

Aus der Klinik für Neurologie der Universität zu Lübeck
(Direktor: Prof. Dr. med. D. Kömpf)

Molekulargenetische Untersuchungen bei spinocerebellärer Ataxie und Parkinsonsyndromen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von

Katja Zschiedrich

aus Mainz

Lübeck 2007

1. Berichterstatterin:	Frau Prof. Dr. med. Christine Klein
2. Berichterstatter/ Berichterstatterin:	Herr Prof. Dr. med Olaf Hiort
Tag der mündlichen Prüfung:	16.06.2009
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	16.06.2009

gez. Prof. Dr. med Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Klinik und Diagnose verschiedener Bewegungsstörungen	1
1.1.1. Ataxie	2
1.1.2. Morbus Parkinson.....	3
1.1.3. Parkinsonsyndrome und Überlappung mit Demenzen	4
1.1.4. Neuroleptika-induzierte Bewegungsstörungen.....	5
1.2. Annäherung an die Ätiologie von Krankheiten	6
1.2.1. Entwicklung eines Krankheitsmodells	6
1.2.2. Pathogenese des Parkinsonsyndroms und seine Ursachenvielfalt	7
1.2.3. Methoden zur Identifizierung von Krankheitsgenen	9
1.3. Bekannte genetische Aspekte	11
1.3.1. Genetik der Ataxien.....	11
1.3.2. Familiäres Parkinsonsyndrom	12
1.3.3. Suszeptibilitätsgene für primäre Parkinsonsyndrome	15
1.3.4. Das <i>MDR1</i> -Gen als weiterer Kandidat für das Parkinsonsyndrom	16
1.4. Vorarbeiten	19
1.5. Zielsetzung und Fragestellung	20
2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	22
2.1. Patienten	22
2.1.1. Familie R mit Ataxie und anderen neurologischen Symptomen.....	22
2.1.2. Familien mit familiärem Parkinsonsyndrom	24
2.1.2.1. Familie M.....	24
2.1.2.2. Familie K	24
2.1.2.3. Familie P	25
2.1.3. Patienten mit primärem Parkinsonsyndrom und Kontrollen	25
2.1.4. Patienten mit Neuroleptika-induzierten Bewegungsstörungen und Kontrollen.....	26

2.2. Material	28
2.2.1. Chemikalien.....	28
2.2.2. Geräte.....	28
2.2.3. Lösungen	29
2.3. Methoden.....	30
2.3.1. DNA-Extraktion	30
2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.3.2.1. PCR unter Standardbedingungen.....	31
2.3.2.2. PCR mit fluoreszenzmarkierten Markern.....	32
2.3.2.3. Duplex-PCR.....	34
2.3.3. Schmelzkurvenanalyse am <i>LightCycler</i>	34
2.3.4. Gelelektrophorese.....	37
2.3.4.1. Agarose-Gelelektrophorese	37
2.3.4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	38
2.3.5. Genotypisierung und Haplotypisierung.....	39
2.3.6. <i>Multipoint</i> -Kopplungsanalyse	40
2.3.7. Sequenzierung	41
2.3.7.1. Säulenaufreinigung	42
2.3.7.2. Sequenzierung mittels eines markierten <i>Primers</i> am LI-COR-System	42
2.3.7.3. Sequenzierung mittels markierter Didesoxynukleotide am ABI-System.....	43
2.3.8. <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> -Analyse (MLPA).....	44
2.3.9. Statistische Beurteilung der Assoziationsstudien	47
3. ERGEBNISSE.....	49
3.1. Haplotypisierung und genomweite Kopplungsanalyse bei einer SCA-Familie.....	49
3.1.1. Haplotypisierung des Genorts <i>SCA5</i>	49
3.1.2. Genomweite Kopplungsanalyse	51
3.2. Haplotypisierung, Mutationsanalyse und Gendosis-Veränderungen bei Familien mit Parkinsonsyndrom.....	59
3.2.1. Haplotypisierung	59
3.2.2. Mutationsanalyse mittels Sequenzierung	64
3.2.3. Gendosis-Veränderungen	66

3.3. Assoziationsstudien zum <i>MDRI</i> -Gen	68
3.3.1. Bestimmung von Genotypen am <i>LightCycler</i>	68
3.3.2. Assoziation im <i>MDRI</i> -Gen bei Parkinsonpatienten	69
3.3.3. Assoziation im <i>MDRI</i> -Gen bei Neuroleptika-Patienten	71
4. DISKUSSION	74
4.1. Bewertung der verwendeten Methoden.....	74
4.1.1. Genomweite Kopplungsanalyse mit <i>short tandem repeat</i> -Markern.....	74
4.1.2. Genotypisierung und Haplotypisierung der Gene <i>PARK1</i> - <i>PARK8</i> sowie <i>SCA5</i>	75
4.1.3. Methoden der qualitativen und quantitativen Mutationsanalyse	76
4.1.4. Methode der Genotypisierung von <i>single nucleotide polymorphisms</i> am <i>LightCycler</i>	76
4.2. Haplotypisierung und genomweite Kopplungsanalyse der SCA-Familie R	77
4.2.1. Haplotypisierung des Genorts <i>SCA5</i>	78
4.2.2. Genomweite Kopplungsanalyse	78
4.2.2.1. Überlappung einer Kandidatenregion mit dem Genort <i>SCA28</i>	80
4.2.2.2. Die molekulare Pathogenese der spinocerebellären Ataxie als Ausgangspunkt für die Suche nach Kandidatengen in der Region 18p11.21 - q21.2	81
4.2.2.3. Die chromosomalen Abschnitte 2p25.3 - p25.1 und 3p24.3 - p14.3 als weitere Kandidatenregionen.....	84
4.3. Haplotypisierung und Mutationsanalyse bei Familien mit Parkinsonsyndrom.....	86
4.3.1. Gewonnene Erkenntnisse hinsichtlich einer genetischen Ursache bei den Familien M, K und P.....	86
4.3.2. Weitere Vorgehensweise	88
4.4. Assoziationsstudien zum <i>MDRI</i> -Gen	89
4.4.1. Genotypenverteilung der <i>MDRI</i> -Polymorphismen bei Parkinson-Patienten ...	90
4.4.2. Genotypenverteilung der <i>MDRI</i> -Polymorphismen bei Neuroleptika-Patienten	93
4.5. Schlussfolgerungen	94
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	97
6. AUSBLICK	98
7. LITERATURVERZEICHNIS	99

8. ANHANG	vi
8.1. Erläuterungen der Methodik zur Identifizierung von Krankheitsgenen.....	vi
8.1.1. Kopplungsanalyse.....	vi
8.1.2. Feinkartierung und Identifizierung der Kandidatengene.....	viii
8.1.3. Assoziationsstudie	ix
8.2. Tabellen	xi
8.3. Stammbäume der untersuchten Familien	xiii
8.4. Primer und Sonden	xv
8.5. STR-Marker.....	xviii
8.6. Danksagung	xxviii
8.7. Lebenslauf	xxix
8.8. Eidesstattliche Erklärung.....	xxxii

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	n	nano- (10^{-9})
Abb.	Abbildung	n. b.	nicht bekannt
Ala	Alanin	n. u.	nicht untersucht
APS	Ammoniumpersulfat	NL	Neuroleptikum/ Neuroleptika
AS	Aminosäure	p	kurzer Arm eines Chromosoms
bp	Basenpaar(e)	PAA	Polyacrylamid
°C	Grad Celsius	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
C	Cytosin	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
CBD	kortikobasale Degeneration	PET	Positronenemissions- Tomographie
cDNA	<i>Copy (complementary) DNA</i>	P-GP	P-Glykoprotein
Chr.	Chromosom	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
cM	Centi Morgan	Pro	Prolin
D	Dalton	PS	Parkinsonsyndrom
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleosid- 5'-triphosphat	PSP	Progressive supranukleäre Paralyse
dH ₂ O	destilliertes Wasser	q	langer Arm eines Chromosoms
DLB	Demenz mit Lewy Körperchen	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	s	Sekunde(n)
dNTP	2'-Desoxynukleosid- 5'-triphosphat	SCA	spinozerebelläre Ataxie
DRPLA	Dentatorubro-Pallidolysiale Atrophie	SDS	Natrium-Dodekylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat und andere	Ser	Serin
EtOH	Ethanol	SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzel- Nukleotid-Polymorphismus)
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>	STR	<i>short tandem repeat</i> (Mikrosatellitenmarker)
FTD	Frontotemporale Demenz	T	Thymin
g	Gramm	Tab.	Tabelle
G	Guanin	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
ggf.	gegebenenfalls	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamid
Gln	Glutamin	Temp.	Temperatur
Hz	Hertz	Thr	Threonin
IVS	intervenierende Sequenz, Intron	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
k	kilo	U	<i>Unit</i> (Maß für Enzymaktivität)
LC	<i>LightCycler</i>	µ	mikro- (10^{-6})
LOD	<i>logarithm of the odds</i>	Vol.	Volumen
Lsg.	Lösung	W	Watt
m	männlich	w	weiblich
M	molar	z. B.	Zum Beispiel
mind.	mindestens	ZNS	zentrales Nervensystem
MP	Morbus Parkinson		
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure		
MRT	Magnetresonanztomographie		
MSA	Multisystematrophie		

1. EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden für einige neurologische Erkrankungen (Ataxie, Parkinsonsyndrome und Neuroleptika-induzierte Bewegungsstörungen) molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. In diesem ersten Kapitel sollen die Erkrankungen zunächst unter ihrem klinischen Aspekt vorgestellt werden (Abschnitt 1.1). Im darauf folgenden Abschnitt 1.2 wird ein Modell für die Ursache von Krankheiten vorgestellt und anhand eines Beispiels verdeutlicht. Zusätzlich behandelt der Abschnitt, wie sich der Ursache von genetisch bedingten Krankheiten genähert werden kann. Schließlich wird in Abschnitt 1.3 der heutige Wissensstand zu genetischen Ursachen der hier untersuchten Krankheiten dargestellt.

1.1 Klinik und Diagnose verschiedener Bewegungsstörungen

Bewegungsstörungen bilden eine Gruppe neurologischer Krankheiten, die durch Störungen bei der Planung, Kontrollen und Ausführung von Bewegungen charakterisiert sind (Klein, 2005a). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bewegungsstörungen lassen sich zwei Gruppen zuordnen: Bei der einen Gruppe handelt es sich um neurodegenerative Erkrankungen. Sie zeichnen sich durch einen generalisierten oder lokalisierten degenerativen Prozess im Zentralnervensystem aus, der mit dem Untergang von Neuronen und einem dadurch verursachten Mangel der entsprechenden Neurotransmitter einhergeht. Die klinischen Symptome spiegeln den Defekt des betroffenen Systems wider und sind in der Regel progredient. Dieser Gruppe gehören die Ataxie-Krankheiten und der Morbus Parkinson (MP) an. Demgegenüber stehen nicht-degenerative Störungen, die beispielsweise durch Medikation mit Neuroleptika verursacht werden können.

1.1.1 Ataxie

Die Ataxien (gr. *ataxia*: Unordnung) sind klinisch und ätiologisch sehr vielfältig. Sie lassen sich in hereditäre und nicht-hereditäre Formen einteilen, wie in Tabelle 1.1

aufgeführt ist. Hereditäre Ataxien sind seltene Krankheiten; die Prävalenz der spinocerebellären Ataxien (SCA) liegt bei 3:100.000 (van de Warrenburg *et al.*, 2002), die der am häufigsten vorkommenden Friedreich-Ataxie beläuft sich auf 1:50.000 (Cossée *et al.*, 1997). Die autosomal-rezessiv vererbten Formen beginnen in der Regel vor der Pubertät, die autosomal-dominanten Formen später.

Tab. 1.1: Klassifikation der Ataxien nach Harding (1983) und Klockgether (1995)

Hereditäre Ataxien	Nicht-hereditäre Ataxien
Autosomal-dominante Ataxien	Multisystematrophie, cerebellärer Typ
Spinocerebelläre Ataxien 1-28	Sporadische idiopathische Ataxie
Dentatorubro-Pallidolysiale Atrophie	Symptomatische Ataxie
Episodische Ataxie	alkoholtoxischer Genese
Morbus Gerstmann-Sträussler-Scheinker	sonstiger toxischer Genese
Autosomal-rezessive Ataxien	bei Hypothyreose
Friedreich-Ataxie	bei Malabsorptionssyndrom
Ataxia telangiectatica (Louis-Bar-Syndrom)	paraneoplastischer Genese
Morbus Refsum	physikalischer Genese
Vitamin-E-Mangelataxie	
Abetalipoproteinämie	

Das pathologische Kennzeichen der hereditären Ataxien ist eine progrediente Degeneration des Cerebellums, die sich in Störungen der Bewegungskoordination in Form von Dysmetrie, Dysdiadochokinese, Stand-, Gang-, Rumpfataxien, Tremor und Dysarthrie äußern kann. Zusätzlich können atrophische Prozesse im Rückenmark, im Hirnstamm, in den Basalganglien, dem Sehnerv und der Retina auftreten. Daraus resultiert eine Fülle möglicher extracerebellärer Symptome: Muskelatrophien oder -spastiken, veränderte Muskeleigenreflexe, Verlust der epikritischen und protopathischen Sensibilität, periphere Polyneuropathien, Augenbewegungsstörungen, Retinopathien und extrapyramidale Symptome wie ein Parkinsonsyndrom oder Chorea können auftreten (Klockgether, 1995; Manto, 2005). Bei einigen hereditären Ataxien kommen außerdem Manifestationen außerhalb des Nervensystems vor, so beispielsweise eine Kardiomyopathie und Diabetes mellitus bei der Friedreich-Ataxie (Harding, 1981), Teleangiektasien und eine Immundefizienz mit erhöhtem Malignitätsrisiko bei der Ataxia telangiectatica (Taylor und Byrd, 2005).

Die Diagnose einer Ataxie wird mittels klinischer Untersuchung, bildgebender Verfahren und genetischer Tests gestellt. Teilweise ist dies schwierig, da verschiedene Ataxien die

gleiche Symptomatik aufweisen können, ein degenerativer Prozess nicht sichtbar oder kein genetischer Test etabliert ist.

Interessant ist, dass einige Formen der spinocerebellären Ataxie bekannt sind, die mit parkinsonoiden Symptomen (SCA1, SCA2, SCA3, SCA12, SCA17 und SCA21) und/ oder mit einer Abnahme der kognitiven Fähigkeiten (SCA1, SCA2, SCA3, SCA13, SCA17, SCA19 sowie SCA21) einhergehen können (Manto, 2005).

1.1.2 Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson (MP) wurde erstmals von dem englischen Arzt James Parkinson in seinem Aufsatz „*An essay on the shaking palsy*“ (Parkinson, 1817) erwähnt. Heute ist der MP nach dem Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Die Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter an und liegt bei den über 65-Jährigen bei 1,6 %, bei den über 80-Jährigen bei bis zu 3,5 % (de Rijk *et al.*, 1997).

Pathophysiologisch liegt, vereinfacht dargestellt, ein Mangel des Neurotransmitters Dopamin im nigrostriatalen System, woraus eine Überaktivität hemmend wirkender cholinergischer Interneurone resultiert (Crossman, 2000). Dieser Transmittermangel ist die Folge einer selektiven Degeneration dopaminerger Neurone des Mittelhirns, insbesondere der *Pars compacta* der *Substantia nigra* (Fearnley und Lees, 1991), aber auch des *Locus coeruleus*. Ein weiteres pathologisches Kennzeichen des MP sind sog. Lewy-Körperchen. Dies sind intrazelluläre, eosinophile Einschlusskörperchen, die sich in den überlebenden Neuronen der *Substantia nigra* finden

Die Krankheit zeichnet sich durch vier Kardinalsymptome aus: Das Vorliegen eines Ruhetremors mit einer Frequenz von 4 - 6 Hz, der meist als erstes Symptom unilateral an einer Extremität auftritt; Bradykinese, die sich z. B. in Hypomimie und Mikrographie äußern kann; ein alle Muskelgruppen betreffender Rigor sowie der Verlust der Haltereфлекse (posturale Instabilität) begründen die klinisch gestellte Diagnose (Gibb and Lees, 1988). Neben diesen Krankheitsmerkmalen können auch vegetative und psychische Begleitsymptome auftreten. Im Durchschnitt entwickeln 40 % der Erkrankten im Verlauf der Krankheit eine Demenz (Hughes *et al.*, 2000). Der Schweregrad der meist langsam progredient verlaufenden Krankheit kann anhand der *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* dokumentiert werden (Fahn *et al.*, 1987; Goetz *et al.*, 2007).

1.1.3 Parkinsonsyndrome und Überlappungen mit Demenzen

Der beschriebene MP ist die idiopathische Variante des primären Parkinsonsyndroms (PS) und stellt mit ungefähr 75 % die häufigste Erscheinungsform des PS dar und gehört zu den primären Formen dieser Krankheit. Weiterhin primäre Entitäten sind die familiären (oder monogenen) Formen, auf die in Abschnitt 1.3.2 gesondert eingegangen wird. Die Symptome des MP treten vollständig oder teilweise auch bei anderen Krankheiten auf, die sich jedoch in Ätiologie, Pathogenese und pathologischen Kennzeichen von der idiopathischen Variante unterscheiden. Auch klinische Aspekte wie das Erkrankungsalter, das Verteilungsmuster der Symptome und deren Voranschreiten variieren. Zu diesen Krankheiten zählen die sekundären Formen des PS, seltene Erbkrankheiten und andere neurodegenerative Krankheiten, die auch als Parkinson-Plus-Syndrome bezeichnet werden (siehe Tabelle 1.2). Zu letzterer Gruppe gehören die Multisystematrophie (MSA), die progressive supranukleäre Blicklähmung (PSP), die corticobasale Degeneration (CBD) und die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) (Kompoliti und Goetz, 2005). Dabei wird als Demenz eine erworbene, progrediente Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktion und weiterer kognitiver Fähigkeiten (z. B. Sprachvermögen, Fähigkeit zur Aufmerksamkeit) oder exekutiver Funktionen (z. B. Organisations- und Abstraktionsvermögen) bezeichnet, die derart gravierend ist, dass sie das Individuum in seiner alltäglichen Funktion einschränkt (American Psychiatric Association, 2000).

Bei der PSP, der CBD und der DLB kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einem solchen Verlust cerebraler Fähigkeiten unterschiedlichen Ausmaßes. Weitere Beispiele für die Überlappung des Phänotyps eines PS und einer Demenz sind die frontotemporale Demenz mit *Parkinsonism* gekoppelt an Chromosom 17 (FTDP17) als auch der Morbus Alzheimer. Diese Krankheiten bilden somit Übergangsformen zwischen hypokinetisch-rigiden Bewegungsstörungen und Demenzen.

Tab. 1.2: Klassifikation parkinsonoider Krankheiten nach Kompoliti und Goetz (2005)

Primäre Parkinsonsyndrome	Sekundäre Parkinsonsyndrome	Parkinson-Plus-Syndrome	Hereditäre Krankheiten
<ul style="list-style-type: none"> • Idiopathischer Morbus Parkinson • Familiäres Parkinsonsyndrom • Dopa-responsive Dystonie 	<ul style="list-style-type: none"> • Vaskulär • Traumatisch • Postencephalitis • Neoplastisch • Psychogen • Metabolisch • Infektiös • Toxisch • Medikamentös • Hydrocephal 	<ul style="list-style-type: none"> • CBD • DLB • FTDP17 • MSA • PSP 	<ul style="list-style-type: none"> • Morbus Wilson • SCA • Chorea Huntington • Morbus Gaucher • Morbus Fahr • Hallervorden-Spatz-Syndrom

CBD, Corticobasale Degeneration; DLB, Demenz mit Lewy-Körperchen; FTDP17, Frontotemporale Demenz mit *Parkinsonism* gekoppelt an Chromosom 17; MSA, Multisystematrophie; PSP, Progressive supranukleäre Blicklähmung; SCA, Spinocerebellärer Ataxie

1.1.4 Neuroleptika-induzierte Bewegungsstörungen

Neuroleptika (NL) werden seit 1950 zur Therapie der Schizophrenie eingesetzt. Bald darauf finden sich in der Literatur die ersten Berichte über Bewegungsstörungen, die im Rahmen der Therapie auftreten können (Schönecker, 1957; Sigwald *et al.*, 1959). Heute werden die auftretenden Störungen in solche eingeteilt, die kurz nach Therapiebeginn auftreten, wie Frühdyskinesien, ein sekundäres Parkinsonsyndrom und Akathisien, und solche, die erst nach längerer Therapiedauer in Erscheinung treten, wozu Spätdyskinesien zählen. Stets handelt es sich um repetitive, unfreiwillige und ungerichtete Bewegungen; dass verschiedene Störungen bei demselben Patient auftreten, ist möglich. Weitere Angaben zur Symptomatik, zum Verlauf und zu den Therapiemöglichkeiten dieser Nebenwirkungen sind in Tab. 1.3 aufgeführt (Casey, 1990).

Die Angaben zur Gesamtprävalenz der Syndrome schwanken zwischen 29 - 65 % (Ayd, 1961; McCreadie *et al.*, 1992; Lencer *et al.*, 2004), was durch die Heterogenität der untersuchten Populationen, die Verwendung unterschiedlicher Bewertungsskalen und die Anwendung verschiedener NL bedingt sein kann.

Die Nebenwirkungen werden häufiger durch die älteren NL (Leitsubstanz: Haloperidol) als durch die neueren, sog. atypischen NL (Leitsubstanz: Clozapin) hervorgerufen (Janno *et al.*, 2004). Der pathophysiologische Mechanismus ist mit einer Blockade des zentralen D₂-

Dopaminrezeptors verbunden, wobei Differenzen zwischen typischen und atypischen NL gegenwärtig diskutiert werden (Casey, 2004).

Tab. 1.3: Neuroleptika-induzierte Bewegungsstörungen

	Frühdyskinesie	Parkinsonsyndrom	Akathisie	Spätdyskinesie
Symptomatik	Torticollis, Sprach- und Schluckstörungen, periorale Spasmen, okulogyrische Krisen	Tremor, Rigidität, Bradykinesie	Allgemeine Unruhe, Bewegungsdrang, Trippelbewegungen	Schmatz- und Kaubewegungen, Protrusion der Zunge, choreatisch-athetotische Bewegungen der Extremitäten
Latenz	Stunden bis Tage	Tage bis Wochen	Wochen bis Monate	Monate bis Jahre
Therapieerfolg*	Sehr gut	Gut	Kaum	Verschlechterung des Zustandes
Reversibilität	Rasch	Langsam	Langsam	Langsam; nur bei wenigen Patienten

*mit Anticholinergika

1.2 Annäherung an die Ätiologie von Krankheiten

1.2.1 Entwicklung eines Krankheitsmodells

Die genetische Information für die Ausprägung von Merkmalen tragen die linear auf den Chromosomen angeordneten Gene. Dabei können ein einzelnes Gen (monogen), einige (oligogen) oder viele Gene (polygen) am Zustandekommen eines Merkmals beteiligt sein (siehe Abbildung 1.1). Liegen Störungen im genetischen Programm von Zellen und Geweben vor, ist es möglich, dass die Merkmalsausprägung krankhaft ist. Andererseits ist es möglich, dass externe Faktoren aus der Umwelt derart auf den Organismus einwirken, dass es auch ohne die Veränderung der genetischen Information zur Entwicklung einer Krankheit kommen kann. Zwischen diesen beiden Extrema, einer rein endogen oder rein exogen bedingten Krankheit, befindet sich ein breites Spektrum möglicher Interaktionen zwischen genetischer Prädisposition und auslösenden Umweltfaktoren, die die Krankheit entstehen lassen können und zugleich ihren Ausprägungsgrad bestimmen. Man spricht dann von multifaktoriell bedingten Krankheiten.

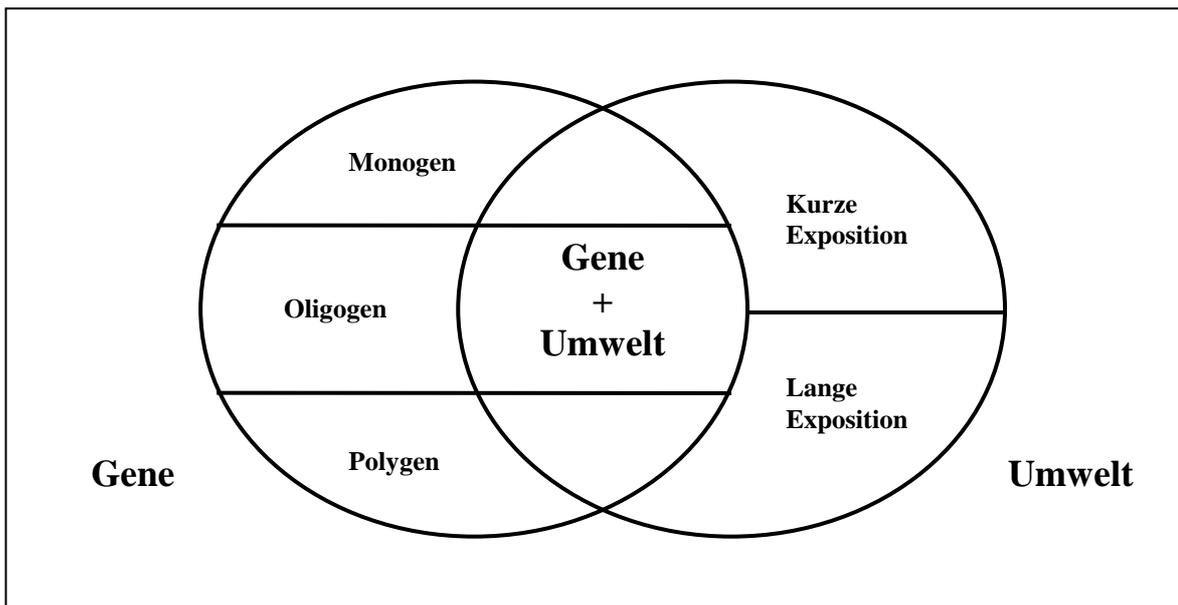


Abb. 1.1: Modell zur Entstehung von Krankheiten, wie z. B. das Parkinsonsyndrom

Es gibt nun Krankheiten, die, bildlich gesprochen, nur einen Teil des Modells in Anspruch nehmen, da sie nur genetisch oder nur umweltbedingt ausgelöst werden. Für andere Krankheiten konnte gezeigt werden, dass sie durch eine Vielzahl möglicher Kombinationen des gesamten Spektrums verursacht werden können; dies wird in folgendem Abschnitt am Beispiel des Parkinsonsyndroms verdeutlicht.

1.2.2 Pathogenese des Parkinsonsyndroms und seine Ursachenvielfalt

Gegenwärtig werden zwei verschiedene zelluläre Stoffwechselsysteme für den Zelluntergang in der *Substantia nigra* verantwortlich gemacht: eine Dysfunktion der Mitochondrien einerseits und eine Störung des Abbaus von Proteinen, der vom Proteasom vollzogen wird, andererseits. Beide Systeme und Interaktionen untereinander führen zu einer erhöhten Belastung der Zelle durch oxidativen Stress, was letztendlich den Zelltod bewirkt (zusammengefasst bei Abou-Sleiman *et al.*, 2006).

Mittlerweile sind mehrere monogen vererbte Formen bekannt. Beispielsweise wurde im Jahr 1997 eine *missense*-Mutation in dem Gen *α -Synuclein (SNCA)* entdeckt, die ein autosomal-dominant vererbtes familiäres Parkinsonsyndrom verursacht (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Weitere die Aminosäuresequenz verändernde Mutationen (Krüger *et al.*, 1998; Zarranz *et al.*, 2004) sowie Duplikationen und Triplikationen des Gens (Singleton *et*

al., 2003; Ibanez *et al.*, 2004) kamen hinzu, die teilweise zusätzlich zu dem Parkinson-Phänotyp Symptome einer Demenz zeigen. Das Protein SNCA wurde als ein Hauptbestandteil der pathologischen Lewy-Körperchen identifiziert (Spillantini *et al.*, 1997) und die Hypothese generiert, dass das mutierte Protein sich zu Aggregaten formiert, die die Funktion des Proteasoms negativ beeinflussen und die Bildung toxischer Sauerstoffradikale begünstigen (Abou-Sleiman *et al.*, 2006).

Aggregate des SNCA finden sich aber auch bei Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson, ohne dass eine der seltenen Mutationen im Gen vorliegt. Vor kurzem zeigte eine Metaanalyse, dass ein Polymorphismus im Promoter des Gens in einer an Morbus Parkinson leidenden Population häufiger vorkommt als in einer gesunden Kontrollpopulation (Maragagnore *et al.*, 2006). Der Polymorphismus konnte somit als genetischer Risikofaktor etabliert werden, der die pathologische Formation der Lewy-Körperchen zwar nicht kausal bedingt, aber fördern kann. Damit die Krankheit letztendlich ausbricht, müssen aber noch weitere begünstigende Faktoren hinzutreten. Diese können genetischer Art sein, aber auch in der Interaktion des Individuums mit seiner Umwelt bestehen.

So konnte beispielsweise eine Assoziation zwischen (A) der beruflichen Exposition mit Herbiziden, Pestiziden sowie dem Beruf des Landwirts und (B) dem Risiko für MP gezeigt werden (Gorell *et al.*, 1998). Eine Metaanalyse bestätigt diese Ergebnisse und betont außerdem das ländliche Leben und den Konsum von Brunnenwasser als umgebungsbedingten Risikofaktor (Priyadarshi *et al.*, 2001). Die Hypothese ist, dass der vermehrte Kontakt mit den aggressiven Substanzen neurotoxisch wirkt. Unterstützt wird diese Hypothese durch höhere Insektizidkonzentrationen in der *Substantia nigra*, die bei Autopsien von MP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden wurden (Corrigan *et al.*, 2000). Aber auch diese Ergebnisse implizieren, dass weitere genetische sowie umweltbedingte Risikofaktoren an der Verursachung der Krankheit beteiligt sein müssen.

Es sind auch Fälle bekannt, die belegen, dass das typische Krankheitsbild ausschließlich durch Umweltsubstanzen ausgelöst werden kann, was man als sekundäres Parkinsonsyndrom bezeichnet. 1983 erschien eine Publikation über 1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin (MPTP), einem Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette, das bei Drogenabhängigen nach intravenöser Applikation ein schweres Parkinsonsyndrom

auslöste (Langston *et al.*, 1983). MPTP wird heute im Tierversuch benutzt, um ein Modell für das Parkinsonsyndrom zu gewinnen (zusammengefasst bei Bové *et al.*, 2005).

Es wird ersichtlich, dass ein Parkinsonsyndrom durch eine Vielzahl möglicher Kombinationen von Faktoren ausgelöst werden kann. Deren vollständige Enthüllung ist besonders bei einer multifaktoriellen Ätiologie schwierig. In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Untersuchung genetischer Faktoren.

1.2.3 Methoden zur Identifizierung von Krankheitsgenen

Die Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen im menschlichen Genom ähnelt der sprichwörtlichen Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen. Das gesamte Genom umfasst 3.000.000.000 Basenpaaren (bp) und besteht aus ungefähr 20.000 bis 25.000 Genen (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004). Ein einzelnes Gen umfasst wahrscheinlich durchschnittlich 20.000 bis 50.000 bp, von denen letztendlich nur ein geringer Teil (ca. 10 %), die Exons, für das Protein kodieren. Der größte Teil des Genoms besteht somit aus nicht-kodierenden Bereichen innerhalb der Gene, den Introns, und intergenischen Bereichen. Es wird vermutet, dass diese über regulatorische Effekte die Genexpression beeinflussen können. Sowohl in den Exons als auch in den nicht-kodierenden Bereichen können Veränderungen ursächlich für die Entwicklung einer Krankheit sein. Eine gute Strategie ist notwendig, um genetische Determinanten des menschlichen Phänotyps in dieser Fülle von Information ausfindig zu machen. Je nach vermutetem genetischem Aspekt einer Krankheit (monogen bis multifaktoriell), gibt es verschiedene Herangehensweisen an diese Herausforderung.

Ein Indiz für eine monogen verursachte Krankheit ist ihr gehäuftes Auftreten innerhalb einer Familie. Unter günstigen Bedingungen, etwa wenn die zugrunde liegende Mutation keiner reduzierten Penetranz (trotz vorliegender Mutation tritt kein typischer Phänotyp auf) unterliegt und eine Phänokopie (die genetische Ursache einer Krankheit ist bei betroffenen Mitgliedern einer Familie unterschiedlich) ausgeschlossen scheint, lässt sich die Vererbung der Krankheit innerhalb eines Stammbaums verfolgen. Die Humangenetik bedient sich gerne solch interessanter Familien, um mittels eines positionellen Klonierungsverfahrens das zugrunde liegende Gen zu identifizieren. Dabei wird sich der letztendlich erwünschten

Sequenzierung des betroffenen DNA-Abschnitts über die Bestimmung seiner Lokalisation im menschlichen Genom genähert. Die hierbei verwendete Methode ist die Kopplungsanalyse. Ihr Prinzip beruht darauf, das unbekannte Gen, dessen Veränderung der Krankheit ursächlich zugrunde liegt, durch eine gemeinsam beobachtete Vererbung, bezeichnet als Kopplung, mit bekannten und darstellbaren Markern zu lokalisieren (siehe hierzu auch Abschnitt 8.1.1). Wenn keinerlei Anhaltspunkte vorliegen, wo sich eine Mutation befinden könnte, kann eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt werden, was im Rahmen dieser Arbeit für Familie R vorgenommen wurde. Existieren bereits Hinweise dafür, auf welchem Abschnitt eines Chromosoms sich das verantwortliche Gen befindet, wird die Region im Rahmen einer Feinkartierung näher erschlossen (siehe Abschnitt 8.1.2). Die vorliegende Arbeit führt dies bei drei Familien M, K und P mit einem familiärem Parkinsonsyndrom für eine ausgewählte Anzahl bereits beschriebener Genorte durch.

Im Unterschied zur Kopplung, die die Beziehung verschiedener Loci zueinander beschreibt, stellt eine Assoziation eine statistische Beobachtung über das gemeinsame Auftreten von Allelen und Phänotypen dar. Innerhalb von Familien führt eine bestehende Kopplung daher auch zu einer Assoziation. Zwischen nicht verwandten Individuen ist die Ermittlung einer Kopplung nicht zulässig. Hier kommt allein die Assoziationsstudie in Betracht, um den Beitrag einer genetischen Variante zu einem Phänotyp zu ermitteln. Sie ist eine gängige Methode zur Untersuchung von polygen und multifaktoriell bedingter Krankheiten. Mit Hilfe einer Assoziationsstudie untersucht man, ob sich eine genetische Variante in einem Patientenkollektiv statistisch signifikant häufiger oder seltener findet als bei gesunden Kontrollindividuen. Des Weiteren kann man, ähnlich einer Kopplungsanalyse, unter Verwendung vieler über das Genom verteilter Marker eine neue Kandidatenregion identifizieren. Ersteres wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt und drei Polymorphismen eines Kandidatengens für das primäre Parkinsonsyndrom auf eine Assoziation in zwei verschiedenen Fall-Kontroll-Populationen untersucht. Nähere Informationen zum Design einer Assoziationsstudie, den zu verwendenden Markern und der Beurteilung solcher Studien finden sich im Anhang (Abschnitt 8.1.3).

1.3 Bekannte genetische Aspekte

Mit Hilfe der in Abschnitt 1.2.3 vorgestellten Methoden gelingt es, bei der Suche nach Mutationen, die eine Krankheit auslösen oder begünstigen, fündig zu werden. Die Erfolge systematischer genetischer Analysen der in dieser Arbeit untersuchten Krankheiten werden nun vorgestellt.

1.3.1 Genetik der spinocerebellären Ataxien

Das Spektrum der autosomal-dominanten spinocerebellären Ataxien (SCAs) umfasst 28 Loci, von denen bis heute 14 Gene identifiziert wurden (vgl. Tab. 1.4). Bei der Mehrheit der berichteten Mutationen handelt es sich um Trinukleotid-*Repeat*-Expansionen der Basenfolge CAG, welche für die Aminosäure (AS) Glutamin kodiert. Die entstehenden Polyglutaminketten aggregieren und führen zum Zelltod (zusammengefasst bei Zoghbi und Orr, 2000). Häufig wird eine inverse Beziehung zwischen der Länge der *Repeat*-Expansion und dem Erkrankungsalter beobachtet. Ein typisches Phänomen der SCAs ist die Antizipation, was bedeutet, dass die Krankheit von Generation zu Generation früher ausbricht. Dies kommt durch eine instabile Vererbung zustande, bei der sich die *Repeat*-Expansion verlängert.

Tab. 1.4: Subtypen der spinocerebellären Ataxien

Subtyp	Locus	Protein	Mutation	OMIM
SCA1	6p23	Ataxin 1	CAG-RP	164400
SCA2	12q24.13	Ataxin 2	CAG-RP	183090
SCA3	14q32.12	Ataxin 3	CAG-RP	607047
SCA4	16q24-qter	n. b.	n. b.	600223
SCA5	11q13.2	Beta-III spectrin	D, MM	600224
SCA6	19p13	CACNA1A	CAG-RP	183086
SCA7	3p21.1-p12	Ataxin 7	CAG-RP	164500
SCA8	13q21	Kelch-like 1	CTG-RP	603680
SCA9	reserviert	n. b.	n. b.	n. b.
SCA10	22q13	Ataxin 10	ATTCT-RP	603516
SCA11	15q14-q21.3	n. b.	n. b.	604432

Fortsetzung der Tabelle 1.4

Subtyp	Locus	Protein	Mutation	OMIM
SCA12	5q31-q33	PPP2R2B	CAG-RP	604326
SCA13	19q13.3-q13.4	KCNC3	MM	605259
SCA14	19q13.4	PRKCG	MM	605361
SCA15	3p26.1-p.25.3	n. b.	n. b.	606658
SCA16	8q22.1-q42.1	n. b.	n. b.	606364
SCA17	6q27	TBP	CAG-RP	607136
SCA18	7q22-q32	n. b.	n. b.	607458
SCA19	1p21-q21	n. b.	n. b.	607346
SCA20	11p13-q11	n. b.	n. b.	608687
SCA21	7p21.3-p15.1	n. b.	n. b.	607454
SCA22	1p21-q21	n. b.	n. b.	607346
SCA23	20p13-p12.3	n. b.	n. b.	610245
SCA24	1p36	n. b.	n. b.	607317
SCA25	2p21-p153	n. b.	n. b.	608703
SCA26	19p13.3	n. b.	n. b.	609306
SCA27	13q34	FGF14	MM	609307
SCA28	18p11.22-q11.2	n. b.	n. b.	610246
DRPLA	12p13.31	Atrophin 1	CAG-RP	125370

D, Deletion; DRPLA, Dentatorubrale-Pallidolysiale Atrophie; MM, Missense Mutation; n. b., nicht bekannt; OMIM, *online mendelian in man* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>); RP, *Repeat-Expansion*

1.3.2 Familiäres Parkinsonsyndrom

Die Ursache eines Parkinsonsyndroms (PS) kann, wie bereits dargestellt, vielfältig sein und bisher ist eine vollständige Aufklärung schwierig. Für einige Familien mit autosomal-dominant oder -rezessiv vererbtem PS ist dies bereits gelungen, und so wurden seit 1997 dreizehn Genorte kartiert, die mit einem familiären (oder monogen vererbten) PS assoziiert sind. Von diesen konnten bis heute acht Gene identifiziert werden (siehe Tab. 1.5).

Zu den autosomal-rezessiven Formen des familiären PS gehören Mutationen in den Genen *Parkin* (Kitada *et al.*, 1998), *PINK1* (Valente *et al.*, 2004a) und *DJ-1* (Bonifati *et al.*, 2003). Sie sind mit einem frühen Krankheitsbeginn assoziiert und werden daher auch als *early-onset parkinsonism* (EOP) bezeichnet. Weiterhin ist für sie ein langsames Voranschreiten der Krankheit typisch (Hedrich *et al.*, 2002).

Tab. 1.5: Genorte des familiären Parkinsonsyndroms

Akronym	Erbgang	Region	Protein	Referenzen
<i>PARK1</i>	AD	4q21-q23	α -Synuclein	Polymeropoulos <i>et al.</i> , 1997 ⁺
<i>PARK2</i>	AR	6q25.2-q27	Parkin	Kitada <i>et al.</i> , 1998 ⁺
<i>PARK3</i>	AD	2p13	n. b.	Gasser <i>et al.</i> , 1998 [#]
<i>PARK4</i>	AD	4q21-q23	α -Synuclein*	Singleton <i>et al.</i> , 2003 ⁺
<i>PARK5</i>	AD	4p14	UCHL1	Leroy <i>et al.</i> , 1998 ⁺
<i>PARK6</i>	AR	1p35-p36	PINK1	Valente <i>et al.</i> , 2004a ⁺
<i>PARK7</i>	AR	1p36	DJ-1	Bonifati <i>et al.</i> , 2003 ⁺
<i>PARK8</i>	AD	12cen	LRRK2	Paisan-Ruiz <i>et al.</i> , 2004 ⁺ ; Zimprich <i>et al.</i> , 2004 ⁺
<i>PARK9</i>	AR	1p36	ATP13A2	Ramirez <i>et al.</i> , 2006 ⁺
<i>PARK10</i>	n. b.	1p32	n. b.	Hicks <i>et al.</i> , 2002 [#]
<i>PARK11</i>	n. b.	2q36-q37	n. b.	Pankratz <i>et al.</i> , 2003 [#]
<i>PARK12</i>	X	Xq21-q25	n. b.	Pankratz <i>et al.</i> , 2003 [#]
<i>PARK13</i>	n. b.	2p12	HTRA2	Strauss <i>et al.</i> , 2005 ⁺

⁺erste beschriebene Genmutation; [#]Kartierung des Locus; *Identifikation einer α -Synuclein-Triplikation; AD, autosomal-dominant; AR, autosomal-rezessiv; n. b., nicht bekannt; X, X-chromosomal

Mutationen im *Parkin*-Gen wurden am Häufigsten beobachtet (Lücking *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2005b). Das Spektrum der über 100 identifizierten *Parkin*-Mutationen reicht von Einbasenpaarsubstitutionen oder -deletionen bis hin zu Deletionen oder Multiplikationen ganzer Exons, die auch als Gendosis-Veränderungen bezeichnet werden. Diese Gendosis-Veränderungen wurden bei über 50 % aller *Parkin*-Mutationsträger gefunden. (Hedrich *et al.*, 2001; Hedrich *et al.*, 2004a). Gegenwärtig diskutiert wird die Rolle der heterozygoten Mutationsträger: In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass insbesondere bei älteren Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson heterozygote *Parkin*-Mutationen vorliegen (West *et al.*, 2002; Hedrich *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). Auf der anderen Seite gibt es Untersuchungen, die keinen Unterschied in der Häufigkeit von heterozygoten Mutationsträgern bei gesunden Probanden verglichen mit MP-Patienten aufweisen (Lincoln *et al.*, 2003; Munhoz *et al.*, 2004, Kay *et al.*, 2007). Das Parkin-Protein ist an der Protein-Degradation als Ubiquitin-Protein-Ligase (E3-Protein) beteiligt. Es ist nicht eindeutig geklärt, wie ein Verlust dieser Funktion zur Degeneration von Neuronen führt. Es wird jedoch vermutet, dass Parkin eine wichtige Funktion zum Schutz der Zellen vor oxidativem Stress besitzt (Greene *et al.*, 2005).

Die Gene *PINK1* und *DJ-1* sind weitere Gene für autosomal-rezessiven EOP und werden ebenfalls in Zusammenhang mit oxidativem Stress diskutiert (Bonifati *et al.*, 2003; Valente

et al., 2004b). Mutationen in *PINK1* findet man mit einer Frequenz von ca. 5 % (Valente *et al.*, 2004b) und in *DJ-1* bei etwa 1 % der EOP-Patienten (Abou-Sleimann *et al.*, 2003). Neben Punktmutationen, kleinen Deletionen und Insertionen sind für die beiden Gene auch einige Gendosis-Veränderungen bekannt (Bonifati *et al.*, 2003; Hedrich *et al.*, 2004b, Li *et al.*, 2005; Marongiu *et al.*, 2007). Für *PINK1* gibt es zudem Hinweise, dass heterozygote Mutationen einen Suszeptibilitätsfaktor für das PS darstellen (Criscuolo *et al.*, 2006; Hedrich *et al.*, 2006; Hiller *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2007). Für *DJ-1* sind noch zu wenige Daten bekannt, um über die Rolle heterozygoter Mutationsträger urteilen zu können.

Vor Kurzem wurde im *PARK9*-Locus das Gen *ATP13A2* als ursächlich für die Kufor-Rakeb-Krankheit ausgemacht (Ramirez *et al.*, 2006). Der Phänotyp der Krankheit zeigt neben einem PS auch pyramidale und dementielle Elemente (Williams *et al.*, 2005).

Alpha-Synuclein (SNCA) (Polymeropoulos *et al.*, 1997), *UCHL1* (Leroy *et al.*, 1998) und *LRRK2* (Paisan-Ruiz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004) gehören zu den autosomal-dominant vererbten Formen des familiären PS. Neben drei verschiedenen Punktmutationen wurden auch Duplikationen bzw. Triplikationen des gesamten *α-Synuclein*-Gens beobachtet, die ebenfalls zu dem charakteristischen Phänotyp führen (Singleton *et al.*, 2003; Ibanez *et al.*, 2004). Die häufigste Ursache für das autosomal-dominant vererbte PS bilden jedoch Mutationen des Gens *LRRK2*. Bisher wurden ungefähr 20 verschiedene Mutationen identifiziert. Eine der Mutationen, die c.6055G/A (p.Gly2019Ser), wurde mit einer Häufigkeit von 5 - 6 % bei mehreren großen Familien mit dominantem Erbgang gefunden (Nichols *et al.*, 2005), aber auch bei 1 - 2 % der Patienten ohne familiäre Häufung (Gilks *et al.*, 2005). *LRRK2* ist das erste Gen, das eine Rolle beim später beginnenden primärem PS zu spielen scheint, da das mittlere Erkrankungsalter von Patienten mit *LRRK2*-Mutationen bei 50 - 70 Jahren liegt. Das Protein *LRRK2* kodiert für eine Proteinkinase, weshalb vermutet wird, dass *LRRK2* eine Rolle im intrazellulären Signaltransfer spielt (Smith *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass Mutationen zu einer Erhöhung der Kinase-Aktivität führen (Gloeckner *et al.*, 2006).

Die Genorte *PARK10*, *PARK11*, *PARK12* konnten mittels Assoziationsstudien und Kopplungsanalysen als weitere Kandidatenregionen identifiziert werden; Mutationen wurden allerdings noch keine gefunden (Hicks *et al.*, 2002; Maraganore *et al.*, 2005; Pankratz *et al.*, 2003a und 2003b). In bislang einer Studie wurde eine heterozygote Punktmutation in dem Gen *HTRA2* (*PARK13*) bei vier von 518 Parkinsonpatienten gefunden (Strauss *et al.*, 2005).

1.3.3 Suszeptibilitätsgene für primäre Parkinsonsyndrome

Auf der Suche nach genetischen Faktoren, die familiäre und idiopathische Parkinsonsyndrome verursachen könnten, wurden zahlreiche Polymorphismen in einer Vielzahl von Genen untersucht. Mit Hilfe dieser Assoziationsstudien konnte für einige genetische Varianten in mehreren Studien übereinstimmend eine erhöhte Suszeptibilität (Anfälligkeit) für die Krankheit festgestellt werden. Diese könnte dadurch hervorgerufen werden, dass die Varianten direkt zur Pathogenese beitragen, dass sie die Penetranz der Krankheit erhöhen, das Alter bei Erkrankungsbeginn senken oder einen permissiven Effekt auf schädliche endogene oder exogene Substanzen haben (Klein und Schlossmacher, 2006). Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2000 zeigte für die Gene *Monoaminoxidase B* (involviert in die Verstoffwechslung von Dopamin), *N-Acetyltransferase 2* (beteiligt an der hepatischen Entgiftung Phase II) und die mitochondrial kodierten Gene *Glutathion-S-Transferase Theta 1* und *tRNA^{Glu}* einen positiven Zusammenhang mit MP auf (Tan *et al.*, 2000). Bei vielen Genen, für die in einer Studie eine Assoziation mit MP hergestellt wurde, ließ sich das Ergebnis in weiteren Studien nicht replizieren. Da Suszeptibilität keinen kausalen Zusammenhang aufdeckt, sondern lediglich protektive und permissive genetische Faktoren identifiziert und der Einfluss dieser Faktoren in verschiedenen Stichproben unterschiedlich groß sein kann, sollte eine solche Unstimmigkeit nicht überbewertet werden. Die endgültige Evaluation ihrer Einwirkung auf die multifaktorielle Genese primärer Parkinsonsyndrome ist damit aber ebenso schwierig. Eine Auswahl diskutierter Gene befindet sich im Anhang (Tab. 8.1). An dieser Stelle sollen exemplarisch zwei Suszeptibilitätsgene vorgestellt werden.

Das Isoenzym CYP2D6 (Debrisoquin-4-hydroxylase) gehört zur Familie der Cytochrome P450, welche in die erste Phase der hepatischen Entgiftung involviert ist. Dabei überführt es zahlreiche endogene und exogene Substanzen sowie Noxen in elektrophile Zwischenprodukte. Entsprechend ihrer Umsatzgeschwindigkeit werden genetische Varianten von *CYP2D6* in langsame, normale und ultraschnelle Phänotypen unterschieden. Die Vermutung lautet, dass es aufgrund einer langsameren Entgiftung zur Akkumulation potentieller Neurotoxine wie z. B. Pestizide kommt, die schädlich auf die *Substantia nigra* wirken können. So gibt es Studien, die eine Assoziation zwischen *CYP2D6*-Varianten, Pestizidexposition und dem Auftreten von MP belegen (Deng *et al.*, 2004; Elbaz *et al.*,

2004). Andere Studien konnten diese Beobachtung wiederum nicht bestätigen (Payami *et al.*, 2001).

Das Produkt des *MAPT*-Gens ist das Protein Tau, welches an der Organisation und Instandhaltung des Zytoskeletts beteiligt ist. Seine zelluläre Akkumulation in hyperphosphorylierter Form (*neurofibrillary tangles*) ist ein pathologisches Kennzeichen der Tauopathien, zu der beispielsweise die FTDP17 gehört (Hutton *et al.*, 1998). Daneben existiert eine Reihe von Polymorphismen, die gemeinsam als sogenannter H1-Haplotyp auftreten und in dieser Formation als genetischen Risikofaktor für MP gewertet werden. Studien mit großen Stichproben von Skipper *et al.* (2004) und Mamah *et al.* (2005) sowie eine Metaanalyse von 14 Publikationen (Zhang *et al.*, 2005) kommen übereinstimmend zu diesem Ergebnis.

1.3.4 Das *MDRI*-Gen als weiterer Kandidat für das Parkinsonsyndrom

Das *MDRI* (*Multidrug Resistance 1*)-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert. Es besteht aus 29 Exons, die für eine 3.843 bp lange cDNA kodieren (Chen *et al.*, 1986). Das Produkt des *MDRI*-Gens ist das Permeabilitäts-Glykoprotein (P-GP). Es handelt sich dabei um ein 1.280 Aminosäuren langes, 170 kD schweres, transmembranes Protein, das zu der Familie der *ATP-binding cassette*-Proteine gehört. Das P-GP ist in der Lage, unter Verbrauch von ATP seine Substrate von der intrazellulären auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran zu befördern (zusammengefasst bei Gottesman *et al.*, 1995).

Neben seiner schon frühzeitig beobachteten Expression in Tumorzellen (Juliano und Ling, 1976), findet sich das P-GP in vielen gesunden Geweben, die eine Ausscheidungs- und/oder Barrierefunktion besitzen, wie beispielsweise der Darmmukosa, der Leber und der Niere. So findet es sich auch in der Blut-Hirn-Schranke (Cordon-Cardo *et al.*, 1989). Diese besteht aus Endothelzellen, die durch *tight junctions* miteinander verbunden sind und zusätzlich von Gliazellen ummantelt werden. Diese Anordnung verhindert, dass es zu einem ungehinderten Übertritt von im Blut zirkulierenden lipophilen Stoffen in das dahinter liegende empfindliche Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS) kommt. Hier spielt das P-GP eine entscheidende Rolle: Aufgrund seiner Lokalisation in der lumenwärts gerichteten Membran der Kapillarendothelzellen ist es in der Lage, potentiell

neurotoxische Stoffe wieder der peripheren Zirkulation zuzuführen (zellulärer Efflux). Ein schematischer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

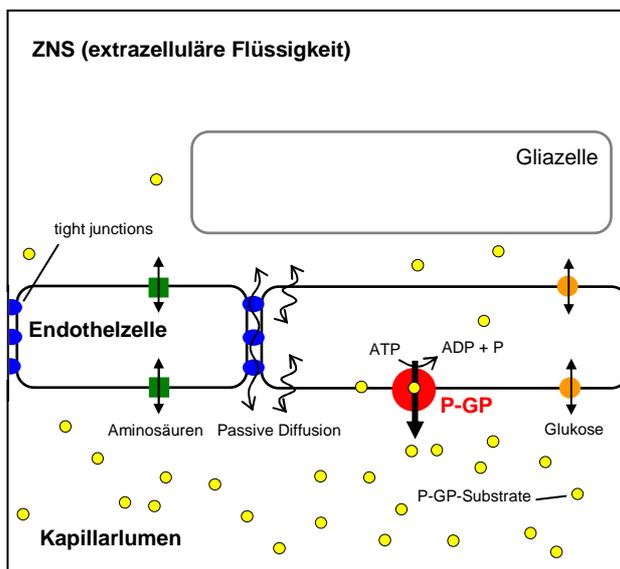


Abb 1.2: Vereinfachter Aufbau der Blut-Hirn-Schranke. Die Endothelzellen der Kapillaren sind durch *tight junctions* fest miteinander verknüpft und nicht fenestriert, weshalb nur sehr kleine hydrophile Substanzen interzellulär in das ZNS eindringen können; größere benötigen spezielle Transportsysteme, so z. B. Aminosäuren und Glukose. Lipophile Substanzen können die Barriere passiv durch Diffusion überwinden. Die lipophilen Substrate des P-GP werden am Übertritt in das ZNS gehindert, da es sie unter Verbrauch von ATP wieder in das Kapillarlumen zurücktransportiert. Ihre Konzentration ist daher im ZNS wesentlich niedriger als in der Kapillare.

Die detoxifizierende Funktion wurde erstmals durch Experimente an *Knock-Out*-Mäusen nahegelegt (Schinkel *et al.*, 1994) und ist für die verschiedenen Lokalisationen des P-GP charakteristisch. Der Transport erfolgt stets in die Richtung, die eine beschleunigte Eliminierung der Substanz aus dem angrenzenden Gewebe begünstigt.

Bis heute wurde eine Vielzahl von Substraten des P-GP identifiziert (siehe Tab. 8.2 im Anhang). Bei den meisten handelt es sich um Medikamente verschiedener therapeutischer Kategorien, wobei die Substrate eine hohe strukturelle Variabilität vorweisen. Das P-GP besitzt daher im klinischen Alltag einen nicht zu unterschätzenden Stellenwert: Im Bereich der Tumorthherapie mit Zytostatika ist ein Therapieversagen aufgrund einer primären oder sekundären Überexpression des Transporterproteins noch immer gefürchtet (zusammengefasst bei Takara *et al.*, 2006). Auch Neuroleptika gehören zu den Substraten des P-GP und ihre Verteilung im ZNS wird von der Efflux-Pumpe beeinflusst. Es ist daher möglich, dass das P-GP bei der Entstehung von NL-induzierten Bewegungsstörungen eine Rolle spielt.

In den letzten Jahren wurde das *MDR1*-Gen auf das Vorhandensein von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) untersucht. Insgesamt wurden 20 SNPs von zwei Arbeitsgruppen identifiziert (Hoffmeyer *et al.*, 2000, Cascorbi *et al.*, 2001). Ein Teil der vorliegenden

Arbeit beschäftigt sich mit drei dieser *MDR1*-SNPs: In Exon 21 c.2677G/T/A, in Exon 26 c.3320A/C und ebenfalls in Exon 26 c.3435C/T. Die von Cascorbi erhobene Genotypenverteilung dieser SNPs ist in Tabelle 8.3 im Anhang aufgeführt. Bei dem SNP c.3435C/T handelt es sich um eine *silent mutation*, die keine Aminosäuresubstitution im Protein verursacht. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein des Allels 3435T mit einer verminderten Expression und Funktion des P-GP in Enterozyten *in vivo* und in einer Subpopulation peripherer Leukozyten korreliert (Hoffmeyer *et al.*, 2000, Hitzl *et al.*, 2001). Eine Erklärung dafür könnten an Hepatozyten gemachte Beobachtungen liefern, die zeigten, dass der SNP c.3435C/T die Stabilität der mRNA ungünstig beeinflusst (Wang *et al.*, 2005). In vielen Geweben, in denen P-GP exprimiert wird, scheinen allelische Varianten des P-GP die Funktionalität der Efflux-Pumpe zu mindern. Die unterschiedlichen Allele des SNP c.2677G/T/A führen zum Einbau der AS Alanin (G), Serin (T) bzw. Threonin (A) an Position 893 des Proteins. Auch für diesen SNP liegen Untersuchungen zur Expression und Funktion vor, die jedoch widersprüchliche Ergebnisse zeigen: Einerseits wurde eine Assoziation der genetischen Variante mit einer verminderten Expression von P-GP in plazentaren Trophoblasten gefunden (Tanabe *et al.*, 2001), andererseits wurde eine verstärkte Funktion *in vitro* wie auch *in vivo* bei Vorliegen des Allels 2677T gezeigt (Kim *et al.*, 2001). Zudem gab es Hinweise auf eine partielle Kopplung der Allele 2677T, 3435T und eines weiteren SNPs in den beiden zitierten Studien. Eine weitere Studie konnte keine signifikante Änderung der Expression und der Funktion durch den SNP c.2677G/T/A zeigen (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2002). Für den SNP an Position 3320 in Exon 26, der zum Austausch von Glutamin (A) gegen Prolin (C) an Position 1107 des Proteins führt, liegen bis jetzt noch keine Experimente zur allelspezifischen Expressionsrate vor.

Vor Kurzem verglich eine Arbeitsgruppe die Integrität der Blut-Hirn-Schranke von Patienten mit primären Parkinsonsyndrom mit der von gesunden Kontrollindividuen (Kortekaas *et al.*, 2005). Dazu verwendeten sie zur Messung der Aktivität des P-GP *in vivo* die Detektierung radioaktiv markierten [¹¹C]-Verapamils mittels Positronenemissionstomographie (PET), welche zuvor als eine sensitive Methode zur Erfassung der Funktion von P-GP etabliert worden war (Bart *et al.* 2003). Die Ergebnisse von Kortekaas *et al.* zeigten, dass die Parkinsonpatienten im Bereich des Mittelhirns und der dorsalen *Pons* eine Schwäche der Blut-Hirn-Schranke gegenüber gesunden Kontrollen aufwiesen, also deren Aktivität der ATP-Pumpe herabgesetzt war. Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass

Noxen durch einen ungehinderten Übertritt in das Hirnparenchym die Anfälligkeit für das primäre Parkinsonsyndrom erhöhen können und machen das *MDRI*-Gen zu einem interessanten Kandidatengen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird diesen Überlegungen in einer Assoziationsstudie nachgegangen. Die Genotypenverteilung der oben angeführten häufigen SNPs wird in einer Gruppe von Parkinsonpatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ermittelt. Da wie oben erwähnt auch ein Zusammenhang bei der Entstehung von Nebenwirkungen durch NL bestehen könnte, wird in einer zweiten Fall-Kontroll-Studie die hypothetische Beziehung zwischen NL-induzierten Bewegungsstörungen und einer herabgesetzten Effektivität des P-GP untersucht.

1.4 Vorarbeiten

I Vorarbeiten zur genomweiten Kopplungsanalyse

Bei einer großen Familie mit SCA (Familie R) wurden zunächst zwei Familienmitglieder (L-1671 und L-1689, vgl. Stammbaum in Abb. 8.1a) auf *Repeat*-Expansionen in den *SCA*-Loci 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 12 und 17 im Institut für Humangenetik der Universität Lübeck untersucht, um ausschließen zu können, dass der Phänotyp durch eine dieser Ataxien bedingt ist. Dabei wurden für beide Proben Allele von normaler Länge nachgewiesen, womit die Gene nicht als krankheitsverursachend in Betracht kommen. Im Rahmen der Vorarbeiten bestätigte sich eine im Jahr 2005 entdeckte Mutation in dem Gen *DCTN1/Dynactin* für L-1693 und V.3 (Münch *et al.*, 2005). Sie wurde ebenso für deren Nachkommen L-1670, L-1672 und L-1683 nachgewiesen, konnte aber bei allen anderen Familienmitgliedern, von denen genetisches Material zur Verfügung stand, ausgeschlossen werden (Rosenbohm *et al.*, eingereicht).

II Vorarbeiten zu Feinkartierung, Mutationsanalyse und Gendosis-Veränderungen bei Familien mit Parkinsonsyndrom

Für Familie K, eine der drei Familien mit familiärem Parkinsonsyndrom, wurde in der hiesigen Arbeitsgruppe bereits eine Untersuchung der Gene *Parkin*, *PINK1* und *DJ-1* in den Jahren 2002 bis 2005 im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt. Dabei wurde ein *Screening* auf Mutationen mit Hilfe der *single strand confirmation polymorphism* (SSCP)-Analyse vollzogen, wobei keine Veränderungen der DNA-Einzelstrangkongformation entdeckt wurden.

1.5. Zielsetzung und Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit wird nach der genetischen Komponente verschiedener neurologischer Krankheiten in drei Populationen auf drei verschiedene Arten gesucht.

I Familie R – Genomweite Kopplungsanalyse

Für Familie R, in der vor allem Patienten mit SCA-Phänotyp auftreten, soll mittels Haplotypisierung der kürzlich klonierte Genort *SCA5* als ursächlich für die Krankheit ausgeschlossen werden. Nach erfolgtem Ausschluss soll eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt werden.

Lassen sich bei den betroffenen Mitgliedern der Familie eine oder mehrere Regionen auf dem Genom identifizieren, die für eine gekoppelte Vererbung eines Haplotyps und der Krankheit sprechen, und somit das Vorhandensein einer kausalen Mutation in einer dieser Regionen wahrscheinlich macht?

II Familie M, K und P – Haplotypisierung, Mutationsanalyse und Gendosis-Veränderungen

Für drei Familien M, K und P, bei denen ein familiäres Parkinsonsyndrom auftritt, wird eine Haplotypisierung der Genorte *PARK1* bis *PARK8* vorgenommen. An Genorten, die nicht ausgeschlossen werden können, schließt sich eine Mutationsanalyse der entsprechenden Loci an. Zusätzlich sollen die Genorte auf bekannte Gendosis-Veränderungen untersucht werden, da diese mit der konventionellen Mutationsanalyse nicht aufgedeckt werden können.

Kann bei den betroffenen Mitgliedern der Familien ein Genort identifiziert werden, der eine Mutation in diesem Bereich wahrscheinlich macht? Gelingt es, eine Mutation im entsprechenden *PARK*-Locus zu finden?

III *MDR1* – Zwei Assoziationsstudien

Zur Untersuchung, ob bestimmte Polymorphismen des *MDR1*-Gens einen genetischen Risikofaktor a) für das primäre Parkinsonsyndrom und b) für das Auftreten von NL-induzierten Bewegungsstörungen darstellen, werden die Genotypenverteilungen von einer Gruppe Parkinsonpatienten und einer Gruppe psychiatrischer Patienten, die durch Neuroleptika unter Bewegungsstörungen leiden, mit einer passenden Kontrollgruppe verglichen.

IIIa) Besteht für Personen mit einem SNP an einer von drei ausgewählten Positionen im *MDR1*-Gen ein verändertes Risiko am primären Parkinsonsyndrom zu erkranken als für gesunde Kontrollindividuen?

IIIb) Ist die Verteilung der genannten SNPs in einer Gruppe von Patienten, die mit NL behandelt wurden und darunter typische Bewegungsstörungen als Nebenwirkung entwickelt haben, anders als in einer entsprechend therapierten Kontrollgruppe ohne Entwicklung derartiger Symptome?

2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen molekulargenetisch untersucht. Drei Familien weisen ein familiär auftretendes Parkinsonsyndrom auf, eine weitere Familie gehäuft Ataxie zusammen mit weiteren neurologischen Störungen. An diesen Familien wurden Kopplungsanalysen vollzogen. Zwei weitere Patientenkollektive und dazugehörige Kontrollpopulationen wurden im Rahmen von Assoziationsstudien untersucht. Alle involvierten Personen hatten ihr schriftliches Einverständnis zu den Analysen gegeben; die Untersuchungen waren durch die lokale Ethikkommission genehmigt worden.

2.1.1 Familie R mit Ataxie und anderen neurologischen Symptomen

Mitglieder der Familie R wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm (Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Ludolph) vorgestellt und dort von Frau Dr. A. Rosenbohm untersucht. Es konnte ein sieben Generationen umfassender Stammbaum erstellt werden, der insgesamt aus 74 Familienmitgliedern besteht, von denen 24 erkrankt waren. Der Stammbaum, in dem die untersuchten Individuen mit L-Nummer gekennzeichnet sind, ist in Abbildung 8.1a im Anhang abgebildet. Aus den ersten vier Generationen sind alle Personen bereits verstorben; anhand von Krankenakten und Beschreibungen durch Angehörige konnten Daten zu ihrem klinischen Status erhoben werden. Allerdings wurden über zwei Verstorbene (III.1 und III.2) keine sicheren Angaben gemacht, weil die Tochter (L-1689) aufgrund einer Demenz keine verlässliche Aussage mehr treffen konnte. Die Individuen III.1 und III.2 sind daher bezüglich ihres Gesundheitsstatus mit einem „?“ in Abbildung 8.1a gekennzeichnet (s. Anhang).

Von Familie R lagen Blutproben aus den drei jüngsten Generationen und von L-1689 vor. Insgesamt konnte von 24 Personen Blut gewonnen werden, davon wurden 20 in die Analysen eingeschlossen (Ausschluss von L-1684, L-1685, L-1691 und L-1692 aus Kapazitätsgründen). Die neun lebenden Betroffenen und L-1689, die noch vor ihrem Tod

2.1.2 Familien mit familiärem Parkinsonsyndrom

2.1.2.1 Familie M

Familie M ist eine Kernfamilie bestehend aus vier Mitgliedern, welche von Herrn Dr. J. Friedmann (*NeuroHealth Parkinson's Disease and Movement Disorder Center*, Rhode Island, USA) betreut wird. Es handelt sich um ein gesundes Elternpaar (L-2480 und L-2477; vgl. Abb. 8.1b im Anhang) mit zwei Töchtern (L-2478 und L-2479), die beide seit vielen Jahren an einer Parkinson-Symptomatik mit frühem Erkrankungsbeginn leiden. Eine dritte und älteste Tochter (L-2491), die ebenfalls seit dem frühen Erwachsenenalter typische Parkinsonsymptome bot, war im Jahr 1980 bereits verstorben. Bei der durchgeführten Autopsie fand sich eine für MP typische Pathologie mit Lewy-Körperchen in der *Pars compacta* der *Substantia nigra*. Weitere Informationen sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt. Von allen Familienmitgliedern stand Vollblut zur genetischen Untersuchung zur Verfügung.

Tab. 2.2: Klinische Daten von untersuchten Mitgliedern der Familie M

DNA-Nr.	Geburtsjahr	Geschlecht	Erkrankungs- alter (Jahre)	Symptome
L-2480	1937	m	-	Keine
L-2477	1941	w	-	Keine
L-2478	1962	w	20	Typische Parkinson-Symptomatik
L-2479	1964	w	35	Atypisches Parkinsonsyndrom, symmetrisch, kein Tremor, Spastiken
L-2491	n. b., gest. 1980	w	20	Typische Parkinson-Symptomatik

gest., gestorben; m, männlich; n. b.; nicht bekannt; w, weiblich

2.1.2.2 Familie K

Familie K ist eine Familie aus der Schweiz. Der Indexpatient L-1435 (siehe Abb. 8.1c) wurde im Jahr 2002 in der Klinik Zihlschlacht Parkinson-Zentrum, Schweiz (Direktor: Dr. med. C. Gutknecht), bei Frau Dr. med. H. Lisitchkina vorgestellt. Zum damaligen Zeitpunkt bot er eine fortgeschrittene Parkinson-Symptomatik mit Akinese, Rigor, gestörter Feinmotorik, Mikrographie und zeitweiligem Speichelfluss. Die motorischen Störungen fluktuierten stark. Die Diagnose stand damals bereits seit acht Jahren, der Patient war im

Alter von 38 Jahren erkrankt. Die Familienanamnese ergab, dass beide Eltern des Patienten ebenfalls an Parkinsonsymptomen litten. Die Tochter (L-1437) wies einen essentiellen Tremor auf. Die anamnestischen Angaben bestätigten sich bei Vorstellung der genannten Familienmitglieder. Auch einige gesunde Verwandte stellten ihr Blut zu Analysezwecken zur Verfügung.

Tab. 2.2: Klinische Daten von untersuchten Mitgliedern der Familie K

DNA-Nr.	Geburtsjahr	Geschlecht	Erkrankungs- alter (Jahre)	Symptome
L-1440	1929	m	-	Keine
L-1441	1933	m	-	Keine
L-1436	1926	w	n. b.	Typische Parkinson-Symptomatik
L-1439	1951	m	-	Keine
L-1435	1954	m	38	Initial tremordominant, später ausgeprägte Parkinson-Symptomatik vom Äquivalenztyp mit starken Fluktuationen
L-1438	1956	m	-	Keine
L-1437	1981	w	n. b.	Essentieller Tremor

m, männlich; n. b., nicht bekannt; w, weiblich

2.1.2.3 Familie P

Bei Familie P handelt es sich um eine größere Familie aus dem nordfriesischen Raum, die im Jahr 2005 in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. G. Deuschl) bei Herrn Dr. med. F. Papengut vorstellig wurde. Es konnte ein fünf Generationen umfassender Stammbaum rekonstruiert werden, der 34 Personen umfasst, wovon zehn allerdings schon verstorben waren. Von den verbliebenen 24 Individuen waren sieben von einer milden Parkinson-Symptomatik betroffen (vgl. Abb. 8.1d im Anhang). Vier der Erkrankten willigten in eine Blutspende ein, ebenso zehn der nicht betroffenen Familienmitglieder.

2.1.3 Patienten mit primärem Parkinsonsyndrom und Kontrollen

In einem Rekrutierungszeitraum von 1999 bis 2005 wurden Blutproben von Patienten mit primärem Parkinsonsyndrom und Kontrollen in der Arbeitsgruppe Neurogenetik der

hiesigen Universität gesammelt. Die Diagnose war von verschiedenen Bewegungsstörungsspezialisten anhand der *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank Criteria* (Gibb und Lees, 1988) gestellt worden. Insgesamt wurden 418 Patienten in die in dieser Arbeit durchgeführte Fall-Kontroll-Studie eingeschlossen. Die Stichprobe setzte sich aus 241 (57,7 %) Männern und 177 (42,3 %) Frauen zusammen. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug bei der Rekrutierung $56,0 \pm 12,6$ Jahre. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei $45,2 \pm 13,1$ Jahren (bei 353 bekannten Angaben). Die Patienten waren unterschiedlicher ethnischer Abstammung: 265 (63,4 %) Deutsche, 59 (14,1 %) Italiener, 42 (10,0 %) Serben, 37 (8,9 %) Südtiroler, 12 (2,8 %) Holländer sowie Einzelpersonen aus Irland, der Türkei und Frankreich (je 0,23%). Soweit bekannt, war keiner der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit einem der anderen Patienten verwandt.

Neben den Patienten wurden 185 Kontrollindividuen in die Studie involviert. Davon waren 83 (44,9 %) Männer und 102 (55,1 %) Frauen. Das Durchschnittsalter lag bei $50,9 \pm 13,0$ Jahre. Außerdem wurde die Kontrollpopulation hinsichtlich ihrer ethnischen Herkunft auf die Patientenpopulation abgestimmt. Sie bestand aus 123 (66,5 %) Deutschen, aus 61 (33,0 %) Serben und einem (0,5 %) Südtiroler. Die deutschen Kontrollindividuen waren nach gründlicher neurologischer Untersuchung als gesund befunden worden. Die Kontrollperson aus Südtirol wurden auf ihr generelles gesundheitliches Befinden untersucht; die serbischen Kontrollpersonen wurden keiner Untersuchung unterzogen.

2.1.4 Patienten mit Neuroleptika-induzierten Bewegungsstörungen und Kontrollen

Die Teilnehmer der zweiten Fall-Kontroll-Studie wurden aus dem stationären Patientengut der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. F. Hohagen) rekrutiert. Die Patienten wurden aufgrund verschiedener psychiatrischer Erkrankungen mit Neuroleptika (NL) therapiert. Es wurden nur Patienten in die Studie aufgenommen, die folgende Einschlusskriterien vorwiesen: (1) Therapie mit Neuroleptika seit mindestens einer Woche, (2) keine neurologischen Vorerkrankungen, (3) kein Schädeltrauma in der Vorgeschichte, (4) keine weitere Medikation, die potentielle Bewegungsstörungen verursachen könnte. Jeder Patient wurde von Ärzten in der

neurologischen Facharztausbildung (Dr. M. Kasten, Dr. A. Hiller) der hiesigen Klinik gründlich untersucht. Folgende Beurteilungsskalen wurden zur genauen Diagnostik der Bewegungsstörungen herangezogen: die *Abnormal Involuntary Movement Scale* (National Institute of Mental Health, 1975); die *Tsui Rating Scale for Cervical Dystonia* (Tsui et al., 1986); die *Burke Rating Scale for Primary Torsion Dystonia* (Burke et al., 1985); Abschnitt III der *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease, 2003); die *Hillside Scale* (Fleischhacker et al., 1991) und die *Barnes Akathisia Scale* (Barnes, 1989).

Unter 113 untersuchten Personen wurden insgesamt 76 Patienten erfasst, die unter Medikation mit NL Bewegungsstörungen entwickelt hatten. Davon waren 37 Männer (48,7 %) und 39 Frauen (51,3 %). Das Durchschnittsalter betrug $42,3 \pm 15,2$ Jahre. 68 Patienten (89,9 %) waren deutscher, 3 (3,9 %) türkischer, 2 (2,6 %) polnischer und je einer (1,3 %) italienischer, portugiesischer bzw. deutsch-afrikanischer Abstammung. Art und Häufigkeit der beobachteten Bewegungsstörungen sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst. Zu beachten ist, dass bei einigen Patienten mehr als eine Störung diagnostiziert wurde.

Tab. 2.4: Art und Häufigkeit der diagnostizierten Bewegungsstörungen

	Frühdyskinesie	Parkinsonsyndrom	Akathesie	Spätdyskinesie
Anzahl	40	52	22	10
prozentual (%)	52,6	68,4	28,9	13,2

Als Kontrollen dienten die 37 Personen, die unter NL-Medikation keine Bewegungsstörungen entwickelt hatten. Sie wurden nach denselben Kriterien wie die Patientengruppe erfasst. Die Gruppe bestand aus 13 (35,1 %) Männern und 24 (64,9 %) Frauen. Das Durchschnittsalter betrug $44,9 \pm 13,5$ Jahre. Die Stichprobe setzte sich aus 31 (83,3 %) Personen deutscher Abstammung, 3 (8,1 %) Personen türkischer und aus je einer (2,7 %) Person dänischer, südtiroler bzw. serbischer Abstammung zusammen.

2.2. Material

2.2.1 Chemikalien

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase und Puffer	Qbiogene
Oligonukleotide, <i>Primer</i>	MWG Biotech
Sonden für den <i>LightCycler</i>	TIB MolBiol
Desoxyribonukleotide	Qbiogene
<i>LightCycler FastStart DNA Master Plus Hybridization Probes</i>	Roche Diagnostics
Molekulargewichtsstandard	Invitrogen
QIAquick PCR <i>Purificationkit</i>	Qiagen
MLPA-Kit	MRC-Holland
<i>Thermo Sequenase flourescent labelled Primer cycle sequencing kit</i>	Amersham Biosciences
30%ige Acrylamidlösung	Roth
<i>Long Ranger</i> Acrylamidlösung	Biozym

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden von den Firmen Roth, Fluka Biochemica und Merck geliefert.

2.2.2 Geräte

Thermocycler	
Mastercycler	Eppendorf
PTC 100 und PTC 200	Biozym
<i>LightCycler</i>	Roche Diagnostics
IR2-DNA-Sequenzierer 4200 (LI-COR)	MWG Biotech
BioDocAnalyze	Biometra

2.2.3 Lösungen

10x TBE:

890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA

1x TE-Puffer

5 ml 1 M Tris/HCl (pH 7,6); 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); ad 500 ml dH₂O

EDTA:

0,5 M EDTA-Lösung mit HCl/ NaOH auf pH 8,0 einstellen

Formamid-Farbstoff:

47,5 ml Formamid; 2,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); 0,01 g Bromphenolblau

Leidener-Lösung:

144 ml 1 M NH₄Cl; 10 ml 1 M KHCO₃; 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0);
ad 1000 ml mit dH₂O (steril filtriert)

Lysepuffer:

5 ml 1 M Tris; 40 ml 5 M NaCl; 200 µl 0,5 M EDTA; ad 500 ml mit dH₂O

Polyacrylamid (PAA)-Gel, denaturierend für Genotypisierung:

6 ml 30%ige Acrylamidlösung (Roth); 3 ml 10x TBE; 3 g Harnstoff;
ad 30 ml mit dH₂O; Polymerisieren mit 180 µl 10% APS und 25 µl TEMED

PAA-Gel, denaturierend für MLPA-Analyse:

2,4 ml *Long Ranger* Acrylamidlösung (Biozym); 2,4 ml 10x TBE;
8,4 g Harnstoff; ad 20 ml mit dH₂O; Polymerisieren mit 134 µl 10% APS
und 13,4 µl TEMED

PAA-Gel, denaturierend für Sequenzierung:

3,3 ml *Long Ranger* Acrylamidlösung (Biozym); 3 ml 10x TBE;
12,6 g Harnstoff; ad 30 ml mit dH₂O; Polymerisieren mit 200 µl 10% APS
und 20 µl TEMED

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion

Die Präparation genomischer DNA erfolgte aus Leukozyten des peripheren Blutes nach der Aussalzmethode (Miller *et al.*, 1988). Dabei wurden die Zellen durch Zugabe einer hypertonen Lösung zunächst lysiert, Proteine durch das Enzym Proteinase K verdaut, und die DNA anschließend mittels Präzipitation isoliert. Die Durchführung geschah im Einzelnen wie folgt:

- Versetzen von 10 ml Vollblut (EDTA/ Heparin/ Citrat) mit 35 ml Leidener-Lösung
- Inkubation für 30 min auf Eis bei 200 rpm
- Abzentrifugieren der Leukozyten (6000 rpm, 4° C, 20 min)
- Waschen des *Zellpellets* durch Resuspendieren in 10 ml Leidener-Lösung
- Inkubation für 20 min auf Eis und Zentrifugation (6000 rpm, 4° C, 20 min)
- Resuspension des *Pellet* in 3 ml Lysepuffer
- Zugabe von 200 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 100 µl SDS (20 %)
- Inkubation über Nacht bei 55° C
- Zugabe von 1 ml 6 M NaCl-Lösung und kräftig schütteln
- Zentrifugation (6000 rpm, 20° C, 25 min)
- Überstand mit 6 M NaCl-Lösung waschen bis dieser keine sichtbaren Schwebeteilchen mehr enthält
- Ausflocken der DNA durch Zugabe von 2 Vol. 96 % EtOH
- DNA-Flocke mit 1 ml 70% EtOH waschen
- Zentrifugation (12000 rpm, 4° C, 15 min), Überstand verwerfen
- *Pellet* (DNA) im Thermoblock bei 37° C trocknen
- Zugabe von 500 bis 1000 µl 1x TE-Puffer; DNA über Nacht im Kühlschrank lösen

Auf diese Weise konnten ca. 100 bis 1000 µg genomischer DNA gewonnen werden.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine enzymatische Methode, mit der DNA *in vitro* vervielfältigt werden kann (Saiki *et al.*, 1985). Die Spezifität der Amplifikation wird durch die Verwendung zweier chemisch synthetisierter sequenzspezifischer Oligonukleotide (*Primer*) gewährleistet, welche komplementär zu den Randbereichen der Zielsequenz binden. Eine thermostabile Polymerase synthetisiert sodann die zwischen den *Primern* gelegene Sequenz.

Die Reaktion ist in drei sich wiederholende Schritte unterteilt: Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzung auf 95° C in komplementäre Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Abkühlen des Reaktionsansatzes auf ca. 55° C (*Primer*-spezifisch) ermöglicht die Anlagerung der *Primer* an die Einzelstränge (*Annealing*), bevor die Polymerase im letzten Schritt bei 72° C eine komplementäre Kopie des Einzelstranges ausgehend von den 3'-Enden der *Primer* erstellt (Extension).

Die exponentielle Vermehrung der Zielsequenz garantiert eine für anschließende Analysen ausreichend hohe DNA-Konzentration.

2.3.2.1 PCR unter Standardbedingungen

Bei geltenden Standardbedingungen, wie dies beispielsweise für die Amplifikation des Exons 26 des *MDRI*-Gens der Fall war, wurde ein Reaktionsansatz nach folgendem Rezept erstellt:

Substanz	Konzentration	Volumen	Konzentration im Ansatz
dH ₂ O		ad 10,00 µl	
dNTP	1 mM	2,00 µl	0,2 mM
Puffer	10x	1,00 µl	1x
<i>Primer F</i>	10 µM	0,60 µl	0,6 µM
<i>Primer R</i>	10 µM	0,60 µl	0,6 µM
Taq	5 U/µl	0,05 µl	0,025 U/µl
DNA	~ 5 ng/µl	5,00 µl	~ 2,5 ng/µl

Die PCR wurden mit einer Standard-*Taq*-Polymerase durchgeführt (Qbiogene). Das Enzym besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, jedoch keine Korrekturlesefunktion. An die 3'-Enden wird unabhängig von der Matrix ein Desoxyadenosin angefügt.

Bei jeder PCR wurde auch eine Negativkontrolle angesetzt. Die Reaktionsgefäße wurden in einen auf 95° C vorgeheizten Thermoblock eines *Thermocyclers* mit beheizbarem Deckel gesetzt. Das verwendete PCR-Programm setzte sich aus den genannten Schritten zusammen:

35 x	}	95° C	3 min	initiale Denaturierung
		95° C	30 s	Denaturierung
		55° C	30 s	<i>Annealing</i>
		72° C	30 s	Extension
		72° C	10 min	terminale Extension
		4° C		als Endtemperatur

Die Amplifikation erfolgt bei einer der *Primer*-Sequenz angepassten *Annealing*-Temperatur. Die Dauer der Extension richtet sich nach der erwarteten Produktgröße, wobei eine Synthesegeschwindigkeit von 1 kb/min angenommen wurde.

Für eine Anzahl von durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen galten abweichende Bedingungen. Die jeweiligen Angaben unter Aufführung der verwendeten *Primer* sind den Tabellen 8.5 - 8.11 im Anhang zu entnehmen.

2.3.2.2 PCR mit fluoreszenzmarkierten *Primern*

Da die Genotypen und Sequenzen mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (LI-COR) ausgewertet wurden, war die Zugabe eines fluoreszenzmarkierten *Primers* notwendig (vgl. 2.3.5 und 2.3.7.2). Alle für die Sequenzierung am LI-COR-System verwendeten PCR-spezifischen *Primer* waren am 5'-Ende um die M13-*Primer*-Sequenz verlängert, die Vorwärts-*Primer* mit der M13F-Nukleotidsequenz und die Rückwärts-*Primer* mit M13R. Zusätzlich wurden *Primer* mit der M13F- bzw. M13R-*Primer*-Sequenz hinzugefügt, die mit dem Fluoreszenz-Farbstoff IRD-700 bzw. IRD-800 markiert waren (s. Tab. 8.4 im Anhang). Bei der Sequenzierreaktion entstanden so spezifische Produkte, die um eine M13F- bzw. M13R-Sequenz verlängert waren und zusätzlich am 5'-Kettenende das Fluorophor IRD-700 im Falle der Vorwärtssequenz, im Falle der Rückwärtssequenz das Fluorophor IRD-800 aufwiesen.

Für die Genotypisierung wurden lediglich die Vorwärts-*Primer* am 5'-Ende um die M13F-Sequenz verlängert und ein *Primer* mit der M13F-*Primer*-Sequenz hinzugefügt, der IRD-

700 oder IRD-800 markiert sein konnte. Dementsprechend entstanden PCR-Produkte, die nur in vorwärts transkribierter Richtung um die M13F-Sequenz verlängert waren und das Fluorophor IRD-700 oder IRD-800 beinhalten.

Die PCR zur Sequenzierung wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Substanz	Konzentration	Volumen	Konzentration im Ansatz
dH ₂ O		ad 15,00 µl	
Betain	5 mM	0,70 µl	0,23 mM
Puffer	10x	1,50 µl	1 x
dNTP-Mix	1 mM	3,00 µl	0,2 µl
<i>Primer +</i>	10 µM	0,60 µl	0,4 µl
<i>Primer -</i>	10 µM	0,60 µl	0,4 µl
Taq	5 U/µl	0,07 µl	0,23 U/µl
DNA	~ 5 ng/µl	5,00 µl	~ 1,67 ng/µl

Das PCR-Programm lautete:

95° C 5 min // 35 Zyklen: 95° C 30 s; 55 - 72 ° C 30 s; 72° C 45 s // 72° C 10 min // 4° C als Endtemperatur.

Die sich daran anschließende Sequenzier-Reaktion, bei der nun die fluoreszenzmarkierten *Primer* mit der M13-*Primer*-Sequenz benötigt wurden, wird im Kontext der Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.3.7.2) erläutert.

Die PCR zur Genotypisierung wurde nach folgendem PCR-Ansatz durchgeführt:

Substanz	Konzentration	Volumen	Konzentration im Ansatz
dH ₂ O		ad 15,00 µl	
Betain	5 mM	0,20 µl	0,2 mM
Puffer	10x	0,50 µl	1x
dNTP-Mix	1 mM	1,00 µl	0,2 mM
<i>Primer +</i>	10 µM	0,06 µl	0,12 µM
<i>Primer -</i>	10 µM	0,06 µl	0,12 µM
M13F- <i>Primer</i> *	10 µM	0,05 µl	0,1 µM
Taq	5 U/µl	0,05 µl	0,05 U/µl
DNA	~ 5 ng/µl	3,00 µl	~ 1 ng/µl

* IRD700- oder IRD800-markiert

Die Amplifikation fand unter folgenden Bedingungen statt:

95° C 5 min // 35 Zyklen: 95° C 30 s; 58° C 30 s; 72° C 45 s // 72° C 10 min // 4° C als Endtemperatur.

2.3.2.3 Duplex-PCR

Im Gegensatz zur gewöhnlichen Monoplex-PCR ist die Duplex-PCR eine Reaktion, bei der zwei Zielsequenzen zeitgleich amplifiziert werden. Dem PCR-Ansatz werden also zwei *Primer*-Paare hinzugefügt.

Im vorliegenden Fall wurde ein Abschnitt des *Beta Globin*-Gens und das *MDR1*-Gen Exon 21 simultan vervielfältigt. Bei der speziell in diesem Fall angewandten Duplex-PCR werden außerdem zwei fluoreszenzmarkierte Sonden pro Zielsequenz im PCR-Ansatz verwendet, um eine getrennte Detektion der amplifizierten Produkte durch den *LightCycler* zu ermöglichen. Das PCR-Protokoll und die Funktionsweise des *LightCyclers* werden im nachfolgenden Abschnitt 2.3.3 dargestellt.

2.3.3 Schmelzkurvenanalyse am *LightCycler*

Der *LightCycler*2.0 (LC, Firma RocheDiagnostics) ist ein Echtzeit-PCR-Gerät. Mittels Fluoreszenzmessung gelingt es, die Vermehrung der Zielsequenz einer PCR *online* zu verfolgen. Durch die Möglichkeit, zwei Zielsequenzen simultan zu amplifizieren und getrennt voneinander zu detektieren und zu vergleichen, können Aussagen über die Quantität der vervielfältigten DNA-Fragmente getroffen werden. Des Weiteren kann über eine sog. Schmelzkurvenanalyse Auskunft über das Vorhandensein einer bekannten Punktmutation bzw. eines *single nucleotide polymorphisms* (SNP) in einer Zielsequenz gegeben werden. Letztere Funktion des Gerätes wurde genutzt.

Die PCR-Reaktion findet in Glaskapillaren statt, die in einem rotierenden Karussell sitzen. Die Temperatur wird über einen Luftstrom (Temperaturänderung bis 20° C/s) reguliert. Das Gerät hat mehrere Fluoreszenzkanäle, mit denen Signale unterschiedlicher Wellenlänge in verschiedenen Kanälen gemessen werden können (530 nm in Kanal 1; 640 nm in Kanal 2; 710 nm in Kanal 3).

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die Schmelztemperatur (T_m) eines amplifizierten DNA-Fragments und einer daran hybridisierten Sonde ermittelt. Darunter versteht man diejenige Temperatur, bei der 50 % der Sonden an ihrer Zielsequenz hybridisiert und 50 % von dieser dissoziiert vorliegen. Der T_m -Wert ist abhängig vom GC-Gehalt der Sequenz, deren Länge sowie vom Grad der Homologie. Je komplementärer die Sonde zum DNA-Strang ist, desto mehr Wärmeenergie ist notwendig, um diese abzulösen. Ist der Grad der Homologie vermindert, und sei es durch eine einzige Basenveränderung innerhalb der Sequenz, sinkt die Schmelztemperatur im Umkehrschluss ab.

Bei den angesprochenen Hybridisierungssonden handelt es sich um sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide. Zur Detektion einer bekannten Punktmutation benötigt man ein Paar dieser markierten Sonden. Ein Oligonukleotid (*Sensor*) ist am 3'-Ende mit Fluorescein (FL) markiert. Es ist so generiert, dass es an die fraglich mutationstragende Sequenz hybridisiert. Die zweite Sonde (*Anchor*) ist am 5'-Ende mit einem LC-spezifischen Farbstoff (LC640 oder LC705) markiert; sie bindet in unmittelbarer Nachbarschaft des *Sensors* an den DNA-Einzelstrang. Die detektierbare Lichtemission wird durch einen sog. *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) verursacht, der in Abbildung 2.1 erläutert wird. Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden sind in Tabelle 8.12 im Anhang aufgeführt.

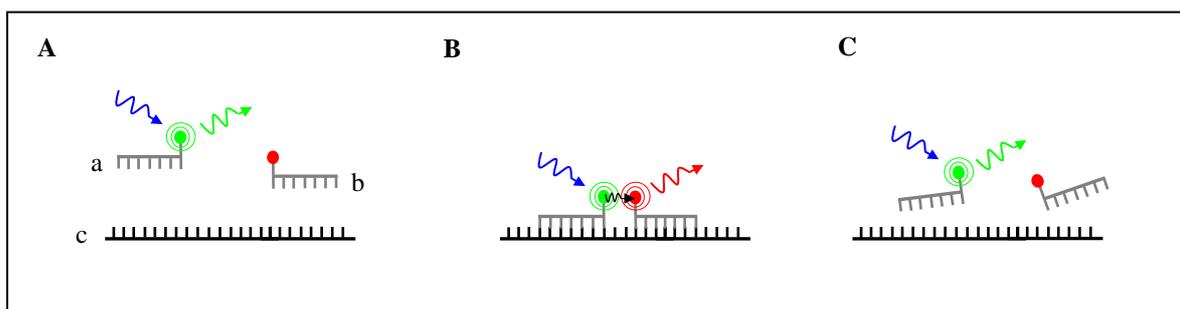


Abb. 2.1: Prinzip des *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET): (A) Die Lichtquelle des *LightCyclers* (470nm, blau) regt das am *Sensor* (a) gebundene Fluorescein zur Emission von grünem Licht (530 nm) an. Der *Sensor* und der *Anchor* (b) hybridisieren im Zuge des *Annealings* (B) nebeneinander an die Zielsequenz (c), so dass das vom *Sensor* emittierte Licht den LC-Farbstoff des *Anchor*s zu Emission von rotem Licht (640 nm) anregt. Dieses kann vom *LightCycler* in Kanal 2 detektiert werden. Durch weiteres Erwärmen der Probe (C) dissoziieren die Sonden von der Zielsequenz ab und sind damit wieder zu weit voneinander entfernt, als dass eine Anregung des *Anchor*s stattfinden könnte. Folglich sinkt das detektierte Fluoreszenzsignal ab. Legende: a, *Sensor*; b, *Anchor*; c, Zielsequenz.

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird im Anschluss an eine PCR das Produkt denaturiert und zügig abgekühlt. Die Sonden binden an die Einzelstränge und der Reaktionsansatz wird kontinuierlich erwärmt. Sobald sich während der Temperaturerhöhung die *Sensor*-Sonde im Falle der erwähnten Punktmutation früher von der DNA löst als die *Anchor*-Sonde, wird der zweite Farbstoff nicht mehr angeregt, und das Signal nimmt ab.

Im LC wurden drei SNPs im *MDRI*-Gens untersucht. Der Reaktionsansatz für die Duplex-PCR des Exon 21 lautete wie folgt (modifiziert nach Arjomand-Nahad *et al.*, 2004):

Substanz	Konzentration	Volumen	Konzentration im Ansatz
dH ₂ O		ad 10,00 µl	
Primer Ex 21 (F+R)	20 µM	1,0 µl	2 µM
Sonde FL Ex 21	4 µM	0,5 µl	0,2 µM
Sonde LC640 Ex 21	4 µM	0,5 µl	0,2 µM
Primer Glob (F+R)	5 µM	1,0 µl	0,5 µM
Sonde FL Glob	4 µM	0,5 µl	0,2 µM
Sonde LC705 Glob	4 µM	0,5 µl	0,2 µM
Hybrid-Mix (Kit*)	10x	1,0 µl	0,5 x
DNA	~ 5 ng/µl	2,0 µl	~ 1 ng/µl

**LightCycler FastStart DNA Master Plus Hybridization Probes*, enthält 1 mM MgCl₂; Ex, Exon; Glob, β-Globulin

Das *Beta-Globin* wurde dabei als interne PCR-Kontrolle mitgeführt. Der in Glaskapillaren pipettierte Ansatz wurde in das Probenkarussell gesetzt und folgende PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse durchgeführt:

	Temperatur	Dauer	Temp.-änderung	
45 x	94° C	10 min	20° C/ s	initiale Denaturierung
	94° C	5 s	20° C/ s	Denaturierung
	58° C	10 s	20° C/ s	<i>Annealing</i>
	72° C	15 s	20° C/ s	Extension
	94° C	20 s	20° C/ s	terminale Denaturierung
	32° C	20 s	20° C/ s	Hybridisierung der Sonden
	32° C → 70° C	0 s	0,1° C/ s	Schmelzkurve
	32° C			als Endtemperatur

Für das Exon 26 fand die PCR unter den in 2.3.2.1 genannten Standardbedingungen in einem gewöhnlichen *Thermocycler* statt. Anschließend wurden 4 µl des PCR-Produkts zusammen mit je 0,5 µl 4 mM Sonde (je FL und LC pro SNP) auf 10 µl mit dH₂O

aufgefüllt und in eine Glaskapillare überführt. Im LC wurde folgendes Programm durchgeführt:

94° C 10 s bei 20° C/ s // 6 Zyklen: 32° C 15 s bei 20° C/ s; 94° C 10 s bei 20° C/ s // 40° C 20 s bei 20° C/s // 40° C → 90° C 0 s bei 0,05° C/ s // 40° C als Endtemperatur.

Die Schmelzkurven wurden abschließend mit der *LightCycler*-Software ausgewertet.

2.3.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, bei dem Moleküle nach bestimmten Eigenschaften, wie etwa der Molekülgröße, aufgetrennt werden können. Verschiedene Substanzen können dabei als Matrix dienen. Im Falle einer Größenauftrennung durchwandern kürzere DNA-Fragmente die Matrix dabei schneller als längere Fragmente.

2.3.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wurde als Standardmethode zur Überprüfung von DNA-Fragmentgrößen im Anschluss an eine PCR angewendet. Die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten nach ihrer Größe im elektrischen Feld ist aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrates möglich. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit nimmt aufgrund der Netzstruktur logarithmisch mit steigender Basenzahl des Gels ab.

Über den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht (365 nm) als rot-orange Bande sichtbar gemacht und mit einer Videokamera mit angeschlossenem Bildverarbeitungssystem (BioDocAnalyze, Biometra) fotografisch dokumentiert werden.

Durchführung:

- Suspendieren von 4 g Agarose in 400 ml 1x TBE
- Aufkochen der Gelsuspension in der Mikrowelle
- Zugabe von 7,5 µl Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml)
- Gießen des Gels in eine vorbereitete Kammer mit ein oder zwei Kämmen

- Versetzen der Proben mit 1/3 Vol. Formamid-Farbstoff
- Pipettieren der Proben und Molekulargewichtsstandard (100 bp-Leiter) in die Ladetaschen
- Elektrophorese bei 120 V für 30 - 60 min in 1x TBE als Laufpuffer

2.3.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Methode der vertikalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde im Rahmen der Genotypisierung, der MLPA-Analyse und der Sequenzierung angewandt. Der im Ansatz des jeweiligen Gels (vgl. 2.2.3) enthaltene Harnstoff verhindert dabei, dass die DNA-Fragmente nach durchgeführter Denaturierung erneut eine Sekundärstruktur entwickeln. Die Auftrennung der DNA-Einzelstränge erfolgt ausschließlich nach ihrer Größe. Das Auflösungsvermögen der PAGE ist dem der Agarose-Gelelektrophorese überlegen: Bei entsprechender Laufdauer werden Größenunterschiede von 1 bp gut dargestellt. Die Detektion der im Gel befindlichen fluoreszenzmarkierten DNA-Moleküle erfolgt über einen Laser. Dazu wurde das Plattensequenziergerät (LI-COR Long Read IR2-DNA-Sequenzierer) verwendet, das mit Hilfe von zwei Infrarotlasern bei 700 nm und 800 nm simultan Informationen aufnehmen kann. Somit war es möglich, zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte gleichzeitig aufzutrennen und zu detektieren.

Durchführung - denaturierende PAGE:

- Gießen eines Gels (vgl. 2.2.3)
 - für Genotypisierung 25 cm x 22,5 cm x 0,4 mm
 - für MLPA 25 cm x 22,5 cm x 0,2 mm
 - für Sequenzierung 25 cm x 41 cm x 0,2 mm
- Nach erfolgter Polymerisierung Einspannen in ein LI-COR Sequenziergerät
- Rechner für den Gellauf vorbereiten (Fokussierung des Lasers und Hell-Dunkel-Abgleich)
- Vorlauf mind. 20 min
- Mischen der Proben mit Formamid-Farbstoff
 - bei Genotypisierung 2 Vol.
 - bei MLPA 5 Vol.
 - bei Sequenzierung 4 µl Farbstoff aus Kit (vgl. 2.3.7.2)

- Denaturieren der Proben bei 95° C für 3 min, dann sofort abkühlen auf 4° C
- Laden
 - bei Genotypisierung 0,7 - 1,5 µl
 - bei MLPA 0,7 µl
 - bei Sequenzierung 1 µl
- Elektrophorese in 1x TBE als Laufpuffer
 - bei Genotypisierung für ca. 3 h bei 45° C, 25 W und 40 mA
 - bei MLPA für ca. 3 h bei 45° C, 25 W und 40 mA
 - bei Sequenzierung für ca. 6 h bei 50° C, 31,5 W und 35 mA

2.3.5 Genotypisierung und Haplotypisierung

Die Herkunft von Chromosomenabschnitten innerhalb (z. B. bei Kopplungsanalysen) und außerhalb (z. B. bei Gründermutationen) von Familien kann durch Genotypisierung und anschließende Haplotypisierung verfolgt werden. Dazu werden häufig STR-Marker benutzt (vgl. Abschnitt 1.2.3 und 8.1.1). Mit Hilfe der PCR können die STR-Marker amplifiziert und auf einem PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden, wie dies in Abbildung 2.2 schematisch für einen fiktiven Marker gezeigt ist.

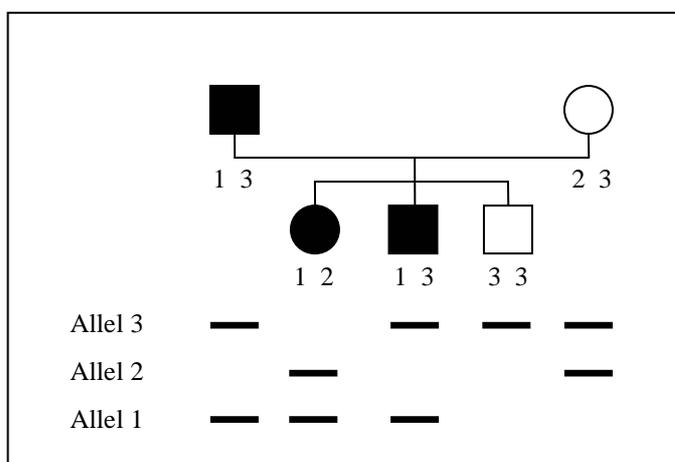


Abb. 2.2: Prinzip der Genotypisierung: Die Querbalken stellen die Allele eines STR-Markers nach gelelektrophoretischer Auftrennung in Laufrichtung von oben nach unten dar. Es existieren drei Allele unterschiedlicher Länge ($1 < 2 < 3$). Die Genotypen sind unter den Symbolen der Familienangehörigen angegeben, wobei das väterliche Allel links, das mütterliche rechts steht. Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Personen. Schwarze Symbole kennzeichnen Erkrankte, weiße Gesunde. Im vorliegenden Beispiel tragen alle Erkrankten das Allel 1.

Ein Haplotyp ergibt sich, wenn die Genotypen benachbarter Marker eines einzelnen elterlichen Chromosoms „in Phase gebracht“ werden, d. h. entsprechend ihrer genetischen Kartierung und elterlichen Herkunft platziert werden (Haplotypisierung). Ist die Anordnung der Haplotypen erfolgt, lässt sich die Vererbung und ggf. Rekombination des betrachteten Chromosomenabschnittes von einer Generation auf die nächste genau verfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Genotypisierung und Haplotypisierung der *PARK1* bis *PARK8*-Regionen für die Familien M, K und P vorgenommen. Dafür wurden je vier bis sechs Marker gewählt, die das Gen bzw. den Genort flankieren oder aber in selbigem liegen. Die hierzu verwendeten STR-Marker sind im Anhang (Tab. 8.13) aufgelistet. Des Weiteren wurde der Genort *SCA5* der Familie R durch sechs STR-Marker auf gleiche Weise charakterisiert (Tab. 8.13). Zudem wurde das gesamte Genom der Familie R einer Genotypisierung und anschließenden *Multipoint*-Kopplungsanalyse unterzogen (siehe Abschnitt 2.3.6). Die Genotypisierung der Familie R erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau S. Winkler und Herrn Dr. N. Brüggemann.

Die Amplifikation der STR-Marker erfolgte unter den in Abschnitt 2.3.2.2 genannten PCR-Bedingungen. Anschließend fand eine PAGE statt, wie in Abschnitt 2.3.4.2 erläutert. Um die korrekte Größe der jeweiligen Allele bestimmen zu können, wurden zwei Kontrollindividuen 1331.1 und 1331.2 des *Centre d'Etude du Polymorphisme Humaine* (CEPH) in die Genotypisierung der einzelnen Marker miteinbezogen. Angaben zur Länge ihrer Allele sind im Internet einsehbar (<http://research.marshfieldclinic.org>). Die Genotypen konnten direkt am LI-COR ausgewertet werden. Die Haplotypen der Familie M, K und P wurden per Hand unter Annahme der geringsten Rekombination in Phase gebracht und in einen Stammbaum eingetragen, wozu das Computerprogramm Cyrillic 2.1 genutzt wurde. Für Familie P wurde die wahrscheinlichste Allelverteilung für die Haplotypisierung mit Hilfe des Computerprogramms Allegro2.0 ermittelt.

2.3.6 *Multipoint*-Kopplungsanalyse

Das Prinzip der *Multipoint*-Analyse wurde andernorts bereits beschrieben (Abschnitte 1.2.3 und 8.1.1). Zur Beschreibung des klinischen Status der Mitglieder der Familie R wurden drei Einteilungen verwendet: gesund, betroffen und unbekannt. Die eingeheirateten

Individuen wurden als gesund eingestuft, da es sich um eine seltene Krankheit handelt und somit die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, dass diese Individuen an der gleichen Krankheit leiden. Die übrigen nicht betroffenen Familienmitglieder wurden hingegen aufgrund des Phänomens der reduzierten Penetranz und einem möglichen altersabhängigen Beginn der Krankheit als unbekannt für den klinischen Status eingestuft.

Die statistische Auswertung wurde mittels einer klassischen parametrischen *Multipoint*-Analyse für 26 Individuen vorgenommen. Die Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm Allegro 2.0 durchgeführt (Gudbjartsson *et al.*, 2005). Allegro 2.0 rechnet für die *Multipoint*-Analysen bei einer Rekombinationshäufigkeit von $\theta = 0$. Als genetisches Modell diente der in Abb. 8.1a dargestellte Stammbaum. Die Parameter bezüglich Erbgang, *disease allele frequency* und Penetranz sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tab. 2.5: Parameter für die Kopplungsanalyse in Familie R

Parameter	Familie R
Erbgang	Autosomal-dominant
<i>Disease allele frequency</i>	0,001
Penetranz (wt/wt); (wt/mut); (mut/mut) mut, mutiert; wt, Wildtyp	0,01; 0,90; 0,90

Die im Rahmen der *Multipoint*-Kopplungsanalyse verwendeten STR-Marker werden in Tabelle 8.14 im Anhang genannt. Die *Multipoint*-Kopplungsanalyse erfolgte mit Unterstützung von Herrn P. Seibler.

2.3.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgt nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens (Sanger, 1977). Diese enzymatische Methode beruht auf dem Einbau von 2',3'-Didesoxynukleotiden während der PCR. Didesoxynukleotide besitzen auch am C3-Atom keine Hydroxylgruppe, sondern nur ein Wasserstoffatom. Wird ein solches Molekül von der Polymerase in die entstehende Polynukleotidkette eingebaut, bricht die Kettenverlängerung ab, da keine freie OH-Gruppe mehr für die Veresterung mit der Phosphatgruppe des nachfolgenden Nukleotids vorhanden ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Sequenzen zum Einen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten *Primern* ermittelt (vgl. 2.3.7.2), zum Anderen mit Hilfe

fluoreszenzmarkierter Nukleotide (vgl. 2.3.7.3.). In beiden Fällen wurde zunächst eine PCR zur Amplifikation der Zielsequenz durchgeführt, wie unter 2.3.2.2. angegeben. Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel auf seine Größe kontrolliert (vgl. 2.3.4.1) und anschließend aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.3.7.1), bevor das Prinzip des Kettenabbruchs in einer weiteren PCR zur Anwendung kam.

Einen Überblick, welche der Gene, die ein familiäres Parkinsonsyndrom verursachen, in den Familien M, K und P im Rahmen dieser Arbeit sequenziert wurden, ist zusammen mit den jeweiligen Ergebnissen in Tabelle 3.3 dargestellt.

2.3.7.1 Säulenaufreinigung

Um ein qualitativ besseres Ergebnis bei der Sequenzierung zu erreichen, wurde das amplifizierte DNA-Fragment aufgereinigt und so von überschüssigen PCR-*Primern*, Nukleotiden und unspezifischen PCR-Produkten befreit. Dazu wurde ein vorgefertigtes System (QIAquick PCR *Purificationkit*) der Firma Qiagen verwendet: Das PCR-Produkt wird zunächst mit Bindepuffer auf eine Säulenmatrix gegeben und andere Bestandteile der PCR in einem Waschschrift abzentrifugiert. Anschließend können die DNA-Fragmente eluiert werden.

2.3.7.2 Sequenzierung mittels eines markierten *Primers* am LI-COR-System

Für die Sequenzier-Reaktion wurde ein vorgefertigtes System (*Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit*) der Firma Amersham Biosciences verwendet. Pro Sequenz wurden vier verschiedene Reaktionen (entsprechend der vier möglichen Nukleotide) durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt ein Gemisch aus Desoxynukleotiden (dNTPs) und jeweils einem Didesoxynukleotid (ddNTPs). Zunächst wurde die doppelsträngige DNA denaturiert, danach konnte der fluoreszenzmarkierte M13-*Primer* an den sequenzspezifischen, um die M13-Sequenz verlängerten *Primer* binden (vgl. 2.3.2.2). Durch die Aktivität der DNA-Polymerase wurde der Einzelstrang entsprechend der Matrize synthetisiert, bis zufällig ein komplementäres ddNTP anstatt des dNTPs eingebaut wurde und damit einen Kettenabbruch verursacht wurde. Somit erhielt man je Reaktionsansatz ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten. Die Ansätze wurden anschließend nebeneinander auf einem denaturierenden PAA-Gel

elektrophoretisch aufgetrennt. Das Verfahren wird auch als ein *single-label four-lane approach* bezeichnet.

Da die Amplifikate des *Sense*-Stranges eine andere Fluoreszenzmarkierung trugen als die Amplifikate des *Nonsense*-Stranges, war eine gleichzeitige Sequenzierung in beide Synthesrichtungen mit dem LI-COR möglich.

Durchführung – Sequenzierreaktion:

- Ansatz Mastermix:

aufgereinigtes PCR-Produkt	2 - 10 µl
M13F-Primer, IRD700-markiert, 2 µM	1,5 µl
M13R-Primer, IRD800-markiert, 2 µM	1,5 µl
dH ₂ O	ad 17,0 µl

- Verteilen von je 3,9 µl Mastermix auf 4 Reaktionsgefäße
- Zugabe von je 2 µl A-, T-, G-, C-Reagenz (aus *Kit*)
- Amplifikation mit Kettenabbruch unter folgenden Bedingungen:
94° C 2 min // 30 Zyklen mit 94° C 30 s; 58° C 30 s; 72° C 30 s // 72° C 10 min // 4° C als Endtemperatur
- Zugabe von je 4 µl Ladepuffer (aus *Kit*)

Die denaturierende PAGE wurde wie in Abschnitt 2.3.4.2 beschrieben durchgeführt, wobei die Produkte der Sequenzierreaktion in der Reihenfolge A-T-G-C auf das Gel aufgetragen wurden. Eine Auswertung der Gele erfolgte direkt am Bildschirm durch den Vergleich mit publizierten Sequenzen, welche in der Datenbank *Entrez Nucleotide* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) vermerkt sind (*Accession numbers*: SNCA NM_007308; *Parkin* NM_13988; *PINK1* NM_032409; *DJ-1* NM_007262; *LRRK2* AY792511).

2.3.7.3 Sequenzierung mittels markierter Didesoxynucleotide am ABI-System

Die Sequenzierung mittels markierter Didesoxynucleotide (ddNTP) erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG. Im Unterschied zum oben erwähnten Sequenzierverfahren ist hier nicht der *Primer* markiert, sondern die vier ddNTPs mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. In der Sequenzierreaktion entstehen Produkte verschiedener

Länge, die je nach terminalem ddNTP eine spezifische Markierung tragen. Sie können auf einer gemeinsamen Gelspur elektrophoretisch aufgetrennt werden, wobei ein Lasersystem, welches zwischen den vier Fluoreszenzfarbstoffen unterscheiden kann, die Produkte detektiert.

Zu den Vorarbeiten gehörte eine PCR (vgl. Abschnitt 2.3.2.2) sowie die Aufreinigung des Produkts wie in 2.3.7.1 beschrieben. Eine geringe Menge des Eluats (1-3 μ l) wurde über Nacht eingetrocknet und anschließend zusammen mit 10 μ l einer 10 mM *Primer*-Verdünnung der Firma MWG Biotech AG postalisch zugestellt. Das Ergebnis der Sequenzierung konnte über das Internet eingesehen werden. Die Auswertung fand unter Verwendung des Computerprogramms Genrunner 3.1 statt. Mit dessen Hilfe wurde die ermittelte Sequenz mit der Referenzsequenz aus der in Abschnitt 2.3.7.2 erwähnten Datenbank verglichen.

2.3.8 *Multiplex ligation-dependent probe amplification*-Analyse (MLPA)

Die *Multiplex-ligation-dependent probe amplification* (MLPA)-Analyse ist eine neue Methode zur Detektion von bekannten *Exon-Rearrangements*, also Multiplikationen und Deletionen, sowie einiger spezifischer Punktmutationen in Genen (Schouten *et al.*, 2002). Es existieren *Kits*, die eine Vielzahl von Sondenpaaren enthalten, mit denen sich diese Mutationen identifizieren lassen, so auch für Gene, die mit einem familiärem Parkinsonsyndrom assoziiert sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 2.6 genannten *Kits* der Firma MRC Holland benutzt.

Tab. 2.6: MLPA-Kits und Inhalt

Gen	Kit SALSA P051	Kit SALSA P052
	Sondenpaar für Exon	
<i>SNCA</i>	1,2,3,4,5,6 + p.Ala30Pro*	2
<i>Parkin</i>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 + Intron 1
<i>UCHL1</i>	-	1,4,5,9
<i>PINK1</i>	1,2,3,4,5,6,7,8	-
<i>DJ-1</i>	1,3,5,6,7	-
<i>LRRK2</i>	p.Gly2019Ser*	1,10,15,27,41,49 + p.Gly2019Ser*
<i>GCH1</i>	-	1,2,3,5,6

*spezifisch für diese Missense-Mutation

Beide Sonden eines Paares bestehen aus einem Oligonukleotid-Abschnitt, der komplementär an Sequenzabschnitte der aufgeführten Exons der entsprechenden Gene bindet, als auch aus einem nicht-komplementären Teil, der für alle Sonden identisch ist. Dieser fungiert als Bindestelle für einen *Primer* im Rahmen einer PCR. Eine der Sonden besteht zusätzlich aus einer zwischen diesen beiden Anteilen eingefügten *stuffer sequence*, die eine für das Sondenpaar charakteristische PCR-Produktlänge (130 - 480 bp) sicherstellt (siehe Abbildung 2.3). Nach Denaturierung der DNA können die Sondenpaare während einer Inkubationsphase von 16 h bei 60° C in unmittelbarer Nachbarschaft an ihre *Target*-Sequenz hybridisieren. Im zweiten Schritt verbindet eine zum Ansatz hinzugegebene Ligase die Sonden zu einem zusammenhängenden DNA-Fragment. Bei der anschließend durchgeführten PCR werden nun die ligierten Sonden amplifiziert, wobei der verwendete *Primer* eine Fluoreszenzmarkierung (IRD 800) trägt. Die entstandenen Produkte spezifischer Größe können anschließend aufgetrennt werden; hier erfolgte dies auf einem denaturierenden PAA-Gel unter Verwendung des LI-COR Sequenziergerätes, welches das Fluorophor detektiert.

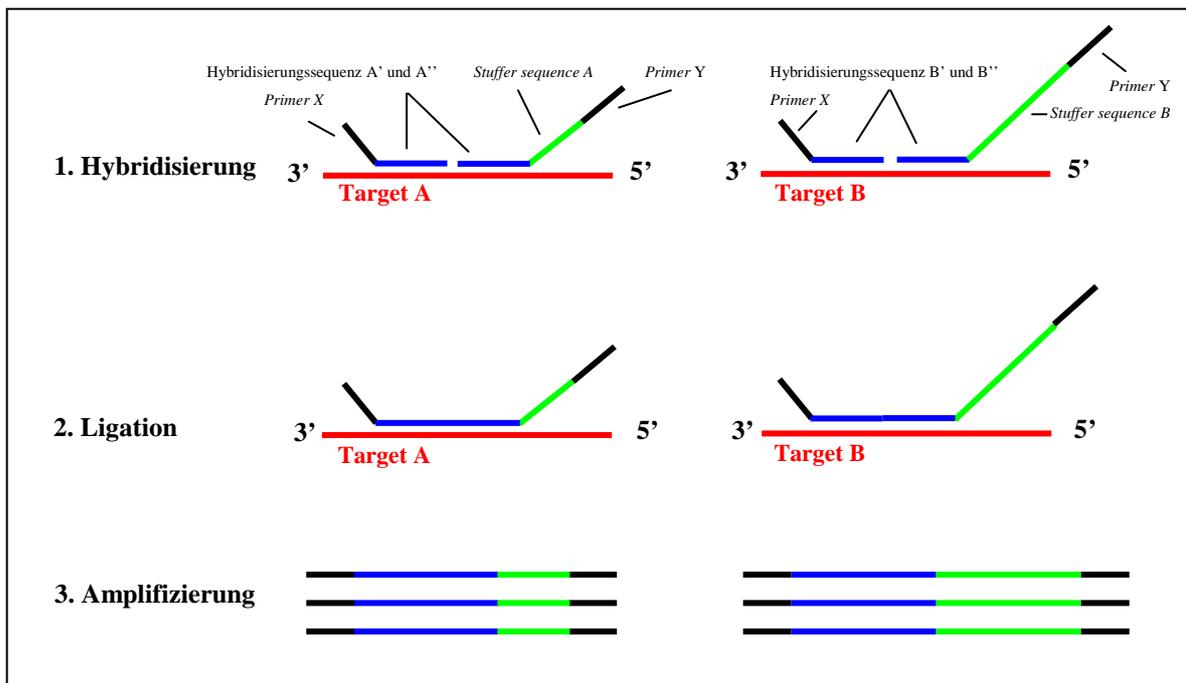


Abb. 2.3: Das Prinzip der MLPA-Analyse. Für jedes Ziel wird ein Paar von Sonden benötigt, die alle die gleichen *Primer*-Sequenzen (hier X und Y) besitzen. Die Hybridisierungssequenzen sind spezifisch für das jeweilige *Target* und die *stuffer sequence* ist für jedes Sondenpaar unterschiedlich lang. Im ersten Schritt hybridisieren die Sondenpaare mit der Hybridisierungssequenz an ihr *Target*. Die Ligation durch eine temperaturstabile Ligase findet im zweiten Schritt statt. Anschließend ist im dritten Schritt eine Amplifizierung der Produkte möglich. Können aufgrund einer Mutation oder des Fehlens der Zielsequenz eine oder beide Sonden nicht binden, findet keine Ligation und damit auch keine Amplifikation statt. Die Menge an gebundenen Sonden kann nach der Amplifikation quantitativ bestimmt werden (nach Schouten *et al.*, 2002).

Durchführung MLPA:

- Denaturierung von 5 μ l DNA-Probe für 5 min / 98° C
- Abkühlen auf 25° C für 3 min, anschließend Zugabe von 3 μ l Mix 1, bestehend aus:

SALSA probe-mix	1,5 μ l
MLPA buffer	1,5 μ l
- Inkubation für 1 min bei 95° C, danach für 16 h bei 60° C
- Nach Abkühlen auf 54° C Zugabe von 32 μ l Mix 2, bestehend aus:

Ligase buffer A	3 μ l
Ligase buffer B	3 μ l
dH ₂ O	25 μ l
Ligase-65	1 μ l

- Ligation für 15 min bei 54° C, dann für 5 min bei 98° C
- Nach Abkühlen auf 4° C Zugabe von 10 µl des Produktes in Mix 3, bestehend aus:

10x SALSA <i>PCR buffer</i>	4 µl
dH ₂ O	26 µl
- Während einer Temperatur von 60° C Zugabe von 10 µl Mix 4, bestehend aus:

SALSA <i>primers</i>	2 µl
SALSA <i>enzyme buffer</i>	2 µl
SALSA <i>polymerase</i>	0,5 µl
dH ₂ O	5,5 µl
- PCR-Reaktion: 95° C 5 min // 33 Zyklen mit 95° C 30 s; 60° C 30 s; 72° C 1 min // 72° C 20 min // 4° C Endtemperatur

Die Durchführung der PAGE erfolgte wie unter 2.3.4.2 angegeben.

Das für jede analysierte Probe entstandene Bandenmuster wurde mit Hilfe des Computerprogramms TotalLab TL100 v2006 ausgewertet. Um die Intensitäten untereinander vergleichbar zu machen, mussten die Daten normalisiert werden. Zwei DNA-Proben dienten als interne Kontrollen, wobei die anderen Proben zu ihnen ins Verhältnis gesetzt wurden. Die Auswahl der Kontrollen erfolgte durch optisches Betrachten des Gels; es wurden Proben verwendet, bei denen alle Banden vorhanden waren und für die nur ein möglichst kleiner Anteil an *Primer*-Dimeren auf dem Gel zu sehen war. Anschließend war durch einen Vergleich der Intensitäten eine relative Quantifizierung der DNA-Menge möglich. Für eine normale Gendosis wurde ein Verhältnis [Intensität Probe/Intensität Kontrolle] von 0,8 - 1,2 erwartet. Eine heterozygote Exon-Deletion hätte einen Wert im Intervall 0,3 - 0,7 und eine heterozygote Exon-Duplikation läge im Intervall 1,3 - 1,7. Die MLPA-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. A. Djamarti durchgeführt.

2.3.9 Statistische Beurteilung der Assoziationsstudien

Im Rahmen der durchgeführten Assoziationsstudien wurde die Verteilung der Genotypen für drei SNPs im *MDRI*-Gen (c.2677G/T/A, c.3320A/C und c.3435C/T) ermittelt. Dabei

wurde für alle Tests das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ festgelegt. Eine Adjustierung des Alpha-Fehlers fand nicht statt, insofern verstehen sich alle inferenzstatistischen Auswertungen letztlich deskriptiv.

Bei allen ermittelten Genotypenfrequenzen wurde zunächst überprüft, ob sie nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verteilt waren. War dies nicht der Fall, so wurde die Genotypisierung für die entsprechende Gruppe wiederholt. Für den Polymorphismus c.2677G/T/A wurde der Chi² (χ^2)-Test für unabhängige Variablen angewendet. Dabei wurden die ermittelten Genotypenhäufigkeiten mit den erwarteten Genotypenhäufigkeiten getestet, unter der Annahme, dass keine Abhängigkeit des Phänotyps vom Genotyp besteht (Nullhypothese) gegen die Annahme, dass eine Abhängigkeit des Phänotyps vom Genotyp besteht (Alternativhypothese). Die Nullhypothese wird für große χ^2 -Werte verworfen. Entsprechend der vorhandenen Freiheitsgrade, die von der Anzahl der möglichen Genotypen abhängt, kann der p -Wert bestimmt werden. Ein Nachteil des χ^2 -Tests ist, dass er lediglich untersucht, ob ein Unterschied in der Genotypenverteilung zwischen Fällen und Kontrollen besteht, aber nicht, für welche(n) Genotyp(en) dieser vorhanden ist (in: Ziegler und König, 2006).

Eine differenziertere Untersuchung der Genotypenverteilung ermöglicht der Cochran-Armitage-Trend-Test, der für die SNPs c.3320A/C und c.3435C/T verwendet wurde (Armitage, 1955). Dabei werden zunächst *Odds Ratios* bestimmt (heterozygot Mutierte zum Wildtyp und homozygot Mutierte zum Wildtyp) und die Genauigkeit des ermittelten Schätzwertes durch Konfidenzintervalle angegeben (vgl. Abschnitt 8.1.3). Der im Anschluss durchgeführte Test prüft ebenfalls, ob eine Abhängigkeit des Phänotyps vom Genotyp besteht, und zusätzlich, ob dieser Unterschied gerichtet ist (Richtung Wildtyp oder Richtung homozygot mutiert). Auch für diesen Test existiert eine Teststatistik, üblicherweise wird aber nur der p -Wert angegeben. Der Cochran-Armitage-Trend-Test konnte für c.2677G/T/A nicht angewendet werden, da bei diesem SNP mehr als drei Genotypenkonstellationen möglich sind. Die statistischen Auswertungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. I. König des Instituts für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität Lübeck angefertigt.

3. ERGEBNISSE

In diesem Kapitel der Arbeit werden zunächst die Resultate der Untersuchungen zur Ursache der spinocerebellären Ataxie bei Familie R dargestellt (Abschnitt 3.1). Es wurde die Haplotypisierung an einem ausgewählten Genort sowie eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Der darauffolgende Abschnitt 3.2 erläutert die gewonnenen Ergebnisse der drei Familien mit familiärem Parkinsonsyndrom, Familie M, K und P, bei denen die Feinkartierung einiger Genorte unternommen wurde mit anschließender Mutationssuche und Analysen zu Gendosis-Veränderungen. Die Ergebnisse der Assoziationsstudien zum *MDRI*-Gen werden im letzten Abschnitt 3.3 des Kapitels thematisiert.

3.1 Haplotypisierung und genomweite Kopplungsanalyse bei einer SCA-Familie

3.1.1 Haplotypisierung des Genorts *SCA5*

Unter Verwendung des genetischen Materials von 20 Mitgliedern der vornehmlich von spinocerebellärer Ataxie betroffenen Familie R, wurde eine Genotypisierung und anschließende Haplotypisierung des Genorts *SCA5* vorgenommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1 dargestellt und zeigt, dass nur wenige Betroffene (L-1693, L-1671 und L-1679) einen gemeinsamen Haplotypen teilen, während die restlichen Betroffenen (L-1689, L-1678, L-1680 und L-1692) andere Markerallele besitzen. Um als krankheitsverursachender Locus in Betracht zu kommen, müssten alle Betroffenen mindestens einen Haplotyp teilen. Da dies nicht der Fall ist, kann eine pathogene Mutation in *SCA5* ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Vorarbeiten und das oben erwähnte Ergebnis schließen die *SCA*-Loci 1, 2, 3, 5, 6, 7,8, 10, 12 und 17 als genetische Ursache sowie eine Mutation im *Dynactin*-Gen für die in der Familie R auftretende Krankheit aus (vgl. Abschnitt 1.4). Die Konsequenz daraus war die umfassendere Suche nach der beteiligten genetischen Region in Form einer genomweiten Kopplungsanalyse (s. Abschnitt 3.1.2).

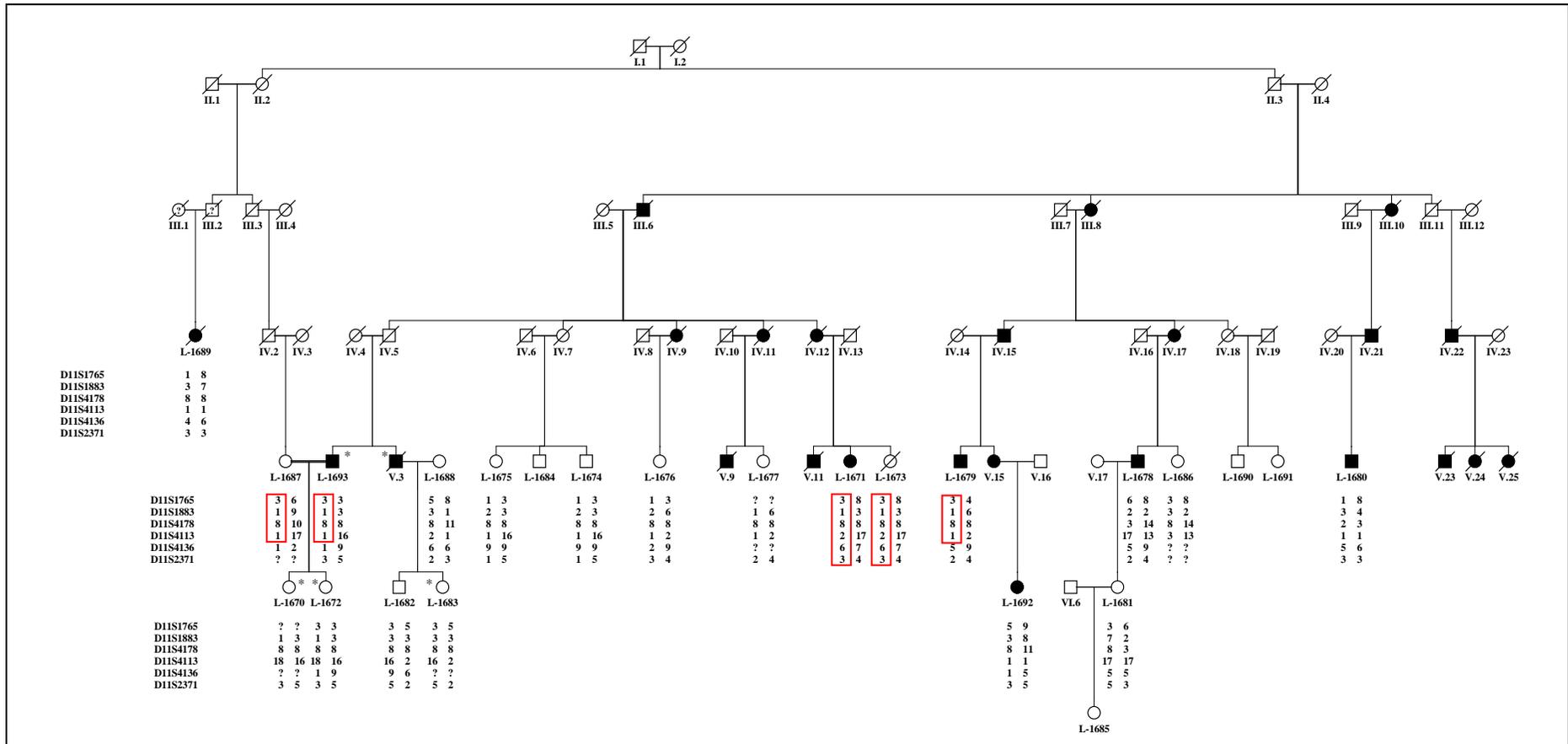


Abb. 3.1: Die Abbildung zeigt die ermittelten Haplotypen des Genorts SCA5 auf Chromosom 11 der Familie R. Für die Betroffenen L-1693, L-1671 und L-1679 konnte ein in Teilen gemeinsamer Haplotyp (rot) gefunden werden, wie auch bei den nicht betroffenen Individuen L-1687 und L-1673. Bei den weiteren Erkrankten fehlt er, weshalb der Genort als ursächlich für die Erkrankung ausgeschlossen werden kann. Legende: Kreis, weiblich; Quadrat, männlich; schwarz, erkrankt; weiß, gesund; durchgestrichen, verstorben; „?“ im Symbol, klinischer Status nicht eindeutig; **Dynactin*-Mutation nachgewiesen; ?, keine Genotypisierung möglich; Doppelstrich, Blutsverwandschaft zwischen Eheleuten.

3.1.2 Genomweite Kopplungsanalyse

Die genomweite Kopplungsanalyse der Familie R wurde mit dem Ziel durchgeführt, Regionen im Genom einzugrenzen, in denen sich mit höherer Wahrscheinlichkeit eine Genmutation befinden könnte, die die Symptome der Betroffenen verursacht (vgl. Abschnitt 2.1.1).

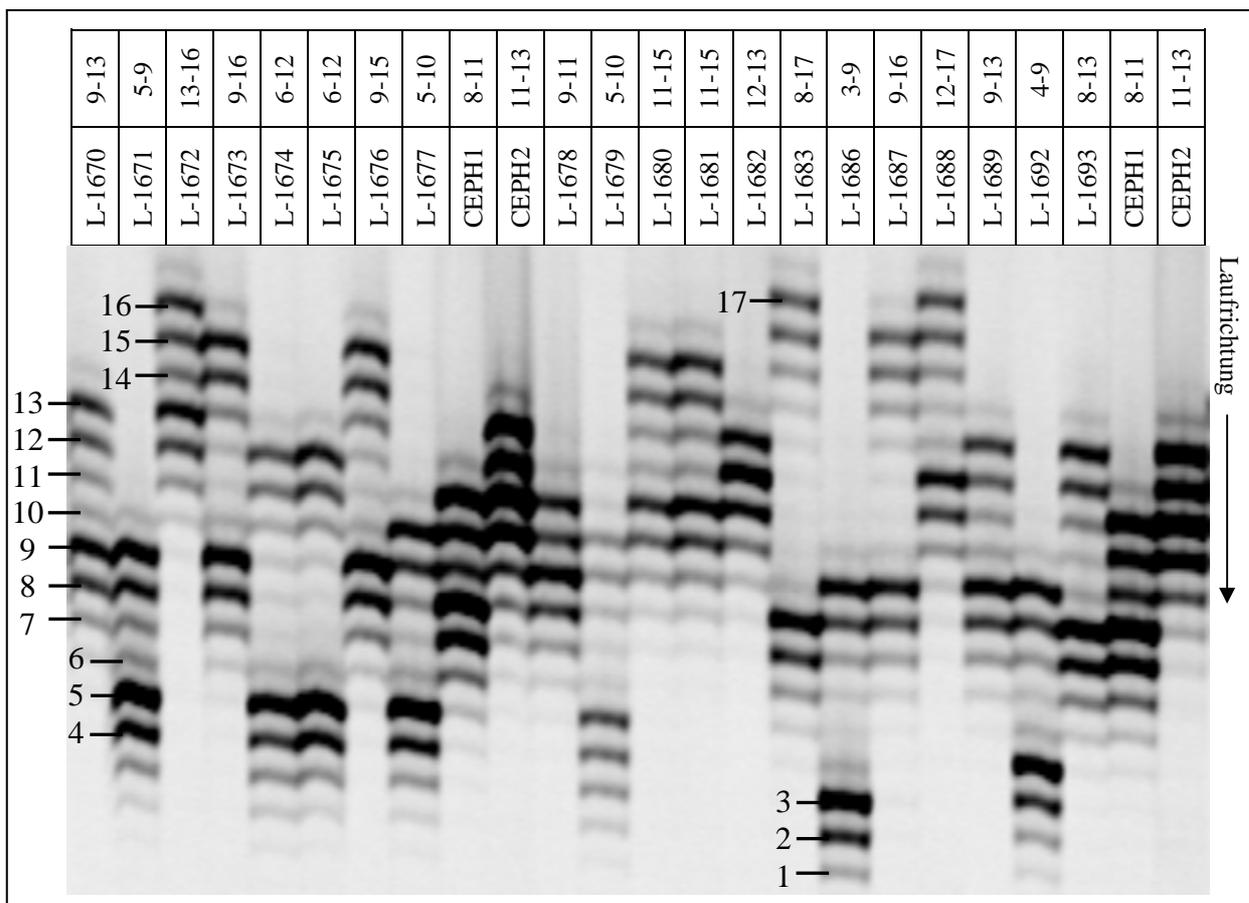


Abb. 3.2: Dargestellt ist das Abbild eines denaturierenden Polyacrylamidgels, das mit dem amplifizierten Marker D12S77 der Familie R beladen worden ist. Alle Individuen haben einen heterozygoten Genotyp, da je zwei kräftige Banden sichtbar sind; bei Homozygoten wäre nur eine zu sehen. Zusätzlich sind „Stotterbanden“ vorhanden, das sind Artefakte der PCR, die in der Regel die Größe der nächst kürzeren Allele besitzen und schwächer sind als die echte Bande. Die Banden wurden nach ihrer Größe nummeriert (1 - 17); kleinere DNA-Fragmente laufen schneller durch das Gel und sind daher weiter unten zu finden. In der Tabelle über dem Gel sind die untersuchten Mitglieder von Familie R aufgeführt, zusammen mit dem Genotyp für den Marker. In der Mitte und am Ende sind zwei mit CEPH1 und CEPH2 beschriftete Kontrollproben geladen. Laut Datenbank haben ihre Allele für diesen Marker eine Größe von CEPH1: 175/181 bp und CEPH2: 181/185 bp (<http://research.marshfieldclinic.org>).

Dazu wurden von 20 Individuen der Familie R je 375 STR-Marker mittels PCR amplifiziert und die fluoreszenzmarkierten Produkte auf einem Polyacrylamidgel ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch ein Gel, das mit dem Marker D12S77 der untersuchten Personen beladen ist. Für jedes Individuum ergibt sich ein Bandenmuster und aus dem relativen Längenvergleich untereinander und zu den anderen Proben der Genotyp, der als Zahlenpaar angegeben ist. Die absolute Länge der Allele lässt sich über den Vergleich mit den Genotypen der Kontrollen CEPH1 und CEPH2 erschließen, für die in einer Datenbank Angaben hinterlegt sind (<http://research.marshfieldclinic.org>). Die STR-Marker wurden so gewählt, dass sie auf der genetischen Karte im Durchschnitt 9,0 cM ($\pm 4,7$ cM) voneinander entfernt waren.

In die *Multipoint*-Kopplungsanalyse wurden sieben Individuen und 19 Ahnen integriert. Letztere sind die Familienmitglieder ohne genetische Information, die eine Verbindung zwischen den untersuchten Personen herstellen. Ihre Berücksichtigung ist für die Durchführung der computergestützten parametrischen *Multipoint*-Kopplungsanalyse notwendig. Die 26 Familienmitglieder sind in Abbildung 3.3 hervorgehoben.

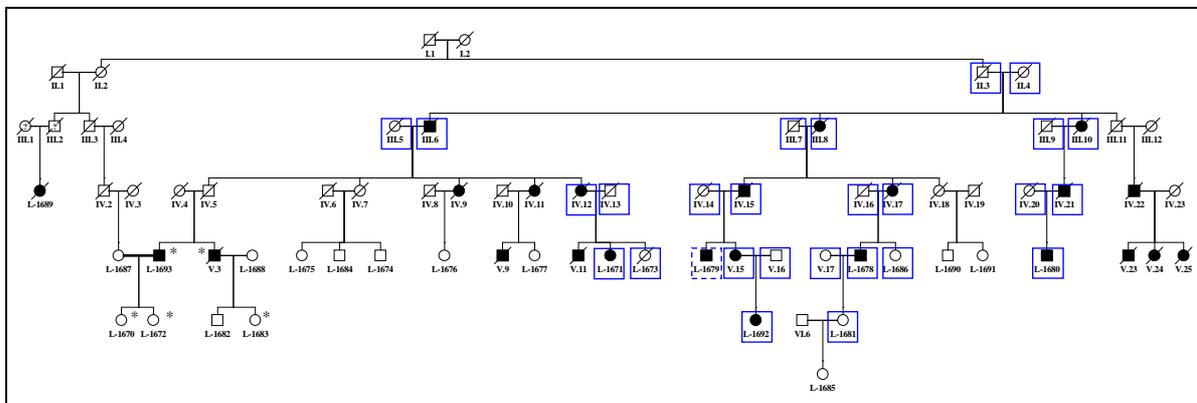


Abb. 3.3: Der Stammbaum der Familie R, aus dem insgesamt sieben Individuen (L-1671, L-1673, L-1678, L-1686, L-1680, L-1692 und L-1681) und 19 Ahnen (Verwandte ohne DNA-Information) in die parametrische *Multipoint*-Kopplungsanalyse miteinbezogen wurden; sie sind in der Abbildung blau umrandet. Das Individuum L-1679 wurde nach Beginn der Berechnungen wieder aus der Kopplungsanalyse ausgeschlossen, da durch Verunreinigungen der DNA hervorgerufene Unsicherheiten bei der Bestimmung der Markerallele die Ergebnisse der *Multipoint*-Kopplungsanalyse verzerrten. Von allen Individuen mit einer L-Nummer war DNA vorhanden. Die übrigen Familienmitglieder wurden entsprechend der Generation (I bis VI) und ihrer Position im Stammbaum (von links nach rechts) bezeichnet. Der Doppelstrich zwischen L-1687 und L-1693 symbolisiert eine Verwandtenehe. Für die mit einem Sternchen gekennzeichneten Individuen wurde bereits eine Mutation beschrieben (Münch *et al.*, 2005; Rosenbohm *et al.*, eingereicht). Legende: Kreis, weiblich; Quadrat, männlich; schwarz, erkrankt; weiß, gesund; durchgestrichen, verstorben.

Wie aus der Abbildung 3.3 hervorgeht, wurden drei Äste der Familie bei der *Multipoint*-Kopplungsanalyse nicht berücksichtigt, was durch die begrenzte Rechenkapazität bedingt ist. Der erste Ast umfasst das Paar I.1 und I.2 sowie deren Nachkommen II.1, II.2, III.1 bis III.4 und L-1689. Es war nicht möglich, die Information von L-1689 zu integrieren, da zu viele Ahnen ($n = 6$) dazwischen lagen. Außerdem ist nicht eindeutig, von welchem Elternteil ihre Erkrankung stammt, weshalb sie zudem nicht informativ ist. Der zweite vernachlässigte Ast wird von den Individuen IV.6 bis IV.11 und deren Nachkommen gebildet, von denen entweder keine Blutprobe vorhanden war oder bei denen es sich um Personen handelt, die wahrscheinlich gesund sind (oder reduzierte Penetranz). Sie liefern keine entscheidenden Informationen und wurden daher vernachlässigt. Der dritte Ast umfasst die Eltern, Ehepartner und Kinder von L-1693 und V.3. Für die beiden letztgenannten Personen sowie L-1670, L-1672 und L-1683 wurde bereits eine kausale Mutation beschrieben (vgl. Abschnitt 2.1.1), ihre genetische Information sollte also nicht in die genomweite Suche miteinbezogen werden. Außerdem wurde das Individuum L-1679 nachträglich aus der Kalkulation wieder ausgeschlossen, da Verunreinigungen der DNA die eindeutige Bestimmung der Genotypen erschwerte. Diese Unsicherheit behinderte den Rechengang; erst unter Ausschluss der Person waren die Berechnungen möglich. Zur genaueren Untersuchung von interessanten Regionen wurden allerdings alle zur Verfügung stehenden Individuen betrachtet (siehe unten).

Weitere Parameter, die zur Durchführung der *Multipoint*-Kopplungsanalyse mit dem Programm Allegro 2.0 benötigt wurden, sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Als „gesund“ wurden lediglich angeheiratete Personen klassifiziert. Alle nicht betroffenen Nachkommen wurden als „unbekannt“ für den klinischen Status eingestuft, da aufgrund des Phänomens der reduzierten Penetranz und einem möglichen altersabhängigen Beginn der Erkrankung der krankheitsassoziierte Haplotyp derjenigen Personen nicht ausgeschlossen werden kann.

Die *Multipoint*-Kopplungsanalyse ermittelte auf sechs Chromosomen (1, 2, 3, 7, 10 und 18) Regionen mit *LOD-Scores* $Z > 2$, davon auf Chromosom 2, 3, und 18 über eine Distanz von drei Markern. Diese sind in Tabelle 3.2 zusammengestellt.

Tab. 3.1: Mitglieder der Familie R, die bei der *Multipoint*-Kopplungsanalyse berücksichtigt wurden und ihre Abstammung innerhalb der Familie.

Individuum	Vater	Mutter	Geschlecht	Gesundheitsstatus
II.3	0	0	1	0
II.4	0	0	2	0
III.5	0	0	2	1
III.6	II.3	II.4	1	2
III.7	0	0	1	1
III.8	II.3	II.4	2	2
III.9	0	0	1	1
III.10	II.3	II.4	2	2
IV.12	III.6	III.5	2	2
IV.13	0	0	1	1
IV.14	0	0	2	1
IV.15	III.7	III.8	1	2
IV.16	0	0	1	1
IV.17	III.7	III.8	2	2
IV.20	0	0	2	1
IV.21	III.9	III.10	1	2
L-1671	IV.13	IV.12	2	2
L-1673	IV.13	IV.12	2	0
V.15	IV.15	IV.14	2	2
V.16	0	0	1	1
V.17	0	0	2	1
L-1678	IV.16	IV.17	1	2
L-1686	IV.16	IV.17	2	0
L-1680	IV.21	IV.20	1	2
L-1692	V.16	V.15	2	2
L-1681	L-1678	V.17	2	0

Spalten „Vater“ und „Mutter“: 0, bei Gründern; Spalte „Geschlecht“: 1, männlich; 2, weiblich; Spalte „Gesundheitsstatus“: 1, gesund; 2, krank; 0 unbekannt

Tab 3.2: Übersicht über die Regionen des Genoms mit den höchsten *Multipoint*-LOD-Scores

Chromosom	Marker	Position [cM]	Mpt-LOD
2	Start	0,00	2,04
2	D2S2393	7,05	2,37
2	D2S2166	10,86	2,32
2	D2S162	20,03	-0,70
3	D3S3726	42,64	-2,28
3	D3S3727	56,07	2,24
3	D3S3521	63,12	2,57
3	D3S1613	72,21	2,65
3	D3S1300	80,32	-0,27
18	D18S453	43,49	-1,47
18	D18S877	54,40	2,62
18	D18S1124	61,17	2,79
18	D18S535	64,48	2,75
18	D18S1127	77,36	0,19

Mpt-LOD, *Multipoint*-LOD-Score; cM, Centimorgan

Eine vollständige Auflistung der ermittelten *Multipoint-LOD-Scores* ist in Tabelle 8.14 im Anhang zu finden unter Angabe der verwendeten STR-Marker, ihrer Position auf der genetischen Karte und des Abstandes zu benachbarten Markern. In der Tabelle sind auch erhöhte *LOD-Scores* einzelner Marker hervorgehoben.

In Abbildung 3.4 ist das Ergebnis Kopplungsanalyse für Chromosom 2 graphisch aufgearbeitet. Zu Beginn des Chromosoms findet sich eine Erhöhung des *LOD-Scores* auf Werte von $Z \geq 2,32$. Dieser Bereich vom Anfang des Chromosoms bis D2S162 umfasst 20 cM (vgl. Tabelle 3.2) und ist den zytogenetischen Banden 2p25.3 - p25.1 zugeordnet. In diesem 8,8 Mb großen Bereich befinden sich 46 Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>).

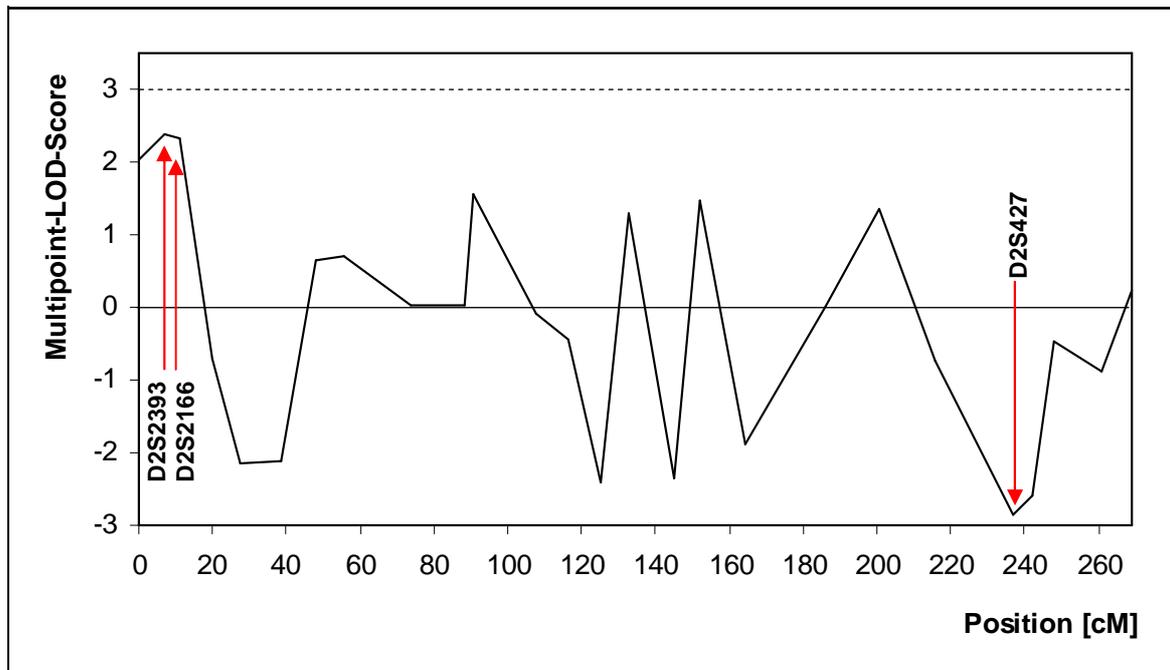


Abb. 3.4: Ergebnis der *Multipoint-Kopplungsanalyse* von Chromosom 2. Aufgetragen sind die *LOD-Scores* gegen die Position der Marker auf der genetischen Karte in cM. Jede Änderung des Kurvenverlaufs repräsentiert den *LOD-Score* Z eines Markers. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Allegro 2.0 für 24 Marker von den ausgewählten sieben Individuen und 19 Ahnen der Familie R durchgeführt. Der niedrigste *LOD-Score* für das Chromosom wurde auf Höhe des Markers D2S427 mit einem Wert von $Z = -2,84$ ermittelt. Zwei Werte sind mit $Z = 2,37$ (D2S2393) und $Z = 2,32$ (D2S2166) deutlich erhöht. Die gestrichelte Linie auf Höhe des *LOD-Score* $Z = 3$ kennzeichnet den unteren Grenzwert, für den eine Kopplung als signifikant angenommen werden kann (Lander und Kruglyak, 1995).

Die interessierende Region auf Chromosom 3 erstreckt sich über eine Distanz von 37,7 cM bzw. 41,1 Mb und ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Der Bereich zwischen D3S3726 und D3S1300 entspricht den Banden 3p24.3 - p14.3, in der 429 Gene lokalisiert sind (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>).

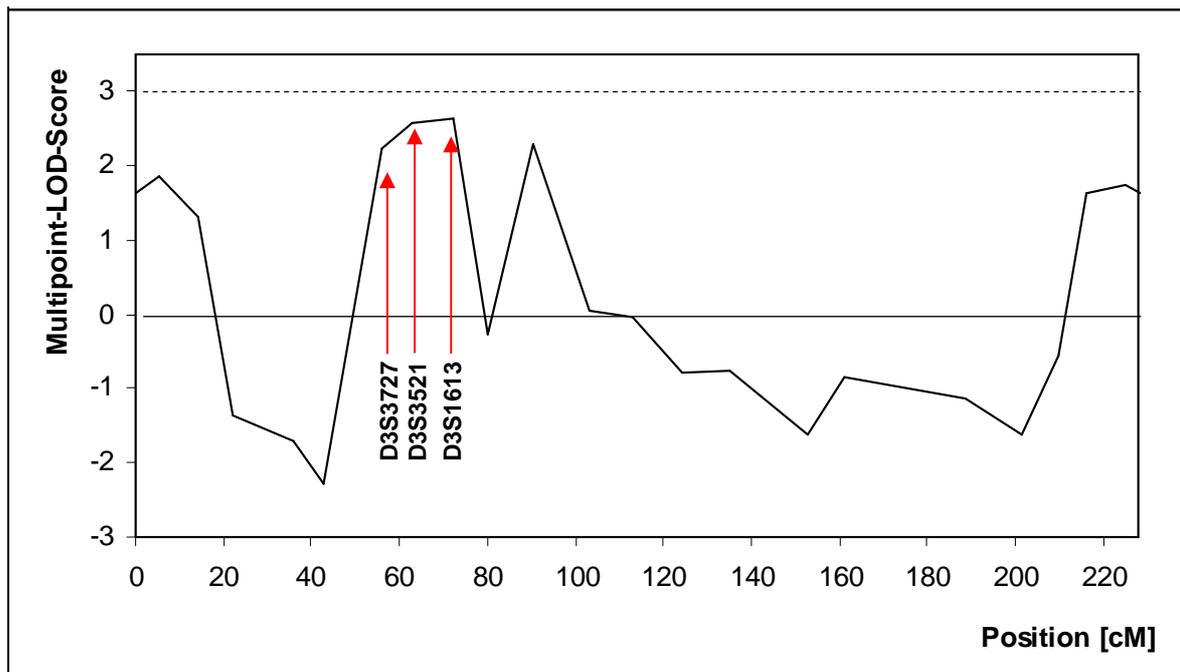


Abb. 3.5: Errechnete *Multipoint-LOD-Scores* für Chromosom 3. Die gegen die Position auf der genetischen Karte in cM aufgetragenen *LOD-Scores* erzielen im Bereich der Marker D3S3727, D3S3521 und D3S1613 Werte von $Z = 2,24$, $Z = 2,57$ bzw. $Z = 2,65$. Die Berechnungen wurden für 21 Marker des Chromosoms durchgeführt. Die gestrichelte Linie bei $Z = 3$ kennzeichnet den unteren Grenzwert, für den eine Kopplung als signifikant angenommen werden kann.

Auf dem Chromosom 18 (siehe Abbildung 3.6) befindet sich eine Region zwischen 43,49 und 77,36 cM mit *LOD-Scores* von $Z \geq 2,62$, die dem unteren Grenzwert von $Z = 3$ für eine vorliegende Kopplung nahekommen. Sie wird flankiert von den Markern D18S453 und D18S1127. Die von ihnen umfasste Region ist ca. 38,8 Mb groß und umfasst die Banden 18p11.21 - q21.2 des Chromosoms. Die Recherche in der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>) ergab 213 bekannte Gene in dieser Region.

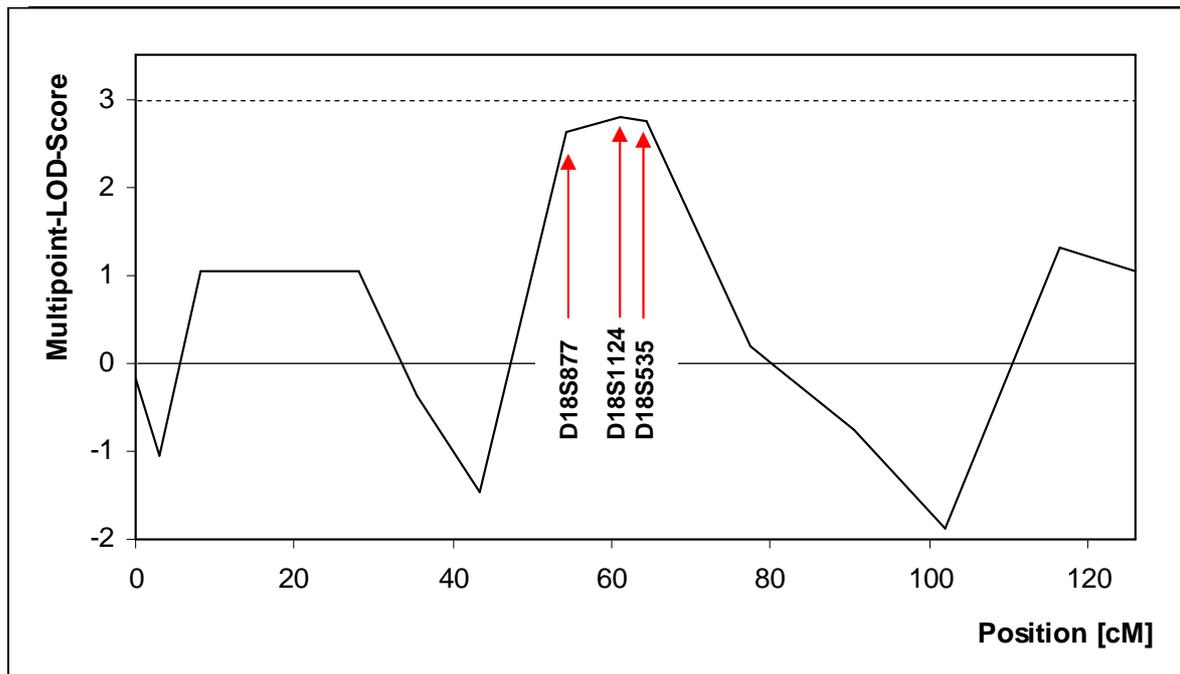


Abb. 3.6: Ergebnis der *Multipoint*-Analyse von Chromosom 18. Die LOD-Scores sind gegen die Position auf der genetischen Karte in cM aufgetragen. Im Bereich der Marker D18S877 (54,40 cM) bis D18S535 (64,48 cM) erreichen die LOD-Scores Werte zwischen 2,62 und 2,79. Sie kommen damit der gestrichelten Linie bei $Z = 3$ nahe, welche den unteren Grenzwert markiert, für den eine Kopplung als wahrscheinlich gilt. Auf Chromosom 18 wurden 13 Marker analysiert.

Die hier vorgestellten Regionen werden in Abschnitt 4.2.1 näher diskutiert.

Im Anschluss an die genomweite *Multipoint*-Kopplungsanalyse ist es notwendig, die Bereiche des Genoms, in denen erhöhte LOD-Scores ermittelt wurden, unter Einbeziehung aller verfügbaren Individuen zu betrachten, um einen gemeinsamen Haplotypen zu identifizieren. Das Ergebnis der anschließend durchgeführten Haplotypisierung der Region auf Chr. 18 ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Dabei konnte ein gemeinsamer Haplotyp bei vier Betroffenen und bei zwei als klinisch unbekannt eingestuften Familienmitgliedern gefunden werden. Im weiteren Verlauf des Projektes sollen erstens die Lücken in der Genotypisierung geschlossen und zweitens die Kandidatenregion im Rahmen einer Feinkartierung detaillierter dargestellt und somit eingegrenzt werden.

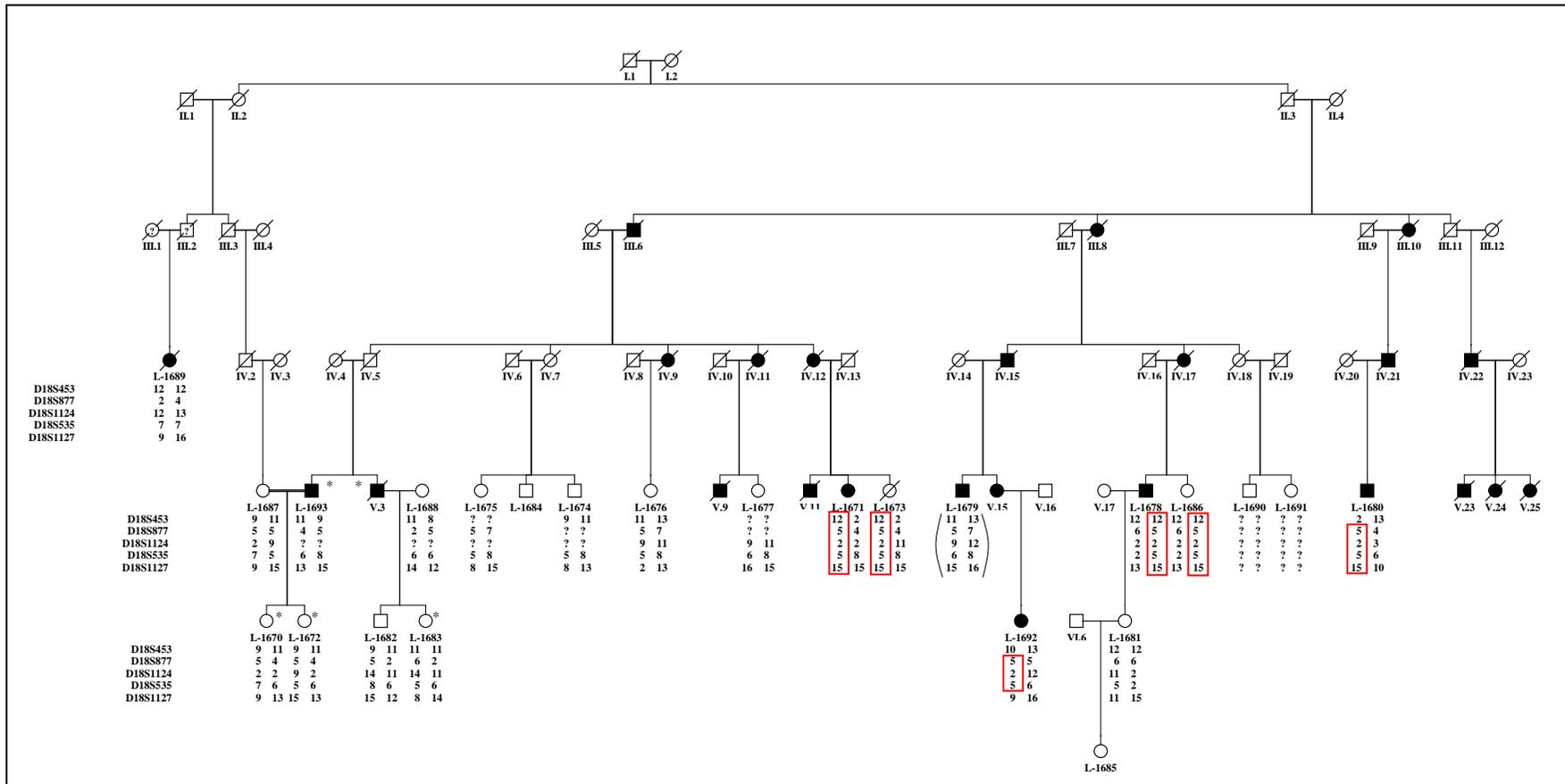


Abb. 3.7: Haplotypen in der interessanten Region auf Chromosom 18 von Familie R. Für die drei Marker D18S877, D18S1124 und D18S535 findet sich ein gemeinsamer Haplotyp (rot) bei den Betroffenen L-1671, L-1678, L-1680 und L-1692 sowie bei den klinisch als unbekannt eingestuften Familienmitgliedern L-1673 und L-1686. Bei dem Betroffenen L-1693, für den bereits eine Mutation beschrieben wurde (Münch *et al.*; 2005), findet sich dieser Haplotyp nicht, ebenso wenig bei L-1689, der ganz links im Stammbaum abgebildet ist. Bei dem Betroffenen L-1679 lagen Schwierigkeiten bei der Genotypisierung durch Verunreinigungen der DNA vor, daher wurde der Haplotyp in Klammern gesetzt. Legende: Kreis, weiblich; Quadrat, männlich; schwarz, erkrankt; weiß, gesund; durchgestrichen, verstorben; **Dynactin*-Mutation nachgewiesen; ?, keine Genotypisierung möglich. Der Doppelstrich zwischen L-1687 und L-1693 symbolisiert Blutsverwandtschaft zwischen Eheleuten.

3.2 Haplotypisierung, Mutationsanalyse und Gendosis-Veränderungen bei Familien mit Parkinsonsyndrom

3.2.1 Haplotypisierung

Für die Familien M, K und P wurde eine Genotypisierung der Genorte *PARK1* bis *PARK8* unter Verwendung der in Tabelle 8.13 genannten STR-Marker durchgeführt. Ziel war es, nach der Bildung der Haplotypen einige der Regionen als krankheitsverursachend ausschließen zu können. Angaben zu den Positionen der verwendeten Marker auf der genetischen Karte finden sich ebenfalls in der Tabelle 8.13 im Anhang.

Das Ergebnis der Haplotypisierung der Region um *PARK6* auf Chr. 1 der Familie M zeigt Abbildung 3.8. Das *PINK1*-assoziierte Parkinsonsyndrom wird autosomal-rezessiv vererbt, wonach bei allen drei Nachkommen beide Allele des Gens mutiert sein müssten, gleiche Mutationen bei einer homozygoten und verschiedene Mutationen bei einer *compound-heterozygoten* Ätiologie. In der Literatur werden zudem Fälle beschrieben, bei der eine heterozygote Mutation innerhalb des Gens genügt, um das Parkinsonsyndrom auszulösen (vgl. Abschnitt 1.3.2). Würde dies auf Familie M zutreffen, so müssten die Nachkommen zumindest einen gemeinsamen Haplotypen teilen. Da dies nicht der Fall war, konnte eine *PINK1*-Mutation als Ursache ausgeschlossen werden und das Gen musste nicht zusätzlich sequenziert werden.

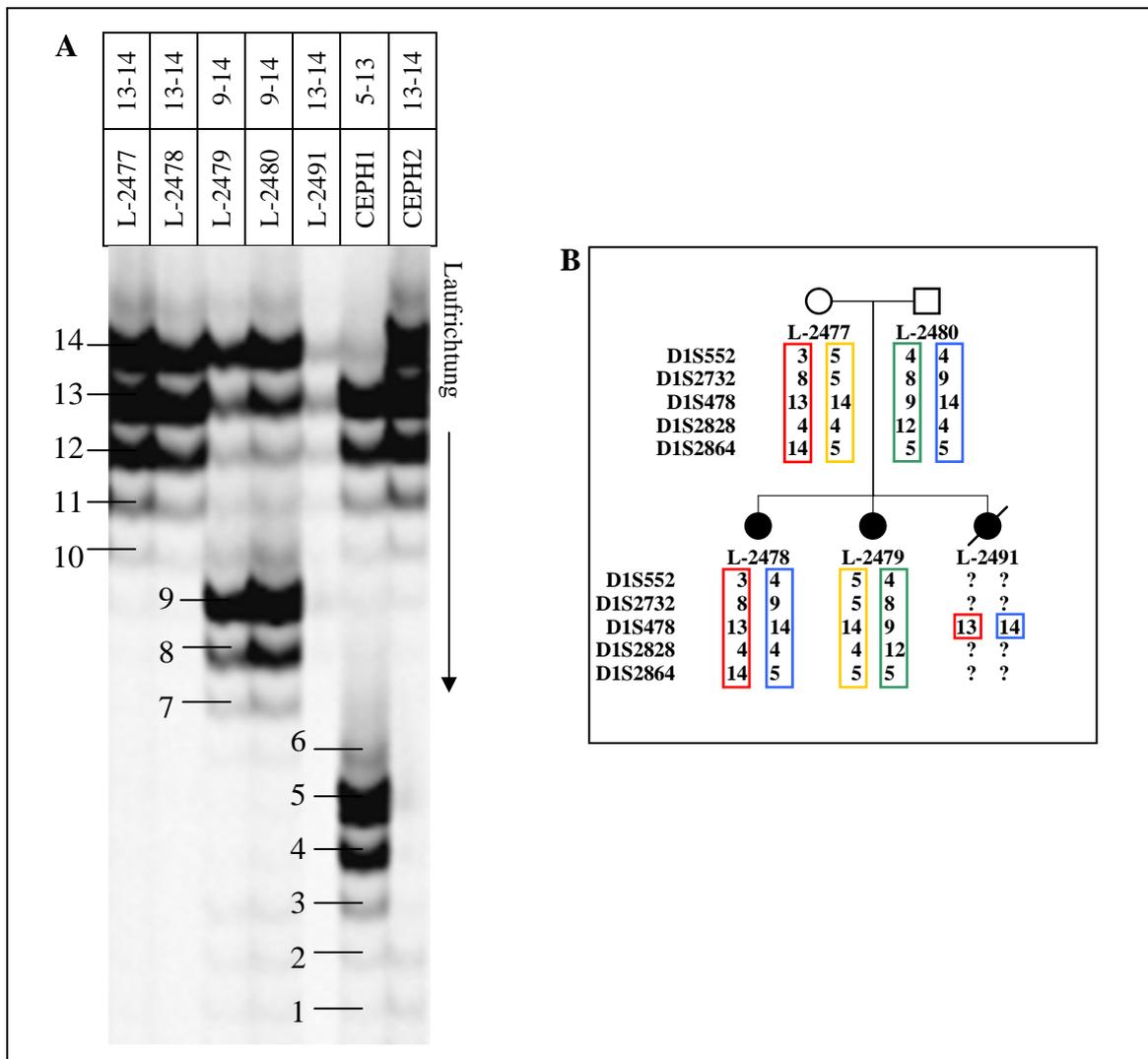


Abb. 3.8: Die linke Seite der Abbildung (A) zeigt den Marker D1S478 für den Genort *PARK6* der Familie M auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Banden sind der Größe nach von 1 bis 14 nummeriert, die jeweils stärksten Banden einer Bahn kennzeichnen den Genotyp, schwächere Banden sind sog. „Stotterbanden“. Die Genotypen sind in der Leiste oberhalb des Gels eingetragen. Die Kontrollen CEPH1 und CEPH2 haben laut Datenbank eine Länge von CEPH1 155/171 bp und CEPH2 171/173 bp (<http://research.marshfieldclinic.org>). In B sind die Genotypen des Markers D1S478 zusammen mit Genotypen weiterer Marker für den Genort *PARK6* in den Stammbaum eingetragen und vier Haplotypen (rot, gelb, grün, blau) in der Elterngeneration gebildet worden. L-2478 hat den roten Haplotyp von der Mutter und den blauen vom Vater geerbt, L-2479 den gelben von der Mutter und den grünen vom Vater. Da die Qualität der DNA von L-2491 schlecht war, konnten nicht alle Genotypen ermittelt werden. Trotz der fehlenden Information lässt sich dieser Genort als ursächlich für die Erkrankung ausschließen: Wäre er krankheitsverursachend, so müssten alle Kinder mindestens einen gemeinsamen Haplotyp besitzen. Legende: Kreis, weiblich; Quadrat, männlich; schwarz, erkrankt; weiß, gesund; durchgestrichen, verstorben; ?, keine Genotypisierung möglich.

Die Haplotypisierung der anderen Genorte der Familie M erlaubte keinen Ausschluss, da alle drei Nachkommen stets mindestens einen gemeinsamen Haplotyp teilten (Ergebnisse nicht dargestellt). Die autosomal-dominant vererbten Formen (*PARK1*, *PARK3*, *PARK5* und *PARK8*) lassen sich unter der Annahme, dass eine reduzierte Penetranz bei dem involvierten Elternteil vorliegt, erklären. Ebenso sind die übrigen autosomal-rezessiven Formen (*PARK2* und *PARK7*) unter der Annahme, dass auch eine heterozygote Mutation als krankheitsverursachend ausreicht, möglich (vgl. Abschnitt 1.3.2). Eine Zusammenstellung der Ergebnisse der Haplotypisierung von Familie M findet sich in Abbildung 3.9.

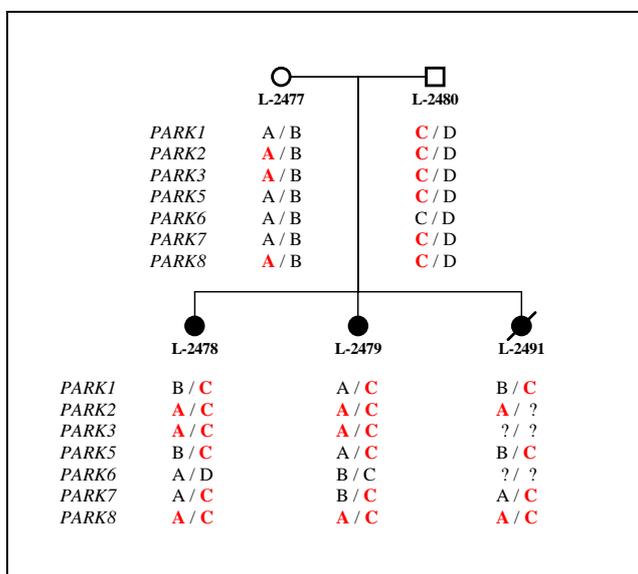


Abb. 3.9: Ergebnisse der Haplotypisierung der Familie M. Die für die Genorte *PARK1* bis *PARK8* ermittelten Haplotypen sind mit den Buchstaben A bis D bezeichnet. Die rot hervorgehobenen Buchstaben kennzeichnen die Haplotypen, die eine krankheitsauslösende Mutation tragen könnten, die schwarze Haplotypen scheiden als Verursacher aus. Der Genort *PARK6* konnte durch die Haplotypisierung ausgeschlossen werden. Legende: Kreis, weiblich; Quadrat, männlich; schwarz, erkrankt; weiß, gesund; durchgestrichen, verstorben; ?, keine Haplotypisierung möglich.

Bei der Familie K konnte durch die Haplotypisierung keiner der Genorte *PARK1* - *PARK8* ausgeschlossen werden. Exemplarisch ist dies für den Genort *PARK2* in Abbildung 3.10 gezeigt. Für jeden der Genorte war es möglich, einen gemeinsamen Haplotyp entweder über die Linie L-1436 – L-1435 – L-1437 oder die Linie Großvater (Ehemann von L-1436) – L-1435 – L-1437 zu verfolgen. Für eine bessere Beurteilung des Vererbungsmodus sind weitere klinische Untersuchungen der Betroffenen notwendig.

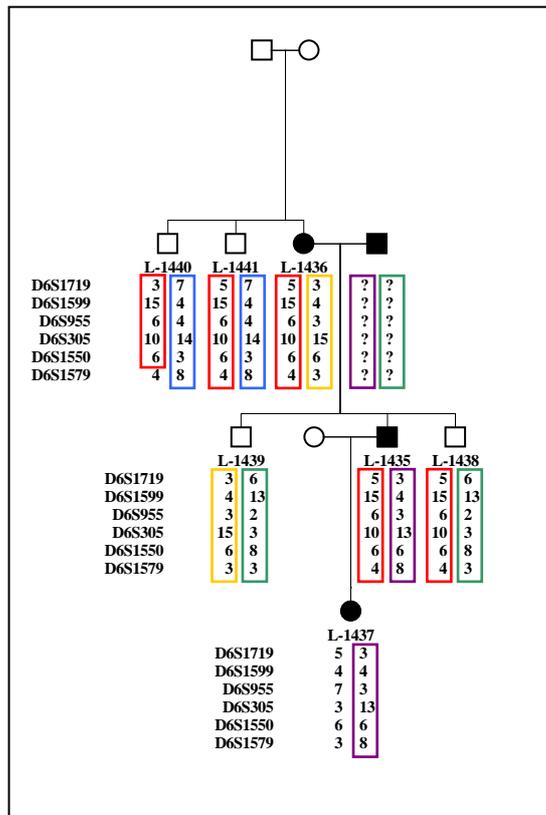


Abb. 3.10: Ermittelte Haplotypen des Genorts *PARK2* der Familie K. Die Tochter L-1437 und ihr Vater L-1435 teilen den violetten Haplotyp. Ihre Großmutter L-1436 besitzt diesen nicht. Der violette Haplotyp muss also vom Großvater stammen, von dem kein genetisches Material zur Verfügung steht. Es besteht die Möglichkeit, dass der violette Haplotyp die krankheitsverursachende Mutation trägt. Über den Grund der Erkrankung von L-1436 kann keine Aussage gemacht werden. Ähnliche Ergebnisse liefern auch die Analysen der anderen Genorte. Legende: Kreis, weiblich; Quadrat, männlich; schwarz, erkrankt; weiß, gesund; ?, keine Genotypisierung möglich, da kein genetisches Material vorhanden.

Differenziertere Ergebnisse lieferten die Untersuchungen zur Familie P. Fünf Genorte (*PARK1*, *PARK2*, *PARK3*, *PARK5* und *PARK7*) konnten mit Hilfe der Haplotypisierung als ursächlich für die Erkrankung ausgeschlossen werden. Das Ergebnis des Genortes *PARK6* ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Wie daraus hervorgeht, teilen alle untersuchten Betroffenen einen gemeinsamen Haplotyp. Somit besteht die Möglichkeit, dass eine heterozygote Mutation im Gen die Krankheit verursacht. Bei der anschließenden Sequenzierung des Gens konnte allerdings keine Mutation gefunden werden (siehe Abschnitt 3.2.2). Die Haplotypisierung des Genorts *PARK8* ergab ebenfalls, dass alle Betroffenen einen kleinen Haplotyp teilen: Für die Marker D12S2519 und D12S2520 trugen sie je ein gemeinsames Allel (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Sequenzierung von acht Exons des *LRRK2*-Gens deckte keine Mutation auf.

Bei Betrachtung der Haplotypen in Abbildung 3.11 fällt die Unstimmigkeit auf, dass der gelbe Haplotyp von L-2473, der braune von L-2474 und der violette von L-2469 von demselben Elternteil stammen müssen. Die Wiederholung der Genotypisierung brachte dasselbe Ergebnis.

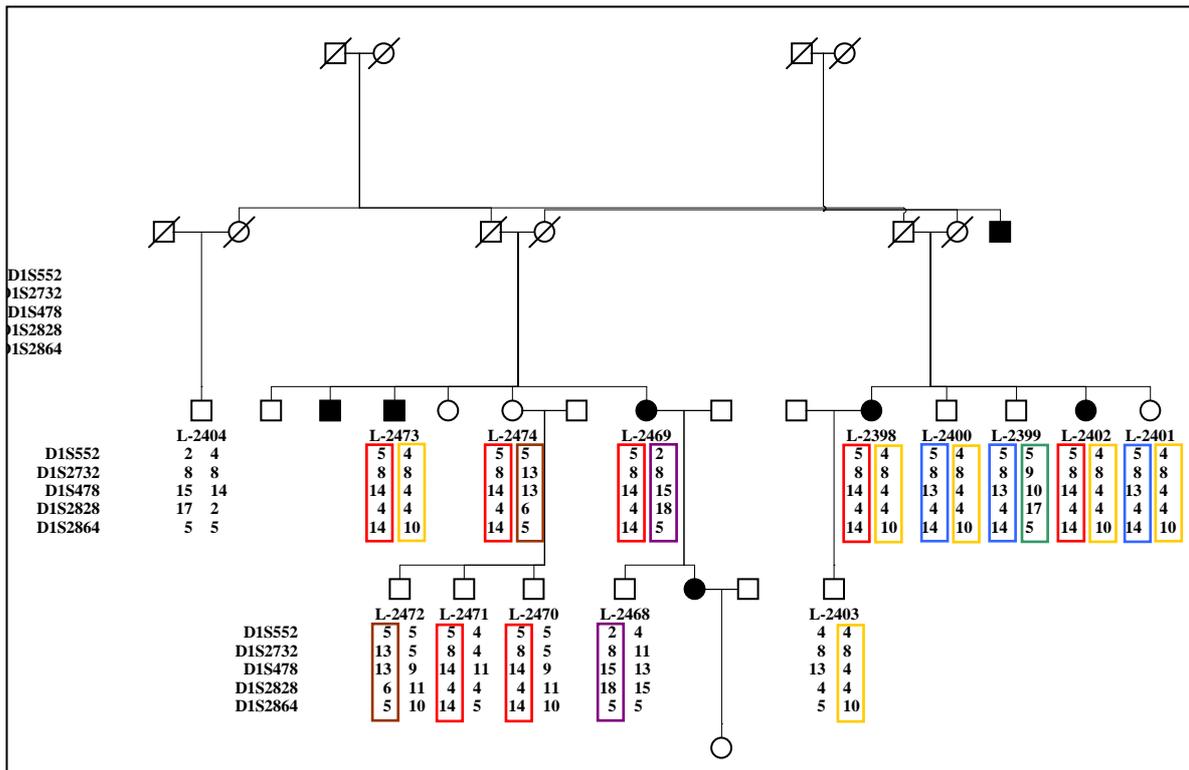


Abb. 3.11: Ergebnis der Haplotypisierung des Genorts *PARK6* der Familie P. Es finden sich keine Hinweise auf krankheitsverursachende homozygote oder *compound*-heterozygote Mutationen, da die Betroffenen keine zwei gemeinsamen Haplotypen besitzen. Der rot markierte Haplotyp (5-8-14-4-14) ist jedoch bei allen Erkrankten vorhanden, was das in dieser Region liegende *PINK1*-Gen zu einem interessanten Kandidaten macht. Die gesunden Familienmitglieder L-2470, L-2471 und L-2474 tragen ebenfalls den roten Haplotyp; somit wäre eine Erhöhung der Suszeptibilität für die Krankheit bei Besitz des roten Haplotyps denkbar, insofern eine Mutation in *PINK1* vorhanden ist. Die Unstimmigkeit, dass der gelbe Haplotyp von L-2473, der braune von L-2474 und der violette von L-2469 von demselben Elternteil stammen müssen, ließ sich auch nach wiederholter Genotypisierung der Marker nicht korrigieren. Legende: Kreis, weiblich; Quadrat, männlich; schwarz, erkrankt; weiß, gesund; durchgestrichen, verstorben; ?, kein genetisches Material vorhanden.

Die anderen Haplotypisierungen legten zwei weitere Probleme frei: Für den Genort *PARK1* wurden im Personenkreis L-2398, L-2399, L-2401 und L-2402 im Bereich von drei Markern sechs Haplotypen entdeckt, bei *PARK8* ein überzähliges Allel im Bereich eines Markers (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch hier zeigte die Wiederholung der Analysen dasselbe Ergebnis. Eine Erklärung für die beobachteten Phänomene könnte das Vorhandensein eines weiteren, unbekanntes Vaters sein.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Haplotypisierung zeigt die Abbildung 3.12.

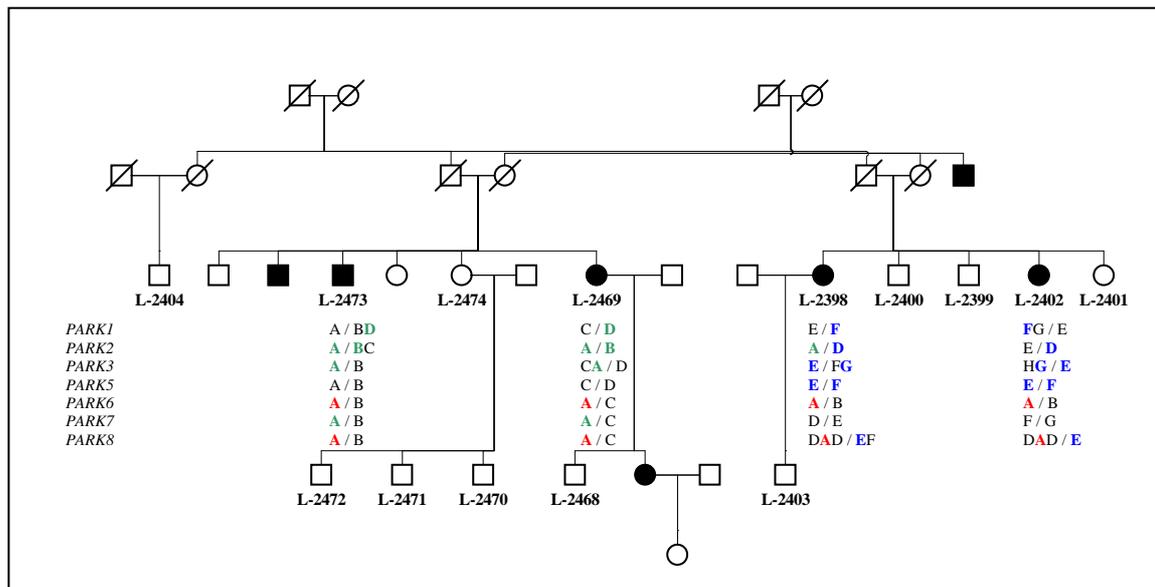


Abb. 3.12: Übersicht der Ergebnisse der Haplotypisierung von Familie P in Hinblick auf die Betroffenen. Die ermittelten Haplotypen der Genorte *PARK1* bis *PARK8* sind mit Buchstaben bezeichnet. Rekombinationsereignisse sind mit mehreren Buchstaben im Bereich eines Haplotyps kenntlich gemacht. Die farbigen Hervorhebungen kennzeichnen diejenigen Haplotypen, die bei mehreren Betroffenen gleich sind (grün mit Dominanz im Zweig L-2473/L-2469, blau mit Dominanz im Zweig L-2398/L-2402). Rote, fette Hervorhebungen kennzeichnen Haplotypen, die bei allen Betroffenen vorkommen, wie dies bei *PARK6* und *PARK8* der Fall ist (in beiden Fällen symbolisiert durch ein A). Bei den anderen Loci kommt es bei den vier Betroffenen nicht zu einer Übereinstimmung der Haplotypen. Daher konnten diese Genorte als krankheitsverursachend ausgeschlossen werden. Legende: Kreis, weiblich; Quadrat, männlich; schwarz, erkrankt; weiß, gesund; durchgestrichen.

3.2.2 Mutationsanalyse mittels Sequenzierung

Aufgrund der Ergebnisse der Haplotypisierung wurde entschieden, ob eine Sequenzierung des jeweiligen Gens von ein bis zwei Mitgliedern der Familie sinnvoll war oder sich erübrigte. Als weiteres Kriterium wurde die Menge beschriebener Mutationen des Gens berücksichtigt, so dass häufig betroffene Gene eher als selten mutierte Gene sequenziert wurden. Im Fall des Gens *LRRK2* wurden neben häufig mutierten Exons diejenigen Exons sequenziert, die für strukturelevante Domänen kodieren. Die zwei genutzten Methoden zur Mutationsanalyse werden in der folgenden Abbildung 3.13 vorgestellt. Es wurden stets beide Stränge sequenziert.

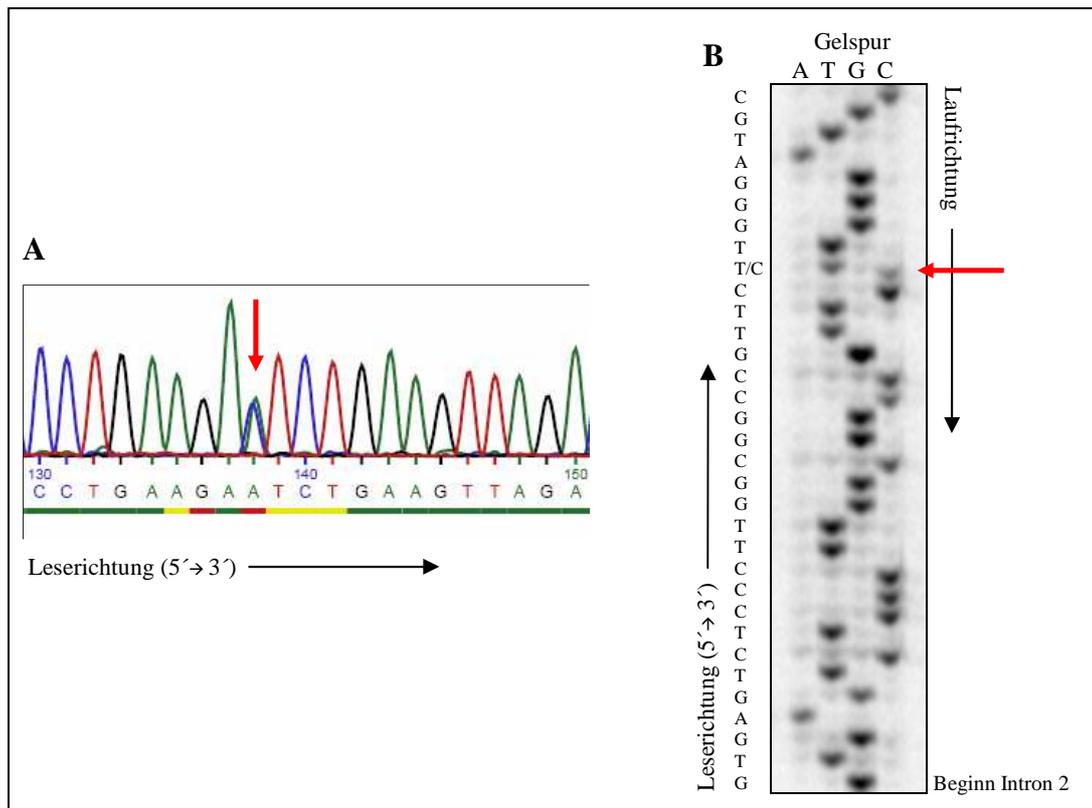


Abb. 3.13: Gezeigt werden die beiden in dieser Arbeit angewendeten Sequenzierverfahren. **A:** Die unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide ermittelte Sequenz ist ein Ausschnitt von *PINK1* Exon 8 des Individuums L-2402. Die Basenreihenfolge ergibt sich aus der zeitlichen Abfolge, in der die vier verschiedenen Fluoreszenzsignale detektiert werden, wobei die Signalintensität der Amplitude der Kurve entspricht. Der höchsten zu einem Zeitpunkt gemessenen Amplitude wird die korrespondierende Base zugeordnet (grün = A, schwarz = G, rot = T und blau = C). Zu erkennen ist die Überlagerung eines grünen mit einem blauen *peak* bei gleichzeitiger Detektion der Signale (Pfeil) aufgrund des Vorliegens einer genetischen Variante auf einem Allel. Es handelt sich um den heterozygoten Polymorphismus c.1562A/C. **B:** Ausschnitt der Sequenzierung von *Parkin* Intron 2 von L-2478 am LI-COR. In jeder Gelspur hat das genannte Didesoxynukleotid in einer vorangegangenen PCR zum Kettenabbruch geführt. Die Sequenz der Polynukleotidkette ist in aufsteigender Größe von unten nach oben abzulesen. An Position 25 des Introns 2 sind zwei Banden T und C sichtbar (Pfeil); es liegt ein heterozygoter Polymorphismus vor (IVS2+25C/T).
 Legende: A, Adenin; C, Cytosin; G, Guanin; T, Thymin.

Das *Parkin*-Gen wurde mittels markierter *Primer* am LI-COR-System sequenziert, alle anderen Sequenzen wurden unter Verwendung markierter Didesoxynucleotide ermittelt (ABI-System). Die Ergebnisse der Mutationsanalyse sind in Tabelle 3.3 wiedergegeben. Es wurde keine pathogene Mutation in den untersuchten Genen der Patienten entdeckt. Alle vorgefundenen Polymorphismen sind ebenfalls in der Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tab. 3.3: Ergebnisse der Sequenzierung im Rahmen der Mutationsanalyse

Locus	Gen, Exon	Familie M	Familie K	Familie P	
		L-2478	L-1435	L-2402	L-2469
<i>PARK1</i>	<i>SCNA</i> , 3	k. V.	k. V.	n. u.	n. u.
<i>PARK2</i>	<i>Parkin</i> , 1 - 12	IVS2+25T/C (ht)	n. u.	n. u.	n. u.
<i>PARK5</i>	<i>UCHL1</i>	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
<i>PARK6</i>	<i>PINK1</i> , 1 - 8	n. u.	n. u.	IVS1-64delTC (ht) IVS1-7A/G (hm) IVS4-5G/A (hm) c.1562A/C (ht) IVS8+37A/T (hm)	IVS1-7A/G (hm) IVS4-5G/A (hm) IVS6+43C/T (ht) IVS8+37A/T (hm)
<i>PARK7</i>	<i>DJ-1</i> , 2 - 7	IVS4-85A/G (ht)	n. u.	n. u.	n. u.
<i>PARK8</i>	<i>LRKK2</i> , 24, 25, 29, 31, 35, 38, 40, 41	IVS35+23 A/T (ht)	IVS40+48C/T (ht)	k. V.	k. V.

A, Adenin; C, Cytosin; del, Deletion; G, Guanin; hm, homozygot; ht, heterozygot; IVS, intervenierende Sequenz (Intron); k. V., keine Veränderung gefunden; n. u., nicht untersucht; T, Thymin

Sequenzierungen des *PARK3*-Gens konnten nicht vorgenommen werden, weil das Gen noch nicht identifiziert wurde. Auf eine Sequenzierung von *Parkin*, *PINK1* und *DJ-1* der Familie K wurde verzichtet, da bereits im Rahmen der Vorarbeiten keine Hinweise auf eine Mutation in diesen Genen gewonnen wurden (vgl. Abschnitt 1.4).

3.2.3 Gendosis-Veränderungen

Da Veränderungen der Gendosis, also Deletionen oder Multiplikationen ganzer Exon, mit Hilfe der konventionellen qualitativen Mutationsanalyse nicht entdeckt werden können, wurde die MLPA-Analyse als quantitatives Nachweisverfahren eingesetzt. MLPA-Analysen wurden für je zwei Mitglieder der drei Familien (L-2478 und L-2479 aus Familie P; L-1435 und L-1436 aus Familie K; L-2402 und L-2469 aus Familie P) vorgenommen. Es wurden stets beide *Kits* P051 und P052 (vgl. Tabelle 2.6) angewendet. Wie es exemplarisch für L-2479 (*Kit* P051) in der Abbildung 3.14 gezeigt ist, bewegten sich alle Ergebnisse der MLPA-Analysen im als unauffällig zu bewertenden Referenzbereich von 0,8 - 1,2.

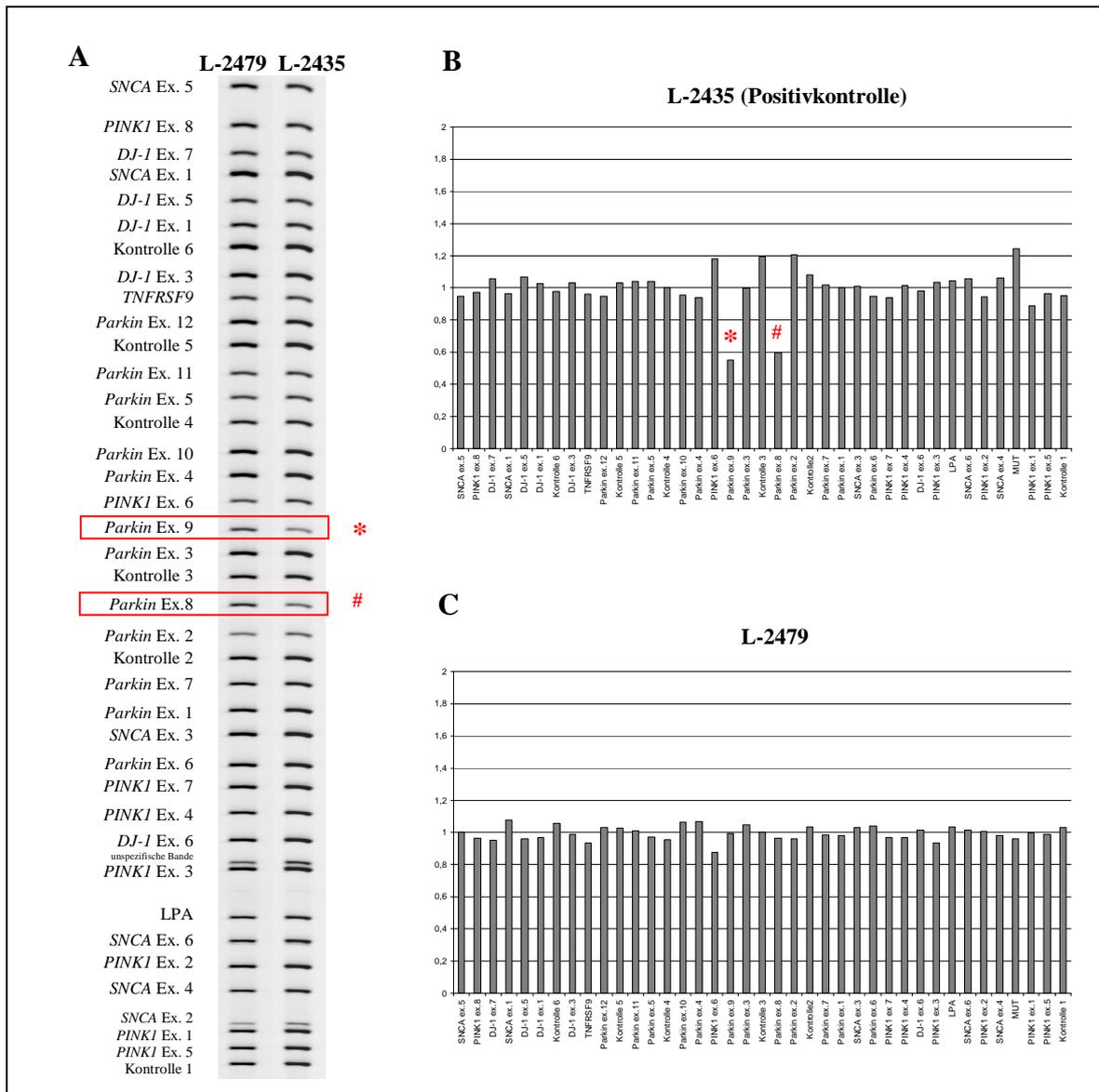


Abb. 3.14: Ergebnis der MLPA-Analyse. **A**: Abbild eines Polyacrylamidgels beladen mit den PCR-Produkten des Kits P051 einer zu untersuchenden Probe L-2479 und der Positivkontrolle L-2435. Die Banden besitzen eine Länge, die für das Sondenpaar spezifisch ist. Das Exon oder die Punktmutation, die die Bande repräsentiert, ist auf Höhe der entsprechenden Bande notiert. Die roten Kästchen (* und #) markieren Bereiche, in denen die Positivkontrolle L-2435 heterozygote Gendosis-Veränderungen im *Parkin*-Gen aufweist (Ex9del bzw. Ex8del). Hier sind diese bereits mit bloßem Auge zu erkennen: Die beiden Banden von L-2435 sind blasser als die von L-2479. **B** und **C**: Durch die Messung der Intensität jeder Bande und die anschließende Normalisierung der Werte lassen sich die Ergebnisse graphisch darstellen. Jede Säule zeigt das Verhältnis des Messwerts zu einer internen negativen Kontrolle. Ein Verhältnis im Bereich von 0,8 bis 1,2 gilt als normal. Die in B mit * und # markierten Säulen bestätigen mit Werten von 0,55 (*) bzw. 0,60 (#) die zuvor beobachteten heterozygoten Exondeletionen.

3.3 Assoziationsstudien zum *MDR1*-Gen

3.3.1 Bestimmung von Genotypen am *LightCycler*

Zur Untersuchung, ob die Polymorphismen c.2677G/TA in Exon 21, c.3320A/C und c.3435C/T in Exon 26 des *MDR1*-Gens genetische Risikofaktoren für ein primäres Parkinsonsyndrom bzw. für das Auftreten von Neuroleptika (NL)-induzierten Bewegungsstörungen darstellen, wurden die Genotypenhäufigkeiten entsprechender Fall- und Kontrollgruppen mit Hilfe des *LightCyclers* analysiert (vgl. Abschnitt 2.3.3).

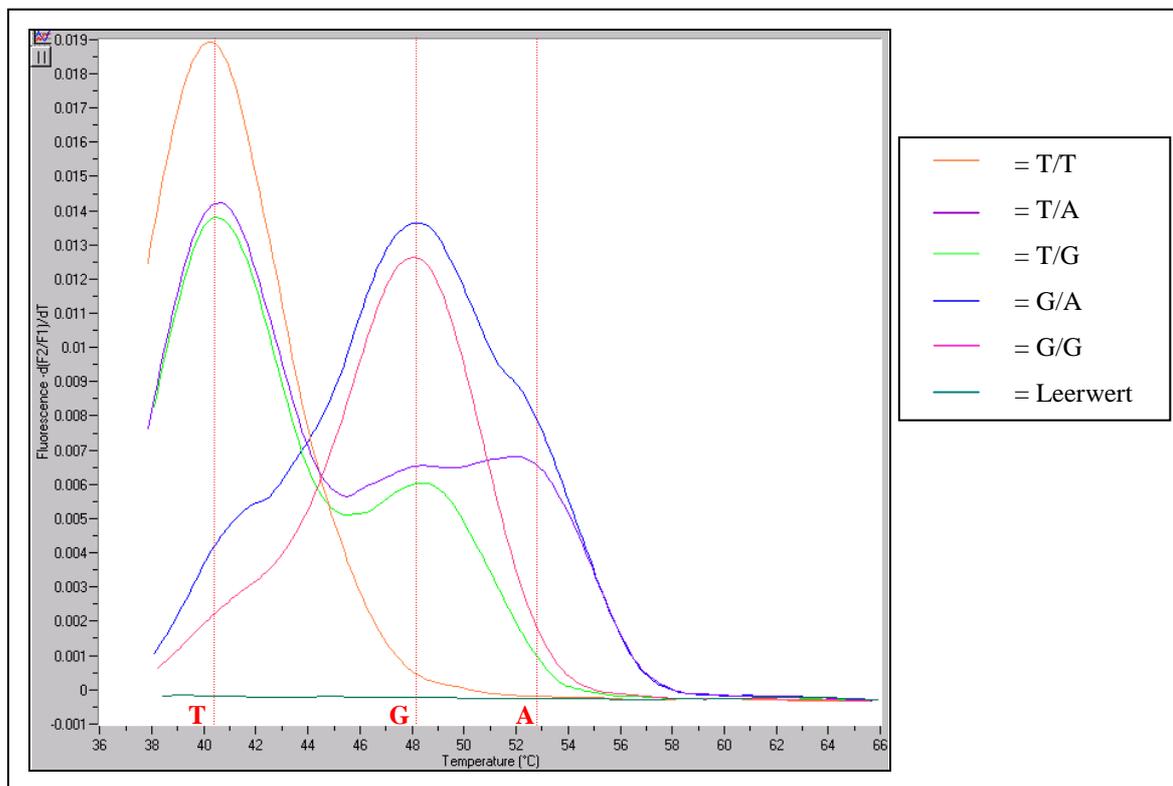


Abb. 3.15: Die Abbildung zeigt die zweite Ableitung (Wendepunkte) der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur für fünf Proben mit verschiedenen Genotypen des SNPs c.2677 des *MDR1*-Gens. Die möglichen Nukleotide an dieser Position (G, T oder A) rufen im Experiment charakteristische Schmelztemperaturen hervor (ca. 40,5° C, 48,25° C bzw. 53° C), die durch Maxima des Kurvenverlaufes gekennzeichnet sind. So lassen sich Allele leicht einem Genotypen zuordnen. Im Falle der grünen Kurve ist dieser beispielsweise c.2677T/G. Ein Leerwert zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsansatzes ist mitgeführt. Von ihm darf kein Fluoreszenzsignal ausgehen.

Das Gerät ermittelt Änderungen der Fluoreszenzintensität, die bei bestimmten Temperaturen durch die Dissoziation der Sonden von ihrer Zielsequenz entstehen, welche durch den vorliegenden SNP bestimmt werden. In der Abbildung 3.15 werden die typischen Kurvenverläufe für den variabelsten SNP c.2677 anhand von fünf Proben gezeigt.

Bei den drei SNPs wurde von allen vorkommenden Allelkonstellationen je ein Träger zu Kontrollzwecken sequenziert (Ergebnisse nicht dargestellt). Anschließend wurde diese Probe als Positivkontrolle mitgeführt. Nach Abschluss der Analysen wurden zur Überprüfung der Ergebnisse stichprobenartig 6,7 % der insgesamt 716 Proben für Exon 21 und 14,5 % der Proben für Exon 26 erneut genotypisiert, wobei eine Fehlerquote von 2,08 % bzw. 3,85 % ermittelt wurde.

3.3.2 Assoziation im *MDR1*-Gen bei Parkinsonpatienten

Die Genotypen der benannten drei SNPs wurden für insgesamt 418 Patienten mit primärem Parkinsonsyndrom erhoben und mit denen von 185 Kontrollindividuen verglichen. Da die Verteilung der Allele in verschiedenen Bevölkerungsgruppen unterschiedlich sein kann, wurden die deutschen (n = 265) und serbischen (n = 42) Patienten zusätzlich getrennt ausgewertet. Die anderen Ethnien waren in zu geringer Zahl vertreten, als dass eine separate Auswertung sinnvoll gewesen wäre. Die Ergebnisse der drei Teilberechnungen sind in Tabelle 3.4 zu finden.

Bei den Untersuchungen aller ethnischen Gruppen findet sich für den SNP c.2677G/TA in der Fall- als auch in der Kontrollgruppe eine ähnliche Verteilung der Genotypen. Der Wildtyp G/G ist in der Gruppe der Parkinsonpatienten mit 35,2 % der zweithäufigste Genotyp nach dem heterozygoten Genotyp G/T (44,7 %). In der Kontrollgruppe haben 31,9 % Wildtypallele (G/G) und 44,9 % den Genotyp G/T. Der dritthäufigste Genotyp in der Fall- sowie in der Kontrollgruppe ist T/T mit 17,5 % bzw. 16,2 %. Die Genotypen, die das Allel ‚A‘ beinhalten, kommen seltener vor: G/A 1,2 % und T/A 1,4 % in der Fallgruppe und G/A 3,2 % und T/A 3,8 % in der Kontrollgruppe. Die statistischen Berechnungen mit Hilfe des χ^2 -Tests (p -Wert = 0,15) bestätigen als Ergebnis, dass kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe vorliegt.

Tab. 3.4: Häufigkeit der *MDRI*-Polymorphismen bei Patienten mit primärem Parkinsonsyndrom im Vergleich zu Kontrollen

	Fälle		Kontrollen		Statistische Untersuchungen		
	n	%	n	%			
Alle Ethnien	418		185				
c.2677					χ^2 -Wert 6,75	Freiheitsgrade 4	p-Wert 0,15
G/G*	147	35,2	59	31,9			
G/T	187	44,7	83	44,9			
T/T	73	17,5	30	16,2			
G/A	5	1,2	6	3,2			
T/A	6	1,4	7	3,8			
c.3320					OR 0,70	CI 0,20- 2,77	p-Wert 0,55
A/A*	410	98,1	180	97,3			
A/C	8	1,9	5	2,7			
c.3435					OR 0,92	CI 0,71- 1,18	p-Wert 0,53
C/C*	104	24,9	37	20,0			
C/T	205	49,0	101	54,6			
T/T	109	26,1	47	25,4	0,84	0,51- 1,40	
Nur deutscher Herkunft	265		123				
c.2677					χ^2 -Wert 12,25	Freiheitsgrade 4	p-Wert 0,016
G/G*	98	37,0	39	31,7			
G/T	115	43,4	61	49,6			
T/T	48	18,1	14	11,4			
G/A	2	0,8	5	4,1			
T/A	2	0,8	4	3,3			
c.3320					OR 1,08	CI 0,10- 7,64	p-Wert 1,00
A/A*	261	98,5	121	98,4			
A/C	4	1,5	2	1,6			
c.3435					OR 0,88	CI 0,64- 1,21	p-Wert 0,44
C/C*	69	26,0	21	17,1			
C/T	126	47,5	73	59,3			
T/T	70	26,4	29	23,6	0,78	0,41- 1,47	
Nur serbischer Herkunft	42		61				
c.2677					χ^2 -Wert 4,71	Freiheitsgrade 4	p-Wert 0,32
G/G*	18	42,9	20	32,8			
G/T	18	42,9	22	36,1			
T/T	6	14,3	16	26,2			
G/A	0	0,0	1	1,6			
T/A	0	0,0	2	3,3			
c.3320					OR 0,63	CI 0,51- 5,67	p-Wert 0,67
A/A*	40	95,2	58	95,1			
A/C	2	4,8	3	4,9			
c.3435					OR 0,92	CI 0,52- 1,61	p-Wert 0,79
C/C*	12	28,6	15	24,6			
C/T	18	42,9	28	45,9			
T/T	12	28,6	18	29,5	0,84	0,27- 2,58	

* Wildtyp

Die Untersuchung des SNPs c.3320A/C in allen ethnischen Gruppen deckte in der überwiegenden Zahl der Fälle (98,1 % in der Parkinson- und 97,3 % in der Kontrollgruppe) den Wildtyp A/A auf. Die übrigen Untersuchten waren an dieser Stelle heterozygot A/C; ein homozygoter Genotyp A/A lag bei keinem der untersuchten Individuen vor. Zwischen der Gruppe der Parkinsonpatienten und den Kontrollen konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypenhäufigkeiten ermittelt werden ($p = 0,55$).

Auch beim Vergleich der Genotypenverteilung des SNPs c.3435 wurde kein Unterschied ermittelt ($p = 0,53$). Sowohl in der Fall- als auch in der Kontrollgruppe wurde der Wildtyp C/C (24,9 % bzw. 20,0 %) seltener als der heterozygote Genotyp T/C (49,0 % bzw. 54,6 %) und als die homozygote Variante T/T (26,1 % bzw. 25,4 %) gefunden.

Bei der durchgeführten Subanalyse mit Parkinsonpatienten ausschließlich deutscher ($n = 265$) Herkunft und der entsprechend ethnisch angeglichenen Kontrollgruppe ($n = 123$) wurde für den SNP c.2677G/T/A ein großer χ^2 -Wert ($\chi^2 = 12,25$) ermittelt, der nach Einbeziehung der vier bestehenden Freiheitsgrade einen signifikanten p -Wert ($p = 0,016$) besitzt (vgl. Tabelle 3.4). Unabhängig von den anderen Testungen betrachtet müsste damit für diesen SNP die Nullhypothese, welche besagt, dass kein Unterschied in der Verteilung der Genotypenhäufigkeit zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe herrscht, verworfen und die Alternativhypothese angenommen werden. Die Interpretation dieses Befundes wird in Abschnitt 4.4.1 vorgenommen. Die Analyse der anderen SNPs ergab keine signifikanten Verteilungsunterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Eine zweite Subanalyse von Personen serbischer Abstammung (Fälle: $n = 42$; Kontrollen: $n = 61$) ergab, wie aus der Tabelle 3.4 hervorgeht, keine weiteren signifikanten Unterschiede in der Genotypenverteilung der drei untersuchten SNPs.

3.3.3 Assoziation im *MDR1*-Gen bei Neuroleptika-Patienten

In dieser zweiten Fall-Kontroll-Studie wurden 76 Patienten, die unter Therapie mit NL Bewegungsstörungen als Nebenwirkung entwickelt hatten, mit 37 entsprechend therapierten Patienten, die keine solchen Nebenwirkungen entwickelt hatten, hinsichtlich der Genotypenfrequenzen der genannten SNPs im *MDR1*-Gen verglichen. Die Tabelle 3.5 gibt die erhobenen Daten hierzu wieder; es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe gefunden werden.

Tab. 3.5: Häufigkeit der *MDRI*-Polymorphismen bei Patienten, die unter Therapie mit Neuroleptika Bewegungsstörungen entwickelten, im Vergleich zu Kontrollen

	Patienten mit Bewegungsstörungen		Patienten ohne Bewegungsstörungen		Statistische Berechnungen			
	n	%	n	%				
Alle Ethnien	76		37					
c.2677					χ^2 -Wert 2,96	Freiheitsgrade 4	p-Wert 0,56	
G/G*	23	30,3	14	37,8				
G/T	35	46,1	16	43,2				
T/T	10	13,2	6	16,2				
G/A	4	5,3	0	0,0				
T/A	4	5,3	1	2,7				
c.3320	A/A*	76	100,0	37	100,0	Kein Test durchgeführt		
	A/C	0	0,0	0	0,0			
c.3435	C/C*	14	18,4	10	27,0	OR	CI	p-Wert
	C/T	43 [#]	56,6	13 [°]	35,1	0,92	0,50- 1,66	0,78
	T/T	19	25,0	14	37,8	0,85	0,25- 2,77	
Nur deutscher Herkunft	68		31					
c.2677					χ^2 -Wert 2,54	Freiheitsgrade 4	p-Wert 0,64	
G/G*	19	27,9	10	32,3				
G/T	31	45,6	14	45,2				
T/T	10	14,7	6	19,4				
G/A	4	5,9	0	0,0				
T/A	4	5,9	1	3,2				
c.3320	A/A*	68	100,0	31	100,0	Kein Test durchgeführt		
	A/C	0	0,0	0	0,0			
c.3435	C/C*	11	16,2	7	22,6	OR	CI	p-Wert
	C/T	40 [#]	58,8	11 [°]	35,5	0,80	0,40- 1,56	0,53
	T/T	17	25,0	13	41,9	0,64	0,16- 2,42	

*Wildtyp; [#]Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: zu viele Heterozygote; [°]Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: zu wenig Heterozygote

Die Genotypenverteilung des SNPs c.2677 in der Gruppe der Patienten mit Bewegungsstörungen (Fallgruppe) ähnelt derjenigen der Kontrollgruppe: Die Wildtyp G/G (30,0 % in der Fall-, 37,8 % in der Kontrollgruppe) kommt seltener vor als der Genotyp T/G (46,1 % in der Fall- und 43,2 % in der Kontrollgruppe), aber häufiger als der Genotyp T/T (13,1 % in der Fall-, 16,2 % in der Kontrollgruppe). Die weiteren Genotypen T/A und G/A sind in der Gruppe der Patienten mit Bewegungsstörungen selten vertreten, ebenso in der Kontrollgruppe. Die statistische Prüfung der Ergebnisse belegte, dass kein signifikanter Unterschied in der Genotypenhäufigkeit des SNPs c.2677 besteht ($p = 0,56$).

Im Falle des SNP c.3320 zeigten alle untersuchten Individuen der Fall- und der Kontrollgruppe den Genotyp A/A, weshalb sich statistische Berechnungen erübrigten.

Bei der Analyse des SNP c.3435 wurde in der Fallgruppe eine Genotypenverteilung von C/C (Wildtyp) 18,4 %, T/C 56,6 % und T/T 25,0 % ermittelt. Nach dem in der Populationsgenetik geltenden Hardy-Weinberg-Gleichgewicht kommen in der untersuchten Gruppe zu viele Heterozygote vor. Ein umgekehrtes Bild zeigte sich in der

Kontrollgruppe für den SNP, in der mit 35,1 % zu wenig Heterozygote vorhanden waren (C/C = 27,0 %, T/T = 37,8 %). Der statistische Ermittlung der Riskoveränderung ergab dennoch keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,78$).

Auch bei dieser Assoziationsstudie wurde für eine Untergruppe deutscher Abstammung ($n = 68$) zusätzlich getrennte Berechnungen unternommen, in der sich keine signifikanten Unterschiede in der Genotypenhäufigkeit der drei untersuchten SNPs feststellen ließen (siehe Tabelle 3.5). Die Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht im Falle des SNP c.3435 wurden hier in gleicher Weise gefunden (in der Fallgruppe mit 58,8 % zu viele, in der Kontrollgruppe mit 37,9 % zu wenig Heterozygote). Weitere Subgruppen hinsichtlich der Abstammung separat zu analysieren, war aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht möglich.

4. DISKUSSION

Dieses Kapitel der Arbeit erläutert im ersten Abschnitt 4.1, warum die angewandten Methoden zur Bearbeitung der einzelnen Fragestellungen verwendet wurden. Die Familie R mit spinocerebellärer Ataxie wurde einer genomweiten Kopplungsanalyse unterzogen und dabei mehrere Regionen identifiziert, für die eine gekoppelte Vererbung mit der Krankheit wahrscheinlich ist. Diese werden in Abschnitt 4.2 näher vorgestellt und das weitere Vorgehen zur Identifizierung der genetischen Ursache der Krankheit in Familie R erläutert. In Abschnitt 4.3 werden die Ergebnisse der Feinkartierung sowie der qualitativen und quantitativen Mutationsanalyse der Gene *PARK1* bis *PARK8* bei den Parkinsonfamilien M, K und P diskutiert. Anschließend werden die Ergebnisse von zwei Assoziationsstudien im *MDR1*-Gen bei primärem Parkinsonsyndrom und Neuroleptika-induzierten Bewegungsstörungen erörtert (Abschnitt 4.4). Zuletzt werden in Abschnitt 4.5 Schlussfolgerungen geäußert.

4.1 Beurteilung der verwendeten Methoden

4.1.1 Genomweite Kopplungsanalyse mit *short tandem repeat*-Markern

Die genomweite Kopplungsanalyse der SCA-Familie R wurde unter Verwendung von 375 *short tandem repeat* (STR)-Markern durchgeführt. Bereits andere Studien haben gezeigt, dass die gewählte Anzahl von Markern ausreichend ist, um einen an die Krankheit gekoppelten Chromosomenabschnitt zu lokalisieren (Cagnoli *et al.*, 2006). Die verwendeten Marker wurden ausgewählt, weil sie erstens gleichmäßig über dem Genom verteilt waren ($9,0 \text{ cM} \pm 4,7 \text{ cM}$), und zweitens weil sie in der hiesigen Arbeitsgruppe bereits vorrätig waren. Die genomweite Kopplungsanalyse unter Verwendung von STR-Markern ist ein gängiges Verfahren, um sich der genetischen Ursache einer Krankheit innerhalb einer Familie zu nähern. Eine weitere Möglichkeit wäre gewesen, das Genom mittels Analyse von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) zu untersuchen. Im Gegensatz zu den STR-Markern sind SNPs weitaus zahlreicher im Genom vorhanden,

können aber in der Regel nur zwei Allele annehmen. Ein STR-Marker trägt aufgrund seiner zahlreich möglichen Allellängen mehr Informationen zur Kopplungsanalyse bei.

4.1.2 Genotypisierung und Haplotypisierung der Genorte *PARK1-PARK8* sowie *SCA5*

Die Genotypisierung und anschließende Haplotypisierung wurde für die Genorte *PARK1-PARK8* bei den Familien M, K und P mit familiärem Parkinsonsyndrom sowie für den Genort *SCA5* bei der SCA-Familie R durchgeführt. Die jeweiligen Marker wurden benutzt, da sie den das Gen umgebenden chromosomalen Bereich abdecken, im Fall von *PARK2* und *PARK8* sogar innerhalb des Gens liegen (vgl. Tab. 8.13). Die anschließende Haplotypisierung konnte bei Familie M und K per Hand vorgenommen werden, da es sich um kleine Familien handelt. Im Vorfeld dieser Arbeit war für Familie K bereits ein *Screening* auf Mutationen in den Genen *Parkin* (*PARK2*), *PINK1* (*PARK6*) und *DJ-1* (*PARK7*) mittels *single strand confirmation polymorphism* (SSCP)-Analyse durchgeführt worden. Das Prinzip der SSCP-Analyse beruht darauf, dass durch eine Mutation eine Veränderung der DNA-Einzelstrangkongformation verursacht wird, die sich beim Wandern des Fragmentes in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel als Mobilitätsänderung äußert. Die Sensitivität dieser Methode ist deutlich < 100 % (Fan *et al.*, 1993), weshalb eine erneute Überprüfung dieser Gene mittels Haplotypisierung gerechtfertigt schien. Im Falle der Familien M, K und P sollte die Genotypisierung und Haplotypisierung möglichst viele Genorte vorzeitig ausschließen und somit kostspielige und zeitaufwändige Sequenzanalysen ersparen.

4.1.3 Methoden der qualitativen und quantitativen Mutationsanalyse

Die konventionelle Sequenzierung mittels Kettenabbruchverfahren nach Sanger (vgl. 2.3.7) ist eine sehr sensitive Methode zur Mutationsanalyse, die alle qualitativen Veränderungen der DNA im untersuchten Bereich detektiert. Der Aufwand der Sequenzierung mittels fluoreszenzmarkierter *Primer* (vgl. 2.3.7.2) ist relativ groß, da für

jedes ddNTP ein eigener Reaktionsansatz hergestellt wird. Daher wurde diese Methode nur für das *Parkin*-Gen (Exons und Exon/Intron-Übergänge) bei Familie M angewandt. Die übrigen Sequenzierungen wurden mittels fluoreszenzmarkierter Nukleotide (vgl. 2.3.7.3) durchgeführt. Um eine höhere Sensitivität zu erreichen, wurden bei allen Sequenzierungen sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärtsstrang analysiert und oft zwei Familienmitglieder untersucht (vgl. Tab. 3.3). Eine Limitierung der konventionellen Sequenzierung ist allerdings, dass Deletionen und Amplifikationen ganzer Exons nicht aufgespürt werden können.

Als *Screening* zur Erfassung dieser quantitativen DNA-Mutationen stehen zwei Methoden zur Auswahl: Die in dieser Arbeit verwendete MLPA-Analyse sowie die *real-time*-PCR. Ein Vergleich der beiden Methoden zeigt jedoch, dass mit der MLPA-Analyse eine deutliche Kosten- und Zeitersparnis realisierbar ist, ohne die Qualität der Versuchsergebnisse zu beeinträchtigen (Djarmati *et al.*, im Druck). Bei der *real-time*-PCR ist es notwendig, für jedes Exon eine eigene PCR zu etablieren. Das ist sehr kostenintensiv, insbesondere gilt das für die Sonden und speziellen Reagenzien der fluoreszenz-basierten *real-time*-PCR. Bei der MLPA-Analyse besteht aufgrund der Möglichkeit mehrere Exons simultan in einem Ansatz zu untersuchen ein klarer Zeitvorteil. Allerdings ist man bei der MLPA-Analyse abhängig von den angebotenen *Screening*-Kits, wobei hingegen die *real-time*-PCR-Methode für jedes gewünschte Exon anwendbar ist. Die Auswahl der Methode richtet sich daher nach der jeweiligen Fragestellung. Für die hier untersuchten Proben war ein *Screening* mittels MLPA-Analyse zunächst ausreichend.

4.1.4 Methode der Genotypisierung von *single nucleotide polymorphisms* am *LightCycler*

Es hat sich gezeigt, dass die in dieser Arbeit verwendete Methode sich gut eignet, um *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) zu genotypisieren. Die Vorzüge dieser Methode bestehen darin, dass sofort eine Differenzierung zwischen Wildtyp sowie homo- und heterozygoter Mutante möglich ist. Im Falle des SNPs c.2677G/T/A in Exon 21 erlaubt die Methode eine eindeutige Unterscheidung aller sechs möglichen Genotypen (Arjomand-Nahad *et al.*, 2004). Ein Nachteil bei der Benutzung des *LightCyclers* ist, dass die pro Lauf

analysierte Probenzahl auf 32 Stück (inklusive Kontrollen und Leerwert) begrenzt ist. Ein höherer Durchsatz wäre bei der Anwendung der dHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*) möglich gewesen. Allerdings ist es bei der dHPLC für die Unterscheidung aller homozygoten Allelkonstellationen (Wildtyp und Mutanten) notwendig, die PCR-Produkte zu mischen und anschließend ein zweites Mal zu messen. Dadurch wäre wiederum erstens ein Zeitverlust und zweitens ein höherer Kostenaufwand entstanden. Da zudem die Technik der dHPLC-Anlage recht komplex ist und sie somit eine hohe Störanfälligkeit besitzt, wurde die Verwendung des *LightCyclers* der dHPLC vorgezogen.

4.2 Haplotypisierung und genomweite Kopplungsanalyse der SCA-Familie R

Bei der Familie R trat gehäuft ein breites Spektrum an neurologischen Defiziten auf. Viele Betroffene zeigten das Bild einer SCA, isoliert oder in Kombination mit Blicklähmungen, kortikaler Demenz, Dystonie, Pyramidenbahnzeichen, Tremor und Pallhypästhesie (vgl. 2.1.1). Für die Betroffenen mit FTD (L-1693) und ALS (V.3) sowie drei Nachkommen wurde bereits eine Mutation im *Dynactin*-Gen beschrieben (Münch *et al.*, 2005; Rosenbohm *et al.*, eingereicht), weshalb diese Personen und ihre Nachkommen bei der Berechnungen der *LOD-Scores* im Anschluss an die Kopplungsanalyse nicht berücksichtigt wurden. Für die übrigen Betroffenen können zwei verschiedene Möglichkeiten für die Vielfalt der Symptome in Betracht gezogen werden: Einerseits könnten die verschiedenen neurologischen Störungen durch *eine* Mutation in einem bereits bekannten oder noch unbekanntem *SCA-Locus* verursacht sein; andererseits könnten *verschiedene* Mutationen existieren, welche bei Personen, die von beiden Mutationen betroffen sind, zu einer Überlagerung der Phänotypen führen. Die vorliegende Arbeit wurde im Wesentlichen unter der ersten Annahme erstellt und wird im Hinblick darauf diskutiert.

Von den 28 bekannten, autosomal-dominant vererbten SCAs gelang eine Identifizierung der genetischen Ursache bislang erst für 14 Formen, denn häufig ist die Suche nach der krankheitsverursachenden Mutation ein über Jahre andauernder Prozess. Die häufigsten bekannten Mutationen sind Trinukleotid-Repeat-Expansionen (*SCA1*, 2, 3, 6, 7, 8, 12, 17 und *DRPLA*), aber auch Deletionen und *Missense*-Mutationen (*SCA5*, 13, 14 und 27) sind beschrieben worden. Im Fall von *SCA10* handelt es sich um eine intronische Pentanukleotid-Repeat-Expansion (s. Tab. 1.1). Da eine Trinukleotid-Repeat-Expansion der häufigste bekannte Mutationstyp bei SCA ist, kann vermutet werden, dass diese Art von Mutation auch in weiteren Fällen vorliegt, so auch bei Familie R.

4.2.1 Haplotypisierung des Genorts *SCA5*

Im Vorfeld der genomweiten Kopplungsanalyse konnte mittels Haplotypisierung der Genort *SCA5* als möglicher veränderter Locus ausgeschlossen werden (vgl. 3.1.1), da nur drei von sechs Betroffenen über einen gemeinsamen Haplotypen verfügen. Die Untersuchung des Genorts war bei Familie R angebracht, denn es existieren bis heute nur wenige Familien, in denen Mutationen im *Beta-III-Spektrin*-Gen beschrieben wurden (Ikeda *et al.*, 2006). Die Betroffenen dieser publizierten Familien zeigen eine geringere Variabilität der Symptome als die der Familie R (Bürk *et al.*, 2004; Ranum *et al.*, 1994; Stevanin *et al.*, 1999). Da jedoch bekannt ist, dass sich ataktische Krankheiten der gleichen Entität klinisch unterschiedlich manifestieren können (Manto, 2005), wäre ein Ausschluss des Genorts *SCA5* allein auf Grundlage des klinischen Vergleichs der Familie R mit den anderen Familien nicht ausreichend gewesen.

4.2.2 Genomweite Kopplungsanalyse

Die genomweite Kopplungsanalyse von sieben Individuen und 19 Ahnen der Familie R ergab für mehrere Regionen des Genoms *Multipoint-LOD-Scores* > 2, von denen drei (Chr. 2, 3 und 18) im Kapitel 3.1.2 dargestellt wurden. Der höchste *LOD-Score* ($Z = 2,79$) wurde

im Bereich der zytogenetischen Banden 18p11.21 - q21.1 für den Marker D18S1124 errechnet (vgl. Tab. 3.2).

Für die *LOD-Scores* einer Kopplungsanalyse existiert ein maximaler Erwartungswert, welcher sich aus der Anzahl der informativen Betroffenen multipliziert mit dem Faktor 0,3 abschätzen lässt. Im Falle der Familie R wurden 12 eindeutig Betroffene in die Berechnungen eingeschlossen (vgl. Abbildung 3.3), womit sich ein Erwartungswert von 3,6 ergibt. Die Diskrepanz zwischen dem tatsächlich ermittelten Wert und dem maximal zu erwartenden Wert ist dadurch bedingt, dass die genetischen Analysen nur bei vier Betroffenen aus der fünften und sechsten Generation tatsächlich durchgeführt werden konnten.

Die aussichtsreichste Region im Genom befindet sich, wie bereits erwähnt, auf Chr. 18 in dem Bereich 18p11.21 - q21.2. Sie umfasst ein Gebiet von 33,9 cM (43,49 - 77,36 cM) und ist 38,8 Mb groß (zwischen 12,9 Mb und 51,5 Mb). In dieser Region wurden 213 Gene gefunden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>). Die im Rahmen dieser Arbeit erstellte Haplotypisierung der Region unter Berücksichtigung aller Familienmitglieder zeigt Folgendes: Vier der sieben untersuchten Erkrankten und zwei klinisch als unbekannt eingestufte Familienmitglieder (L-1673 und L-1686) teilen einen gemeinsamen Haplotypen in dieser Region (vgl. Abbildung 3.7). Eine der erkrankten Personen ohne den Haplotyp ist L-1689, die verwandtschaftlich weit von den anderen Betroffenen entfernt ist. Es könnten erstens eine Vielzahl an Rekombinationen stattgefunden haben, die dazu geführt haben, dass ein kleiner Haplotyp, den letztendlich alle gemeinsam haben, zwischen zwei der erhobenen Markern liegt oder eng an die dargestellten Marker angrenzt und im Rahmen der genomweiten Kopplung noch nicht aufgedeckt wurde. Zweitens ist es möglich, insofern die angeheiratete Mutter von L-1689 (III.1) tatsächlich betroffen war, dass L-1689 an der von ihr vererbten Krankheit litt und somit kein genetischer Zusammenhang zwischen der Erkrankung von L-1689 und der der anderen Familienmitgliedern besteht und damit L-1689 für die Haplotypisierung nicht informativ ist. Die anschließende Feinkartierung wird dieser Frage weiter nachgehen. Der Betroffene L-1693 ist für die Haplotypisierung nicht informativ, da für ihn bereits eine Mutation im *DCTN1*-Gen entdeckt wurde (Münch *et al.*, 2005). Auch bei L-1679 fehlt der gemeinsame Haplotyp. Die DNA der Person war kontaminiert, weshalb sie auch in die *Multipoint*-Kopplungsanalyse nicht eingeschlossen wurde. In diesem Fall ist eine Überprüfung der Marker mit frischer DNA notwendig, um ein verlässliches Ergebnis zu erreichen. Bei den

klinisch als unbekannt eingestuften Familienmitgliedern mit dem gemeinsamen Haplotyp könnte eine reduzierte Penetranz vorliegen. Dieses Phänomen wurde auch schon für andere SCA-Subtypen beschrieben, so z. B. bei SCA17 (Nakamura *et al.*, 2001). Möglich ist auch, dass die besagten Familienmitglieder erst in einem höheren Lebensalter erkranken.

4.2.2.1 Überlappung einer Kandidatenregion mit dem Genort SCA28

Interessanterweise wurde für die erläuterte Region auf Chr. 18p11.21 - q21.2 eine Überlappung mit dem bereits bekannten Genort SCA28 festgestellt (Cagnoli *et al.*, 2006). Dieser Genort wurde bei einer italienischen Familie im Rahmen einer genomweiten Kopplungsanalyse mit einem maximalen LOD-Score von $Z = 4,77$ im Bereich 18p11.22 - q11.2 lokalisiert und mittels Haplotypisierung konnte bei den Betroffenen ein gemeinsamer Haplotyp von ca. 7,9 Mb Größe gefunden werden. Bei Familie R konnte auf Chr. 18 eine Region von 38,8 Mb identifiziert werden, in der der höchste *Multipoint*-LOD-Score $Z = 2,79$ beträgt. Um einen höheren Wert zu erhalten, wird es notwendig sein, von weiteren betroffenen Individuen der Familie R genetisches Material zu gewinnen und in die Untersuchung mit einzuschließen.

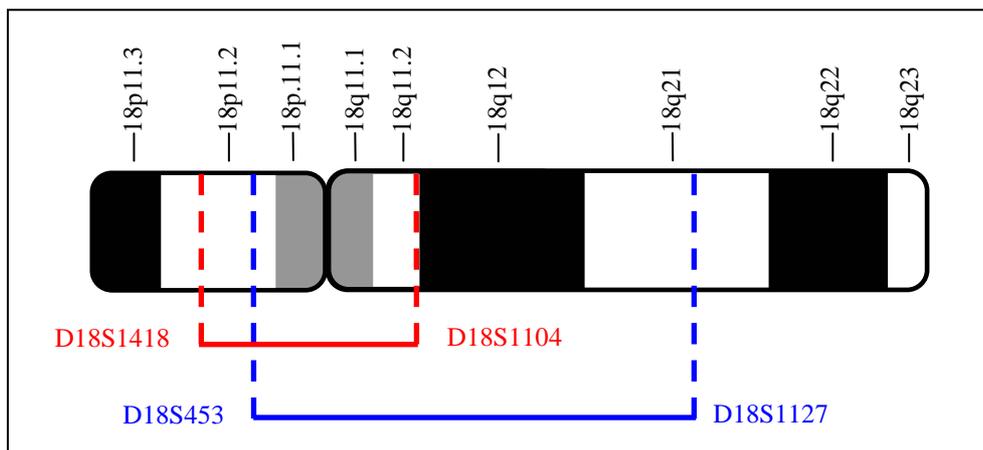


Abb. 4.1: Überlappung der gekoppelten Region bei Familie R mit dem Locus SCA28. Oberhalb des quer liegenden Chromosoms 18 sind die zytogenetisch unterscheidbaren Banden 18p11.3 bis 18q23 angezeigt (kurzer Arm, p; langer Arm, q), darunter ist der SCA28-Genort rot und die in dieser Arbeit erhobene Region blau markiert. Der sich überlappende Bereich befindet sich zwischen den Marker D18S453 und D18S1104 (18p11.21 - q11.2), hat eine Größe von 4,5 Mb bzw. 6,0 cM und umfasst das Zentromer.

Die die Überlappung begrenzenden STR-Marker aus der Veröffentlichung von Cagnoli und aus dieser Arbeit sind in Abbildung 4.1 eingetragen. Der Bereich hat eine Größe von 4,6 Mb und reicht von 43,5 bis 49,6 cM.

Die Betroffenen der italienischen Familie leiden an einer SCA, die zwischen dem 12. und 36. Lebensjahr (im Durchschnitt mit 19,5 Jahren) sehr früh begann und sich langsam progredient fortsetzte. Zusätzlich zeigten die Betroffenen zu Beginn der Krankheit einen Blickrichtungsnystagmus, während länger Erkrankte verlangsamte Sakkaden, Blickparesen und oft eine Ptosis entwickelten. Zusätzlich hatten viele Betroffene Pyramidenbahnzeichen in Form von gesteigerten Sehnenreflexen (Cagnoli *et al.*, 2006). Das klinische Bild der Familie R zeigt teilweise Übereinstimmungen der Symptome mit denen der italienischen Familie. Auch hier tritt eine SCA auf, in vier Fällen in Kombination mit Blickparesen und in zwei Fällen mit Pyramidenbahnzeichen. Die Krankheit verlief ebenfalls langsam progredient. Zusätzlich leiden einige Betroffene an kortikaler Demenz, Dystonie, Tremor oder Pallhypästhesie (vgl. Tab. 2.1), was in der italienischen Familie nicht auftritt. Auch das mittlere Erkrankungsalter der Familie R liegt mit 37,8 Jahren höher. Allerdings wurde in der Vergangenheit auch für andere SCA-Varianten eine große Variation im Phänotyp und Erkrankungsalter gezeigt (Schöls *et al.*, 2004). Von vier italienischen Patienten wurde eine Magnetresonanztomographie (MRT) angefertigt, wobei eine rein cerebelläre Atrophie gefunden wurde. Fünf Betroffene der Familie R ließen ebenfalls eine MRT durchführen, auch hier zeigte sich eine rein cerebelläre Atrophie, in einem Fall (V.9) kombiniert mit einer bifrontotemporalen Atrophie und Hydrocephalus (Daten nicht dargestellt). Der Vergleich der Familie R (L-1693 und V.5 wurden nicht berücksichtigt, da für sie bereits eine Mutation identifiziert wurde) mit der italienischen Familie zeigt neben Gemeinsamkeiten auch Unterschiede auf. Dennoch ist es denkbar, dass der gleiche Genort verantwortlich ist. Im Anschluss an diese Arbeit ist es notwendig, die Region 18p21.2 - q21.2 mit einer höheren Markerdichte feiner zu kartieren, um zu beobachten, ob sich die Überlappung auf Chr. 18 bestätigt und um diese gegebenenfalls weiter einzuengen.

4.2.2.2 Die molekulare Pathogenese der spinocerebellären Ataxie als Ausgangspunkt für die Suche nach Kandidatengenen in der Region 18p11.21 - q21.2

Wie bereits erwähnt ist der häufigste Mutationstyp in der Gruppe der SCAs eine CAG-Repeat-Expansion; bei *SCA1*, 2, 3, 6, 7, 17 und *DRPLA* wurde sie in kodierenden

Bereichen spezifischer Gene nachgewiesen und führt zu einer abnormal langen Polyglutaminkette innerhalb des exprimierten Proteins. Die veränderten Proteine aggregieren und bilden nukleäre oder zytoplasmatische Einschlusskörperchen (Zoghbi und Orr, 2000). Es ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob die Einschlusskörperchen toxisch wirken, oder ein Versuch der Zelle sind, das Zellmilieu zu stabilisieren. Die Einschlüsse enthalten weitere zelluläre Komponenten, unter anderem das Ubiquitin. In gesunden Zellen markiert Ubiquitin diejenigen Proteine, die durch das Proteasom abgebaut werden sollen. Der Abbau der veränderten Proteine scheint erschwert; des Weiteren gibt es Anhaltspunkte, dass die Polyglutamin-Proteine die Aktivität des Proteasoms drosseln (Park *et al.*, 2005). Aufgrund des häufigen Vorkommens der CAG-Repeat-Expansionen bei SCA ist es denkbar, dass auch bei weiteren Genorten diese Art der Mutation als Krankheitsursache vorliegt. Die in dieser Arbeit kartierte Region 18p11.21 - q21.1 wurde daher nach Genen mit CAG-Repeats durchsucht (Referenzsequenzen: NT_010859.14 von 12,0 - 15,4 Mb ab dem Telomer des p-Arms von Chr. 18; NT_010966 von 16,7 - 50,3 Mb; NT_025028.13 von 50,3 - 52,0 Mb). Unter anderem wurde dabei ein CAG₍₂₄₎-Repeat im Intron 1 des *Transkriptionsfaktors 4 (TCF4) Isoform B* identifiziert. Bei einer Expansion des Repeats wäre es möglich, dass dies pathogenetische Konsequenzen hat, z. B. durch Veränderung des posttranskriptionellen *Splicings*. Mit SCA8 und SCA12 sind bereits zwei SCA-Genorte bekannt, die durch Trinukleotid-Repeat-Expansionen in nicht-kodierenden Bereichen verursacht werden (Holmes *et al.*, 1999; Koob *et al.*, 1999), welche vermutlich zu einer Fehlregulation der Genexpression führen. Der *TCF4 Isoform B* (NP_003199) ist ein 667 Aminosäuren großes Protein mit Homologie zu einfachen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren. Bislang wurde der *TCF4* in Verbindung mit bipolaren Störungen (Del-Favero *et al.*, 2002) und dem seltenen Pitt-Hopkins Syndrom diskutiert (Amiel *et al.*, 2007). Letztere Erkrankung ist eine Enzephalopathie, die mit Epilepsie, mentaler Retardierung und intermittierender Hyperventilation einhergeht. Neben dem Repeat in *TCF4* wurde ein weiterer CAG₍₆₎-Repeat im Intron 27 des Gens *Laminin Alpha 3* gefunden. Dieses Gen wurde bislang mit Hautkrankheiten assoziiert. Bei der Suche nach einer CTG-Repeat-Expansion, wie sie für SCA8 beschrieben ist, wurde ein CTG₍₆₎-Repeat im *SET binding protein 1*, Intron 1 sowie ein weiterer im Gen *CXXC finger 1*, Exon 11 gefunden. Bevor die Mitglieder der Familie R auf das Vorkommen von Repeat-Expansionen in einem der angesprochenen Gene untersucht werden, soll abgewartet

werden, ob die entsprechende Region auf Chr. 18 bei der anstehenden Feinkartierung bestätigt und ggf. eingengt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit, Kandidatengene zu evaluieren, ist die Recherche in Datenbanken. Mit dem Wissen über die Zusammenhänge der molekularen Pathogenese, in die sich das gesuchte Gen einfügen lassen muss, können interessante Gene ausgewählt werden. Im Folgenden werden weitere Hypothesen zur Pathogenese von SCA diskutiert.

So ist das Phagosom-Lysosom-System (Autophagie) ein weiterer Zellmechanismus zum Abbau von Aggregaten. In einer Studie wurde gezeigt, dass dieser Prozess eine wichtige Rolle bei dem Abbau von Aggregaten aus mutiertem Ataxin 1 bei SCA1 spielt (Iwata *et al.*, 2005).

Eine Veränderung der Kalzium-Homöostase wird ebenfalls in Zusammenhang mit SCA-Erkrankungen beobachtet. Es ist bekannt, dass eine Überladung des Zytoplasmas mit Kalzium zytotoxisch wirken und den Zelltod einleiten kann (Orrenius *et al.*, 2003). In *Ataxin 1*-mutierten Mäusen wurde eine Herunterregulierung mehrerer neuronaler Gene beobachtet, die vor allem in den *Purkinje*-Zellen des Kleinhirns exprimiert werden und in Prozesse der Kalzium-Homöostase involviert sind (Serra *et al.*, 2004). Darüber hinaus handelt es sich bei dem krankheitsverursachenden Protein von SCA6 um einen spannungsabhängigen Kalziumkanal. Es ist jedoch unklar, wie sich die Mutation auf die Funktion des Kanals auswirkt.

Für SCA27 wurde der Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF14 als krankheitsverursachendes Protein identifiziert. FGF14 ist in den neuronalen Signaltransfer involviert, wobei in Tierversuchen beobachtet wurde, dass Mäuse mit einer Mutation für FGF14 eine reduzierte Antwort auf Dopamin-Agonisten aufwiesen. Daher scheint auch das dopaminerge System zumindest bei SCA27 eine Rolle zu spielen. Das Protein Beta-III Spectrin (SCA5) ist wiederum assoziiert mit dem Glutamat-Transporter EAAT4, der insbesondere in den *Purkinje*-Zellen exprimiert wird. Es wird vermutet, dass Mutationen im *Beta-III Spectrin*-Gen die Verteilung und Stabilität dieses Transporters verändern. Demnach könnte ein gestörter Glutamat-Signaltransfer ein Faktor bei der molekularen Pathogenese von SCA5 sein (Duenas *et al.*, 2006).

Aus diesen Informationen lässt sich noch kein einheitliches Bild zu der molekularen Pathogenese der SCAs ablesen. Dennoch kann es hilfreich sein, diese Hypothesen nach Vollendung der Feinkartierung bei der Recherche nach Kandidatengenen zu berücksichtigen.

4.2.2.3 Die chromosomalen Abschnitte 2p25.3 - p25.1 und 3p24.3 - p14.3 als weitere Kandidatenregionen

Sollten die nachfolgenden Untersuchungen auf Chr. 18 keine genetische Ursache identifizieren können, so müssen die anderen Regionen mit erhöhten *LOD-Scores* einer näheren Betrachtung unterzogen werden. Die Haplotypisierung der in Kapitel 3.1.2 vorgestellten Regionen auf Chr. 2 wurde mit dem Ergebnis durchgeführt, dass neun Familienmitglieder (vier Kranke, fünf als klinisch unbekannt eingestufte) ein gemeinsames Allel des Markers D2S2393 tragen und vierzehn ein gleiches Allel für den Marker D2S2166 (Haplotypisierung nicht dargestellt). Für die Region auf Chr. 3 ergab die Haplotypisierung, dass fünf Betroffene und fünf als klinisch unbekannt eingestufte Individuen ein gemeinsames Allel des Markers D3S3521 teilen (Ergebnisse nicht dargestellt). In beiden Fällen wird eine höhere Aussagekraft der Haplotypisierung erst im Zuge der Feinkartierung erreicht werden.

Die Suche nach CAG-/ CTG-*Repeats* in der Region 2p25.3 - p25.1 (20 cM oder 8,8 Mb groß) mit erhöhten *Multipoint-LOD-Scores* bis $Z = 2,32$ blieb allerdings erfolglos (Referenzsequenz: NT_022327.14 von 0 - 1,2 Mb ab dem Telomer des p-Arms von Chr. 2; NT_022221.12 von 1,2 - 3,5 Mb; NT_022139.12 von 3,6 - 5,0 Mb; NT_005334.15 von 5,1 - 8,8 Mb). Es wurden keine repetitiven Sequenzen > 4 *Repeats* entdeckt, so dass eine mögliche Krankheitsursache, falls in dieser Region, vermutlich nicht auf einen solchen Mutationstyp zurückzuführen ist. Die Recherche in der Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=gene) nach dem Expressionsmuster der in dieser Region vorhandenen Gene deckte sechs Gene auf, die ausschließlich oder unter anderem im Gehirn exprimiert werden (Symbole: *ACPI*, *MYTIL*, *TSSCI*, *RNASEH1*, *SOX11* und *ID2*). Falls die weiteren Untersuchungen zeigen, dass die Region 2p25.3 - p25.1 die genetische Ursache der Krankheit der Familie R beherbergt, sollten zunächst diese Gene auf Mutationen untersucht werden.

Auch für die Region 3p24.3 - p14.3 wurden erhöhte *LOD-Scores* ($2,24 \leq Z \leq 2,65$) errechnet. Der Bereich überlappt im Übrigen nicht mit der Lokalisation des Gens *Ataxin 7*. CAG-*Repeat*-Mutationen in *Ataxin 7* verursachen SCA7. Der Genort wurde in der Region 3p21.1 - p12 kartiert, das Gen befindet sich bei 63,87 - 63,46 Mb. Die in dieser Arbeit ermittelten erhöhten *LOD-Scores* auf Chr. 3 schließen zunächst den Bereich zwischen 19,50 - 60,52 Mb ein und liegt somit weiter vom Zentromer entfernt als *Ataxin 7*. Zudem

wurde während der Vorarbeiten (vgl. Abschnitt 1.4) SCA7 als Krankheitsursache ausgeschlossen. Allerdings zeigt die Abb. 3.5, die die errechneten *Multipoint-LOD-Scores* von Chr. 3 darstellt, einen erneuten Anstieg des *Score* in Höhe des Markers D3S4542 (vgl. Tab. 8.14) auf $Z = 2,30$ an. In anschließenden Analysen muss untersucht werden, ob an D3S4542 angrenzende Marker in Richtung Telomer und in Richtung Zentromer *LOD-Scores* > 2 annehmen und so eventuell ein weiterer interessierender Bereich entsteht.

Der Grundstein für eine effektive Suche nach der krankheitsverursachenden Mutation in der Familie R ist mit der genomweiten Kopplungsanalyse gelegt worden. Außerdem wurde hier erläutert, dass es viele Hypothesen gibt, auf deren Grundlage Kandidatengene auf bestimmten chromosomalen Abschnitten ermittelt werden können. Bevor jedoch ein Mutationsscreening in diesen Genen sinnvoll ist, sollten die entsprechenden Regionen durch eine Feinkartierung bestätigt und auf einen kleineren Bereich eingegrenzt werden. Als nächster Schritt ist daher die Kopplungsanalyse fortzuführen, damit bestehende Lücken in der genomweiten Kopplungsanalyse von > 15 cM Abstand geschlossen werden. Dabei besteht die Möglichkeit, dass weitere kleine Regionen entdeckt werden, für die die *Multipoint-Kopplungsanalyse* erhöhte *LOD-Scores* ergibt. Anschließend muss in allen Bereichen, die *LOD-Scores* > 2 aufzeigen, eine Feinkartierung durchgeführt werden, wobei die Regionen durch dichter gewählte STR-Marker in einer höheren Auflösung dargestellt werden. Bei der Feinkartierung wird das genetische Material von allen zur Verfügung stehenden Individuen benutzt, und die Haplotypen in der Region werden auf dem Stammbaum verfolgt. Dieses Vorgehen soll dazu führen, dass im besten Fall nur eine Region des Genoms in Betracht kommt, die pathogene Mutation zu tragen. In dieser können dann nach oben gezeigtem Vorbild Kandidatengene identifiziert und mit der Mutationsanalyse begonnen werden.

4.3 Haplotypisierung und Mutationsanalyse bei Familien mit Parkinsonsyndrom

4.3.1 Gewonnene Erkenntnisse hinsichtlich einer genetischen Ursache bei den Familien M, K und P

Es wurde untersucht, ob sich mittels Haplotypisierung und anschließender qualitativer sowie quantitativer Mutationsanalyse bei den drei Familien M, K und P die genetische Ursache für das familiäre Parkinsonsyndrom (PS) finden lässt. Die Untersuchungen blieben bis jetzt unauffällig, im Einzelnen gelang jedoch der Ausschluss der im Folgenden genannten Bereiche:

Durch die Haplotypisierung der Genorte *PARK1* bis *PARK8* bei Familie M wurde *PARK6* (*PINK1*) ausgeschlossen (vgl. Abbildungen 3.8 und 3.9). Die Intention, bereits mit Hilfe der Haplotypisierung möglichst viele der *PARK*-Loci auszuschließen, konnte nicht gut umgesetzt werden. Dies ist auf die kleine Größe der Familie zurückzuführen. Allerdings ließen sich durch die anschließende vollständige Sequenzierung von *PARK2* (*Parkin*) und *PARK7* (*DJ-1*) diese beiden Genorte ausschließen (s. Tab. 3.3). Von *PARK1* (*SNCA*) wurde das dritte Exon analysiert, sowie von *LRRK2* die Exons 24, 25, 29, 31, 35, 38, 40 und 41, für die bereits pathogene Mutationen beschrieben sind bzw. im Fall von *LRRK2* auch für strukturelevante Domänen kodieren (*SNCA*: Polymeropoulos *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 1998; Zarranz *et al.*, 2004; *LRRK2*: Paisan-Ruiz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004; Di Fonzo *et al.*, 2005) (vgl. Tab. 3.3). Dadurch konnten bereits bekannte und teilweise häufige Ursachen in diesen beiden Genen ausgeschlossen werden. Schließlich zeigte auch das *Screening* auf Gendosis-Veränderungen mittels MLPA-Analyse, dass diese nicht die Ursache für das PS bei Familie M sein können (vgl. Tab. 2.6 und Abschnitt 3.2.3). Die Krankheitsursache liegt also außerhalb der untersuchten Bereiche, und weitere Analysen sind notwendig, um sie zu identifizieren (siehe Abschnitt 4.3.2).

Im Fall von Familie K lieferte die Haplotypisierung keine wesentlichen Ergebnisse (vgl. Abbildung 3.10), da es für jeden der untersuchten Genorte möglich war, einen gemeinsamen Haplotypen bei drei Betroffenen zu finden und für den vierten Betroffenen

(stets L-1436 oder deren Ehemann) eine andere kausale Genmutation oder eine sporadische Erkrankung anzunehmen. Folglich hätten alle gekoppelten *PARK*-Loci sequenziert werden müssen, worauf aber aufgrund des hohen Kosten- und Arbeitsaufwandes verzichtet wurde. Lediglich im Falle von *SNCA* und *LRRK2* wurden die Exons untersucht, für die bereits Mutationen beschrieben wurden (vgl. Tab. 3.3), da diese im Rahmen der Vorarbeiten noch nicht untersucht worden waren. Diese Sequenzabschnitte sowie mögliche Gendosis-Veränderungen der in der Tabelle 2.6 genannten Exons konnten mittels Sequenzierung bzw. MLPA-Analyse als krankheitsverursachend ausgeschlossen werden.

Auch wenn diese Erkenntnisse noch keine wesentliche Annäherung an die Mutation bedeuten, lässt sich anhand der Familie K gut verdeutlichen, dass es bei genetischen Analysen von familiär auftretenden Bewegungsstörungen wichtig ist, auch über den Gesundheitszustand von angeheirateten Personen informiert zu sein. Hätte man für den Ehemann von L-1346 angenommen, dass er gesund sei, so hätte die Haplotypisierung der untersuchten Genorte den Ausschluss von *PARK1*, *PARK2* und *PARK8* ergeben (vgl. Abschnitt 3.2.1). Dieser Ausschluss ist bei Berücksichtigung des tatsächlichen Phänotyps gar nicht zulässig und illustriert, wie wichtig die oft vernachlässigte Untersuchung von „gesunden“ Angehörigen ist.

Für Familie K sollte zum Ausschluss der untersuchten Genorte eine Erweiterung der Familie angestrebt werden, um mehr Informationen in die Haplotypisierung einschließen zu können. Des Weiteren könnte es gelingen, durch detaillierte klinische Untersuchungen von L-1436 und deren Ehemann Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, wessen Symptomatik besser mit der von L-1435 übereinstimmt und so möglicherweise Rückschlüsse über den Vererbungsweg zu ziehen.

Bei Familie P erreichte die Haplotypisierung den Ausschluss der Genorte *PARK1* - 3, *PARK5* und *PARK7* (vgl. Abschnitt 3.2.1). Die anschließenden Sequenzierungen schlossen auch das gesamte *PINK1*-Gen (*PARK6*) und die bereits erwähnten Exons von *LRRK2* (*PARK8*) als krankheitsverursachend aus (vgl. Tab. 3.3), ebenso wie bekannte Gendosis-Veränderungen der *PARK*-Loci ausgeschlossen werden konnten (vgl. Abschnitt 3.2.3). Die genetische Ursache des familiären PS muss sich also außerhalb der hier untersuchten Bereiche befinden; die weitere Suche danach wird in Abschnitt 4.3.2 beschrieben.

Ein Problem bei Familie P stellen die Befunde dar, dass für drei der sieben untersuchten Genorte überzählige Haplotypen bzw. Allele eines Markers vorhanden sind. In einer Elterngeneration existieren normalerweise vier Haplotypen, die sich auf die Filialgeneration – unter Berücksichtigung von Rekombinationsereignissen – verteilen. Die Untersuchungen zeigen, dass für *PARK6* in der Filialgeneration (L-2473, L-2474 und L-2469) fünf verschiedene Haplotypen existieren (vgl. Abb. 3.11). Eine mögliche Ursache ist, dass eine der drei Personen einen anderen Vater als seine Geschwister hat. Auch im anderen Zweig der Familie (L-2398, L-2399, L-2401 und L-2402) wurden in Abschnitten von *PARK1* und *PARK8* zu viele (> 4) Allele beobachtet. Fehler im Rahmen der Genotypisierung konnten durch eine zweifache Wiederholung der Analysen ausgeschlossen werden. Hier, wie auch im erstgenannten Fall, sind weitere Untersuchungen zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse notwendig. Eine Möglichkeit besteht darin, weitere über das Genom verteilte STR-Marker zu untersuchen und die Ergebnisse einer statistischen *Relationship*-Schätzung zu unterziehen (beispielsweise mit dem Computerprogramm PREST). Sollte auch dieses Vorgehen kein eindeutiges Resultat liefern, so kann versucht werden, neue Blutproben der Familienmitglieder zu erhalten, um so eine mögliche Verwechslung auszuschließen und eine erneute Haplotypisierung durchzuführen. Falls sich herausstellt, dass es sich bei ein oder mehreren Personen um Halbgeschwister handelt, so muss diese Information bei der Haplotypisierung beachtet werden, wobei sich dieser Zustand auch als hilfreich bei der Identifizierung des krankheitsassoziierten Haplotyps erweisen kann.

4.3.2 Weitere Vorgehensweise

Die bisher unternommenen Anstrengungen haben zum Ausschluss vieler Gen- und Genabschnitte geführt, aber auch Probleme im Fall von Familie K und P aufgeworfen. Diese sollten zunächst gelöst und die Ergebnisse der Haplotypisierung anschließend neu beurteilt werden, bevor weitere Sequenzierungen unternommen werden. Zum Ausschluss weiterer in Frage kommender Sequenzbereiche und letztendlich zur Identifizierung des pathogen veränderten Sequenzabschnitts sollte bei anschließenden Untersuchungen Folgendes berücksichtigt werden: Erstens ist es denkbar, dass sich im Falle von *SNCA* (*PARK1*) und *LRRK2* (*PARK8*) eine Mutation innerhalb der noch nicht untersuchten Exons

befindet, für die noch keine Mutationen beschrieben wurden; die Sequenzierung dieser Bereiche sollte für die jeweiligen Familien (Familie M und K: *SCNA* sowie *LRRK2*, Familie P nur *LRRK2*) durchgeführt werden. Zweitens wurde das *UCHL1*-Gen (*PARK5*) im Falle von Familie M und K nicht sequenziert, da bislang nur eine Mutation in einer Familie bekannt ist (Leroy *et al.*, 1998). Auch für dieses Gen sollte eine Sequenzierung in Betracht gezogen werden. Drittens konnte in der vorliegenden Arbeit der *PARK3*-Locus bei Mitgliedern der Familie M bzw. K nicht sequenziert werden, da bislang nur die Kopplung eines familiärem PS zu einem 2,2 Mb großen Bereich auf Chr. 2p13 gezeigt wurde, aber noch kein Gen identifiziert werden konnte (Karamohamed *et al.*, 2003). Viertens sind neben den hier untersuchten Genorten noch weitere *PARK*-Loci bekannt (vgl. Tab. 1.5): Für *PARK9* (*ATP13A2*) sind fünf verschiedene Punktmutationen beschrieben (Ramirez *et al.*, 2006; Di Fonzo *et al.*, 2007); für *PARK13* (*HTRA2*) ist eine Punktmutation bekannt (Strauss *et al.*, 2005). Die drei weiteren Genorte *PARK10* - *PARK12* sind bislang Suszeptibilitätsloci für das PS, für die noch kein Gen identifiziert wurde (Hicks *et al.*, 2002; Pankratz *et al.*, 2003a und 2003b). Neben den mit *PARK* bezeichneten Genen und Suszeptibilitätsloci sind weitere Gene bekannt, in denen Mutationen zu einem PS geführt haben, wie *Synphilin* (Marx *et al.*, 2003) und *NR4A2/Nurr1* (Le *et al.*, 2003; Grimes *et al.*, 2006). Weiterhin ist es möglich, dass bislang noch nicht identifizierte Suszeptibilitätsloci existieren. Neben der konkreten Möglichkeit, dass sich eine pathogene Mutation in einem Exon eines bereits bekannten Gens befindet, gibt es im Genom somit noch eine Reihe denkbarer Lokalisationen. Weitere detaillierte Untersuchungen (z. B. Genomscan) zu dieser Fragestellung sind jedoch nur nach einer Erweiterung der Familien möglich.

4.4 Assoziationsstudien zum *MDR1*-Gen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Genotypenverteilung der SNPs c.2677G/T/A, c.3320A/C und c.3435C/T im *MDR1*-Gen zwischen a) einer Gruppe von Patienten mit primärem PS sowie b) einer Gruppe von Patienten, die durch NL an Bewegungsstörungen leiden, von der jeweils dazugehörigen Kontrollgruppe nicht signifikant unterscheidet.

Kortekaas *et al.* hatten 2005 bei einigen Patienten mit primärem PS eine lokale Schwäche der Blut-Hirn-Schranke im Bereich des Mittelhirns und der dorsalen *Pons* nachgewiesen, die auf eine Aktivitätsminderung von P-GP zurückzuführen war. Der am Besten untersuchte SNP des Gens ist c.3435C/T, für den eine Änderung der Funktion und Expression *in vivo* belegt wurde (Hoffmeyer *et al.*, 2000; Hitzl *et al.*, 2001) und daher als geeigneter Kandidat für die hier durchgeführten Analysen erschien. In dessen Nähe befindet sich auch der seltene SNP c.3320A/C (Cascorbi *et al.*, 2001), der daher ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand und mit nur geringen Mehrkosten untersucht werden konnte. Der SNP c.2677G/T/A ist ebenfalls in der Diskussion, die Expression und Funktion von P-GP zu beeinflussen (Kim *et al.*, 2001; Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2002; Tanabe *et al.*, 2001). Zusammen mit c.3435C/T gehört er zu den häufigsten genetischen Veränderungen im *MDRI*-Gen (Cascorbi *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse (vgl. Tab. 3.4 und 3.5) zeigen keine wesentlichen Abweichungen der Genotypenverteilung von zuvor gemachten Untersuchungen (wiedergegeben in Tab. 8.3) mit Ausnahme des SNPs c.3435C/T in der Studie mit NL-Patienten (siehe dazu Abschnitt 4.4.2).

4.4.1 Genotypenverteilung der *MDRI*-Polymorphismen bei Parkinsonpatienten

Die Genotypenhäufigkeiten der drei SNPs unterschieden sich in der Gruppe mit primärem PS nur in einer Subanalyse signifikant von derjenigen der Kontrollgruppe: Bei alleiniger Berücksichtigung der Fälle (n = 265) und Kontrollen (n = 123) mit deutscher Abstammung zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Allele des SNPs c.2677G/T/A ($p = 0,016$) (vgl. Tab. 3.4). Der Wert suggeriert, dass Individuen mit dem Allel 2677A für die Erkrankung weniger anfällig sind, da die Genotypen G/A und T/A deutlich seltener in der Fallgruppe auftreten. Der Genotyp 2677G/T ist in der Kontrollgruppe häufiger zu finden und könnte daher einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung der Krankheit haben. Allerdings muss bei der Interpretation bedacht werden, dass der p -Wert im Zuge von multiplem Testen ermittelt wurde und daher möglicherweise als zufälliger Befund zu bewerten ist.

Die hier unternommenen Analysen gestatten insgesamt nicht die Annahme der einleitend geäußerten Vermutung, dass für Patienten mit einem vorliegenden SNP ein verändertes Erkrankungsrisiko für ein primäres PS besteht.

In der Literatur existieren einige Veröffentlichungen, die sich mit der gleichen Fragestellung beschäftigt haben. Diese sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Tab. 4.1: Ergebnisse bisher veröffentlichter Assoziationsstudien zu *MDRI*-Polymorphismen und primärem Parkinsonsyndrom

Autor u. Jahr	Analysierte SNPs	Parkinson-patienten	Kontroll-individuen	Ergebnisse
Furuno <i>et al.</i> , 2002	2677G/T/A, 3435C/T u. a.	n = 95; M = 60, F = 35; EOPD (\leq 45 Jahre) = 25, LOPD ($>$ 45 Jahre) = 70; NV; italienisch; UKPDS	n = 106; M = 56, F = 50; NV; italienisch	<ul style="list-style-type: none"> •Generell keine signifikante Assoziation. •Trend: Wildtypgenotyp bei Kontrollen $>$ LOPD $>$ EOPD bei beiden SNPs, für homozygot Mutierte Trend umgekehrt. •Signifikante Kopplung [2677G/3435C] und [2677T/3435T].
Drózdziak <i>et al.</i> , 2003	3435C/T	n = 107; M = 56, F = 51; EOPD (\leq 50 Jahre) = 30, LOPD ($>$ 50 Jahre) = 77; PE = 59, keine PE = 48; NV; polnisch	n = 103; M = 50, F = 53; polnisch	<ul style="list-style-type: none"> •Generell keine signifikante Assoziation. •Trend: 3435TT bei EOPD $>$ LOPD. •Genotyp 3435CC signifikant seltener in der Gruppe mit PE vs. ohne PE; Allel 3435T signifikant häufiger bei PE.
Lee <i>et al.</i> , 2004	2677G/T/A, 3435C/T u. a.	n = 206; M = 110, F = 96; EOPD (\leq 55 Jahre) = 56, LOPD (\geq 60 Jahre) = 110; chinesisch, UKPDS	n = 224; M = 119, F = 105; chinesisch	<ul style="list-style-type: none"> •Allele 2677G und 3435C sowie konstruierter Haplotypen signifikant mit erhöhtem Erkrankungsrisiko assoziiert. •Signifikanz besonders bei Männern und LOPD-Patienten gültig, seltener bei Frauen und EOPD.
Tan <i>et al.</i> , 2004	2677G/T/A, 3435C/T u. a.	n = 158; M = 90, F = 68; polnisch; UKPDS; inkl. 90 Patienten aus Drózdziak, 2003	n = 139; M = 70, F = 69; polnisch; inkl. 90 Kontrollen aus Drózdziak, 2003	<ul style="list-style-type: none"> •Generell keine signifikante Assoziation. •Trend: Haplotyp [2677G/3435C] assoziiert mit Kontrollen.
Tan <i>et al.</i> , 2005	2677G/T/A, 3435C/T u. a.	n = 185; M = 98, F = 87, chinesisch; UKPDS	n = 206; M = 103, F = 103; chinesisch	<ul style="list-style-type: none"> •Generell keine signifikante Assoziation. •Haplotyp [2677T/3435T] signifikant mit Kontrollen assoziiert; Haplotyp [2677T/3435C] signifikant mit Erkrankung assoziiert.

EOPD, Early Onset Parkinson's Disease; F, Frauen; LOPD, Late Onset Parkinson's Disease; M, Männer; NV, nicht verwandt; PE, Pestizidexposition; u.a., und andere; UKPDS, *United Kingdom Parkinson's Disease Society* Diagnosekriterien

In allen fünf Studien waren Patienten und Kontrollen mit gleichem ethnischen Hintergrund untersucht worden. Nur in einer Studie konnte für Parkinsonpatienten

chinesischer Abstammung eine generelle Assoziation der Allele 2677G und 3435C mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko ermittelt werden (Lee *et al.*, 2004). Erstaunlicherweise handelt es sich dabei um die im kaukasischen Raum als „Wildtyp“ bezeichneten Allele, für die keine Minderung der Expression oder Funktion *in vitro* als auch *in vivo* bekannt ist (vgl. Abschnitt 1.3.4 und eigene Ergebnisse). Dieser Gegensatz könnte durch eine positive Selektion der Allele in der chinesischen Bevölkerung erklärt werden (Tang *et al.*, 2004). In allen anderen Studien konnten signifikante Unterschiede bzw. Trends nur im Rahmen von Subanalysen festgestellt werden. Dabei wurden die Patienten in verschiedene Kategorien bezüglich ihres Erkrankungsalters (früh vs. spät), einer langjährigen Pestizidexposition (ja vs. nein) unterteilt oder Analysen aufgrund von Haplotypenschätzungen unternommen. Es ist möglich, dass in den durchgeführten Studien einige signifikante Effekte übersehen wurden, da sie aufgrund der relativ kleinen Kollektive statistisch nicht ermittelt werden konnten.

Die Ergebnisse der Studien mit Kaukasiern deuten auf eine Erhöhung der Suszeptibilität für das früh beginnende PS (*Early Onset Parkinson's Disease*) bei Vorhandensein der Genotypen 2677TT und 3435TT hin. Zudem scheint eine langjährige Pestizidexposition bei Vorliegen des Allels 3435T die Krankheitsentstehung zu begünstigen. Der Haplotyp [2677G/3435C] übt vermutlich einen protektiven Effekt, der Haplotyp [2677T/3435G] einen permissiven Effekt aus. Umgekehrt scheint es sich in der chinesischen Bevölkerung zu verhalten.

Die in dieser Arbeit untersuchten Subanalysen richteten sich nach der ethnischen Zugehörigkeit. Diese Differenzierung ist durchaus sinnvoll, wie jedoch aus Tabelle 4.1 hervorgeht, scheint eine generelle Assoziation zwischen einem Genotyp der SNPs c.2677G/T/A oder c.3435C/T und einem veränderten Erkrankungsrisiko die Ausnahme zu sein. Allerdings sollte ein stark verändertes Erkrankungsrisiko auch nicht erwartet werden, denn schließlich handelt es sich beim primären PS um ein heterogenes Krankheitsgeschehen, dass durch zahlreiche endogene und exogene Einflüsse bedingt sein kann und der Einfluss einzelner prädisponierender Faktoren somit gering ist.

Im Rahmen der durchgeführten Fall-Kontroll-Studie kann nicht ausgeschlossen werden, dass für anders ausgerichtete Subanalysen eine signifikante Risikoveränderung besteht. In nachfolgenden Untersuchungen könnte die gesamte Stichprobe und auch die ethnischen Subgruppen hinsichtlich des Erkrankungsalters stratifiziert werden. Außerdem ist es

wünschenswert, statistisch assistierte Haplotypenschätzungen durchzuführen. Die nachträgliche Erhebung von Daten zur Pestizidexposition wird sich allerdings als schwierig erweisen. Trotzdem könnten durch differenziertere Berechnungen exaktere Hinweise auf die pathogene Relevanz genetischer Varianten des *MDR1*-Gens bei der Entwicklung eines primären PS gewonnen werden.

4.4.2 Genotypenverteilung der *MDR1*-Polymorphismen bei Neuroleptika-Patienten

Die durchgeführten Analysen ermittelten keinen signifikanten Unterschied der Genotypenverteilung zwischen der Fall- und Kontrollgruppe und damit auch keine signifikante Risikoveränderung für die Entwicklung NL-induzierter Bewegungsstörungen (vgl. Tab. 3.5).

Allerdings wurde im Falle des SNP c.3435C/T Genotypenfrequenzen entdeckt, die nicht der zu erwartenden Verteilung nach Hardy-Weinberg entspricht: In der Patientengruppe mit Bewegungsstörungen kam der heterozygote Genotyp 3435CT deutlich häufiger vor als erwartet, in der Patientengruppe ohne Bewegungsstörungen zu selten. Ein Fehler bei der Genotypisierung kann ausgeschlossen werden, da sowohl die Fall- als auch die Kontrollgruppe erneut analysiert wurden, wobei keine Veränderungen auffielen. Das bestehende Ungleichgewicht könnte möglicherweise auf einen Selektionsnachteil für heterozygote Träger des SNPs c.3435C/T hinweisen. Allerdings ist es bei der relativ kleinen Stichprobe auch möglich, dass es sich hierbei um eine zufällige Schwankung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts handelt, die bei einer Erweiterung der Stichprobe nicht fortbestehen würde. In weiterführenden Untersuchungen sollte dieser Frage nachgegangen werden.

Bisher existieren keine Publikationen zu der hier untersuchten Fragestellung. Aber es wurden Studien durchgeführt, in denen der Therapieerfolg mit NL bei psychiatrischen Patienten in Abhängigkeit von SNPs im *MDR1*-Gens diskutiert wird. Dabei konnte für die Substanzen Olanzapin, Bromperidol und Risperidon in Teilen ein Zusammenhang zwischen den Genotypen der SNPs c.2677G/T/A, c.3435C/T sowie eines weiteren SNPs c.1236C/T und der Ansprechrate auf die Therapie gezeigt werden, wobei bei Vorliegen der

Polymorphismen ein besseres Therapieergebnis erreicht wurde (Bozina *et al.*, 2006; Yasui-Furukori *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2006). Eine andere Studie konnte diese Assoziation nicht bestätigen (Qian *et al.*, 2006). Ebenso wird für Olanzapin und Risperidon vermutet, dass sie das P-GP an der Blut-Hirn-Schranke hemmen können (Wang *et al.*, 2006). Bei den hier genannten Wirkstoffen handelt es sich allerdings um atypische NL, für die eine Induktion von Bewegungsstörungen als Nebenwirkung eher unüblich ist. Aber es wird deutlich, dass es Hinweise dafür gibt, dass eine genetisch bedingte verminderte Funktionalität des P-GP die Penetration einzelner NL in das ZNS verändern kann und damit möglicherweise auch das Potential, NL-induzierte Bewegungsstörungen auszulösen. Daher wäre es von Interesse, die hier vorgestellte Stichprobe unter Berücksichtigung der verwendeten NL erneut zu analysieren. Allerdings ist dazu eine Erweiterung der Stichprobe notwendig, da die einzelnen Subgruppen zu wenige Personen umfassen.

4.5 Schlussfolgerungen

Alle in Abschnitt 1.5 aufgestellten Zielsetzungen wurden in dieser Arbeit erfolgreich umgesetzt. Die einleitend gestellten Fragen sollen hier beantwortet werden.

I Familie R – genomweite Kopplungsanalyse

Der Genort *SCA5* konnte als ursächlich für das Krankheitsgeschehen in Familie R ausgeschlossen werden (vgl. Abschnitt 3.1.1). Im Anschluss daran konnten durch die genomweite Kopplungsanalyse und der Berechnung von *Multipoint-LOD-Scores* auf drei Chromosomen Regionen identifiziert werden mit *LOD-Scores* von $Z > 2$ für mehrere benachbarte Marker (siehe Tab. 3.2), in denen somit das Vorhandensein einer krankheitsverursachenden Mutation wahrscheinlicher ist als auf dem übrigen Genom. Auf den Chromosomen 2, 3, und 18 erstreckte sich die Region über eine Distanz von drei Markern (siehe Tab. 3.2 sowie Abb. 3.4 - 3.6). Die Region 18p11.21 - q21.2, für die der höchste *LOD-Score* ermittelt wurde, überlappt mit dem Genort *SCA28* (vgl. Abschnitt 4.2.2.1).

II Familie M, K und P – Haplotypisierung, Mutationsanalyse und Gendosis-Veränderungen

Durch die Haplotypisierung konnte im Fall der Familie M der Genort *PINK1* (*PARK6*) als Krankheitslocus ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 3.8 und 3.9). Die Ursache der Erkrankung befindet sich auch nicht in den Genen *Parkin* (*PARK2*) und *DJ-1* (*PARK7*), die durch die Sequenzierung der Gene ausgeschlossen wurden (vgl. Tab. 3.3), ebenso wie das Exon 3 des *SNCA*-Gens (*PARK1*) und die Exons 24, 25, 29, 31, 35, 38, 40 und 41 von *LRRK2* (*PARK8*). Auch eine quantitative Mutation konnte mittels MLPA-Analyse für viele Exons der sieben untersuchten *PARK*-Loci ausgeschlossen werden (vgl. Tab. 2.6 und Abschnitt 3.2.3). Die weiterhin unbekannt Mutation liegt außerhalb der hier analysierten Sequenzbereiche.

Im Fall der Familie K war kein Ausschluss eines Genortes mittels Haplotypisierung möglich. Auf die Sequenzierung aller *PARK*-Loci wurde verzichtet, da im Rahmen der Vorarbeiten bei einem *Screening* kein Hinweis auf eine Mutation in den Genen *Parkin*, *PINK1* und *DJ-1* gewonnen wurde (vgl. Abschnitt 1.4). In den untersuchten Exons der Gene *SNCA* und *LRRK2* wurde keine Mutation entdeckt (vgl. Tab. 3.3), auch die Suche nach bekannten Gendosis-Veränderungen verlief unauffällig (vgl. Abschnitt 3.2.3). Da es bei einer betroffenen Person stets unklar ist, von welchem Elternteil sie die Erkrankung geerbt hat, sind weitere Analysen der Familie K erst sinnvoll, nachdem die Familie erweitert wurde, um mehr Informationen in die Haplotypisierung mit einbeziehen zu können oder nachdem weitere klinische Untersuchungen der Familienmitglieder Rückschlüsse über den Vererbungsweg geben könnten (vgl. Abschnitt 4.3.1).

Bei Familie P konnten die Genorte *PARK1* - 3, *PARK5* und *PARK7* mittels Haplotypisierung ausgeschlossen werden (Abbildung 3.11 und 3.12), des Weiteren das Gen *PINK1* und acht Exons des *LRRK2*-Gens mittels Sequenzierung (siehe Tab. 3.3) sowie Gendosis-Veränderungen (vgl. Abschnitt 3.2.3). Probleme ergaben sich für die Genorte *PARK1*, *PARK6* und *PARK8*, da hier in der Filialgeneration die Anzahl der möglichen Haplotypen überschritten wurde und somit die Richtigkeit der angegebenen Verwandtschaftsbeziehungen fraglich erscheinen (siehe Abbildung 3.11 und Abschnitt 4.3.1).

III *MDRI* – Zwei Assoziationsstudien

Die Genotypenverteilung der drei untersuchten SNPs des *MDRI*-Gens c.2677G/T/A, c.3320A/C und c.3435C/T in einer Gruppe von Patienten mit primärem Parkinsonsyndrom unterschied sich nicht signifikant von derjenigen in einer gesunden Kontrollgruppe, womit auch das Erkrankungsrisiko nicht signifikant verändert war (vgl. Tab. 3.4). Dies trifft auch für Subanalysen von Personen mit gleicher ethnischer Abstammung zu. Lediglich die Verteilung der Genotypen des SNPs c.2677G/T/A zwischen einer deutschen Fall- und Kontrollgruppe zeigte signifikante Unterschiede, welche möglicherweise als Zufallsbefund im Rahmen von multiplem Testen zu bewerten sind (vgl. Abschnitt 4.4.1).

Auch im Rahmen der zweiten Assoziationsstudie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Genotypenverteilung der drei untersuchten SNPs in der Fall- und der Kontrollgruppe gefunden werden (vgl. Tab. 3.5); hier besteht somit kein Unterschied der Erkrankungsrisiken der Gruppenmitglieder. Für den SNP c.3435C/T stimmen die Genotypenhäufigkeiten nicht mit der erwarteten Verteilung nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz überein; als Ursache kommt ein Selektionsvor- bzw. nachteil in Betracht, ebenso wie dass es sich lediglich um zufällige Schwankungen handeln kann (vgl. Abschnitt 4.2.2).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für viele neurodegenerative Krankheiten, wie die spinocerebelläre Ataxie (SCA) und das Parkinsonsyndrom (PS), konnten in der letzten Dekade zahlreiche Ursachen für genetisch bedingte Formen gefunden werden. Für die SCA sind bis heute 28 Genorte bekannt und 14 Gene identifiziert; oft sind *CAG-Repeat-Expansionen* die Ursache der Erkrankung. Für die familiären Formen des PS sind 12 Loci inklusive 6 Gene bekannt. Neben den monogenen Formen können auch Umwelteinflüsse oder eine Kombination von beidem die Entstehung der Krankheit verursachen. Für das PS wird unter anderem das *Multidrug Resistance 1-Gen* als Suszeptibilitäts-gen diskutiert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, (I) bei einer Familie mit SCA die genetische Ursache mit Hilfe einer genomweiten Kopplungsanalyse einzugrenzen, (II) bei drei kleinen Familien mit PS eine bekannte genetische Ursache zu identifizieren, indem die Genorte *PARK1* - *PARK8* haplotypisiert und anschließend Mutationsanalysen (Sequenzanalyse und Test auf Gendosis-Veränderungen) durchgeführt wurden, sowie (III) mittels zweier Fall-Kontroll-Studien die Risikoveränderung IIIa) für ein PS und IIIb) für Neuroleptika-induzierte Bewegungsstörungen in Abhängigkeit der Genotypen von drei Einzelnukleotid-polymorphismen (SNPs) im *MDR1*-Gen zu untersuchen.

(I) Bei der SCA-Familie wurden auf drei Chromosomen größere Regionen mit hohen *Multipoint-LOD-Scores* identifiziert, in denen das Vorliegen einer pathogenen Mutation wahrscheinlich ist. Die aussichtsreichste Region ist auf Chromosom 18p11.21 - q21.2, welche mit dem Genort *SCA28* überlappt. Interessanterweise liegt in dem Bereich ein Gen mit einem *CAG₍₂₄₎-Repeat*. Im Anschluss an diese Arbeit werden die Kandidatentregionen feiner kartiert und identifizierte Kandidatengene sequenziert. (II) Bei keiner PS-Familie wurde eine Mutation gefunden, aber einige Genorte konnten ausgeschlossen werden. In der größten Familie (Familie P mit vier Betroffenen) konnten alle bekannten Genorte entweder durch Haplotypisierung oder Sequenzanalysen ausgeschlossen werden, so dass nach Erweiterung der Familien gegebenenfalls die Suche nach einem neuen Gen in dieser Familie begonnen werden kann. (III) Für keinen der drei SNPs veränderte sich das Erkrankungsrisiko in den Fallgruppen der beiden Studien. Nach einer Erweiterung der Stichproben könnte eine Auswertung geschichtet nach dem Erkrankungsalter und geschätzten Haplotypen (a) bzw. nach Neuroleptika (b) differenziertere Ergebnisse liefern.

6. AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit hat sich mit den genetischen Ursachen verschiedener Bewegungsstörungen beschäftigt. Das Bestreben von genetischer Forschung ist durch Aufspüren von Mutationen Wissen über die Ätiologie und Pathogenese von Krankheiten zu gewinnen, um so den Patienten quälende Fragen beantworten zu können, um Diagnostik zu ermöglichen und um therapeutische Ansätze zu entwickeln. Die Fortsetzung der hier durchgeführten Untersuchungen unter kritischer Einbeziehung neuer Forschungsergebnisse wird so vielleicht einige Wissenslücken schließen können. Mögliche Vorgehensweisen, wie bereits in der Diskussion dieser Arbeit erwähnt, werden hier nochmals dargestellt.

(I) Familie mit SCA: Bevor ein Mutationsscreening in den Genen der drei Kandidatenregionen begonnen wird, ist eine Fortführung der Kopplungsanalyse erstrebenswert, um alle Markerabstände auf ≤ 15 cM zu reduzieren. Anschließend sollte für alle Bereiche, in denen erhöhte LOD-Scores vorhanden sind, eine Feinkartierung vorgenommen werden. In den sich bestätigenden Regionen kann dann nach *CAG-Repeats* und nach weiteren Kandidatengen gesucht und schließlich mit der Mutationsanalyse begonnen werden.

(II) Familien mit Parkinsonsyndrom: Bestehende Probleme (z. B. hinsichtlich des Vererbungsweges bzw. der Verwandtschaft) müssten in Folgeuntersuchungen behoben werden. Für Familie K sollte eine Erweiterung der Familie sowie eine erneute klinische Begutachtung angestrebt werden, für Familie P wäre eine statistische Schätzung der Verwandtschaftsbeziehungen sowie eine Erweiterung durchzuführen, bevor weiterführende Untersuchungen (Sequenzierung von Genen, die äußerst selten mit einem Parkinsonsyndrom assoziiert sind bzw. Suche nach neuen Genen) unternommen werden.

(III) Fall-Kontroll-Studien zum *MDRI*-Gen: Differenziertere Aussagen über die Auswirkung auf das Erkrankungsrisiko könnte im Fall der Parkinsonstudie eine Analyse unter Berücksichtigung des Erkrankungsalters und eine Schätzung der Haplotypen der drei SNPs zulassen. Im Falle der Neuroleptika-Studie ist es erstrebenswert, die Stichprobe unter Berücksichtigung der verwendeten Neuroleptika auszuwerten. Hierzu ist allerdings eine Erweiterung der Stichprobe nötig.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abou-Sleiman PM, Healy, DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW: The role of pathogenetic *DJ-1* mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 54: 283-286.
- Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW: Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 207-219.
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM: Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 361-398.
- American Psychiatric Association: *Diagnostical and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision*. American Psychiatric Association, Washington DC 2000; 147.
- Amiel J, Rio M, Pontual LD, Redon R, Malan V, Boddaert N, Plouin P, Carter NP, Lyonnet S, Munnich A, Colleaux L: Mutations in TCF4, Encoding a Class I Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Are Responsible for Pitt-Hopkins Syndrome, a Severe Epileptic Encephalopathy Associated with Autonomic Dysfunction. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 988-993.
- Arjomand-Nahad F, Diefenbach K, Landt O, Gaikovitch E, Roots I: Genotyping of the triallelic variant G2677T/A in MDR1 using LightCycler with locked-nucleic-acid-modified hybridization probes. *Anal Biochem* 2004; 334 :201-203.
- Armitage P: Test for linear trends in proportions and frequencies. *Biometrics* 1955; 11: 375-386.
- Ayd FJ Jr: A survey of drug-induced extrapyramidal reactions. *JAMA* 1961; 175: 1054-1060.
- Barnes TR: A rating scale for drug-induced akathisia. *Br J Psychiatry* 1989; 154: 672-676.
- Bart J, Willemsen AT, Groen HJ, van der Graaf WT, Wegman TD, Vaalburg W, de Vries EG, Hendrikse NH: Quantitative assessment of P-glycoprotein function in the rat blood-brain barrier by distribution volume of [¹¹C]verapamil measured with PET. *Neuroimage* 2003; 20: 1775-1782.
- Bird TD, Jarvik GP, Wood NW: Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology* 2001; 57: 1153-1154.

- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijin CM, Oostra BA, Heutink P: Mutations in the *DJ-1* gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299: 256-259.
- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S: Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2005; 2: 484-494.
- Bozina N, Kuzman MR, Medved V, Jovanovic N, Sertic J, Hotujac L: Associations between MDR1 gene polymorphisms and schizophrenia and therapeutic response to olanzapine in female schizophrenic patients. *J Psychiatr Res* 2006; Epub.
- Burk K, Zuhlke C, Konig IR, Ziegler A, Schwinger E, Globas C, Dichgans J, Hellenbroich Y: Spinocerebellar ataxia type 5: clinical and molecular genetic features of a German kindred. *Neurology* 2006; 62: 327-329.
- Burke RE, Fahn S, Marsden CD, Bressman SB, Moskowitz C, Friedman J: Validity and reliability of a rating scale for the primary torsion dystonias. *Neurology* 1985; 35: 73-77.
- Buselmaier W, Tariverdian G: Humangenetik. 3. Auflage. Springer Medizin Verlag, Berlin 2004; 44-50.
- Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, Seri M, Brussino A, Michielotto C, Grisoli M, Di Bella D, Migone N, Gellera C, Di Donato S, Brusco A: SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* 2006; 129: 235-242.
- Cardon LR, Bell JI: Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 91-99.
- Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I: Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 169-174.
- Casey DE: Tardive dyskinesia. *West J Med* 1990; 153: 535-541.
- Casey DE: Pathophysiology of antipsychotic drug-induced movement disorders. *J Clin Psychiatry* 2004; 65 (Supplement 9): 25-28.
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB: Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986 47: 381-389.

- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR: Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 695-698.
- Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE, Mann D: Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 59: 229-234.
- Cossee M, Schmitt M, Campuzano V, Reutenauer L, Moutou C, Mandel JL, Koenig M: Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 7452-7457.
- Criscuolo C, Volpe G, De Rosa A, Varrone A, Marongiu R, Mancini P, Salvatore E, Dallapiccola B, Filla A, Valente EM, De Michele G: PINK1 homozygous W437X mutation in a patient with apparent dominant transmission of parkinsonism. *Mov Disord* 2006; 21: 1265-1267.
- Crossman AR: Functional anatomy of movement disorders. *J Anat* 2000; 196: 519-525.
- de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A, Rocca WA: Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62: 10-15.
- Del-Favero J, Gestel SV, Borglum AD, Muir W, Ewald H, Mors O, Ivezic S, Oruc L, Adolfsson R, Blackwood D, Kruse T, Mendlewicz J, Schalling M, Van Broeckhoven C: European combined analysis of the CTG18.1 and the ERDA1 CAG/CTG repeats in bipolar disorder. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 276-280.
- Deng Y, Newman B, Dunne MP, Silburn PA, Mellick GD: Further evidence that interactions between CYP2D6 and pesticide exposure increase risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 55: 897.
- Di Fonzo A, Rohe, CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, Guedes L, Fabrizio E, Manfredi M, Vanacore N, Goldwurm S, Breedveld G, Sampaio C, Meco G, Barbosa E, Oostra BA, Bonifati V, Italian Parkinson Genetics Network: A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 2005; 365: 412-415.
- Di Fonzo A, Chien HF, Socal M, Giraudo S, Tassorelli C, Iliceto G, Fabbrini G, Marconi R, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, Squitieri F, Horstink MW, Montagna P, Libera AD, Stocchi F, Goldwurm S, Ferreira JJ, Meco G, Martignoni E, Lopiano L, Jardim LB, Oostra BA, Barbosa ER, The Italian Parkinson Genetics Network, Bonifati V: ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 2007; 68: 1557-1562.

- Djarmati A, Gužvic M, Grünwald A, Lang A, Pramstaller P, Simon D, Kaindl A, Vieregge P, Nygren A, Beetz C, Hedrich K, Klein C: Rapid and reliable detection of exon rearrangements in various movement disorders genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Mov Disord*. Im Druck.
- Drozdik M, Bialecka M, Mysliwiec K, Honczarenko K, Stankiewicz J, Sych Z: Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 2004; 13: 259-263.
- Duenas AM, Goold R, Giunti P: Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 2006; 129: 1357-1370.
- Editorial: Freely associating. *Nat Genet* 1999; 22: 1-2.
- Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Amouyel P, Alperovitch A, Chartier-Harlin MC, Tzourio C: CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 55: 430-434.
- Fahn S, Elton RL & Members of the UPDRS Development Committee: Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden C und Goldstein M: *Recent Developments in Parkinson's Disease*. 2. Auflage, Macmillan Healthcare Information, Florham Park 1987; 153-63.
- Fan E, Levin DB, Glickman BW, Logan DM: Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutat Res* 1993; 288: 85-92.
- Fearnley JM, Lees AJ: Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991; 114: 2283-2301.
- Fleischhacker WW, Miller CH, Schett P, Barnas C, Ehrmann H: The Hillside Akathisia Scale: a reliability comparison of the English and German versions. *Psychopharmacology (Berl)* 1991; 105: 141-144.
- Furuno T, Landi MT, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I, Nappi G, Martignoni E, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 529-534.
- Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznoi B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD: A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 1998; 18: 262-265.
- Gibb WR, Lees AJ: The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51: 745-752.

- Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, Shaw K, Bhatia KP, Bonifati V, Quinn NP, Lynch J, Healy DG, Holton JL, Revesz T, Wood NW: A common *LRRK2* mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005; 365: 415-416.
- Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, Braun RJ, O'Neill E, Meitinger T, Kolch W, Prokisch H, Ueffing M: The Parkinson disease causing *LRRK2* mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 223-232.
- Goetz CG, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stebbins GT, Stern MB, Tilley BC, Dodel R, Dubois B, Holloway R, Jankovic J, Kulisevsky J, Lang AE, Lees A, Leurgans S, LeWitt PA, Nyenhuis D, Olanow CW, Rascol O, Schrag A, Teresi JA, Van Hilten JJ, LaPelle N: Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): process, format, and clinimetric testing plan. *Mov Disord* 2007; 22: 41-47.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ: The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 1998; 50: 1346-1350.
- Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein V, Germann UA, Pastan I: Genetic analysis of multidrug transporter. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 607-649.
- Greene JC, Whitworth AJ, Andrews LA, Parker TJ, Pallanck LJ: Genetic and genomic studies of *Drosophila parkin* mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 799-811.
- Grimes DA, Han F, Panisset M, Racacho L, Xiao F, Zou R, Westaff K, Bulman DE: Translated mutation in the *Nurr1* gene as a cause for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21: 906-909.
- Gudbjartsson DF, Thorvaldsson T, Kong A, Gunnarsson G, Ingolfsson A: Allegro version 2. *Nat Genet* 2005; 37: 1015-1016.
- Harding AE: Early onset cerebellar ataxia with retained tendon reflexes: a clinical and genetic study of a disorder distinct from Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1981; 44: 503-508.
- Harding AE: Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1983; 1: 1151-1155.
- 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: The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the *parkin* gene in early-onset parkinsonism. *Hum Molec Genet* 2001; 10: 1649-1656

- Hedrich K, Marder K, Harris J, Kann M, Lynch T, Meija-Santana H, Pramstaller PP, Schwinger E, Bressman SB, Fahn S, Klein C: Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for *parkin* mutations. *Neurology* 2002; 58: 1239-1246.
- Hedrich K, Eskelson C, Wilmot B, Marder K, Harris J, Garrels J, Meija-Santana H, Vieregge P, Jacobs H, Bressman SB, Lang AE, Kann M, Abbruzzese G, Martinelli P, Schwinger E, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C, Kramer P: Distribution, type, and origin of *Parkin* mutations: review and case studies. *Mov Disord* 2004a; 19: 1146-1157.
- Hedrich K, Djarmati A, Schafer N, Hering R, Wellenbrock C, Weiss PH, Hilker R, Vieregge P, Ozelius LJ, Heutink P, Bonifati V, Schwinger E, Lang AE, Noth J, Bressman SB, Pramstaller PP, Riess O, Klein C: DJ-1 (*PARK7*) mutations are less frequent than *Parkin* (*PARK2*) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2004b; 62: 389-394.
- Hedrich K, Hagenah J, Djarmati A, Hiller A, Lohnau T, Lasek K, Grunewald A, Hilker R, Steinlechner S, Boston H, Kock N, Schneider-Gold C, Kress W, Siebner H, Binkofski F, Lencer R, Munchau A, Klein C: Clinical spectrum of homozygous and heterozygous *PINK1* mutations in a large German family with Parkinson disease: role of a single hit? *Arch Neurol* 2006; 63: 833-838.
- Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K, Sveinbjornsdottir S: A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2002; 52: 549-555.
- Hiller A, Hagenah JM, Djarmati A, Hedrich K, Reetz K, Schneider-Gold C, Kress W, Munchau A, Klein C: Phenotypic spectrum of *PINK1*-associated parkinsonism in 15 mutation carriers from 1 family. *Mov Disord* 2007; 22: 145-147.
- Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF: The C3435T mutation in the human *MDR1* gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 293-298.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3473-3478.
- Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth RG, Sherr M, Sumner AJ, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Viera-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA, Margolis RL: Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 50 region of *PPP2R2B* is associated with SCA12. *Nat Genet* 1999; 23: 391-392

- Hughes TA, Ross HF, Musa S, Bhattacharjee S, Nathan RN, Mindham RH, Spokes EG: A 10-year study of the incidence of and factors predicting dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 2000; 54: 1596-1602.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P: Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998; 393: 702-705.
- Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Durr A, Brice A: Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364: 1169-1171.
- Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, Stevanin G, Durr A, Zuhlke C, Burk K, Clark HB, Brice A, Rothstein JD, Schut LJ, Day JW, Ranum LP: Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 2006; 38: 184-190.
- International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-945.
- Iwata A, Christianson JC, Bucci M, Ellerby LM, Nukina N, Forno LS, Kopito RR: Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13135-13140.
- Janno S, Holi M, Tuisku K, Wahlbeck K: Prevalence of neuroleptic-induced movement disorders in chronic schizophrenia inpatients. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 160-163.
- Juliano RL, Ling V: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455: 152-162.
- Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Gibson JM, Ross OA, Lynch T, Wiley J, Payami H, Nutt J, Maraganore DM, Czyzewski K, Styczynska M, Wszolek ZK, Farrer MJ, Toft M: Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 672-680.

- Karamohamed S, DeStefano AL, Wilk JB, Shoemaker CM, Golbe LI, Mark MH, Lazzarini AM, Suchowersky O, Labelle N, Guttman M, Currie LJ, Wooten GF, Stacy M, Saint-Hilaire M, Feldman RG, Sullivan KM, Xu G, Watts R, Growdon J, Lew M, Waters C, Vieregge P, Pramstaller PP, Klein C, Racette BA, Perlmutter JS, Parsian A, Singer C, Montgomery E, Baker K, Gusella JF, Fink SJ, Myers RH, Herbert A: A haplotype at the PARK3 locus influences onset age for Parkinson's disease: the GenePD study. *Neurology* 2003; 61: 1557-1561.
- Kay DM, Moran D, Moses L, Poorkaj P, Zabetian CP, Nutt J, Factor SA, Yu CE, Montimurro JS, Keefe RG, Schellenberg GD, Payami H: Heterozygous parkin point mutations are as common in control subjects as in Parkinson's patients. *Ann Neurol* 2007; 61: 47-54.
- Khan NL, Horta W, Eunson L, Graham E, Johnson JO, Chang S, Davis M, Singleton A, Wood NW, Lees AJ: Parkin disease in a Brazilian kindred: Manifesting heterozygotes and clinical follow-up over 10 years. *Mov Disord* 2005; 20: 479-484.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR: Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70: 189-199.
- Kimchi-Sarfaty C, Gribar JJ, Gottesman MM: Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1-6.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N: Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605-608.
- Klein C: Movement disorders: classifications. *J Inherit Metab Dis* 2005a; 28: 425-439.
- Klein C, Djarmati A, Hedrich K, Schafer N, Scaglione C, Marchese R, Kock N, Schule B, Hiller A, Lohnau T, Winkler S, Wiegers K, Hering R, Bauer P, Riess O, Abbruzzese G, Martinelli P, Pramstaller PP: *PINK1*, *Parkin*, and *DJ-1* mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur J Hum Genet* 2005b; 13: 1086-1093.
- Klein C, Schlossmacher MG: The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 136-146.
- Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE: Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol* 2007; 6: 652-656
- Klockgether T, Burk K, Auburger G, Dichgans J: Classification and diagnosis of degenerative ataxias. *Nervenarzt* 1995; 66: 571-581.

- Kompoliti K, Goetz C: Parkinson's Disease and related movement disorders. In: Beal MF, Lang AE, Ludolph A: Neurodegenerative Diseases. 1. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge 2005; 551-554.
- Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW, Ranum LP: An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8) *Nat Genet* 1999; 21: 379-384.
- Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen AT, Hendrikse NH: Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol* 2005; 57: 176-179.
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schöls L, Riess O: Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18: 106-108.
- Lander E, Kruglyak L: Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995; 11: 241-247.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I: Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-980.
- Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK: Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 2003; 33: 85-89.
- Lee CG, Tang K, Cheung YB, Wong LP, Tan C, Shen H, Zhao Y, Pavanni R, Lee EJ, Wong MC, Chong SS, Tan EK: MDR1, the blood-brain barrier transporter, is associated with Parkinson's disease in ethnic Chinese. *J Med Genet* 2004; 41: e60.
- Lencer R, Eismann G, Kasten M, Kabakci K, Geithe V, Grimm J, Klein C: Family history of primary movement disorders as a predictor for neuroleptic-induced extrapyramidal symptoms. *Br J Psychiatry* 2004; 185: 465-471.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH: The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395: 451-452.
- Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hatano Y, Yoshino H, Atsumi M, Kitaguchi M, Sasaki S, Kawaguchi S, Miyajima H, Toda T, Mizuno Y, Hattori N: Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology* 2005; 64: 1955-1957.
- Lincoln S, Wiley J, Lynch T, Langston JW, Chen R, Lang A, Rogaeva E, Sa DS, Munhoz RP, Harris J, Marder K, Klein C, Bisceglia G, Hussey J, West A, Hulihan M, Hardy J, Farrer M: *Parkin*-proven disease: common founders but divergent phenotypes. *Neurology* 2003; 60: 1605-1610.

- Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meo G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease: Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 2000; 342: 1560-1567.
- Mamah CE, Lesnick TG, Lincoln SJ, Strain KJ, de Andrade M, Bower JH, Ahlskog JE, Rocca WA, Farrer MJ, Maraganore DM: Interaction of alpha-synuclein and tau genotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005; 57: 439-443.
- Manto MU: The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum* 2005; 4: 2-6.
- Maraganore DM, de Andrade M, Lesnick TG, Strain KJ, Farrer MJ, Rocca WA, Pant PV, Frazer KA, Cox DR, Ballinger DG: High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 685-693.
- Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C; Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium: Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 2006; 296: 661-670.
- Marongiu R, Brancati F, Antonini A, Ialongo T, Ceccarini C, Scarciolla O, Capalbo A, Benti R, Pezzoli G, Dallapiccola B, Goldwurm S, Valente EM: Whole gene deletion and splicing mutations expand the PINK1 genotypic spectrum. *Hum Mutat* 2007; 28: 98.
- Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, Li L, Eberhardt O, Gerhardt E, Cookson MR, Hernandez D, Farrer MJ, Kachergus J, Engelender S, Ross CA, Berger K, Schols L, Schulz JB, Riess O, Kruger R: Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1223-1231.
- McCreadie RG, Robertson LJ, Wiles DH: The Nithsdale schizophrenia surveys. IX: Akathisia, parkinsonism, tardive dyskinesia and plasma neuroleptic levels. *Br J Psychiatry* 1992; 160: 793-799.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease: The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations. *Mov Disord* 2003; 18: 738-750.

- Münch C, Rosenbohm A, Sperfeld AD, Uttner I, Reske S, Krause BJ, Sedlmeier R, Meyer T, Hanemann CO, Stumm G, Ludolph AC: Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD. *Ann Neurol* 2005; 58: 777-780.
- Munhoz RP, Sa DS, Rogaeva E, Salehi-Rad S, Sato C, Medeiros H, Farrer M, Lang AE: Clinical findings in a large family with a parkin ex3delta40 mutation. *Arch Neurol* 2004; 61: 701-704.
- Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I: SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1441-1448.
- National Institute of Mental Health: Abnormal Involuntary Movement Scale (AIMS). *Early Clinical Drug Evaluation Unit Intercom* 1975; 4: 3-6.
- Nichols WC, Pankratz N, Hernandez D, Paisan-Ruiz C, Jain S, Halter CA, Michaels VE, Reed T, Rudolph A, Shults CW, Singleton A, Foroud T, Parkinson Study Group-PROGENI investigators: Genetic screening for a single common *LRRK2* mutation in a familial Parkinson's disease. *Lancet* 2005; 365: 410-412.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 552-565.
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Martinez Gil A, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW, Singleton AB: Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's Disease. *Neuron* 2004; 44: 595-600.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T; Parkinson Study Group: Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet* 2003a; 72: 1053-1057.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T; Parkinson Study Group: Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet* 2003b; 12: 2599-2608.
- Park Y, Hong S, Kim SJ, Kang S: Proteasome function is inhibited by polyglutamine-expanded ataxin-1, the SCA1 gene product. *Mol Cells* 2005; 19: 23-30.
- Parkinson J: An essay in the shaking palsy. Wittingham and Rowland, London 1817.
- Payami H, Lee N, Zarepari S, Gonzales McNeal M, Camicioli R, Bird TD, Sexton G, Ganchar S, Kaye J, Calhoun D, Swanson PD, Nutt J: Parkinson's disease, CYP2D6 polymorphism, and age. *Neurology* 2001; 56: 1363-1370.

- 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, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL: Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.
- Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS: Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 2001; 86: 122-127.
- Qian W, Homma M, Itagaki F, Tachikawa H, Kawanishi Y, Mizukami K, Asada T, Inomata S, Honda K, Ohkohchi N, Kohda Y: MDR1 gene polymorphism in Japanese patients with schizophrenia and mood disorders including depression. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 2446-2450.
- Ramirez A, Heimbach A, Grundemann 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: Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38: 1184-1191.
- Ranum LP, Schut LJ, Lundgren JK, Orr HT, Livingston DM: Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. *Nat Genet* 1994; 8: 280-284.
- Rosenbohm A, Lohmann K, Zschiedrich K, Seibler P, Djarmati A, Zühlke C, Klein C, Ludolph AC: Autosomal-dominant neurodegenerative disorder with predominantly spinocerebellar signs. *Neurology*, eingereicht.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
- Sanger F, Nicklen S, Coulsen AR: DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 47: 5463-5467.
- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, Berns AJ, Horst P: Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994; 77: 491-502.
- Schönecker M: Ein eigentümliches Syndrom im oralen Bereich bei Megaphen-Applikation. *Nervenarzt* 1957; 28: 550-553.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57.

- Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O: Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2004; 3: 291-304.
- Seelig A: A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 1998; 251: 252-261.
- Serra HG, Byam CE, Lande JD, Tousey SK, Zoghbi HY, Orr HT: Gene profiling links SCA1 pathophysiology to glutamate signaling in Purkinje cells of transgenic mice. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2535-2543.
- Sigwald J, Bouttier D, Raymondeaus C, Piot C: 4 Cases of facio-bucco-linguo-masticatory dyskinesia of prolonged development following treatment with neuroleptics. *Rev Neurol (Paris)* 1959; 100: 751-755.
- 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, Muentzer M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K: alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841.
- Skipper L, Wilkes K, Toft M, Baker M, Lincoln S, Hulihan M, Ross OA, Hutton M, Aasly J, Farrer M: Linkage disequilibrium and association of MAPT H1 in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 669-677.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA: Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat Neurosci* 2006; 9: 1231-1233.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M: Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388: 839-840.
- Stevanin G, Herman A, Brice A, Durr A: Clinical and MRI findings in spinocerebellar ataxia type 5. *Neurology* 1999; 53: 1355-1357.
- Strachan T, Read AP: Molekulare Humangenetik. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, München 2005; 470-473 und 517-524.
- Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Muller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Kruger R: Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2099-2111.
- Sun M, Latourelle JC, Wooten GF, Lew MF, Klein C, Shill HA, Golbe LI, Mark MH, Racette BA, Perlmutter JS, Parsian A, Guttman M, Nicholson G, Xu G, Wilk JB, Saint-Hilaire MH, DeStefano AL, Prakash R, Williamson S, Suchowersky O, Labelle N, Growdon JH, Singer C, Watts RL, Goldwurm S, Pezzoli G, Baker KB, Pramstaller PP, Burn DJ, Chinnery PF, Sherman S, Vieregge P, Litvan I, Gillis T, MacDonald ME, Myers RH, Gusella JF: Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson disease: the GenePD study. *Arch Neurol* 2006; 63: 826-832.

- Takara K, Sakaeda T, Okumura K: An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Des* 2006, 12: 273-86.
- Tan EK, Khajavi M, Thornby JI, Nagamitsu S, Jankovic J, Ashizawa T: Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease. *Neurology* 2000; 55: 533-538.
- Tan EK, Drozdziak M, Bialecka M, Honczarenko K, Klodowska-Duda G, Teo YY, Tang K, Wong LP, Chong SS, Tan C, Yew K, Zhao Y, Lee CG: Analysis of MDR1 haplotypes in Parkinson's disease in a white population. *Neurosci Lett* 2004; 372: 240-244.
- Tan EK, Chan DK, Ng PW, Woo J, Teo YY, Tang K, Wong LP, Chong SS, Tan C, Shen H, Zhao Y, Lee CG: Effect of MDR1 haplotype on risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2005; 62: 460-464.
- Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K: Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 1137-1143.
- Tang K, Wong LP, Lee EJ, Chong SS, Lee CG: Genomic evidence for recent positive selection at the human MDR1 gene locus. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 783-797.
- Taylor AM, Byrd PJ: Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J Clin Pathol* 2005; 58: 1009-1015.
- Tsui JK, Eisen A, Stoessl AJ, Calne S, Calne DB: Double-blind study of botulinum toxin in spasmodic torticollis. *Lancet* 1986; 2: 245-247.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW: Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK1*. *Science* 2004a; 304: 1158-1160.
- Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B, Bentivoglio AR: *PINK1* mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004b; 56: 336-341.
- van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, Maat-Kievit JA, Dooijes D, Notermans NC, Lindhout D, Knoers NV, Kremer HP: Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 2002; 58: 702-708.
- Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W: Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 693-704.

- Wang JS, Zhu HJ, Markowitz JS, Donovan JL, DeVane CL: Evaluation of antipsychotic drugs as inhibitors of multidrug resistance transporter P-glykoprotein. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 187: 415-423.
- Weber JL, May PE: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 388-396.
- West A, Periquet M, Lincoln S, Lucking CB, Nicholl D, Bonifati V, Rawal N, Gasser T, Lohmann E, Deleuze JF, Maraganore D, Levey A, Wood N, Durr A, Hardy J, Brice A, Farrer M: Complex relationship between *parkin* mutations and Parkinson disease: French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility on Parkinson's Disease. *Am J Med Genet* 2002; 114: 584-591.
- Williams DR, Hadeed A, al-Din AS, Wreikat AL, Lees AJ: Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Mov Disord* 2005; 20: 1264-1271.
- Xing Q, Gao R, Li H, Feng G, Xu M, Duan S, Meng J, Zhang A, Qin S, He L: Polymorphisms of the ABCB1 gene are associated with the therapeutic response to risperidone in Chinese schizophrenia patients. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 987-993.
- Yasui-Furukori N, Saito M, Nakagami T, Kaneda A, Tateishi T, Kaneko S: Association between multidrug resistance 1 (MDR1) gene polymorphisms and therapeutic response to bromperidol in schizophrenic patients: a preliminary study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30: 286-291.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yebenes JG: The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004; 55: 164-173.
- Zhang J, Song Y, Chen H, Fan D: The tau gene haplotype h1 confers a susceptibility to Parkinson's disease. *Eur Neurol* 2005; 53: 15-21.
- Ziegler A, König IR: A Statistical Approach to Genetic Epidemiology. Concepts and Applications. 1. Auflage. Wilchey-VCH, Weinheim 2006; 200-203.
- 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, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T: Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44: 601-607.
- Zoghbi HY, Orr HT: Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 2000; 23: 217-247.

8. ANHANG

8.1 Erläuterungen der Methodik zur Identifizierung von Krankheitsgenen

8.1.1 Kopplungsanalyse

Merkmale, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, werden immer unabhängig voneinander vererbt. Ob zwei oder mehrere auf demselben Chromosom platzierten Merkmale (syntäne Allele) gemeinsam vererbt werden, ist von ihrer Entfernung zueinander abhängig. Während der Meiose kommt es zur Aneinanderlagerung der homologen Zweichromatidchromosomen und zum zufälligen Austausch von chromosomalen Abschnitten (*crossing-over*). Die neu entstandene Reihenfolge von väterlichen und mütterlichen Allelen auf einem Chromosom bezeichnet man als Rekombination. Das Ereignis der Rekombination ist umso häufiger, desto weiter entfernt sich die Merkmale voneinander befinden. Die Entfernung zweier Merkmale wird in Centi-Morgan (cM) angegeben; beträgt sie beispielsweise 1 cM, so bedeutet dies, dass die betrachteten Merkmale in einem von hundert Fällen nicht gemeinsam vererbt werden. Als Faustregel gilt, dass eine relative Entfernung von 1 cM einer physikalischen Entfernung von 1,0 Mb entspricht. Die Rekombinationshäufigkeit kann einen Wert von 0 (die Allele sind gekoppelt) bis maximal 0,5 (die Allele liegen sehr weit voneinander entfernt und sind „frei“ rekombinierbar) annehmen (Buselmaier und Tarverdian, 2004).

Bei der Kopplungsanalyse bedient man sich z. B. *short tandem repeat* (STR)-Markern, auch Mikrosatellitenmarker genannt. Dies sind zwei bis vier Basenpaare lange, repetitive Sequenzen, die sich in den nicht-kodierenden Bereichen der DNA finden (Weber und May, 1989). Es existieren über 50.000 dieser STR-Marker, die sich über das ganze Genom verteilen. Ihre Lage ist bekannt und auf sog. genetischen Karten vermerkt (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/compMaps.asp>). STR-Marker zeichnen sich dadurch aus, dass sie hochpolymorph sind, also viele verschiedene Allele vorkommen. Dies macht es möglich, verschiedene Individuen voneinander zu unterscheiden. Außerdem werden sie in der Regel stabil vererbt. Dadurch kann ihre

Weitergabe von einer Generation auf die nächste verfolgt werden. Je polymorpher ein Marker ist und je gleichmäßiger verteilt diese Allele in der Bevölkerung sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, einen heterozygoten Träger zu finden. Bei der Betrachtung mehrerer dieser informativen Marker auf einem Chromosom lässt sich eine Rekombination gut aufspüren.

Für eine Kopplungsanalyse werden mehrere 100 STR-Marker gleichmäßig verteilt über das gesamte Genom von jedem Mitglied einer Familie analysiert. Anschließend wird untersucht, ob ein Allel eines Markers oder ein Haplotyp (mehrere in Reihenfolge gebrachte und nach elterlicher Herkunft sortierte Allele von benachbarten Markern) zusammen mit der Krankheit auftreten. Das gesuchte Gen wird mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Nähe dieser Marker liegen.

Zur Beurteilung der Wahrscheinlichkeit, dass in einem gemeinsam auftretenden Haplotyp bei allen Betroffenen tatsächlich das krankheitsverursachende Gen lokalisiert ist, berechnet man den sog. *LOD (logarithm of the odds)-Score* Z . Er ist folgendermaßen definiert, wobei θ für die Rekombinationshäufigkeit, L für die Wahrscheinlichkeit steht:

$$Z(\theta) = \log_{10} [L(\theta)/L(0,5)]$$

Der Term $L(\theta)/L(0,5)$ drückt dabei die Wahrscheinlichkeit aus, dass Marker und Krankheit gekoppelt sind, dividiert durch die Wahrscheinlichkeit, dass sie nicht gekoppelt vererbt werden. Bei der wahrscheinlichsten Rekombinationshäufigkeit θ erreicht Z sein Maximum, bei der maximalen Rekombinationshäufigkeit von $\theta = 0,5$ werden alle *LOD-Scores* gleich null, da das Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten gleich eins ist und $\log_{10}(1) = 0$. Positive *LOD-Scores* befürworten eine Kopplung, negative sprechen dagegen. Die Bewertung der *LOD-Scores* erfolgt nach den Richtlinien von Lander und Kruglyak (1995). Ein *LOD-Score* von $Z \geq 3$ ist der untere Grenzwert für eine Kopplung bei einer angenommenen Fehlerwahrscheinlichkeit von fünf Prozent. Bei $Z \leq -2$ ist eine Kopplung auszuschließen.

Die Aussagekraft der Kopplungsanalyse wird erheblich verbessert, wenn man die Position eines Krankheitslocus innerhalb eines äußeren Rahmens von mehreren Markern in Form einer *Multipoint*-Analyse bestimmt. Das dafür verwendete Computerprogramm prüft benachbarte Marker (Haplotypen) auf Kopplung und bildet gleichzeitig den *LOD-Score* des gesuchten Krankheitslocus zu jedem einzelnen Marker. Das Ergebnis ist eine Kurve von *LOD-Scores*, die gegen die bekannte Markerposition auf dem Chromosom aufgetragen

wird (Strachan und Read, 2005). Neben der Anwendung einer *Multipoint*-Analyse steigt die Zuverlässigkeit einer Kopplungsanalyse auch mit der Größe des Stammbaumes und der Anzahl der Betroffenen an.

Zur Analyse der Daten einer *Multipoint*-analyse kann man zwei Modelle heranziehen. Bei der parametrischen Analyse benötigt man ein genaues genetisches Modell. Hierzu gehören Angaben zum Erbgang (dominant oder rezessiv), der Allelfrequenz (Häufigkeit der genetischen Varianten des Krankheitsgens in der Allgemeinbevölkerung), sowie der Penetranz (Anteil der Erkrankten von Mutationsträgern), wobei letztere Werte jedoch nur geschätzt werden können. Bei nicht-parametrischen Analysen betrachtet man, welche Markerallele betroffene Personen untereinander häufiger teilen als statistisch erwartet wird. Besonders geeignet sind große Serien an Kernfamilien, die aus einem Geschwisterpaar gegebenenfalls mit Eltern bestehen. Diese Art der Analyse ist insbesondere für komplexe Krankheiten mit mehreren Krankheitsgenen interessant, da hier oftmals genaue Angaben zu einem genetischen Modell in einer einzelnen Familie fehlen. Zudem führen fehlerhafte Informationen im Fall einer parametrischen Analyse zu falschen Kopplungsanalysen. Bei der nicht-parametrischen Analyse geht man allerdings davon aus, dass mehrere dieser Kernfamilien Mutationen im gleichen Gen tragen. Wenn jedoch alle Informationen zum genetischen Modell vorhanden sind, ist die parametrische Analyse überlegen, da die statistische Aussagekraft deutlich höher ist.

8.1.2 Feinkartierung und Identifizierung der Kandidatengene

Durch die genomweite Kopplungsanalyse werden Informationen über ein Markerset mit relativ großem Abstand (4 - 20 cM) voneinander gewonnen. Ziel der Feinkartierung ist es, die Regionen mit einem hohen *LOD-Score* detaillierter zu charakterisieren. Dazu müssen weitere Marker analysiert werden. Mit einer genügend hohen Markerdichte ist es möglich, eine Haplotypenanalyse durchzuführen, wofür die Marker relativ zueinander auf der genetischen Karte platziert werden. Dabei werden die vererbten Allele unter Berücksichtigung der Mendel'schen Vererbungsregeln so auf die Chromatiden der Familienmitglieder verteilt, dass die Rekombinationshäufigkeit so gering wie möglich ist. Rekombinationsereignisse können durch zusätzliche Marker erkannt und damit die Region

immer mehr eingegrenzt werden. Die gekoppelte Region einer autosomal-dominanten Erkrankung ist der Bereich, in dem alle Merkmalsträger den gleichen Haplotyp besitzen, während nicht betroffene Personen in der Regel einen anderen Haplotyp aufweisen. Bei einem rezessiven Erbgang müssen die Betroffenen beide Haplotypen teilen.

Ist die Position ermittelt, kann über Datenbanken nach Kandidatengen gesucht werden. Als Kandidatengene werden Gene bezeichnet, deren Funktionsverlust sinnvoll in den Pathomechanismus der Krankheit integriert werden können. Daher muss in den Datenbanken zumindest eine Hypothese über die Funktion des Genproduktes vorliegen. Die Überprüfung der Kandidatengene findet in erster Linie durch die Sequenzierung der Exons statt. Ziel ist es, eine Mutation zu finden, von der nun angenommen werden kann, dass sie die Krankheit verursacht.

8.1.3 Assoziationsstudie

Bei multifaktoriell und polygen bedingten Krankheiten tragen viele pathogene Faktoren zur Entwicklung des Krankheitsgeschehens bei. Es ist nachvollziehbar, dass das Wegfallen eines protektiven oder Hinzukommen eines schädlichen Faktors das bestehende Gleichgewicht zwischen schützenden und gefährdenden Einflüssen zerstört und zur Entwicklung der Krankheit führt. Assoziationsstudien dienen dazu, solche Risikofaktoren, die in der Genetik als Suszeptibilitätsgene (Anfälligkeitsgene) bezeichnet werden, zu identifizieren.

Die untersuchten genetischen Varianten sind Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), die im Vergleich zu den STR-Markern dichter über das Genom verteilt liegen (durchschnittlich ≥ 1 pro 1 kb) und noch seltener als diese mutieren. Da man vermutet, dass die Anfälligkeit für Krankheiten auf genetische Varianten weit zurückliegender gemeinsamer Vorfahren zurückzuführen ist, eignen sich die stabilen SNPs sehr gut für Untersuchungen dieser Art, zumal sie oft eine funktionelle Relevanz für die Genexpression besitzen.

Das gewählte Studiendesign entspricht oft dem einer Fall-Kontroll-Studie, so auch in der vorliegenden Arbeit. Bei der Zusammenstellung der Fall- und Kontrollgruppen ist es von großer Wichtigkeit, die Kontrollgruppe in möglichst vielen Aspekten der Fallgruppe anzupassen, z. B. in Hinblick auf das Alter, Geschlecht und die ethnische Abstammung.

Nur so kann man ausschließen, dass die gemachten Beobachtungen nicht mit diesen Variablen in Zusammenhang stehen (Bird *et al.*, 2001).

Fall-Kontroll-Studien ermitteln retrospektiv die Wahrscheinlichkeit (*Odds*), als Träger einer bestimmten genetischen Variante an einer Krankheit erkrankt zu sein und setzen ins Verhältnis zu derjenigen Wahrscheinlichkeit, ohne Vorliegen dieser Variante an dieser Krankheit zu leiden. Der ermittelte Quotient heißt *Odds Ratio* (OR) und ist eine Schätzung des relativen Risikos, das für retrospektive Studien nicht erhoben werden kann. Auf die Genauigkeit des ermittelten Schätzwertes wird durch Konfidenzintervalle (KI) hingewiesen. Sie sagen aus, in welchen Grenzen sich der Schätzwert mit einer festgelegten Wahrscheinlichkeit von 95 % tatsächlich befindet und erlauben so Rückschlüsse von der untersuchten Stichprobe auf die Bevölkerungsgruppe. Ein $OR > 1$ deutet darauf hin, dass der untersuchte Polymorphismus ein Risikofaktor für die Krankheit ist, ein Quotient > 2 ist allerdings wünschenswert (Bird *et al.*, 2001). Ein $OR < 1$ deutet auf einen protektiven Einfluss hin; bei einem $OR = 1$ besteht kein Zusammenhang zwischen untersuchtem Faktor und Krankheit. Das OR gilt daher erst dann als bedeutsam, wenn das entsprechende KI den Wert 1 nicht beinhaltet.

Retrospektive Assoziationsstudien bieten gegenüber Kopplungsanalysen den Vorteil, dass sich mit ihrer Hilfe genetische Varianten mit einem geringen Effekt auf den Phänotypen identifizieren lassen. Sie sind einfacher als prospektive Studien durchzuführen, da von Beginn an bekannt ist, ob der Teilnehmer der Fall- oder Kontrollgruppe angehört. Andererseits können bei der Anfertigung solcher Studien einige Fehler auftreten: Zu kleine Stichprobengrößen, eine schlecht angepasste Kontrollgruppe und eine möglicherweise bestehende Stratifikation der Stichproben können Assoziationen vortäuschen, die in Wirklichkeit auf dem Zufall oder unbekanntem Einflussgrößen beruhen. Die Analyse von Subgruppen der Stichprobe verringert deren Größe und somit hat die Untersuchung eine geringere *Power* (Effektstärke mit der es gelingt, einen tatsächlich bestehenden Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen als statistisch signifikant nachzuweisen). Unvorsichtiges Deklarieren eines Gens als Kandidat und die Gefahr der Überinterpretation gewonnener Ergebnisse verkünden eine Assoziation, die ungenügend validiert ist. Nicht zu vergessen ist die Tatsache, dass sich signifikante Ergebnisse besser veröffentlichen lassen und so ein unvollständiges Bild der Studienlage existiert (Editor von *Nature Genetics*, 1999; Cardon und Bell, 2000; Tan *et al.*, 2000). Die zitierten Autoren schlagen daher Richtlinien vor, um die Güte der Studien zu verbessern. Diese beinhalten neben der

Auswahl geeigneter Kontrollindividuen und einer ausreichenden Größe der Stichprobe, eine unabhängige Replikation der Ergebnisse, die Berechnung der *Power* der Untersuchung, hohe Signifikanzschwellen, die Erläuterung plausibler biologischer Hintergründe sowie die Darstellung aller angefallenen Ergebnisse.

8.2 Tabellen

Tab. 8.1: Ausgewählte Suszeptibilitätsgene für das primäre Parkinsonsyndrom

Diskutiertes Gen	OMIM
Dopaminrezeptor D2	126450
Dopaminrezeptor D4	126452
Dopamintransporter	126455
Monoaminoxidase B	309860
Catechol-O-Methyltransferase	116790
Glutathion-S-Transferase Omega 1	605482
N-Acetyltransferase 2	243400
Glukocerebrosidase	606463
NADH-Dehydrogenase, Untereinheit 1	516000
NADH-Dehydrogenase, Untereinheit 3	516002
Apolipoprotein E	107741
Semaphorin 5A	609297
<i>Brain-derived neurotrophic-factor</i>	113505
Interleukin 1B	147720
<i>Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2</i>	601828
Serinprotease 25	606441
Synphillin 1	603779

OMIM, *online mendelian in man* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)

Tab. 8.2: Ausgewählte Substrate des P-Glykoproteins (aus Ambudkar *et al.*, 1999; Seelig, 1998)

Substratklasse	Wirkstoff
Antihistaminika	Terfenadin
Antibiotika, Antihelminthika,	Cefazolin, Cefoperazon, Clotrimazol*, Erythromycin*, Ivermectin,
Antimykotika	Rifampicin*
HIV-Proteaseinhibitoren	Indinavir, Ritonavir, Saquinavir
Immunsuppressiva	Cyclosporin A, Tacrolimus
Kalziumkanalblocker	Diltiazem, Gallopamil, Nicardipin, Nifedipin*, Verapamil,
Kardiaka	Amiodaron, Chinidin, Digoxin, Propafenon
Morphine	Morphin, Morphin-6-Glucoronid, Loperamid
Psychopharmaka	Fluphenazin ⁺ , Midazolam*, Ondansetron, Perphenazin ⁺ , Phenobarbital*, Phenoxazin, Phenytoin, Thioridazin ⁺ , Trifluoperazin ⁺ , Triflupromaxin ⁺
Steroide	Aldosteron, Dexamethason, Hydrocortison
Tumorthapeutika	Dactinomycin*, Daunorubicin*, Doxorubicin*, Etoposid*, Mitomycin C, Mitoxantron, Paclitaxel*, Tamoxifen, Topotecan, Vinblastin*, Vincristin*
Andere Substanzen	Colchicin*, Dipyridamol, Domperidon, Methadon, MPTP, Reserpin*, Prazosin, Yohimbin

⁺Neuroleptikum ; *zusätzlich Induktion von P-GP

Tab. 8.3: Ermittelte Genotypenverteilung dreier SNPs des *MDR1*-Gens aus Cascorbi *et al.*, 2001

Exon / cDNA-Position	Allel (wt/mt)	Effekt	Genotyp	Häufigkeit* (%)
21 / 2677	G T A	Ala893 Ser893 Thr893	G/G	30,9
			G/T	49,2
			T/T	16,1
			G/A	2,0
			T/A	1,8
			A/A	0,0
26 / 3320	A C	Gln1107 Pro1107	A/A	99,6
			A/C	0,4
			C/C	0,0
26 / 3435	C T	Ile1140 ⁺	C/C	20,8
			C/T	50,5
			T/T	28,6

*bei 461 Individuen deutscher Abstammung; ⁺keine Aminosäuresubstitution

8.3 Stammbäume der untersuchten Familien

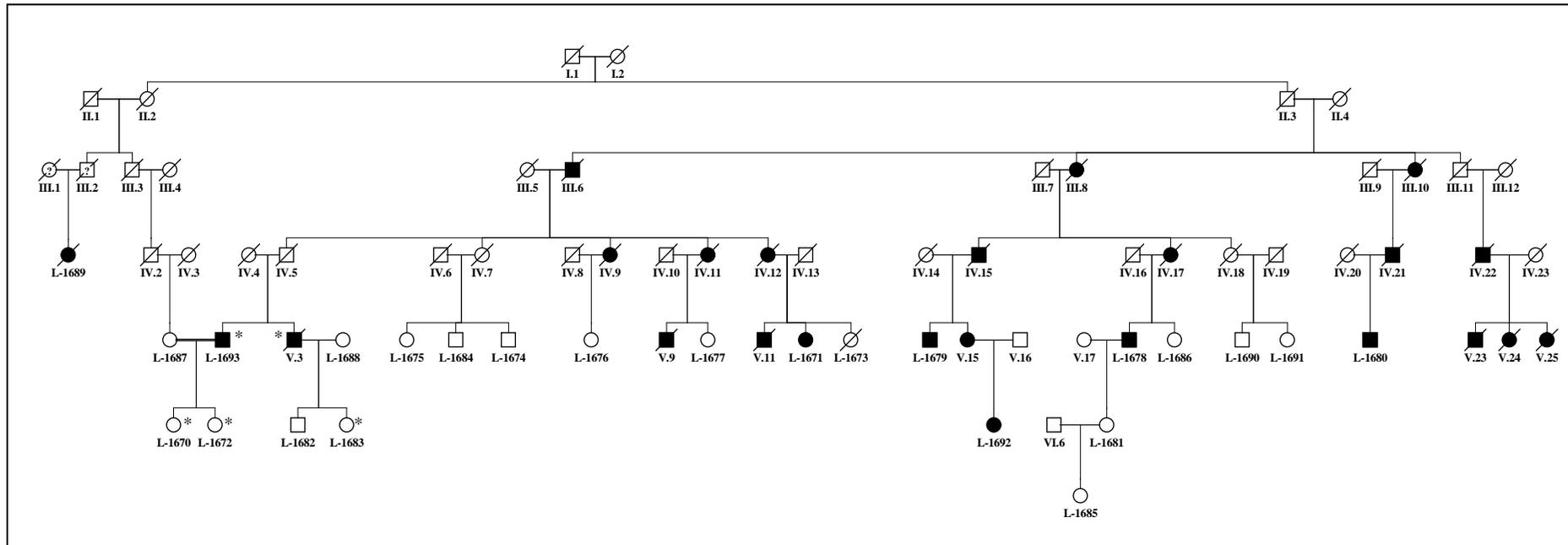


Abb. 8.1a: Stammbaum der Familie R. In der Abbildung stehen Kreise für weibliche, Quadrate für männliche Personen. Durchgestrichene Individuen sind bereits verstorben. Die Symbole sind schwarz angefüllt, wenn die Person sicher von der Krankheit betroffen ist. Ein weißes Symbol bedeutet, dass die Person nicht betroffen ist. Bei den Individuen mit Fragezeichen (III.1 und III.2) konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob sie betroffen sind oder nicht. Für die mit * markierten Personen wurde bereits eine Mutation in dem Gen *DCTN1* beschrieben (Münch *et al.*, 2005; Rosenbohm *et al.*, eingereicht). Der Doppelstrich zwischen L-1687 und L-1693 symbolisiert Blutsverwandtschaft zwischen Eheleuten.

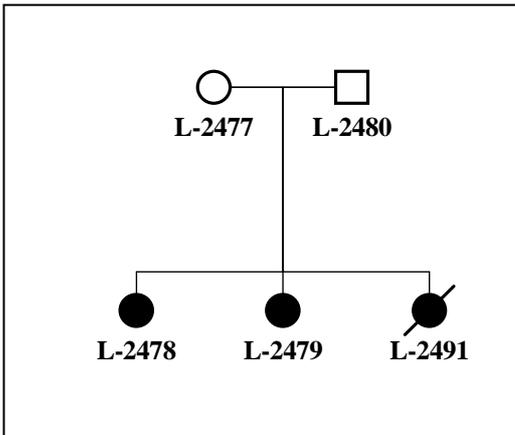


Abb.8.1b: Stammbaum der Familie M. In den Abbildungen a - c stehen Kreise für weibliche, Quadrate für männliche Personen. Die Symbole sind schwarz angefärbt, wenn die Person sicher von der Krankheit betroffen ist. Ein weißes Symbol bedeutet, dass die Person nicht betroffen ist. Durchgestrichene Individuen sind bereits verstorben.

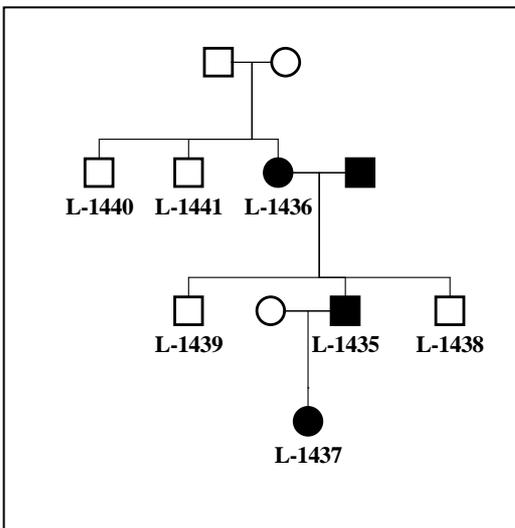


Abb.8.1c: Stammbaum der Familie K. (Legende siehe Abb. 8.1.b)

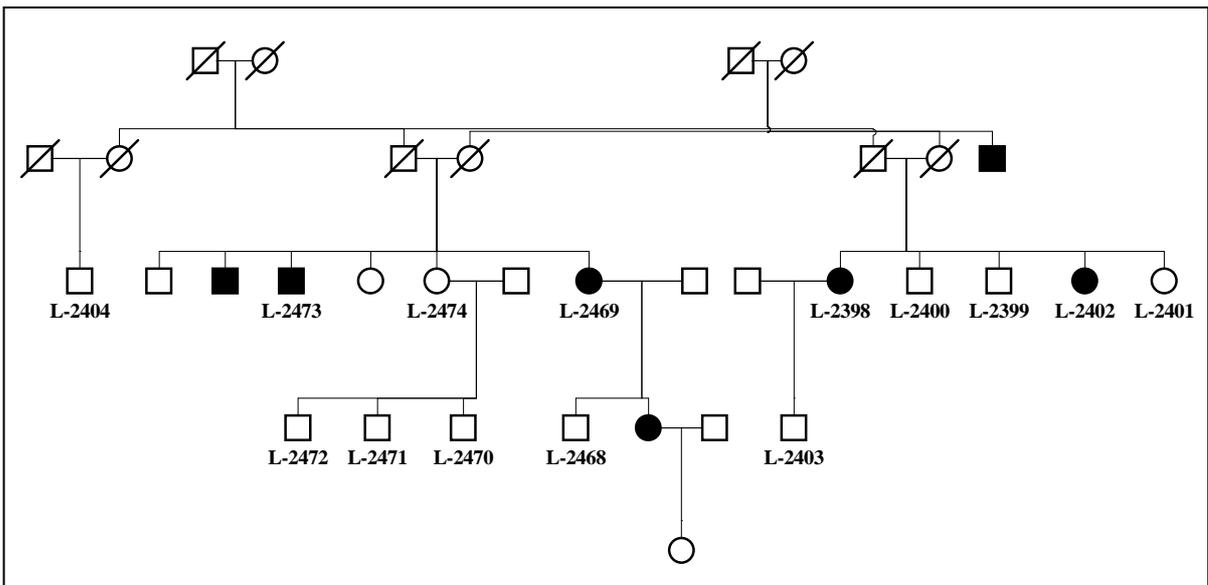


Abb. 8.1d: Stammbaum der Familie P. (Legende siehe Abb. 8.1.b)

8.4 Primer und Sonden

Tab. 8.4: Allgemeine Primer

Primer-Name	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)
<i>M13F</i>	F: CAC GAC GTT GTA AAA CGA C
<i>M13R</i>	R: GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
<i>M13-700F</i>	IRD700- CAC GAC GTT GTA AAA CGA C
<i>M13-800F</i>	IRD800- CAC GAC GTT GTA AAA CGA C
<i>M13-800R</i>	IRD800- GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG

Tab. 8.5: Primer für *MDR1*

Gen	Exon	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)	Größe [bp]	Annealing-Temp. [° C]	Zusätze
<i>MDR1</i>	21	F: GCA GGA GTT GTT GAA ATG AAA ATG R: TAG AGC ATA GTA AGC AGT AGG GAG	167	58	1 mM MgCl ₂
<i>MDR1</i>	26	F: ATC TGT GAA CTC TTG TTT TCA GC R: TCG ATG AAG GCA TGT ATG TTG	207	55	-

Tab. 8.6: Primer für *Beta-Globin*

Gen	Exon	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)	Größe [bp]	Annealing-Temp. [° C]	Zusätze
<i>Beta-Globin</i>	1	F: ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC R: CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	110	58	1 mM MgCl ₂

Tab. 8.7: Primer für *SNCA*

Gen	Exon	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)	Größe [bp]	Annealing-Temp. [° C]	Zusätze
<i>SNCA</i>	3	F: GCT AAT CAG CAA TTT AAG GCT AG R: GAT ATG TTC TTA GAA TGC TCA G	218	55	-

Tab. 8.8: Primer für *Parkin**

Gen	Exon	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)	Größe [bp]	Annealing-Temp. [° C]	Zusätze
<i>Parkin</i>	1	F: GCG CGG CTG GCG CCG CTG CGC GCA R: GCG GCG CAG AGA GGC TGT AC	112	72	3,0 µl Betain
<i>Parkin</i>	2	F: ATG TTG CTA TCA CCA TTT AAG GG R: AGA TTG GCA GCG CAG GCG GCA TG	308	58	0,7 µl Betain
<i>Parkin</i>	3a	F: ACA TGT CAC TTT TGC TTC CCT R: ACT GAG CTG CTG AGG TCC AC	480	58	0,7 µl Betain

Fortsetzung der Tabelle 8.8:

Gen	Exon	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)	Größe [bp]	Annealing-Temp. [° C]	Zusätze
<i>Parkin</i>	3b	F: AGA AAC GCG GCG GGA GGC TG R: AGG CCA TGC TCC ATG CAG ACT GC	280	58	0,7 µl Betain
<i>Parkin</i>	4	F: ACA AGC TTT TAA AGA GTT TCT TGT R: AGG CAA TGT GTT AGT ACA CA	261	58	0,7 µl Betain
<i>Parkin</i>	5	F: ACA TGT CTT AAG GAG TAC ATT T R: TCT CTA ATT TCC TGG CAA ACA GTG	227	58	0,7 µl Betain
<i>Parkin</i>	6	F: AGA GAT TGT TTA CTG TGG AAA CA R: GAG TGA TGC TAT TTT TAG ATC CT	268	58	0,7 µl Betain
<i>Parkin</i>	7	F: TGC CTT TCC ACA CTG ACA GGT ACT R: TCT GTT CTT CAT TAG CAT TAG AGA	239	58	0,7 µl Betain
<i>Parkin</i>	8	F: TGA TAG TCA TAA CTG TGT GTA AG R: ACT GTC TCA TTA GCG TCT ATC TT	206	58	0,7 µl Betain
<i>Parkin</i>	9	F: GGG TGA AAT TTG CAG TCA GT R: AAT ATA ATC CCA GCC CAT GTG CA	278	58	0,7 µl Betain
<i>Parkin</i>	10	F: ATT GCC AAA TGC AAC CTM TGT C R: TTG GAG GAA TGA GTA GGG CAT T	165	58	0,7 µl Betain
<i>Parkin</i>	11	F: ACA GGG AAC ATA AAC TCT GAT CC R: CAA CAC ACC AGG CAC CTT CAG A	303	58	0,7 µl Betain
<i>Parkin</i>	12	F: GTT TGG GAA TGC GTG TTT T R: AGA ATT AGA AAA TGA AGG TAG ACA	255	58	0,7 µl Betain

*Kitada *et al.*, 1998Tab. 8.9: Primer für *PINK1*

Gen	Exon	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)	Größe [bp]	Annealing-Temp. [° C]	Zusätze
<i>PINK1</i>	1a	F: AGG CGC CAG TAC CAG CAT AGC R: TCC GCC TGT TTT TCC TCG ATG	530	60	1,5 µl DMSO; 0,7 µl Betain
<i>PINK1</i>	1b	F: TCG GGC TCG GGC TCC CTA A R: CGG CCC TCG ATC TGC TCA G	330	55	0,5 µl Formamid; 0,7 µl Betain
<i>PINK1</i>	2	F: ATT GAT CTG GTA GAC GTG GAC R: CCT TTC CTG TGG ATA ATC TGT C	522	55	-
<i>PINK1</i>	3	F: CTC GAA GGT CAG AGC CAA TTC R: CTG TCA TAT CAG ACA CTG TAC C	323	55	-
<i>PINK1</i>	4	F: GAA TGT CAG TGC CAG TGT TGG R: AGA TAT GTT CCC TTT GCA TGG C	429	69	-
<i>PINK1</i>	5	F: CGT ATT GGG AGT CGT CGA TGT R: GAC CTG AAG AGT CAG TCC TAA A	300	55	-
<i>PINK1</i>	6	F: GTC AGC TAT GTC TTG CTG GTG R: ATC ACA AGG CAT CGA GAT TCC	309	55	-
<i>PINK1</i>	7	F: TGG ATC AGG TGA TGT GCA GGA R: AGG ATC TGT CAC TGT GGC TCT	416	72	-
<i>PINK1</i>	8	F: GAG AAG GGA AGA CCC TCA CTA R: CAG ACT GAA CTC TCA CTC AAG T	520	55	-

Tab 8.10: Primer für DJ-1*

Gen	Exon	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)	Größe [bp]	Annealing-Temp. [° C]	Zusätze
<i>DJ-1</i>	2 ⁺	F: GGG GTA TCT CAG GGT TGC AAT G R: TGG CTA AAA ATC GAT GTG GGA CT	199	59	1 µl Betain
<i>DJ-1</i>	3	F: GGT GAG ACC CCA TCT CTC TTT R: AAC AAA GAA GCC ATA TGA AGG AA	247	58	1 µl Betain
<i>DJ-1</i>	4	F: GCT ATC TCC TGT ACT TCC CAC A R: TTG AGG TAT AAT TGA GTA GAA TTT TT	201	55	1 µl Betain
<i>DJ-1</i>	5	F: TTA TGA GAA ATG CCT TGC R: GCC ACC CAA ACT AAA TA	414	56	1 µl Betain
<i>DJ-1</i>	6	F: TGG GCT TTT CTA TAT CTG CAC TTA G R: GGG ATT GCA GTA AGC CAA GA	240	61	1 µl Betain
<i>DJ-1</i>	7	F: GCC CAT TAG GAT GTC ACC TT R: TTC CTA ACG GCC TGT TTC TC	245	60	1 µl Betain

*Hedrich *et al.*, 2004b; ⁺Das Exon 1 kodiert nicht für die Aminosäuresequenz.

Tab. 8.11: Primer für LRRK2

Gen	Exon	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)	Größe [bp]	Annealing-Temp. [° C]	Zusätze
<i>LRRK2</i>	24	F: TCC TCA GAT GGT TCA CTT TAG R: ACA TCA GCA TAT TTA GGC AAC	346	61	-
<i>LRRK2</i>	25	F: CCT CTT TGA TGC TGT TCT TTG R: GCC AAC CTG CTA ATT TTA TTT	398	61	-
<i>LRRK2</i>	29	F: AAA AGA ACT CAC CTA AAT CTC AAG R: TCC AAA CAA ATG GTA AAA GTG	351	59	-
<i>LRRK2</i>	31	F: TCA ACA GGA ATG TGA GCA GG R: CCC ACA ATT TTA AGT GAG TTG C	386	61	-
<i>LRRK2</i>	35	F: CAT TTG CTC AAC AAG GTT GG R: ATG CCA TCT CCC TAA TTT CTC	304	61	-
<i>LRRK2</i>	38	F: GAT TGG TTA GAA AGG GAG GG R: CAT CCT CAT CTT GAT CCT AGT CT	493	61	-
<i>LRRK2</i>	40	F: TTT AAA GAA GGA GAT ACG TGG GT R: TAC AGG GTT AAG ATG ATG GGT TC	519	61	-
<i>LRRK2</i>	41	F: TGA TGC TTG ACA TAG TGG ACA TT R: CTG TTT TCC TTT TGA CTC TTC TGA	353	61	-

Tab. 8.12: Sonden für den *LightCycler*

Gen	Exon/ SNP	Anchor/ Sensor	Sondensequenz und Fluorophormarkierung
<i>MDRI</i>	SNP 2677	Sensor	TTC CCA GTA CCT TCT--FL*
<i>MDRI</i>	SNP 2677	Anchor	LCRed640-CTT TCT TAT CTT TCA GTG CTT GTC C--PH*
<i>MDRI</i>	SNP 3435	Sensor	GAC AAC AGC CGG GGT GTG TCA--FL
<i>MDRI</i>	SNP 3435	Anchor	LCRed640-GGA AGA GAT CGT GAG GGC AG --PH
<i>MDRI</i>	SNP 3320	Sensor	CGA CTG AAT GTT CCG TGG C--FL
<i>MDRI</i>	SNP 3320	Anchor	LCRed705-CCG AGC ACA CCT GGG CAT CGT G--PH
<i>β-Globin</i>	Exon 1	Sensor	CAA ACA GAC ACC ATG GTG CAC CTG ACT CCT GAG GA--FL
<i>β-Globin</i>	Exon 1	Anchor	LCRed705-AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG GGC AA

*Arjomand-Nahad *et al.* 2004

8.5 STR-Marker

Tab. 8.13: Für die Haplotypisierungen verwendete STR-Marker

Locus	Marker	Position auf genetischer Karte (cM)	Position auf physikalischer Karte (Mb)	Lokalisation des Gens (Mb)
<i>PARK1</i>	D4S2367	78,43	k.A.	<i>SNCA</i> (90,9)
	D4S3042	85,42	77,1	
	D4S2922	90,28	82,7	
	D4S2361	93,48	85,2	
	D4S2986	105,29	99,9	
<i>PARK2*</i>	D6S1719	177,88	165,9	<i>Parkin</i> (163,0-161,7)
	D6S1599	169,95	162,8	
	D6S955	167,78	162,4	
	D6S305	166,39	162,1	
	D6S1550	166,39	161,8	
	D6S1579	166,39	160,9	
<i>PARK3</i>	D2S441	86,00	68,1	Gen unbekannt
	D2S327	88,15	70,1	
	D2S2111	90,29	73,2	
	D2S2114	95,67	75,7	
	D2S438	99,41	78,8	
<i>PARK5</i>	D4S3001	49,47	32,7	<i>UCHL-1</i> (40,9)
	D4S1581	51,60	37,8	
	D4S405	56,95	40,0	
	D4S1627	60,16	43,9	
	D4S2367	78,43	k.A.	

Fortsetzung der Tabelle .13:

Locus	Marker	Position auf genetischer Karte (cM)	Position auf physikalischer Karte (Mb)	Lokalisation des Gens (Mb)
<i>PARK6</i>	D1S552	45,33	19,1	<i>PINK1</i> (20,8)
	D1S2732	48,53	20,5	
	D1S478	48,53	21,5	
	D1S2828	48,53	21,8	
	D1S2864	50,28	22,7	
<i>PARK7</i>	D1S468	4,22	2,8	<i>DJ-1</i> (7,9)
	D1S2845	8,85	4,4	
	D1S2870 [#]	14,04	6,2	
	D1S2663 [#]	14,59	7,1	
	D1S1612	16,22	8,0	
<i>PARK8</i>	D1S1597	29,33	13,7	<i>LRRK2</i> (38,9-39,0)
	D12S2194	55,5	k.A.	
	D12S2515 ⁺	n. g.	38,9	
	D12S2519 ⁺	n. g.	39,1	
	D12S2520 ⁺	n. g.	39,1	
<i>SCA5</i>	D12S1048	56,38	39,3	<i>SPTBN2</i> (66,2)
	D11S1765	61,78	39,9	
	D11S1883	65,05	63,1	
	D11S4178	67,48	67,9	
	D11S4113	68,01	68,5	
	D11S4136	71,60	73,2	
	D11S2371	76,13	69,3	

*Reihenfolge der *Parkin*-Marker hier absteigend, da das Gen auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang kodiert ist; [#]nur bei Familie M untersucht; ⁺Kachergus *et al.*, 2005; k.A., keine Angaben; n.g., nicht gelistet

Tab. 8.14: STR-Marker und Ergebnisse der genomweiten Kopplungsanalyse für Familie R

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. [cM]	Entfernung zum vorhergehenden Marker [cM]	Multipoint-LOD-Score
1	StartC01	0,00		1,83
1	D1S468	4,22	4,22	2,01
1	D1S1612	16,22	12,00	-0,02
1	D1S1597	29,93	13,71	-0,06
1	D1S552	45,33	15,40	1,65
1	D1S1622	56,74	11,41	-0,29
1	D1S2134	75,66	18,92	1,96
1	D1S3728	89,49	13,83	-1,37
1	D1S1665	102,02	12,53	-0,79
1	D1S1728	109,04	7,02	-0,81
1	D1S2766	118,14	9,10	-1,07
1	D1S2626	136,34	18,20	1,43
1	D1S3723	140,39	4,05	-0,35
1	D1S534	151,88	11,49	-1,11
1	D1S1679	170,84	18,96	0,81

Fortsetzung der Tabelle 8.14:

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. [cM]	Entfernung zum vorhergehenden Marker [cM]	Multipoint-LOD-Score
1	D1S1677	176,00	5,16	-0,34
1	D1S1589	192,05	16,05	0,22
1	D1S2848	200,96	8,91	-1,95
1	D1S533	209,15	8,19	-2,14
1	D1S1725	219,92	10,77	-2,75
1	D1S2891	224,50	4,58	-3,21
1	D1S-A-	227,00	2,50	-0,79
1	D1S3462	247,23	20,23	-0,70
1	D1S235	254,64	7,41	-1,09
1	D1S180	267,51	12,87	-1,04
1	D1S1609	274,53	7,02	-3,01
1	EndC01	289,67	15,14	-0,17
2	StartC02	0,00		2,04
2	D2S2393	7,05	7,05	2,37
2	D2S2166	10,86	3,81	2,32
2	D2S162	20,03	9,17	-0,70
2	D2S2200	27,60	7,57	-2,16
2	D2S1360	38,33	10,73	-2,13
2	D2S405	47,97	9,64	0,65
2	D2S1788	55,51	7,54	0,71
2	D2S1352	73,61	18,10	0,03
2	D2S327	88,15	14,54	0,02
2	D2S1394	90,82	2,67	1,56
2	D2S2232	107,46	16,64	-0,08
2	D2S2229	116,55	9,09	-0,43
2	D2S410	125,18	8,63	-2,41
2	D2S1328	132,58	7,40	1,29
2	D2S1334	145,08	12,50	-2,34
2	D2S1399	152,04	6,96	1,47
2	D2S1353	164,51	12,47	-1,88
2	D2S1391	186,21	21,70	0,01
2	D2S1384	200,43	14,22	1,34
2	D2S434	215,78	15,35	-0,73
2	D2S427	236,70	20,92	-2,84
2	D2S2348	242,17	5,47	-2,59
2	GATA151D2	248,00	5,83	-0,46
2	D2S125	260,63	12,63	-0,87
2	EndC02	269,07	8,44	0,23
3	StartC03	0,00		1,63
3	D3S2387	5,54	5,54	1,85
3	D3S3050	14,46	8,92	1,30
3	D3S1304	22,33	7,87	-1,36
3	D3S1263	36,10	13,77	-1,70
3	D3S3726	42,64	6,54	-2,28
3	D3S3727	56,07	13,43	2,24
3	D3S3521	63,12	7,05	2,57
3	D3S1613	72,21	9,09	2,65
3	D3S1300	80,32	8,11	-0,27
3	D3S4542	90,27	9,95	2,30
3	D3S2406	103,00	12,73	0,06
3	D3S4529	112,78	9,78	-0,05
3	D3S3045	124,52	11,74	-0,79

Fortsetzung der Tabelle 8.14:

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. [cM]	Entfernung zum vorhergehenden Marker [cM]	Multipoint-LOD-Score
3	D3S2460	135,00	10,48	-0,76
3	D3S1764	152,98	17,98	-1,61
3	D3S1744	161,40	8,42	-0,83
3	D3S2427	188,65	27,25	-1,13
3	D3S1262	201,50	12,85	-1,61
3	D3S2398	209,77	8,27	-0,56
3	D3S2418	216,20	6,43	1,63
3	D3S1311	225,24	9,04	1,75
3	ENDC03	228,50	3,26	1,62
4	StartC04	0,00		0,08
4	D4S2366	12,93	12,93	-1,29
4	D4S2639	21,00	8,07	-1,93
4	D4S403	25,90	4,90	-1,91
4	D4S1546	35,03	9,13	-1,16
4	D4S2632	40,00	4,97	-0,79
4	D4S3001	49,47	9,47	-0,65
4	D4S405	56,95	7,48	-1,90
4	D4S1627	60,16	3,21	-1,30
4	D4S3248	72,52	12,36	-1,33
4	D4S3042	83,29	10,77	0,62
4	D4S2361	93,48	10,19	0,54
4	D4S2986	105,29	11,81	-1,35
4	D4S2623	114,04	8,75	-1,69
4	D4S3039	132,72	18,68	-1,24
4	D4S1625	145,98	13,26	-2,21
4	D4S2934	155,41	9,43	-0,96
4	D4S2368	167,55	12,14	-1,96
4	D4S2431	176,19	8,64	0,00
4	D4S2417	181,93	5,74	-0,03
4	D4S408	195,06	13,13	-1,07
4	GATA129D03	204,00	8,94	-2,65
4	D4S1652	208,07	4,07	-1,85
4	ENDC04	211,66	3,59	-0,67
5	StartC05	0,00		-1,06
5	D5S2488	0,01	0,01	-1,06
5	D5S2505	14,31	14,30	0,46
5	D5S817	22,89	8,58	-1,45
5	D5S2848	40,00	17,11	-1,69
5	D5S1470	45,35	5,35	-1,64
5	D5S1457	59,31	13,96	-2,73
5	D5S2500	69,24	9,93	-4,33
5	D5S2003	78,32	9,08	-2,73
5	D5S1501	85,26	6,94	-2,49
5	D5S1725	97,83	12,57	-0,53
5	D5S1462	105,30	7,47	-2,56
5	D5S1453	123,01	17,71	-3,80
5	D5S1505	129,84	6,83	-4,54
5	D5S2098	131,49	1,65	-5,40
5	D5S1480	147,50	16,01	-1,95
5	D5S2090	150,35	2,85	-1,92
5	D5S422	164,20	13,85	-1,45
5	D5S1456	174,81	10,61	-2,16

Fortsetzung der Tabelle 8.14:

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. [cM]	Entfernung zum vorhergehenden Marker [cM]	Multipoint-LOD-Score
5	D5S211	182,90	8,09	-1,75
5	D5S408	195,50	12,60	-0,23
5	ENDC05	197,55	2,05	0,16
6	StartC06	0,00		0,28
6	D6S-F13A1	9,00	9,00	-0,76
6	D6S1034	23,23	14,23	-0,62
6	D6S260	29,93	6,70	-3,23
6	D6S1660	40,14	10,21	-1,93
6	D6S2427	53,81	13,67	-1,70
6	D6S426	60,44	6,63	-0,95
6	D6S1689	71,77	11,33	-1,07
6	D6S1053	80,45	8,68	-1,38
6	D6S1031	88,63	8,18	-3,03
6	D6S1056	102,81	14,18	-1,51
6	D6S1021	112,20	9,39	-1,33
6	D6S474	118,64	6,44	-2,42
6	D6S1040	128,93	10,29	-1,10
6	D6S1009	137,74	8,81	-1,38
6	D6SB	147,00	9,26	-2,58
6	D6S2436	154,64	7,64	-0,21
6	D6S1035	164,78	10,14	-0,87
6	D6S1277	173,31	8,53	-2,16
6	D6S503	184,51	11,20	-0,11
6	ENDC06	193,14	8,63	0,54
7	StartC07	0,00		-1,84
7	D7S1819	0,01	0,01	-1,85
7	D7S517	7,45	7,44	-3,29
7	D7S2514	13,38	5,93	-1,56
7	D7S513	17,75	4,37	0,90
7	D7S2508	27,67	9,92	-2,61
7	D7S2562	34,16	6,49	-0,44
7	D7S2515	43,85	9,69	0,72
7	D7S2251	54,85	11,00	-2,74
7	D7S691	63,68	8,83	-1,00
7	D17S1830	72,79	9,11	-2,18
7	D7S3046	78,66	5,87	-2,26
7	D7S2518	86,13	7,47	-1,21
7	D7S2212	95,44	9,31	-0,77
7	D7S657	104,87	9,43	2,39
7	D7S821	109,13	4,26	2,41
7	D7S635	130,18	21,05	1,38
7	D7S1804	136,96	6,78	-1,47
7	D7S1824	149,91	12,95	1,72
7	D7S2195	162,01	12,10	-2,51
7	D7S3070	163,02	1,01	-2,30
7	D7S1823	173,70	10,68	-2,16
7	ENDC07	181,96	8,26	-0,18
8	StartC08	0,00		-1,78
8	D8S264	0,73	0,73	-2,18
8	D8S1130	22,41	21,68	-3,10
8	D8S1106	26,42	4,01	0,42

Fortsetzung der Tabelle 8.14:

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. [cM]	Entfernung zum vorhergehenden Marker [cM]	Multipoint-LOD-Score
8	D8S1145	37,03	10,61	-0,85
8	D8S136	43,95	6,92	1,28
8	D8S1477	60,33	16,38	-0,25
8	D8S1113	77,88	17,55	-0,77
8	D8S1136	82,25	4,37	0,77
8	D8S2324	94,07	11,82	-0,88
8	D8S-A-	110,99	16,92	1,21
8	D8S1132	121,99	11,00	-1,07
8	D8S592	125,26	3,27	-1,70
8	D8S1179	135,07	9,81	-1,42
8	D8S256	148,11	13,04	-0,46
8	D8S373	164,46	16,35	1,71
8	ENDC08	167,90	3,44	1,57
9	StartC09	0,00		1,89
9	D9S1779	0,01	0,01	1,89
9	D9S1813	9,84	9,83	0,57
9	D9S286	18,07	8,23	-2,11
9	D9S274	28,43	10,36	0,01
9	D9S1684	34,43	6,00	-0,92
9	D9S171	42,74	8,31	-1,36
9	D9S169	49,21	6,47	-0,60
9	D9S1118	58,27	9,06	-0,53
9	D9S1876	67,94	9,67	-0,60
9	D9S1123	77,57	9,63	0,16
9	D9S152	79,07	1,50	1,17
9	D9S257	91,88	12,81	-3,05
9	D9S1690	106,64	14,76	0,92
9	D9S930	120,05	13,41	1,06
9	D9S934	127,99	7,94	-1,14
9	D9S1827	140,87	12,88	-0,25
9	D9S1818	150,93	10,06	0,02
9	D9S1826	159,62	8,69	1,73
9	D9S1838	163,85	4,23	-0,99
9	ENDC09	168,99	5,14	0,42
10	StartC10	0,00		-1,29
10	D10S1435	3,00	3,00	-2,79
10	D10S591	13,49	10,49	-3,65
10	D10S189	19,00	5,51	-0,17
10	D10S1412	28,31	9,31	-4,82
10	D10S1430	33,18	4,87	-1,83
10	D10S1477	42,50	9,32	-2,64
10	D10S1423	46,00	3,50	-1,64
10	D10S600	54,23	8,23	1,80
10	D10S220	70,23	16,00	2,26
10	D10S1225	80,77	10,54	0,16
10	D10S-A-	88,00	7,23	0,21
10	D10S1432	93,92	5,92	2,39
10	D10S541	109,33	15,41	2,65
10	D10S677	117,42	8,09	0,66
10	D10S1239	125,00	7,58	-0,78
10	D10S1230	142,78	17,78	0,43
10	D10S1213	148,17	5,39	0,83

Fortsetzung der Tabelle 8.14:

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. [cM]	Entfernung zum vorhergehenden Marker [cM]	Multipoint-LOD-Score
10	D10S1248	165,27	17,10	-0,62
10	D10S212	170,94	5,67	-2,55
10	ENDC10	173,13	2,19	-0,97
11	StartC11	0,00		0,27
11	D11S1984	2,11	2,11	-0,14
11	D11S2362	8,90	6,79	-2,13
11	D11S1999	17,19	8,29	-1,04
11	D11S915	30,88	13,69	-1,61
11	D11S1392	43,16	12,28	-2,02
11	D11S1985	58,40	15,24	-4,20
11	D11S1765	61,78	3,38	-4,36
11	D11S1883	65,05	3,27	-2,46
11	D11S4178	67,48	2,43	-3,59
11	D11S4113	68,01	0,53	-2,97
11	D11S4136	71,60	3,59	-1,31
11	D11S2371	76,13	4,53	-0,45
11	D11S1989	84,31	8,18	-2,34
11	D11S22002	85,48	1,17	-2,78
11	D11S4118	93,12	7,64	-2,85
11	D11S1778	101,75	8,63	-3,07
11	D11S1986	105,74	3,99	-4,14
11	D11S1998	113,13	7,39	-1,94
11	D11S4464	123,00	9,87	0,54
11	D11S4150	132,95	9,95	-2,73
11	D11S874	140,18	7,23	1,36
11	D11S4085	141,91	1,73	1,35
11	D11S4125	147,77	5,86	-0,37
11	ENDC11	147,78	0,01	-0,36
12	StartC12	0,00		-0,85
12	D12S372	6,42	6,42	-3,30
12	D12S77	20,27	13,85	-1,21
12	D12S391	26,23	5,96	-3,62
12	D12S364	30,60	4,37	-2,59
12	D12S373	36,06	5,46	-0,10
12	D12S1591	43,38	7,32	-1,20
12	D12S345	53,09	9,71	-0,37
12	D12S339	64,43	11,34	-0,13
12	D12S375	80,52	16,09	0,96
12	D12S1052	83,19	2,67	0,00
12	D12S1064	95,03	11,84	0,45
12	D12S1044	98,60	3,57	-0,20
12	D12S78	111,87	13,27	-2,11
12	D12S1605	116,66	4,79	-0,49
12	D12S2070	125,31	8,65	-0,92
12	D12S395	136,82	11,51	0,29
12	D12S1639	148,24	11,42	-3,87
12	D12S2078	150,00	1,76	-3,79
12	D12S392	165,69	15,69	-1,59
12	ENDC12	168,79	3,10	-0,60
13	StartC13	0,00		1,87
13	D13S1316	0,01	0,01	1,87

Fortsetzung der Tabelle 8.14:

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. [cM]	Entfernung zum vorhergehenden Marker [cM]	Multipoint-LOD-Score
13	D13S787	8,88	8,87	-0,33
13	D13S1250	17,22	8,34	-1,37
13	D13S1493	25,81	8,59	-1,22
13	D13S1253	34,56	8,75	-1,17
13	D13S788	45,56	11,00	-2,85
13	D13S1296	52,65	7,09	-1,88
13	D13S162	58,55	5,90	-2,92
13	D13S1235	64,98	6,43	-2,50
13	D13S793	76,01	11,03	-1,39
13	D13S779	82,94	6,93	-1,39
13	D13S796	93,53	10,59	-2,03
13	D13S1315	102,74	9,21	-2,82
13	D13S285	110,56	7,82	-3,44
13	ENDC13	114,99	4,43	-1,16
14	StartC14	0,00		-0,05
14	D14S742	12,46	12,46	-1,91
14	D14S1280	25,87	13,41	-1,92
14	D14S608	28,01	2,14	-1,22
14	D14S1014	42,81	14,80	-0,82
14	D14S1048	45,12	2,31	-0,89
14	D14S976	50,50	5,38	-1,02
14	D14S1057	55,82	5,32	-0,11
14	D14S980	60,43	4,61	-2,55
14	D14S592	66,81	6,38	-1,77
14	D14S1069	73,03	6,22	-1,95
14	D14S606	91,62	18,59	-2,25
14	GATA193A07	96,00	4,38	-2,62
14	D14S1434	113,17	17,17	1,06
14	ENDC14	138,19	25,02	0,50
15	StartC15	0,00		0,25
15	D15S822	12,30	12,30	-0,88
15	D15SACTC	17,00	4,70	-2,82
15	D15S165	20,24	3,24	-0,17
15	D15S994	40,25	20,01	-0,52
15	D15S643	52,33	12,08	-3,28
15	D15S1507	60,17	7,84	-2,31
15	D15S818	71,82	11,65	-1,97
15	D15S211	75,85	4,03	-4,97
15	D15S655	82,84	6,99	-2,06
15	D15S652	90,02	7,18	-2,24
15	D15S816	100,59	10,57	-0,99
15	D15S657	104,86	4,27	-3,09
15	D15S642	122,14	17,28	-2,71
15	ENDC15	122,15	0,01	-2,70
16	StartC16	0,00		-0,17
16	D16S3024	7,05	7,05	-1,15
16	D16S2616	11,46	4,41	-1,16
16	D16S3052	15,32	3,86	-1,94
16	D16S519	20,77	5,45	-4,01
16	D16S500	28,30	7,53	-1,30
16	D16S403	43,89	15,59	-2,44

Fortsetzung der Tabelle 8.14:

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. [cM]	Entfernung zum vorhergehenden Marker [cM]	Multipoint-LOD-Score
16	D16S769	50,60	6,71	-1,66
16	D16S753	57,79	7,19	-2,49
16	D16S-A-	63,78	5,99	-1,17
16	D16S3253	71,77	7,99	-1,16
16	D16S3019	85,94	14,17	-0,86
16	D16S3018	90,65	4,71	-0,84
16	D16S516	100,39	9,74	-0,22
16	D16S402	113,52	13,13	-0,71
16	D16S539	124,73	11,21	0,47
16	D16S621	130,41	5,68	-2,09
16	ENDC16	134,13	3,72	-0,47
17	StartC17	0,00		-0,29
17	D17S1308	0,63	0,63	-0,91
17	D17S1528	6,60	5,97	-0,67
17	D17S1832	13,07	6,47	1,48
17	D17S1303	23,56	10,49	1,29
17	D17S947	31,96	8,40	-0,46
17	D17S2196	44,62	12,66	-4,65
17	D17S1294	50,74	6,12	-1,79
17	D17S1293	56,48	5,74	-3,17
17	D17S1299	62,01	5,53	-1,11
17	D17S791	64,14	2,13	-3,35
17	D17S806	66,83	2,69	-3,44
17	D17S2180	66,85	0,02	-3,44
17	D17S943	68,42	1,57	-2,42
17	D17S787	74,99	6,57	-1,55
17	D17S1606	80,36	5,37	-2,09
17	D17S1604	81,44	1,08	-0,65
17	D17S1290	82,00	0,56	-1,14
17	D17S1811	82,54	0,54	-1,31
17	D17S948	82,55	0,01	-1,31
17	D17S794	83,38	0,83	-1,95
17	D17S807	85,94	2,56	-1,46
17	D17S2193	89,32	3,38	-2,49
17	D17S1301	100,02	10,70	-1,27
17	D17S784	116,86	16,84	-0,63
17	D17S928	126,46	9,60	-1,78
17	ENDC17	126,47	0,01	-1,77
18	StartC18	0,00		-0,17
18	D18S-A-	3,00	3,00	-1,04
18	D18S54	8,30	5,30	1,04
18	D18S843	28,10	19,80	1,03
18	D18S1153	35,46	7,36	-0,38
18	D18S453	43,49	8,03	-1,47
18	D18S877	54,40	10,91	2,62
18	D18S1124	61,17	6,77	2,79
18	D18S535	64,48	3,31	2,75
18	D18S1127	77,36	12,88	0,19
18	D18S858	80,41	3,05	-0,02
18	D18S1147	90,60	10,19	-0,77
18	D18S878	102,00	11,40	-1,87
18	D18S844	116,44	14,44	1,31

Fortsetzung der Tabelle 8.14:

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. [cM]	Entfernung zum vorhergehenden Marker [cM]	Multipoint-LOD-Score
18	ENDC18	126,00	9,56	1,03
19	StartC19	0,00		-0,03
19	D19S591	9,84	9,84	-1,83
19	D19S1034	20,75	10,91	-0,81
19	D19S884	26,37	5,62	-1,51
19	D19S413	32,39	6,02	0,40
19	D19S586	32,94	0,55	-0,10
19	D19S394	34,25	1,31	-0,11
19	D19S714	42,00	7,75	-2,80
19	D19S433	51,88	11,88	-1,61
19	D19S197	63,10	11,22	-1,84
19	D19S574	69,50	6,40	-1,97
19	D19S879	75,41	5,91	-3,78
19	D19S866	77,54	2,13	-1,36
19	D19S246	78,08	0,54	-2,72
19	D19S888	85,87	7,79	-1,88
19	D19S589	87,66	1,79	-1,15
19	D19S254	100,61	12,95	-3,22
19	ENDC19	105,02	4,41	-1,01
20	StartC20	0,00		-1,36
20	D20S1155	0,01	0,01	-1,37
20	D20S482	10,00	9,99	-1,14
20	D20S194	18,26	8,26	-1,58
20	D20S851	24,70	6,44	-2,11
20	D20S604	32,94	8,24	-1,53
20	D20S470	39,25	6,31	-1,14
20	D20S478	54,09	14,84	-1,22
20	D20S888	64,88	10,79	-0,63
20	D20S857	77,75	12,87	-0,37
20	D20S100	84,78	7,03	1,27
20	D20S173	98,09	13,31	-0,42
20	ENDC20	101,22	3,13	0,54
21	StartC21	0,00		0,72
21	D21S1911	0,00	0,00	0,72
21	D21S1899	9,72	9,72	-2,64
21	D21S1257	17,67	7,95	-2,73
21	D21S1909	28,48	10,81	-1,00
21	D21S1252	35,45	6,97	-2,03
21	D21S1899	45,26	9,81	-4,28
21	D21S1446	57,77	12,51	-2,73
21	ENDC21	57,78	0,01	-2,67
22	StartC22	0,00	0,00	0,03
22	D22S420	4,06	4,06	-0,84
22	D22S345	19,00	14,94	1,03
22	D22S689	28,57	9,57	0,87
22	D22S683	36,22	7,65	-2,60
22	D22S445	45,82	9,60	-1,53
22	ENDC22	62,31	16,49	-0,02

Multipoint-LOD-Scores > 2 sind grau hinterlegt

8.6 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle ist das Frau Prof. Dr. med. Christine Klein, die mir freundlicherweise die interessanten Themen zur Bearbeitung überlassen hat und die nicht billigen Arbeitsmaterialien zur Verfügung gestellt hat. Ich danke ihr für die wertvollen Anregungen während meiner praktischen Tätigkeit und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Mein Dank gilt in gleicher Weise Frau Dr. rer. nat. Katja Lohmann, die mich von der Einarbeitung in die Methoden bis zur Niederschrift dieser Arbeit exzellent betreute und stets eine geduldige und kompetente Ansprechpartnerin war.

Frau Dr. rer. biol. hum. Inke König aus dem Institut für Medizinische Statistik der hiesigen Universität danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Assoziationsstudien.

Aus unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich zunächst bei Frau Susen Winkler und Herrn Dr. med. Norbert Brüggemann für die gute Zusammenarbeit bei der Erstellung der genomweiten Kopplungsanalyse bedanken und bei Frau Dr. rer. nat. Ana Djarmati für die Hilfestellung bei der Anfertigung der MLPA-Analysen. Herrn Philip Seibler danke ich für die Unterstützung bei der Berechnung der Kopplungsanalyse.

Auch den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für das sehr angenehme Arbeitsklima: Heather Boston, Sylwia Dankert, Anne Grünewald, Herr Dr. med. Norman Kock, Ellen Kosakowski, Thora Lohnau, Heike Pawlack, Aleksandar Raković, Falk Schlaudraff, Anne Weißbach und Karin Wiegers haben dafür gesorgt, dass ich gerne ins Labor gekommen bin.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei den Patienten, die sich zur Teilnahme an den Untersuchungen bereit erklärt haben und den Ärzten, die diese durchgeführt und das Patientenmaterial sichergestellt haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner liebsten Familie und meinen Freunden.

8.7 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Katja Lena Zschiedrich
Anschrift	Kleiner Bauhof 12, 23552 Lübeck, Deutschland
Geburtsdatum, -ort	16. April 1982 in Mainz

Schulbildung

1988 - 1992	Grundschulbesuch in Mainz und Bremen
1992 - 2001	Besuch des Ökumenischen Gymnasiums zu Bremen, Abitur im Juni 2001

Hochschulstudium

2002 - 2004	Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Universität Rostock, Physikum im September 2004
Seit 2004	Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck

Doktorarbeit

Oktober 2005 - Oktober 2007	Universität Lübeck, Klinik für Neurologie, Arbeitsgruppe Neurogenetik, Leiterin: Frau Prof. Dr. med. C. Klein. Titel: Molekulargenetische Untersuchungen bei spinocerebellärer Ataxie und Parkinsonsyndromen
--------------------------------	---

Famulaturen

Februar 2005	Innere Medizin, Krankenhaus St.-Joseph-Stift, Bremen
August 2005	Chirurgie, Herz-Jesu-Krankenhaus, Wien, Österreich
Februar 2006	Neurologie (Poliklinik), Universitätsklinikum Lübeck
Februar 2007	Gynäkologie und Geburtshilfe, Hospital Central de la Fuerza Aérea del Perú, Lima, Peru
September 2007	Neurologie, Krankenhaus Franz Tappeiner, Meran, Italien
Oktober 2007	Dermatologie (Poliklinik), Universitätsklinikum Lübeck

Auslandsaufenthalte

1998 - 1999	Besuch einer High School in Redlands, Kalifornien, USA
2001 - 2002	Ehrenamtliche Arbeit als Englischlehrerin und Kindergärtnerin in Tilarán, Costa Rica

Veröffentlichungen

Rosenbohm A, Lohmann K, **Zschiedrich K**, Seibler P, Djarmati A, Zühlke C, Klein C, Ludolph AC: Autosomal-dominant neurodegenerative disorder with predominantly spinocerebellar signs. *Neurology*, eingereicht.

Zschiedrich K, Brüggemann N, König I, Kock N, Kasten M, Leenders KL, Kostić V, Ziegler A, Vieregge P, Klein C, Lohmann K: *MDRI* variants and risk of Parkinson disease: Association with pesticide exposure? *Annals Neurol*, eingereicht.

8.8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere, dass ich nicht vorher oder gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder die Dissertation vorgelegt habe und dass ich mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen habe.

Ich bestätige, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen 04-155 vom 02.03.2006) genehmigt wurden.

Lübeck, den