

Aus dem Institut für Neurogenetik
(Direktorin: Prof. Dr. med. C. Klein)
Universität zu Lübeck

Mutationsanalysen bei Patienten mit Parkinson- Syndrom frühen und späten Beginns

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- **Aus der Sektion Medizin** -

Vorgelegt von

Claudia Leuchs

aus Hagenow

Lübeck 2013

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christine Klein

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Stefan Krüger

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.12.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Der Morbus Parkinson und das Parkinson-Syndrom (PS)	6
1.2. Das Parkinson-Syndrom und seine genetischen Ursachen.....	9
1.2.1. Das <i>Parkin</i> -assoziierte Parkinson-Syndrom (<i>PARK2</i>)	13
1.2.2. Das <i>DJ-1</i> -assoziierte Parkinson-Syndrom (<i>PARK7</i>)	16
1.2.3. Das <i>NR4A2</i> -Gen	18
1.3. Ziele der vorliegenden Arbeit	20
2. Patienten und Methoden	21
2.1. Patienten.....	21
2.1.1. Patienten mit PS frühen Beginns für die Untersuchung von <i>Parkin</i> - und <i>DJ-1</i> -Gen	22
2.1.2. Patienten mit PS späten Beginns für die Untersuchung des <i>Parkin</i> -Gens.....	22
2.1.3. Kontrollen für die Untersuchung des <i>Parkin</i> -Gens mit dem <i>WAVE</i> -System	22
2.1.4. Patienten und Kontrollen für die Polymorphismus-Analyse im <i>Core</i> -Promotor.....	22
2.1.5. Patienten für die Untersuchung des <i>NR4A2</i> -Gens	23
2.2. Methoden	23
2.2.1. Verfahren zur DNA-Präparation	23
2.2.2. Spektralphotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	24
2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.2.3.1. PCR-Standardbedingungen.....	25
2.2.3.2. Quantitative Echtzeit-PCR.....	26
2.2.4. Gelelektrophorese und Gelelution.....	28
2.2.4.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.2.4.2. Gelelution	28
2.2.4.3. Nicht-denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese	29
2.2.4.4. Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese	29
2.2.5. Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse	30
2.2.6. Silberfärbung.....	30
2.2.7. Mutationsanalyse mit dem <i>WAVE</i> -System.....	31
2.2.8. PCR-Verdau mit Restriktionsenzymen	34
2.2.9. Schmelzkurven am <i>LightCycler</i>	35
2.2.10. Sequenzierung	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1. Etablierung und Optimierung von Methoden.....	37
3.1.1. Etablierung der dHPLC-Methode am <i>WAVE</i> -System	37
3.1.2. Optimierung der Analyse von Polymorphismen im <i>Core</i> -Promotor des <i>Parkin</i> -Gens	40
3.1.2.1. Verdau mit Restriktionsenzymen.....	40

3.1.2.2.	Sequenzierung des <i>Core</i> -Promotors.....	41
3.1.2.3.	Schmelzkurven am <i>LightCycler</i>	42
3.2.	Mutations-Screening des <i>Parkin</i> -Gens	43
3.2.1.	<i>Parkin</i> -Screen von Patienten mit PS frühen Beginns	43
3.2.1.1.	SSCP-Analyse und Sequenzierung	43
3.2.1.2.	Gendosis-Untersuchungen	46
3.2.1.3.	Zusammenfassung der Mutationsanalyse der Gruppe mit PS frühen Beginns	47
3.2.2.	<i>Parkin</i> -Screen von Patienten mit PS späten Beginns	48
3.2.2.1.	SSCP-Analyse und Sequenzierung	48
3.2.2.2.	Gendosis-Untersuchungen	50
3.2.3.	<i>Parkin</i> -Screen einer Kontrollgruppe am WAVE-System.....	51
3.2.3.1.	Untersuchungen am WAVE-System.....	51
3.2.3.2.	Gendosis-Untersuchungen	53
3.2.4.	Die Polymorphismus-Analyse des <i>Core</i> -Promotors.....	53
3.2.4.1.	Ergebnisse der Schmelzkurven-Untersuchungen.....	53
3.3.	Untersuchungen am <i>DJ-1</i> -Gen.....	54
3.3.1.	Patienten mit Parkinson-Syndrom frühen Beginns	54
3.3.1.1.	Gendosis-Untersuchungen	54
3.4.	Ergebnisse der <i>Parkin</i> - und <i>DJ-1</i> -Gen-Untersuchungen bei PS frühen Beginns im Vergleich	55
3.5.	Untersuchungen am <i>NR4A2</i> -Gen	56
3.5.1.	Patienten mit positiver Familienanamnese (FA)	56
3.5.2.	Sequenzierungen im <i>NR4A2</i> -Gen.....	56
4.	Diskussion.....	58
4.1.	Bewertung der Methoden.....	58
4.1.1.	Methoden zur Detektion qualitativer DNA-Veränderungen	58
4.1.2.	Methoden zur Detektion quantitativer DNA-Veränderungen	59
4.2.	Mutationen im <i>Parkin</i> -Gen	60
4.2.1.	<i>Parkin</i> -Mutationen bei PS frühen Beginns.....	63
4.2.2.	<i>Parkin</i> -Mutationen bei PS späten Beginns.....	65
4.2.3.	<i>Parkin</i> -Mutationen bei Kontrollen	67
4.2.4.	Mutationen im <i>Core</i> -Promotor des <i>Parkin</i> -Gens	68
4.3.	Mutationen im <i>DJ-1</i> -Gen	69
4.4.	Mutationen im <i>NR4A2</i> -Gen	71
4.5.	Fazit	73
4.6.	Ausblick	74
5.	Zusammenfassung	76

6. Literaturverzeichnis	78
7. Anhang.....	105
7.1. Abkürzungsverzeichnis	105
7.2. Abbildungsverzeichnis.....	109
7.3. Tabellenverzeichnis	110
7.4. Material.....	111
7.4.1. Chemikalien	111
7.4.2. Stammlösungen und Puffer	112
7.4.3. Geräte	113
7.5. Primer und Sonden	114
7.5.1. Allgemeine Primer	114
7.5.2. Primer zur konventionellen <i>Parkin</i> -Mutationsanalyse.....	114
7.5.3. Primer für die dHPLC-Analyse im <i>Parkin</i> -Gen.....	115
7.5.4. Primer zur quantitativen PCR für Gendosisbestimmungen im <i>Parkin</i> -Gen	116
7.5.5. Sonden zur quantitativen PCR für Gendosisbestimmungen im <i>Parkin</i> -Gen.....	117
7.5.6. Primer für die Schmelzkurvenanalyse am <i>Core</i> -Promotor des <i>Parkin</i> -Gens.....	118
7.5.7. Sonden für die Schmelzkurvenanalyse am <i>Core</i> -Promotor des <i>Parkin</i> -Gens.....	118
7.5.8. Primer zur quantitativen PCR für Gendosisbestimmungen im <i>DJ-1</i> -Gen	118
7.5.9. Sonden zur quantitativen PCR für Gendosisbestimmungen im <i>DJ-1</i> -Gen.....	119
7.5.10. Primer zur Sequenzierung im <i>DJ-1</i> -Gen.....	119
7.5.11. Primer zur Sequenzierung des Exon 1 des <i>NR4A2</i> -Gens	120
7.6. Patientenlisten.....	121
7.7. Zusätzliche Abbildungen	131
7.7.1. Quantitative PCR des Exon 3 des <i>Parkin</i> -Gens	131
7.7.2. SSCP-Gele verschiedener Exons des <i>Parkin</i> -Gens	133
7.8. Zusätzliche Tabellen	136
7.8.1. <i>Parkin</i> -Mutationen	136
7.8.2. <i>DJ-1</i> -Mutationen	142
7.8.3. <i>NR4A2</i> -Mutationen	143
7.9. Votum der Ethikkommission	144
7.10. Eidesstattliche Erklärung	144
8. Danksagung.....	145
9. Lebenslauf	147
10. Publikationsverzeichnis	149

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird über die Mutationsanalyse dreier verschiedener Gene, welche bei der Entwicklung eines monogenen Parkinson-Syndroms ätiologische Bedeutung haben können, berichtet. In diesem Kapitel wird ein Überblick über den Morbus Parkinson sowie das Parkinson-Syndrom gegeben und der heutige Wissensstand über deren Ursachen und die beteiligten Gene zusammengefasst. Es wird insbesondere auf die drei untersuchten Gene (*Parkin*, *DJ-1* und *NR4A2*) eingegangen und die Bedeutung von Mutationen in diesen Genen dargestellt.

Die praktischen Arbeiten für diese Doktorarbeit fanden in den Jahren 2002 bis 2004 statt. Damals stand insbesondere das *Parkin*-Gen gefolgt vom *DJ-1*-Gen im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Die Publikationen seit Beginn der „Parkinson-Genetik“ 1997 bis Abschluss der praktischen Arbeiten 2004 sind für die inhaltliche Ausrichtung und Einordnung der vorliegenden Arbeit von großer Relevanz und stellen daher einen wesentlichen Teil der hier zitierten Studien und Verfahren dar. In den letzten Jahren wurde durch die Weiterentwicklung von Methoden in der Genforschung das Spektrum von Kandidaten-Genen für das Parkinson-Syndrom rasant vergrößert. Auch die hier untersuchten Gene werden weiterhin intensiv beforscht, um die Pathogenese des Parkinson-Syndroms besser zu verstehen, wobei das *Parkin*-Gen zu den am längsten und intensivst untersuchten „Parkinson-Genen“ gehört. Die im Kontext zu dieser Doktorarbeit stehenden wissenschaftlichen Studien und Verfahren, welche nach Abschluss der praktischen Arbeiten entstanden, sowie aktuelle Studien wurden in die vorliegende Arbeit integriert. Sie zeigen einerseits die Aktualität des Themas, andererseits den hohen Stellenwert der Genforschung in Bezug auf ein Verständnis für Krankheitsentstehung und hieraus die Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Anwendungen auf.

1.1. Der Morbus Parkinson und das Parkinson-Syndrom (PS)

Der Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung mit einer weltweiten Prävalenz von bis zu 200/100000 Einwohnern (de Rijk *et al.*, 1995; Tandberg *et al.*, 1995; Hirtz *et al.*, 2007) wobei die Prävalenz mit zunehmendem Alter ansteigt und in der Altersgruppe der über 75-jährigen 3,4 % bzw. bei den über 85-jährigen mehr als 3,6 % von der Erkrankung betroffen sind (de Rijk *et al.*, 1997; Elbaz *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2008; Coppedè, 2012).

Der englische Arzt Dr. James Parkinson beschrieb die Erkrankung erstmals im Jahre 1817 und bezeichnete sie als *shaking palsy* („Schüttellähmung“). Im Jahre 1887 veröffentlichte Dr. Parkinson „An essay on the Shaking Palsy“ („Eine Abhandlung über die Schüttellähmung“), welches zum Standardwerk der Neurologie avancierte und bis heute die diagnostischen Kriterien der Erkrankung beschreibt. Kennzeichnend für den Morbus Parkinson sind die vier Hauptsymptome (auch

Kardinalsymptome genannt): Ruhetremor, Rigor, Bradykinese (auch Akinese oder Hypokinese genannt) und eine Störung der Stellreflexe mit Verlust der Haltungskontrolle. Unter dem Begriff der „Parkinson’schen Trias“ versteht man die drei erstgenannten Symptome. Zur Diagnosestellung müssen mindestens zwei der aufgeführten Hauptsymptome vorhanden sein (Gibb und Lees, 1988), wobei ein einseitig beginnender Ruhetremor sowie ein Ansprechen auf die Gabe von Levodopa oder Apomorphin die Diagnose sichern. Neuropathologisch gilt der Nachweis von intrazytoplasmatischen Proteinaggregaten (Lewy-Körperchen) vor allem in der *Substantia nigra pars compacta* (SNc) als charakteristisch. Therapeutisch kommt der Einsatz von Levodopa oder eine operative Behandlung mittels Tiefenhirn-Stimulation (THS) des *Nucleus subthalamicus* (STN) in Betracht. Der Basalganglien-Schaltkreis ist vereinfacht in Abbildung 1.1. dargestellt.

Die THS ist ein seit einigen Jahren angewendetes und sehr wirksames Verfahren zur Behandlung von Bewegungsstörungen (Damian *et al.*, 2003; Krack *et al.*, 2003; Charles *et al.*, 2004; Deuschl *et al.*, 2006; Moro *et al.*, 2010). Die Methode wird seit Mitte der 90er Jahre erfolgreich bei schweren motorischen Fluktuationen und Dyskinesien beim Levodopa-responsiven Parkinson-Syndrom angewandt. Über eine bilaterale Stimulation des *Nucleus subthalamicus* in der *Substantia nigra* wird eine permanente elektrische Reizung verursacht, die zur Hemmung der beteiligten überaktiven Neuronen führt. Die Einstellungen des „Hirn-Schrittmachers“ können der Symptomstärke angepasst werden. Das chirurgische *Outcome* ist mit verschiedenen Faktoren assoziiert, dazu zählen niedriges Alter, kurze Erkrankungsdauer, Abwesenheit von Levodopa-resistenten axialen Zeichen und kognitiver Status der Patienten (Charles *et al.*, 2004). Einer Studie von Kleiner-Fisman *et al* aus dem Jahre 2006 nach scheint nur das präoperative Ansprechen auf Levodopa den Therapieerfolg zu beeinflussen. Es ist nur wenig dazu bekannt, ob genetische Faktoren einen Einfluss auf den Therapieerfolg einer THS haben.

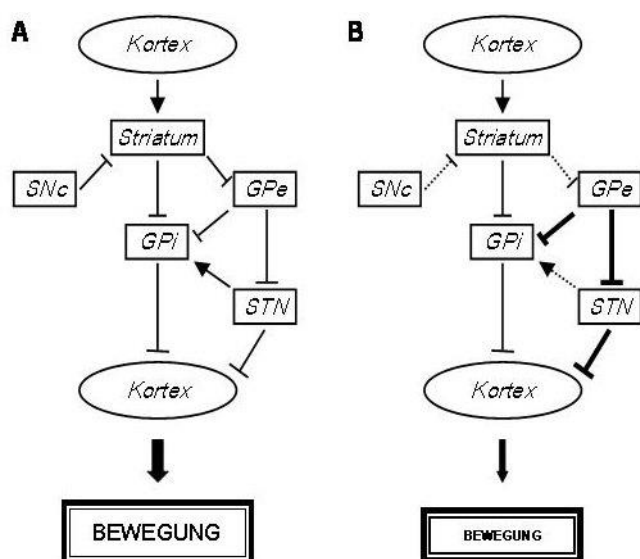


Abbildung 1.1.: Schaltkreis zur Regulierung der Bewegung in den Basalganglien
Pfeile bedeuten Aktivierung und Querstriche Hemmung des Signals.

A) Normaler Signalweg in den Basalganglien.

B) Signalweg beim PS. Während eine Erhöhung des Signals durch eine dickere Linie gekennzeichnet ist, stellen gestrichelte Linien eine Verminderung des Signals dar (nach Todd und Perlmuter, 1998 und Herrero *et al.*, 2002).

Anhand der 5-Punkte-Skala von Hoehn und Yahr (1967) oder der *Unified Parkinson's Disease Scale* (Fahn *et al.*, 1987) kann der Schweregrad der Erkrankung dokumentiert werden. Klinisch werden drei verschiedene Prädomanztypen unterschieden, wobei die Symptomausprägung ausschlaggebend ist: der Tremor-dominante Typ, der akinetisch-rigide Typ und der Äquivalenztyp bei gleichmäßigem Vorkommen von Tremor und Bradykinese (Poewe *et al.*, 1988). Häufig treten vegetative und psychische Zusatzsymptome auf, so dass die Erkrankung äußerst komplex erscheint. Unter der Bezeichnung des Parkinson-Syndroms (PS) werden alle klinischen Syndrome zusammengefasst, welche das Krankheitsbild des Morbus Parkinson imitieren können. Es findet sich hierbei eine Vielzahl von Ätiologien, Pathologien und Zusatzsymptomen. Typische Erkrankungen bei denen man ein Parkinson-Syndrom findet, gehören in den Formenkreis der neurodegenerativen Erkrankungen. Hierzu zählen beispielsweise die Multisystematrophie und die progressive supranukleäre Blicklähmung sowie Demenzerkrankungen. Bezüglich der Ätiologie bleibt die Ursache des Morbus Parkinson in den meisten Fällen unbekannt (idiopathischer Morbus Parkinson, ca. 80 %). Zu den wenigen bekannten Ursachen des „symptomatischen“ oder „sekundären“ Morbus Parkinson gehören das medikamentös induzierte Parkinson-Syndrom, das toxisch bedingte Parkinson-Syndrom (Ballard *et al.*, 1985; Tetrud *et al.*, 1989; Elbaz *et al.*, 2004) oder das postenzephalitische Parkinsonsyndrom (Poskanzer und Schwab, 1963). In aktuellen Studien wird ein Zusammenhang von einer Pestizid-Exposition und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines PS angenommen (Costello *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Jedoch kann wahrscheinlich nur ein kleiner Teil der Erkrankungen durch diese spezifischen umweltbedingten Ursachen erklärt werden. Ebenfalls in die Gruppe der Parkinson-Syndrome werden die monogenen Parkinson-Syndrome eingeordnet. Es wird bei etwa 20 % der Patienten mit einem frühen Erkrankungsalter von unter 45 Jahren (*early-onset Parkinson's disease*, EOPD) und bei weniger als 3 % der Patienten mit einem späten Erkrankungsalter von über 45 Jahren (*late-onset Parkinson's disease*, LOPD) eine monogene Ursache identifiziert (Lohmann-Hedrich *et al.*, 2007). Insgesamt wird bei etwa 5-10 % der Parkinson-Patienten eine autosomal dominante oder rezessive Vererbung angenommen (Lill *et al.*, 2012). Die vorgenannten Werte entsprechen Schätzungen, sie stammen aus zum Teil nur kleinen Stichproben und sind abhängig von Faktoren wie Herkunft der Patienten und angewendeten Methoden zur Mutationsdetektion. Es wird deutlich, dass in der Ursachenforschung in den letzten Jahrzehnten sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Veränderungen nachgewiesen und diskutiert werden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass der Großteil der Parkinsonerkrankungen durch eine multifaktorielle Ursachenkombination aus Gen-Umwelt-Interaktion (Abb. 1.2.) verursacht wird (Semchuk *et al.*, 1993; Lang und Lozano, 1998 a und b).

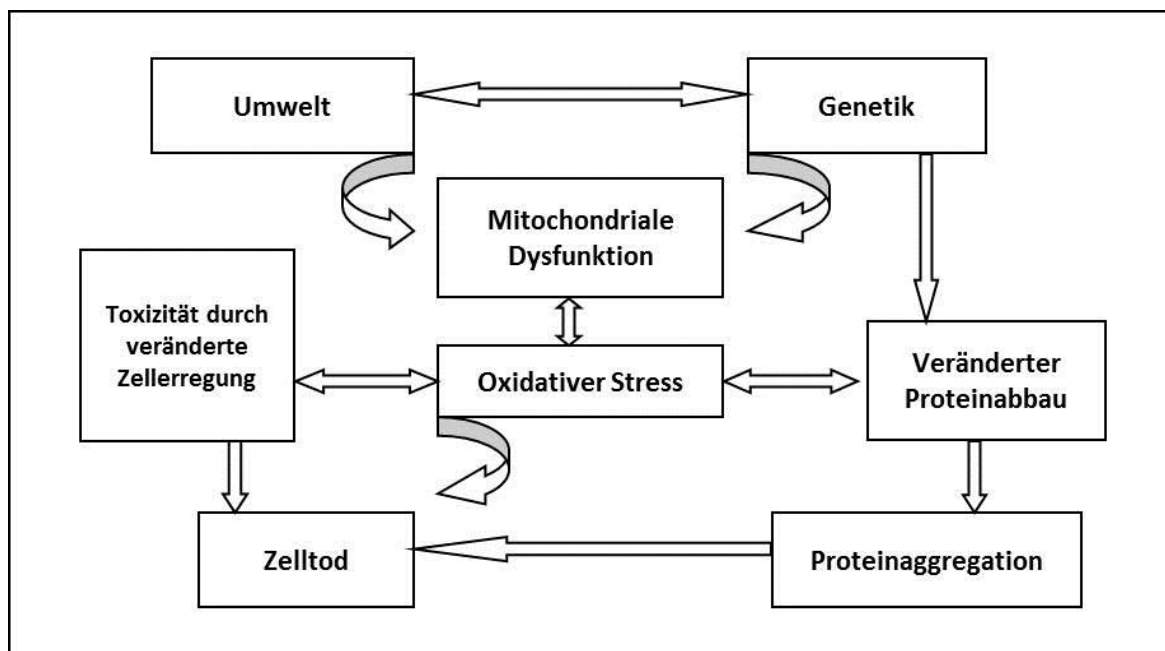


Abbildung 1.2.: Schema zur Gen-Umwelt-Interaktion.

Als Ausgangspunkt dienen genetische und Umweltfaktoren, die über einen veränderten Proteinabbau und –aggregation bzw. über eine mitochondriale Dysfunktion und Folge-mechanismen zum Zelltod führen (nach Betarbet, 2002).

Für die Bedeutung der genetischen Grundlagenforschung spricht, dass es bei ca. 25 % aller Parkinson-Patienten mindestens einen weiteren Betroffenen in der Familie gibt (Krüger *et al.*, 2002). Charcot bemerkte schon vor 140 Jahren, dass ein Teil seiner Parkinson-Patienten eine positive Familienanamnese aufwies (Charcot, 1886). Insbesondere bei Patienten mit EOPD ist eine direkte genetische Ursache wahrscheinlich (Quinn *et al.*, 1987; Schrag *et al.*, 1998; Tanner *et al.*, 1999; Lücking *et al.*, 2000).

1.2. Das Parkinson-Syndrom und seine genetischen Ursachen

In den letzten 15 Jahren wurden bei genetischen Untersuchungen großer Familien 8 verschiedene Gene identifiziert, die eindeutig mit der Pathogenese des PS assoziiert sind (ursächliche Gene). Dazu zählen die autosomal-rezessiv vererbten Mutationen in den Genen *Parkin* (*PARK2*), *PINK1* (*PARK6*), *DJ-1* (*PARK7*) und *ATP13A2* (*PARK9*), welche am häufigsten bei EOPD gefunden werden. Mutationen im *Alpha-Synuklein*-Gen (*PARK1*, *PARK4*) und im *LRRK2*-Gen (*PARK8*) gehen mit einem autosomal-dominanten Vererbungsmuster einher. Die autosomal-dominant vererbten Formen des PS kommen bis auf *PARK8* sehr selten vor. Zu den vor kurzem identifizierten autosomal dominant vererbten „Parkinson-Genen“ gehören *VPS35* und *EIF4G1* (Vilarino-Güell *et al.*, 2011; Chartier-Harlin *et al.*, 2011). Während der letzten Jahre wurden v. a. durch Genomweite Assoziationsstudien und Anwendung moderner Untersuchungstechnologien wie *Next Generation Sequencing* (s. 4.1.1.) neue Genorte und Kandidaten-Gene identifiziert. Bis

heute wurden in mehr als 800 Assoziationsstudien vielfach widersprüchliche Aussagen v. a. zu den prädisponierenden Genen (Suszeptibilitätsgenen oder -faktoren) getroffen. Validierte Suszeptibilitätsfaktoren sind beispielsweise Polymorphismen der Niedrigrisiko-Orte *α-Synuklein*, *MAPT*, *LRRK2* und *HLA* sowie des Hochrisiko-Ortes *GBA* (Bekris *et al.*, 2010; Lill *et al.*, 2012). Kürzlich entdeckte Gene, die eine genomweite Assoziation mit einem erhöhten Risiko für ein PS aufweisen (*MCCC1*, *CCDC62*, *SYT11*, *STK39* und *ITGA8*; Lill *et al.*, 2012), sind zwecks Validierung Gegenstand der aktuellen Forschung. Sicherlich werden in den nächsten Jahren weitere prädisponierende und auch ursächliche „Parkinson-Gene“ etabliert. Die bisher identifizierten Genorte und ursächlichen Gene wurden der Reihenfolge ihrer Entdeckung nach klassifiziert (*PARK1* bis *PARK18*, vgl. Klein und Schlossmacher, 2007; Lohmann-Hedrich *et al.*, 2007; Hardy, 2010; Liu *et al.*, 2011; Lill *et al.*, 2012; Coppédè, 2012). *PARK3*, *PARK10-PARK12* fungieren als Suszeptibilitätsfaktoren, wobei die Art der Transmission unbekannt ist und möglicherweise weitere Faktoren z. B. Umweltfaktoren involviert sind. Hinter den übrigen „*PARK*“-Akronymen verbergen sich durch Assoziationsstudien identifizierte Gene oder auch Genorte, bei denen ein ursächliches Gen bisher nicht detektiert werden konnte. Einige Genmutationen wie z. B. im *MAPT*-Gen, welches dem *FTDP-17 Locus* (Frontotemporaler-Demenz-Phänotyp) zugeordnet wird, bewirken typischerweise einen Demenz-Phänotyp, jedoch kann es ebenso zu einem PS kommen. Ähnliches gilt für die Gene *Ataxin2* und 3 sowie *Spatacsin* (Hardy, 2010). Die bisher lokalisierten Gene und das jeweils entsprechende Genprodukt scheinen eine kausale Rolle bei der Entstehung des PS zu spielen. Einige identifizierte Genorte und Gene, welche wahrscheinlich als prädisponierend oder ursächlich zu betrachten sind, tragen (noch) kein „*PARK*“-Akronym (u. a. *Synphilin-1*, *NR4A2*, *VPS35*, *EIF4G1*). Im Folgenden werden einige der wichtigsten bisher identifizierten Gene beschrieben.

(1) Das *α-Synuklein* war das erste identifizierte Parkinson-Gen und wurde *PARK1* genannt (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Das Gen kodiert für ein weit verbreitetes neuronales Protein und ist ein Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen (Spillantini *et al.*, 1997). Mutationen im *α-Synuklein*-Gen resultieren in einer Anhäufung abzubauenender und schädigender Proteine. Es sind bisher drei verschiedene Punktmutationen sowie Duplikationen und Triplikationen des gesamten Gens in wenigen Fällen identifiziert worden (Polymeropoulos *et al.*, 1997 [Ala53Thr]; Krüger *et al.*, 1998 [Ala30Pro]; Krüger *et al.*, 2002, Singleton *et al.*, 2003; Zarranz *et al.*, 2004 [E46K]). Darüber hinaus wird der Einfluss eines Dinukleotid-Repeat-Polymorphismus (REP1) in der Promotor-Region des *α-Synuklein*-Gens auf die Expression des Gens diskutiert (Krüger *et al.*, 1999; Touchman *et al.*, 2001). Neuere Studien konnten demonstrieren, dass REP1-Allele unterschiedlich häufig bei Parkinson-Patienten und Kontrollen vorkommen und mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines PS einhergehen (Maraganore *et al.*, 2006; Mata *et al.*, 2010).

(2) Mutationen in *PARK2* (*Parkin*) wurden in zahlreichen Familien unterschiedlicher ethnischer Herkunft zuerst jedoch bei japanischen PS-Patienten beschrieben (Kitada *et al.*, 1998). Mutationen im *Parkin*-Gen sind besonders bei Patienten mit einem autosomal-rezessiven PS mit frühem

Erkrankungsbeginn und einer positiven Familienanamnese häufig (Lücking *et al.*, 2000; Lohmann-Hedrich *et al.*, 2007; Hardy, 2010). Es wurden weltweit zahlreiche Mutationen (Punktmutationen und größere Deletionen und Duplikationen) identifiziert. Da die Untersuchungen am *Parkin*-Gen einen Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit ausmachen, wird in den folgenden Kapiteln ausführlicher auf das Gen eingegangen.

(3) Mutationen im *PINK1*-Gen (*PTEN-induced putative kinase 1*, *PARK6*) werden nach den *Parkin*-Mutationen als häufige Ursache für die Entwicklung eines EOPD gefunden (Valente *et al.*, 2004; Kawajiri *et al.*, 2011). *PINK1* fungiert als mitochondriale Proteinkinase und schützt Neurone wahrscheinlich durch die Phosphorylierung mitochondrialer Proteine vor der Apoptose. Die meisten der beschriebenen Mutationen (über 100 verschiedene Punktmutationen, kleine Sequenzveränderungen, größere Deletionen sowie komplette Gendeletionen) befinden sich im Bereich der funktionellen Domäne für die Proteinkinase und bewirken *in vivo* einen Funktionsverlust des Proteins (Valente *et al.*, 2004; Bonifati *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2006; Tan und Dawson, 2006; Kawajiri *et al.*, 2011). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die *PINK1*-Proteinkinase auf einem gemeinsamen Stoffwechselweg mit dem durch das *Parkin*-Gen kodierte Protein (Parkin) die Mitochondrienfunktion beeinflusst (Deng *et al.*, 2008; Joselin *et al.*, 2012).

(4) Mutationen des *DJ-1*-Gens wurden erstmals 2003 identifiziert (Bonifati *et al.*, 2003). Die Funktion des Gen-Produkts (DJ-1) wird durch intensive Forschungen der letzten Jahre zunehmend beleuchtet. Es wird angenommen, dass DJ-1 eine Funktion als Sensor für oxidativen Stress besitzt und somit als Antioxidans wirkt. Aktuell konnte demonstriert werden, dass die nukleäre Translokation von DJ-1 Neurone vorm Zelluntergang nach oxidativem Stress schützen könnte (Kim *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass DJ-1 als mitochondriales Protein einen Komplex mit Parkin und der *PINK1*-Proteinkinase bildet (Xiong *et al.*, 2009) und schützende Einflüsse gegen eine mitochondriale Schädigung ausübt (Bonifati *et al.*, 2004; Canet-Aviles *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012). Bislang wurden mehr als 20 verschiedene Punktmutationen, kleine Sequenzveränderungen und Deletionen ein oder mehrerer Exons detektiert (Bonifati *et al.*, 2003, Klein *et al.*, 2005; Nuytemans *et al.*, 2010). Auf das *DJ-1*-Gen wird im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit näher eingegangen.

(5) Mutationen im *LRRK2*-Gen (*Leucine-rich repeat kinase 2*, *PARK8*) wurden 2004 beschrieben (Paisán-Ruiz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004). Das Gen kodiert für ein Protein namens Dardarin und ist vor allem in dopaminozeptiven Regionen exprimiert. Es fungiert wie auch *PINK1* als Proteinkinase und einige Mutationen schränken die Phosphorylisierungsaktivität ein, was wiederum über verstärkte Proteinaggregatbildung zum Absterben neuronaler Zellen führen kann (Smith *et al.*, 2005 und 2006). In der Literatur sind über 100 verschiedene Varianten mit unklarer pathogenetischer Bedeutung, darunter viele verschiedene Punktmutationen beschrieben (Farrer *et al.*, 2005; Hedrich *et al.*, 2006; Nuytemans *et al.*, 2009; Macedo *et al.*, 2009).

Das Gen für die Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1 (*UCH-L1*-Gen) wurde als *PARK5* klassifiziert. Bisher wurde nur bei einer einzigen deutschen Familie eine Mutation nachgewiesen, dessen pathogenetische Bedeutung nicht ausreichend geklärt ist (Ile93Met; Leroy *et al.*, 1998a), wahrscheinlich resultiert ein partieller Verlust der Hydrolase-Funktion. In einer *Screening*-Studie wurde eine 2. Variante des Gens detektiert (S18Y; Maraganore *et al.*, 1999), welche einen protektiven Effekt bei der Pathogenese des PS haben könnte. Die Ergebnisse aktueller Studien sind diesbezüglich nicht einheitlich (Ragland *et al.*, 2009; Snapinn *et al.*, 2011). Auch in den übrigen identifizierten Genen, wozu *Omi/HtrA2* (*PARK13*), *Synphilin-1* und *POLG1* gehören, wurden bislang wenige Mutationen bei einer kleinen Anzahl von Patienten detektiert. *POLG1*-Mutationen sollen über eine mitochondriale Dysfunktion direkt zur Entstehung eines PS führen können (Orsucci *et al.*, 2011). Mutationen in einem weiteren Gen, dem *GBA*-Gen sind bis vor wenigen Jahren nur in der ethnischen Bevölkerungsgruppe der Ashkenazi-Juden beschrieben worden und kommen dort bei 30 % vor (Aharon-Peretz *et al.*, 2004). In einer großen *Screening*-Studie wurde eine europäische Kohorte auf *GBA*-Mutationen untersucht, welche bei PS-Patienten signifikant häufiger vorkamen als bei Kontrollen (6,7 % vs. 1 %) Insbesondere konnte bei 8,4 % der PS-Patienten mit positiver Familienanamnese eine *GBA*-Mutation festgestellt werden. Daher vermuten die Autoren, dass *GBA*-Mutationen den größten genetischen Risikofaktor für ein PS unter Europäern darstellen (Lesage *et al.*, 2011). Als ein weiteres Kandidaten-Gen wird das *NR4A2*-Gen diskutiert. In einer Studie im Jahr 2003 wurden bei 10 von 107 Individuen mit einer positiven PS-Familienanamnese zwei verschiedene Mutationen im *NR4A2*-Gen identifiziert, welches für ein Rezeptor-Protein kodiert (Le *et al.*, 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das *NR4A2*-Gen untersucht und wird daher im Folgenden gesondert beschrieben.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die derzeit bekannten monogenen Formen und Suszeptibilitätsfaktoren des Parkinson-Syndroms, dick gedruckt sind die in dieser Arbeit untersuchten Gene, die im Folgenden ausführlicher dargestellt werden.

Tabelle 1.1.: Genetische Formen des Parkinson-Syndroms

Subtyp/Locus	Genort	Gen/Protein	Erbgang
<i>PARK1/4</i>	4q21.3	<i>SNCA</i> /α-Synuklein	autosomal-dominant
<i>PARK2</i>	6q25.2 - q27	<i>Parkin</i>	autosomal-rezessiv
<i>PARK3</i>	2p13	unbekannt	autosomal-dominant
<i>PARK5</i>	4p14	<i>UCH-L1</i>	autosomal-dominant
<i>PARK6</i>	1p35 - p36	<i>PINK1</i>	autosomal-rezessiv
<i>PARK7</i>	1p36	<i>DJ-1</i>	autosomal-rezessiv
<i>PARK8</i>	12p11.2 - q13.1	<i>LRRK2/Dardarin</i>	autosomal-dominant
<i>PARK9</i>	1p36	<i>ATP13A2</i>	autosomal-rezessiv
<i>PARK10</i>	1p32	Late-onset Suszeptibilitätsfaktor	<i>non Mendelian</i>
<i>PARK11</i>	2q36 - q37	<i>GIGYF2</i> /Suszeptibilitätsfaktor	<i>non Mendelian</i>

<i>PARK12</i>	Xq21 - 25	Suszeptibilitätsfaktor	<i>non Mendelian</i>
<i>PARK13</i>	2p12	<i>Omi/HtrA2</i>	<i>non Mendelian</i>
<i>PARK14</i>	22q13.1	<i>PLA2G6</i>	autosomal rezessiv
<i>PARK15</i>	22q11.2 - qter	<i>FBX07</i>	autosomal rezessiv
<i>PARK16</i>	1q32.1	evtl. <i>PM20D1</i> ; <i>SLC41A1</i>	autosomal dominant
<i>PARK17</i>	4p16	<i>GAK</i>	autosomal rezessiv?
<i>PARK18</i>	6p21.3	<i>HLA</i>	autosomal rezessiv?
unbenannt	5q23.1 - q23.315q25	<i>Synphilin-1</i>	autosomal-dominant
unbenannt	2q22 - q23	<i>NR4A2/Nurr1</i>	autosomal-dominant
unbenannt	15q25	<i>POLG</i>	<i>non Mendelian</i>
<i>Gaucher's Locus</i>	1q21	<i>GBA</i>	<i>non Mendelian</i>
<i>FTDP-17</i>	17q21.31	<i>MAPT</i>	autosomal-dominant
<i>SCA2</i>	12q24.1	<i>Ataxin2</i>	autosomal-dominant
<i>SCA3</i>	14q21	<i>Ataxin3</i>	autosomal-dominant
<i>SPG11</i>	15q21.1	<i>Spatacsin</i>	autosomal-rezessiv
unbenannt	4p15	<i>BST1</i>	autosomal-dominant
unbenannt	3q26 - q28	<i>EIF4G1</i>	autosomal-dominant
unbenannt	16p12.1 - q12.1	<i>VPS35</i>	autosomal-dominant

1.2.1. Das *Parkin*-assoziierte Parkinson-Syndrom (*PARK2*)

Das *Parkin*-assoziierte PS wird autosomal-rezessiv vererbt und stellt weltweit mit 10-20 % die häufigste genetische Ursache für ein *early-onset parkinson's disease* (EOPD) dar (Hedrich *et al.*, 2002). *Parkin*-Mutationen werden besonders häufig bei Patienten mit einem niedrigen Erkrankungsalter und insbesondere bei PS-Patienten mit juvenilem Beginn (unter 20 Jahren) gefunden (Abbas *et al.*, 1999; Lücking *et al.*, 2000; Bekris *et al.*, 2010). Im Jahre 2000 wurde in einer Studie an 73 PS-Familien und 100 sporadischen Patienten gezeigt, dass 77 % (10/13) der Patienten mit juvenilen PS *Parkin*-Mutationen aufwiesen. Der Anteil bei den 21- bis 30-jährigen verringerte sich auf 26 % (6/23) und lag bei den 31- bis 45-jährigen nur noch bei 3 % (2/64) (Lücking *et al.*, 2000). Die Prävalenz von *Parkin*-Mutationen verringert sich also deutlich mit ansteigendem Erkrankungsalter. In Folgestudien konnten ähnliche Prävalenzen bestätigt werden (Periquet *et al.*, 2003; Mata *et al.*, 2004). Zur Häufigkeit von *Parkin*-Mutationen bei Patienten mit spätem Erkrankungsbeginn (LOPD) sind bisher nur wenige Studien durchgeführt worden. In einer Studie von Oliveri *et al.* (2001) wurden 118 Patienten (23 PS-Familien und 95 Patienten mit sporadischem PS) auf Mutationen im *Parkin*-Gen untersucht. Es wurden keine Mutationen gefunden, wobei auch keine Gendosis-Untersuchungen durchgeführt wurden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit LOPD-Patienten mittels konventioneller Methoden und Gendosis-Bestimmungen untersucht.

Das *Parkin*-assoziierte PS zeigt neben den klassischen Symptomen des Morbus Parkinson einen zumeist frühen Erkrankungsbeginn. Es gibt jedoch einige klinische Befunde, die eine Abgrenzung zur sporadischen Form erlauben, jedoch nicht bei allen *Parkin*-assoziierten PS-Patienten gefunden werden können: tageszeitliche Schwankungen der Symptomausprägung, Besserung nach Schlaf, Dystonie, Hyperreflexie, gute Ansprechbarkeit auf Levodopa, frühzeitig induzierte Dyskinesien durch die Levodopa-Behandlung und ein langsamer Krankheitsverlauf (Yamamura *et al.*, 1973; Lücking *et al.*, 2000; Hedrich *et al.*, 2001; Hedrich *et al.*, 2002; Kann *et al.*, 2002; Lohmann *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2006). Daraus leitete man den Begriff EOPD ab. Unter den Patienten mit EOPD scheint es keine klinischen Befunde zu geben, die *Parkin*-Mutationsträger von den übrigen Patienten unterscheiden könnten. Dies wurde jedoch nur an einer kleinen Kohorte untersucht (Lohmann *et al.*, 2009).

Das humane *Parkin*-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 6 (6q25.2-q27) (Matsumine *et al.*, 1997). Mit einer Größe von über 1,5 Mb und 12 Exons (Abb. 1.3.) ist das *Parkin*-Gen das zweitgrößte bekannte humane Gen (Asakawa *et al.*, 2001, West *et al.*, 2001). Es gibt eine große Anzahl und ein weites Spektrum an *Parkin*-Mutationen, wobei sich in jedem der 12 Exons mehr als 100 beschriebene Mutationen finden (Hedrich *et al.*, 2004).

Die ersten *Parkin*-Mutationen wurden bei fünf japanischen EOPD-Patienten mit autosomal-rezessivem Erbgang entdeckt. Es handelte sich um homozygote Deletionen von einem oder mehreren Exons des *Parkin*-Gens (Kitada *et al.*, 1998). Die Bandbreite der Mutationen erstreckt sich über (1) Punktmutationen (*missense* und *nonsense*) sowie (2) Deletionen und Insertionen einer oder mehrerer Basenpaare innerhalb eines Exons. Hierbei kommt es in den meisten Fällen zu einer Leserasterverschiebung (*frameshift*) und damit zu einem vorzeitigen Proteinabbruch. Weiterhin kommen (3) Deletionen oder Multiplikationen von einem oder mehreren Exons vor, welche über eine Leserasterverschiebung zu einer Veränderung des Transkripts führen und somit einen vorzeitigen Abbruch der Translation bewirken. Des Weiteren kommen (4) Mutationen an der Intron-Exon-Grenze vor, die die Spleißregion beeinflussen.

Über 50 % der Mutationsträger zeigen Exonrearrangements, die im heterozygoten Zustand nicht mit konventionellen Methoden der Mutationsdetektion nachzuweisen sind (Hedrich *et al.*, 2004; Elfferich *et al.*, 2011). Das Vorkommen von homozygoten Exon-Deletionen ließ darauf schließen, dass es auch heterozygote Deletionen ganzer Exons geben musste. Mitte 2000 wurde die erste Studie veröffentlicht, die mittels semiquantitativer Multiplex-PCR von elf der zwölf Exons des *Parkin*-Gens das Vorhandensein heterozygoter Exon-Deletionen und -Duplikationen untersuchte (Lücking *et al.*, 2000). Damit konnten erste Aussagen über die Häufigkeit dieser Mutationen getroffen werden und die Wichtigkeit der Gendosisuntersuchung dargestellt werden.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christine Klein veröffentlichte 2001 Daten zu einer quantitativen Methode der Mutationsdetektion aller 12 Exons des *Parkin*-Gens, welche Exonrearrangements genauer nachweisen kann als mithilfe der voran genannten semiquantitativen Multiplex-PCR.

Erwähnenswert ist, dass *Parkin*-Mutationen auch bei Familien mit einem (scheinbar) dominanten Erbgang identifiziert wurden (Klein *et al.*, 2000; Maruyama *et al.*, 2000; Lücking *et al.*, 2001; Bonifati *et al.*, 2001; Sidransky, 2006), obwohl EOPD im Allgemeinen autosomal-rezessiv vererbt wird (Kitada *et al.*, 1998). In der bei Klein *et al.* (2000) beschriebenen Familie wird deutlich, dass auch eine heterozygote *Parkin*-Mutation zu einem PS prädisponieren kann.

Das Transkript des *Parkin*-Gens hat eine Größe von 4,5 kb und wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Besonders ausgeprägt ist es im Gehirn (Kitada *et al.*, 2000), dort v. a. im Zytosol, aber auch in synaptischen Vesikeln, im Golgi-Apparat, dem endoplasmatischen Retikulum und der äußeren Mitochondrienmembran. Huynh *et al.* (2000) zeigten, dass Parkin in neuronalen Fortsätzen und Zellkörpern von Neuronen in den Basalganglien, im Mittelhirn, der Großhirnrinde und im Kleinhirn exprimiert ist. Außerdem wurde Parkin in Lewy-Körperchen beschrieben (Shimura *et al.*, 1999; Schlossmacher *et al.*, 2002).

Das Parkin-Protein besteht aus 4 Domänen (Abb. 1.3.): (1) die aminoterminal Ubl-Domäne (*ubiquitin-like domain*), (2) die carboxyterminale RING-box, welche aus den beiden RING-Finger-Domänen (Ring 1 und 2) und der In-between-RING Domäne besteht und (3) dem Verbindungsabschnitt zwischen N- und C-Terminus. Die vierte RING-Finger-Domäne (Ring 0) wurde erst einige Jahre später entdeckt. Die drei RING-Finger-Domänen und die IbR-Domäne können jeweils 2 Zink-Ionen binden (Hristova *et al.*, 2009).

Shimura *et al.* konnten im Jahr 2000 zeigen, dass Parkin an der Protein-Degradation als eine Ubiquitin-Protein-Ligase (E3-Protein) beteiligt ist. Zu den Substraten gehören u. a. eine glykosylierte Form von α -Synuklein (Shimura *et al.*, 2001), p38 (Corti *et al.*, 2003), Synaptotagmin XI (Huynh *et al.*, 2003), der *Parkin-related endothelial receptor-like* Rezeptor (Pael-R; Imai *et al.*, 2001), ein mit synaptischen Vesikeln assoziiertes Protein (CDCrel-1; Zhang *et al.*, 2000) und Synphilin-1, ein mit α -Synuklein interagierendes Protein sowie Parkin selbst. Bei *Parkin*-Mutationsträgern ist die Akkumulation dieser Stoffe aufgrund des Verlustes der Ligaseaktivität möglicherweise verantwortlich für den selektiven Zelluntergang in Neuronen der *Substantia nigra* und des *Nucleus coeruleus* (Cookson *et al.*, 2005). Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Mutationen im RING-Finger-Motiv oder der aminoterminalen Ubl-Domäne die Löslichkeit des Proteins vermindert ist und somit die Proteinaggregation zunimmt (Hampe *et al.*, 2006). Hristova *et al.* demonstrierten mit ihrem Experiment, dass die Entfernung der Zink-Ionen von Parkin zur Entfaltung des Proteins führt. Somit wird verständlich, dass Mutationen in den zinkbindenden RING-Finger- und IbR-Domänen zu einer beeinträchtigten Proteinentfaltung und Funktionseinschränkung bzw. -verlust führen können (Hristova *et al.*, 2009).

Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Expression von Parkin als Antwort auf Stress wie bei der Akkumulation ungefalteter Proteine (z. B. Pael-Rezeptor) hochreguliert wird und damit ein Zelltod unterdrückt wird (Imai *et al.*, 2000 und 2001). Durch Studien an Zell- und Tiermodellen wurde demonstriert, dass Parkin wichtige antioxidative Eigenschaften aufweist. In Zelllinien, in denen

Parkin ausgeschaltet war, kam es zu apoptotischem Zelltod und Erhöhung von auto-oxidierten Formen von Levodopa und Dopamin (Machida *et al.*, 2005). Wie bereits in Abschnitt 1.2. aufgeführt, wurde in den letzten Jahren beleuchtet, dass Parkin gemeinsam mit den Proteinen PINK1 und DJ-1 die Mitochondrienfunktion reguliert und schützende Einflüsse gegen eine mitochondriale Schädigung ausübt (Xiong *et al.*, 2009, Joselin *et al.*, 2012). Parkin scheint dabei in alle mitochondrialen Prozesse involviert zu sein und wird als „Haupt-Regler“ der mitochondrialen Homöostase diskutiert (Lim *et al.*, 2012). Bis *dato* wird die Rolle einer gestörten Mitochondrienfunktion in der molekularen Pathophysiologie des PS untersucht und es muss weiterhin eruiert werden, ob diese Ursache oder Folge der Pathogenese des PS ist (Trancikova *et al.*, 2012).

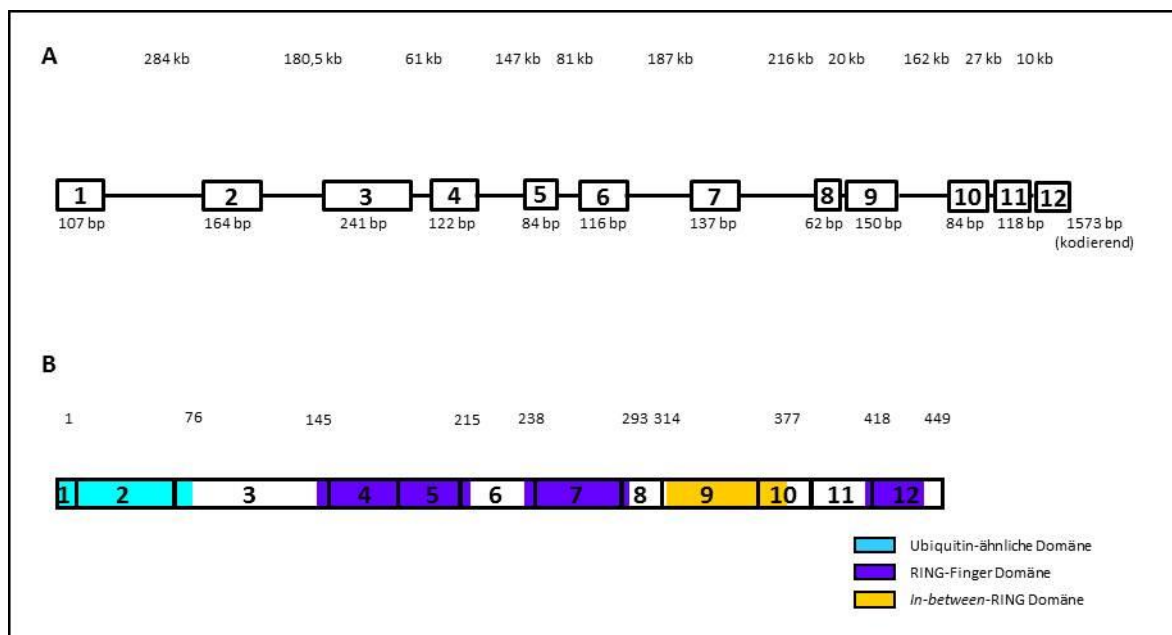


Abbildung 1.3.: Schematische Darstellung des *Parkin*-Gens und *Parkin*-Proteins.

In Teil A sind die 12 Exons als schwarze Kästen mit fortlaufender Nummerierung dargestellt. Unterhalb der Kästen ist die Größe des jeweiligen Exons in Basenpaaren (bp) angegeben. Die Linie zwischen den Exons soll den Introns des Gens entsprechen, deren Größe in Kilobasenpaaren oberhalb abgedruckt ist. Die Abbildung ist maßstabsgerecht, wobei die Exons 1000fach vergrößert gegenüber den Introns dargestellt sind. In dem Teil B sind die funktionellen Regionen, die für bestimmte Domänen im Protein kodieren, farbig hervor gehoben. Das *Parkin*-Protein besteht aus 465 Aminosäuren und enthält fünf charakteristische Domänen. Die Lage der Domänen relativ zu den für sie kodierenden Exons kann man aus diesem Bild entnehmen. Die Zahlen über den Kästen geben die Position der Domänen an (nach Shimura *et al.*, 2000 und Corti *et al.*, 2011).

1.2.2. Das *DJ-1*-assoziierte Parkinson-Syndrom (*PARK7*)

Das *DJ-1*-assoziierte PS wird autosomal-rezessiv vererbt und wird vor allem bei Patienten mit EOPD gefunden. In den Studien der vergangenen Jahre wurde gezeigt, dass Mutationen des *DJ-1*-Gens relativ selten mit PS assoziiert sind. Wahrscheinlich sind nur etwa 1 % der Patienten mit EOPD durch eine Mutation in diesem Gen zu erklären (Clark *et al.*, 2004, Hering *et al.*, 2004;

Lockhart *et al.*, 2004; da Costa, 2007; Corti *et al.*, 2011). Eine Studie von Choi *et al.* zeigte jedoch, dass *DJ-1* eine wichtige Rolle bei sporadisch vorkommenden Formen der Parkinsonerkrankung spielen könnte, da in den untersuchten Gehirnen eine Erhöhung der *DJ-1*-Menge und oxidative Schäden am Protein gefunden wurden (Choi *et al.*, 2006). Außerdem fand man signifikant höhere *DJ-1*-Mengen im Liquor von Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson (insbesondere im Anfangsstadium) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Waragai *et al.*, 2006).

Das klinische Bild des *DJ-1*-assoziierten PS präsentiert sich ähnlich dem *Parkin*-assoziierten PS und mit vielen Ähnlichkeiten zum klassischen Morbus Parkinson. Wie bei dem *Parkin*-assoziierten PS findet man einen frühen Krankheitsbeginn sowie einen langsamen Krankheitsverlauf.

Das humane *DJ-1*-Gen (Abb. 1.4.) befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 und ist ein vergleichsweise kleines Gen mit 7 Exons, wovon das erste Exon nicht kodierend ist. Die ersten beschriebenen Mutationen waren eine autosomal-rezessiv vererbte Exondeletion der Exons 1-5 und eine Punktmutation (*missense*) [Leu166Pro] bei zwei europäischen Familien (Bonifati *et al.*, 2003). Diese beiden *DJ-1*-Mutationen lagen im homozygoten Zustand vor. Mittlerweile sind auch Mutationen in *compound*-heterozygoten und heterozygoten Zuständen identifiziert, welche über das gesamte Gen verstreut liegen (Abou-Sleiman *et al.*, 2003; Hague *et al.*, 2003; Djarmati *et al.*, 2004; Hedrich *et al.*, 2004b; Tang *et al.*, 2006). Wie beim *Parkin*-assoziierten PS scheint eine heterozygote Mutation des *DJ-1*-Gens möglicherweise ausreichend zu sein, um den Phänotyp eines PS auszubilden.

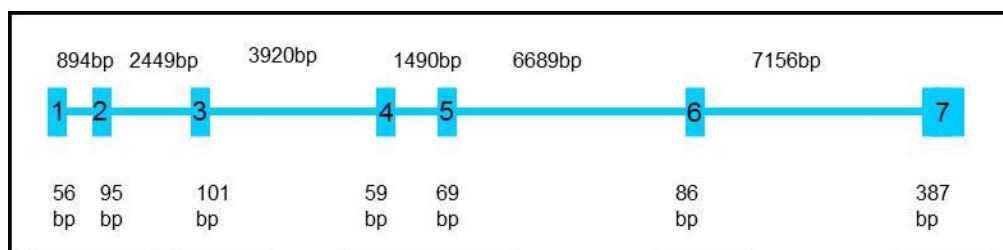


Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung des *DJ-1*-Gens

Es sind die sieben Exons als Kästen dargestellt. Die Größe der Exons ist unterhalb in Basenpaaren (bp) angegeben. Das erste Exon (nicht kodierend) wird in 1A und 1B unterteilt. Zusammen mit den Introns (Größe oberhalb des Schemas in Basenpaaren), als blaue Linien gezeichnet, erstreckt sich das Gen über 24 Kilobasen (kb). Die Abbildung ist maßstabsgerecht, wobei die Exons 10fach vergrößert gegenüber den Introns dargestellt sind.

Das DJ-1-Protein kommt ubiquitär in verschiedenen Geweben vor. Im Gehirn findet man es in neuronalen und glialen Strukturen (Bandopadhyay *et al.*, 2004; Olzmann *et al.*, 2007), hauptsächlich ist es in Astrozyten exprimiert. Daher kann man eine Bedeutung bei der glialen Funktion vermuten. Höhere Konzentrationen des Proteins finden sich in subkortikalen Regionen wie dem Thalamus und der *Substantia nigra pars compacta*. Weiterhin ist es im Zytoplasma und in kleinerem Umfang in Assoziation mit Mitochondrien lokalisiert (Zhang *et al.*, 2005). Die Struktur des DJ-1-Proteins entspricht einem Homodimer (Moore *et al.*, 2003).

Die Funktionen des Proteins sind Gegenstand intensiver Forschung. DJ-1 gehört zur Familie der Chaperone, welche bei oxidativem Stress induziert werden. Das Protein soll als Antioxidans, direkter Fänger von reaktiven Sauerstoffverbindungen und Sensor für oxidativen Stress fungieren. Beispielsweise wurde beschrieben, dass DJ-1 die Aggregation von α -Synuklein verhindern konnte (Mitsumoto and Nakagawa, 2001; Canet-Aviles *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006). In einer anderen Studie wurde belegt, dass DJ-1 die reaktive Sauerstoffverbindung Hydrogenperoxid durch Auto-Oxidation eliminieren konnte (Taira *et al.*, 2004). Des Weiteren wird vermutet, dass über die Interaktion mit einem Polypeptid-Komplex, der ein Ubiquitin-ähnliches modifizierendes Protein besitzt, die mRNA-Expression durch DJ-1 beeinflusst wird. Dieses Ubiquitin-ähnliche modifizierende Protein, SUMO genannt, fördert die Stabilität subzellulärer Proteine (Takahashi *et al.*, 2001). In aktuellen Studien am Tiermodell wurde demonstriert, dass oxidiertes DJ-1 bei unbehandelten PS-Patienten häufiger als bei behandelten PS-Patienten und Kontrollen vorkommt (Saito *et al.*, 2009) und die oxidative Modifikation von DJ-1 im Gehirn und den Erythrozyten in die Pathogenese eines PS involviert ist (Akazawa *et al.*, 2010). Daher kann oxidiertes DJ-1 als Biomarker für neurodegenerative Erkrankungen genutzt werden (Kahle *et al.*, 2009). Neue Studien belegen ebenso, dass die DJ-1 Spiegel in Mitochondrien nach oxidativer Schädigung von Neuronen erhöht sind und dieser Prozess von Parkin abhängig ist. Das Zusammenspiel der Proteine DJ-1 und Parkin auf einem gemeinsamen Zellstoffwechselweg wird aktuell in vielen Arbeitsgruppen untersucht. Joselin *et al.* zeigten kürzlich in einem Zellexperiment, dass ein Verlust von DJ-1-Protein zu einer erhöhten, stress-induzierten Parkin-Rekrutierung und zur erhöhten Mitophagie führt. Durch Expression von Wildtyp DJ-1 konnte dieser Prozess beendet werden, nicht jedoch durch eine Mutante (Joselin *et al.*, 2012).

Die DJ-1-Mutation [Leu166Pro] führt zu einer Destabilisierung des Proteins aufgrund einer beeinträchtigten Proteinfaltung des C-Terminus. Außerdem kann die Homodimer-Struktur nicht aufgebaut werden und ein beschleunigter Abbau des DJ-1-Proteins über das Proteasom wird vermittelt (Miller *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2003; Olzmann *et al.*, 2004). Weitere Folgen der o. a. Mutation sind eine Verringerung der neuroprotektiven Funktion von DJ-1 (Taira *et al.*, 2004) und eine verminderte nukleäre Lokalisation des Proteins vor allem in den Mitochondrien (Bonifati *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2011). Bei einer konsekutiv verminderten Sekretion von neuroprotektiven Faktoren und der Zunahme von freien Sauerstoffverbindungen lässt sich somit ein höheres Risiko für den dopaminergen Zelltod vermuten.

1.2.3. Das NR4A2-Gen

Zu Beginn dieser Arbeit war nur wenig über das NR4A2-Gen im Zusammenhang mit PS bekannt. Das Gen (Abb. 1.5.), welches 9,8 kb spannt und 8 Exons besitzt, kodiert für einen Rezeptor aus der Familie der Steroid/Thyroid-Hormone (Hering *et al.*, 2004a; Chen *et al.*, 2007). Er wird in Dopaminzellen exprimiert und ist für die Entwicklung von dopaminergen Neuronen im Mittelhirn

notwendig, wobei er an der Transkription der Tyrosinhydroxylase und der Dopamin-Transportergene beteiligt ist (Tan *et al.*, 2003). Über eine verringerte Bildung neurotoxischer Mediatoren soll *NR4A2* als Transkriptionsfaktor vorm Zelluntergang dopaminergener Neuronen schützen (Saijo *et al.*, 2009). Bei Versuchen mit Mäusen hat sich gezeigt, dass Tiere, die den durch *NR4A2* kodierten Rezeptor nicht aufwiesen (homozygote Tiere), auch keine dopaminergen Neuronen entwickelten und rasch starben. Die Tiere, die den Rezeptor nur in geringem Ausmaß exprimierten (heterozygote Tiere), aber ansonsten gesund waren, hatten reduzierte Dopamin-Spiegel (Zetterström *et al.*, 1997). In den letzten Jahren wurde auch bei Patienten mit PS eine reduzierte *NR4A2*-Gen Expression gemessen (Le *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012). Es wird deutlich, dass das *NR4A2*-Gen eine bedeutende Rolle in der Entstehung des Parkinson-Syndroms spielen könnte (Healy *et al.*, 2006).

Die Arbeitsgruppe um Le *et al.* veröffentlichte 2003 eine Studie, in der sie zwei heterozygote Mutationen im Exon 1 des *NR4A2*-Gens bei 10 von 107 (9,3 %) der untersuchten PS-Patienten mit positiver Familienanamnese detektierte. Von den 10 Mutationsträgern europäischer Herkunft teilten 8 die gleiche Mutation und auch mindestens 8 der Mutationsträger wiesen einen dominanten Erbgang auf, so dass sich die Schlussfolgerung ergab, *NR4A2*-Mutationen seien häufig mit einem autosomal-dominanten PS assoziiert (Le *et al.*, 2003). Bei den beiden beschriebenen Mutationen handelt es sich um [-245T→G] und [-291Tdel] in Exon 1 des Gens.

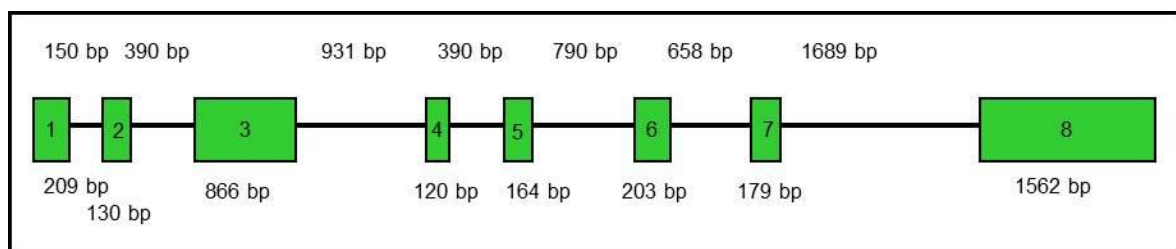


Abbildung 1.5.: Schematische Darstellung des *NR4A2*-Gens.

Die grünen Kästen repräsentieren die 8 Exons des Gens, ihre Größe in Basenpaaren (bp) ist unterhalb des Schemas angegeben. Die Größe der Introns in Basenpaaren ist maßstabsgerecht oberhalb der Linien (welche den Introns entsprechen sollen) aufgetragen.

1.3. Ziele der vorliegenden Arbeit

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, genetische Ursachen bei PS-Patienten mithilfe moderner molekulargenetischer Techniken und detaillierter Analyse zu untersuchen, um somit ein besseres Verständnis der monogenen PS-Formen zu erhalten. Damit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie häufig sind *Parkin*-Mutationen bei Patienten mit EOPD, LOPD und Kontrollen und welche Bedeutung haben sie?
 - 1.1. Welche Rolle haben heterozygote Mutationen des *Parkin*-Gens?
 - 1.2. Haben *Parkin*-Mutationen eine Bedeutung für den Therapieerfolg bei Patienten mit THS?
 - 1.3. Welche Bedeutung haben Mutationen im *Core*-Promotor des *Parkin*-Gens?
2. Welchen Stellenwert haben *DJ-1*-Mutationen bei Patienten mit EOPD?
3. Welche Rolle spielen *NR4A2*-Mutationen bei Patienten mit familiärem PS?

2. Patienten und Methoden

2.1. Patienten

Für die molekulargenetischen Untersuchungen wurden Patienten mit einem PS und gesunde Kontrollen untersucht. Die entsprechende Diagnose wurde von Bewegungsstörungsspezialisten gestellt und beruhte auf publizierten Kriterien für ein Parkinson-Syndrom (Gibb und Lees, 1988). Eine Einverständniserklärung aller Patienten und Kontrollindividuen lag für die Untersuchungen und Veröffentlichung vor. Die Untersuchungen waren durch die lokalen Ethikkommissionen genehmigt worden.

Nachfolgend werden die unterschiedlichen Patientengruppen und Kontrollen aufgeführt und zur besseren Übersicht in Tabelle 2.1. dargestellt.

Tabelle 2.1.: Gene und Patientenkollektive

Aufgelistet sind die drei untersuchten Gene und die verschiedenen Patientenkollektive, an denen die genetischen Untersuchungen durchgeführt wurden.

Gen / Patientengruppe	<i>Parkin</i> -Gen	<i>DJ-1</i> -Gen	<i>NR4A2</i> -Gen
(1) 87 PS-Patienten mit frühem Beginn (EOPD)	<i>Screen</i> mit SSCP, quant. PCR + Sequenzierung		
(2) 61 PS-Patienten mit spätem Beginn (LOPD)	<i>Screen</i> mit SSCP, quant. PCR + Sequenzierung		
(3) 20 MRT-Kontrollen	<i>Screen</i> mithilfe der dHPLC-Technik (WAVE- System) + Sequenzierung		
(4) 128 Kontrollen + 116 PS-Patienten	Schmelzkurven am <i>LightCycler</i> (<i>Parkin</i> -Promotor)		
(5) 71 Patienten mit EOPD (Teil von Gruppe 1)		<i>LightCycler</i> - <i>Screen</i> + Sequenzierung	
(6) 50 Patienten mit positiver FA			Sequenzierung Exon 1

2.1.1. Patienten mit PS frühen Beginns für die Untersuchung von *Parkin*- und *DJ-1*-Gen

Die größtenteils in der Neurologischen Klinik der Universität Lübeck und Kiel gesammelte Stichprobe setzt sich aus 87 Parkinson-Patienten mit einem frühen Krankheitsbeginn (EOPD) zusammen. Des Weiteren wurden DNA-Proben von Patienten aus Deutschland, Russland, Irland, Kanada und der USA untersucht, die speziell für die Untersuchungen überwiesen wurden. Das Erkrankungsalter der Patienten lag bei unter 50 Jahren. In dieser Gruppe wiesen zwei Patienten eine positive Familienanamnese auf, ansonsten handelte es sich um sporadische PS-Patienten. In die Stichprobe wurden 24 norddeutsche PS-Patienten, die eine Tiefenhirnstimulation (THS) erhalten hatten, eingeschlossen.

2.1.2. Patienten mit PS späten Beginns für die Untersuchung des *Parkin*-Gens

Die Patienten stammten einerseits aus der geographisch isolierten Region des Südtirol und wurden am Bozener Spital durch Dr. P. Pramstaller rekrutiert (n=28). Ein größerer Teil der Patienten (n=33) wurde in der neurologischen Polyklinik der Universität Lübeck gesammelt. Bei neun Patienten war bekannt, dass es betroffene Familienmitglieder gab, bei sieben Patienten war die Familienanamnese unklar.

2.1.3. Kontrollen für die Untersuchung des *Parkin*-Gens mit dem WAVE-System

Es handelte sich um eine kleine Kontrollgruppe von 20 gesunden Kontrollen, bei denen mittels einer Magnetresonanztomographie des Gehirns ein M. Parkinson ausgeschlossen werden konnte.

2.1.4. Patienten und Kontrollen für die Polymorphismus-Analyse im *Core*-Promotor

Die Stichprobe wurde von der Neurologischen Klinik der Lübecker Universität zusammen getragen. Das Erkrankungsalter der 116 Patienten lag unterhalb von 50 Jahren, somit handelte es sich um Patienten mit einem PS frühen Beginns (EOPD). Die Kontrollgruppe bestand aus 128 nicht an PS erkrankten Personen aus dem Raum Lübeck. In Alter und Geschlecht stimmten Patienten- und Kontrollgruppe überein.

2.1.5. Patienten für die Untersuchung des *NR4A2*-Gens

Es wurden 50 PS-Patienten, in deren Familie es mindestens einen ebenfalls an PS erkrankten Verwandten ersten Grades gab, und man somit von einem dominantem Erbgang ausgehen konnte, auf Mutationen im *NR4A2*-Gen getestet. Die Patienten-DNA stammte aus der Neurologischen Klinik der Universität Lübeck.

2.2. Methoden

In den folgenden Abschnitten werden die Methoden, die zu den molekulargenetischen Untersuchungen angewendet wurden, vorgestellt. Die experimentellen Arbeiten fanden im Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck statt.

2.2.1. Verfahren zur DNA-Präparation

Es wurde humane genomische DNA für die genetischen Untersuchungen als Grundlage für die Durchführung von PCR-Reaktionen benötigt. Die Präparation genomischer DNA erfolgte aus Leukozyten des Blutes nach der Aussalzmethode (Miller *et al.*, 1988). Nach Lysierung der Zellen wurden die Proteine durch Proteinase K verdaut, anschließend die DNA durch Präzipitation isoliert.

Vorgehen:

- Zufügen von 35 ml Leidener-Lösung zu 10 ml Vollblut (EDTA/Heparin/Citrat) in 50 ml Röhrchen
- Bei 200 rpm 30 min lang auf Eis schütteln
- Abzentrifugieren der Leukozyten bei 6000 rpm und 4° C
- Überstand abgießen
- Reinigen des *Pellets* durch Resuspendieren in 10 ml Leidener-Lösung
- Lysieren für 20 min auf Eis und Zentrifugation (6000 rpm, 4° C, 20 min)
- Reinigungsvorgang wiederholen, bis Leukozytenablagerung weiß erscheint
- Resuspension und Vermischen des *Pellet* in 3 ml Lysepuffer
- Zugabe von 200 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 100 µl SDS (20 %ig) um Proteinabbau einzuleiten
- Inkubation über Nacht bei 55° C
- Zugabe von 1 ml 6 M NaCl-Lösung pro Röhrchen und kräftiges Schütteln
- Verdau abzentrifugieren (6000 rpm, 20° C, 25 min)
- Überstand mit 6 M NaCl-Lösung waschen
- Ausflocken der DNA durch Zugabe von 2 Vol. 96 % EtOH und leichtes Schwenken
- DNA-Flocke mit 1 ml 70 % EtOH in 1,5 ml Reaktionsgefäß waschen

- Zentrifugation (12000 rpm, 4° C, 15 min)
- Überstand abgießen
- *Pellet* (DNA) im geöffneten Röhrchen kurz bei 37° C trocknen
- Zugabe von 200 bis 1000 µl 1x TBE-Puffer

2.2.2. Spektralphotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Mithilfe der spektralphotometrischen Messung kann man die Konzentration einer DNA-Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus der Extinktion berechnen. Bei einer Wellenlänge zwischen 250 und 270 nm absorbieren die Nukleinsäuren Licht. Sind Proteine in der Probe enthalten, absorbieren diese vor allem Licht der Wellenlänge 280 nm. Der Quotient $E_{260} : E_{280}$ liegt für reine DNA zwischen 1,8 und 2,0. Bei Verunreinigung durch viele Proteine wird der Quotient kleiner, die Probe muss aufgereinigt werden. Vor der Messung der Proben am Photometer wurde jeweils ein Nullabgleich gegen Wasser durchgeführt. Nachteil der Methode ist die Bestimmung der Gesamtnukleinsäure, dass also auch RNA mit in die Messung einfließt.

Berechnung der Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c_{NA} = E_{260} * d * e * f$$

E_{260} ...Extinktion bei 260 nm

d.....Schichtdicke der Küvette (= 1)

e.....Extinktionskoeffizient (= 50)

f.....Verdünnungsfaktor

c_{NA}Konzentration der Nukleinsäure

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986) ist es möglich, bestimmte Nukleinsäuresequenzen enzymatisch zu vervielfältigen, d. h. *in-vitro* zu amplifizieren. Durch Einsatz von zwei sequenzspezifischen *Primern* wird eine spezifische Amplifikation gewährleistet. Die *Primer* können sich an die Randbereiche der definierten Nukleinsäuresequenz komplementär anlagern, so dass sich dieser Bereich durch eine thermostabile Polymerase duplizieren lässt. Es werden drei Schritte zyklisch durchlaufen: die Denaturierung führt zum Auftrennen der doppelsträngigen DNA in Einzelstrang-DNA. Im nächsten Schritt kommt es zum Anlagern der spezifischen komplementären *Primer* (*Annealing*). Danach wird die DNA mit Hilfe einer thermostabilen *Taq*-Polymerase elongiert, welche am 3'-Ende der *Primer* ansetzt. Dieser sich mehrfach wiederholende Zyklus führt zu einer schnellen Vervielfältigung der ursprünglichen Nukleinsäuren, da sich in jeder exponentiellen Phase die Anzahl der Kopien verdoppelt.

2.2.3.1. PCR-Standardbedingungen

PCR-Ansatz und -Reaktion für die konventionelle Mutationsdetektion

Die PCR-Reaktionen wurden mit einer Standard-*Taq*-Polymerase durchgeführt (Q-Biogene oder Eppendorf), wenn anschließend ein Mutationsscreening mittels SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) und direkter PCR-Produkt-Sequenzierung folgen sollte. Das Enzym besitzt eine 5′-3′-Exonuklease-Aktivität; an die 3′-Enden wird unabhängig von der Matrix ein Desoxyadenosin angehängt. Am *Thermocycler* wurden die PCR-Standardbedingungen vereinfacht wie folgt gewählt:

95° C: 5 min// 95° C: 30 s, 55-72° C: 30 s (34 Zyklen), 72° C: 30 s - 4 min; 72° C: 10 min; 4° C als Endtemperatur.

PCR-Ansatz:

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
steriles dH ₂ O		7,3 µl	
Puffer	10x	2,0 µl	1x
dNTP-Mix	1 mM	4,0 µl	4 nmol
<i>Primer</i> +	10 µM	0,8 µl	8 pmol
<i>Primer</i> -	10 µM	0,8 µl	8 pmol
<i>Template</i>	5 - 10 ng/µl	5,0 µl	25 - 50 ng
Taq	5 U/µl	0,1 µl	0,5 U
		Σ 20,0 µl	

In den auf 95° C vorgeheizten Block eines *Thermocyclers* wurden die Reaktionsgefäße gestellt, zu denen auch für jede PCR Positiv- und Negativkontrolle gehörten. Die Amplifikation erfolgte bei einer *Annealing*-Temperatur, die der *Primer*-Sequenz angepasst war.

Mit Hilfe des Programms „Oligo“ wurden die *Primer* abgeleitet. *Primer* und Sonden sind Oligonukleotide, die zumeist aus 20 bis 24 Basen bestehen. Die *Primer* sollen möglichst keine Sekundärstrukturen mit sich selbst oder dem Gegen-*Primer* bilden. Das 3′-OH-Ende bestand zumeist aus einem Guanin oder Cytosin, da dadurch eine höhere Bindungsstärke erreicht wird als bei einem A-T-Paar.

Wurden neue *Primer* verwendet, musste zunächst eine Gradienten-PCR (mit verschiedenen *Annealing*-Temperaturen) durchgeführt werden, um die optimale Temperatur zu ermitteln. Funktionierte eine PCR nicht optimal, wurden unterschiedliche Mg²⁺-Konzentrationen getestet und Zusätze wie Formamid, Betain, Glycerin und DMSO ins Rezept aufgenommen.

Die *Primer* und Sonden sowie die zugehörigen *Annealing*-Temperaturen und Besonderheiten sind im Anhang aufgeführt.

2.2.3.2. Quantitative Echtzeit-PCR

Mit einer Echtzeit-PCR kann man Nukleinsäuren in der log-linearen Phase der PCR quantifizieren und dabei am Computer-Monitor die Menge an PCR-Produkt *online* verfolgen. Hierzu wurde der *LightCycler* (RocheDiagnostics) verwendet und nach den Protokollen von Hedrich *et al.* (2001) gearbeitet. Mit dieser Methode ist es möglich, heterozygote Deletionen und Duplikationen ganzer Exons in einem Gen, in diesem Falle dem *Parkin*-Gen und dem *DJ1*-Gen, festzustellen.

Anhand einer *Duplex*-PCR können zwei definierte DNA-Abschnitte zeitgleich in einem Reaktionsansatz vervielfältigt werden. Dazu wurden zwei unterschiedlich markierte Paare von Hybridisierungs sonden zum Messen der PCR-Produktmenge eingesetzt. Als Referenz-Gen diente das β -Globin-Gen. Verglichen wurden die PCR-Produktmengen des *Parkin*-Gens bzw. des *DJ1*-Gens und des koamplifizierten β -Globin-Gens. Das *Parkin*-spezifische PCR-Produkt wurde in Kanal F2 (mit LC640-markiert), das β -Globin-spezifische PCR-Produkt wurde in Kanal F3 (LC705-markiert) gemessen. Die Sonden wurden so gewählt, dass sie nach Hybridisierung mit der Zielsequenz dicht beieinander lagen (1-5bp). Eine der beiden Sonden war mit einem 3'-Fluoreszeinfarbstoff markiert, der durch Licht aus dem *LightCycler* angeregt wurde. Die andere Sonde enthielt einen 5'-*LightCycler-Red*-Farbstoff, durch den fluoreszierendes Licht über einen speziellen Sensor gemessen werden konnte, nachdem die Energie des angeregten 3'-Fluoreszeinfarbstoffs auf diesen übertragen wurde. Diese Energieübertragung bezeichnet man als *fluorescence energy transfer technique* (FRET).

Die vom 5'-*LightCycler-Red*-Farbstoff emittierte Lichtmenge und die Menge der amplifizierten DNA stehen in einer proportionalen Beziehung. Die Amplifikation der DNA in der log-linearen Phase kann daher mit folgender Formel beschrieben werden:

$$N = N_0 \cdot E_{\text{const}}^n$$

N	Menge der amplifizierten Moleküle
N ₀	Menge der Moleküle bei Reaktionsbeginn
E _{const}	Amplifikations-Effizienz (konstant in log-linearer Phase)
N _n	Anzahl der Zyklen

Mithilfe dieser Angaben kann man die Ausgangskonzentrationen von DNA-Proben errechnen. Es werden die Mengen des *Parkin*-Gens bzw. des *DJ1*-Gens und des β -Globin-Gens zueinander ins Verhältnis gesetzt. Erhält man Werte zwischen 0,8 und 1,2 (1 +/- 20 %) wird das normale Vorliegen des Exons angenommen. Bei Werten zwischen 0,4 und 0,6 (0,5 +/- 20 %) geht man von einer heterozygoten Deletion des betroffenen Exons aus. Liegen die Werte zwischen 1,3 und 1,7 ist es wahrscheinlich, dass eine heterozygote Duplikation des Exons vorliegt. Bei allen DNA-Proben

wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und nur diejenigen Doppelwerte akzeptiert, die innerhalb einer Standardabweichung von 10 % der ermittelten Konzentration lagen.

Durch SSCP-Analysen und Sequenzierungen wurden vor den Messungen zur quantitativen DNA-Bestimmung Mutationen in den Anlagerungsstellen der *Primer* ausgeschlossen.

Es wurden für die PCR der Exons 2 - 5, 7, 9, 11 und 12 des *Parkin*-Gens exonische *Primer* verwendet. Für die kleineren Exons 1 und 8 des *Parkin*-Gens wurden intronische *Primer* benutzt. Bei den *Parkin*-Exons 6 und 10 wurde eine Kombination aus exonischen und intronischen *Primern* gewählt. Im *DJ1*-Gen wurden Exon 2, 3, 4, 5, 6 und 7 mithilfe von exonischen *Primern* amplifiziert.

Um eine absolute Quantifizierung zu erzielen, ist bei jeder Messung eine Verdünnungsreihe einer Standard-DNA (Roche Diagnostics) mit bekannter Konzentration mitgelaufen. Bei den ersten Messungen der nicht aufgereinigten Proben aus Bozen am *LightCycler* wurden Konzentrationen von 0,3125 ng/µl, 1,25 ng/µl und 5 ng/µl als Standardreihe verwendet. Bei der Untersuchung anderer eingesandter und in Lübeck extrahierter DNA-Proben, die bei 1:100 Verdünnung in den meisten Fällen eine Konzentration zwischen 1 und 10 ng/µl aufwiesen, wurde die Standardreihe auf folgende Konzentrationen umgestellt: 0,6125 ng/µl, 2,5 ng/µl und 10 ng/µl.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
dH ₂ O		ad 10 µl	
MgCl ₂	25 mM	0,8 bis 1,8 µl	2 bis 4,5 mM ¹
<i>Primer</i> Ex (F+R)	5 µM	1,0 µl	0,5 µM
Sonde FL Ex	4 µM	0,5 µl	0,2 µM
Sonde LC Ex	4 µM	0,5 µl	0,2 µM
<i>Primer</i> Glob (F+R)	5 µM	1,0 µl	0,5 µM
Sonde FL Gl	4 µM	0,5 µl	0,2 µM
Sonde LC Gl	4 µM	0,5 µl	0,2 µM
Hybrid-Mix (Kit ²)	10x	1,0 µl	1x
DNA	~ 5 ng	2,0 µl	~ 10 ng

¹: 1 mM ist im Hybrid-Mix enthalten; ²: *DNA Master Fast Start Hybridization Probes* (RocheDiagnostics)

Die Amplifizierung des Exon 1 des *Parkin*-Gens wurde in 4 % Glycerin und bei Exon 5 in 3 % Formamid durchgeführt.

Das PCR-Programm am *LightCycler* lautete wie folgt : 95° C 10 min // 95° C 10 s; 55° C 10 s; 72° C 10 s (38 Zyklen) // Kühlen auf 40° C 30 s

2.2.4. Gelelektrophorese und Gelelution

2.2.4.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde als Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe im Anschluss an eine PCR angewendet. Die Nukleinsäuren wandern entsprechend ihrer Größe, Konformation und Ladung unterschiedlich schnell in dem elektrischen Feld und bilden daher ein entsprechendes Bandenmuster aus. Die Auftrennung der DNA-Moleküle nach ihrer Größe im elektrischen Feld ist aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrates gegeben. Aufgrund der Netzstruktur des Agarosegels nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle mit steigender Basenzahl ab. Agarosegele sind einfach in ihrer Anwendung, haben aber ein geringeres Auflösungsvermögen als beispielsweise Polyacrylamid- (PAA-) Gele.

Vorgehen:

- Lösen von 6 g Agarose in 300 ml 1x TBE
- Aufkochen der Gellösung in der Mikrowelle
- Zugaben von 1/50 Vol. Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml)
- Gießen des Gels in eine Gelkammer, welche mit ein oder zwei Kämmen bestückt ist
- Festes Agarosegel in die mit 1x TBE gefüllte Elektrophoresekammer einlegen
- 1/3 Vol. Formamid-Farbstoff zu den Proben pipettieren
- 7µl der Probe und geeigneten Längenstandard in die Ladetaschen füllen
- Elektrophorese bei 80 bis 120 V für 30 min bis 2 h

Durch den fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid, der in der DNA interkaliert, konnte die DNA unter UV-Licht (365 nm) als rot-orange-farbige Bande sichtbar gemacht werden. Anschließend wurde das Bandenmuster mit einer Videokamera mit angeschlossenem Bildverarbeitungssystem (BioDocAnalyse, Biometra) fotografisch dokumentiert.

2.2.4.2. Gelelution

Um PCR-Produkte für eine Sequenzierung von Nukleotiden, *Primern* und anderen unspezifischen PCR-Amplifikaten reinigen zu können, wurde eine Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose durchgeführt. Benutzt wurde das Aufreinigungskit Perfectprep Cleanup (Eppendorf). Dieses System basiert auf der Löslichkeit von Agarose und der selektiven Adsorption von DNA an Silica-Partikel in Hochsalzpuffern (Vogelstein und Gillespie, 1979).

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde die DNA-Bande mithilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten und dann nach Herstellerangaben aus diesem eluiert. Hierbei wurde zunächst die Agarose in einem Hochsalzpuffer durch Wärme gelöst und die DNA an Silica-Partikel bzw. an eine Membran gebunden. Daran schlossen sich verschiedene Waschschriffe der Säule an und schließlich wurde die DNA mit 10 mM Tris-Puffer eluiert.

2.2.4.3. Nicht-denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

In einer nicht-denaturierenden Gellösung können sich DNA-Stränge zusammenlagern und es können sich Wasserstoffbrücken-Bindungen ausbilden. Bei der SSCP-Analyse ist die Ausbildung bestimmter Konformationen der einzelnen DNA-Stränge erwünscht, daher werden nicht-denaturierende Gele verwendet. Die Gellösung wurde nach dem unter 2.2.4.1. genannten Rezept hergestellt.

Vorgehen:

- Zugießen von 500 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat) zu 50 ml SSCP-Acrylamid-Gellösung
- Gießen eines luftblasenfreien Gels (25 cm x 40 cm und 4 mm dick [Abstandhalter])
- Nach der Polymerisation der Gele vertikales Einspannen in Kammern
- PCR-Produkte mit 5-7 µl 40 % Formamid-Farbstoff versetzen und für 5 min bei 95° C denaturieren, danach sofort auf Eis stellen
- Je 7 µl PCR-Produkt bzw. Längenstandard pro Ladetasche auftragen
- Elektrophorese bei konstanter Leistung (4 - 20 W) über 5 - 16 h
- Silberfärbung der Gele zum Sichtbarmachen der Produkte

2.2.4.4. Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Polyacrylamidgele zeichnen sich im Vergleich zu Agarosegelen durch ein höheres Auflösungsvermögen aus. Bei der denaturierenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese enthält die Gellösung das Wasserstoffbrücken-brechende Agens Harnstoff. Somit können einzelsträngige DNA-Moleküle analysiert werden.

Vorgehen:

- Gießen eines Gels (25 cm x 41 cm und 0,2 mm dick [Abstandhalter])
- Haifischzahn (0,2 mm) als Taschenformer einschieben
- Gel mind. 2 h auspolymerisieren lassen
- Gel in Sequenziergerät LI-COR einspannen
- Rechner für die Messung vorbereiten (Fokussierung des Lasers und Hell-Dunkel-Abgleich)
- 20 min Vorlauf
- 4 µl fluoreszenzfreien FA-Farbstoff zum Sequenzprodukt pipettieren
- Denaturieren der Proben bei 95° C für 3 min
- Proben in den Eisblock stellen
- Laden von je 1,5 µl Produkt in der Reihenfolge A-T-G-C
- Elektrophorese für ca. 6 h bei 50° C und 31,5 W in 1x TBE als Laufpuffer
- Nachladen eines Geles war ein zweites Mal möglich
- Auswertung durch direktes Lesen am Bildschirm

2.2.5. Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse

Mit der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-(SSCP)-Analyse, als ein etabliertes elektrophoretisches Trennverfahren, lassen sich Sequenzunterschiede in PCR-Produkten darstellen (Orita *et al.*, 1989). Die Methode beruht auf dem Nachweis unterschiedlicher Laufgeschwindigkeiten von einzelsträngiger DNA in nativen Polyacrylamidgelen. Sequenzunterschiede führen in den meisten Fällen zu einer Konformationsänderung der DNA, dadurch verändert sich die elektrophoretische Mobilität, was sich in dem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel zeigt. Das Bestreben von DNA, unter nicht-denaturierenden Bedingungen komplementäre Wasserstoffbrücken-Bindungen auszubilden, die innerhalb eines Stranges oder zwischen verschiedenen Strängen bestehen können, wird ausgenutzt. Das heißt, dass bei der SSCP die Bindungen bzw. die daraus resultierenden Konformationen von Einzelsträngen untersucht werden.

Wenn zum Beispiel ein PCR-Produkt eine Sequenzveränderung aufweist, kann dies dazu führen, dass sich andere komplementäre Wasserstoffbrücken-Bindungen bilden als in der Wildtyp-DNA. Das wiederum kann in einer abweichenden Konformation dieses Stranges resultieren und somit das Laufverhalten verändern. Die Probe fällt durch ein verändertes Bandenmuster im Gel verglichen mit den anderen Proben auf.

Es muss auf gleich bleibende Bedingungen während der Elektrophorese geachtet werden, um zu reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen. Jedoch konnten nicht alle Laufbedingungen konstant gehalten werden (wie Temperatur und Luftdruck). Daher wurden immer mehrere Proben miteinander verglichen, um einzelne abweichende Muster zu erkennen.

Die Sensitivität, mit der Sequenzveränderungen festgestellt werden können, liegt bei über 90 %. Es können in der Regel alle kleinen Deletionen und Insertionen (1 - 40 bp) und etwa 80 % der Punktmutationen erkannt werden (Hayashi und Yandell, 1993). Diese Methode wurde benutzt, um Mutationen (Frequenz in der Population < 1 %) als auch Polymorphismen (Frequenz > 1 %) zu detektieren (Murken und Cleve, 1994; Passarge, 1994). Die Größe der untersuchten Nukleinsäurestränge sollte 350 bp nicht überschreiten.

2.2.6. Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine empfindliche Färbemethode, um DNA-Moleküle im Gel sichtbar zu machen (von Deimling *et al.*, 1993). Sie beruht auf der Komplexbildung von Ag⁺-Ionen und ist etwa 30fach sensitiver als eine Ethidiumbromidfärbung (Krause *et al.*, 1994) s. unter 2.2.4.1. und zudem nicht toxisch.

Vorgehen:

- Trennen der Elektrophoreseplatten mit Trennkeil
- Inkubation der Gele für 5 min in 10 % Ethanol

- Inkubation für 3 min in 1 % Salpetersäure
- Zweimal mit Aqua dest. spülen
- Inkubation für 20 bis 60 min in 12 mM AgNO₃-Lösung
- Dreimal gründlich mit Aqua dest. spülen
- Entwickeln der Gele mit 280 mM Na₂CO₃ in 0,2 % Formaldehyd-Lösung nach Sicht
- Stoppen der Färbung durch Zugabe von 10 % Essigsäure
- Waschen des Gels mit Aqua dest.
- Übertragen des Gels auf ein Trockenpapier (Whatman-Papier)
- Trocknen des Gels auf heizbaren Gelrockner mit Vakuumanschluß für 1-2 h bei 75° C

2.2.7. Mutationsanalyse mit dem WAVE-System

Mit dem WAVE-System hat man die Möglichkeit, drei verschiedene Arten von DNA-Analysen durchzuführen. Im vorliegenden Fall wurde mit der partiell denaturierenden Methode gearbeitet, welche Temperaturen von 52° C bis 75° C nutzt. Diese Methode wird zur Detektion von Polymorphismen und Mutationen verwendet und ist im Folgenden beschrieben. Im nicht-denaturierenden Bereich bis zu etwa 50° C prüft man mit dem WAVE-System beispielsweise die Güte von PCR-Produkten oder kann quantitative Analysen durchführen. Bei 75-80° C (voll denaturierender Bereich) können mithilfe des WAVE-Systems z. B. RNA-Analysen vorgenommen werden.

Mittels *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (dHPLC) können am WAVE-System (Transgenomic) Einzelbasen-Substitutionen, kleine Insertionen oder Deletionen detektiert werden. Das WAVE-System setzt die dHPLC in Verbindung mit einer speziellen Trennsäule ein. Die Wanderung von Molekülen durch die Säule wird durch eine Hochdruckpumpe beschleunigt. Eine wiederverwendbare Matrix, zugleich stationäre Phase des WAVE-Systems, besteht aus nichtporösen Polystyrol-(PS-DVB) Strängen. Über das Reagenz Triethylammonium-Acetat (TEAA) werden hydrophobe Interaktionen zwischen der injizierten DNA-Probe und der Säulenmatrix hergestellt. Als mobile Phase dient eine Kombination von Puffern, die die DNA ausspült. Eine 0,1M TEAA-Lösung, die mit 25 % Acetonitril versetzt ist, wird benötigt, um die Interaktionen zu unterbrechen und die DNA von der Säule zu eluieren. Erhöht man die Konzentration von Acetonitril in der Säule, wird das TEAA von der Matrix gelöst und die DNA ausgewaschen. Aufgrund des Effektes, dass Doppelstrang-(ds)DNA fester mit der Matrix verknüpft ist als Einzelstrang-(ss)DNA, wird bei einer Konzentrationserhöhung von Acetonitril nur die Elution der ssDNA gefördert.

Zunächst wurde ein PCR-Produkt nach folgendem Protokoll hergestellt.

PCR-Ansatz:

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
steriles dH ₂ O		7,3 µl	
Optimerase-Puffer	1,5 mM	2,0 µl	1x
dNTP-Mix	1 mM	4,0 µl	4 nmol
<i>Primer +</i>	10 µM	0,8 µl	8 pmol
<i>Primer -</i>	10 µM	0,8 µl	8 pmol
<i>Template</i>	5 - 10 ng/µl	5,0 µl	25 - 50 ng
<i>Taq</i>	5 U/µl	0,1 µl	0,5 U
		Σ 50,0 µl	

Um ein Gemisch aus *Hetero-* und *Homoduplex*-DNA (Abb. 2.1.) zu erhalten, wurde das PCR-Produkt, welches bei heterozygoter Mutation ein gleiches Verhältnis von Wildtyp und mutierter DNA aufweist, bei 95°C denaturiert. Anschließend erfolgte ein graduelles *Reannealing* von 94° C zu 10° C über einen längeren Zeitraum. In der Abbildung erkennt man, dass die *Heteroduplex*-DNA an einer Stelle ungepaart ist, hier kann die Denaturierung ansetzen und in der Folge ssDNA entstehen.

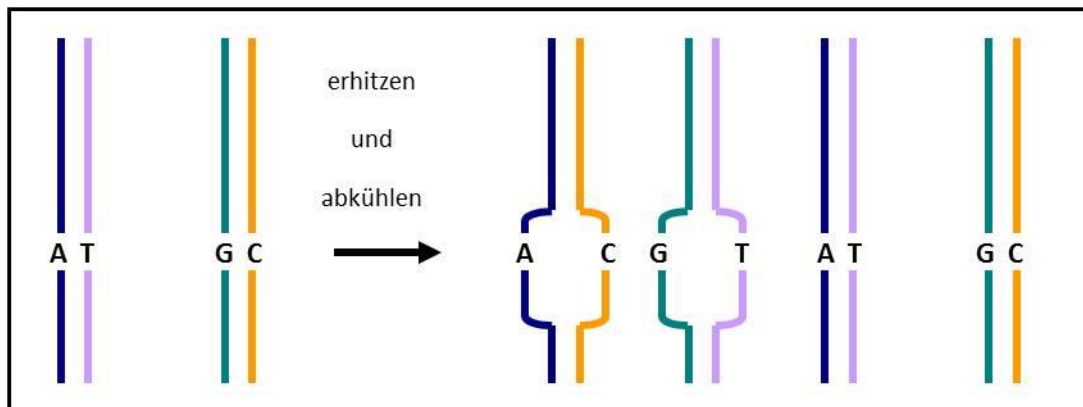


Abbildung 2.1.: Nach Hybridisierung entsteht *Hetero-* und *Homoduplex*-DNA.

Bei einer heterozygoten Mutation (hier A>G) bilden sich Fehlbasenpaarungen aus. Diese führen zur Bildung von *Heteroduplex*-DNA, nachdem die DNA denaturiert und anschließend abgekühlt wird.

Die Detektion von Mutationen durch DHPLC Analyse nutzt die unterschiedlichen Retentionen der *dsHomo-* und *Heteroduplexe* unter den Bedingungen der partiellen thermischen Denaturierung, d. h. es können beide DNA-Typen voneinander getrennt sichtbar gemacht werden. Dabei spielen die Säulentemperatur während der DNA-Denaturierung und die Konzentration von Acetonitril eine wichtige Rolle.

Um eine Mutation zu detektieren, wurde eine Temperatur eingesetzt, bei der die DNA gerade zu schmelzen begann. Diese Temperatur war abhängig vom GC- bzw. AT-Anteil der DNA, daher gab

es für jedes Exon Messungen bei mehreren verschiedenen Temperaturen. Mit der Messung bei verschiedenen Temperaturen wurde versucht, eine gute Auflösung zu erreichen. Zunächst kam es zur Denaturierung der DNA mit einer Fehlpasenpaarung (*Heteroduplex*-DNA), während die Konzentration von Acetonitril erhöht wurde. Nach einer gewissen Zeit war die DNA um ca. 20 - 40 Nukleotide um diese Fehlpaarung herum aufgeschmolzen und wurde mit dem Acetonitril aus der Säule herausgespült. Daraufhin konnte die herausgespülte DNA wie auf der folgenden Abbildung bei 254 nm im Spektrometer detektiert werden:

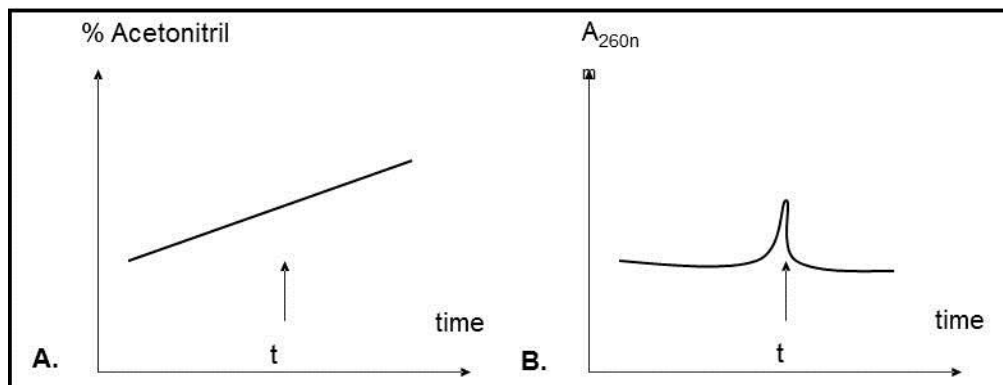


Abbildung 2.2: Spektrometrische Messung am WAVE-System

A) Die Konzentration von Acetonitril wird während der Messung am WAVE-System erhöht. B) Die aufgeschmolzene DNA kann dann mit dem Acetonitril herausgespült werden und bei 254 nm mit dem Spektrometer detektiert werden.

Die Denaturierung der *Homoduplex*-DNA erfolgt später als die Denaturierung der *Heteroduplex*-DNA. Daher werden die unterschiedlichen DNA-Formationen zeitversetzt herausgespült und gemessen. Es wird ein spezielles Bandenmuster abgebildet, welches bei idealer Temperatur aus je zwei Peaks für die *Heteroduplices* und *Homoduplices* besteht, da sich vier unterschiedliche Basenpaarungen ausbilden können und bei vier unterschiedlichen Schmelztemperaturen gemessen werden können (Abb. 2.3.).

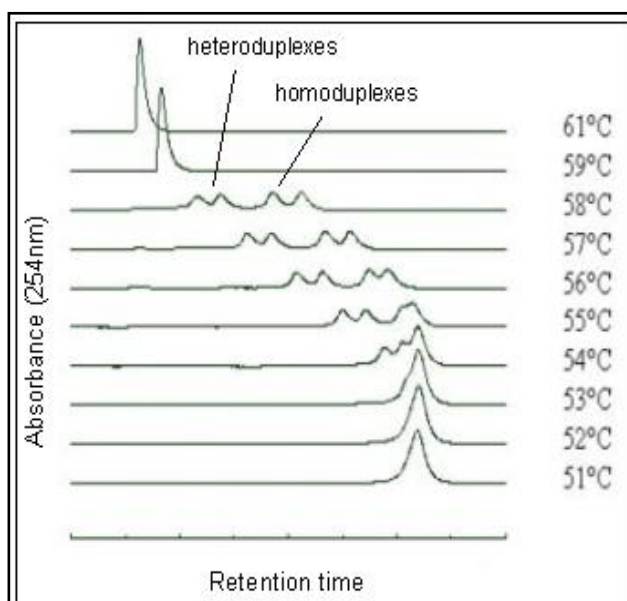


Abbildung 2.3.: Analysetemperaturen von *Hetero*- und *Homoduplex*-DNA

Die Peaks von *Hetero*- und *Homoduplex*-DNA können entsprechend ihrer Retentionszeit temperaturabhängig gemessen werden. *Heteroduplex*-DNA wird schneller denaturiert und daher eher detektiert als *Homoduplex*-DNA.

Um homozygote Mutationen zu detektieren, wurden DNA und Wildtyp im Verhältnis 1:1 gemischt, so dass durch Denaturierung und Renaturierung ebenfalls *Hetero-* und *Homoduplex-*DNA entstanden sind. In den Fällen, in denen die DNA nicht mutiert war, konnte sich nur eine DNA-Formation ausbilden und somit war auch nur ein *Peak* zu messen.

2.2.8. PCR-Verdau mit Restriktionsenzymen

Mit dieser Methode wurde versucht, zwei funktionelle Polymorphismen im Promotor des *Parkin*-Gens nachzuweisen. Es handelt sich um die von West *et al.* (2002a) beschriebenen Polymorphismen -258 T/G und -227 A/G, welche einen Einfluss auf die Genexpression, wie in Zellkulturexperimenten gezeigt (West *et al.*, 2002b), haben sollen.

Die Methode brachte kein zufrieden stellendes Ergebnis, da sich die Banden nicht eindeutig einem Wildtyp, einem hetero- oder homozygoten Polymorphismus zuordnen ließen.

Anschließend wurde versucht eine bessere Bandenauflösung auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel zu erreichen. Dazu wurde der gleiche Verdau mit 7 µl auf das Gel aufgebracht und befand sich für 14 h bei 7 Watt in der Elektrophorese. Das Resultat nach Silberfärbung war ebenfalls sehr schlecht auszuwerten und nicht reproduzierbar.

Vorgehen:

- PCR bei 64° C Annealing-Temperatur

PCR-Rezept:	dH ₂ O	1,4 µl
	dNTP-Mix	2,0 µl
	10xPuffer	1,0 µl
	Primer +	0,4 µl
	Primer –	0,4 µl
	<i>Taq</i>	0,05 µl
- PCR-Produkte auf 2 % Agarosegel überprüfen
- Bei ausreichendem und reinem Produkt Inkubation mit einem Restriktionsenzym (*STY I*) über Nacht bei 37° C

Verdau-Rezept:	10,0 µl PCR-Produkt
	7,0 µl dH ₂ O
	2,0 µl NE Puffer
	1,0 µl Enzym
- Auftragen des Verdaus auf 3 % Agarose und anschließende Gel-Elektrophorese
- Auswerten des Bandenmusters

2.2.9. Schmelzkurven am *LightCycler*

Mithilfe des *LightCyclers* lassen sich Schmelzkurven für PCR-Produkte erstellen. Anhand von Schmelztemperaturen (T_m -Werte) können Rückschlüsse auf vorhandene Punktmutationen, in diesem Falle den oben erwähnten Polymorphismus, gezogen werden. Die Schmelztemperatur stellt die Temperatur dar, bei welcher ein DNA-Doppelstrang zur Hälfte aufgeschmolzen wurde. Dieser Wert ist unter anderem vom GC-Anteil der Nukleinsäuren, vom Grad der Homologie zwischen den Nukleinsäuresträngen und von der Ionenstärke des Lösungsmittels direkt abhängig.

Vorgehen:

- PCR bei 58° C *Annealing*-Temperatur

PCR-Rezept:	dH ₂ O	1,4 µl
	dNTP-Mix	2,0 µl
	10xPuffer	1,0 µl
	<i>Primer</i> +	0,4 µl
	<i>Primer</i> –	0,4 µl
	<i>Taq</i>	0,05 µl
- Mischen von 9 µl PCR-Produkt und 1 µl Sonde (Sensor- und Anchor-Sonde 1:1, s. Anhang) in einer *LightCycler*-Kapillare
- Kurz zentrifugieren
- *LightCycler*-Programm:

4 x	{ 95° C	20 s	Denaturierung
	40° C	10 s	<i>Annealing</i>
	95° C	20 s	Denaturierung }
- schrittweise Erhöhung der Temperatur von 40° C auf 95° C

Nachdem mehrere verschiedene Rezepte für das Verhältnis von PCR-Produkt und Sonden getestet wurden, sind die Messungen mit neuen Sonden nach dem beschriebenen Vorgehen durchgeführt worden. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Katja Ritz fortgeführt. Die PCR-Produkte wurden in dem *LightCycler*-Programm kurz denaturiert, anschließend wurde die Temperatur unter die Anlagerungstemperatur der Sonden (40° C) gesenkt. Die Sonden konnten sich dann spezifisch an die einzelstängige DNA anlagern. Wurde der Schmelzpunkt nach schrittweiser erfolgter Temperaturerhöhung erreicht, war ein Abfallen der Fluoreszenz aufgrund der Lösung der Hybridisierung von Nukleinsäure und Sonde festzustellen. Die Fluoreszenzmessung des *LightCyclers* nach dem Prinzip des *FRET* ist unter Punkt 2.2.3.2. erläutert. Im Falle einer Punktmutation im Hybridisierungsbereich der Sonden würde der Schmelzpunkt niedriger als normal liegen. Dies erklärt sich durch die schwächere Bindung der Sonde in diesem Bereich, wodurch weniger Energie zum Ablösen der Sonde nötig ist. Die Sonden

enthielten an entsprechender Stelle die Base C, so dass im Falle des Vorhandensein eines G die Sonde stärker an die DNA gebunden wurde und deshalb eine höhere Schmelztemperatur gemessen wurde.

2.2.10. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Didesoxy- oder Kettenabbruchverfahrens (Sanger *et al.*, 1977). Diese enzymatische Methode beruht auf dem Einbau von Didesoxynukleotiden, die am C3-Atom nur ein Wasserstoff-Atom tragen. Wird durch die *Taq*-Polymerase ein Didesoxyribonukleotid-Triphosphat eingebaut, ist keine Kettenverlängerung mehr möglich, da die zur Polymerisation nötige freie 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Benutzt wurde ein vorgefertigtes System (*Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit*) der Firma *Amersham Biosciences*. Pro Sequenz wurden vier verschiedene Reaktionen (entsprechend den vier möglichen Nukleotiden) durchlaufen. In die vier Reaktionsansätze wurde zu dem Gemisch aus Desoxynukleotiden (dNTPs) jeweils eine Didesoxynukleotid-Form (ddNTPs) zugefügt. Die geleluierten PCR-Produkte (doppelsträngige DNA) wurden denaturiert und danach konnte der sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte *Primer* binden. Durch die Aktivität der DNA-Polymerase wurde der Einzelstrang entsprechend der komplementären Basen aufgefüllt, bis zufällig ein komplementäres ddNTP anstatt des dNTPs eingebaut wurde. Damit wurde ein Kettenabbruch verursacht. Bei der nachfolgenden elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente ihrer Größe nach in dem denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgte eine Detektion über Laser. Das Plattensequenziergerät, dass verwendet wurde (LI-COR Long Read IR2-DNA-Sequenzierer), kann mit Hilfe von zwei Infrarotlasern bei 700 und 800 nm simultan Informationen aufnehmen (Duolaser). Dadurch war es möglich, die Sequenzierung des Vorwärts- und Rückwärts-Stranges gleichzeitig mit unterschiedlich markierten *Primern* in einem Ansatz durchzuführen, um detektierte Mutationen auf der Sequenz des Gegenstranges zu bestätigen.

Vorgehen bei der Sequenzierreaktion:

- Ansatz Mastermix:

DNA	2-10 µl
M13F- <i>Primer</i> , IRD700-markiert, 2 µM	1,5 µl
M13R- <i>Primer</i> , 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*) pro Probe
- 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*)

3. Ergebnisse

- (1) Für das *Parkin*-Gen wurde eine Methode zur Detektion von Einzelbasen-Substitutionen, kleinen Insertionen und Deletionen an dem WAVE-System (Transgenomics) etabliert. Weiterhin wurde in einer großen PS-Patientengruppe und einer dazu passenden Kontrollgruppe die Untersuchung des *Core*-Promotors des *Parkin*-Gens am *LightCycler* optimiert (3.1.). Es wurden drei verschiedene Patientenkollektive auf Mutationen im *Parkin*-Gen getestet, wobei zwei Gruppen mittels konventioneller Mutationsanalyse (SSCP-Analyse und Sequenzierungen) und eine Kontrollgruppe im Rahmen eines Pilotprojekts per *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (dHPLC) am WAVE-System (Transgenomics) untersucht wurden (3.2.).
- (2) Das zweite Gen (*DJ-1*-Gen) wurde mit seinen sechs kodierenden Exons (Exon 2, 3, 4, 5, 6, 7) mittels quantitativer PCR am *LightCycler* auf größere Exon-Deletionen oder -Duplikationen getestet. Es wurden insgesamt 66 Patienten untersucht (3.3.).
- (3) Das dritte der untersuchten Gene, das *NR4A2*-Gen, wurde auf Mutationen bei Patienten mit positiver Familienanamnese für ein PS mittels Sequenzierung des ersten Exons untersucht (3.5.).

3.1. Etablierung und Optimierung von Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde neben den konventionellen qualitativen Methoden zur Detektion von Mutationen, zu denen die *Single-Strand Conformation Polymorphism* (SSCP)-Analyse und die Sequenzierung gehört, eine neue Methode mit hoher Sensitivität und hoher Zuverlässigkeit zur Detektion von Mutationen sowie Einzel-Nukleotid-Polymorphismen angewandt (Marsh *et al.*, 2001). Es handelt sich um die denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC)-Analyse, die am WAVE-System (Transgenomics) zur Untersuchung des *Parkin*-Gens etabliert wurde.

3.1.1. Etablierung der dHPLC-Methode am WAVE-System

DNA-Veränderungen in Form von Einzelbasen-Substitutionen, kleinen Deletionen oder Insertionen können mit konventionellen Methoden (SSCP-Analyse) dargestellt werden, welche jedoch zeitaufwendig und anfällig für äußere Einflüsse (wie Temperatur, Druck, Lichteinfall) sind. Um ein möglichst effizientes und sensitives Mutations-Screening durchführen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Laufbedingungen für *Parkin*-Gen-Messungen mittels *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (dHPLC) am WAVE-System (Transgenomics) etabliert. Dazu wurde für jedes einzelne Exon des *Parkin*-Gens eine Methode mit optimaler

Schmelztemperatur (T_m -Wert), abhängig von der Größe und der Sequenz der DNA-Fragmente, für die Messung am WAVE-System entwickelt.

Zunächst einmal mussten einige Kriterien zur Herstellung geeigneter DNA-Amplicons, die möglichst frei von Polymerase-induzierten Fehlern und Nebenprodukten sein sollten, beachtet werden. Das Amplicon-Design konnte bei bekannter Sequenz der *Parkin*-Exons mithilfe der WAVEMAKERTM-Software (Transgenomic) durchgeführt werden.

Um eine optimale Analyse am WAVE-System durchführen zu können, sollten die Amplicons nicht viel größer als 700 bp sein und möglichst wenige Schmelzbereiche aufweisen, die vollständig aufschmelzen. Bei größeren Fragmenten mit verschiedenen Schmelzbereichen musste daher die Messung bei mehreren Temperaturen durchgeführt werden, um eine sichere Detektion entlang des gesamten Fragments zu gewähren. Wenn die Schmelzbereiche in einem Fragment mehr als 5° C voneinander entfernt waren, musste dieses Fragment mit kleineren Amplicons neu entworfen werden.

Nachdem die Zielsequenz für das Amplicon feststand, konnten geeignete *Primer* für die PCR ausgewählt werden. Die *Primer* sollten nicht näher als 30 - 50 bp vom Ende der Sequenz ansetzen, sollten ungefähr 18 - 30 bp lang sein und etwa 45 - 60 % Guanin- und Cytosinbasen enthalten. Innerhalb eines *Primer*-Paares sollte die Differenz der Schmelztemperaturen (T_m) 2° C nicht überschreiten. Bei den *Primern* war darauf zu achten, dass sie untereinander und zu sich selbst nicht komplementär waren. Für die Exons 3, 6, 8 und 10 des *Parkin*-Gens wurden neue *Primer* entworfen, die übrigen Exons wurden mit den bisher für die SSCP-Analyse verwendeten *Primern* amplifiziert.

Bei bekannter Schmelztemperatur (T_m) der *Primer* konnten die *Annealing*-Temperaturen für die einzelnen Exons kalkuliert werden. Die *Annealing*-Temperaturen der PCR für WAVE-Messungen und SSCP-Analyse unterschieden sich bei den meisten Exons des *Parkin*-Gens aufgrund des veränderten PCR-Ansatzes (s. Anhang). Die Exons 3, 5, 6, 9 und 12 hatten eine *Annealing*-Temperatur von 61° C; bei Exon 2 und 11 fand die Anlagerung bei 65° C statt und im Exon 4, 7 und 10 bei 59° C. Die *Annealing*-Temperatur von 55° C für das Exon 8 entsprach der Temperatur bisheriger PCR-Experimente für die SSCP-Analyse.

Um die Qualität der Auftrennung der DNA-Produkte im relevanten Bereich für die Mutationsanalyse beurteilen zu können, wurden vor jeder Messung von DNA-Proben Standards gemessen. Der WAVE-Low-Range-Standard enthielt ein Gemisch von *Heteroduplex*-DNA und *Homoduplex*-DNA; die optimale Auftrennung dieser Fragmente lag bei 56° C (T_m) (s. Abb. 2.3.). Für den Bereich bis 75° C wurde der WAVE-High-Range-Standard verwendet, bei dem die optimale Auftrennung der *Duplex*-Formationen bei 72° C (T_m) lag.

Alle Messungen des *Parkin*-Gens am WAVE-System lagen in dem Bereich zwischen 54,6° C und 68° C Schmelztemperatur (T_m). Um Mutationen in den einzelnen Exons sicher zu detektieren und keine Schmelzbereiche zu übergehen, wurde bei mehreren Temperaturen gemessen. Im Laufe der Messungen stellten sich die relevanten Schmelzbereiche anhand von bekannten Mutationen und

Polymorphismen (Positiv-Kontrollen) heraus. Auf der folgenden Abbildung ist solch ein Schmelzbereich mit Messkurven exemplarisch für das Exon 11 des *Parkin*-Gens gezeigt.

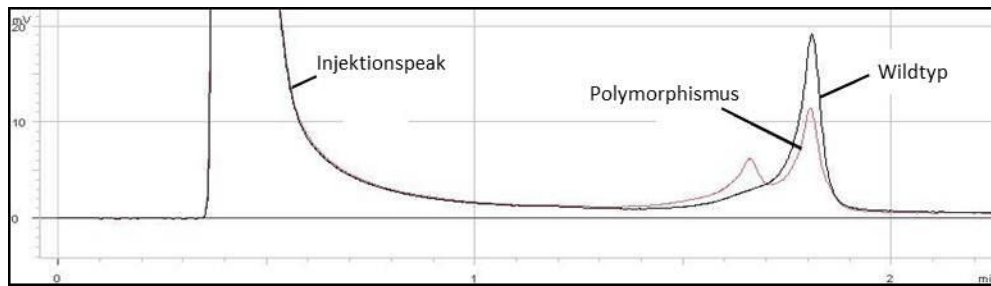


Abbildung 3.1.: Chromatogramm eines Polymorphismus im *Parkin*-Exon 11 am WAVE-System
Anhand der unterschiedlichen Kurven kann man Wildtyp und Polymorphismus (1281G/A) unterscheiden. Der Polymorphismus (*Heteroduplex*-DNA) weist zwei *Peaks* auf, da mutierte DNA und Wildtyp-DNA zeitversetzt detektiert werden. Es handelt sich um PCR-Produkte des Exon 11 des *Parkin*-Gens, gemessen bei 62° C (T_m).

Bei der Messung des Exon 11 wurden vier unterschiedliche Temperaturen gewählt (56,8° C, 58° C, 60° C und 62° C). Mit den Messkurven für die ersten beiden Temperaturen konnte der Polymorphismus nicht sicher von den Kurven für den Wildtyp unterschieden werden, jedoch stellte er sich bei 60 und 62° C eindeutig dar. In Zukunft können Messungen zum *Screening* dieses Exons kosten- und zeitsparend bei einer dieser Schmelztemperaturen durchgeführt werden.

Für jedes Exon wurden die durch SSCP-Analyse und Sequenzierung ermittelten Positiv-Kontrollen und Polymorphismen amplifiziert und am WAVE-System gemessen, um einerseits die Methode zu überprüfen und andererseits Kontrollen und DNA-Proben der Patienten vergleichen zu können. Nur im Falle der eindeutigen Darstellung der Mutation einer Positivkontrolle oder des bekannten Polymorphismus wurden die Kurven der Patienten als unauffällig beurteilt oder bei Auffälligkeit weiterhin durch Sequenzierung untersucht.

In der folgenden Tabelle sind für jedes Exon des *Parkin*-Gens die Temperaturbereiche angegeben, in denen sich Positivkontrollen und Polymorphismen als auffällig (s. Abb. 3.1.) darstellten, wobei in jedem Fall bei zwei bis sechs Temperaturen gemessen wurde, um jeden Schmelzbereich sicher zu detektieren. Anhand dieser ermittelten Schmelztemperaturen können für jedes *Parkin*-Exon ein oder zwei Temperaturen aus dem jeweiligen Bereich für weitere Messungen am WAVE-System ausgewählt werden.

Tabelle 3.1.: Schmelztemperaturen der *Parkin*-Exons am WAVE-System

Bei den aufgeführten Temperaturen konnte ein abweichendes Kurvenmuster für Positivkontrollen und Polymorphismen detektiert werden. Diese Temperaturen entsprechen den Schmelztemperaturen, die zur Auftrennung in *Homo*- und *Heteroduplex*-DNA notwendig sind.

<i>Parkin</i> -Exon	Schmelztemperaturen zur Detektion von Sequenzabweichungen
1	
2	61,5° C - 64° C
3	55,5° C - 63° C
4	56,2° C - 63,2° C
5	54,6° C - 58,5° C
6	56,5° C - 59,7
7	60,1° C - 61,6° C
8	58,4° C - 59,2° C
9	58,4° C - 65,7° C
10	59,9° C - 60,6° C
11	60° C - 62° C
12	66° C - 68° C

3.1.2. Optimierung der Analyse von Polymorphismen im *Core*-Promotor des *Parkin*-Gens

Bei Untersuchungen des *Parkin*-Promotors konnten neun Polymorphismen identifiziert werden. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass zwei dieser Promotor-Polymorphismen [-258T/G und -227A/G] Einfluss auf die Genexpression haben (West *et al.*, 2002). Für die Häufigkeit des Polymorphismus [-258T/G] wurden signifikante Unterschiede bei PS-Patienten und Kontrollen entdeckt, daher wurde dieser Polymorphismus mit der Pathogenese des PS in Verbindung gebracht (West *et al.*, 2002). Um die Rolle dieses Polymorphismus zu verstehen und seine Frequenz bei europäischen Patienten und Kontrollen zu bestimmen, wurde der *Core*-Promotor des *Parkin*-Gens für die vorliegende Arbeit bei 116 Parkinson-Patienten und 128 Kontrollen untersucht.

3.1.2.1. Verdau mit Restriktionsenzymen

Per Gelelektrophorese der über Nacht mit Enzym inkubierten PCR-Produkte konnten die Bandenmuster für das [-258G/G]-Allel (homozygoter Polymorphismus), das [-258T/G]- Allel (heterozygoter Polymorphismus) und das [-258T/T]-Allel (Wildtyp) nicht ausreichend voneinander unterschieden werden. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

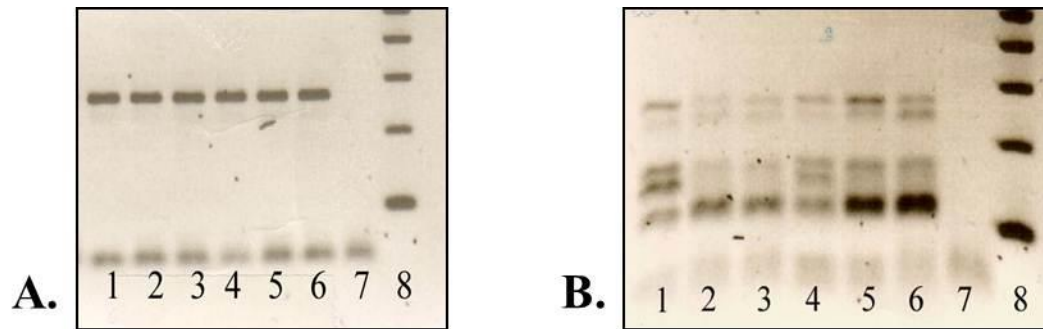


Abbildung 3.2.: Agarosegele mit unverdauten und verdauten PCR-Produkten

A) Agarosegel mit PCR-Produkten vor Verdau mit Enzymen. In Kammer 1-6 wurde Patienten-DNA aufgetragen, in Kammer 7 H₂O und in Kammer 8 die 100bp-Leiter. B) Nach dem Enzym-Verdau ließen sich drei unterschiedliche Bandenmuster voneinander abgrenzen und jeweils einer Allelvariante zuordnen. Jedoch waren die Ergebnisse nach Sequenzierung nicht in allen Fällen reproduzierbar.

Um eine bessere Auftrennung der Banden zu erreichen, wurden die mit Enzym inkubierten PCR-Produkte auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei wurden jedoch nach mehrmaliger Modifizierung der Methode schlechtere Ergebnisse als bei der Elektrophorese des Agarosegels erzielt.

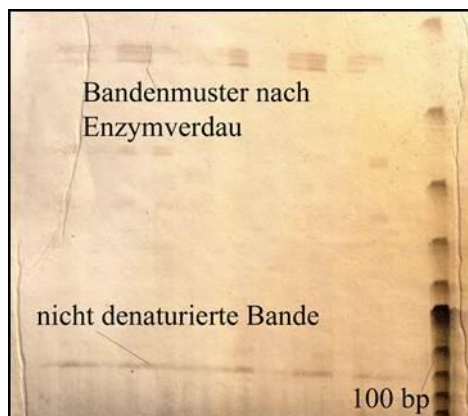


Abbildung 3.3.: SSCP-Gel mit verdauten PCR-Produkten

SSCP-Gel nach 6-stündiger Gelelektrophorese der mit Restriktionsenzymen inkubierten PCR-Produkte. Die Qualität der Bandenauflösung konnte durch weitere Experimente mit Veränderungen der Laufbedingungen nicht verbessert werden.

3.1.2.2. Sequenzierung des *Core*-Promotors

Durch Sequenzierung der PCR-Produkte, die auf dem Agarosegel ein unterschiedliches Muster zeigten, konnten die drei unterschiedlichen Allelvarianten (-258G/G, -258T/T und -258G/T) dargestellt werden. Um die insgesamt 244 Probanden zügig auf die Polymorphismen zu testen, wurden daraufhin Messungen am *LightCycler* durchgeführt.

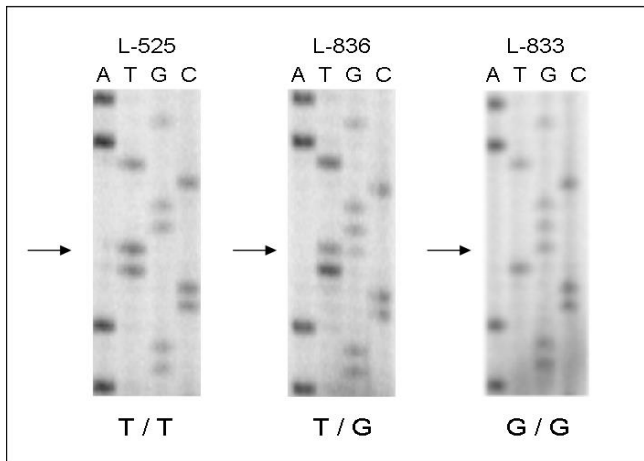


Abbildung 3.4.: Sequenzausschnitt des *Parkin*-Gen-Promotors

Durch Sequenzierung wurden die möglichen DNA-Varianten exemplarisch für 3 Individuen (kodiert durch L-Nummern) dargestellt. Der Patient L-836 ist Träger des Polymorphismus [-258 T/G]. Die Sequenz wird von oben nach unten (5'→3' Richtung) abgelesen, die polymorphe Stelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.1.2.3. Schmelzkurven am *LightCycler*

Mit der unter 2.2.9. aufgeführten Methode ließ sich der von West *et al.* beschriebene Polymorphismus [-258T/G] sowie die zwei anderen möglichen Allele anhand von drei unterschiedlich Mustern der Schmelzkurven detektieren.

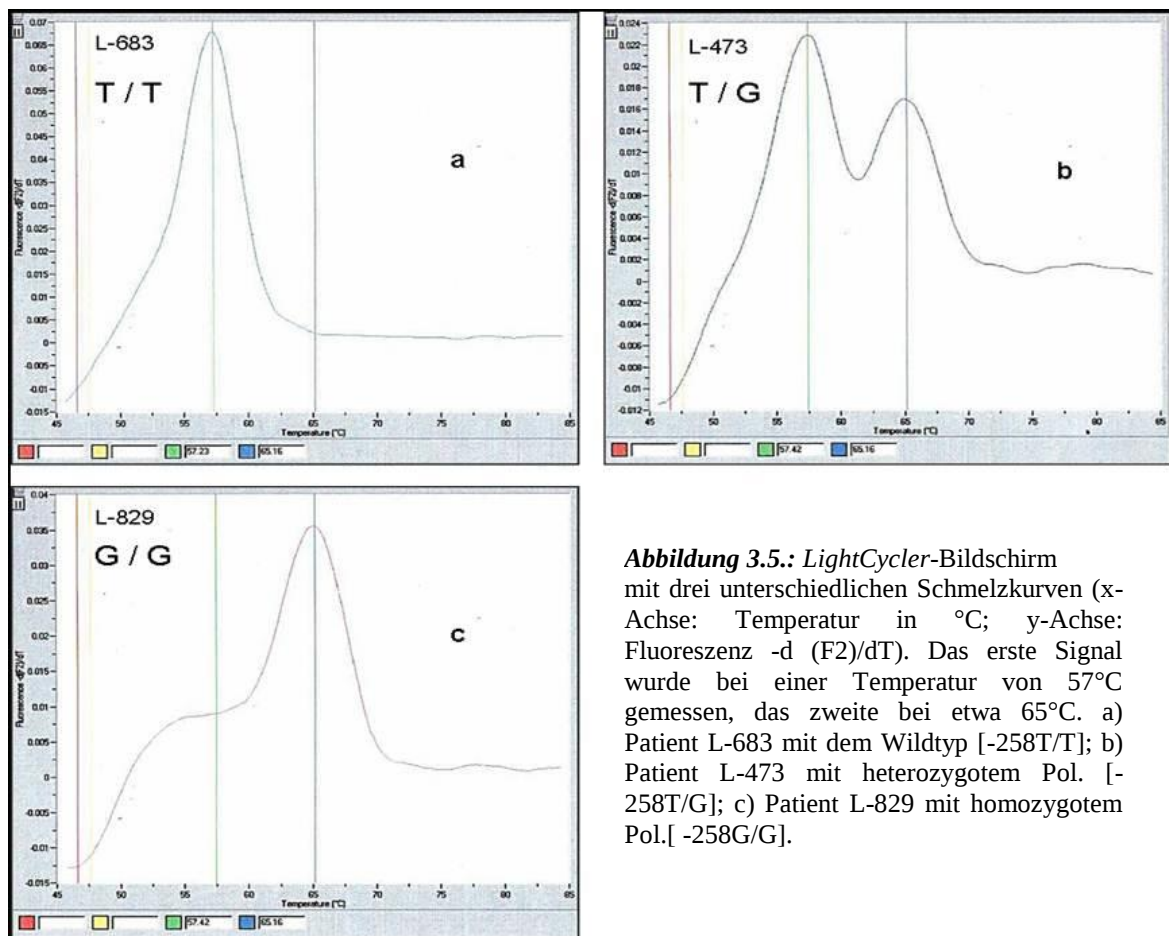


Abbildung 3.5.: *LightCycler*-Bildschirm mit drei unterschiedlichen Schmelzkurven (x-Achse: Temperatur in °C; y-Achse: Fluoreszenz -d (F2)/dT). Das erste Signal wurde bei einer Temperatur von 57°C gemessen, das zweite bei etwa 65°C. a) Patient L-683 mit dem Wildtyp [-258T/T]; b) Patient L-473 mit heterozygotem Pol. [-258T/G]; c) Patient L-829 mit homozygotem Pol. [-258G/G].

Die Schmelztemperatur (T_m) des nicht mutierten T-Allels lag bei 57° C, hier wurde ein Fluoreszenzsignal für die DNA von Patienten mit dem Wildtyp erwartet. Das zweite Fluoreszenzsignal lag ca. 8° C höher, bei einer Temperatur von 65° C, da die verwendete Sonde stärker an das mutierte G an Position 258 gebunden hatte. Bei der zweiten Schmelztemperatur wurden daher die Patienten mit mutiertem G-Allel detektiert. Im Falle eines Signals bei 57° C und eines Signals bei 65° C (s. Abbildung 3.5.) handelte es sich um den heterozygoten Polymorphismus -258T/G. Mit dieser Methode konnten alle drei Allelvarianten sicher und zügig detektiert werden und die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigt werden. Die Schmelzkurven-Untersuchungen am *LightCycler* wurden im Rahmen einer anderen Arbeit fortgeführt, nachdem durch eigene Experimente PCR- und Messbedingungen erarbeitet wurden.

3.2. Mutations-Screening des *Parkin*-Gens

Es wurden bei insgesamt 148 PS-Patienten und 20 Kontrollen die zwölf Exons des *Parkin*-Gens auf Mutationen untersucht. Die Untersuchung des *Parkin*-Gens erfolgte einerseits mit konventionellen Methoden wie SSCP-Analysen und Sequenzierungen, andererseits mit *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (dHPLC) am WAVE-System und mit quantitativen Messungen zur Gendosisbestimmung am *LightCycler*. Weiterhin wurde der Core-Promotor des *Parkin*-Gens bei einer Gruppe von 116 Parkinson-Patienten und 128 Kontrollen mit Schmelzkurven-Messungen am *LightCycler* auf das Vorhandensein von Polymorphismen untersucht.

3.2.1. *Parkin*-Screen von Patienten mit PS frühen Beginns

Die Stichprobe setzt sich aus 87 PS-Patienten mit einem frühen Erkrankungsbeginn (EOPD), darunter 24 Patienten mit THS, zusammen. Der Anteil der Männer betrug in dieser Gruppe 53 % (46/87) und die Frauen machten 45 % (39/87) der Stichprobe aus. Bei zwei Patienten war das Geschlecht nicht bekannt. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 39,5 +/- 7,3 Jahren. Eine positive Familienanamnese konnte nur bei zwei Patienten festgestellt werden. Die Tabelle 7.1. im Anhang fasst die klinischen Daten zusammen.

3.2.1.1. SSCP-Analyse und Sequenzierung

Das *Screening* von Einzelbasen-Substitutionen, kleinen Insertionen und Deletionen wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe von SSCP-Untersuchungen der zwölf *Parkin*-Exons durchgeführt. Neun THS-Patienten wurden mit Hilfe des WAVE-Systems untersucht (Bachelor-Arbeit P. Seibler). Bei Vorhandensein auffälliger Ergebnisse schloss sich die Sequenzierung des jeweiligen Bereiches an. Die SSCP- und WAVE-Untersuchung sowie Sequenzierungen erbrachten folgende Ergebnisse:

In den zwölf Exons des *Parkin*-Gens wurden mit den Methoden zur Detektion qualitativer Gen-Veränderungen sechs verschiedene Mutationen bei sechs Patienten identifiziert.

Bei Patientin L-1522 konnte im Exon 7 eine Punktmutation detektiert werden. Die Mutation zeigte sich in einem abweichenden Kurvenmuster per dHPLC am WAVE-System (Abb. 3.6.). In der Sequenzierung konnte an Position 867 eine heterozygote Transition von Thymin nach Cytosin (867C/T) ausfindig gemacht werden.

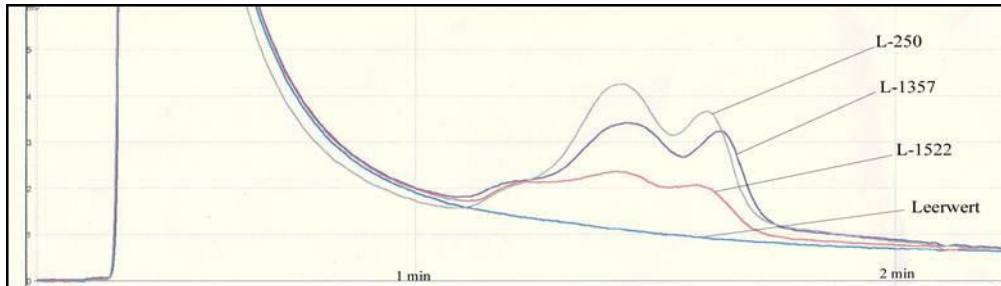


Abbildung 3.6.: Auszug eines Chromatogramms nach Messung am WAVE-System
Detektion einer Mutation im Exon 7 [het. 867C>T] bei der Probe L-1522. Im Vergleich dazu das Kurvenmuster zweier Patienten-Proben (L-250 und L-1357) ohne Mutation. Bei den Messungen im Exon 7 wurden 5 verschiedene Temperaturen getestet (56,8° C, 59,1° C, 60,1° C, 61,6° C, 63° C). Die Mutation war am deutlichsten bei 61,6° C (s. dieser Auszug) zu erkennen.

Die Punktmutation [924C>T] fand sich bei zwei Patienten (AE34, T2). Es wurden vier kleine Deletionen detektiert. Die Mutation [256delA] wurde einmal nachgewiesen (MIN4827). Zusätzlich wurde bei diesem Patienten (MIN4827) im Exon 3 die Mutation [438-77del] identifiziert. Patient AE 142 wies die Mutation [501-3delCCA] im Exon 3 auf. Im Exon 9 konnte die Mutation [1142-3del] bei Patient T1 gefunden werden. Die detektierten Sequenzveränderungen sind in Tabelle 3.2.a zusammengefasst.

Im Intron 2 konnte der in der Abbildung 3.7. dargestellte Polymorphismus [IVS2+25T/C] nachgewiesen werden (L-210, L-262, L-424, L-1163, L-1296, L-1297, L-1356). Bei der Probe L-1385 fand sich an Position 35 im Intron 2 eine Transition von Adenin nach Guanin, welche dem Polymorphismus [IVS2+35A/G] entspricht. Bei der Probe L-853 wurde der intronische Polymorphismus [IVS3-20A/G] detektiert. Der Polymorphismus [601G/A] des *Parkin*-Exons 4 fand sich bei einem Patienten (L-1120). Eine Bandenverschiebung im Sinne des Polymorphismus [1239G/C] des Exon 10 wurde bei sechs Parkinson-Patienten mit frühem Beginn detektiert (L-319, L-425, L-1356, L-1369, 9158, 9170).

Die Untersuchung von neun THS-Patienten am WAVE-System ergab folgende Ergebnisse:

Es wurden drei bekannte Polymorphismen in Introns entdeckt. Bei drei Patienten (L-250, L-1522, L-1529) wurde der Polymorphismus [IVS2+25T/C] und bei fünf Patienten (L-1357, L-1517, L-1521, L-1522, L-1549) der im Intron 7 befindliche Polymorphismus [IVS7-35A/G] nachgewiesen. Der Polymorphismus [1239G/C] des *Parkin*-Exons 4 fand sich bei der Probe L-1549.

Tabelle 3.2.b fasst alle detektierten Polymorphismen zusammen.



Abbildung 3.7.: SSCP-Gel und Sequenzausschnitt eines Polymorphismus im *Parkin*-Exon 2

A) SSCP-Gel des Exon 2 mit dem Bandenmuster eines Polymorphismus bei L-262, L-424 und L-1163. B) Die Sequenzierung der Probe L-1163 zeigt den intronischen Polymorphismus [IVS2+25T/C] mit einer heterozygoten Transition von Thymin nach Cytosin (Pfeilmarkierung).

Tabelle 3.2.: Auflistung der im *Parkin*-Gen detektierten Sequenzabweichungen in Form von a) Mutationen und b) Polymorphismen sowie deren Auswirkung aufs Protein (Aminosäurenaustausch) und die Anzahl der Betroffenen EOPD-Patienten.

a)

Lokalisation	Sequenzabweichung (DNA-Ebene)	AS-Austausch (Proteinebene)	Anzahl der Betroffenen (Labornummer)
Exon 2	256delA	Asn52/Stop80	1 (MIN4827)
Exon 3	438-77del	Leu112/Stop163	1 (MIN4827)
Exon 3	501-3delCCA	unbekannt	1 (AE142)
Exon 7	867C>T	Arg256Lys	1 (L1522)
Exon 7	924C>T	Arg275Trp	2 (AE34, T2)
Exon 9	1142-1143delGA	Gln357/Stop368	1 (T1)

b)

Lokalisation	Sequenzabweichung (DNA-Ebene)	AS-Austausch (Proteinebene)	Anzahl der Betroffenen
Intron 2	IVS2+25T/C	keiner	10
Intron 2	IVS2+35A/G	keiner	1
Intron 3	IVS3-20A/G	keiner	1
Exon 4	601G/A	Ser167→Asn	2
Intron 7	IVS7-35A/G	keiner	5
Exon 10	1239G/C	Val380→Leu	6

3.2.1.2. Gendosis-Untersuchungen

Es wurden sieben verschiedene Exon-Deletionen bei sechs verschiedenen Patienten identifiziert, die in nachstehender Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 3.3.: Detektierte Exon-Deletionen des *Parkin*-Gens bei Patienten mit EOPD

Lokalisation	Mutation	Anzahl der Betroffenen (Labornummer)
Exon 3	Deletion	2 (T1, K1)
Exon 4	Deletion	1 (L-1605)
Exon 5	Deletion	1 (T2)
Exon 7-9	Deletion	1 (L-1523)
Exon 9	Deletion	1 (L-1606)
Exon 10	Deletion	1 (K1)
Exon 11	Deletion	1 (L-1605)

Bei einer Patientin (L-1523) fanden sich im Bereich von drei Exons des *Parkin*-Gens Abweichungen in der Gendosis. Es handelte sich um die Exons 7, 8 und 9, welche jeweils homozygot deletiert waren (hom.Ex7-9del). In den Messungen am *LightCycler* konnte im F2-Kanal (detektiert Menge an *Parkin*-Produkt) kein Fluoreszenzsignal gemessen werden, da die Anzahl der *Parkin*-Gen-Allele null betrug. Im F3-Kanal wurden Kurven für die Menge an amplifiziertem β -Globin-Produkt abgebildet, da die zwei Allele des β -Globin-Gens vorhanden waren. Daher ergaben sich für alle drei Exons (Exon 7, 8, 9) Messwerte von null für das Verhältnis von amplifizierter *Parkin*- und β -Globin-Menge. Bei den übrigen Patienten konnten keine Abweichungen in der *Parkin*-Gendosis festgestellt werden (Abb. 3.8). Es ergaben sich Werte zwischen 0,8 und 1,2 in jedem der zwölf Exons, das bedeutet, dass jeweils zwei Allele des *Parkin*- und β -Globin-Gens vorhanden waren (Tab. 3.4.).

Tabelle 3.4.: Allelanzahl bei Deletionen und Duplikationen und deren Quotient (Messwert)

	Normalfall	Homozygote Deletion	Heterozygote Deletion	Heterozygote Duplikation	Homozygote Duplikation
Allelanzahl des Ziel-Gens	2	0	1	3	4
Allelanzahl des Referenz-Gens	2	2	2	2	2
Messwert	0,8 – 1,2	0,0	0,4 – 0,6	1,3 – 1,7	1,8-2,2

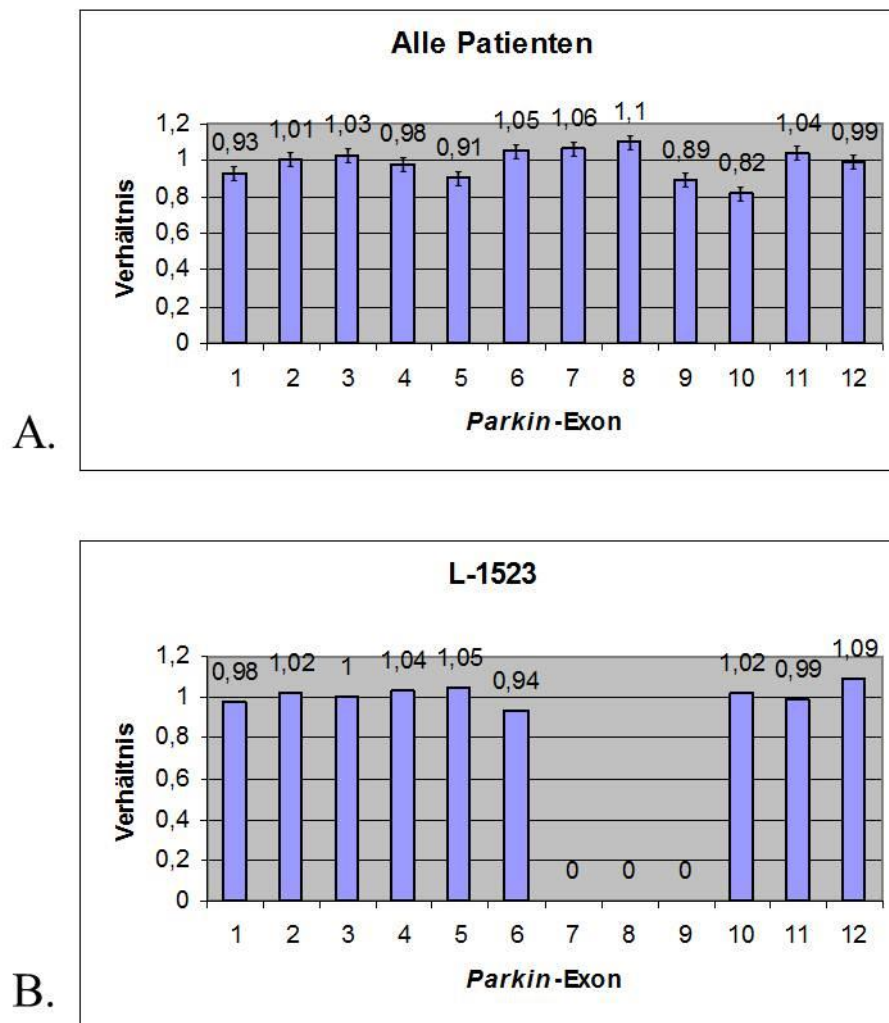


Abbildung 3.8.: Ergebnisse der Gendosis-Untersuchungen mittels *LightCycler*.

A) Angegeben sind die Mittelwerte des Verhältnisses β -Globin zu *Parkin* für jedes *Parkin*-Exon. Bei allen Patienten wurden nur Messwerte zwischen 0,8 und 1,2 zur Auswertung herangezogen. Die Standardabweichungen sind durch die Fehlerstriche gekennzeichnet. B) *Parkin*/ β -Globin-Verhältnisse jedes der zwölf Exons für die Patientin L-1523 mit einer homozygoten Deletion der Exons 7, 8 und 9 des *Parkin*-Gens.

3.2.1.3. Zusammenfassung der Mutationsanalyse der Gruppe mit PS frühen Beginns

Insgesamt wurde bei elf von 87 Patienten eine Mutation entdeckt (12,6 %). Es kamen dreizehn verschiedene Mutationen vor, dabei handelte es sich um sechs Punktmutationen und kleine Deletionen (46 %) und sieben Gendosis-Veränderungen in Form von Exon-Deletionen (54 %). Betrachtet man die Untergruppe der Patienten mit THS gesondert, ergibt sich eine Mutationshäufigkeit von 8,3 % (2/24), wobei eine Punktmutation und eine Exon-Deletion vorkamen. Die untenstehende Abbildung (Abb. 3.9.) illustriert alle detektierten Mutationen dieser Gruppe.

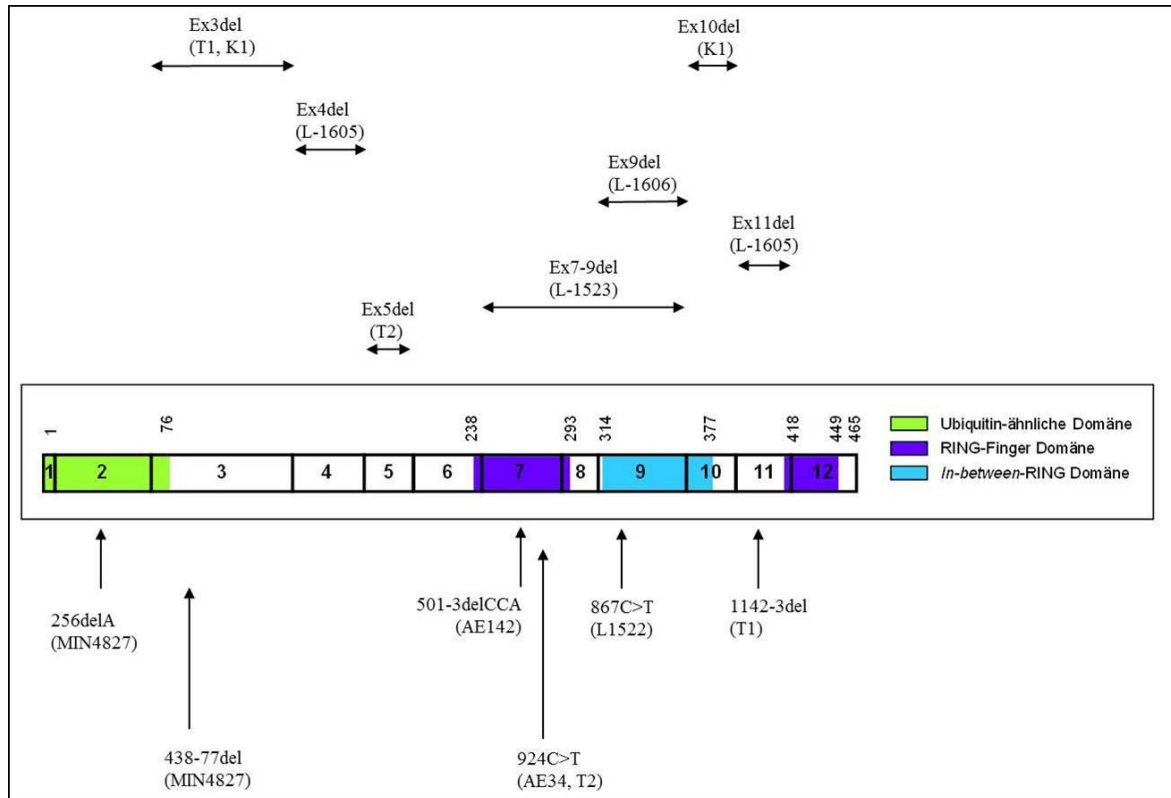


Abbildung 3.9.: Lokalisation der identifizierten *Parkin*-Mutationen.

Deletionen und Duplikationen ganzer Exons sind oberhalb der Sequenz, Punktmutationen und kleine Deletionen sind unterhalb der Sequenz angegeben. Regionen, die für bestimmte Domänen im Protein kodieren, sind farbig hervorgehoben. Die Proben-Nummern der Patienten mit den entsprechenden Mutationen sind in Klammern angegeben. Die Nummer der Nukleotide richtet sich nach der Benennung der cDNA. Die Zahlen über der Sequenz geben die Position der Domänen an (nach Kitada *et al.*, 1998).

3.2.2. *Parkin*-Screen von Patienten mit PS späten Beginns

In der vorliegenden Arbeit wurden 61 Index-Patienten mit LOPD per SSCP-Analyse, quantitativer PCR am *LightCycler* und Sequenzierung auf Mutationen in den zwölf Exons des *Parkin*-Gens untersucht. Der Anteil der Frauen betrug 53 % und der Männer 47 %. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 61,4 +/- 7,5 Jahren. Tabelle 7.2. (Anhang) fasst die klinischen und genetischen Daten der Patienten dieser Gruppe zusammen.

3.2.2.1. SSCP-Analyse und Sequenzierung

Zunächst wurden die DNA-Proben der oben aufgeführten Patienten mittels SSCP-Analyse auf nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen in allen zwölf Exons des *Parkin*-Gens auf Veränderungen hinsichtlich des Bandenmusters untersucht. Im Falle einer Abweichung vom gewöhnlichen Bandenmuster, zum Beispiel in Form von Bandenverschiebungen oder -verdopplungen, wurden die betroffenen Exons anschließend sequenziert.

Nach SSCP-Analyse und Sequenzierung ergaben sich folgende Ergebnisse für die Gruppe der LOPD-Patienten:

Es wurden keine Sequenzveränderungen in Form von Mutationen identifiziert.

Bei acht (B-145, B-265, L-419, L-662, L-938, L-1091, L-1135, L-1148) der untersuchten Personen wurde der bekannte Polymorphismus im Intron 2 des *Parkin*-Gens detektiert [IVS2+25T/C]. Im Intron 3 wurde der Polymorphismus [IVS3-20A/G] bei neun Personen detektiert (B-98, B-131, B-139, B-145, B-176, B-177, B-251, B-255, B-265). Ein weiterer Polymorphismus im *Parkin*-Exon 4 [601G/A] fand sich bei vier Personen (B-131, B-176, B-251, L-1119), dieser ist in Abbildung 3.10. dargestellt. Es handelt sich um einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin an Position 601 im kodierenden Exonabschnitt. Durch diese Veränderung kommt es zum Aminosäureaustausch von Serin zu Asparagin (Ser167Asn). Die Nukleotidsequenz des Exon 10 wies den Polymorphismus [1239G/C] auf. Ein Basenaustausch von Guanin zu Cytosin an Position 1239, der in einem Aminosäureaustausch von Valin zu Leucin resultiert, verursachte eine Bandenverschiebung, die bei zehn Proben zu finden war (B-100, B-102, B-198, B-214, B-248, B-252, L-265, L-423, L-1148, L-1217).

In den übrigen *Parkin*-Exons konnten keine Bandenverschiebungen auf den SSCP-Gelen festgestellt werden. Die beschriebenen Polymorphismen traten jeweils heterozygot auf und sind in Tabelle 3.5. zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3.5.: Detektierte Polymorphismen des *Parkin*-Gens bei LOPD-Patienten

Auflistung der in den Exons und Introns des *Parkin*-Gens detektierten Polymorphismen bei den 61 untersuchten LOPD-Patienten, sowie deren Auswirkung auf das translatierte Protein. In der letzten Spalte ist die Anzahl der betroffenen Patienten aufgeführt, die die Sequenzabweichung heterozygot tragen.

Lokalisation	Polymorphismus (DNA-Ebene)	AS-Austausch (Proteinebene)	Anzahl der Betroffenen
Intron 2	IVS2+25T/C	keiner	8
Intron 3	IVS3-20G/A	keiner	9
Exon 4	601G/A	Ser167→Asn	4
Exon 10	1239G/C	Val380→Leu	10

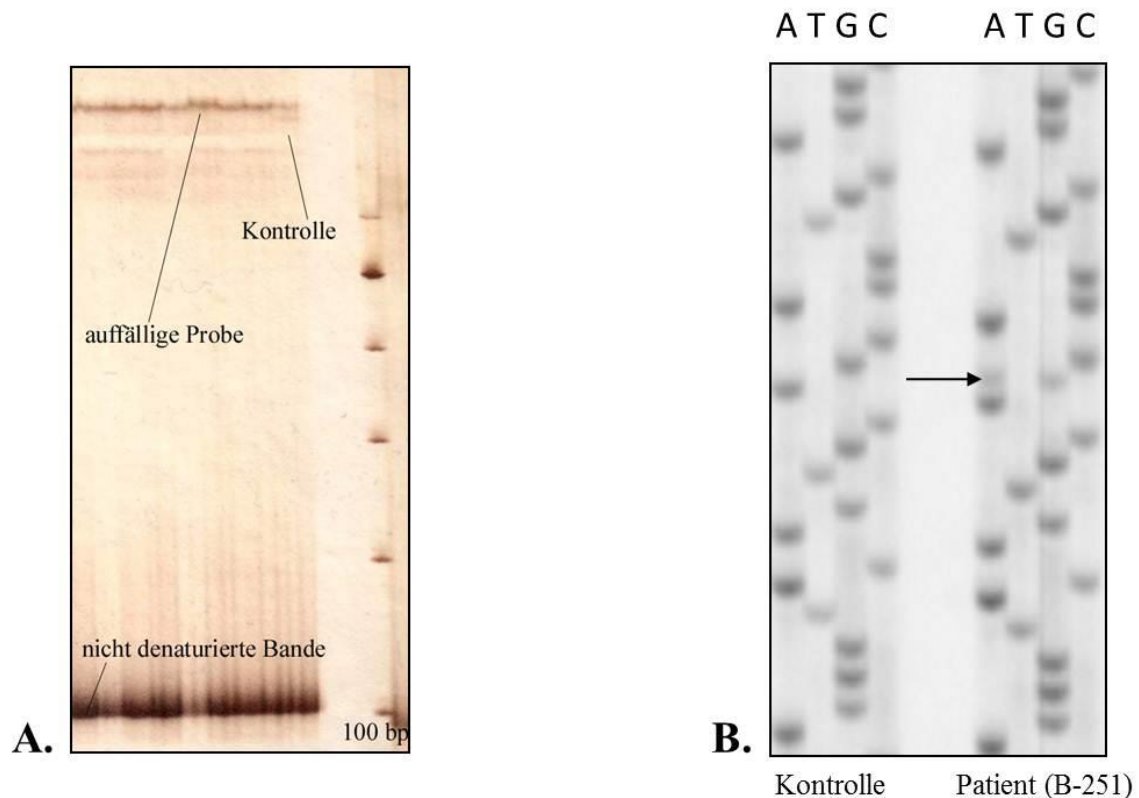


Abbildung 3.10.: SSCP-Gel und Sequenzausschnitt eines Polymorphismus des *Parkin*-Exon 4

A) Ausschnitt aus einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel zur SSCP-Analyse des *Parkin*-Exons 4. Am unteren Gelrand stellt sich die nicht denaturierte Bande und im oberen Gelbereich das spezifische Bandenmuster dar. Die Probe B-251 fällt durch eine Bandenverschiebung auf. Die Positiv-Kontrolle zeigt eine Abweichung vom spezifischen Bandenmuster in Form einer Bandenverdopplung. B) Ausschnitt aus einem denaturierenden Polyacrylamidgel zur Sequenzierung der auffälligen Probe. Die Sequenzierung zeigte eine heterozygote Transition (Pfeilmarkierung) an Position 601. Diese stellt sich als zwei Banden (Adenin und Guanin) auf selber Höhe dar, jede Bande entsprechend einem Allel. Es handelt sich um den in Exon 4 befindlichen Polymorphismus 601G/A.

3.2.2.2. Gendosis-Untersuchungen

Es konnte bei einem der 58 Patienten mit PS späten Beginns eine Alteration in der Gendosis festgestellt werden. Im Bereich von zwei Exons fanden sich Abweichungen in der Gendosis in Form von Deletionen von Exon 3 und Exon 4 des *Parkin*-Gens.

Die Deletion der genannten Exons konnte bei der mit 70 Jahren an PS erkrankten Patientin L-1148 nachgewiesen werden. Der Wert des quantitativen Vergleichs zwischen der amplifizierten DNA-Menge von β -Globin und dem dritten Exon des *Parkin*-Gens lag für die Patientin bei 0,56 (Abb. 3.11.B). Dieser Wert wurde in zwei weiteren Messungen bestätigt, somit war von einer Deletion des besagten Exons in einem der beiden Allele des *Parkin*-Gens auszugehen. Im Exon 4 fand sich ebenfalls eine Abweichung des Verhältnisses amplifizierter β -Globin- zu *Parkin*-Menge. Mehrere Messungen bestätigten das Ergebnis von 0,57 für das Verhältnis beider Gen-Mengen zueinander, welches ebenfalls für eine heterozygote Deletion des *Parkin*-Exon 4 sprach (s. Abb. 3.11.B).

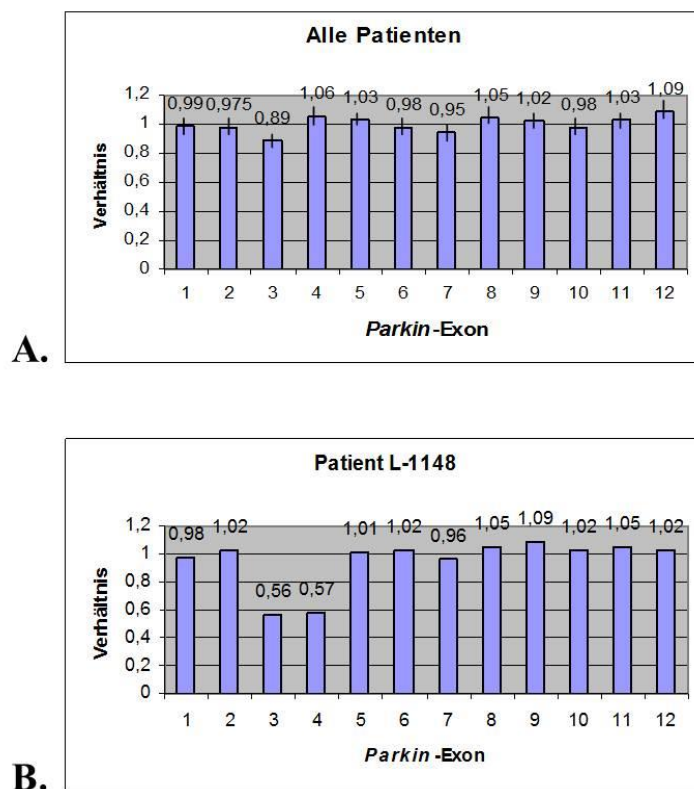


Abbildung 3.11.: Ergebnisse der Gendosis-Untersuchungen bei LOPD

A) Abgebildet sind die Mittelwerte der Verhältnisse *Parkin* zu β -Globin für alle 58 Indexpatienten. Es wurden nur diejenigen Ergebnisse gewertet, die nicht auf eine Veränderung der Gendosis schließen lassen, d. h. Verhältnisse von 0,8 bis 1,2. (Die Fehlerstriche sollen die Standardabweichung wiedergeben.)

B) *Parkin*/ β -Globin Verhältnisse jedes der zwölf Exons für den Patienten L-1148 mit einer heterozygoten Deletion des Exon 3 und des Exon 4.

Die Werte des quantitativen Vergleichs von amplifizierter DNA-Menge des β -Globin-Gens und des *Parkin*-Gens lagen für die übrigen Patienten und das jeweilige Exon zwischen 0,8 und 1,2 (Abb. 3.11.A). Der Auswertebildschirm der *LightCycler*-Messungen für das Exon 3 dieses Patienten ist im Anhang (Abb. 7.1.) zu finden.

Zusammenfassend wurden in der Gruppe der Patienten mit LOPD keine qualitativen Gen-Veränderungen detektiert. Durch Gendosis-Bestimmungen konnte eine Mutation [Ex3-4del] im heterozygoten Zustand detektiert werden (1,6 %).

3.2.3. *Parkin*-Screen einer Kontrollgruppe am WAVE-System

In dieser Gruppe von 20 Probanden, in der neun Individuen männlich, neun weiblich und zwei unbekannten Geschlechts waren, sollte die Häufigkeit von Mutationen und Polymorphismen innerhalb des *Parkin*-Gens für gesunde Kontrollen im Rahmen eines Pilotprojektes an der WAVE bestimmt werden. Die Frauen hatten ein Durchschnittsalter von etwa 55 Jahren, die Männer von etwa 52 Jahren. Dies ergab ein Durchschnittsalter von 53,5 Jahren für die gesamte Kontrollgruppe. Die Liste der Kontrollen mit den verfügbaren Daten findet sich im Anhang (Tabelle 7.3.).

3.2.3.1. Untersuchungen am WAVE-System

Folgende Ergebnisse wurden mit der *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC) am WAVE-System ermittelt:

Der intronische Polymorphismus [IVS2+25T/C] wurde bei sieben Personen detektiert (L-1593, L-1750, L-1752, L-1757, L-1758, L-1761, L-1764). Im Intron 3 konnte der Polymorphismus [IVS3-20G/A] zweimal (L-1596, L-1758) gemessen und durch Sequenzierung bestätigt werden. Bei sechs Personen (L-1593, L-1754, L-1756, L-1757, L-1759, L-1761) konnte der Intron 7-Polymorphismus [IVS7-35A/G] nachgewiesen werden. Im gleichen Intron wurde der Polymorphismus [IVS7-68G/C] bei zwei Personen (L-1754, L-1762) detektiert. Der Polymorphismus [1239G/C] des Exons 10 wurde bei zwei Personen (L-1592, L-1757) detektiert. Abbildung 3.12. zeigt das Ergebnis der WAVE-Messung und der anschließenden Sequenzierung. Ein weiterer Polymorphismus fand sich im Exon 11. An Position 1281 kam es bei vier Personen (L-1752, L-1755, L-1756, L-1763) zum Basenaustausch von Guanin und Adenin.

Tabelle 3.6.: Zusammenfassung aller detektierten Sequenzabweichungen in Form von Polymorphismen in der Kontrollgruppe

Lokalisation	Polymorphismus (DNA-Ebene)	AS-Austausch (Proteinebene)	Anzahl der Betroffenen
Intron 2	IVS2+25T/C	keiner	7
Intron 3	IVS3-20G/A	keiner	2
Intron 7	IVS7-35A/G	keiner	6
Exon 10	1239G/C	Val380→Leu	2
Exon 11	1281G/A	Asp394→Asn	4

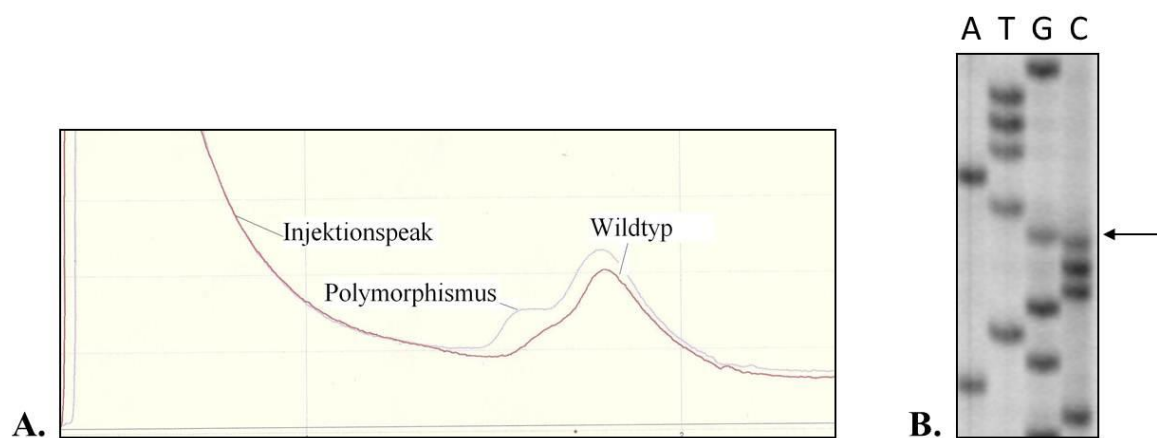


Abbildung 3.12.: Chromatogramm und Sequenzausschnitt eines Polymorphismus des *Parkin*-Exon 10
A) Chromatogramm mit abweichendem Kurvenmuster der Probe L-1592 im Exon 10. B) Ausschnitt aus dem Sequenzgel der Probe L-1592 mit dem detektierten Polymorphismus [1239G/C].

3.2.3.2. Gendosis-Untersuchungen

Bei einer gesunden Kontrolle (L-1764) konnte eine Duplikation von Exon 2 des *Parkin*-Gens im heterozygoten Zustand detektiert werden (Abb. 3.13.). Bei den übrigen Kontrollen wurden keine weiteren Gendosis-Alterationen detektiert.

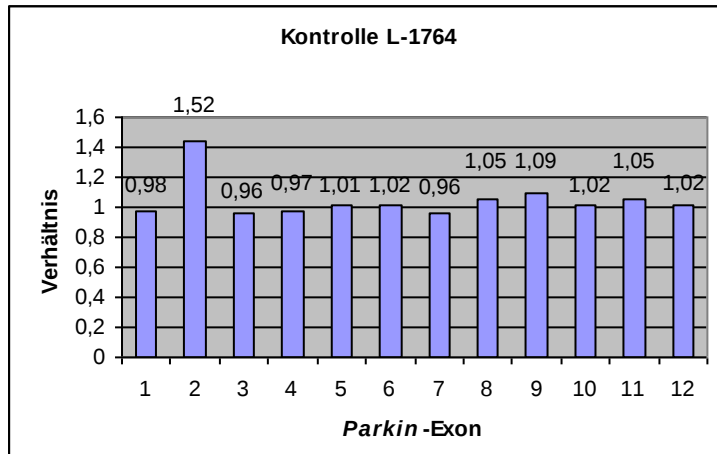


Abbildung 3.13.: Schema von *Parkin/β-Globin*-Verhältnissen bei einer heterozygoten Duplikation des *Parkin*-Exon 2

Parkin/β-Globin Verhältnisse jedes der zwölf *Parkin*-Exons für die Kontrolle L-1764 mit einer heterozygoten Duplikation des Exon 2 des *Parkin*-Gens (Ergebnis aus einer von mehreren Messungen).

3.2.4. Die Polymorphismus-Analyse des Core-Promotors

Das mittlere Erkrankungsalter der 116 Patienten lag bei 47 Jahren, somit handelte es sich um Patienten mit PS frühen Beginns (EOPD). Die Kontrollgruppe bestand aus 128 nicht an PS erkrankten Personen aus dem Raum Lübeck. In Alter und Geschlecht stimmten Patienten- und Kontrollgruppe überein.

3.2.4.1. Ergebnisse der Schmelzkurven-Untersuchungen

Durch die Schmelzkurvenanalyse am *LightCycler* wurden folgende Ergebnisse, die detailliert im Anhang unter Tabelle 7.4. zu finden sind, erzielt:

Von den 116 Parkinson-Patienten konnten 35 als heterozygote Träger des Polymorphismus [-258T/G] identifiziert werden. In der Kontrollgruppe von 128 Personen wiesen 45 Personen diesen Genotypen auf. Dies entspricht einem Anteil von 30 % der Patienten mit [-258T/G]-Allel gegenüber 35 % der Kontrollen mit [-258T/G]-Allel.

Das Wildtyp-Allel [-258T/T] wurde bei 77 Patienten (66 %) und bei 78 Personen der Kontrollgruppe (61 %) gefunden.

Bei 4 von 116 Patienten (3 %) fand sich der homozygote Polymorphismus [-258G/G]. In der Kontrollgruppe kam dieser Genotyp bei 5 Personen (4 %) vor.

Es konnten somit keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) für die Patienten- und Kontrollgruppe festgestellt werden.

Tabelle 3.7.: Genotypen des *Parkin*-Promotors

Anzahl der jeweiligen Genotypen des *Parkin*-Promotors in der Gruppe der 116 an Parkinson erkrankten Patienten und der 128 Kontrollen.

	T/G	T/T	G/G
Patienten	35	77	4
Kontrollen	45	78	5

3.3. Untersuchungen am *DJ-1*-Gen

Der zweite Teil der Doktorarbeit befasst sich mit der Häufigkeit von Sequenzabweichungen im *DJ-1*-Gen. Da während der Zeit der experimentellen Arbeiten am *Parkin*-Gen vermehrt Publikationen über Mutationen in dem mit PS frühen Beginns (EOPD) assoziierten Gen beschrieben wurden (Bonifati *et al.*, 2003; Hedrich *et al.*, 2004), fiel das Interesse auf dessen Untersuchung. Die Abbildung 1.4. in der Einleitung zeigt die genomische Struktur des *DJ-1*-Gens.

3.3.1. Patienten mit Parkinson-Syndrom frühen Beginns

Es wurden 71 Patienten am *LightCycler* auf quantitative DNA-Veränderungen im *DJ-1*-Gen untersucht. Alle Patienten wurden ebenfalls auf Mutationen im *Parkin*-Gen getestet (Tab. 7.1.) und im Rahmen einer anderen Doktorarbeit (Frau Dr. N. Schäfer) am WAVE-System auf Punktmutationen im *DJ-1*-Gen untersucht. Die Gruppe setzte sich aus 37 Männern (52 %), 32 Frauen (45 %) und 2 Patienten unbekannten Geschlechts (3 %) zusammen. Das mittlere Erkrankungsalter lag in dieser Gruppe bei 32,2 +/-8,5 Jahren.

3.3.1.1. Gendosis-Untersuchungen

Es wurden die sechs kodierenden Exons (Exon 2, 3, 4, 5, 6, 7) des *DJ-1*-Gens per quantitativer PCR am *LightCycler* gemessen. Abweichungen in Form von Exon-Deletionen fanden sich bei 2 Patienten. In diesen zwei Fällen (T1, T5) war das Exon 5 des *DJ-1*-Gens deletiert. Der Wert für das Verhältnis von amplifizierter *DJ-1*-Menge und β -Globin-Menge betrug bei Patient T1 0,55 (Abb. 3.14.) und bei T5 0,58, was in beiden Fällen für eine heterozygote Deletion sprechen würde. Die Ergebnisse wurden nach Abschluss dieser Arbeit anhand der MLPA-Methode widerlegt (s. 4.1.2.).

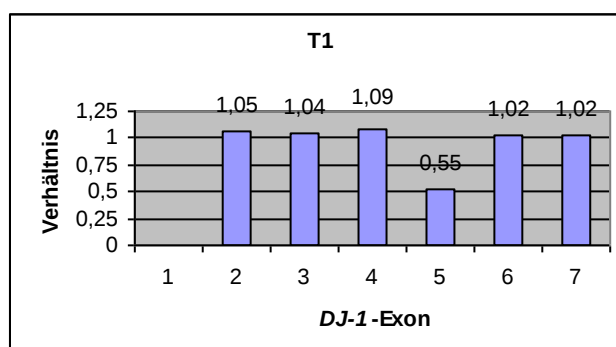


Abbildung 3.14.: Schema von *DJ-1*/ β -Globin-Verhältnissen bei einer heterozygoten Deletion des *DJ-1*-Exon 5. Ergebnisse der Gendosis-Untersuchung für den Patienten T1. Es sind die *DJ-1*/ β -Globin-Verhältnisse für jedes der 6 kodierenden Exons aufgetragen. Bei dem Patienten konnte eine heterozygote Deletion des Exons 5 des *DJ-1*-Gens festgestellt werden.

3.4. Ergebnisse der *Parkin*- und *DJ-1*-Gen-Untersuchungen bei PS frühen Beginns im Vergleich

Durch das *Parkin*-Screen wurden von 87 Patienten mit EOPD elf als Träger einer Mutation im *Parkin*-Gen identifiziert, dies entspricht einer Mutationsfrequenz von 12,6 % für das *Parkin*-Gen. Von diesen 87 Patienten wurden 71 Patienten auf Mutationen des *DJ-1*-Gens untersucht. Mit Hilfe der Analyse am WAVE-System konnte eine Mutation im Intron 5 des *DJ-1*-Gens [IVS52-12del] bei dem Patienten L-1347 gezeigt werden. Es wurden jedoch keine weiteren Mutationen per *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (dHPLC) detektiert. Durch die Gendosis-Bestimmungen am *LightCycler* wurden keine Mutationen im *DJ-1*-Gen aufgedeckt, da es sich wie zuvor beschrieben um zwei falsch-positive Werte bei Patient T1 und T5 handelt, die mittels *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) als unauffällig bewertet wurden (s. 4.1.2.). Diese Methode lag zum Abschluss der praktischen Arbeiten für diese Doktorarbeit noch nicht vor.

Die Mutationsfrequenz für das *DJ-1*-Gen beträgt somit 1,4 % bei einem identifizierten Mutationsträger in einer Gruppe von 71 Patienten (1/71). Werden nur die 71 Patienten miteinander verglichen, die auf Mutationen in beiden Genen untersucht wurden, ergibt sich für das *Parkin*-Gen eine Mutationsrate von 15,5 % in dieser Gruppe (11/71).

Die folgende Abbildung verdeutlicht das häufigere Vorkommen von *Parkin*-Mutationen im Vergleich zu *DJ-1*-Mutationen im selben Patientenkollektiv von PS-Patienten mit EOPD.

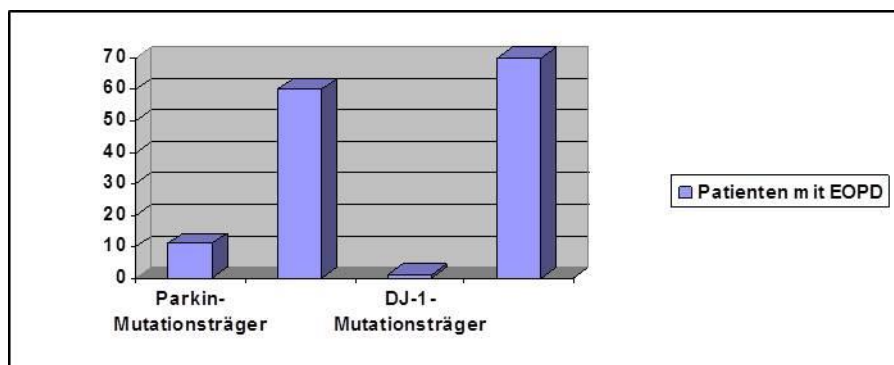


Abbildung 3.15.: *Parkin*- und *DJ-1*-Mutationsträger bei EOPD

Es sind für die 71 untersuchten PS-Patienten mit EOPD (x-Achse) jeweils die absolute Anzahl der betroffenen Mutationsträger (y-Achse) für das *Parkin*-Gen und das *DJ-1*-Gen dargestellt.

3.5. Untersuchungen am *NR4A2*-Gen

Das *NR4A2*-Gen wurde erst vor einigen Jahren in Zusammenhang mit einem autosomal-dominant vererbten PS gebracht. Im Januar 2003 beschrieben Le *et al.* zwei heterozygote Mutationen im Exon 1 des *NR4A2*-Gens bei Patienten mit familiärem Parkinson. Die Mutationsrate in dieser europäisch stämmigen Patientengruppe beträgt 9,3 %.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Frequenz von *NR4A2*-Mutationen in einer eigenen Stichprobe untersucht werden, um somit Hinweise zur Bedeutung dieses Gens in der Pathogenese des PS zu erhalten.

3.5.1. Patienten mit positiver Familienanamnese (FA)

Es wurden 50 PS-Patienten, in deren Familie es mindestens einen ebenfalls an PS erkrankten Verwandten ersten Grades gab, und man somit von einem dominantem Erbgang ausgehen konnte, auf Mutationen im *NR4A2*-Gen getestet. Die Patienten-DNA stammte aus der Neurologischen Klinik der Universität Lübeck. Bei allen 50 Patienten wurden *Parkin*-Mutationen ausgeschlossen. Es wurden außerdem Patienten mit einem relativ niedrigen Erkrankungsalter ausgewählt; 52 % der Patienten hatten ein Erkrankungsalter von weniger als 40 Jahren, ein Erkrankungsalter zwischen 40 und 50 Jahren fand sich bei 32 % und 16 % der Stichprobe erkrankten nach dem 50. Lebensjahr. Das mittlere Erkrankungsalter aller 50 Patienten lag bei 41,8 +/-11,5 Jahren. Von den untersuchten Patienten machten die Frauen 54 % und die Männer 46 % aus. Eine Liste mit Patientendaten und den Untersuchungsergebnissen findet sich im Anhang (Tabelle 7.5.).

3.5.2. Sequenzierungen im *NR4A2*-Gen

Um die von Le *et al.* beschriebenen Mutationen [-245T→G] und [-291Tdel] im Exon 1 des *NR4A2*-Gens zu detektieren, wurden die PCR-Produkte des Exon 1 sequenziert. Mithilfe der Sequenzierung eines 305 Basenpaare überspannenden PCR-Produkts konnten in den 100 Allelen der 50 Patienten keine Sequenzabweichungen beobachtet werden. Es fand sich weder eine der bekannten noch eine neue Mutation. An Position -245 und an Position -291 des Exon 1 des *NR4A2*-Gens waren bei allen Patienten jeweils zwei Allele für die Base Thymin (Wildtyp) vorhanden (s. Abb. 3.16.).

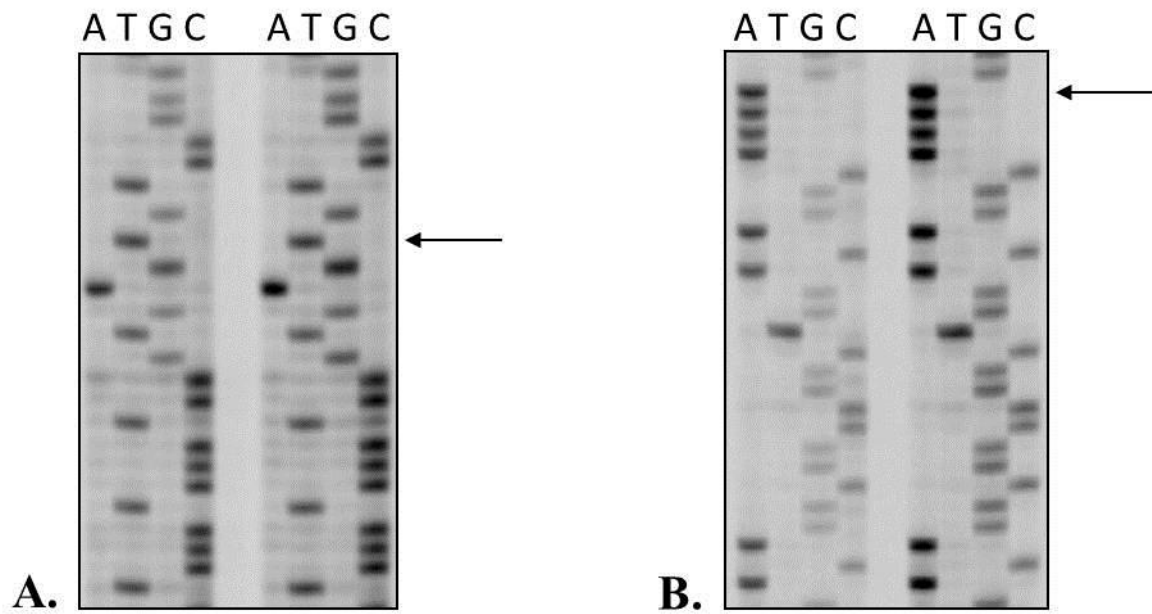


Abbildung 3.16.: Ausschnitte aus Sequenzgelen aus dem Exon 1 des *NR4A2*-Gens

A) Gezeigt ist der Vorwärtsstrang (5'→3'Richtung) mit dem Wildtyp-Allel [-245T/T] (mit Pfeil gekennzeichnet). Es wurde bei keinem Patienten die Mutation [-245T→G] detektiert. B) Im Rückwärtsstrang (3'→5') befand sich an der mit Pfeil markierten Position -291 in allen 100 untersuchten Allelen die Base Adenin, somit war (aufgrund der Komplementarität der Basen) eine Deletion der Base Thymin [-291Tdel] an dieser Stelle ausgeschlossen.

4. Diskussion

4.1. Bewertung der Methoden

4.1.1. Methoden zur Detektion qualitativer DNA-Veränderungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde neben den konventionellen qualitativen Methoden zur Detektion von qualitativen DNA-Veränderungen, zu denen die *Single-Strand Conformation Polymorphism* (SSCP)-Analyse und die Sequenzierung gehören, eine damals neue Methode angewandt. Diese erfasst mit einer Sensitivität von 90-95 % (Eng *et al.*, 2001) und hoher Zuverlässigkeit Mutationen sowie Einzel-Nukleotid-Polymorphismen. Es handelt sich um die denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC)-Analyse, die am WAVE-System (Transgenomics) zur Untersuchung des *Parkin*-Gens etabliert wurde. Das Prinzip der Methode wurde im Methoden-Teil näher vorgestellt. Mit dieser Methode kann man relativ schnell eine große Anzahl von Gen-Abschnitten auf Mutationen untersuchen. Dies ist insbesondere bei einem großen Gen, wie dem *Parkin*-Gen, sehr hilfreich. Zu den Einschränkungen dieser Methode gehört die hohe Ausfalls-Anfälligkeit des WAVE-Systems. Es dürfen beispielsweise keine PCR-Zusätze wie Betaine oder Detergentien im System „mitlaufen“. Außerdem ist die Methode relativ aufwendig, d. h. es sind mehrere Analyse-Runden mit verschiedenen Temperaturen und Gemischen notwendig. Ein weiterer Nachteil sind die verhältnismäßig hohen Kosten der Methode. Mit der im Ergebnis-Teil dargestellten Etablierung und Optimierung der Analysebedingungen für das *Parkin*-Gen mittels dHPLC konnten gute Ergebnisse im Rahmen der durchgeführten Pilotstudie erzielt werden.

Die SSCP-Analyse stellt ein einfaches und relativ zuverlässiges Verfahren zur Detektion von qualitativen Genveränderungen dar. Es ist kostengünstig und eignet sich zum Mutations-Screening von großen Stichproben. Die Sensitivität liegt bei 80-90 %. Die Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Studie zur Untersuchung des *Parkin*-Gens angewandt.

Fielen Abweichungen im Bandenmuster bei der SSCP-Analyse oder beim Screening mit dHPLC auf, wurde zur Verifizierung die Sequenzierung der Probe durchgeführt. Bei Mutationen im heterozygoten Zustand wurden alle kodierenden Exons des Gens untersucht, um weitere Mutationen nicht zu übersehen.

Die Sequenzierung weist eine hohe Sensitivität (100 %) im Vergleich zu den Screening-Verfahren auf, ist jedoch aufwändiger und kostenintensiv. Mit dieser Methode wurden in der vorliegenden Arbeit ausgewählte Proben und Exons aller drei Gene (*Parkin*-Gen und *Core*-Promotor des *Parkin*-Gens sowie *DJ-1*- und *NR4A2*-Gen) untersucht.

Neben den *Screening*-Verfahren wurde eine Methode zur Darstellung einer bestimmten Variante des *Core*-Promotors des *Parkin*-Gens angewandt. Da eine große Patientenzahl untersucht werden sollte, wurde eine neue Methode zur Detektion eines Polymorphismus mithilfe des *LightCyclers* (RocheDiagnostics) etabliert. Es handelt sich um die Darstellung von Schmelzkurven für PCR-Produkte wie im Methoden-Teil beschrieben. Es wurden im ersten Arbeitsschritt Sequenzierungen verschiedener Proben durchgeführt, um den gesuchten Polymorphismus darzustellen. Mit dieser Methode konnten die Proben zuverlässig und schnell untersucht werden, wobei die Ergebnisse der Sequenzierungen bestätigt werden konnten.

Nach Entschlüsselung des menschlichen Genoms 2001 wurden neue nicht-Sanger-basierte Sequenzierungstechnologien entwickelt, welche es seit einigen Jahren erlauben, kostengünstiger und mit hohem Durchsatz zu arbeiten (Tsuji, 2010). Es kommen verschiedene Verfahren wie z. B. Pyrosequenzierung, Sequenzierung durch Synthese bzw. Hybridisierung oder Ionen-Halbleiter-DNA-Sequenzierung zum Einsatz (Mardis, 2008). Die entsprechenden Verfahren werden als Sequenzierung der nächsten Generation (*next generation sequencing*, NGS) bezeichnet und wurden bzw. werden aufgrund der immensen Bedeutung der Genforschung rasch weiterentwickelt. Man kann entweder eine Exom-Sequenzierung (Sequenzierung aller Protein-kodierenden Regionen) oder eine Sequenzierung des gesamten Genoms durchführen. Durch das *1000 Genomes Project Consortium* wurde 2010 das gesamte menschliche Genom anhand verschiedener Strategien an „NGS-Plattformen“ resequenziert. Es konnte ein Datensatz von mehr als 95 % der bis *dato* bekannten Polymorphismen und Mutationen zusammengestellt werden, der als Grundlage für genomweite Assoziationsstudien (GWAS) genutzt werden kann. In Bezug auf die Genetik des Parkinson-Syndroms ermöglichte die Anwendung von NGS und GWAS in den letzten Jahren die Identifizierung von weiteren kausalen und prädisponierenden Genen für die Entstehung eines Parkinson-Syndroms (Kumar, Lohmann und Klein, 2012).

4.1.2. Methoden zur Detektion quantitativer DNA-Veränderungen

Gendosis-Untersuchungen haben eine große Bedeutung für die Mutationsdetektion, da beispielsweise mehr als 50 % der Patienten mit *Parkin*-Mutationen Exonrearrangements des *Parkin*-Gens aufweisen. Diese Mutationen würden bei einem konventionellen Mutations-*Screening* im heterozygoten Zustand übersehen werden, daher sollten Gendosis-Untersuchungen Bestandteil jeden *Parkin-Screenings* sein (Klein *et al.*, 2003). Quantitative Mutationsanalysen wurden mittels einer Echtzeit-PCR am Echtzeit-PCR-Gerät, dem *LightCycler* durchgeführt. Die Methode wurde in der hiesigen Arbeitsgruppe für das *Parkin*-Gen etabliert (Hedrich *et al.*, 2001) und auf das *DJ-1*-Gen ausgeweitet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Echtzeit-PCR angewendet, um Gendosis-Untersuchungen am *Parkin*-Gen und am *DJ-1*-Gen durchzuführen. Es handelt sich um eine

zuverlässige und schnelle Methode, um große genomische Deletionen und Duplikationen im heterozygoten Zustand nachzuweisen.

Zu den Limitationen zählen wenig zuverlässige Ergebnisse bei Vorhandensein schlechter DNA-Qualität und hohe Kosten durch verschiedene Zusätze wie Sonden für die unterschiedlichen Exons von Gen und Referenz-Gen. Heutzutage kommt die quantitative Echtzeit-PCR größtenteils zum Einsatz, um auffällige Ergebnisse von MLPA-Untersuchungen zu validieren.

Vor einigen Jahren wurde jene neue Methode, die *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA), zur Detektion von Exonrearrangements entwickelt (Schouten *et al.*, 2002). Dieses Verfahren basiert auf der Amplifikation der Probe initiiert durch das Auftrennen zugefügter Oligonukleotide, die zuvor bis zur Zielsequenz hybridisiert waren. Anhand des Amplifikations-Ergebnisses lassen sich Rückschlüsse auf die Mutation ziehen. In einer MLPA-Reaktion können bis zu 45 DNA-Abschnitte parallel untersucht werden. Daher ist das Verfahren sehr gut geeignet, um große Populationen von Patienten und Kontrollen zu untersuchen. Außerdem ist es kosteneffektiv und sensitiv. Seit der Etablierung dieser Methode konnten umfangreiche Phänotyp-Genotyp-Korrelationen angestellt werden.

In einer Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Klein konnte bei 20 der 21 vormals per *LightCycler* identifizierten Mutationsträger mit Exonrearrangements die entsprechende Gendosis-Veränderung mittels MLPA nachgewiesen werden (Djarmati *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei zwei Patienten das Vorliegen einer Gendosis-Veränderung in Form einer heterozygoten Exon-Deletion von Exon 5 des *DJ-1*-Gens angezweifelt (s. 3.3.1.1.). Bei mehreren Messungen am *LightCycler* wiesen die Ergebnisse zwar in Richtung einer Deletion im heterozygoten Zustand (0,5 +/- 20 %), lagen aber auch außerhalb des Intervalles (s. Tabelle 3.4.). Anhand von Untersuchungen mit der *ligation-dependent probe amplification* (MLPA) durch die hiesige Arbeitsgruppe wurden die Ergebnisse als wahrscheinlich falsch positiv bewertet. Die Methode konnte akkurate Ergebnisse für viele Gene liefern, beim *DJ-1*-Gen bleibt die Sensitivität jedoch unklar, da bei den damaligen Messungen keine Positiv-Kontrolle zur Verfügung stand. Somit können Gendosis-Veränderungen in diesem Gen nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

4.2. Mutationen im *Parkin*-Gen

In der vorliegenden Arbeit wurden 168 Probanden auf Mutationen im *Parkin*-Gen untersucht. Darunter befanden sich 87 PS-Patienten mit EOPD (mit einer Untergruppe von 24 Patienten mit Tiefenhirn-Stimulation), 61 PS-Patienten mit LOPD und 20 gesunde Kontrollen.

Insgesamt konnten bei zwölf Patienten und einer Kontrolle vierzehn verschiedene Mutationen nachgewiesen werden (Tab. 7.6. und 7.7. im Anhang). Die Anzahl der Betroffenen ist für jede dieser Gruppen in Abbildung 4.1. graphisch dargestellt.

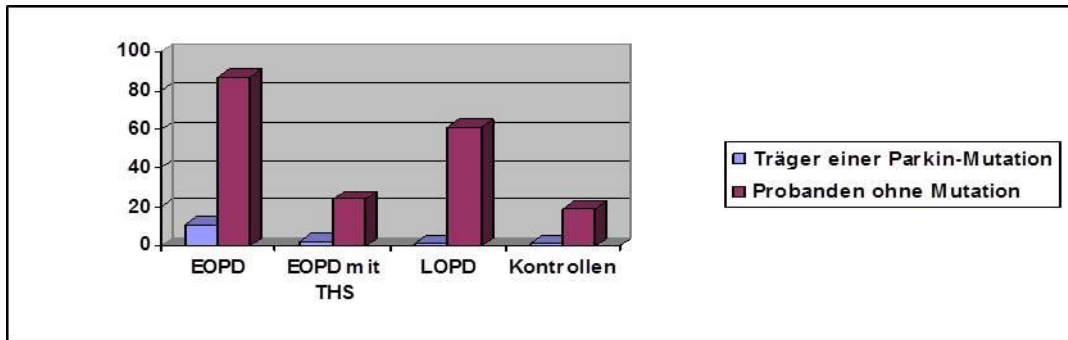


Abbildung 4.1.: Verhältnisse von Mutationsträgern zu Personen ohne *Parkin*-Mutation

Dargestellt sind die absolute Anzahl identifizierter Träger einer *Parkin*-Mutation und der Patienten und Kontrollen ohne *Parkin*-Mutation (y-Achse) im Vergleich für die jeweiligen Gruppen (x-Achse).

Unter den elf betroffenen PS-Patienten mit EOPD (11/81, 12,6 %), darunter befanden sich zwei Patienten mit Tiefenhirn-Stimulation (2/24, 8,3 %), wiesen insgesamt drei Patienten eine homozygote Mutation auf (3,4 %), bei fünf konnten *compound*-heterozygote Mutationen nachgewiesen werden (5,8 %) und drei Patienten trugen eine Mutation im heterozygoten Zustand (3,4 %).

Die betroffene PS-Patientin mit LOPD (1/61, 1,6 %) trug eine Mutation im heterozygoten Zustand. Bei der Kontrolle wurde ebenso eine Mutation im heterozygoten Zustand detektiert (1/20, 5 %).

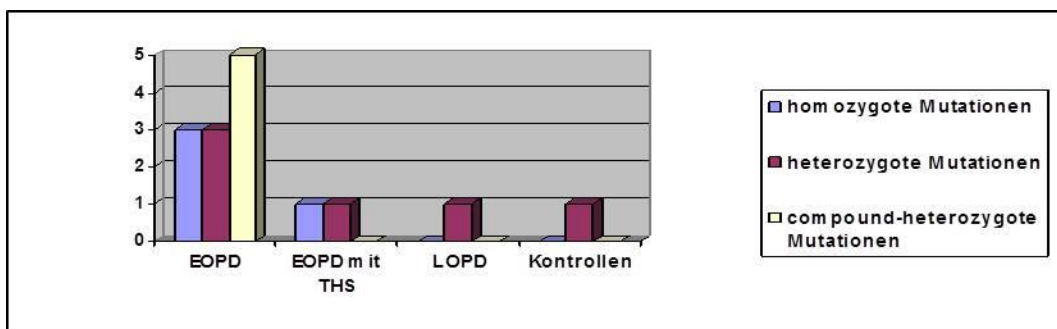


Abbildung 4.2.: Häufigkeit verschiedener *Parkin*-Mutationen bezogen auf die Allel-Variante

Die absolute Anzahl der Patienten und Kontrollen mit *Parkin*-Mutationen in den verschiedenen Allel-Varianten (y-Achse) ist für die verschiedenen Gruppen (x-Achse) dargestellt.

Bei allen Mutationsträgern konnten durch Sequenzierung des *Parkin*-Gens und Untersuchung auf *DJ-1*-Mutationen keine weiteren Sequenzabweichungen detektiert werden, die insbesondere bei den Trägern einer heterozygoten Mutation den Phänotyp eines PS (mit)verursachen könnten. Jedoch können weitere Mutationen in anderen Genen nicht ausgeschlossen werden.

Die in dieser Arbeit detektierten Mutationen sind nur teilweise aus vorherigen Studien bekannt (Hedrich *et al.*, 2004), so dass die eigene Arbeit zur Erweiterung des Spektrums von detektierten *Parkin*-Mutationen beitragen konnte. Die bisher in der Literatur beschriebenen Mutationen wurden für diese Arbeit mithilfe einer *Online*-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) recherchiert, welche zuletzt am 12.10.2012 eingesehen wurde. In den Tabellen 7.6. und 7.7. im

Anhang wurden die Mutationen aufgelistet, die im Rahmen dieser Doktorarbeit detektiert wurden. Es werden jeweils die Studien angeführt, in denen ebendiese *Parkin*-Mutation beschrieben ist, um einen Eindruck über die Häufigkeit der betreffenden Mutation zu erlangen.

Eine große Anzahl und ein weites Spektrum von *Parkin*-Mutationen zeigen sich in den der aktuellen Literatur zufolge mehr als 180 beschriebenen Mutationen, welche in jedem der zwölf Exons des Gens vorkommen. Eine Übersicht der bisher detektierten Mutationen im *Parkin*-Gen kann man im Internet auf der Seite des Instituts für Medizinische Genetik Cardiff unter der URL <http://www.hgmd.cf.ac.uk> oder der *Parkinson Disease Mutation Database* <http://www.molgen.ua.ac.be/PDmutDB> einsehen. Die beschriebenen Mutationen liegen variabel über das gesamte Gen verteilt, dabei lassen sich jedoch gewisse *hot spots* ausmachen. Die Häufung von Mutationen in bestimmten Regionen des Gens lässt eine funktionelle Bedeutung dieser Regionen vermuten. Punktmutationen, kleine Deletionen und Duplikationen machen einen Anteil von bis zu 50 % aus und finden sich am häufigsten im Exon 2 und 7 des *Parkin*-Gens (Bekris *et al.*, 2010).

Die funktionelle *RING-IBR-RING*-Domäne, welche im Zusammenhang mit der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität des Proteins steht, wird im Bereich von Exon 7-12 kodiert. Hieraus leitet sich ab, dass Mutationen in diesem Bereich die Proteinfunktion beeinträchtigen können. Beispielsweise liegt eine der detektierten Mutationen [867C>T] im Exon 7 innerhalb des ersten *RING*-Fingers und führt beim Protein zum Aminosäuren-Austausch von Arginin und Cystein [Arg256Cys]. Inwieweit diese *missense*-Mutation die Proteinfunktion beeinflusst, ist letztendlich nicht geklärt, jedoch scheint sie einen PS-Phänotyp bewirken zu können (Abbas *et al.*, 1999; Hedrich *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; Nuytemans *et al.*, 2009).

Gendosis-Veränderungen machen bis zu 60 % der bisher beschriebenen Mutationen aus und treten am häufigsten in Form von Deletionen der Exons 3 und/oder 4 auf (Hedrich *et al.*, 2004; Bekris *et al.*, 2010; Marder *et al.*, 2010; Grünwald *et al.*, im Druck). Aufgrund dieser Ergebnisse wird deutlich, wie wichtig die Untersuchung aller 12 Exons des *Parkin*-Gens anhand von qualitativen und quantitativen Untersuchungen zur Mutationsdetektion ist.

Von dem Großteil der anfänglichen Arbeiten über *Parkin*-Mutationen beinhalten nur relativ wenige die systematische Suche nach Mutationen in einem größeren Patientenkollektiv mittels quantitativer Methoden zur Detektion von heterozygoten Gendosisveränderungen (Lücking *et al.*, 2000; Nichols *et al.*, 2002; West *et al.*, 2002a; Wang *et al.*, 2003; Foroud *et al.*, 2003), dazu gehören insbesondere die Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Klein (Hedrich *et al.*, 2001; Hedrich *et al.*, 2002; Kann *et al.*, 2002; Djarmati *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2005). In den letzten Jahren hat sich die systematische Analyse qualitativer wie quantitativer Mutationen aufgrund der bereits beschriebenen modernen Untersuchungsmethoden durchgesetzt und es können große Patienten- und Kontroll-Kollektive untersucht werden (z. B. Pankratz *et al.*, 2009; Marder *et al.*, 2010).

4.2.1. *Parkin*-Mutationen bei PS frühen Beginns

In dem Patientenkollektiv der PS-Patienten mit Erkrankungsalter unter 50 Jahren weisen elf von 87 Patienten (12,6 %) Mutationen im *Parkin*-Gen auf. In der Untergruppe der EOPD-Patienten, welche eine Therapie in Form einer Tiefenhirn-Stimulation (THS) erhalten hatten, findet sich eine Mutationsrate von 8,3 % (2/24). Die Patienten der EOPD-Gruppe stammen aus verschiedenen Ländern (Deutschland, Russland, Irland, Südtirol, USA und Kanada). Die Patienten mit THS stammen aus Norddeutschland. Die Patienten beider Gruppen sind größtenteils sporadische PS-Patienten.

In der Literatur sind bei gemischten Kollektiven aus sporadischen und familiären sowie rein sporadischen EOPD Mutationsfrequenzen zwischen 1,3 und 24 % beschrieben worden (Lücking *et al.*, 2000; Munoz *et al.*, 2001; Kann *et al.*, 2002; Hedrich *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2003; Periquet *et al.*, 2003; Djarmati *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2009; Keyser *et al.*, 2010; Elfferich *et al.*, 2011).

Wichtige Faktoren in Bezug auf die Mutationsfrequenz sind neben der ethnischen Herkunft, die beispielsweise das Vorkommen von häufig auftretenden Mutationen in Zusammenhang mit Gründereffekten wahrscheinlicher machen, die Familienanamnese. Bei Studien mit rein familiären (ethnisch homogenen) südtiroler bzw. japanischen EOPD-Patienten finden sich Mutationsraten von 33 bzw. 56 % (Hattori *et al.*, 1998; Hedrich *et al.*, 2001). Auch bei der Untersuchung ethnisch gemischter familiärer Patienten mit EOPD finden sich hohe Mutationsraten von 49 % (Lücking *et al.*, 2000) und 53 % (Bertoli-Avella *et al.*, 2005). Somit wird ersichtlich, dass wahrscheinlich mehrere Faktoren zusammen wirken.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der stark mit der Mutationshäufigkeit korreliert, ist das Erkrankungsalter der Patienten mit EOPD. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutationsrate von sporadisch erkrankten Patienten mit einem Erkrankungsalter von unter 20 Jahren bei etwa 70 % liegt, wohingegen der Anteil bei den 21- bis 30-jährigen auf 26 % und bei den 31- bis 45-jährigen sogar auf 3 % sank (Lücking *et al.*, 2000; Periquet *et al.*, 2003; Mata *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden an einer großen Kohorte erhoben, wobei sich generell erkennen lässt, dass der Prozentsatz der Mutationsträger höher ist, wenn diese in den ersten Lebensdekaden erkranken (Pankratz *et al.*, 2009). Einer aktuellen Studie zufolge erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Mutation bei EOPD der Reihenfolge nach bei 1) betroffenem erstgradig Verwandtem, 2) niedrigem Erkrankungsalter, 3) betroffenem Geschwister und 4) elterlicher Blutsverwandschaft (Kilarski *et al.*, 2012).

Von den Patienten, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden, weisen neun Patienten ein Erkrankungsalter von unter 20 Jahren und somit ein juveniles PS auf. Betrachtet man diese Patienten gesondert, ergibt sich eine Mutationsrate von 11 % (1/9). Dieses Ergebnis ist nicht vollständig dadurch zu erklären, dass es sich um ein kleines, wenig repräsentatives Patientenkollektiv handelt. Voran genannte Kriterien müssen ebenso in Betracht gezogen werden.

Außerdem können trotz der aufwendigen Suche nach Mutationen in der vorliegenden Arbeit und anderen Studien (z. B. Kann *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2003; Djarmati *et al.*, 2004) einzelne Veränderungen übersehen worden sein. Mit der hier angewendeten *Screening*-Methode in Form der SSCP-Analyse werden einerseits nur ca. 80 – 90 % der Punktmutationen entdeckt (Hayashi und Yandell, 1993). Andererseits wurde die Sequenz der riesigen Introns nicht untersucht (s. Abb. 1.3.). Es wäre denkbar, dass eine Veränderung der Intronsequenz (Basenaustausch oder Deletion) zu einer Veränderung der chromosomalen Struktur und damit zu einer veränderten Transkription oder zu Veränderungen beim Spleißen führt.

Insgesamt liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter der EOPD-Patienten dieser Studie bei etwa 39 Jahren (es fehlen z. T. Angaben über das genaue Erkrankungsalter einiger Patienten). Die Mutationsträgerrate von 12,6 % für alle EOPD-Patienten liegt zwar innerhalb der in der Literatur beschriebenen Spanne, aber hätte durchaus höher ausfallen können. Jedoch wurde bei der Auswahl der Patienten vorrangig auf ein Erkrankungsalter von unter 50 Jahren geachtet, andere Kriterien wie Familienanamnese, ethnische Herkunft und zusätzliche klinische Zeichen waren von geringerer Bedeutung.

Bei den hier identifizierten Trägern einer *Parkin*-Mutation liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter bei ca. 30 Jahren und bestätigt damit die starke Assoziation von Mutationsrate und Erkrankungsalter.

Patienten mit EOPD und THS

Neben dem Ziel, Mutationsraten für THS-Patienten zu evaluieren, sollten anhand dieser Untersuchungen Kurz-Zeit- (1-3 Jahre) und Lang-Zeit-Effekte (3-6 Jahre) der chirurgischen Therapie bei Patienten mit bilateraler Stimulation des *Nucleus subthalamicus* beurteilt werden. Die vorliegende Arbeit ist Teil einer größeren Studie (Moro *et al.*, 2008).

In die EOPD-Untergruppe der THS-Patienten wurden ethnisch homogene Patienten mit sporadischem PS jungen Beginns mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 35 Jahren eingeschlossen. In dieser Gruppe wurden zwei Träger von Mutationen des *Parkin*-Gens identifiziert (8,3 %). Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren bislang nur 24 Patienten rekrutiert, welche in die Pilotstudie eingeschlossen wurden.

Mittlerweile wurden 80 Patienten untersucht, wovon elf (14 %) eine *Parkin*-Mutation aufweisen (Moro *et al.*, 2008). Es konnten verschiedene Ergebnisse für Mutationsträger und Patienten ohne Mutation eruiert werden. Bei den Patienten mit *Parkin*-Mutationen fand sich präoperativ eine stärkere Beeinträchtigung von Gang und posturaler Stabilität als bei den „mutations-negativen“ Patienten. Postoperativ konnten die Patienten ohne *Parkin*-Mutationen zunächst besser von der THS profitieren. Dieser (Kurz-Zeit-)Effekt verringerte sich jedoch drei Jahre nach Operation aufgrund der Entwicklung therapieresistenter axialer Zeichen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein unterschiedlicher dynamischer Prozess in der Krankheitsentwicklung von „mutations-

positiven“ und „mutations-negativen“ Patienten sein. Der Lang-Zeit-Effekt ist für Patienten mit und ohne *Parkin*-Mutationen bei einem Prozentsatz von 42 bzw. 44 % klinischer Verbesserung vergleichbar. In der Folge-Studie wurden 51 Patienten nach 5-6 Jahren nachuntersucht, wobei die Wirksamkeit der THS bestätigt werden konnte (Moro *et al.*, 2010).

Somit kann man zum jetzigen Zeitpunkt schlussfolgern, dass Patienten mit Mutationen von einer THS in einem ähnlichen Maße wie Patienten ohne Mutation profitieren können. Um genauere Aussagen treffen zu können, sollten weitere Studien mit großen Patientenzahlen folgen und die Patienten im längeren Langzeit-Verlauf evaluiert werden.

4.2.2. *Parkin*-Mutationen bei PS späten Beginns

Wie bereits erläutert, hat das Alter einen starken Effekt auf die Mutationshäufigkeit. In vielen Studien werden Patienten mit einem PS frühen Beginns, bei denen eine höhere Mutationsrate zu erwarten ist, untersucht. Bei Patienten mit LOPD (Erkrankungsalter über 50 Jahre) ist die Mutationshäufigkeit weitgehend unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund unterschiedlicher Erkrankungsalter Gruppen von PS-Patienten gebildet. Mit 1,6 % liegt die Mutationsrate am niedrigsten in der Gruppe der Patienten mit spätem Erkrankungsbeginn (LOPD), welche südtiroler Abstammung sind. Die hier untersuchten Patienten mit LOPD weisen größtenteils eine negative Familienanamnese auf, so dass das Auftreten genetischer Veränderungen unwahrscheinlicher ist als bei familiären Fällen.

Die wenigen vorhandenen Studien der letzten Jahre liefern ähnliche Mutationsraten von 0,5 % und 1,6 % bei Patienten mit LOPD norwegischer bzw. deutscher Herkunft (Schlitter *et al.*, 2006). Je nach Auswahl der Studiengruppe und angewendeten Methoden variieren die Mutationsfrequenzen bei LOPD abhängig davon ob familiäre oder sporadische PS-Patienten eingeschlossen wurden zwischen 0 und 11 % (Foroud *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2003; Mata *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2005; Schlitter *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2010). In die Studien mit den höchsten Mutationsraten von 11 % bzw. 10 % wurden beispielsweise Patienten mit einem Erkrankungsalter ab 45 Jahren (Foroud *et al.*, 2003) oder eine kleine Fallzahl familiärer LOPD-Patienten (Bras *et al.*, 2008) eingeschlossen.

Bei der heterozygoten Mutationsträgerin der LOPD-Gruppe handelt es sich bemerkenswerterweise um einen sporadischen Fall von LOPD. Die Patientin erkrankte im Alter von 70 Jahren und entwickelte die klassischen Symptome eines PS. Hier ist die Rolle von heterozygoten Mutationen als Suszeptibilitätsfaktor für ein Parkinson-Syndrom zu diskutieren (Klein *et al.*, 2007).

Es ist von klinischer Bedeutung, dass einzelne heterozygote Mutationen im rezessiven *Parkin*-Gen oder auch anderen rezessiven „Parkinson-Genen“ wahrscheinlich nicht ausreichen, um ein Parkinson-Syndrom zu verursachen. Jedoch können sie die Wahrscheinlichkeit für den Ausbruch der Erkrankung erhöhen (Klein *et al.*, 2007). In Kombination damit wirken weitere Umstände wie andere genetische Varianten und schädigende Umwelteinflüsse ein und führen letztendlich ab

einem bestimmten „Schwellenwert“ zur Erkrankung. Der Ausbruch der Erkrankung ist somit bei älteren Menschen wahrscheinlicher als bei jungen Menschen.

Bekräftigt wird diese Vermutung durch Studien, die nachweisen konnten, dass Patienten mit nur einer heterozygoten Mutation ein signifikant höheres Erkrankungsalter als Patienten mit zwei heterozygoten Mutationen aufweisen (Hedrich *et al.*, 2002; Kann *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2007). In der Studie von Sun *et al.* konnte ein detaillierter Zusammenhang von heterozygoten Mutationen und dem Erkrankungsalter gezeigt werden. Träger einer *Parkin*-Mutation haben ein 11,7-Jahre niedrigeres Erkrankungsalter als Patienten ohne Mutation, Träger von zwei *Parkin*-Mutationen haben ein wiederum 13,2-Jahre niedrigeres Erkrankungsalter als Träger einer heterozygoten Mutation (Sun *et al.*, 2006). Außerdem scheinen Träger von heterozygoten *Parkin*-Mutationen milder betroffen zu sein als Träger von zwei mutierten Allelen. Es lassen sich weiterhin unterschiedliche klinische Zeichen finden. Die Patienten mit einem einzigen mutierten Allel zeigen oft einen asymmetrischen Beginn der Symptomatik und häufig Levodopa-induzierte Fluktuationen sowie Dystonien (Lohmann *et al.*, 2003). In einer aktuellen Meta-Analyse wurden Träger heterozygoter Mutationen, Träger homozygoter bzw. *compound*-heterozygoter Mutationen und Patienten mit idiopathischen M. Parkinson bezüglich der klinischen Zeichen verglichen. Dyskinesien, Dystonien und tageszeitliche Schwankungen wurden am häufigsten unter den Trägern homozygoter bzw. *compound*-heterozygoter Mutationen gefunden. Außerdem konnte festgestellt werden, dass eine Demenz-Entwicklung bei Trägern von (heterozygoten und homozygoten bzw. *compound*-heterozygoten) *Parkin*-Mutationen sehr selten ist (Grünewald *et al.*, im Druck). Aus diesen interessanten Befunden ergeben sich somit auch Gesichtspunkte zur Gendiagnostik von Patienten mit PS für klinisch-diagnostische Zwecke.

Die Ausprägung der genannten klinischen Zeichen korreliert mit der Anzahl der mutierten Allele und lässt einen Dosis-Effekt vermuten (Grünewald *et al.*, im Druck). Es wird angenommen, dass verschiedene Effekte wie ein dominant-negativer, negativer oder *gain-of-funktion*-Effekt und eine Haplo-Insuffizienz, d. h., dass die Menge an synthetisiertem Protein von nur einer DNA-Kopie nicht ausreicht, zur Rolle der heterozygoten Mutationen als Suszeptibilitätsfaktor für ein PS beitragen (Klein *et al.*, 2007). Bereits 2002 spekulierten West *et al.*, dass eine Haplo-Insuffizienz des *Parkin*-Gens für einige Fälle ihrer untersuchten Patienten verantwortlich sein könnte. Weitere Studien bestätigen ebenso die Annahme, dass heterozygote Mutationen insbesondere bei LOPD als Suszeptibilitätsfaktor agieren (Foroud *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2003; Schlitter *et al.*, 2006). Die Arbeitsgruppe Pankratz *et al.* konnte zeigen, dass insbesondere durch heterozygote Gendosis-Mutationen eine *Parkin*-Haplo-Insuffizienz bewirkt und somit das Erkrankungsrisiko erhöht wird (Pankratz *et al.*, 2009). Andererseits wurden in einer großangelegten Studie bei knapp 1 % der PS-Patienten und Kontrollen heterozygote Gendosis-Mutationen entdeckt und daher geschlussfolgert, dass es keine Assoziation zum Parkinson-Syndrom gäbe. Allerdings fügten die Autoren an, dass sämtliche Gendosis-Mutationen der untersuchten Kontrollen die Bereiche des *Parkin*-Gens betreffen, die kein funktionelles Protein kodieren (Kay *et al.*, 2010). Vor kurzem konnte jedoch

durch eine genomweite Assoziationsstudie die Rolle von heterozygoten *Parkin*-Mutationen als Suszeptibilitätsfaktor fürs PS bestätigt werden und die Ergebnisse früherer richtungsweisender Studien validiert werden (Pankratz *et al.*, 2011).

4.2.3. *Parkin*-Mutationen bei Kontrollen

Die Untersuchung von 20 gesunden Kontrollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist Teil einer größeren Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Klein, wobei es sich um insgesamt 356 norddeutsche und aus Südtirol stammende Kontrollen handelt (Brüggemann *et al.*, 2009).

Die 20 Kontrollen, die in der vorliegenden Arbeit am WAVE-System untersucht wurden, weisen keine Punktmutationen, kleinen Deletionen oder Insertionen auf. Jedoch konnte bei einer Kontrolle (1/20) mittels quantitativer PCR eine heterozygote Duplikation von Exon 2 des *Parkin*-Gens detektiert werden. Insgesamt wurden unter den 356 Kontrollen 13 Mutationsträger mit heterozygoten Mutationen identifiziert (3,7 %). Es konnten keine homozygoten oder *compound*-heterozygoten Mutationen detektiert werden. Eine der eingeschlossenen gesunden Kontrollen, die eine heterozygote Mutation aufweist, zeigte bei der neurologischen Untersuchung drei Jahre nach Testung mit 67 Jahren milde Zeichen eines PS, ohne dass die Kriterien für ein PS erfüllt sind.

Bislang gibt es nur wenig Studien, die Kontrollen systematisch auf Mutationen in autosomal-rezessiven Genen getestet haben (Lincoln *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2007; Kay *et al.*, 2010). Diese „Fall-Kontroll“-Studien weisen Mutationsraten zwischen 0 und 3,7 % bei gesunden Kontrollen abhängig davon auf, welche Einschlusskriterien (Alter, Mutationsanalyse, klinische Untersuchung, ethnischer Hintergrund) angewendet wurden.

Bei den meisten der detektierten Gendosis-Mutationen so auch der Mutation (Ex2dup) handelt es sich um *frame-shift*-Mutationen (Elfferich *et al.*, 2011). Es kommt bei der Transkription zur Leseraster-Verschiebung mit folgendem Proteinabbruch. Es wäre aber auch eine ungestörte Transkription denkbar, bei der das zusätzliche Exon „ignoriert“ wird. Hinweise, wenn auch nicht Beweise zur Pathogenität der identifizierten Mutationen, kann man zum Beispiel durch neurologische und apparative Untersuchungen der mutations-positiven Kontrollen im Längsschnitt erhalten.

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass bei „gesunden“ Kontrollen im präklinischen Stadium oftmals Veränderungen mit bildgebenden Verfahren nachgewiesen werden können. Es wurden etwa bei asymptomatischen Trägern von *Parkin*-Mutationen Positronen-Emissions-Tomographie-(PET)Studien durchgeführt, die eine signifikante Reduktion der 18-Fluorodopa-Aufnahme zeigen und somit einen präklinischen Krankheits-Prozess vermuten lassen (Hilker *et al.*, 2001 und 2002; Khan *et al.*, 2002). Bei dem o. a. Patienten zeigte die transkranielle Duplex-Sonographie auffällige Befunde in Form einer signifikant erhöhten Hyperechogenität der *Substantia nigra*. Diese Hyperechogenität findet man bei 90 % der PS-Patienten (Becker *et al.*, 1995). In einer aktuellen Studie konnte man ebenso einen Anstieg der Hyperechogenität der *Substantia nigra* über die

Lebenszeit bei älteren gesunden Personen sehen (Hagenah *et al.*, 2010), wobei hier Gen-Untersuchungen fehlen und somit unklar bleibt, ob sich unter diesen Personen heterozygote Mutationsträger befinden.

Dringend werden mehr Studien mit älteren Kontrollpersonen, die sorgfältig neurologisch untersucht werden müssen und PS-Patienten mit LOPD benötigt, um weitere Aufschlüsse zur Rolle von heterozygoten Mutationen und letztendlich zur Pathogenese des PS zu erhalten.

4.2.4. Mutationen im *Core-Promotor* des *Parkin*-Gens

In die Analyse des *Parkin*-Gens eingeschlossen war auch die Promotorregion. Es wurden 116 PS-Patienten mit EOPD und 128 Kontrollen auf Sequenzveränderungen in diesem Bereich des Gens untersucht.

Zum Zeitpunkt des Studienbeginns gab es eine einzige Studie, die nach Sequenzveränderungen im Promotor bei Patienten mit EOPD suchte (West *et al.*, 2002a). Dabei wurden neun Veränderungen in einer Region von 5 kb identifiziert, wovon es sich um acht Polymorphismen handelt. Weiterhin konnte durch die Arbeitsgruppe an 296 Patienten und 184 Kontrollen gezeigt werden, dass einer dieser Polymorphismen [-258T/G] signifikant ($p < 0,05$) mit dem idiopathischen PS assoziiert ist (West *et al.*, 2002b).

In der vorliegenden Arbeit weisen jeweils ein Drittel der Patienten und Kontrollen den Polymorphismus im heterozygoten Zustand auf [-258T/G]. Das Wildtyp-Allel ist jeweils bei etwa zwei Drittel der Patienten und Kontrollen vorhanden [-258T/T]. Selten im Vergleich dazu kommt der Polymorphismus im homozygoten Zustand nur bei unter 4 % der Patienten und Kontrollen vor [-258G/G]. Andere Sequenzveränderungen wurden nicht detektiert.

Die Ergebnisse der Studie von West *et al.* konnten für das hier untersuchte norddeutsche Patientenkollektiv nicht bestätigt werden, da kein signifikanter Unterschied im Auftreten des Polymorphismus zwischen Patienten und Kontrollen identifiziert wurde.

In unterschiedlichen bisher veröffentlichten Studien wurden weitere Polymorphismen beschrieben, welche ebenfalls gleich häufig bei Patienten und Kontrollen vorkommen und somit keinen Zusammenhang zum Erkrankungsrisiko für das PS vermuten lassen. Dies wurde vor kurzem durch eine Analyse der bis *dato* beschriebenen *Parkin*-Promotor-Polymorphismen bestätigt (Chang *et al.*, 2011).

Die in dieser Studie erhobenen Befunde wurden durch weitere Arbeiten bekräftigt, die ebenso keine Häufigkeitsunterschiede beim Vorliegen des Polymorphismus [-258T/G] bei Patienten und Kontrollen feststellten (Mata *et al.*, 2002; Studien der eigenen Arbeitsgruppe; Ross *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2009). Allerdings wurde auch demonstriert, dass bei älteren chinesischen Menschen ein höheres Erkrankungsrisiko für ein PS besteht, wenn [-258T/G] vorliegt (Tan *et al.*, 2005). In einer Studie an 175 australischen Patienten mit PS konnte gezeigt werden, dass das Auftreten des homozygoten Polymorphismus [-258G/G] signifikant mit einem niedrigeren Erkrankungsalter für

das PS im Vergleich zum Wildtyp assoziiert ist. Keine Auswirkung auf das Erkrankungsalter ergab sich beim Vorliegen des von West *et al.* detektierten heterozygoten Polymorphismus (Sutherland *et al.*, 2007). Auch Chang *et al.* vermuten, dass [-258G/G] das Risiko für ein PS unter älteren Menschen speziell der chinesischen Bevölkerung erhöht und möglicherweise ein ethnisch spezifischer Effekt vorliegt (Chang *et al.*, 2011). Es wird angenommen, dass der Polymorphismus im homozygoten Zustand zu einer Erniedrigung von funktionellem Protein führt und dadurch zur frühzeitigeren Entwicklung eines PS beitragen könnte.

Wie bei den übrigen heterozygoten Mutationen des *Parkin*-Gens bleibt auch die Rolle dieses heterozygoten Polymorphismus im *Core*-Promotor als eventueller Suszeptibilitätsfaktor für ein PS zukünftig zu untersuchen. In der Konsequenz für die eigene Studie wären die gesunden Kontrollen, bei denen ein homozygoter und heterozygoter Polymorphismus vorliegt, im Langzeit-Verlauf zu evaluieren. Theoretisch müssten die fünf gesunden Träger des homozygoten Polymorphismus [-258G/G] in Kombination mit weiteren einwirkenden Faktoren (s. 4.2.1.) das höchste Risiko haben, an einem PS zu erkranken.

4.3. Mutationen im *DJ-1*-Gen

In der vorliegenden Arbeit wurden unter den 71 untersuchten PS-Patienten mit EOPD keine Träger von Gendosis-Veränderungen des *DJ-1*-Gens identifiziert. Bei einem der Patienten (1,4 %) wurde im Rahmen einer anderen Doktorarbeit (Schäfer, 2006) durch Untersuchung von Punktmutationen, kleinen Deletionen und Insertionen am WAVE-System eine Mutation im Intron 5 [IVS5+2-12del] im heterozygoten Zustand detektiert (Hedrich *et al.*, 2004).

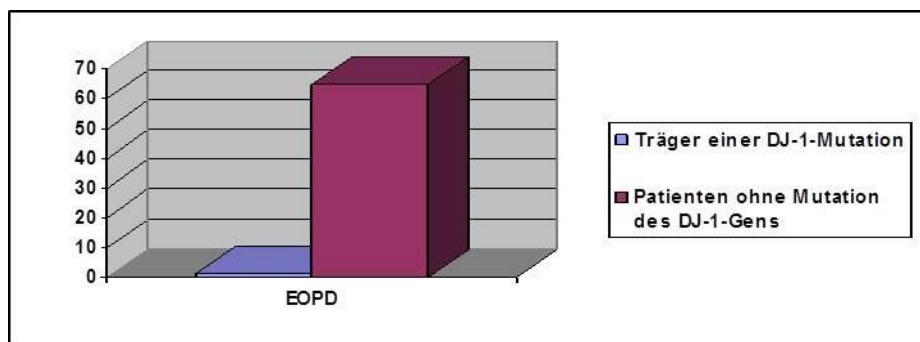


Abbildung 4.3.: Verhältnisse von Mutationsträgern/Personen ohne *DJ-1*-Mutation
Darstellung des Verhältnisses von Patienten mit Mutationen des *DJ-1*-Gens und Patienten ohne Mutation dieses Gens (y-Achse) aus der Gruppe der EOPD (x-Achse) in absoluten Zahlen.

Insgesamt konnten in den seit 2003 veröffentlichten Studien mehrere verschiedene Mutationen des *DJ-1*-Gens beschrieben werden. Im Vergleich zum *Parkin*-Gen wurden bisher nur wenige Mutationen (ca. 30) entdeckt und publiziert, die daher tabellarisch zusammen getragen wurden (Tabelle 7.8. und 7.9. im Anhang). Der Großteil der *DJ-1*-Mutationen liegt im größten Exon, Exon 7. Mutationen wurden aber auch in allen anderen kodierenden und nicht kodierenden Exons

detektiert. Bei den meisten Mutationen herrscht jedoch Unklarheit bezüglich der Pathogenität (Nuytemans *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Fakten lässt die Häufigkeit und Verteilung von Mutationen in den einzelnen Exons des *DJ-1*-Gens keinen stichhaltigen Schluss über mögliche Bedeutungen funktioneller Bereiche des Gens zu.

Zur Häufigkeit von *DJ-1*-Mutationen bei PS-Patienten mit EOPD gibt es im Vergleich zur Häufigkeit von *Parkin*-Mutationen weitaus weniger Studien (Bonifati *et al.*, 2003; Eerola *et al.*, 2003; Ibanez *et al.*, 2003; Abou-Sleiman *et al.*, 2003; Hague *et al.*, 2003; Hedrich *et al.*, 2004; Djarmati *et al.*, 2004; Lockhart *et al.*, 2004; Hering *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2004; Healy *et al.*, 2004; Karamohamed *et al.*, 2005; Annesi *et al.*, 2005). Alle in diesen Studien erhobenen Mutationsraten liegen zwischen 0 und 1,3 %. Es handelt sich zum größten Teil um Patienten mit EOPD. In den letzten Jahren wurden häufig verschiedene rezessive „Parkinson-Gene“ wie *Parkin*, *DJ-1* oder *PINK1* gemeinsam in einem Studien-Design untersucht bzw. Mutationsdaten der vorherigen Jahre ausgewertet (Nuytemans *et al.*, 2009; Alcalay *et al.*, 2010; Ghazavi *et al.*, 2011; Kilarski *et al.*, 2012). Dabei konnten die Ergebnisse der älteren Studien größtenteils validiert werden. Interessanterweise könnten bei iranischen EOPD-Patienten laut einer aktuellen Studie jedoch mehr als 12 % der Parkinsonfälle auf *DJ-1*-Mutationen zurückzuführen sein (Ghazavi *et al.*, 2011). Bei häufigem Vorkommen einer oder weniger Mutationen in der iranischen Bevölkerung könnte dies auf einen Gründer-Effekt hindeuten.

In den wenigen Studien, die Patienten mit LOPD evaluierten, wurden keine *DJ-1*-Mutationen gefunden (Abou-Sleiman *et al.*, 2003) bzw. wurde in einer gemischten PS-Kohorte bei einem Patienten mit 56-jährigem Erkrankungsalter eine heterozygote Mutation entdeckt (Keyser *et al.*, 2009).

Die in dieser Studie erhobene Mutationsrate von 1,4 % (1/71) unterstützt die Annahme, dass *DJ-1*-Mutationen im Hinblick auf die Assoziation des *DJ-1*-Gens mit dem autosomal-rezessiven EOPD eher selten sind.

Unter den 71 Patienten weisen im Vergleich elf Patienten (15,5 %) Mutationen des *Parkin*-Gens auf (3.4.). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass *DJ-1*-Mutationen deutlich seltener bei EOPD vorkommen als *Parkin*-Mutationen, jedoch als mögliche Ursache für ein autosomal-rezessives PS bei Patienten mit EOPD in Erwägung gezogen werden sollten. Unter eigener Beteiligung wurde dies in einer Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klein demonstriert (Hedrich *et al.*, 2004).

Nahezu alle bislang veröffentlichten Studien unterstützen die Annahme, dass *DJ-1*-Mutationen relativ selten beim PS vorkommen. In damaligen größeren Genom-Untersuchungen von PS-Patienten ohne *Parkin*-Mutation konnte keine Assoziation zum *DJ-1*-Gen festgestellt werden (Pankratz *et al.*, 2002; Nichols *et al.*, 2002). Heutzutage werden durch genomweite Assoziationsstudien bzw. deren Meta-Analyse Risiko-Orte bestimmt, die im Zusammenhang mit der Entwicklung eines PS stehen (Lill *et al.*, 2012). Unter den bisherigen 11 Orten mit genomweiter Signifikanz finden sich weder *DJ-1* noch *Parkin*, jedoch beispielsweise α -Synuklein und *LRRK2*, die somit sowohl causal als auch prädisponierend wirken können.

Hinsichtlich des Phänotyps bei PS-Patienten mit Mutationen des *DJ-1*-Gens zeigen sich zusätzliche klinische Zeichen zum klassischen PS, welche Patienten mit autosomal-rezessivem EOPD in Assoziation mit anderen rezessiven Genen wie *Parkin* oder *PINK1* teilen. Dazu zählen ein langsamer Krankheitsverlauf, eine gute und lang anhaltende Wirkung von Levodopa - auch von kleinen Dosen - und andere Symptome wie Dystonien oder psychiatrische Auffälligkeiten.

Der Phänotyp der identifizierten Trägerin der Mutation im Intron 5 [IVS5+2-12del] des *DJ-1*-Gens illustriert dies eindrücklich. Sie erkrankte mit 17 Jahren und entwickelte ein langsam progredientes, tremor-dominantes PS. An zusätzlichen Symptomen wurden eine Fingerdystonie und ein Zungentremor festgestellt. Das Ansprechen auf Levodopa wurde als sehr gut beurteilt.

Bezüglich der Auswirkung der identifizierten kleinen Deletion im Intron 5 [IVS5+2-12del] auf das DJ-1-Protein wird angenommen, dass es durch die Veränderung der Spleißregion zu einem vorzeitigen Abbruch des Proteins kommt. In diesem Fall wird ein Protein produziert, bei dem die Domänen fehlen, welche durch die deletierten Exons kodiert werden. Wie in 1.2.2. beschrieben, liegt das DJ-1-Protein als Homodimer vor. Bei pathogenen Mutationen fehlen somit wichtige Sequenzabschnitte zur Dimerisierung des Proteins, welches damit in seiner Funktionsfähigkeit eingeschränkt sein könnte (Andres-Mateos *et al.*, 2007; Hulleman *et al.*, 2007). Inwieweit eine Funktionseinschränkung oder ein Funktionsverlust bei verschiedenen Mutationen vorliegt, bleibt in weiteren Studien abzuklären. Bei der betroffenen Patientin war leider keine RNA für weiterführende Untersuchungen vorhanden.

4.4. Mutationen im *NR4A2*-Gen

In der vorliegenden Studie wurden 50 PS-Patienten mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 41,8 Jahren und positiver Familienanamnese auf das Vorliegen der von Le *et al.* 2003 beschriebenen Mutationen [-245T→G] und [-291Tdel] im Exon 1 untersucht. Die Arbeitsgruppe um Le fand diese beiden Mutationen bei 10/107 (9,3 %) Patienten mit autosomal-dominantem Erbgang.

Es konnten bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten keine Mutationen nachgewiesen werden (s. Tab. 7.11. im Anhang).

Bislang sind unter den wenigen identifizierten Mutationen die beiden voran genannten Mutationen bei familiären PS-Patienten sowie eine neu detektierte Mutation mit einer heterozygoten C→G Transversion im Exon 3 des *NR4A2*-Gens bei einem sporadischen PS-Patienten beschrieben worden. Diese Mutation stellt die erste kodierende Mutation des *NR4A2*-Gens dar (Grimes *et al.*, 2006; Jacobsen *et al.*, 2008). Es konnten in der Studie von Grimes und Mitarbeitern keine Sequenzveränderungen des Exons 1 bei 202 familiären bzw. sporadischen PS-Patienten festgestellt werden. In anderen Arbeiten wurden zwei weitere Sequenzveränderungen im Exon 1 bei zwei sporadischen PS-Patienten detektiert [-253C→T] und [-223C→T] (Hering *et al.*, 2004). Bei einem

chinesischen Patienten fand sich eine Sequenzveränderung im Intron 7 [7+33C→T], welche in einer Folgestudie an einer asiatischen Kohorte bei 5 - 10 % vorkam und somit einen Polymorphismus darstellt (Tan *et al.*, 2003 und 2004).

In diesen Studien wurden sowohl familiäre als auch sporadische PS-Patienten untersucht und die von Le *et al.* beschriebenen Mutationen nicht detektiert.

Die Tabelle 7.10. im Anhang fasst die bisher beschriebenen Mutationen, deren Auswirkung auf Proteinebene sowie den ethnischen Hintergrund der Patienten zusammen.

Des Weiteren wurden mehrere Polymorphismen detektiert, welche teilweise im Zusammenhang mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für ein PS stehen sollen. Hierzu zählt der homozygote Polymorphismus [IVS6+16insG], der bei 10/105 familiären PS-Patienten (9,5 %), bei 5/120 sporadischen PS-Patienten (4,2 %) und 2/221 Kontrollen (0,9 %) vorkommt (Xu *et al.*, 2002). In einer Folgestudie konnte der o. a. Polymorphismus nur im heterozygoten Zustand jedoch nicht im homozygoten Zustand häufiger bei PS-Patienten (18/37, 48,6 %) als bei Kontrollen (14/59, 23,7 %) gefunden werden (Zheng *et al.*, 2003). In anderen Studien wurden vergleichbare Häufigkeiten für das Vorkommen des Polymorphismus bei PS-Patienten und Kontrollen gefunden (Hering *et al.*, 2004; Grimes *et al.*, 2006; Healy *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007, Sutherland *et al.*, 2009). Healy *et al.* detektierten insgesamt zehn verschiedene Polymorphismen (inkl. [IVS6+16insG]) und fanden keine Häufigkeitsunterschiede zwischen den 802 PS-Patienten und den 784 Kontrollen sowie für die Untergruppen von EOPD und LOPD. Daher schlußfolgern sie, dass die bisher beschriebenen häufigen genetischen Varianten keinen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko für ein PS haben (Healy *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und anderer Studien konnten das von Le *et al.* angenommene häufige Vorkommen von *NR4A2*-Mutationen bei familiären PS-Patienten nicht bestätigen. In dem hier untersuchten Patientenkollektiv fand sich eine Mutationsrate von 0 %, die vergleichbar ist mit den Raten der anderen Folgestudien (0 - 0,5 %), welche in Tabelle 7.11. im Anhang aufgeführt sind.

Anhand von Arbeiten mit großen Stammbäumen (Pankratz *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2001), die mit größerer Wahrscheinlichkeit Gene mit autosomal-dominanten Mutationen detektieren würden als Untersuchungen nur von Geschwistern, konnte keine Kopplung zum *NR4A2*-Genlocus demonstriert werden. Auch wurde in einer Untersuchung von 12 Familien mit autosomal-rezessivem PS eine Kopplung zum *NR4A2*-Gen ausgeschlossen (Rawal *et al.*, 2002). Andererseits lassen Gentestungen von *NR4A2* in einer großen chinesischen Kohorte aufgrund des Vorkommens mehrerer Mutationen vermuten, dass *NR4A2* ein Suszeptibilitätsfaktor für PS in der chinesischen Population sein dürfte (Liu *et al.*, 2012).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt zeigt sich somit eine kontroverse Studienlage. Die Rolle von *NR4A2*-Mutationen im Zusammenhang mit familiärem sowie sporadischem PS ist weiterhin unklar. Allerdings gibt es im Vergleich zum *Parkin*- oder selbst dem *DJ-1*-Gen viel weniger Arbeiten, die die Rolle dieses Gens beim PS untersuchten. Interessant ist der Zusammenhang von

NR4A2-Mutationen und psychiatrischen Erkrankungen wie bipolaren Störungen oder Schizophrenie, in deren Pathogenese ebenso das dopaminerge System involviert ist (Buervenich *et al.*, 2000; Carmine *et al.*, 2003). Aktuelle Studien beleuchten die pathogenetischen Mechanismen an unterschiedlichen Signalstellen und zeigen auf, dass ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren (hier *DJ-1* und *NR4A2*) für die Entstehung eines PS relevant sein könnte. Beispielsweise ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *NR4A2* über einen ERK1/2 genannten Signalweg von *DJ-1* abhängig, was wiederum Auswirkungen auf die Regulierung der Tyrosinhydroxylase hat. Für die *DJ-1*-Mutation Leu166Pro konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg verändert wird (Lu *et al.*, 2012). Vorstellbar wären ebenso Auswirkungen von *NR4A2*-Mutationen auf diesem oder einem anderen für die Pathogenese des PS relevanten Signalweg. Eine systematische Beteiligung des Gens ist dabei nicht ausgeschlossen, was durch aktuelle Studien untermalt wird, die die Genexpression von *NR4A2* bei kaukasischen und chinesischen Patienten gemessen haben und eine signifikante Reduktion im Vergleich zu Kontrollen feststellten (Le *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012). Gerade aufgrund der wichtigen Funktion von *NR4A2* bei der Entwicklung von dopaminergen Neuronen sollten weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven erfolgen, um eine spezifische Bedeutung des *NR4A2*-Gens für das PS beurteilen zu können.

4.5. Fazit

Im Folgenden wird abschließend auf die in der Einleitung formulierten Zielsetzungen dieser Doktorarbeit eingegangen.

1. Häufigkeit und Bedeutung von *Parkin*-Mutationen bei Patienten mit EOPD, LOPD und Kontrollen.

In der vorliegenden Arbeit wurden unter den 87 Patienten mit EOPD elf Träger verschiedener *Parkin*-Mutationen ermittelt. Dies entspricht einer Mutationsträgerrate von 12,6 % für die untersuchten Patienten mit einem PS frühen Beginns. Es konnte eine Patientin mit PS späten Beginns als Trägerin einer heterozygoten *Parkin*-Mutation identifiziert werden. Die Häufigkeit von *Parkin*-Mutationen in dem untersuchten Kollektiv von 61 Patienten mit LOPD liegt somit bei 1,6 %. Die Ergebnisse bestätigen, dass Mutationen bei LOPD seltener sind und die Mutationshäufigkeit signifikant mit dem Erkrankungsalter assoziiert ist. *Parkin*-Mutationen kommen auch bei klinisch gesunden Kontrollen vor, die Rolle von heterozygoten Mutationen muss anhand der Untersuchung großer Kohorten geklärt werden.

- 1.1. Rolle von heterozygoten Mutationen des *Parkin*-Gens.

Heterozygote Mutationen fungieren höchst wahrscheinlich als Suszeptibilitätsfaktor für ein PS mit spätem Beginn.

1.2. Bedeutung von *Parkin*-Mutationen bei Patienten mit Tiefenhirn-Stimulation.

Unter den Patienten mit und ohne *Parkin*-Mutationen konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Unterschiede in den Langzeit-Effekten einer Tiefenhirn-Stimulation eruiert werden. Es ist zu vermuten, dass Patienten mit *Parkin*-Mutationen von einer THS profitieren.

1.3. Bedeutung von Mutationen im *Core*-Promotor

Der heterozygote Polymorphismus [-258T/G] im *Core*-Promotor lässt in der untersuchten Patientengruppe keine Assoziation zum PS erkennen.

2. Stellenwert von *DJ-1*-Mutationen bei Patienten mit EOPD

In der vorliegenden Arbeit wies die untersuchte Gruppe von 71 Patienten mit EOPD eine Mutationrate von 1,4 % auf. Die Ergebnisse bestätigen, dass *DJ-1*-Mutationen wesentlich seltener im Vergleich zu *Parkin*-Mutationen auftreten.

3. Bedeutung von *NR4A2*-Mutationen bei Patienten mit familiären PS.

Bei 50 PS-Patienten mit positiver Familienanamnese wurden keine Mutationen im Exon 1 des *NR4A2*-Gen detektiert. Mutationen dieses Gens scheinen sehr selten bei europäischen Patienten mit familiärem PS zu sein.

4.6. Ausblick

Seit der Erforschung der monogenen Parkinson-Syndrome sind viele verschiedene Mutationen in den rezessiven PS-Genen insbesondere dem *Parkin*-Gen entdeckt worden. Ob und wie sich die unterschiedlichen Mutationen auf die Pathogenese des PS auswirken, ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Neue Verfahren wie z. B. im Tiermodell eingesetzte bakterielle, künstliche Chromosomen, welche beispielsweise ein *Parkin*-Gen mit einer der bekannten Mutationen tragen, können wegweisende Befunde liefern.

Die Ergebnisse von bisherigen Studien zur Auswirkung von bestimmten Mutationen auf die Proteinfunktion von Parkin und DJ-1 tragen einen wichtigen Teil dazu bei, Theorien zur Pathogenese des Parkinson-Syndroms zu entwickeln. Unter den rezessiven Genen, die mit einem PS assoziiert sind, wurden gemeinsame Wirkmechanismen insbesondere in der Mitochondrienfunktion beschrieben. Ob hier ein Schlüssel zur Pathogenese gefunden werden kann, ist spannend, zumal Defekte in der Mitochondrienfunktion auch beim normalen Altersprozess und anderen Erkrankungen des Alters gefunden werden. Es bleibt weiterhin zu erforschen, ob die verschiedenen genetischen Veränderungen auf einen gemeinsamen Zellstoffwechselweg einwirken, der die Entwicklung eines PS erklären könnte.

Ein wesentliches klinisches Unterscheidungskriterium von Parkinson-Patienten mit *Parkin*-Mutation zu denen ohne Mutation ist das häufige Vorhandensein einer Dystonie und das seltene Vorkommen einer Demenz. Hieraus können sich Richtlinien für genetische Testungen ergeben, die Hand in Hand mit den neuen Untersuchungsmethoden dazu führen können, dass möglichst viele mutationspositive Patienten neuen Therapieformen zugänglich werden. Hier könnten Gen-spezifische Ansätze und evtl. auch Stammzell-Therapien vielversprechend sein.

Mithilfe der neuen gentechnischen Verfahren wie *next generation sequencing* ist es möglich, viele DNA-Proben in kurzer Zeit zu untersuchen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit groß, zukünftig weitere genetische Ursachen für das Parkinson-Syndrom zu finden und dem Schlüssel zur Pathogenese des PS näher zu kommen, wovon nicht nur mutationspositive Patienten profitieren würden.

Um Langzeit-Effekte bei Patienten mit und ohne *Parkin*-Mutationen hinsichtlich des Therapie-Erfolgs einer Tiefenhirn-Stimulation beurteilen zu können, müssen Patienten in Längsschnitt-Studien eingeschlossen werden.

Untersuchungen des *NR4A2*-Gens an Kollektiven unterschiedlichen ethnischen Hintergrundes können Aussagen zum Verständnis neuro-psychiatrischer Erkrankungen liefern. Bei einer systematischen Beteiligung des Gens in der Pathogenese des PS wären gentherapeutische Ansätze wie z. B. die Induktion von *NR4A2*-Gen denkbar.

Die Diskussion der Rolle heterozygoter Mutationen beim *Parkin*- wie auch dem *DJ-1*-Gen ist von besonderer Bedeutung und impliziert weitere molekular-genetische und klinische Untersuchungen an großen Patienten- und Kontroll-Kollektiven. Gesunde Träger von heterozygoten Mutationen mit erhöhtem Risiko für ein PS, beispielsweise ein Geschwister eines Parkinson-Patienten, könnten von neuroprotektiven Behandlungen profitieren.

5. Zusammenfassung

Das Parkinson-Syndrom ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Die Pathogenese ist letztlich nicht geklärt, jedoch haben genetische Faktoren einen bedeutenden Stellenwert. Die Identifizierung von genetischen PS-Formen trägt dazu bei, ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung zu erlangen. Es konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt verschiedene monogene Parkinson-Syndrome klassifiziert werden. Derzeit wird bei etwa 20 % der Patienten mit EOPD und bei weniger als 3 % der Patienten mit LOPD eine monogene Ursache identifiziert. Insbesondere das *Parkin*-assoziierte PS macht einen Großteil des rezessiv-vererbten PS aus. Des Weiteren wird das *DJ-1*-Gen mit einem rezessiv-vererbten PS in Verbindung gebracht, wahrscheinlich spielt es jedoch nur bei einer kleineren Anzahl von Fällen eine Rolle. Es wurden auch dominant-vererbte PS beschrieben, wobei die Häufigkeit von Mutationen in diesen Genen, wie dem in dieser Studie untersuchten *NR4A2*-Gen, gering ist.

Mittels der vorliegenden Arbeit wurde beabsichtigt, an Hand des Einsatzes molekulargenetischer Techniken ein besseres Verständnis der monogenen Parkinson-Syndrome zu erzielen. Hauptschwerpunkt war die Untersuchung des *Parkin*-Gens bei Patienten mit frühem und spätem Beginn des PS und bei gesunden Kontrollen.

1. Es wurde eine Methode zur Detektion von Punktmutationen, kleinen Deletionen und Insertionen im *Parkin*-Gen mittels dHPLC-Analyse am WAVE-System entwickelt. Diese Methode kann zur zügigen Untersuchung großer Patientenkollektive angewandt werden und ist auf andere Gene übertragbar, wobei sie jedoch relativ aufwendig und kostenintensiv ist. Diese Methode wird heutzutage vor allem als Referenzmethode angewandt.
2. *Parkin*-Mutationen kommen häufig bei Patienten mit Parkinson-Syndrom frühen Beginns vor. In der vorliegenden Studie tragen 12,6 % der Index-Patienten mit EOPD *Parkin*-Mutationen. Es wird deutlich, dass das Vorliegen einer *Parkin*-Mutation wahrscheinlicher ist, wenn eine positive Familienanamnese bekannt ist und die Erkrankung in den ersten Lebensdekaden auftritt. Klinisch finden sich sehr häufig Dystonien und selten Demenzen. Außerdem gibt es richtungsweisende Befunde, dass auch eine heterozygote *Parkin*-Mutation zum Parkinson-Syndrom prädisponiert, welches dann allerdings mit einem höheren Erkrankungsalter assoziiert zu sein scheint. Unter den Index-Patienten mit LOPD trug eine Patientin eine *Parkin*-Mutation im heterozygoten Zustand, somit betrug die Mutationsrate vergleichsweise nur 1,6 %. Ebenso wurde in der vorliegenden Arbeit ein „gesunder“ Träger einer heterozygoten *Parkin*-Mutation identifiziert. In diesem Falle bleibt abzuwarten, ob ein Parkinson-Syndrom klinisch in Erscheinung tritt, wenn ja, wird es wahrscheinlich mit einem höheren Erkrankungsalter assoziiert sein.

3. *Parkin*-Mutationen und häufige Varianten (Polymorphismen) wurden über das gesamte Gen verteilt identifiziert. Dabei konnte das Spektrum der bis dato bekannten Mutationen des *Parkin*-Gens um zwei Mutationen in Form von Exon-Deletionen von Exon 9 und 11 erweitert werden. Auch in der Promotor-Region des *Parkin*-Gens wurden Sequenzveränderungen bei Patienten und Kontrollen detektiert, welche jedoch in der hier untersuchten Kohorte keine Assoziation zum PS zeigen.
4. Die Therapiestrategien sind gegenwärtig noch unabhängig von dem genetischen Status der Patienten. Bei der Untersuchung von Patienten mit EOPD und Tiefenhirn-Stimulation zeigen sich vergleichbare Ergebnisse für diese Therapieform bei Patienten mit *Parkin*-assoziiertem PS und Patienten mit nicht genetisch bedingtem PS.
5. Unter den 71 Index-Patienten mit EOPD befindet sich nur eine Patientin mit einer heterozygoten Mutation des *DJ-1*-Gens. Im Vergleich zur Mutationsrate von 1,4 % für das *DJ-1*-Gen liegt die Mutationsrate für das *Parkin*-Gen in dieser Gruppe bei 15,5 %, da elf von den 71 Patienten eine *Parkin*-Mutation aufweisen. Bei der *DJ-1*-Mutationsträgerin konnte keine *Parkin*-Mutation detektiert werden. Die vorliegende Studie bestätigt, dass Mutationen im *DJ-1*-Gen seltener als *Parkin*-Mutationen sind. Aber dennoch kommen sie als mögliche Ursache für ein rezessives PS in Frage, wahrscheinlich sogar, wenn sie im heterozygoten Zustand vorliegen.
6. Mutationen beim rezessiven *Parkin*-assoziierten PS und anderen rezessiven PS-Formen wie dem *DJ-1*-assoziierten PS scheinen eher mit einem Funktionsverlust des jeweiligen Proteins einherzugehen, daher sollten Strategien zur Erhöhung der Proteinmenge entwickelt werden.
7. Die Mutationsanalyse des *NR4A2*-Gens, welches in Verbindung mit einer dominant vererbten PS-Form gebracht wird, konnte keine Träger von *NR4A2*-Mutationen unter den untersuchten Patienten mit familiärem PS detektieren. *NR4A2* könnte als ethnisch spezifischer Suszeptibilitätsfaktor fungieren.
8. Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit die wissenschaftlich anerkannte Bedeutung von *Parkin*-Mutationen und die eher untergeordnete Bedeutung von *DJ-1*-Mutationen beim rezessiv vererbten bzw. von *NR4A2*-Mutationen beim autosomal dominant vererbten Parkinson-Syndrom und zeigen auf, dass die genetische Forschung einen wesentlichen Schlüssel zum Verständnis der Pathophysiologie darstellt.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas N, Lücking CB, Ricard S, Dürr A, Bonifati V, De Michele G, Bouley S, Vaughan JR, Gasser T, Marconi R, Broussolle E, Brefel-Courbon C, Harhangi BS, Oostra BA, Fabrizio E, Bohme GA, Pradier L, Wood NW, Filla A, Meco G, Deneffe P, Agid Y, Brice A, the French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. A wide variety of mutations in the *parkin* gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. *Hum Mol Genet* 1999;8:567-574.
- 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;54:283-6.
- Aguiar P de C, Lessa PS, Godeiro C Jr, Barsottini O, Felício AC, Borges V, Silva SM, Saba RA, Ferraz HB, Moreira-Filho CA, Andrade LA. Genetic and environmental findings in early-onset Parkinson's disease Brazilian patients. *Mov Disord* 2008;23:1228-33.
- Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2004;351:1972-7.
- Andres-Mateos E, Perier C, Zhang L, Blanchard-Fillion B, Greco TM, Thomas B, Ko HS, Sasaki M, Ischiropoulos H, Przedborski S, Dawson TM, Dawson VL. DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:14807-12.
- Akazawa YO, Saito Y, Hamakubo T, Masuo Y, Yoshida Y, Nishio K, Shichiri M, Miyasaka T, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Noguchi N, Niki E. Elevation of oxidized DJ-1 in the brain and erythrocytes of Parkinson disease model animals. *Neurosci Lett* 2010;483(3):201-5.
- Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Tang MX, Rosado L, Ross BM, Verbitsky M, Kisselev S, Louis ED, Comella C, Colcher A, Jennings D, Nance MA, Bressman SB, Scott WK, Tanner C, Mickel S, Andrews H, Waters C, Fahn S, Cote L, Frucht S, Ford B, Rezak M, Novak K, Friedman JH, Pfeiffer R, Marsh L, Hiner B, Siderowf A, Ottman R, Marder K, Clark LN. Frequency of known mutations in early-onset Parkinson disease: implication for genetic counseling: the consortium on risk for early onset Parkinson disease study. *Arch Neurol* 2010;67(9):1116-22.
- Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 2008;255(5):18-32.
- Annesi G, Savettieri G, Pugliese P, D'Amelio M, Tarantino P, Ragonese P, La Bella V, Piccoli T, Civitelli D, Annesi F, Fierro B, Piccoli F, Arabia G, Caraciolo M, Cirò Candiano IC,

Quattrone A. DJ-1 mutations and parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex. *Ann Neurol* 2005;58:803-7.

- Asakawa S, Tsunematsu Ki, Takayanagi A, Sasaki T, Shimizu A, Shintani A, Kawasaki K, Mungall AJ, Beck S, Minoshima S, Shimizu N. The genomic structure and promoter region of the human *parkin* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:863-868.
- Bandopadhyay R, Kingsbury AE, Cookson MR, Reid AR, Evans IM, Hope AD, Pittman AM, Lashley T, Canet-Aviles R, Miller DW, McLendon C, Strand C, Leonard AJ, Abou-Sleiman PM, Healy DG, Ariga H, Wood NW, de Silva R, Revesz T, Hardy JA, Lees AJ. The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* 2004;127:420-30.
- Ballard PA, Tetrad JW, Langston JW. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology* 1985;35:949-56.
- Bardien S, Keyser R, Yako Y, Lombard D, Carr J. Molecular analysis of the parkin gene in South African patients diagnosed with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15:116-21.
- Barsottini OG, Felício AC, Aguiar Pde C, Godeiro-Junior C, Shih MC, Hoexter MQ, Bressan RA, Ferraz HB, Andrade LA. Clinical and molecular neuroimaging characteristics of Brazilian patients with Parkinson's disease and mutations in PARK2 or PARK8 genes. *Arq Neuropsiquiatr* 2009;67:7-11.
- Bayrakli F, Bilguvar K, Mason CE, DiLuna ML, Bayri Y, Gungor L, Terzi M, Mane SM, Lifton RP, State MW, Gunel M. Rapid identification of disease-causing mutations using copy number analysis within linkage intervals. *Hum Mutat* 2007;28:1236-40.
- Becker G, Seufert J, Bogdahn U, Reichmann H, Reiners K. Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology* 1995;45(1):182-4.
- Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010;23(4):228-42.
- Bertoli-Avella AM, Giroud-Benitez JL, Akyol A, Barbosa E, Schaap O, van der Linde HC, Martignoni E, Lopiano L, Lamberti P, Fincati E, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Squitieri F, Marini P, Abbruzzese G, Fabbrini G, Marconi R, Dalla Libera A, Trianni G, Guidi M, De Gaetano A, Boff Maegawa G, De Leo A, Gallai V, de Rosa G, Vanacore N, Mecocci G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P, Bonifati V; Italian Parkinson Genetics Network. Novel parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005;20:424-31.

- Betarbet R, Sherer TB, Di Monte DA, Greenamyre JT. Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Pathol* 2002;12:499-510.
- Bonifati V, Lucking CB, Fabrizio E, Periquet M, Meco G, Brice A. Three parkin gene mutations in a sibship with autosomal recessive early onset parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:531-534.
- 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 Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003;299:256-259.
- Bonifati V, Oostra BA, Heutink P. Linking DJ-1 to neurodegeneration offers novel insights for understanding the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Mol Med* 2004;82:163-74. Review.
- Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Tassorelli C, Tavella A, Marconi R, Nicholl DJ, Chien HF, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, De Gaetano A, Horstink MW, Maat-Kievit JA, Sampaio C, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Toni V, Guidi M, Dalla Libera A, Tinazzi M, De Pandis F, Fabbrini G, Goldwurm S, de Klein A, Barbosa E, Lopiano L, Martignoni E, Lamberti P, Vanacore N, Meco G, Oostra BA, Italian Parkinson Genetics Network. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 2005;65:87-95.
- Bras J, Guerreiro R, Ribeiro M, Morgadinho A, Januario C, Dias M, Calado A, Semedo C, Oliveira C, Hardy J, Singleton A. Analysis of Parkinson disease patients from Portugal for mutations in SNCA, PRKN, PINK1 and LRRK2. *BMC Neurol* 2008;8:1.
- Brüggemann N, Mitterer M, Lanthaler AJ, Djarmati A, Hagenah J, Wiegers K, Winkler S, Pawlack H., Lohnau T, Pramstaller PP, Klein C, Lohmann K. Frequency and clinical features of heterozygous Parkin mutations in control subjects. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15:425-9.
- Buervenich S, Carmine A, Arvidsson M, Xiang F, Zhang Z, Sydow O, Jönsson EG, Sedvall GC, Leonard S, Ross RG, Freedman R, Chowdari KV, Nimgaonkar VL, Perlmann T, Anvret M, Olson L. NURR1 mutations in cases of schizophrenia and manic-depressive disorder. *Am J Med Genet* 2000;96:808-13.
- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9103-8.

- Carmine A, Buervenich S, Galter D, Jönsson EG, Sedvall GC, Farde L, Gustavsson JP, Bergman H, Chowdari KV, Nimgaonkar VL, Anvret M, Sydow O, Olson L. NURR1 promoter polymorphisms: Parkinson's disease, schizophrenia, and personality traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003;120B:51-7.
- Chang XL, Mao XY, Li HH, Zhang JH, Li NN, Burgunder JM, Peng R, Tan EK. Functional parkin promoter polymorphism in Parkinson's disease: new data and meta-analysis. *J Neurol Sci* 2011;302(1-2):68-71.
- Charcot JM. De la paralysie agitante in Bourneville, DM: Oeuvres completes de J.M. Charcot. Delahay I.:Paris 1886;159-188.
- Charles PD, Padaliya BB, Newman WJ, Gill CE, Covington CD, Fang JY, So SA, Tramontana MG, Konrad PE, Davis TL. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus reduces antiparkinsonian medication costs. *Parkinsonism Relat Disord* 2004;10:475-9.
- Chartier-Harlin MC, Dachsel JC, Vilariño-Güell C, Lincoln SJ, Leprêtre F, Hulihan MM, Kachergus J, Milnerwood AJ, Tapia L, Song MS, Le Rhun E, Mutez E, Larvor L, Duflot A, Vanbesien-Mailliot C, Kreisler A, Ross OA, Nishioka K, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Melrose HL, Behrouz B, Keeling BH, Bacon JA, Hentati E, Williams L, Yanagiya A, Sonenberg N, Lockhart PJ, Zubair AC, Uitti RJ, Aasly JO, Krygowska-Wajs A, Opala G, Wszolek ZK, Frigerio R, Maraganore DM, Gosal D, Lynch T, Hutchinson M, Bentivoglio AR, Valente EM, Nichols WC, Pankratz N, Foroud T, Gibson RA, Hentati F, Dickson DW, Destée A, Farrer MJ. Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011;89(3):398-406.
- Chaudhary S, Behari M, Dihana M, Swaminath PV, Govindappa ST, Jayaram S, Goyal V, Maitra A, Muthane UB, Juyal RC, Thelma BK. Parkin mutations in familial and sporadic Parkinson's disease among Indians. *Parkinsonism Relat Disord* 2006;12:239-45.
- Chen R, Gosavi NS, Langston JW, Chan P. Parkin mutations are rare in patients with young-onset parkinsonism in a US population. *Parkinsonism Relat Disord* 2003;9:309-12.
- Chen CM, Chen IC, Chang KH, Chen YC, Lyu RK, Liu YT, Hu FJ, Chao CY, Lee-Chen GJ, Wu YR. Nuclear receptor NR4A2 IVS6 +18insG and brain derived neurotrophic factor (BDNF) V66M polymorphism and risk of Taiwanese Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007;144B:458-62.
- Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, Gearing M, Levey AI, Chin LS, Li L. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J Biol Chem* 2006;281:10816-24.

- Choi JM, Woo MS, Ma HI, Kang SY, Sung YH, Yong SW, Chung SJ, Kim JS, Shin HW, Lyoo CH, Lee PH, Baik JS, Kim SJ, Park MY, Sohn YH, Kim JH, Kim JW, Lee MS, Lee MC, Kim DH, Kim YJ. Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease. *Neurogenetics* 2008;9:263-9.
- Clark LN, Afridi S, Mejia-Santana H, Harria J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Singleton A, Wavrant De-Vrieze F, Hardy J, Mayeux R, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. Analysis of an early-onset Parkinson's disease cohort for DJ-1 mutations. *Mov Disord* 2004;19:796-800.
- Clark LN, Afridi S, Karlins E, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. Case-control study of the parkin gene in early-onset Parkinson disease. *Arch Neurol* 2006;63:548-52.
- Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* 2005;74:29-52. Review.
- Coppedè F. Genetics and epigenetics of Parkinson's disease. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:489830.
- Corti O, Hampe C, Koutnikova H, Darios F, Jacquier S, Prigent A, Robinson JC, Pradier L, Ruberg M, Mirande M, Hirsch E, Rooney T, Fournier A, Brice A. The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 2003;12:1427-37.
- Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's Disease and Residential Exposure to Maneb and Paraquat From Agricultural Applications in the Central Valley of California. *Am J Epidemiol* 2009;169(8): 919–926.
- Damian M, Davis TL, Konrad PE, Roberts AG, Pfister AA, Charles PD. Deep brain stimulation: a new treatment for Parkinson's disease. *Tenn Med* 2003;96:33-5.
- Dawson E, Abecasis GR, Bumpstead S, Chen Y, Hunt S, Beare DM, Pabial J, Dibling T, Tinsley E, Kirby S, Carter D, Papaspyridonos M, Livingstone S, Ganske R, Lohmussaar E, Zernant J, Tonisson N, Remm M, Magi R, Puurand T, Vilo J, Kurg A, Rice K, Deloukas P, Mott R, Metspalu A, Bentley DR, Cardon LR, Dunham I. A first-generation linkage disequilibrium map of human chromosome 22. *Nature* 2002;418:544-548.
- Deng H, Le WD, Hunter CB, Ondo WG, Guo Y, Xie WJ, Jankovic J. Heterogeneous phenotype in a family with compound heterozygous parkin gene mutations. *Arch Neurol* 2006;63(2):273-7.
- Deng H, Le WD, Hunter CB, Mejia N, Xie WJ, Jankovic J. A family with Parkinson disease, essential tremor, bell palsy, and parkin mutations. *Arch Neurol* 2007;64:421-4.

- Deng H, Le W, Shaded J, Xie W, Lankovic J. Mutation analysis of the parkin and PINK1 genes in American Caucasian early-onset Parkinson disease families. *Neurosci Lett* 2008;430:18-22.
- Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(38):14503-8.
- de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meche FG, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology* 1995;45:2143-6.
- 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.
- Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schäfer H, Bötzel K, Daniels C, Deutschländer A, Dillmann U, Eisner W, Gruber D, Hamel W, Herzog J, Hilker R, Klebe S, Kloss M, Koy J, Krause M, Kupsch A, Lorenz D, Lorenzl S, Mehdorn HM, Moringlane JR, Oertel W, Pinsker MO, Reichmann H, Reuss A, Schneider GH, Schnitzler A, Steude U, Sturm V, Timmermann L, Tronnier V, Trottenberg T, Wojtecki L, Wolf E, Poewe W, Voges J, German Parkinson Study Group, Neurostimulation Section. A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2006;355:896-908.
- Djarmati A, Hedrich K, Svetel M, Schäfer N, Juric V, Vukosavic S, Hering R, Rieß O, Romac S, Klein C, Kostic V. Detection of Parkin (PARK2) and DJ1 (PARK7) mutations in early-onset Parkinson disease: Parkin mutation frequency depends on ethnic origin of patients. *Hum Mutat* 2004;23:525.
- Djarmati A, Guzvić M, Grünewald A, Lang AE, Pramstaller PP, Simon DK, Kaindl AM, Vieregge P, Nygren AO, 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* 2007;22:1708-14.
- Dogu O, Johnson J, Hernandez D, Hanson M, Hardy J, Apaydin H, Ozekmekçi S, Sevim S, Gwinn-Hardy K, Singleton A. A consanguineous Turkish family with early-onset Parkinson's disease and an exon 4 parkin deletion. *Mov Disord* 2004;19:812-6.
- Eerola J, Hernandez D, Launes J, Hellström O, Hague S, Gulick C, Johnson J, Peuralinna T, Hardy J, Tienari PJ, Singleton AB. Assessment of a DJ-1 (PARK7) polymorphism in Finnish PD. *Neurology* 2003;61:1000-2.

- Elbaz A, Grigoletto F, Baldereschi M, Breteler MM, Manubens-Bertran JM, Lopez-Pousa S, Dartigues JF, Alperovitch A, Tzourio C, Rocca WA. Familial aggregation of Parkinson's disease: a population-based case-control study in Europe. EURO-PARKINSON Study Group. *Neurology* 1999;52:1876-82.
- 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;55:430-4.
- Elfferich P, Verleun-Mooijman MC, Maat-Kievit JA, van de Warrenburg BP, Abdo WF, Eshuis SA, Leenders KL, Hovestadt A, Zijlmans JC, Stroy JP, van Swieten JC, Boon AJ, van Engelen K, Verschuuren-Bemelmans CC, Lesnik-Oberstein SA, Tassorelli C, Lopiano L, Bonifati V, Dooijes D, van Minkelen R. Breakpoint mapping of 13 large parkin deletions/duplications reveals an exon 4 deletion and an exon 7 duplication as founder mutations. *Neurogenetics* 2011;12(4):263-71.
- Eng C, Brody LC, Wagner TM, Devilee P, Vijg J, Szabo C, Tavtigian SV, Nathanson KL, Ostrander E, Frank TS; Steering Committee of the Breast Cancer Information Core (BIC) Consortium. Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1. *J Med Genet* 2001;38:824-33.
- Fahn S, Elton RL, Members of the UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's Disease Rating Scale in Fahn S, Marsden C and Goldstein M: Recent Developments in Parkinson's Disease II. Macmillan: Florham Park 1987;153-163.
- Farrer M, Chan P, Chen R, Tan L, Lincoln S, Hernandez D, Forno L, Gwinn-Hardy K, Petrucelli L, Hussey J, Singleton A, Tanner C, Hardy J, Langston JW. Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* 2001;50:293-300.
- Farrer M, Stone J, Mata IF, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Strain KJ, Maraganore DM. LRRK2 mutations in Parkinson disease. *Neurology* 2005;65:738-40.
- Foroud T, Uniacke SK, Liu L, Pankratz N, Rudolph A, Halter C, Shults C, Marder K, Conneally PM, Nichols WC; Parkinson Study Group. Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease. *Neurology* 2003;60:796-801.
- Ghazavi F, Fazlali Z, Banihosseini SS, Hosseini SR, Kazemi MH, Shojaee S, Parsa K, Sadeghi H, Sina F, Rohani M, Shahidi GA, Ghaemi N, Ronaghi M, Elahi E. PRKN, DJ-1, and PINK1 screening identifies novel splice site mutation in PRKN and two novel DJ-1 mutations. *Mov Disord* 2011;26(1):80-9.
- Gibb WRG, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:745-752.

- 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;21:906-9.
- Grünewald A, Kasten M, Ziegler A, Klein C. Next generation phenotyping using the Parkin example: Time to catch up with genetics. In press.
- Guo JF, Xiao B, Liao B, Zhang XW, Nie LL, Zhang YH, Shen L, Jiang H, Xia K, Pan Q, Yan XX, Tang BS. Mutation analysis of Parkin, PINK1, DJ-1 and ATP13A2 genes in Chinese patients with autosomal recessive early-onset Parkinsonism. *Mov Disord* 2008;23:2074-9.
- Guo JF, Zhang XW, Nie LL, Zhang HN, Liao B, Li J, Wang L, Yan XX, Tang BS.. Mutation analysis of Parkin, PINK1 and DJ-1 genes in Chinese patients with sporadic early onset parkinsonism. *J Neurol* 2010;257(7):1170-5.
- Hagenah J, König IR, Sperner J, Wessel L, Seidel G, Condefer K, Saunders-Pullman R, Klein C, Brüggemann N. Life-long increase of substantia nigra hyperechogenicity in transcranial sonography. *Neuroimage*. 2010;51:28-32.
- Hague S, Rogaeva E, Hernandez D, Gulick C, Singleton A, Hanson M, Johnson J, Weiser R, Gallardo M, Ravina B, Gwinn-Hardy K, Crawley A, St George-Hyslop PH, Lang AE, Heutink P, Bonifati V, Hardy J. Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann Neurol* 2003;54:271-4.
- Hampe C, Ardila-Osorio H, Fournier M, Brice A, Corti O. Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum Mol Genet* 2006;15:2059-75.
- Hardy J. Genetic Analysis of Pathways to Parkinson Disease. *Neuron* 2010;68(2):201-206. Review.
- Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Yamamura Y, Yoshino H, Kobayashi T, Yokochi M, Wang M, Yoritaka A, Kondo T, Kuzuhara S, Nakamura S, Shimizu N, Mizuno Y. Molecular genetic analysis of a novel parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol* 1998a;44:935-941.
- Hattori N, Matsumine H, Asakawa S, Kitada T, Yoshino H, Elibol B, Brookes AJ, Yamamura Y, Kobayashi T, Wang M, Yoritaka A, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y. Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) in the parkin gene. *Biochem Biophys Res Com* 1998b;249:754-758.
- Hayashi K und Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 1993;2:338-346. Review.

- Hayashi S, Wakabayashi K, Ishikawa A, Nagai H, Saito M, Maruyama M, Takahashi T, Ozawa T, Tsuji S, Takahashi H. An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene. *Mov Disord* 2000;15:884-888.
- Healy DG, Abou-Sleiman PM, Valente EM, Gilks WP, Bhatia K, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:144-5.
- Healy DG, Abou-Sleiman PM, Ahmadi KR, Gandhi S, Mugit MM, Bhatia KP, Quinn NP, Lees AJ, Holton JL, Revesz T, Wood NW. NR4A2 genetic variation in sporadic Parkinson's disease: a genome-wide approach. *Mov Disord* 2006;21:1960-3.
- 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 Mol 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, Djarmati A, Schäfer N, Hering R, Wellenbrock C, Weiss PH, Hilker R, Vieregge P, Ozelius LJ, Heutink P, Bonifati V, Schwinger E, Lang AE, 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* 2004a;62:389-94.
- 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* 2004b; 19:1146-57.
- Hedrich K, Winkler S, Hagenah J, Kabakci K, Kasten M, Schwinger E, Volkmann J, Pramstaller PP, Kostic V, Vieregge P, Klein C. Recurrent LRRK2 (Park8) mutations in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006;21:1506-10.
- Hering R, Petrovic S, Mietz EM, Holzmann C, Berg D, Bauer P, Voitalla D, Müller T, Berger K, Krüger R, Riess O. Extended mutation analysis and association studies of Nurr1 (NR4A2) in Parkinson disease. *Neurology* 2004a;62:1231-2.
- Hering R, Strauss KM, Tao X, Bauer A, Voitalla D, Mietz EM, Petrovic S, Bauer P, Schaible W, Müller T, Schöls L, Klein C, Berg D, Meyer PT, Schulz JB, Wollnik B, Tong L, Krüger R, Riess O. Novel homozygous p.E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7). *Hum Mutat* 2004b;24:321-9.

- Herrero MT, Barcia C, Navarro JM. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst* 2002;18:386-404. Review.
- Hertz JM, Ostergaard K, Juncker I, Pedersen S, Romstad A, Møller LB, Güttler F, Dupont E. Low frequency of Parkin, Tyrosine Hydroxylase, and GTP Cyclohydrolase I gene mutations in a Danish population of early-onset Parkinson's Disease. *Eur J Neurol* 2006;13:385-90.
- Hilker R, Klein C, Ghaemi M, Kis B, Strotmann T, Ozelius LJ, Lenz O, Vieregge P, Herholz K, Heiss WD, Pramstaller PP. Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the parkin gene. *Ann Neurol* 2001;49:367-376.
- Hilker R, Klein C, Hedrich K, Ozelius LJ, Vieregge P, Herholz K, Pramstaller PP, Heiss W-D. The striatal dopaminergic deficit is dependent on the number of mutant alleles in a family with mutations in the parkin gene: evidence for enzymatic parkin function in humans. *Neurosci Lett* 2002;323:50-54.
- Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* 2007;68:326-37.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967;17:427-42.
- Hoenicka J, Vidal L, Morales B, Ampuero I, Jimenez-Jimenez FJ, Berciano J, del Ser T, Jimenez A, Ruiz PG, de Yébenes JG. Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain. *Arch Neurol* 2002;59:966-970.
- Hulleman JD, Mirzaei H, Guigard E, Taylor KL, Ray SS, Kay CM, Regnier FE, Rochet JC. Destabilization of DJ-1 by familial substitution and oxidative modifications: implications for Parkinson's disease. *Biochemistry* 2007;46:5776-89.
- Huynh DP, Scoles DR, Ho TH, Del Bigio MR, Pulst SM. Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells. *Ann Neurol* 2000;48:737-744.
- Huynh DP, Scoles DR, Nguyen D, Pulst SM. The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum Mol Genet* 2003;12:2587-97.
- Hristova VA, Beasley SA, Rylett RJ, Shaw GS. Identification of a novel Zn²⁺-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *J Biol Chem* 2009;284(22):14978-86.
- Ibáñez P, De Michele G, Bonifati V, Lohmann E, Thobois S, Pollak P, Agid Y, Heutink P, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Screening for DJ-1 mutations in early onset autosomal recessive parkinsonism. *Neurology* 2003;61:1429-31.

- Ibáñez P, Lohmann E, Pollak P, Durif F, Tranchant C, Agid Y, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *Neurology* 2004;62:2133-4.
- Illarioshkin SN, Periquet M, Rawal N, Lücking CB, Zagorovskaya TB, Slominsky PA, Miloserdova OV, Markova ED, Limborska SA, Ivanova-Smolenskaya IA, Brice A. Mutations analysis of the parkin gene in Russian families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Mov Disord* 2003;18:914-9.
- Imai Y, Soda M, Takahashi R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 2000;275:35661-35664.
- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 2001;105:891-902.
- Jeon BS, Kim JM, Lee DS, Hattori N, Mizuno Y. An apparently sporadic case with parkin gene mutation in a Korean woman. *Arch Neurol* 2001;58:988-989.
- Joselin AP, Hewitt SJ, Callaghan SM, Kim RH, Chung YH, Mak TW, Shen J, Slack RS, Park DS. ROS-dependent regulation of Parkin and DJ-1 localization during oxidative stress in neurons. *Hum Mol Genet* 2012;21(22):4888-903.
- Kahle PJ, Waak J, Gasser T. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radic Biol Med* 2009;47(10):1354-61.
- Kann M, Vieregge P, Jacobs H, Mohrmann K, Schumacher K, Hedrich K, Garrels J, Schwinger E, Pramstaller PP, Breakefield XO, Ozelius LJ, Klein C. The role of parkin mutations in 111 community-derived patients with early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2002;51:621-625.
- Karamohamed S, Golbe LI, Mark MH, Lazzarini AM, Suchowersky O, Labelle N, Guttman M, Currie LJ, Wooten GF, Stacy M, Saint-Hilaire M, Feldman RG, Liu J, Shoemaker CM, Wilk JB, DeStefano AL, Latourelle JC, 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, Herbert A, Myers RH. Absence of previously reported variants in the SCNA (G88C and G209A), NR4A2 (T291D and T245G) and the DJ-1 (T497C) genes in familial Parkinson's disease from the GenePD study. *Mov Disord* 2005;20:1188-91.
- Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Hattori N. Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32(10):573-80.
- 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 disease. *Ann Neurol* 2007;61:47-54.

- Kay DM, Stevens CF, Hamza TH, Montimurro JS, Zabetian CP, Factor SA, Samii A, Griffith A, Roberts JW, Molho ES, Higgins DS, Gancher S, Moses L, Zarepari S, Poorkaj P, Bird T, Nutt J, Schellenberg GD, Payami H. A comprehensive analysis of deletions, multiplications, and copy number variations in PARK2. *Neurology* 2010;75(13):1189-94.
- Keyser RJ, van der Merwe L, Venter M, Kinnear C, Warnich L, Carr J, Bardien S. Identification of a novel functional deletion variant in the 5'-UTR of the DJ-1 gene. *BMC Med Genet* 2009;10:105.
- Keyser RJ, Lombard D, Veikondis R, Carr J, Bardien S. Analysis of exon dosage using MLPA in South African Parkinson's disease patients. *Neurogenetics* 2010;11(3):305-12.
- Khan NL, Brooks DJ, Pavese N, Sweeney MG, Wood NW, Lees AJ, Piccini P. Progression of nigrostriatal dysfunction in a parkin kindred: an [18F]dopa PET and clinical study. *Brain* 2002;125:2248-56.
- Khan NL, Graham E, Critchley P, Schrag AE, Wood NW, Lees AJ, Bhatia KP, Quinn N. Parkin disease: a phenotypic study of a large case series. *Brain* 2003;126:1279-92.
- Kilarski LL, Pearson JP, Newsway V, Majounie E, Knipe MD, Misbahuddin A, Chinnery PF, Burn DJ, Clarke CE, Marion MH, Lewthwaite AJ, Nicholl DJ, Wood NW, Morrison KE, Williams-Gray CH, Evans JR, Sawcer SJ, Barker RA, Wickremaratchi MM, Ben-Shlomo Y, Williams NM, Morris HR. Systematic Review and UK-Based Study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27(12):1522-9.
- Kim JS, Lee KS, Kim YI, Lee KH, Kim HT. Homozygous exon 4 deletion in parkin gene in a Korean family with autosomal recessive early onset parkinsonism. *Yonsei Med J* 2003;44:336-9.
- Kim SJ, Park YJ, Hwang IY, Youdim MB, Park KS, Oh YJ. Nuclear translocation of DJ-1 during oxidative stress-induced neuronal cell death. *Free Radic Biol Med* 2012;53(4):936-50.
- 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.
- Kitada T, Asawaka S, Minoshima S, Mizuno Y, Shimizu N. Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. *Mamm Genome* 2000;11:417-21.
- Klein C, Pramstaller PP, Kis B, Page CC, Kann M, Leung J, Woodward H, Castellan CC, Scherer M, Vieregge P, Breakefield XO, Kramer PL, Ozelius LJ. Parkin deletions in a family

with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype. *Ann Neurol* 2000;48:65-71.

- Klein C, Hedrich K, Wellenbrock C, Kann M, Harris J, Marder K, Lang AE, Schwinger E, Ozelius LJ, Vieregge P, Pramstaller PP, Kramer PL. Frequency of parkin mutations in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54:415-6.
- Klein C, Djarmati A, Hedrich K, Schäfer 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 DJ1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur J Hum Genet* 2005;13:1086-93.
- 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;6:652-62. Review.
- Klein C, Lohmann-Hedrich K. Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2007;20(4):453-64. Review.
- Klein C, Schlossmacher MG. Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder. *Neurology* 2007;69:2093-104. Review.
- Kleiner-Fisman G, Herzog J, Fisman DN, Tamma F, Lyons KE, Pahwa R, Lang AE, Deuschl G. Subthalamic nucleus deep brain stimulation: summary and meta-analysis of outcomes. *Mov Disord* 2006;21:290-304. Review.
- Koziorowski D, Hoffman-Zacharska D, Slawek J, Szirkowiec W, Janik P, Bal J, Friedman A. Low frequency of the PARK2 gene mutations in Polish patients with the early-onset form of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2010 Feb;16(2):136-8.
- Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C, Koudsie A, Limousin PD, Benazzouz A, LeBas JF, Benabid AL, Pollak P. Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003;349:1925-34.
- Krause G, David S, Buchler W, Wehling M, Gerzer R. Distinction of weakly homologous cDNA amplicates by single-strand conformation polymorphism analysis: application to guanylyl cyclase isozymes. *Electrophoresis* 1994;15:557-561.
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitall D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genet* 1998;18:106-108.
- Krüger R, Vieira-Saecker AM, Kuhn W, Berg D, Müller T, Kuhn N, Fuchs GA, Storch A, Hungs M, Woitalla D, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. Increased susceptibility to

sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 1999;45:611-617.

- Krüger R, Schöls L, Rieß O. Idiopathisches Parkinson-Syndrom. In: Rieß O. und Schöls L. Neurogenetik. 2. Auflage, Stuttgart, Kohlhammer, 2002:326-333.
- Kumar KR, Lohmann K, Klein C. Genetics of Parkinson disease and other movement disorders. *Curr Opin Neurol* 2012;25(4):466-74.
- Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 1998a;339:1044-1053.
- Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 1998b;339:1130-1143.
- 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.
- Le W, Pan T, Huang M, Xu P, Xie W, Zhu W, Zhang X, Deng H, Jankovic J. Decreased NURR1 gene expression in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2008;273(1-2):29-33.
- Lee MJ, Mata IF, Lin CH, Tzen KY, Lincoln SJ, Bounds R, Lockhart PJ, Hulihan MM, Farrer MJ, Wu RM. Genotype-phenotype correlates in Taiwanese patients with early-onset recessive Parkinsonism. *Mov Disord* 2009;24:104-8.
- Leroy E, Anastasopoulos D, Konitsiotis S, Lavedan C, Polymeropoulos MH. Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Hum Genet* 1998;103:424-427.
- Lesage S, Lohmann E, Tison F, Durif F, Durr A, Brice A. Rare heterozygous parkin variants in French early-onset Parkinson's disease patients and controls. *J Med Genet* 2008;45:43-6.
- Lesage S, Anheim M, Condroyer C, Pollak P, Durif F, Dupuits C, Viallet F, Lohmann E, Corvol JC, Honoré A, Rivaud S, Vidailhet M, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2011;20(1):202-10.
- Levecque C, Destée A, Mouroux V, Amouyel P, Chartier-Harlin MC. Assessment of Nurr1 nucleotide variations in familial Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2004;366:135-8.
- Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, Kavvoura FK, Bagade S, Schjeide BM, Schjeide LM, Meissner E, Zauft U, Allen NC, Liu T, Schilling M, Anderson KJ, Beecham G, Berg D, Biernacka JM, Brice A, DeStefano AL, Do CB, Eriksson N, Factor SA, Farrer MJ, Foroud T,

Gasser T, Hamza T, Hardy JA, Heutink P, Hill-Burns EM, Klein C, Latourelle JC, Maraganore DM, Martin ER, Martinez M, Myers RH, Nalls MA, Pankratz N, Payami H, Satake W, Scott WK, Sharma M, Singleton AB, Stefansson K, Toda T, Tung JY, Vance J, Wood NW, Zabetian CP; 23andMe Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease Consortium; International Parkinson's Disease Genomics Consortium; Parkinson's Disease GWAS Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2), Young P, Tanzi RE, Khoury MJ, Zipp F, Lehrach H, Ioannidis JP, Bertram L. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet* 2012;8(3):e1002548.

- Lim KL, Ng XH, Grace LG, Yao TP. Mitochondrial dynamics and Parkinson's disease: focus on parkin. *Antioxid Redox Signal* 2012;16(9):935-49.
- Lincoln S, Maraganore DM, Lesnick TG, Bounds R, de Andrade M, Bower JH, Hardy JA, Farrer MJ. Parkin variants in North American Parkinson's disease: cases and controls. *Mov Disord* 2003;18:1306-11.
- Liu H, Wei L, Tao Q, Deng H, Ming M, Xu P, Le W. Decreased NURR1 and PITX3 gene expression in Chinese patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2012;19(6):870-5.
- Liu H, Tao Q, Deng H, Ming M, Ding Y, Xu P, Chen S, Song Z, Le W. Genetic analysis of NR4A2 gene in a large population of Han Chinese patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2012;10.1111/j.1468-1331.
- Lockhart PJ, Bounds R, Hulihan M, Kachergus J, Lincoln S, Lin CH, Wu RM, Farrer MJ. Lack of mutations in DJ1 in a cohort of Taiwanese ethnic Chinese with early-onset parkinsonism. *Mov Disord* 2004;19:1065-9.
- Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, Wood NW, De Michele G, Bonnet AM, Fraix V, Broussolle E, Horstink MW, Vidailhet P, Gasser T, Nicholl D, Teive H, Raskin S, Rascol O, Destee A, Ruberg M, Gasparini F, Meco G, Agid Y, Dürr A, Brice A. How much phenotypic variation can be attributed to Parkin genotype? *Ann Neurol* 2003;54:176-85.
- Lohmann E, Thobois S, Lesage S, Broussolle E, du Montcel ST, Ribeiro MJ, Remy P, Pelissolo A, Dubois B, Mallet L, Pollak P, Agid Y, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. A multidisciplinary study of patients with early-onset PD with and without parkin mutations. *Neurology* 2009;72:110-6.
- Lohmann-Hedrich K, Brüggemann N, Hagenah J, Klein C. Das Parkinson-Syndrom und seine genetischen Ursachen – eine Standortbestimmung. *Akt Neurol* 2007;34:151-161.

- Lu CS, Wu JC, Tsai CH, Chen RS, Chou YH, Hattori N, Yoshino H, Mizuno Y. Clinical and genetic studies on familial parkinsonism: the first report on a parkin gene mutation in a Taiwanese family. *Mov Disord* 2001;16:164-166.
- Lu L, Sun X, Liu Y, Zhao H, Zhao S, Yang H. DJ-1 upregulates tyrosine hydroxylase gene expression by activating its transcriptional factor Nurr1 via the ERK1/2 pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(1):65-71.
- Lücking CB, Abbas N, Dürr A, Bonifati V, Bonnet AM, de Broucker T, De Michele G, Wood NW, Agid Y, Brice A. Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease and the French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *Lancet* 1998;352:1355-6.
- Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:1560-7.
- Lücking CB, Bonifati V, Periquet M, Vanacore N, Brice A, Meco G. Pseudo-dominant inheritance and exon 2 triplication in a family with parkin gene mutations. *Neurology* 2001;57:924-7.
- Macedo MG, Verbaan D, Fang Y, van Rooden SM, Visser M, Anar B, Uras A, Groen JL, Rizzu P, van Hilten JJ, Heutink P. Genotypic and phenotypic characteristics of Dutch patients with early onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009;24:196-203.
- Maraganore DM, Farrer MJ, Hardy JA, Lincoln SJ, McDonnell SK, Rocca WA. Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease. *Neurology* 1999;53(8):1858-60.
- Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger 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(6):661-70.
- Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 2008;24(3):133-41.

- Marsh DJ, Theodosopoulos G, Howell V, Richardson AL, Benn DE, Proos AL, Eng C, Robinson BG. Rapid mutation scanning of genes associated with familial cancer syndromes using denaturing high-performance liquid chromatography. *Neoplasia* 2001;3:236-44.
- Maruyama M, Ikeuchi T, Saito M, Ishikawa A, Yuasa T, Tanaka H, Hayashi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Tsuji S. Novel mutations, pseudo-dominant inheritance, and possible familial affects in patients with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Ann Neurol* 2000;48:245-250.
- Mata IF, Lockhart PJ, Farrer MJ. Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2004;13(1):R127-33.
- Mata IF, Shi M, Agarwal P, Chung KA, Edwards KL, Factor SA, Galasko DR, Ginchina C, Griffith A, Higgins DS, Kay DM, Kim H, Leverenz JB, Quinn JF, Roberts JW, Samii A, Snapinn KW, Tsuang DW, Yearout D, Zhang J, Payami H, Zabetian CP. SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch Neurol* 2010;67(11):1350-6.
- Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, Yokochi M, Kobayashi T, Igarashi S, Takano H, Sanpei K, Koike R, Mori H, Kondo T, Mizutani Y, Schaffer AA, Yamamura Y, Nakamura S, Kuzuhara S, Tsuji S, Mizuno Y. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 1997;60:588-596.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- Miller DW, Ahmad R, Hague S, Baptista MJ, Canet-Aviles R, McLendon C, Carter DM, Zhu PP, Stadler J, Chandran J, Klinefelter GR, Blackstone C, Cookson MR. L166P mutant DJ-1, causative for recessive Parkinson's disease, is degraded through the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem* 2003;278:36588-95.
- Mitumoto A, Nakagawa Y. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res* 2001;35:885-93.
- Moore DJ, Zhang L, Dawson TM, Dawson VL. A missense mutation (L166P) in DJ-1, linked to familial Parkinson's disease, confers reduced protein stability and impairs homo-oligomerization. *J Neurochem* 2003;87:1558-67.
- Moro E, Volkmann J, König IR, Winkler S, Hiller A, Hassin-Baer S, Herzog J, Schnitzler A, Lohmann K, Pinsker MO, Voges J, Djarmati A, Seibler P, Lozano AM, Rogaeva E, Lang AE, Deuschl G, Klein C. Bilateral subthalamic stimulation in Parkin and PINK1 parkinsonism. *Neurology* 2008;70:1186-91.

- Moro E, Lozano AM, Pollak P, Agid Y, Rehnacrona S, Volkmann J, Kulisevsky J, Obeso JA, Albanese A, Hariz MI, Quinn NP, Speelman JD, Benabid AL, Fraix V, Mendes A, Welter ML, Houeto JL, Cornu P, Dormont D, Tornqvist AL, Ekberg R, Schnitzler A, Timmermann L, Wojtecki L, Gironell A, Rodriguez-Oroz MC, Guridi J, Bentivoglio AR, Contarino MF, Romito L, Scerrati M, Janssens M, Lang AE. Long-term results of a multicenter study on subthalamic and pallidal stimulation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2010;25(5):578-86.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DANN in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-73.
- Munoz E, Tolosa E, Pastor P, Marti MJ, Valldeoriola F, Campdelacreu J, Oliva R. Relative high frequency of the c.255delA parkin gene mutation in Spanish patients with autosomal recessive parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:582-584.
- Myhre R, Steinkjer S, Stormyr A, Nilsen GL, Abu Zayyad H, Horany K, Nusier MK, Klungland H. Significance of the parkin and PINK1 gene in Jordanian families with incidences of young-onset and juvenile parkinsonism. *BMC Neurol* 2008;8:47.
- Nichols WC, Pankratz N, Uniacke SK, Pauciulo MW, Halter C, Rudolph A, Conneally PM, Foroud T. Linkage stratification and mutation analysis at the Parkin locus identifies mutation positive Parkinson's disease families. *J Med Genet* 2002;39:489-492.
- Nisipeanu P, Inzelberg R, Blumen SC, Carasso RL, Hattori N, Matsumine H, Mizuno Y. Autosomal-recessive juvenile parkinsonism in a Jewish Yemenite kindred: mutation of Parkin gene. *Neurology* 1999;53:1602-1604.
- Nuytemans K, Meeus B, Crosiers D, Brouwers N, Goossens D, Engelborghs S, Pals P, Pickut B, Van den Broeck M, Corsmit E, Cras P, De Deyn PP, Del-Favero J, Van Broeckhoven C, Theuns J. Relative contributions of simple mutations versus copy number variations in five Parkinson disease genes in the Belgian population. *Hum Mutat* 2009;30(7):1054-61.
- Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* 2010;31(7):763-80. Review.
- Oliveri RL, Zappia M, Annesi G, Bosco D, Annesi F, Spadafora P, Pasqua AA, Tomaino C, Nicoletti G, Pirritano D, Labate A, Gambardella A, Logroscino G, Manobianca G, Epifanio A, Morgante L, Savettieri G, Quattrone A. The parkin gene is not involved in late-onset Parkinson's disease. *Neurology* 2001;57:359-362.
- Oliveira SA, Scott WK, Martin ER, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Ondo WG, Allen FH Jr, Scott BL, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F,

- Stajich JM, Zhang F, Booze MW, Winn MP, Middleton LT, Haines JL, Pericak-Vance MA, Vance JM. Parkin mutations and susceptibility alleles in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54:415-6.
- Olzmann JA, Brown K, Wilkinson KD, Rees HD, Huai Q, Ke H, Levey AI, Li L, Chin LS. Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J Biol Chem* 2004;279:8506-15.
 - Olzmann JA, Bordelon JR, Muly EC, Rees HD, Levey AI, Li L, Chin LS. Selective enrichment of DJ-1 protein in primate striatal neuronal processes: implications for Parkinson's disease. *J Comp Neurol* 2007;500(3):585-99.
 - Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2766-2770.
 - Orsucci D, Caldarazzo Ienco E, Mancuso M, Siciliano G. POLG1-related and other "mitochondrial Parkinsonisms": an overview. *J Mol Neurosci* 2011;44(1):17-24.
 - Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, López de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Martí-Massó JF, Pérez-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. Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Genet* 2002;71:124-35.
 - Pankratz N, Kissell DK, Pauciulo MW, Halter CA, Rudolph A, Pfeiffer RF, Marder KS, Foroud T, Nichols WC; Parkinson Study Group-PROGENI Investigators. Parkin dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations. *Neurology* 2009;73:279-86.
 - Pankratz N, Dumitriu A, Hetrick KN, Sun M, Latourelle JC, Wilk JB, Halter C, Doheny KF, Gusella JF, Nichols WC, Myers RH, Foroud T, DeStefano AL; PSG-PROGENI and GenePD Investigators, Coordinators and Molecular Genetic Laboratories. Copy number variation in familial Parkinson disease. *PLoS One* 2011;6(8):e20988.
 - Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002;14:223-36. Reprint in: Critchley 1955, 145-218.
 - Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S, Teive H, Fraix V, Vidailhet M, Nicholl D, Barone P, Wood NW, Raskin S, Deleuze JF, Agid Y, Dürr A, Brice A, French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic

Susceptibility in Parkinson's Disease. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 2003;126:1271-8.

- Poewe WH, Lees AJ, Stern GM. Dystonia in Parkinson's disease: clinical and pharmacological features. *Ann Neurol* 1988;73-78.
- 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 α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-2047.
- Poorkaj P, Nutt JG, James D, Ganther S, Bird TD, Steinbart E, Schellenberg GD, Payami H. Parkin mutations analysis in clinic patients with early-onset Parkinson [corrected] disease. *Am J Med Genet A* 2004;129:44-50.
- Poskanzer DC, Schwab RS. Cohort analysis of Parkinson's syndrome: Evidence for a single etiology related to subclinical infection about 1920. *J Chronic Dis* 1963;16:961-73.
- Quinn N, Critchley P, Marsden CD. Young onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 1987;2:73-91.
- Ragland M, Hutter C, Zabetian C, Edwards K. Association between the ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 gene (UCHL1) S18Y variant and Parkinson's Disease: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2009;170(11):1344-57.
- Rawal N, Periquet M, Dürr A, de Michele G, Bonifati V, Teive HA, Raskin S, Guimaraes J, Agid Y, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. Exclusion of the Nurr1 gene in autosomal recessive Parkinson's disease. *J Neurol* 2002;249:1127-9.
- Rawal N, Periquet M, Lohmann E, Lücking CB, Teive HA, Ambrosio G, Raskin S, Lincoln S, Hattori N, Guimaraes J, Horstink MW, Dos Santos Bele W, Brousolle E, Destée A, Mizuno Y, Farrer M, Deleuze JF, De Michele G, Agid Y, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. New parkin mutations and atypical phenotypes in families with autosomal recessive parkinsonism. *Neurology* 2003;60:1378-81.
- Ross OA, Haugarvoll K, Stone JT, Heckman MG, White LR, Aasly JO, Mark Gibson J, Lynch T, Wszolek ZK, Uitti RJ, Farrer MJ. Lack of evidence for association of Parkin promoter polymorphism (PRKN-258) with increased risk of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13(7):386-8.

- Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 2009;137(1):47-59.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic modification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 1985;230:1350-1354.
- Saito Y, Hamakubo T, Yoshida Y, Ogawa Y, Hara Y, Fujimura H, Imai Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Shichiri M, Nishio K, Kinumi T, Noguchi N, Kodama T, Niki E. Preparation and application of monoclonal antibodies against oxidized DJ-1. Significant elevation of oxidized DJ-1 in erythrocytes of early-stage Parkinson disease patients. *Neurosci Lett* 2009;465(1):1-5.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.
- Schäfer N. Molekulargenetische Untersuchung des DJ1- und Parkin-Gens bei Patienten mit Parkinson-Syndrom. Med. Diss. Lübeck, 2006.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
- Schlitter AM, Kurz M, Larsen JP, Woitalla D, Müller T, Epplen JT, Dekomien G. Parkin gene variations in late-onset Parkinson's disease: comparison between Norwegian and German cohorts. *Acta Neurol Scand* 2006;113:9-13.
- Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, Medina M, Sharma N, Forno L, Ochiishi T, Shimura H, Sharon R, Hattori N, Langston JW, Mizuno Y, Hyman BT, Selkoe DJ, Kosik KS. Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 2002;160:1655-1667.
- Schrag A, Ben-Shlomo Y, Brown R, Marsden CD, Quinn N. Young-onset Parkinson's disease revisited--clinical features, natural history, and mortality. *Mov Disord* 1998;13:885-94.
- Schweitzer KJ, Brüssel T, Leitner P, Krüger R, Bauer P, Woitalla D, Tomiuk J, Gasser T, Berg D. Transcranial ultrasound in different monogenetic subtypes of Parkinson's disease. *J Neurol* 2007;254:613-6.
- Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Masterman D, Mastaglia F, Laing NG, Stajich JM, Slotterbeck B, Booze MW, Ribble RC, Rampersaud E, West SG, Gibson RA, Middleton LT, Roses AD, Haines JL, Scott BL, Vance JM, Pericak-

Vance MA. Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes. *JAMA* 2001;286:2239-44.

- Seibler P. Bachelor thesis. Lübeck, 2006.
- Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology* 1993;43:1173-80.
- Shadrina MI, Semenova EV, Slominsky PA, Bagyeva GH, Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaia II, Limborska SA. Effective quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the parkin gene (PARK2) exon 1-12 dosage. *BMC Med Genet* 2007;8:6.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N, Mizuno Y. Immunohistochemical and subcellular localization of parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol* 1999;45:668-672.
- Shimura H, Hattori N, Kubo Si, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000;25:302-305.
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 2001;293:263-269.
- Sidransky E. Heterozygosity for a Mendelian disorder as a risk factor for a complex disease. *Clin Genet* 2006;70:275-82. Review.
- Simon-Sanchez J, Scholz S, Matarin Mdel M, Fung HC, Hernandez D, Gibbs JR, Britton A, Hardy J, Singleton A. Genomewide SNP assay reveals mutations underlying Parkinson disease. *Hum Mutat* 2008;29:315-22.
- 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, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003;302:2599-2608.
- Sinha R, Racette B, Perlmutter JS, Parsian A. Prevalence of parkin gene mutations and variations in idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11(6):341-7.
- Sironi F, Primignani P, Zini M, Tunesi S, Ruffmann C, Ricca S, Brambilla T, Antonini A, Tesei S, Canesi M, Zecchinelli A, Mariani C, Meucci N, Sacilotto G, Cilia R, Isaias IU, Garavaglia B, Ghezzi D, Travi M, Decarli A, Coviello DA, Pezzoli G, Goldwurm S. Parkin analysis in early onset Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14:326-33.

- Sleiman PM, Healy DG, Mugit MM, Yang YX, Van der Brug M, Holton JL, Revesz T, Quinn NP, Bhatia K, Diss JK, Lees AJ, Cookson MR, Latchman DS, Wood NW. Characterisation of a novel NR4A2 mutation in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett*. 2009;457:75-9.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18676-81.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat Neurosci* 2006;9:1231-3.
- Snapinn KW, Larson EB, Kawakami H, Ujike H, Borenstein AR, Izumi Y, Kaji R, Maruyama H, Mata IF, Morino H, Oda M, Tsuang DW, Yearout D, Edwards KL, Zabetian CP. The UCHL1 S18Y polymorphism and Parkinson's disease in a Japanese population. *Parkinsonism Relat Disord* 2011;17(6):473-5.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Tronanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839-40.
- 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;63:826-32.
- Sutherland G, Mellick G, Sue C, Chan DK, Rowe D, Silburn P, Halliday G. A functional polymorphism in the parkin gene promoter affects the age of onset of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2007;414:170-3.
- Sutherland GT, Halliday GM, Silburn PA, Mastaglia FL, Rowe DB, Boyle RS, O'Sullivan JD, Ly T, Wilton SD, Mellick GD. Do polymorphisms in the familial Parkinsonism genes contribute to risk for sporadic Parkinson's disease? *Mov. Disord*. 2009; 24:833-8.
- Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 2004;5:213-8.
- Takahashi K, Taira T, Niki T, Seino C, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor. *J Biol Chem* 2001;276:37556-63.

- Tan EK, Chung H, Zhao Y, Shen H, Chandran VR, Tan C, Teoh ML, Yih Y, Pavanni R, Wong MC. Genetic analysis of Nurr1 haplotypes in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2003;347:139-42.
- Tan EK, Tan C, Zhao Y, Yew K, Shen H, Chandran VR, Teoh ML, Yih Y, Pavanni R, Wong MC. Genetic analysis of DJ-1 in a cohort of Parkinson's disease patients of different ethnicity. *Neurosci Lett* 2004;367:109-12.
- Tan EK, Puong KY, Chan DK, Yew K, Fook-Chong S, Shen H, Ng PW, Woo J, Yuen Y, Pavanni R, Wong MC, Puvan K, Zhao Y. Impaired transcriptional upregulation of Parkin promoter variant under oxidative stress and proteasomal inhibition: clinical association. *Hum Genet* 2005;118:484-8.
- Tan EK, Shen H, Tan JM, Lim KL, Fook-Chong S, Hu WP, Paterson MC, Chandran VR, Yew K, Tan C, Yuen Y, Pavanni R, Wong MC, Puvan K, Zhao Y. Differential expression of splice variant and wild-type parkin in sporadic Parkinson's disease. *Neurogenetics* 2005;6:179-84.
- Tan JM, Dawson TM. Parkin blushed by PINK1. *Neuron* 2006;50:527-9.
- Tan EK, Yew K, Chua E, Puvan K, Shen H, Lee E, Puong KY, Zhao Y, Pavanni R, Wong MC, Jamora D, de Silva D, Moe KT, Woon FP, Yuen Y, Tan L. PINK1 mutations in sporadic early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006;21:789-93.
- Tan EK, Skipper LM. Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Hum Mutat* 2007;28:641-53.
- Tandberg E, Larsen JP, Nessler EG, Riise T, Aarli JA. The epidemiology of Parkinson's disease in the county of Rogaland, Norway. *Mov Disord* 1995;10:541-9.
- Tang B, Xiong H, Sun P, Zhang Y, Wang D, Hu Z, Zhu Z, Ma H, Pan Q, Xia JH, Xia K, Zhang Z. Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2006;15(11):1816-25.
- Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenber J, Chan P, Mayeux R, Langston JW. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 1999;281:341-346.
- Tarantino P, Civitelli D, Annesi F, De Marco EV, Rocca FE, Pugliese P, Nicoletti G, Carrideo S, Provenzano G, Annesi G, Quattrone A. Compound heterozygosity in DJ-1 gene non-coding portion related to parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15(4):324-6.
- Taylor JM, Wu RM, Lin CH, Delatycki MB, Lockhart PJ. Lack of evidence for association of a parkin promoter polymorphism with early-onset Parkinson's disease in a Chinese population. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15(2):149-52.
- Tetrad JW, Langston JW. MPTP-induced parkinsonism as a model for Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 1989;126:35-40.

- Thomas KJ, McCoy MK, Blackinton J, Beilina A, van der Brug M, Sandebring A, Miller D, Maric D, Cedazo-Minguez A, Cookson MR. DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Hum Mol Genet* 2011;20(1):40-50.
- Todd RD, Perlmutter JS. Mutational and biochemical analysis of dopamine in dystonia: evidence for decreased dopamine D2 receptor inhibition. *Mol Neurobiol* 1998;16:135-147.
- Touchman JW, Dehejia A, Chiba-Falek O, Cabin DE, Schwartz JR, Orrison BM, Polymeropoulos MH, Nussbaum RL. Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element. *Genome Res* 2001;11:78-86.
- Trancikova A, Tsika E, Moore DJ. Mitochondrial dysfunction in genetic animal models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2012;16(9):896-919.
- Tsuji S. Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing. *Hum Mol Genet* 2010;19(R1):R65-70.
- Ujike H, Yamamoto M, Yamaguchi K, Kanzaki A, Takagi M, Kuroda S. [Two cases of sporadic juvenile Parkinson's disease caused by homozygous deletion of Parkin gene] *No To Shinkei* 1999;51:1061-1064. Japanese.
- Ujike H, Yamamoto M, Kanzaki A, Okumura K, Takaki M, Kuroda S. Prevalence of homozygous deletions of the parkin gene in a cohort of patients with sporadic and familial Parkinson's disease. *Mov Disord* 2001;16:111-113.
- 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* 2004;56:336-341.
- Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM, Lincoln SJ, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Wilhoite GJ, Bacon JA, Behrouz B, Melrose HL, Hentati E, Puschmann A, Evans DM, Conibear E, Wasserman WW, Aasly JO, Burkhard PR, Djaldetti R, Ghika J, Hentati F, Krygowska-Wajs A, Lynch T, Melamed E, Rajput A, Rajput AH, Solida A, Wu RM, Uitti RJ, Wszolek ZK, Vingerhoets F, Farrer MJ. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011;89(1):162-7.
- Vogelstein B und Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:615-619.
- von Deimling A, Bender B, Louis DN, Wiestler OD. A rapid and non-radioactive PCR based assay for the detection of allelic loss in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993;19:524-9.

- Wang T, Liang Z, Sun S, Cao X, Peng H, Cao F, Liu H, Tong ET. Point mutations in the parkin gene on patients with Parkinson's disease. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2003;23:145-7.
- Wang T, Liang Z, Sun S, Cao X, Peng H, Liu H, Tong. Exon deletions of parkin gene in patients with Parkinson disease. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004;24:262-5.
- Wang A, Costello S, Cockburn M, Zhang X, Bronstein J, Ritz B. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *Eur J Epidemiol* 2011;26(7):547-55.
- Wang X, Petrie TG, Liu Y, Liu J, Fujioka H, Zhu X. Parkinson's disease-associated DJ-1 mutations impair mitochondrial dynamics and cause mitochondrial dysfunction. *J Neurochem* 2012;121(5):830-9.
- Waragai M, Wie J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, Akatsu H, Yamada T, Hashimoto M. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:967-72.
- West A, Farrer M, Petrucelli L, Cookson M, Lockhart P, Hardy J. Identification and characterization of the human parkin gene promoter. *J Neurochem* 2001;78:1146-1152.
- 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, Dürr A, Hardy J, Brice A, Farrer M. Complex relationship between Parkin mutations and Parkinson disease. *Am J Med Genet* 2002a;114:584-591.
- West AB, Maraganore D, Crook J, Lesnick T, Lockhart PJ, Wilkes KM, Kapatos G, Hardy JA, Farrer MJ. Functional association of the parkin gene promoter with idiopathic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2002b;11:2787-2792.
- Wu RM, Bounds R, Lincoln S, Hulihan M, Lin CH, Hwu WL, Chen J, Gwinn-Hardy K, Farrer M. Parkin mutations and early-onset parkinsonism in a Taiwanese cohort. *Arch Neurol* 2005;62:82-7.
- Wu YR, Wu CH, Chao CY, Kuan CC, Zhang WL, Wang CK, Chang CY, Chang YC, Lee-Chen GJ, Chen CM. Genetic analysis of Parkin in early onset Parkinson's disease (PD): Novel intron 9 g > a single nucleotide polymorphism and risk of Taiwanese PD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010;153B(1):229-34.
- Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, Tang C, Xia K, Jiang W, Ronai Z, Zhuang X, Zhang Z. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest* 2009;119(3):650-60.

- Xu PY, Liang R, Jankovic J, Hunter C, Zeng YX, Ashizawa T, Lai D, Le WD. Association of homozygous 7048G7049 variant in the intron six of Nurr1 gene with Parkinson's disease. *Neurology* 2002;58:881-4.
- Xu J, Zhong N, Wang H, Elias JE, Kim CY, Woldman I, Pifl C, Gygi SP, Geula C, Yankner BA. The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. *Hum Mol Genet* 2005;14:1231-41.
- Yamamura Y, Sobue I, Ando K, Iida M, Yanagi T. Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms. *Neurology* 1973;23:239-244.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yebenes JG. The new mutation. E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004;55:164-73.
- Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 1997;276:248-50.
- Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13354-13359.
- Zhang L, Shimoji M, Thomas B, Moore DJ, Yu SW, Marupudi NI, Torp R, Torgner IA, Ottersen OP, Dawson TM, Dawson VL. Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2005;14:2063-73.
- Zheng K, Heydari B, Simon DK. A common NURR1 polymorphism associated with Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Arch Neurol* 2003;60:722-5.
- Zhou W, Zhu M, Wilson MA, Petsko GA, Fink AL. The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein. *J Mol Biol* 2006;356:1036-48.
- Zimprich A, Asmus F, Leitner P, Castro M, Bereznaï B, Homann N, Ott E, Rutgers AW, Wieditz G, Trenkwalder C, Gasser T. Point mutations in exon 1 of the NR4A2 gene are not a major cause of familial Parkinson's disease. *Neurogenetics* 2003;4:219-20.
- 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, Müller-Miyhok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004;44:601-7.
- 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010;467(7319):1061-73.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
A	Adenin
α	Alpha
Abb.	Abbildung
Ag+	Silber
AgNO ₃	Silbernitrat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
Bp	Basenpaar(e)
brasil.	brasilianisch
bzw.	beziehungsweise
C	<i>Concentration</i>
C	Cytosin
C	Kohlenstoff
ca.	circa
°C	Celsius
cDNA	<i>Copy (complementary) DNA</i>
comp.	<i>compound</i>
cm	Zentimeter
cM	Centi Morgan
d	Schichtdicke
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
del	Deletion
dest.	destilliert
d.h.	das heisst
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
dHPLC	<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

ds	Doppelstrang
e	Extinktionsfaktor
E	Extinktion
Econst	Amplifikations-Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOPD	<i>early-onset Parkinson's Disease</i>
EtOH	Ethanol
Ex	Exon
f	Frau
f	Verdünnungsfaktor
FA	Familienanamnese
franz.	französisch
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
g	Gramm
G	Guanin
Gpe	externes Segment des <i>Globus pallidus</i>
Gpi	internes Segment des <i>Globus pallidus</i>
h	Stunde
het	heterozygot
hom	homozygot
HCl	Salzsäure
IBR	<i>In between Ring</i>
ital.	italienisch
IVS	intronischer Polymorphismus
kb	Kilobasenpaare
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter
LiCOR	<i>Long Read IR2-DNA Sequencer</i>
LOPD	<i>Late- onset Parkinson's Disease</i>
LRRK2	Leucine- rich repeat kinase2
M	Molar (g/mol)
m	Mann
m	Milli- (10^{-3})
m	Meter
Mb	Megabasen
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mm	Millimeter

min	Minute
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MP	Morbus Parkinson
mRNA	Messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
μ	Mikro- (10^{-6})
n	Nano- (10^{-9})
n	Anzahl
N	Menge
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NH ₄ Cl	Salpetersäure
Nr	Nummer
OD	Optische Dichte
o.a.	oben aufgeführt
p	Pico- (10^{-12})
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PET	Positronenemissions-Tomographie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PS	Parkinson-Syndrom
PS	Polystyrol
q	langer Arm eines Chromosoms
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SNCA	<i>α-Synuklein</i>
SNr	<i>Substantia nigra pars reticulata</i>
ss	Einzelstrang

SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
STN	<i>Nucleus subthalamicus</i>
STR	<i>short tandem repeat</i> , Mikrosatellitenmarker
t	<i>time</i>
T	Thymin
Tm	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamid
TEAA	Triethylammonium-Acetat
THS	Tiefenhirnstimulation
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i> (Maß für Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
V	Volt
vieln.	vietnamesisch
Vol	Volumen
W	Watt

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.: Schaltkreis zur Regulierung der Bewegung in den Basalganglien	7
Abbildung 1.2.: Schema zur Gen-Umwelt-Interaktion.....	9
Abbildung 1.3.: Schematische Darstellung des <i>Parkin</i> -Gens und <i>Parkin</i> -Proteins.	16
Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung des <i>DJ-1</i> -Gens.....	17
Abbildung 1.5.: Schematische Darstellung des <i>NR4A2</i> -Gens.	19
Abbildung 2.1.: Nach Hybridisierung entsteht <i>Hetero</i> - und <i>Homoduplex</i> -DNA.	32
Abbildung 2.2.: Spektrometrische Messung am <i>WAVE</i> -System	33
Abbildung 2.3.: Analysetemperaturen von <i>Hetero</i> - und <i>Homoduplex</i> -DNA	33
Abbildung 3.1.: Chromatogramm eines Polymorphismus im <i>Parkin</i> -Exon 11 am <i>WAVE</i> -System	39
Abbildung 3.2.: Agarosegele mit unverdauten und verdauten PCR-Produkten	41
Abbildung 3.3.: SSCP-Gel mit verdauten PCR-Produkten	41
Abbildung 3.4.: Sequenzausschnitt des <i>Parkin</i> -Gen-Promotors.....	42
Abbildung 3.5.: <i>LightCycler</i> -Bildschirm.....	42
Abbildung 3.6.: Auszug eines Chromatogramms nach Messung am <i>WAVE</i> -System.....	44
Abbildung 3.7.: SSCP-Gel und Sequenzausschnitt eines Polymorphismus im <i>Parkin</i> -Exon 2	45
Abbildung 3.8.: Ergebnisse der Gendosis-Untersuchungen mittels <i>LightCycler</i>	47
Abbildung 3.9.: Lokalisation der identifizierten <i>Parkin</i> -Mutationen.	48
Abbildung 3.10.: SSCP-Gel und Sequenzausschnitt eines Polymorphismus des <i>Parkin</i> -Exon 4 ...	50
Abbildung 3.11.: Ergebnisse der Gendosis-Untersuchungen bei LOPD	51
Abbildung 3.12.: Chromatogramm und Sequenzausschnitt eines Polymorphismus des <i>Parkin</i> -Exon 10.....	52
Abbildung 3.13.: Schema von <i>Parkin</i> / β - <i>Globin</i> -Verhältnissen bei einer heterozygoten Duplikation des <i>Parkin</i> -Exon 2.....	53
Abbildung 3.14.: Schema von <i>DJ-1</i> / β - <i>Globin</i> -Verhältnissen bei einer heterozygoten Deletion des <i>DJ-1</i> -Exon 5	54
Abbildung 3.15.: <i>Parkin</i> - und <i>DJ-1</i> -Mutationsträger bei EOPD	55
Abbildung 3.16.: Ausschnitte aus Sequenzgelen aus dem Exon 1 des <i>NR4A2</i> -Gens	57
Abbildung 4.1.: Verhältnisse von Mutationsträgern zu Personen ohne <i>Parkin</i> -Mutation.....	61
Abbildung 4.2.: Häufigkeit verschiedener <i>Parkin</i> -Mutationen bezogen auf die Allel-Variante	61
Abbildung 4.3.: Verhältnisse von Mutationsträgern/Personen ohne <i>DJ-1</i> -Mutation	69
Abbildung 7.1.: Auswertebildschirm der Quantifizierung mit dem <i>LightCycler</i>	132
Abbildung 7.2.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 3 des <i>Parkin</i> -Gens.....	133
Abbildung 7.3.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 1 des <i>Parkin</i> -Gens.....	133
Abbildung 7.4.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 4 des <i>Parkin</i> -Gens.....	133
Abbildung 7.5.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 5 des <i>Parkin</i> -Gens.....	133

Abbildung 7.6.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 6 des <i>Parkin</i> -Gens.....	134
Abbildung 7.7.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 8 des <i>Parkin</i> -Gens.....	134
Abbildung 7.8.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 7 des <i>Parkin</i> -Gens.....	134
Abbildung 7.9.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 9 des <i>Parkin</i> -Gens.....	135
Abbildung 7.10.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 10 des <i>Parkin</i> -Gens.....	135

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.: Genetische Formen des Parkinson-Syndroms	12
Tabelle 2.1.: Gene und Patientenkollektive	21
Tabelle 3.1.: Schmelztemperaturen der <i>Parkin</i> -Exons am WAVE-System.....	40
Tabelle 3.2.: Auflistung der im <i>Parkin</i> -Gen detektierten Sequenzabweichungen.....	45
Tabelle 3.3.: Detektierte Exon-Deletionen des <i>Parkin</i> -Gens bei Patienten mit EOPD	46
Tabelle 3.4.: Allelanzahl bei Deletionen und Duplikationen und deren Quotient (Messwert).....	46
Tabelle 3.5.: Detektierte Polymorphismen des <i>Parkin</i> -Gens bei LOPD-Patienten	49
Tabelle 3.6.: Zusammenfassung aller detektierten Sequenzabweichungen in Form von Polymorphismen in der Kontrollgruppe.....	52
Tabelle 3.7.: Genotypen des <i>Parkin</i> -Promotors.....	54
Tabelle 7.1.: Patientenliste EOPD	121
Tabelle 7.2.: Patientenliste LOPD	123
Tabelle 7.3.: Liste mit den Daten der Kontrollgruppe	125
Tabelle 7.4.: Patienten und Kontrollen zur Untersuchung des <i>Parkin</i> -Promotors.....	126
Tabelle 7.5.: Patientenliste zu den Untersuchungen des <i>NR4A2</i> -Gens.....	129
Tabelle 7.6.: Identifizierte qualitative Gen-Veränderungen des <i>Parkin</i> -Gens.....	136
Tabelle 7.7.: Identifizierte quantitative Gen-Veränderungen des <i>Parkin</i> -Gens.....	138
Tabelle 7.8.: Qualitative Mutationen des <i>DJ-1</i> -Gens	142
Tabelle 7.9.: Gendosis-Veränderungen des <i>DJ-1</i> -Gens.....	142
Tabelle 7.10.: Bisher in der Literatur beschriebene Mutationen des <i>NR4A2</i> -Gens	143
Tabelle 7.11.: Häufigkeit der von Le <i>et al.</i> beschriebenen <i>NR4A2</i> -Mutationen beim PS.....	143

7.4. Material

Alle verwendeten Chemikalien und Geräte sind mitsamt Hersteller aufgeführt.

7.4.1. Chemikalien

Acrylamid (30 %); rotiphoreseGel30	Roth
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Aqua Spüllösung	Delta-Pharma
Betain	Sigma
Borsäure	Merck
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Amersham Biosciences
EDTA (Titrplex III)	Merck
Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Merck
Formaldehyd 37 %	Sigma
Glycerin	Merck
Harnstoff	USB
Hybridisation <i>FastStart</i> -Mix	Roche
Kaliumhydrogencarbonat	Merck
<i>Long Ranger</i> -Gel-Lösung 50 %	Biozym
Magnesiumchlorid	Merck
Natriumcarbonat wasserfrei	Merck
Natriumchlorid	Merck
Molekulargewichtsstandard (100 bp)	Invitrogen
Primer	Biometra
Oligonukleotide	Biometra; MWG Biotech; TIB Molbiol
Oligonukleotide, markiert für LI-COR	MWG Biotech
Proteinase-Inhibitor	RocheDiagnostics
Restriktionsenzyme und Puffer/BSA	New England Biolabs; Invitrogen
Salpetersäure	Merck
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Amersham Biosciences
Silbernitrat	Caelo

Sonden für <i>LightCycler</i>	TIB Molbiol
Taq-DNA-Polymerase + Puffer	Quantum/Applicene; Eppendorf
Tetramethylethyldiamin (TEMED) 50	Sigma
Tris	ICN Biomedicals
Xylencyanol	Merck

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

7.4.2. Stammlösungen und Puffer

DNA-Isolation und Analyse:

Agarose 1 %:	1 g Agarose, 100 ml 1xTBE, 2µl Ethidiumbromid
Formamid-Farbstoff:	47,5 ml Formamid; 2,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); 0,01 g Bromphenolblau; 0,01 g Xylencyanol
Leidener-Lösung:	155 mM NH ₄ Cl; 10 mM KHCO ₃ ; 0,1 mM EDTA (pH 8,0); (steril filtriert)
Lyse-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 400 mM NaCl; 0,2 mM EDTA (pH 8,0); (steril filtriert)
Puffer A, für dHPLC:	50,0 ml 2M TEAA; 250 l Acetonitril; ad 1 l mit dH ₂ O
Puffer B, für dHPLC:	50,0 ml 2M TEAA; 250 ml Acetonitril; ad 1 l mit dH ₂ O
PAA-Gel, denaturierend für Sequenzierung:	3,3 ml <i>LongRanger</i> Acrylamidlösung (Biozym); 3,0 ml 10x TBE; 12,6 g Harnstoff (entspricht 7 M); ad 30 ml mit dH ₂ O; Polymerisieren mit 200 µl 10 % APS und 20 µl TEMED
SSCP-Acrylamid-Gellösung, denaturierend:	400 g Harnstoff, 200 ml Acrylamid-Gellösung (30 %), 200 ml 5x TBE, 800 µl TEMED, ad 1 l mit dH ₂ O; 60 ml Polymerisieren mit 500 µl 10 % APS
SSCP-Acrylamid-Gellösung, nicht-denaturierend:	6 / 8 % Acrylamidgellösung; 8 % Glycerin; in 1x TBE mit 1/1000 Vol. TEMED

1x TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0); (autoklaviert)
10x TBE-Puffer:	890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA

7.4.3. Geräte

dHPLC und <i>Software</i>	Transgenomics
Sequenziergerät, LI-COR IR2-DNA-Sequenzierer und <i>Software</i>	MWG Biotech
Spektrophotometer	Eppendorf
Thermocycler	
- Mastercycler	Eppendorf
- PTC-100 und PTC-200	Biozym
- <i>LightCycler</i> und <i>Software</i>	RocheDiagnostics

Alle hier nicht aufgeführten Standardgeräte wurden von den Firmen Eppendorf, Peqlab u. a. verwendet.

7.5. Primer und Sonden

Die für die SSCP- und Sequenzanalyse verwendeten *Primer* trugen am 5'-Ende die M13-*Primer*-Sequenz. Die Vorwärts-*Primer* waren um die M13F-Sequenz verlängert und die Rückwärts-*Primer* um die M13R-Sequenz.

7.5.1. Allgemeine *Primer*

<i>Primer</i> -Name	Region	Sequenz	<i>Annealing</i> -Temp. (°C)	Größe des PCR-Produktes (bp)
M13F-700	für alle Sequenzierungen	IRD700-CACGACGTTGTAAAACGAC	58	
M13R-800		IRD800-GATAACAATTCACACAGG		

7.5.2. *Primer* zur konventionellen *Parkin*-Mutationsanalyse

<i>Primer</i>	Region	Sequenz (nach Kitada <i>et al.</i> , 1998)	<i>Annealing</i> -Temp. (°C)	Größe des PCR-Produktes (bp)
Ex 1 F	Exon 1	GCGCGGCTGGCGCCGCTGCGCGCA ¹	72	112
Ex 1 R		GCGGCGCAGAGAGGCTGTAC ¹		
Ex 2 F	Exon 2	ATGTTGCTATCACCATTAAAGGG	55	308
Ex 2 R		AGATTGGCAGCGCAGGCGGCATG		
Ex 3/1 F	Exon 3, 5'-Teil	ACATGTCACTTTTGCTTCCCT	55	274
Ex 3/1 R		ACTGAGCTGCTGAGGTCCAC		
Ex 3/2 F	Exon 3, 3'-Teil	AGAAACGCGGCGGGAGGCTG	55	221
Ex 3/2 R		AGGCCATGCTCCATGCAGACTGC		
Ex 4 F	Exon 4	ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTTGT	55	261
Ex 4 R		AGGCAATGTGTTAGTACACA		
Ex 5 F	Exon 5	ACATGTCTTAAGGAGTACATTT	55	227
Ex 5 R		TCTCTAATTTCTTGGCAAACAGTG		
Ex 6 F	Exon 6	AGAGATTGTTTACTGTGGAAACA	55	268
Ex 6 R		GAGTGATGCTATTTTTAGATCCT		
Ex 7 F	Exon 7	TGCCTTTCCACACTGACAGGTACT	55	239
Ex 7 R		TCTGTTCTTCATTAGCATTAGAGA		
Ex 8 F	Exon 8	TGATAGTCATAACTGTGTGTAAG	55	206

Ex 8 R		ACTGTCTCATTAGCGTCTATCTT		
Ex 9 F	Exon 9	GGGTGAAATTTGCAGTCAGT	55	278
Ex 9 R		AATATAATCCCAGCCCATGTGCA		
Ex 10 F	Exon 10	ATTGCCAAATGCAACCTMTGTC	55	165
Ex 10 R		TTGGAGGAATGAGTAGGGCATT		
Ex 11 F	Exon 11	ACAGGGAACATAAACTCTGATCC	55	303
Ex 11 R		CAACACACCAGGCACCTTCAGA		
Ex 12 F	Exon 12	GTTTGGGAATGCGTGTTTT	55	255
Ex 12 R		AGAATTAGAAAATGAAGGTAGACA		

¹: Zusatz von 12 % Betain zur PCR

7.5.3. Primer für die dHPLC-Analyse im *Parkin*-Gen

Primer	Region	Sequenz	Annealing-Temp. (°C)	Größe des PCR-Produktes (bp)
Ex 1 F	Exon 1	GCGCGGCTGGCGCCGCTGCGCGCA	72	112
Ex 1 R		GCGGCGCAGAGAGGCTGTAC		
Ex 2 F	Exon 2	ATGTTGCTATCACCATTAAAGGG	65	308
Ex 2 R		AGATTGGCAGCGCAGGCGGCATG		
Ex 3W F	Exon 3	CACGACGTTGTAAAACGACTTTGCTT CCCTTCTACC	61	495
Ex 3W R		GGATAACAATTTACACAGGCCCTGC TTGGAGGAAT		
Ex 4 F	Exon 4	ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTTGT	59	261
Ex 4 R		AGGCAATGTGTTAGTACACA		
Ex 5 F	Exon 5	ACATGTCTTAAGGAGTACATTT	61	227
Ex 5 R		TCTCTAATTTCTGGCAAACAGTG		
Ex 6W F	Exon 6	TTAGAGGAAAAATGAGCAGCC	61	268
Ex 6W R		TATTGGGAAAGTAAGGAGGGG		
Ex 7 F	Exon 7	TGCCTTTCCACACTGACAGGTACT	59	239
Ex 7 R		TCTGTTCTTCATTAGCATTAGAGA		
Ex 8W F	Exon 8	CACGACGTTGTAAAACGACACGTCTG TGTCCTCCCAAAG	55	206
Ex 8W R		GGATAACAATTTACACAGGGCCCA AACTGTCTCATTAGCG		

Ex 9 F	Exon 9	GGGTGAAATTTGCAGTCAGT	61	278
Ex 9 R		AATATAATCCCAGCCCATGTGCA		
Ex 10W F	Exon 10	CACGACGTTGTAAAACGACGAGTAA AGAGTGAACAA	59	165
Ex 10W R		GGATAACAATTTACACAGGAAATA TGCACCCGGTG		
Ex 11 F	Exon 11	ACAGGGAACATAAACTCTGATCC	65	303
Ex 11 R		CAACACACCAGGCACCTTCAGA		
Ex 12 F	Exon 12	GTTTGGGAATGCGTGTTTT	61	255

7.5.4. *Primer zur quantitativen PCR für Gendosisbestimmungen im Parkin-Gen*

Primer	Region	Sequenz	Annealing-Temp. (°C)	Primer-Endkonzentration
β-Globin F	β-Globin-Gen	ACACAACCTGTGTTCACTAGC ²	55	0,5 pmol/μl
β-Globin R		CAACTTCATCCACGTTCCACC ²		
Park Ex 1 F	Parkin Exon 1	GCGCGGCTGGCGCCGCTGCGCGCA ^{3,4}	55	1,0 pmol/μl
Park Ex 1 R		GCGGCGCAGAGAGGCTGTAC ^{3,4}		
Park Ex 2 F	Parkin Exon 2	TTCAACTCCAGCCATGGTTTC	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 2 R		CCAGTCATTCCTCAGCTCCTTC		
Park Ex 3 F	Parkin Exon 3	GCAACTGGAGGCGACGAC	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 3 R		GTCCTTCCTGCTGTCAGTGTG		
Park Ex 4 F	Parkin Exon 4	GGTAGATCAATCTACAACAGCTTTT ATG	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 4 R		GTCAAGGTGAGCGTTGCC		
Park Ex 5 F	Parkin Exon 5	CCATCTTGCTGGGATGATGTT ⁵	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 5 R		TGCACTAGTCCCAGGGCA ⁵		
Park Ex 6 F	Parkin Exon 6	GGAATTTTCTTTAAATGTGGAGCA	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 6 R		GAGTGATGCTATTTTATGATCCT ³		
Park Ex 7 F	Parkin Exon 7	GAGCCCCGTCCTGGTTTT	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 7 R		ACAAGGCAGGGAGTAGCCAA		
Park Ex 8 F	Parkin Exon 8	TGATAGTCATAACTGTGTGTAAG ³	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 8 R		ACTGTCTCATTAGCGTCTATCTT ³		
Park Ex 9 F	Parkin Exon 9	AGCAGTATGGTGCAGAGGAGTG	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 9 R		CCCCTTCGCAGGTGACT		

Park Ex 10 F	Parkin Exon 10	GCCTTCTGCCGGAATGTA	55	1,0 pmol/μl
Park Ex 10 R		TTGGAGGAATGAGTAGGGCATT ³		
Park Ex 11 F	Parkin Exon 11	CGCCTACAGAGTCGATGAAAGAG	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 11 R		TTTTTCCACTGGTACATGGCAG		
Park Ex 12 F	Parkin Exon 12	CGAGTGGTGCTGGAAGTGTG	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 12 R		AATTGAAGGTAGACACTGGGTATG		

2: Primer publiziert bei Wittwer *et al.*, 1997

3: Primer publiziert bei Kitada *et al.*, 1998

4: Zusatz von 1 % Glycerin zur PCR

5: Zusatz von 3 % Formamid zur PCR

7.5.5. Sonden zur quantitativen PCR für Gendosisbestimmungen im *Parkin*-Gen

Sonde	Region	Sequenz	Mg ²⁺ -Endkonzentration
β-GlobinLC	β-Globin-Gen	L-AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAA	2,0 – 4,5 mM
β-GlobinFL		CAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGA-F	
Park Ex 1LC	Parkin Exon 1	L-CCCGCAGCCGCCACCTACC	4,5 mM
Park Ex 1FL		CGCGCATGGGCCTGTTCCTG-F	
Park Ex 2LC	Parkin Exon 2	L-ATGCTGGTGTGAGAATCGACCTCCAC	3,0 mM
Park Ex 2FL		GCAACCACCTCCTTGAGCTGGAA-F	
Park Ex 3LC	Parkin Exon 3	L-TCAGCAGCTCAGTCCTCCCAGGAG	3,0 mM
Park Ex 3FL		CCCAGAGCTTGACTCGGGTGGAC-F	
Park Ex 4LC	Parkin Exon 4	L-CTCAGGGTACAGTGCAGCACCTGC	3,0 mM
Park Ex 4FL		CCTGTCAAAGAGTGCAGCCGGGA-F	
Park Ex 5LC	Parkin Exon 5	L-AATGCCAATCCCCACACTGC	4,5 mM
Park Ex 5FL		TTTTAATTCCAAACCGGATGAGTGGT-F	
Park Ex 6LC	Parkin Exon 6	L-CGCAACAAATAGTCGGAACATCACTTG	3,0 mM
Park Ex 6FL		GGAAACACCAGTAGCTTTGCACCTGA-F	
Park Ex 7LC	Parkin Exon 7	L-TACTGTGTGACAAGACTCAATGATCGGCA	3,0 mM
Park Ex 7FL		CCACGTGATTGTCTTAGACTGTTTCCAC-F	
Park Ex 8LC	Parkin Exon 8	L-CTTTAATCAAGGAGTTGGGACAGCCA	3,0 mM
Park Ex 8FL		CTCCCAGAATCCTGAAGTGATGGAGC-F	
Park Ex 9LC	Parkin Exon 9	L-CTGCTGCCGGAGCCTGACCAGA	3,0 mM
Park Ex 9FL		CCCCGCCCTGGCTGTGGAGC-F	

Park Ex 10LC	Parkin Exon 10	L-GCACTCCCCTTCATGGTACGCTTC	2,0 mM
Park Ex 10FL		TGTTCCCTGAGGCTTCAAATACGGCAC-F	
Park Ex 11LC	Parkin Exon 11	L-AAGAAAACCACCAAGCCCTGTCCCC	3,0 mM
Park Ex 11FL		TGGGAAGCAGCCTCCAAAGAAACCAT-F	
Park Ex 12LC	Parkin Exon 12	L-TGGTCCCCCATGCAGACGCGGT	3,0 mM
Park Ex 12FL		CCGCCCTGGCTACACGTCGAACC-F	

7.5.6. Primer für die Schmelzkurvenanalyse am Core-Promotor des Parkin-Gens

Primer-Name	Region	Sequenz	Annealing-Temp. (°C)	Größe des PCR-Produktes (bp)
Prom 2 F	Core-Promotor	TTACGGATGTGAGCAGGAGGTC	58	
Prom 2 R		TTCAGGCCCAGCAATCTTACG		

7.5.7. Sonden für die Schmelzkurvenanalyse am Core-Promotor des Parkin-Gens

Sonde	Region	Sequenz	Mg ²⁺ -Endkonzentration
Sensor (G)	Core Promotor	GCAGCTCTAGCCCAGGTCC	2,0 – 4,5 mM
Anchor		GCCCTCTTCCCGCCCCGCCCT	

7.5.8. Primer zur quantitativen PCR für Gendosisbestimmungen im DJ-1-Gen

Primer-Name	Region	Sequenz	Annealing-Temp. (°C)	Primer-Endkonzentration
Ex 2 F	DJ-1 Exon 2	TTTTTTTTTTTTTAAGGCTTGTAAC	57	1,0 pmol/μl
Ex 2 R		GGCTAAAAATCGATGTGGGACT		
Ex 3 F	DJ-1 Exon 3	AGATTAAGGTCACCGTTGCAG	57	1,0 pmol/μl
Ex 3 R		TGAAGGAATAACTCCATGTATGGAT		
Ex 4 F	DJ-1 Exon 4	TTGTTTCTTTATGTTTAAACTGTACA	53	1,5 pmol/μl
Ex 4 R		CCAGCTTTATTGAGGTATAATTGAGTA		

Ex 5 F	DJ-1 Exon 5	AGGTCAGAGAGCTTGTGGTTT	60	0,5 pmol/μl
Ex 5 R		ACCAATGACGCTGCAACAC		
Ex 6 F	DJ-1 Exon 6	CTGCACTTAGATCTTTTTATTTTATT	52	1,5 pmol/μl
Ex 6 R		C CAAACAAACAAAAACAAGCATATAC		
Ex 7 F	DJ-1 Exon 7	CATTACACCTACTCTGAGAATCGTG	57	0,5 pmol/μl
Ex 7 R		TCCTAACGGCCTGTTTCTCTAA		

7.5.9. Sonden zur quantitativen PCR für Gendosisbestimmungen im DJ-1-Gen

Primer-Name	Region	Sequenz	Mg ²⁺ -Endkonzentration
β-Globin LC	β-Globin-Gen	L-AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAA	2,0 – 4,5 mM
β-Globin FL		CAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAG GA-F	
Ex 2 LC	DJ-1 Exon 2	L- CTGGTCATCCTGGCTAAAGGAGCA	3,0 mM
Ex 2 FL		GGAAATGGAGACGGTCATCCCTGT-F	
Ex 3 LC	DJ-1 Exon 3	L- AGACCCAGTACAGTGTAGCCGTGATG	3,0 mM
Ex 3 FL		GGTCATTTGTCCTGATGCCAGCC-F	
Ex 4 LC	DJ-1 Exon 4	L- CAGATAAAATTCTGTGCGCCCAGATT	4,5 mM
Ex 4 FL		CCTCCTGGTAGAACCACCACATCA-F	
Ex 5 LC	DJ-1 Exon 5	L- TCTTTTCACTAGTCTGCTGCTGTGAAGG	3,0 mM
Ex 5 FL		ATACTGAAGGAGCAGGAAAACCGGAAG-F	
Ex 6 LC	DJ-1 Exon 6	L- CCTCCATTTCATCATTTTGTCTTTAGCAAG	3,8 mM
Ex 6 FL		GGTGTGTTGTAACCTTACTTCCAAAACC-F	
Ex 7 LC	DJ-1 Exon 7	L- TTGCCATTTCAGGGCTTCAACAATT	3,0 mM
Ex 7 FL		CAAGCGCAAACCTCGAAGCTGGTC-F	

7.5.10. Primer zur Sequenzierung im DJ-1-Gen

Primer-Name	Region	Sequenz	Annealing-Temp. (°C)	Größe des PCR-Produktes (bp)
Ex 2 F	DJ-1 Exon 2	GGGGTATCTCAGGGTTGCAATG	59	199
Ex 2 R		TGGCTAAAAATCGATGTGGGACT		

Ex 3 F	<i>DJ-1</i> Exon 3	GGTGAGACCCCATCTCTCTTT	58	247
Ex 3 R		AACAAAGAAGCCATATGAAGGAA		
Ex 4 F	<i>DJ-1</i> Exon 4	GCTATCTCCTGTACTTCCCACA	55	201
Ex 4 R		TTGAGGTATAATTGAGTAGAATTTTT		
Ex 5 F	<i>DJ-1</i> Exon 5	AGGTCAGAGAGCTTGTGGTTT	59	223
Ex 5 R		ACCAATGACGCTGCAACAC		
Ex 6 F	<i>DJ-1</i> Exon 6	TGGGCTTTTCTATATCTGCACTTAG	61	240
Ex 6 R		GGGATTGCAGTAAGCCAAGA		
Ex 7 F	<i>DJ-1</i> Exon 7	GCCCATTAGGATGTCACCTT	60	245
Ex 7 R		TTCCTAACGGCCTGTTTCTC		

7.5.11. *Primer zur Sequenzierung des Exon 1 des NR4A2-Gens*

<i>Primer</i>	Region	Sequenz	<i>Annealing-Temp.</i> (° C)	Größe des PCR-Produktes (bp)
Ex 1 F	Exon 1	CGCAAGCCACATAAAACAAAG	64	305
Ex 1 R		ACGTGCAAAAGAAGGAAAAAG		

7.6. Patientenlisten

Tabelle 7.1.: Patientenliste EOPD

Zusammenfassung der klinischen Daten und Untersuchungsergebnisse für das *Parkin*- und *DJ-1*-Gen der untersuchten Patienten mit PS frühen Beginns (EOPD). In Teil B sind die THS-Patienten gesondert aufgeführt. Mutationsträger sind in Fettdruck hervorgehoben.

A.

Nr.	Lab-Nr.	Geburts-jahr	Erkrankungs-alter	Geschlecht	FA	<i>Parkin</i> -Mutation	<i>DJ-1</i> -Mutation
1	L1347	1977	17	f		keine	IVS5*2-12del
2	L1350	1962	30	m		keine	keine
3	AE 30	1969	27	f		keine	keine
4	AE34	1941	35	m		hom	keine
5	AE 142		31	f		het	keine
6	AE144	1961	37	f		keine	keine
7	AE172	1950	45	m		keine	keine
8	AE176	1950	42	m		keine	keine
9	AE 178		35	m		keine	keine
10	AE 214	1944	39	f		keine	keine
11	AE230	1960	33	m		keine	keine
12	AE 362	1953	39	f		keine	keine
13	AE 396	1961	36	f		keine	keine
14	AE 532	1961	32	f		keine	keine
15	AE 593	1966	35	m		keine	keine
16	MIN 4827	1954	33	f		comp het	keine
17	28068	1962	28	m		keine	keine
18	K1		30	f		comp het	keine
19	T1	1968	22	m		comp het	keine
20	T2	1958	18	f		comp het	keine
21	T3	1983	14	m		keine	keine
22	T4	1961	29	f		keine	keine
23	T5	1963	30	f		keine	keine
24	L-1435	1954	39	m		keine	keine
25	L- 649	1955	16	m		keine	keine
26	L-1613	1956	31	f		keine	keine
27	L-1456	1966	33	m		keine	keine
28	L-1447	1961	40	f		keine	keine
29	DR 1		<40	f		keine	keine
30	L-1273	1973	<31	m		keine	keine
31	L-1374		<40	m		keine	keine
32	L-1392	1987	<17	m		keine	keine
33	L-1409	1960	<44	m		keine	keine
34	L-1412	1998	<6	f		keine	keine
35	L-1444	1956	<48	f		keine	keine
36	L-1451	1987	<17	m		keine	keine
37	L-1603	1960	<44	m		keine	keine

38	L-1604	1987	<17	f		keine	keine
39	L-1605	1960	<44	m		comp het	keine
40	L-1606	1970	<34	m		het	keine
41	L-1607	1964	<40	f		keine	keine
42	L-1608	1974	<30	f		keine	keine
43	L-1609	1978	<25	m		keine	keine
44	9988	1970	<34	m		keine	keine
45	10030	1961	<43	m		keine	keine
46	JH 51		<40			keine	keine
47	JH 52		<40			homEx3-4del	keine
48	L-210	1946	49	f	0	keine	nicht getestet
49	L-250	1938	38	m		keine	nicht getestet
50	L-262	1939	42	m	0	keine	nicht getestet
51	L-295	1950	46	f	0	keine	nicht getestet
52	L-298	1946	39	m	0	keine	nicht getestet
53	L-316	1947	46	f	0	keine	nicht getestet
54	L-319	1927	37	m	0	keine	nicht getestet
55	L-424	1943	50	m	0	keine	nicht getestet
56	L-425	1943	41	m	0	keine	nicht getestet
57	L-719	1943	48	f	0	keine	nicht getestet
58	L-852	1952	43	f	1	keine	nicht getestet
59	L-853	1939	45	m	0	keine	nicht getestet
60	L-1120	1938	46	m	0	keine	nicht getestet
61	L-1163	1960	40	f	1	keine	nicht getestet
62	L-1209	1948	45	f	0	keine	nicht getestet
63	L-1263	1954	37	m		keine	nicht getestet

B.

1	L- 1296	1952	30	m	0	keine	keine
2	L- 1297	1950	15	m	0	keine	keine
3	L- 1325	1936	47	m		keine	keine
4	L- 1340	1935	46	m		keine	keine
5	L- 1349	1936	34	f	0	keine	keine
6	L- 1355	1975	24	f	0	keine	keine
7	L- 1356	1940	40	m	0	keine	keine
8	L- 1357	1948	37	m	0	keine	keine
9	L- 1367	1944	42	m	0	keine	keine
10	L- 1369	1952	32	m	0	keine	keine
11	L- 1370	1944	38	m	0	keine	keine
12	L- 1371	1950	32	f	0	keine	keine
13	L- 1385	1950	35	m	0	keine	keine
14	L- 1404	1945	35	m	0	keine	keine

15	91 52	1952	35	f		keine	keine
16	91 58	1942	39	m		keine	keine
17	91 70	1959	36	f	0	keine	keine
18	L-1517	1949	47	f	0	keine	keine
19	L- 1520	1940	50	f	0	keine	keine
20	L- 1521	1947	34	f	0	keine	keine
21	L- 1522	1947	37	f	0	het. 867C>T	keine
22	L- 1523	1943	32	f	0	hom. Ex7-9del	keine
23	L- 1529	1937	49	f	0	keine	keine
24	L- 1549	1949	40	m	0	keine	keine

Tabelle 7.2.: Patientenliste LOPD

Übersicht der Patienten mit PS späten Beginns (LOPD). Die Familienanamnese (FA, 0 für negativ und 1 für positiv) und die Ergebnisse der *Parkin*-Mutationsanalyse sind zu entnehmen.

Nr.	Lab-Nr.	Geburts-jahr	Erkrankungs-alter	Geschlecht	FA	<i>Parkin</i> -Mutation
1	B92	1923	71	m	0	keine
2	B96	1928	55	f	1	keine
3	B98	1921	75	f	0	keine
4	B99	1935	51	m	0	keine
5	B100	1931	50	m	0	keine
6	B102	1927	58	f	0	keine
7	B103	1929	63	f	0	keine
8	B106	1936	52	m	0	keine
9	B120	1921	71	m	0	keine
10	B129	1929	54	f	0	keine
11	B131	1925	72	f	0	keine
12	B132	1930	60	m	0	keine
13	B139	1923	60	m	0	keine
14	B144	1927	51	f	0	keine
15	B145	1938	51	f	0	keine
16	B176	1924	67	f	0	keine
17	B177	1923	55	f	0	keine
18	B180	1931	62	m	1	keine
19	B198	1933	63	f	0	keine
20	B214	1927	71	f	0	keine
21	B248	1918	75	m	0	keine
22	B250	1928	63	m	0	keine
23	B251	1920	74	f	0	keine

24	B252	1932	50	f	0	keine
25	B255	1923	58	f	0	keine
26	B256	1929	64	f	0	keine
27	B263	1935	62	f	1	keine
28	B265	1924	74	f	0	keine
29	L148	1923	56	m	1	keine
30	L218	1939	53	m	1	keine
31	L228	1932	60	f	1	keine
32	L231	1934	55	f	0	keine
33	L265	1937	56	m	0	keine
34	L280	1923	70	m	1	keine
35	L320	1927	63	f	0	keine
36	L417	1932	51	m		keine
37	L419	1940	55	m	0	keine
38	L423	1938	60	m	1	keine
39	L510	1936	61	m	0	keine
40	L524	1943	55	m	0	keine
41	L662	1925	53	f	0	keine
42	L736	1915	79	m	0	keine
43	L749	1934	63	f	0	keine
44	L854	1942	54	f	0	keine
45	L861	1939	59	m	1	keine
46	L938	1948	54	f		keine
47	L990	1914	70	m	0	keine
48	L1091	1936	63	f	0	keine
49	L1098	1934	61	f	0	keine
50	L1119	1933	67	m	0	keine
51	L1127	1938	53	f	0	keine
52	L1134	1923	63	m	0	keine
53	L1135	1945	52	m		keine
54	L1148	1927	70	f	0	hetEx3-4del
55	L1151	1931	70	f	0	keine
56	L1198	1924	68	m		keine
57	L1200	1937	61	f	0	keine
58	L1217	1940	55	m	0	keine
59	L1454	1929	70	m		keine
60	L1464	1935	52	m		keine
61	L1486	1946	56	f		keine

Tabelle 7.3.: Liste mit den Daten der Kontrollgruppe
(20 MRT-Kontrollen)

Nr.	Lab-Nr.	Geburtsjahr	Alter bei Untersuchung	Geschlecht	<i>Parkin</i>-Mutation
1	L-1592	1962	42	m	keine
2	L-1593	1963	41	f	keine
3	L-1594	1963	41	m	keine
4	L-1595	1968	36	m	keine
5	L-1596	1965	39	f	keine
6	L-1750	1956	48	f	keine
7	L-1751	1951	53	m	keine
8	L-1752	1942	62	f	keine
9	L-1753	1950	54	m	keine
10	L-1754	1943	64	f	keine
11	L-1755	1936	71	f	keine
12	L-1756	1947	57	m	keine
13	L-1757	1941	63	f	keine
14	L-1758	1940	64	f	keine
15	L-1759	1942	62	m	keine
16	L-1760	1944	60	f	keine
17	L-1761	1932	72	m	keine
18	L-1762	1936	68		keine
19	L-1763	1946	58		keine
20	L-1764	1953	51	m	Ex2dupl

Tabelle 7.4.: Patienten und Kontrollen zur Untersuchung des *Parkin*-Promotors

In Teil A sind die Ergebnisse der Schmelzkurven-Analyse des *Parkin*-Promotors (Allele an Position -258) für die 128 Kontrollen zusammengefasst. In Teil B wurden die Ergebnisse dieser Untersuchung für die 116 Parkinson-Patienten aufgelistet.

A.**B.**

Nr.	Lab-Nr.	<i>Parkin</i> -Promotor	Nr.	Lab-Nr.	<i>Parkin</i> -Promotor
01	L-825	T/T	01	L-252	T/T
02	L-826	T/G	02	L-246	T/G
03	L-827	T/T	03	L-328	T/T
04	L-820	T/T	04	L-290	T/G
05	L-824	T/T	05	L-295	T/T
06	L-823	T/T	06	L-274	T/G
07	L-822	T/G	07	L-273	T/G
08	L-628	T/T	08	L-283	T/T
09	L-629	T/T	09	L-297	T/T
10	L-626	T/T	10	L-272	T/G
11	L-627	T/T	11	L-291	T/G
12	L-625	T/T	12	L-310	T/T
13	L-651	T/T	13	L-331	T/T
14	L-598	T/T	14	L-305	T/T
15	L-597	T/G	15	L-312	T/G
16	L-716	T/T	16	L-302	T/T
17	L-606	T/T	17	L-361	T/T
18	L-635	T/T	18	L-332	G/G
19	L-636	T/T	19	L-306	T/T
20	L-637	T/G	20	L-324	T/T
21	L-595	T/T	21	L-315	T/G
22	L-594	T/T	22	L-301	T/T
23	L-604	T/G	23	L-311	T/T
24	L-609	T/G	24	L-317	T/G
25	L-596	T/T	25	L-334	T/G
26	L-565	T/G	26	L-333	T/G
27	L-514	T/G	27	L-309	T/T
28	L-540	T/G	28	L-323	T/T
29	L-645	T/T	29	L-299	T/T
30	L-590	T/G	30	L-303	T/T
31	L-652	G/G	31	L-325	T/G
32	L-567	T/T	32	L-389	T/G
33	L-577	T/T	33	L-396	T/T
34	L-582	T/G	34	L-341	T/T

35	L-578	T/T	35	L-350	T/T
36	L-591	T/T	36	L-370	T/G
37	L-647	T/G	37	L-381	T/T
38	L-505	T/G	38	L-380	T/T
39	L-624	T/T	39	L-365	T/T
40	L-566	T/T	40	L-392	T/G
41	L-623	T/G	41	L-366	T/T
42	L-828	T/G	42	L-395	T/T
43	L-568	T/T	43	L-390	T/G
44	L-621	T/T	44	L-397	T/T
45	L-574	T/T	45	L-391	T/T
46	L-648	T/T	46	L-387	T/T
47	L-605	T/G	47	L-388	T/G
48	L-602	T/G	48	L-378	T/T
49	L-569	T/T	49	L-373	T/T
50	L-643	T/T	50	L-375	T/T
51	L-613	T/T	51	L-402	T/G
52	L-592	T/G	52	L-371	T/T
53	L-614	T/T	53	L-367	T/T
54	L-507	T/G	54	L-382	T/T
55	L-617	T/T	55	L-383	T/G
56	L-576	T/G	56	L-384	T/T
57	L-511	T/T	57	L-398	T/T
58	L-573	T/G	58	L-374	T/T
59	L-588	T/T	59	L-368	T/T
60	L-612	T/G	60	L-376	T/G
61	L-622	T/G	61	L-377	T/G
62	L-618	T/G	62	L-393	T/T
63	L-593	T/T	63	L-349	T/T
64	L-615	T/T	64	L-369	T/T
65	L-572	T/T	65	L-400	T/T
66	L-610	T/G	66	L-372	T/T
67	L-562	T/G	67	L-385	T/T
68	L-508	T/G	68	L-401	T/G
69	L-580	T/G	69	L-348	T/T
70	L-619	T/T	70	L-343	T/T
71	L-683	T/T	71	L-356	T/T
72	L-571	T/G	72	L-363	T/T
73	L-496	T/T	73	L-340	T/T
74	L-481	T/G	74	L-362	T/T

75	L-502/438	T/G	75	L-352	T/T
76	L-518	T/T	76	L-347	T/G
77	L-473	T/G	77	L-351	T/T
78	L-522	T/T	78	L-355	T/T
79	L-586	T/T	79	L-394	T/T
80	L-603	T/T	80	L-346	T/G
81	L-472	T/G	81	L-339	T/T
82	L-519	T/T	82	L-357	T/T
83	L-500/442	T/T	83	L-360	T/G
84	L-482	T/T	84	L-345	T/G
85	L-476	T/T	85	L-359	T/T
86	L-478	T/T	86	L-353	T/G
87	L-485	T/T	87	L-364	T/G
88	L-574/486	T/T	88	L-399	T/T
89	L-470	T/T	89	L-354	T/T
90	L-547	T/T	90	L-358	T/T
91	L-448	T/T	91	L-342	T/G
92	L-444	T/T	92	L-558	T/G
93	L-479	T/T	93	L-584	T/T
94	L-525	T/T	94	L-600	T/G
95	L-829	G/G	95	L-611	T/T
96	L-494/441	T/T	96	L-587	T/T
97	L-477	T/T	97	L-649	G/G
98	L-493/443	T/T	98	L-564	T/T
99	L-529	T/G	99	L-512	T/G
100	L-483	T/G	100	L-589	T/T
101	L-531	T/T	101	L-561	T/T
102	L-446	T/T	102	L-644	T/T
103	L-539	T/T	103	L-650	T/T
104	L-541	T/G	104	L-509	T/T
105	L-830	T/T	105	L-642	T/T
106	L-831	T/G	106	L-513	G/G
107	L-487	T/G	107	L-563	T/G
108	L-559	T/T	108	L-575	G/G
109	L-488	T/T	109	L-515	T/T
110	L-523	T/G	110	L-585	T/T
111	L-533/474	T/G	111	L-581	T/G
112	L-557	T/T	112	L-601	T/T
113	L-832	T/G	113	L-608	T/T
114	L-833	G/G	114	L-616	T/G

115	L-834	G/G	115	L-503	T/T
116	L-836	T/G	116	L-583	T/T
117	L-837	T/T			
118	L-838	T/T			
119	L-839	G/G			
120	L-497	T/T			
121	L-499	T/G			
122	L-498	T/T			
123	L-840	T/T			
124	L-841	T/T			
125	L-842	T/G			
126	L-843	T/T			
127	L-853	T/T			
128	L-1119	T/G			

Tabelle 7.5.: Patientenliste zu den Untersuchungen des *NR4A2*-Gens

Auflistung und Untersuchungsergebnisse der Patienten mit positiver Familienanamnese, die auf Mutationen im *NR4A2*-Gen getestet wurden. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden nur die 50 Patienten herangezogen, die keine Mutation im *Parkin*-Gen aufwiesen.

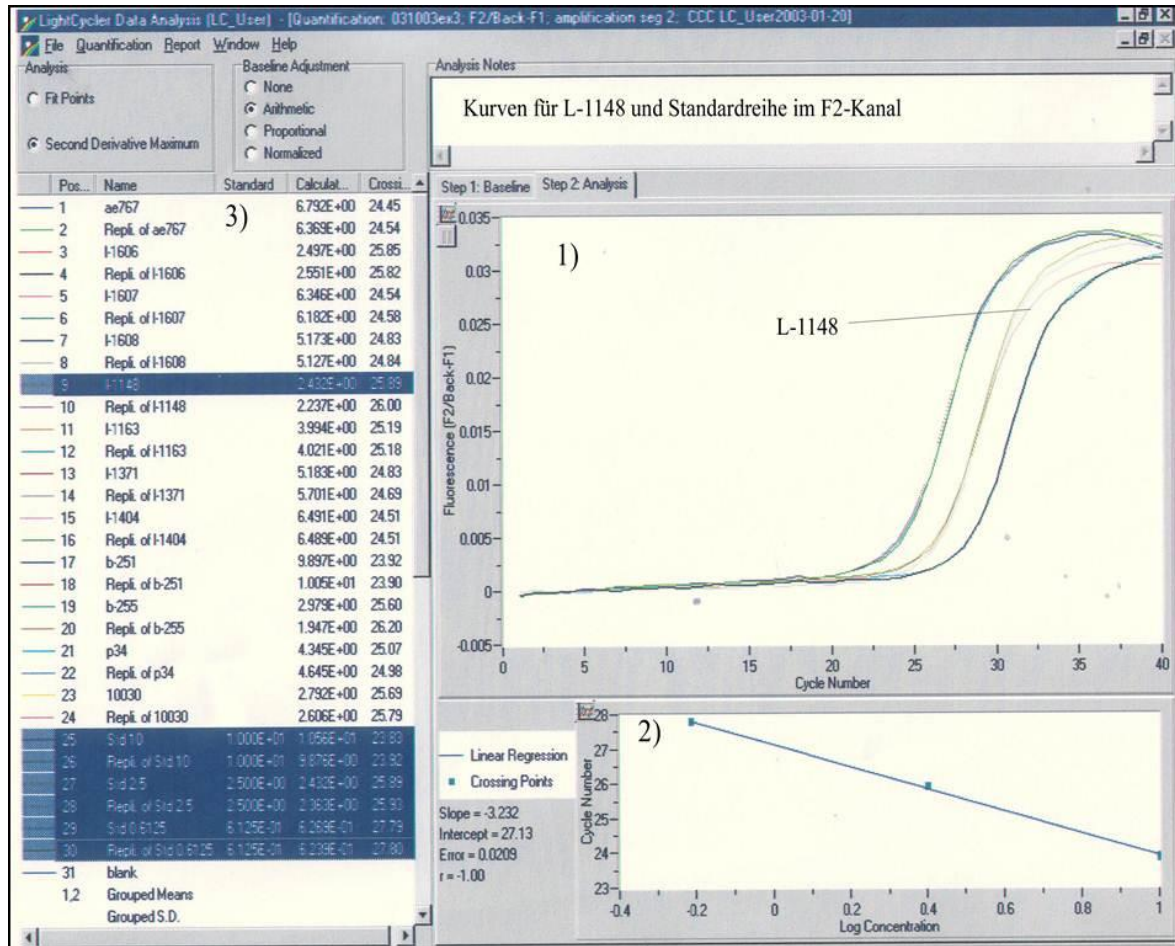
Patient	Geburts-jahr	Erkrankungs-alter	Geschlecht	<i>Parkin</i> -Mutation	<i>NR4A2</i> -Mutation
L-274	1954	38	f	keine	keine
L-301	1960	27	m	keine	keine
L-302	1956	33	f	keine	keine
L-305	1950	35	f	1152A>T	keine
L-306	1961	37	f	keine	keine
L-312	1956	29	m	keine	keine
L-325	1956	34	m	keine	keine
L-331	1951	39	m	keine	keine
L-332	1956	34	f	keine	keine
L-339	1953	38	m	keine	keine
L-341	1959	31	f	keine	keine
L-345	1948	30	f	keine	keine
L-346	1954	34	m	keine	keine
L-353	1955	31	f	keine	keine
L-359	1950	16	m	del4, 924C>T	keine
L-361	1957	24	m	keine	keine
L-365	1956	31	f	keine	keine
L-370	1956	34	f	keine	keine
L-374	1953	36	m	dupl3	keine
L-384	1958	34	m	keine	keine
L-391	1948	37	m	keine	keine
L-396	1957	36	f	keine	keine
L-397	1956	39	f	keine	keine

L-400	1957	37	m	keine	keine
L-561	1948	21	m	del4, 734A>T	keine
L-340	1948	36	f	keine	keine
L-372	1949	45	m	keine	keine
L-348	1952	41	f	keine	keine
L-383	1951	45	m	keine	keine
L-399	1950	44	m	keine	keine
L-512	1954	40	m	1152A<C	keine
L-295	1950	45	f	keine	keine
L-273	1951	41	f	keine	keine
L-373	1950	47	f	keine	keine
L-392	1952	43	f	keine	keine
L-584	1952	41	f	keine	keine
L-1239	1926	46	f	keine	keine
L-1447	1961	40	m	keine	keine
L-1452	1957	31	f	keine	keine
L-1456	1966	32	m	keine	keine
L-1464	1935	50	m	keine	keine
L-1486	1946	55	f	keine	keine
L-309	1949	42	f	keine	keine
L-358	1949	42	m	keine	keine
L-126	1941	49	m	keine	keine
L-128	1941	55	m	keine	keine
L-231	1934	39	f	keine	keine
L-228	1935	60	f	keine	keine
L-255	1919	81	m	keine	keine
L-254	1929	66	f	keine	keine
L-251	1941	51	f	keine	keine
L-281	1937	56	m	keine	keine
L-288	1932	49	m	keine	keine
B-68	1925	76	f	keine	keine

7.7. Zusätzliche Abbildungen

7.7.1. Quantitative PCR des Exon 3 des *Parkin*-Gens

A.



B.

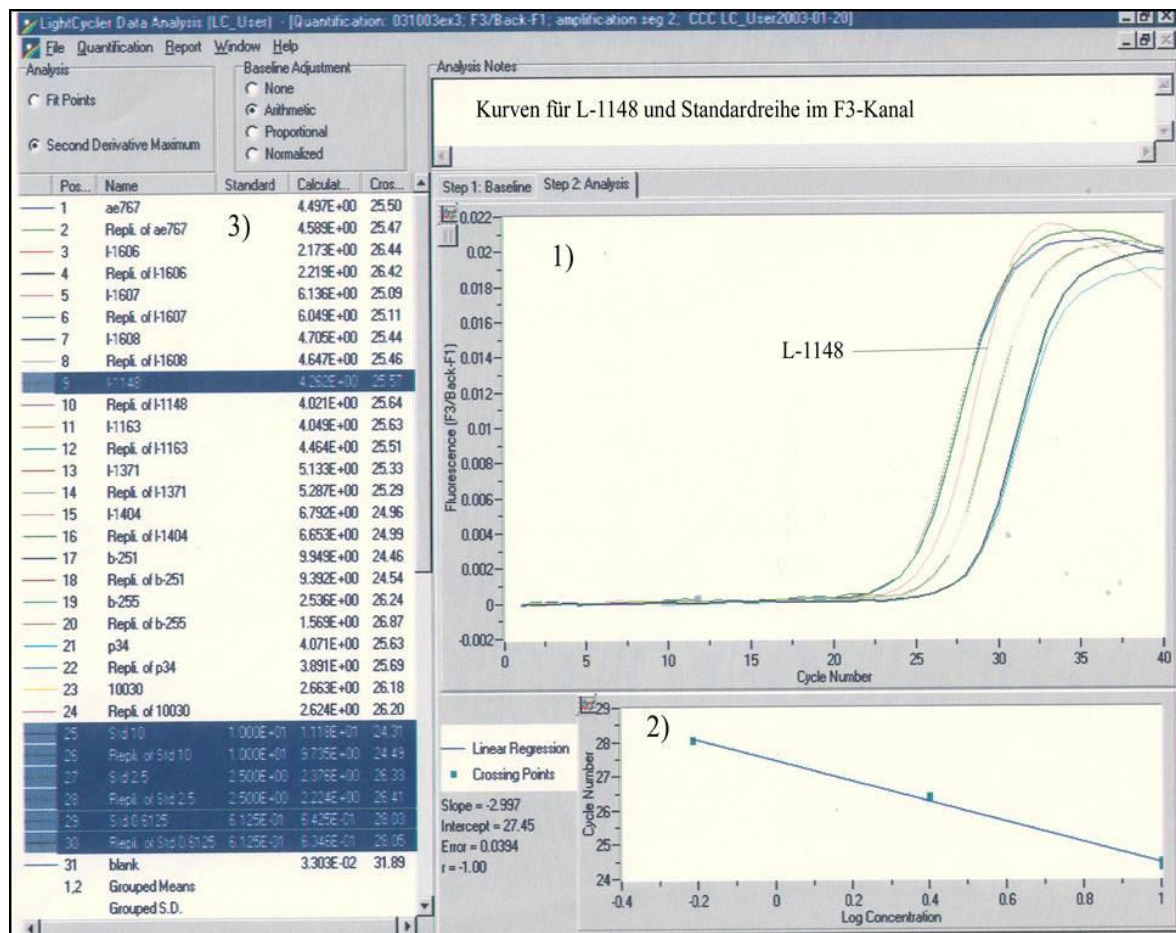


Abbildung 7.1.: Auswertebildschirm der Quantifizierung mit dem *LightCycler*

In Teil A wird die Messung des *Parkin*-spezifischen PCR-Produkts im F2-Kanal wiedergegeben. Die Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Menge von *Parkin*-Exon 3. Die Kurve in Teil B entspricht der PCR-Produkt-Menge von β -Globin, da die Messung des β -Globin-spezifischen PCR-Produkts im F3-Kanal stattfindet. Im Fenster 1 ist jeweils die Menge des PCR-Produkts als Funktion der Zeit aufgetragen. Die Kurven zeigen die Menge an PCR-Produkt für die drei verschiedenen Standardverdünnungen und eine DNA-Probe (L-1148) während der PCR. Im zweiten Fenster unterhalb der Kurven ist die Standardgerade (Fluoreszenzsignal als Funktion der Konzentration) für die drei Standardverdünnungen gezeigt. Links daneben sind Anstieg der Kurve, hieraus errechnete Effizienz der PCR und Abweichung der Messpunkte von der Gerade (Fehler) gelistet. Im linken Fenster (Fenster 3) sind die Konzentrationen der Proben basierend auf der Standardgerade angegeben. Im Beispiel wird am Mittelwert der Konzentration von L-1148 (Doppelbestimmung) und am Vergleich der Probe zu den Standards im Diagramm erkennbar, dass das Verhältnis von Konzentration *Parkin*-Exon 3 zu β -Globin $2,33/4,14 = 0,56$ betrug. Daher hat die untersuchte Probe eine Deletion in Exon 3.

7.7.2. SSCP-Gele verschiedener Exons des *Parkin*-Gens

Die dazugehörigen Erläuterungen sind am Ende der Abbildungen zusammengefasst.

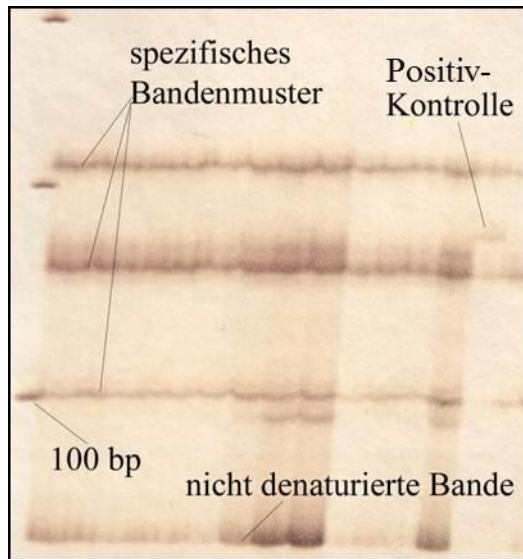


Abbildung 7.3.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 1 des *Parkin*-Gens

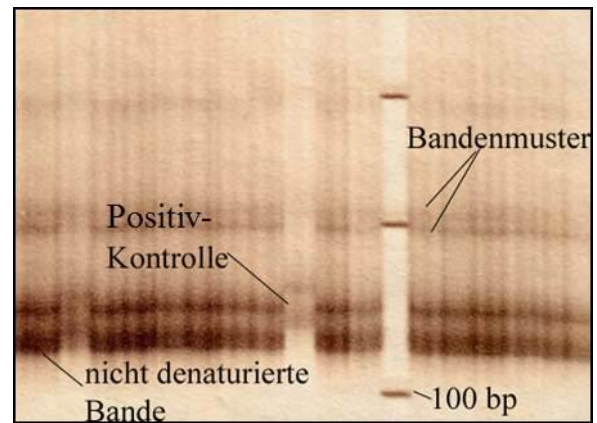


Abbildung 7.2.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 3 des *Parkin*-Gens

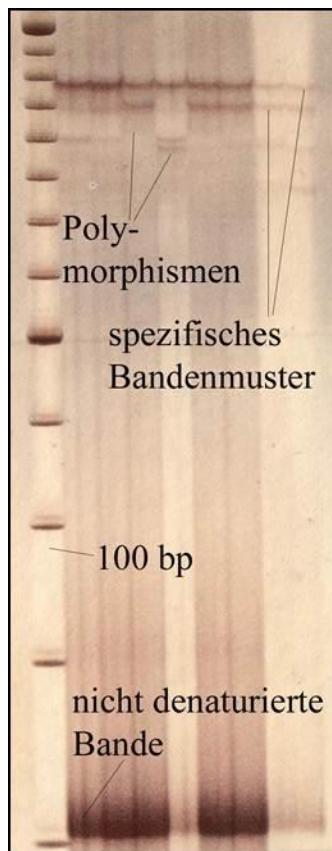


Abbildung 7.4.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 4 des *Parkin*-Gens



Abbildung 7.5.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 5 des *Parkin*-Gens

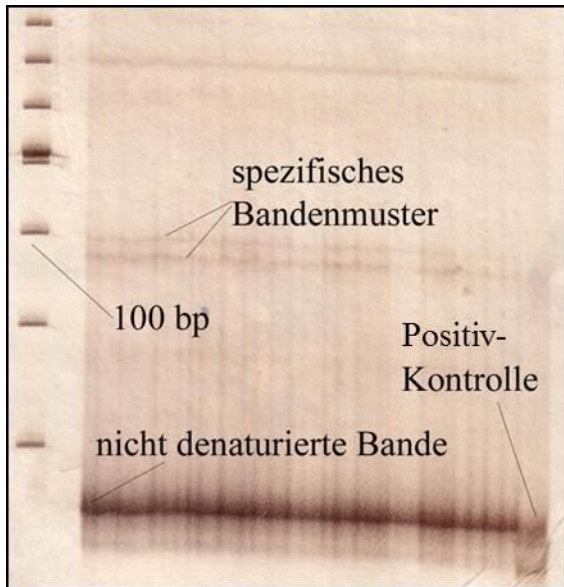


Abbildung 7.6.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 6 des *Parkin*-Gens



Abbildung 7.8.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 7 des *Parkin*-Gens



Abbildung 7.7.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 8 des *Parkin*-Gens



Abbildung 7.9.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 9 des *Parkin*-Gens

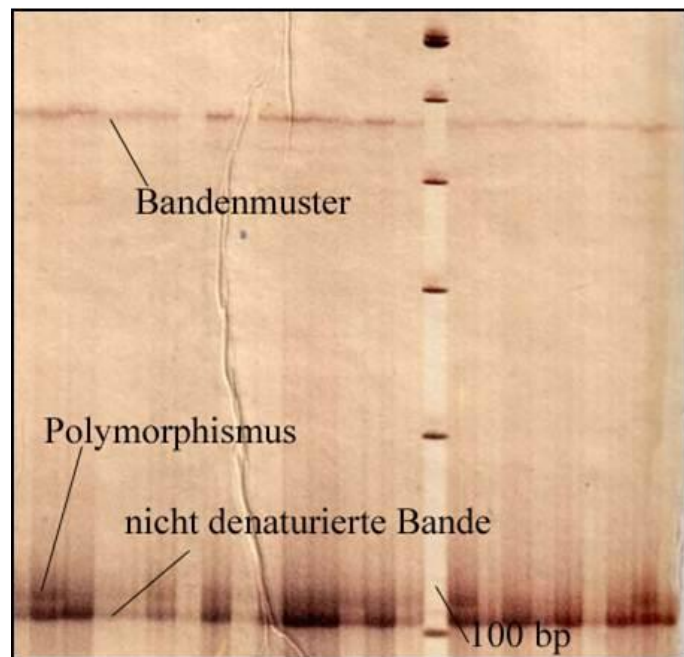


Abbildung 7.10.: Ausschnitt aus der SSCP-Analyse des Exon 10 des *Parkin*-Gens

Zu den Abbildungen 7.2.-7.10.:

Die Abbildungen zeigen Ausschnitte aus PAGE-Gelen der SSCP-Analyse des *Parkin*-Gens. Auf allen Gelen stellen sich am unteren Gelrand die nicht denaturierte Bande und im oberen Gelbereich das spezifische Bandenmuster dar. Einige Gele zeigen zusätzliche, interexperimentell variable Schattenbanden, die sich zwischen dem Bandenmuster und der nicht denaturierten Bande befinden (z. B. Exon 4). Diese Schattenbanden müssen hinsichtlich der Mutationsanalyse von wirklichen DNA-Veränderungen unterschieden werden. DNA-Veränderungen in Form von Polymorphismen finden sich in den Gelen von Exon 4 und 10 des *Parkin*-Gens. Im Exon 4 stellen sich zwei unterschiedliche Polymorphismen dar. Der Polymorphismus 601G/A ist an einer zusätzlichen etwas schwächeren Bande unterhalb der mittleren Bande des spezifischen Bandenmusters zu erkennen. Da die Bande, die zum spezifischen Bandenmuster gehört und das nicht mutierte Allel darstellt, noch vorhanden ist, handelt es sich um einen heterozygoten Polymorphismus. Im zweiten Fall handelt es sich um einen heterozygoten intronischen Polymorphismus, bei dem die untere Bande des spezifischen Bandenmusters nach unten verschoben, aber noch erhalten ist.

7.8. Zusätzliche Tabellen

7.8.1. *Parkin*-Mutationen

Tabelle 7.6.: Identifizierte qualitative Gen-Veränderungen des *Parkin*-Gens

Lokalisation	Mutation	Protein	Referenz und Gesamtzahl	Herkunft
Exon 2	255delA	Asn52/Stop80	Abbas <i>et al.</i> , 1999 Lücking <i>et al.</i> , 2000 Hedrich <i>et al.</i> , 2002 Hoenicka <i>et al.</i> , 2002 Munoz <i>et al.</i> , 2002 Rawal <i>et al.</i> , 2003 Hedrich <i>et al.</i> , 2004 Sun <i>et al.</i> , 2006 Dächsel <i>et al.</i> , 2006 Lesage <i>et al.</i> , 2008 Bras <i>et al.</i> , 2008 Lohmann <i>et al.</i> , 2009 Nuytemans <i>et al.</i> , 2009 Camargos <i>et al.</i> , 2009 Brooks <i>et al.</i> , 2009 Pankratz <i>et al.</i> , 2009 Marder <i>et al.</i> , 2010 eigene Arbeit (1) insgesamt 39	französisch europäisch puertoricanisch spanisch spanisch brasilianisch italienisch, norddeutsch französisch portugiesisch französisch belgisch brasilianisch nord-amerikanisch
Exon 3	438-77del	Leu112/Stop163	Farrer <i>et al.</i> , 2001 Hedrich <i>et al.</i> , 2002 Nichols <i>et al.</i> , 2002 Oliveira <i>et al.</i> , 2003 Chen <i>et al.</i> , 2003 Foroud <i>et al.</i> , 2003 Lincoln <i>et al.</i> , 2003 Scherfler <i>et al.</i> , 2004 Wiley <i>et al.</i> , 2004 Poorkaj <i>et al.</i> , 2004 Hedrich <i>et al.</i> , 2004 Poorkaj <i>et al.</i> , 2005 Clark <i>et al.</i> , 2006 Sun <i>et al.</i> , 2006 Wang <i>et al.</i> , 2008 Brooks <i>et al.</i> , 2009 Pankratz <i>et al.</i> , 2009 Sammler <i>et al.</i> , 2009 Marder <i>et al.</i> , 2010 eigene Arbeit (1) insgesamt 52	europäisch nord-amerikanisch irisch nord-amerikanisch nord-amerikanisch
Exon 3	501-3delCCA	Nicht bekannt	eigene Arbeit (1) (Hedrich <i>et al.</i> , 2004) insgesamt 1	nord-amerikanisch

Exon 7	867C>T	Arg256Lys	Abbas <i>et al.</i> , 1999 Hedrich <i>et al.</i> , 2002 West <i>et al.</i> , 2002 Periquet <i>et al.</i> , 2003 Oliveira <i>et al.</i> , 2003 Khan <i>et al.</i> , 2003 Shyu <i>et al.</i> , 2005 Schlitter <i>et al.</i> , 2006 Lesage <i>et al.</i> , 2008 Moro <i>et al.</i> , 2008 Nuytemans <i>et al.</i> , 2009 Pankratz <i>et al.</i> , 2009 Marder <i>et al.</i> , 2010 eigene Arbeit (1) insgesamt 17	deutsch britisch französisch chinesisch deutsch, norwegisch französisch belgisch deutsch
Exon 7	924C>T	Arg275Trp	Abbas <i>et al.</i> , 1999 Lücking <i>et al.</i> , 2000 Farrer <i>et al.</i> , 2001 Pramstaller <i>et al.</i> , 2002 Hedrich <i>et al.</i> , 2002 Kann <i>et al.</i> , 2002 Nichols <i>et al.</i> , 2002 West <i>et al.</i> , 2002 Oliveira <i>et al.</i> , 2003 Periquet <i>et al.</i> , 2003 Foroud <i>et al.</i> , 2003 Rawal <i>et al.</i> , 2003 Khan <i>et al.</i> , 2003 Scherfler <i>et al.</i> , 2004 Wiley <i>et al.</i> , 2004 Hedrich <i>et al.</i> , 2004 Arias Vásquez <i>et al.</i> , 2004 Klein <i>et al.</i> , 2005 Sinha <i>et al.</i> , 2005 Clark <i>et al.</i> , 2006 Sun <i>et al.</i> , 2006 Lesage <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008 Sironi <i>et al.</i> , 2008 Lohmann <i>et al.</i> , 2009 Macedo <i>et al.</i> , 2009 Nuytemans <i>et al.</i> , 2009 Brooks <i>et al.</i> , 2009 Brüggemann <i>et al.</i> , 2009 Pankratz <i>et al.</i> , 2009 Marder <i>et al.</i> , 2010 eigene Arbeit (2) insgesamt 79	italienisch irisch französisch britisch europäisch deutsch niederländisch irisch italienisch nord-amerikanisch französisch italienisch holländisch belgisch nord-amerikanisch
Exon 9	1142-1143delGA	Gln357/Stop368	Lücking <i>et al.</i> , 2000 eigene Arbeit (1) (Moro <i>et al.</i> , 2008) insgesamt 2	kanadisch

Tabelle 7.7.: Identifizierte quantitative Gen-Veränderungen des *Parkin*-Gens

Lokalisation	Mutation	Referenz und Gesamtzahl	Anmerkung
Exon 2	Duplikation	Periquet <i>et al.</i> , 2003	französisch
		Chaudhary <i>et al.</i> , 2006	indisch
		Simon-Sanchez <i>et al.</i> , 2008	
		Sironi <i>et al.</i> , 2008	italienisch
		Nuytemans <i>et al.</i> , 2009	belgisch
		Koziorowski <i>et al.</i> , 2010	polnisch
		Pankratz <i>et al.</i> , 2009	
		Keyser <i>et al.</i> , 2010	süd-afrikanisch
		Guo <i>et al.</i> , 2010	chinesisch
		Zhang <i>et al.</i> , 2010	chinesisch
		Marder <i>et al.</i> , 2010	
		Elfferich <i>et al.</i> , 2011	
		eigene Arbeit (1) (Brüggemann <i>et al.</i> , 2009)	deutsch
		insgesamt 13	
Exon 3	Deletion	Hattori <i>et al.</i> , 1998a	japanisch
		Lücking <i>et al.</i> , 1998	
		Nisipeanu <i>et al.</i> , 1999	israelisch
		Lücking <i>et al.</i> , 2000	europäisch
		Tassin <i>et al.</i> , 2000	
		Kobayashi <i>et al.</i> , 2000	japanisch
		Hedrich <i>et al.</i> , 2001	europäisch
		Lu <i>et al.</i> , 2001	taiwanesisch
		van de Warrenburg <i>et al.</i> , 2001	
		Hedrich <i>et al.</i> , 2002	europäisch
		Hoenicka <i>et al.</i> , 2002	spanisch
		Nichols <i>et al.</i> , 2002	
		West <i>et al.</i> , 2002	
		Wu <i>et al.</i> , 2002	
		Illarioshkin <i>et al.</i> , 2003	russisch
		Lincoln <i>et al.</i> , 2003	
		Khan <i>et al.</i> , 2003	
		Kobayashi <i>et al.</i> , 2003	japanisch
		Periquet <i>et al.</i> , 2003	französisch
		Abbruzzese <i>et al.</i> , 2004	
		Poorkaj <i>et al.</i> , 2004	
		Sasaki <i>et al.</i> , 2004	japanisch
		Wang <i>et al.</i> , 2004	
		Capecci <i>et al.</i> , 2004	italienisch
		Varrone <i>et al.</i> , 2004	italienisch
		Wiley <i>et al.</i> , 2004	irisch
		Poorkaj <i>et al.</i> , 2005	
		Bertoli-Avella <i>et al.</i> , 2005	italienisch
		Shyu <i>et al.</i> , 2005	chinesisch
		De Rosa <i>et al.</i> , 2006	italienisch
		Sun <i>et al.</i> , 2006	
		Chung <i>et al.</i> , 2006	koreanisch
		Shadrina <i>et al.</i> , 2007	indisch
		Scarciolla <i>et al.</i> , 2007	

		Deng <i>et al.</i> , 2008 Lesage <i>et al.</i> , 2008 Chung <i>et al.</i> , 2008 Moro <i>et al.</i> , 2008 Aguiar <i>et al.</i> , 2008 Guo <i>et al.</i> , 2008 Sironi <i>et al.</i> , 2008 Bardien <i>et al.</i> , 2009 Lohmann <i>et al.</i> , 2009 Macedo <i>et al.</i> , 2009 Barsottini <i>et al.</i> , 2009 Brüggemann <i>et al.</i> , 2009 Keyser <i>et al.</i> , 2010 Guo <i>et al.</i> , 2010 Marder <i>et al.</i> , 2010 Zhang <i>et al.</i> , 2010 Elfferich <i>et al.</i> , 2011 eigene Arbeit (2) insgesamt 134	nord-amerikanisch französisch chinesisch brasilianisch chinesisch italienisch süd-afrikanisch holländisch brasilianisch süd-afrikanisch chinesisch chinesisch nord-amerikanisch (1), deutsch (1)
Exon 3 - 4	Deletion	Hattori <i>et al.</i> , 1998 Kobayashi <i>et al.</i> , 2000 Ujike <i>et al.</i> , 2001 Lücking <i>et al.</i> , 2000 Lücking <i>et al.</i> , 2001 Kuroda <i>et al.</i> , 2001 Hedrich <i>et al.</i> , 2002 Kann <i>et al.</i> , 2002 Nichols <i>et al.</i> , 2002 West <i>et al.</i> , 2002 Foroud <i>et al.</i> , 2003 Rawal <i>et al.</i> , 2003 Periquet <i>et al.</i> , 2003 Abbruzzese <i>et al.</i> , 2004 Hedrich <i>et al.</i> , 2004 Kunishige <i>et al.</i> , 2004 Varrone <i>et al.</i> , 2004 Wiley <i>et al.</i> , 2004 Bertoli-Avella <i>et al.</i> , 2005 Shyu <i>et al.</i> , 2005 De Rosa <i>et al.</i> , 2006 Clark <i>et al.</i> , 2006 Biswas <i>et al.</i> , 2006 Nakaso <i>et al.</i> , 2006 Shadrina <i>et al.</i> , 2007 Deng <i>et al.</i> , 2008 Lesage <i>et al.</i> , 2008 Simon-Sanchez <i>et al.</i> , 2008 Moro <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008 Guo <i>et al.</i> , 2008	japanisch japanisch japanisch japanisch italienisch nord-amerikanisch brasilianisch französisch japanisch italienisch irisch italienisch chinesisch italienisch indisch japanisch russisch nord-amerikanisch französisch chinesisch

		Sironi <i>et al.</i> , 2008 Lohmann <i>et al.</i> , 2009 Macedo <i>et al.</i> , 2009 Bardien <i>et al.</i> , 2009 Pankratz <i>et al.</i> , 2009 Keyser <i>et al.</i> , 2010 Sammler <i>et al.</i> , 2009 Marder <i>et al.</i> , 2010 Zhang <i>et al.</i> , 2010 eigene Arbeit (1) insgesamt 98	italienisch holländisch süd-afrikanisch nord-amerikanisch süd-afrikanisch chinesisch
Exon 4	Deletion	Hattori <i>et al.</i> , 1998a Kitada <i>et al.</i> , 1998 Abbas <i>et al.</i> , 1999 Ujike <i>et al.</i> , 1999 Hayashi <i>et al.</i> , 2000 Kitada <i>et al.</i> , 2000 Maruyama <i>et al.</i> , 2000 Lücking <i>et al.</i> , 2000 Jeon <i>et al.</i> , 2001 Ujike <i>et al.</i> , 2001 Hedrich <i>et al.</i> , 2002 Kann <i>et al.</i> , 2002 Wu <i>et al.</i> , 2002 Illarioshkin <i>et al.</i> , 2003 Kim <i>et al.</i> , 2003 Foroud <i>et al.</i> , 2003 Rawal <i>et al.</i> , 2003 Periquet <i>et al.</i> , 2003 Wang <i>et al.</i> , 2004 Dogu <i>et al.</i> , 2004 Wiley <i>et al.</i> , 2004 Khan <i>et al.</i> , 2005 Sun <i>et al.</i> , 2006 Shadrina <i>et al.</i> , 2007 Lesage <i>et al.</i> , 2008 Choi <i>et al.</i> , 2008 Guo <i>et al.</i> , 2008 Myhre <i>et al.</i> , 2008 Lohmann <i>et al.</i> , 2009 Lee <i>et al.</i> , 2009 Macedo <i>et al.</i> , 2009 Bardien <i>et al.</i> , 2009 Pankratz <i>et al.</i> , 2009 Keyser <i>et al.</i> , 2010 Guo <i>et al.</i> , 2010 Marder <i>et al.</i> , 2010 Zhang <i>et al.</i> , 2010 Elfferich <i>et al.</i> , 2011 eigene Arbeit (2) insgesamt 94	japanisch japanisch italienisch europäisch japanisch italienisch deutsch russisch koreanisch brasilianisch, französisch chinesisch türkisch irisch russisch französisch koreanisch chinesisch jordanisch taiwanesisch holländisch süd-afrikanisch süd-afrikanisch chinesisch chinesisch deutsch

Exon 5	Deletion	Hattori <i>et al.</i> , 1998a Lücking <i>et al.</i> , 2000 Bonifati <i>et al.</i> , 2001 Hedrich <i>et al.</i> , 2001 Hoenicka <i>et al.</i> , 2002 West <i>et al.</i> , 2002a Illarioshkin <i>et al.</i> , 2003 Khan <i>et al.</i> , 2003 Kobayashi <i>et al.</i> , 2003 Scherfler <i>et al.</i> , 2004 Hedrich <i>et al.</i> , 2004 Wiley <i>et al.</i> , 2004 Bertoli-Avella <i>et al.</i> , 2005 Shyu <i>et al.</i> , 2005 Clark <i>et al.</i> , 2006 Deng <i>et al.</i> , 2006 und 2007 Bayrakli <i>et al.</i> , 2007 Lesage <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008 Lohmann <i>et al.</i> , 2009 Lee <i>et al.</i> , 2009 Pankratz <i>et al.</i> , 2009 Guo <i>et al.</i> , 2010 Marder <i>et al.</i> , 2010 Wu <i>et al.</i> , 2010 Elfferich <i>et al.</i> , 2011 eigene Arbeit (1) insgesamt 44	französisch, italienisch albanisch spanisch russisch japanisch irisch chinesisch nord-amerikanisch französisch taiwanesisch nord-amerikanisch chinesisch taiwanesisch nord-amerikanisch
Exon 7-9	Deletion	Lücking <i>et al.</i> , 2000 Zhang <i>et al.</i> , 2010 eigene Arbeit (1) (Moro <i>et al.</i> , 2008) insgesamt 4	chinesisch
Exon 9	Deletion	Keyser <i>et al.</i> , 2010 eigene Arbeit (1) insgesamt 2	süd-afrikanisch deutsch
Exon 10	Deletion	Foroud <i>et al.</i> , 2003 Illarioshkin <i>et al.</i> , 2003 Periquet <i>et al.</i> , 2003 Marder <i>et al.</i> , 2010 eigene Arbeit (1) insgesamt 8	russisch französisch deutsch
Exon 11	Deletion	Hertz <i>et al.</i> , 2006 Aguiar <i>et al.</i> , 2008 Barsottini <i>et al.</i> , 2009 Guo <i>et al.</i> , 2010 eigene Arbeit (1) insgesamt 6	dänisch brasilianisch brasilianisch chinesisch deutsch

7.8.2. DJ-1-Mutationen

Tabelle 7.8.: Qualitative Mutationen des DJ-1-Gens

Die Nummerierung beginnt bei Nukleotid 85 (Translations-Start) der GenBank-Sequenz NM_007262.3.

Nr.	Lokal.	Mutation	Protein	Referenz	Herkunft
1	5'UTR	c.-122-107del	unklar	Keyser <i>et al.</i> , 2009	süd-afrikanisch
2	Exon 2	c.29T>C	Leu10Pro	Guo <i>et al.</i> , 2008	chinesisch
3	Exon 2	c.56delC/c.57G>A	Proteinabbruch	Hague <i>et al.</i> , 2003	
4	Exon 2	c.78G>A	Met26Ile	Abou-Sleiman <i>et al.</i> , 2003	aschkenasisch
5	Exon 2	c.91-2A>G	unklar	Ghazavi <i>et al.</i> , 2011	iranisch
6	Exon 3	c.115G>T	Ala39Ser	Tang <i>et al.</i> , 2006	
7	Exon 3	c.192G>C	Glu64Asp	Hering <i>et al.</i> , 2004	
8	Exon 4		Gly78	Abou-Sleiman <i>et al.</i> , 2003	aschkenasisch
9	Exon 5	c.293G>A	Arg98Gln	Abou-Sleiman <i>et al.</i> , 2003 Lockhart <i>et al.</i> , 2004 Healy <i>et al.</i> , 2004 Clark <i>et al.</i> , 2004 Pankratz <i>et al.</i> , 2006	aschkenasisch
10	Exon 5	c.294G>A	Arg98	Abou-Sleiman <i>et al.</i> , 2003	aschkenasisch
11	Exon 5	c.310G>A	Ala104Thr	Hague <i>et al.</i> , 2003 Clark <i>et al.</i> , 2004	
12	Exon 5	c.319G>C	Ala107Pro	Ghazavi <i>et al.</i> , 2011	iranisch
13	Intron 5	IVS5+2-12del	Proteinabbruch	Hedrich <i>et al.</i> , 2004	russisch
14	Exon 7	c.449A>C	Asp149Ala	Abou-Sleiman <i>et al.</i> , 2003	aschkenasisch
15	Exon 7	c.471-473delGCC	Pro158del	Macedo <i>et al.</i> , 2009	holländisch
16	Exon 7	c.480C>A	Thr160	Pankratz <i>et al.</i> , 2006	
17	Exon 7	c.487G>A	Glu163Lys	Annesi <i>et al.</i> , 2005	italienisch, komplexer Phänotyp
18	Exon 7	c.497T>C	Leu166Pro	Bonifati <i>et al.</i> , 2003	italienisch
19	Exon 7	c.501A>G	Ala167	Abou-Sleiman <i>et al.</i> , 2003	aschkenasisch
20	Exon 7	c.511G>T	Ala171Ser	Clark <i>et al.</i> , 2004	
21	Exon 7	c.523A>G	Lys175Glu	Nuytemans <i>et al.</i> , 2009	belgisch
22	Exon 7	c.535G>A	Ala179Thr	Macedo <i>et al.</i> , 2009 Nuytemans <i>et al.</i> , 2009	holländisch belgisch
23	Exon 7	c.558T>C	Val186	Hering <i>et al.</i> , 2004	
24	Exon 7	c.590-591insA	c.*120insA	Abou-Sleiman <i>et al.</i> , 2003	aschkenasisch
25	Exon 7	c.671G>A	c.*203G>A	Abou-Sleiman <i>et al.</i> , 2003	aschkenasisch

Tabelle 7.9.: Gendosis-Veränderungen des DJ-1-Gens

Nr.	Lokalisation	Gendosis-Veränderung	Referenz	Anmerkung
1	Exon 1a/b-5	Deletion	Bonifati <i>et al.</i> , 2003	holländisch
2	Exon 1a/b-5	Duplikation	Macedo <i>et al.</i> , 2009	holländisch
3	Exon 2	Deletion	Guo <i>et al.</i> , 2010	chinesisch
4	Exon 5	Deletion	Djarmati <i>et al.</i> , 2004	serbisch
5	Exon 5-7	Deletion	Hedrich <i>et al.</i> , 2004 (1)	südtirolisch

7.8.3. NR4A2-Mutationen

Tabelle 7.10.: Bisher in der Literatur beschriebene Mutationen des NR4A2-Gens

Nr.	Lokalisation	Mutation	Protein	Referenz	Herkunft
1	5'UTR	c.309C>T	keine Sequenzveränderung	Sleiman <i>et al.</i> , 2009	europäisch
2	Exon 1	c.-291Tdel	keine Sequenzveränderung	Le <i>et al.</i> , 2003	europäisch
3	Exon 1	c.-245G>T	„	Le <i>et al.</i> , 2003	europäisch
4	Exon 1	c.-253T>C		Hering <i>et al.</i> , 2004	afrikanisch
5	Exon 1	c.-223T>C		Hering <i>et al.</i> , 2004	süddeutsch
6	Exon 2	c.-35A>G	unklar	Liu <i>et al.</i> , 2012	chinesisch
7	Exon 2	c.-20C>G	unklar	Liu <i>et al.</i> , 2012	chinesisch
8	Exon 3	c.709G>C	Ser125Cys	Grimes <i>et al.</i> , 2006	kanadisch
9	Exon 3	c.711C>A	unklar	Liu <i>et al.</i> , 2012	chinesisch
10	Intron 4	IVS4-16G>T	unklar	Liu <i>et al.</i> , 2012	chinesisch
11	Exon 8	c.1615G>A	unklar	Liu <i>et al.</i> , 2012	chinesisch

Tabelle 7.11.: Häufigkeit der von Le *et al.* beschriebenen NR4A2-Mutationen beim PS

Referenz	Mutationshäufigkeit	Ethnische Herkunft	Anmerkung
Le <i>et al.</i> , 2003	10/107 (9,3 %)	kaukasisch	familiär
Wellenbrock <i>et al.</i>, 2003	0/50 (0 %)	deutsch	familiär
Zimprich <i>et al.</i> , 2003	0/44 (0 %)		familiär
Tan <i>et al.</i> , 2003	0/202 (0 %)	chinesisch	familiär
Nichols <i>et al.</i> , 2003	0/783 (0 %)		familiär
Carmine <i>et al.</i> , 2003	0/108 (0 %)	schwedisch	familiär und sporadisch
Ibanez <i>et al.</i> , 2004	0/108 (0 %)	französisch	familiär
Hering <i>et al.</i> , 2004	2/503 (0,4 %)	> 80 % deutsch	familiär und sporadisch
Levecque <i>et al.</i> , 2004	0/117 (0 %) 0/104 (0 %)	französisch	familiär Kontrollen
Karamohamed <i>et al.</i> , 2005	0/292 (0 %)	aus der <i>GenePD study</i>	familiär
Grimes <i>et al.</i> , 2006	1/202 (0,5 %)	kanadisch	familiär und sporadisch
Healy <i>et al.</i> , 2006	0/802 (0 %)	nordeuropäisch	familiär und sporadisch
Sleiman <i>et al.</i> , 2009	0/409 (0 %)	gemischt	familiär und sporadisch
Liu <i>et al.</i> , 2012	0/689 (0 %)	chinesisch	familiär und sporadisch

7.9. Votum der Ethikkommission

Die Genehmigung durch die Ethikkommission ist mit Schreiben vom 02.03.2006 mit Aktenzeichen 04-155 vorliegend.

7.10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich keinen anderen Zulassungsantrag gestellt habe, und dass ich die Dissertation nicht anderorts vorgelegt habe.

Ich habe mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den

8. Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mich auf dem Weg hin zur Fertigstellung dieser Arbeit in verschiedenster Weise unterstützt haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Christine Klein für die hervorragende Betreuung und die Möglichkeit, in dem spannenden Gebiet der Neurogenetik forschen zu können. Sie ermöglichte mir, ein Thema zu bearbeiten, welches mich persönlich fasziniert und ein Stück Forschergeist in mir weckte, zumal in meiner Familie ein Großvater und mehrere seiner Geschwister vom Parkinson-Syndrom betroffen waren.

Mit ihrer Unterstützung einer Famulatur an der neurologischen Polyklinik der Universität zu Lübeck und einem PJ-Tertial am Institute of Neurology des University College London, war es mir möglich, die klinischen Varianten des Parkinson-Syndroms kennen- und die gesamte Neurologie lieben zu lernen.

Des Weiteren danke ich ihr, für das Ermöglichen einer Kongressreise mit der Präsentation von Teilergebnissen dieser Arbeit, außerdem den für mich sehr wertvollen Gesprächen, Labortreffen und Journal-Clubs zu verschiedenen neurogenetischen Themen.

Herrn Prof. Dr. med. Eberhardt Schwinger danke ich für den bereitgestellten Laborplatz und die Möglichkeit zur Forschung am Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck.

Großer Dank sei der AG Molekulare Neurogenetik für die Unterstützung und das Anspornen ausgesprochen.

Frau Dr. rer. nat. Katja Lohmann stand mir stets mit wertvollen Tipps und tatkräftiger Unterstützung beim Etablieren und Optimieren von Methoden zur Seite. Sie arbeitete mich in die Experimente ein, war für jede Frage während der praktischen Arbeit und auch beim Abfassen der Arbeit offen und half beim Korrigieren des Manuskripts.

Frau Jennifer Garrels, Frau Karin Wiegers und Frau Thora Lohnau unterstützten mit Tipps und helfender Hand bei SSCs und Sequenzierungen. Herr Kemal Kabakci ermöglichte durch seine Arbeit in Form der DNA-Extraktion aus Blutproben die quantitative DNA-Untersuchung. Ich erinnere mich gern an die gemeinsamen Stunden mit der AG in meist positiver und beschwingter Atmosphäre.

Meinen „Mitstreitern“ Frau Eva-Maria Meyer und Frau Dr. Nora Schäfer danke ich für die gegenseitige Motivation und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Selbst in anstrengenden Phasen konnten wir uns unter anderem mit dem Ausprobieren neuer Backrezepte oder Tanzschritte bei Laune halten.

Auch allen anderen der AG Molekulare Neurogenetik vielen Dank für die herzliche Zusammenarbeit.

Für das Untersuchen der Patienten, die Bereitstellung der klinischen Daten und der Blutproben danke ich den Ärzten der neurologischen Ambulanzen der Universität zu Lübeck und Kiel, des Spitals in Bozen und weiterer Spezialambulanzen in Deutschland, USA, Kanada, Irland und Russland.

Insbesondere danke ich den Patienten und Kontrollpersonen für die Teilnahme an dieser Arbeit.

Abschließend danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann, für die große emotionale Unterstützung und den Glauben an sowie das Vertrauen in mich, was mich immer wieder neue Energie und Kraft schöpfen ließ.

9. Lebenslauf

Claudia Leuchs (geb. Wellenbrock)
geboren am 09.06.1979 in Hagenow

Ausbildung

07/1998	Abitur
01 - 09/1999	Grundausbildung und Ausbildung zum Sanitätsoffizieranwärter der Bundeswehr
10/1999	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
09/2001	Physikum
08/2002	1. Staatsexamen
08/2004	2. Staatsexamen
12/2005	3. Staatsexamen

Famulaturen

02 - 03/2002	Anästhesie an der Universität zu Lübeck
09 - 10/2002	Neurologie an der Universität zu Lübeck
07/2003	Psychiatrie am Bundeswehrkrankenhaus Koblenz
08/2003	Neurologie am Bundeswehrkrankenhaus Koblenz
09/2003	Innere Medizin am Bundeswehrkrankenhaus Koblenz

Praktisches Jahr

10/2004 - 02/2005	Chirurgie an der Universität zu Lübeck
02 - 05/2005	Neurologie am National Institute of Neurology London
05 - 07/2005	Innere Medizin in der Sana-Klinik Lübeck
07 - 09/2005	Innere Medizin am St. Lukes Hospital auf Malta

Beruflicher Werdegang

12/2005 - 07/2007	Neurologie und Psychiatrie am Bundeswehrkrankenhaus Berlin
08/2007 - 03/2008	Anästhesie und Notfallmedizin am Bundeswehrkrankenhaus Berlin

04/2008 - 01/2011	Allgemeinmedizin und Chirurgie am Fachsanitätszentrum Hannover
03/2009 - 05/2009	Auslandseinsatz im Kosovo als Rettungsmediziner
01/2010 - 05/2010	Auslandseinsatz im Kosovo als Rettungsmediziner und Kompaniechef
Seit 02/2011	Allgemeinmedizin in der Sanitätsstaffel Bischofswiesen

Promotion

11/2001 – 07/2004	“Mutationsanalysen bei Patienten mit Parkinson-Syndrom frühen und späten Beginns” in der Arbeitsgruppe Neurogenetik der Universität zu Lübeck
-------------------	---

10. Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten/Kurzberichte/Mitteilungen:

- **Wellenbrock C**, Hedrich K, Schäfer N, Kasten M, Jacobs H, Schwinger E, Hagenah J, Pramstaller PP, Vieregge P, Klein C. NR2A4 mutations are rare among European patients with familial Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54:415. **IF: 11,089**
- Klein C, Hedrich K, **Wellenbrock C**, Kann M, Harris J, Marder K, Lang AE, Schwinger E, Ozelius LJ, Vieregge P, Pramstaller PP, Kramer PL. Frequency of parkin mutations in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;54:415-6. **IF: 11,089**
- Hedrich K, Djarmati A, Schäfer 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. DJ1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2004;62:389-94. **IF: 8,31**