sind, bleibt zu diesem Zeitpunkt unbeantwortet.

Gerade die generalisierten Dystonien bewirken teilweise eine massive Einschränkung der Lebensqualität. Der Stillstand des sozialen Lebens ist auch bei fokalen oder segmentalen Dystonien ein belastender Faktor. So verwundert es nicht, wenn viele Patienten in anfänglichen Anamnesegesprächen eine familiäre Häufung verneinen (Uitti, Maraganore 1993; Leube et al. 1997c). Die Dunkelziffer der Erkrankten mag deswegen viel höher sein.

Gerade weil Stress zu den Triggern dieser Erkrankungen zählt und weil die Symptome im Schlaf sistieren, wurden die Dystonien lange als eine psychogene Erkrankung angesehen (Fahn, Williams 1988).

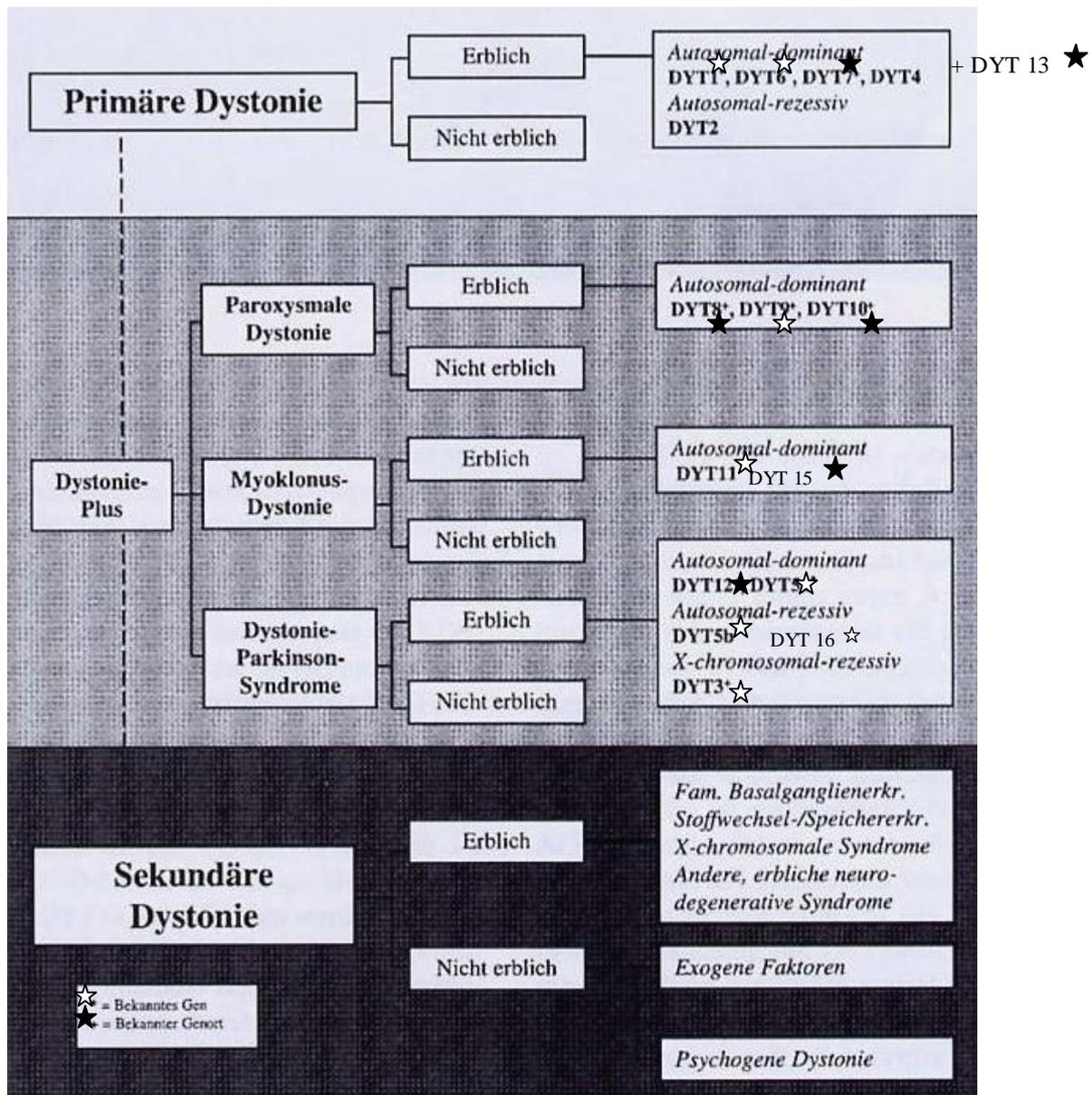


Abb. 1.1. Einteilungsschema der Dystonien: Der weiße Stern markiert die Dystonien mit bekanntem Gen, der schwarze Stern die Dystonien mit bekanntem Genort. Neben den großen Gruppen der primären und sekundären Dystonien nehmen die Dystonie-plus Syndrome einen Platz in der Nomenklatur ein. Unter primären Dystonien werden die erblichen und nicht erblichen Formen beschrieben, die direkt im motorischen System einen Defekt hervorrufen. Dagegen sind die sekundären Formen diejenigen, die aufgrund einer Neurodegeneration oder endo- bzw. exotoxischer Hirnschädigung etc. zum Krankheitsausbruch führen, ohne dass der Krankheitsherd im motorischen System liegen muss (vergl. Speichererkrankungen). Die Dystonie-plus Syndrome werden in Paroxysmale-, Myoklonus- und Parkinson-Dystonie Syndrome eingeteilt. Auch hier gilt die Unterscheidung zwischen erblichen und nicht erblichen Typen. Die Existenz von Dystonie-plus Syndromen zeigt die Komplexität des motorischen Systems, und die Schwierigkeit, funktionelle Zusammenhänge und Unterschiede der Basalganglienerkrankungen zu definieren.

[Aus: Klein C, Kann M, Kis B, Pramstaller PP, Breakefield XO, Ozelius LJ, Vieregge P (2000): *Genetik der Dystonien. Nervenarzt* 71: 431-441]

1.1.3. Pathomechanismen

Die Pathogenese der Torsionsdystonie ist trotz der intensiven Forschung unklar. Hinweise darüber, dass dieser Symptomenkomplex eine extrapyramidale Erkrankung ist, lieferten erstens die neurodegenerativen Formen (Németh 2002) und zweitens der Dopaminmangel in

den Basalganglien bei Dystonie-plus Syndromen (DYT5, DYT14). Neuroleptikabehandlungen mit Blockade der Dopamin-Rezeptoren ($D_{1/2}$) und der m-Cholinorezeptoren führen zu extrapyramidal-motorischen Störungen mit Parkinsonismus. L-Dopa Therapie bei M. Parkinson führt wiederum zu Dystonien in der Form von Früh- und Spätdyskinesien. Deswegen wird den D_1 Rezeptoren der Basalganglien Bedeutung in der Entwicklung von Dystonien zugeschrieben (Gerlach et al. 2003).

Die zelluläre Verteilung des Proteins TorsinA (DYT1) zeigte sich am häufigsten in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra, im Locus coeruleus, im Nucleus dentatus, in den Purkinjezellen, in Thalamuskernen, im Nucleus oculomotorius, im Hippokampus und im frontalen Kortex. In hier nicht aufgezählten Strukturen des extrapyramidalen Systems wurde TorsinA kaum oder in nur sehr geringen Mengen nachgewiesen (Augood et al. 1999).

Vieles spricht demnach für funktionelle Zelldefekte ohne neurodegenerative Prozesse, da die fokalen Dystonien, im Gegensatz zu DYT1, keine pathologischen Einschlusskörperchen für TorsinA und Ubiquitin zeigen (Holton et al. 2008).

Bei Betrachtung der genetisch determinierten Dystonien fällt keine Kontinuität im Pathomechanismus auf (s.o.). Obwohl Störungen der neuronalen Erregung bei den primären Dystonien dominieren (DYT1, 5, 8, 10, 12), sind auch Störungen des Zytoskeletts (DYT11) dokumentiert. Außerdem zeigen viele mitochondrial bedingte Neurodegenerationen Dystonie als Begleitsymptom (Schapira et al. 1988; Wallace, Murdock 1999).

1.1.4. Therapie

Nur der geringste Anteil (2,6%) der Dystonieklienten zählt zu den psychogen induzierten Dystonien, die mit Physio- und Psychotherapie, zusätzlich mit Antidepressiva behandelt werden können (Fahn, Williams 1988).

Einige genetisch determinierte Dystonie-plus Syndrome sprechen auf L-Dopa Medikation an (s.o.), doch für die meisten Patienten gibt es keine zufriedenstellende therapeutische Möglichkeit.

Symptome wie der Torticollis spasticus, der Blepharospasmus, der Spasmus hemifacialis und der Schreibkrampf können durch lokale Botulinumtoxin-Injektionen (Botulinumtoxin A = Botox®, Dysport®) in 90% der Fälle gemildert werden. Die Wirkung setzt nach drei Tagen ein und dauert circa drei Monate an. Dabei tritt zwar eine Schwächung der nicht betroffenen Nachbarmuskulatur ein, Überempfindlichkeitsreaktionen und Antikörperbildung werden aber

selten beobachtet. Vor dem ersten Injektionsversuch ist durchaus ein Therapieversuch mit Anticholinergika, Baclofen, L-Dopa oder Clonazepam zu überlegen (Naumann 1998).

Circa 70% der Torticollispatienten profitieren auch von den sogenannten *gestes antagoniques*, durch kontinuierliche Druckausübung auf die Kinnregion kontralateral des betroffenen M. sternocleidomastoideus. Hierbei stellt sich innerhalb von Stunden ein Nachlassen des dystonen Krampfes ein. Diese als *sensory tricks* bezeichneten Effekte lassen sich auch durch die transkranielle Magnetstimulation (TMS) bestimmter Regionen reproduzieren. Da sich hier auch unerwünschte Wirkungen zeigen (Hörminderung, Kopfschmerzen, Stimmungsschwankungen) und der Effekt von nur kurzer Dauer ist, ist diese Methode momentan in klinischer Erprobung und nur ausgewählten therapierefraktären Fällen vorbehalten (Bhidayasiri, Bronstein 2005).

1.1.5. Sequenzierung von vier Kandidatengen auf Chromosom 18p11 in einer Familie mit fokaler Torsionsdystonie (DYT7)

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit ist die Sequenzierung von Kandidatengen auf dem DYT7 Locus. Die zu untersuchende Familie *K* stammt aus dem Nordwesten Deutschlands (Emsland) und leidet an der autosomal dominant vererbten Form der zervikalen primären Torsionsdystonie mit Manifestation im Erwachsenenalter (AFITD = *adult onset focal idiopathic torsion dystonia*). Die Kandidatenregion befindet sich am telomeren Ende des Chromosoms 18p, nördlich des Mikrosatelliten D18S1153 und umfasst 30cM (Leube et al. 1996). Eine vereinfachte Darstellung des Stammbaums von Leube et al. (1997c) findet sich in Abb. 2.1. Hier wird auch die reduzierte Penetranz deutlich, da einige Überträger der Erkrankung keine Symptome zeigen. Die definitiv Erkrankten wiesen eine starke Uneinheitlichkeit bezüglich der Symptomatik auf (Torticollis, Blepharospasmus, Meige-Syndrom, spasmodische Dysphonie). Das Manifestationsalter der Dystonie in Familie *K* variierte zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr (Leube et al. 1997c). Die Haplotypisierung von „sporadischen“ AFITD Patienten mit gleicher geografischer Herkunft konnte eine Risikoregion von 6cM zwischen den Markern D18S1105 und D18S54 definieren (Leube et al. 1997b). In einer weiteren Studie wurden die Haplotypen (individuelle genetische Eigenschaften) auf dem mutierten Chromosom 18 dieser Familie *K* mit den Haplotypen anderer emsländer Patienten mit fokaler Torsionsdystonie und *positiver Familienanamnese*

verglichen. Dadurch konnte die Kandidatenregion auf 4,4cM (für den Marker D18S1098 zwischen D18S1105 und D18S54 signifikant) eingeschränkt werden. Außerdem ließ dies die Schlussfolgerung zu, es handle sich um eine Gründermutation für AFITD in Mitteleuropa (Leube et al. 1997a). Die Ergebnisse dieser Heterogenitäts-Score-Analyse konnten allerdings in Studien einer Hamburger Population nicht bestätigt werden (Klein et al. 1998b). Detaillierte Untersuchungen mit einem neuen Mikrosatelliten (Ch18M12tgc) angrenzend an D18S1098 widerlegten ebenfalls die Ergebnisse in der primär untersuchten Patientengruppe (Leube, Auburger 1998).

Dieser Locus gewann wiederum durch zwei weitere Dystoniefamilien an Bedeutung. Im Jahre 2002 wurde eine kanadische Familie mit einem Myoklonus-Dystonie Syndrom bekannt, die Kopplung zu einer 17cM Region zwischen den Markern D18S843 und D18S1132 zeigte (Grimes et al. 2002). Diese Region befindet sich innerhalb der Kandidatenregion der Familie K. Aufgrund der unterschiedlichen Phänotypen wurde diesem Locus die Terminologie DYT15 zugeordnet (Klein 2005). Im Jahr 2005 berichteten Bhidayasiri et al. von drei bulgarischen Brüdern und derer Tante mütterlicherseits mit sich spät manifestierendem Schreibkrampf. Da die Patientenzahl zu klein war, erfolgte kein *Genomscan*, sondern nur der Abgleich der Haplotypen mit anderen genetisch determinierten Dystonieformen, die den Schreibkrampf als Symptom aufweisen. Diese Untersuchung zeigte in der bulgarischen Familie die beste Kopplung von allen untersuchten Markern auf Chromosom 18p (D18S481, D28S52, D18S976, GATA185C06, D18S391, D18S967).

Ferner wird das Auftreten von Dystonie im 18p-Syndrom beschrieben, das durch eine Deletion des telomeren Endes (ca. 50cM) entsteht. Beschrieben wurde die Symptomatik bei drei Patienten, die im Jugendalter verschiedenste Typen einer kraniozervikalen und brachialen Dystonie entwickelten und mentale Retardierung zeigten (Klein et al. 1998c). Zudem wird von einer Mutter und ihrem Sohn berichtet, die eine unbalancierte 18p Deletion von ca. 15Mb mit Fusion des deletierten Arms am Chromosom 14 aufweisen. Die Mutter zeigt ausschließlich einen Torticollis und eine brachiofaziale Dystonie, wohingegen beim Sohn die mentale Retardierung im Vordergrund steht (Nasir et al. 2006). Da die Region dem DYT7 Locus entspricht, besteht die Annahme, es handle sich um ein gemeinsames Dystonie-Gen. Allerdings kann beim 18p Syndrom eine generelle Neurodegeneration auch ursächlich für eine Dystonie sein. Dafür spricht auch das häufige Vorkommen von Dystonie bei Deletion anderer chromosomaler Abschnitte, wie z.B. (18q) (Gordon et al. 1995).

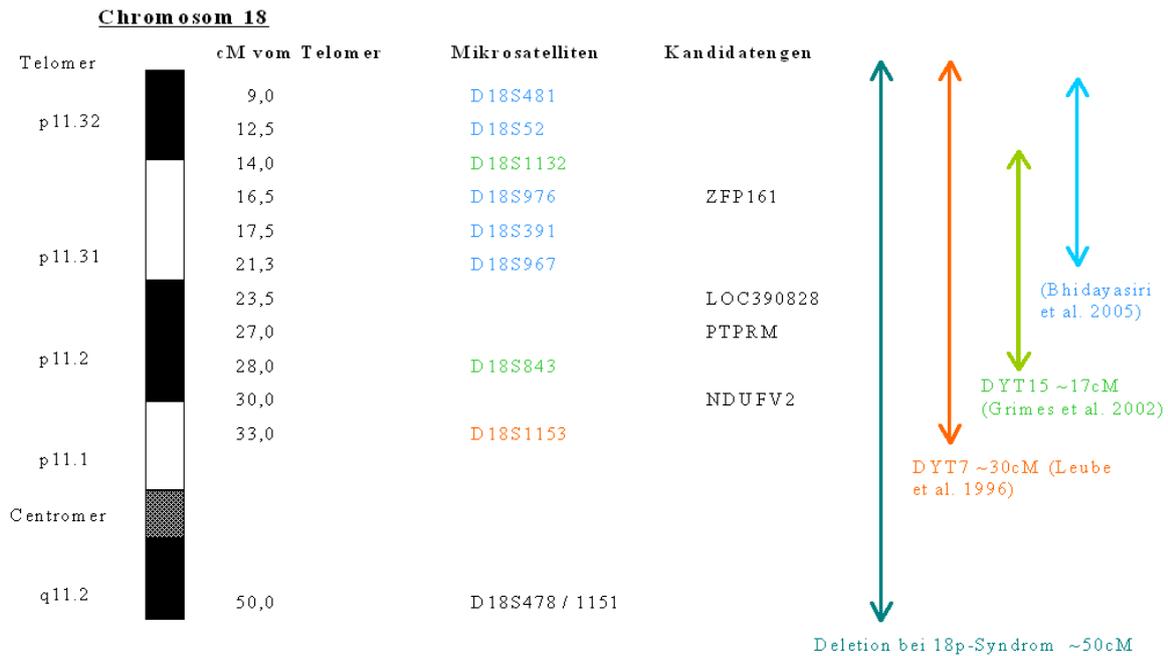


Abb.1.2. Darstellung des Kandidatenlokus für Dystonie auf Chromosom 18p: Der Marker D18S1153 (orange) flankiert die DYT7 Region. Telomerwärts zeigten alle Mikrosatelliten-Marker signifikant gekoppelte Vererbung mit der Krankheit. Die Marker D18S1132 und D18S843 (grün) sind für die DYT15 Familie die flankierenden Marker. Alle hellblauen Marker sind für die bulgarische Familie die Marker, die Kopplung zu DYT7 zeigten. Der DYT 15 Locus konnte durch neue Kartierung auf 3,18Mb reduziert werden. Der Marker D18S1132 und der SNP rs385769 im Gen PTPRM flankieren die neu eingegrenzte DYT15 Kandidatenregion (Han et al. 2007).

Für die Sequenzierung von DYT7 wurden vier Kandidatengene ausgesucht, die pathobiochemische Zusammenhänge mit der Erkrankung zeigen könnten. Die Auswahl erfolgte im Hinblick auf bereits bekannte pathologische Mechanismen, die zu anderen Formen der Dystonie führen (s.o.).

Das Kandidatengen **LOC390828** ist sequenzverwandt mit einem mitochondrialen Transporter. Da Dystonie beim Mohr-Tranebjaerg Syndrom (MTS) mit Mutation in einem mitochondrialen Transportprotein (DDP1) auftritt (Koehler et al. 1999), liegt die Auswahl dieses Kandidatengens nahe.

Mit **ZFP161** wurde ein Protein mit Involvement in den Dopamin-Signalweg ausgewählt. Als Zink-Finger Protein aktiviert es die Transkription des Dopamintransporters (DAT) (Lee et al. 2004a). Die mögliche Bedeutung des Neurotransmitters Dopamin in der Pathogenese der Dystonien wurde mit DYT5 und DYT13 belegt (s.o.).

Die mitochondriale Funktion ist auch bei **NDUFV2** von Bedeutung, da es die 24kDa Untereinheit des Komplex I der Atmungskette darstellt (Toda et al. 1989; Coo et al. 1995; Hattori et al. 1995). Bekannte Mutationen in diesem Gen sind für mitochondriale Myopathien verantwortlich (Schapira et al. 1988), oder erhöhen das Risiko einer Parkinsonerkrankung

(Hattori et al. 1998), wohingegen Mutationen in sequenzverwandten Genen für das Leigh Syndrom ursächlich sind (Schuelke et al. 1999).

Das größte Kandidatengen ist **PTPRM**, eine Protein Tyrosin Phosphatase mit Einfluss auf neuronales Wachstum (Burden-Gulley, Brady-Kalnay 1999; Koop et al. 2003).

Bei der Sequenzierung handelt es sich um die Methode, die nach dem heutigen Forschungsstandpunkt die höchste Auflösung bei der Analyse der genomischen DNA (Desoxyribonukleinsäure) zeigt. Bei der hier angewendeten automatisierten DNA-Sequenzierung handelt es sich um eine Abwandlung der Sequenzierung nach Sanger (1977, vergl. Abb.1.3.). Das Prinzip der Sequenzierung basiert auf der komplementären in vitro Synthese eines DNA-Partnerstrangs nach Vorgabe einer Einzelstrang-Matrize. In einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zunächst die zu sequenzierende genomische DNA-Sequenz durch Primer (Oligonukleotide) flankiert und selektiv vervielfältigt (amplifiziert) (siehe dazu Abb.1.3.). Die Größe dieser DNA-Doppelstränge entspricht dem Abstand der beiden flankierenden Primer. Es handelt sich dabei meist um einige hundert Basenpaare. Die 25 Zyklen der danach folgenden Sequenzier-PCR beinhalten drei Schritte:

- a) Hitzdenaturierung des Doppelstrangs
- b) Anlagerung der Primer (*Annealing*)
- c) Synthese des Partnerstrangs.

Allerdings sind dem Reaktionsansatz, neben den gängigen DNA-Bausteinen (Desoxynukleotide: dATP, dCTP, dGTP und dTTP), in einem bestimmten Verhältnis auch **Didesoxynukleotide** hinzugefügt. Ihnen fehlt am 3'-Ende eine Hydroxylgruppe (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Werden diese modifizierten Bausteine von der strangsynthetisierenden Polymerase zufällig eingebaut, so bricht die Strangsynthese hier ab. Folglich entsteht ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Sequenzen, die jeweils auf ein terminierendes Didesoxynukleotid enden. Diese DNA-Stränge werden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wandern kurze Stränge schneller durch die Gelspur und werden als erstes mit Hilfe eines Lasers von einem Detektor erfasst. Da die vier modifizierten Nukleotide, auf die ein Strang enden kann, gleichzeitig mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, erfasst der Detektor ein farbstoff- und somit basenspezifisches Profil für jede Stelle der Sequenz. Die in vier unterschiedlichen Wellenlängen detektierten Fluoreszenzmaxima werden digital als Elektropherogramme gespeichert und stehen dann dem Sequenzvergleich mit anderen Probanden zur Verfügung (Lewin 1998; Strachan, Read 2005)

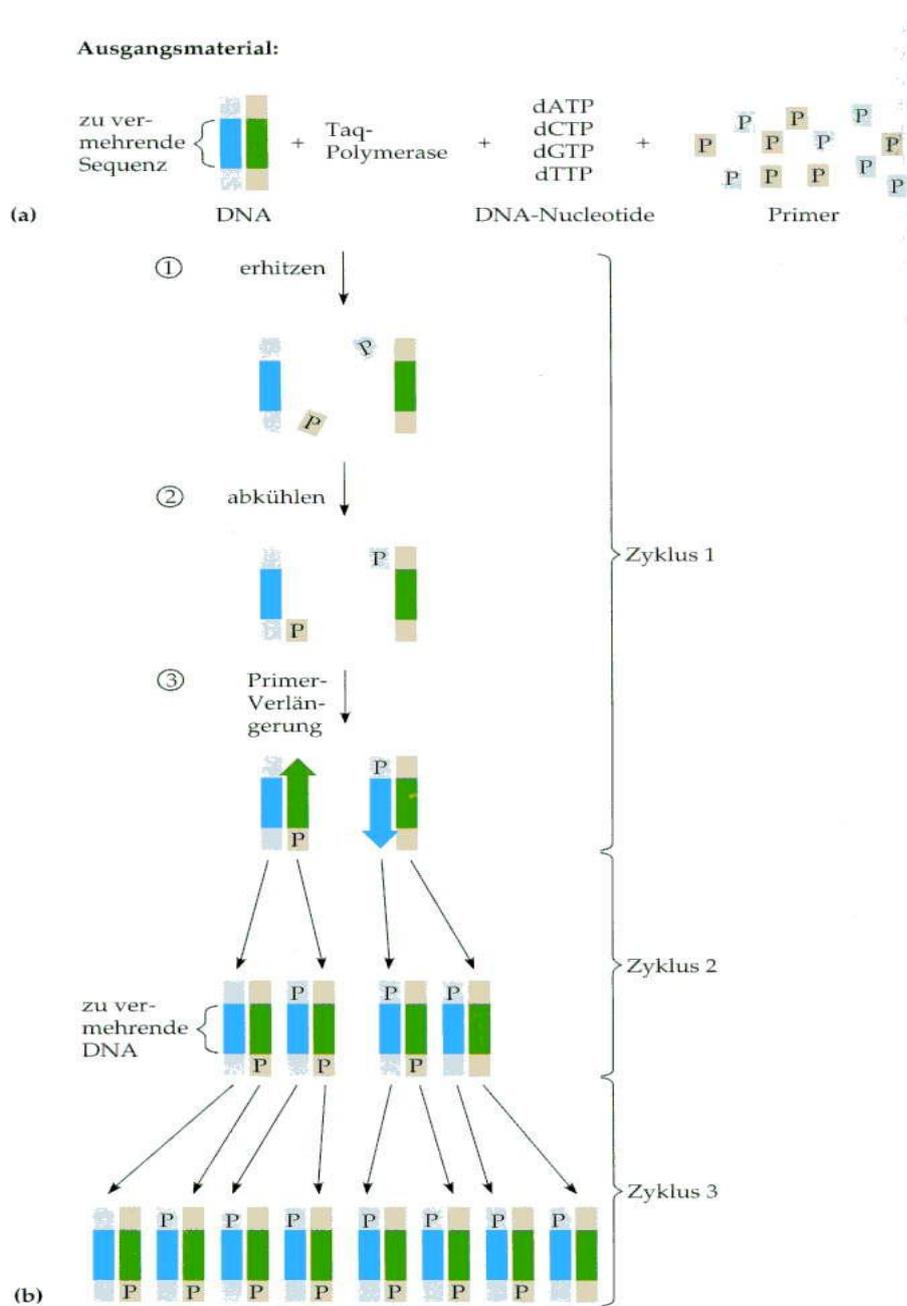


Abb.1.3. Polymerase-Kettenreaktion PCR: Der Reaktionsansatz enthält genomische DNA, die vier verschiedenen Nucleotidbausteine, das strangsynthetisierende Enzym (Taq-Polymerase) und die Oligonucleotide (Primer). Schritt 1: Die DNA-Doppelstränge werden durch Erhitzen getrennt. Durch das Primerannealing werden die Grenzen des zu amplifizierenden Abschnitts markiert (Schritt 2). Im Schritt 3 wird deutlich, dass die Primer der Taq-Polymerase als Anheftungsstelle dienen. Zu jedem Einzelstrang wird mit den Nucleotidbausteinen ein komplementärer Partnerstrang synthetisiert. In jedem Zyklus laufen diese Schritte ab, sodass es zur exponentiellen Vermehrung des DNA-Abschnitts kommt.

[Aus: Campbell NA (2000): *Biologie*. 2.Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 412]

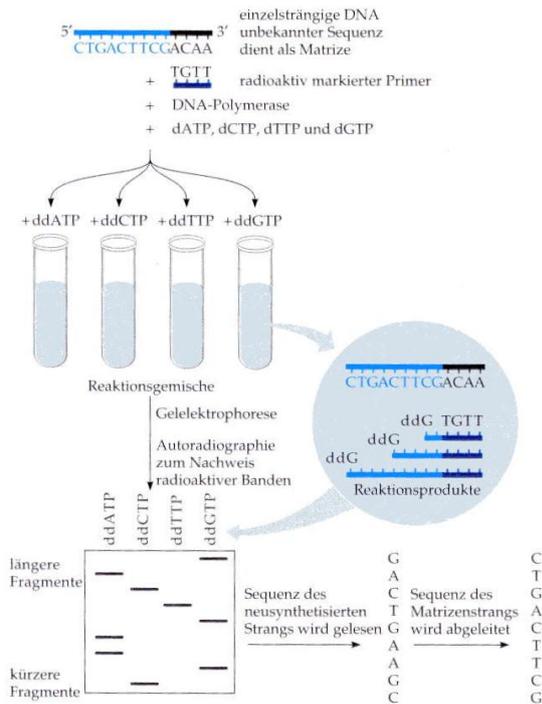


Abb.1.4. DNA-Sequenzierung nach Sanger: Die Abbildung zeigt die oben beschriebene Sequenzier-Methode in der Version nach Sanger. Alternativ werden hier nicht fluoreszierende Nukleotide, sondern radioaktiv markierte DNA-Bausteine verwendet. Deshalb sind hier pro Sequenzierung vier verschiedene Reaktionsansätze notwendig, da die Nukleotide radiologisch nicht voneinander zu unterscheiden sind.

[Aus: Campbell NA (2000): *Biologie*. 2.Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 411]

Bei der Familie K handelt es sich um die weltweit einzige bekannte Familie mit monogener Vererbung einer rein zervikalen Torsionsdystonie, die normalerweise nur sporadisch auftritt. Die Bedeutung, die in der Entdeckung der krankheitsverursachenden Mutation liegt, ist demnach für Erforschung der Pathogenese, für das Verstehen der Abläufe in den Basalganglien und der kooperierenden Gehirnregionen sowie für Therapie und Linderung der Symptomatik nicht nur in dieser Familie, sondern möglicherweise auch bei sporadisch Erkrankten von immensem Wert.

1.2. Morbus Parkinson

1.2.1. Klinische Aspekte

Der Morbus Parkinson wurde 1817 von James Parkinson (London 1755-1824) zum ersten Mal klinisch beschrieben. Diese neurodegenerative Erkrankung wurde initial durch die Trias aus Rigor, Akinese und Tremor definiert, seither wurden auch posturale Instabilität als Diagnosekriterium, sowie Hyposmie und REM-Schlaf-Verhaltensstörung als wichtige Prodromi etabliert. Diagnostisch relevant und ein Zeichen der Früherkennung sind das Nichtmitschwingen der Arme beim Gehen, der kleinschrittige Gang, das Maskengesicht sowie das Auftreten von depressiven Verstimmungen (Gerlach et al. 2003). Das Defizit der Spontanmotorik wird neuropathologisch durch das Absterben dopaminproduzierender Neurone in der Substantia nigra pars compacta, einem Kern der Basalganglien, verursacht. Histopathologisch gelten Lewy-Körperchen und Lewy-Dendriten als intrazytoplasmatische ubiquitinierte Proteinaggregate aus α -Synuklein und weiteren Proteinen im Hirngewebe für spezifisch und diagnostisch (Lewy 1913; Bethlem, Hartog Jager 1960; Harrower et al. 2005).

Das motorische Defizit manifestiert sich, wenn 70% der dopaminergen Neurone ihre Funktion, die cholinergen Neurone des Corpus striatum zu inhibieren, verloren haben und daraus ein Transmitterungleichgewicht zwischen dem Katecholamin Dopamin und Acetylcholin entsteht. Dieses dopaminerge Defizit und cholinerge Übergewicht äußert sich in den oben genannten extrapyramidalmotorischen Komplikationen.

Die Prävalenz von Parkinson-Symptomen beträgt 1,4% bei den über 55-Jährigen und steigt auf 3,4% bei den über 75-Jährigen. Der M. Parkinson wird auch als das idiopathische Parkinson Syndrom oder das primäre Parkinson Syndrom bezeichnet. Die Ätiologie dieser Krankheitsform wird durch genetische Risikofaktoren sowie Umwelteinflüsse erklärt.

Dagegen werden dem symptomatischen oder sekundären Parkinson Syndrom folgende Ursachen zugeschrieben: hirnarteriosklerotisch, postenzephalitisch, toxisch, medikamentös und traumatisch. Die Multisystematrophien (MSA), die kortikobasale Degeneration (CBD) und die paroxysmale supranukleäre Blickparese (PSP) werden zu den atypischen Parkinson Syndromen gezählt.

James Parkinson konnte keinen Risikofaktor ausfindig machen, doch Charcot stellte schon 1867 viele Krankheitsfälle mit positiver Familienanamnese fest. Das Krankheitsbild, das

trotzdem jahrelang so stimmig schien, wurde in den fünfziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts zersprengt, als sich Familien mit früh manifestierendem Parkinsonismus zeigten, der sich nach den Mendel'schen Regeln vererbte.

Es existieren zudem verschiedene Hypothesen, die solchen Faktoren, wie Pestiziden und intrauterine Infektionen ein erhöhtes Risiko, dagegen Rauchen und Kaffeetrinken ein erniedrigtes Risiko für Altersparkinson zuschreiben. Dabei scheinen Umweltfaktoren genetische Determinanten zu modulieren. Diese Modulation findet in einer ganz frühen Lebensphase statt (Logroscino 2005). Auch wenn nur ein sehr geringer Anteil der Parkinsonpatienten die erbliche Form dieser Krankheit trägt, so zeigt sich hier die Variabilität der klinischen, histopathologischen, biochemischen und pathophysiologischen Aspekte. Die erblichen Varianten des M. Parkinson fallen einerseits durch ihre frühe Manifestation auf, andererseits fehlen bei mehreren Varianten auch die Lewy-Körperchen. Die Liste solcher "Ausnahmen" und Besonderheiten ist lang und verlangt eine genau Betrachtungsweise, denn sie bedeutet eine Korrektur unseres Bildes von dieser Erkrankung.

1.2.2. Histopathologische Aspekte

Die Basalganglien sind über eine kortiko-striato-thalamo-kortikale Rückkopplung in jede motorische Funktion eingeschaltet. Die Basalganglien im engeren Sinne beinhalten den Nucleus caudatus und das Putamen, die zum Corpus striatum zusammengefasst werden. Funktionell werden auch der Globus pallidus, der Nucleus subthalamicus (Diencephalon) und die Substantia nigra (Mesencephalon) hinzugezählt. Das extrapyramidale (unwillkürliche) System sorgt über diese Kerne für die Regulation der Kraft, Richtung und Geschwindigkeit einer jeden Bewegung. Zum und vom Kortex bestehen ausgedehnte Faserverbindungen. Affärenzen entstammen auch dem Hirnstamm, Efferenzen ziehen auch ins limbische System. Wie Abb. 1.5. verdeutlicht, besteht eine physiologische dopaminerge Hemmung des Putamens durch Neurone der Substantia nigra (indirekter Weg). Wohingegen der direkte Weg vom Putamen zum Thalamus eine Aktivitätssteigerung bewirkt und vom Dopamin stimuliert wird. Beim M. Parkinson kommt es durch Wegfall der dopaminergen Hemmung zu einem Überwiegen der exzitatorischen Signale im Kortex mit Rigidity der Muskulatur. Die ungenügende Aktivierung des direkten Weges und die zu geringe Hemmung des indirekten Weges durch Wegfall des dopaminergen Einflusses führt Netto zu einer verminderten Thalamusaktivität mit Akinese. Gründe des Tremors sind Oszillationen in den Rückkopplungskreisen vom Striatum zum Kortex. Auf Dauer gehen auch die Neurone der

kortiko-striatalen Projektion zu Grunde, es werden somit auch nicht-dopaminerge Kerngebiete und Rindenfelder funktionell beeinträchtigt (Braak, Del Tredici 2008).

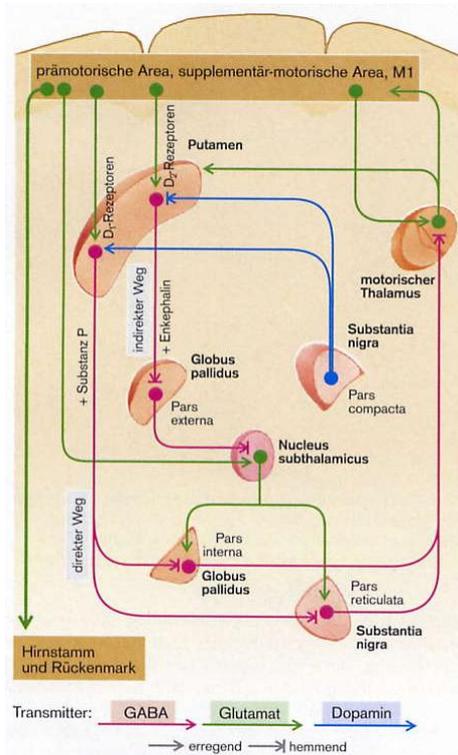


Abb. 1.5. Neuronale Schleife des motorischen Systems: Die Darstellung beschreibt den direkten und indirekten Basalganglienweg. Der oben markierte direkte Weg vom Putamen über Globus pallidus (pars interna) bzw. Substantia nigra (pars reticulata) äußert sich in einer Disinhibition des Thalamus (Aktivitätsförderung). Der indirekte Weg führt vom Putamen über den Globus pallidus (pars externa) zur Disinhibition des Nucleus subthalamicus. Da dieser die Kerne des direkten Wegs aktiviert, resultiert der indirekte Weg letztendlich in einer Hemmung der Thalamusaktivität. Somit wirken direkter und indirekter Weg antagonistisch zueinander. [Aus: Bruggencate G ten, Dieringer N (2003): *Sensomotorische Systeme: Körperhaltung, Bewegung und Blickmotorik*. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.): *Lehrbuch der Physiologie*. 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 682]

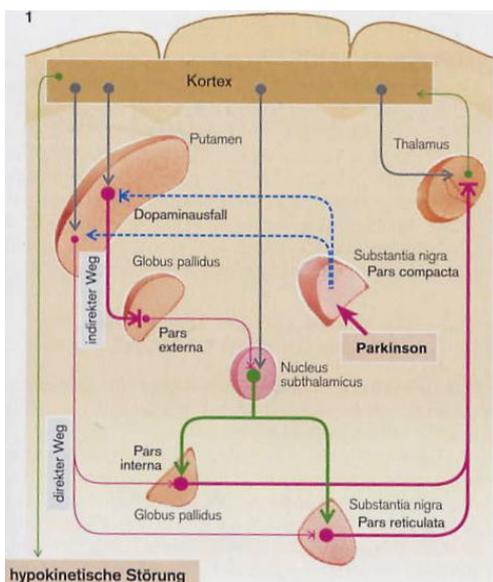


Abb. 1.6. Konsequenz des Dopaminausfalls in der Substantia nigra (pc): Im Vergleich zur Abb. 1.5. ist hier anhand der Liniendicke zu sehen, welche Wege beim dopaminergen Neuronensterben gehemmt oder gefördert werden. Der direkte Weg wird weniger stimuliert, der indirekte Weg wird weniger gehemmt. Dies resultiert auf

beiden Wegen in der Reduzierung der Thalamusaktivität mit folglich verminderter thalamokortikaler Erregung. Dies führt zur hypokinetischen Bewegungsstörung beim M. Parkinson.

[Aus: Bruggencate G ten, Dieringer N (2003): *Sensomotorische Systeme: Körperhaltung, Bewegung und Blickmotorik*. In: Klinker R, Silbernagl S (Hrsg.): *Lehrbuch der Physiologie*. 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 683]

1.2.3. Biochemische Aspekte

Die anatomische Charakterisierung des M. Parkinson besteht in der Depigmentierung der mesenzephalen Substantia nigra und im histopathologischen Auftreten von Lewy-Körperchen. Der Verlust der nigrostriatalen Neurone geht mit pathobiochemischen Prozessen einher, die heutzutage zwar weitgehend aufgeschlüsselt sind, deren Ursache aber unklar bleibt. Dabei sind die hier genannten Mechanismen nicht voneinander trennbar, vielmehr bedingen sie sich gegenseitig.

Es existieren verschiedene Modelle, die den nigrostriatalen Neuronentod erklären:

1. Verminderte Funktion des Komplex I der Atmungskette in den Mitochondrien

- a) durch Komplex I Inhibitoren (Endo- oder Exotoxine, wie z.B. MPTP)
- b) durch genetische Defekte in nukleärer oder mitochondrialer DNA

2. Oxidativer Stress

- a) durch Endo- oder Exotoxine
- b) durch mitochondriale Komplex I Schwächung
- c) durch genetische Defekte (Detoxifizierungsprozesse sind geschädigt)

3. Exzitotoxizität durch unphysiologisch hohe Glutamatfreisetzungen

Das Neurotoxin MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridin) trug zum Verständnis bei, dass dem oxidativem Stress durch eine Überproduktion von Sauerstoffradikalen in den Mitochondrien bei der progredienten Neurodegeneration der Parkinsonerkrankung eine zentrale Bedeutung zukommt: In den frühen 80er Jahren traten bei einer Gruppe von Heroinabhängigen in Kalifornien plötzlich Parkinson-Symptome auf. Grund für das Sterben dopaminergener Neurone war MPTP (mit dem aktivem Metaboliten MPP^+ = 1-Methyl-4-phenylpyridin Ion), das bei der unvollständigen chemischen Synthese von Heroin als Kontaminante anfiel. MPP^+ ist ein Substrat des Dopamintransporters und des mitochondrialen H^+ -Transporters, wird also spezifisch in den Mitochondrien dopaminergener Neurone angereichert, wo es eine Störung der Aktivität des Komplex I der Atmungskette bewirkt und zur Freisetzung von hochreaktiven Elektronen und der Bildung von Sauerstoffradikalen führt (Langston 1998). Die MPTP Toxizität resultiert demnach in einem selektiven, akuten Zelltod der dopaminergen Neurone über Komplex I Hemmung und einem plötzlichen und dem

irreversiblen Auftreten der Parkinson-Symptome Rigor und Hypokinesie (Dawson, Dawson 2003).

Dieses Modell legte die Vermutung nahe, dass mitochondriale Dysfunktion sowie unzureichende Schutzmechanismen und in ihrer Folge oxidativer Stress in Form von freien reaktionsfreudigen Sauerstoffradikalen auslösende Faktoren für den nigrostriatalen Zelltod sind (Jenner 2003). Wobei unklar bleibt, warum diese Mechanismen selektiv die dopaminergen Neurone der Substantia nigra schädigen.

Die Mitochondrien stellen den Energielieferanten ATP her. Dazu wird gebundener Wasserstoff auf NAD^+ oder FAD übertragen, um durch schrittweise Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff einen Protonengradienten aufzubauen. Dies geschieht im Komplex I bis IV der Atmungskette. Der Gradient wird vom Komplex V für die ATP Produktion genutzt (Reichmann, Janetzky 2000). Die Mitochondrien sind demnach prädisponiert für die Entstehung von oxidativem Stress, da sie ein sauerstoff- und elektronenreiches Milieu besitzen.

Die Komplex I Hemmung führt über die Produktion freier Radikale (z.B. ROS = reactive oxygen species) zur Oxidation zellulärer Proteine, Lipide und Nukleinsäuren. Unter der toxischen Bildung von Protein-Carbonylen, Lipid-Peroxiden und 8-Hydroxydeoxyguanosin resultiert unter anderem eine erhöhte Mutationsrate im mitochondrialen Genom, mit einem progredienten Defizit der Zellatmung und schließlich dem Zelltod. Die anfängliche Induktion antioxidativer Mechanismen ist im Endstadium defizitär und vermag diese Prozesse nicht aufzuhalten.

Eine verringerte Aktivität des mitochondrialen Komplex I der Atmungskette wird auch in der Substantia nigra von Parkinsonpatienten beschrieben (Mizuno et al. 1989; Schapira et al. 1998; Reichmann, Janetzky 2000). Die Reduktion des Komplex I der Atmungskette beläuft sich auf 30 bis 40 %. Die dopaminergen Neuronen formen aber nur 1 bis 2 % der Substantia nigra. Deshalb ist auch eine Beteiligung von Gliazellen nicht auszuschließen (Jenner 2003). Um den Einfluss des mitochondrialen versus nukleären Genoms auf diese Störung zu differenzieren, wurde über die Fusion von kernlosen Blutzellen mit mtDNA aus Patienten der Einfluss nukleärer DNA ausgeschaltet (ρ^0 Cybrids) und weiterhin die verringerte Komplex I Aktivität beobachtet. Diese Ergebnisse wiesen auf die Bedeutung mitochondrialer Mutationen hin, und verdeutlichten die Koexistenz von normalen und mutierten Mitochondrien in Zellen von Parkinsonpatienten - eine sogenannte Heteroplasmie der mtDNA (Schapira et al. 1998). Altersbedingte Veränderungen der mtDNA (Punktmutationen, Deletionen etc.) erhöhen im

Laufe des Lebens den Heteroplasmiegrad und resultieren in einem Abfall der Komplex I Aktivität mit den bereits beschriebenen Folgen. Deshalb wurde von einigen Autoren *das Alter* als der einzig gültige Risikofaktor für den M. Parkinson angesehen (Langston 1998).

Eine Komplex I Hemmung führt nicht nur zur Bildung freier Radikale sondern geht auch immer mit einem ATP Mangel einher. Da der Energieträger ATP auch für die Funktion der Ionenkanäle essentiell ist, kann es durch ein Energiedefizit zum Verlust des neuronalen Ruhepotentials kommen. Dementsprechend kommt es durch eine Vordepolarisation zur Aufhebung des Mg^{2+} -Blocks an NMDA-Rezeptoren, was Schäden durch glutamaterge Exzitotoxizität verursacht. Der damit verbundene Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels aktiviert Ca^{2+} -abhängige Proteine und die NO^{\bullet} -Synthetasen. Das dabei gebildete NO^{\bullet} ist ein Radikal und induziert so kaskadenartig die Bildung weiterer Oxidationsprodukte und zellschädigender Faktoren (Dawson, Dawson 2003).

Die drei hier beschriebenen Zelltodursachen: 1. Komplex I Hemmung 2. Oxidativer Stress 3. Exzitotoxizität führen zur Störung der Ca^{2+} Homöostase mit Aktivierung Ca^{2+} abhängiger Enzyme. Protein- und Lipidabbau, eine Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität, verschlechterte Transkriptionsbedingungen und die Dauerdepolarisation mit Cl^- und Wassereinstrom haben durch mitochondriale Cytochrom c Ausschüttung den apoptotischen Zelltod zur Folge (Gerlach et al. 2003).

Die ATP-Abhängigkeit von K^+ -Kanälen scheint Hauptursache der selektiv hohen Vulnerabilität von dopaminergen Neuronen der Substantia nigra zu sein, weil es nur hier zu einer Öffnung der Kanäle kommt, sobald Komplex I gehemmt wird bzw. ein ATP Mangel herrscht (Liss et al. 2005).

Doch selbst der zelluläre Dopaminstoffwechsel im gesunden Gehirn scheint toxisch zu sein. Die Autotoxizität des Dopaminstoffwechsels ist durch das beim Dopaminabbau entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu erklären, aus dem wiederum das Hydroxylradikal (OH^{\bullet}) gebildet werden kann. Das außerdem beim Dopaminabbau gebildete 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd fördert diese Radikalbildung. Die Produktion von Dopamin-Chinon aus Dopamin - als Konsequenz der oxidativen Schädigung - führt zur Entkopplung der Atmungskette von der ATP Produktion (Berman, Hastings 1999). Diese Mechanismen machen auch die L-Dopa Therapie zu einem zweiseitigen Schwert.

Bei Applikation des nicht gewebe selektiven Komplex I Hemmstoffs Rotenon in Ratten werden neurologische Symptome, neurochemische und neuropathologische Störungen hervorgerufen, wobei die Autoren den präferentiellen Untergang dopaminergener Neurone nicht

mit einer Schwächung der Atmungskette und resultierendem ATP Mangel erklärten, sondern mit der zusätzlichen Belastung dopaminerger Neurone durch frei werdende Sauerstoffradikale im Rahmen des zelleigenen Dopamin-Katabolismus (Betarbet et al. 2000). Diese Ergebnisse konnten *in vitro* bestätigt werden (Sherer et al. 2002). In den Versuchsreihen von Betarbet und Sherer wurden in den Zellen zytoplasmatische Proteinaggregate, positiv für das Chaperon α -Synuklein und den Degradationsmarker Ubiquitin, gefunden. Dies spricht auch für eine Störung des proteinabbauenden Systems (Ubiquitin-Proteasom-System, UPS): Ein ATP Mangel oder durch Oxidation entstandene Produkte, wie HNE (4-Hydroxynonenal, Lipidperoxidationsprodukt), vermögen das proteinabbauende 26S Proteasom-System zu schwächen, wodurch Proteine mangels Degradation akkumulieren, wie es für α -Synuklein bekannt ist (Jenner 2003). Auch beim monogen vererbtem Parkinson konnte eine Verbindung zu Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems gezeigt werden (Leroy et al. 1998a). An einem Tiermodell wurden Auswirkungen der medikamentösen Hemmung des UPS demonstriert: Die Nagetiere zeigten selektive Degeneration dopaminerger Neurone, zytoplasmatische α -Synuklein positive Einschlüsse und motorische Störungen. Eine nigraspezifische Schwächung des UPS zeigte sich auch in postmortalen Gehirnen von Parkinsonpatienten (McNaught et al. 2003, Eriksen 2005).

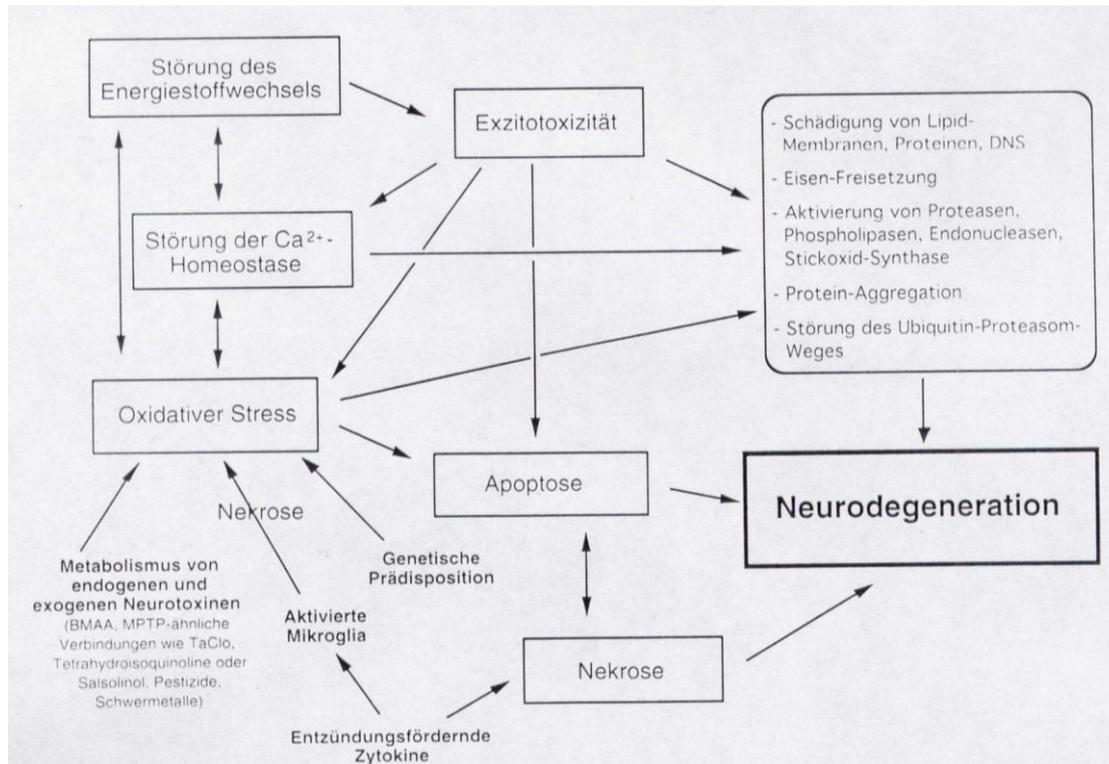


Abb. 1. 7. Mechanismen der Neurodegeneration: Das Schaubild zeigt die extra- und intrazellulären Faktoren, die zu neurodegenerativen Prozessen in der Substantia nigra führen. Betrachtet man die Pfeildichte, so scheint die Hauptursache des Neuronensterbens im oxidativem Stress zu liegen. Dieser wird ausgelöst durch endo- und exogene Neurotoxine, genetische Prädisposition, entzündliche Prozesse, Störung des Energie- und Ca²⁺-Stoffwechsels sowie Exzitotoxizität. Diese Faktoren werden wiederum durch den oxidativen Stress vermehrt. Letztlich führt dieser Teufelskreis zu Schäden in Lipidmembranen, Proteinen und DNA. Eisenfreisetzung, Proteinaggregation, Protease-, Phospholipase- und Endonukleaseaktivierung sowie Störungen des Ubiquitin-Proteasom-Systems bedingen die Neurodegeneration.

[Aus: Gerlach M, Reichmann H, Riederer P (2003): *Die Parkinson Krankheit, Grundlagen – Klinik – Therapie*. 3. Aufl., Springer, Wien, New York, S. 131]

1.2.4. Genetik des M. Parkinson

PARK1

PARK1 auf Chromosom 4q21 kodiert für das Protein **α -Synuklein**. α -Synuklein induziert wichtige Lernvorgänge bei Vögeln (George et al. 1995) weshalb ein Einfluss auf synaptische Plastizität (Lernen und kognitive Funktionen) im Hippokampus angenommen wird, da eine Regulationsfunktion für Neurotransmitter an der Präsynapse gefunden wurde (Liu et al. 2004). Dementsprechend konnte eine Interaktion mit synaptischen Vesikeln nachgewiesen werden, was die Aktivität des Dopamintransporters (DAT) negativ reguliert. Neueste Untersuchungen zeigen die Fähigkeit des α -Synukleins, K63-Multiubiquitinketten zu regulieren, die für Ribosomenkontrolle, Proteinsortierung, Proteintrafficking und Endozytose der Membranvesikel verantwortlich sind (Doss-Pepe et al. 2005). Somit erklärt sich auch die Reduzierung des Resevpools an Vesikeln in der präsynaptischen Nervenendigung bei α -

Synuklein Knock-out Mäusen (Cabin et al 2002). Der Einfluss von α -Synuklein auf die Vesikelmembranfusion scheint über den SNARE-Komplex zu funktionieren (Chandra et al. 2005). Knock-out Mäuse in anderen Studien wiesen mitochondriale Störungen aufgrund von reduzierten Cardiolipinanteilen und Komplex I Aktivität auf (Ellis et al. 2005).

In einer großen italienischen Familie aus dem Ort Contursi in der Nähe Neapels, die autosomal dominant vererbten Parkinsonismus aufweist, wurde als Ursache die Punktmutation von Alanin zu Threonin an der Aminosäure 53 der α -Synuklein Sequenz (A53T) entdeckt. Drei weitere Familien aus Griechenland wurden mit der gleichen Mutation gefunden (Polymeropoulos et al. 1996, 1997). Außerdem ist eine A30P Mutation in einer deutschen Familie beschrieben (Krüger et al. 1998). Eine spanische Familie zeigt eine E36K Mutation, wobei phänotypische Besonderheit zusätzliche Symptome einer Demenz sind (DLB = *dementia with Lewy bodies*) (Zarranz et al. 2004). Alle diese Krankheitsformen mit Lewy-Körperchen Pathologie (Parkinson PD, DLB, Multi System Atrophie MSA, einige Alzheimer Formen und Prionenerkrankungen) werden deshalb als *Synukleinoopathien* bezeichnet (Farrer et al. 1999a). Die Funktion von α -Synuklein ist noch nicht hinreichend bekannt, gesichert ist aber die Aggregation dieses Proteins im oxidativen Milieu (Golbe, Mouradian 2004), und eine erhöhte Akkumulation von mutiertem α -Synuklein (A53T) durch verminderten proteasomalen Abbau (Bennett et al. 1999). *In vitro* Experimente zeigten erhöhte Empfindlichkeit für oxidativen Stress in Zelllinien mit den A53T und A30P Mutationen (Kanada et al. 2000). Die oben beschriebene Schwächung der Mitochondrienfunktion durch MPTP konnte in Mäusen mit α -Synuklein Überexprimierung trotz subtoxischer MPTP Konzentrationen nachgewiesen werden (Beal 2004). Vielversprechend scheinen Studien mit transgenen Mäusen (A53T) zu sein, die bis dato einige motorische Symptome der Parkinson-Krankheit aufwiesen, ohne aber die typische Lewy-Körperchen Pathologie auszuprägen (Gispert et al. 2003).

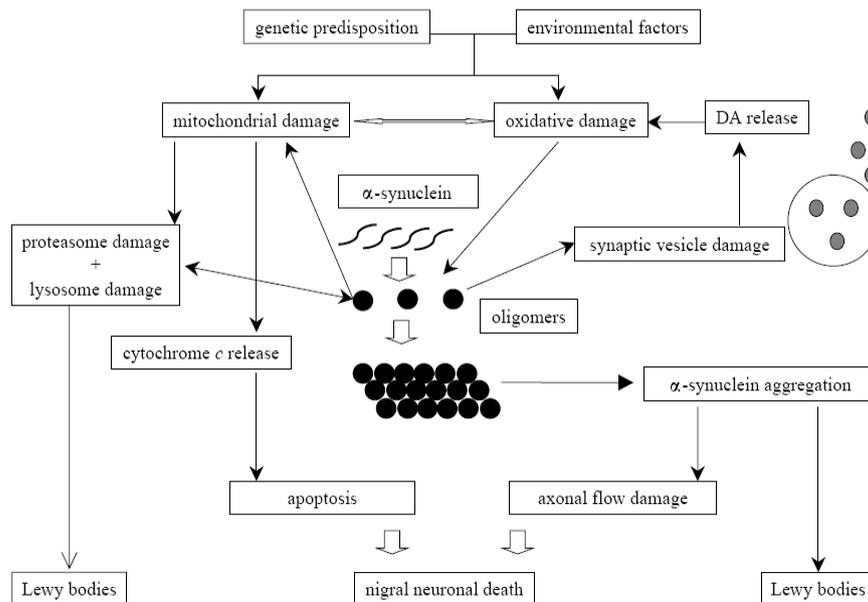


Abb. 1.8. Schematische Darstellung der Neurodegeneration: Die Abbildung zeigt die heute anerkannte Vorstellung der Neurodegeneration und Lewy-Körperchen Pathologie für sporadische Parkinsonfälle. α -Synuclein spielt demnach nicht nur in PARK1 eine pathobiochemische Rolle. DA = Dopamin.

[Aus: Mizuno Y, Hattori N, Kubo S, Sato S, Nishioka K, Hatano T, Tomiyama H, Funayama M, Machida Y, Mochizuki H (2008): *Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. Phil Trans R Soc B* 363: 2215-2227]

PARK2

Das auf Chromosom 6q25.2-q27 lokalisierte PARK2 Gen, kodierend für das Protein **Parkin**, wurde in japanischen Familien mit autosomal rezessiver, früh manifestierender Parkinson-erkrankung entdeckt (Kitada et al. 1998). Die klinische Symptomatik äußerte sich bei asiatischen Patienten zusätzlich - trotz guter Verträglichkeit - in L-Dopa induzierten Dyskinesien, in einer dystonen Fußantwort und in langsamer Progression. Im Gegensatz zu PARK1 und idiopathischem Parkinson ist bei PARK2 meistens keine Lewy-Körperchen Pathologie bekannt. Die Symptomatik mancher europäischer Patienten war von der des idiopathischen Parkinson nicht unterscheidbar. Es zeigten sich sogar Fälle mit einer späten Manifestation im 58. Lebensjahr (Lücking et al. 2000). 50% der Parkinson-Familien mit autosomal rezessiver Vererbung und früher Manifestation weisen eine Parkin Mutationen als Ursache auf. Mit dem Anstieg des Manifestationsalters sinkt bei einem Patienten die Wahrscheinlichkeit einer Parkin Mutation (Lücking et al. 2000; Klein et al. 2003; Hattori, Mizuno 2004). In genetischen Untersuchungen nach Parkin Mutationen ist neben den gängigen Sequenzanalysen auf *missense* Mutationen auch nach *chromosomalem rearrangement*, so z.B. nach kompletten Exondeletionen oder -duplikationen zu suchen (Hedrich et al. 2001), dabei wurden bis heute circa 100 Mutationen als krankheitsverursachend ermittelt (Mizuno et al. 2008).

Parkin ist eine E3-Ubiquitin Ligase. Durch die Rolle Parkins im proteinabbauenden System, wurde auch dessen Einfluss auf oxidativen Stress diskutiert, da die Inhibierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems antioxidative Mechanismen zu blockieren scheint. Dabei wurde in Leukozyten von Patienten mit Parkin-Mutation eine signifikant verringerte Komplex I Aktivität gemessen (reduziert um 62,5%). Einen ähnlichen Wert zeigten auch Patienten mit idiopathischem Parkinson. Doch beim Vergleich der Komplex IV Aktivitäten wurde eine Reduktion nur für die sporadischen Patienten nachgewiesen (Müftüoğlu et al. 2003). Die Funktion von Parkin hat den Fokus der Forschung stark auf Proteinabbau und –akkumulation gelegt.

PARK3

PARK3 wurde 1998 in sechs Familien auf Chromosom 2p13 als Ursache für autosomal dominanten Parkinson lokalisiert. Dabei wurde für zwei amerikanische Familien, die aus der Region Süddänemark und Norddeutschland stammten, eine gemeinsame Gründermutation nachgewiesen, die sich nicht in anderen deutschen Parkinsonpatienten bestätigte (West et al. 2001). Das Manifestationsalter zeigt, gegensätzlich zu den anderen genetisch bedingten Parkinson Syndromen eine sehr große Spannweite (37-89 Jahre). Eine detaillierte Haplotypisierung der Kandidatenregion in verschiedenen europäischen und amerikanischen Familien ergab in der Kopplungsanalyse LOD-Werte zwischen 2 und 3 für Marker in der Nähe des Gens für das Sepiapterin Reduktase Gen (SPR). SPR, ein Kofaktor für die Dopaminsynthese, ist gleichzeitig ein Initiator für die NO-Synthetase Isoform iNOS (*inducible* NOS), einen Schutzfaktor für Parkinson. In sporadischen Patienten ergab die Genotypisierung verschiedener SNPs in dieser Region signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientengruppen, was das SPR-Gen als einen Parkinson-Risikofaktor auszeichnet (Sharma et al. 2006).

PARK4

PARK4 wurde 1999 in der sogenannten „Iowa-Familie“ mit autosomal dominantem M. Parkinson beschrieben und auf Chromosom 4p in einiger Entfernung zu den PARK1 und PARK5 Regionen lokalisiert (Farrer et al. 1999b). Später wurde festgestellt, dass es sich bei PARK4 auch um eine α -Synuklein Mutation handelt, hier aber um eine Triplikation des kompletten Gens, was durch einen Gen-Dosis-Effekt die Pathogenität erklärt (Singleton et al. 2003). Die Symptomatik zeigt neben der Parkinson-Trias essentiellen Tremor und DLB (Gwinn-Hardy 2002).

PARK5

PARK5 auf Chromosom 4p14 kodiert für die **Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1 (UCH-L1)**. Ein Aminosäureaustausch (Ile93Met) wurde bei einer deutschen Familie mit autosomal dominant vererbtem M. Parkinson beobachtet. Das Manifestationsalter lag bei 50 Jahren, die Symptomatik äußerte sich in Rigor, Bradykinesie und Haltungsinstabilität mit Ansprechbarkeit auf L-Dopa (Leroy et al. 1998a), eine Lewy-Körperchen Pathologie ist bekannt (Auburger et al. 2005). UCH-L1 ist ein gehirnspezifisches Enzym, das als Monomer Deubiquitylierungsfunktion hat (Wilkinson et al. 1989), jedoch als Dimer die Funktion einer E3-Ligase besitzt (Liu et al. 2002) und K48-Multiubiquitinketten reguliert. UCH-L1 ist somit an Proteinabbau und Ubiquitin - Recycling beteiligt (Larsen et al. 1998). Dem S18Y Polymorphismus wird eine Schutzfunktion vor der Parkinsonerkrankung zugeschrieben (Maraganore et al. 2004). Untersuchungen in vitro zeigten, dass die I93M Mutation mehr pathologische Einschlusskörperchen formte als die S18Y Mutation oder der Wildtyp (Ardley et al. 2004). Parkin und UCH-L1 unterstreichen die Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems für die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen (Sherman, Goldberg 2001). Eine Mauslinie namens *gracile axonal dystrophy (gad)* mit Spontanmutation von UCH-L1 (Deletion von Exon sieben und acht) ist das erste Säugetiermodell mit Defekt im UPS und mit Aggregation von β - und γ -Synuklein, nicht aber α -Synuklein (Ichihara et al. 1995; Saigoh et al. 1999; Wang et al. 2004). Die UCH-L1 Mutation der *gad* Maus entspricht einer Null-Mutante (Osaka et al. 2003). Die neurologischen Symptome gleichen nicht dem M. Parkinson, denn es treten eine schwere Neurodegeneration des Rückenmarks und Hirnstamms mit Lähmungen sowie sensorischer und motorischer Ataxie auf.

PARK6

PARK6 wurde gekoppelt auf Chromosom 1p36 in der sizilianischen sogenannten „Marsala Familie“ gefunden. Es handelte sich um eine autosomal rezessive Vererbung (Valente et al. 2001b). Die Symptome beginnen im 32. bis 48. Lebensjahr, zeigen nur langsame Progression, und trotz L-Dopa induzierten Dyskinesien besteht mit dieser Medikation eine andauernde Therapieoption. PARK6 kodiert für **PINK1** (*PTEN-induced putative kinase-1*, BRPK in der Maus) (Valente et al. 2004a), das zuerst im Signalweg des Tumorsuppressors PTEN entdeckt wurde (Unoki et al. 2001). Aufgrund von Sequenzhomologien wurde PINK1 den Serin/Threonin Kinasen zugeordnet (Manning et al. 2002; Nakajima et al. 2003). Von allen bei erblichem Parkinson mutierten Proteinen ist PINK1 das einzige mit primär mitochondrialer Lokalisation. Bei der in spanischen PARK6-Familien beschriebenen G309D-

Mutation geht ein Schutz vor Apoptose verloren, die experimentell durch oxidativen Stress induziert wurde (Valente et al. 2004a). Die trunkierende Mutation W394OPA in der Marsala-Familie und weitere *nonsense* Mutationen bei anderen italienischen (Rohe et al. 2004) und japanischen (Hatano et al. 2004) Familien belegen, dass ein Funktionsverlust von PINK1 die Pathogenese auslöst.

Interessanterweise konnte eine Interaktion zwischen PINK1 und Parkin festgestellt werden. Drosophila Knock-out Mutanten für PINK1 und Parkin zeigten unter anderem mitochondriale Fehlfunktion und Verlust dopaminerger Neurone, wobei alleine die Parkin Überexpression die verloren gegangenen Funktionen „retten“ konnte, nicht umgekehrt. Dies spricht dafür, dass PINK1 im gemeinsamen *pathway* vor Parkin steht (Park et al. 2006, Clark et al. 2006).

Eine Kopplungsanalyse konnte PINK1 in sporadischen Parkinson-Fällen als Risikofaktor ausschließen (Healy et al. 2004). Allerdings sind sporadische Fälle mit Manifestation vor dem 50. Lebensjahr mit PINK1 Mutationen in Verbindung gebracht worden. Hier wurden über PET Studien in Kontrollen mit *heterozygoten* Mutationen Dysfunktionen im nigrostriatalen System gefunden (Valente et al. 2004b). Präklinische Auffälligkeiten ließen sich in einer Familie bei den nicht betroffenen Trägern mit heterozygoter G309D Mutation ebenfalls nachweisen, da ¹²³I-FP-CIT-SPECT Analysen eine erhöhte DAT-Bindung zeigten (Kessler et al. 2005).

PARK7

Auch PARK7 ist eine Parkinson-Variante mit autosomal rezessiver Vererbung und früher Manifestation wie PARK2 und PARK6 (EOPD = *early onset Parkinson disease* oder AREP = *autosomal recessive early onset parkinsonism*). PARK7 liegt auf Chromosom 1p36, ganz in der Nähe des PARK6 Locus, und kodiert für **DJ-1**. Zuerst wurde eine niederländische Familie mit Deletion der ersten fünf Exons beschrieben, dann eine italienische Familie mit L166P Mutation in DJ-1 (Bonifati et al. 2003). Das klinische Bild zeigt ein asymmetrisches, aber langsames Voranschreiten der Krankheit, auch mit psychischen Symptomen, und kann klinisch nicht sicher von PARK2 oder PARK6 unterschieden werden. In nur wenigen Fällen konnten in anderen Patienten mit Frühmanifestation weitere Mutationen gefunden werden, wobei hier Gen-Dosis Studien zur Anwendung kamen (Hedrich et al. 2004; Djarmati et al. 2004).

DJ-1 wurde zuerst durch seine Rolle in der Stabilisierung von posttranskriptionaler mRNA gefunden, außerdem wurden Homologien zu Proteasen und Chaperonen festgestellt (Nagakubo 1997). Unter oxidativem Stress konnte der zellprotektive Effekt von DJ-1

nachgewiesen werden, weil es als Sensor für oxidativen Stress fungiert (Taira et al. 2004), und in die Mitochondrien eingeschleust wird (Blackington et al. 2005). Folglich wird die Zelle empfindlicher gegenüber oxidativem Stress, sobald pathogene DJ-1 Mutationen vorliegen (Bonifati et al. 2003; Cookson 2005). Zudem ist Parkin ein Interaktionspartner von mutiertem DJ-1, was sich auch unter oxidativem Stress zeigte (Moore et al. 2005).

PARK8

PARK8 auf 12q12 ist die Krankheitsursache für autosomal dominanten M. Parkinson bei einer japanischen Familie (Samigahara Familie), und wird als die häufigste Ursache für autosomal dominanten M. Parkinson angenommen (Mizuno et al. 2008). Bei dieser Krankheitsform, mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 51 Jahren, zeigen sich Symptome, die weitestgehend dem idiopathischen Parkinson ähneln, mit guter Ansprechbarkeit auf L-Dopa (Funayama et al. 2002; Dekker et al. 2003). Ursächliche Mutationen wurden 2004 im Protein **LRRK2** (*leucine-rich repeat kinase 2*) gefunden, das in Lunge, Putamen und Substantia nigra stark exprimiert wird. LRRK2 gehört in die ROCO-Proteinfamilie (*Ras/GTPase superfamily*) und müsste diesbezüglich bei der Reorganisation des Zytoskeletts, bei Zelltransformierung, Zelladhäsion und stressinduzierter Kinaseaktivität wichtig sein. In den von Zimprich beschriebenen Familien war die Histopathologie so variabel (Lewy-Körperchen oder Tau-Aggregate oder Fehlen von Aggregaten) und die Phänotypen so differenziert (Parkinson und/oder Amyotrophe Lateralsklerose = ALS), dass die Autoren von einem Einfluss auf mehrere neurodegenerative Erkrankungen ausgehen (Zimprich et al. 2004).

Da eine Lokalisation in *lipid rafts* nachgewiesen wurde, wird LRRK2 eine Rolle in Signaltransduktion und *membrane trafficking* zugeschrieben (Hatano et al. 2007).

PARK9

PARK9 ist ein Locus auf Chromosom 1p36, der in einer konsanguinen Familie jordanischer Herkunft autosomal rezessiv vererbt wird. Diese als Kufor Rakeb bekannte Krankheit (KRD) zeigt neben der Parkinson-Symptomatik (ohne Tremor), Degeneration der Pyramidenbahn, supranukleäre Blickparese, Dystonien- sowie Myoklonusattacken und kognitive Einschränkungen, die in früher Jugend beginnen und auf L-Dopa Therapie Besserung zeigen. Allerdings reduziert sich der Benefit der Therapie mit zunehmender Krankheitsdauer. Der chromosomale Locus ist benachbart zu einem Locus für spinocerebelläre Ataxie mit Sakkaden (SCASI), zu DYT13, PARK6, PARK7 und PARK10 (Williams et al. 2005). 2006

konnte eine Mutation im lysosomalen Membranprotein **ATP13A2**, das eine ATPase Domäne trägt, gefunden werden (Ramirez et al. 2006).

PARK10

Ein Genomscan mit 781 Mikrosatellitenmarkern in Patienten isländischer Herkunft mit positiver Familienanamnese erbrachte LOD-Werte von 4,9 auf dem chromosomalen Lokus von 1p32. Die Region umfasst 7,6cM, überschneidet sich aber nicht mit PARK6 oder 7 (Hicks et al. 2002).

PARK11

Eine durch Voruntersuchungen lokalisierte Region auf Chromosom 2 wurde in einer Studie an weiteren Parkinsonpatienten mit starker familiärer Häufung aus Nord-Amerika eingehender untersucht. Die Kandidatenregion auf 2q36-37 umfasst 20cM und überschneidet sich nicht mit PARK3 (Pankratz et al. 2003b).

PARK12

Eine ähnliche Untersuchung, wie sie auch bei PARK11 zum Kandidatenlokus verhalf, wurde hier durchgeführt. Die statistische Analyse ergab für Patienten mit nur schwacher familiärer Häufung oder bei einer weitgefassten Definition der Parkinson-Symptome eine Kopplung auf dem X-Chromosom (Pankratz et al. 2003a).

PARK13

Dieser Lokus wurde in vier deutschen Patienten mit sporadischem Parkinson auf Chromosom 2p12 gefunden, eine Mutation in **Omi/Htra2** scheint ursächlich zu sein (Strauss et al. 2005). Dabei handelt es sich um ein mitochondriales Protein, das im intermembranären Spalt lokalisiert ist und als mutierte Form eine defekte Aktivierung seiner Protease-Aktivität zeigt, was in stressinduzierter neuronaler Degeneration resultiert (Suzuki et al. 2001). Eine Relevanz für die familiären Formen konnte zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen werden.

Abb. 1.9. fasst alle heute bekannten Parkinson-Gene (bis auf LRRK2) zusammen. Deutlich werden drei Stationen der Pathogenese, von denen mindestens eine in jeder genetisch determinierten Form vorliegt: Oxidativer Stress durch mitochondriale Dysfunktion (α -Synuklein, PINK1 und DJ-1), Störung im proteinabbauenden System (UPS) (α -Synuklein, Parkin, UCHL-1), und Störung von Phosphorylierungskaskaden (PINK1 und LRRK2).

Denkbar ist deshalb ein heute noch unbekannter gemeinsamer Pathomechanismus, in den sich sporadische Fälle an unterschiedlichen Stellen einklinken.

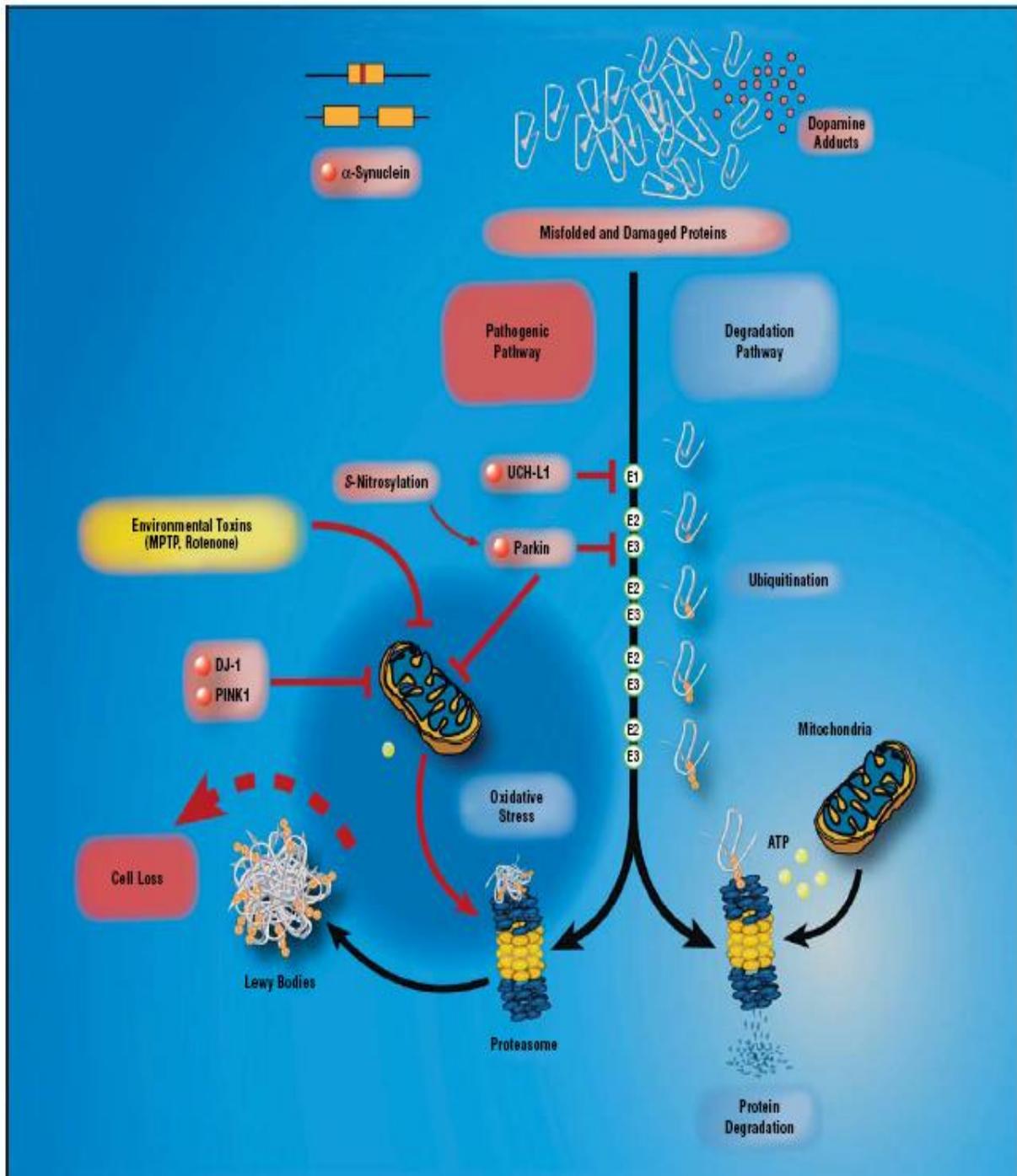


Abb. 1.9. Genetische Ursachen und allgemeine Pathomechanismen: Mutationen in α -Synuclein, UCHL-1, Parkin, DJ-1, und PINK1 sind für die erblichen Parkinsonerkrankungen mit Frühmanifestation verantwortlich. α -Synuclein führt zu zyttoplasmatischen Proteineinschlüssen. UCH-L1 und Parkin schwächen das Ubiquitin-Proteasom-System. Parkin, DJ-1 und PINK1 stören die mitochondriale Funktion, was mit proteolytischem Stress assoziiert ist. Die Toxine MPTP und Rotenon führen über mitochondriale Funktionsminderung zu oxidativem Stress.

[Aus: Eriksen JL, Wszolek Z, Petrucelli L (2005): *Molecular pathogenesis of Parkinson disease. Arch Neurol* 62: 353-357]

1.2.5. Therapie

Bereits 1867 wurden die Symptome des M. Parkinson durch die Gabe der Belladonna-Alkaloide (m-Cholinorezeptor-Antagonisten) gemildert (Gerlach et al. 2003).

Circa 100 Jahre später begannen die Wiener Neurologen Birkmayer und Hornykiewicz mit der L-Dopa Gabe an Parkinsonpatienten und konnten damit die Symptome fast vollständig reduzieren (Hornykiewicz 2001).

Dagegen sind heutzutage die therapeutischen Optionen und medikamentösen Kombinationen zur Behandlung der Parkinson-Symptomatik so vielfältig wie kompliziert. Einen ausführlichen Überblick geben Gerlach et al. (2003). Deshalb soll hier nur ein kurzer Abriss der Parkinson-Medikation mit den wichtigsten Wirkungen und Nebenwirkungen geleistet werden, ohne eine wertende Komponente einfließen zu lassen.

Die drei großen Symptomenkomplexe, die behandelt werden müssen, sind:

1. Motorische Störungen (Plus- und Minussymptomatik)
2. Vegetative Störungen (erhöht sind Speichel- und Tränen- sowie Talgproduktion, gestörte Schweißregulation, niedriger Blutdruck, gestörte Blasen- und Darmfunktion)
3. Psychische Störungen (Depression, Demenz)

Tab. 1.2. Pharmakologische Therapie. Legende: *BHS* = Bluthirnschranke; *NW* = Nebenwirkungen; *GIT* = Gastrointestinaltrakt.

Wirkstoffgruppe	Handelspräparat	Wirkung	Nebenwirkung
L-Dopa (auch: Levodopa)	Levopar® und Madopar® enthalten L-Dopa in Kombination mit <i>Benserazid</i> Levodopa comp. C STADA® und Levodopa-ratiopharm® enthalten Levodopa und <i>Carbidopa</i>	als Dopamin-Vorstufe BHS-gängig, nur in Kombination mit Decarboxylasehemmern, Besserung von Akinese, Rigor und psychischen Symptomen, kurze Wirkdauer	Übelkeit, Erbrechen; On-Off-Phänomene (= Wirkungsfluktuationen); bei Langzeittherapie Dyskinesien; ohne Kombination mit Decarboxylasehemmer kommt es durch Dopaminüberschuss zu NW in der Peripherie (Tachkardien); Schlaflosigkeit, Verwirrtheit
COMT-Hemmer	Entacapon (Comtess®)	peripherer Abbau von L-Dopa und Dopamin durch Blockade der Methylierungsreaktion verhindert, ermöglicht die Reduktion der L-Dopa Dosis	Dyskinesien, Übelkeit, Abdominalschmerzen, Motilitätsstörungen des GIT, Mundtrockenheit
MAO-B-Hemmer	Selegilin (A mindan®, Antiparkin®)	verhindert den Dopamin-Abbau und die Wiederaufnahme in die Synapse; kann End-of-dose-Akinesien vermeiden; verhindert	Übelkeit, Blutdruckabfall

		die Entstehung von ROS; evtl. neuroprotektiv	
Dopamin-Agonisten	<u>Ergotalkaloid-Abkömmlinge:</u> - Bromocriptin - Cabergolin - Lisurid - Pergolid <u>Nicht-Ergotalkaloide:</u> - Ropinirol - Pramipexol	Wirkungsspektrum auf D ₂ -Rezeptoren; oft im Frühstadium als Monotherapie angewendet, Wirkung wird erst nach Wochen erreicht	Übelkeit und Erbrechen (Area postrema Stimulation) durch peripher wirkende Dopamin-Antagonisten (Domperidon) reduzierbar; dosisabhängige NW wie bei L-Dopa; orthostatische Reaktionen treten bei Nicht-Ergotalkaloiden seltener auf
NMDA-Rezeptor-Blocker	Amantadin (Adekin®, PK-Merz®)	nicht kompetitiver Blocker; zur Monotherapie bei leichter Hypokinesie; besonders wirksam bei akinetischer Krise als Dauerinfusion	Unruhe, GIT-Störungen, Verwirrtheit
Zentrale Anticholinergika	Biperidin (Akineton®) (synthetische, lipophile tertiäre m-Cholinozeptor-Antagonisten); Belladonna-Alkaloide sind obsolet Budipin (Parkinsan®) hat auch NMDA-antagonistische Wirkung	Beeinflussung der Plusssymptome durch Reduktion des cholinergen Überschusses; gegen Rigor und Tremor sowie gegen Hyperhidrosis und Hypersalivation	nicht bei kognitiven Störungen anwenden; Übelkeit, Mundtrockenheit, Akkommodations- und Gedächtnisstörungen, Verwirrtheit

Die oben genannten Medikamente können zwar nicht die Progression der Krankheit verhindern, doch sie erhalten ein Stück Lebensqualität. Die Parkinson-Medikation ist eine lebenslange Medikation, die aber immer neu angepasst werden muss, deshalb sind begleitend auch Physio- und Psychotherapie empfehlenswert.

Nach Erschöpfung der medikamentösen Möglichkeiten stellt die Tiefe Hirnstimulation eine effiziente Parkinson-Therapie mit langfristigem Nutzen dar. Experimentelle Ansätze gibt es auch mit stereotaktischen Läsionen, mit Transplantation von Stammzellen und mit neurotrophen Faktoren.

1.2.6. Parametrische Kopplungsanalyse von PARK5 in einer Familie mit autosomal dominant vererbtem Morbus Parkinson

1.2.6.1. Genetische Analyse

Die zweite molekulargenetische Methode, die hier zum Tragen kommt, ist die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit radioaktiver Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit nachfolgender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zur Auftrennung der Mikrosatelliten-Allele nach ihrer Größe. Bei Mikrosatelliten handelt es sich um eine Abfolge von zwei bis zehn Basenpaaren, die sich individuell unterschiedlich oft wiederholen. Damit gehören sie zu tandemartig angeordneten repetitiven DNA-Sequenzen, wie auch die Satelliten- und Minisatelliten-DNA. Im Gegensatz zu diesen, sind die Mikrosatelliten auch in codierenden Abschnitten zu finden und gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt. Da sie zwei Prozent des Genoms einnehmen und bei jedem Individuum unterschiedlich lang sind, werden sie als Marker für Kopplungsanalysen und zur Kartierung des Genoms verwendet (Strachan, Read 2005). Die Größe dieser Marker-Allele wird dann für die Haplotypisierung der untersuchten Personen genutzt, um eine gekoppelte Vererbung zwischen dem Parkinson-Gen UCH-L1 (PARK5) und dem Krankheitsphänotyp auszuschließen oder zu bestätigen.

Die hier untersuchte Familie stammt aus Spanien und zeigt einen autosomal dominant vererbten M. Parkinson mit Frühmanifestation und unbekannter Penetranzrate.

Aufgrund der autosomal dominanten Vererbung in dieser Familie müssen folgende heute bekannten Genloci als mögliche Kandidatengene in Betracht gezogen werden: PARK1, PARK4, PARK5 und PARK8.

Mit Ausnahme von PARK5 wurden in einer groben Screening-Untersuchung des gesamten Genoms mit Mikrosatelliten-Markern und Kopplungsanalyse alle anderen chromosomalen Regionen autosomal-dominanter PARK Gene ausgeschlossen (Ergebnisse von Prof. Auburger in Kooperation mit Dr. Polymeropoulos, damals NHGRI/NIH, Bethesda, USA).

Anhand einer parametrischen Kopplungsuntersuchung soll auch das letzte mögliche Gen (PARK5) bezüglich einer mit dieser Krankheit gekoppelten Vererbung untersucht werden.

In tierischen Zellen existiert ein diploider (doppelter) Chromosomensatz, da von jedem Elternteil von einem Allelenpaar nur ein Allel an das gleiche Kind weitergegeben wird. Jedes Gen liegt somit in zwei Versionen (= Allele) vor. Werden Gene als solche Marker verwendet, dann ist die Möglichkeit, dass eine Familie nur homozygote Träger für beide Allele eines Gens hat, sehr hoch. Dieses Problem gibt es nicht bei den hochinformativen Mikrosatelliten

(Dib et al. 1996). Da die Mikrosatelliten hochpolymorph sind, ist ihre Länge auf den zwei Allelen eines definierten Lokus einer Person unterschiedlich, also heterozygot für die Mikrosatelliten, was man sich bei Haplotypisierungen zunutze macht. Bei der Kopplungsanalyse lässt sich somit über den Längenvergleich der Mikrosatelliten verfolgen, welches Allel von welchem Elternteil vererbt wurde (phasendefiniert). Dies lässt gerade bei autosomal dominanten Erbgängen die Identifikation des Allels zu, das mit der Krankheit vererbt wird (Kosegregation). Der Haplotyp (Allelkombination in einem definierten Chromosomenabschnitt) beantwortet bei der Kopplungsanalyse die Frage, ob eine bestimmte Allelkombination immer mit der Krankheit vererbt wird (Schumacher et al. 2002).

Bei der Kopplungsanalyse (*Linkage*-Statistik) wird untersucht, ob eine polymorphe Eigenschaft in chromosomaler Nähe des Krankheitsgens bei der Vererbung innerhalb einer Familie immer zusammen mit der Krankheit in den Betroffenen auftritt, also mit der Krankheit gekoppelt vererbt wird. Kopplungsanalysen kommen nur in Familien mit monogen vererbten Krankheiten zur Anwendung. Dabei werden die oben beschriebenen Mikrosatelliten als Marker verwendet, um über das gesamte Chromosom verteilt, jedem Familienmitglied seinen individuellen Haplotyp zuzuweisen. Dafür werden 400 Mikrosatelliten in einem Abstand von 10 Millionen Basenpaaren mittels PCR und PAGE auf ihre Länge hin untersucht. Von Kopplung wird allgemein gesprochen, wenn eng benachbarte Allele auf einem Chromosomenabschnitt in einer genetisch verwandten Familie zusammen übertragen werden. Sollte es zu einer Trennung dieser Nachbarloci kommen, wird dies als Rekombination bezeichnet: Homologe Chromatiden lagern sich während der meiotischen Zellteilung übereinander (*Crossing-over*) und tauschen Chromosomenabschnitte aus. Die Rekombinationswahrscheinlichkeiten unterscheiden sich zwischen den Geschlechtern und sind auch abhängig von der chromosomalen Lokalisation. Über das gesamte Genom gemittelt entspricht eine Rekombinationshäufigkeit von einem Prozent einer einzigen Rekombination in 100 untersuchten Meiosen. Der genetische Abstand zwischen den ausgetauschten Segmenten entspricht dann einem centiMorgan, der physikalische Abstand beträgt ungefähr eine Millionen Basenpaare (Schumacher et al. 2002; Strachan, Read 2005). Dies hat zur Folge, dass sich chromosomal nahstehende Abschnitte mit höherer Wahrscheinlichkeit gekoppelt vererben. Die Kopplungsanalyse gibt Aufschluss über den chromosomalen Abstand zwischen Krankheitsgen und untersuchtem Marker. Rekombinationsereignisse die über das gesamte Genom individuell unterschiedlich verteilt sind, können die Eingrenzung einer Krankheitsregion ermöglichen und werden mit höherer Wahrscheinlichkeit gefunden, wenn viele Meiosen untersucht werden. Die Auswertung dieser Datenmasse ist nur statistisch

möglich und verlangt neben den Haplotypen auch die Allelfrequenzen, den Erbgang und die Penetranz der Erkrankung. Die statistische Maßzahl für die Sicherheit einer Kopplung ist der LOD-Wert (*LOD-score, logarithm of the odds*, Logarithmus der Chancen). Dieser Wert errechnet sich aus dem Logarithmus des Verhältnisses zwischen der Rekombinationshäufigkeit Θ wenn die Loci gekoppelt sind und $\Theta = 0,5$ wenn sie nicht gekoppelt sind. Ein LOD-Wert von drei gilt als Nachweis für die Kopplung von zwei Markern. Er erreicht also dann sein Maximum, wenn keine Rekombination aufgetreten ist, also Marker und Krankheitsloкус genetisch nahe sind (Strachan, Read 2005).

Für die Kopplungsanalyse von PARK5 auf Chromosom 4p14 werden telomerwärts und centromerwärts vom Kandidatengen UCH-L1 Nukleotidrepeats festgelegt, die ungefähr drei Millionen Basenpaare voneinander entfernt sind.

Die hier verwendeten Mikrosatelliten D4S2382 und D4S3357 sind auf der Internetseite des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) unter www.ncbi.nlm.nih.gov beschrieben.

Die Größenbestimmung dieser Mikrosatelliten setzt zuerst ihre Amplifizierung über eine radioaktive PCR voraus. Dabei sind die verwendeten dCTP Nukleotide zum Teil mit ³²Phosphor markiert. Dies ermöglicht die Darstellung des PCR-Produkts auf einem Acrylamidgel (30x40cm), das einen Röntgenfilm radioaktiv belichtet, und somit einen relativen Vergleich zwischen der Länge der Mikrosatelliten erlaubt. Nur Gele dieser Größe können die Längendifferenz der Mikrosatelliten hochauflösend darstellen. Dabei sind Unterschiede von zwei Basenpaaren erfassbar. Basierend auf den verschiedenen Allelen, die durch die Mikrosatelliten gefunden werden, kann mittels einer Haplotypisierung die Kopplungsanalyse erfolgen.

Neben den Mikrosatelliten existieren weitere genetische Merkmale, durch die sich Individuen unterscheiden. Da sie nur den Austausch eines Nukleotids bewirken, werden sie als *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) bezeichnet. Durchschnittlich sind diese SNPs mit einem Abstand von 1000bp im menschlichen Genom verteilt. Es existieren demnach zusätzlich zu repetitiven DNA-Sequenzen drei Millionen SNPs, in denen sich die Menschen voneinander unterscheiden. Die Lokalisation der SNPs kann intergenisch oder intragenisch sein, sie können auf kodierenden oder nicht kodierenden Sequenzen vorkommen Ein SNP kann eine stumme oder im Phänotyp sichtbare Mutation zur Folge haben (Strachan, Read 2005). Ein

solcher Polymorphismus (rs9321) wird im UCH-L1 Gen zusätzlich zur Kopplungsanalyse auf Assoziation mit der Krankheit untersucht, um den Haplotyp genauer zu erfassen.

UCH-L1 kodiert für neun Exons und umfasst einen Bereich von 11,5 kB (Leroy et al. 1998b). Der SNP rs9321 ist in der untranslatierten Region am 5'-Ende (5'UTR) von UCH-L1 lokalisiert. Somit erfolgt keine Aminosäuresubstitution wenn dieser SNP vorliegt. Die NCBI Homepage gibt für den SNP rs9321 einen Basenaustausch von Cytosin nach Thymin im UCH-L1 Gen an. Die Base Cytosin kommt mit einer Häufigkeit von 0,903 und die Base Thymin mit einer Häufigkeit von 0,097 in der Bevölkerung vor. Die Heterozygotenrate beträgt 0,176. Mittels bakteriellen Restriktionsendonukleasen kann das amplifizierte PCR-Produkt in Fragmente zerlegt werden. Die enzymespezifischen Erkennungssequenzen werden Palindrome genannt. Ergibt sich durch einen Einzelnukleotidaustausch eine Änderung des Palindroms, so entfällt oder ergibt sich eine Schnittstelle. Das Fragmentmuster ist demnach anders, je nachdem, ob der Polymorphismus homo- oder heterozygot oder gar nicht vorliegt (Strachan, Read 2005). Wenn der SNP rs9321 vorhanden ist, entfällt eine erwartete Restriktionsschnittstelle für das Enzym MspI. Dies ist dann mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese als ein differenziertes Bandenmuster sichtbar.

1.2.6.2. Charakterisierung des Kandidatengens UCH-L1

1989 wurde das für Neuronen spezifische Protein PGP9,5 als eine Ubiquitin C-terminale Hydrolase (UCH-L1) identifiziert, womit ein entscheidender Beitrag zum Verständnis des Ubiquitin-Proteasom-Systems geliefert wurde (Wilkinson et al. 1989, 2000). Die Bedeutung des UPS für Zellfunktion und Neurodegeneration ist in den letzten Jahren immer besser verstanden worden und scheint immer wichtiger zu werden. Das Ubiquitin-Proteasom-System hat seine Aufgabe im Abbau von Proteinen. Ubiquitin muss dabei aktiviert, konjugiert und an Proteine ligiert werden, um diese für den proteasomalen Abbau zu markieren. UCH-L1 ist dafür verantwortlich, Ubiquitin durch das Schneiden von Polyubiquitinketten zu recyceln bzw. markierte Aminosäuren oder Oligopeptide zu deubiquitylieren (Larsen et al. 1998).

Da bis jetzt nur eine Familie mit I93M Mutation in UCH-L1 bekannt ist (Leroy et al. 1998a), wird PARK5 in der Literatur zum Teil als Kandidatengen unsicherer Relevanz für Parkinson gewertet (Cookson 2005). Dazu beigetragen haben Studien, die keine weiteren Familien mit autosomal dominantem M. Parkinson durch eine PARK5 Mutation identifizieren konnten (Lincoln et al. 1999). Stattdessen fiel hierbei ein S18Y Polymorphismus in UCH-L1 auf, bei dem das Y-Allel in Kollektiven von idiopathischen Parkinson-Patienten signifikant seltener gefunden wurde, und damit wohlmöglich ein reduziertes Risiko für die Manifestation dieser

Erkrankung einhergeht (Lincoln et al. 1999; Facheris et al. 2005). Der protektive Polymorphismus (S18Y) wurde in ethnisch unterschiedlichen Populationen nachgewiesen (Elbaz et al. 2003). Gleichzeitig wurden Studien publiziert, nach denen der protektive Effekt von S18Y nicht detektierbar war (Mellik et al. 2000; Levecque et al. 2001). Dies führte zur Prüfung der widersprüchlichen Ergebnisse in einer globalen Studie (Maraganore et al. 2004). Dabei konnte ein protektiver Effekt durch S18Y hinsichtlich der Erkrankung in jungen Lebensjahren belegt werden. Demnach wäre der Einfluß von UCH-L1 auf das Parkinson-Risiko glaubwürdig.

Die einzig heute bekannte Mutation in PARK5 zeigt sich in der oben beschriebenen Familie deutscher Herkunft (Leroy et al. 1998a). Leider existieren keine Nachkommen in diesem Stammbaum. Es lebt nur eine Person mit PARK5 Mutation. Dies macht weitere Forschung an PARK5 sehr schwer. Eine positive Kopplungsanalyse in der hier untersuchten spanischen Familie wäre wichtige Evidenz für die Rolle von UCH-L1 bei neurodegenerativen Prozessen. Zu diesem Zweck wird es in der zu untersuchenden Familie mittels isolierter Haplotypisierung der Kandidatenregion UCH-L1 möglich sein zu entscheiden, ob weltweit eine weitere Familie mit Mutation in UCH-L1 existieren könnte.

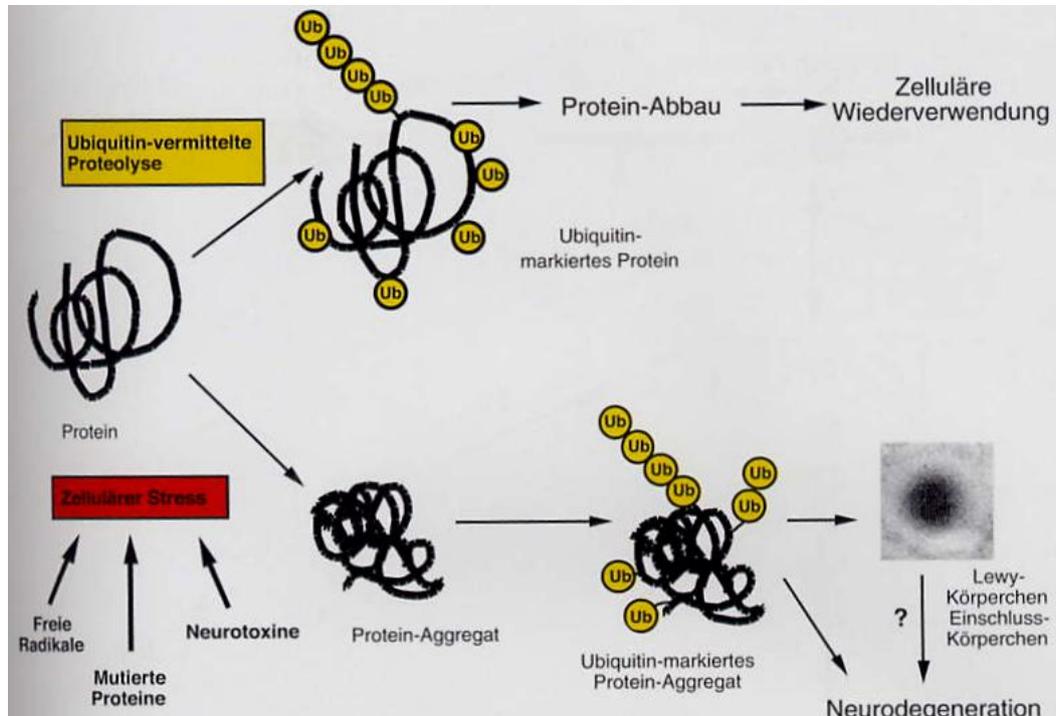


Abb.1.10. Ubiquitin-Proteasom-System: Das Schema zeigt im oberen Teil die Ubiquitin vermittelte Proteolyse von Proteinen, die für den Abbau bestimmt sind. Durch drei Enzyme (E1, E2 und E3 - hier nicht gezeigt) wird Ubiquitin an die abzubauenen Proteine konjugiert und dient als Initiator der Proteolyse. Im unteren Teil der Abbildung wird dieser Weg durch Zellstress unterbunden, da das System mit der Menge an falsch gefalteten Proteinen erschöpft ist. Dies resultiert in den Proteinaggregaten, die in Lewy-Körperchen Erkrankungen gefunden werden. Noch ist unklar, ob die Lewy-Körperchen ein Schutzmechanismus für die Zelle darstellen, oder Ursache der Neurodegeneration sind.

[Aus: Gerlach M, Reichmann H, Riederer P (2003): *Die Parkinson Krankheit, Grundlagen – Klinik – Therapie*. 3. Aufl., Springer, Wien, New York, S. 137]

1.2.7. Assoziationsuntersuchung zweier Parkinson Kandidatengene anhand von *single nucleotide polymorphisms*

1.2.7.1. Methodenbetrachtung und Studiendesign

Die dritte hier angewendete Methode ist die Untersuchung von ausgewählten SNPs aus Parkinson-Kandidatengenen auf Assoziation mit Parkinson in vergleichenden Studien von Patienten versus Kontrollen. Die Kandidatengene NME4 und MTIF3 sind mögliche Interaktionspartner von PINK1, das von PARK6 kodiert wird, und das als erstes Parkinson-Krankheitsprotein in Mitochondrien lokalisiert wurde (Valente et al. 2004a).

Assoziationsstudien werden im Gegensatz zu Kopplungsanalysen nicht in Familien mit monogenetischen Erbkrankheiten verwendet, sondern bei Patientengruppen, die an polygenetisch determinierten Krankheiten leiden, also nicht nach den Mendel'schen Regeln vererbt werden. Die Assoziationsstudie, wie sie hier zur Anwendung gekommen ist, gehört zum Standardrepertoire der genetischen Untersuchung von Erkrankungen mit unbekannter Ursache. Die Assoziation (auch: Kopplungsungleichgewicht) ist dabei kein genetisches sondern ein statistisches Phänomen, das das gemeinsame Auftreten von Allelen mit Phänotypen bezeichnet (Schumacher et al. 2002).

Diese Studien basieren auf der Annahme, dass eine Population gemeinsame Vorfahren hat und somit spezifische Allele, also auch Krankheitsrisikoallele dieser Vorfahren teilt. Natürlich hat sich in der Generationenfolge durch Rekombinationen ein gemeinsam vererbtes Chromosomensegment verändert und verkürzt. Allerdings besteht für Allele in unmittelbarer Nähe zum Krankheitslokus noch Assoziation. Genauer gesagt kommt ein Kopplungsungleichgewicht innerhalb von einem centiMorgen um den untersuchten Marker zum Tragen. Die Assoziationsstudien sind dabei die einzige Möglichkeit, um Allele ausfindig zu machen, denen ein nur *geringer* Krankheitseffekt zugeschrieben wird (Risch, Merikangas 1996).

Ein Risikoallel kann, muss also nicht die Krankheit auslösen. Wenn nun eine Gruppe von circa 200 Genpolymorphismen für eine komplexe Erkrankung verantwortlich ist, reicht eine individuenspezifische Kombination von beispielsweise 20 Genpolymorphismen aus, um das Krankheitsrisiko signifikant zu erhöhen (Comings, MacMurray 2003). So wurde als Risikofaktor für die nicht-familiäre Alzheimererkrankung das Allel $\epsilon 4$ im Gen für das Apolipoprotein E (ApoE) mittels der Assoziationsuntersuchung gefunden (Selkoe 2001).

Assoziationsuntersuchungen an *sporadischen* Formen der Parkinsonerkrankung ergaben kein Kopplungsungleichgewicht mit PINK1 Polymorphismen (Healy et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit soll validiert werden, ob aber ein Kopplungsungleichgewicht zwischen PINK1-Interaktoren und dem idiopathischen Parkinson besteht.

Das dieser Analyse zugrunde liegende Studiendesign variiert von herkömmlichen Studienansätzen. So bestand bisher erhebliche Uneinigkeit darüber, welche Kontrollgruppen zum jeweiligen Patientenkollektiv passen. Entweder besteht die Möglichkeit mit den Patienten verwandte Kontrollen zu verwenden, oder es werden nicht verwandte Kontrollen analysiert. Stratifikationsprobleme ergeben sich dann, wenn eine allelische Assoziation nicht krankheitsspezifisch, sondern herkunftsbedingt ist. Das führt zu falsch positiven Ergebnissen (Tu, Whittemore 1999; Maraganore 2005). Dies würde *a priori* einen Vorteil den Fall-Kontroll-Studien mit verwandten Kontrollen zusprechen. Doch nachteilig besteht hier eine geringere statistische Sicherheit (Risch 2000). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit einem Patientenkollektiv F nicht verwandte Kontrollen zugewiesen, hingegen einem zweiten Patientenkollektiv T verwandte Kontrollen.

1.2.7.2. MTIF3

Das erste durch eine Assoziationsstudie genetisch validierte Kandidatengen ist der mitochondriale Translations-Initiations-Faktor 3.

Biochemische Gründe, die MTIF3 zu einem aussichtsreichen Parkinson-Kandidatengen machen sind folgende:

- a) Die fördernde Wirkung von MTIF3 auf die mitochondriale Translation und somit seine Wirkung auf die Produktion der Atmungskettenkomplexe.
- b) Die Identifizierung von MTIF3 als Interaktor-Kandidat von PINK1 in der Fruchtfliege mittels Hefe-2-Hybrid-Technik.

MTIF3 (IF3mt) auf Chromosom 13q12.2 ist in Säugetierzellen erst seit 2002 bekannt. Mit dem bakteriellen Homolog IF3 teilt sich das Säugetier MTIF3 circa 21% Identität (Koc, Spremulli 2002). In Bakterien ist die Aufgabe von IF3 die Identifikation des Startcodons (AUG, GUG oder UUG) auf der mRNA gefolgt von der Dissoziation der ribosomalen Untereinheit. Die Aufgabe des Säugetier-MTIF3 ist die Förderung der Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten, um somit die Menge an freier 28S ribosomaler Untereinheit zu gewährleisten. Die letztere ist nötig für IF2mt, was die Bindung der fMet-tRNA an die 28S Untereinheit stimuliert. Nur so kann die Translation in Mitochondrien starten.

Unter <http://flybase.org/reports/FBgn0029891.html>, eine Homepage für das Genom der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, wird das homologe Protein zu PINK1 in *Drosophila* als CG4523 bezeichnet. Von allen Protein-Interaktionspartnern, die für CG4523 mit der Hefe-2-Hybrid-Technik glaubhaft gemacht werden konnten, ist CG11656 der einzige, der beim Menschen mitochondrial lokalisiert ist. Es handelt sich bei CG11656 um das Homolog des menschlichen MTIF3 (<http://www.thebiogrid.org/SearchResults/summary/58093>).

1.2.7.3. NME4

Bei dem zweiten hier genetisch untersuchten putativen PINK-Interaktor handelt es sich um NME4 (non-metastatic cell expressed protein 4) bzw. nm23-H4.

NME4 auf Chromosom 16p13.3 gehört in die Gruppe der Nukleosid Diphosphat Kinasen (NDP Kinasen), die die Umwandlung von Nukleosidtri- in diphosphate katalysieren und dementsprechend für den mitochondrialen Nukleosidtriphosphat-Pool mitverantwortlich sind (Milon et al. 1997).

In Lymphoblasten von PARK6-Patienten und ihren gesunden Geschwistern konnten mittels Transkriptom-Microarrays die mRNAs bestimmt werden, die als Folge der Mutation hoch- oder runterreguliert sind. Das Transkript von NME4 wurde in dieser Testgruppe mit 2,1 fach verminderter Expression entdeckt, und war unter allen alterierten Transkripten das einzige mitochondriale, was die Möglichkeit einer intramitochondrialen Interaktion zwischen PINK1 und NME4 in den Raum stellt (Daten Labor Prof. Auburger). Da NME4 wie PINK1 zu den Kinasen gehört und oft Kaskaden von Kinasen Signal-Amplifikation und -Regulationen ermöglichen, und weil NME4 einen direkten Einfluss auf das mitochondriale Genom, auf seine Replikation und auf mitochondriale Funktionsverluste haben kann, ist auch NME4 als Parkinson-Kandidatengeng glaubwürdig.

Im Gegensatz zu den anderen Proteinen der nm23 Gruppe hat NME4 eine N-terminale Sequenz für den mitochondrialen Transport und wurde in der äußeren und inneren mitochondrialen Membran gefunden (Milon et al. 2000). Auch eine Involvierung in den mitochondrialen Lipidtransfer über die Bindung an Cardiolipin konnte nachgewiesen werden (Epanand et al. 2007). Dies, und die spezifische Bindung an die innere Mitochondrienmembran und die Erhaltung eines Energie-Pools zeigen eine mögliche Rolle bei der Apoptose (Tokarska-Schlattner et al. 2008).

Wie die bisherige Darstellung der Parkinson-Krankheit deutlich macht, gibt es keinen bekannten Umwelt- oder Genrisikofaktor für die idiopathische Form, vergleichbar dem Stellenwert des Apoε4 beim M. Alzheimer. Zu klären ist in diesem Abschnitt der Arbeit, ob ausgewählte SNPs in den Kandidatengen MTIF3 und NME4 überdurchschnittlich gehäuft in der Patientengruppe oder Kontrollgruppe vorkommen. Dies würde das komplette Allel, auf dem sich das Gen befindet als Risikoallel auszeichnen. Die Genotypisierung erfolgt wie in 1.2.6.1. beschrieben mittels Restriktionsverdau.

Die Signalwege, die monogene Parkinsonerkrankungen anbieten, für Assoziationsstudien an sporadischen Patienten zu nutzen, hat auch Nicholas W. Wood vorgeschlagen, als er von den *genetischen Risikofaktoren* des M. Parkinson sprach (Wood 1998).

Bei der Suche nach genetischer Prädisposition für die mehrheitlich idiopathische Form des M. Parkinson wäre eine hier nachgewiesene Allelassoziation ein relevanter Beitrag für die Forschung an dieser neurodegenerativen, progredienten Erkrankung.

2. Materialien und Methoden

Teil A: Materialien

Liste der verwendeten Chemikalien, Geräte und Programme

a) Chemikalien:

Acrylamide/Bis 29:1	Bio-Rad Laboratories - Hercules, CA, USA
Agarose electrophoresis	Invitrogen - Carlsbad, CA, USA
Alconox Powdered Precision Cleaner	Aldrich - Milwaukee, WI, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma - St. Louis, MO, USA
B ig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems - Foster City, CA, USA
Blue Dextran/ EDTA	Applied Biosystems
BSA: Purified BSA 100X	NEB - Ipswich, MA, USA
Borsäure	AppliChem - Darmstadt, D
Bromphenolblau	Sigma
Cresol red, sodium salt	Sigma
d CTP $\alpha^{32}\text{P}$ (3000 Ci/mmol)	Amersham Bioscience - Piscataway, NJ, USA
DMSO (Dimethylsulfat)	Sigma
dNTP Set 100mM PCR Grade	Invitrogen
E DTA	Sigma
Ethanol	JT Baker - Phillipsburg, New Jersey, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth- Karlsruhe, D
F icoll	Sigma
G lycerol	Sigma
I sopropanol	Apotheke der J.-W. Goethe Uni

M arker: Ready-Load 1kb oder 100bp DNA Ladder	Invitrogen
MgCl ₂ .6H ₂ O	Honeywell Riedel-deHaën - Seelze, D
MgCl ₂ Solution 25mM	Applied Biosystems
N aCl	KMF Laborchemie - Lohmar, D
Natriumacetat	Fluka - Buchs, Schweiz
NaOH	Carl Roth
P rimers	Operon Biotech. - Huntsville, AL, USA
Proteinase K (Fungal) 100mg (>20U/mg)	Invitrogen
10X PCR Buffer II	Applied Biosystems
Q iaquick PCR Purification Kit	QIAGEN - Hilden, D
R estriktionsenzyme	NEB - Ipswich, MA, USA
Röntgenfilm: Kodak Bio Max MR Film MR1, Size 35x43	Sigma Aldrich
S accharose	Carl Roth
SDS, Lauryl Sulfate	Sigma Aldrich
Silikon (Imprägniermittel für Gläser)	Carl Roth
T aq DNA Polymerase	Abgene - Epsom, UK / Applied Biosystems
Taq Polymerase Puffer, 10X PCR BufferII	Applied Biosystems
TEMED = N',N',N',N'-Tetramethyldiamin	Sigma
TRIS = Trizma base	Sigma
Triton X-100	AppliChem
U rea	Bio-Rad Laboratories
W hatman Papier	Whatman - Brentford Middlesex, UK
Wasser für die Molekularbiologie	AppliChem

b) Zusammensetzung selbst hergestellter Reagenzien▪ Ladepuffer (Blue): 5 ml

- 1ml TBE (5X)
- 4ml ddH₂O
- 0,8g Ficoll

➤ weniger als eine Messerspitze Bromphenolblau (Achtung: Giftig und sehr farbintensiv!)

▪ NL Puffer: (pH 8)

- 10mM TRIS
- 400mM NaCl
- 2mM EDTA
- 1L ddH₂O

▪ PINK Juice 16ml

- 1,0 ml Cresol (2mM)
- 2,0 ml 10X PCR Puffer II
- 1,2 ml MgCl₂ Lösung (25mM)
- 2,0 ml dNTP (2mM)
- 4,0 ml Saccharose (60%)
- 5,8 ml ddH₂O

➤ 2mM Cresol:

- 404,4mg Cresol + 10ml ddH₂O = 100mM
- 1ml 100mM + 9ml ddH₂O = 10mM
- 1ml 10mM + 4ml ddH₂O = 2mM

➤ dNTPs:

100µl dATP
+ 100µl dCTP
+ 100µl dGTP
+ 100µl dTTP
+ 4,6ml ddH₂O

5ml 2mM dNTPs

➤ Saccharose (60%): 60g Saccharose in 100ml ddH₂O

▪ TBE-Puffer: 5X, (pH 8)

- 270 g TRIS
- 137,5 g Borsäure
- 100 ml EDTA (5mM)
- 5 L ddH₂O

➤ Diesen 5X Puffer verdünnen auf 0,5X, d.h. 1,5l TBE-Puffer auf 13,5l H₂O

▪ TE-Lösung: (pH7,5)

- 10mM TRIS
- 1mM EDTA
- 1L ddH₂O

▪ TL Puffer: (pH 7,5)

- 0,32M Saccharose
- 10mM TRIS
- 5mM MgCl₂.6H₂O
- 1L ddH₂O

➤ 10ml Triton-x100 nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von 80°C hinzugeben

c) Geräte:

ABI Prism 377 DNA Sequenzer Applied Biosystems

Agarose-Gelelektrophoresetrays:

Easy Cast Elektrophoresis Systems Owl Scientific - Portsmouth, NH,
USA

Welabo Düsseldorf, Deutschland Welabo - Düsseldorf, Deutschland

Thermo EC Classic CSS42515 E-C Apparatus CORP

Elektrophoreseapparatur:

Model S2 Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus Life Technologies - MD, USA

Geiger-Müller Zählrohr Umo LB123 Berthold Technologies - Bad
Wildbach, Deutschland

H₂O MilliQ Water Purification System Millipore - Billerica, MA, USA

PCR Maschine: Gene Amp PCR System 2700 Applied Biosystems

Spannungsgeber

Biometra Power Pack P25 Biometra - Göttingen, D

Elektrophoresis Power Supply PS9009 Gibco BRL - Gaithersburg, MD,
USA

Tischzentrifuge Centrifuge 5415D Eppendorf - Hamburg, D

Tischzentrifuge Megafuge 1.0R Heraeus Instr. - Düsseldorf, D

UV Kamera: Image Master VDS Pharmacia Biotech - San
Francisco, CA, USA

Vakuumpumpe KNF Neuberger - Freiburg, D

Vakuumentrockner Fröbel Labortechnik – Lindau, D

d) ComputerprogrammeSequenzierung:

ABI PRISM 377 für Macintosh von Applied Biosystems

DNASTAR für Microsoft Windows (DNASTAR - Madison, WI, USA)
inklusive SeqMan, MapDraw, EditSeq, MegAlign, PrimerSelect

Statistikprogramme:

SNP Single Locus Analyse mit HW (Tim Becker, Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie, Universität Bonn)

Bias für Windows (Hanns Ackermann, Institut für Biomathematik, Universitätsklinik Frankfurt/Main)

e) InternetadressenGeninformationen:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>

Genominformationen:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=genome>

Literaturrecherche:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

<http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/fl.phtml?bibid=UBFM>

Primerdesign:

<http://frodo.wi.mit.edu>

SNP:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp>

Spidey:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey>

Teil B: Methoden

2.1. PCR-Sequenzierung von vier Kandidatengenem auf Chromosom 18p11 in einer Familie mit fokaler Torsionsdystonie (DYT7)

2.1.1. Patientenbeschreibung

Die hier untersuchte Familie K leidet an autosomal dominanter Vererbung der fokalen Torsionsdystonie mit dem Hauptsymptom des Torticollis spasmodicus. In dieser aus dem Emsland stammenden Familie finden sich sieben definitiv betroffene und fünf wahrscheinlich betroffene Mitglieder. Die Erkrankung zeigt reduzierte Penetranz (zwischen 42 und 84%). Alle definitiv erkrankten Patienten zeigen den bereits beschriebenen Symptomenkomplex der fokalen Torsionsdystonie mit Manifestation zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr. Zusätzliche Symptome sind bei den Patienten Kopftremor, das Meige-Syndrom, dystone Dysphonie, Handgelenkstremor und Schreibkrampf.

Als Patientenmaterial wurde DNA von zwei definitiv betroffenen Familienmitgliedern (Patienten II3 und III24) und von den gesunden Ehepartnern (Kontrollen II4 und III25) dieser Patienten verwendet. Die Auswahl dieser Kontrollen erfolgte mit der Absicht genetisch ähnliche Personen aus dem gleichen Abstammungsgebiet, die dennoch nicht verwandt sind, mit den Patienten zu vergleichen. Weitere 96 gesunde Blutbankkontrollen wurden zudem herangezogen, um die bei der Sequenzierung gefundenen Polymorphismen zu verifizieren.

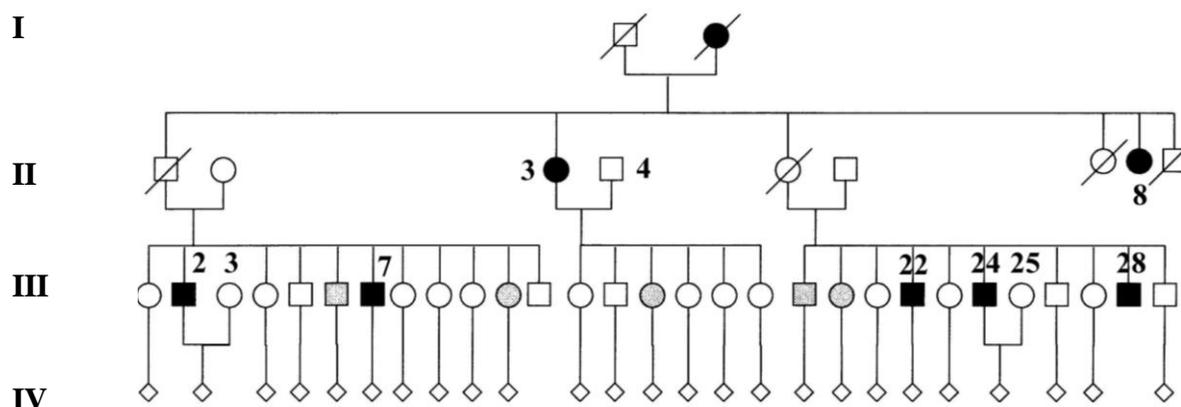


Abb. 2.1. Stammbaum der Familie K mit autosomal dominanter fokaler Torsionsdystonie: Runde Symbole stehen für weibliche Personen, die Quadrate für männliche Personen. Der Stammbaum zeigt die definitiv betroffenen Familienmitglieder mit schwarz ausgefüllten Symbolen. Graue Symbole bezeichnen die wahrscheinlich betroffenen Mitglieder. In der dritten Generation sind die Ehepartner nicht dargestellt (Ausnahme: Ehepartner, die hier genetisch untersucht wurden). Die Kinder (vierte Generation) sind nur durch Rauten symbolisiert. Ein Symbol kann auch für mehrere Kinder stehen. Die mit den Zahlen markierten Personen wurden in dieser Studie genetisch untersucht.

2.1.2. Die Methode der Sequenzierung

Mit der PCR-Sequenzierung ist es möglich Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen eines oder mehrerer Basenpaare zu finden. Zunächst werden die Exons der verschiedenen Gene einzeln mittels einer PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert, sodann aufgereinigt und anschließend mit einer Sequenzier-PCR sequenziert. Durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird jede Probe in einem Gel aufgetrennt. Ein Laser detektiert das dabei abgestrahlte Fluoreszenzlicht und liefert die entsprechenden Elektropherogramme. Näheres zur Methode findet sich im Abschnitt 1.1.5. und 2.1.9. In diesem Versuchsteil wurden die Kandidatengene in zwei Patienten und in zwei Kontrollen aus der selben geografischen Region sequenziert. Dies hat den Sinn Unterschiede in den Elektropherogrammen, die eventuell aufgrund anderer Abstammung entstanden sind, auszuschließen. Da es sich in dieser Familie um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung handelt, wird nach heterozygoten Unterschieden in den Sequenzanalysen gesucht, die ausschließlich bei den Patienten vorhanden sein dürfen. Die Punktmutation, Basendeletion oder -insertion muss zu einem Aminosäureaustausch in der kodierenden Sequenz führen. Abb. 2.2. soll einen Überblick der einzelnen methodischen Vorarbeiten für eine Sequenzierung liefern.

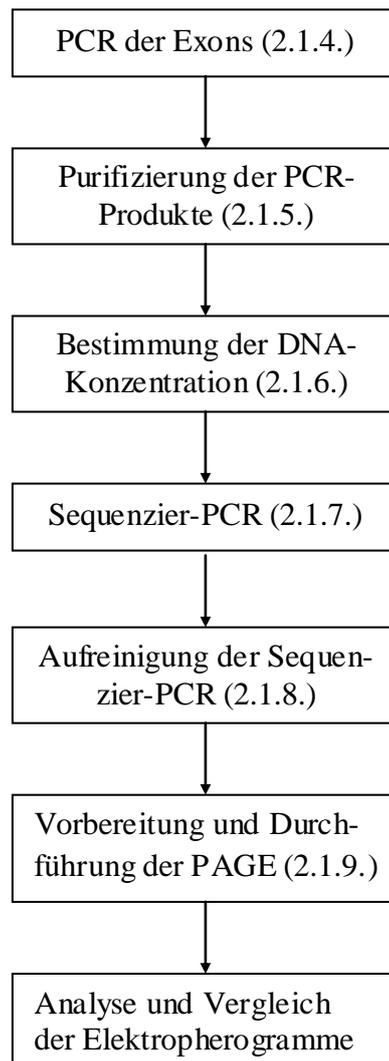


Abb. 2.2. Das Schaubild zeigt die einzelnen Schritte der Sequenzanalyse: In Klammern ist auf die jeweiligen Kapitel, in denen diese Methode beschrieben wird, verwiesen.

2.1.3. Beschreibung der Kandidatengene

Es sei an dieser Stelle nochmals auf die Gründe für die Auswahl der Kandidatengene im Kapitel 1.1.5. verwiesen. Im folgenden soll klar werden, wie die Exon-Intron Verteilung der Gene ist, wie groß die zu sequenzierenden Exons sind und welche Primer für die Sequenzierung verwendet wurden.

Tab. 2.1. Übersicht der Kandidatengene: Hier werden für die vier Kandidatengene die Anzahl der Exons, die zu sequenzierenden Nukleotide (Größe der mRNA) und die Lokalisation des jeweiligen Gens in der Kandidatenregion gezeigt.

<i>Kandidatengene</i>	<i>Anzahl der Exons</i>	<i>Anzahl der zu sequenzierenden Nukleotide</i>	<i>Lokalisation</i>
ZFP161	2	1351	18pter-11.2
LOC390828	5	1071	18p11.31
NDUFV2	8	827	18p11.31-p11.2
PTPRM	22	5053	18p11.2

2.1.3.1. ZFP161

Das Gen ZFP161 besteht aus zwei Exons, die eine Region von circa 3934bp überspannen. Davon werden 2896 Nucleotide in mRNA transkribiert, aber nur 1347 in die Aminosäuresequenz translatiert. Das erste Exon besteht ausschließlich aus dem Startcodon ATG, das für die Aminosäure Methionin kodiert. Da das zweite Exon über 1300 Basenpaare enthält, ist eine Sequenzierung nur mit sich überschneidenden Sequenzstücken durchführbar. Abb. 2.3. soll dies veranschaulichen. In Tab. 2.2. sind die Primer und ihre Position in Exon eins und zwei vermerkt.

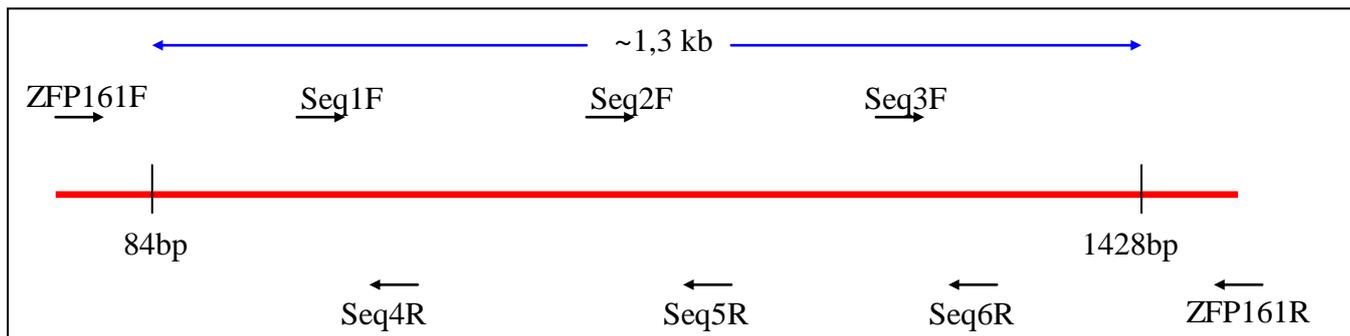


Abb. 2.3. Zweites Exon des Gens ZFP161 und relative Positionen der Primer: Das Exon wurde mit den Primern ZFP161F und R amplifiziert und mit allen in der Abbildung eingezeichneten Primern sequenziert. Die Sequenzierung liefert somit einzelne Sequenzen, die sich überschneiden und das komplette Exon abdecken. Das Exon beginnt an der Position 84bp und endet an Position 1428bp.

Tab. 2.2. Nukleotidabfolge und Position der einzelnen Primer für Exon eins und zwei: Die Primer für die Sequenzierung in Vorwärtsrichtung sind mit F, die für die Rückrichtung sind mit R gekennzeichnet. Tm gibt die *Annealing*temperatur für die PCR an. Sie ist primerspezifisch, s.u. Abschnitt 2.1.4.

<i>Name</i>	<i>Primer 5'→3'</i>	<i>Position</i>	<i>Tm [°C]</i>
ZFPex1F	CTCTGTAGGTCTGGCGTGCT	-	60
ZFPex1R	TTCATGCACAATCAGAATTGG	-	60
ZFP161F	TTGACCAGGAAATGAAAATGTGAC	1 – 24	62
ZFPseq1F	GCTTGAGGTTGATAGTCTT	270 – 289	-
ZFPseq2F	CCCACCACAACGCTCAGG	640 – 657	-
ZFPseq3F	GGCCACCTGAAAGAACC	1200 – 1039	-
ZFPseq4R	GTTCAGGACCTCTTCAAATA	342 – 323	-
ZFPseq5R	GCCGTAGCAATTGACCTTCC	720 – 701	-

ZFPseq6R	CTGGGGCACGGATAAATGAT	1108 – 1089	-
ZFP161R	GGCAAAGTGTCCCTGTCCC	1457 – 1439	62

Da der Primer ZFP161F für die Sequenzierung nicht geeignet war, war für diesen Abschnitt des Gens ein neuer Primer nötig: 5´ TGAAAATGTGACTGTGTTCTCTCATA 3´. Dieser Primer ZFP161Fneu überschneidet sich mit dem Ende des ersten Primers. Möglicherweise war dies der Grund, warum der neue Primer auch nicht funktionierte. Als Lösung dieses Problems stand nur die Möglichkeit offen, eine komplett neue PCR durchzuführen und den ersten Primer (ZFP161F) als Sequenzier-Primer zu verwenden. Die zwei neuen PCR-Primer waren folgende (Tm: 62°C):

ZFP161Fneu2 : 5´TGGGATCAGTCTTTTCTACCC 3´

ZFP161Rneu2 : 5´GGTGTGCCTTCTACTGTGTCA 3´

Daraus ergab sich ein neues Template mit einer Länge von circa 700 Basenpaaren. Auch mit diesem PCR-Produkt als neues Template ergab sich keine erfolgreiche Sequenzierung trotz der Verwendung aller möglicher Sequenzier-Primer (d.h. ZFP161F, ZFP161Fneu und ZFP161Fneu2). Als Konsequenz wurde noch ein dritter neuer Primer bestellt (5´GGTTCATAGATTGAC 3´ ZFP161Fneu3). Auch dieser führte nicht zum Erhalt der Anfangssequenz. Grund dieser Misserfolge war höchstwahrscheinlich die Poly-T-Struktur vor Beginn der exonischen Sequenz, die es der Taq-Polymerase nicht ermöglichte die Sequenzierung nach dem Poly-T-Abschnitt fortzuführen. Die Lösung dessen war die selbstständige Konstruktion eines Primers, der sich der Poly-T-Struktur anschließt, jedoch einen Teil der exonischen Sequenz beinhaltet. Bei der Sequenzierung fehlen folglich die ersten Basenpaare des zweiten Exons in der Vorwärtsrichtung. Damit fehlt nicht die komplette Sequenz zwischen ZFP161F und ZFPseq1F, sondern nur noch die ersten 30 bis 40 Basenpaare.

2.1.3.2. LOC390828

Das Gen LOC390828 besteht aus fünf Exons und überspannt 40kb. Die acht Exons kodieren für eine mRNA mit einer Länge von 1071 Nukleotiden. Hierbei wurde für jedes Exon eine eigene PCR gemacht und dieses Template dann vor- und rückwärts sequenziert. Die Tab. 2.3. gibt alle wichtigen Informationen für dieses Gen.

Tab. 2.3. Daten zu LOC390828: Hingewiesen sei auf das große Template des ersten Exons. Hier wurde die PCR mit dem ex1F und dem ex2R Primer durchgeführt, da die PCR bessere Resultate lieferte als mit dem Primerpaar ex1F und ex1R.

Name	Primer 5'→3'	Größe des Templates	Größe des Exons	T _m [°C]
LOCex1F	CTGACCTCAGGCAATCCA	921 bp	81 bp	60
LOCex1R	CTACGTGTTGAAGGCTGCAC			
LOCex2F	CCTGGAATCCTTCCCTAATTG	493 bp	322 bp	55
LOCex2R	TCCCCACTAGGCTGAGACTG			
LOCex3F	ACGTCCCTGTGTCTGTTTCC	221 bp	138 bp	55
LOCex3R	CATAGTGC AAATTCACAGAATGC			
LOCex4F	CTTCTAGGC GCCTTCTCCTC	390 bp	241 bp	62
LOCex4R	CCTACTAAGCGCTGCACACA			
LOCex5F	GCAGTGAAATTCCACCATTTG	395 bp	289 bp	60
LOCex5R	AGGGTGGTGGCAGCAGAT			

2.1.3.3. NDUFV2

Das Gen NDUFV2 mit acht Exons kodiert für 31611 Nukleotide, von denen nur 827 in mRNA transkribiert werden. Tab. 2.4. zeigt alle Informationen zu diesem Gen.

Tab. 2.4. Hier sind alle acht Exons des Gens NDUFV2 charakterisiert: Die PCR für Exon drei und vier wurde mit dem Primerpaar Nex3F und Nex4R durchgeführt.

Name	Primer 5'→3'	Größe des Templates	Größe des Exons	T _m [°C]
Nex1F	GAAGTCTCCGCCACAGG	388 bp	72 bp	60
Nex1R	GGCTAAGGCCGACAGTGTC			
Nex2F	TTCCATTGTTGTAAATTATGAATCC	289 bp	66 bp	60
Nex2R	ATGTAAATTCTCACGATGACCA			
Nex3F	CATGTTGGAATTAATGGAGAGA	500 bp	63 bp	62
Nex3R	TGCTTTATGGCCTTCTGGAT		117 bp	
Nex4F	CTCCATTTGATTCACACCAGA	396 bp	169 bp	56
Nex4R	GCTAAAGGGCTCCAAAATCC			
Nex5F	TTCTGCTCTTGAAGA ACTTTTCTG	342 bp	110bp	56
Nex5R	AAGATGGCAGAAGTTGGAAA			
Nex6F	GCGCCTGGCCTCTTTTTA	280 bp	77 bp	60
Nex6R	TTCAGAAACCAACATCTAAGGACA			
Nex7F	TGGGCAACATAGTGAGACCTT	497 bp	153 bp	58
Nex7R	CCAAAGCTCCTACCAATTC			
Nex8F	GGGCTCTTGTGAGGTAACCA			
Nex8R	GGCTAAAGATGGAAAGCAA			

Aufgrund der nicht erfolgreichen Sequenzierung des ersten Exons musste ein neues Primerpaar ausgewählt werden (T_m: 60°C):

Nex1Fneu: 5' CCCTCGCTCCCTCCCGTCAG 3'

Nex1Rneu: 5' CTCCTGCGCCCAAACTA 3'

Auch die Sequenzierung des sechsten Exons in Rückrichtung bereitete Schwierigkeiten, sodass ein neuer Primer ausgewählt werden musste:

Nex6Rneu: 5' TTAAACCAAATGACTAT 3'

2.1.3.4. PTPRM

Das Gen PTPRM kodiert auf circa 840kb für 22 Exons, die sich insgesamt zu einer mRNA mit der Länge von 5053bp zusammensetzen. Für weitere Informationen sei auf Tab. 2.5. verwiesen.

Tab. 2. 5. Informationen für die Sequenzierung des Gens PTPRM: Das Exon 22 wird aufgrund seiner Größe von zwei zusätzlichen Primern sequenziert.

Name	Primer 5'→3'	Größe des Templates	Größe des Exons	T _m [°C]
Pex1F Pex1R	GGGTAGCCAATTGGGAGTGT GCAACATCCTTACCTAAAATAACACA	280 bp	14 bp	60
Pex2F Pex2R	GCTCTAGGTCTCCTCAAGAAAA GGACTATAGAGGCATTTGACAGA	250 bp	9 bp	60
Pex3F Pex3R	CATAGGGCTATGATTGCTTTCC TACCCTCAAAGCCCAGAATG	250 bp	11 bp	60
Pex4F Pex4R	GCAGCGTGTGAGGTCTGTG TCACTCTGCATTTCTCTCTGCT	247 bp	9 bp	60
Pex5F Pex5R	GGCACTTGATACAACTTAGACTTGA TGAAACCAACCCCCACAG	250 bp	17 bp	60
Pex6F Pex6R	AGCCTGGCAGAGTGCTTG TGGCACAAAGGATCACTGAA	467 bp	153 bp	60
Pex7F Pex7R	TGACGAAAGGTTGCTTGTCTT CGTAAGCAGGTCAATGCAGA	494 bp	75 bp	60
Pex8F Pex8R	TCGTTTGGACTGCTTTGTAA CCCCAGAATACTGAGGGACA	567 bp	188 bp	56
Pex9F Pex9R	TCTCATTTCTGTCGGCATTCT TGATGAAGTGGGGGTAGACAG	392 bp	88 bp	60
Pex10F Pex10R	AGCAGAGTGTCTGTGGGTGA TGAGCCCAATGTATGTCCAA	376bp	77 bp	60
Pex11F Pex11R	TGCACATTCCTTTCAGCAA GAACCGCAATAAATGTGCAA	237bp	37 bp	60
Pex12F Pex12R	GGGAACTGCATGTGGGTATT AATAGTTCAAAGCTTGCCTCA	290bp	98 bp	60
Pex13F Pex13R	CATGGGAGGAACTCCAAAA CCACTAGTGTCTGACCATAGCTT	225bp	117 bp	60
Pex14F Pex14R	TCCCTGCTTATTTGTGGTTTG ACTCATCATCCCCAAAGGTG	297bp	155 bp	60
Pex15F Pex15R	GCAGTGTGGTCTTCTTCCT AAATGGGGAGATGCAGGAG	249bp	136 bp	60

Pex16F	TCTTTCCTCCTTCTCTGGTTCTC	250bp	150 bp	60
Pex16R	GAGCAAGTCACCGTGCAGT			
Pex17F	CCAAGGCTTCTTGTCCTCAT	289bp	174 bp	60
Pex17R	GAAGAGCCCAAGCCTGTTCTG			
Pex18F	TCTTCTCTTCCCATTTTCCTGA	228bp	132 bp	60
Pex18R	CCCCTGGCACTAGTTCTGAC			
Pex19F	TGAGTGTCAATACTAACCTTATCCAAA	249bp	126 bp	60
Pex19R	GAAACCATAATCACAGGCATGA			
Pex20F	TTTCTTCCACTCCCCGATT	243bp	164 bp	60
Pex20R	CCTCGCTGTTCTGAAATGAAG			
Pex21F	CCACAGGTGTTTGCAAGATG	248bp	136 bp	60
Pex21R	GCTAATGGGGTGTCATG			
Pex22F	TCAAATCCTCCCAGATTGATG	964bp	748 bp	60
Pex22Fi	CCACCGGCTTCCTAGAGC			
Pex22R	TGCTCACGGGTCATCATTTA			
Pex22Ri	CCACAAAATAATACCCAAAGG			

Beim Sequenzieren ergab sich in Exon 22 in Rückwärtsrichtung in der Mitte eine Lücke, deren Sequenz erst durch einen neuen Primer (Pex22R782neu 5'→3': GGTCGGTGAATCTGATCGTT) geschlossen wurde.

2.1.4. PCR zur Amplifikation der Exons

Die PCR dient der selektiven Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts. In diesem Abschnitt müssen die Enden bekannt sein, um spezielle Oligonukleotide (Primer) zu synthetisieren, die sich an die Ziel-DNA anlegen und somit Beginn und Ende flankieren. Die Taq-Polymerase aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* dient der Amplifizierung der Ziel-DNA. Die Thermostabilität ist wichtig, da vor jedem Amplifizierungsschritt die Doppelstrang-DNA bei 94°C in Einzelstränge denaturiert wird, damit sich die Primer und die Taq-Polymerase anlagern können, um den komplementären Strang zu synthetisieren. Mit einem Zyklus können aus einem DNA-Strang zwei Tochterstränge entstehen. Diese beiden Tochterstränge stehen nun für die nächste Amplifizierung zur Verfügung. Weil Primer, die vier verschiedenen Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und die hitzestabile Taq-Polymerase in genügender Menge zur Verfügung stehen, können innerhalb von 30 bis 35 Amplifizierungszyklen mit exponentieller Vermehrung Millionen von Ziel-DNA Molekülen entstehen.

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte einer PCR im GeneAmp PCRSystem 2700 von Applied Biosystems mit Zeit- und Temperaturangabe aufgelistet.

- | | | | |
|---|------------------|----------------------------|-------------|
| - | Denaturierung | 3min bei 94°C | |
| - | Denaturierung | 1min bei 94°C | } 35 Zyklen |
| - | <i>Annealing</i> | 1min bei T _m °C | |
| - | Extension | 2min bei 72°C | |
| - | Extension | 7min bei 72°C | |
| - | Aufbewahrung | bei 4°C | |

Die oben genannte *Annealing*temperatur ist für jeden Primer abhängig vom Verhältnis der Nukleotide individuell mittels der unten stehenden Gleichung zu berechnen.

$$[(A)_n+(T)_n] * 2^\circ\text{C} + [(C)_n+(G)_n] * 4^\circ\text{C} \approx T_m[^\circ\text{C}]$$

Da für die Sequenzierung DNA-Mengen von 50-100ng/μl nötig sind, und ein gewisser Template-Pool gebraucht wird, um im Zweifelsfall mehrere Male zu sequenzieren, wird pro Person und pro Exon die ca. achtzehnfache Menge an Materialien verwendet.

▪ *Materialien*

- | | | |
|---|------------------------------------|-------|
| - | 0,8 μl DNA | } 18X |
| - | 16,0 μl <i>Pink Juice</i> (s.S.54) | |
| - | 1,0 μl Primer F (5pmol/μl) | |
| - | 1,0 μl Primer R (5pmol/μl) | |
| - | 1,1 μl ddH ₂ O | |
| - | 0,1 μl Taq-Polymerase (5 U/μl) | |

20,0 μl Reaktionsansatz pro Tube

▪ *Durchführung*

Entsprechend der primerspezifischen *Annealing*temperatur werden die Proben amplifiziert, gepoolt und ihre DNA-Menge bestimmt. Dabei beläuft sich die Menge von ca. 18 PCRs bedingt durch Kondensationsprozesse auf ungefähr 270-300μl.

2.1.5. Extraktion der PCR-Produkte

Die Befreiung des amplifizierten Templates von allen ungepaarten Nukleotiden oder Primern etc. kann durch zwei Methoden erfolgen. Sollte die PCR bei Auftragen auf ein Agarosegel nur die Bande spezifischer Größe zeigen, so kann die DNA-Extraktion direkt aus den gepoolten PCR-Produkten erfolgen. Zeigen sich jedoch viele unspezifische Banden, die auch nach Optimierung der PCR durch Veränderung der Materialmengen oder der *Annealing*temperatur

nicht verschwinden, so muss das Template aus dem Gel isoliert werden. Für beide Methoden wurde das QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN®) verwendet.

2.1.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte müssen zur Darstellung auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Da sich durch die PCR verschieden lange Produkte ergeben und diese entsprechend ihrer Länge eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit haben, bedarf es einer Variation in der Menge der Agarose. Gele mit hochprozentigem Agaroseanteil (bis zu 2%) vermögen DNA-Fragmente gut zu trennen, die nur einige hundert Basenpaare aufweisen. Zur Differenzierung von Fragmenten mit einer Länge von 1,1 und 1,2 kb bedarf es eines Gels mit nur niedrigem Agaroseanteil (circa 0,7-0,8%).

Das Gelelektrophorese-*Tray* wird zur Volumenbestimmung ausgemessen und ein entsprechender Kamm ausgewählt.

- Materialien

- 50ml TBE-Puffer 0,5X (entspricht dem ausgemessenen Volumen in cm^3)
- 1g Agarose (für ein Gel mit 2% Agaroseanteil)
- 0,5 μl Ethidiumbromid (10mg/ μl)

- Durchführung:

- Das abgewogene Agarosepulver wird mit dem TBE-Puffer erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Verdampfendes Volumen muss zur Erhaltung der Konzentration mit Wasser ersetzt werden, um danach die entsprechende Menge Ethidiumbromid hinzuzufügen (1 μl /100ml).
- Während des kompletten Arbeitsvorgangs ist das Tragen von Nitrilhandschuhen wegen der kanzerogenen Wirkung von Ethidiumbromid empfohlen.
- Nach dem Eingießen des Gels in das *Tray* kann das Gel für eine Elektrophorese bei 100V erst dann verwendet werden, wenn es fest und abgekühlt ist.
- Ein parallel zu den Proben laufender Marker hilft bei der Zuordnung der Fragmentlängen. Um die Fragmente auf dem Gel sichtbar zu machen, wird UV-Licht verwendet. Anschließend kann ein Photo aufgenommen werden.

2.1.5.2. Extraktion direkt aus der PCR

- Materialien: Alle Materialien sind im QIAquick PCR Purification Kit enthalten.
- Durchführung:
 - Das fünffache Volumen des PB Puffers wird zum PCR-Produkt hinzugegeben und gut gemischt. (z.B. 1450 µl PB Puffer zu 290 µl PCR).
 - Die Probe wird auf die QIAquick Säule gegeben und eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und abgekippt.
 - Sollte mehr als 800 µl an Probe vorliegen, kann der Zentrifugationsschritt in der selben Säule weitere Male durchgeführt werden.
 - Um die Säule zu waschen, werden 0,75 ml PE Puffer auf die Säule gegeben und erneut eine Minute zentrifugiert.
 - Da der PE Puffer Ethanol enthält, sollte die Säule ein weiteres Mal zentrifugiert werden, um alle Ethanolreste zu entfernen.
 - Die Säule wird in ein sauberes Röhrchen gestellt und mit 30-50 µl des EB Puffers beladen.
 - Nach einer Minute Inkubation wird für eine weitere Minute zentrifugiert.
 - Die purifizierte DNA steht nun für weitere Experimente zur Verfügung oder kann bei -20°C gelagert werden.

2.1.5.3. DNA Extraktion aus einem Agarosegel

- Die Extraktion aus dem Agarosegel ermöglicht das Aussuchen der spezifischen Bande unter dem UV-Licht. Hier sei Vorsicht geboten. Zum einen ist das UV-Licht für den, der damit arbeitet äußerst gefährlich, zum anderen kann DNA durch UV-Licht fragmentiert werden.
- Bei der Agarose-Gelelektrophorese ist *low-melting* Agarose zu verwenden, die schon bei Temperaturen um 55°C schmilzt.
- Materialien: Alle Materialien sind im QIAquick® PCR Purification Kit enthalten.
- Durchführung:
 - Das Agarosegel wird wie üblich (s.2.1.5.1.) mit *low-melting* Agarose hergestellt. Der Kamm sollte dabei aber so abgeklebt werden, dass eine große Kammer entsteht, in die die gesamte gepoolte Menge der PCR pipettiert wird.
 - Die gewünschte Bande wird nach der Elektrophorese mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten.
 - Der Gelblock wird abgewogen und mit dem dreifachen Volumen an QG Puffer in einem Tube bei 50°C unter Schütteln aufgelöst.

- Bei Gewichten über 400mg muss der Gelblock aufgeteilt werden, um die Kapazität der Säulen nicht zu überlasten.
- Um DNA Fragmente von unter 500bp und über 4 kb zu entfernen, wird zu dem Gemisch noch das einfache Volumen des Gels an Isopropanol hinzugegeben, gut gemischt und auf eine Säule gegeben. Ein erneuter Zentrifugationsschritt von einer Minute folgt.
- Als nächstes wird 0,5ml QG Puffer auf die Säule geladen und nach einer Inkubationszeit von zwei bis fünf Minuten zentrifugiert.
- Wie unter 2.1.5.2. erwähnt, werden 0,75ml des PE Puffers auf die Säulen gegeben. Ab hier wird mit dem gleichen Verfahren wie oben beschrieben isoliert.

2.1.6. Bestimmung der DNA-Konzentration durch Gelelektrophorese

Die Sequenzierung schreibt genaue Kenntnis der DNA-Menge in einer Probe vor. Gleichzeitig kann die Menge an Template entscheidend über Erfolg und Misserfolg einer Sequenzierung sein. Zwar ist eine Konzentrationsbestimmung mit einem Spektrophotometer möglich, doch ist dieses Gerät bei kleinen Konzentrationen um 50ng/μl sehr ungenau. Besser ist demnach die visuelle Konzentrationsbestimmung durch Vergleich der Bandenintensität von Probe und Marker.

2.1.6.1. Materialien

- Zur Konzentrationsbestimmung werden 0,5 bis 2μl des purifizierten PCR-Produkts wie folglich verdünnt:
 - 12 μl ddH₂O
 - 3 μl Blue Ladepuffer
 - 0,5 – 2 μl DNA

2.1.6.2. Durchführung

- Die DNA wird in zwei Verdünnungsschritten aufgetragen (z.B. 1 und 2μl). Zusätzlich werden je 1-5μl an 100bp und 1kb Marker verwendet. Dies geschieht in 1μl Schritten. Bei 3μl des Markers entspricht die dickste Bande 30ng DNA, bei 5μl entspricht die dickste Bande 50ng DNA. Durch den Vergleich der Bandenintensität ist somit eine Konzentrationsbestimmung in der geladenen Probe möglich.

2.1.7. Sequenzier-PCR mit Big Dye®

Bei der Sequenzier-PCR handelt es sich um eine Abwandlung der Sanger-Coulson Methode (s. 1.1.5.). Idealerweise befindet sich in der DNA nur das Template, das sequenziert werden muss. Das Prinzip der Sequenzierung ist ein gewollter Kettenabbruch durch **Dideoxynukleotide**, die es der Taq-Polymerase nicht mehr erlauben den DNA-Strang am 3' Ende zu verlängern, da den Dideoxynukleotiden eine Hydroxylgruppe fehlt. Es gibt im Sequenzier-Ansatz alle vier Basen als Nukleotide und als Dideoxynukleotide. Die vier verschiedenen Dideoxynukleotide sind mit jeweils einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Wenn die Taq-Polymerase während des PCR-Zyklus den denaturierten Strang komplementär verlängert, so tut sie das nur so lange, bis sie ein Dideoxynukleotid einbaut. Durch das richtige Mengenverhältnis gibt es theoretisch an jeder Stelle irgendwann einen Kettenabbruch und somit eine Mischung an verschiedenen langen DNA-Strängen, die alle mit einem der vier Dideoxynukleotiden enden.

Auf dem Gel liest der Laser im Sequenzierapparat durch das Fluoreszenzsignal, mit welcher Base der jeweilige Strang endet. Die richtige Reihenfolge ergibt sich durch die Tatsache, dass kurze Stränge im Gel schneller laufen. So erstellt das Sequenziergerät ein Elektropherogramm und zeigt die Base die an einer Position gelesen wurde als *peak*. Die Auswertung erfolgt durch den Vergleich der Kontroll- und Patientenprobe.

2.1.7.1. Materialien

- Für einen Sequenzier-Ansatz werden verwendet:

- 8 µl Big Dye®
- 1 µl *Forward* oder *Reverse* Primer (3,2pmol/µl)
- x µl DNA (je nach erforderter Menge 10-100ng/µl)
- 20-(8+1+x) µl ddH₂O

20 µl

- Die tatsächlich verwendete Menge der DNA richtete sich nach der vorher bestimmten Konzentration. Mit der Fragmentlänge steigt auch die zu verwendende DNA-Menge. Durchschnittlich soll eine Menge von circa 50-60ng pro Reaktionsansatz verwendet werden

2.1.7.2. Durchführung

- Im PCR-Gerät werden folgende Werte eingestellt:

- 96°C	10s	} 25 x
- 50°C	5s	
- 60°C	4min	

- danach bei -20°C gelagert, wenn es nicht gleich isoliert wird (s. 2.1.8.)

2.1.8. Aufreinigung der Sequenzier-PCR

Nach der Sequenzier-PCR erfolgt ein weiterer Aufreinigungsschritt, um die Probe von allen ungebundenen Zusätzen zu befreien und maximal zu konzentrieren.

2.1.8.1. Materialien

- Zuerst wird ein Mix angesetzt:
 - 3,0 µl Natriumacetat (pH 4,5)
 - 62,5 µl Ethanol (95%)
 - 14,5 µl ddH₂O

80,0 µl Endvolumen für eine Probe

2.1.8.2. Durchführung

- Zu den 20µl einer Sequenzier-Probe werden 80µl des Mix pipettiert und gut gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Bei 14.000rpm werden die Proben, mit dem Gelenk nach außen, 20 min zentrifugiert.
- Unter größter Vorsicht wird der Überstand abpipettiert.
- Es werden 250µl Ethanol (70%) hinzugefügt und für zehn Minuten zentrifugiert.
- Das Ethanol wird danach schnell abpipettiert.
- Es wird ein weiteres Mal für ca. 3,5 min zentrifugiert, um Ethanol vollständig entfernen zu können.
- Danach werden die Proben für 20 bis 60 Minuten an der Luft getrocknet.
- 3µl eines blauen EDTA/Formamid Puffers werden hinzugegeben und bei 92°C für zwei Minuten in einem Heizblock denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

2.1.9. Vorbereitung und Durchführung der Sequenzierung

Zur Sequenzierung wird der ABI Prism 377 (Applied Biosystems) verwendet. Vor dem ersten Gebrauch und nach mehrmaliger Benutzung sind die zum Gerät gehörenden Glasplatten über Nacht in ein 2M NaOH Bad zu legen. Es ist wichtig, nach jeder Benutzung die Platten gründlich mit Wasser und dem Reinigungsdetergens Alconox zu spülen. Die beiden Glasplatten sind dann gebrauchsfertig.

Dennoch sollten zur Vorbereitung einer Sequenzierung die sauberen Platten kurz vor Gebrauch nochmals mit destilliertem Wasser abgespült und an der Luft getrocknet werden. In der Zeit kann die Vorbereitung des Gels, das zwischen die Platten gespritzt wird, stattfinden.

2.1.9.1. Materialien

- Für das Gel werden benötigt:
 - 10,5 g Harnstoff
 - 6,0 ml TBE (5X)
 - 7,0 ml ddH₂O
 - 4,2 ml Bis-/Polyacrylamid 29:1(Achtung: Giftig!)
- Auf einem Magnetrührer wird alles für eine halbe Stunde gemischt und mit Aluminiumfolie abgedeckt.
- Kurz vor dem Einspritzen des Gels in das Sandwich aus den Glasplatten (siehe unten) werden 150µl Amoniumpersulfat (APS) und 10µl TEMED hinzugegeben und gut gemischt. Erst durch die Zugabe der zwei letzten Komponenten beginnt die Polymerisation des Gels. Deswegen muss zügig gearbeitet werden.

2.1.9.2. Durchführung

- Die trocknen Platten werden mit Whatman-Tüchern gereinigt. Die Platten müssen staubfrei sein.
- Sie werden mit der nach innen gewandten Seite, nur durch zwei Spacer voneinander getrennt, aufeinander gelegt und mit Klammern fixiert.
- Wie unter 2.1.9.1. beschrieben, wird der fertige Gelansatz mit einer 50ml Spritze über einen Membranfilter zwischen die Platten gespritzt. Dabei sollten sich keine Luftblasen bilden.
- Der Kamm wird mit der Rückseite an der oberen (kurzen) Seite des Plattensandwichs zwischen die Glasplatten geschoben. Die andere kurze Seite muss mit Klarsichtfolie abgedeckt werden, um das Trocknen zu beschleunigen.

- Das Gel polymerisiert in zwei Stunden.
- Die Platten werden danach mit dem gleichen Verfahren wie bereits erwähnt auch von außen gründlich gereinigt, auf einen Rahmen gespannt und mit den Pufferreservoirs und der Heizplatte in das Gerät eingesetzt.
- Über den Apple Mac Computer wird der Modus „Sequence Run“ aufgerufen und mit dem „Plate Check“ die Sauberkeit überprüft.
- 1,5 l 1X TBE werden in die Pufferreservoirs gegeben. Nachdem der obere Rand der Platten gespült ist, können 60 µl des EDTA/Formamid Puffers aufgetragen werden, um den Kamm vorsichtig ins Gel zu schieben.
- Der 20-minütige „Pre Run“ sorgt für eine gleichmäßige Ionenverteilung.
- Danach werden zwischen die Zähne des Kamms ca. 3 µl jeder Probe geladen.
- Unter „Sequence Run“ wird die siebenstündige Sequenzierung gestartet.

- Nach Beendigung der Sequenzierung wird jeder Probe eine Linie auf dem Gelbild zugeordnet und in ein Elektropherogramm übersetzt. Die Auswertung erfolgt unter vergleichender Betrachtung der Elektropherogramme.

2.1.10. Restriktionsverdau

Um eine in den Elektropherogrammen gefundene Mutation zu bestätigen, wird ein Restriktionsverdau durchgeführt.

Stellt sich in einer Person ein putativer heterozygoter Basenaustausch dar, wird dieser mittels Restriktionsverdau in insgesamt sieben Patienten aus der Familie und drei Kontrollen (gesunde Ehepartner), ebenso in weiteren 96 Kontrollen nachgewiesen. Anhand der damit erfolgten Genotypisierung wird über die Pathogenität des Polymorphismus entschieden.

Restriktionsenzyme, die aus Bakterien gewonnen werden, schneiden sequenzspezifisch fremde DNA. Die Erkennungssequenzen, an denen die DNA geschnitten wird, werden Palindrome genannt. Ändert sich nun durch einen Polymorphismus die Sequenz, entfällt entweder für ein Enzym die herkömmliche Schnittstelle, oder ein anderes Enzym erhält an dieser Position eine neue Schnittstelle. Diese Änderungen spiegeln sich in heterozygoten Polymorphismusträgern anders wider, als in homozygoten Trägern und Nichtträgern. Folglich ergibt sich für jeden Genotyp ein anderes Bandenmuster im Agarosegel, wenn die geschnittenen Teilstrecken elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Bei der Handhabung der Enzyme ist besondere Vorsicht geboten. Jedes Enzym hat ein bestimmtes Temperaturoptimum, bei dem es arbeitet. Durch ständiges Auftauen und

Einfrieren des bei -20°C gelagerten Enzyms kommt es zum so genannten Star-Effekt, mit Verlust der Erkennung der enzymspezifischen Schnittstellen.

Tab. 2. 6. Restriktionsverdau: Jeder in der Sequenzanalyse gefundene Polymorphismus wurde mittels Restriktionsverdau bestätigt. Die Lokalisation ist in der ersten Spalte vermerkt. Hier sei erwähnt, dass die Zahlen in Klammern nicht die Größe des Exons, sondern die Größe des PCR-Produkts angeben. Die rechte Spalte gibt das Enzym an, dessen Schnittstelle durch den Polymorphismus entfällt oder neu entsteht.

<i>Gen</i>	<i>Restriktions- endonuklease</i>
LOC390828 ex 2 (495bp)	Rsa I
LOC390828 ex 3 (222bp)	Mnl I
LOC390828 ex 4 (391bp)	Apa I
LOC390828 ex 5 (396bp)	Nsp I
NDUFV2 ex4 (500bp)	Mse I
PTPRM ex20 (243bp)	Rsa I

2.1.10.1. Materialien

- Entsprechend des verwendeten Restriktionsenzym ist die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zu modifizieren. Die Informationen sind der Tab. 2.7. zu entnehmen.

- 10,0 μl PCR-Produkt
- 0,2 μl BSA
- 2,0 μl NEB (1-4) Puffer
- X μl Restriktionsenzym (5-10 U/ml)
- 20-12,2-X μl ddH₂O

20,0 μl für einen Reaktionsansatz

2.1.10.2. Durchführung:

- Tab. 2.7. gibt für jedes Enzym die optimale Arbeitstemperatur an. Der Verdau kann über Nacht inkubiert werden.

Tab. 2.7. Die Tabelle verdeutlicht die enzymespezifischen Eigenschaften: Nur die Einhaltung der einzelnen Parameter führt zu erfolgreichen Ergebnissen.

<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Puffer</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Dauer des Verdau</i>
Rsa I	1,0µl (10000U/ml)	NEB 1	37	über Nacht
Mnl I	1,0µl (10000U/ml)	NEB 2	37	“
Apa I	0,2µl (50000U/ml)	NEB 4	25	“
Nsp I	1,0µl (10000U/ml)	NEB 2	37	“
Mse I	1,0µl (10000U/ml)	NEB 2	37	“

2.1.11. Agarose-Gelelektrophorese

Wie unter 2.1.5.1. beschrieben, werden die verdauten DNA-Fragmente durch eine Agarose-Gelelektrophorese (2%) aufgetrennt.

2.2. Parametrische Kopplungsanalyse von PARK5 in einer Familie mit autosomal dominant vererbtem Morbus Parkinson

2.2.1. Patientenbeschreibung

Die zu untersuchende Familie mit autosomal dominanter Vererbung und reduzierter Penetranz stammt aus Spanien und zeigt frühe Manifestation des M. Parkinson mit Tremor im Durchschnittsalter von 33 Jahren. Das jüngste Manifestationsalter beläuft sich auf 20 Jahre, das älteste auf 50 Jahre. In dieser Mehrgenerationenfamilie stehen 28 Probanden zur Verfügung, von denen fünf Familienmitglieder erkrankt sind. Zwei weitere Familienmitglieder mit rechtsbetontem Tremor der Hand, mit Rigor und Hypokinesie zeigten diese Symptome erst in höherem Lebensalter (>70. Lebensjahr) und sollen deswegen nicht zu der Gruppe mit sich früh manifestierendem Parkinson Syndrom gezählt werden. Im Folgenden werden die verwendeten Methoden beschrieben, um nachzuweisen, ob das Kandidatengen UCH-L1(PARK5) mit den untersuchten Markern, die diesen Locus flankieren, gekoppelt vererbt wird. Mit Hilfe einer Mikrosatelliten-PCR und der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist für jedes Individuum eine Haplotypisierung für das untersuchte Allel möglich. Zeigt sich ein bestimmter Haplotyp nur bei den Parkinsonpatienten, so klassifiziert dies den untersuchten Locus in dieser Familie zu einem Risikolocus. Zur Haplotypisierung wird telomer- und centromerwärts von UCH-L1 in einem Abstand von circa drei Millionen Basenpaaren jeweils ein hochpolymorpher Mikrosatellit ausgewählt. Im Kandidatengen selbst wird ergänzend ein SNP genotypisiert.

2.2.2. Parametrische Kopplungsanalyse

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode zur Größenbestimmung der Mikrosatelliten. Wichtig in dieser Arbeit war nicht die absolute Anzahl der Tetranukleotidrepeats, sondern nur der relative Vergleich der einzelnen Banden und folglich die Definition der Allele. Dies erlaubt es nachzuvollziehen, ob ein bestimmtes Allel immer mit der Erkrankung des M. Parkinson vererbt wird. Um diese Vererbung nachzuweisen, wurde nur mit dem Anteil des Stammbaumes der spanischen Familie gearbeitet, der direkt betroffen ist. Dieser Teil schließt die fünf definitiv betroffenen Mitglieder und die Verwandtschaft ersten Grades ein (s. Abb. 2.4.).

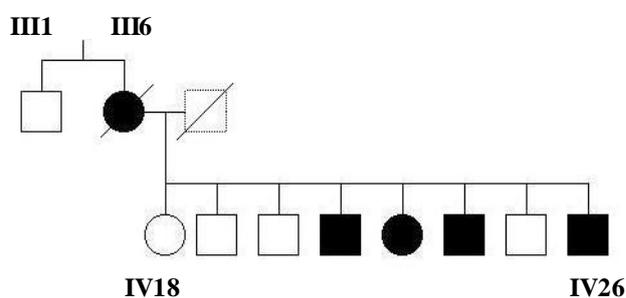


Abb. 2. 4. Anteil des Stammbaums der spanische Familie mit autosomal dominantem M. Parkinson: Der Stammbaum zeigt die erkrankte Person III6 und ihre acht Kinder IV18-26, von denen vier erkrankt sind. DNA des Ehemanns von III6 liegt nicht vor. Hier nicht gezeigt sind weitere Geschwister von III6 und die Eltern von III6. Haplotypisiert werden III1, III6 und alle hier aufgezeichneten Kinder von III6, d.h. IV18 bis IV26, mit Ausnahme von IV25. Hinweis: Ausgefüllte Symbole zeigen erkrankte Personen an.



Abb. 2. 5. Chromosom 4 mit Lage der untersuchten Mikrosatelliten und des SNP.

2.2.3. DNA Extraktion aus humanem Blut mit der Salzmethode

2.2.3.1. Materialien:

- 5ml Patientenblut (in EDTA oder Citrat Röhrchen)
- TL Puffer (pH 7,5)
- NL Puffer (pH 8)
- SDS-Lösung (10%)
- Proteinase K (10 mg/ml)
- NaCl (6 M)
- Ethanol (70% und 100%)
- TE-Lösung (pH 7,5)

2.2.3.2. Durchführung:

- Für die DNA Extraktion aus humanem Blut wurden 5ml Patientenblut mit Zusatz von antikoagulierendem EDTA oder Citrat verwendet.
- Zur Zellmembranlyse wird 40ml TL Puffer hinzugegeben und dies 30 min auf Eis gelagert.
- Bei 4°C und 4000 rpm, wird das Gemisch 15 min zentrifugiert und der Überstand mit einer Vakuumpumpe vorsichtig abgesaugt.
- Nach erneuter Zugabe von 10ml TL Puffer zur kompletten Zellmembranlyse und Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen kann der Überstand einfach abgegossen werden.
- Das Sediment muss mit 3ml NL Puffer vollständig aufgelöst werden, bevor 115 µl 10% ige SDS-Lösung und 50 µl Proteinase K (10mg/ml) dazugegeben werden.
- Die Proben werden im Wasserbad bei 55°C über Nacht inkubiert.
- 1ml 6M Natriumchlorid (NaCl) wird hinzugegeben, geschüttelt und unter den gleichen Bedingungen wie am Vortag zentrifugiert. Ist der Überstand nicht transparent, wird der Zentrifugationsschritt wiederholt.
- Der Überstand wird in ein neues Röhrchen abpipettiert und das gleiche Volumen an Isopropanol oder das doppelte Volumen an Ethanol hinzugegeben.
- Nach kräftigem Schütteln ist die DNA in der Flüssigkeit als weißliche Fäden sichtbar, wird mit 2ml Flüssigkeit entnommen und in einem neuen Röhrchen bei 14000 rpm 5min zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt.
- Mit 2ml 70%igem Ethanol wird dieser Vorgang wiederholt, wobei nach Wegkippen des Überstandes ein weiteres Mal zentrifugiert und Restflüssigkeit abpipettiert wird, um eine völlig trockene und salzfreie DNA zu erhalten.

- Bei 4°C kann die DNA in 200µl TE-Lösung aufbewahrt werden. Längerfristige Lagerung verlangt das Einfrieren bei -80°C.
- Wird nach Zugabe von Ethanol bzw. Isopropanol keine DNA sichtbar, so muss aus dem Röhrchen immer 2ml zentrifugiert, abgekippt und erneut mit 2ml aus dem Röhrchen aufgefüllt werden, bis die Flüssigkeit aufgebraucht ist. Es folgt, wie schon oben beschrieben, der letzte Arbeitsschritt mit der Zugabe von 2ml Ethanol etc.

2.2.4. Radioaktive Polymerase-Kettenreaktion

Bei der radioaktiven Polymerase-Kettenreaktion zur Darstellung der hochinformativen Mikrosatelliten sind die verwendeten dCTP Nukleotide zum Teil mit ³²Phosphor markiert. Dies ermöglicht die Darstellung des PCR-Produkts auf einem Acrylamidgel (30x40cm), das einen Röntgenfilm radioaktiv belichtet, und somit einen relativen Vergleich zwischen der Länge der Mikrosatelliten erlaubt. Nur Gele dieser Größe können die Längendifferenz der Mikrosatelliten hochauflösend darstellen. Dabei sind Unterschiede von zwei Basenpaaren erfassbar.

2.2.4.1. Materialien

- Für die Radioaktive PCR wird pro Patient folgendes benötigt:

- 1 µl Patienten DNA (~100ng/µl)
- 1,5µl Taq Polymerase Puffer (10x)
- 0,9µl MgCl₂ (25mM)
- 1 µl D4S2382 F (5pm/µl)
- 1 µl D4S2382 R (5pm/µl)
- 3 µl dNTP HOT Mix
- 0,1µl dCTP α³²P
- 0,1µl Taq Polymerase (5U/µl)
- 6,4µl ddH₂O

15,0µl

- Zusammensetzung von 400µl dNTP HOT Mix:

- 50 µl dATP (10mM) => Endkonzentration: 1,25mM
- 50 µl dTTP (10mM) => Endkonzentration: 1,25mM
- 50 µl dGTP (10mM) => Endkonzentration: 1,25mM
- 4 µl dCTP (10mM) => Endkonzentration: 0,10mM
- 246µl H₂O

- Die radioaktive PCR wurde für jeden Probanden modifiziert mit dem Primerpaar D4S3357F/R durchgeführt.

Tab. 2. 8. Primerliste: Eigenschaften der Primer, die bei der radioaktiven PCR für die Amplifizierung der Mikrosatelliten verwendet wurden.

<i>Name</i>	<i>Primer 5'→3'</i>	<i>T_m [°C]</i>
D4S2382 F	TCTAGCCACCATTGCTTTC	58
D4S2382 R	GTGTGTATGGTATGCTGCCA	
D4S3357 F	ATTAGTATGCCTTTGGATAGATAGG	60
D4S3357 R	CTGTACGCTCATGTGCTCATTG	

2.2.4.2. Durchführung

Die 15 µl Reaktionsansatz pro Tube werden unter folgenden Bedingungen in das PCR-Gerät gestellt:

- Denaturierung 3min bei 94°C
 - Denaturierung 1min bei 94°C
 - Annealing 1min bei T_m[°C]
 - Extension 2min bei 72°C
 - Extension 7min bei 72°C
 - Aufbewahrung bei 4°C
- } 35 Zyklen

2.2.5. Heiße Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die heiße Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfordert die Herstellung eines 6%igen Acrylamidgels zur Auftrennung der radioaktiven PCR-Produkte, die je nach Mikrosatellitengröße individuelle Länge aufweisen.

2.2.5.1. Vorbereitung der Glasplatten

- Zwei gleich große Glasplatten müssen gründlich gereinigt werden (Alconox, Wasser, Isopropanol).
- Vor der ersten Anwendung wird eine der Glasplatten einmalig mit Silikon beschichtet, damit sich später bei der Trennung der Platten das Gel von dieser Platte besser löst. Der Zusammenbau der Platten erfolgt wie bei der Sequenzierung beschrieben (2.1.9.).
- Die beiden Längsseiten und eine kurze Seite werden mit dickem Klebeband abgeklebt und mit Klammern zusammengedrückt. Die zweite kurze Seite bleibt offen.

2.2.5.2. Materialien

- 10 ml Acrylamid (30%)
- 10 ml TBE Puffer (5x)
- 30 ml ddH₂O
- 166 µl APS (10%)
- 33 µl TEMED

~50 ml

2.2.5.3. Durchführung

- Nach der Mischung der genannten Bestandteile des Acrylamidgels wird das flüssige Gel an der offenen kurzen Seite zwischen die beiden Glasplatten gespritzt und der Kamm mit der glatten Seite zwischen die beiden Platten geschoben.
- Wenn das Gel nach ungefähr 30 min polymerisiert ist, kann das Klebeband an der kurzen Seite entfernt und die Glasplatten senkrecht in den Elektrophoreseapparat aufgestellt werden.
- Nach dem Auffüllen der Pufferreservoirs mit TBE Puffer (5x) wird der Kamm diesmal mit den Zinken zwischen die beiden Glasplatten wieder hinein geschoben.
- Ein Vorlauf (*Pre-run*) sorgt für das Aufheizen der Platten und eine gleichmäßige Ionenverteilung.
- Zu den bei 4°C gelagerten Patientenproben wird pro Tube 3µl Blue Ladepuffer hinzugegeben und 8µl dieser Mischung auf das Gel geladen.
- Nun wird mit der Kathode am oberen Rand und mit der Anode am unteren Rand des Apparates für zwei bis drei Stunden eine Leistung von 58Watt angelegt.
- Nach Beendigung der Laufzeit werden die Glasplatten voneinander getrennt, um das Gel auf ein 3mm dickes Papier (*Whatman*) zu transferieren, dieses mit Klarsichtfolie abzudecken und in einem Vakuumtrockner bei 65°C zu trocknen.
- In der Dunkelkammer wird das getrocknete Gel in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Nach einer halben Stunde kann der Film zur Entwicklung gegeben werden.

ACHTUNG: Da hier mit radioaktivem Material gearbeitet wird, ist jeder flüssige und feste Stoff als radioaktiver Abfall anzusehen, und dementsprechend zu entsorgen. Der Experimentierende hat Filmdosimeter und Schutzkleidung zu tragen und ist verpflichtet die radioaktive Kontamination von Umgebung und Geräten mit einem Geiger Müller-Zählrohr zu überprüfen und zu beseitigen.

2.2.6. Polymerase-Kettenreaktion

Die folgende Beschreibung der Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifizierung einer bestimmten Gensequenz des PARK5 Gens für UCH-L1, die einen Single Nucleotide Polymorphism (SNP) enthält.

Tab. 2.9. Primerliste: Verwendete Primer für die Amplifizierung des SNPs rs9321 in UCH-L1.

<i>Name</i>	<i>Primer 5'→3'</i>	<i>Tm [°C]</i>
UCH-L1 rs9321F	GCGATGAGCTGCAAGGTT	60
UCH-L1 rs9321R	GCCACTCACTTTGTTCAGCA	

2.2.6.1. Materialien

- Für die PCR ist folgendes nötig:
 - 1 µl DNA (50-100ng/µl)
 - 16 µl *Pink Juice*
 - 1 µl UCH-L1rs9321F(5pmol/µl)
 - 1 µl UCH-L1rs9321R (5pmol/µl)
 - 0,1µl Taq Polymerase (5U/µl)
 - 0,9µl ddH₂O

20,0µl

2.2.6.2. Durchführung

- Für die Durchführung der PCR muss in der PCR Maschine folgender Modus eingestellt werden:
 - Denaturierung 3min bei 94°C
 - Denaturierung 1min bei 94°C
 - Annealing 1min bei 60°C
 - Extension 2min bei 72°C
 } 35 Zyklen
 - Extension 7min bei 72°C
 - Aufbewahrung bei 4°C

2.2.7. Restriktionsverdau

Zusätzlich zur Haplotypisierung erfolgte der Restriktionsverdau von rs9321 im Gen UCH-L1. Die NCBI Homepage gibt für den SNP rs9321 einen Basenaustausch von Cytosin nach Thymin im UCH-L1 Gen an. Das Restriktionsenzym MspI kann dann, an den für das Enzym definierten Erkennungssequenzen, das PCR-Produkt schneiden. Wenn der SNP rs9321

vorhanden ist, entfällt eine erwartete Restriktionsschnittstelle. Dies ist dann mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese als ein differenziertes Bandenmuster sichtbar.

2.2.7.1. Materialien

- 10 μ l PCR-Produkt
- 0,2 μ l BSA
- 2 μ l NEB2 Puffer
- 0,25 μ l MspI Restriktionsenzym (5U/ml)
- 7,55 μ l ddH₂O

20,00 μ l

2.2.7.2. Durchführung:

- Der Ansatz für den Restriktionsverdau wird entsprechend des Temperaturoptimums des Enzyms mindestens zwei bis drei Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.8. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Darstellung der Fragmente, die beim Restriktionsverdau entstehen, wird ein zweiprozentiges Agarosegel vorbereitet.

2.2.8.1. Materialien

- 150,0 ml TBE-Puffer 0,5X
- 3,0 g Agarosepulver
- 1,5 μ l Ethidiumbromid

2.2.8.2 Durchführung:

- Bei der Elektrophorese eines Restriktionsverdaus sollte ein Volumen von 12 μ l in die Kammer pipettiert werden, da sich die Produkte auftrennen und die einzelnen Banden sonst schwer darzustellen sind.

2.3. Assoziationsuntersuchung zweier Parkinson Kandidatengene anhand von *single nucleotide polymorphisms*

2.3.1. Assoziationsuntersuchung

Mit einer Fall-Kontroll-Studie soll im dritten Teil der Arbeit eine Assoziationsuntersuchung zweier Parkinson Kandidatengene durchgeführt werden. Die Auswahl der Kandidatengene erfolgte aufgrund bekannter Interaktion der Genprodukte von NME4 und MTIF3 mit PINK1 in *Drosophila melanogaster* oder *C. elegans* und möglicher pathophysiologischer Mechanismen in den Mitochondrien.

Die NCBI Database dokumentiert alle im menschlichen Genom bekannten SNPs. Hier erfolgte die Auswahl der SNPs rs10172 und rs7669 für das Gen von MTIF3 und die Auswahl der SNPs rs8967 und rs38882 für das Gen von NME4.

Über das Programm MapDraw war es möglich ein Restriktionsenzym auszuwählen, für das sich in den ausgewählten Genen durch einen SNP eine Änderung in den Restriktionsschnittstellen ergibt. Die mit der Polymerase-Kettenreaktion zu amplifizierende Teilsequenz liefert durch den Restriktionsverdau für jeden Polymorphismus ein spezifisches Bandenmuster in der Agarose-Gelelektrophorese.

Tab. 2.10. Polymorphismen: Jeder Polymorphismus ist mit der Position des Basen- bzw. Aminosäureaustauschs sowie mit dem zugehörigen Enzym beschrieben.

<i>Gen</i>	<i>SNP</i>	<i>Basenaustausch</i>	<i>Aminosäureaustausch</i>	<i>Enzym</i>
MTIF3	Rs10172	G905A	Ala257Thr	BsaI
	rs7669	T1034C	Asp266Asp	StyI
NME4	rs11538882	A391G	Ser120Ser	XhoI
	rs8967	A712G	intronischer SNP	BfaI

2.3.2. Patientenbeschreibung

Die Assoziationsuntersuchung erfolgte in zwei unabhängigen Fall-Kontroll-Studien. Zum einen wurde das herkömmliche Studiendesign mit sporadischen Parkinsonpatienten und randomisierten nicht verwandten Kontrollen verwendet, zum anderen erfolgte die gleiche Studie in einem Patientenkollektiv und den verwandten und gesunden Kontrollen.

Das erste Kollektiv (Gruppe F) mit 192 erkrankten Personen stammt aus der Parkinson-Spezialklinik in Kassel. Die gleich große Kontrollgruppe stammt aus dem Rhein-Main Gebiet, die Proben sind aus dem Blutspendedienst der Frankfurter Universitätsklinik. Neben diesem

Kollektiv liegt ein zweites Kollektiv (Gruppe T) aus 261 Patienten aus der Region um Tübingen und 178 blutsverwandten Kontrollen vor.

Für eine Assoziationsuntersuchung von diesem Ausmaß ist es wichtig Stratifikationsprobleme zu vermeiden. Durch Randomisieren kann bei großen Stichproben davon ausgegangen werden, dass beide Gruppen vergleichbar sind.

2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion

- Die PCR wurde nach den unter 2.1.4. genannten Vorgaben durchgeführt.
- Ein Unterschied ergab sich durch die Verwendung von nur 0,8µl DNA anstatt 1µl DNA.
- Außerdem wurde den PCR-Ansätzen 1,9µl H₂O zugegeben, sodass sich das Gesamtvolumen in jedem Tube auf 20,8µl erhöhte.
- Für das Primerpaar NME4BfaI F/R wurden anstatt 1,9µl H₂O, 1µl Glycerol und 1µl H₂O verwendet. Beim Testen der Primer war die Produktmenge unter dieser Modifikation größer.

Tab. 2.11. Primerdesign und die Annealingtemperatur der verwendeten Primer: Es ist anzumerken, dass die Primerpaare MTIF3 F/R rs7669 und rs10172 die gleichen sind, weil beide SNPs in räumlicher Nähe zueinander stehen und die Teilsequenz in der selben PCR amplifiziert werden konnte.

<i>Name</i>	<i>Primer 5'→3'</i>	<i>T_m[°C]</i>
MTIF3Frs10172	AGCACCAAAGCCTCTGATTT	58
MTIF3Rrs10172	CTGTGTGGAAGACAAGATGCTC	
MTIF3Frs7669	AGCACCAAAGCCTCTGATTT	58
MTIF3Rrs7669	CTGTGTGGAAGACAAGATGCTC	
NME4BfaI F	TGTTACTCCTTCCCTGTCTGC	55
NME4BfaI R	CCCACCACAAAGGTTGTCC	
NME4XhoI F	CGTGTGGGTGTGTCTTTCC	58
NME4XhoI R	CCACCACCCCAAGTGATG	

2.3.4. Restriktionsverdau

- Tab. 2.12. stellt jeden Polymorphismus mit dem Enzym dar, dessen Restriktionsverhalten durch den Basenaustausch verändert wird.
- Die Modifikationen beim Restriktionsverdau im Vergleich zu 2.1.10. beliefen sich auf die Enzymmenge (Unit/ml), die angewendeten Puffer (NEB2-4), die optimale Temperatur und die Dauer des Restriktionsverdaus. Tab. 2.13. zeigt die Unterschiede im Einzelnen.

Tab. 2.12. SNPs: Liste der vier ausgewählten SNPs mit den zu erwarteten PCR-Produkten und Restriktionsendonukleasen.

<i>SNP</i>	<i>PCR Produkt</i>	<i>Enzym</i>
rs10172	400 bp	Bsa I
rs7669	400 bp	Sty I
rs8967	496 bp	Bfa I
rs11538882	281 bp	Xho I

Tab. 2.13. Restriktionsenzyme: Hier sind die wichtigsten Unterschiede im Umgang mit den Enzymen aufgelistet.

<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Puffer</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Dauer des Verdaus</i>
Bsa I	1 µl (10000U/ml)	NEB 3	50	über Nacht
Sty I	1 µl (10000U/ml)	NEB 3	37	über Nacht
Bfa I	1 µl (5000U/ml)	NEB 4	37	über Nacht
Xho I	0,5 µl (20000U/ml)	NEB 2	37	über Nacht

2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Auch die Durchführung der Elektrophorese ist vergleichbar mit der Anleitung unter 2.1.10.

2.3.5.1. Materialien

- 225ml TBE-Puffer 0,5X (entspricht dem ausgemessenen Volumen in cm³)
- 4,5g Agarose (für ein Gel mit 2% Agaroseanteil)
- 2,25 µl Ethidiumbromid

2.3.5.2. Durchführung

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.1.10.beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1. Sequenzierung von vier Kandidatengenem auf Chromosom 18p11 in einer Familie mit fokaler Torsionsdystonie (DYT7)

3.1.1. Zusammenstellung der Ergebnisse

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Suche nach der krankheitsverursachenden Mutation in vier ausgewählten Kandidatengenem im Lokus für die autosomal dominant vererbte Form der zervikalen Torsionsdystonie. Die vier Gene LOC390828, ZFP161, NDUFV2 und PTPRM wurden in beiden Richtungen in zwei definitiv erkrankten Personen und in zwei Kontrollpersonen, die aus der gleichen Region stammen und die nicht blutsverwandten Ehepartner der Patienten sind, sequenziert.

In keinem der vier Gene konnte eine Mutation, die nur bei den Patienten auftritt und zu einem Aminosäureaustausch führt - und somit krankheitsverursachend sein könnte - gefunden werden. Im Folgenden sind die Basenaustausche dokumentiert, die sich als *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) definieren ließen. Alle potentiellen Basenaustausche wurden in den vier sequenzierten Fragmenten mittels Restriktionsverdau bestätigt oder ausgeschlossen. Bei bestätigten SNPs wurden auch die restlichen Patienten und 96 unabhängige Kontrollpersonen mit dem Restriktionsverdau untersucht. So konnte für SNPs nicht nur die Krankheitsrelevanz überprüft, sondern gleichzeitig das prozentuale Vorkommen in einer Kontrollgruppe etabliert werden. Zur Vollständigkeit der Ergebnisse wurden SNPs auch dann in Kontrollgruppen untersucht, wenn sie nicht zu einem Aminosäureaustausch auf Proteinebene führten.

Bei der Auswertung der Elektropherogramme wurde auf folgendes geachtet: Da es sich hier um einen autosomal dominanten Erbgang handelt (s. Abb. 2.1.), konzentrierte sich die Suche nach der Mutation auf einen heterozygoten Basenaustausch, auf eine heterozygote Deletion oder Insertion. Zur Sequenzanalyse wurden die Kontrollpersonen mit der Originalsequenz (erhältlich auf der NCBI Datenbank) verglichen. Es folgte der Vergleich der beiden Kontrollpersonen II4 und III25 untereinander, sowie der entscheidende Vergleich der Kontrollpersonen mit den beiden Patienten II3 und III24. Die Sequenzen wurden unabhängig voneinander in beiden Richtungen ausgewertet. In Fällen, in denen ein möglicher Basenaustausch nur in einer Richtung sichtbar war, wurde zur Sicherheit ein Restriktionsverdau oder eine nochmalige Sequenzierung angeschlossen. Die Sequenzen wurden auch dann wiederholt, wenn sie schlecht zu interpretieren oder unvollständig waren. Bei der Wiederholungssequenzierung wurde eine höhere DNA Menge verwendet, was in den

meisten Fällen erfolgreich war. War dies nach einmaliger Wiederholung bei allen vier Personen nicht der Fall, so wurde ein neuer Primer bestellt.

3.1.2. Definition und Lokalisation der Polymorphismen

Bei der Sequenzierung der vier DYT7 Kandidatengene sind in den Exons insgesamt sechs Polymorphismen nachgewiesen worden. Diese Polymorphismen konnten auch in Kontrollpersonen bestätigt werden.

3.1.2.1. LOC390828

In LOC390828 wurden insgesamt vier Polymorphismen gefunden. Alle führten zu einem Aminosäureaustausch im Protein.

Die Elektropherogramme in Abb. 3.1. zeigen mit Pfeilen gekennzeichnet einen homozygoten Basenaustausch von Guanin nach Adenin im Exon 2 des Gens in der Sequenzanalyse der Person Locex2F4 (Kontrollperson). Der SNP ist im *open reading frame* (ORF) an Position 375, was in der Aminosäuresequenz des Proteins einem Austausch von Alanin durch Threonin an Position 125 entspricht.

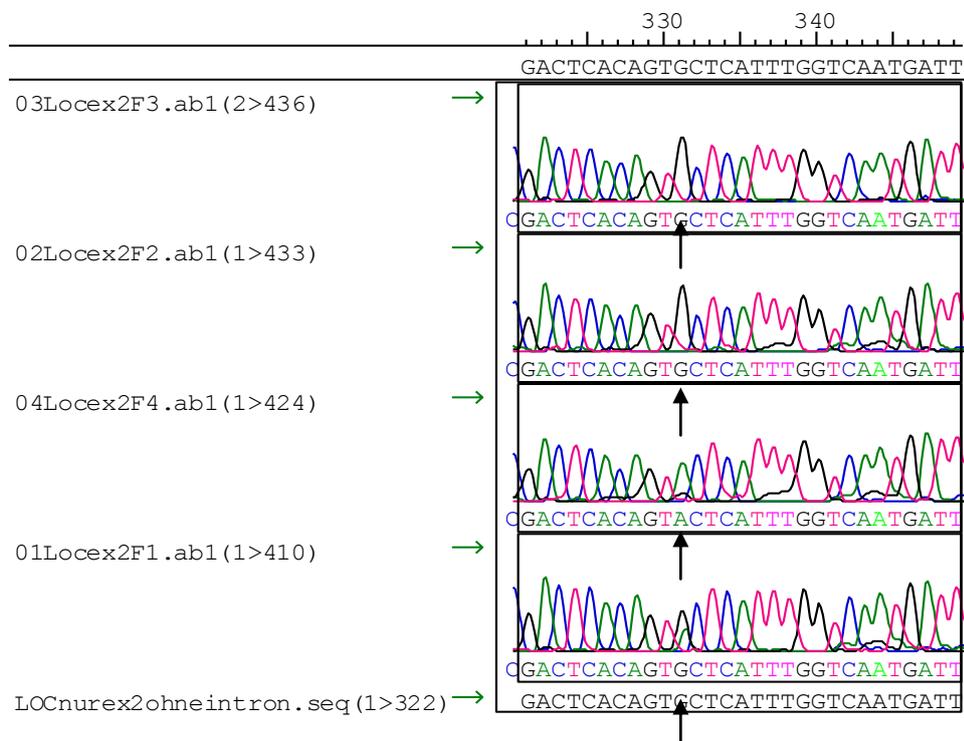


Abb. 3.1. Elektropherogramme / SNP in LOC390828 Exon 2: Die Sequenz „LOCnurex2ohneintron“ entspricht der humanen genomischen Sequenz. Locex2F2 und F3 entsprechen den Patienten, Locex2F1 und F4 entsprechen den Kontrollen. An Position 331 des PCR-Produkts wird in Person Locex2F4 ein homozygoter Basenaustausch von Guanin nach Adenin deutlich.

Abb. 3.2. zeigt einen Polymorphismus im Exon 3 des Gens mit einem Basenaustausch von Adenin nach Guanin an Position 429 im ORF mit einem Aminosäureaustausch von Glycin nach Arginin an Position 143 des Proteins.

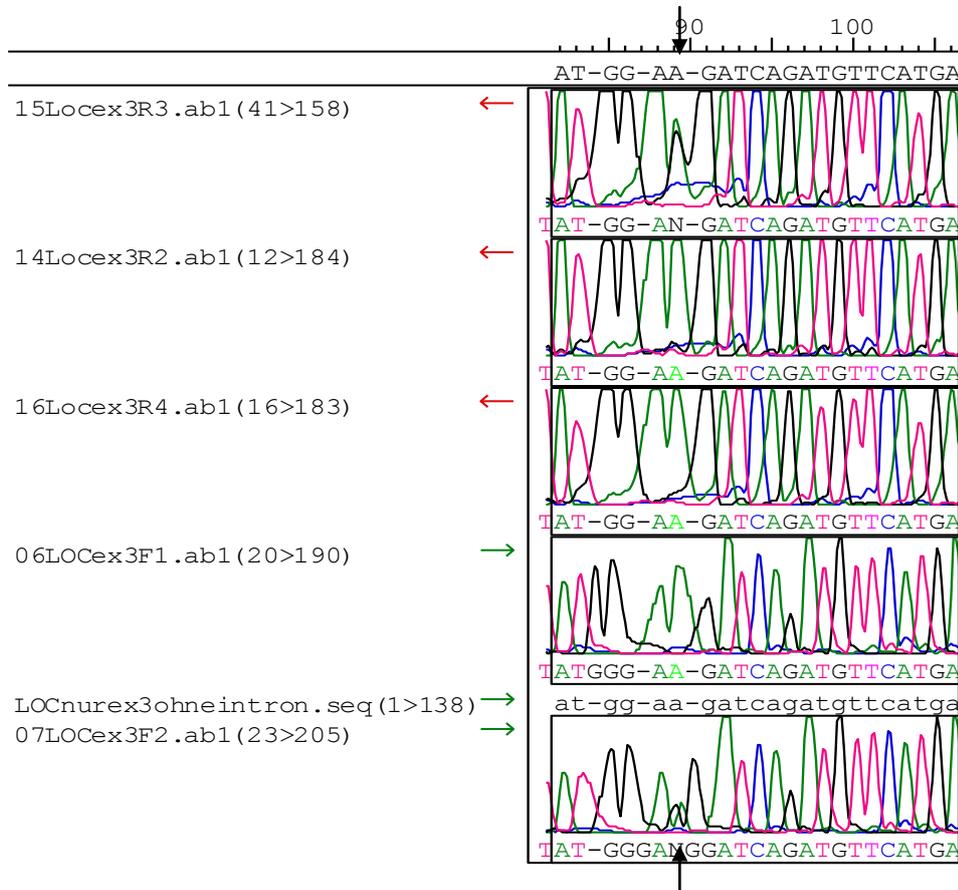


Abb. 3.2. SNP in LOC390828 Exon 3: „LOCnurex3ohneintron“ entspricht der genomischen Sequenz. Locex3R2 und R3 sowie F2 entsprechen den Patienten. Locex3F1 und R4 entsprechen den Kontrollen. In dieser Abbildung wird deutlich, dass die beiden Patienten einen heterozygoten Basenaustausch an Position 89 im PCR-Produkt aufweisen. Obwohl die Vorwärtssequenz bei Person F2 (Patient) einen Basenaustausch zeigt, so ist in der Rückwärtssequenz dieser nicht nachweisbar (R2).

Abb. 3.3. zeigt den Polymorphismus im vierten Exon des Gens. Der Austausch von Cytosin durch Adenin an Position 594 im ORF führt im Protein zum Austausch der Aminosäure Prolin durch Threonin an Position 129.

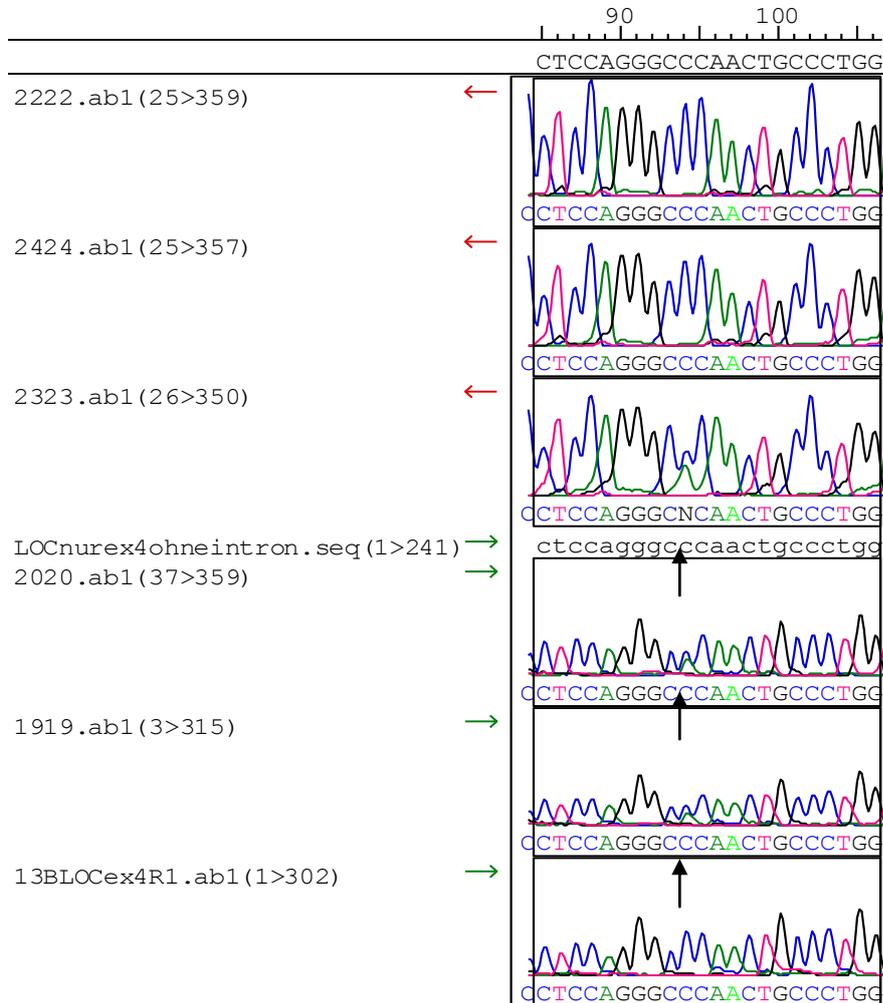


Abb. 3. 3. SNP in LOC390828 Exon 4: „LOCnurex4ohneintron“ entspricht der genomischen Sequenz. Datei 1919 und 2323 entsprechen einem Patienten. 2222 entspricht dem anderen Patienten. 2020 und 2424 entspricht einer Kontrolle. BLOCex4R1 entspricht der anderen Kontrolle. Markiert mit einem Pfeil wird an Position 94 ein heterozygoter Basenaustausch von Cytosin nach Adenin. Dieser Polymorphismus ist im zweiten Patienten (1919 bzw. 2323) sowie in der zweiten Kontrolle (2020) zu sehen. Hier ist erneut anzumerken, dass in der Kontrolle der Polymorphismus in der Rückwärtssequenz (2424) nicht zu sehen ist.

Abb. 3.4. verdeutlicht den Polymorphismus im fünften Exon des Gens LOC390828. Es handelt sich hierbei um einen Basenaustausch von Guanin nach Thymin an Position 825 im ORF. Dies entspricht in der Aminosäuresequenz einem Austausch von Methionin durch Isoleucin an Position 275.

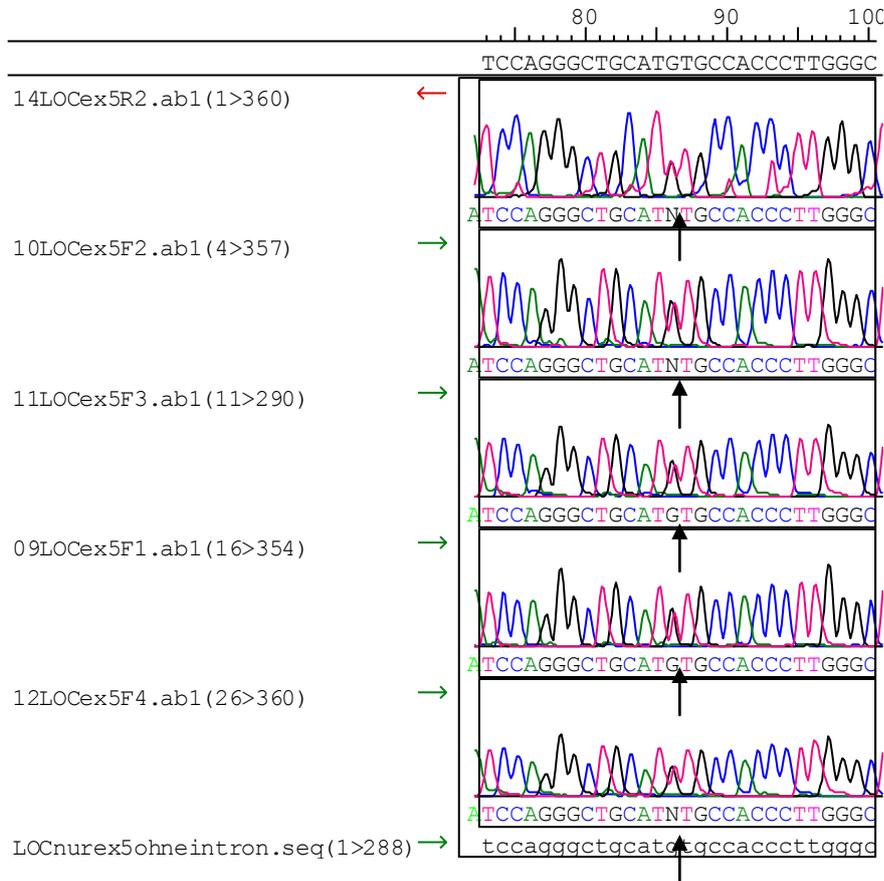


Abb. 3.4. SNP in LOC390828 Exon 5: Erneut entsprechen die Proben F2 bzw. R2 sowie F3 den beiden Patienten. F1 und F4 sind die beiden Kontrollpersonen. Eindeutig ist in allen vier Personen ein heterozygoter Basenaustausch von Guanin nach Thymin zu sehen. Die Datei „LOCnurex5ohneintron“ zeigt die genomische Sequenz.

3.1.2.2. ZFP161

In beiden Richtungen des Gens ZFP161 konnte in keiner der untersuchten Personen ein Polymorphismus gefunden werden.

3.1.2.3. NDUFV2

Im Gen NDUFV2 wurde in Exon 4 ein Polymorphismus gefunden. Allerdings führt dieser nicht zu einem Aminosäureaustausch. Es handelt sich um einen heterozygoten Basenaustausch von Adenin nach Guanin an Position 219 im ORF.

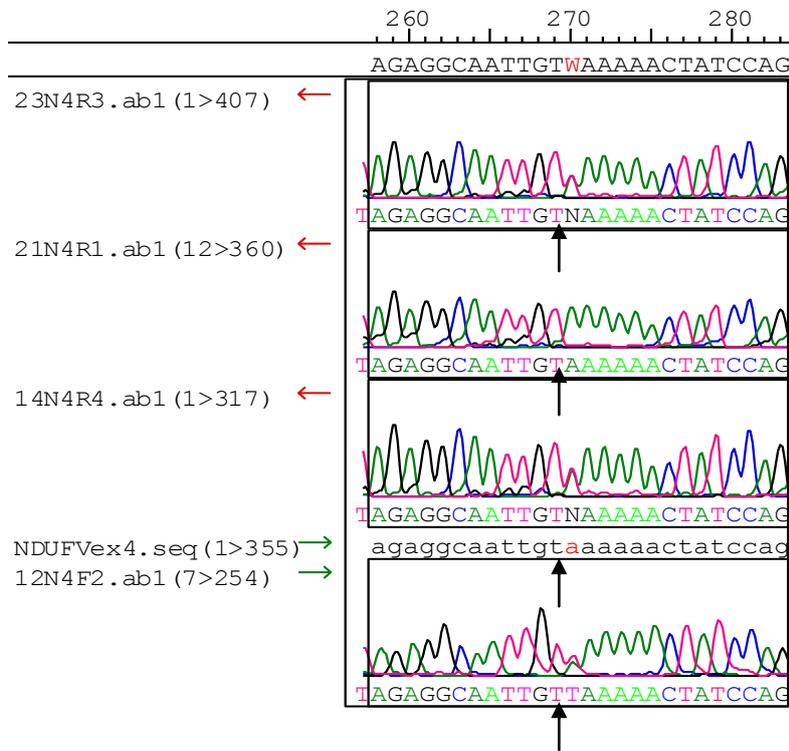


Abb. 3.5. SNP in NDUFV2 Exon 4: „NDUFVex4“ kennzeichnet die genomische Sequenz. In F2 und R3 (Patienten) ist der Polymorphismus an Position 270 sichtbar. Auch R4 (Kontrolle) zeigt den Polymorphismus, R1 (Kontrolle) dagegen nicht.

3.1.2.4. PTPRM

Abb. 3.6. zeigt den heterozygoten Polymorphismus, der an Position 4131 im ORF (Exon 20) gefunden wurde. Dieser Basenaustausch von Guanin nach Adenin führt nicht zu einem Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz.

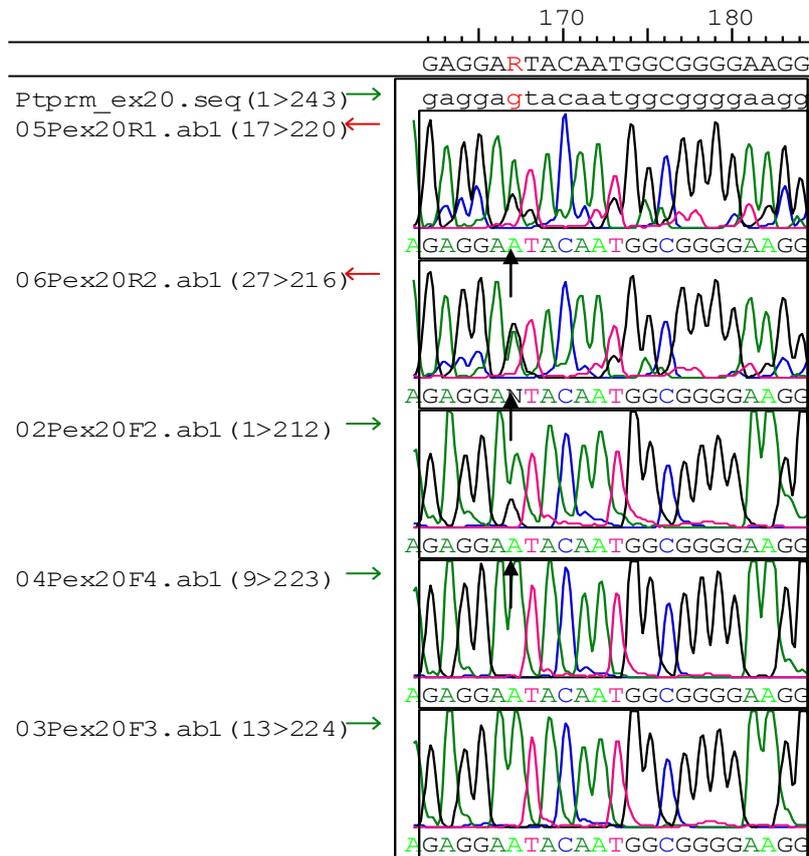


Abb. 3.6. SNP in Exon 20 des Gens PTPRM: Die Datei Ptpm_ex20 ist die genomische Sequenz. F2 bzw. R2 (Patient) zeigen so wie auch R1 (Kontrolle) den Polymorphismus an Position 167 des PCR-Produkts. F3 (Patient) und F4 (Kontrolle) zeigen keinen Unterschied zur genomischen Sequenz.

In Tab. 3.1. sind alle Polymorphismen dargestellt. Neben dem Basen- bzw. Aminosäureaustausch ist auch das Restriktionsenzym genannt, für das eine neue Schnittstelle hinzukommt oder eine bestehende Schnittstelle entfällt. Die letzten drei Spalten stellen die unterschiedlichen Fragmentlängen im Restriktionsverdau beim Wildtyp sowie homo- und heterozygoten Polymorphisusträgern dar.

Tab. 3.1. Zusammenstellung der SNPs: Jeder in der Sequenzanalyse gefundene Polymorphismus wurde mittels Restriktionsverdau bestätigt. Die Lokalisation ist in der ersten Spalte vermerkt. Hier sei erwähnt, dass die Zahlen in Klammern nicht die Größe des Exons, sondern die Größe des PCR-Produkts angeben. Neben den Enzymen sind auch die Position des Basenaustauschs im *open reading frame* (ORF), sowie der Aminosäureaustausch (falls vorhanden) dargestellt. Die drei letzten Spalten verdeutlichen die unterschiedlichen Fragmentlängen, die durch den Polymorphismus entstehen. Die Summe der Fragmente des Polymorphismus im Gen NDUFV2 Exon4 ergibt nicht 500bp (wie in Spalte eins deutlich wird), weil Mse I das *template* an weiteren Stellen schneidet. Die vielen kleinen Fragmente, die dabei entstehen, sind im Agarosegel nicht sichtbar.

<i>Gen</i>	<i>Enzym</i>	<i>Basen- austausch</i>	<i>Aminosäure- austausch</i>	<i>Wildtyp</i>	<i>homozygot</i>	<i>heterozygot</i>
LOC390828 ex 2 (495bp)	Rsa I	G375A	Ala125Thr	495bp	113bp, 382bp	113bp, 382bp, 495bp
LOC390828 Ex 3 (222bp)	Mnl I	A429G	Gly143Arg	29bp, 193bp	29bp, 36bp, 157bp	29bp, 36bp, 157bp, 193bp
LOC390828 Ex 4 (391bp)	Apa I	C594A	Pro198Thr	98bp, 293bp	391bp	98bp, 293bp, 391bp
LOC390828 Ex 5 (396bp)	Nsp I	G825T	Met275Ile	102bp, 294bp	396bp	102bp, 294bp, 396bp
NDUFV2 ex4 (500bp)	Mse I	A219T	Gly73Gly	164bp, 299bp	78bp, 164bp, 221bp	78bp, 164bp, 221bp, 299bp
PTPRM ex20 (243bp)	Rsa I	A4131G	Glu1377Glu	72bp, 77bp, 94bp	94bp, 149bp	72bp, 77bp, 94bp, 149bp

3.1.3. Verteilung der Polymorphismen in der Patientengruppe

Jeder Polymorphismus wurde nicht nur in den zwei untersuchten Patienten, sondern auch in fünf weiteren Patienten und einer weiteren Kontrolle (Ehepartner) untersucht. Der Stammbaum in Abb. 3.7. verdeutlicht, wer zusätzlich untersucht wurde.

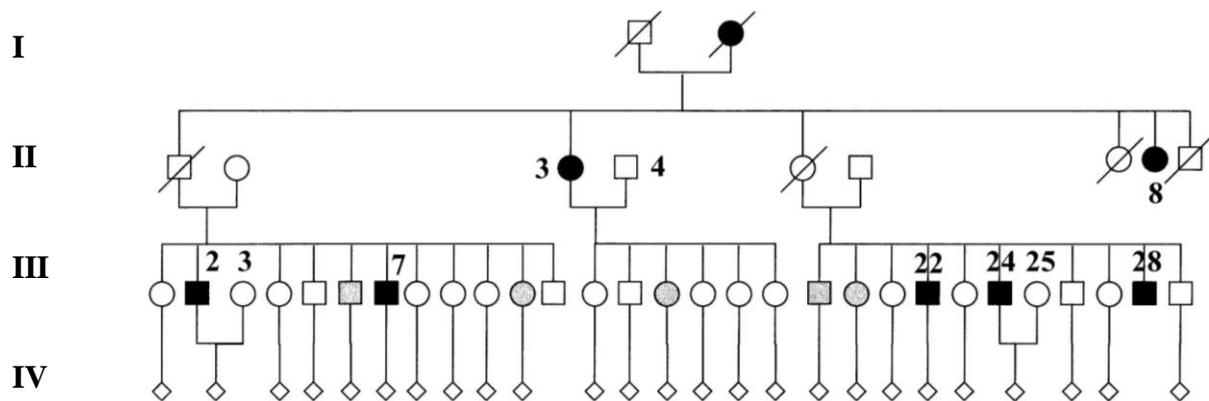


Abb. 3.7. Stammbaum der deutschen Familie aus dem Emsland: Folgende Personen wurden genetisch untersucht: II3, II4, II8, III2, III3, III7, III22, III24, III25, III28. Schwarz ausgefüllte Symbole stellen die definitiv betroffenen Mitglieder dar. Graue Symbole markieren die wahrscheinlich betroffenen Mitglieder. Ehepartner sind in der dritten Generation nur dann erwähnt, wenn sie untersucht wurden. Die Kinder (vierte Generation) sind nur als Rautensymbole dargestellt.

Die Abb. 3.8. bis 3.14. zeigen die Ergebnisse. Für alle Abbildungen gilt, dass die ersten drei Spuren die Kontrollpersonen (II4, III25, III3) und die restlichen Spuren die Patienten (II3, III24, III7, III2, II8, III22) zeigen. Unter M ist immer ein Längenstandard aufgetragen. Die Banden des Markers sind in Schritten zu je 100bp aufgeteilt. Die Zahlen am rechten Rand der Abbildungen sind die Größe der Banden, die im jeweiligen Restriktionsverdau entstanden sind. Der Patient III28 ist mit allen Polymorphismen in Abb. 3.14. charakterisiert.

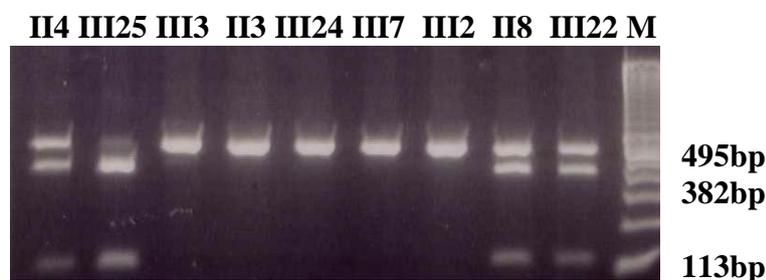


Abb. 3.8. LOC390828 ex2 G375A-Polymorphismus: Die Personen III3, II3, III24, III7 und III2 tragen den Polymorphismus nicht (Wildtyp, Index: 11). Die Personen II4, II8, III22 sind heterozygot für den Polymorphismus (heterozygote, Index:12). Die Person III25 trägt den Polymorphismus auf beiden Chromosomen (homozygot, Index: 22).

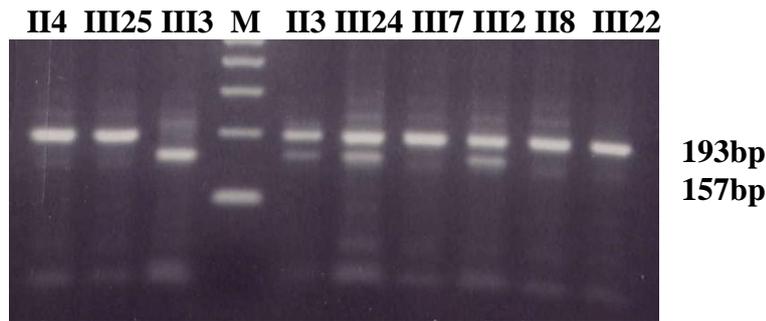


Abb. 3.9. LOC390828 ex3 A429G-Polymorphismus: Die Personen *II4*, *III25*, *III7*, *II8*, *III22* tragen den Polymorphismus nicht (Wildtyp). *II3*, *III24* und *III2* sind heterozygot für den Polymorphismus. *III3* ist homozygot für den Polymorphismus.

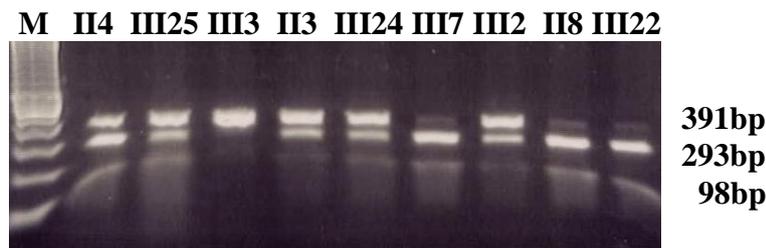


Abb. 3.10. LOC390828 ex4 C594A-Polymorphismus: *III7*, *II8*, *III22* sind Wildtypen. *II4*, *III25*, *II3*, *III24*, *III2*, sind Heterozygote. *III3* ist homozygot für den Polymorphismus.



Abb. 3.11. LOC390828 ex5 G825T-Polymorphismus: *III7* und *II8* sind Wildtypen. In dem untersuchten Kollektiv ist keine Person homozygot für den Polymorphismus. *II4*, *III25*, *III3*, *II3*, *III24*, *III2*, *III22* sind heterozygot für den Polymorphismus.

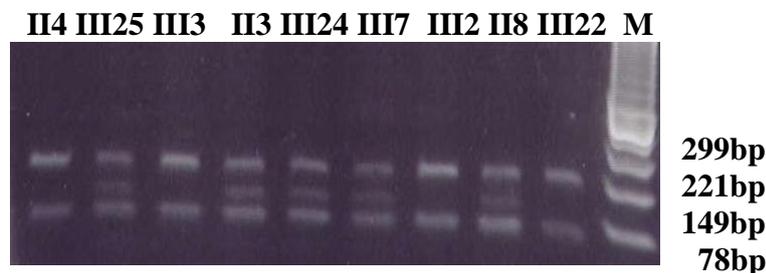


Abb. 3.12. NDUFV2 ex4 A219T-Polymorphismus: *II4*, *III3*, *III2* und *III22* sind Wildtypen. Die Personen *III25*, *II3*, *III24*, *III7* und *II8* sind Heterozygote für den Polymorphismus.

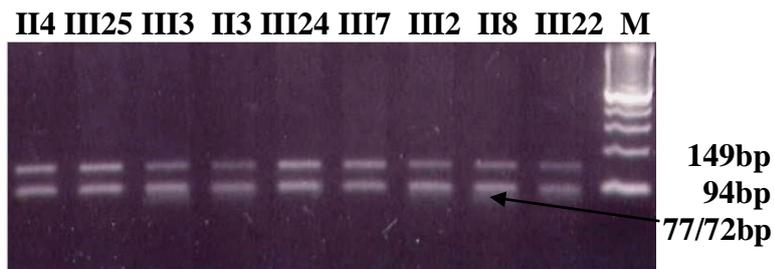


Abb. 3.13. PTPRM ex20 A4131G-Polymorphismus: Die Differenzierung zwischen heterozygoten Polymorphismusträgern und Wildtypen ist hier dadurch erschwert, dass beide Gruppen sich nur durch die 72/77bp Bande unterscheiden. Diese ist bei den Heterozygoten durch eine leichte DNA-Spur unter der 94bp Bande zu sehen. Demnach sind *III3*, *II3*, *III2*, *II8* und *III22* heterozygot und *II4*, *III25*, *III24* sowie *III7* Wildtypen.

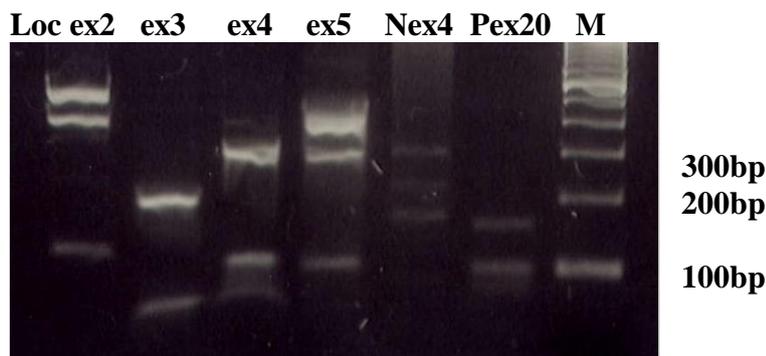


Abb. 3.14. Alle Polymorphismen auf einen Blick: Hier erfolgte die Genotypisierung in Person *III28* in allen oben getesteten Polymorphismen. Der Index 11 bezeichnet den Wildtyp, der Index 12 die Heterozygotie. Loc $ex2 \rightarrow 12$; $ex3 \rightarrow 11$; $ex4 \rightarrow 11$; $ex5 \rightarrow 12$; $Nex4 \rightarrow 12$; $Pex4 \rightarrow 12$. **M** bezeichnet den Längenstandard.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle in der Sequenzierung gefundenen Polymorphismen durch den Restriktionsverdau bestätigt werden konnten. Allerdings wurden bei einigen Sequenzen, die als Wildtyp erschienen, im Verdau eine Heterozygotie nachgewiesen, was als technisches Problem in der Sequenzierung zu werten ist (s. S. 107).

3.1.4. Frequenz der Polymorphismen in der Kontrollgruppe

In einer Mikrotiterplatte mit 96 Kontrollpersonen wurden die Polymorphismen zusätzlich untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.2. dargestellt. Die Frequenzen sind jeweils für die Wildtypen (11), die heterozygoten (12) und homozygoten (22) Polymorphismusträger angegeben.

Tab. 3.2. Frequenzen der nachgewiesenen Polymorphismen in einer Kontrollgruppe aus Frankfurt.

<i>Polymorphismus</i>	<i>Wildtyp (11)</i>	<i>heterozygot (12)</i>	<i>homozygot (22)</i>
Loc390828 ex 2 / G375A	0,548	0,355	0,097
Loc390828 ex 3 / A429G	0,258	0,527	0,215
Loc390828 ex 4 / C594A	0,253	0,537	0,210
Loc390828 ex 5 / G825T	0,468	0,447	0,085
NDUFV2 ex 4 / A219T	0,800	0,190	0,010
PTPRM ex 20 / A4131G	0,653	0,274	0,073

3.2. Parametrische Kopplungsanalyse von PARK5 in einer Familie mit autosomal dominant vererbtem Morbus Parkinson

3.2.1. Zusammenstellung der Ergebnisse

Bei der Kopplungsanalyse (*Linkage*-Statistik) wird untersucht, ob in einem Kandidatengen ein Allel immer mit dem Phänotyp der Erkrankung vererbt wird. Somit gibt diese Untersuchung nicht Aufschluss über Art und Lokalisation der Mutation. Für die Kopplungsanalyse von PARK 5 auf Chromosom 4p14 wurden telomer- und centromerwärts vom Kandidatengen UCH-L1 Nukleotidrepeats festgelegt, die ungefähr drei Millionen Basenpaare voneinander entfernt sind. Nicht nur mit intergenischen Mikrosatelliten, sondern auch mit Hilfe eines intragenischen SNP wurde gearbeitet.

3.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

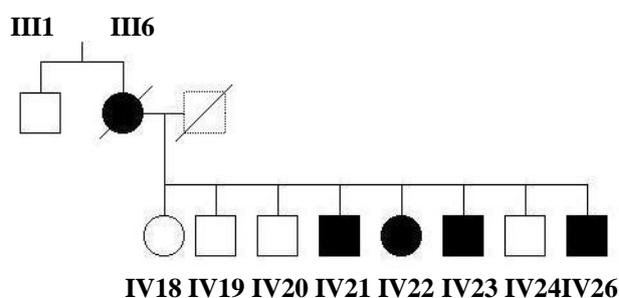


Abb. 3.15. Anteil des Stammbaums der spanischen Familie mit autosomal dominantem M. Parkinson. Der Stammbaum zeigt die erkrankte Person III6 und ihre acht Kinder IV18-26 von denen vier erkrankt sind. DNA des Ehemanns von III6 liegt nicht vor. Hier nicht gezeigt sind weitere Geschwister von III6 und die Eltern von III6. Hinweis: Ausgefüllte Symbole zeigen erkrankte Personen an.

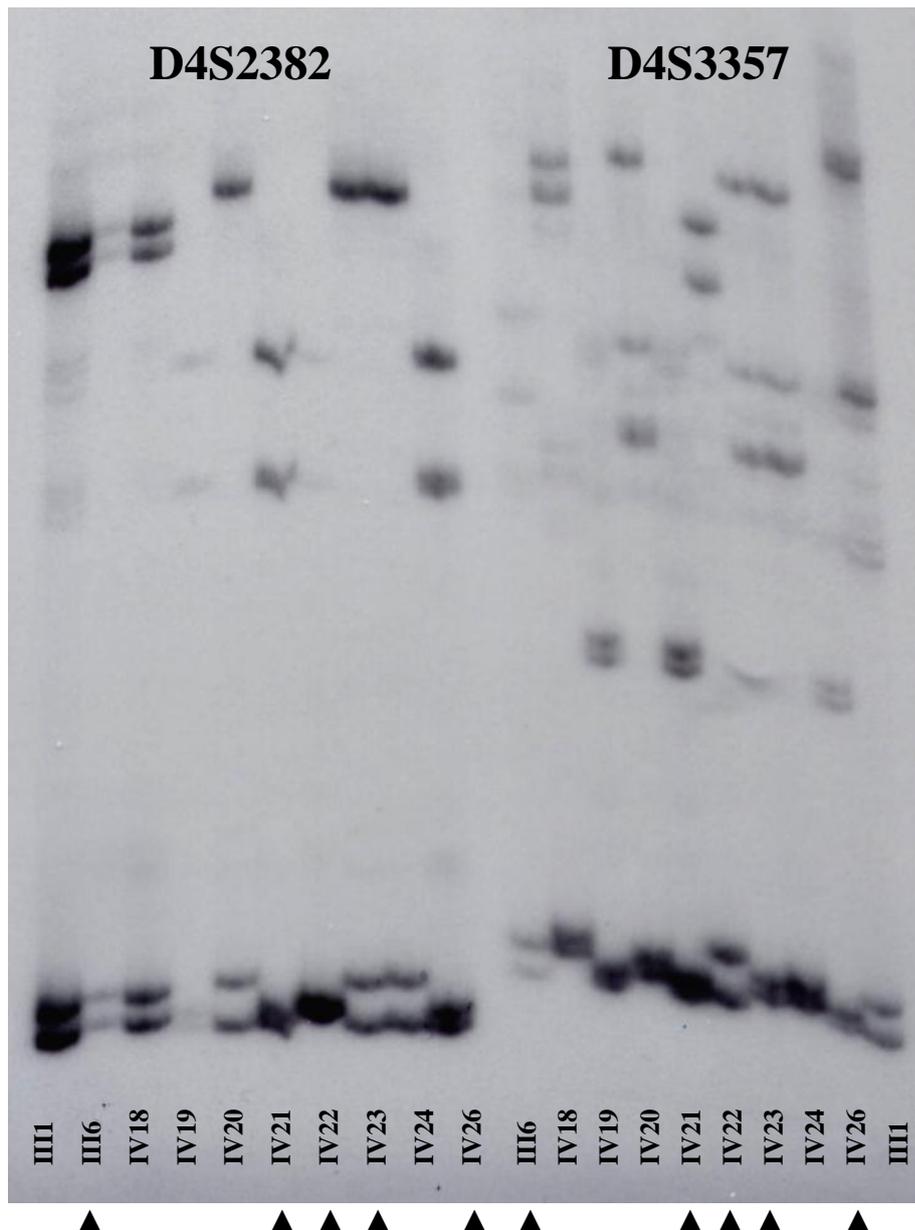


Abb. 3.16. Ergebnisse der Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei zehn Probanden der spanischen Familie. Hier ist links der Mikrosatellit D4S2382 nördlich von UCH-L1 und D4S3357 südlich von UCH-L1 dargestellt. Die unten stehenden Ziffern markieren die Probanden (siehe Abb. 3.15.). Jeder Proband weist in den Mikrosatelliten ein unterschiedliches Bandenmuster auf. Durch Bezifferung der Banden anhand ihrer Lokalisation sind für jeden Mikrosatelliten verschiedene Allele zuzuordnen. Somit wird jeder Person ein anderer Haplotyp zugewiesen. Durch Vergleich der Haplotypen kann eine *Linkage*-Statistik angefertigt werden. Diese gibt dann Auskunft darüber, ob ein Allel nur mit der Krankheit vererbt wird. Hinweis: Die schwarzen Dreiecke (▲) am Bildunterrand kennzeichnen definitiv erkrankte Personen.

3.2.3. Restriktionsverdau

Zusätzlich zu den Haplotypen aus der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde der Polymorphismus rs9321 in UCH-L1 untersucht. Dies hilft bei der Analyse, ob ein Allel mit der Krankheit assoziiert weitervererbt wird. Auch in der spanischen Familie ließ sich dieser Polymorphismus mittels Restriktionsverdau nachweisen. Dabei wurde die Sequenz aus UCH-

L1, die den SNP rs9321 enthält, amplifiziert und mit der Restriktionsendonuklease MspI geschnitten. Abb. 3.17. zeigt die Ergebnisse. Tab. 3.3. macht deutlich, wie sich der Basenaustausch in den Fragmentlängen beim Restriktionsverdau widerspiegelt.

Tab. 3.3. Erwartete Fragmentlängen durch den Restriktionsverdau mit MspI. Die Tabelle zeigt, dass bei Vorliegen eines Polymorphismus eine Restriktionsschnittstelle verschwindet und folglich das Fragment mit einer Länge von 141bp ungeschnitten bleibt. Beim Wildtyp wird dieses Fragment in zwei Fragmente mit einer Länge von 68bp und 73bp zerlegt. Heterozygote Träger zeigen somit zum einen das Fragment mit 141bp und zum anderen die Fragmente mit 68bp und 73bp Länge. Die Gesamtlänge des PCR-Produkts beträgt 390bp.

SNP	Wildtyp	Homozygot	Heterozygot
rs9321	27bp, 68bp, 73bp, 102bp, 120bp	27bp, 102bp, 120bp, 141bp	27bp, 68bp, 73bp, 102bp, 120bp, 141bp

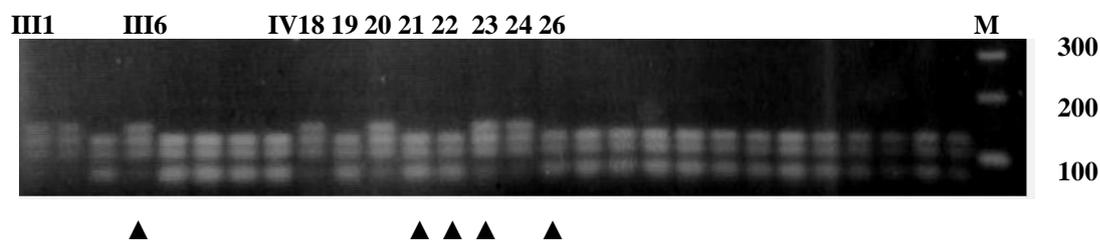


Abb. 3.17. Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese. Die Abbildung zeigt das differierende Bandenmuster in der Gelelektrophorese wenn der Polymorphismus vorliegt. In M ist ein Längenstandard aufgetragen. Die Proben IV19, 21, 22, 26 sind Wildtypen, bei denen keines der Allele den Polymorphismus trägt. Die Proben III1, III6, IV18, 20, 23, 24 zeigen den Polymorphismus in heterozygoter oder homozygoter Form. Dies ist hier schlecht differenzierbar, da sich Homo- und Heterozygote nur durch die 68bp und 73bp Banden unterscheiden. Im oberen Agarosegel ist eine konkrete Aussage nicht zu treffen. Die nicht beschrifteten Personen sind weitere gesunde Familienmitglieder. ▲ kennzeichnet definitiv erkrankte Personen.

Aufgrund der in Abb.3.17. angesprochenen Problematik wurden die unklaren Probanden nochmals getestet. In einer neuen Agarose-Gelelektrophorese konnte bestätigt werden, dass alle oben unklaren Probanden heterozygot für den Polymorphismus sind.

3.2.4. Auswertung der Ergebnisse

Die Auftrennung der Mikrosatelliten nach Größe mittels PAGE und der Restriktionsverdau eines Genabschnitts mit anschließender Gelelektrophorese ermöglichen die Ermittlung der Haplotypen. In Abb.3.18. sind die Haplotypen zusammengestellt.

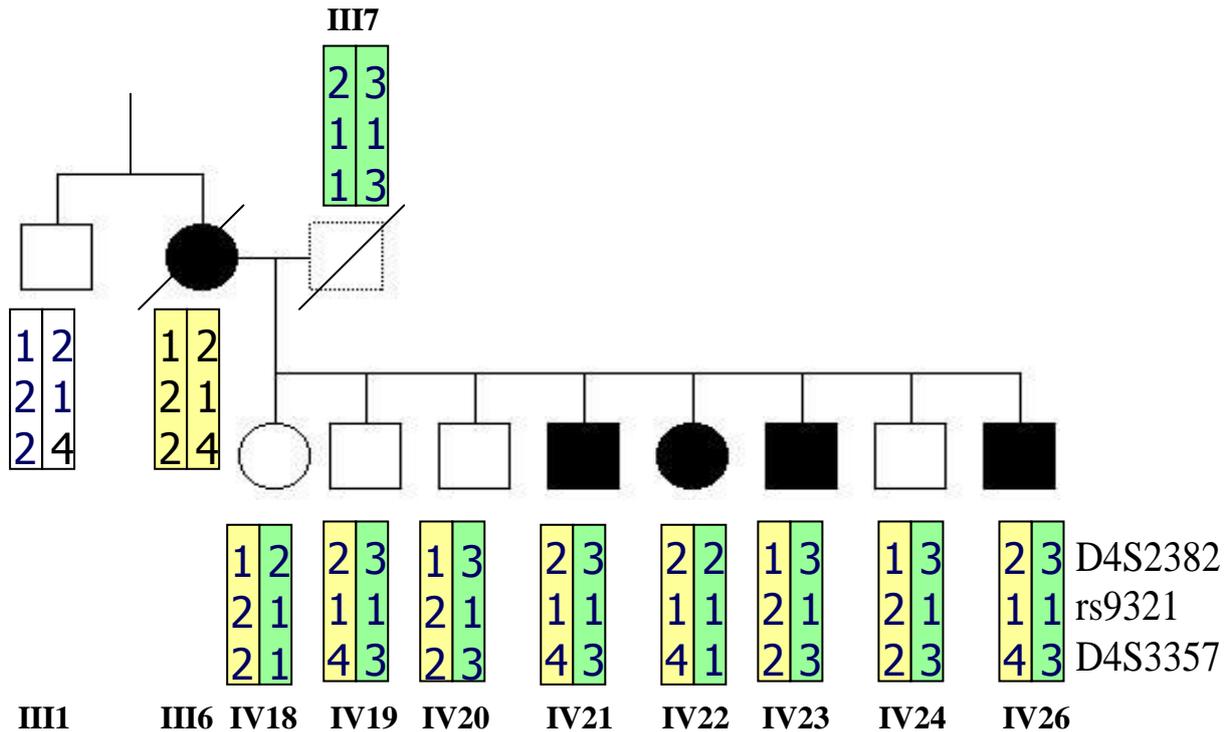


Abb. 3. 18. Kopplungsanalyse im Stammbaum der spanischen Familie mit autosomal dominantem M. Parkinson. Die ausgefüllten Symbole zeigen die erkrankten Personen. Die farbigen Balken zeigen die beiden Allele einer Person für die am rechten Rand aufgezeigten Marker. Die Allelkombination des Ehemanns III7 der Person III6 konnten durch die Allele der gemeinsamen Kinder rekonstruiert werden. Die Farbkodierung [gelb für die Mutter (III6) und grün für den Vater (III7)] zeigt, welches Allel bei den Kindern vom Vater bzw. von der Mutter vererbt wurde.

Die Abb.3.18. macht die Allelverteilung des Chromosoms 4p14 deutlich. Die erkrankte Person III6 hat neun Kinder, von denen IV21, IV22, IV23 und IV26 erkrankt sind. Eine weitere Tochter (IV25) stand nicht zur Verfügung. Drei der erkrankten Nachkommen (IV21, IV22, IV26) tragen den gleichen Haplotyp, den sie alle von der Mutter vererbt bekommen haben. Eines der gesunden Familienmitglieder (IV19) trägt den mütterlichen Haplotyp wie drei seiner erkrankten Geschwister. Der erkrankte Sohn IV23 trägt nicht das gleiche mütterliche Allel wie seine drei erkrankten Geschwister.

3.3. Assoziationsuntersuchung zweier Parkinson Kandidatengene anhand von *single nucleotide polymorphisms*

Anhand einer Assoziationsuntersuchung zwischen putativen Interaktionspartnern von PINK1 in einem Patienten- sowie Kontrollkollektiv sollte untersucht werden, ob bestimmte SNPs überzufällig häufig in einer Gruppe vorkommen.

Tritt dieser Fall ein, spricht man von einer Assoziation, das heißt, krankheitsverursachendes Allel und untersuchtes Allel liegen an zwei sehr nahe liegenden Genorten und werden deshalb zusammen vererbt. Eine bestimmte Genvariante (Allel) ist demnach mit einem erhöhten Krankheitsrisiko verbunden.

Die untersuchten Gene waren NME4 und MTIF3.

3.3.1. Restriktionsverdau

Einen Überblick der Polymorphismen verschafft Tab. 3.4.

Tab. 3. 4. Zusammenstellung aller wichtigen Informationen über die vier untersuchten Polymorphismen. Neben den Restriktionsenzymen und den Fragmentlängen in den verschiedenen Genotypen enthält die Tabelle auch die Lokalisation der Basen- und Aminosäureveränderungen.

<i>Gen / SNP</i>	<i>Enzym</i>	<i>Basen- austausch</i>	<i>Aminosäure- Austausch</i>	<i>Wildtyp</i>	<i>Homozygot</i>	<i>Heterozygot</i>
MTIF3 / rs10172	Bsa I	C905T	Tyr257Ala	194bp, 206bp	400bp	194bp, 206bp, 400bp
MTIF3 / rs7669	Sty I	C934T	Asp266Asp	41bp, 48bp, 79bp, 232bp	41bp, 48bp, 311bp	41bp, 48bp, 79bp, 232bp, 311bp
NME4 / rs8967	Bfa I	A712G	untranslatiert	39bp, 457bp	39bp, 107bp, 350bp	39bp, 107bp, 350bp, 457bp
NME4 / rs11538882	Xho I	A391G	Ser120Ser	132bp, 148bp	281bp	132bp, 148bp, 281bp

Abbildung 3.19. zeigt die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese. Die beiden SNPs rs10172 (MTIF3) und rs8967 (NME4) konnten in dem hier untersuchten Kollektiv nicht

beobachtet werden. Keine der Kontrollpersonen oder Patienten zeigt Hetero- oder Homozygotität für diese Polymorphismen.

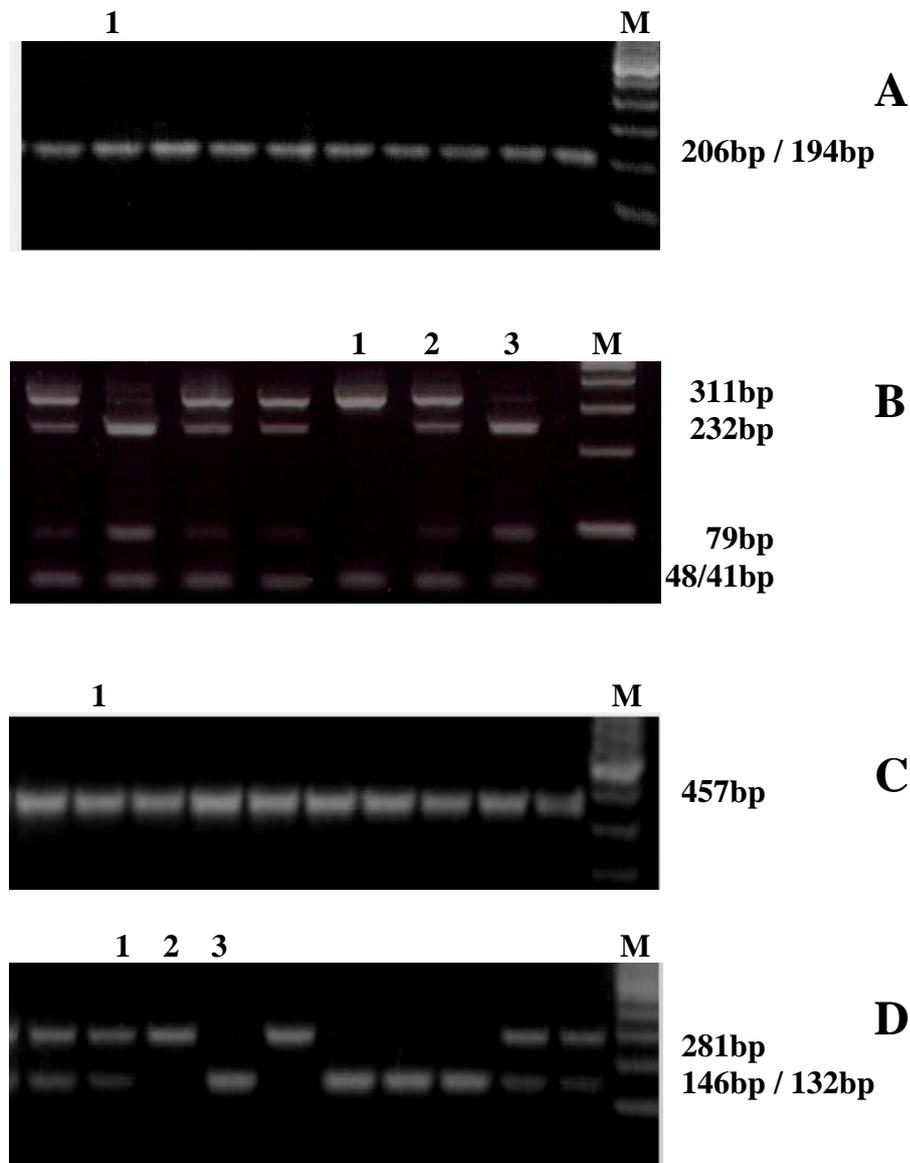


Abb. 3.19. Agarose-Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau (A-D). **A MTIF3 rs10172:** Bild A zeigt einen Ausschnitt aus der Patientengruppe. Es ist kein Polymorphismus vorhanden. Probe 1 mit einem Bandenmuster bei circa 206bp / 194bp gehört zu den Wildtypen, bei denen das Restriktionsenzym Bsa I das 400bp lange PCR-Produkt in zwei circa 200bp lange Stücke schneidet. **B MTIF3 rs7669:** Bild B, ein Ausschnitt aus der Patientengruppe weist unter Probe 1 einen Homozygoten auf; das PCR-Fragment ist in ein 311bp und zwei circa 41bp und 48bp lange Stücke geschnitten. Dagegen ist in Probe 2 ein Heterozygoter zu erkennen, der nur auf einem Chromosom den Polymorphismus trägt und deshalb eine zusätzliche 232bp Bande hat. Probe 3 ist ein Wildtyp, der nur die 232bp Bande trägt. **C NME4 rs8967:** Auch unter C ist kein Polymorphismus nachweisbar, in Probe 1 ist nur die 457bp lange Bande zu erkennen, eine zusätzliche 39bp Bande ist im Agarosegel nicht erfassbar. **D NME4 rs1153882:** Probe 1 zeigt hier einen Heterozygoten für den Polymorphismus, deshalb ist eine 140bp und 281bp Bande zu sehen. Dagegen ist in Probe 2 ein Homozygoter für den Polymorphismus aufgetragen. Es ist nur die 281bp Bande sichtbar. In Probe 3 ist der Wildtyp zu sehen. Beachte: Unter M ist ein Längenstandard aufgetragen.

3.3.2. Auswertung der Ergebnisse

Da sich für die zwei SNPs rs10172 (aus MTIF3) und rs8967 (aus NME4) kein Polymorphismus ergab, werden beide im Folgenden nicht mehr berücksichtigt. Dagegen kann für die Verteilung von Wildtypen sowie Hetero- und Homozygoten für die SNPs rs7669 (MTIF3) und rs11538882 (NME4) eine statistische Auswertung hinsichtlich unterschiedlicher Verteilung in Patienten- und Kontrollgruppen erfolgen. Es werden zum einen die Verteilungsunterschiede der Allele (allelische Frequenz) zum anderen die Allelkombinationen (genotypische Frequenz) auf Signifikanz überprüft.

Tab. 3.5. Polymorphismus rs7669 im Gen MTIF3: Darstellung der Allel- und Genotypfrequenzen in zwei unabhängigen Fall-Kontroll-Studien (F und T). Die Daten sind in der letzten Zeile zusammengefasst (F+T). **PD** Parkinson's disease; **N** Anzahl der Individuen. **a:** Signifikanz für den Vierfeldertafeltest bei Annahme Allel 1 sei dominant und Allel 2 rezessiv ($p_a = 0,034$); $RR = 0,514$ (KI 95%: 0,277 - 1,952) relatives Risiko für homozygote Polymorphismusträger zu erkranken. **b:** Signifikanz für den Chi-Quadrat-Test $\chi^2 = 6,84$ ($p_{b1} = 0,033$); Signifikanz für das Hardy-Weinberg-Equilibrium ($p_{b2} = 0,015$); $RR = 1,23$ (KI 95%: 1,05 - 1,44) relatives Risiko für heterozygote Polymorphismusträger zu erkranken. **c:** Signifikanz für den Vierfeldertafeltest bei Annahme Allel 1 sei dominant und Allel 2 rezessiv ($p_{c1} = 0,022$); Signifikanz für den Chi-Quadrat-Test $\chi^2 = 9,97$ ($p_{c2} = 0,007$); Signifikanz für das Hardy-Weinberg-Equilibrium ($p_{c3} = 0,003$); $RR = 0,67$ (KI 95%: 0,48 - 0,94) relatives Risiko für homozygote Polymorphismusträger zu erkranken; $RR = 1,18$ (KI 95%: 1,04 - 1,34) relatives Risiko für heterozygote Polymorphismusträger zu erkranken.

		Allelfrequenzen		Genotypfrequenzen		
rs7669	N	C	T	CC	CT	TT
PD/F	192	0,797	0,203	0,620	0,354	0,026 ^a
Kontrolle/F	192	0,776	0,224	0,625	0,302	0,073 ^a
rs7669	N	C	T	CC	CT	TT
PD/T	261	0,782	0,218	0,602	0,360 ^{b1/2}	0,038
Kontrolle/T	178	0,815	0,185	0,691	0,247 ^{b1/2}	0,062
rs7669	N	C	T	CC	CT	TT
PD/F+T	453	0,788	0,212	0,609	0,358 ^{c1/2/3}	0,033 ^{c1/2/3}
Kontrolle/F+T	370	0,795	0,205	0,657	0,275 ^{c1/2/3}	0,068 ^{c1/2/3}

Tab. 3.6. Polymorphismus rs11538882 im Gen NME4: Fall-Kontroll-Studie in der Gruppe F. **PD** Parkinson's disease; **N** Anzahl der Individuen. Da hier keine signifikanten Unterschiede deutlich wurden, wurde dieser Polymorphismus nicht in einer weiteren Kontrollgruppe untersucht.

		Allelfrequenzen		Genotypfrequenzen		
rs11538882	N	1	2	11	12	22
PD/F	190	0,558	0,442	0,295	0,526	0,179
Kontrolle/F	185	0,586	0,414	0,329	0,514	0,157

Für die informativen Polymorphismen rs7669 (MTIF3) und rs11538882 (NME4) ergab die statistische Auswertung nur im Falle von rs7669 einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Patientengruppe (Gruppe F). Aufgrund dieses Unterschieds wurde eine zweite unabhängige Fall-Kontroll-Gruppe (Gruppe T) hinzugezogen. Diese Untersuchung wurde im Fall des Polymorphismus rs11528882 nicht durchgeführt, weil hier ein signifikantes Ergebnis in der Gruppe T unwahrscheinlich erschien.

Wie die Tab. 3.5. zeigt, ergab sich in Gruppe F ein signifikanter Wert für den Vierfeldertafeltest, unter der Annahme Allel eins sei dominant gegenüber dem Allel zwei ($p_{a1} = 0,034$). Liegt nun das rezessive Allel homozygot vor, so fällt in Tab.3.5. die viel höhere Frequenz dieses Genotyps für die Kontrollgruppe (0,073) im Gegensatz zur Patientengruppe (0,026) auf. Das Relative Risiko für homozygote Polymorphismusträger zu erkranken betrug $RR = 0,514$ (Konfidenzintervall KI 95%: 0,277 - 0,952). Andere statistische Tests wie der Chi-Quadrat-Test und das Hardy-Weinberg-Equilibrium lieferten zwar keine signifikanten Ergebnisse, zeigten aber Tendenzen ($\chi^2 = 5,06$ $p = 0,08$); (HWE $p = 0,07$).

Bei Betrachtung der Verteilung des Polymorphismus in Gruppe T fiel ein signifikanter Wert für den Chi-Quadrat-Test auf ($\chi^2 = 6,84$ $p_{b1} = 0,033$). Auch das Hardy-Weinberg-Equilibrium zeigte Signifikanz ($p_{b2} = 0,015$). Für heterozygote Polymorphismusträger bedeutet dies ein Relatives Risiko von $RR = 1,23$ (KI 95%: 1,05 - 1,44) zu erkranken. Hier sei noch erwähnt, dass der Vierfeldertafeltest, bei Annahme Allel zwei sei dominant gegenüber Allel eins, eine Tendenz zur Signifikanz zeigte ($p_{b3} = 0,056$).

Da beide Studien Signifikanz in unterschiedlichen Tests zeigen, wurden die Ergebnisse aus der Gruppe F und T summiert (F + T). Dabei ergab sich eine Signifikanz im Vierfeldertafeltest bei Annahme Allel eins sei dominant gegenüber Allel zwei ($p_{c1} = 0,022$). Für homozygote Polymorphismusträger ist das relative Risiko an Parkinson zu erkranken $RR = 0,67$ (KI 95%: 0,48 - 0,94). Im Chi-Quadrat-Test ist der Wert signifikant ($\chi^2 = 9,97$ $p_{c2} = 0,007$). Auch beim Hardy-Weinberg-Equilibrium ist eine Signifikanz deutlich ($p_{c3} = 0,003$). Für heterozygote Polymorphismusträger besteht somit ein Relatives Risiko von $RR = 1,18$ (KI 95%: 1,04 - 1,34) zu erkranken.

Diese Ergebnisse bedürfen weiterer Betrachtung in der Diskussion (s. Kapitel 4.3.)

4. Diskussion

4.1. Sequenzierung von vier Kandidatengenem auf Chromosom 18p11 in einer Familie mit fokaler Torsionsdystonie (DYT7)

4.1.1 Analyse der Ergebnisse

Bei der Suche nach der Mutation für den Locus DYT7 wurden die vier Kandidatengene LOC390828, ZFP161, NDUFV2 und PTPRM sequenziert. Es wurden die exonischen Sequenzen in zwei Patienten aus einer deutschen Familie mit autosomal dominant vererbter fokaler zervikaler Torsionsdystonie mit den Sequenzen von zwei Kontrollen verglichen.

Die Sequenzierung erbrachte keine Mutation in den kodierenden Sequenzen, die nur mit der Erkrankung auftrat. Die gefundenen Polymorphismen (vergl. Tab. 3.1.), die anfänglich als mögliche Mutationen angesehen wurden, konnten mittels Restriktionsverdau in den vier Personen sowie fünf weiteren erkrankten Familienmitgliedern und einer weiteren Kontrolle bestätigt werden (vergl. Abb. 3.8 bis 3.14.). Dementsprechend folgte die Beantwortung der Frage, ob in einer normalen Kontrollpopulation bestehend aus 96 Personen diese Polymorphismen zu finden sind. Die Ergebnisse des Restriktionsverdaus in der Kontrollgruppe belegten, dass es sich bei diesen Polymorphismen nur um *single nucleotide polymorphisms* (SNP) handelte, die keine Pathogenitätsfaktoren bedeuteten, da sie in der untersuchten Kontrollgruppe nachzuweisen waren (vergl. Tab. 3.2.).

Infolgedessen scheint auch ein Abgleich der Polymorphismen mit der SNP Datenbank der NCBI Homepage als erforderlich. Im Gen LOC390828 wurden drei bereits bekannte Polymorphismen (rs449996 / rs450497 / rs454719) gefunden und bestätigt. Für den SNP rs449996 gibt die NCBI Homepage eine Heterozygotenrate von 0,428 an. In dieser Studie wurde die Heterozygotenrate auf 0,527 festgelegt. Bei den anderen beiden SNPs war die angegebene Frequenz der Heterozygoten unbestimmt, wohingegen hier Werte von 0,537 und 0,447 gefunden wurden (vergl. Tab. 3.2.). Drei weitere SNPs in diesem Gen (rs384790 / rs9948183 / rs1848894) wurden beim Sequenzieren nicht bestätigt. Die NCBI Datenbank gibt für die ersten beiden erneut eine unbekannte Heterozygotenrate an. Für den letzten liegt die Frequenz bei 0,089.

Im Gen ZFP161 konnte mit der Sequenzierung der vier Personen keiner der bekannten SNPs nachgewiesen werden. Die NCBI Homepage gibt für alle diese Polymorphismen eine unbestimmte Heterozygotenrate an.

Der einzige heute bekannte Polymorphismus rs906807 (Ala29Val) im Gen NDUFV2 wurde in keiner der untersuchten Personen nachgewiesen. Interessanterweise ist dieser SNP mit einem erhöhten Risiko für sporadischen M. Parkinson assoziiert. Wobei homozygote Träger signifikant mehr in der Patientengruppe (23,8%) gefunden wurden als in der Kontrollgruppe (11,5%). Biochemische Konsequenz des Aminosäureaustauschs ist die Änderung am C-Terminus des Proteins von einer α -Helix- in eine β -Faltblatt-Struktur. Dies könnte Einfluss auf das Schneiden des mitochondrialen Signalpeptids haben und so die Menge der 24kDa - Untereinheit von Komplex I der Atmungskette beeinflussen (Hattori et al. 1998). Der Polymorphismus, der in Exon 4 des Gens (s. Tab. S.97) gefunden wurde (Gly73Gly / Het.-Rate 0,190), ist bis jetzt noch nicht erwähnt. Da bei der Vererbung der fokalen Torsionsdystonie von einer reduzierten Penetranz auszugehen ist und *modifier genes* Einfluss auf die klinische Manifestation haben, könnte eine die Krankheit verursachende Mutation auch mit geringer Häufigkeit in der Kontrollgruppe zu erwarten sein.

Im Gen PTPRM wurde nur der Polymorphismus rs593978 mit einer Het.-Rate von 0,274 gefunden. Dagegen ist die Heterozygotenrate auf der NCBI Datenbank auf 0,428 festgelegt. Nicht beobachtet wurden die Polymorphismen rs2230601 (Het.-Rate 0,495) und rs3744983 (0,014). Der Polymorphismus rs593950 (Thr1385Thr), der nur in einem Patienten heterozygot vertreten war, konnte nicht mit einem Verdau bestätigt werden, da für dieses Palindrom keine Restriktionsendonuklease existierte. Alle bekannten SNPs in PTPRM sind ohne Aminosäureaustausch.

Gründe für die differierenden Ergebnisse zwischen den hier gefundenen SNPs und den SNPs in der Datenbank des NCBI sind auf Untersuchungsgruppen mit genetisch differierender Herkunft zurückzuführen. So kann sich die Heterozygotenrate von Population zu Population ändern. Der Grund warum einige SNPs überhaupt nicht gefunden wurden, kann entweder auf den ethnischen Ursprüngen basieren oder darauf, dass einige SNPs in großen Studien nur bei einzelnen Personen gefunden wurden. In diesem Fall wird keine Heterozygotenrate angegeben. Wohlmöglich bestehen hier noch unbekannte Prädispositionen für polygenetisch determinierte Krankheiten.

Demzufolge sind die kodierenden Sequenzen dieser vier Gene ohne Einfluss auf die Krankheit. Die vollständige Sequenzierung und die Genauigkeit mit der die Elektropherogramme ausgewertet und verglichen wurden (vergl. 3.1.1.) sprechen gegen einen irrtümlichen Ausschluss der Kandidatengene. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt

werden, dass sich eindeutig mutationsfreie Sequenzen im Elektropherogramm als Mutationen im Restriktionsverdau bestätigten. So ist bei rs449996 (LOC390828 exon 3) in der Rückwärtssequenz (vergl. Abb.3.2.) der heterozygote Basenaustausch nicht zu erkennen, obwohl dieser in der Vorwärtssequenz zu sehen ist. Der Verdau in Abb. 3.9. bestätigt die Heterozygotie der Person II3.

Ähnliches wird auch im Exon 4 dieses Gens deutlich. Was bei Person 2121 (auch in BLOCex4R1) sowie Person 2222 als Wildtypsequenz erscheint (vergl. Abb.3.3.), wird dagegen im Restriktionsverdau als Heterozygotie deutlich. Da alle sequenzierten Probanden im Restriktionsverdau als heterozygot definiert wurden (II4, III25, II3, III24), muss der Unterschied in den Elektropherogrammen auf technischer Ursache beruhen (Signale zu schwach; schwer zugängliche DNA-Struktur).

Bei Exon 5 im Gen PTPRM ergibt sich einzig der Fall, dass Person 1 in der Rückwärtssequenz als heterozygot erscheint (vergl. Abb. 3.6.), was sich im Verdau nicht nachweisen lässt (vergl. Abb. 3.13. Person II4). Allerdings ist das Elektropherogramm dieser Person in der Abb.3.6. nicht deutlich (starker Hintergrund), was die Charakterisierung erschwert.

Es bleiben bei diesen vier Genen die intronischen Sequenzen und die Promotorregion als mögliche Genorte mit Mutation übrig. Eine Sequenzierung ist in Anbetracht der Größe der Introns (Größe des Gens PTPRM ca. 800kb!) mit dieser Methode eine nicht zu bewältigende Aufgabe. Bemühungen und Konzentration sollten dagegen eher in die Sequenzierung weiterer DYT7 Kandidatengene gelegt werden (s.u.). So wurden beim X-chromosomal rezessiven Parkinson-Dystonie Syndrom (DYT3) bis dato alle kodierenden Sequenzen erfolglos analysiert (Bandmann, Müller 2002). Es wurden krankheitsspezifische Polymorphismen entdeckt, die in Exons von multiplen Transkriptomsystemen lokalisiert waren (Nolte et al. 2003). Allerdings könnte auch strukturelles *rearrangement* eine Rolle spielen. DYT3 ist folglich ein Beispiel für eine Erkrankung, bei der der genetische Hintergrund schwer zu erfassen ist.

Neben den Möglichkeiten, die DYT7 Mutation befände sich auf intronischen Sequenzen besteht auch Anlass zur Annahme, dass eine heterozygote Deletion oder Duplikation eines ganzen Exons Krankheitsursache sein kann. Dieser Fall ist durch herkömmliche Sequenzierung nicht nachzuweisen, sondern durch quantitative PCR oder die MLPA-Technik (*multiplex ligation probe amplification*) So kann bedingt durch ein fehlerhaftes

stöchiometrisches Verhältnis der einzelnen Domänen die korrekte Zusammensetzung und Faltung der Proteine beeinträchtigt sein.

Beispielhaft dafür sind PARK2 und PARK4. Bei beiden Parkinson Genloci wurden in einigen Familien nicht die herkömmlichen Mutationen nachgewiesen. Es stellte sich heraus, dass bei PARK2 (Parkin) in einigen Patienten komplette Exons hetero- oder homozygot fehlten oder dupliziert waren. Dies macht Gen-Dosis Studien bei Untersuchungen unerlässlich (Hedrich et al. 2001). So wurde bei PARK4 jahrelang die Annahme vertreten, es handle sich auf Chromosom 4 um eine anderes Gen als bei PARK1 (gleicher Lokus), bis eine α -Synuklein Lokustriplikation das Gegenteil bewies (Singleton et al. 2003).

4.1.2 Auswahl und Charakterisierung der Kandidatengene

Letztlich werfen die negativen Ergebnisse auch die Frage auf, wie gut die Auswahl der Kandidatengene war. Die Suche erfolgte basierend auf heute bekannten Dystonie Genen. Die Mutationen dieser Gene sind krankheitsverursachend und zeigen pathobiochemische Wege auf, die auch in der Ätiologie der hier untersuchten fokalen Torsionsdystonie eine Rolle spielen könnten. So werden mit LOC390828 ein mitochondriales Protein, mit ZFP161 ein Protein im Dopamin-Signalweg, mit NDUFV2 ein Protein der mitochondrialen Atmungskette und mit PTPRM ein Protein für das neuronale Wachstum erfasst.

Das Protein **LOC390828** mit unbekannter Funktion scheint sequenzverwandt mit einem Mitochondrientransporter zu sein. Hinweise auf mitochondriale Dysfunktionen bei Dystonie geben Untersuchungen von Benecke et al. (1992), die besagen, dass Dystoniepatienten eine signifikant erniedrigte Komplex I Aktivität aufweisen. Viel deutlicher wird die Wichtigkeit der mitochondrialen Transporter im Mohr-Tranebjaerg Syndrom (MTS), einer X-chromosomal rezessiven neurodegenerativen Erkrankung mit Mutation im DDP1 (DFN-1) Gen, das für ein intermembranäres mitochondriales Protein kodiert, welches für den Proteinimport essentiell zu sein scheint (Koehler et al. 1999).

Die weitere Verbindung zwischen Dystonie und mitochondrialer Fehlfunktion zeigt die neurodegenerative Lebersche Optikusatrophie (LHON) mit genetischem Defekt im Komplex I der Atmungskette (mitochondrial kodierte Untereinheit MTND4). Verursacht ist die Dystonie in dieser Erkrankung durch bilaterale Basalgangliendegeneration (Wallace, Murdock 1999).

Die Untersuchung von **NDUFV2** erfolgte zum einen unter dem oben genannten Gesichtspunkt der Dysfunktion von Atmungskettenkomplexen in neurologischen Erkrankungen, zum anderen durch die Involvierung des Gens in verschiedene neurologische

Krankheitsbilder. Schon 1988 wurde in Patienten mit mitochondrialen Myopathien eine Komplex I Aktivitätsminderung durch den Verlust dieser 24kDa Untereinheit beschrieben (Schapira et al. 1988). Interessanterweise ist ein Polymorphismus (Ala29Val) mit signifikant erhöhtem Parkinsonrisiko assoziiert (Hattori et al. 1998). Wohingegen in der asiatischen Bevölkerung Assoziationen zwischen bestimmten NDUFV2 Polymorphismen und bipolaren Psychosen (manisch depressive Erkrankungen) nachgewiesen wurden (Washizuka et al. 2003; Washizuka et al. 2004). Nicht außer Acht zu lassen sind Mutationen in NDUFV2, die für hypertrophische Kardiomyopathie und Enzephalopathie verantwortlich sind (Bénil et al. 2003). Erwähnenswert ist das Vorkommen von Mutationen in den Genfamilien der NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) Flavoproteine (NDUFV) und NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) Fe-S Proteine (NDUFS), die phänotypisch ein Krankheitsspektrum von letaler Enzephalomyopathie ohne Laktatazidose bis zum Leigh Syndrom abdecken (Schuelke et al. 1999). Einige Formen von sporadischem Leigh Syndrom zeigen Dystonien als Hauptsymptomatik mit Auffälligkeiten der Basalganglien in MRT Aufnahmen (Lera et al. 1994). Die mit NDUFV2 assoziierten Krankheitsbilder machen dieses Protein auch zu einem aussichtsreichen Kandidaten für den M. Parkinson und weitere neurodegenerative Erkrankungen.

Das Gen **ZFP161** gehört zu den Zink-Finger Proteinen und wurde aufgrund seiner Aktivierungsfunktion der Transkription des Dopamintransporters (DAT) ausgewählt (Lee et al. 2004a). Die Existenz von L-Dopa-responsiven Dystonien ermöglicht eine Beteiligung des Dopamin-Signalwegs auch in der hier untersuchten fokalen Torsionsdystonie. DYT5 ist der Locus mit Mutation im Gen für die GTP Cyclohydrolase I (GCH I), dessen Produkt entscheidend für die Tetrahydrobiopterin-Synthese (Co-Faktor der Dopamin-Synthese) ist (Ichinose et al. 1994). Eine rezessive Form dieser Dystonie (DYT5b) wird durch Mutationen in der Tyrosinhydroxylase (TH) hervorgerufen (Klein 2005). Da Dystonie und M. Parkinson möglicherweise einen gemeinsamen Teil im Dopamin-Signalweg einnehmen, ist ZFP161 auch ein guter Kandidat für andere Basalganglienerkrankungen. Allerdings zeigte sich hier bei der Sequenzierung dieses Gens in der DYT15 Familie keine Mutation (Han et al. 2007).

Das neuronal exprimierte **PTPRM** gehört zur Familie der Protein Tyrosin Phosphatasen, die die Aufgabe des zellulären Wachstums und der Differenzierung übernehmen (Suijkerbuijk et al. 1993). So hat speziell PTPRM die Funktion die zelluläre Adhäsion und das neuronale Wachstum zu fördern. Neuronales Wachstum wird dabei von PTPRM alleine reguliert oder

über N-Cadherin vermittelt (Burden-Gulley, Brady-Kalnay 1999). Die Phosphatase-Funktion kann durch oxidativen Stress, der zu Dimerisierung oder Inaktivierung des Proteins führt, moduliert werden (Blanchetot et al. 2002). PTPRM Inaktivierung in Mäusen verursachte Defizite in der Organisation des Hippocampus, eine abnorme neuronale Innervation sowie Defekte in der Hirnentwicklung. Dennoch wird eine Involvierung in die neuronale Hirnfunktion des Erwachsenen nicht ausgeschlossen (Koop et al. 2003). Gleichzeitig ist für PTPRM eine Regulierung der mRNA Expression der K^+ -Kanal Gene nachgewiesen worden (Hershman, Levitan 2000). Denkbar wäre eine Auswirkung der PTPRM Funktion auf bestimmte Neurone, die bei Ausfall eine veränderte neuronale Aktivität bewirken. Obwohl auch von der Arbeitsgruppe um David Grimes als hochputatives Kandidatengen anerkannt, zeigte sich hier in der DYT15 Familie keine Mutation (Han et al. 2007).

Die Sequenzierung ist momentan die einzige Methode, die die Aufschlüsselung der genomischen Sequenz ermöglicht. Da hier eine chromosomale Kandidatenregion (18p11) durch einen Genomscan identifiziert wurde, liegt es an der Auswahl des richtigen Kandidatengens und an der Genauigkeit der Auswertung der Patienten- und Kontrollsequenzen die Mutation zu finden. Da aber die Kandidatenregion 30cM umfasst, sollte über eine hochauflösende Feinkartierung der Krankheitslokus eingegrenzt werden, bevor weiter sequenziert wird.

4.1.3. Ausblick

Die DYT7 Region bietet noch weitere interessante Kandidatengene, die sequenziert werden können.

Zum einen handelt es sich dabei um **USP14**, eine Ubiquitin spezifische Protease. Bei an Ataxie leidenden Mäusen (*ax^J*) wurde eine Mutation in diesem Protein gefunden, die im zentralen und peripheren Nervensystem die synaptische Übertragung verändert. Neurodegeneration und Proteineinschlüsse, wie sie bei M. Parkinson, SCA1 und der *gad* Maus vorkommen, wurden nicht entdeckt. Von USP14 ist bekannt, dass es Monoubiquitin von markierten Proteinen abzutrennen vermag und somit die Proteine der synaptischen Transmission reguliert (Wilson et al. 2002). Die Involvierung von USP14 in das proteinabbauende System, die Aufgabe der synaptischen Übertragung und die Tatsache, dass Mutationen in homologen Genen bei Mensch und Maus nicht den gleichen Phänotyp zeigen (Gispert et al. 2003; Saigoh et al. 1999), macht USP14 zu einem interessanten Kandidaten für Dystonie und andere neuromuskuläre Erkrankungen.

Ein weiterer Kandidat ist **ADCYAP1** (PACAP = Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide), ein Mitglied in der Familie der Vasoaktiven Intestinalen Peptide (VIP), das in PACAP^{-/-} Mäusen zu Verhaltensauffälligkeiten führte. Die Mäuse zeigten eine verminderte Angschwelle, Hyperaktivität und explosionsartige Sprünge. Als Grund dessen wurde der erniedrigte 5-Hydroxyindolacetat-Spiegel (Serotonin-Metabolit) im Kortex und Striatum angenommen. Durch die Ergebnisse im Tier-Modell könnte PACAP (über die Rezeptoren VPAC_{1/2}) eine regulatorische Funktion in psychomotorischen Abläufen zukommen (Hashimoto et al. 2001).

PACAP wurde über den Rezeptor PAC1 eine Stimulierung in der neuronalen Stammzellproliferation zugewiesen. Diese Ergebnisse gelten für Stammzellen in erwachsenen Tieren. Der Signalweg wird über Phospholipase C γ / Proteinkinase C vermittelt. Gleichzeitig stimuliert PACAP die Tyrosinhydroxylase-Expression, was diesem Protein in der Substantia nigra Gewicht verleiht, da hier die PACAP-Synthese dominiert (Mercer et al. 2004).

18p kodiert außerdem für ein muskuläres Protein: **MYOM1**. MYOM1 kodiert für Myomesin1, ein Verbindungsprotein zwischen den Titinfilamenten und der M-Bande des Muskels. Es existiert keine Literatur zu den funktionellen Aspekten dieses Proteins.

EPB41L3 (DAL-1/Protein4.1B) trägt zwar den Namen eines erythrozytären Membranproteins, ist aber ein gehirnspezifisches Protein aus der Gruppe der 4.1 Proteine. DAL-1 übernimmt noch unklare Funktionen im Zellwachstum, doch viel entscheidender sind dessen Interaktoren, die in die Gruppe der 14-3-3 Proteine gehören. Diese spielen wiederum eine Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen. So wurden DAL-1 die 14-3-3 Isoformen β , γ und η als Bindungspartner an der Zellmembran zugeordnet (Yu et al. 2002). 14-3-3 Proteine werden am meisten im Gehirn produziert und regulieren die Zellteilung, Signaltransduktion und Apoptose, indem sie als Adapterproteine und Chaperone fungieren (Berg et al. 2003). Dabei wurden Polymorphismen in 14-3-3 zeta-Homologen mit Verlust der Bindungsfähigkeit an die Tyrosinhydroxylase bei Parkinsonpatienten gefunden (Mosbacher et al. 2005). Auch für die DYT15 Familie ist dieses Protein aufgrund der Strukturverwandtschaft zum ϵ -Sarkoglykan Gen (DYT11, Myoklonus-Dystonie) ein interessanter Kandidat, eine Mutation wurde allerdings nicht gefunden (Han et al. 2007).

LAMA1 wurde bei der Myoklonus-Dystonie (DYT15) als eines der aussichtsreichsten Kandidatengene angesehen (Grimes et al. 2002), allerdings konnte keine ursächliche Mutation

gefunden werden. Die Tatsache, dass die Patienten der DYT15 Familie alle homozygot für bestimmte SNPs in diesem Gen waren, hätte auf eine Deletion eines Allels hinweisen können, was aber in Gen-Dosis Studien ausgeschlossen werden konnte (Han et al. 2007).

LAMA1 gehört zur Gruppe der Laminine und wurde in Gehirnen von Alzheimerpatienten in überexprimierter Form gefunden. Co-Immunoprecipitationen lokalisierten Laminin-1 mit dem β -Amyloid-Precursor Protein in senilen Plaques. Gliazellen des frontalen Kortex zeigten bei Patienten eine ansonsten unphysiologische Laminin Expression (Palu, Liesi 2002).

VAPA (VAP33) ist ein VAMP-assoziiertes Protein (VAMP = Vesikel assoziiertes Membran Protein). Das Protein wird unter anderem am meisten in Gehirn und Skelettmuskel exprimiert und scheint Einfluss auf Vesikelfusion, Exozytose und neuronale Transmission zu haben (Weir et al. 1998). Das bei Dystonien therapeutisch wirksame Botulinumtoxin wirkt als Neurotoxin an der neuromuskulären Endplatte, indem es die Erregungsübertragung vom Nerv auf den Muskel und somit die muskuläre Kontraktion hemmt. Als Zink-Endopeptidase ist es in der Lage Proteine des Vesikelfusionsapparates zu spalten und somit die Exozytose der Vesikel zu verhindern (Naumann 1998). Aufgrund dieser pathobiochemischen Überlegungen ist auch VAPA ein aussichtsreiches Kandidatengen.

Die Vielfalt der bisher sequenzierten Gene und die Möglichkeiten der noch ausstehenden Gene spiegelt auch die Verschiedenheit der heute bekannten Dystonie Gene wider. Genauso wie die Genotypen und die Pathomechanismen variieren, so unterschiedlich sind auch die phänotypischen Merkmale. Phänotypisch unterscheiden sich selbst die gleichen Genotypen, wie bei DYT1 (GAG Deletion) zu sehen ist, da in dieser Erkrankungsform generalisierte oder auch nur fokale Typen (Schreibkrampf) vorkommen (Kabakci et al. 2004). So ist das ATP-Bindungsprotein TorsinA an der Lokalisation von intermembranären Proteinen (DAT, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Ionen-Kanäle) beteiligt (Torres et al. 2004), wohingegen das neu entdeckte Gen MR-1 (DYT8, PNKD) im Detoxifizierungsprozess von Produkten des oxidativen Stress involviert ist (Lee et al. 2004b), und für DYT12 (RDP) Mutationen in einer ATP-abhängigen Na^+/K^+ Pumpe verantwortlich sind (Carvalho Aguiar et al. 2004). Vom momentanen Forschungsstandpunkt haben alle diese Proteine keine gemeinsame Endstrecke. Es bleibt unbeantwortet, ob überhaupt eine gemeinsame neuropathologische Genese existiert.

Die Schwierigkeit in der Forschung mit der Torsionsdystonie hat verschiedene Gründe. Einerseits ist die Dystonie eine neuromotorische Erkrankung, andererseits hat sie Auswirkung

auf Psyche und soziale Umwelt, die dieses Krankheitsbild in der Gesellschaft tabuisieren. Viele Autoren berichten von Schwierigkeiten, ausfindig zu machen, ob in einer Familie noch weitere Krankheitsfälle vorkommen, da sich die Betroffenen oft schämen und zurückziehen. Der Patient wiederum klagt über die Beschwerlichkeit, mit seiner Krankheit anerkannt zu werden. So wurde der Indexpatient III7 (vergl. Abb. 3.7.) jahrelang wegen ungeklärter Angststörungen und Kopfschmerzen psychologisch behandelt, ohne dass seine Krankheit diagnostiziert wurde. Wenn nun tatsächlich eine psychische Störung in diese Krankheit involviert ist, so könnte sich ein genetischer Defekt auf das limbische System und die Motorik auswirken, da bestimmte Großhirnstrukturen des limbischen Systems neuronal mit dem motorischen Assoziationskortex verbunden sind, der wiederum besonders intensiv ins Striatum projiziert (Trepel 2004). Das eventuelle Zusammenspiel von Psyche und Motorik erschwert die Auswahl des Kandidatengens zusätzlich. Da in keiner genetischen Dystonie-Form die geschädigten Strukturen identifiziert sind, und das Vorkommen von Dystonie-plus Syndromen (mit Parkinson und Myoklonus) beachtet werden muss, ohne die L-Dopa-responsiven Dystonien außer Acht zu lassen, kann insgesamt von einer direkten oder indirekten Beeinträchtigung des extrapyramidalen Systems ausgegangen werden.

Die DYT7 Familie teilt sich die Kandidatenregion mit einer kanadischen Familie mit autosomal dominanter Myoklonus-Dystonie (Grimes et al. 2002). Hierbei war der höchste LOD-Score in einer Region, die die Gene ZFP161, EPB41L3, LAMA1 und LOC390828 beinhaltet, zugeordnet.

Auch in einer bulgarischstämmigen Familie mit sehr spät manifestierendem Schreibkrampf konnte eine *Linkage* Analyse die Region 18p als Kandidatenlokus auszeichnen (Bhidayasiri et al. 2005). Kooperation mit beiden Forschergruppen könnten Schwierigkeiten, die mit der Sequenzierung in dieser großen Region verbunden sind, teilweise beheben. Allerdings können die verschiedenen phänotypischen Krankheitsbilder auch für zwei oder drei verschiedene Gene sprechen. Dem ist entgegenzuhalten, dass unterschiedliche Gene für ähnlich neurologische Erkrankungen in einer übereinstimmenden Region eher unwahrscheinlich sind. Es kann sich genauso gut um verschiedene Mutationen in einem Gen handeln.

Die hier vorgestellte Familie ist die einzig weltweit bekannte Patientengruppe mit erblich bedingtem Torticollis. Sollte sich hier in Zukunft durch Sequenzierung eine Mutation in einem Gen auf Chromosom 18p ergeben, so wäre dies ein entscheidender Fortschritt in der Dystonieforschung. Besonders die sporadischen Torticollispatienten könnten von der

Aufdeckung des Pathomechanismus im erblichen Torticollis profitieren. Wie bei anderen komplexen neurologischen Erkrankungen helfen die familiären Formen die Ätiologie einer Krankheit aufzudecken, um zukünftige Therapieoptionen zu entwickeln.

4.2. Parametrische Kopplungsanalyse von PARK5 in einer Familie mit autosomal dominant vererbtem Morbus Parkinson

4.2.1 Analyse der Ergebnisse

Die parametrische Kopplungsanalyse in einer Familie spanischen Ursprungs mit autosomal dominantem M. Parkinson wurde mit Hilfe von Mikrosatelliten, die durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese charakterisiert wurden, durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse fand eine Zuweisung der Haplotypen in dieser Familie statt, die klären sollte, ob UCH-L1 hier als krankheitsverursachendes Gen in Frage kommt.

Die Experimente zeigen, dass drei erkrankte Geschwister das gleiche Allel von der erkrankten Mutter geerbt haben und auch der Sohn IV19 dieses Allel trägt, ohne aber an der Krankheit zu leiden (vergl. Abb. 3.18.). Ein solcher Befund wäre mit einer inkompletten Penetranz vereinbar, wobei zur Manifestation der Erkrankung Faktoren wie Umwelteinflüsse, Geschlecht oder andere genetische Varianten beitragen. Das Phänomen der inkompletten Penetranz ist bei der einzig bekannten Familie mit einer Mutation im PARK5 Gen wahrscheinlich. Die Autoren berichten, von einem erkrankten Geschwisterpaar aus Deutschland mit Ile93Met Mutation, deren Onkel und Großmutter väterlicherseits auch an M. Parkinson mit Frühmanifestation erkrankten. Vom Vater des Geschwisterpaares ist keine Erkrankung bekannt (Leroy et al. 1998a).

Ursache für das Nicht-Erkranken von IV19 kann auch folgendes sein: Angenommen eine PARK5 Mutation geht zwar mit Parkinsonismus einher, aber das Manifestationsalter rangiert über mehrere Dekaden, das heißt vom zwanzigsten Lebensjahr bis zum 80. Lebensjahr, so könnte IV19 den Phänotyp nicht ausgeprägt haben, weil das Manifestationsalter noch nicht erreicht ist. So könnte auch der Vater des deutschen Geschwisterpaares verstorben sein, bevor sich die Krankheit manifestierte. Vergleichbares gibt es bei autosomal rezessiven Parkin Mutationen, bei denen das Manifestationsalter eine Spannweite von 7 bis 58 Jahren umfasst (Lücking et al. 2000). Es sind auch Patienten mit noch höherem Manifestationsalter (68 Jahre)

bekannt (Valente et al. 2002). Bei PARK8 werden sogar Manifestationen im 80. Lebensjahr beschrieben (Paisán-Ruíz et al. 2005).

Durch eine Kopplungsanalyse in einer Familie mit Chorea Huntington, wurde auf Chromosom 4 ein Marker lokalisiert, der bis auf eine Ausnahme mit der Erkrankung segregierte. Die nicht erkrankte Person mit Krankheitsallel hatte das Manifestationsalter bereits überschritten. Nähere Angaben zu diesem Fall wurden nicht gemacht (Gusella et al. 1983).

Neben dem gesunden Probanden IV19 (mit mütterlichem Kandidatenallel) existiert ein erkrankter Bruder (IV23), der nicht dieses Kandidatenallel von der Mutter (III6) geerbt hat, wie seine drei kranken Geschwister. Der Patient IV23 ist im Gegensatz zu seinen Geschwistern relativ spät an M. Parkinson erkrankt. Er zeigt ein Manifestationsalter von 50 Jahren, wohingegen das Manifestationsalter der restlichen Familie sich auf 27 bis 40 Jahren beläuft. Es wäre somit durchaus anzunehmen, eine Mutation auf PARK5 sei für die Erkrankung verantwortlich und die Indexperson IV23 sei am idiopathischen M. Parkinson erkrankt und nicht an dem hier vererbten.

Demzufolge müssten für die Bejahung einer UCH-L1 Mutation zwei Grundvoraussetzungen gegeben sein: (1) Zum einen müsste der gesunde Bruder (IV19) mit mütterlichem Kandidatenallel, die Krankheit bedingt durch inkomplette Penetranz oder Nichterreichen des Manifestationsalters nicht oder noch nicht ausgeprägt haben, (2) zum anderen müsste gleichzeitig der erkrankte Bruder (IV23) am sporadischen Altersparkinson erkrankt sein.

Jedes Parkinson Gen ruft bei einer Mutation ein anderes Krankheitsbild hervor, ja sogar innerhalb eines Kandidatengens variiert die Klinik einer Erkrankung bedingt durch verschiedene Mutationen. Deswegen lässt sich vom Phänotyp nie auf den Genotyp und umgekehrt schließen. Somit sind Krankheitsmerkmale (Manifestationsalter, Symptome, Therapie etc.) keine eindeutigen Aussagekriterien für einen sporadischen oder genetischen Parkinson (Lücking et al. 2000; Dekker et al. 2003).

Ein weiterer interessanter Aspekt in der spanische Familie, der die Komplexität des M. Parkinson widerspiegelt ist das Auftreten von Parkinsonismus bei den Geschwistern der Person III6. Von den sieben Geschwistern der dritten Generation ist eindeutig nur bei III6 die Frühmanifestation des M. Parkinson bekannt. Bei zwei Brüdern existieren zwar Tremor, Rigor und Hypokinesie, doch manifestierten sich diese Symptome erst in höherem Lebensalter (70. Lebensjahr bei III1 und unbekanntes Manifestationsalter bei III2). Vom

bereits verstorbenem Bruder III3 wird ein Manifestationsalter von 15 berichtet (fragliche Angaben), eine weitere Schwester III5 berichtet von Einsetzen eines Tremor nach dem 60. Lebensjahr. Vom Vater dieser Generation ist bekannt, er sei im Alter von 30 Jahren mit Tremor aus dem Krieg zurückkehrte (1910). Soweit ist nur von den Nachkommen der Person III6 ein sich früh manifestierender M. Parkinson bekannt. Diese Berichte lassen sich aufgrund des Todes der betroffenen Personen und wegen des hohen Alters der Geschwister nicht hinreichend überprüfen oder nachvollziehen. Erschwert wird die Untersuchung dieses Problems durch die infrastrukturell stark benachteiligte Gegend in Spanien, in der diese Familie wohnt. So besteht nicht die Möglichkeit des regen Kontakts mit den betreuenden Ärzten vor Ort. Die zuletzt dargelegten Spekulationen sind somit für die Aufklärung des Vererbungswegs in dieser Familie nicht zu gebrauchen, vielmehr wird die Aufklärung durch unklare Krankheitsfälle, die durchaus dem Bild des sporadischen M. Parkinson ähneln, erschwert. Denkbar ist nicht nur die Vererbung der krankheitsverursachenden Mutation durch den Vater von III6 sondern auch eine Neumutation bei III6, wenn man bedenkt, dass nur in der Nachkommenschaft von III6 erkrankte Personen zu finden sind. Die Nachkommen der erkrankten Geschwister hatten zum Zeitpunkt der Blutabnahme schon das typische Manifestationsalter für den früh einsetzenden M. Parkinson überschritten. Es bleibt abzuwarten, ob sich in den kommenden Jahren eventuell weitere Krankheitsfälle zeigen. Für PARK5 konnte hier keine eindeutige Bestätigung erzielt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass beide oben genannten Hypothesen (1. IV19 noch nicht erkrankt. 2. IV23 an sporadischem Parkinson erkrankt.) in dieser Familie zutreffen, ist sehr gering. Sollte IV23, genauso wie die Geschwister von III6, an der sporadischen Form der Erkrankung leiden, so bestünde neben der Mutation für den erblichen Parkinson in dieser Familie gleichzeitig eine genetische Prädisposition für den sporadischen Parkinson. Die Häufigkeit mit der die sporadische Form in dieser Familie auftritt, spräche dann aber nicht mehr für einen prädisponierenden Faktor, wie ihn fast jeder sporadische Patient trägt, sondern für eine mendelnde Erkrankung.

Vom momentanen Standpunkt ist keine Aussage zu treffen, wo im Genom die krankheitsverursachende Mutation lokalisiert ist. Da alle möglichen dominant vererbten Kandidatengene (PARK1/4 bzw. PARK5 und PARK8) ausgeschlossen werden konnten, ist von einem neuen, heute nicht bekannten PARK-Gen auszugehen. Dies würde nicht nur die Krankheitsursache in dieser Familie klären, sondern könnte auch einen entscheidenden Beitrag zur Pathogenese des M. Parkinson, zu biochemischen Abläufen im Gehirn und zur Therapie leisten.

4.2.2 Methodenbetrachtung

Selbstverständlich bedarf es auch der Diskussion, ob die Kopplungsanalyse überhaupt geeignet ist, um krankheitsverursachende Allele zu identifizieren. Die Kopplungsanalyse weist nach, ob ein bestimmter Phänotyp mit einem Allel an einem Kandidatengenort weitergegeben wird. Dies dient der Kartierung von monogenetischen Erkrankungen im menschlichen Genom. Für Gene mit einer mittleren bis starken krankheitsverursachenden Sequenz ist eine Kopplungsanalyse aussagekräftiger als Assoziationsstudien (Tu und Whittmore 1999). Bei der parametrischen Kopplungsanalyse werden im Gegensatz zur nicht-parametrischen Untersuchungen gesunde sowie kranke Mitglieder aus Mehrgenerationenfamilien verwendet. Außerdem liegt ihr die Kenntnis des Vererbungsweges zu Grunde (rezessiv oder dominant). Dies weist den parametrischen Analysen eine größere Aussagekraft (*statistische Power*) zu (Schumacher et al. 2002).

Vielversprechend sind solche Untersuchungen mit Kopplungsanalyse, wie J. Hoenicka et al. 2002 berichteten. Die Autoren verwendeten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 6q26-27 (PARK2) um in mehreren spanischen Familien die Ursache von autosomal rezessivem M. Parkinson zu finden. Erst die Kopplungsanalyse brachte den Hinweis, bei welcher Familie PARK2 als mögliches Kandidatengen in Frage kommt. Somit konnte anschließend durch gezielte Sequenzierung und *single-strand conformation polymorphism* (SSCP) eine Reihe von neuen und bereits bekannten Mutationen im Parkin Gen lokalisiert werden. Andererseits kann die Kopplungsanalyse auch mit Markern erfolgen, die über das gesamte menschliche Genom verteilt sind (400 Marker im Abstand von 10cM). Dabei konnte in einer Familie mit Parkinsonismus und gleichzeitigem Haltungstremor nur über diese Art von Genomscan eine Kandidatenregion auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 identifiziert werden. Zu Kandidatengen auf Chromosom 4p zählte auch UCH-L1 (PARK5), wobei in vier Fällen ein Polymorphismus (S18Y) gefunden wurde, der aber außerhalb der Kandidatenregion in der dort untersuchten Familie lag. Auch wenn UCH-L1 hier ausgeschlossen wurde, war es möglich über Kopplungsanalyse eine Kandidatenregion zu identifizieren (Farrer et al. 1999b). Die beiden Marker D4S2382 und D4S3357 haben eine genetische Distanz von nur 3cM, was einer Wahrscheinlichkeit von 3% entspricht, dass es in 100 Meiosen zu einer Trennung von Krankheits- und Markerallel kommt. Die Resultate der Haplotypisierung sprechen gegen ein Rekombinationsereignis in dem hier untersuchten Abschnitt auf Chromosom 4p14. Die untersuchte Familie weist ca. 30 Meiosen auf, wobei es in gerade einmal einer Person zu einer Rekombination kommen könnte.

Die Kopplungsanalyse konnte hier ein hochputatives Kandidatengen ausschließen. Dennoch sind weitere Untersuchungen nicht möglich, da die Anzahl der Krankheitsfälle zu klein ist, um diese Methode auf das ganze Genom auszuweiten. Die Methode hat somit die Schwäche, dass in kleinen Familien (oder in Familien mit wenigen Krankheitsfällen) zwar bestimmte Kandidatengene (z.B. PARK5) ausgeschlossen werden können, aber eine weitere genomische Analyse nicht durchführbar ist. Diese Option ist erst realisierbar, wenn in den nächsten Jahren weitere Parkinson-Fälle in dieser Familie auftreten. Dann erst wäre die Patientenzahl so hoch (>12), um eine ausreichend statistische Sicherheit für eine Kopplung zu erhalten.

4.2.3. Ausblick

Im Vergleich zur Ausgangssituation in der DYT7 Familie (s.o.) existieren in der spanischen Familie keine Hinweise welches Chromosom betroffen ist. In der Dystonie-Familie ist die Forschung einen Schritt weiter, da die chromosomale Lokalisation bekannt ist und die Sequenzierung nun die Methode der Wahl ist. Wie schon erwähnt, ergibt sich hier durch die Größe der Kandidatenregion (30cM) und die Auswahl des richtigen Kandidatengens eine andere Problematik (s.o.). Der Vererbungsweg, die Familienstruktur und die Patientenzahl sind demnach entscheidend über Auswahl des methodischen Spektrums und dessen Erfolg.

Auch wenn nur ein geringer Anteil an familiären Formen des Parkinson bekannt ist, so sind es gerade diese Fälle, die es der Forschung ermöglichen Hinweise für zellbiologische Vorgänge und Pathomechanismen in neurodegenerativen Erkrankungen zu finden.

4.3. Assoziationsuntersuchung zweier Parkinson Kandidatengene anhand von *single nucleotide polymorphisms*

4.3.1. Analyse der Ergebnisse

Grundgedanke der Assoziationsuntersuchungen ist die Auszeichnung eines bestimmten Kandidatenallels und der Vergleich der Häufigkeit dieses Allels in der Patienten- und Kontrollgruppe. Die hier untersuchten Polymorphismen in den Parkinson-Kandidatengenen MTIF3 und NME4 zeigten nur für den SNP rs7669 im Gen MTIF3 signifikante Unterschiede in der allelischen Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen in Gruppe F (Frankfurt/Main). Dieses Ergebnis ließ sich in einer zweiten unabhängigen Fall-Kontroll-Studie in Gruppe T (Tübingen) reproduzieren (vergl. Abb.3.5.).

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse in Gruppe F zeigt sich die Signifikanz im Vierfeldertafeltest für den Fall, dass Allel 1 dominant und Allel 2 rezessiv sei ($p_{a1} = 0,034$). Im Hinblick auf die Häufigkeiten fällt auf, dass heterozygote Polymorphismusträger weniger in der Kontroll- (0,302) als in der Patientengruppe (0,354) vorkommen (vergl. Tab. 3.6.). Heterozygote hätten mit einem relativen Risiko von $RR = 1,12$ (KI 95%: 0,91-1,38) ein erhöhtes Krankheitsrisiko für den M. Parkinson als andere Genotypen.

Dagegen gibt es mehr Homozygote in der Kontroll- (0,073) als in der Patientengruppe (0,026) (vergl. Tab.3.6.). Dies verringert das Relative Risiko für den sporadischen Parkinson bei homozygoten Polymorphismusträgern auf $RR = 0,514$ (KI 95%: 0,277 - 0,952).

Auswertung der Ergebnisse von Gruppe T zeigt folgendes: Der Chi-Quadrat Test ($\chi^2 = 6,84$; $p_{b1} = 0,033$), und der Test für das Hardy-Weinberg Gleichgewicht ($p_{b2} = 0,015$) sind beide signifikant. Im Hinblick auf die Genotypverteilung wurde in der Kontrollgruppe eine signifikant erniedrigte Anzahl an heterozygoten Polymorphismusträgern (0,247) im Gegensatz zur Patientengruppe (0,36) erkennbar (vergl. Tab.3.6.). Auch hier ist das Relative Risiko für heterozygote Polymorphismusträger erhöht $RR = 1,23$ (KI 95%: 1,05 – 1,44), wohingegen das Relative Risiko für homozygote Polymorphismusträger (vergl. Tab.3.6.) erniedrigt ist $RR = 0,79$ (KI 95%: 0,53 – 1,19).

Da beide Gruppen ihre Signifikanz in verschiedenen Tests zeigten, gleichzeitig aber Tendenzen zur Signifikanz in anderen Tests aufwiesen, folgt nun die Interpretation der zusammengefassten Ergebnisse aus Gruppe F und T:

Hier zeigten alle drei Tests signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientengruppe. Eine erniedrigte Anzahl von Heterozygoten in der Kontrollgruppe (0,275) im Vergleich zur Patientengruppe (0,358) wird deutlich. Genauso wird ein Homozygoteneffekt auffällig, denn in der Patientengruppe sind weniger Homozygote zu finden (0,033) als in der Kontrollgruppe (0,068) (vergl. Tab.3.6.).

Dementsprechend ist das Relative Risiko für den sporadischen Parkinson mit $RR = 0,67$ (KI 95%: 0,48 – 0,94) für homozygote Polymorphismusträger erniedrigt, dagegen für heterozygote Polymorphismusträger erhöht ($RR = 1,18$; KI 95%: 1,04-1,34).

Die Analyse der Ergebnisse zeigt eine verminderte Anzahl von heterozygoten Kontrollen. Dies ist nicht mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate im Heterozygotenstatus zu erklären, da dieses Risiko auch in der Patientengruppe gegeben sein müsste. Zwar ist die Heterozygotenzahl in der Patientengruppe erhöht, diese Werte sind aber nicht signifikant. Da

aber gleichzeitig in der Patientengruppe eine verminderte Homozygotenrate zu erkennen ist, muss diese Allelverteilung krankheitsspezifisch sein. Wie die Statistik zeigt, ist diese Assoziation in beiden unabhängigen Studiengruppen (F und T) nachweisbar. Durch jeweilige Summierung der Kontroll- und der Patientenzahlen in beiden Untersuchungen, wird das Ergebnis noch aussagekräftiger. Dieses wird durch eine höhere Probandenanzahl und folglich durch eine erhöhte *statistische Power* erklärt. Möglich ist demnach eine gekoppelte Vererbung von Marker und Mutation (Kopplungsungleichgewicht). So scheint der Träger des Allels 1 in homozygoter Form (Wildtyp = 11) kein erhöhtes oder erniedrigtes Krankheitsrisiko zu besitzen. Allerdings ist bei heterozygoten Merkmalsträgern (12) ein vermehrtes Krankheitsrisiko zu beobachten, wohingegen der homozygote Polymorphisträger (22) einen Schutzeffekt zu tragen scheint.

Die krankheitsverursachende oder -schützende Mutation muss in einem Bereich 100kb telomer- und centromerwärts vom untersuchten Marker liegen. Außerhalb dieser genetischen Distanz ist ein Kopplungsungleichgewicht nicht mehr erfassbar.

Es könnte sich bei dem hier untersuchten Polymorphismus tatsächlich um einen Pathogenitätsfaktor handeln, da auch ohne Aminosäureaustausch nur durch einen Nukleotidaustausch eine veränderte MTIF3-mRNA Stabilität und somit veränderte Transkriptspiegel resultieren können, was eine schwedische Arbeitsgruppe mit Hilfe von quantitativer PCR für diesen MTIF3 Polymorphismus nachwies (unpublizierte Daten).

Generell ist es bei Assoziationsuntersuchungen nicht zwingend, dass der Marker (SNP) selbst Ursache der Erkrankung ist, aber er muss sich in engster Nähe zur Mutation befinden, um mit der Mutation gekoppelt vererbt zu werden. Allerdings kann der untersuchte SNP nur dann im Kopplungsungleichgewicht stehen, wenn (1.) der Abstand so gering ist, dass es durch Rekombination nicht zur Trennung der beiden Genorte gekommen ist, oder (2.) wenn diese Mutation nur einmalig in einem Gründer stattgefunden hat, der die Mutation - gekoppelt an den Marker - in eine Population einführte. Hat nämlich die gleiche Mutation auf unterschiedlichen Allelen in unabhängigen Gründern stattgefunden, dann verschwindet der "Gründereffekt", weil die Mutation bei allen Nachkommen der Gründer mit anderen Markern assoziiert ist.

Es ist hier von jeweils einem Gründereffekt in zwei unterschiedlich geografischen Gruppen (F und T) auszugehen, in denen der Risikofaktor an ein Allel gekoppelt vererbt wurde.

Bei diesem Punkt sollten die Ergebnisse der NME4 Studie nicht übergangen werden. Zwar zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede, doch könnte der Fall, dass mehrere

Gründer eine Mutation unabhängig voneinander auf verschiedenen Allelen in dieselbe Population eingeführt haben, eine allelische Assoziation für den Untersucher unsichtbar machen. Aufgrund der Studienergebnisse kann in der hier untersuchten Bevölkerung (Gruppe F) NME4 als Parkinson-Kandidatengenen ausgeschlossen werden, da der oben beschriebene Fall nicht zu beweisen ist. Trotzdem ist NME4 aufgrund seiner Funktion immer noch ein putativer PINK1-Interaktionspartner und deshalb ein Kandidat für die Parkinsonforschung (s.u.).

Beim Vergleich des Relativen Risikos für die einzelnen Genotypen, ist der Begriff der „molekularen Heterosis“ heranzuziehen. Heterosis bezeichnet in statistischen Auswertungen eine Werteverteilung, bei der Heterozygote für ein Merkmal nicht in der Mitte zwischen Wildtyp und Homozygoten liegen, sondern darüber oder darunter. Es würde sich also bei Einzeichnung einer Hilfsgeraden eine nach unten oder nach oben offene Parabel ergeben (Comings, MacMurray 2000). Das beste Beispiel für Heterosis ist die Sichelzellanämie, bei der die symptomfreien Heterozygoten ein relativ geringeres Krankheitsrisiko für die Malaria tropica haben. Homozygot Erkrankte haben durch die Anämie eine geringere Überlebenschancen, wohingegen Wildtypen schwer an Malaria erkranken können. Bei der Genotypverteilung in dieser Assoziationsstudie war die Heterozygotenrate für die Kontrollgruppen nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu niedrig. Die Werte lagen aber nicht, wie für die Heterosis zwingend, über oder unter den anderen Werten. Bei Betrachtung der Relativen Risiken für jeden Genotyp in jeder Studiengruppe fällt allerdings negative Heterosis auf (vergl. Abb.4.1.). Der Zuordnung `positiv` bzw. `negativ` bezieht sich auf den Vorteil bzw. den Nachteil für ein Lebewesen heterozygot zu sein, nicht auf die Abweichung in Diagrammen (Denic et al. 2004). Das Relative Risiko für Wildtypen (11) beträgt ca. 1, bedeutet somit für den Träger weder Nutzen noch Schaden. Die Homozygoten für das Allel 2 haben ein erniedrigtes Krankheitsrisiko, tragen demnach einen Nutzen von ihrer Allelkombination. Das Risiko der heterozygoten Träger müsste eigentlich zwischen dem Risiko der Wildtypen und der Homozygoten für Allel 2 liegen. Da das Risiko aber erhöht ist, tritt hier das Phänomen der Heterosis auf.

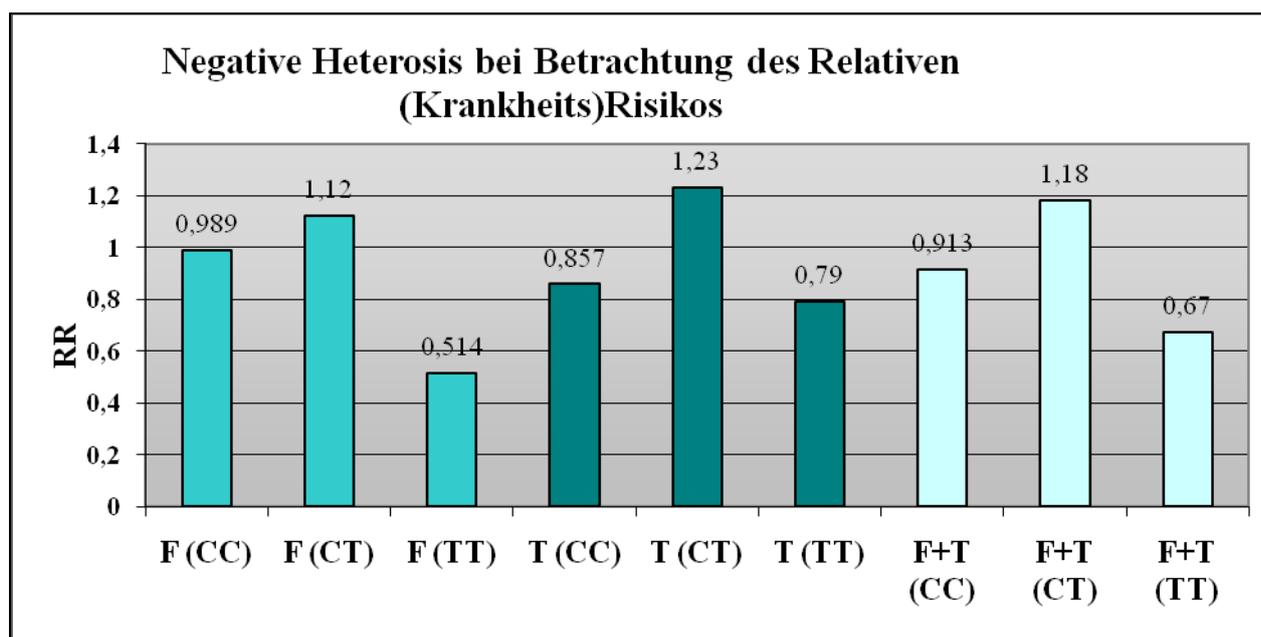


Abb.4.1. Negative Heterosis für den SNP rs7669 im Gen MTIF3 hinsichtlich des Relativen Risikos für den idiopathischen M. Parkinson: Die drei farblich zu unterscheidenden Auswertungen zeigen negative Heterosis. Eigentlich müsste das Relative Risiko für den M. Parkinson für Heterozygote (CT) in einem Bereich zwischen Wildtypen und Homozygoten liegen. Mögliche Erklärungen für die Abweichung siehe Text.

Der Heterosiseffekt kann geschlechts- oder phänotypspezifisch sein und somit je nach untersuchtem Merkmal variieren. Die Erklärung für die Beobachtungen liegt entweder in einer differenzierten Genregulation oder in der Interaktion der Proteinuntereinheiten ausschließlich bei Heterozygoten. Da es sich bei dem untersuchten SNP nicht um einen Aminosäureaustausch handelt, muss die gesuchte Mutation mit Krankheitsrisiko in engster Nähe stehen (z.B. Aminosäureaustausch in Promotor oder kodierender Region oder im 5' bzw. 3' UTR-Bereich). Wie bei der Sichelzellenanämie kann ein dritter Faktor die „Wertigkeit“ eines Genotyps verändern, da sich der Heterozygotenvorteil nur im Hinblick auf die Malariainfektion zeigt. Ein modulierender dritter Faktor könnte auch hier eine Rolle spielen.

4.3.2. Methodenbetrachtung und Studiendesign

Die Assoziationsstudie, wie sie hier zur Anwendung gekommen ist, gehört zum Standardrepertoire der genetischen Untersuchung von komplexen Erkrankungen mit unbekannter Ursache.

Der Grund warum sich der M. Parkinson so sehr für diese Analysen eignet ist seine polygenetische Ursache (Risch 2000). Bei polygenetisch verursachten Erkrankungen wird

allerdings jedem einzelnen Gen nur ein geringer Beitrag zum Krankheitsausbruch zugeschrieben, nur die Summe der Risikogene ergibt eine erhöhte Krankheitsprädisposition.

Im Gegensatz zu Kopplungsanalysen sind Assoziationsuntersuchungen dann aussagekräftiger, wenn es sich um Mutationen mit nur geringem bis moderatem Krankheitseffekt handelt. Assoziationsstudien sind dann von Bedeutung, wenn ein kausaler Geneffekt zu schwach ist, um entdeckt zu werden (Risch, Merigankas 1996).

Würde es durch die Mutation zu einem Selektionsnachteil kommen, dann hätte dies zur Folge, dass die Mutation sich nicht weitervererbt. Da aber der M. Parkinson zu den Erkrankungen gehört, die sich in höherem Lebensalter, nach der Reproduktionsphase manifestieren, haben Mutationen keinen Selektionsnachteil. Dies ist mitunter Bedingung für die Erhaltung eines Kopplungsungleichgewichts in einer Population (Böhringer, Epplen 2002).

Die Herkunft erklärt, warum Polymorphismen nicht in allen ethnischen Gruppen gefunden werden bzw. überall mit einer Erkrankung assoziiert sind. Stratifikationsprobleme ergeben sich demnach immer dann, wenn sich eine allelische Assoziation allein durch die Herkunft erklärt und nichts mit der Erkrankung zu tun hat. Dies führt zu falsch positiven Ergebnissen und kann nur dadurch umgangen werden, wenn Verwandte als Kontrollen verwendet werden, denn jeder genetische Unterschied der sich dann zwischen Patienten und Kontrollen zeigt, ist allein durch die Krankheit bedingt (Tu, Whittemore 1999).

Auch Maraganore (2005) bevorzugt das Verwenden von mit Patienten verwandten Kontrollgruppen, da sie sich einen genetischen Hintergrund teilen, in jungen Jahren gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt sind und sie sich in ihren Lebensgewohnheiten ähneln. So sind zwar bei diesem Design die Stratifikationsprobleme ausgeschlossen, dennoch treten diese Probleme auch bei Studien mit dem allerbesten Design auf (Freedman et al. 2004).

Hier wurden deswegen zwei unterschiedliche Studiendesigns für die Untersuchung eines möglichen PINK1-Interaktors angewendet. Zum einen wurden nicht verwandte Kontrollen (Blutbank) mit sporadischen Parkinsonpatienten verglichen (Gruppe F), zum anderen wurden Verwandte als Kontrollen hinzugezogen (Gruppe T).

In Gruppe T können demnach die Unterschiede in der Genotypverteilung nicht auf der Herkunft beruhen, sondern müssen krankheitsspezifisch sein. Da aber die Kontrollpopulation der Gruppe T genetisch einen hohen Risikofaktor mit sich trägt (weil mit den Patienten verwandt), kann dann von der "Allgemeinbevölkerung" ausgegangen werden? Denn das Wiederholungsrisiko für diese Erkrankungen ist für eine Person erhöht, wenn ein Elternteil

betroffen ist (Risiko ca. 1-2%). Das Risiko von Verwandten wird im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (0,1%) um ein Vielfaches gesteigert (Böhringer, Epplen 2002). Untersuchungen mit Verwandten büßen folglich an *statistischer Power* ein und machen eine Erhöhung der Studienteilnehmer um das zwei- bis fünffache notwendig (Risch 2000).

Diese *Power* wird in der vorliegenden Assoziationsstudie durch die Gruppe F geliefert, die auch zuerst untersucht wurde und den Hinweis auf eine allelische Assoziation erbrachte.

Der Nachteil von herkömmlichen Fall-Kontroll-Studien ist wiederum eine geringere Beständigkeit, was die Verwendung von vielen unabhängigen SNPs zur Bedingung macht (Risch 2000).

Mit zwei unterschiedlichen Studiendesigns wurden hier vergleichbare Ergebnisse erzielt (Heterozygotenrate zu niedrig bei den Kontrollen, Homozygotenrate zu niedrig bei den Patienten). Größere Unterschiede (vergl. Tab. 3.5.) zwischen Patienten und Kontrollen wurden in Gruppe T deutlich. Allerdings war der Homozygoteneffekt in Gruppe F ausgeprägter (vergl. RR in Abb.4.1.).

Abschließend kann davon ausgegangen werden, dass die Kombination aus familiären und nicht verwandten Fall-Kontroll-Studien die Vorteile der einzelnen Designs summiert und die Nachteile subtrahiert. Es wird deswegen der Vorschlag gemacht eine Patientengruppe zum einen mit der familienbasierten Kontrolle und einmal mit nicht verwandten Kontrollen zu vergleichen (Teng, Risch 1999), was in dieser Studie auch zum Tragen gekommen ist.

4.3.3. Auswahl und Charakterisierung der Kandidatengene

Die beiden Gene MTIF3 und NME4 sind abgesehen von den Ergebnissen allein aufgrund ihrer Funktion aussichtsreiche PINK1 Interaktionspartner und daher auch Kandidatengene in der Pathogenese der untersuchten Erkrankung. Eine Bedeutung würde beiden Genen in sporadischen Parkinsonpatienten zukommen, bei denen selbst für die bekannten Gene (z.B. Parkin oder α -Synuklein) keine Relevanz gefunden wurde (Klein et al. 2003; Healy et al. 2004). Beide nukleär kodierten Genprodukte sind genauso wie PINK1 in den Mitochondrien der Zellen lokalisiert. Der Einfluss mitochondrialer Fehlfunktion in Parkinsonpatienten ist schon lange sicher (Schapira et al. 1998; Mizuno et al. 1998; Dawson, Dawson 2003).

4.3.3.1. NME4

Schon 1989 postulierte Adams eine mögliche Teilnahme der NDP Kinasen am Nucleosidtriphosphat-*Pool* der Mitochondrien. Die Autoren gingen von einer Bildung anderer

Nukleosidtriphosphate gekoppelt an das durch die Atmungskette produzierte ATP mittels NDP Kinasen aus (Adams et al. 1989). In Verbindung mit der Reduktion des ATP Bestands und der Zunahme von mitochondrialem Stress, könnten mitochondriale NDP Kinasen, wie NME4, wichtig für zelluläre Funktionen sein. Doch dieses Protein bietet auch andere interessante Signalwege in Mitochondrien. So können GTP und ATP die innere mitochondriale Membran nicht passieren. Da aber der Stoffwechsel in der mitochondrialen Matrix auf NTPs angewiesen ist, benötigt dieses Organell ein funktionierendes Liefersystem. NTPs werden zum einen für die mitochondriale DNA benötigt. GTP ist außerdem wichtig für die Succinyl-CoA Synthetase des Krebszyklus.

Beim *Heat Shock* Protein 70 (Hsp70) scheint sich der Kreis zu schließen, denn ATP ist essentiell für dieses Protein, um andere Proteine in die Mitochondrien zu schleusen und diese korrekt zu falten. Es gibt also eine mögliche Kausalität für mitochondriale Dysfunktion, die PINK1 involviert (korrekter Proteintransport?). Die mögliche NME4-PINK1 Interaktion nimmt Einfluss auf die mitochondrialen Homöostase (GTP und ATP Mengen) bei dessen Ungleichgewicht ein apoptotisches Signal ausgesendet wird. Auch im letzten Aspekt lässt sich eine Verbindung zum PINK1 Signalweg aufzeigen. Von PINK1 wird ein Schutz vor apoptotischem Zelltod bei mitochondrialem Stress berichtet (Valente et al. 2004a). Da sich in den Microarrayergebnissen eine Hochregulation von NME4 bei PINK1 Defekt zeigte, müssen sich beide Proteine in einem gemeinsamen Signalweg wiederfinden. Der Einfluss von NME4 auf die ATP-Menge kann über das Hsp70 den mitochondrialen PINK1 Import beeinflussen (dabei wäre NME4 im Signalweg vor PINK1 eingeschaltet). Viel interessanter ist das Zusammenspiel von NME4 und PINK1 im Hinblick auf die Kinase Aktivität von PINK1, die durch bestimmte Mutationen verloren geht (Valente et al. 2004a; Beilina et al. 2005; Petit et al. 2005). Sollte NME4 von PINK1 phosphoryliert werden, so würde eine Unterbrechung dieses Signalwegs zu verminderter NME4 Aktivität oder Inaktivität führen und die oben angesprochenen Konsequenzen bewirken. Hierbei wäre NME4 im Signalweg nach PINK1 eingeschaltet.

Die Gefahr NME4 als Kandidatengen irrtümlich abzulehnen ist groß, da nur ein Polymorphismus informativ war. Die möglichen Signalwege und Hinweise auf PINK1 Interaktion sind gleichzeitig viel zu aussagekräftig, um NME4 zurückzuweisen.

4.3.3.2. MTIF3

MTIF3 ist ein nukleär kodierter mitochondrialer Translationsinitiationsfaktor (Koc, Spremulli 2002). Hinsichtlich der Rolle von MTIF3 in der Pathophysiologie des M. Parkinson ist von

einem möglichen Einfluss auf die Translation von Komplexen der Atmungskette auszugehen, die teilweise mitochondrial kodiert werden. Dies scheint der heute geglaubten Pathogenese des M. Parkinson nahe zu kommen. Eine mögliche Schwächung der Translation von mitochondrialen Genen aufgrund einer Mutation im MTIF3 Gen, der die Aktivität oder Affinität des Initiationsfaktors verringert, könnte das stöchiometrische Verhältnis der einzelnen Komplex I Untereinheiten negativ beeinflussen und somit für inkorrekte Proteinfaltung und Komplex I Schwächung sorgen. Neben ATP-Mangel, der zu Depolarisation und Exitotoxizität führt, steigt auch die Konzentration freier Radikale. Es folgen mitochondrialer Stress, Proteinaggregation und anschließende Apoptose der Zellen (Dawson, Dawson 2003; Jenner 2003). Gerade die dopaminergen Zellen der Substantia nigra sind sehr empfindlich gegenüber stressinduzierter Dysfunktion (Sherer et al. 2002). ATP wird in dopaminergen Neuronen nicht nur für die Funktion der Kanäle gebraucht, sondern auch für die Protonenpumpe der synaptischen Vesikel. ATP-Mangel würde zu einer Dopaminakkumulation im Zytosol mit vermehrtem Abbau zu DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylethylsäure) führen, was wiederum durch Bildung von Sauerstoffradikalen toxisch ist (Silvestri et al. 2005).

Denkbar wäre eine durch De-/Phosphorylierung bedingte Aktivierung oder Inhibierung von MTIF3 durch PINK1, sodass die Produktion der Atmungskettenkomplexe durch MTIF3 direkt und durch die PINK1-Funktion indirekt beeinflusst wird. MTIF3 ist bedingt durch die besondere Empfindlichkeit der Neurone der SN für oxidativen Stress und ATP-Mangel ein vielversprechender Kandidat.

In einem Bereich ca. 100kb nördlich und südlich vom untersuchten Marker kann ein Kopplungsungleichgewicht noch erfasst werden. Die Region auf Chromosom 13q12.2 zeigt in unmittelbarer Nachbarschaft von MTIF3 nur das Gen GTF3A (*general transcription factor IIIA*). Dieses Protein steuert die Transkription der 5s rRNA und ist somit sehr stark in die Zellfunktion eingebunden. Ein Polymorphismus in GTF3A würde daher die Translation aller nukleär kodierten Gene stören. Dies müsste mit einer im Leben viel früher eintretenden Auswirkung auf den Organismus - ja vielleicht sogar mit einem Selektionsnachteil - korrelieren. Zusätzlich ist anzumerken, dass bis auf GTF3A kein anderes Gen im Kopplungsungleichgewicht stehen kann, da die nächsten Gene 160kb nördlich bzw. 120kb südlich von MTIF3 lokalisiert ist.

Demnach ist die Chance hier ein parkinsonassoziiertes Gen gefunden zu haben sehr hoch, aber nicht bewiesen. Ein weiterer Abgleich in zukünftigen Assoziations- und Proteinstudien kann Klärung bringen.

4.3.4. Ausblick

Auch im letzten Teil dieser Arbeit wird deutlich, wie sehr die familiären Formen des M. Parkinson pathobiochemische Wege aufzeigen, die für die sporadische sich spät manifestierende Erkrankung von Bedeutung sein können. Mit Assoziationsstudien im entsprechenden Ausmaß können Kandidatengene schnell und unkompliziert untersucht werden.

Die hier vorgestellte Identifizierung einer putativen krankheitsprädisponierenden Region erfordert zum einen eine direkte Assoziationsuntersuchung mit MTIF3, durch ausschließliche Verwendung von SNPs mit Aminosäureaustausch und die komplette Sequenzierung von MTIF3 in einem kleinen Patienten- und Kontrollkollektiv. Zum anderen sollten mittels Co-Immunoprecipitation MTIF3-PINK1 und NME4-PINK1 Interaktionen geprüft werden. Anschließend könnten quantitative RT-PCR und Proteom-Studien (Westernblot etc.) mit der Analyse funktioneller zellbiologischer Unterschiede bei Patienten folgen. Sollte sich in diesen Studien eine krankheitsverursachende Rolle bestätigen, dann wären weitere Untersuchungen am Tiermodell denkbar. Letztendlich könnten durch die Aufdeckung der Pathologie in sporadischen Parkinsonpatienten Optionen für Prävention und Therapie erforscht werden.

4.4. Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit drei unterschiedlichen genetischen Analysen in neurodegenerativen Erkrankungen. Das Methodenspektrum ist auch bei jeder anderen monogenetischen oder polygenetischen Erkrankung anderer Fachgebiete anzuwenden.

Erst durch das Entdecken der Krankheitsgene können diese Erkrankungen verstanden werden. Dabei scheint es zwischen den extrapyramidalen Erkrankungen noch unbekannte Zusammenhänge zu geben. α -Synuklein, Parkin und UCH-L1, die alle ihren Beitrag zur Pathogenese des familiären M. Parkinson liefern und von denen Hinweise ausgehen, die auch die sporadischen Formen erklären könnten, gehören zu den besten Beispielen (Krüger et al. 2002; McNaught, Olanow 2003).

Am Anfang jeder zellbiologischen Forschung stehen jedoch immer die Grundlagen, wie sie in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gekommen sind. Die ermittelten Ergebnisse, vor allem die Resultate der MTIF3 Studie, ermöglichen weitere Forschung auf diesem Gebiet.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertationsschrift befasst sich mit der molekulargenetischen Analyse zweier Basalganglienerkrankungen. Zum einen wurden Patienten mit M. Parkinson genetisch untersucht, zum anderen Patienten mit autosomal dominanter zervikaler Torsionsdystonie. Die Aufgabe bestand in der passenden Wahl der Methode zur jeweiligen humangenetischen Fragestellung.

Der erste Teil handelte von der Suche der krankheitsverursachenden Mutation für die *autosomal dominante zervikale Torsionsdystonie* mit Spätmanifestation auf Chromosom 18p (Kandidatenlocus *DYT7*). Die erkrankte Familie deutscher Herkunft zeigt dystone Symptome mit Betonung auf kraniozervikale und brachiale Körperabschnitte und ist somit die weltweit einzige bekannte Familie mit Vererbung dieser ansonsten sporadisch auftretenden Erkrankung. Die PCR-Sequenzierung der Kandidatengene *ZFP161*, *LOC390828*, *NDUFV2* und *PTPRM* auf dem *DYT7* Locus erbrachte bei den sieben erkrankten Familienmitgliedern im Vergleich zu nicht verwandten Kontrollen (Ehepartner und 96 Kontrollen der Blutbank) keinen Aminosäureaustausch, der ausschließlich bei den erkrankten Probanden zu finden war. Technisch konzentrierte sich diese Untersuchung auf die Amplifizierung und anschließende Sequenzierung jedes einzelnen Exons in den zu untersuchenden Proben, und die Bestätigung einer putativen Mutation mittels Verdau der PCR-Produkte durch Restriktionsendonukleasen. Die Auswahl der Kandidatengene erfolgte aufgrund der Annahme pathobiochemischer Mechanismen, die durch andere Formen der vererbten Torsionsdystonie oder zellbiologische Experimente als krankheitsverursachend gelten. Auch wenn keine Mutation gefunden wurde, so konnten bereits bekannte und neue single nucleotide polymorphisms (SNP) etabliert werden.

Die zweite Thematik befasste sich mit der Frage, ob das bereits bekannte Parkinson-Gen *UCH-L1* auf dem *PARK5* Locus krankheitsverursachend für den autosomal dominanten M. Parkinson in einer spanischen Familie ist. Diese parametrische Kopplungsanalyse wurde mithilfe der heißen *Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)* durchgeführt. Dabei konnte in allen Patienten und den Verwandten ersten Grades über Analyse der Mikrosatelliten nördlich und südlich der Kandidatenregion (*UCH-L1*) in einem Bereich sehr niedriger Rekombinationswahrscheinlichkeit eine Haplotypisierung erfolgen. Die Haplotypisierung zeigte nicht die erforderliche Identifizierung eines Krankheitsallels bei allen betroffenen Probanden. Somit ist hier neben der einzig bekannten deutschen *PARK5* Familie keine weitere Familie mit *UCH-L1* Mutation bestätigt worden. Dementsprechend ist die Ätiologie dieser Erkrankung in dieser Familie noch unklar, was aber der Bedeutung des *Ubiquitin-*

Proteasom Systems in der Parkinson-Entität keinen Abbruch getan hat. Da alle anderen autosomal dominanten Parkinson-*Loci* ausgeschlossen sind, muss sich die Ursache für den M. Parkinson in dieser Familie in einem heute noch unbekanntem Gen befinden. Weitere Untersuchungen im Rahmen eines *Genomscans* sind aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich.

Die letzte Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Durchführung einer *Assoziationsstudie* mit den putativen PINK1 (PARK6) Interaktoren *NME4* und *MTIF3* für den mehrheitlich *sporadisch* auftretenden M. Parkinson. Dabei wurden in zwei unabhängigen Studiengruppen mit insgesamt 453 sporadischen Parkinsonpatienten und 370 Kontrollen jeweils zwei SNPs auf gekoppelte Vererbung mit der Erkrankung untersucht. Der Unterschied zwischen den Testgruppen bestand im Studiendesign, da zum einen mit den Patienten nicht verwandte Kontrollen und zum anderen verwandte Kontrollen verwendet wurden. Die mit beiden Studientypen normalerweise auftretenden Probleme durch *Stratifikation* bzw. erniedrigte *statistische Power* konnten durch Kombination der Studien ausgeglichen werden. Das Methodenspektrum umfasste PCR und Restriktionsverdau, was zum Auffinden eines Kopplungsungleichgewichts für das Gen *MTIF3* führte. Ein heterozygoter Basenaustausch für den Polymorphismus rs7669 erhöht signifikant das Relative Risiko an M. Parkinson zu erkranken, wohingegen der homozygote Basenaustausch das Krankheitsrisiko des Trägers signifikant erniedrigt. Bezüglich des Relativen Risikos wurde der Effekt der molekularen Heterosis nachgewiesen. Bei diesem mitochondrial lokalisierten Gen handelt es sich um einen Initiator der mitochondrialen Translation. Demzufolge besteht hier Einfluss auf die Homöostase und somit Funktionalität der Atmungskettenkomplexe, die als bedeutend für die Pathogenese des M. Parkinson angesehen werden. Die Verbindung zum mitochondrial lokalisierten PINK1 besteht aufgrund seiner Kinase-Aktivität in der An- und Abschaltung des mitochondrialen Translations - Initiationsfaktors. Aber auch die Wichtigkeit von *NME4* konnte in dieser Studie trotz fehlender Assoziation nicht ausgeschlossen werden, da vorangehende experimentelle Ergebnisse dieses Protein bereits in den PINK1 Signalweg zuordnen konnten.

MTIF3 könnte wohlmöglich ein wichtiger *genetische Risikofaktor* für den idiopathischen M. Parkinson sein. Es bleibt abzuwarten, ob zukünftige genetische und zellbiologische Experimente die Wichtigkeit, die in diesem Protein zu liegen scheint, bestätigen können.

6. Basic Approaches for the Molecular Genetic Analysis of Movement Disorders

This thesis delves into the molecular analysis of two basal ganglia disorders. Patients with Parkinson's disease or with autosomal dominant cervical torsion dystonia were genetically examined. Three molecular genetic approaches were used to elucidate the genetic causes of these diseases.

The first part of the dissertation deals with a candidate gene-sequencing approach to search the disease-causing mutation for autosomal dominant cervical torsion dystonia with late onset on chromosome 18p (locus DYT7). The medical examination of a large family with German origin shows dystonia in the cranio-cervical region and the upper limbs. These symptoms usually appear in sporadic patients, but were observed with autosomal dominant inheritance in this family, which was the first pedigree worldwide with a large enough size to permit linkage analysis. The sequencing of the candidate genes *ZFP161*, *LOC390828*, *NDUFV2* and *PTPRM* (within the DYT7 locus) in affected family members showed no disease causing mutation compared to unaffected controls of the same geographic origin. Technically, in each sample the candidate genes were amplified, followed by PCR sequencing. In case of a putative amino acid exchange, the frequency of such a variant was confirmed by restriction digest in further family members and unaffected controls from the blood bank.

The selection of each candidate gene based on pathological and biochemical mechanisms known from other forms of inherited torsion dystonia or from cell biology experiments. Although no mutation was found, new single nucleotide polymorphisms (SNP) could be established and old ones could be verified.

The second part of this thesis uses the linkage approach to deal with the question if a Spanish family with autosomal dominant Parkinson's disease shows disease association with the candidate locus PARK5. To establish a parametric linkage analysis, the polyacrylamid gel electrophoresis of microsatellites neighbouring the candidate gene UCH-L1 was applied as an appropriate method. In this region of very low recombination probability, chromosomal haplotypes in each patient and in unaffected but related controls could be established. This haplotype analysis could not verify the candidate alleles to be linked to disease inheritance. Besides the only known German family with mutation in the gene UCH-L1 there is currently no other specified family who shows linkage to PARK5. All other currently known autosomal

inherited genes for familial Parkinson's disease had been previously excluded. Consequently, the genetic etiology of this disease in the Spanish family stays unidentified until there are more members affected, which will give the opportunity to perform a genome-wide independent linkage analysis.

In the last part of this thesis, a statistical approach via case-control association studies was used to test candidate interactor proteins of PINK1 for involvement in sporadic Parkinson's disease pathogenesis. In a hypothesis-testing sample consisting of 192 Parkinson's disease patients and 192 random blood bank controls two single nucleotide polymorphisms in the gene encoding for the mitochondrial initiation factor 3 (MTIF3) and the gene for the kinase protein NME4 were tested with allele association studies. The results showed a significantly increased frequency of heterozygotes among the patients and a significantly decreased frequency of homozygotes among the control group for one MTIF3 genotype. These results were corroborated in a hypothesis-confirming sample of Central European origin, containing 262 sporadic Parkinson patients and 182 related but unaffected controls. Analysing the distribution of the relative risk, the phenomenon of molecular heterosis can be shown. Here the study design differed from conventional association studies due to the fact that patients and unrelated random controls as well as patients and related but unaffected controls were tested. The first group maximizes statistical power, while the second group reduces stratification bias and environmental influences. The methodical range included polyacrylamide gel electrophoresis (PCR) following a restriction digest analysis. In conclusion, the relative risk for Parkinson's disease may be significantly increased when the single nucleotide polymorphism (SNP) rs7669 shows a heterozygote nucleotide exchange and significantly decreased when the SNP shows a homozygote nucleotide exchange in contrast to the wildtype. The allele association found here marks a chromosomal area of 100kB distance centromeric and telomeric from MTIF3 as a candidate region. Within this chromosomal area there is only one other gene (GTF3A), but the protein encoded influences cellular protein synthesis rather than having influence on mitochondrial function. The putative PINK1 interactor MTIF3 may have influence on the homeostasis and functionality of the mitochondrial respiratory chain, emphasizing its putative role in Parkinson pathogenesis.

For the polygenetic, non-Mendelian forms of Parkinson's disease, MTIF3 might have an important role next to other, not yet identified genetic risk factors. This result should be validated by further genetic and biochemical studies to understand in detail the role of PINK1 and mitochondria in the Parkinson pathogenesis.

7. Literaturverzeichnis

Adams V, Bosch W, Schlegel J, Wallimann T, Brdiczka D (1989): *Further characterization of contact sites from mitochondria of different tissues: topology of peripheral kinases.* Biochim Biophys Acta 981(2): 213-225

Ahmad F, Davis MB, Waddy HM, Oley CA, Marsden CD, Harding AE (1993): *Evidence for locus heterogeneity in autosomal dominant torsion dystonia.* Genomics 15: 9-12

Almasy L, Bressman SB, Raymond D, Kramer PL, Greene PE, Heiman GA, Ford B, Yount J, Leon D de, Chouinard S, Saunders-Pullman R, Brin MF, Kapoor RP, Jones AC, Shen H, Fahn S, Risch NJ, Nygaard TG (1997): *Idiopathic torsion dystonia linked to chromosome 8 in two Mennonite families.* Ann Neurol 42: 670-673

Ardley H C, Scott GB, Rose SA, Tan NGS, Robinson PA (2004): *UCH-L1 aggresome formation in response to proteasome impairment indicates a role in inclusion formation in Parkinson's disease.* J Neurochem 90: 379-391

Auburger G, Ratzlaff T, Lunkes A, Nelles HW, Leube B, Binkofski F, Kugel H, Heindel W, Seitz R, Benecke R, Witte OW, Voit T (1996): *A gene for autosomal dominant paroxysmal choreoathetosis/ spasticity (CSE) maps to the vicinity of a potassium channel gene cluster on chromosome 1p, probably within 2cM between DIS443 and DIS197.* Genomics 31: 90-94

Auburger G, Kessler KR, Kang J-S, Gispert S, Stoltenburg G, Braak H (2005) : *Die PARK5 I93M Mutation verursacht Parkinson'sche Krankheit mit kognitiver Einschränkung und Lewy-Pathologie? (Ergebnisse präsentiert auf dem 4. deutschen Parkinson Kongress in Frankfurt/Main 3.-5. März 2005)*

Augood SJ, Martin DM, Ozelius LJ, Breakefield XO, Penney JB, Standaert DG (1999): *Distribution of the mRNAs encoding TorsinA and TorsinB in the normal adult human brain.* Ann Neurol 46: 761-769

Bandmann O, Müller U (2002): *Dystonien.* In: Riess O, Schöls L (Hrsg.): Neurogenetik. 2.Aufl., Kohlhammer, S. 340f

Bandmann O, Nygaard TG, Surtees R, Marsden D, Wood NW, Harding AE (1996): *Dopa-responsive dystonia in British patients: new mutations of the GTP-cyclohydrolase I gene and evidence for genetic heterogeneity.* Hum Mol Genet 5(3): 403-406

Beal MF (2004): *Commentary on "Alpha-synuclein and mitochondria: a tangled skein".* Exp Neurol 186: 109-111

Beilina A, Burg M van der, Ahmad R, Kesavapany S, Miller DW, Petsko GA, Cookson MR (2005): *Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability.* PNAS 102(16): 5703-5708

Benecke R, Strümper P, Weiss H (1992): *Electron transfer complex I defect in idiopathic dystonia.* Ann Neurol 32: 683-686

- Bénil P**, Beugnot R, Chretien D, Giurgea I, Lonlay-Debeney P de, Issartel JP, Corral-Debrinski M, Kersch S, Rustin P, Rötig A, Munnich A (2003): *Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy*. Hum Mutat 21: 582-586
- Bennett MC**, Bishop JF, Leng Y, Chock PB, Chase TN, Mouradian MM (1999): *Degradation of α -synuclein by proteasome*. J Biol Chem 274(48): 33855-33858
- Berg D**, Holzmann C, Riess O (2003): *14-3-3 proteins in the nervous system*. Nature Reviews 4: 752-762
- Berman SB**, Hastings TG (1999): *Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease*. J Neurochem 73: 1127-1137
- Betarbet R**, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000): *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nature Neurosci 3(12): 1301-1306
- Bethlem J**, Hartog Jager WA den (1960): *The incidence and characteristics of Lewy bodies in idiopathic paralysis agitans (Parkinson's disease)*. J Neurol Neurosurg Psychiatr 23: 74-80
- Bhidayasiri R**, Bronstein JM (2005): *Improvement of cervical dystonia: possible role of transcranial magnetic stimulation simulating sensory tricks effect*. Med Hypotheses 64: 941-945
- Bhidayasiri R**, Jen JC, Baloh RW (2005): *Three brothers with a very-late-onset writer's cramp*. Mov Disord 20(10): 1375-1377
- Blackinton J**, Ahmad R, Miller DW, Brug MP van der, Canet-Avilés RM, Hague SM, Kaleem M, Cookson MR (2005): *Effects of DJ-1 mutations and polymorphisms on protein stability and subcellular localization*. Brain Res Mol Brain Res 134: 76-83
- Blanchetot C**, Tertoolen LG, Overvoorde J, Hartog Jager WA den (2002): *Intra- and intermolecular interactions between intracellular domains of receptor protein-tyrosine phosphatases*. J Biol Chem 277(49): 47263-47269
- Böhringer S**, Epplen JT (2002): *Analyse komplexer genetischer Erkrankungen*. In: Riess O, Schöls L (Hrsg.): Neurogenetik. 2.Aufl., Kohlhammer, S. 35f
- Bonifati V**, Rizzu P, Baren MJ van, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, Dongen JW van, Vanacore N, Swieten JC van, Brice A, Meco G, Duijn CM van, Oostra BA, Heutink P (2003): *Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism*. Science 299: 256-259
- Braak H**, Del Tredici K (2008): *Neue Sicht des kortiko-striato-thalamo-kortikalen Regelkreises bei M. Parkinson*. Nervenarzt 79(12): 1440-1445
- Bressman SB** (2004): *Dystonia genotypes, phenotypes and classification*. Adv Neurol 94: 101-107

- Bressman SB**, Leon D de, Kramer PL, Ozelius LJ, Brin MF, Greene PE, Fahn S, Breakefield XO, Risch NJ (1994): *Dystonia in Ashkenazi Jews: clinical characterization of a founder mutation*. Ann Neurol 36: 771-777
- Bressman SB**, Warner TT, Almasy L, Uitti RJ, Greene PE, Heiman GA, Raymond D, Ford B, Leon D de, Fahn S, Kramer PL, Risch NJ, Maraganore DM, Nygaard TG, Harding AE (1996): *Exclusion of the DYT1 locus in familial torticollis*. Ann Neurol 40: 681-684
- Bruggencate G** ten, Dieringer N (2003): *Sensomotorische Systeme: Körperhaltung, Bewegung und Blickmotorik*. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.): Lehrbuch der Physiologie. 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 682f
- Burden-Gulley SM**, Brady-Kalnay SM (1999): *PTP μ regulates n-cadherin-dependent neurite outgrowth*. J Cell Biol 144: 1323-1336
- Cabin DE**, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL (2002): *Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α -synuclein*. J Neurosci 22(20): 8797-8807
- Camargos S**, Scholz S, Simón-Sánchez J, Paisán-Ruiz C, Lewis P, Hernandez D, Ding J, Gibbs JR, Cookson MR, Bras J, Guerreiro R, Resende Liveira C, Lees A, Hardy J, Cardoso F, Singleton AB (2008): *DYT16, a novel young-onset dystonia-parkinsonism disorder: identification of a segregating mutation in the stress-response protein PRKRA*. Lancet Neurol 7: 207-215
- Campbell NA** (2000): *Biologie*. 2.Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 411f
- Carvalho Aguiar P** de, Sweadner KJ, Penniston JT, Zaremba J, Liu L, Caton M, Linazasoro G, Borg M, Tijssen MAJ, Bressman SB, Dobyns WB, Brashear A, Ozelius LJ (2004): *Mutations in the Na⁺/K⁺-ATPase α 3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism*. Neuron 43: 169-175
- Chandra S**, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC (2005): *α -Synuclein cooperates with CSP α in preventing neurodegeneration*. Cell 123: 282-296
- Chen DH**, Matsushita M, Rainier S, Meaney B, Tisch L, Feleke A, Wolff J, Lipe H, Fink J, Bird TD, Raskind WH (2005): *Presence of Alanine-to-Valine substitutions in myofibrillogenesis regulator 1 in paroxysmal nonkinesigenic dyskinesias*. Arch Neurol 62: 597-600
- Clark IE**, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Hong Seol J, Ji Yoo S, Hay BA, Guo M (2006): *Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin*. Nature 441: 1162-1166
- Comings DE**, MacMurray JP (2000): *Molecular heterosis: a review*. Molec Genet Metab 71: 19-31
- Coo R** de, Buddiger P, Smeets H, Kessel AG van, Morgan-Hughes J, Weghuis DO, Overhauser J, Oost B van (1995): *Molecular cloning and characterization of the active*

human mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase 24-kDa gene (NDUFV2) and its pseudogene. Genomics 26: 461-466

Cookson MR (2005): *The biochemistry of Parkinson's disease.* Annu Rev Biochem 74: 29-52

Dawson TM, Dawson VL (2003): *Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease.* Science 302: 819-821

Dekker MCJ, Bonifati V, van Duijn CM (2003): *Parkinson's disease: piecing together a genetic jigsaw.* Brain 126: 1722-1733

Denic S, Khatib F, Awad M, Karbani G, Milenkovic J (2004): *Cancer by negative heterosis: breast and ovarian cancer excess in hybrid of inbred ethnic groups.* Med Hypotheses 64: 1002-1006

Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996): *A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites.* Nature 380(6570): 152-154

Doss-Pepe EW, Chen L, Madura K (2005): *Alpha-synuclein and parkin contribute to the assembly of ubiquitin lysine63-linked multiubiquitin chains.* J Biol Chem 280(17): 6619-6624

Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Corrèze JR, Delemotte B, Amouyel P, Alperovitch A, Chartier-Harlin MC, Tzourio C (2003): *S18Y polymorphism in the UCH-L1 gene and Parkinson's disease: evidence for an age-dependent relationship.* Mov Disord 18: 130-137

Ellis CE, Murphy EJ, Mitchell DC, Golovko MY, Scaglia F, Berceλό-Coblijn GC, Nussbaum RL (2005): *Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking α -synuclein.* Mol Cell Biol 25(22): 10190-10201

Epand RF, Schlattner U, Wallimann T, Lacombe ML, Epand RM (2007): *Novel lipid transfer property of two mitochondrial proteins that bridge the inner and outer membranes.* Biophys J 92: 126-137

Eriksen JL, Wszolek Z, Petrucelli L (2005): *Molecular pathogenesis of Parkinson disease.* Arch Neurol 62: 353-357

Facheris M, Strain KJ, Lesnick TG, Andrade M de, Bower JH, Ahlskog E, Cunningham JM, Lincoln S, Farrer MJ, Rocca WA, Maraganore DM (2005): *UCHL1 is associated with Parkinson's disease: A case-unaffected sibling and case-unrelated control study.* Neurosci Lett 381: 131-134

Fahn S, Bressman SB, Marsden CD (1998): *Classification of dystonia.* Adv Neurol 78: 1-10

Fahn S, Williams DT (1988): *Psychogenic dystonia.* Adv Neurol 50 (Dystonia 2): 431-455

Farrer M, Gwinn-Hardy K, Hutton M, Hardy J (1999a): *The genetics of disorders with synuclein pathology and parkinsonism.* Hum Mol Genet 8(10): 1901-1905

- Farrer M**, Gwinn Hardy K, Muentner M, Wavrant DeVrieze F, Crook R, Perez-Tur J, Lincoln S, Maraganore D, Adler C, Newman S, MacElwee K, McCarthy P, Miller C, Waters C, Hardy J (1999b): *A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor*. Hum Mol Genet 8(1): 81-85
- Fink JK**, Rainier S, Wilkowski J, Jones SM, Kume A, Hedera P, Albin R, Mathay J, Girbach L, Varvil T, Otterud B, Leppert M (1996): *Paroxysmal dystonic choreoathetosis: tight linkage to chromosome 2q*. Am J Hum Genet 59: 140-145
- Freedman ML**, Reich D, Penney KL, McDonald GJ, Mignault AA, Patterson N, Gabriel SB, Topol EJ, Smoller JW, Pato CN, Pato MT, Petryshen TL, Kolonel LN, Lander ES, Sklar P, Henderson B, Hirschhorn JN, Altshuler D (2004): *Assessing the impact of population stratification on genetic association studies*. Nature Genetics 36(4): 388-393
- Funayama M**, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obato F (2002): *A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1*. Ann Neurol 51: 296-301
- Furukawa Y**, Shimadzu M, Rajput AH, Shimizu Y, Tagawa T, Mori H, Yokochi M, Narabayashi H, Hornykiewicz O, Mizuno Y, Kish SJ (1996): *GTP-cyclohydrolase I gene mutations in hereditary progressive and dopa-responsive dystonia*. Ann Neurol 39: 609-617
- George JM**, Jin H, Woods WS, Clayton DF (1995): *Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch*. Neuron 15: 361-372
- Gerlach M**, Reichmann H, Riederer P (2003): *Die Parkinson Krankheit, Grundlagen – Klinik – Therapie*. 3. Aufl., Springer, Wien, New York, S. 22-28; 72; 128-134; 137; 165-210; 249
- Gispert S**, Del Turco D, Garrett L, Chen A, Bernard DJ, Hamm-Clement J, Korf HW, Deller T, Braak H, Auburger G, Nussbaum RL (2003): *Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation*. Mol Cell Neurosci 24: 419-429
- Golbe LI**, Mouradian MM (2004): *Alpha-synuclein in Parkinson's disease: light from two new angles*. Ann Neurol 55(2): 153-155
- Gordon MF**, Bressman S, Brin MF, Leon D de, Warburton D, Yeboa K, Fahn S (1995): *Dystonia in a patient with deletion of 18q*. Mov Disord 10(4): 496-499
- Grimes DA**, Han F, Lang AE, George-Hyslop P St, Racacho L, Bulman DE (2002): *A novel locus for inherited myoclonus-dystonia on 18p11*. Neurology 59: 1183-1186
- Grundmann K** (2005): *Primary torison dystonia*. Arch Neurol 62: 682-685
- Gusella JF**, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB (1983): *A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease*. Nature 306: 234-238
- Gwinn-Hardy K** (2002): *Genetics of Parkinsonism*. Mov Disord 17: 645-656
- Han F**, Racacho L, Lang AE, Bulman DE, Grimes DA (2007): *Refinement of the DYT15 locus in myoclonus dystonia*. Mov Disord 22 (6): 888-892

Harrower TP, Michell AW, Barker RA (2005): *Lewy bodies in Parkinson's disease: protectors or perpetrators?* Exp Neurol 195: 1-6

Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A (2001): *Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)*. PNAS 98(23): 13355-13360

Hatano T, Kubo S, Imai S, Maeda M, Ishikawa K, Mizuno Y, Hattori N (2007): *Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts*. Hum Mol Genet 16: 678-690

Hatano Y, Sato K, Elibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng AR, Rosales RL, Hassin-Baer S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu-Chou YH, Ata FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N (2004): *PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations*. Neurology 63: 1482-1485

Hattori N, Mizuno Y (2004): *Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease*. Lancet 364: 722-724

Hattori N, Suzuki H, Wang Y, Minoshima S, Shimizu N, Yoshino H, Kurashima R, Tanaka M, Ozawa T, Mizuno Y (1995): *Structural organization and chromosomal localization of the human nuclear gene (NDUFV2) for the 24-kDa iron-sulfur subunit of complex I in mitochondrial respiratory chain*. Biochem Biophys Res Commun 216(3): 771-777

Hattori N, Yoshino H, Tanaka M, Suzuki H, Mizuno Y (1998): *Genotype in the 24-kDa subunit gene (NDUFV2) of mitochondrial complex I and susceptibility to Parkinson disease*. Genomics 49: 52-58

Healy DG, Abou-Sleiman PM, Ahmadi KR, Muqit MMK, Bhatia KP, Quinn NP, Lees AJ, Latchman DS, Goldstein DB, Wood NW (2004): *The gene responsible for PARK6 Parkinson's disease, PINK1, does not influence common forms of parkinsonism*. Ann Neurol 56: 329-335

Hedrich K, Djarmati A, Schäfer N, Hering R, Wellenbrock C, Weiss PH, Hilker R, Vieregge P, Ozelius LJ, Heutnik P, Bonifati V, Schwinger E, Lang AE, Noth J, Bressman SB, Pramstaller PP, Riess O, Klein C (2004): *DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease*. Neurology 62: 389-394

Hedrich K, Kann M, Lanthaler AJ, Dalski A, Eskelson C, Landt O, Schwinger E, Vieregge P, Lang AE, Breakefield XO, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C (2001): *The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the parkin gene in early-onset parkinsonism*. Hum Mol Genet 10(16): 1649-1656

Hershman KM, Levitan ES (2000): *RPTP μ and protein phosphorylation regulate K⁺ channel mRNA expression in adult cardiac myocytes*. Am J Physiol Cell Physiol 278: 397-403

Hicks AA, Pétursson H, Jónsson T, Stefánsson H, Jóhannsdóttir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefánsson K, Sveinbjörnsdóttir S (2002): *A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease*. Ann Neurol 52: 549-555

- Hoenicka J**, Vidal L, Morales B, Ampuero I, Jiménez-Jiménez FJ, Berciano J, Ser T, del, Jiménez A, Ruiz PG, Yébenes JG de (2002): *Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain*. Arch Neurol 59: 966-970
- Hofele K**, Benecke R, Auburger G (1997): *Gene locus FPD1 of the dystonic Mount-Reback type of autosomal dominant paroxysmal choreoathetosis*. Neurology 49: 1252-1256
- Holton JL**, Schneider SA, Ganesharajah T, Gandhi S, Strand C, Shashidharan P, Barreto J, Wood NW, Lees AJ, Bhatia KP, Revesz T (2008): *Neuropathology of primary adult-onset dystonia*. Neurology 70: 695-699
- Hornykiewicz O** (2001): *How L-DOPA was discovered as a drug for Parkinson's disease 40 years ago*. Wien Klin Wochenschr 113(22): 855-862
- Ichihara N**, Wu J, Chui DH, Yamazaki K, Wakabayashi T, Kikuchi T (1995): *Axonal degeneration promotes abnormal accumulation of amyloid β -protein in ascending gracile tract of gracile axonal dystrophy (GAD) mouse*. Brain Res 695: 173-178
- Ichinose H**, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, Nomura Y, Endo K, Tanaka H, Tsuji S, Fujita K, Nagatsu T (1994): *Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene*. Nature Genetics 8: 236-242
- Jenner P** (2003): *Oxidative stress in Parkinson's disease*. Ann Neurol 53 (suppl 3): S26-S38
- Kabakci K**, Hedrich K, Leung JC, Mitterer M, Vieregge P, Lencer R, Hegenah J, Garrels J, Witt K, Klostermann F, Svetel M, Friedman J, Kostic V, Bressman SB, Breakefield XO, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C (2004): *Mutation in DYT1 extension of the phenotype and mutational spectrum*. Neurology 62: 395-400
- Kanada S**, Bishop JF, Eglitis MA, Yang Y, Mouradian MM (2000): *Enhanced vulnerability to oxidative stress by α -synuclein mutations and C-terminal truncation*. Neurosci 97(2): 279-284
- Kessler KR**, Hamscho N, Morales B, Menzel C, Barrero F, Vives F, Gispert S, Auburger G (2005): *Dopaminergic function in a family with the PARK6 form of autosomal recessive Parkinson's syndrome*. J Neural Transm 112(10): 1345-53
- Kitada T**, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998): *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature 392: 605-608
- Klein C** (2005): *Movement disorders: classifications*. J Inherit Metab Dis 28: 425-439
- Klein C**, Hedrich K, Wellenbrock C, Kann M, Harris J, Marder K, Lang AE, Schwinger E, Ozelius LJ, Vieregge P, Pramstaller PP, Kramer PL (2003): *Frequency of parkin mutations in late-onset Parkinson's disease*. Ann Neurol 54(3): 415-416
- Klein C**, Kann M, Pramstaller PP, Breakefield XO, Ozelius LJ, Vieregge P (2000): *Genetik der Dystonien*. Nervenarzt 71: 431-441

- Klein C**, Brin MF, Leon D de, Limborska SA, Ivanova-Smolenskaya IA, Bressman SB, Friedman A, Markova ED, Risch NJ, Breakefield XO, Ozelius LJ (1998a): *De novo mutations (GAG deletion) in the DYT1 gene in two non-Jewish patients with early-onset dystonia*. Hum Mol Genet 7: 1133-1136
- Klein C**, Page CE, LeWitt P, Gordon MF, Leon D de, Awaad Y, Breakefield XO, Brin MF, Ozelius LJ (1998c): *Genetic analysis of three patients with an 18p-syndrome and dystonia*. Neurology 52(3): 649-51
- Koc EC**, Spremulli LL (2002): *Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs*. J Biol Chem 277: 35541-35549
- Koehler CM**, Leuenberger D, Merchant S, Renold A, Junne T, Schatz G (1999): *Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease*. PNAS 96: 2141-2146
- Koop EA**, Lopes SC, Feiken E, Bluysen HAR, Valk M van der, Voest EE, Mummery CL, Moolenaar WH, Gebbink MFBG (2003): *Receptor protein tyrosine phosphatase μ expression as a marker for endothelial cell heterogeneity; analysis of RPTP μ gene expression using LacZ knock-in mice*. Int J Dev Biol 47: 345-354
- Kramer PL**, Heiman GA, Gasser T, Ozelius LJ, Leon D de, Brin MF, Burke RE, Hewett J, Hunt AL, Moskowitz C, Nygaard TG, Wilhelmsen KC, Fahn S, Breakefield XO, Risch NJ, Bressman SB (1994): *The DYT1 gene on 9q34 is responsible for most cases of early limb-onset idiopathic torsion dystonia in non-Jews*. Am J Hum Genet 55: 468-475
- Kramer PL**, Mineta M, Klein C, Schilling K, Leon D de, Farlow MR, Breakefield XO, Bressman SB, Dobyns WB, Ozelius LJ, Brashear A (1999): *Rapid-onset dystonia-parkinsonism: linkage to chromosome 19q13*. Ann Neurol 46: 176-182
- Krüger R**, Eberhardt O, Riess O, Schulz JB (2002): *Parkinson's disease: one biochemical pathway to fit all genes?* Trends Mol Med 8(5): 236-240
- Krüger R**, Kuhn W, Müller T, Voitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O (1998): *Ala30Pro mutation in the gene coding α -synuclein in Parkinson's disease*. Nature Genetics 18: 106-108
- Lance JW** (1977): *Familial paroxysmal dystonic choreoathetosis and its differentiation from related syndromes*. Ann Neurol 2: 285-293
- Langston JW** (1998): *Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease: progress in resolving an age-old debate*. Ann Neurol 44(Suppl. 1): S45-S52
- Larsen CN**, Krantz BA, Wilkinson KD (1998): *Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin c-terminal hydrolases*. Biochemistry 37: 3358-3368
- Lee KH**, Kwak YD, Kim DH, Chang MY, Lee YS, Lee YS (2004a): *Human zinc finger protein 161, a novel transcriptional activator of the dopamine transporter*. Biochem Biophys Res Commun 313: 969-976

- Lee** HY, Xu Y, Huang Y, Ahn AH, Auburger G, Pandolfo M, Kwieciński H, Grimes DA, Lang AE, Nielsen JE, Averyanov Y, Servidei S, Friedman A, Bogaert P van, Abramowicz MJ, Bruno MK, Sorensen BF, Tang L, Fu YH, Ptáček LJ (2004b): *The gene for paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia encodes an enzyme in a stress response pathway*. Hum Mol Genet 13(24): 3161-3170
- Lera** G, Bhatia K, Marsden CD (1994): *Dystonia as the major manifestation of Leigh's syndrome*. Mov Disord 9(6): 642-649
- Leroy** E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Levedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998a) : *The ubiquitin pathway in Parkinson's disease*. Nature 395: 451-452
- Leroy** E, Boyer R, Polymeropoulos MH (1998b): *Intron-exon structure of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1*. DNA Res 5: 397-400
- Leube** B, Auburger G (1998): *Questionable role of adult-onset focal dystonia among sporadic dystonia patients*. Ann Neurol 44(6): 984-985
- Leube** B, Hendgen T, Kessler KR, Knapp M, Benecke R, Auburger G (1997a): *Evidence of DYT7 being a common cause of cervical dystonia (torticollis) in Central Europe*. Am J Med Genet 74: 529-532
- Leube** B, Hendgen T, Kessler KR, Knapp M, Benecke R, Auburger G (1997b): *Sporadic focal idiopathic dystonia patients in Northwest Germany: Molecular basis elucidated by chromosome 18p analysis*. Ann Neurol 42: 111-114
- Leube** B, Kessler KR, Ferbert A, Ebke M, Schwendemann G, Erbguth F, Benecke R, Auburger G (1999): *Phenotypic variability of the DYT1 mutation in German dystonia patients*. Acta Neurol Scand 99: 248-251
- Leube** B, Kessler KR, Goecke T, Auburger G, Benecke R (1997c): *Frequency of familial inheritance among 488 index patients with idiopathic focal dystonia and clinical variability in a large family*. Mov Disord 12(6): 1000-1006
- Leube** B, Rudnicki D, Ratzlaff T, Kessler KR, Benecke R, Auburger G (1996): *Idiopathic torsion dystonia: assignment of a gene to chromosome 18p in a German family with adult onset, autosomal dominant inheritance and purely focal distribution*. Hum Mol Genet 5(10): 1673-1677
- Levecque** C, Destée A, Mouroux V, Becquet E, Defebvre L, Amouyel P, Chartier-Harlin MC (2001): *No genetic association of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 gene S18Y polymorphism with familial Parkinson's disease*. J Neural Transm 108: 979-984
- Lewin** B (1998): *Molekularbiologie der Gene*. 1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg, S.95-110
- Lewy** FH (1913): *Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans*. Dtsch Z Nervenheilk 50: 50-55

- Lincoln S**, Vaughan J, Wood N, Baker M, Adamson J, Gwinn-Hardy K, Lynch T, Hardy J, Farrer M (1999) : *Low frequency of pathogenic mutations in the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase gene in familial Parkinson's disease*. NeuroReport 10: 427-429
- Liss B**, Haeckel O, Wildmann J, Miki T, Seino S, Roeper J (2005): *K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons*. Nature Neurosci 8(12): 1742-1751
- Liu S**, Ninan I, Antonova I, Battaglia F, Trinchese F, Narasanna A, Kolodilov N, Dauer W, Hawkins RD, Arancio O (2004): *α -synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release*. The EMBO Journal 23: 4506-4516
- Liu Y**, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury Jr PT (2002): *The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect α -synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility*. Cell 111: 209-218
- Logroscino G** (2005): *The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: What is the evidence?* Environ Health Perspect 113: 1234-1238
- Lücking CB**, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, Michele G de, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Denèfle P, Wood NW, Agid Y, Brice A (2000): *Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene*. N Engl J Med 342(21): 1560-1567
- Maraganore DM** (2005): *Blood is thicker than water*. Neurology 64: 408-409
- Maraganore DM**, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Krüger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JPA, Andrade M de, Rocca WA, and the UCHL1 Global Genetics Consortium (2004): *UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene*. Ann Neurol 55: 512-521
- Marsden CD**, Harrison MJG, Bunday S (1976): *Natural history of idiopathic torsion dystonia*. Adv Neurol 14: 177-187
- Mc Naught KStP**, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW (2003): *Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease*. Exp Neurol 179: 38-46
- Mc Naught KStP**, Olanow CW (2003): *Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease*. Ann Neurol 53 (suppl 3): S73-S86
- Mellick GD**, Silburn PA (2000): *The ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 gene S18Y polymorphism does not confer protection against idiopathic Parkinson's disease*. Neurosci Lett 293: 127-130
- Mendel K** (1931): *Torsionsdystonie*. Handbuch der Neurologie XVI: 849-873
- Mercer A**, Rönholm H, Holmberg J, Lundh H, Heidrich J, Zachrisson O, Ossoinak A, Frisén J, Patrone C (2004): *PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain*. J Neurosci Res 76: 205-215

- Milon L**, Meyer P, Chiadmi M, Munier A, Johansson M, Karlsson A, Lasco I, Capeau J, Lacombe JJ, Lacombe ML (2000): *The human nm23-H4 gene product is a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase*. J Biol Chem 279: 14264-14272
- Milon L**, Rousseau-Merck MF, Munier A, Erent M, Lasco I, Capeau J, Lacombe ML (1997): *Nm23-H4, a new member of the family of human nm23/nucleoside diphosphate kinase genes localised on chromosome 16p13*. Hum Genet 99: 550-557
- Mizuno Y**, Hattori N, Kubo S, Sato S, Nishioka K, Hatano T, Tomiyama H, Funayama M, Machida Y, Mochizuki H (2008): *Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease*. Phil Trans R Soc B 363: 2215-2227
- Mizuno Y**, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y (1989): *Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease*. Biochem Biophys Res Commun 163(3): 1450-1455
- Mizuno Y**, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T, Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kondo T (1998): *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Ann Neurol 44(Suppl. 1): S99-S109
- Moore DJ**, Zhang L, Troncoso J, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL (2005): *Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress*. Hum Mol Genet 14(1): 71-84
- Mosbacher S**, Holzmann C, Hermann K, Schwarz N, Krüger R, Ichimura T, Riess O (2005): *Charakterisierung 14-3-3 homologer Gene und deren Bedeutung für die Parkinson'sche Erkrankung*. (Ergebnisse präsentiert auf dem 4. deutschen Parkinson Kongress in Frankfurt/Main 3.-5. März 2005)
- Müftüoğlu M**, Elibol B, Dalmazrak Ö, Ercan A, Kulaksız G, Ögüs H, Dalkara T, Özer N (2003): *Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations*. Mov Disord 19(5): 544-779
- Müller U**, Graeber MB (1991): *Dystonie-Parkinson-Syndrom*. MMW Munch Med Wochenschr 133(30): 456-460
- Müller U**, Kupke KG (1990): *The genetics of primary torsion dystonia*. Hum Genet 84: 107-115
- Nagakubo D**, Taira T, Kitaura H, Ideka M, Tamai K, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H (1997): *DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras*. Biochem Biophys Res Commun 231: 509-513
- Nasir J**, Frima N, Pickard B, Malloy MP, Zhan L, Grünwald R (2006): *Unbalanced whole arm translocation resulting in loss of 18p in dystonia*. Mov Disord 21: 859-863
- Naumann M** (1998): *Botulinumtoxin – Wirkprinzip und klinische Anwendung*. 1.Aufl., UNI-MED, Bremen, S.20; 27-31
- Németh AH** (2002): *The genetics of primary dystonias and related disorders*. Brain 125: 695-721

- Nolte D**, Niemann S, Müller U (2003): *Specific sequence changes in multiple transcript system DYT3 are associated with X-linked dystonia parkinsonism*. PNAS 100(18): 10347-10352
- Nygaard TG**, Duvoisin RC (1986): *Hereditary dystonia-parkinsonism syndrome of juvenile onset*. Neurology 36: 1424-1428
- Nygaard TG**, Raymond D, Chen C, Nishino I, Greene PE, Jennings D, Heiman GA, Klein C, Saunders-Pullman RJ, Kramer P, Ozelius LJ, Bressman SB (1999): *Localization of a gene for Myoclonus-Dystonia to chromosome 7q21-q31*. Ann Neurol 46: 794-798
- Oppenheim H** (1911): *Über eine eigenartige Krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters*. Neurologisches Zentralblatt 30: 1090-1107
- Osaka H**, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K (2003): *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron*. Hum Mol Genet 12(16): 1945-1958
- Ozelius LJ**, Hewett JW, Page CE, Bressman SB, Kramer PL, Shalish C, Leon D de, Brin MF, Raymond D, Corey DP, Fahn S, Risch NJ, Buckler AJ, Gusella JF, Breakefield XO (1997): *The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein*. Nature Genetics 17: 40-48
- Ozelius L**, Kramer PL, Moskowitz CB, Kwiatkowski DJ, Brin MF, Bressman SB, Schuback DE, Falk CT, Risch N, Leon D de, Burke RE, Haines J, Gusella JF, Fahn S, Breakefield XO (1989): *Human gene for Torsion Dystonia located on chromosome 9q32-q34*. Neuron 2: 1427-1434
- Paisán-Ruiz C**, Lang AE, Kawarai T, Sato C, Salehi-Rad S, Fisman GK, Al-Khairallah T, St George-Hyslop P, Singleton A, Rogaeva E (2005): *LRRK2 gene in Parkinson disease mutation analysis and case control association study*. Neurology 65: 696-700
- Palu E**, Liesi P (2002): *Differential distribution of laminins in Alzheimer disease and normal human brain tissue*. J Neurosci Res 69: 243-256
- Pankratz N**, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T and the Parkinson Study Group (2003a): *Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families*. Hum Mol Genet 12(20): 2599-2608
- Pankratz N**, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T and the Parkinson Study Group (2003b): *Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37*. Am J Hum Genet 72: 1053-1057
- Park J**, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim J-M, Chung J (2006): *Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin*. Nature 441: 1157-1161
- Parker N** (1985): *Hereditary whispering dysphonia*. J Neurol Neurosurg Psychiat 48: 218-224

- Petit A**, Kawarai T, Paitel E, Sanjo M, Maj M, Scheid M, Chen F, Gu Y, Hasegawa H, Salehi-Rad S, Wang L, Rogaeva E, Fraser P, Robinson B, St George-Hyslop P, Tandon A (2005): *Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations*. J Biol Chem 280(40): 34025-34032
- Polymeropoulos MH**, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Iorio G di, Sanges G, Stanroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC (1996): *Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23*. Science 274: 1197-1199
- Polymeropoulos MH**, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Iorio G di, Golbe LI, Nussbaum RL (1997): *Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. Science 276: 2045-2047
- Quinn NP** (1993): *Parkinsonism and dystonia, pseudoparkinsonism and pseudodystonia*. Adv Neurol 60: 540-543
- Ramirez A**, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C (2006) : *Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase*. Nature Genetics 38 (10) : 1184-1191
- Reichmann H**, Janetzky (2000): *Mitochondrial dysfunction – a pathogenetic factor in Parkinson's disease*. J Neurol 247(Suppl 2): II/63-II/68
- Risch N** (2000): *Searching for genetic determinants in the new millenium*. Nature 405: 847-856
- Risch N**, Leon D de, Ozelius L, Kramer P, Almasy L, Singer B, Fahn S, Breakefield XO, Bressman S (1995): *Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population*. Nature Genetics 9: 152-159
- Risch N**, Merikangas K (1996): *The future of genetic studies of complex human diseases*. Science 273: 1516-1517
- Rohé CF**, Montagna P, Breedveld G, Cortelli P, Oostra BA, Bonifati V (2004): *Homozygous PINK1 C-terminus mutation causing early-onset parkinsonism*. Ann Neurol 56: 427-431
- Saigoh K**, Wang YL, Suh JG, Yamanishi T, Sakai Y, Kiyosawa H, Harada T, Ichihara N, Wakana S, Kikuchi T, Wada K (1999): *Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice*. Nature Genetics 23: 47-51
- Schapira AHV**, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, Patel SD, Cleeter MJW, Ragan CI, Clark JB (1988): *Molecular basis of mitochondrial myopathies: polypeptide analysis in complex-I deficiency*. Lancet 1(8584): 500-503

- Schapira** AHV, Gu M, Taanman JW, Tabrizi SJ, Seaton T, Cleeter M, Cooper JM.(1998): *Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease*. Ann Neurol 44(Suppl 1): S89-S98
- Schmidt** A, Schneider SA, Hagenah J, Klein C (2008): *Dystonien*. Nervenarzt 79 (Suppl 2): 53-66
- Schuelke** M, Smeitink J, Mariman E, Loeffen J, Plecko B, Trijbels F, Stöckler-Ipsiroglu S, Heuvel L van den (1999): *Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy*. Nature Genetics 21: 260-261
- Schumacher** J, Nöthen MM, Propping P (2002): *Methoden der Genidentifizierung bei genetisch komplexen Krankheiten*. In: Riess O, Schöls L (Hrsg.): Neurogenetik. 2.Aufl., Kohlhammer, S. 41-49
- Selkoe** DJ (2001): *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. Phys Rev 81(2): 741-766
- Sharma** M, Mueller JC, Zimprich A, Lichtner P, Hofer A, Leitner P, Maass S, Berg D, Dürr A, Bonifati V, Michele G de, Oostra B, Brice A, Wood NW, Wszolek ZK, Müller-Myhsok B, Gasser T (2006): *The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson disease in European populations*. J Med Genet 43(7): 557-562
- Sherer** TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT (2002): *An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered α -synuclein metabolism and oxidative damage*. J Neurosci 22(16): 7006-7015
- Sherman** MY, Goldberg AL (2001): *Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases*. Neuron 29: 15-32
- Shimura** H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ (2001): *Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease*. Science 293(5528): 263-269
- Silvestri** L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G (2005): *Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism*. Hum Mol Genet 14(22): 3477-92
- Singleton** AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003): *α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease*. Science 203: 841
- Strachan** T, Read AP (2005): *Molekulare Humangenetik*. 3.Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, München, S. 143-153; 210-218; 307-309; 462-481; 517-525
- Strauss** KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Müller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Krüger R

(2005): *Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease.* Hum Mol Genet 14: 2099-2111

Suijkerbuijk RF, Gebbink MFGB, Moolenaar WH, Geurts van Kessel A (1993): *Fine mapping of the human receptor-like protein tyrosine phosphatase gene (PTPRM) to 18p11.2 by fluorescence in situ hybridization.* Cytogenet Cell Genet 64: 245-246

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001): *A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death.* Molecular Cell 8: 613-621

Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Arigo SMM, Takahashi K, Ariga H (2004): *DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death.* EMBO reports 5: 213-218

Teng J, Risch N (1999): *The relative power of family-based and case-control designs for linkage disequilibrium studies of complex human diseases. II. Individual genotyping.* Genome Res 9: 234-241

Toda H, Hosokawa Y, Nishikimi M, Suzuki H, Kato K, Ozawa T (1989): *Cloning and sequencing of a cDNA encoding the precursor to the 24kDa iron-sulfur protein of human mitochondrial NADH dehydrogenase.* Int J Biochem 21(10): 1161-1168

Takorska-Schlattner M, Boissan, Munier A, Borot C, Mailleau C, Speer O, Schlattner U, Lacombe ML (2008): *The nucleoside diphosphate kinase D (NM23-H4) binds the inner mitochondrial membrane with high affinity to cardiolipin and couples nucleotide transfer with respiration.* JBC 283 (38): 26198-26207

Tomita H, Nagamitsu S, Wakui K, Fukushima Y, Yamada K, Sadamatsu M, Masui A, Konishi T, Matsuishi T, Aihara M, Shimizu K, Hashimoto K, Mineta M, Matsushima M, Tsujita T, Saito M, Tanaka H, Tsuji S, Takagi T, Nakamura Y, Nanko S, Kato N, Nakane Y, Niikawa N (1999): *Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis locus maps to chromosome 16p11.2-q12.1.* Am J Hum Genet 65: 1688-1697

Torres GE, Sweeney AL, Beaulieu JM, Shashidharan P, Garon MG (2004): *Effect of torsinA on membrane proteins reveals a loss of function and a dominant-negative phenotype of the dystonia-associated ΔE -torsinA mutant.* PNAS 101(44): 15650-15655

Trepel M (2004): *Neuroanatomie - Struktur und Funktion.* 3. Aufl., Urban & Fischer, München, Jena, Kapitel 9.2.2. bis 9.2.8.

Tu IP, Whittemore AS (1999): *Power of association and linkage tests when the disease alleles are unobserved.* Am J Hum Genet 64: 641-649

Uitti RJ, Maraganore DM (1993): *Adult onset familial cervical dystonia: report of a family including monozygotic twins.* Mov Disord 8(4): 489-494

Unoki M, Nakamura Y (2001): *Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway.* Oncogene 20(33): 4457-65

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R,

Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RG, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW (2004a): *Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1*. Science 304: 1158-1160

Valente EM, Bentivoglio AR, Cassetta E, Dixon PH, Davis MB, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Wood NW, Albanese A (2001a) : *DYT13, a novel primary torsion dystonia locus, maps to chromosome 1p36.13-36.32 in an Italian family with cranial-cervical or upper limb onset*. Ann Neurol 49: 362-366

Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali, Albanese A, Wood NW (2001b): *Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36*. Am J Hum Genet 68: 895-900

Valente EM, Brancati F, Caputo V, Graham EA, Davis MB, Ferraris A, Breteler MMB, Gasser T, Bonifati V, Bentivoglio AR, Michele G de, Dürr A, Cortelli P, Filla A, Meco G, Oostra BA, Brice A, Albanese A, Dallapiccola B, Wood NW (2002): *PARK6 is a common cause of familial parkinsonism*. Neurol Sci 23: 117-118

Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B, Bentivoglio AR (2004b): *PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism*. Ann Neurol 56: 336-341

Valente EM, Warner TT, Jarman PR, Mathen D, Fletcher NA, Marsden CD, Bhatia KP, Wood NW (1998): *The role of DYT1 in primary torsion dystonia in Europe*. Brain 121: 2335-2339

Waddy HM, Fletcher NA, Harding AE, Marsden CD (1991): *A genetic study of idiopathic focal dystonias*. Ann Neurol 29: 320-324

Wallace DC, Murdock DG (1999): *Mitochondria and dystonia: the movement disorder connection?* PNAS 96: 1817-1819

Wang YL, Takeda A, Osaka H, Hara Y, Furuta A, Setsuie R, Sun YJ, Kwon J, Sato Y, Sakurai M, Noda M, Yoshikawa Y, Wada K (2004): *Accumulation of β - and γ -synucleins in the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1-deficient gad mouse*. Brain Research 1019: 1-9

Washizuka S, Iwamoto K, Kazuno A, Kakiuchi C, Mori K, Kametani M, Yamada K, Kunugi H, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Yoshikawa T, Kato T (2004): *Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 at 18p11 with bipolar disorder in Japanese and the National Institute of Mental Health Pedigrees*. Biol Psychiatry 56: 483-489

Washizuka S, Kakiuchi C, Mori K, Kunugi H, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Kato T (2003): *Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 at 18p11 with bipolar disorder*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 120B:72-78

Weir ML, Klip A, Trimble WS (1998): *Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP*. Biochem J 333: 247-251

West AB, Zimprich A, Lockhart PJ, Farrer M, Singleton A, Holtom B, Lincoln S, Hofer A, Hill L, Müller-Myhsok B, Wszolek ZK, Hardy J, Gasser T (2001): *Refinement of the PARK3*

locus on chromosome 2p13 and the analysis of 14 candidate genes. Eur J Hum Genet 9: 659-666

Wilkinson KD (2000): *Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome.* Semin Cell Dev Biol 11: 141-148

Wilkinson KD, Lee K, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J (1989): *The neuron-specific protein PGP 9.5 is an ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase.* Science 246: 670-672

Williams DR, Hadeed A, Najim al-Din AS, Wreikat AL, Lees AJ (2005): *Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, Levodopa-responsive Parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia.* Mov Disord 20(10): 1264-1271

Willow M, Gonoï T, Catterall WA (1985): *Voltage clamp analysis of the inhibitory actions of diphenylhydantoin and carbamazepin on voltage sensitive sodium channels in neuroblastoma cells.* Mol Pharmacol 27: 549-558

Wilson SM, Bhattacharyya B, Rachel RA, Coppola V, Tessarollo L, Householder DB, Fletcher CF, Miller RJ, Copeland NG, Jenkins NA (2002): *Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease.* Nature 32: 420-425

Wood NW (1998): *Genetic risk factors in Parkinson's disease.* Ann Neurol 44(Suppl 1): S58-S62

Yu T, Robb VA, Singh V, Gutmann DH, Newsham IF (2002): *The 4.1/ezrin/radixin/moesin domain of the DAL-1/protein 4.1B tumour suppressor interacts with 14-3-3 proteins.* Biochem J 365: 783-789

Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, Ser T del, Munoz DG, Yébenes JG de (2004): *The new mutation E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia.* Ann Neurol 55: 164-173

Zeman W, Kaelbing R, Pasamanick B (1960): *Idiopathic dystonia musculorum deformans II. The formes frustes.* Neurology 10: 1068-1075

Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carballo Carbajal I, Vieregge P, Asmus F, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZW, Gasser T (2004): *Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology.* Neuron 44: 601-607

Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, Scheidtmann K, Kern P, Winkelmann J, Müller-Myhsok B, Riedel L, Bauer M, Müller T, Castro M, Meitinger T, Strom TM, Gasser T (2001): *Mutations in the gene encoding ϵ -sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome.* Nature Genetics 29: 66-69

8. Publikationen, Kongressteilnahmen & Seminare

8.1. Publikationen

Abahuni N, Gispert S, Bauer P, Riess O, Krüger R, Becker T, Auburger G (2007): *Mitochondrial translation initiation factor 3 gene polymorphism associated with Parkinson's disease*. Neuroscience Letters 414(2): 126-29

8.2. Kongressteilnahmen & Seminare

03.03. - 05.03.2005: 4. Deutscher Parkinson-Kongress in Frankfurt

26.08. - 30.08.2005: Interdisziplinäres Treffen der Neurowissenschaften an der Universitätsklinik Frankfurt im Kleinwalsertal, Thema des Vortrags: „DYT7 Candidate Genes“

06.07. - 08.07.2009: GEO-PD Meeting (Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease) in Tübingen

09.08. - 22.08.2009: Akademie X Rot International der Studienstiftung des Deutschen Volkes e.V. in Rot an der Rot :

Thema: Proteinaggregation und Neurodegeneration (Leitung: Prof. A. Giese, LMU München, Prof. M. Zweckstetter, MPI Göttingen sowie Prof. H.W. Oertel, Neurologische Universitätsklinik Marburg)

Thema der von mir gehaltenen Vorträge:

1. „Molekulargenetische Analyse neurodegenerativer Erkrankungen – Probleme und Perspektiven“
2. „Aktuelle Therapie des M. Parkinson“
3. „Zellbiologie-Proteinabbau“

30.09.2009: Mittwochsseminar Neurologie, Uniklinik Frankfurt. Thema: „Molekulargenetische Analyse neurodegenerativer Erkrankungen – Probleme und Perspektiven“

9. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Georg Auburger für die Überlassung dieses außergewöhnlichen und produktiven Dissertationsthemas, die umfangreiche Unterstützung, die freundliche Aufnahme in das Labor - Team und die bereitwillige Vermittlung seines Wissens.

Frau Dr. Suzana Gispert - Sanchez danke ich für die überaus herzliche und uneingeschränkte Unterstützung und die wissenschaftliche Betreuung während der Arbeit im Labor und danach.

Den Mitarbeitern der Sektion Molekulare Neurogenetik danke ich für die Gestaltung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Bei Prof. Dr. med. König bedanke ich mich recht herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Zudem bedanke ich mich bei Peter Bauer, Olaf Riess und Rejko Krüger von der Universität Tübingen für die Bereitstellung eines Patienten- und Kontrollkollektivs, Herrn Tim Becker von der Universität Bonn danke ich für die Überlassung seines Statistikprogramms für die Single Locus Analyse.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Nobutaka Hattori für meinen lehrreichen und unvergesslichen Aufenthalt in Japan bedanken. Frau Shiori Odajima, danke ich für ihre uneingeschränkte Freundschaft.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, Großeltern und meine Schwester Carolin Taline, die mich unermüdlich unterstützt und gefördert haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Molekulargenetische Ansätze zur Untersuchung von Basalganglienerkrankungen

im Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie, Sektion Molekulare Neurogenetik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Georg Auburger mit Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. Suzana Gispert-Sanchez ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

*Abahuni N, Gispert S, Bauer P, Riess O, Krüger R, Becker T, Auburger G (2007):
Mitochondrial translation initiation factor 3 gene polymorphism associated with Parkinson´s
disease. Neuroscience Letters 414(2): 126-29*

Frankfurt, den 29. November 2009

Nadine Abahuni