

Aus der Sektion für Klinische und Molekulare Neurogenetik
(Leiterin: Prof. Dr. med. C. Klein)
an der Klinik für Neurologie der Universität zu Lübeck
(Direktor: Prof. Dr. med. Th. Münte)

**Molekulargenetische Untersuchung einer
deutschstämmigen Familie mit einem
familiären Parkinson-Syndrom**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Wiebe Ulrike Külper
aus Hamburg

Hamburg 2012

1. Berichterstatterin:	Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Katja Lohmann
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Patrick Diemert
Tag der mündlichen Prüfung:	04. 07. 2013
zum Druck genehmigt. Lübeck, den	04. 07. 2013

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

*"Der Wissenschaftler findet seine Belohnung in dem, was Poincaré die
Freude am Verstehen nennt,
nicht in den Anwendungsmöglichkeiten seiner Erfindung."
(Albert Einstein)*

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Parkinson-Syndrom: Symptomatik, Ätiologie und Therapie	1
1.1.1. Symptomatik und Begriffsdefinition des Idiopathischen Parkinson-Syndroms	2
1.1.2. Ätiologie und Therapie des Idiopathischen Parkinson-Syndroms.....	6
1.2. Beitrag genetischer Faktoren bei genetisch bedingten Erkrankungen	9
1.3. Die Suche nach der Nadel im Heuhaufen - Grundprinzipien der Genidentifizierung	12
1.4. Genetik des Parkinson-Syndroms.....	15
1.5. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	22
1.6. Ziel der Arbeit.....	24
2. PATIENTEN, MATERIALIEN UND METHODEN	25
2.1. Patienten.....	25
2.1.1. Familie SP	25
2.1.2. Erläuterungen der Tests zur Erkrankungsschwere und etwaigen Frühsymptomen.....	31
2.1.3. Klinische Beschreibung des Indexpatienten	32
2.2. Materialien.....	33
2.2.1. Chemikalien.....	33
2.2.2. Kits	33
2.2.3. Lösungen.....	33
2.2.4. Geräte	34
2.3. Methoden	35
2.3.1. Durchführung der Genotypisierung.....	35
2.3.1.1. DNA-Extraktion	35
2.3.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.3.1.3. Gelelektrophorese	39
2.3.2. Das Studiendesign der Arbeit: Kopplungsanalyse und Feinkartierung ...	42
2.3.2.1. Kopplungsanalyse	42
2.3.2.2. Feinkartierung.....	45
2.3.3. Vom <i>LOD score</i> zur Basensequenz: Die DNA-Sequenzierung	46
3. ERGEBNISSE	53

3.1. Die genomweite Kopplungsanalyse legt 13 Kandidatenregionen nahe.....	53
3.2. Die Feinkartierung identifiziert den wahrscheinlichen Genort auf Chromosom 7.....	57
3.3. Die Sequenzierung ergibt keine pathogenetische Veränderung in den Kandidatengenomen.....	73
4. DISKUSSION	79
4.1. Der Phänotyp des Parkinson-Syndroms der Familie SP.....	79
4.2. Beurteilung der angewandten Methoden	82
4.2.1. Die Verfahren zur klinischen Diagnosestellung	82
4.2.2. Die molekulargenetische Methodik.....	83
4.3. Das Chromosom 7, die Kandidatenregion und die -gene.....	85
4.3.1. Das Chromosom 7.....	85
4.3.2. Die Kandidatenregion und die fünf Kandidatengene	86
4.3.3. Beurteilung der Auswahl der Kandidatengene und der Sequenzierungsmethodik	93
5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	94
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	96
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	98
8. ANHANG	i
8.1. Abkürzungsverzeichnis	i
8.2. Schriftprobe der Person I.2	iii
8.3. Erläuterung angewandter Tests	iv
8.3.1. <i>UK Parkinson's Disease Brain Bank Diagnostic Criteria</i>	iv
8.3.2. Tests zur Beurteilung der Erkrankungsschwere	v
8.3.3. Tests zur Einschätzung der kognitiven Fähigkeiten.....	vi
8.3.4. Tests zur Erfassung von Frühsymptomen	vi
8.4. Ergebnisse der klinischen Untersuchung aller in die genetische Analyse einbezogener Familienmitglieder	vii
8.5. <i>STR</i> -Marker der genomweiten Kopplungsanalyse und Feinkartierung	x
8.6. Gene in der identifizierten Kandidatenregion	xxi
8.7. Lebenslauf.....	xxvii
8.8. Danksagung	xxviii
8.9. Eidesstattliche Erklärung.....	xxix
8.10. Votum der Ethikkommission.....	xxx

1. EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wird eine deutschstämmige Familie beschrieben, in welcher mehrere Familienmitglieder an einem klassischen Parkinson-Syndrom (PS) erkrankt sind. Neben der Bewegungsstörung fällt die Häufung demenzieller Syndrome in der Familie auf, welche teilweise in Kombination mit dem PS auftreten. Da die Erkrankung in drei aufeinander folgenden Generationen der Familie vorkommt, wird eine monogene Ursache für das PS vermutet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Familie klinisch und genetisch charakterisiert, um den Hintergrund dieses familiären PS zu identifizieren.

In dem folgenden Abschnitt wird das PS zunächst allgemein in seiner Symptomatik und Ätiologie beschrieben und von anderen Formen des Parkinsonismus abgegrenzt. Des Weiteren werden die heute angewandten Therapiemöglichkeiten erklärt und nach einer kurzen Erläuterung genetischer Grundprinzipien die bisher bekannten genetischen Aspekte des PS näher beschrieben.

1.1. Das Parkinson-Syndrom: Symptomatik, Ätiologie und Therapie

„...the hand failing to answer with exactness to the dictates of the will. Walking becomes a task which cannot be performed without considerable attention. The legs are not raised to that height, or with that promptitude which the will directs, so that the utmost care is necessary to prevent frequent falls.“ (Parkinson, 1817)

So beschreibt James D. Parkinson, englischer Arzt und Naturwissenschaftler (1755-1824) 1817 in seinem Aufsatz *„Essay on the shaking palsy“* einige der Krankheitszeichen (Festination, Akinese), welche er dem Symptomkomplex der Erkrankung *paralysis agitans* bzw. *shaking palsy* zurechnete. Die damals von ihm beobachteten Merkmale kennzeichnen auch heute noch den klassischen Symptomenkomplex des nach ihm benannten PS (Thomas und Beal, 2007).

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS; Morbus Parkinson, Parkinson'sche Krankheit) zählt zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen mit einer altersabhängigen Prävalenz, die in der europäischen Bevölkerung bei 0,6 % bei den 65-69-Jährigen und bei 2,6 % bei den 85-89-Jährigen liegt, wobei beide

Geschlechter gleich häufig betroffen sind (de Rijk *et al.*, 2000). Die Erkrankung zeichnet sich durch die Symptome Akinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität aus, die in unterschiedlicher Ausprägung auftreten können. Im Allgemeinen werden drei PS-Typen unterschieden: 1. ein akinetisch-rigider Typ, welcher vorwiegend durch Akinese, Rigor, Festination und posturale Instabilität gekennzeichnet ist; 2. ein Tremor-dominanter Typ, bei welchem der klassische Ruhetremor im Vordergrund steht; und 3. ein Äquivalenztyp, bei dem die Kardinalsymptome Akinese, Rigor und Tremor in etwa gleichem Maße ausgeprägt sind (Storch und Gregor, 2009).

1.1.1. Symptomatik und Begriffsdefinition des Idiopathischen Parkinson-Syndroms

Da für die vorliegende Arbeit eine genaue Charakterisierung der PS-spezifischen Symptome der verschiedenen Familienmitglieder von Bedeutung ist, soll im Folgenden ausführlicher auf die Kardinalsymptome des IPS - Akinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität - eingegangen werden.

„...the muscular power is more decidedly diminished, (...) the words are now scarcely intelligible, (...) the saliva fails of being directed to the back part of the fauces (...)“
(Parkinson, 1817)

Das Leitsymptom des IPS ist die asymmetrische Akinese. Dieser Begriff impliziert nicht nur die Verlangsamung der Bewegungsabläufe der betroffenen Personen (Bradykinese), sondern auch deren erschwerte Initiation und die daraus resultierende Bewegungsarmut (Hypokinese) (Gerlach *et al.*, 2007). Die Akinese ist zu Beginn der Erkrankung asymmetrisch ausgeprägt, beschränkt sich vornehmlich auf die obere Extremität und initial nur auf eine Körperseite. Sofern die dominante Seite betroffen ist, fällt sie frühzeitig durch eine Mikrographie (verkleinertes Schriftbild) auf. Im fortgeschrittenen Stadium werden die Arme häufig im Ellenbogengelenk angewinkelt an den Körperstamm adduziert gehalten. Auf die Akinese lässt sich auch die Hypomimie (starrer Gesichtsausdruck), die Sialorrhoe (Hypersalivation aufgrund reduzierter Schluckhäufigkeit), die Seborrhoe im Gesichtsbereich (Salbengesicht bedingt durch die Hypomimie) und die monotone, leise und schlecht artikulierte

Sprache (Hypophonie) der Betroffenen zurückführen (Ceballos-Baumann, 2006; Gerlach et al., 2007).

„Spasticity, (...) is of spinal origin and is more or less directly related to a physiologic or structural dysfunction of the descending spinal pyramidal tracts. What is the physiologic explanation for rigidity in Parkinson's disease? As far as I know, nothing is known (...).“ (Charcot, 1887 (leçon 22))

„Sooner or later there is an apparent decrease in strength. Movement is slow and seemingly weak, although testing with a dynamometer shows that this is not really weakness. Such problems seem rather to relate as we will see to muscle rigidity.“ (Charcot, 1887 (leçon 9))

Parkinson selber unterschied nicht zwischen den Kardinalsymptomen Akinese und Rigor (Louis, 1997). Erst Jean-Martin Charcot, französischer Neurologe und Begründer der modernen Neurologie (1825-1893), differenzierte zwischen diesen Symptomen. Das Kardinalsymptom Rigor bezeichnet eine muskuläre Tonuserhöhung in agonistisch und antagonistisch wirkenden Muskelgruppen. Bei passiver Durchbewegung der Extremitäten zeigt sich ein gleichmäßiger, wächserner Widerstand, der anders als bei einer Spastik nicht abnimmt. Der im Zusammenhang mit einem IPS häufig verwendete Begriff „Zahnradphänomen“ beschreibt das ruckartige Nachgeben des Muskeltonus bei passiver Bewegung, welches auftritt, wenn dem Rigor ein Tremor unterlagert ist. Wie auch bei der Akinese beschränkt sich der Rigor zu Beginn der Erkrankung zumeist auf eine Körperhälfte und fällt vor allem beim Gehen durch ein vermindertes Mitschwingen des Armes auf. Er lässt sich häufig erst dann bannen, wenn mit der anderen Extremität eine bestimmte Bewegungsfolge ausgeführt wird (sog. aktivierbarer Rigor bei Koinnervation).

„...with a proneness to trembling in some particular part; (...) most commonly in one of the hands and arms (...). He first perceived weakness in the left hand and arm, and soon after found the trembling commence. (...) three years afterwards the right arm became affected in a similar manner: and soon afterwards the convulsive motions affected the whole body (...).“ (Parkinson, 1817)

Der klassische Ruhetremor, der der Erkrankung auch den Namen „*paralysis agitans*“ bzw. „Schüttellähmung“ gab, tritt initial bei weniger als 50 % der Patienten auf (Ceballos-Baumann, 2006). Der für ein IPS typische Tremor ist niedrig-frequent mit

einer Frequenz von 4-6 Hz und wird auch als „pill-rolling“-Tremor bezeichnet, da er an das stereotype Drehen von Pillen erinnert. Er äußert sich zu Beginn der Erkrankung vornehmlich unilateral in Ruhe und sistiert, anders als der höherfrequente Intentionstremor, bei Bewegungsbeginn. Nicht selten tritt auch beim Halten der ausgestreckten Extremität ein Haltetremor mit einer deutlich höheren Frequenz und einer häufig niedrigeren Amplitude auf.

„...the patient can no longer exercise himself by walking in his usual manner, but is thrown on the toes and forepart of the feet; being, at the same time, irresistibly impelled to take much quicker and shorter steps, and thereby to adopt unwillingly a running pace. In some cases it is found necessary entirely to substitute running for walking; since otherwise the patient (...) would inevitably fall.“ (Parkinson, 1817)

Die Störung der posturalen Reflexe äußert sich häufig durch vermehrte Stürze der betroffenen Personen, da die Fähigkeit abhanden kommt, erforderliche Ausgleichsbewegungen auszuführen, um Stürze zu verhindern (Boonstra *et al.*, 2008). Während in einem mittleren Krankheitsstadium diese Störung noch durch sog. Retropulsionstests, d. h. plötzliches Zurückziehen an den Schultern provoziert werden muss, kann es im Verlauf der Erkrankung durch zunehmende Beeinträchtigung der Halte- und Stellreflexe spontan zu Stürzen kommen.

Das Gangbild eines klassischen Parkinsonpatienten ist gekennzeichnet durch eine vornübergebeugte Haltung und einen trippeligen, kleinschrittigen Gang. Bei Wendemanövern bedingt letzterer, dass die Personen eine erhöhte Anzahl an Wendeschritten beim Umdrehen benötigen als üblich. Des Weiteren ist das Gangbild durch sog. „Freezing“- Momente charakterisiert, die gekennzeichnet sein können durch ein plötzliches Erstarren der Person in einer Bewegung, bspw. bei der Passage von Engstellen und Hindernissen oder durch die Unfähigkeit, eine Bewegung zu initiieren.

„...In this stage, the sleep becomes much disturbed. (...) The urine and faeces are passed involuntarily; and at the last, constant sleepiness, with slight delirium, and other marks of extreme exhaustion, announce the wished-for release.“ (Parkinson, 1817)

Über die genannten Kardinalsymptome hinaus lassen sich auch weitere, nicht-motorische, kognitive und neuropsychiatrische Symptome beobachten (Löhle *et al.*,

2009; Park und Stacy, 2009; Gómez-Esteban *et al.*, 2011), wie bspw. eine dementielle Entwicklung, gehäuft auftretende Depression (Riedel *et al.*, 2010), Anhedonie (Lemke, 2008) sowie eine REM-Schlafbezogene Parasomnie (Chaudhuri *et al.*, 2006; Tolosa *et al.*, 2009; Menza *et al.*, 2010). Des Weiteren treten im Verlauf der Erkrankung häufig vegetative Symptome wie orthostatische Dysregulation, Obstipation, Detrusorhyperreflexie (mit Dranginkontinenz) und Impotenz auf (Truong *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2011).

Bereits vor Auftreten der ersten motorischen Symptome liegt ein vermindertes Geruchs- und/oder Farbdiskriminierungsvermögen vor (Del Tredici *et al.*, 2002; Braak *et al.*, 2003; Löhle *et al.*, 2009). Etwa 40 % der betroffenen Personen berichten darüber hinaus über weitere Frühsymptome wie unspezifische Parästhesien, Schmerzen oder Taubheitsgefühle, die den motorischen Symptomen auf der später klinisch betroffenen Seite vorausgehen (Defazio *et al.*, 2008; Barone *et al.*, 2009).

Da in der Literatur verschiedene Termini für die Erkrankung kursieren, die häufig synonym für unterschiedliche Ausprägungen eines ähnlichen Krankheitsbildes verwendet werden, sollen zunächst drei für die vorliegende Arbeit relevante Begriffe genauer erläutert werden.

Idiopathisches Parkinson-Syndrom

Der in dieser Arbeit verwendete Begriff „Idiopathisches Parkinson-Syndrom“ (IPS) beschreibt mit einer Prävalenz von ca. 75 % die häufigste Form eines Parkinsonismus (Klein und Lohmann-Hedrich, 2007), dessen Ursachen, wie der Name bereits impliziert, bisher unbekannt sind. Die Erkrankung, welche auch unter dem Terminus „Morbus Parkinson“ bekannt ist, tritt in der Regel im höheren Lebensalter auf (de Rijk *et al.*, 2000). Neben dem Kardinalsymptom Akinese muss für die Diagnose eines IPS ein weiteres Symptom - Rigor, Ruhetremor oder posturale Instabilität - vorliegen. Die Symptome sind zu Beginn der Erkrankung meistens auf eine Körperhälfte beschränkt. Im Verlauf der Krankheit betreffen die Symptome in der Regel jedoch beide Körperhälften, wobei die Asymmetrie lange erhalten bleibt. Die Gabe von Levodopa bessert beim IPS die Symptomatik typischerweise sehr gut, allerdings kann der progrediente Krankheitsverlauf durch diese Therapie nicht aufgehalten werden (Schapira, 2005; Kompetenznetz-Parkinson, 2011).

Familiäres/genetisches Parkinson-Syndrom

Wenn ein PS auf eine einzelne genetische Ursache zurückgeführt werden kann, spricht man von einem monogenen PS. Eine genetische Veränderung kann dabei Grund für eine familiäre Häufung eines PS sein, weshalb in diesem Fall von einem familiären PS gesprochen wird. Genetische Veränderungen können jedoch auch sporadisch, d. h. nur bei einzelnen Personen, vorkommen, wenn bspw. eine Neumutation im Erbgut auftritt oder wenn eine Mutation aufgrund des sog. Phänomens der reduzierten Penetranz nicht bei allen Mutationsträgern zu phänotypischen Veränderungen führt.

Bisher kann lediglich ein kleiner Prozentsatz aller PS auf eine monogene Ursache zurückgeführt werden (Hatano *et al.*, 2009; Lesage und Brice, 2009). Diese Formen liefern jedoch wichtige Informationen zum näheren Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung und sind somit seit einigen Jahren Bestandteil intensiver Forschung. In Abschnitt 1.4 werden die verschiedenen, bisher bekannten genetischen Formen näher erläutert.

Sekundäres/symptomatisches Parkinson-Syndrom

Kann ein PS anamnestisch auf eine definitive Ursache zurückgeführt werden, wie bspw. auf eine Toxinexposition (Kohlenmonoxid, MPTP) (Sanyal *et al.*, 2010), eine metabolische Erkrankung (Morbus Wilson), eine Läsion der Basalganglien wie eine Kalzifizierung im Rahmen eines Hypoparathyreodismus, eine zerebrale Mikroangiopathie oder auf die Einnahme bestimmter Medikamente (Neuroleptika, Amphetamine, u. a.), wird von einem sekundären PS gesprochen (Kompetenznetz-Parkinson, 2011).

Im Allgemeinen bleibt es jedoch häufig schwierig, die symptomatische Ursache abzugrenzen, da die Krankheitsbilder innerhalb der Erkrankung sehr heterogen ausfallen können und darüber hinaus Symptomatik und Krankheitsverlauf von etwaigen Vorerkrankungen beeinflusst werden.

1.1.2. Ätiologie und Therapie des Idiopathischen Parkinson-Syndroms

Führte James Parkinson die Symptome des PS noch auf eine Störung des Rückenmarks der Halswirbelsäule zurück (Parkinson, 1817), konnten Ehringer und Hornykiewicz 1960 die Krankheitssymptome mit einem Mangel an Dopamin in der

Substantia nigra (SN) des Mittelhirns in Verbindung bringen (Ehringer und Hornykiewicz, 1960).

Die SN, bestehend aus *pars compacta* (SNc) und *pars reticularis* (SNr), steht funktionell in enger Beziehung mit anderen Basalganglien - *Striatum* und *Globus pallidus* -, welche u. a. für die Planung, Ausführung und Koordination von Bewegungsabläufen zuständig sind. Im physiologischen Zustand hemmt die SNc die bewegungsinhibierende Aktivität des *Striatums* und bewirkt somit eine Aktivierung der motorischen Zentren der Großhirnrinde.

Der Mangel an Dopamin beim IPS, welcher auf den vorzeitigen und übermäßigen Untergang dopaminerger Neurone in der SNc zurückzuführen ist, bewirkt eine Enthemmung des *Striatums* und eine Aufhebung der aktivierenden Wirkung der SNc, was in den für das IPS charakteristischen „Negativ-Symptomen“ Akinese („zu wenig Bewegung“) und posturale Instabilität („zu wenig Stellreflexe“) resultiert.

Des Weiteren führt die verminderte dopaminerge Innervation des *Nucleus caudatus* zu einem Ungleichgewicht zwischen den Neurotransmittern Dopamin und Acetylcholin. Das relative Übergewicht von Acetylcholin verursacht die sog. „Plus-Symptome“ Tremor („zuviel Bewegung“) und Rigor („zuviel Muskeltonus“) (Crossmann, 2000).

Die Degeneration dopaminerger Neurone erfolgt physiologischerweise auch bei gesunden Menschen im Rahmen natürlicher Altersvorgänge. Man vermutet, dass ca. 7 % der nigrostriatalen Neurone pro Lebensdekade degenerieren (Siefker, 2006). Die IPS-typischen Symptome treten jedoch erst auf, wenn mehr als 60 % der dopaminerger Neurone untergegangen sind (Bernheimer *et al.*, 1973; Lesage und Brice, 2009). Der frühzeitige und beschleunigte Untergang dieser Neurone bei einem PS lässt sich postmortal u. a. durch eine Depigmentierung der SN von Parkinson-Patienten nachweisen (Underwood, 2004).

Von der Neuronendegeneration sind auch andere dopaminerge Nervenzellkomplexe außerhalb der SN betroffen, wie bspw. die dopaminerger Neurone in der Retina oder im *Nucleus olfactorius anterior*. Dieser Neuronenuntergang erklärt den bereits früh im Krankheitsverlauf einsetzenden Verlust des Farb- und Geruchsdiskriminierungsvermögens (Del Tredici *et al.*, 2002; Braak *et al.*, 2003; Gaig und Tolosa, 2009). Des Weiteren findet ein Neuronenuntergang auch in noradrenergen und serotonergen Kernen statt, wobei dieser zwar weniger stark ausgeprägt ist, u. a. aber für die

Entstehung der Parkinson-assoziierten Depression und REM-Schlaf-bezogener Verhaltensstörungen relevant ist (Comella, 2007; Lemke, 2008; Erro *et al.*, 2010).

In den untergehenden Ganglienzellen der dopaminergen Neurone treten lokal intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen, sog. Lewykörperchen, auf (Erstbeschreiber Fritz H. Lewy, 1885-1950), welche α -Synuclein, Ubiquitin, Neurofilamente und andere Proteine enthalten (Krüger *et al.*, 2000; Braak *et al.*, 2004). Lewykörperchen sind zwar charakteristisch für ein PS, jedoch nicht spezifisch für dieses Krankheitsbild (Schulz-Schaeffer, 2010).

Welche Faktoren das vorzeitige selektive Absterben dieser Neurone bewirken und wodurch sich die dopaminergen Neurone der SNc von anderen Neuronen unterscheiden, ist noch weitgehend unbekannt. Umwelteinflüsse, wie die genannte Toxinexposition und genetische Faktoren werden sowohl in Kombination als auch als alleinige Ursache diskutiert. Wichtige Auslöser scheinen oxidativer Stress der Nervenzellen und eine mitochondriale Dysfunktion zu sein (Klein und Schlossmacher, 2006; Henchcliffe und Beal, 2008; Büeler, 2009; Jomova *et al.*, 2010).

Therapie des Parkinson-Syndroms

Da die Ätiologie der Neuronendegeneration noch weitgehend unbekannt ist, wird das PS in erster Linie symptomatisch therapiert - eine kausale Therapie existiert bisher nicht.

Das auch heute noch wirkungsvollste Medikament Levodopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) wurde erstmals 1961 durch Hornykiewicz zur Therapie des PS eingesetzt (Birkmayer und Hornykiewicz, 1961). Die lipophile Substanz kann anders als sein Metabolit Dopamin die Blut-Hirn-Schranke durchdringen und somit selektiv zu einem erhöhten Angebot von Dopamin im Gehirn führen. Um die frühzeitige Verstoffwechselung des Levodopas in der Leber zu verhindern, muss die Substanz stets in Kombination mit einem Decarboxylasehemmer (bspw. Benserazid, Carbidopa) verabreicht werden.

Trotz der guten Wirksamkeit des Medikaments treten bei einer Langzeittherapie in der Regel nach einigen Jahren tageszeitabhängige Schwankungen der Beweglichkeit (sog. *On-Off*-Phänomene) und Levodopa-induzierte Dyskinesien auf (Crossman, 2000; Schapira, 2005; Poewe *et al.*, 2010). Da diese Nebenwirkungen bei Dopaminagonisten möglicherweise seltener bzw. später auftreten, werden diese

primär in der Initialtherapie jüngerer Patienten (< 70 Jahren) mit einer leichten bis mittelschweren Symptomatik eingesetzt. In der Regel werden nicht-ergotartige Dopaminagonisten, wie bspw. Ropinirol, Pramipexol und Rotigotin verwendet. Um den Abbau von Levodopa zu verzögern und die Bioverfügbarkeit zu erhöhen, werden u. a. auch Hemmer der Catechol-O-Methyl-Transferase (Entacapon, Tolcapon) und der Monoaminoxidase B (Selegilin, Rasagilin) eingesetzt.

Seit einigen Jahren steht für geeignete Patienten mit einem fortgeschrittenen IPS auch ein operatives Verfahren - die tiefe Hirnstimulation - als Therapieoption zur Verfügung. Dabei wird ein elektrisches Feld mittels Hochfrequenzstimulation erzeugt, das modulierend auf die Aktivität des *Nucleus subthalamicus* einwirkt.

1.2. Beitrag genetischer Faktoren bei genetisch bedingten Erkrankungen

„The abnormality (Alkaptonurie Anm. d. A.) is apt to make its appearance in two or more brothers and sisters whose parents are normal and among whose forefathers there is no record of its having occurred, a peculiar mode of incidence (...). Thus of 32 known examples, which were presumably congenital, no less than 19 have occurred in seven families. (...) In four British families in which were 11 congenitally alkaptonuric members no less than three were the offspring of marriages of first cousins who did not themselves exhibit this abnormality.“ (Garrod, 1902)

Eine familiäre Häufung bestimmter Krankheitsbilder wurde bereits 1902 durch den Arzt Archibald Garrod in seinem Artikel *„The Incidence of Alkaptonuria: A Study in Chemical Individuality“* beschrieben. Garrod beobachtete im Rahmen seiner ärztlichen Tätigkeit ein vermehrtes Auftreten der metabolischen Erkrankung Alkaptonurie bei Kindern gesunder blutsverwandter Eltern. In seinem 1923 verfassten Werk *„Inborn Errors of Metabolism“* vermutete er dann, dass diese Erkrankung nicht, wie zuvor geglaubt, durch eine bakterielle Infektion im Kindesalter entsteht, sondern vielmehr eine Vererbung mit einem sog. rezessiven Muster wirke (Garrod, 1923).

Bis heute sind ca. 16.000 Erkrankungen bekannt, welche auf eine Veränderung im Erbgut von Betroffenen zurückgeführt werden können (Grimm, 2006). Im Folgenden werden einige genetische Grundlagen beschrieben, die für das Verständnis von Erbkrankheiten und der Genetik des PS relevant sind.

Chromosomen, Gene und Mutationen

Das menschliche Genom ist auf 23 Chromosomen verteilt. Der einfache Chromosomensatz kommt so allerdings nur in haploiden Geschlechtszellen vor. Alle somatischen Zellen verfügen über den diploiden Chromosomensatz ($n = 46$), welcher aus jeweils 22 homologen mütterlichen und väterlichen Autosomen (Chromosom 1-22) und zwei Gonosomen (X- und Y-Chromosom) besteht. Lediglich 0,1 % der genetischen Information befindet sich auf der mitochondrialen DNA, die ausschließlich über das Zytoplasma der Eizellen vererbt wird und somit nur von der Mutter auf die Nachkommen weitergegeben werden kann.

Genetische Merkmale, wie bspw. krankheitsverursachende DNA-Veränderungen können demnach autosomal (bspw. Chorea Huntington, Mukoviszidose), gonosomal (bspw. Hämophilie A) oder mitochondrial (bspw. chronisch progressive Ophthalmoplegie) vererbt werden.

Durch das Humane Genom-Projekt, mit dessen Hilfe zwischen den Jahren 1993 und 2004 das menschliche Genom zu 99 % entschlüsselt werden konnte, wurde die Anzahl der menschlichen Gene auf ca. 20.000 bis 26.000 geschätzt (Venter *et al.*, 2001; International Human Sequence Consortium, 2004). Diese Gene setzen sich bei Eukaryonten aus Exons, welche lediglich 1 % der gesamten DNA ausmachen sowie nicht-kodierenden Introns zusammen und werden durch ebenfalls nicht-kodierende DNA-Abschnitte voneinander getrennt (sog. intergenische DNA).

Im Rahmen der Proteinbiosynthese werden die Gene zunächst in eine sog. prä-mRNA transkribiert, deren Nukleotidinformation - nach verschiedenen Aufarbeitungsschritten - im Ribosom in Aminosäuresequenzen translatiert wird. Die prä-mRNA enthält zunächst noch die gesamte Information der Exons und Introns. Durch das Spleißen der nicht-kodierenden Introns entsteht die mRNA (Abbildung 1.1). Diese dient im Rahmen der Translation als Vorlage, so dass lediglich die Information der Exons in einen Aminosäurestrang „übersetzt“ wird. Dabei kodieren jeweils drei Basen (sog. Basen-*Triplets*) für eine der 20 proteinogenen Aminosäuren. Durch Mutationen der DNA kann es zum Austausch von Basenpaaren kommen. Da aufgrund der sog. Degeneriertheit des genetischen Codes jedoch mehrere Nukleotidkombinationen für ein und dieselbe Aminosäure kodieren können, zieht nicht jeder Basenpaaraustausch auch einen Aminosäureaustausch nach sich. Kodiert eine neue Nukleotidkombination somit weiterhin für dieselbe Aminosäure, spricht man von einer *Silent-Mutation*. So kodieren bspw. die Trinukleotide G-A-G

ebenso für die Aminosäure Glutamin wie die Kombination G-A-A. Wird hingegen eine Aminosäure aufgrund des Basenpaaraustausches durch eine andere ersetzt, wird dies als *Missense-Mutation* bezeichnet. Manche Aminosäureveränderungen werden dabei toleriert, andere hingegen können bereits eine Erkrankung induzieren.

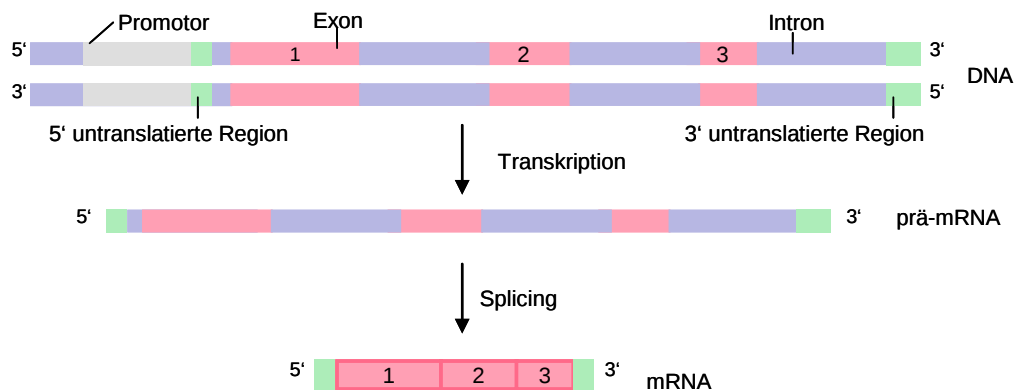


Abb.1.1: Prinzip der Transkription. Die DNA wird im Rahmen der Transkription zunächst in prä-mRNA umgeschrieben. Dabei bindet die RNA-Polymerase an eine bestimmte Stelle des Promotors und initiiert zusammen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren die Transkription in eine prä-mRNA, die aus Introns, Exons und der 5'- bzw. 3'-untranslatierten Region besteht. Durch Herausschneiden der nicht-kodierenden Introns (Spleißen) entsteht die mRNA, die als Vorlage für die Translation dient. Die 5'-untranslatierte Region dient der besseren Bindung der mRNA an das Ribosom im Rahmen der Translation, die 3'-untranslatierte Region enthält Sequenzen, die die Transkription bzw. die Translation regulieren. Diese Regionen werden im Rahmen der Translation nicht in Aminosäuren umgeschrieben.

Entsteht durch einen Basenpaaraustausch ein Stopp-Codon, welches den Abbruch der Translation vor der vollständigen Proteinsynthese bedingt, handelt es sich um eine *Nonsense-Mutation*. Ein Basenpaaraustausch, welcher mit einer Häufigkeit von $> 1 \%$ in einer Population auftritt, wird auch als *single nucleotide polymorphism (SNP)* bezeichnet. Eine Mutation hingegen beschreibt in der Regel eine pathogene Veränderung mit einer Häufigkeit $< 1 \%$.

Neben den beschriebenen Mutationen gibt es noch viele weitere Mutationsformen (u. a. *Promoter-Mutationen*, *Spleiß-Mutationen*, *Insertionen*), auf die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen werden soll.

Erbgänge: dominante, rezessive, monogene und komplex-genetische

Aufgrund der Diploidität des Chromosomensatzes liegen die autosomalen Gene sowohl mütterlichen als auch väterlichen Ursprungs vor. Wird der Phänotyp eines Gens lediglich von einem der beiden Allele bestimmt, ist dieses Allel gegenüber dem zweiten dominant. Das bedeutet, dass eine einzelne (heterozygote) Mutation auf einem Allel bereits eine Erkrankung auslösen kann und somit jeder heterozygote

Mutationsträger auch Merkmalsträger ist (bspw. Osteogenesis imperfecta Typ II). Häufig gehen dominant vererbte Mutationen entweder mit einer verstärkten, oder toxischen Proteinaktivität gegenüber der physiologischen Form einher (*gain of function*-Mechanismus). Alternativ kann auch ein als Haploinsuffizienz bezeichnetes Phänomen bestehen, bei dem die „halbierte“ Dosis an translatiertem Protein nicht ausreicht, um die physiologische Aktivität des Proteins aufrechtzuerhalten.

Ein Merkmal, welches rezessiv vererbt wird, muss hingegen auf beiden Allelen vorliegen, um den Phänotyp zu prägen. Die Mutation eines Allels wird, wie beim bereits erwähnten Beispiel der Alkaptonurie, „toleriert“. Erst das Zusammentreffen zweier mutierter Allele, wie es bei Kindern blutsverwandter Eltern vorkommen kann, löst die phänotypische Veränderung aus. Rezessiv vererbte Mutationen bewirken zumeist einen Aktivitätsverlust des Proteins (*loss of function*-Mechanismus) (Holinski-Feder, 2006).

Wird eine Erbkrankheit durch eine Veränderung in einem einzigen Gen ausgelöst, so spricht man von einer monogenen Erkrankung (bspw. Mukoviszidose). Sehr viel häufiger liegt einer Erkrankung jedoch eine komplex-genetische Ursache zugrunde. D. h., dass mehrere genetische Veränderungen sowie Umwelteinflüsse bei der Entstehung einer Krankheit eine Rolle spielen. Dabei erhöht zwar jeder einzelne Faktor das Risiko für die Erkrankung, reicht aber alleine nicht aus, um die Krankheit auszulösen (bspw. Schizophrenie (Lill und Bertram, 2010)).

1.3. Die Suche nach der Nadel im Heuhaufen - Grundprinzipien der Genidentifizierung

Die Identifizierung pathogenetischer Veränderungen in einem Gen gleicht bei den ca. 3 Mrd. Basenpaaren und ca. 26.000 Genen, aus welchen unser Genom besteht (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004), einer wahren Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Zwar ist nur ein geringer Anteil des Genoms kodierend (Exons), allerdings scheinen auch die nicht-kodierenden Introns und die intergenischen Abschnitte der DNA eine Rolle u. a. bei der Regulation der Genexpression zu spielen. Da sich die pathogenetischen Veränderungen sowohl in den Exons als auch in den Introns oder in der intergenischen DNA befinden können, bedarf es einer guten Methode, um den genetischen „Heuhaufen“ auf krankheitsverursachende Veränderungen hin zu untersuchen.

Je nachdem ob von einer monogenen oder multifaktoriellen Ursache für eine bestimmte Erkrankung ausgegangen wird, kommen unterschiedliche Studiendesigns zur Anwendung, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

Die Kopplungsanalyse

Tritt, wie bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Familie SP, eine Erkrankung gehäuft innerhalb einer Familie auf, gibt dies Hinweis auf das Vorliegen einer monogenen Erkrankung. Mittels einer sog. Kopplungsanalyse lässt sich die der Erkrankung zugrunde liegende einzelne pathogenetische Veränderung im Erbgut der betroffenen Familie lokalisieren. Das Prinzip dieses Studiendesigns basiert dabei auf der Beobachtung, dass Merkmale, die auf einem Chromosom eng benachbart liegen, nicht unabhängig voneinander vererbt, sondern gekoppelt, d. h. gemeinsam übertragen werden (Morgan, 1910; Grimm, 2006).

Diese Kopplung kann durch *Crossing-over*, d. h. durch DNA-Austausch zwischen zwei homologen Chromosomen, aufgehoben werden. In der Meiose können sich dabei zwei der vier Chromatidchromosomen so dicht aneinanderlagern, dass es zu Brüchen einzelner Chromosomenteilstücke kommt, welche mit anderen (homologen) Teilstücken verschmelzen und somit die ursprüngliche elterliche Herkunft der Allele auf dem Chromosom ändern. Nach der Reifeteilung der „neu zusammengesetzten“ Chromatiden kommt es so zu rekombinanten Gameten; eine Rekombination hat stattgefunden (siehe auch Abbildung 2.3) (Holliday, 1961; Strachan und Read, 2005; Berg *et al.*, 2010).

Die Wahrscheinlichkeit einer Trennung zweier Gene durch *Crossing-over* (= Rekombinationsrate) ist abhängig vom Abstand der Gene auf dem Chromosom. Je weiter zwei Gene voneinander entfernt liegen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch ein *Crossing-over* der homologen Chromosomen voneinander getrennt werden. Dicht benachbarte Gene werden demgegenüber nur selten voneinander getrennt (Grimm, 2006). Die Angabe des Abstands zweier Gene in *Centimorgan* (cM) drückt diese Wahrscheinlichkeit der Trennung der Gene durch *Crossing-over* aus. In Bezug auf die Rekombinationsraten kann 1 cM mit einer 1 %-igen Rekombinationshäufigkeit gleichgesetzt werden. Da ein *Crossing-over* jeweils nur zwei der vier Allele betrifft, ergibt sich für zwei Gene auf dem gleichen Chromosom eine minimale Rekombinationsrate $\theta = 0$ (die Gene werden gekoppelt

vererbt) und eine maximale Rekombinationsrate $\theta = 0,5$ (die Gene werden ungekoppelt vererbt).

Bei der Kopplungsanalyse wird das Genom von Familienmitgliedern auf gekoppelte Chromosomenbereiche, die bei den betroffenen, nicht jedoch bei den nicht-betroffenen Personen nachgewiesen werden können, untersucht (Daiger, 2005). Liegen, wie in der vorliegenden Arbeit, keine Informationen über die Lokalisation der gesuchten Veränderung vor, wird zunächst eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt, um sich dem koppelnden Chromosomenabschnitt zu nähern. Ist hingegen bereits die Chromosomenregion bekannt, in welcher sich die pathogene Veränderung befindet, kann mittels Feinkartierung dieser Abschnitt näher eingegrenzt werden.

Um einen Chromosomenabschnitt in einem Stammbaum verfolgen zu können, bediente man sich bei Aufnahme der vorliegenden Arbeit sog. Mikrosatelliten- (*short tandem repeat*- (*STR*-)) Marker. Dabei handelt es sich meist um n-zählige Wiederholungen der Basenfolge C-A in nicht kodierenden DNA-Abschnitten, die über dem gesamten Genom verteilt vorliegen. Im Vergleich zu *SNPs* sind *STR*-Marker zwar seltener, jedoch hochpolymorph, d. h. sie können viele verschiedene (Längen-)Ausprägungen annehmen und ermöglichen es so, Individuen anhand ihrer Markerlänge voneinander zu unterscheiden.

Um die Anordnung der *STR*-Marker auf dem Genom festlegen zu können, wurden seit 1984 mit Hilfe von 61 Familien, welche durch das *Centre pour l'Etude des Polymorphismes Humaines (CEPH)* analysiert wurden, Markerrahmenkarten erstellt. Heute werden diese ebenfalls durch das Humane Genom Projekt erarbeitet.

Innerhalb der letzten Jahre wurde die Kopplungsanalyse mit *STR*-Markern durch die Analyse mittels *SNPs* abgelöst. Letzteres Verfahren ist mittlerweile automatisiert mit Hilfe von DNA-Chips möglich und somit ggb. dem Verfahren mit *STR*-Markern nicht nur weniger zeit- und arbeitsintensiv, sondern vor allem auch finanzierbar geworden. Da zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit *SNP*-Genotypisierungen noch recht teuer und die *SNPs* noch nicht ausgereift waren (Probleme bei der Lesbarkeit), wurden für die Kopplungsanalyse und Feinkartierung dieser Arbeit *STR*-Marker verwendet, welche größtenteils bereits in der Sektion für Klinische und Molekulare Neurogenetik vorhanden waren; somit blieben die Kosten relativ gering.

Assoziationsstudien

Um im Rahmen multifaktorieller oder polygener Erkrankungen die Veränderungen im Erbgut zu identifizieren, welche im Zusammenspiel mit anderen Faktoren eine Erkrankung begünstigen (sog. Suszeptibilitätsgene), werden in Fall-Kontroll-Studien die Häufigkeiten des Auftretens bestimmter genetischer Varianten bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen miteinander verglichen. Anders gesagt wird dabei die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit welcher eine Erkrankung mit einem bestimmten genetischen Merkmal assoziiert ist (sog. Assoziationsstudien). Der Quotient, der sich aus diesem Verhältnis - Wahrscheinlichkeit, als Merkmalsträger an einer Krankheit zu erkranken vs. Wahrscheinlichkeit, als Nicht-Merkmalsträger zu erkranken - wird *Odds Ratio* genannt und ist eine Schätzung des relativen Risikos.

Assoziationsstudien werden vor allem bei nicht verwandten Individuen durchgeführt, da hier eine Kopplungsanalyse nicht möglich ist. Das Genom der erkrankten Personen wird dabei auf *SNPs* hin untersucht, die im Gegensatz zu *STR*-Markern seltener mutieren.

1.4. Genetik des Parkinson-Syndroms

Die Ätiologie des PS wurde lange Zeit allein auf verschiedene Umwelteinflüsse zurückgeführt. Die Bedeutung genetischer Faktoren wurde dabei im Allgemeinen als eher gering eingeschätzt (Gasser, 2000). In dem letzten Jahrzehnt war es jedoch möglich, genetische Ursachen für die Entstehung des PS zu identifizieren, wobei monogene Formen von komplex-genetischen unterschieden werden (Schulz, 2008). Monogene Formen, die zunächst in einzelnen betroffenen Familien identifiziert wurden, jedoch im weiteren Verlauf auch bei sporadischen Patienten nachgewiesen werden konnten, machen lediglich ca. 2-3 % aller PS aus (Klein und Lohmann-Hedrich, 2007). Für die Mehrzahl der PS werden komplex-genetische Ursachen vermutet.

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund des Vorkommens der Erkrankung in drei aufeinanderfolgenden Generationen von einer monogenen Ursache für das PS bei dieser Familie ausgegangen. Daher soll im Folgenden näher auf die bereits bekannten monogenen PS-Formen eingegangen und die identifizierten Gene, die eine monogenes PS auslösen können, zusammenfassend beschrieben werden.

Viele monogene PS-Formen zeichnen sich durch ein frühes Erkrankungsalter aus (< 20. Lebensjahr bei der juvenilen Form, < 40. Lebensjahr bei der frühen Form des PS), lassen sich jedoch - abgesehen von einigen Ausnahmen - klinisch nicht von einem IPS unterscheiden (Klein und Schlossmacher, 2006). Sie werden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit dem Akronym *PARK* - für „Parkinson“ - (*PARK* 1-16) betitelt, wobei bisher lediglich elf Gene identifiziert werden konnten. In den übrigen Fällen sind nur die Genorte, nicht jedoch die eigentlichen Gene bekannt (Tabelle 1). Darüber hinaus muss die Exklusivität des *PARK*-Akronyms für rein monogene Formen relativiert werden, da die Genorte *PARK* 10-12 und *PARK*16 zu den komplex-genetischen Formen zählen und lediglich zu einer erhöhten Empfindlichkeit für ein PS führen.

Die Identifizierung von PS-Genen ermöglicht es, die Pathophysiologie des PS zumindest in Teilen verstehen zu können. Darüber hinaus wird durch deren Kenntnis auch die Suche nach weiteren erleichtert, die aufgrund ähnlicher Zellfunktionen oder -lokalisationen auch mit der Entstehung des PS in Verbindung stehen könnten.

Tabelle 1: Bekannte genetische Formen des PS

<i>PARK</i>-Akronym	Vererbungsmuster	Chrom.lokalisation	Gen	OMIM
<i>PARK1/PARK4</i>	autosomal dominant	4q21-q23	<i>SNCA</i>	168601
<i>PARK2</i>	autosomal rezessiv	6q25-q27	<i>Parkin</i>	600116
<i>PARK3</i>	autosomal dominant	2p13	?	602404
<i>PARK5</i>	autosomal dominant	4p14	<i>UCHL1</i>	191342
<i>PARK6</i>	autosomal rezessiv	1p35-p36	<i>PINK1</i>	605909
<i>PARK7</i>	autosomal rezessiv	1p36	<i>DJ-1</i>	606324
<i>PARK8</i>	autosomal dominant	12q12	<i>LRRK2</i>	607060
<i>PARK9</i>	autosomal rezessiv	1p36	<i>ATP13A2</i>	606693
<i>PARK10</i>	?	1p	?	606852
<i>PARK11</i>	autosomal dominant	2q37.1	?	607688
<i>PARK12</i>	?	Xq21-q25	?	300557
<i>PARK13</i>	autosomal dominant	2p12	<i>HtrA2/Omi</i>	610297
<i>PARK14</i>	autosomal rezessiv	22q13.1	<i>PLA2G6</i>	603604
<i>PARK15</i>	autosomal rezessiv	22q12-q13	<i>FBXO7</i>	605648
<i>PARK16</i>	?	1q32	?	613164

SNCA α -Synuclein; *UCHL1* ubiquitin C-terminal hydrolase L1; *PINK1* phosphatase and tensin homolog (*PTEN*)- induced putative kinase 1; *LRRK2* leucine-rich repeat kinase 2; *HtrA2/Omi* high-temperature requirement protein A2; *PLA2G6* Phospholipase A2, Group VI; *FBXO7* F-box protein 7; *OMIM* Online Mendelian Inheritance in Man; modifiziert nach Klein und Schlossmacher, 2006

Da die Rolle der genetischen Veränderungen in den Genen *HtrA2/Omi* (*high-temperature requirement protein A2*) und *UCHL1* (*ubiquitin C-terminal hydrolase L1*) bei der Entstehung eines PS bisher noch nicht abschließend geklärt ist, wird auf diese Gene und ihre Veränderungen im weiteren Verlauf nicht näher eingegangen (Healy *et al.*, 2006; Hutter *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2008; Lesage und Brice, 2009).

Wie in Tabelle 1 dargestellt, befinden sich die identifizierten Gene meist auf unterschiedlichen Chromosomenloci und sind auf sieben verschiedenen Chromosomen (Chromosom 1, 2, 4, 6, 12, 22 und X) verteilt. Die Gene unterscheiden sich jedoch nicht nur bezüglich ihrer Lokalisation, sondern zum Teil auch hinsichtlich des assoziierten Phänotyps, in Bezug auf die Häufigkeit mit welcher sie Ursache eines PS sind, in Hinblick auf ihr Vererbungsmuster und ihre physiologische Funktion.

Der Phänotyp

Die PS, die durch Veränderungen in den beschriebenen Genen ausgelöst werden, unterscheiden sich teilweise phänotypisch in Bezug auf das Erkrankungsalter, den Krankheitsverlauf und die Häufigkeit auftretender Begleitsymptome. Generell können drei Formen unterschieden werden: typische PS, *early-onset* PS und atypische PS.

PS, die einem IPS ähneln, d. h. ein spätes Erkrankungsalter zeigen und langsam verlaufen, werden als typische PS bezeichnet. Vor allem Veränderungen im *LRRK2*- (*Leucine-rich repeat kinase 2*-) Gen können für diese Form des PS verantwortlich sein. Des Weiteren können auch Patienten mit einer Duplikation des *α -Synuclein*- (*SNCA*-) Gens oder einer im heterozygoten Zustand vorliegenden *Parkin*- oder *PINK1*- (*phosphatase and tensin homolog (PTEN)- induced putative kinase 1*-) Mutation das Bild eines typischen PS zeigen (Cookson und Bandmann, 2010).

Homozygote *Parkin*-, bzw. *PINK1*- und *DJ-1*-Mutationsträger erkranken hingegen in der Regel an einem PS, welches sehr früh, d. h. noch vor dem 40. Lebensjahr auftritt und als sog. *early-onset* PS (*EOPD*) bezeichnet wird (Quinn *et al.*, 1987; Cookson und Bandmann, 2010). Diese PS sind sich phänotypisch sehr ähnlich und zeichnen sich durch einen langsamen Verlauf und symmetrisch verteilte Dystonien der unteren Extremitäten aus (Lücking *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 2003; Pramstaller *et al.*, 2005; Pankratz *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte bei *Parkin*- und *PINK1*-Mutationsträgern eine Steigerung der Muskeleigenreflexe (Hyperreflexie) nachgewiesen werden (Lohmann *et al.*, 2003; Ibáñez *et al.*, 2006; Schneider und

Klein, 2010). Psychiatrische Symptome scheinen tendenziell häufiger bei *PINK1*-assoziierten PS aufzutreten (Steinlechner *et al.*, 2007). Postmortale Studien an *Parkin*-Mutationsträgern zeigten des Weiteren, dass *Parkin*-assoziierte PS sowohl mit als auch ohne Ausbildung von Lewykörperchen einhergehen können (Mori *et al.*, 1998; Farrer *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2004; Pramstaller *et al.*, 2005).

Auch Punktmutationen und Gendosisveränderungen (Triplikationen) des *SNCA*-Gens zeigen einen frühen Beginn der Erkrankung und sind oft durch eine reduzierte Lebenserwartung und eine begleitende Demenz gekennzeichnet (Singleton *et al.*, 2003; Cookson *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2007). Vergleicht man diese Symptomatik mit der beschriebenen Duplikation des *SNCA*-Gens, scheint hier die Gendosis die Schwere der Erkrankung zu beeinflussen (Chartier-Harlin *et al.*, 2004).

PS, die aufgrund ihrer Begleitsymptome und ihres Verlaufs nicht den beiden genannten Gruppen zugeordnet werden können, werden als atypische PS bezeichnet. In diese Gruppe fällt bspw. das PS, das auf Mutationen im *ATP13A2*-Gen zurückgeführt werden kann. Dieses PS, welches auch als Kufor-Rakeb-Syndrom bezeichnet wird, ist charakterisiert durch einen frühen Beginn und einen schweren Verlauf, in welchem neben Pyramidenbahnzeichen (bspw. positiver Babinski-Reflex) auch eine vertikale supranukleäre Blickparese und eine schwere Demenz auftreten (Najim al-Din *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 2006; Behrens *et al.*, 2010). In der Bildgebung kann eine Atrophie des *Globus pallidus* sowie eine im späteren Stadium der Erkrankung generalisierte Hirnatrophie nachgewiesen werden (Najim al Din *et al.*, 1994; Di Fonzo *et al.*, 2007).

Ein weiteres atypisches PS kann auch durch Mutationen im *PLA2G6*- (*Phospholipase A2, Group VI*-) Gen hervorgerufen werden. Veränderungen in diesem Gen wurden zunächst mit einer infantilen neuroaxonalen Dystrophie assoziiert (Morgan *et al.*, 2006), konnten mittlerweile jedoch auch bei Patienten mit Levodopa-responsiven Dystonie-PS identifiziert werden (Paisan-Ruiz *et al.*, 2009; Yoshino *et al.*, 2010). Betroffene Personen erkranken zumeist im Erwachsenenalter und zeigen neben Pyramidenbahnzeichen auch kognitive bzw. psychiatrische Symptome.

Sog. Parkinson-Pyramidale- oder Pallido-Pyramidale-Syndrome - atypische PS, die eine Kombination aus frühem Erkrankungsalter, einer im Verlauf zunehmenden Parkinsonsymptomatik und Pyramidenbahnzeichen zeigen (Davison, 1954) - konnten

erst kürzlich auf Mutationen im *FBXO7*- (*F-box protein 7*-) Gen zurückgeführt werden (Shojaee *et al.*, 2008; Di Fonzo *et al.*, 2009).

Von den PS, die auf den genannten Veränderungen beruhen, muss das Auftreten eines Parkinsonismus im Rahmen anderer genetischer neurodegenerativer Erkrankungen abgegrenzt werden. So können Veränderungen im *Dynactin 1*- (*DCTN1*-) Gen bspw. das Perry-Syndrom induzieren, ein neurodegeneratives Syndrom, welches mit einem früh beginnenden Parkinsonismus, Depression, Hypoventilation und Gewichtsverlust einhergeht (Farrer *et al.*, 2009). Genetische Veränderungen in den Genen für *Microtubule-associated proteine tau* (*MAPT*) und *Progranulin* konnten mit dem Auftreten eines Parkinsonismus mit einer frontotemporalen Demenz assoziiert werden (Dumanchin *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 2006; Cruts *et al.*, 2006).

Die Häufigkeit

Die häufigste genetische Ursache für ein PS sind Mutationen im *LRRK2*-Gen (Paisan-Ruiz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004), wobei die Prozentzahlen der *LRRK2*-assoziierten Erkrankungen in verschiedenen Populationen unterschiedlich hoch sind. Besonders häufig findet sich diese Form bei Familien arabischer Abstammung. Hier können ca. 40 % aller PS auf eine Veränderung im *LRRK2*-Gen zurückgeführt werden (Lesage *et al.*, 2006); in der Population der Ashkenazi Juden sind dies ca. 20 % (Ozelius *et al.*, 2006). In Deutschland liegt der Anteil *LRRK2*-assoziiierter PS bei etwa 1 % (Hedrich *et al.*, 2006).

EOPD sind in 10-20 % der Fälle bedingt durch Mutationen im *Parkin*-Gen und in 1-2 % durch eine Veränderung im *DJ-1*-Gen (Lücking *et al.*, 2000; Hedrich *et al.*, 2004; Pankratz *et al.*, 2006). Mutationen im *PINK1*-Gen treten mit einer Häufigkeit zwischen 1-8 % auf, wobei die Prozentzahlen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen variieren können (Klein *et al.*, 2006).

Veränderungen im *SNCA*-Gen waren zwar die ersten Veränderungen, die eindeutig mit einem PS in Verbindung gebracht werden konnten (Polymeropoulos *et al.*, 1997), sind im Allgemeinen jedoch sehr selten und zeigen abhängig von der Mutation (Punktmutation, Duplikation oder Triplikation) zum Teil eine deutlich reduzierte Penetranz, was bedeutet, dass nur einige der Mutationsträger auch ein PS entwickeln (Klein und Lohmann-Hedrich, 2007). In Einzelfällen konnte auch für

Mutationen im *ATP13A2*- (Najim al-Din *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 2006), *FBXO7*- (Di Fonzo *et al.*, 2009) und *PLA2G6*-Gen (Morgan *et al.*, 2006; Paisan-Ruiz *et al.*, 2009) eine Assoziation mit der Entwicklung eines monogenen PS nachgewiesen werden.

Das Vererbungsmuster

Mutationen im *SNCA*- und *LRRK2*-Gen folgen einem autosomal-dominanten Vererbungsmuster (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Paisan-Ruiz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004). Mutationen im *Parkin*- (Kitada *et al.*, 1998), *PINK1*- (Valente *et al.*, 2004), *DJ-1*- (Bonifati *et al.*, 2003) und *ATP13A2*-Gen (Ramirez *et al.*, 2006) sowie Mutationen im *PLA2G6*- (Paisan-Ruiz *et al.*, 2009) und *FBXO7*-Gen (Di Fonzo *et al.*, 2009) werden hingegen autosomal-rezessiv vererbt.

Darüber hinaus konnte bei einigen *Parkin*-, *PINK1*-, *DJ-1* und *ATP13A2*-Mutationsträgern, entgegen dem eigentlichen Prinzip rezessiver Erbgänge, die Entwicklung eines PS auch beobachtet werden, wenn nur ein Allel mutiert war (Lücking *et al.*, 2000; Hedrich *et al.*, 2004; Valente *et al.*, 2004; Abou-Sleiman *et al.*, 2006; Pankratz *et al.*, 2006; Di Fonzo *et al.*, 2007; Tan und Skipper, 2007; Djarmati *et al.*, 2009). Bisher ist nicht abschließend geklärt, welcher Mechanismus bei diesen PS ursächlich für die Beobachtung ist. Eine mögliche Erklärung wäre das Prinzip der Haploinsuffizienz (Lohmann-Hedrich *et al.*, 2007).

Die Proteinfunktion

Die Proteinfunktionen der identifizierten Gene sind vielfältig (Hatano *et al.*, 2009; Xiromerisiou *et al.*, 2010). Die Gene kodieren u. a. für Phosphoproteine - *SNCA* (Vekrellis *et al.*, 2004) -, Proteinkinasen - *LRRK2*, *PINK1* (Galter *et al.*, 2006; Ghandi *et al.*, 2006) - und für Enzyme, die am Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau beteiligt sind - *Parkin* (Shimura *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte für das Genprodukt von *PLA2G6* die Funktion einer Phospholipase (Morgan *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. Im Folgenden wird auf die Proteinfunktionen einzelner Gene näher eingegangen.

Viele Genprodukte konnten im zentralen und peripheren Nervengewebe nachgewiesen werden. So kodiert bspw. das *SNCA*-Gen für ein Phosphoprotein, welches im Nervensystem von Vertebraten exprimiert wird und an der Reifung präsynaptischer Vesikel beteiligt ist sowie die Freisetzung von Neurotransmittern

hemmt (Vekrellis *et al.*, 2004). Veränderung im Gen haben zur Folge, dass die physiologische Bindungsfähigkeit des Proteins an Membranen präsynaptischer Vesikel herabgesetzt wird und das Protein autoaggregiert (Braak *et al.*, 2003). Da das Genprodukt in dieser Form nur unzureichend proteasomal abgebaut werden kann, entstehen in den Nervenzellen Einschlusskörperchen, die aggregiertes α -Synuclein, Ubiquitin, Neurofilamente und andere Proteine enthalten - die bereits genannten Lewykörperchen. Darüber hinaus beeinflussen Veränderungen im *SNCA*-Gen die mitochondriale Funktion und führen zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, die die Zelle schädigen (Parihar *et al.*, 2009).

Das Genprodukt von *LRRK2* - eine zytoplasmatische Proteinkinase - hat eine Autophosphorylierungsaktivität, die durch Genmutation erhöht wird (*gain-of-function*) und zu neuronaler Degeneration führt (West *et al.*, 2005). So zeigten Zellen, die ein verändertes *LRRK2*-Protein expremierten, eine stärkere Anfälligkeit für oxidativen Stress (Liou *et al.*, 2008) und eine erhöhte Sensitivität auf neurotoxische Stoffe, wie bspw. auf Rotenon.

PINK1, welches ebenfalls für eine Proteinkinase kodiert, ist in Mitochondrien lokalisiert und wird ubiquitär, jedoch vor allem im Herzen, Skelettmuskel und Gehirn exprimiert (Ghandi *et al.*, 2006). Man nimmt an, dass die Kinase im physiologischen Zustand die Funktion bestimmter mitochondrialer Proteine durch Phosphorylierung verändert und somit einen neuroprotektiven Effekt auf die Zelle ausübt (Valente *et al.*, 2004; Silvestri *et al.*, 2005; Sim *et al.*, 2006). Mutationen im *PINK1*-Gen verändern hingegen die Form und Funktion der Mitochondrien. Ähnlich wie Mutationen im genannten *LRRK2*- bzw. im *DJ-1*-Gen, dessen mitochondriales Protein Sauerstoffspezies entgiftet, führen auch Veränderungen im *PINK1*-Gen zu einer erhöhten mitochondrialen Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und bewirken eine mitochondriale Dysfunktion (Abbildung 1.2), (Malkus *et al.*, 2009). Das Genprodukt von *Parkin* - eine Enzym-abhängige Ubiquitin-Protein-Ligase, welche an der Degradation falsch gefalteter Proteine in Proteasomen beteiligt ist - zeigt im physiologischen Zustand ebenfalls einen zytoprotektiven Effekt, indem es Zellen vor oxidativem Stress schützt (Shimura *et al.*, 2000). Durch Mutationen im Gen kann diese Proteinfunktion auf verschiedenste Weise gestört werden: So kann sowohl die Löslichkeit, die Lokalisation oder auch die Bindungs- und Ubiquitinierungseigenschaft des Proteins verändert werden (Hampe *et al.*, 2006). Darüber hinaus führt wohl auch

die Anhäufung der *Parkin*-Substrate zu einem selektiven Zelluntergang in Neuronen der *SN* und des *Nucleus coeruleus* (Cookson, 2005).

Ein weiteres im Hirngewebe exprimiertes Protein ist das Genprodukt von *ATP13A2*, welches vornehmlich in lysosomalen Membranen in Zellen des Hirngewebes vorkommt. Mutierte, instabile Formen verbleiben hingegen im endoplasmatischen Retikulum und werden in Proteasomen abgebaut (Ramirez *et al.*, 2006).

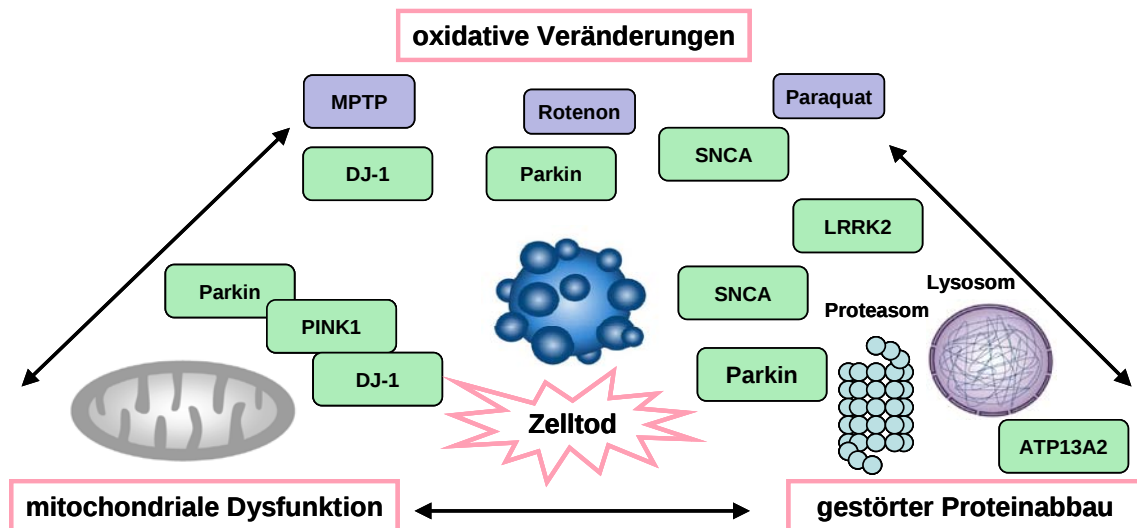


Abb. 1.2: Schema des „Bermuda-Dreiecks“, welches die Pathophysiologie der Neuronendegeneration beim PS darstellt (nach Malkus *et al.*, 2009). Es wird angenommen, dass die Neurodegeneration auf drei molekulare Mechanismen, die im Wechselspiel zueinander stehen, zurückgeführt werden kann: 1. oxidative Veränderungen, 2. mitochondriale Dysfunktion, 3. gestörter Proteinabbau. Rotenon und MPTP inhibieren bspw. Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, was über die Bildung reaktiver Sauerstoffradikalen zum Zelltod, insbesondere dopaminerger Neurone führt. Auch Paraquat, ein Pflanzenschutzmittel, führte nachweislich zu einem selektiver Untergang dopaminerger Neurone. Veränderungen in den Genen *Parkin*, *PINK1*, *DJ-1*, *SNCA* und *ATP13A2* bewirken über unterschiedliche Mechanismen eine erhöhte zelluläre Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress, welche zum Zelltod führt (näheres siehe Text).

1.5. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

In den vergangenen vier Jahren rekrutierte die Sektion für Klinische und Molekulare Neurogenetik an der Klinik für Neurologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Klein mit Unterstützung von Herrn Dr. Brüggemann und Herrn Prof. Dr. Vieregge, Neurologischer Chefarzt des Krankenhauses Lemgo, die deutschstämmige Familie SP, in welcher mehrere Familienmitglieder an einem PS erkrankt sind. Es gab keinen Anhalt für eine Blutsverwandtschaft innerhalb der Familie.

Nachdem der Indexpatient (L-2812) sich 2006 in der neurologischen Sprechstunde bei Herrn Prof. Vieregge vorgestellt hatte, war es Herrn Dr. Brüggemann bis Mitte

2008 möglich, weitere 25 Mitglieder der Familie SP zu rekrutieren und einen fünf Generationen umfassenden Familienstammbaum zu erstellen.

Mehrere Bewegungsstörungsexperten der Klinik für Neurologie der Universität zu Lübeck untersuchten 20 Familienmitglieder klinisch-neurologisch sowie psychiatrisch und fertigten Videoprotokolle an. Es wurden sowohl Daten zur Bewertung des Erkrankungsstatus (*Unified Rating Scale for Parkinsonism (UPDRS) I-IV, Hoehn and Yahr-Rating-Skala*) und der Gedächtnisleistung (*Mini-Mental-Status-Test, Montreal Cognitive Assessment (MoCA)*) erhoben, als auch Untersuchungen zur Erkennung von möglichen Frühsymptomen der Erkrankung wie nachlassende Farbdiskriminierung und Geruchsleistung durchgeführt (*FM 100 Hue Color Vision Test, University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT)*) (Brüggemann *et al.*, 2011).

Personen, die definitiv an einem PS erkrankt waren, wurden mittels CT und MRT weiter untersucht, um sekundäre Ursachen für die motorischen Störungen ausschließen zu können.

Anhand der ermittelten Daten wurde eine Konsensusdiagnose in den Kategorien „Betroffenheitsstatus“, „Diagnose“ und „Symptomstatus“ für 20 Familienmitglieder durch Bewegungsstörungsexperten sowie durch mehrere geblindete Untersucher gestellt.

Im Rahmen der Untersuchungen konnten Blutproben von allen 25 Familienmitgliedern aus der dritten, vierten und fünften Generation gewonnen werden, aus denen im Folgenden DNA extrahiert wurde. Es wurde eine umfassende Kopplungs- und Mutationsanalyse auf bekannte PS-verursachende Genmutationen (*LRRK2, SNCA, Parkin, PINK1, DJ-1, ATP13A2, PLA2G6*) mittels verschiedener molekulargenetischer Verfahren durchgeführt - im einzelnen *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*, *Single Strand Conformation Polymorphism Analysis (SSCP)* und Sequenzierung. Darüber hinaus wurden auch die Gene *DCTN1, MAPT* und *Progranulin* auf mögliche Mutationen hin untersucht.

Die Ergebnisse der Kopplungs- und Mutationsanalyse ergaben keine Hinweise auf Mutationen in den bekannten Genen als Ursache des genetischen PS der Familie SP. Daraufhin wurde eine genomweite Kopplungsanalyse zur Lokalisation eines bisher nicht beschriebenen PS-assoziierten Gens durchgeführt, welche Bestandteil dieser Arbeit war.

1.6. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den genetischen Hintergrund des typischen, autosomal-dominant vererbten PS mit spätem Beginn und begleitenden kognitiven Störungen bei der Familie SP zu identifizieren.

Dabei soll zunächst mittels genomweiter Kopplungsanalyse und anschließender Feinkartierung von Kandidatenregionen die genetische Veränderung lokalisiert werden. Anschließend werden Kandidatengene in dieser Region sequenziert, um die PS-verursachende Mutation zu identifizieren.

2. PATIENTEN, MATERIALIEN UND METHODEN

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Identifizierung des genetischen Hintergrunds des PS der Familie SP eine genomweite Kopplungsanalyse und eine Feinkartierung mit anschließender Sequenzierung von Kandidatengenomen durchgeführt.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst die untersuchte Familie SP vorgestellt und die PS-spezifische Symptomatik der betroffenen Familienmitglieder beschrieben. Im Anschluss werden die angewandten molekulargenetischen Methoden näher erläutert.

2.1. Patienten

2.1.1. Familie SP

Die deutschstämmige Familie SP zählt 44 identifizierte Familienmitglieder (Abbildung 2.1). Der erstellte Familienstammbaum umfasst fünf Generationen, wobei die Familienmitglieder der ersten und zweiten Generation bereits verstorben sind. Ein Familienmitglied der dritten Generation (L-123) verstarb im Verlauf der Anfertigung dieser Arbeit im Alter von 77 Jahren.

Zu den bereits verstorbenen Familienmitgliedern wurden fremdanamnestische Daten zum Krankheitsstatus bzw. zu anderen Erkrankungen durch Befragung von Familienmitgliedern eingeholt.

Die verstorbene Person (I.2) zeigte nach Berichten der Angehörigen eindeutige Zeichen eines PS. Der Arbeitsgruppe liegen Schriftproben vor, die das Schriftbild der Person über mehrere Monate hinweg dokumentieren. Die über die Zeit stetig kleiner und unleserlicher werdende Handschrift (Mikro- und Dysgraphie) ist ein typisches Charakteristikum eines PS und unterstreicht die Fremdanamnese. Abbildung 8.1 des Anhangs zeigt einen Ausschnitt einer dieser Schriftproben.

Aus der ersten Generation gehen drei Söhne und zwei Töchter hervor. Bei dem jüngsten Sohn (II.9) war ein PS bekannt. Die älteste Tochter (II.3) litt an einem Kopftremor. Die zweite Tochter (II.5) zeigte Symptome, die im Rahmen eines PS auftreten können, wie eine Demenz und eine Anosmie.

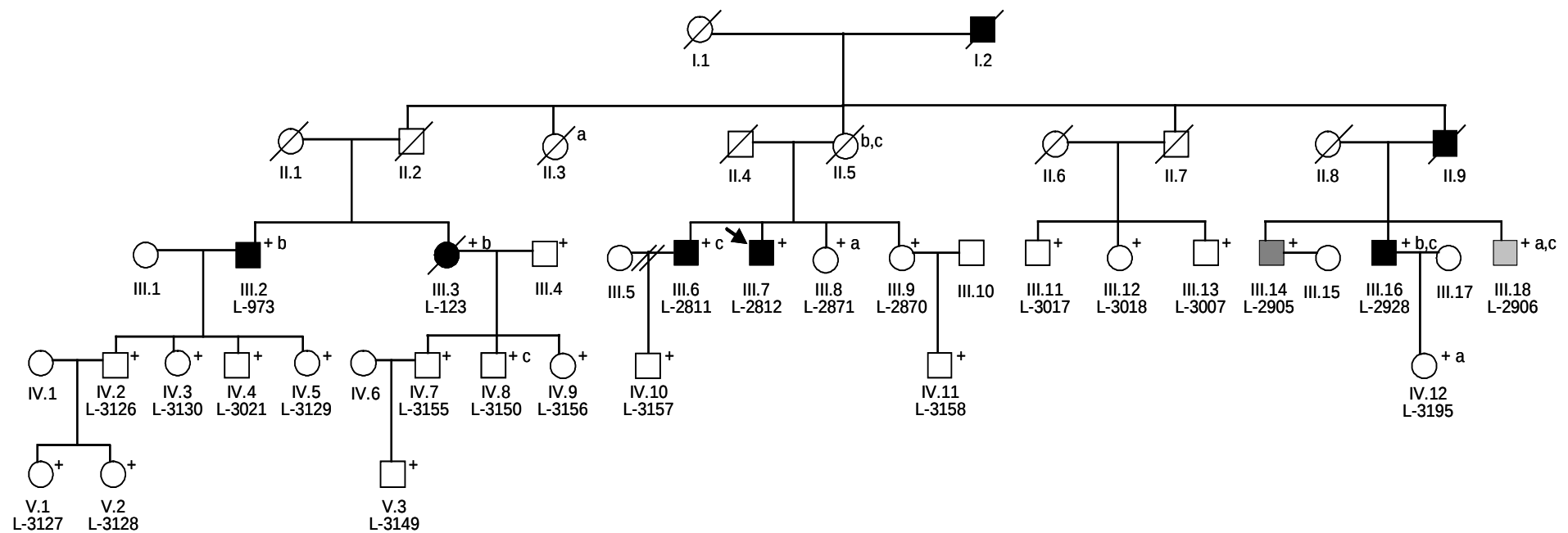


Abb. 2.1: Stammbaum der Familie SP. Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Verstorbene Personen werden mit einem durchgestrichenen Symbol beschrieben. Personen, die definitiv an einem PS erkrankt sind, werden durch schwarze Symbole, wahrscheinlich betroffene Personen durch dunkelgraue, möglich betroffene Personen durch hellgraue Symbole dargestellt. Weiße Symbole kennzeichnen gesunde Personen. Die mit einem Kreuz versehenen Symbole beschreiben Personen, die klinisch-neurologisch untersucht wurden (Brüggemann *et al.*, 2011). Die L-Nummern stellen DNA-Codes der Individuen mit verfügbarer DNA dar. Die Nummern I-V geben die Generationen, die nachfolgenden Zahlen 1-18 geben die einzelnen Personen in den Generationen des Familienstammbaums wieder. a Tremor, b kognitive Einschränkungen, c Hyp-/Anosmie; ▲ Indexpatient

Bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit war es möglich, 25 Familienmitglieder aus der dritten, vierten und fünften Familiengeneration zu rekrutieren und Blutproben für die genetische Untersuchung zu gewinnen.

Tabelle 2.1 fasst die Ergebnisse der durchgeführten klinischen Tests, den Symptomstatus und Daten zu den Zusatzsymptomen der definitiv, wahrscheinlich und möglich betroffenen Personen zusammen. Die Charakterisierung von allen weiteren untersuchten Familienmitgliedern ist den Tabellen 8.1a und 8.1.b des Anhangs zu entnehmen.

Der klinische Status wird durch die Modalitäten „ja“, d. h. die Person ist von der Erkrankung betroffen, bzw. „unbekannter Status“, d. h. die Person liefert keine Anzeichen für ein PS, beschrieben. Im letzteren Fall kann der klinische Status nicht durch die Modalität „nicht-betroffen“ ersetzt werden, da aufgrund des Phänomens der reduzierten Penetranz das Vorliegen einer Mutation bzw. aufgrund des variierenden Erkrankungsalters eine spätere Entwicklung von Symptomen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Die klinische Diagnose der betroffenen Familienmitglieder wird durch die Adjektive „definitiv“, „wahrscheinlich“ und „möglich“ näher beschrieben, um die unterschiedliche Diagnosesicherheit der PS-spezifischen Symptome der einzelnen Personen bei der Beurteilung zu berücksichtigen. Die Diagnose eines „definitiven PS“ wurde basierend auf den *United Kingdom Brain Bank Criteria* (Gibb und Lees, 1988) gestellt, mit der Ausnahme, dass eine positive Familienanamnese nicht als Ausschlusskriterium galt (siehe auch Abschnitt 8.3.1). Ein „wahrscheinliches PS“ ist als eine Kombination aus dem Symptom Akinese (≥ 2 Punkte in den UPDRS-Fragen 24-26 und 31) und einem weiteren PS-typischen Symptom definiert, wobei beide Symptome mindestens eine milde Ausprägung zeigen müssen. Ob die Symptome Levodopa-responsiv sind, ist bei einem „wahrscheinlichen PS“ nicht bekannt. Ein „mögliches PS“ liegt bei einer isoliert auftretenden, mild-ausgeprägten Akinese bzw. einer Kombination aus mild-ausgeprägter Akinese und leichtem Rigor vor (Hedrich *et al.*, 2006; Brüggemann *et al.*, 2011).

Nach diesen Kriterien wurde für fünf Familienmitglieder der dritten Generation - L-123, L-973, L-2811, L-2812, L-2928 - die Diagnose eines „definitiven PS“ gestellt. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 63,2 $\pm$ 6,4 Jahren; die mittlere Krankheitsdauer bei 8,8 Jahren.

Für jeweils eine weitere Person der dritten Generation wurde ein „wahrscheinliches“ (L-2905) bzw. ein „mögliches“ (L-2906) PS diagnostiziert. L-2905 präsentierte im Alter von 65 Jahren ein rechts-betontes hypokinetisches Syndrom mit rechtsseitig reduziertem Armschwung. L-2906 zeigte während der klinischen Untersuchung im Alter von 56 Jahren eine leichte Hypomimie, einen symmetrischen posturalen Tremor der Hände und eine milde Bradydiadochokinese sowie eine leichte posturale Instabilität. Familienmitglieder, deren Betroffenheitsstatus „nicht bekannt“ war, wurden auch mit dem Diagnosekriterium „nicht bekannt“ beschrieben.

Neben der klinischen Diagnose wurde auch der Symptomstatus der Personen beurteilt. Als „symptomatisch“ wurden Personen bezeichnet, die die vorliegenden Symptome selber wahrnahmen (L-123, L-973, L-2811, L-2812, L-2928). „Asymptomatische“ Personen hingegen zeigten in der klinisch-neurologischen Untersuchung zwar Symptome, beobachteten diese jedoch nicht selber an sich (L-2905, L-2906). Aufgrund des bereits angesprochenen variierenden Erkrankungsalters konnte die Mehrzahl der Familienmitglieder der vierten und fünften Generation in Bezug auf den Symptomstatus nicht abschließend beurteilt werden, da sie zum Zeitpunkt der Untersuchung zwar symptomfrei waren, jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie zu einem späteren Zeitpunkt Symptome entwickeln. Diese Personen wurden demnach für die Kopplungsanalyse als „asymptomatisch mit unbekanntem Status“ eingestuft.

Das PS dieser deutschstämmigen Familie ist durch einen späten Erkrankungsbeginn und durch die Kardinalsymptome Akinese und Rigor charakterisiert, die alle definitiv betroffenen Personen aufwiesen. Unter den definitiv betroffenen Familienmitgliedern traten gehäuft nicht-motorische neurologisch-psychiatrische Symptome auf. Zwei Personen zeigten im Verlauf der Erkrankung eine zunehmende Demenz (L-123, L-973); drei Betroffene berichteten über visuelle Halluzinationen bzw. optische Täuschungen (L-123, L-973, L-2811). Eine betroffene Person entwickelte im Laufe der Erkrankung eine für das PS typische REM-Schlaf-Verhaltensstörung (L-2811). Darüber hinaus lag bei einer definitiv erkrankten Person eine depressive Episode in der Anamnese vor (L-123).

Weitere motorische Kardinalsymptome waren bei den verschiedenen Personen unterschiedlich ausgeprägt: Zwei Personen zeigten eine posturale Instabilität (L-123, L-973), zwei andere einen klassischen Ruhetremor (L-2812, L-2928).

Im Verlauf der Untersuchungen erhielten vier definitiv betroffene Personen einen Therapieversuch mit Levodopa (L-123, L-973, L-2811, L-2928). Alle vier sprachen gut auf die Therapie an. Ein positives Ansprechen war dabei definiert als Verbesserung der motorischen *UPDRS III*-Werte um mindestens 30 %.

Da das PS der Familie SP sowohl Männer als auch Frauen betrifft, wurde vermutet, dass der Erkrankung ein autosomaler Erbgang zugrunde liegt. Das Auftreten des PS in jeder der ersten drei Generationen deutete auf ein dominantes Vererbungsmuster hin.

Tabelle 2.1: Zusammenfassende Daten zum Erkrankungsalter, Symptomstatus und Testergebnissen der betroffenen Personen

	L-123	L-973	L-2811	L-2812	L-2928	L-2905	L-2906
Geschlecht	weiblich	männlich	männlich	männlich	männlich	männlich	männlich
Alter bei klin. Untersuchung	76, † 2008	78	74	71	61	65	57
Alter bei Erkrankungsbeginn	62	70	65	66	53	65	57
Betroffenheitsstatus	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Diagnosemodalität	definitiv	definitiv	definitiv	definitiv	definitiv	wahrscheinlich	möglich
Symptomstatus	sympt.	sympt.	sympt.	sympt.	sympt.	asympt.	asympt.
PS-spezif. Symptome	A, R, PI	A, R, PI	A, R	A, R, RT	A, R, RT, (PI)	A, R, PT	PT, AK, PI
Ansprechen auf Levodopa	initial gut	gering	ausreichend	n. u.	gering	n. u.	n. u.
UPDRS I (max. 16 Pkt.)	n. u.	n. u.	4	0	2	1	n. u.
UPDRS II (max. 52 Pkt.)	n. u.	n. u.	11	2	4	2	n. u.
UPDRS III (max. 108 Pkt.)	> 60	64	25	10	34	9	28
UPDRS IV (max. 23 Pkt.)	n. u.	n. u.	0	0	0	n. u.	n. u.
Hoehn and Yahr- Skala	5	5	3	1,5	2,5	n. u.	n. u.
UPSIT	n. u.	anamn. Anosmie seit > 40 Jahren	4	13	22	n. u.	n. u.
Demenz	+	+	-	-	-	-	-
visuelle Halluzinationen	+	+	+	-	-	-	-
Depression	+	-	-	-	-	-	-

Spalte PS-spezifische Symptome: A Akinese, R Rigor, PI posturale Instabilität, RT Ruhetremor, PT posturaler Tremor; n. u. nicht untersucht; *UPDRS I-IV* Unified Parkinson's Disease Rating Scale I-IV, *UPSIT* University of Pennsylvania Smell Identification Test; + Symptom liegt vor, - Symptom liegt nicht vor

2.1.2. Erläuterungen der Tests zur Erkrankungsschwere und etwaigen Frühsymptomen

Im Folgenden werden einige der durchgeführten klinischen Tests zum näheren Verständnis der Tabelle 2.1 kurz erläutert. Bezüglich anderer klinischer Untersuchungen und der Ergebnisse der anderen Familienmitglieder wird auf den Abschnitt 8.3 des Anhangs verwiesen.

Tests zur Beurteilung der Erkrankungsschwere

Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)

Abschnitt I: kognitive Funktionen, Verhalten und Stimmung (0-16 Punkte)

Abschnitt II: Aktivitäten des täglichen Lebens (0-52 Punkte)

Abschnitt III: Motorische Untersuchung (0-108 Punkte)

Abschnitt IV: Komplikationen der Behandlung

A. Dyskinesien (0-13 Punkte)

B. Klinische Fluktuationen (0-7 Punkte)

C. Anderweitige Komplikationen (0-3 Punkte)

In den einzelnen Abschnitten werden unterschiedliche Funktionen mit jeweils 0-4 bzw. 0-2 Punkten bewertet. Je höher die Punktzahl, desto stärker der Betroffenheitsstatus

Hoehn and Yahr Rating-Skala

Stadium 0 keine Anzeichen der Erkrankung

Stadium 1 einseitige Erkrankung

Stadium 1,5 einseitige und axiale Beteiligung

Stadium 2 beidseitige Erkrankung ohne Gleichgewichtsstörung

Stadium 2,5 leichte beidseitige Erkrankung mit Ausgleich bei Retropulsionstest

Stadium 3 leichte bis mäßige beidseitige Erkrankung: leichte Haltungsinstabilität; körperlich unabhängig

Stadium 4 starke Behinderung; kann aber ohne Hilfe laufen oder stehen

Stadium 5 im Rollstuhl sitzend oder bettlägerig

(modifiziert nach Hoehn und Yahr, 1967)

Tests zur Erfassung von Frühsymptomen

University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT)

0-5 Punkte	wahrscheinliche Simulation
6-18 Punkte	totale Anosmie
19-25 Punkte	starke Mikrosmie
26-30 Punkte	mäßige Mikrosmie
31-34 Punkte	schwache Mikrosmie
35-40 Punkte	Normosmie

Der Test ist nicht anzuwenden bei Jungen < 15 Jahren und Mädchen < 10 Jahren.

Im Folgenden werden exemplarisch der Krankheitsverlauf und die PS-spezifischen Symptome anhand des Indexpatienten (L-2812) beschrieben.

2.1.3. Klinische Beschreibung des Indexpatienten

Der 1935 geborene Patient bemerkte im Alter von 66 Jahren erstmalig die Symptome eines beginnenden PS. Er berichtet von einer zunehmend zittrigen Handschrift und einem Tremor der rechten Hand in Ruheposition. Darüber hinaus habe er den Verlust des Geschmackssinns bemerkt.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines tremor-dominanten PS fielen ein mittelschlägiger, intermittierender Ruhetremor der rechten Hand, eine rechts-betonte Akinese und eine leichte Hypomimie auf.

Bei der neurologischen Untersuchung im Rahmen der Studie (2007) wurde ergänzend zu den bereits beschriebenen Symptomen ein mäßiger Rigor beider Arme und ein feinschlägiger, hochfrequenter posturaler Tremor der Hände dokumentiert. Die Ergebnisse des *UPDRS III*, welcher die motorischen Funktionen untersucht, ergaben einen Wert von 10/108. Anhand der *Hoehn and Yahr Rating-Skala*, welche den Betroffenheitsstatus einer Person beurteilt, befand sich der Patient im Stadium 1,5 - d. h. es lag eine auf eine Seite beschränkte Krankheit mit Beteiligung des Rumpfes vor (Hoehn und Yahr, 1967). Der Geruchstest *UPSIT* bestätigte die totale Anosmie. Farbdiskriminierungs- und Gedächtnistests liegen von dem Patienten nicht vor (siehe auch Tabelle 2.1 bzw. Tabelle 8.1a).

2.2. Materialien

2.2.1. Chemikalien

Acrylamid (30%), rotiphoreseGel30	Roth
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Betain	Sigma-Aldrich
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Qbiogene
96 % Ethanol (EtOH)	J.T. Baker
ExoSAP-IT	USB
Harnstoff	USB
HPLC-Wasser	Merck
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen
Molekulargewichtsstandard (100bp)	Invitrogen
Natrium-Acetat (NaAc)	Merck
6 M Natrium-Chlorid (NaCl)	Merck
Oligonukleotide, <i>Primer</i>	MWG Biotech
Proteinase K (10mg/ml)	Sigma-Aldrich
20 % Sodiumdodecylsulphat (SDS)	Fluka
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (250U; 5U/ μ l) + Puffer	Qbiogene

2.2.2. Kits

PCR-Purification-Kit	Qiagen
Terminator v1.1 Cycle Sequencing-Kit	Applied Biosystems

2.2.3. Lösungen

Leidener-Lösung:	155 mM NH_4Cl 10 mM KHCO_3 0,5 M EDTA (pH 8,0) (steril filtriert)
Lyse Puffer (10x/500ml):	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 400 mM NaCl 0,2 mM EDTA (pH 8,0) (steril filtriert)

Formamid-Farbstoff:	47,5 ml Formamid 2,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 0,01 g Bromphenolblau
10x TBE-Puffer:	890 mM TRIS 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
1x TE-Puffer (autoklaviert):	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)
denaturierendes Polyacrylamid-Gel für Genotypisierung:	6 ml 30%ige Acrylamidlösung 3 ml 10x TBE 3 g Harnstoff 30 ml dH ₂ O 13,4 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Agarose-Gel:	300 ml 1x TBE-Puffer 4,5 g Agarose 7 µl Ethyidiumbromid (EtBr)

2.2.4. Geräte

Thermocycler PTC 100 und PTC 200	Biozym
Mastercycler	Eppendorf
IR-DNA-Sequenzierer 4200	LI-COR
3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Zentrifuge Contifuge <i>stratos</i>	Heraeus
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus
Biofuge <i>pico</i>	Heraeus

2.3. Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die in der Arbeit angewandten molekulargenetischen Methoden in der Reihenfolge beschrieben, in welcher sie während der Versuche durchgeführt wurden. So wird zunächst im Abschnitt 2.3.1 die Durchführung der Genotypisierung erläutert. Im Weiteren wird näher auf das der Arbeit zugrunde liegende Studiendesign eingegangen (Abschnitt 2.3.2) und abschließend die Methode der DNA-Sequenzierung beschrieben (Abschnitt 2.3.3).

2.3.1. Durchführung der Genotypisierung

2.3.1.1. DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion diente der Isolierung von DNA - in diesem Fall aus Blutzellen. Durch mehrere Zentrifugations- und Waschschrte wurde zunächst das Serum von den Blutzellen getrennt und nach Zellyse, Verdau und Ausfällen der Zellproteine die freigesetzte DNA durch Zugabe von EtOH präzipitiert. Die extrahierte DNA wurde in TE-Puffer gelöst und konnte für genetische Untersuchungen verwendet werden.

Zur Deproteinisierung der Zellproteine des Blutes wurde die Aussalzmethode nach Miller angewandt, welche sich der Beobachtung bedient, dass nur von einer Hydrathülle umgebene Proteine löslich sind. Durch Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung werden der Protein-Hydrathülle Wassermoleküle entzogen, woraufhin die Zellproteine ihr Löslichkeitsvermögen verlieren und ausfallen (Miller *et al.*, 1988).

Im Einzelnen erfolgte die Extraktion der DNA wie folgt:

- Versetzen von 10 ml Vollblut (EDTA/Heparin/Citrat) mit 35 ml gekühlter Leidener-Lösung zur Lyse der im Vollblut befindlichen Erythrozyten
- Inkubation auf Eis für 20 Minuten bei 40 UpM
- Abzentrifugieren der Leukozyten (3000 UpM, 3 Minuten, Raumtemperatur (RT))
- Verwerfen des Überstandes und Waschen des Pellets durch Versetzen mit 20 ml Leidener-Lösung
- Zentrifugation (3000 UpM, 3 Minuten, RT)
- Verwerfen des Überstandes und Zugabe von 10 ml Leidener-Lösung
- Zentrifugation (3000 UpM, 3 Minuten, RT)
(Beliebig häufiges Wiederholen der Wasch- und Zentrifugationsschritte, bis das Pellet weiß ist.)

- Dekantieren des Überstandes und Lösen des Pellets durch Zugabe von 3 ml Lysepuffer
- Lyse der Zellmembranen durch Zugabe von 150 µl SDS (20 %-ig)
- Proteolytischer Verdau der in der Zelle vorliegenden und der DNA anhaftenden Proteine durch Zugabe von 300 µl Proteinase K (10 mg/ml)
- Inkubation über Nacht bei 58 °C
- Ausfall der in der Lösung befindlichen Zellproteine durch Zugabe von 1050 µl NaCl (6 M) und anschließendes Vortexen der Lösung
- Zentrifugation (4700 UpM, 20 Minuten, RT)
- Dekantieren und Waschen des Überstandes mit 6 M NaCl bis der Überstand klar und kein Proteinpellet mehr sichtbar ist
- Ausflocken der DNA durch Zugabe von 10 ml Vol. 96 % EtOH
- Waschen der DNA-Flocke mit 1 ml 70 % EtOH
- Zentrifugation (12 000 UpM, 4 °C, 5 Minuten) und Dekantieren des Überstandes
- Trocknen des Pellets im Thermoblock bei 56 °C
- Entsprechend der „Flockengröße“, Lösen in 250 µl, 100 µl oder 50 µl TE-Puffer über Nacht im Kühlschrank

2.3.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Da die DNA-Menge eines bestimmten Genomabschnitts einer Zelle zu gering ist, um sequenziert zu werden, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, um selektiv DNA-Fragmente *in-vitro* in einer heterogenen Mischung von DNA-Sequenzen innerhalb weniger Stunden exponentiell vermehren zu können. Durch das Verwenden zweier spezifisch synthetisierter *Primer* (Oligonukleotide, zwischen 18-25 Nukleotide lang), welche komplementär zu den Randbereichen der Zielsequenz sind, konnte selektiv der gewünschte Bereich eines Chromosoms amplifiziert werden. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Abschnitten - Denaturierung, *Primeranlagerung*, *Elongation* -, welche in den folgenden Zyklen wiederholt werden.

1. Denaturierung:

Zu Beginn eines Zyklus wird die Lösung auf 95 °C erhitzt, um sowohl die den DNA-Doppelstrang verbindenden Wasserstoffbrückenbindungen als auch Bindungen zwischen den *Primer*paaren zu trennen.

2. Primeranlagerung/*Annealing*:

An die nun als Einzelstrang vorliegende DNA lagern sich die *Primer* beim Abkühlen des Ansatzes auf eine bestimmte Temperatur (sog. *Annealing*-Temperatur) an die komplementäre DNA-Sequenz an (*Primeranlagerung*). Diese *Annealing*-Temperatur ist *Primerspezifisch* und abhängig von der Schmelztemperatur des *Primers*, welche je nach Nukleotidzusammensetzung und Länge des *Primers* variiert. Für die im Rahmen der genomweiten Kopplungsanalyse durchgeführten PCRs wurde eine *Annealing*-Temperatur von 55 °C gewählt.

3. Elongation/DNA-Synthese:

Nach Anlagerung der *Primer* an die DNA-Vorlage wird die Temperatur der Lösung angehoben, um die Synthese des komplementären DNA-Strangs durch die *Taq*-Polymerase (hitzestabiles Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*) in 5' - 3' Richtung mittels der im Ansatz befindlichen 4 Desoxynukleotide (dNTPs) zu ermöglichen.

Die Elongation wird durch eine erneute Temperaturerhöhung abgeschlossen. Die neu synthetisierten DNA-Stränge einer bestimmten Länge werden von der *template*-DNA gespalten und dienen nun ebenfalls als Matrize für einen neuen Zyklus.

Innerhalb weniger Stunden kann auf diese Weise eine einzelne DNA-Sequenz zu einer detektierbaren und sequenzierbaren Menge vermehrt werden.

Für die Genotypisierung und Feinkartierung wurde die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- | | | | |
|--------|----|---------------------------------|---------------------------|
| | 1. | 95 °C für 5 Minuten | → initiale Denaturierung |
| | 2. | 95 °C für 30 Sekunden | → Denaturierung |
| 35 x { | 3. | 55 °C bzw. x °C für 30 Sekunden | → <i>Primeranlagerung</i> |
| | 4. | 72 °C für 45 Sekunden | → Extension |
| | 5. | 72 °C für 10 Minuten | → terminale Extension |
| | 6. | 4 °C als Endtemperatur | |

PCR mit fluoreszierenden Markern

Die PCR-Produkte der Genotypisierung wurden mit Hilfe des *LI-COR*-Systems ausgewertet. Dieses System detektiert die durch ein Polyacrylamidgel laufenden Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte mittels eines Infrarot-Lasers.

Um eine derartige Detektion zu ermöglichen, wurden dem PCR-Ansatz spezielle *Primer* zugesetzt, bei denen der Vorwärtsprimer am 5'-Ende mit einer M13F-Nukleotidsequenz verlängert ist. Zusätzlich wurden dem Ansatz *Infrared Dye*-(*IRD*-)700/800-markierte M13-*Primer* zugefügt. *IRD*-800-markierte *Primer* sind mit einem Heptamethincyanin-Farbstoff versetzt, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 795 nm liegt. *IRD*-700-markierte *Primer* sind mit einem Pentamethin-Carbocyanin-Farbstoff versetzt, welcher ein Absorptionsmaximum bei einer Lichtwellenlänge von 685 nm aufweist und wurden bei *Primern* eingesetzt, deren PCR-Produkte eine Größe > 150 bp haben (DNA Sequencing Manual, 1999). Während der PCR lagerten sich die *IRD*-M13-*Primer* an die komplementäre M13-Struktur des *Primers* an, wobei PCR-Produkte entstanden, welche 700- bzw. 800-Fluorophorm enthielten.

Die PCR mit Fluoreszenz-markierten *Primern* wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

Substanz	Volumen	Konzentration	Konzentration im Ansatz
dest. H ₂ O	2,28 µl		
Puffer	0,50 µl	10 x	1,43 x
dNTPs	1,00 µl	1 mM	0,2 mM
<i>Primer</i> vorwärts	0,12 µl	10 µM	0,24 µM
<i>Primer</i> rückwärts	0,12 µl	10 µM	0,24 µM
<i>Taq</i> - Polymerase	0,05 µl	5 U/µl	0,05 U/µl
M13- <i>Primer</i> *	0,05 µl	10 µM	0,10 µM
DNA	1,00 µl	~ 5 ng/µl	5,00 ng
Gesamtansatz	5,00 µl		

* *IRD* 700/800-markierte M13-*Primer*

Duplex-PCR

Für die Genotypisierung wurden anstatt der beschriebenen Monoplex-PCR mit Fluoreszenz-markierten *Primern* hauptsächlich Duplex-PCRs durchgeführt, bei welchen zwei DNA-Sequenzen zeitgleich in einem PCR-Ansatz vervielfältigt wurden. Dem Standard-PCR-Ansatz wurden dabei zwei *Primer*paare zugesetzt, deren PCR-Produkte sich in ihrer Größe um mindestens 15 Basenpaare unterscheiden mussten, um eine korrekte Auswertung am *LI-COR*-System zu ermöglichen. Abbildung 2.2

zeigt einen Ausschnitt eines Polyacrylamid-Gels, auf welchem die Produkte einer Duplex-PCR aufgetragen wurden.

Die Duplex-PCR wurde mit folgendem PCR-Ansatz durchgeführt:

Substanz	Volumen	Konzentration	Konzentration im Ansatz
dest. H ₂ O	1,92 µl		
Puffer	0,50 µl	10 x	1,43 x
dNTPs	1,00 µl	1 mM	0,2 mM
<i>Primer I</i> vorwärts	0,12 µl	10 µM	0,24 µM
<i>Primer I</i> rückwärts	0,12 µl	10 µM	0,24 µM
<i>Primer II</i> vorwärts	0,12 µl	10 µM	0,24 µM
<i>Primer II</i> rückwärts	0,12 µl	10 µM	0,24 µM
Taq- Polymerase	0,05 µl	5 U/µl	0,05 U/µl
M13- <i>Primer</i> *	0,05 µl	10 µM	0,1 µM
DNA	1,00 µl	5 ng/µl	5,00 ng
Gesamtansatz	5,00 µl		

*IRD 700/800-markierte M13-Primer

2.3.1.3. Gelelektrophorese

Im Folgenden wird das Trennverfahren, welches für die Genotypisierung und Feinkartierung angewandt wurde, dargestellt. Dieses Verfahren diente der Auftrennung von PCR-Produkten (bzw. DNA-Fragmenten) nach ihrer Länge und beruht auf dem Prinzip, dass durch Anlegen einer Spannung an ein Medium ein Spannungsfeld entsteht, in welchem die negativ geladene DNA ein bestimmtes Laufverhalten zeigt.

Die bei einer PCR amplifizierten DNA-Produkte wurden auf ein Gel (Polyacrylamid- oder Agarose-Gel) aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung wanderten die negativ geladenen DNA-Produkte entsprechend ihrer Größe schneller oder langsamer durch das Gel in Richtung Kathode.

Anschließend konnten die Produkte entweder durch Bestrahlung eines Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegels mit UV-Licht oder durch einen Laser detektiert werden, wenn die Produkte Fluoreszenz-markiert waren.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) handelt es sich um ein elektrophoretisches Trennverfahren, welches DNA-Fragmente mit einem Längenunterschied von einer Base aufzutrennen vermag. Dieses Verfahren ist demnach wesentlich hochauflösender als die Agarose-Gelelektrophorese, die im Rahmen der DNA-Sequenzierung verwendet wurde (vergl. auch 2.3.3).

Um die hohe Auflösung der Auftrennung zu ermöglichen, wurde bei der PAGE ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel verwendet, welches eine Porengröße von 3-5 nm aufweist. Die in einer vorangegangenen PCR mit fluoreszierenden Markern erhaltenen Produkte (siehe auch 2.3.1.2) wurden mit Farbstoff versetzt und denaturiert, um die DNA-Doppelstränge zu spalten und DNA-Einzelstränge zu erhalten. Im Anschluss wurden die Produkte auf das Gel aufgetragen. Der sich in der Gellösung befindliche Harnstoff hinderte die DNA daran, während der Auftrennung Sekundärstrukturen auszubilden, so dass das Laufverhalten allein durch die Länge der DNA bestimmt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde die PAGE in einem Plattensequenziergerät (*LI-COR*) durchgeführt. Dieses System besitzt für die Detektion der Produkte einen sich auf Höhe des unteren Drittels des Gels befindlichen Laser, welcher die „vorbeilaufenden“ Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte je nach Produktgröße früher oder später als Banden aufzeichnen kann.

Als Kontrolle und Längenstandard wurden für jeden *Primer* zwei *CEPH*-Proben mit bekannter Allelgröße mitamplifiziert und auf das Gel aufgetragen. Im Vergleich mit den Banden der *CEPH*-Proben konnte so auf die Größe des PCR-Produkts geschlossen werden. Das Bild des Gels wurde zur Auswertung in ein Bildbearbeitungsprogramm importiert und ausgedruckt. Anschließend wurden die Proben per Hand ausgewertet.

Durchführung der PAGE:

- Versetzen von 30 ml Lösung für denaturierendes Polyarylamid-Gel (siehe unter 2.2.3) mit 180 µl Ammoniumpersulfat (APS)
- Gießen des Polyacrylamid-Gels zwischen zwei Glasplatten (25 cm x 22,5 cm x 0,4 cm)
- Befestigen einer Pufferkammer an der Oberseite der Platte

- Einstecken eines Kamms in die Oberkante des Gels zur Bildung von Taschen, in welche die einzelnen Proben pipettiert werden können
- Einhängen der Platten in eine Pufferkammer im *LI-COR*-System
- Füllen der Pufferkammern mit TBE-Puffer, so dass Ober- und Unterkante des Gels von dem Puffer umspült sind. PCR-Proben mit formamidhaltigem Farbstoff versetzen (15 µl bei 700 nm-Produkten, 10 µl bei 800 nm-Produkten)
- Denaturieren der PCR-Produkte bei 95 °C für 5 Minuten zur Herstellung von DNA-Einzelsträngen. Der Farbstoff dient dabei zum einen dem Sichtbarmachen der Proben beim Auftragen, zum anderen unterstützt Formamid den Denaturierungsvorgang und verhindert die Renaturierung der DNA. Nach der Denaturierung werden die Proben auf einem Eisblock aufbewahrt
- Auftragen von ca. 0,8-1,5 µl Probe pro Tasche
- Proben bei 45 °C und 25 W 2h laufen lassen

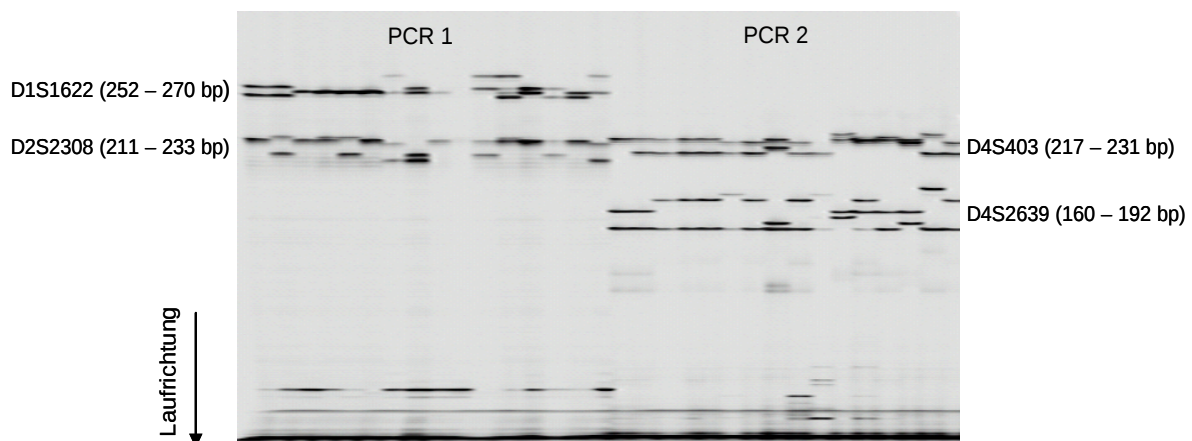


Abb. 2.2: Ausschnitt eines Polyacrylamid-Gels, auf dem die Produkte von zwei Duplex-PCRs (PCR1, PCR2) nebeneinander aufgetragen wurden. Schwarze Schlieren am Bildunterrand entstehen durch den formamidhaltigen Farbstoff in den Proben. Kleine Produkte durchlaufen das Gel schnell und werden früh detektiert (bspw. D4S2639 - größtes Produkt 192bp). Große Produkte laufen langsamer durch das Gel und werden später von dem Laser detektiert (bspw. D1S1622 - größtes Produkt 270bp). Letztere befinden sich daher am Bildoberrand.

Auswertung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PAGE wurden die Genotypen eigenständig bestimmt. Anhand der *CEPH*-Proben, deren Produktgrößen bekannt waren und im Internet eingesehen werden konnten (<http://www.research.marshfieldclinic.org>), wurde die Größe des Produkts der einzelnen DNA-Proben ermittelt. War eine Person für einen Marker heterozygot, d. h. hatte sie zwei unterschiedliche Allele von Vater und Mutter geerbt, zeigten sich auf dem Gel aufgrund der unterschiedlichen Produktgröße zwei Banden.

Homozygotie stellte sich durch nur eine Bande auf dem Gel dar (siehe auch Abbildung 3.2). Nach dieser Methode wurden alle 423 *STR*-Marker für die 13 Familienmitglieder bestimmt.

2.3.2. Das Studiendesign der Arbeit: Kopplungsanalyse und Feinkartierung

2.3.2.1. Kopplungsanalyse

Zur Identifizierung der krankheitsverursachenden Mutation bei der Familie SP wurde, wie bereits unter 1.3 erwähnt, eine genomweite, parametrische Kopplungsanalyse anhand der DNA-Proben von 13 Familienmitgliedern durchgeführt. Das Genom dieser Personen wurde mit Hilfe von *STR*-Markern, die in Abständen zwischen 0,01-15 cM auf den Chromosomen verteilt vorlagen, auf Regionen hin untersucht, die bei jedem Betroffenen vorkommen, d. h., die mit dem PS gekoppelt vererbt wurden. Je nach Größe des Chromosoms wurden unterschiedlich viele Marker verwendet. Die eingesetzten Marker waren bereits in der Sektion für Klinische und Molekulare Neurogenetik an der Klinik für Neurologie oder am Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck vorhanden. Eine detaillierte Darstellung der verwendeten Marker ist der Tabelle 8.2 des Anhangs zu entnehmen.

Für die Kopplungsanalyse sind besonders solche Marker von Interesse, die zwar bei erkrankten, nicht jedoch bei gesunden Personen vorkommen, da diese Marker möglicherweise in der Nähe des Krankheitsauslösenden Gens liegen und mit diesem gekoppelt vererbt werden (Lander und Kruglyak, 1995). Bei der Anwendung einzelner Marker können die Ergebnisse per Auge ausgewertet werden. Bei der Genotypisierung im vorliegenden Fall hingegen, bei welcher 423 verschiedene Marker angewandt wurden, wurden die Ergebnisse statistisch mit Hilfe des *Logarithm of the odds (LOD) score* berechnet. Demnach wird von einer sicheren Kopplung zwischen einem *STR*-Marker bzw. einem Gen oder Genort und einer Erkrankung dann ausgegangen, wenn die errechnete Wahrscheinlichkeit, dass die beobachtete Markerverteilung aufgrund einer Kopplung gegenüber der einer zufälligen Verteilung gleich oder größer als 1000:1 ist. Der dekadische Logarithmus dieses Verhältnisses ($= 3$) ist der *LOD score* (Smith, 1953). Dieser berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$Z(\theta) = \log_{10} \frac{L(\theta)}{L(0,5)} \quad \text{mit } 0 \leq \theta \leq 0,5$$

Dabei steht Z für den *LOD score*, θ für die Rekombinationswahrscheinlichkeit und der Quotient aus $L(\theta)/L(0,5)$ für das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit, dass Marker und Erkrankung gekoppelt bzw. ungekoppelt vererbt werden (Grimm, 2006). Bei dem Wert $\theta = 0,5$ ist dies gleichbedeutend mit einer freien Rekombination. Nimmt θ den Wert 0 an, werden Marker und Erkrankung gekoppelt vererbt (siehe auch 1.3). Einen signifikanten Hinweis auf eine Kopplung zweier Genorte liefert ein *LOD score* $Z \geq 3,0$; ein *LOD-score* von $Z < -2,0$ schließt hingegen eine Kopplung aus (Lander und Kruglyak, 1995).

Um einen als signifikant geltenden *LOD score* von 3 zu erreichen, sind zehn informative Familienmitglieder nötig (man schätzt pro Person einen Beitrag zum *LOD score* von etwa 0,3). In kleinen Familien mit wenigen informativen Familienmitgliedern werden daher andere Kriterien angewandt, anhand derer eine Kopplung zwischen einer Region und einer Erkrankung vermutet werden kann. Da in der untersuchten Familie SP lediglich sechs Familienmitglieder informativ waren (definitiv und wahrscheinlich Betroffene) und somit ein *LOD score* von 3 nicht erreicht werden konnte, wurden folgende zwei Kriterien aufgestellt, die bei Zutreffen eines der beiden Merkmale eine Kopplung zwischen der Chromosomenregion und dem PS wahrscheinlich macht:

- a) Zwei benachbarte Marker, die maximal durch einen Marker getrennt werden, zeigen einen *Singlepoint LOD score* $> 0,5$ sowie einen *Multipoint LOD score* $> 0,5$ in der selbigen Region
- b) Ein Marker weist einen *Multipoint LOD score* > 1 auf

Die statistische Berechnung der Daten der Genotypisierung und der sich anschließenden Feinkartierung wurde mit Hilfe des Computerprogramms Allegro 2.0 selbstständig durchgeführt. Aufgrund der bekannten Familienstruktur wurde eine parametrische Analyse angewandt. Dabei wurden sowohl eine *Single-* als auch eine *Multipoint-*Analyse realisiert. Bei der *Singlepoint-*Analyse wird jeweils ein *STR*-Marker auf eine eventuelle Kopplung mit der Krankheit hin untersucht - die Anordnung der Marker ist in dieser Berechnung nicht relevant. Bei der *Multipoint-*Analyse hingegen wird die Kopplungswahrscheinlichkeit aller Marker auf dem Chromosom ermittelt. Hierbei fließt die Reihenfolge der Marker und die Abstände zwischen diesen in die Berechnungen mit ein.

Für die Analyse war insbesondere die Beschreibung des klinischen Status der Familienmitglieder wichtig. Hierfür wurden drei Einteilungen gewählt:

1. gesunde Personen: Angeheiratete Personen, da die Prävalenz eines familiären/genetischen PS in der allgemeinen Bevölkerung sehr niedrig ist und es bei diesen Personen keine berichteten Hinweise auf das Vorliegen PS-assoziiierter Symptome gab
2. betroffene Personen: Personen, die in der klinisch-neurologischen Untersuchung PS-spezifische Symptome zeigen (definitiv oder wahrscheinlich Betroffene)
3. Personen unbekannten klinischen Status: Familienmitglieder, die zum Zeitpunkt der Untersuchung möglicherweise betroffen sind oder keine PS-spezifischen Symptome zeigten, aber dennoch Mutationsträger sein können

Darüber hinaus wurden bei der statistischen Berechnung Faktoren wie das der Erkrankung zugrunde liegende Vererbungsmuster, die Penetranz- bzw. Phänokopierate der einzelnen Allele sowie die Häufigkeit der Erkrankung in der Allgemeinbevölkerung und populationsgenetische Parameter berücksichtigt.

Das Auftreten des krankheitsverursachenden Allels wurde mit einer Frequenz von 0,01 angenommen, die Häufigkeit der unterschiedlichen Allele der verschiedenen Marker wurde für alle Allele jedes Markers gleichgesetzt. Für die Familienmitglieder, die an einem PS erkrankt waren, wurde einer der drei folgenden Genotypen angenommen:

- a) die erkrankte Person besitzt kein mutiertes Allel (Penetranz = 0,03 %, dies entspricht der Phänokopierate, d. h. der zugrunde liegenden Krankheitshäufigkeit in der Allgemeinbevölkerung)
- b) die erkrankte Person hat ein mutiertes Allel, d. h. die Person ist heterozygot für die Mutation (Penetranz = 0,95 %)
- c) die erkrankte Person hat zwei mutierte Allele, d. h. die Person ist homozygot für die Mutation (Penetranz = 0,95 %)

Bei einem dominanten Erbgang wird nicht zwischen den Möglichkeiten b) und c) unterschieden, da das mutierte Allel unabhängig davon, ob es heterozygot oder homozygot vorliegt, den Phänotypen der Person bestimmt.

Alle Regionen, die in der Genotypisierung eines der beiden aufgestellten Kriterien erfüllten, wurden unter Anwendung zusätzlicher Marker in einem weiteren Schritt feinkartiert.

2.3.2.2. Feinkartierung

Um die Markerdichte in den Chromosomenbereichen, die einen erhöhten *LOD score* zeigten, weiter zu erhöhen und somit die Kopplung der Region zu überprüfen, einzugrenzen bzw. ggf. auszuschließen, wurden mit Hilfe von genetischen Karten (<http://www.research.marshfieldclinic.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zusätzliche *STR*-Marker ausgewählt. *STR*-Marker mit hoher Heterozygotie-Rate in der Bevölkerung sind dabei besonders geeignet, da sie die Vererbung der einzelnen Allele besser beobachten lassen.

Für die Feinkartierung wurden alle Familienmitglieder, die eine Blutprobe abgegeben hatten und deren DNA vorlag (insgesamt 25 Personen), in die genetische Untersuchung eingeschlossen, da sich die Segregation der Allele besser in einem größeren Personenkollektiv verfolgen lässt.

Die Ergebnisse der Feinkartierung wurden mit Hilfe des Computerprogramms *cyrillic* in den Stammbaum der Familie übertragen. Da die Anordnung der verwendeten Marker auf den Chromosomen bekannt und im Internet einsehbar war (<http://www.research.marshfieldclinic.org>), konnten die Allele eines jeden Markers einer Position auf dem Chromosom zugeordnet werden. Wenn darüber hinaus die Allele des Vaters und der Mutter bekannt waren, konnte auch der elterliche Ursprung der Allele ermittelt (= Phasen) und ggf. Rekombinationsbruchpunkte detektiert werden. Im Allgemeinen wurde für die Zuordnung der Allele eine minimale Anzahl an Rekombinationen angenommen. Abbildung 2.3 erläutert anhand eines Auszuges aus dem Stammbaum der Familie SP das Prinzip der Segregation.

Die Darstellung im Stammbaum diente zum einen der Überprüfung der statistisch ermittelten *LOD scores*: Bilden die Allele einen Haplotyp, der über Generationen hinweg vererbt wird? Zum anderen ermöglichte diese Darstellung, die Haplotypen von erkrankten und gesunden Personen zu vergleichen und den Haplotypen zu ermitteln, der ausschließlich bei den betroffenen Familienmitgliedern vorkam. Bei diesem wurde davon ausgegangen, dass eine Kopplung zum PS der Familie in dieser Chromosomen- bzw. Genregion vorliegt.

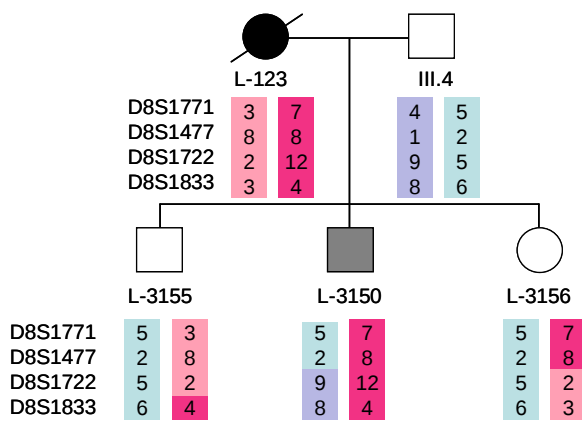


Abb. 2.3: Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem Stammbaum der Familie SP, in welchem die Allele von vier Markern, die zur Feinkartierung der Region 8 auf Chromosom 8 verwendet wurden (D8S1771, D8S1477, D8S1722, D8S1833), eingetragen sind. Väterliche Allele werden auf der linken Seite, mütterliche Allele auf der rechten Seite notiert. Durch diese Anordnung entstehen virtuelle „väterliche und mütterliche Chromatide“. Für die Marker sind sowohl die Allele der Kinder als auch die der Eltern bekannt, womit die elterliche Herkunft der Allele ermittelt werden kann, vorausgesetzt es handelt sich

hierbei um die leiblichen Eltern. Die Tochter ist bspw. heterozygot für den Marker D8S1771 (5/7). Da der Vater lediglich die Allele 4 und 5 besitzt, muss das Allel 7 von der Mutter stammen. Bei allen Kindern kam es zwischen dem mütterlichen und väterlichen Chromosom sowohl der Mutter als auch des Vaters in diesem Chromosomenbereich zu Rekombinationsbrüchen. So lautet die neue Anordnung auf dem Chromatid von L-3150 bspw. statt 5-2-5-6 bzw. 4-1-9-8 nun 5-2-9-8.

Wurde eine solche Region so weit wie möglich durch die Feinkartierung und die Überprüfung der Segregation im Stammbaum eingegrenzt, konnten mit Hilfe der Ergebnisse des Humanen Genom-Projektes Gene in dieser Chromosomenregion gesucht werden. Diejenigen Gene, die funktionell eine Rolle in der Pathophysiologie des PS spielen könnten - sog. Kandidatengene -, wurden im Folgenden bei zwei definitiv betroffenen Familienmitgliedern (L-973, L-2812) sequenziert, um mögliche krankheitsverursachende Mutationen zu detektieren.

2.3.3. Vom *LOD score* zur Basensequenz: Die DNA-Sequenzierung

Mit der Einführung der DNA-Sequenzierung in die genetische Untersuchung war es möglich, die Abfolge der DNA-Basen in einer Gensequenz zu bestimmen und Sequenzvariationen nachzuweisen.

Die noch heute angewandte Sequenzierungsmethode wurde 1975 von Fred Sanger als sog. Kettenabbruchverfahren etabliert (Sanger *et al.*, 1977). Dabei werden einem Sequenzansatz Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugefügt, welche am 3'-Ende anstatt einer Hydroxyl-Gruppe nur ein Wasserstoffatom besitzen. An diese Nukleotide kann die Polymerase kein weiteres Nukleotid mit Phosphodiesterbindung anknüpfen - der Nukleotidstrang bricht ab.

Um Veränderungen in Genen zu identifizieren, die die Funktion der Proteine beeinflussen, verändern oder inhibieren, wurden bei der Sequenzierung die Bereiche

der für ein Protein kodierenden Exons auf Basenpaarveränderungen hin untersucht. Dafür mussten zunächst Sequenzprimer für die einzelnen Exons hergestellt werden, die diese Bereiche in einer PCR amplifizieren können.

Primerdesign

Für die Sequenzierung der Kandidatengene wurden für ein Exon jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärts-*Primer* mit Hilfe des Software-Programms *OLIGO* entworfen. Dabei wurden bestimmte Anforderungen an den *Primer* gestellt, um eine spezifische Bindung des *Primers* am Anfang bzw. Ende des Exons zu garantieren:

- Länge: zwischen 19-23 bp
- *Annealing*-Temperatur: zwischen 50 °C und 58 °C
- Vorwärts- und Rückwärts-*Primer-Annealing*-Temperatur sollten nicht > 1 °C auseinanderliegen
- „freies“ 3'-Ende des *Primers*. D. h. der *Primer* sollte am 3'-Ende weder beim Vorliegen als Einzelstrang (in Form einer Schleifenbildung), noch bei der Paarbildung mit dem Rückwärts- bzw. Vorwärtsprimer eine Bindung eingehen
- die Base Guanin bzw. Cytosin am 3'-Ende des *Primers*, um die Bindung des *Primers* durch Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen zu erhöhen
- Berücksichtigung bekannter Polymorphismen

Für die synthetisierten *Primer* musste zunächst die optimale Temperatur für die Bindung der *Primer* an die DNA-Stränge ermittelt werden. Diese ist abhängig von der *Primerlänge* und -basenpaarzusammensetzung und kann mitunter von der Bindungstemperatur von 55 °C, wie sie standardmäßig für die *Primer* bei der genomweiten Kopplungsanalyse verwendet wurde, abweichen. Genaue Informationen zu den *Primern* - insbesondere zur Größe, Sequenz und Bindungstemperatur - sind der Tabelle 8.5 des Anhangs zu entnehmen.

War die optimale Temperatur für die *Primer* ermittelt, wurden mit ihnen die gewünschten Exonabschnitte und angrenzenden Intronbereiche der Kandidatengene in einer PCR unter Standardbedingungen vervielfältigt und die Produkte zur Kontrolle und Bestimmung der entstandenen DNA-Menge auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

PCR unter Standardbedingungen

Die Monoplex-PCR für die Sequenzierung erfolgte unter Bedingungen, wie sie unter 2.3.1.2 bereits beschrieben wurden. Für die PCR vor einer Sequenzierung wurden keine Fluoreszenz-markierten *Primer* benötigt, da die PCR-Produkte im Anschluss auf ein Agarose-Gel aufgetragen und durch UV-Licht detektiert wurden.

Die Monoplex-PCR für die Sequenzierung wurde mit folgendem PCR-Ansatz durchgeführt:

Substanz	Volumen	Konzentration	Konzentration im Ansatz
dest. H ₂ O	2,28 µl		
Puffer	0,50 µl	10 x	1,43 x
dNTPs	1,00 µl	1 mM	0,29 mM
<i>Primer</i> vorwärts	0,12 µl	10 µM	0,34 µM
<i>Primer</i> rückwärts	0,12 µl	10 µM	0,34 µM
<i>Taq</i> - Polymerase	0,05 µl	5 U/µl	0,07 U/µl
DNA	1,00 µl	~ 5 ng/µl	5,00 ng
Gesamtansatz	5,00 µl		

Agarose-Gelelektrophorese

Agarose dient bei der elektrophoretischen Trennung von Substanzen als Gelbildner. Je nach Größe der durch Agarose-Gelelektrophorese aufzutrennenden Substanz kann das Gel in höher- bzw. niedrigerprozentiger Form angesetzt werden. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1,5 %-iges Agarosegel verwendet, welches wie folgt hergestellt wurde:

- Suspendieren von 4,5 g Agarose mit 300 ml 1x TE-Puffer (1,5 %)
- Aufkochen der Gellösung
- Zugabe von 7 µl Ethydiumbromid (EtBr; Stammlösung: 10 mg/ml)
- Einfüllen der Lösung in eine Agarosekammer, in welcher Kämme eingehängt sind. Durch die Kammzähne bilden sich Vertiefungen in dem Gel, in welche die Produkte nach Erkalten pipettiert werden können
- Erkalten und Polymerisierung der Agarose

Im Anschluss wurden die Proben wie folgt auf das Gel aufgetragen:

- Einlegen des Agarosegels in eine mit TBE-Laufpuffer gefüllte Kammer

- Versetzen der PCR-Proben mit 7 µl (= 1/3 Vol.) Formamid-haltigem Farbstoff
- Pipettieren von 7 µl Proben, sowie 4 µl Längenstandard (Standard-100-Basenpaarleiter) und 2 µl Massenstandard (*low mass ladder*) in die jeweiligen Ladetaschen
- Elektrophorese bei 120 V für 20-30 Minuten

Anhand des Längenstandards (100-bp-Leiter) konnte die Basenpaargröße des PCR-Produkts, anhand des Massenstandards (*lowmass ladder*) die Menge des PCR-Produkts bestimmt werden. Durch Anlegen einer Spannung liefen die negativ geladenen Nukleinsäuren durch das Gel in Richtung Kathode. Das im Gel enthaltene Ethydiumbromid interkalierte zwischen den DNA-Doppelsträngen und veränderte dadurch sein Anregungsspektrum. Somit wurde die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht.

Die PCR-Produkte wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Mit Hilfe einer Fotokamera und eines angeschlossenen Bildverarbeitungssystems (*BioDocAnalyze*, Biometra) konnten die Ergebnisse abschließend ausgedruckt werden.

Die restlichen, nicht im Agarosegel analysierten PCR-Produkte wurden im Folgenden enzymatisch durch Zugabe einer sog. *Exo-sap*-Lösung aufgereinigt. Die *Exo-sap*-Lösung enthielt in Puffer gelöste *Endonuclease I*, welche restliche einzelsträngige DNA entfernte und *Shrimp Alkaline Phosphatase*, welche noch im Ansatz befindliche dNTPs verdaute. Die so aufgereinigten PCR-Produkte dienten in einer weiterführenden Sequenz-PCR als neue „Vorlage“.

Neben der „DNA-Vorlage“ enthielt der Ansatz für die Sequenz-PCR die jeweiligen *Primer*, den entsprechenden Vorwärts- oder Rückwärts-*Primer* sowie einen Terminatormix, welcher *Taq*-Polymerase, die vier Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dTTP, dGTP und dCTP sowie die Didesoxynukleosidtriphosphate ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP beinhaltete. So wurde die DNA-Vorlage in einem Ansatz nur vom Vorwärts-, in einem anderen Ansatz nur vom Rückwärts-*Primer* abgelesen und vervielfältigt. Dadurch war es möglich, beide DNA-Stränge im Bereich dieses Exons separat auf Basenveränderungen hin zu untersuchen.

In dem Sequenz-Ansatz lagen alle dNTPs auch zu einem geringen Teil als ddNTPs vor. Die Didesoxyformen wurden so statistisch gesehen an allen Positionen eingebaut und die DNA-Synthese an allen Positionen einmal abgebrochen. Somit

entstanden unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die an ihrem Ende jeweils ein bestimmtes ddNTP besaßen.

Durch Markierung der ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Farben konnten die PCR-Produkte ihrer Länge und ihres am Ende befindlichen ddNTPs nach aufgetrennt und die Abfolge der DNA-Basen - die Gensequenz - ermittelt werden.

Bevor die Produkte im letzten Schritt aufgetrennt werden konnten, mussten sie durch Fällung von allen weiteren Reagenzien im Ansatz bereinigt werden. Dies geschah durch Zugabe von Natriumacetat-EtOH-Lösung, welche die Hydrathülle der DNA verkleinert und somit ihre Löslichkeit herabsetzt.

Die Amplifikation und Sequenzierung erfolgte unter folgenden Bedingungen:

- PCR nach Standardprotokoll mit Sequenzierungsprimern
- Überprüfen der PCR durch Agarose-Gelelektrophorese
- Etwaige Verdünnung des PCR-Produkts mit HPLC-H₂O
- Enzymatische Aufreinigung von 5,0 µl PCR-Produkt durch Zugabe von 2,0 µl *Exo-sap*

Programm: ABI-37

1. 37 °C für 15 Minuten → Inkubation und Verdau
 2. 80 °C für 15 Minuten → Inaktivierung von *Exo-sap*
 3. 4 °C Endtemperatur
- 1 µl des aufgereinigten PCR-Produkts wurde wie folgt in einem Sequenzansatz weiter verarbeitet:

Die Sequenz-PCR wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

Substanz	Volumen	Konzentration	Konzentration im Ansatz
HPLC-H ₂ O	6,00 µl		
Puffer	1,50 µl	5 x	0,75 x
Terminatormix 1.1*	1,00 µl		
<i>Primer</i> vorwärts/rückwärts	0,50 µl	10 pmol/µl	0,5 pmol/µl
PCR-Produkt	1,00 µl	5-20 ng	0,5-2 ng
Gesamtansatz	10,00 µl		

* im Terminatormix 1.1 sind Polymerase, dNTPs und fluoreszenz-markierte ddNTPs in Puffer gelöst enthalten

Programm: ABI-Seq

- | | | | |
|-------|----|-----------------------|--------------------------------|
| | 1. | 96 °C für 1 Minute | → initiale Denaturierung |
| 25x { | 2. | 96 °C für 10 Sekunden | → Denaturierung |
| | 3. | 60 °C für 5 Sekunden | → <i>Primer</i> hybridisierung |
| | 4. | 60 °C für 1 Minute | → Extension |
| | 5. | 4 °C Endtemperatur | |

- Fällung von 10 µl Sequenzprodukt durch Zugabe von 10 µl HPLC-H₂O, 2 µl 3M NaAc und 50 µl 70 % EtOH
- Inkubation (15 Minuten, RT)
- Zentrifugation (3000 UpM, 60 Minuten, RT)
- Abziehen des Überstandes
- Zugabe von 50 µl frisch angesetztem Vol. 70 % EtOH
- Zentrifugation (3000 UpM, 45 Minuten, RT)
- Abziehen des Überstandes
- Trocknen der Proben auf dem Thermoblock bei 56 °C
- Lösen der Proben in HiDi bei 4 °C über Nacht
- Auftragen auf den Kapillarsequencer ABI 3130

Das Auftrennen, Ablesen und Auswerten der gereinigten Produkte erfolgte mit Hilfe des *Sequencers 3130 Genetic Analyzer*. Die Produkte wurden dabei in eine dünne, mit Gel gefüllte Glaskapillare pipettiert. Ähnlich wie bei den bereits beschriebenen Trennverfahren durchwanderten auch bei dieser Methode die Produkte die Kapillare

je nach Größe des Produkts in unterschiedlicher Geschwindigkeit. Ein Laser detektierte dabei die Farbabfolge der durchwandernden Produkte, welche durch die farbig markierten Enden eines „abgebrochenen“ DNA-Stranges zustande kamen. Da jede Farbe für eine der vier Basen kodiert, konnte anhand der Farbabfolge auf die Basensequenz des jeweiligen Exons geschlossen werden.

Auswertung der Sequenzen

Zunächst wurden die Sequenzen auf ihre Qualität hin mit dem Computerprogramm *SequenceAnalysis* 5.2 bewertet. Das Programm wandelte das vom Laser detektierte Farbsignal einer jeden Base in eine äquivalente Farbkurve um. Anhand der Höhe der Kurve konnte die Quantität des Produkts ermittelt werden (hoher Kurvenverlauf = große Menge an Produkt, niedriger Kurvenverlauf = geringe Menge an Produkt). Mit Hilfe der Farbreinheit der Kurve wurde die Reinheit des im Ansatz befindlichen Produkts beurteilt. Ein zu starkes Signal bedeutete, dass die Probe eine zu große Menge an PCR-Produkt enthielt. Durch Zugabe von Wasser oder durch eine kürzere Injektionszeit war es möglich, die Qualität des Ergebnisses zu verbessern. Ein schwaches Signal konnte ggf. durch eine verlängerte Injektionszeit oder durch eine größere Menge an PCR-Produkt verstärkt werden. War die Qualität der Sequenzen gut, konnten die Daten ausgedruckt und mit Hilfe des Computerprogramms *GeneRunner* ausgewertet werden. Dabei wurde die entsprechende Sequenz mit der Referenzsequenz (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen und auf Abweichungen (Polymorphismen oder Mutationen) hin untersucht. Da das der Arbeit zugrunde liegende Versuchsdesign darauf basierte, dass alle an dem PS erkrankten Familienmitglieder dieselbe im Erbgut enthaltene Veränderung zeigen, musste eine von der Originalsequenz abweichende Basenfolge nicht nur auf beiden DNA-Strängen, sondern auch bei beiden untersuchten Personen nachgewiesen werden. Zeigte sich eine Sequenzveränderung bei beiden Erkrankten, so wurde diese mit bereits beschriebenen und im Internet veröffentlichten DNA-Variationen in diesem Bereich verglichen. Eine bereits als Polymorphismus bekannte Veränderung im Erbgut konnte somit als Ursache für ein monogenes, dominant vererbtes PS ausgeschlossen werden.

3. ERGEBNISSE

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Resultate der genomweiten Kopplungsanalyse und der statistischen Auswertung dargestellt (Abschnitt 3.1). Die Ergebnisse der sich anschließenden Feinkartierung und Segregationsanalyse der ausgewählten Kandidatenregionen werden unter Abschnitt 3.2 beschrieben. Darauf folgt die Darstellung und Charakterisierung der ermittelten Kandidatenregion, für welche als einzige eine Kopplung mit der Erkrankung gezeigt werden konnte. Ferner werden die fünf Kandidatengene, die für die Sequenzanalyse ausgewählt wurden, vorgestellt und abschließend die Sequenzierungsergebnisse präsentiert (Abschnitt 3.3).

3.1. Die genomweite Kopplungsanalyse legt 13 Kandidatenregionen nahe

Um den genetischen Hintergrund des autosomal dominant vererbten PS der Familie SP zu identifizieren, wurde eine genomweite parametrische Kopplungsanalyse von DNA-Proben 13 ausgewählter Familienmitglieder durchgeführt. In Abbildung 3.1 werden die Familienmitglieder, die in die genomweite Kopplungsanalyse eingeschlossen wurden, im Familienstammbaum dargestellt.

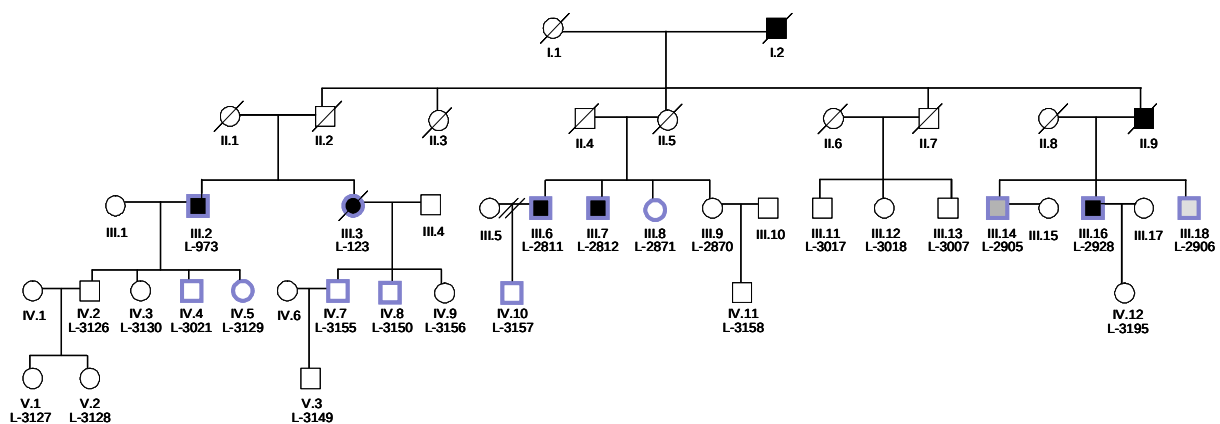


Abb. 3.1: Stammbaum der Familie SP. Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Verstorbene Personen werden mit einem durchgestrichenen Symbol gekennzeichnet. Personen, die definitiv an einem PS erkrankt sind, werden durch schwarze Symbole, wahrscheinlich betroffene Personen durch dunkelgraue, möglich betroffene Personen durch hellgraue Symbole dargestellt. Weiße Symbole kennzeichnen gesunde Personen. Römische Zahlen (I-V) geben die Generationen, arabische Zahlen (1-18) die einzelnen Personen in den Generationen wieder. Die L-Nummern stellen die DNA-Codes der Individuen mit verfügbarer DNA dar. Die 13 Individuen, die in die genomweite Kopplungsanalyse eingeschlossen wurden, sind blau hervorgehoben.

Informationen zu den in der Kopplungsanalyse verwendeten *STR*-Markern einschließlich der Angaben über die Lokalisation auf dem zugehörigen Chromosom, dem Abstand zum vorhergehenden Marker und dem statistisch ermittelten *Single- und Multipoint LOD score* können der Tabelle 8.2 des Anhangs entnommen werden. In Tabelle 3.1 werden die untersuchten Chromosomen, ihre Länge in cM sowie die Anzahl der verwendeten Marker aufgeführt.

Tabelle 3.1: Informationen zu den untersuchten Chromosomen

Chrom.	Chrom.länge (cM)	Anzahl verwendeter Marker	Chrom.	Chrom.länge (cM)	Anzahl verwendeter Marker
1	274,53	30	12	165,69	21
2	260,63	28	13	110,55	14
3	224,88	24	14	126,00	17
4	211,65	23	15	122,14	15
5	195,49	23	16	130,00	17
6	189,00	19	17	126,46	26
7	181,97	22	18	116,44	14
8	164,47	20	19	100,61	16
9	163,84	21	20	98,09	11
10	170,94	23	21	57,77	7
11	147,77	23	22	45,82	7

Die *STR*-Marker wurden in einer Mono- oder Duplex-PCR (siehe 2.3.1.2) vervielfältigt und die Produkte mittels PAGE (siehe 2.3.1.3) aufgetrennt. Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt eines Polyacrylamid-Gels, auf welches PCR-Produkte nach Amplifikation des Markers D1S1665 aufgetragen wurden.

Unter Zuhilfenahme der genannten Methoden wurden die Allelgrößen der verwendeten 423 Marker für jede Person ermittelt und die Daten anschließend statistisch unter Ermittlung des *LOD scores* mit Hilfe des Computerprogramms Allegro 2.0 ausgewertet. Dabei waren für die computergestützte Berechnung Informationen zur Familienstruktur, dem Geschlecht und dem Erkrankungszustand einer jeden Person relevant. Diese Daten finden sich in der Tabelle 3.2.

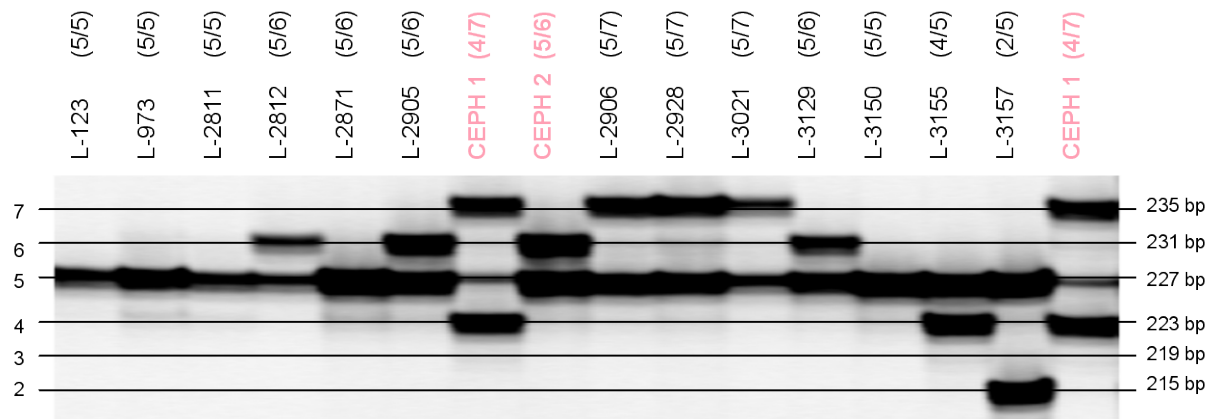


Abb. 3.2: Ausschnitt eines Polyacrylamid-Gels, von 15 DNA-Proben nach Amplifikation des Markers D1S1665. Die oberhalb der Abbildung notierten L-Nummern bezeichnen die Proben, deren Allelstruktur nebenstehend angeführt ist. Die *CEPH*-Proben dienen als Standard und Kontrollen und zur Ermittlung der Allelgröße der 13 unbekannten Proben. Links im Bildausschnitt sind die Bandennummern, rechts die zugehörigen Basenpaarlängen aufgetragen. *CEPH 1 (4/7)* bedeutet, dass diese Probe ein Allel der Länge 223 bp und ein Allel der Länge 235 bp besitzt. *CEPH 2 (5/6)* hat analog ein Allel der Länge 227 bp und ein Allel der Länge 231 bp. Zeigt sich auf dem Gel nur eine Bande, ist die Probe homozygot für diesen Marker. Beide Allele sind gleich groß und wandern im Gel gleich weit (bspw. L-123). Zeigen sich hingegen zwei Banden, ist die Probe heterozygot und die beiden Allele unterschiedlicher Länge (bspw. L-2812). Da kleinere bzw. kürzere Produkte ein schnelleres Laufverhalten aufweisen als größere Produkte, befinden sich die kürzeren PCR-Fragmente am Unterrand, die längeren hingegen am Oberrand des Gels.

Für die statistische Berechnung wurde sowohl die *Single*- als auch die *Multipoint LOD score*-Methode (siehe 2.3.2.1) angewandt. Die Auswertung erfolgte unter der Annahme, dass insgesamt sechs Personen - „die klinisch als „definitiv“ und „wahrscheinlich“ betroffenen klassifizierten Familienmitglieder - eindeutig an einem PS erkrankt sind.

Da aufgrund der geringen Anzahl an informativen Familienmitgliedern kein als signifikant geltender *LOD score* von 3 erreicht werden konnte, wurden zwei alternative Kriterien für das Vorliegen einer Kopplung definiert (vergl. auch Abschnitt 2.3.2.1). Für insgesamt 13 Regionen traf eines dieser beiden Kriterien zu. Diese Regionen auf den Chromosomen 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 16, 17 und 22 sind in Tabelle 3.3 näher beschrieben (Brüggemann *et al.*, 2011).

Tabelle 3.2: Familienstruktur und Erkrankungsstatus der Familienmitglieder

ID Familienmitglied	ID Vater	ID Mutter	Geschlecht	Erkrankungsstatus
I.1	0	0	w	nicht betroffen
I.2	0	0	m	betroffen
II.2	I.2	I.1	m	unbekannt
II.3	I.2	I.1	w	unbekannt
II.5	I.2	I.1	w	unbekannt
II.7	I.2	I.1	m	unbekannt
II.9	I.2	I.1	m	betroffen
L-123	II.2	II.1	w	betroffen
L-973	II.2	II.1	m	betroffen
L-2811	II.4	II.5	m	betroffen
L-2812	II.4	II.5	m	betroffen
L-2870	II.4	II.5	w	unbekannt
L-2871	II.4	II.5	w	unbekannt
L-2905	II.9	II.8	m	betroffen
L-2906	II.9	II.8	m	betroffen
L-2928	II.9	II.8	m	betroffen
L-3007	II.7	II.6	m	unbekannt
L-3017	II.7	II.6	m	unbekannt
L-3018	II.7	II.6	w	unbekannt
L-3021	L-973	III.1	m	unbekannt
L-3126	L-973	III.1	m	unbekannt
L-3127	L-3126	IV.1	w	unbekannt
L-3128	L-3126	IV.1	w	unbekannt
L-3129	L-973	III.1	w	unbekannt
L-3130	L-973	III.1	w	unbekannt
L-3149	L-3155	IV.6	m	unbekannt
L-3150	III.4	L-123	m	unbekannt
L-3155	III.4	L-123	m	unbekannt
L-3156	III.4	L-123	w	unbekannt
L-3157	L-2811	III.5	m	unbekannt
L-3158	III.10	L-2870	m	unbekannt
L-3195	L-2928	III.17	w	unbekannt

Spalte ID Familienmitglied: römische Zahlen stehen für die Generation, arabische für die Anordnung im Stammbaum (vergl. Abb. 3.1), L-Nummern stellen DNA-Codes von Individuen mit verfügbarer DNA dar. m männlich, w weiblich; Spalte Vater/Mutter: 0 mutmaßliche Gründerpersonen, deren DNA nicht vorlag und somit nicht in die Untersuchung mit einbezogen wurden. Grau unterlegt sind die Familienmitglieder mit dem Erkrankungsstatus „betroffen“, deren DNA in der genomweiten Kopplungsanalyse weiter untersucht wurde.

Tabelle 3.3: In die Feinkartierung eingeschlossene Chromosomenregionen

Region	Chromosom	Lage (cM)	max. <i>Spt</i> LOD score	max. <i>Mpt</i> LOD score
1	1	102,02 - 109,04	0,73	0,95
2	1	136,34 - 140,39	0,91	1,92
3	3	63,12 - 80,32	1,57	1,69
4	3	180,80 - 201,50	0,98	0,57
5	4	0,00 - 25,90	0,93	1,70
6	5	0,01 - 22,89	0,87	1,13
7	7	34,16 - 43,85	1,34	1,78
8	8	50,05 - 60,33	1,04	0,5
9	9	0,01 - 9,84	1,14	0,67
10	16	90,65 - 100,39	1,03	0,97
11	17	0,63 - 6,60	1,14	0,76
12	17	116,84 - 126,45	1,00	1,32
13	22	19,00 - 36,22	0,91	0,66

Dargestellt sind die Chromosomenregionen, welche in der statistischen Berechnung unter Annahme von sechs betroffenen Personen eines der beiden aufgestellten Kriterien erfüllten. max. *Spt* LOD score maximaler *Singlepoint* LOD score, max. *Mpt* LOD score maximaler *Multipoint* LOD score; cM Centimorgan. Die Regionen sind von 1-13 durchnummeriert. Die Lage der jeweiligen Region auf dem Chromosom ist in cM angegeben.

3.2. Die Feinkartierung identifiziert den wahrscheinlichen Genort auf Chromosom 7

Um die mögliche Kopplung zu den genannten Regionen zu überprüfen, näher einzugrenzen oder ggf. auszuschließen, wurde im Anschluss an die genomweite Kopplungsanalyse eine Feinkartierung der 13 Regionen durchgeführt. Dafür wurden in diesen Regionen zusätzlich zu den bereits verwendeten *STR*-Markern weitere Marker mit Hilfe der *Marshfieldmap* (<http://www.marshfield-research.org>) ausgewählt. Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht über die Anzahl der Marker, die für die Feinkartierung der jeweiligen Region verwendet wurden. Detaillierte Informationen zu den Markern sind der Tabelle 8.3 im Anhang der Arbeit zu entnehmen.

Tabelle 3.4: Anzahl der Marker für die Feinkartierung

Region	Chromosom	Anzahl verwendeter Marker	Region	Chromosom	Anzahl verwendeter Marker
1	1	4	8	8	4
2	1	8	9	9	5
3	3	6	10	16	5
4	3	5	11	17	6
5	4	13	12	17	6
6	5	5	13	22	5
7	7	12			

Darüber hinaus wurde die DNA zwölf weiterer Familienmitglieder in die Feinkartierung mit einbezogen, um die Segregation der Allele im Stammbaum adäquat nachvollziehen zu können. Die Durchführung der Feinkartierung erfolgte analog zur genomweiten Kopplungsanalyse mittels Monoplex- oder Duplex-PCR und anschließender PAGE (siehe 2.3.2.2).

Die Ergebnisse der Feinkartierung wurden für die Segregationsanalyse mit Hilfe des Computerprogramms *cyrillic* in den Stammbaum der Familie eingetragen. Dabei wurden die Allele entsprechend ihrer elterlichen Herkunft sortiert, so dass bestimmte Haplotypen entstanden (vergl. auch 2.3.2.2 und Abbildung 2.3). Auf diese Weise konnten in jeder feinkartierten Region die Haplotypen von erkrankten und gesunden Familienmitgliedern miteinander verglichen werden.

Durch die Feinkartierung und anschließende Segregationsanalyse konnten zunächst neun der 13 Regionen definitiv von einer Kopplung mit der Erkrankung ausgeschlossen werden. Für diese Regionen wurde kein Haplotyp identifiziert, den alle erkrankten Personen miteinander teilten. Die Abbildungen 3.4 bis 3.12 stellen die Ergebnisse der Segregationsanalyse dieser Regionen in den jeweiligen Stammbäumen dar. Dabei sind die Haplotypen, die bei mindestens zwei definitiv betroffenen Personen nachgewiesen werden konnten, farbig unterlegt, um die Segregation über die Generationen hinweg besser verfolgen zu können.

Für vier Regionen (Region 6, 7, 11 und 13) konnte nach der ersten Feinkartierung eine Kopplung nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Die Regionen 6, 11 und 13 wurden im Rahmen der Bachelorarbeit „Monogene Parkinson-Syndrome: Lokalisation einer genetischen Ursache und Mutationsanalyse“ von Frau Rondorf mit

weiteren Markern näher untersucht und schließlich ebenfalls von einer Kopplung mit dem PS der Familie SP ausgeschlossen (Rondorf, 2008).

Im Gegensatz dazu wurde für die Region 7 auf Chromosom 7 ein Haplotyp identifiziert, den alle an einem PS erkrankten Mitglieder der Familie SP miteinander teilten. Diese gekoppelte Region konnte durch die Technik der Feinkartierung noch näher eingegrenzt werden (Brüggemann *et al.*, 2011).

Tabelle 3.5 fasst die Ergebnisse der Feinkartierung mit Ausnahme der Regionen 6, 11 und 13 zusammen. Aufgeführt sind die jeweilige Region, der identifizierte Haplotyp, der bei mindestens zwei definitiv betroffenen Personen nachgewiesen werden konnte und die Individuen, die diesen zeigen. „Definitiv“ und „wahrscheinlich“ betroffene Personen sind grau unterlegt, da sie in der statistischen Berechnung den Status „definitiv erkrankt“ erhielten.

Im Folgenden wird näher auf die Ergebnisse der Feinkartierung und Segregationsanalyse der gekoppelten Region 7 mit Darstellung des krankheitsspezifischen Haplotypen eingegangen.

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Feinkartierung der 13 Regionen mit Ausnahme der Regionen 6, 11 und 13

Region (Chr.)	Haplotyp	L-123	L-973	L-2811	L-2812	L-2870	L-2871	L-2905	L-2906	L-2928	L-3007	L-3017	L-3018	L-3021	L-3126	L-3127	L-3128	L-3129	L-3130	L-3149	L-3150	L-3155	L-3156	L-3157	L-3158	L-3195
1 (1)	5-10-8-3	x	x												x			x	x							
	5-12-8-3		x					x		x			x	x												x
	5-4-6-3	x		x		x	x		x		x	x									x	x	x	x		
2 (1)	5-6-4-11-7-6-3-5		x		x*			x*	x*	x*			x	x					x							
	7-9-9-11-7-5-3-8	x		x	x*	x	x				x	x*										x*		x		
3 (3)	9-2-9-5-2-4	x	x	x*	x*	x*		x	x					x*				x		x	x	x	x*			
	6-4-15-6-7-5	x	x											x*	x				x				x*			
4 (3)	6-3-5-18-8	x	x															x	x				x*			
	5-2-7-16-3		x	x*	x*									x	x		x									
5 (4)	4-3-7-5-1-6-4-6-3-6-3-1-1		x	x*	x*	x*	x*	x*	x	x*		x*			x	x*		x*	x*					x*		
	4-1-7-4-1-4-3-1-4-6-3-2-6	x	x*											x				x*	x*	x	x	x	x			
	1-3-1-5	x		x	x		x	x		x														x		
7 (7)	6-5-8-5-15-3-6-5-2-5-4	x	x											x	x	x		x	x			x				
	6-5-4-5-16-4-6-3	x	x	x	x			x	x	x											x		x			
8 (8)	3-8-2-3	x	x															x*	x	x*		x*	x*			
	5-8-2-4			x	x	x																			x*	
	3-8-9-7							x*	x	x																x
9 (9)	1-5-4-4-5			x	x	x*	x				x*	x*	x											x		
10 (16)	4-6-1-4-8	x*	x	x		x		x*	x	x*				x	x	x	x	x								
12 (17)	3-8-9-5-8	x	x																x	x	x	x	x			
	1-3-5-9-2-8			x	x	x	x																	x		
	5-1-9-9-4-8							x*	x	x	x		x													x

Für die jeweilige Region sind das zugehörige Chromosom und die verschiedenen Haplotypen notiert. L-Nummern stellen DNA-Codes der Individuen mit verfügbarer DNA dar, die in die Feinkartierung eingeschlossen wurden. Die Ergebnisse der "betroffenen" Personen sind grau unterlegt. x die Person teilt den angeführten Haplotyp; x* die Person teilt lediglich Anteile des angeführten Haplotyps.

Die Region 7 auf Chromosom 7 (34,16 – 43,85 cM)

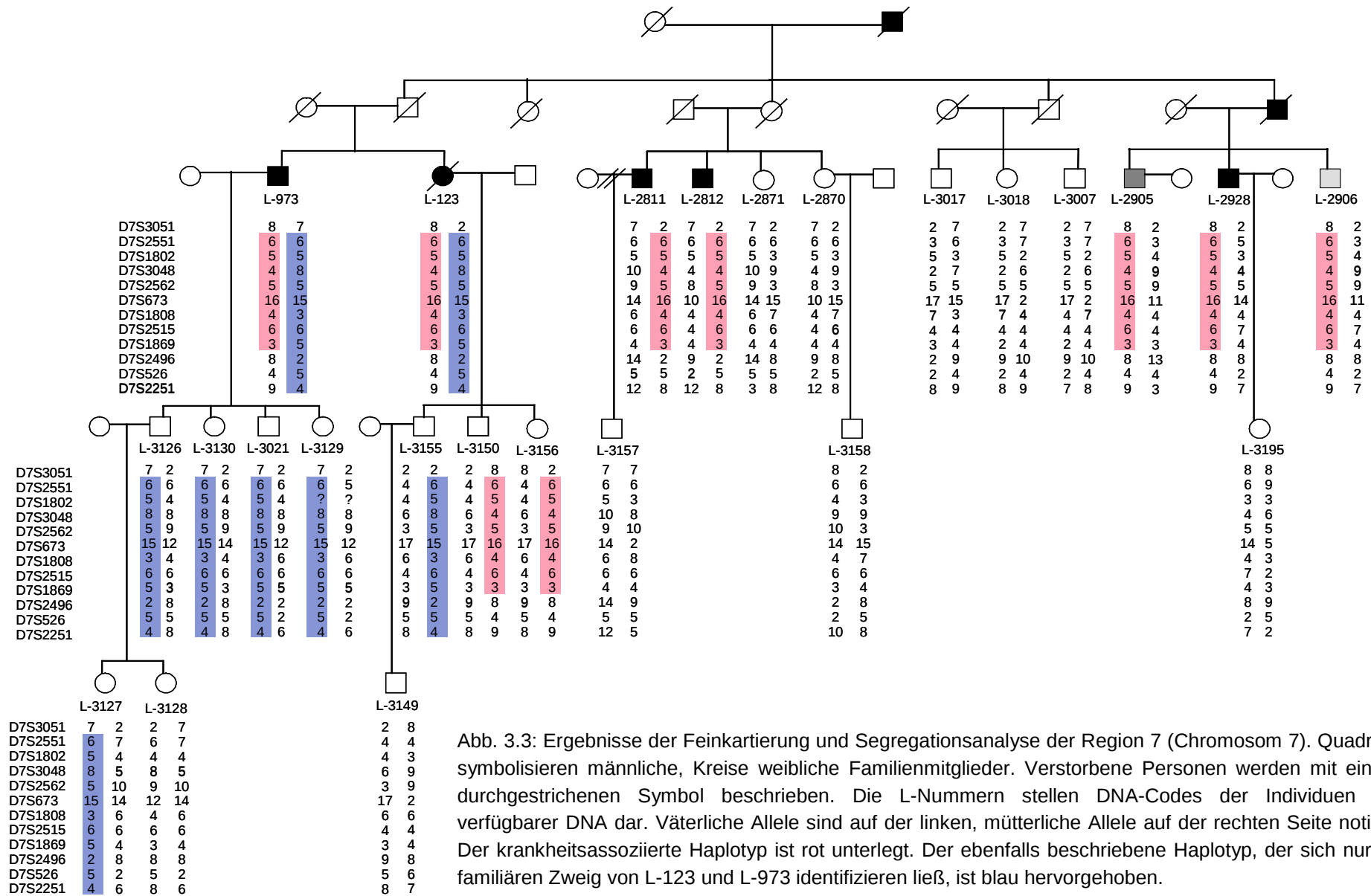
Die Region 7 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 wurde zusätzlich zu den drei in der genomweiten Kopplungsanalyse verwendeten Markern mit weiteren neun *STR*-Markern (D7S3051, D7S2551, D7S1802, D7S3048, D7S673, D7S1808, D7S1869, D7S2496, D7S526) feinkartiert. Eine erneute *LOD score*-Berechnung für die in der Feinkartierung verwendeten Marker ergab einen maximalen *Multipoint LOD score* von 1,99 für vier benachbarte *STR*-Marker (D7S3048, D7S2562, D7S673 und D7S1808) und einen maximalen *Singlepoint LOD score* von 1,40 für den *STR*-Marker D7S673. In Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse der erneuten *LOD score*-Berechnung sowie Angaben zu den verwendeten Markern bezüglich ihrer Position auf dem Chromosom und dem Abstand zum vorhergehenden *STR*-Marker dargestellt.

Tabelle 3.6: In der Feinkartierung der Region 7 verwendete *STR*-Markern

Marker	Position auf dem Chr.		Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	<i>Spt</i> <i>LOD</i> <i>score</i>	<i>Mpt</i> <i>LOD</i> <i>score</i>
	physikalische Karte (Mb)	genetische Karte (cM)			
D7S3051	12,46	29,28		-0,40	0,42
D7S2551	20,10	30,90	1,62	0,81	1,88
D7S1802	20,59	32,52	1,62	0,89	1,98
D7S3048	21,15	34,15	1,63	0,93	1,99
D7S2562	21,37	34,15	0,00	1,31	1,99
D7S673	23,73	38,48	4,33	1,40	1,99
D7S1808	27,91	41,69	3,21	1,15	1,99
D7S2515	28,59	43,84	2,15	0,73	1,94
D7S1869	29,38	47,08	3,24	0,75	0,00
D7S2496	29,44	47,08	0,00	-0,94	0,00
D7S526	30,83	49,22	2,14	-1,22	-0,01
D7S2251	36,16	54,84	5,62	-0,65	-0,03

In der Region 7 konnten durch die Segregationsanalyse zwei Haplotypen identifiziert werden, die bei mindestens zwei definitiv betroffenen Personen vorkommen und darüber hinaus teilweise auch bei mehreren Personen der vierten und fünften Generation zu finden sind (Abbildung 3.3). Der Haplotyp "6-5-8-5-15-3-6-5-2-5-4" wurde dabei lediglich in erstgradig Verwandten von L-973 und L-123 nachgewiesen, weshalb eine Kopplung zum familiären PS ausgeschlossen wurde. Der Haplotyp

“6-5-4-5-16-4-6-3“ hingegen konnte bei allen sieben Personen identifiziert werden, für die die Diagnose eines „definitiven“, „wahrscheinlichen“ oder „möglichen“ PS gestellt wurde. Darüber hinaus kommt dieser Haplotyp auch bei zwei Personen der vierten Generation, deren klinischer Status als “unbekannt“ zu klassifizieren war (L-3150, L-3156), vor (Brüggemann *et al.*, 2011). Beide Personen waren deutlich jünger als das durchschnittliche Erkrankungsalter, weshalb nicht auszuschließen ist, dass sich Krankheitssymptome im späteren Leben entwickeln. Abbildung 3.3 fasst die Ergebnisse der Feinkartierung und Segregationsanalyse im Stammbaum zusammen.



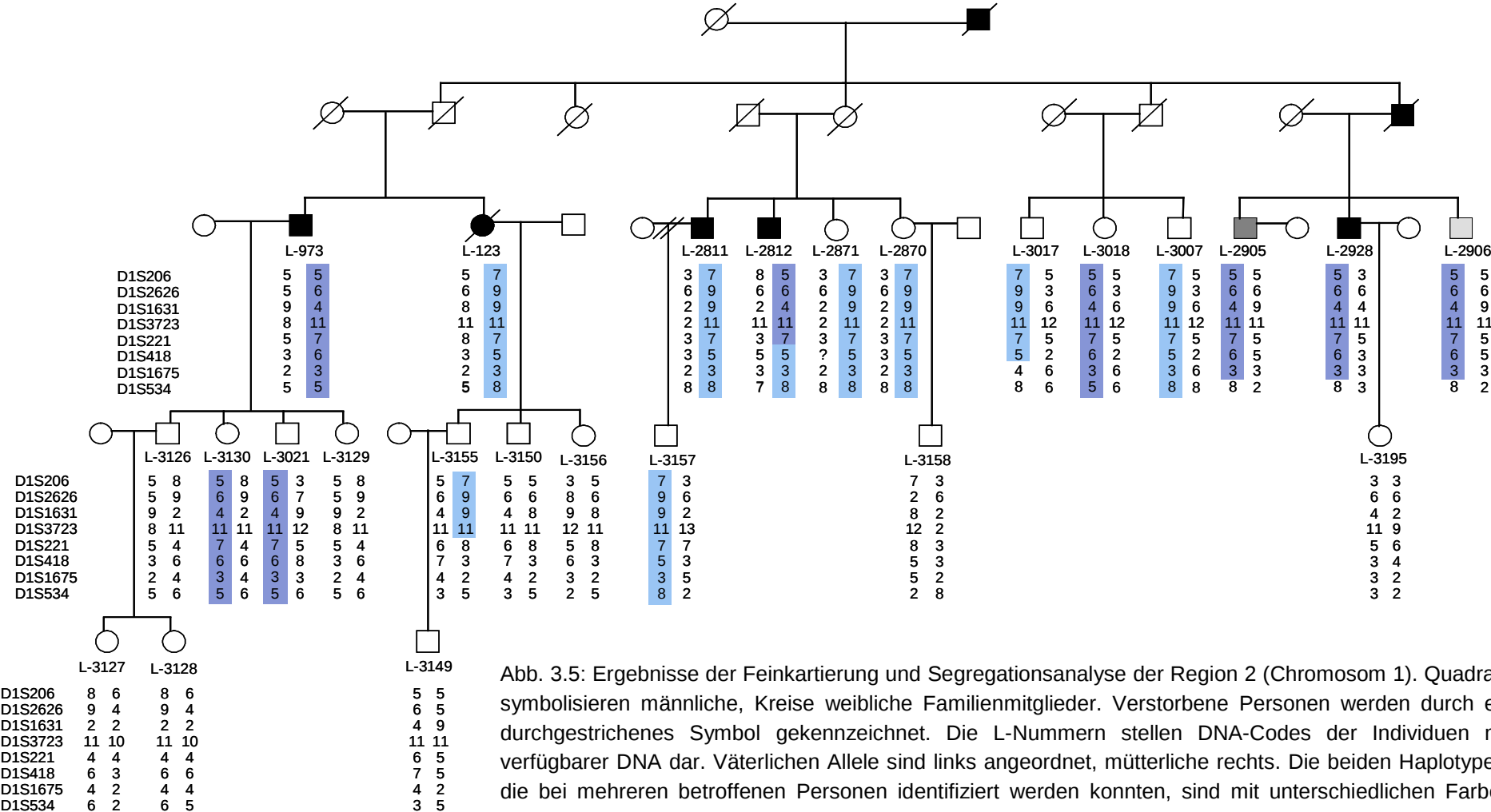


Abb. 3.5: Ergebnisse der Feinkartierung und Segregationsanalyse der Region 2 (Chromosom 1). Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Verstorbene Personen werden durch ein durchgestrichenes Symbol gekennzeichnet. Die L-Nummern stellen DNA-Codes der Individuen mit verfügbarer DNA dar. Väterlichen Allele sind links angeordnet, mütterliche rechts. Die beiden Haplotypen, die bei mehreren betroffenen Personen identifiziert werden konnten, sind mit unterschiedlichen Farben unterlegt. Die Proben L-3017 und L-3155 zeigen nur Teile des jeweiligen Haplotyps, wohingegen es bei L-2812 zu einer Rekombination der beiden Haplotypen kam.

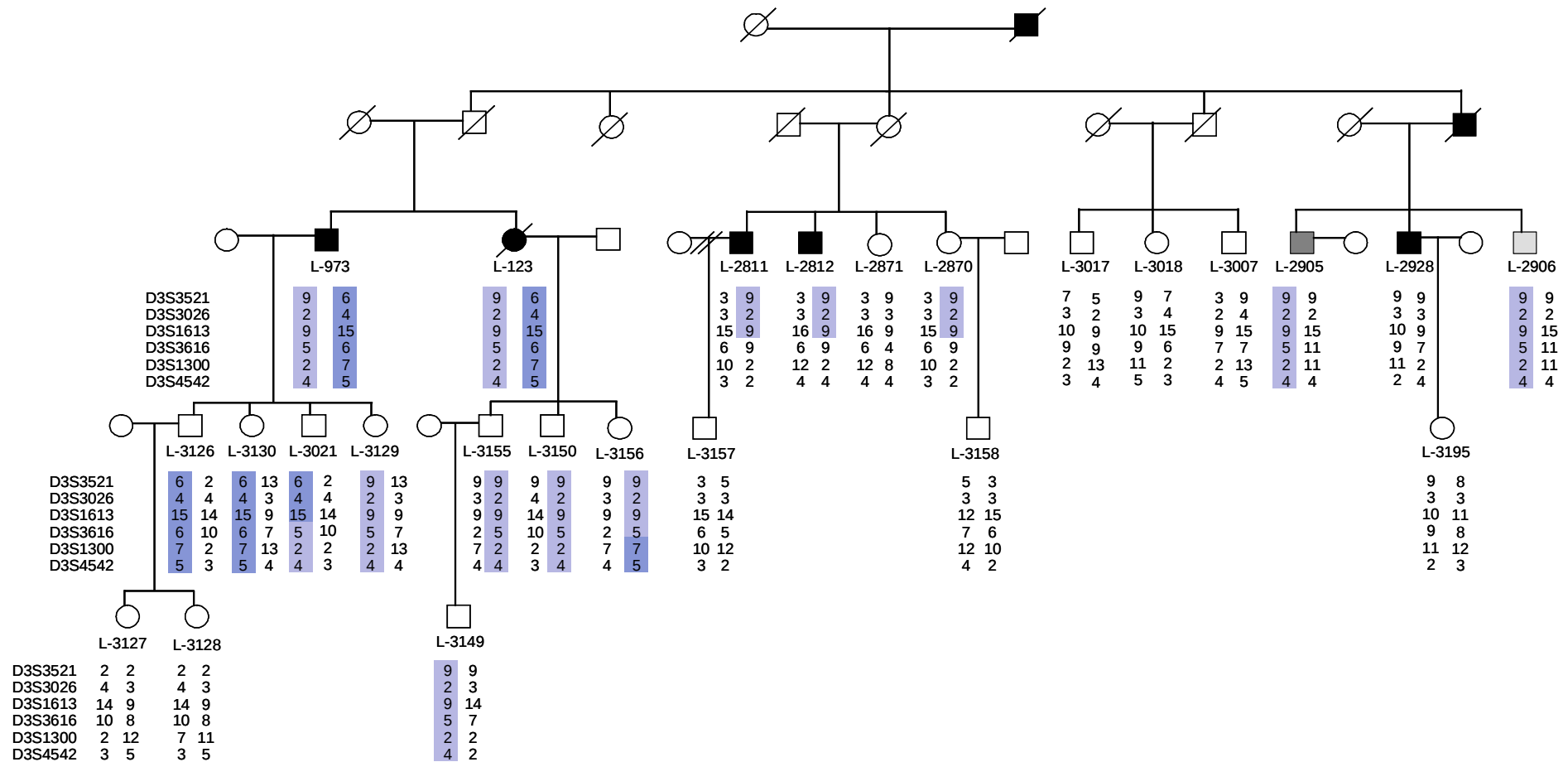


Abb. 3.6: Ergebnisse der Feinkartierung und Segregationsanalyse der Region 3 (Chromosom 3). Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Verstorbene Personen werden mit einem durchgestrichenen Symbol beschrieben. Die L-Nummern stellen DNA-Codes der Individuen mit verfügbarer DNA dar. Väterliche Allele sind auf der linken Seite, mütterliche Allele auf der rechten Seite notiert. Die beiden Haplotypen, die bei mehreren betroffenen Personen vorkamen, sind verschiedenfarbig unterlegt. Die Proben L-2811, L-2812 und L-2870 zeigen nur Teile des jeweiligen Haplotyps. Bei L-3021 und L-3156 kam es zu einer Rekombination der beiden Haplotypen.

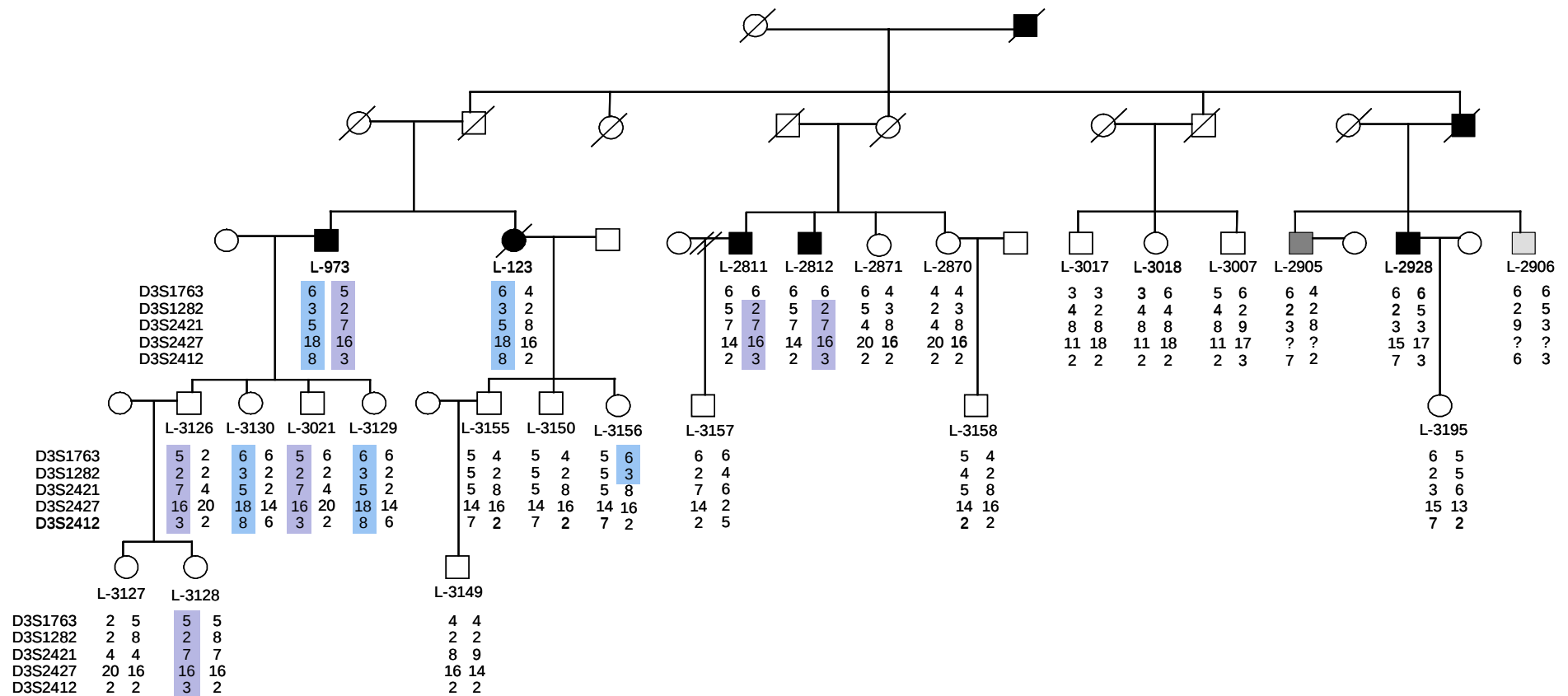
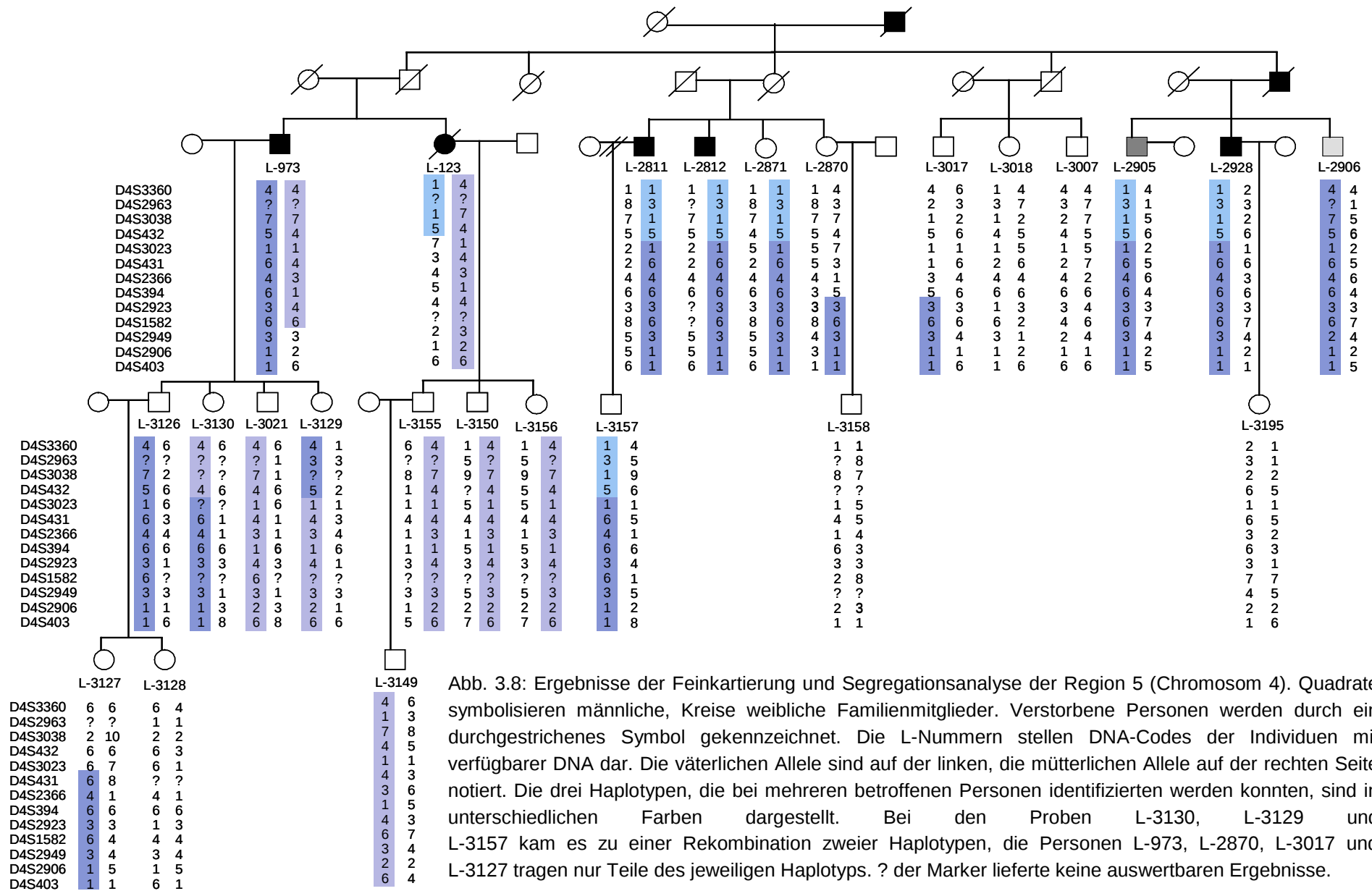


Abb. 3.7: Ergebnisse der Feinkartierung und Segregationsanalyse der Region 4 (Chromosom 3). Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Verstorbene Personen werden mit einem durchgestrichenen Symbol beschrieben. Die L-Nummern stellen DNA-Codes der Individuen mit verfügbarer DNA dar. Väterliche Allele sind links, mütterliche rechts notiert. Die beiden Haplotypen, die bei mehreren betroffenen Personen identifiziert werden konnten, sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Einige Proben tragen nur Teile der Haplotypen (L-2811, L-2812, L-3156). ? der Marker lieferte keine auswertbaren Ergebnisse.



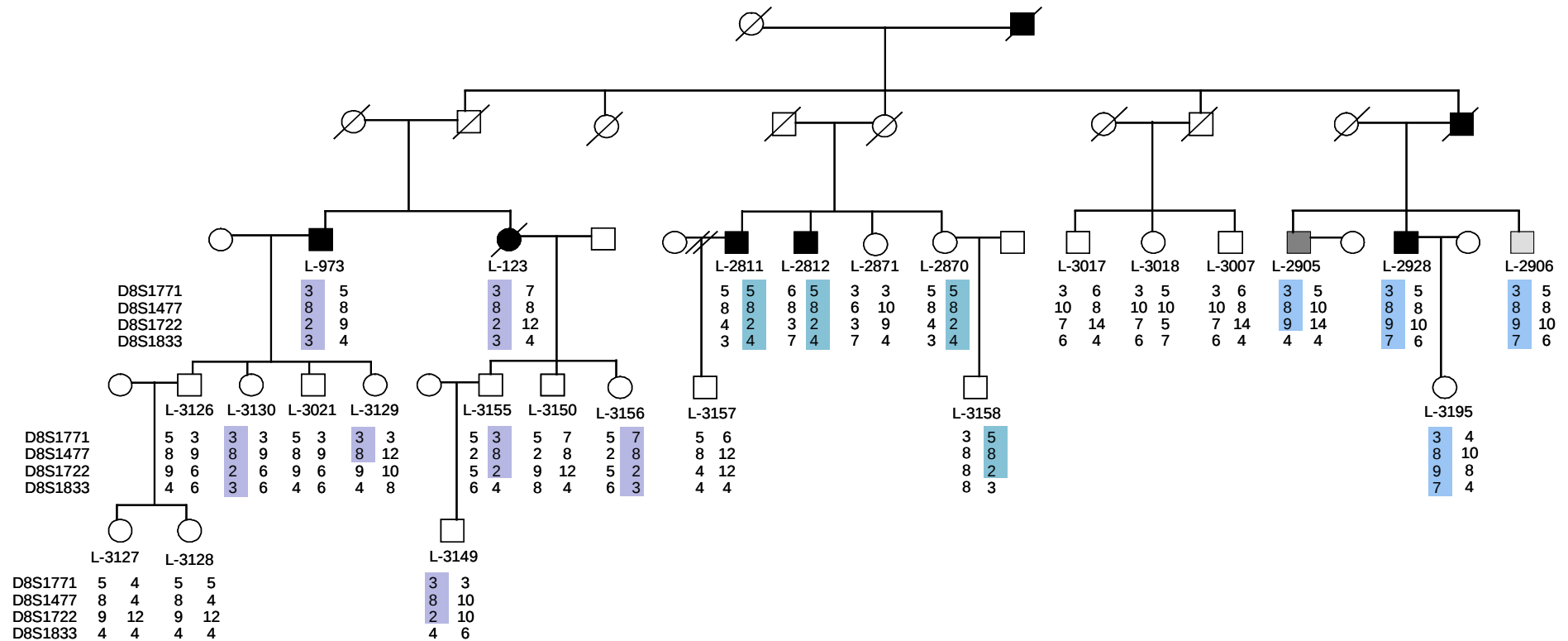


Abb. 3.9: Ergebnisse der Feinkartierung und Segregationsanalyse der Region 8 (Chromosom 8). Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Verstorbene Personen werden mit einem durchgestrichenen Symbol beschrieben. Die L-Nummern stellen DNA-Codes der Individuen mit verfügbarer DNA dar. Väterliche Allele sind links, mütterliche Allele rechts aufgetragen. Insgesamt wurden drei unterschiedliche Haplotypen identifiziert, die bei mehreren Betroffenen vorkamen. Sie sind verschiedenfarbig unterlegt. Einige Proben zeigen nur Teile des jeweiligen Haplotyps (L-2905, L-3129, L-3149, L-3155 und L-3158).

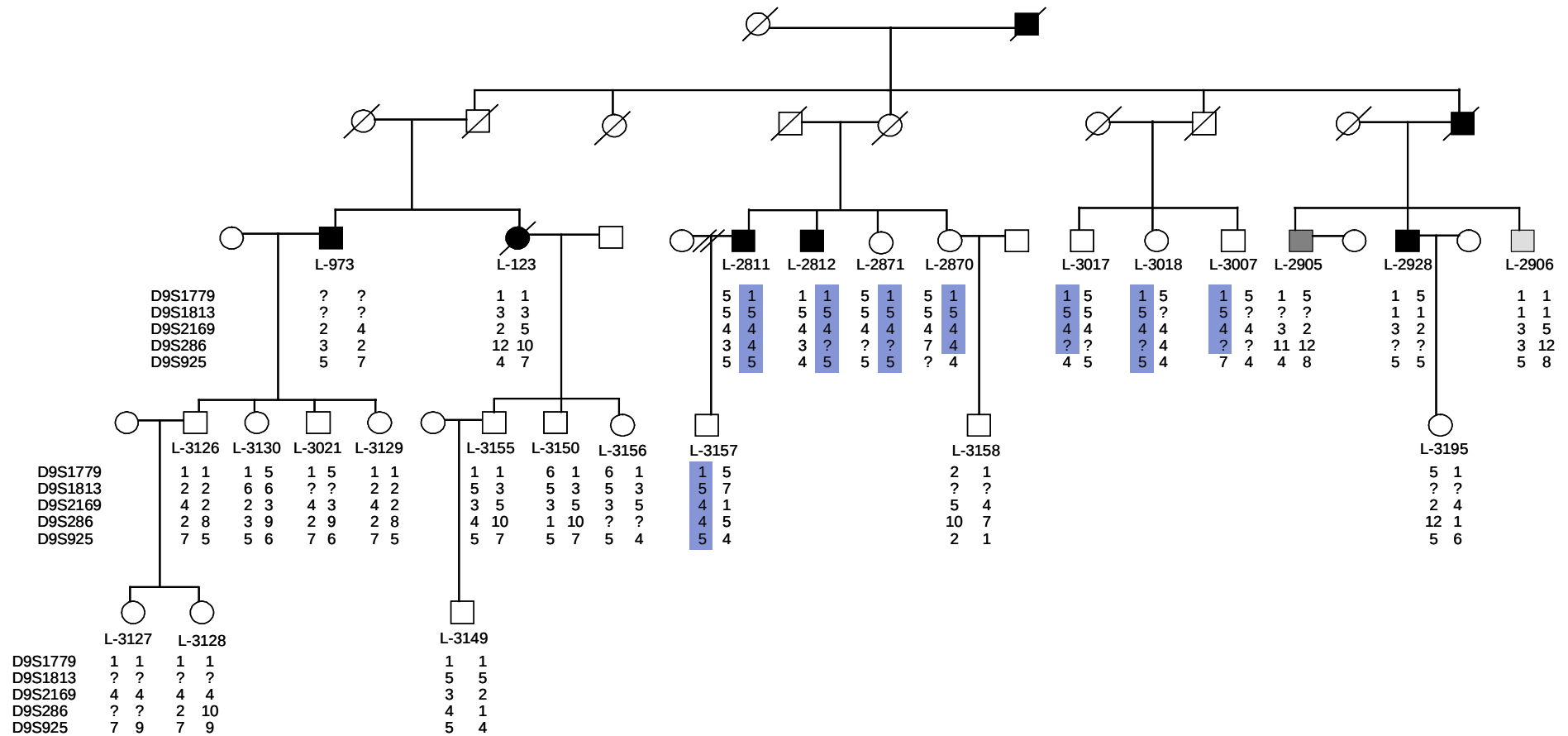


Abb. 3.10: Ergebnisse der Feinkartierung und Segregationsanalyse der Region 9 (Chromosom 9). Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Verstorbene Personen werden mit einem durchgestrichenen Symbol beschrieben. Die L-Nummern stellen DNA-Codes der Individuen mit verfügbarer DNA dar. Väterliche Allele sind auf der linken, mütterliche Allele auf der rechten Seite aufgetragen. Es konnte ein farbig hervorgehobener Haplotyp identifiziert werden, der bei mehreren betroffenen Personen vorkam. Die Proben L- 2870, L-3017 und L-3007 tragen nur Teile dieses Haplotyps. ? der Marker lieferte keine auswertbaren Ergebnisse.

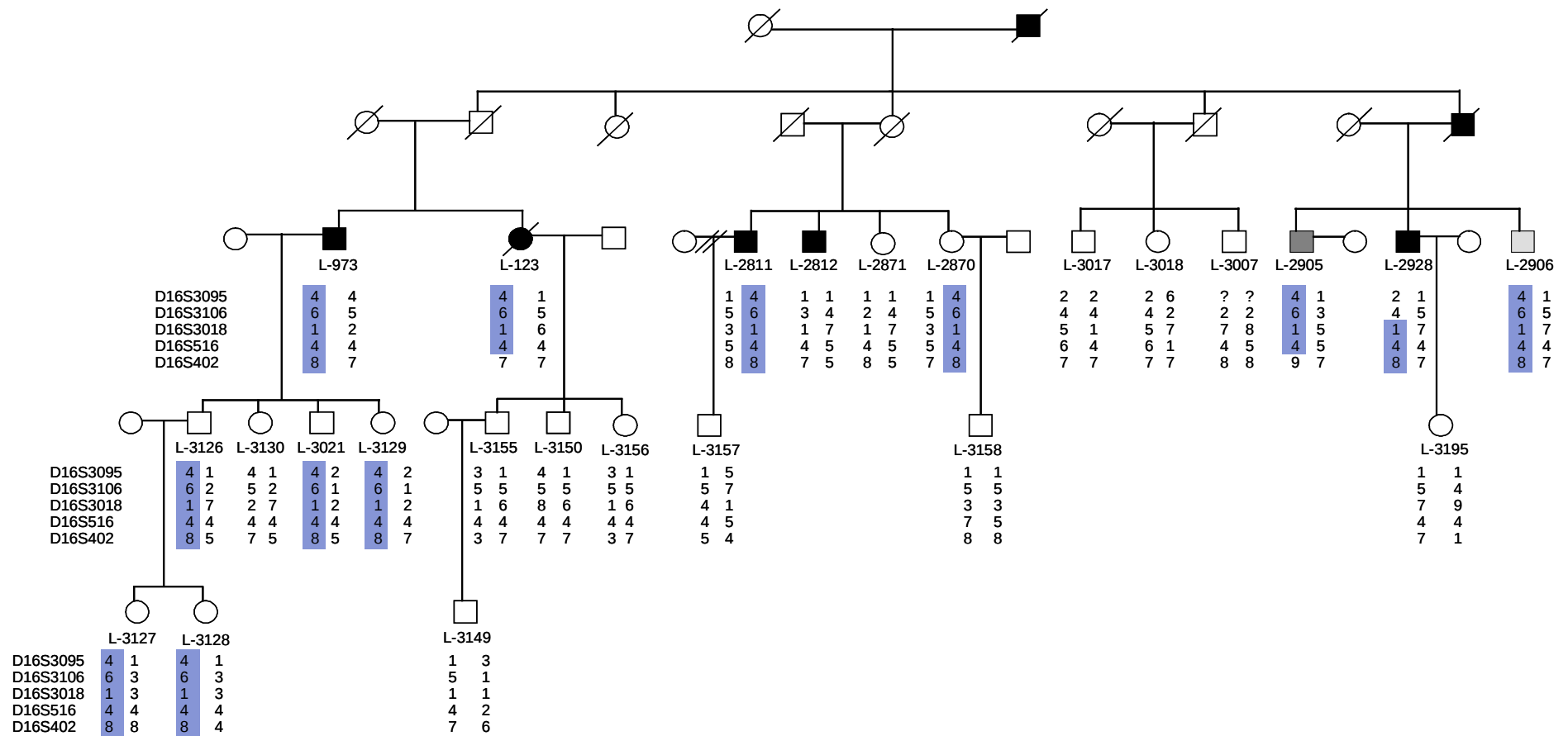


Abb. 3.11: Ergebnisse der Feinkartierung und Segregationsanalyse der Region 10 (Chromosom 16). Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Verstorbene Personen werden mit einem durchgestrichenen Symbol beschrieben. Die L-Nummern stellen DNA-Codes der Individuen mit verfügbarer DNA dar. Väterliche Allele sind links aufgetragen, mütterliche Allele rechts. Der Haplotype, der bei mehreren betroffenen Personen identifiziert werden konnte, ist farbig unterlegt. Einige Proben zeigen nur Teile des Haplotyps (L-123, L-2905, L-2928, L-3149). ? der Marker lieferte keine auswertbaren Ergebnisse.

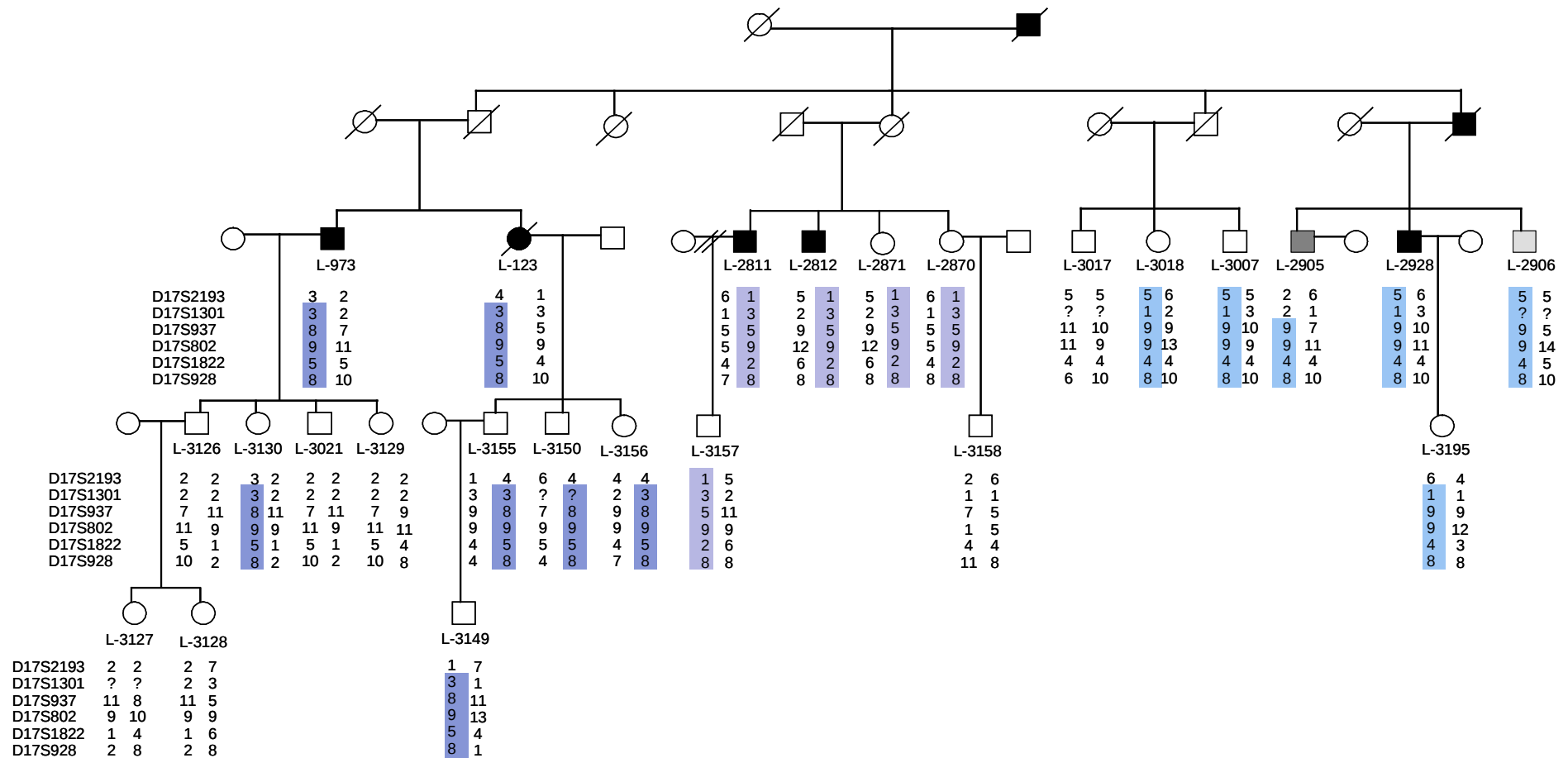


Abb. 3.12: Ergebnisse der Feinkartierung und Segregationsanalyse der Region 12 (Chromosom 17). Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Verstorbene Personen werden mit einem durchgestrichenen Symbol beschrieben. Die L-Nummern stellen DNA-Codes der Individuen mit verfügbarer DNA dar. Väterliche Allele sind links, mütterliche Allele sind rechts aufgetragen. Die drei Haplotypen, die bei mehreren betroffenen Personen identifiziert werden konnten, sind mit unterschiedlichen Farben unterlegt. Einige Proben zeigen nur Teile dieser Haplotypen (L-2905, L-3195). ? der Marker lieferte kein auswertbares Ergebnis.

3.3. Die Sequenzierung ergibt keine pathogenetische Veränderung in den Kandidatengen

Durch die Feinkartierung und Segregationsanalyse konnte mit der Region 7 auf dem Chromosom 7 eine Region eingegrenzt werden, die als einzige eine definitive Kopplung zum PS der Familie SP zeigt. Folglich findet sich in dieser Region mit einer hohen Wahrscheinlichkeit die krankheitsauslösende Mutation in einem dort lokalisierten Gen. Im Anschluss an die Feinkartierung und Segregationsanalyse wurde daher mit der Sequenzierung der Gene in dieser Region begonnen. Dafür wurden zunächst fünf sog. Kandidatengene ausgewählt, deren Funktionen bzw. Mutations-bedingte Malfunktionen mit der bisher bekannten Pathophysiologie des PS zu vereinbaren sind.

Die Region 7 und die fünf identifizierten Kandidatengene

Im Folgenden werden sowohl die Kandidatenregion 7 auf Chromosom 7 als auch die Kandidatengene, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenziert wurden, näher beschrieben.

Die durch die Feinkartierung eingegrenzte Region 7 liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 (Abbildung 3.13a). Auf diesem Chromosom konnten zwar bereits einige Gene mit Erbkrankheiten in Verbindung gebracht werden (siehe auch 4.3.2), ein genetisch bedingtes PS ist bisher jedoch noch nicht im Zusammenhang mit einer Mutation in einem Gen des Chromosoms 7 beschrieben worden.

Die Kandidatenregion wird von den *STR*-Markern D7S2551 und D7S2496 umspannt und umfasst einen ca. 10.7 Mb großen Chromosomenbereich, der von 18.5 Mb (7p21.1) bis 29.2 Mb (7p15) reicht und in welchem 91 Gene beschrieben wurden (Abbildung 3.13b). Eine Auflistung aller sich zum Zeitpunkt der Sequenzierung in dieser Region befindlichen Gene (Stand: Januar 2008) findet sich in Tabelle 8.4 des Anhangs. Mit Hilfe der Ergebnisse des Humanen Genom Projekts wurden die Kandidatengene *ABCB5* (*ATP-binding cassette B5*), *IL6* (*Interleukin 6*), *STK31* (*Serin/Threonin-Kinase31*), *CYC*s (*Cytochrom c, somatic*), *CREB5* (*(cAMP response element) binding 5*) für die Sequenzanalyse ausgewählt, da ihre beschriebenen Funktionen bzw. ihre potentiellen Funktionsveränderungen mit der bisher bekannten Pathophysiologie des PS in Zusammenhang gebracht werden können (Abbildung 3.13c). Weitere Informationen zu den Kandidatengen, auf deren Grundlage die

Primer für die Sequenzierung hergestellt wurden, finden sich in Tabelle 3.6 (Stand: Januar 2008).

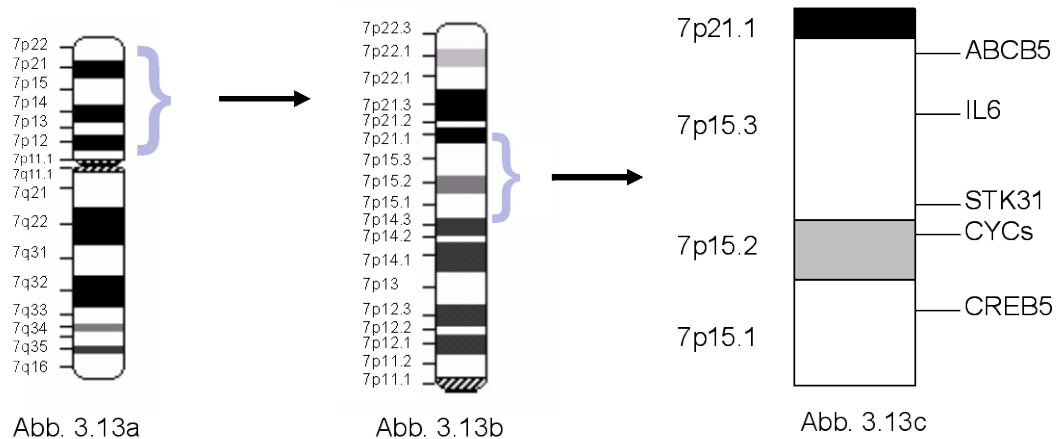


Abb. 3.13a: Dargestellt ist eine schematische Abbildung des Chromosom 7 in der Metaphase mit G-Bänderung. Die Bezeichnungen der einzelnen Chromosomenbanden sind links notiert. Die erste Zahl (7) zeigt das Chromosom an. p steht für den kurzen Arm, q für den langen. Die folgenden Zahlen bezeichnen die jeweiligen Banden. Sie werden ausgehend von der Zentromerregion in Richtung Telomerregion in ansteigender Zahlenfolge durchnummeriert. Die blaue Klammer markiert den kurzen Arm des Chromosoms, auf welchem die Kandidatenregion lokalisiert ist.

Abb. 3.13b: Dargestellt ist eine schematische Vergrößerung des kurzen Arms des Chromosom 7 in der Metaphase mit G-Bänderung. Die blaue Klammer zeigt die Kandidatenregion, welche eine Größe von 10.781.151 bp umspannt.

Abb. 3.13c: Dargestellt ist eine schematische Vergrößerung der gekoppelten Kandidatenregion. Die fünf Kandidatengene sind nach ihrer Lokalisation auf dem Chromosom eingezeichnet.

Tabelle 3.6: Informationen zu den Kandidatengenen (Stand: Januar 2008)

Gen	Lokus	Umspannende Region (bp)	Größe (bp)	Anzahl der Exons	Anzahl kodierender Exons (cDNA)
ABCB5	7p15.3	20.653.570 - 20.761.772	108.203	19	15
IL6	7p21	22.733.345 - 22.738.141	4.797	5	5
STK31	7p15.3	23.716.416 - 23.838.659	122.244	24	24
CYCs	7p15.2	25.124.800 - 25.131.480	6.681	3	2
CREB5	7p15.1	28.305.465 - 28.832.036	526.572	14	12

ABCB5 ATP-binding cassette B5, IL6 Interleukin 6, STK31 Serin/Threonin-Kinase31, CYCs Cytochrom c, somatic, CREB5 (cAMP response element) binding 5; bp Basenpaar; cDNA kodierende DNA

Im Folgenden werden die einzelnen Kandidatengene kurz in ihrer physiologischen Funktion vorgestellt. Für eine genauere Beschreibung der Kandidatengene sowie ihre mögliche Verbindung zu bereits bekannten PS-assoziierten Genen bzw. Pathomechanismen wird auf den Abschnitt 4.3.2 der Diskussion verwiesen.

ABCB5: ATP-binding cassette B5

ABCB5 ist in der Bande 7p15.3 lokalisiert und umfasst 19 Exons, wovon 14 kodierend sind. Die anderen fünf Exons werden in der 5' bzw. 3' untranslatierten Region transkribiert. *ABCB5* kodiert für ein Protein der Familie aktiver Transporter mit einer ATP-bindenden Untereinheit (*ABC ATP-binding cassette*), deren Mitglieder Moleküle unterschiedlicher Größen aus Zellen ausschleusen können (Frank *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). Darüber hinaus spielen die Proteine dieser Familie eine Rolle beim physiologischen intrazellulärem Transport sowie bei der Differenzierung und dem Überleben von Zellen.

IL6: Interleukin 6

In 7p21 ist das für das Zytokin Interleukin 6 (IL-6) kodierende Gen lokalisiert, welches aus fünf Exons besteht. IL-6, welches von Makrophagen sezerniert wird und Endothelzellen sowie T- und B-Lymphozyten aktiviert, spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen (Hof und Dörries, 2005).

STK31: Serin/Threonin-Kinase31

Das *STK31*-Gen ist in 7p15.3 lokalisiert und kodiert für eine Kinase (Serin/Threonin-Kinase31), die vor allem im Zytoplasma von Spermatogonien sowie im Hirngewebe von Feten exprimiert wird (Wang *et al.*, 2001; Yokoe *et al.*, 2008).

CYCc: Cytochrom c, somatic

Das Gen, welches für das somatische Cytochrom c kodiert, befindet sich in der Region 7p15.2 und besteht aus drei Exons, wovon nur zwei kodierend sind. Cytochrom c ist Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette und dient dem Elektronentransport von Komplex III zu Komplex IV. Bei Freisetzung aus der äußeren Mitochondrienmembran induziert Cytochrom c durch Aktivierung von Caspasen den Zelltod (Pfeiffer, 2004; Berg *et al.*, 2010).

CREB5: (cAMP response element) binding 5

Im Abschnitt 7p15.1 befindet sich das Gen *CREB5*. Von den 14 Exons kodieren 13 für ein Protein der *cAMP response element binding* Proteinfamilie. Diese Proteinfamilie kann an bestimmte Elemente in der Promoterregion von Genen binden und somit, ähnlich wie andere Transkriptionsfaktoren, selektiv die Transkription bestimmter Gene aktivieren oder inhibieren (Löffler *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden die beschriebenen fünf Kandidatengene bei zwei definitiv betroffenen Familienmitgliedern (L-973, L-2812) auf mögliche Sequenzvariationen hin analysiert. Abbildung 3.14 zeigt exemplarisch die Sequenz des Vorwärtsstrangs von Exon 3 des Gens *STK31* bei der Probe L-973.

Die Daten aller untersuchten Exons beider in die Sequenzierung eingeschlossenen Personen wurden anschließend mit der Referenzsequenz verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Durch die Sequenzanalyse der Kandidatengene konnten in den Genen *IL6* und *CYC*s keine von der Referenzsequenz abweichenden Veränderungen nachgewiesen werden. In den Genen *ABCB5*, *STK31* und *CREB5* hingegen wurden insgesamt 23 Sequenzvariationen detektiert. Dabei handelt es sich bei 19 Sequenzvariationen um einen Basenaustausch, der in sechs Fällen einen Aminosäureaustausch zur Folge hat. Neben dem Austausch von Basen konnten drei Insertionen und eine Deletion einer bzw. mehrerer Basen nachgewiesen werden. Diese Veränderungen führten jedoch nicht zu einem Aminosäureaustausch, da sie sich in einem Intron bzw. in einer untranslatierten Region des Gens befanden. Zwanzig der 23 detektierten Sequenzvariationen waren bereits als Polymorphismen beschrieben worden.

Drei identifizierte Varianten wurden in dieser Arbeit erstmalig detektiert. Bei diesen handelt es sich um einen heterozygoten Basenaustausch von Cytosin zu Thymin in der Intronsequenz IVS4-7 des *CREB5*-Gens, der lediglich bei der Probe L-973 nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren fand sich ein heterozygoter Basenaustausch von Guanin zu Adenin im Exon 11 an Position 99 des *CREB5*-Gens, der nur bei der Probe L-2812 identifiziert werden konnte und zu keinem Aminosäureaustausch führte. Die dritte bisher nicht beschriebene Variation ist die Insertion der Basensequenz GTTT in der 3'-untranslationierten Region des *STK31*-Gens (3'UTR43_46), welche bei beiden Proben identifiziert werden konnte.

Die 3'-untranslatierte Region sitzt der mRNA am 3'-Ende auf und hat im Rahmen der Transkription eine regulierende Funktion, indem sie Proteinbindungsstellen beinhaltet, die die Stabilität der mRNA beeinflussen können (siehe auch Abbildung 1.1). Diese Regionen werden bei der Proteinbiosynthese nicht translatiert. Somit führen Veränderungen in dieser Region nicht zu einer veränderten Proteinfunktion.

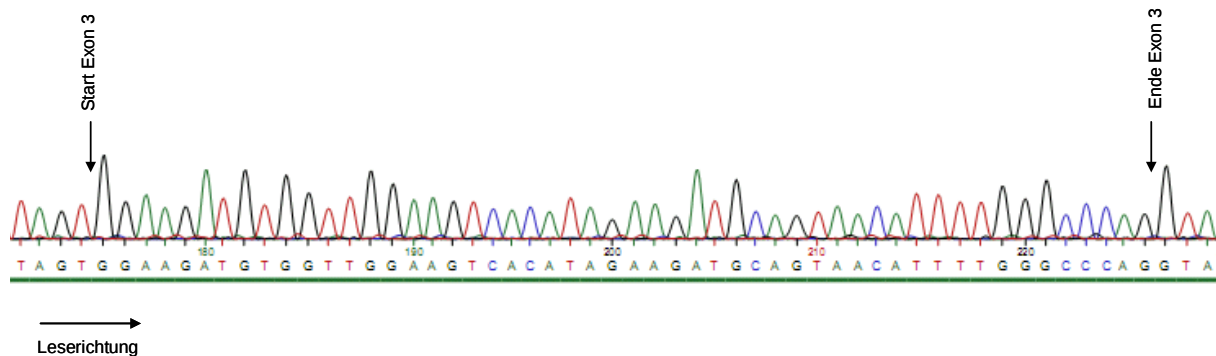


Abb. 3.14: Dargestellt ist die Sequenz des Vorwärtsstrangs von Exon 3 des Gens *STK31* bei der Probe L-973. Die Pfeile zeigen Anfang und Ende des Exons auf. Die Kurven geben die vom Laser empfangenen Signale wieder. Die vier Farben, die während der Auftrennung vom Laser detektiert werden, sind in ihrer Farbkodierung als Kurve dargestellt. Die Höhe der Kurve ist äquivalent zur Quantität des Produktes, die Reinheit wird durch eine klare, eindeutig von den anderen abzugrenzende Kurve dargestellt. Schwarz symbolisiert Guanin, Rot Thymin, Grün Adenin, Blau Cytosin. Die Nummern unterhalb der Kurven geben die fortlaufende Anzahl der detektierten Basen wieder. Im Vorwärtsstrang des Exon 3 zeigen sich bei der Probe L-973 keine Veränderungen im Vergleich zur Originalsequenz.

Die detektierten DNA-Veränderungen in den Kandidatengenomen sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst und den bereits bekannten Variationen gegenübergestellt.

In den fünf Kandidatengenomen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, konnte somit keine für das PS der Familie SP verantwortliche Mutation detektiert werden.

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Sequenzanalyse der Kandidatengene

	Position	Referenz	L-973	L-2812	SNP-Referenz	AS-Austausch	Frequenz
ABCB5	IVS3-30	C	T/C	C/C	rs3213623	n. b.	EU C = 0,73 T = 0,27 C/T = 0,28 (1)
	c.2	T	T/C	T/T	rs34603556	p.Met1Thr	AM/AF C = 0,10 T = 0,90 C/T = 0,16 (2)
	c.343	A	A/G	A/A	rs2301641	p.Lys115Glu	EU A = 0,64 G = 0,36 A/G = 0,44 (3)
	IVS5-44	T	C/T	T/T	rs11764760	n. b.	EU C = 0,17 T = 0,79 C/T = 0,32 (3)
	IVS9+80	A	A/A	A/C	rs11762180	n. b.	EU A = 0,75 C = 0,24 A/C = 0,32 (3)
	IVS9-9	G	G/G	A/G	rs12700230	n. b.	EU A = 0,15 G = 0,83 A/G = 0,31 (3)
	IVS12-96	T	T/A	T/A	rs6948504	n. b.	n. b.
	c.1467	G	A/G	G/G	rs10254317	p.Ala489Ala	EU A = 0,37 G = 0,62 A/G = 0,45 G/G = 0,38 (3)
	c.1573	G	A/A	A/A	rs6461515	p.Glu524Lys	EU A = 0,83 G = 0,16 A/A = 0,66 (3)
	IVS15+86		insG/insG	insG/insG	rs11380694	n. b.	n. b.
IL6	Es konnte keine von der Referenzsequenz abweichende Veränderung identifiziert werden.						
STK31	c.218	A	A/A	A/G	rs7779633	n. b.	EU A = 0,69 G = 0,31 A/G = 0,41 (3)
	c.1160	G	A/G	G/G	rs4722266	p.Gly387Glu	EU A = 0,15 G = 0,84 A/G = 0,29 (3)
	IVS10+48	A	delA/delA	delA/delA	rs34664371	n. b.	n. b.
	IVS11+37	G	G/C	C/C	rs2193826	n. b.	EU C = 0,29 G = 0,68 C/C = 0,07 (3)
	IVS13-19	T	C/C	C/C	rs1469000	n. b.	EU C = 0,57 T = 0,42 C/C = 0,27 (3)
	IVS14+102	G	A/A	A/A	rs1469001	n. b.	EU A = 0,98 G = 0,01 A/A = 0,97 (3)
	IVS16-58	A	G/G	A/G	rs10950961	n. b.	EU A = 0,44 G = 0,54 G/G = 0,32 A/G = 0,47 (3)
	IVS17+73	A	A/A	A/G	rs6461737	n. b.	EU A = 0,67 G = 0,32 A/G = 0,35 (3)
	IVS22-46	C	T/T	T/T	rs2390814	n. b.	EU C = 0,21 T = 0,78 T/T = 0,57 (1)
	IVS23+9		insA/insA	insA/insA	rs5882915	n. b.	n. b.
	3'UTR43_46		insGTTT/insGTTT	insGTTT/insGTTT	n. b.	n. b.	n. b.
CYCs	Es konnte keine von der Referenzsequenz abweichende Veränderung identifiziert werden.						
CREB5	IVS4-7	C	T/C	C/C	n. b.	n. b.	n. b.
	c.999	G	G/G	A/G	n. b.	Pro333Pro	n. b.

Spalte Position: IVS Intron, die nachstehende Zahl bezeichnet die Intronnummer, -/+ Position der veränderten Base liegt vor (-)/nach (+) dem Exon, letzte Zahl gibt die Bp-Position an (vom Anfang bzw. Ende des Introns beginnend durchgezählt), c. kodierendes Exon, nachfolgende Nummer bezeichnet die Position der veränderten Base im Exon; Spalte Referenz: C Cytosin, T Thymin, A Adenin, G Guanin; Spalte L-973/L-2812: an jeweiliger Position vorliegende Base auf dem Vorwärts- bzw. Rückwärtsstrang, del Deletion, ins Insertion; Spalte SNP-Referenz: Referenz bereits beschriebener Sequenzvariationen, n. b. nicht bekannt; Spalte AS (Aminosäure)-Austausch: n. b. nicht bekannt, p. Protein, angegeben ist die Original- sowie die neue AS, die Ziffer zwischen den AS gibt die Position der AS im Protein an, Met Methionin, Thr Threonin, Lys Lysin, Glu Glutamat, Ala, Alanin, Gly Glycin, Pro Proalanin; Spalte Frequenz: beschriebene Frequenz der jeweiligen Sequenzveränderung in einer bestimmten Population, EU Europäer, AM Amerikaner, AF Afrikaner; (1) AFD_EUR_PANEL, (2) AGI_ASP population, (3) HapMap-CEU

4. DISKUSSION

Im folgenden Abschnitt der Arbeit wird zunächst das klinische Bild des PS der Familie SP mit anderen, bereits bekannten monogenen PS-Formen verglichen (Abschnitt 4.1). Des Weiteren werden das Chromosom 7 und die durch die genomweite Kopplungsanalyse und Feinkartierung eingegrenzte Kandidatenregion auf selbigem Chromosom näher beschrieben sowie bisherige Erkenntnisse bezüglich dieser Region dargestellt (Abschnitt 4.2). Abschließend werden die für die Sequenzierung ausgewählten Kandidatengene eingehender erläutert und ihre Funktion in Zusammenhang mit den bisherigen Erkenntnissen zur Pathogenese des monogenen PS gesetzt (Abschnitt 4.3).

4.1. Der Phänotyp des Parkinson-Syndroms der Familie SP

In der deutschstämmigen Familie SP konnte anhand der klinischen Untersuchung für fünf Familienmitglieder ein definitives PS (L-123, L-973, L-2811, L-2812, L-2928) und für jeweils eine weitere Person ein wahrscheinliches bzw. mögliches PS diagnostiziert werden. Anamnestische Daten zu bereits verstorbenen Familienmitgliedern der ersten und zweiten Generation legen nahe, dass neben der Person I.2 auch eine Person der zweiten Generation (II.9) an einem PS erkrankt war. Die Kombination aus den Symptomen Anosmie und Demenz bei der Person II.5 weist möglicherweise auf einen nicht-motorischen Phänotyp hin. Der Phänotyp würde in diesem Fall eine reduzierte Penetranz für die motorischen Symptome aufweisen (Brüggemann *et al.*, 2011).

Unter Einschluss der bereits verstorbenen Familienmitglieder mit einem bekannten PS sowie möglicher nicht-motorischer Phänotypen sind vermutlich neun Mitglieder der Familie in drei aufeinanderfolgenden Generationen an einem PS erkrankt. Diese Häufung der Erkrankung bei der Familie legt eine genetische Ursache für das PS nahe. Die Verteilung der Erkrankung im Stammbaum ist dabei typisch für einen autosomal-dominanten Erbgang (Abbildung 2.1).

Abbildung 4.1 zeigt den Stammbaum einer deutsch-kanadischen Familie mit einem *LRRK2*-assoziierten PS (Zimprich *et al.*, 2004), Abbildung 4.2 präsentiert einen Stammbaum einer italienischen Familie mit einem *SNCA*-assoziierten PS (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Für beide genetisch bedingten PS-Formen konnte ein

autosomal-dominantes Vererbungsmuster gezeigt und letztlich eine heterozygote Mutation identifiziert werden. Betrachtet man das Verteilungsmuster der Erkrankten in den Stammbäumen, so ähnelt dieses dem Verteilungsmuster in der Familie SP. In allen drei Familien betrifft das PS sowohl Männer als auch Frauen und tritt in jeder Generation auf. Ausgenommen davon ist jeweils die erste Generation der Familien, für welche keine Krankheitsdaten bekannt sind und die Generationen vier und fünf der Familie SP, deren Mitglieder das mittlere Erkrankungsalter des PS bei dieser Familie noch nicht erreicht haben.

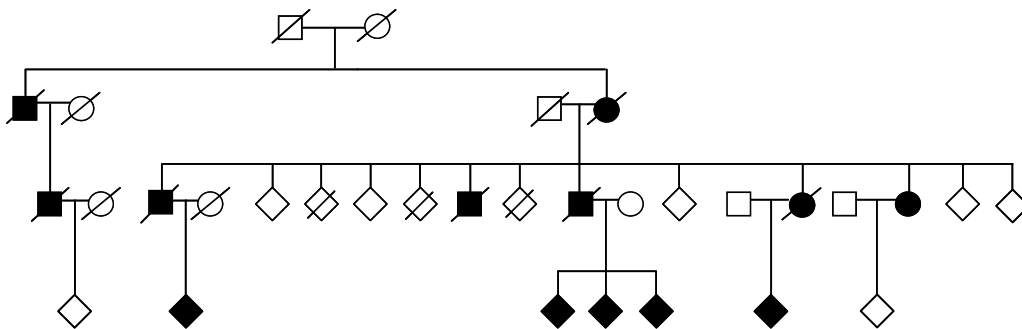


Abb. 4.1: Stammbaum einer deutsch-kanadischen Familie mit einem autosomal-dominant vererbten *LRRK2*-assoziierten PS. Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder, Rhomben kennzeichnen Personen unbekannten Geschlechts. Verstorbene Personen werden mit einem durchgestrichenen Symbol beschrieben. Betroffene Personen werden durch schwarze Symbole, gesunde Personen durch weiße Symbole dargestellt (nach Zimprich *et al.*, 2004).

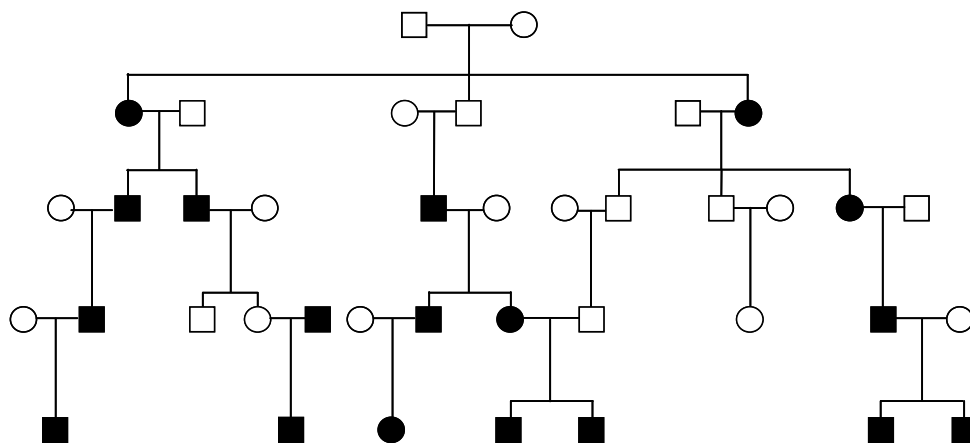


Abb. 4.2: Ausschnitt aus einem Stammbaum einer italienischen Familie mit einem autosomal-dominant vererbten *SNCA*-assoziierten PS. Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienmitglieder. Betroffene Personen werden durch schwarze Symbole, gesunde Personen durch weiße Symbole dargestellt (nach Polymeropoulos *et al.*, 1997).

Die meisten der bisher bekannten PS-Formen, die durch eine monogene Veränderung im Erbgut betroffener Personen entstehen, zeichnen sich durch ein frühes Erkrankungsalter aus (sog. *early-onset Parkinson's disease (EOPD)*). Die PS-

typischen Symptome bei Personen, deren PS auf eine Mutation im *Parkin*-, *PINK1*- oder *DJ-1*-Gen zurückgeführt werden können, treten in der Regel bereits vor dem 40. Lebensjahr auf (Klein und Lohmann-Hedrich, 2007; Cookson und Bandman, 2010). Das Erkrankungsalter von Personen mit einer Mutation im *SNCA*-Gen ist, wie eingangs beschrieben, u. a. abhängig von der Gendosis. So gehen Gentrifikationen wie auch Punktmutationen mit einem frühen Erkrankungsalter der betroffenen Personen einher (Singleton *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2007; Lesage und Brice, 2009). Prozentual häufiger sind hingegen monogene PS, die mit einem späten Erkrankungsalter einhergehen (> 40. Lebensjahr). Sowohl für das *LRRK2*- als auch für das *SNCA*-assoziierte PS, welches mit einer Duplikation des *SNCA*-Gens einhergeht, konnte ein spätes Erkrankungsalter beobachtet werden. Da sich das PS der Familie SP ebenfalls durch einen späten Erkrankungsbeginn auszeichnet - die ersten PS-typischen Symptome zeigten sich bei den Betroffenen zwischen dem 53. und 70. Lebensjahr (mittleres Erkrankungsalter: 63,2 +/- 6,4 Jahre) - wurde die Familie im Rahmen der Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit zunächst auf Mutationen in dem *LRRK2*- und *SNCA*-Gen hin untersucht. Diese konnten jedoch sicher ausgeschlossen werden.

Eine weitere Parallele zwischen dem PS der Familie SP und den genannten, spät beginnenden *SNCA*- und *LRRK2*-assoziierten Formen lässt sich im Zusammenhang mit dem Auftreten kognitiver und psychiatrischer Symptome im Krankheitsverlauf ziehen. So wurden bspw. Depressionen, Angst- und Erregungszustände sowie Halluzinationen und Wahn häufiger bei Personen mit einem *LRRK2*-bedingten PS beschrieben als bei Personen mit einem IPS (Goldwurm *et al.*, 2006; Tomiyama *et al.*, 2006). PS, die auf eine Triplikation des *SNCA*-Gens zurückgeführt werden können, gehen hingegen gehäuft mit einer Demenz einher (Fuchs *et al.*, 2007; Lesage und Brice, 2009).

In der klinischen Untersuchung wurde auch bei zwei definitiv betroffenen Personen der Familie SP nach langjähriger Erkrankung eine dementielle Entwicklung beobachtet (L-123, L-973). Drei definitiv betroffene Familienmitglieder berichteten darüber hinaus von visuellen Halluzinationen bzw. optischen Täuschungen (L-123, L-973, L-2811). Es kann nicht abschließend beurteilt werden, ob die neuropsychologischen Auffälligkeiten einen besonderen Phänotyp darstellen, da auch Patienten mit einem IPS nach langjähriger Erkrankung solche Symptome entwickeln können. Ein Betroffener (L-2811) bildete im Verlauf der Erkrankung eine

REM-Schlaf-bezogene Verhaltensstörung aus, wie sie häufig bei Patienten mit einem IPS, aber auch bei genetischem PS-Formen vorkommt.

4.2. Beurteilung der angewandten Methoden

4.2.1. Die Verfahren zur klinischen Diagnosestellung

Mit Hilfe von Videoaufnahmen, die im Rahmen der klinischen Untersuchung von 20 Familienmitgliedern angefertigt wurden, konnte die Diagnose eines PS anhand der in 2.1.1 beschriebenen Kriterien durch geblindete, d. h. nicht in die klinische Untersuchung involvierte Untersucher, bestätigt werden. Diese Verblindung objektiviert die Diagnosestellung und versucht Fehldiagnosen zu minimieren, die verursacht werden durch den Haloefekt (Überstrahlungsfehler; die Beurteilung einer Person wird durch besonders hervorstechende Merkmale beeinflusst).

Für die statistische Berechnung der Ergebnisse der genomweiten parametrischen Kopplungsanalyse ist eine sichere Diagnosestellung für ein definitives PS obligat. Je nachdem, wie viele Personen in einer Familie erkrankt sind und an welcher „Position“ des Stammbaums sich diese Personen befinden, verändert sich das Ergebnis des *LOD scores*.

Das Stellen einer sicheren klinischen Diagnose ist jedoch besonders schwierig bei einer Erkrankung, deren Symptome erst im höheren Lebensalter auftreten und einen schleichenden Verlauf zeigen mit einer subtilen Ausprägung zu Beginn der symptomatischen Phase und einem sich erst über die Jahre ausprägenden Vollbild. Erschwerend kommt hinzu, dass das PS der Familie SP kein einheitliches Krankheitsbild zeigt, sondern sowohl in Bezug auf das Ansprechen auf Levodopa als auch in Hinblick auf die neben der Akinese und dem Rigor bestehenden Begleitsymptome betroffener Personen Unterschiede aufweist. Es ist deshalb mitunter schwierig, einzelne Symptome dem familiären PS zuzurechnen bzw. diese als von der Erkrankung unabhängige Symptome zu bewerten.

Da eine Parkinsonsymptomatik auch durch exogene Einflüsse wie bspw. durch Pestizide, Einnahme spezifischer Medikamente (u. a. Neuroleptika, Amphetamine) oder entzündliche Erkrankungen hervorgerufen werden kann, müssen in der Anamnese insbesondere diese Faktoren erfragt und ausgeschlossen werden. Ist die Anamnese in Bezug auf diese Umstände positiv, stellt sich wiederum die Frage, wie diese Einflussgrößen in Bezug auf die Entwicklung des PS bewertet werden müssen.

Sind sie der Auslöser für die Erkrankung und handelt es sich somit um ein symptomatisches PS oder spielen sie für die Krankheitsentstehung keine Rolle, da die Dauer und somit die Folgen der Exposition für die Entwicklung der PS-Symptomatik zu vernachlässigen sind?

Aufgrund dieser Problematik wird die Person mit der Diagnose eines „möglichen“ PS (L-2906) in der statistischen Berechnung nicht mit dem Status „erkrankt“ bewertet, da diese Person neben der lediglich leichten Ausprägung der Symptome (posturaler Tremor, leichte Hypomimie, milde Bradydiadochokinese, leichte posturale Instabilität) eine positive Anamnese in Bezug auf die Exposition mit Pflanzenschutzmitteln und übermäßigen Alkoholgebrauch hat. Um eine Verfälschung des *LOD scores* durch eine mögliche Fehldiagnose dieser Person zu verhindern, wird sie daher in der statistischen Berechnung nicht als informative, d. h. erkrankte Person gewertet.

Des Weiteren wird auf die abschließende Beurteilung der Familienmitglieder der vierten und fünften Generation verzichtet, da diese zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung das mittlere Erkrankungsalter noch nicht erreicht hatten. Symptome, die im Rahmen der klinischen Untersuchung bei diesen Personen beobachtet wurden und welche ggf. auch im Rahmen eines PS auftreten können, dürfen bei diesen Personen nicht voreilig einer PS-Genese zugerechnet werden. Diese Personen sollten vielmehr den unbekannten Status beibehalten und im weiteren Verlauf wiederholt klinisch in Bezug auf sich entwickelnde PS-typische Merkmale untersucht werden.

4.2.2. Die molekulargenetische Methodik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine genomweite Kopplungsanalyse mit anschließender Feinkartierung und Segregationsanalyse durchgeführt, um die genetische Ursache des PS bei der Familie SP zu identifizieren. Diese Verfahren haben sich für die Identifizierung einer krankheitsauslösenden Mutation in einer Vielzahl vorangegangener Arbeiten bewährt (Lander und Kruglyak, 1995; Sandford *et al.*, 1996; Kong und Cox, 1997; Cagnoli *et al.*, 2006).

Die Kopplungsanalyse wurde unter Anwendung von 423 *STR*-Markern durchgeführt. Wie bereits eingangs erwähnt wird heutzutage eine derartige Analyse mittels *SNPs* automatisiert realisiert. Dieses Verfahren war jedoch zum Zeitpunkt der Genotypisierung der Familie SP noch nicht gut etabliert und sehr kostenintensiv. Die Kopplungsanalyse mittels *STR*-Marker hingegen war in der Sektion für Klinische und

Molekulare Neurogenetik ein häufig angewandtes Verfahren. Neben den benötigten Geräten, war auch ein großer Teil der verwendeten *STR*-Marker in der Sektion für Klinische und Molekulare Neurogenetik oder im Institut für Humangenetik vorhanden und war in vorangegangenen Versuchen auf ihre Funktionsfähigkeit, auf die optimale Bindungstemperatur sowie auf ihren Informationsgehalt hin getestet worden.

Des Weiteren war bei der Familie SP eine große koppelnde Region erwartet worden, da die an einem PS erkrankten Familienmitglieder im Stammbaum nah beieinander lagen. Für die Identifizierung größerer Regionen bieten sich *STR*-Marker aufgrund ihrer Vielgestaltigkeit und ihrer Verteilung über dem gesamten Genom sehr gut an.

Die Berechnung des *LOD scores* als Maß eignet sich sehr gut, um die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung zwischen einem Genort und einer Erkrankung auszudrücken. Allerdings muss die zu untersuchende Personenzahl bei der Festlegung des Schwellenwertes, ab welchem eine Kopplung mit einer Region wahrscheinlich ist, berücksichtigt werden (siehe auch Abschnitt 2.3.2.1). Für die statistische Berechnung der Ergebnisse der untersuchten Familie SP, in welcher nur sechs Familienmitglieder informativ für die Berechnung sind (definitiv und wahrscheinlich Betroffene), wurden zwei Kriterien festgelegt, die bei Vorliegen eines der beiden Kriterien eine nähere Analyse der Region nach sich zogen. So wurden sowohl Regionen, die einen *Singlepoint LOD score* $> 0,5$ bei zwei benachbarten Markern sowie einen *Multipoint LOD score* $> 0,5$ in der selbigen Region aufwiesen als interessant angesehen (Kriterium a) als auch Regionen, die eine *Multipoint LOD score* > 1 aufwiesen (Kriterium b). Indem die Grenze noch unter die errechneten Schwelle von 1,8 gesenkt wurde, konnte sichergestellt werden, dass auch kleine, möglicherweise koppelnde Regionen, die in dem Genomscan nur durch einen Marker abgedeckt wurden, ebenfalls in der Auswertung erfasst wurden und im Folgenden in der Feinkartierung durch weitere Marker analysiert werden konnten. Die statistisch berechneten Werte des Genomscans und der Feinkartierung sollten stets, wie auch in dieser Arbeit erfolgt, durch die Segregationsanalyse bestätigt werden.

4.3. Das Chromosom 7, die Kandidatenregion und die -gene

Durch die genetische Analyse der DNA von 13 bzw. 25 Familienmitgliedern konnte mittels genomweiter Kopplungsanalyse und Feinkartierung eine Chromosomenregion mit einer Größe von ca. 10,7 Mb auf Chromosom 7 eingegrenzt werden, die eine Kopplung zum PS der Familie zeigt. Der maximale *Singlepoint LOD score* in dieser Region liegt bei 1,40, der maximale *Multipoint LOD score* bei 1,99. Im Vergleich mit den *LOD score* Werten anderer Regionen sind diese *scores* zwar nicht die höchsten, durch die Segregationsanalyse konnte jedoch diese Region als einzige durch die Identifikation eines gemeinsamen Haplotyps bei allen definitiv, wahrscheinlich und möglich betroffenen Personen bestätigt werden. Der Haplotyp wurde darüber hinaus auch in der vierten Generation bei zwei asymptomatischen Personen nachgewiesen (L-3150, L-3156).

Wie bereits erwähnt, darf das Auftreten eines Haplotyps, der von allen betroffenen Personen geteilt wird, bei (bisher) nicht-betroffenen Personen nicht zwangsläufig als Ausschlusskriterium gewertet werden. Da das PS in der Familie SP ein spätes Erkrankungsalter zeigt (mittleres Erkrankungsalter: 63,2 +/-6,4 Jahre), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die asymptomatischen Personen, die zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung das 50. Lebensjahr noch nicht erreicht hatten, im weiteren Verlauf PS-typische Symptome entwickeln werden.

Andererseits wäre es auch möglich, dass aufgrund des Prinzips der reduzierten Penetranz der Haplotyp bei diesen Personen nicht den Phänotyp bestimmt und diese Familienmitglieder auch im späteren Leben keine PS-typischen Symptome entwickeln werden.

4.3.1. Das Chromosom 7

Die durch die Feinkartierung eingegrenzte Region ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert. Dieses Chromosom wurde 2003 nach den Chromosomen 14, 21, und 22 als viertes Chromosom und erstes metazentrisches Chromosom zu 99,4 % sequenziert (Hillier *et al.*, 2003). Bisher wurden 1150 Gene sowie 941 Pseudo-Gene, d. h. nicht funktionsfähige bzw. abgeschaltete Gene, auf diesem Autosom identifiziert. Darüber hinaus bestehen 8,2 % des Chromosoms aus duplizierten Sequenzen, sog. *Duplicons*. Diese stellen Chromosomenabschnitte dar, die eine über 90 %-ige Sequenzhomologie mit anderen Segmenten zeigen (Bailey *et al.*, 2002).

Durch Rekombination können *Duplicons* zu Translokationen, Deletionen oder Inversionen führen (Ji *et al.*, 2000; Marques-Bonet *et al.*, 2009).

Bisher konnte noch kein Gen auf Chromosom 7 identifiziert werden, welches mit der Entstehung eines PS assoziiert wird. Allerdings konnte eine andere Bewegungsstörung mit einem Gen des Chromosom 7 in Verbindung gebracht werden: Mutationen im *SGCE*- (*sarcoglycan, epsilon*-) Gen (7q21) können die sog. Myoklonus-Dystonie auslösen, eine Bewegungsstörung, deren Symptomatik typischerweise durch Alkohol gebessert wird (Klein *et al.*, 2000; Zimprich *et al.*, 2001; Koukouni *et al.*, 2008; Nardocci, 2011). Das Gen, welches für Epsilon-Sarkoglykan kodiert, kann durch eine Genveränderung Ursache für diese autosomal-dominant vererbte Erkrankung sein, die gekennzeichnet ist durch zum Teil Stimulus-sensitive Myoklonien in Arm-, Hals- und Rückenmuskulatur. Die betroffenen Personen zeigen häufig neben den motorischen Symptomen, die meistens bereits in der frühen Kindheit auftreten, auch psychiatrische Auffälligkeiten wie Panikattacken, Zwangsstörungen und chronischen Alkohol-Abusus - letzteres vermutlich bedingt durch die Symptombesserung unter Alkoholeinfluss (Nardocci, 2011).

4.3.2. Die Kandidatenregion und die fünf Kandidatengene

Die identifizierte Kandidatenregion auf Chromosom 7 hat eine Größe von ca. 10,7 Mb und schloss zum Zeitpunkt der Sequenzierung 91 Gene ein. Bei 13 der 91 Gene handelt es sich um sog. Homeobox-Gene (*HOX*-Gene), die für Transkriptionsfaktoren kodieren und eine wichtige Rolle während der Morphogenese spielen, da sie die Expression funktionell zusammenhängender Gene induzieren können (Löffler *et al.*, 2001). *HOX*-Gene sind in Clustern auf vier verschiedenen Chromosomen angeordnet: *HOXA* auf Chromosom 7, *HOXB* auf Chromosom 17, *HOXC* auf Chromosom 12 und *HOXD* auf Chromosom 2. Anhand molekulargenetischer Versuche an der Taufliege *Drosophila melanogaster* konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen in diesen Genen zu schweren Missbildungen, bspw. Ausbildung von Beinen anstatt Antennen, führen können oder letal für den Organismus sind (Löffler *et al.*, 2001). Beim Menschen konnten Mutationen in *HOX*-Genen ebenfalls mit Malformationen der Extremitäten in Verbindung gebracht werden. So führen bspw. Mutationen im *HOXD13*-Gen zur Synpolydaktylie (Mundlos und Olsen, 1997) und Veränderungen im *HOXA13*-Gen

zum Hand-Fuß-Genital-Syndrom, welches mit Malformationen der Hände und Füße sowie des Urogenitaltraktes einhergeht (Mortlock und Innes, 1997; Goodman, 2002). Das Gencluster *HOXA* auf Chromosom 7 wurde bei der Auswahl der Kandidatengene ausgeschlossen, da aufgrund der bereits bekannten Auswirkungen einer Mutation in einem *HOX*-Gen eine Verbindung zu einem spät einsetzenden PS zunächst als unwahrscheinlich angenommen werden kann.

Des Weiteren finden sich in dieser Region 24 Gene, welche bioinformatisch aufgrund von Konsensus-Sequenzen und Homologien vorhergesagt sind, deren genaue Struktur jedoch noch nicht bestätigt ist. Diese Gene werden lediglich als *LOC*-Gene (*LocusLinked-Genes*) bezeichnet und wurden ebenfalls nicht bei der Sequenzierung berücksichtigt.

Nach Ausschluss der *HOX*- und *LOC*-Gene wurden aus den verbliebenen 55 Genen fünf für die Sequenzierung ausgewählt, deren Funktionsverlust mit der bisher bekannten Pathophysiologie des PS in Verbindung gebracht werden könnte. Die Auswahl dieser Kandidatengene - *ABCB5*, *IL6*, *STK31*, *CYC5* und *CREB5* - orientierte sich dabei an den Proteinfunktionen, -lokalisationen oder den beteiligten pathogenetischen Prozessen der bereits bekannten PS-assoziierten Gene *PARK1-16*. Die ausgewählten Gene werden im Folgenden in ihrer Funktion näher beschrieben und die mögliche Korrelation mit der Pathophysiologie des PS aufgezeigt.

ABCB5: ATP-binding cassette B5

Wie bereits erwähnt kodiert *ABCB5* für ein Protein, welches zur Superfamilie aktiver Transporter mit einer ATP-bindenden Untereinheit gehört (*ABC ATP-binding cassette*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). *ABCs* fungieren als Energieabhängige Effluxpumpen, die Moleküle unterschiedlicher Größen aus einer Zelle ausschleusen können (Frank *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). Des Weiteren spielen die Proteine dieser Familie eine Rolle beim physiologischen intrazellulären Transport sowie bei der Differenzierung und dem Überleben von Zellen. In letztgenannter Funktion ist *ABCB5*, welches in verschiedenen Isoformen u. a. in humanen epidermalen Melanozyten, retinalem Pigmentepithel, Melanomzellen und Hodengewebe exprimiert wird (Chen *et al.*, 2009; Moitra *et al.*, 2011), in diesen Zellen an der Regulation des Membranpotentials beteiligt und steuert sowohl die Zellfusion, das -wachstum und die -differenzierung (Frank *et al.*, 2005).

Darüber hinaus gehört *ABCB5* neben *ABCB1*, welches auch als *MDR1* bezeichnet wird, *ABCB4* und *ABCB11* zu der Subfamilie der P-Glykoproteine - ATP-abhängige Medikamenten-Efflux-Transporter. Ähnlich wie das strukturell verwandte *ABCB1* schleust auch *ABCB5* fluoreszierendes Rhodamine-123 und das Chemotherapeutikum Doxorubicin aus Zellen aus (Frank *et al.*, 2005; Moitra *et al.*, 2011). Durch diesen Mechanismus kann eine gewisse zelluläre Resistenz gegenüber bestimmten Medikamenten (sog. *Multidrug resistance (MDR)*) vermittelt werden, die für *ABCB1* bereits nachgewiesen wurde (Ambudkar *et al.*, 2003; Takara *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009).

Ferner konnten zum einen Westerlund *et al.* eine Assoziation eines SNPs im *ABCB1*-Gen mit der Entstehung eines PS aufzeigen (Westerlund *et al.*, 2009). Zum anderen belegen retrospektiven Studien, dass pestizid-exponierte Personen, die zusätzlich eine Veränderung im *ABCB1/MDR1*-Gen tragen, ein höheres Risiko für die Entwicklung eines PS aufweisen, als Personen ohne genetische Veränderung (Drożdżik *et al.*, 2003; Zschiedrich *et al.*, 2009). Aufgrund dieser möglichen Assoziation zwischen der Entstehung eines PS und der genetischen Veränderung im *ABCB1*-Gen wurde das strukturell ähnliche *ABCB5*-Gen als eines der Kandidatengene für die anschließende Sequenzierung ausgewählt.

IL6: Interleukin 6

Das Genprodukt von *Interleukin 6 (IL6)* ist ein Zytokin, welches eine wichtige regulierende Rolle bei Entzündungsreaktionen des Körpers spielt. Es wird zusammen mit IL-1 von Makrophagen im Rahmen einer Entzündung ausgeschüttet, induziert Fieber und stimuliert u. a. die Synthese von Akutephase-Proteinen in der Leber (Hof und Dörries, 2005).

Im Rahmen der Pathogenese eines PS werden Entzündungsreaktionen als zusätzlich schädigender Faktor diskutiert. So konnten neben erhöhten IL-1- und IL-6-Spiegeln im Liquor von PS-Patienten (Blum-Degen *et al.*, 1995) auch aktivierte Mikrogliazellen (Makrophagen-ähnliche Gliazellen, die proinflammatorische und potentiell neurotoxische Substanzen wie Zytokine und Caspasen freisetzen) sowohl *in vitro* in PS-Modellen als auch *in vivo* u. a. in der SN, im Putamen und Hippocampus verstorbener PS-Patienten nachgewiesen werden (McGeer *et al.*, 1988; Imamura *et al.*, 2003; Bartels und Leenders, 2007; Hirsch und Hunot, 2009). Dabei wird die Aktivierung von Entzündungszellen vornehmlich als Reaktion auf eine

vorangegangene neuronale Schädigung bspw. durch eine vorübergehende Toxin- oder Pestizidexposition oder eine virale oder bakterielle Infektionen angesehen (Tansey und Goldberg, 2010). So konnte bspw. im Zusammenhang mit der Exposition ggb. dem Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) nachgewiesen werden, dass die Neuronendegeneration, die initial durch das Toxin induziert wurde, auch in Abwesenheit des Toxins weiter voranschreitet. Die im Striatum von verstorbenen PS-Patienten nachgewiesenen Mikrogliazellen könnten dabei ein Hinweis darauf sein, dass die Entzündungsreaktion, die durch die Toxinexposition und die initiale Neuronendegeneration induziert wurde, den Zelluntergang im Folgenden weiter unterhält (Wilms *et al.*, 2007).

Ein weiterer Aspekt, der eine mögliche Korrelation zwischen einer Neuroinflammation und der Entstehung eines PS aufzeigt, ist die Beobachtung, dass *Parkin*-defiziente Mäuse, die einem Entzündungsreiz ausgesetzt wurden, eine vermehrte Degeneration dopaminerger Zellen aufwiesen (Frank-Cannon *et al.*, 2008). In diesem Kontext könnte auch eine Sequenzvariation in dem für das Protein IL-6 kodierenden Gen die Entstehung des PS bei der Familie SP erklären.

Ob die Einnahme antientzündlicher Medikamente, wie bspw. nicht-steroidaler Antirheumatika (NSAR), einen, wie von Chen *et al.* aufgezeigt protektiven Effekt auf die Entstehung eines PS hat (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005), wird zur Zeit allerdings kontrovers diskutiert (Samii *et al.*, 2009; Tansey und Goldberg, 2010).

STK31: Serin/Threonin-Kinase31

Ähnlich wie die bereits erwähnten PS-assoziierten Gene *LRRK2* und *PINK1*, kodiert das *STK31*-Gen ebenfalls für eine Kinase (Serin/Threonin-Kinase31). Diese Kinase wird im Hodengewebe, genauer im Zytoplasma von Spermatogonien exprimiert (Wang *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte *STK31*-mRNA jedoch auch in fetalem Hirngewebe nachgewiesen werden (Yokoe *et al.*, 2008).

Wie eingangs erwähnt werden die Genprodukte von *LRRK2* und *PINK1* ebenfalls im Hirngewebe exprimiert. *LRRK2* kodiert für eine zytoplasmatische Proteinkinase - *LRRK2* oder *Dardarin* genannt -, welche eine Autophosphorylierungsaktivität besitzt, die durch einige Genmutationen erhöht wird und zu neuronaler Degeneration führt (West *et al.*, 2005). Das Genprodukt von *PINK1*, eine mitochondriale Proteinkinase, welche ähnlich wie *STK31* eine Serin/Threonin-Proteinkinase-Domäne beinhaltet, verändert, vermutlich durch Phosphorylierung bestimmter mitochondrialer Proteine,

deren Funktion und übt somit einen neuroprotektiven Effekt auf die Zelle aus (Silvestri *et al.*, 2005; Sim *et al.*, 2006). Veränderungen im *PINK1*-Gen bewirken hingegen eine Reduktion der Proteinaktivität, die zu morphologischen Veränderungen von Mitochondrien und zur Apoptose gonadaler Zellen und Muskelzellen führt. In manchen Studien konnte des Weiteren ein Verlust dopaminerger Zellen nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2006).

Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit der Serin/Threonin-Kinase31 wurde das zugehörige Gen für die Sequenzierung ausgewählt.

CYC_s: Cytochrom c, somatic

CYC_s kodiert für das somatische Cytochrom c, welches als Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette als Elektronentransporter von Komplex III zu Komplex IV fungiert (Berg *et al.*, 2010; Abbildung 4.3.). Mitochondrien spielen jedoch nicht nur bei der oxidativen Phosphorylierung eine wichtige Rolle, sondern stellen auch eine wichtige zelluläre Quelle für freie Radikale dar und können bspw. durch die Freisetzung von Cytochrom c den Zelltod induzieren (Pfeiffer, 2004; Łabedzka *et al.*, 2006).

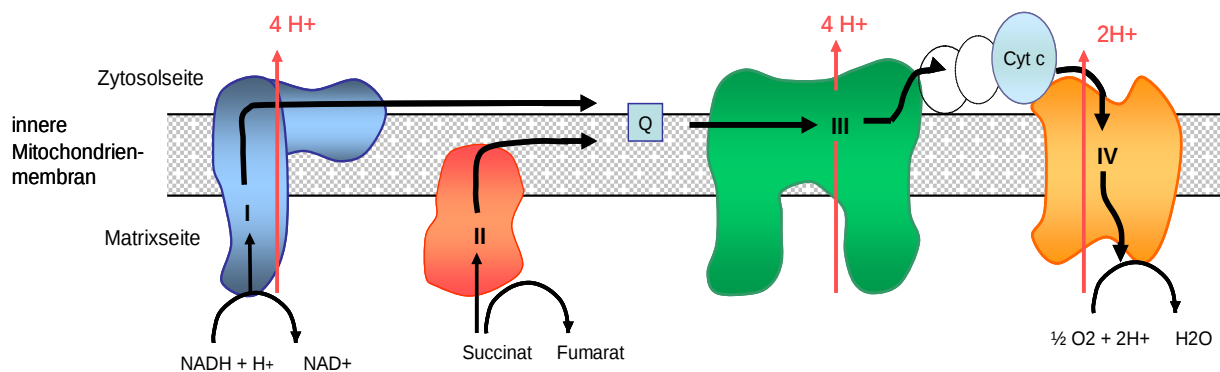


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. Q Ubichinon/Ubichinol. Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) übertragen jeweils zwei Elektronen auf Ubichinon, welches zu Ubichinol reduziert wird. Komplex III (Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase) überträgt die Elektronen vom Ubichinol auf Cytochrom c. Im Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) wird Cytochrom c oxidiert und die Elektronen auf den Sauerstoff übertragen, welcher zusammen mit vier Protonen zu zwei Wassermolekülen reduziert wird.

Eine mitochondriale Dysfunktion wird seit langem als pathogenetischer Baustein bei der Entstehung eines PS diskutiert (Schapira, 2007; Schapira und Jenner, 2011). Das bereits angesprochene Neurotoxin MPTP wird im aktiven Zustand zu 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP⁺), welches zum einen den Komplex I der Atmungskette

inhibiert und zum anderen als Substrat des Dopamintransporters fungiert (Langston *et al.*, 1983; Nicklas *et al.*, 1985).

Durch Inhibierung des Komplex I wird die Atmungskette unterbrochen, so dass ATP nicht mehr, dafür aber freie Radikale vermehrt gebildet werden können. Beide Mechanismen führen zu zunehmendem oxidativen Stress und zur Zellschädigung. Auch das Insektizid Rotenon ist als Hemmer des Komplex I bekannt. Dieser Wirkstoff konnte zwar beim Menschen noch nicht in Verbindung mit der Entstehung eines PS gebracht werden, jedoch bei Ratten ein PS mit *Lewy bodies* induzieren (Betarbet *et al.*, 2000; Greenamyre *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011). Für andere toxische Substanzen wie Kohlenmonoxid, welches den Komplex IV der Atmungskette inhibiert und Mangan, konnte wiederum auch beim Menschen eine Assoziation mit der Entstehung eines sekundären PS bestätigt werden (Ceballos-Baumann, 2006).

Auch Mutationen in den PS-assoziierten Genen *DJ-1* und *PINK1* führen zu einer mitochondrialen Dysfunktion, zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen und zu einer daraus induzierten Zellapoptose. Es ist somit anzunehmen, dass eine mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress eine primäre Rolle in der Pathogenese des PS spielen (Bonifati *et al.*, 2003; Valente *et al.*, 2004; Büeler, 2009; Grünewald *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang könnte auch eine Funktionseinschränkung des Cytochrom c, resultierend aus einer Mutation in dem Gen *CYC*s, bei der Entstehung eines PS eine Rolle spielen.

CREB5: (cAMP response element) binding 5

CREB5 kodiert für ein Protein der *cAMP response element binding* Proteinfamilie. Mitglieder dieser Familie enthalten sog. *Basic Leucine Zipper*-Domänen (*bZIP*), welche sich durch eine C-terminale DNA-Bindungsdomäne und einen, wie der Name bereits impliziert, *Leucine Zipper*, einen Transkriptionsfaktor, auszeichnen. Darüber hinaus ist den Mitgliedern der *CREB*-Familie eine spezifische Zinkfingerdomäne im Protein gemein, welche vornehmlich an eine sog. *cAMP response element-* (*CRE-*) Sequenz eines Gens bindet. Durch die Bindung an diese spezifische Nukleotid-Sequenz in der Promotor-Region eines Gens wird die Transkription desselben verstärkt (Löffler *et al.*, 2001; Lonze und Ginty, 2002). Insbesondere die Transkription von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird durch die Proteine der *CREB*-Familie aktiviert. Diese transmembranären Rezeptoren dienen vor allem der intrazellulären Transduktion von Signalen, die durch Bindung von hydrophilen Hormonen (bspw.

Dopamin, Adenosin, Histamin, Serotonin) an den Rezeptor ausgelöst werden (Levitzki, 1986; Shaywitz und Greenberg, 1999). *CREB*-Proteine sind eng mit den strukturell sehr ähnlichen *cAMP response element modulatory proteins (CREMs)* und den *activating transcription factors 1 (ATF-1)* verbunden, welche ebenfalls als Transkriptionsfaktoren fungieren.

Verschiedene Studien, welche die Auswirkungen der Inhibierung der *CREB*-Proteine untersuchten, konnten zeigen, dass die Mitglieder dieser Familie wichtig für das Überleben von Neuronen sind. Dabei scheint der alleinige Verlust des *CREB*-Gens lediglich die Wahrscheinlichkeit des Überlebens von Neuronen zu reduzieren, jedoch für sich nicht zum Absterben von Neuronen zu führen. Versuche an Mäusen hingegen, denen sowohl das *CREB*- als auch das *CREM*-Gen fehlte, zeigten eine erhöhte perinatale Sterblichkeit und eine ausgeprägte neuronale Degeneration. *CREM*-null Mäuse, welchen postnatal das *CREB*-Gen ausgeschaltet wurde, zeigten vornehmlich eine Degeneration im Cortex, Hippocampus und Striatum, wobei sich die größte Ausprägung im Erwachsenenalter zeigte (Mantamadiotis *et al.*, 2002; Lemberger *et al.*, 2008).

Für das PS-assoziierte Gen *Parkin*, welches als E3-Ubiquitinligase abzubauen Proteine für die Degradation markiert, konnte ebenfalls eine Funktion als Transkriptionsfaktor, der bspw. die Expression des Tumorsuppressorgens p53 inhibiert, nachgewiesen werden (da Costa *et al.*, 2009). Eine Mutation im *Parkin*-Gen führt somit nicht nur zur Akkumulation von zum Teil toxischen Substraten, sondern bedingt auch eine vermehrte p53-Aktivität in Zellen. p53 wird physiologischerweise bei Vorliegen von DNA-Schäden vermehrt in Zellen angehäuft. Es induziert dabei das Anhalten des Zellzyklus, um Reparaturen an der DNA zu ermöglichen. Wird hingegen p53 in zu starkem Maße akkumuliert, wie bspw. bei Vorliegen einer *Parkin*-Mutation, aktiviert p53 Gene, die den Zelluntergang einleiten.

Die an Mäusen durchgeführten Studien weisen auf eine Verbindung zwischen dem *CREB*-Gen und der Integrität des ZNS hin. Welche Rolle Mutationen in diesem Gen beim Menschen spielen, wurde bisher noch nicht beschrieben. Es wäre jedoch denkbar, dass eine funktionsverändernde Mutation im *CREB*-Gen, ähnlich wie eine *Parkin*-Mutation, auch beim Menschen das Überleben von Neuronen inhibiert und möglicherweise auch die Degeneration von Neuronen induzieren könnte.

4.3.3. Beurteilung der Auswahl der Kandidatengene und der Sequenzierungsmethodik

Für alle fünf Kandidatengene konnte eine (theoretische) Verbindung zu den bekannten Pathomechanismen des PS gezogen werden. Die Auswahl dieser fünf Gene aus den 91 Genen in der Region ist somit gerechtfertigt.

Die Sequenzierung der Kandidatengene erfolgte zunächst anhand von DNA-Proben von zwei definitiv betroffenen Personen, was ausreichend ist, da das Studienmodell darauf basiert, dass alle betroffenen Personen die gleiche Mutation aufweisen. Eine genetische Veränderung, die lediglich bei einer Person auftritt, könnte somit als krankheitsauslösende Ursache ausgeschlossen werden. Zeigen beide Personen wiederum dieselbe Mutation, so würden im Folgenden auch die anderen betroffenen Personen auf diese Mutation hin getestet werden. Somit dient die DNA der einen Person stets auch als Kontrolle der anderen. Durch dieses Verfahren wird insofern nicht nur die Wahrscheinlichkeit, eine genetische Veränderung zu übersehen reduziert, sondern auch der Arbeitsaufwand erheblich verringert, ohne dass die Aussagekraft des Ergebnisses vermindert wird.

Durch die Sequenzierung der fünf ausgewählten Kandidatengene konnte keine Sequenzveränderung identifiziert werden, die bei beiden definitiv betroffenen Personen vorkam und bisher nicht als benigne DNA-Veränderung beschrieben wurde. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das PS der Familie SP auf einer Mutation im *ABCB5*-, *IL6*-, *STK31*-, *CYCs*- oder *CREB5*-Gen beruht.

Durch die vorliegende Arbeit wurde eine bisher nicht beschriebene Kandidatenregion, die eine Kopplung mit einem familiären PS zeigt, identifiziert und eingegrenzt. Darüber hinaus konnten pathogenetische Veränderungen in fünf Genen, die sich innerhalb der identifizierten Region befanden, als Ursache für das PS ausgeschlossen werden. Diese identifizierte Kandidatenregion bietet eine seltene Möglichkeit, eine bisher nicht bekannte pathogenetische Genveränderung zu identifizieren und dadurch ggf. einen neuen pathophysiologischen Aspekt des PS aufzudecken.

5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die Entstehung des PS wurde lange Zeit fast ausschließlich auf verschiedene Umwelteinflüsse zurückgeführt. Mit der Identifizierung von PS-verursachenden Veränderungen im SNCA-Gen im Jahr 1997 erfuhr die Erforschung des genetischen Hintergrundes des PS jedoch einen Aufschwung und so konnten seither 11 weitere monogene PS-Formen identifiziert werden. Diese monogenen Formen erklären zwar nur einen geringen Teil der auftretenden PS (2-3 %), sie ermöglichen es jedoch, Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der Erkrankung zu ziehen.

Das PS der Familie SP bietet die seltene Gelegenheit, eine weitere, bisher nicht beschriebene monogene Ursache für die Entstehung eines PS zu identifizieren und so die Kenntnisse zur Pathophysiologie einer der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen zu erweitern.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Familie SP unter Anwendung verschiedener molekulargenetischer Verfahren untersucht und dem PS der Familie eine mit der Erkrankung koppelnde Region auf einem Chromosom zugeordnet. Die dem PS zugrunde liegende genetische Mutation konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht identifiziert werden.

Folgende Erkenntnisse wurden zur Beantwortung der Fragestellung gewonnen:

- I. Bei dem PS der Familie SP handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung. Das PS dieser Familie zeichnet sich im Gegensatz zu den meisten bekannten monogenen Formen durch ein spätes Erkrankungsalter aus.
- II. Mittels der genomweiten Kopplungsanalyse war es möglich, eine Region auf Chromosom 7 zu identifizieren, die eine Kopplung zum PS der Familie SP zeigt. Der maximale *Singlepoint LOD score* in dieser Region liegt bei 1,40, der maximale *Multipoint LOD score* bei 1,99. Durch die Feinkartierung konnte die Kandidatenregion auf ca. 11 Mb eingegrenzt werden.
- III. Mittels Segregationsanalyse wurde ein gemeinsamer Haplotyp detektiert, den alle betroffenen Personen und zwei gesunde Nachkommen

miteinander teilen. Zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung waren diese zwei Nachkommen allerdings erst 40 bzw. 45 Jahre alt und hatten das durchschnittliche Erkrankungsalter des PS der Familie SP noch nicht erreicht.

- IV. Von den 91 Genen, die sich in der Kandidatenregion auf Chromosom 7 befinden, wurden fünf Kandidatengene ausgewählt - *ABCB5*, *IL6*, *STK31*, *CYC5* und *CREB5* -, deren Funktion mit der bisher bekannten Pathophysiologie des PS in Verbindung gebracht werden kann. Bei der Sequenzierung dieser Kandidatengene konnte jedoch keine genetische Veränderung nachgewiesen werden, die für das PS der Familie SP ursächlich ist.

Die Ergebnisse der genomweiten Kopplungsanalyse, der Feinkartierung und der Segregationsanalyse der Familie SP legen nahe, dass die genetische Ursache für das PS der Familie in der durch diese Arbeit eingegrenzten Region auf dem Chromosom 7 zu suchen ist. In einem folgenden Schritt wird die neu verfügbare Methode des *next-generation sequencing* angewandt, um die gesamte koppelnde Region auf Chromosom 7 nach einer Chip-basierten Anreicherung komplett zu sequenzieren.

Durch die Kenntnis der von einer Mutation betroffenen Gene kann die geänderte Funktion des mutierten Gens in biologischen Modellen nachempfunden und seine Rolle in der Krankheitsentstehung identifiziert werden. So kann nicht nur ein Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie des PS geleistet, sondern es könnten auch neue therapeutische Ansätze, die im Gegensatz zur heutigen symptomatischen Therapie evtl. die Ursache der Neuronendegeneration behandeln könnten, entwickelt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Parkinson-Syndrom (PS) ist durch die Kardinalsymptome Akinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität gekennzeichnet. Es ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, die ca. 3 % der über 85-Jährigen in Europa betrifft. Die PS-typischen Symptome beruhen auf einer frühzeitigen und übermäßigen Degeneration dopaminergischer Neurone im zentralen Nervensystem (v. a. in der *Substantia nigra*). Die Ursache hierfür ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Ein geringer Prozentsatz der PS kann auf monogene Veränderungen, d. h. in einzelnen Genen befindliche Mutationen, zurückgeführt werden. So konnten in den letzten 13 Jahren zehn Gene und ein Genlocus identifiziert werden, deren Veränderungen mit der Entstehung eines familiären PS in Zusammenhang gebracht werden konnten. Diese monogenen Formen sind zwar selten, liefern aber wichtige Informationen zum Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine deutschstämmige Familie molekulargenetisch untersucht, in welcher mehrere Personen an einem klassischen PS mit spätem Erkrankungsbeginn und zusätzlichen psychiatrischen Symptomen erkrankt sind. Es konnten ein fünf Generationen umfassender Stammbaum erstellt und 25 Personen aus der dritten bis fünften Generation rekrutiert werden. Da eine Veränderung in den bekannten PS-assoziierten Genen als Ursache für das familiäre PS in Vorarbeiten ausgeschlossen werden konnte, wurde eine genomweite parametrische Kopplungsanalyse bei 13 Familienmitgliedern mit *short tandem repeat-* (STR-) Markern durchgeführt. In einem weiteren Schritt wurden Regionen, die in der statistischen Berechnung einen erhöhten *LOD score* zeigten, durch eine Feinkartierung und eine Segregationsanalyse unter Einschluss aller 25 Personen näher untersucht. Abschließend wurde anhand der DNA von zwei definitiv betroffenen Personen eine Sequenzanalyse von Kandidatengenen durchgeführt, um den Hintergrund des PS der Familie SP zu identifizieren.

Die statistischen Ergebnisse der genomweiten Kopplungsanalyse lieferten in 13 Regionen auf zehn verschiedenen Chromosomen *Single-* und *Multipoint LOD score*-Werte $> 0,5$ oder *Multipoint LOD scores* > 1 (Chromosom 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 16, 17 und 22). Diese Regionen wurden in einer anschließenden Feinkartierung und Segregationsanalyse mit zusätzlichen Markern näher untersucht und auf einen gemeinsamen Haplotypen, den alle erkrankten Personen teilen, hin analysiert. Durch

diese Verfahren konnte eine Kopplung in zwölf der 13 Regionen mit dem PS ausgeschlossen werden, da sich kein gemeinsamer Haplotyp bei allen betroffenen Personen nachweisen ließ. Lediglich für die Region auf Chromosom 7 konnte ein gleicher Haplotyp bei allen betroffenen Personen sowie bei zwei jüngeren Personen der nachgeschalteten Generation, die zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung (noch) keine PS-assoziierten Symptome aufwiesen, identifiziert werden.

Die Kandidatenregion, welche zwischen den *STR*-Markern D7S2551 und D7S2496 liegt und ca. 11 Mb umspannt, beinhaltet 91 Gene, von denen fünf - *ABCB5*, *IL6*, *STK31*, *CYC5* und *CREB5* - für die Sequenzanalyse ausgewählt wurden. Durch die Sequenzanalyse konnten insgesamt 23 genetische Variationen in den Genen *ABCB5*, *STK31* und *CREB5* identifiziert werden. Keine der Veränderungen kann jedoch als pathogene Mutation angesehen werden, da es sich entweder um bekannte Polymorphismen handelt ($n = 20$) oder die Sequenzvariation auf Proteinebene zu keinem Aminosäureaustausch führte ($n = 3$). So konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels verschiedener molekulargenetischer Verfahren dem PS der Familie eine Kandidatenregion auf einem Chromosom zugeordnet werden. Da die genaue krankheitsauslösende Veränderung bisher jedoch nicht identifiziert werden konnte, wird die Kandidatenregion unter Anwendung neuester Sequenzierungsverfahren in sich anschließenden Untersuchungen weiter analysiert werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abou-Sleiman PM, Muqit MM, McDonald NQ, Yang YX, Ghandi S, Healy DG, *et al.* A heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson's disease? *Ann Neurol* 2006; 60: 414-419
- Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZW, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; 22: 7468-7485
- Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, *et al.* Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 2002; 297: 1003-1007
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, *et al.* Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006; 442: 916-919
- Barone P, Antonini A, Colosimo C, Marconi R, Morgante L, Avarello TP, *et al.* The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009; 24: 1641-1649
- Bartels AL, Leenders KL. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease: evidence from animal models to human in vivo studies with [11C]-PK11195 PET. *Mov Disord* 2007; 22: 1852-1856
- Behrens MI, Brüggemann N, Chana P, Venegas P, Kägi M, Parrao T, *et al.* Clinical spectrum of Kufor-Rakeb syndrome in the Chilean kindred with ATP13A2 mutations. *Mov Disord* 2010; 25: 1929-1937
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Stryer Biochemie. 6. Aufl., *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, 2010; 560-587 und 874-911
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 1973; 20: 415-455
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 3: 1301-1306
- Birkmayer W, Hornykiewicz O. Der L-3,4-Dioxyphenylalanin (DOPA)-Effekt bei der Parkinson-Akinese. *Wien Klin Wochenschr* 1961; 73: 787-788
- Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluids of Alzheimer's

- patients and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995; 202: 17-20
- Bonifati V, Rizzu P, Van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299: 256-259
- Boonstra TA, van der Kooji H, Munneke M, Bloem BR. Gait disorder and balance disturbances in Parkinson's disease: clinical update and pathophysiology. *Curr Opin Neurol* 2008; 21: 461-471
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 197-211
- Brüggemann N, Külper W, Hagenah J, Bauer P, Pattaro C, Tadic V, et al. Autosomal dominant Parkinson's disease in a large German pedigree. *Acta Neurol Scand* 2011; [Epub ahead of print]
- Büeler H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2009; 218: 235-246
- Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, Seri M, Brussino A, Michielotto C, et al. SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* 2006; 129: 235-242
- Ceballos-Baumann AO. Das Idiopathische Parkinson-Syndrom. In: Berlitz Klinische Neurologie. 2. Aufl., Springer, Heidelberg, 2006; 852-871
- Charcot J-M. Leçon du Mardi à la Salpêtrière 1887-1888 (leçon 9). Paris. Bureaux du Progrès Médical, 1887
- Charcot J-M. Leçon du Mardi à la Salpêtrière 1887-1888 (leçon 22). Paris. Bureaux du Progrès Médical, 1887
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364: 1167-1169
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH, National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2006; 5: 235-245
- Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Schwarzschild MA, Willett WC, Colditz GA, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2003; 60: 1059-1064

- Chen H, Jacobs E, Schwarzschild MA, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, *et al.* Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk of Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 2005; 59: 988–989
- Chen KG, Valencia JC, Gillet JP, Hearing VJ, Gottesman MM. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009; 22: 740-749
- Comella CL. Sleep disorders in Parkinson's disease: an overview. *Mov Disord* 2007; 22: 367-373
- Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 29-52
- Cookson MR, Bandmann O. Parkinson's disease: insights from pathways. *Hum Mol Genet* 2010; 19: R21-R27
- Cookson MR, Xiomerisiou G, Singleton A. How genetics research in Parkinson's disease is enhancing understanding of the common idiopathic forms of the disease. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 706-711
- da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, West A, Corti O, Brice A, *et al.* Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 1370-1375
- Crossmann AR. Functional anatomy of movement disorders. *J Anat* 2000; 196: 519-525
- Cruts M, Gijssels I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, *et al.* Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 2006; 442: 920-924
- Daiger SP. Was the Human Genome Project worth the effort? *Science* 2005; 308: 362-364
- Davison C. Pallido-pyramidal disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1954; 13: 50-59
- Defazio G, Berardelli A, Fabbrini G, Martino D, Fincati E, Fiaschi A, *et al.* Pain as a nonmotor symptom of Parkinson Disease. *Arch Neurol* 2008; 65: 1191-1194
- Djarmati A, Hagenah J, Reetz K, Winkler S, Behrens MI, Pawlack H, *et al.* ATP13A2 variants in early-onset Parkinson's disease patients and controls. *Mov Disord* 2009; 24: 2104-2111
- DNA Sequencing Manual. Global Edition IR² System. LI-COR 1999

- Drożdżik M, Białecka M, Myśliwiec K, Honczarenko K, Stankiewicz J, Sych Z. Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 259-263
- Dumanchin C, Camuzat A, Campion D, Verpillat P, Hannequin D, Dubois B, *et al.* Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1825-1829
- Ehringer H, Hornykiewicz O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des Extrapyramidalen Systems. *Klin Wochenschr* 1960; 38: 1236-1239
- Erro ME, Moreno MP, Zandio B. Pathophysiological bases of the non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Rev Neurol*. 2010; 50 Suppl 2: S7-13
- Farrer M, Chan P, Chen R, Tan L, Lincoln S, Hernandez D, *et al.* Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* 2001; 50: 293-300
- Farrer MJ, Hulihan MM, Kachergus JM, Dachsel JC, Stoessl AJ, Grantier LL, *et al.* DCTN1 mutations in Perry syndrome. *Nat Genet* 2009; 41: 163-165
- Di Fonzo A, Chein HF, Socal M, Giraudo S, Tassorelli C, Iliceto G, *et al.* ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 2007; 68: 1557-1562
- Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L, *et al.* FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 2009; 72: 240-245
- Frank NY, Pendse SS, Lapchak PH, Margaryan A, Shlain D, Doeing C, *et al.* Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* 2003; 278: 47156-47165
- Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, *et al.* ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2005; 65: 4320-4333
- Frank-Cannon TC, Tran T, Ruhn KA, Martinez TN, Hing J, Marvin M, *et al.* Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. *J Neurosci* 2008; 28: 10825-10834

- Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J, Munz M, Larsson EM, Schüle B, *et al.* Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology* 2007; 68: 916-922
- Gaig C, Tolosa E. When does Parkinson's disease begin? *Mov Disord* 2009; 24 Suppl.2: S656-664
- Galter D, Westerlung M, Carmine A, Lindqvist E, Sydow O, Olson L. LRRK2 expression linked to dopamine-innervated areas. *Ann Neurol* 2006; 59: 714-719
- Garrod AE. The Incidence of Alkaptonuria: A Study in chemical individuality. *Lancet* 1902; 2: 1616-1620
- Garrod AE. Inborn Errors in Metabolism: The Croonian Lectures delivered before the Royal College of Physicians of London in June 1908. *Frowde, Hodder & Stoughton*, London, 1923
- Gasser T. Genetik des Parkinson Syndroms. *Arch Neurol Psychiatr* 2000; 151; 146-149
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Relative microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988; 38: 1285-1291
- Gerlach M, Reichmann H, Riederer P. Die Parkinson-Krankheit: Grundlagen, Klinik, Therapie. 4. Aufl., *Springer*, Wien, 2007; 24-31
- Ghandi S, Muquit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, *et al.* PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 2006; 129: 1720-1731
- 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
- Goldwurm S, Zini M, Di Fonzo A, De Gaspari D, Siri C, Simons EJ, *et al.* LRRK2 G2019S mutation and Parkinson's disease: a clinical, neuropsychological and neuropsychiatric study in a large Italian sample. *Parkinsonism Relat Disord* 2006; 12: 410-419
- Gómez-Esteban JC, Tijero B, Somme J, Ciordia R, Berganzo K, Rouco I, *et al.* Impact of psychiatric symptoms and sleep disorders on the quality of life of patients with Parkinson's disease. *J Neurol* 2011; 258: 494-499

- Goodman FR. Limb malformations and the human HOX genes. *Am J Med Genet* 2002; 112: 256-265
- Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino PG. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 141-142
- Grimm T. Formale Genetik. In: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E. Taschenlehrbuch Humangenetik. 7. Aufl., Thieme, Stuttgart, 2006; 237-276
- Grimm T. Kopplungsanalyse und Genkartierung. In: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E. Taschenlehrbuch Humangenetik. 7. Aufl., Thieme, Stuttgart, 2006; 342-370
- Grünewald A, Gegg ME, Taanman JW, King RH, Kock N, Klein C, *et al.* Differential effects of PINK1 nonsense and missense mutations on mitochondrial function and morphology. *Exp Neurol* 2009; 219: 266-273
- 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: 2059-2075
- Hatano T, Kubo S, Sato S, Hattori N. Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2009; 111: 1075-1093
- Healy DG, Abou-Sleiman PM, Casas JP, Ahmadi KR, Lynch T, Gandhi S, *et al.* UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 2006; 59: 627-633.
- Hedrich K, Djarmati A, Schäfer N, Hering R, Wellenbrock C, Weiss PH, *et al.* DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2004; 62: 389-394
- Hedrich K, Eskelson C, Wilmot B, Marder K, Harris J, Garrels J, *et al.* Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies. *Mov Disord* 2004; 19: 1146-1157
- Hedrich K, Winkler S, Hagenah J, Kabakci K, Kasten M, Schwinger E, *et al.* Recurrent LRRK2 (Park8) mutations in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21: 1506-1510
- Hedrich K, Hagenah J, Djarmati A, Hiller A, Lohnau T, Lasek K, *et al.* Clinical spectrum of homozygous and heterozygous PINK1 mutations in a large German family with Parkinson disease. *Arch Neurol* 2006; 63: 833-838

- Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Neurology* 2008; 4: 600-609
- Hillier LW, Fulton RS, Fulton LA, Graves TA, Pepin KH, Wagner-McPherson C, *et al.* The DNA sequence of human chromosome 7. *Nature* 2003; 424: 157-164
- Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 2009; 8: 382-397
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; 17: 427-442
- Hof H, Dörries R. Mechanismen der angeborenen und der erworbenen Immunität. In: Hof H, Dörries R. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 3. Aufl., *Thieme*, Stuttgart, 2005; 103-104
- Holinski-Feder E. Mutationen beim Menschen und ihre Folgen. In: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E. Taschenlehrbuch Humangenetik. 7. Aufl., *Thieme*, Stuttgart, 2006; 40-79
- Holliday R. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genet Res* 1961; 2: 231-248
- Huang J, Xiong N, Chen C, Xiong J, Jia M, Zhang Z, *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: activity inhibition and protein overexpression in rotenone models for Parkinson's disease. *Neuroscience* 2011; 192: 598-608
- Hutter CM, Samii A, Factor SA, Nutt JG, Higgins DS, Bird TD, *et al.* Lack of evidence for an association between UCHL1 S18Y and Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2008; 15: 13413-13419
- Ibáñez P, Lesage S, Lohmann E, Thobois S, De Michele G, French Parkinson's disease Genetics Study Group, *et al.* Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. *Brain* 2006; 129: 686-694
- Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 2003; 106: 518-526
- International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-945

- Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD. Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res* 2000; 10: 597-610
- Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 2010; 345: 91-104
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605-608
- Klein C, Grünewald A, Hedrich K. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotype, and phenotypes. *Neurology* 2006; 66: 1129-1130
- 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: 652-662
- Klein C, Lohmann-Hedrich K. Impact of recent findings in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2007; 20: 453-464
- Klein C, Schilling K, Saunders-Pullman RJ, Garrels J, Breakefield XO, Brin MF, *et al.* A major locus for myoclonus-dystonia maps to chromosom 7q in eight families. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1314-1319
- Klein C, Schlossmacher MG. The genetics of Parkinson's disease: implications for neurological care. *Nature Clinical Practice* 2006; 2: 136-146
- Kong A, Cox NJ. Allele-Sharing Models: LOD Scores and Accurate Linkage Tests. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1179-1188
- Koukouni V, Valente EM, Cordivari C, Bhatia KP, Quinn NP. Unusual familial presentation of epsilon-sarcoglycan gene mutation with falls and writer's cramp. *Mov Disord* 2008; 23: 1913-1915
- Krüger R, Müller T, Riess O. Involvement of α -synuclein in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *J Neural Transm* 2000; 107: 31-40
- Łabedzka K, Grzanka A, Izdebska M. Mitochondria and cell death. *Postepy Hig Med Dosw* 2006; 60: 439-446
- Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature genetics* 1995; 11: 241-247
- Langston JW, Ballard P, Tetrad JW, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-980

- Lemberger T, Parkitna JR, Chai M, Schütz G, Engblom D. CREB has a context-dependent role in activity-regulated transcription and maintains neuronal cholesterol homeostasis. *FASEB J* 2008; 22: 2872-2879
- Lemke MR. Depressive symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2008; 15: 21-25
- Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 2009; 18(R1): R48-59
- Lesage S, Dürr A, Tazir M, Lohmann E, Leutenegger AL, Janin S, et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med* 2006; 354: 422-423
- Levitzki A. Beta-adrenergic receptors and their mode of coupling to adenylate cyclase. *Physiol Rev* 1986; 66: 819-854
- Lill CM, Bertram L. Online-Datenbanken und systemische Metaanalysen komplex-genetischer Erkrankungen. *Megen* 2010; 22: 235-241
- Liou AK, Leak RK, Li L, Zigmond MJ. Wild-type LRRK2 but not its mutant attenuates stress-induced cell death via ERK pathway. *Neurobiol Dis* 2008; 32: 116-124
- Löhle M, Storch A, Reichmann H. Beyond tremor and rigidity: non-motor features of Parkinsons' disease. *J Neural Transm* 2009; 116: 1483-1492
- Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, Wood NW, De Michele G, Bonnet AM, et al. How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol* 2003; 54: 176-185
- Lohmann-Hedrich K, Brüggemann N, Hagenah J, Klein C. Das Parkinson-Syndrom und seine genetischen Ursachen - eine Standortbestimmung. *Akt Neurol* 2007; 34: 151-161
- Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factor in the nervous system. *Neuron* 2002; 35: 605-623
- Löffler G. Transkription und posttranskriptionale Prozessierung der RNA.; Endokrine Gewebe I: Grundlagen der endokrinen Regulation von Lebensvorgängen. In: Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. 6. Aufl., Springer, Heidelberg, 2001; 254-255 und 775-776
- Louis ED. The shaking palsy, the first forty-five years: a journey through the British literature. *Mov Disord* 1997; 12: 1068-1072

- Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, *et al.* Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 2000; 342: 1560-1567
- Malkus KA, Tsika E, Ischiropoulos H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. *Mol Neurodegener* 2009; 4: 24
- Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, *et al.* Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet* 2002; 31: 47-54
- Marques-Bonet T, Girirajan S, Eichler EE. The origins and impact of primate segmental duplicons. *Trends Genet* 2009; 25: 443-454
- Menza M, Dobkin RD, Marin H, Mark MH, Gara M, Bienfait K, *et al.* The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics* 2010; 51: 474-479
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215
- Moitra K, Scally M, McGee K, Lancaster G, Gold B, Dean M. Molecular evolutionary analysis of ABCB5: the ancestral gene is a full transporter with potentially deleterious single nucleotide polymorphisms. *PLoS One* 2011; 6: e16318
- Morgan NV, Westway SK, Mortin JEV, Gregory A, Gissen P, Sonek S, *et al.* PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. *Nat Genet* 2006; 38: 752-754
- Morgan TH. Sex-limited inheritance in *Drosophila*. *Science* 1910; 32: 120-122
- Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T, *et al.* Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 1998; 51: 890-892
- Mortlock DP, Innis JW. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nat Genet* 1997; 15: 179-180
- Müller B, Larsen JP, Wentzel-Larsen T, Skeie GO, Tysnes OB; for The Parkwest Study Group. Autonomic and sensory symptoms and signs in incident, untreated Parkinson's disease: Frequent but mild. *Mov Disord* 2011; 26: 65-72
- Mundlos S, Olsen BR. Heritable diseases of the skeleton. *FASEB J* 1997; 11: 125-132

- Najim al-Din AS, Wriekat A, Mubaidin A, Dasouki M, Hiari M. Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurol Scand* 1994; 89: 347-352
- Nardocci N. Myoclonus-dystonia syndrome. *Handb Clin Neurol* 2011; 100: 563-575
- Nicklas WJ, Vygus I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 1985; 36: 2501-2508
- Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M, *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2006; 354: 424-425
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Sinón J, van der Brug M, *et al.* Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44: 595-600
- Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW, *et al.* Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 2009; 65: 19-23
- Pankratz N, Pauciulo MW, Elsaesser VE, Marek DK, Halter CA, Wojcieszek J, *et al.* Mutations in DJ-1 are rare in familial Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2006; 408: 209-213
- Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P. Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 2015-2024
- Park A, Stacy M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *J Neurol* 2009; 256 Suppl. 3: 293-298
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. *Whittingham and Rowland*, London, 1817
- Pfeiffer U. Zell- und Gewebeschäden. In: Roessner A, Pfeiffer U, Müller-Hermeling HK. *Grundmann Allgemeine Pathologie*. 10. Aufl., *Urban & Fischer*; München, 2004; 32-34
- Poewe W, Antonini A, Zijlmans JCM, Burkhard PR, Vingerhoets F. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. *Clin Interv Aging* 2010; 5: 229-238

- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047
- Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, Scaravilli F, Eskelson C, Pepivani I, *et al.* Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann Neurol* 2005; 58: 411-422
- Quinn N, Critchley P, Marsden CD. Young onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 1987; 2: 73-91
- Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, *et al.* Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38: 1184-1191
- Riedel O, Heuser I, Klotsche J, Dodel R, Wittchen HU; GEPAD Study Group. Occurrence risk and structure of depression in Parkinson disease with and without dementia: results from the GEPAD Study. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010; 23: 27-34
- de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, *et al.* Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000; 54: 21-23
- Rondorf K. Monogene Parkinson-Syndrome: Lokalisation einer genetischen Ursache und Mutationsanalyse. Bachelorarbeit im Rahmen des Studiengangs „Molecular Life Science“. Lübeck, 2008
- Ross OA, Soto AI, Vilariño-Güell C, Heckman MG, Diehl NN, Hulihan MM, *et al.* Genetic variation of Omi/HtrA2 and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2008; 14: 539-543
- Sandford A, Weir T, Paré P. The genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1749-1765
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467
- Sanyal J, Chakraborty DP, Sarkar B, Banerjee TK, Mukherjee SC, Ray BC, *et al.* Environmental and familial risk factors of Parkinson's disease: case-control study. *Can J Neurol Sci* 2010; 37: 637-642

- Sasaki S, Shirata A, Yamane K, Iwata M. Parkin-positive autosomal recessive juvenile Parkinsonism with alpha-synuclein-positive inclusions. *Neurology* 2004; 63:678-682
- Schapira AH. Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1472-1478
- Schapira AH. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1261-1266
- Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011; 26: 1049-1055
- Schneider SA, Klein C. *PINK1* Type of Young-Onset Parkinson Disease. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K. *GeneReviews* Seattle: University of Washington, Seattle; 1993-2010
- Schulz JB. Update on the pathogenesis of Parkinson's Disease. *J Neurol* 2008; 255 Suppl. 5: 3-7
- Schulz-Schaeffer WJ. The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol* 2010; 120: 131-143
- Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 821-861
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25: 302-305
- Shojaee S, Sina F, Banihoseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi GA, et al. Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 1375-1384
- Siefker CE. Echogenität der Substantia nigra im transkraniellen Ultraschall bei Senioren und Parkinson-Patienten: Korrelation mit klinischen Befunden und epidemiologischen Daten. Med. Diss. Tübingen, 2006
- Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorin L, Dallapiccola B, Valente EM, et al. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3477-3492
- Sim CH, Lio DSS, Mok SS, Masters CL, Hill AF, Culvenor JG, et al. C-terminal truncation and Parkinson's disease-associated mutations down-regulate the

- protein serine/threonine kinase activity of PTEN-induced kinase-1. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 3251-3262
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841
- Smith CAB. The detection of linkage in human genetics. *JR Statist Soc* 1953; 15B: 153-184
- Steinlechner S, Stahlberg J, Völkel B, Djarmati A, Hagenah J, Hiller A, et al. Co-occurrence of affective and schizophrenia spectrum disorders with PINK1 mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 532-535
- Storch A, Gregor O. Extrapyramidale Bewegungsstörungen. In: Klingelhöfer J, Berthele A. *Klinikleitfaden Neurologie*. 4. Aufl., Urban & Fischer, München, 2009; 649-668
- Strachan T, Read AP. Molekulare Humangenetik. 3. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, München, 2005; 45-51
- Takara K, Sakaeda T, Okumura K: An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 273-286
- Tan EK, Skipper LM. Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Hum Mutat* 2007; 28: 641-653
- Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 510-518
- Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2007; 16: R183-194
- Tolosa E, Gaig C, Santamaría J, Compta Y. Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. *Neurology* 2009; 72: S12-20
- Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Hasegawa K, Yoshino H, Kubo S, et al. Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries. *Mov Disord* 2006; 21: 1102-1108
- Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Bohl JR, Braak H. Where does Parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 413-426
- Truong DD, Bhidayasiri R, Wolters E. Management of non-motor symptoms in advanced Parkinson disease. *J Neurol Sci* 2008; 266: 216-228

- Underwood JCE. General and systematic pathology. *Churchill Livingstone* 2004; 4. Aufl.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304: 1158-1160
- Vekrellis K, Rideau HJ, Stefanis L. Neurobiology of α -synuclein. *Mol Neurobiol* 2004; 30: 1-21
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, *et al.* The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351
- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* 2001; 27: 422-426
- West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, Ross CA, *et al.* Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16842-16847
- Westerlund M, Belin AC, Anvret A, Håkansson A, Nissbrandt H, Lind C, *et al.* Association of a polymorphism in the ABCB1 gene with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15: 422-424
- Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. Inflammation in Parkinson's disease and other neurodegenerative disease: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 1925-1928
- Xiromerisiou G, Dardiotis E, Tsimourto V, Kountra PM, Paterakis KN, Kapsalaki EZ, *et al.* Genetic basis of Parkinson disease. *Nervosurg Focus* 2010; 28: E7
- Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang JW, *et al.* Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 10793-10798
- Yokoe T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Ohmachi T, Kusunoki M, *et al.* Efficient identification of a novel cancer/testis antigen for immunotherapy using three-step microarray analysis. *Cancer Res* 2008; 68: 1074-1082
- Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N, Ogaki K, Li Y, Funayama M, *et al.* Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. *Neurology* 2010; 75: 1356-1361

- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, *et al.* Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44: 601-607
- Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, *et al.* Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nat Genet* 2001; 29: 66-69
- Zschiedrich K, König IR, Brüggemann N, Kock N, Kasten M, Leenders KL, *et al.* MDR1 variants and risk of Parkinson disease. Association with pesticide exposure? *J Neurol* 2009; 256: 115-120

Verwendete Internetseiten

Kompetenznetz-Parkinson, 2011

<http://www.kompetenznetz-parkinson.de/Parkinson/leitdiagnostik.html>

(Tag des letzten Zugriffs: 18. 6. 2011)

Marshfield Clinic Research Foundation

<http://www.research.marshfieldclinic.org>

(Tag des letzten Zugriffs: 12. 2. 2010)

National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

(Tag des letzten Zugriffs: 25. 12. 2011)

8. ANHANG

8.1. Abkürzungsverzeichnis

A	-	Adenin
Abb.	-	Abbildung
ABCB5	-	<i>ATP-binding cassette B5</i>
Anm. d. A.	-	Anmerkung des Autors
APS	-	Ammoniumpersulfat
AS	-	Aminosäure
Bp	-	Basenpaar
bspw.	-	beispielsweise
bzw.	-	beziehungsweise
°C	-	Grad Celsius
C	-	Cytosin
cDNA	-	<i>complementary DNA</i>
CEPH	-	<i>Centre pour l'Etude des Polymorphismes Humaines</i>
Chr.	-	Chromosom
cM	-	Centimorgan
CREB5	-	<i>cAMP response element binding 5</i>
CT	-	Computertomographie
CYCs	-	<i>Cytochrom c, somatic</i>
ddNTP	-	Didesoxynukleotide
ddATP	-	Didesoxy-Adenosintri-phosphat
ddCTP	-	Didesoxy-Cytosintri-phosphat
ddGTP	-	Didesoxy-Guanosintri-phosphat
ddTTP	-	Didesoxy-Thymidintri-phosphat
dH ₂ O	-	destilliertes Wasser
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	-	Desoxynukleotide
dATP	-	Desoxy-Adenosintri-phosphat
dCTP	-	Desoxy-Cytosintri-phosphat
dGTP	-	Desoxy-Guanosintri-phosphat
dTTP	-	Desoxy-Thymidintri-phosphat
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	-	<i>et alii, et alliae</i> (und andere)
EtBr	-	Ethydiumbromid
EtOH	-	Ethanol
G	-	Guanosin
g	-	Gramm
ggf.	-	gegebenenfalls
HPLC	-	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
Hz	-	Hertz (1/sek)
IL6	-	Interleukin 6
IPS	-	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
k	-	Kilo
LOD	-	<i>logarithm of the odds</i>
LRRK2	-	<i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
M	-	molar
max.	-	maximal
Mb	-	Megabasen
ml	-	Milliliter
mRNA	-	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
Mpt LOD score	-	<i>Multipoint LOD score</i>
MPTP	-	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MRT	-	Magnetresonanztomographie
n	-	nano (10 ⁻⁹)
n. bek.	-	nicht bekannt

n. u.	-	nicht untersucht
NaAc	-	Natrium-Acetat
OMIM	-	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p	-	kurzer Arm eines Chromosoms
PAGE	-	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	-	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	-	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PINK1	-	<i>phosphatase and tensin homolog (PTEN) induced putative kinase 1</i>
PLA2G6	-	<i>phospholipase A2, group VI</i>
PS	-	Parkinson-Syndrom
q	-	langer Arm eines Chromosoms
REM	-	<i>rapid eye movement</i>
RNA	-	Ribonukleinsäure
RT	-	Raumtemperatur
s	-	Sekunde
SNCA	-	<i>α-Synuclein</i>
SN	-	<i>Substantia nigra</i>
SNc	-	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SNr	-	<i>Substantia nigra pars reticularis</i>
SNP	-	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzel-Nukleotid-Polymorphismus)
sog.	-	sogenannt
Spt LOD score	-	<i>Singlepoint LOD score</i>
STK31	-	<i>serine/threonine kinase 31</i>
STR-Marker	-	<i>short tandem repeat</i> -Marker
T	-	Thymin
Tab.	-	Tabelle
Taq	-	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	-	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
Tris	-	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	-	unter anderem
UpM	-	Umdrehungen pro Minute
UCHL1	-	<i>Ubiquitin C-terminal hydrolase L1</i>
usw.	-	und so weiter
μ	-	mikro- (10^{-6})
v. a.	-	vor allem
Vol.	-	Volumen
z. B.	-	zum Beispiel
ZNS	-	zentrales Nervensystem

8.2. Schriftprobe der Person I.2

Die Akinese ist ein typisches PS-Symptom, welches, sofern die dominante Seite betroffen ist, auch anhand der Handschrift erkrankter Personen nachweisbar ist. Diese wird im Krankheitsverlauf zumeist kleiner, zitteriger und undeutlicher.

Von dem bereits verstorbenen Familiengründer I.2 konnten lediglich fremdanamnestiche Daten bezüglich des Vorliegens eines PS erhoben werden (siehe auch 2.1.1). Der Sektion für Klinische und Molekulare Neurogenetik liegen jedoch Schriftproben dieser Person vor, die die Mikrographie, Ausdruck der PS-typischen Akinese dokumentieren und die fremdanamnestiche Angaben zu einer PS-Erkrankung der Person unterstreichen. Abbildung 8.1 zeigt einen Ausschnitt einer dieser Schriftproben.

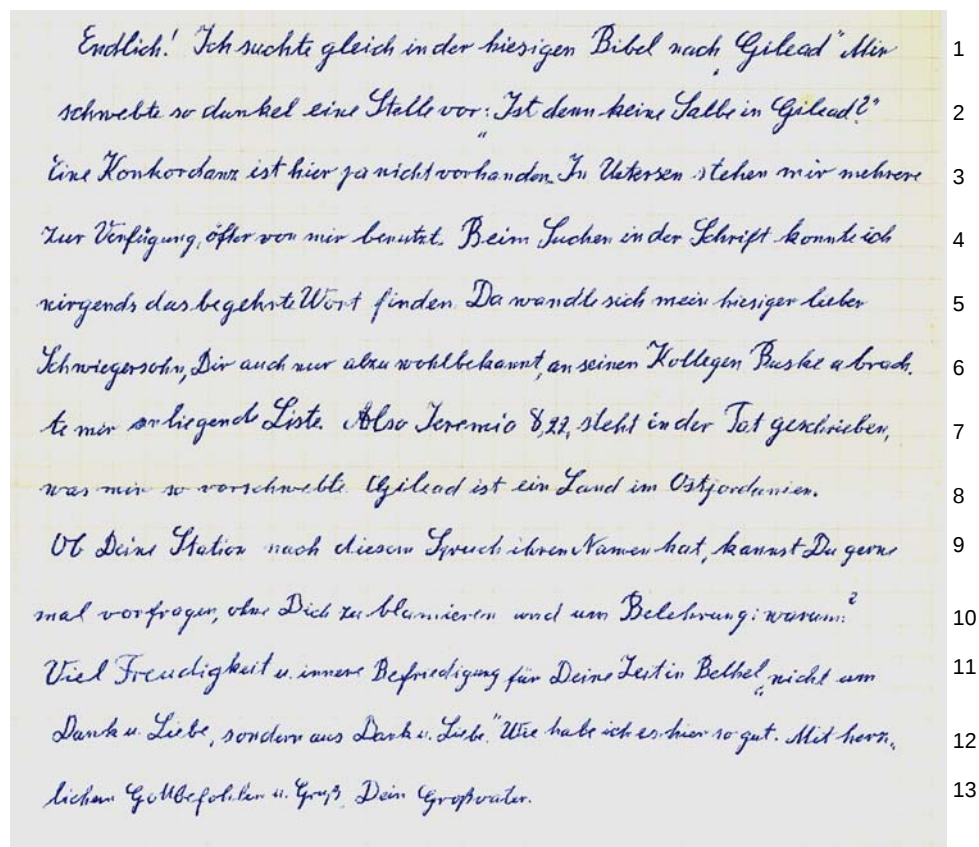


Abb. 8.1: Schriftprobe der verstorbenen Person I.2 vom Mai 1959. Die Zeilen wurden nachträglich durchnummeriert. Zu Beginn der Schriftprobe ist die Schrift deutlich lesbar. In Zeile 3 beginnt sie stetig kleiner und undeutlicher zu werden, bis in Zeile 4 mit einem größeren Schriftbild neu angesetzt wird. Auch in den Zeilen 5, 7, 9 und 11 wird der Schreibfluss durch ein neues Ansetzen unterbrochen, da die Schrift im Verlauf stetig kleiner wird, bis sie schließlich nur noch schlecht lesbar ist.

8.3. Erläuterung angewandter Tests

Einige der Test wurden bereits unter 2.1.2 erläutert, sind aber der Vollständigkeit halber an dieser Stelle nochmals aufgeführt.

8.3.1. UK Parkinson's Disease Brain Bank Diagnostic Criteria

Die *UK Parkinson's Disease Brain Bank Diagnostic Criteria* (Gibb und Lees, 1988) wurden, mit der Ausnahme, dass eine positive Familienanamnese nicht als Ausschlusskriterium galt, angewandt, um die Diagnose eines definitiven PS bei den Familienmitgliedern zu stellen. Die folgenden Kriterien sind dem englischen Originaltext entnommen.

Step 1. Diagnosis of PARKINSONIAN SYNDROME.

BRADYKINESIA (...). And at least one of the following:

- a. muscular rigidity
- b. 4-6 Hz rest tremor
- c. postural instability not caused by primary visual, vestibular, cerebellar or proprioceptive dysfunction

Step 2. Exclusion criteria for Parkinson's disease.

- history of repeated strokes with stepwise progression of Parkinsonian features
- history of repeated head injury
- history of definite encephalitis
- ocylogyric crisis
- neuroleptic treatment at onset of symptoms
- more than one affected relative
- sustained remission
- strictly unilateral features after three years
- supranuclear gaze palsy
- cerebellar signs
- early severe autonomic involvement
- early severe dementia with disturbances of memory, language and praxis
- Babinski sign
- presence of a cerebral tumor or communicating hydrocephalus on CT scan

- negative response to a large doses of levodopa (if malabsorption excluded)
- MPTP exposure

Step 3. Supportive prospective positive criteria for PARKINSON'S DISEASE.

Three or more required for diagnosis of definite Parkinson's disease

- unilateral onset
- rest tremor present
- progressive disorder
- persistent asymmetry affecting the side of onset most excellent response (70-100 %) to levodopa
- severe levodopa-induced chorea
- levodopa response for 5 years or more
- clinical course of 10 years or more

8.3.2. Tests zur Beurteilung der Erkrankungsschwere

Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)

Abschnitt I: kognitive Funktionen, Verhalten und Stimmung (0-16 Punkte)

Abschnitt II: Aktivitäten des täglichen Lebens (0-52 Punkte)

Abschnitt III: Motorische Untersuchung (0-108 Punkte)

Abschnitt IV: Komplikationen der Behandlung

A. Dyskinesien (0-13 Punkte)

B. Klinische Fluktuationen (0-7 Punkte)

C. Anderweitige Komplikationen (0-3 Punkte)

In den einzelnen Abschnitten werden unterschiedliche Funktionen mit jeweils 0-4 bzw. 0-2 Punkten bewertet. Je höher die Punktzahl, desto stärker der Betroffenheitsstatus.

Hoehn and Yahr Rating-Skala

Stadium 0 keine Anzeichen der Erkrankung

Stadium 1 einseitige Erkrankung

Stadium 1,5 einseitige und axiale Beteiligung

Stadium 2 beidseitige Erkrankung ohne Gleichgewichtsstörung

Stadium 2,5 leichte beidseitige Erkrankung mit Ausgleich bei Retropulsionstest

Stadium 3 leichte bis mäßige beidseitige Erkrankung: leichte Haltungsinstabilität; körperlich unabhängig

Stadium 4 starke Behinderung; kann aber ohne Hilfe laufen oder stehen

Stadium 5 im Rollstuhl sitzend oder bettlägerig

(modifiziert nach Hoehn und Yahr, 1967)

8.3.3. Tests zur Einschätzung der kognitiven Fähigkeiten

Montreal Cognitive Assessment (MoCA-Test)

Dieser Test umfasst die kognitiven Bereiche Konzentration, Gedächtnis, Aufmerksamkeit, Exekutivfunktionen, Sprache, visokonstruktive Fähigkeiten, konzeptuelles Denken, Rechnen und Orientierung.

Höchstpunktzahl: 30 Punkte

normale kognitive Leistung: $\geq 26/30$ Punkte

Mini-Mental-Status-Test (MMST)

Dieser Test überprüft ähnlich wie der MoCA-Test kognitive Funktionen, wie zeitliche und räumliche Orientierung, Merk- und Erinnerungsfähigkeit, Aufmerksamkeit, Sprache und Rechnen. Darüber hinaus werden das Sprachverständnis, Lesen, Schreiben und Zeichnen bewertet.

Höchstpunktzahl: 30 Punkte

normale kognitive Leistung: 28-30 Punkte

wahrsch. Vorliegen kognitiver Einschränkungen: $< 25/30$ Punkte

wahrsch. Vorliegen ausgeprägter kognitiver Einschränkungen: $< 18/30$ Punkte

8.3.4. Tests zur Erfassung von Frühsymptomen

University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT)

0-5 Punkte wahrscheinliche Simulation

6-18 Punkte totale Anosmie

19-25 Punkte starke Mikrosmie

26-30 Punkte mäßige Mikrosmie

31-34 Punkte schwache Mikrosmie

35-40 Punkte Normosmie

Der Test ist nicht anzuwenden bei Jungen < 15 Jahren und Mädchen < 10 Jahren.

FM 100 Hue Color Vision Test

„überdurchschnittliche“ Farbdiskriminierung: ≤ 16 Fehlerpunkte

„durchschnittliche“ Farbdiskriminierung: 17-100 Fehlerpunkte

„schlechte“ Farbdiskriminierung: > 100 Fehlerpunkte

Die prinzipielle Farbdiskriminierung ist unabhängig von Farbfehlsichtigkeit.

8.4. Ergebnisse der klinischen Untersuchung aller in die genetische Analyse einbezogener Familienmitglieder

In den folgenden Tabellen (Tabelle 8.1a und 8.1b) sind die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen und aller angewandter Tests der untersuchten Familienmitglieder zusammengestellt.

Tabelle 8.1a: Ergebnisse aller definitiv, wahrscheinlich und möglich betroffener Personen

	L-123	L-973	L-2811	L-2812	L-2928	L-2905	L-2906
Geschlecht	weiblich	männlich	männlich	männlich	männlich	männlich	männlich
Alter bei klin. Untersuchung	76, † 2008	78	74	71	61	65	57
Diagnosemodalität	definitiv	definitiv	definitiv	definitiv	definitiv	wahrscheinlich	möglich
Symptomstatus	sympt.	sympt.	sympt.	sympt.	sympt.	asympt.	asympt.
UPDRS I (max. 16 Pkt.)	n. u.	n. u.	4	0	2	1	n. u.
UPDRS II (max. 52 Pkt.)	n. u.	n. u.	11	2	4	2	n. u.
UPDRS III (max. 108 Pkt.)	>60	64	25	10	34	9	28
UPDRS IV (max. 23 Pkt.)	n. u.	n. u.	0	0	0	n. u.	n. u.
Hoehn and Yahr- Skala	5	5	3	1,5	2,5	n. u.	n. u.
UPSIT	n. u.	anamn. Anosmie seit > 40 Jahren	4	13	22	n. u.	n. u.
MoCA	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	23	n. u.	n. u.
MMST	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	27	n. u.	n. u.
FM 100	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	184 (S)	n. u.	n. u.
Videoaufnahme	+	+	+	+	+	+	+

UPDRS I-IV Unified Parkinson's Disease Rating Scale I-IV, UPSIT University of Pennsylvania Smell Identification Test, MoCA Montreal Cognitive Assessment, MMST Mini Mental Status Test, Spalte FM 100 FM 100 Hue Color Vision Test: S schlechte Farbdiskriminierung; Spalte Videoaufnahme: + Videoaufnahme vorhanden, - keine Videoaufnahme vorhanden

Tabelle 8.1b: Ergebnisse aller Familienmitglieder mit einem unbekannten, asymptomatischen Status

	L-2870	L-2871	L-3007	L-3017	L-3018	L-3021	L-3126	L-3127	L-3128	L-3129	L-3130	L-3149	L-3150	L-3155	L-3156	L-3157	L-3158	L-3195
Geschlecht	w	w	m	m	w	m	m	w	w	w	w	m	m	m	w	m	m	w
Alter bei klin. Untersuchung	68	71	68	78	76	45	49	15	11	39	47	18	45	49	40	46	42	29
UPDRS I (max. 16 Pkt.)	0	1	0	0	0	2	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	1	0	0	2	0	0	0
UPDRS II (max. 52 Pkt.)	1	4	0	0	0	0	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	0	0	0	1	0	1	0
UPDRS III (max. 108 Pkt.)	0	9	4	0	2	7	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	0	1	0	1	0	0	3
UPDRS IV (max. 23 Pkt.)	0	n. u.	0	0	0	0	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	0	0	0	0	0	0	0
Hoehn and Yahr- Skala	n. u.	*	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
UPSIT	34	35	29	38	32	34	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	35	28	32	34	31	31	21 [†]
MoCA	n. u.	n. u.	27	25	23	30	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	29	28	30	31	29	30	19/27**
MMST	n. u.	n. u.	30	30	29	29	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	30	30	30	30	30	30	24/25 **
FM 100	8 (Ü)	68 (D)	64 (D)	72 (D)	16 (Ü)	76 (D)	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	88 (D)	32 (D)	12 (Ü)	8 (Ü)	32 (D)	8 (Ü)	292 (S) **
Videoaufnahme	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

UPDRS I-IV Unified Parkinson's Disease Rating Scale I-IV, Spalte Hoehn and Yahr-Skala: * Symptomatik nicht spezifisch für PS; Spalte UPSIT University of Pennsylvania Smell Identification Test: [†] bei Untersuchung akute Rhinitis; MoCA Montreal Cognitive Assessment, MMST Mini Mental Status Test, Spalte FM 100 FM 100 Hue Color Vision Test: S schlechte Farbdiskriminierung, D durchschnittliche Farbdiskriminierung, Ü überdurchschnittliche Farbdiskriminierung; Spalte Videoaufnahme: + Videoaufnahme vorhanden, - keine Videoaufnahme vorhanden; w weiblich, m männlich; n. u. nicht untersucht; ** Person ist mental retardiert, somit können die erhobenen Werte nicht vollständig verwertet werden

8.5. *STR*-Marker der genomweiten Kopplungsanalyse und Feinkartierung

Im Folgenden sind die *STR*-Marker angegeben, die in der genomweiten Kopplungsanalyse (Tabelle 8.2) und in der Feinkartierung der Regionen 1-13 (Tabelle 8.3) verwendet wurden. Informationen bezüglich der *STR*-Marker, die für die Feinkartierung der Kandidatenregion 7 auf Chromosom 7 eingesetzt wurden, sind der Tabelle 3.6 (Abschnitt 3.2) zu entnehmen.

Tabelle 8.2: Informationen zu den *STR*-Marker der genomweiten Kopplungsanalyse

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. (cM)	Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	<i>Spt</i> LOD score	<i>Mpt</i> LOD score
1	StartC01	0,00		0,00	-0,84
1	D1S468	4,22	4,22	-1,00	-1,15
1	D1S1612	16,22	12,00	-0,01	-0,41
1	D1S1597	29,93	13,71	-1,43	-1,99
1	D1S552	45,33	15,40	0,48	-1,03
1	D1S1622	56,74	11,41	-0,78	-1,20
1	D1S2729	64,92	8,18	-0,33	-1,19
1	D1S2134	75,66	10,74	-1,14	-1,02
1	D1S3728	89,49	13,83	-0,33	0,13
1	D1S1665	102,02	12,53	0,73	0,95
1	D1S1728	109,04	7,02	0,69	0,86
1	D1S2766	118,14	9,10	-0,38	-1,07
1	D1S2779	126,16	8,02	-0,43	0,32
1	D1S2626	136,34	10,18	0,91	1,92
1	D1S3723	140,39	4,05	0,84	1,92
1	D1S534	151,88	11,49	-0,11	0,41
1	D1S305	159,32	7,44	0,95	1,31
1	D1S1679	170,84	11,52	-1,44	-1,42
1	D1S1677	176,00	5,16	-2,14	-2,17
1	D1S2799	183,19	7,19	-1,18	-1,64
1	D1S1589	192,05	8,86	-1,10	-1,68
1	D1S2848	200,96	8,91	-1,57	-1,52
1	D1S533	209,15	8,19	-0,43	-0,82
1	D1S1725	219,92	10,77	1,18	0,66
1	D1S2891	224,50	4,58	-0,36	-1,22
1	D1S-A-	227,00	2,50	-1,08	-1,73
1	D1S490	237,73	10,73	-0,18	0,24
1	D1S3462	247,23	9,50	-0,24	0,33
1	D1S235	254,64	7,41	1,07	0,49
1	D1S180	267,51	12,87	-0,98	-1,54
1	D1S1609	274,53	7,02	-1,00	-1,17
1	EndC01	289,67	15,14	0,00	-0,09
2	StartC02	0,00		0,00	-1,04
2	D2S2393	7,05	7,05	-2,06	-2,16
2	D2S2166	10,86	3,81	-1,51	-2,47
2	D2S162	20,03	9,17	-0,01	-1,02

Fortsetzung der Tabelle 8.2

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. (cM)	Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	Spt LOD score	Mpt LOD score
2	D2S1360	38,33	10,73	-0,63	-1,34
2	D2S405	47,97	9,64	-1,00	-1,57
2	D2S1788	55,51	7,54	-1,99	-2,01
2	D2S2259	64,29	8,78	-1,20	-1,25
2	D2S1352	73,61	9,32	0,47	-0,68
2	D2S327	88,15	14,54	-1,23	-1,08
2	D2S1394	90,82	2,67	-0,96	-1,00
2	D2S438	99,41	8,59	0,99	-0,58
2	D2S2232	107,46	8,05	-0,44	-0,68
2	D2S2229	116,55	9,09	-1,35	-0,97
2	D2S410	125,18	8,63	-1,05	-0,98
2	D2S1334	145,08	12,50	0,76	-0,28
2	D2S1399	152,04	6,96	-0,70	-1,15
2	D2S1353	164,51	12,47	-1,22	-1,26
2	D2S2302	175,91	11,40	-1,11	-1,28
2	D2S1391	186,21	10,30	-1,26	-1,97
2	D2S1384	200,43	14,22	-1,12	-1,73
2	D2S434	215,78	15,35	-1,31	-2,36
2	D2S427	236,70	9,70	-0,01	-0,80
2	D2S2348	242,17	5,47	-1,08	-1,36
2	GATA151D12	248,00	5,83	-1,30	-2,23
2	D2S125	260,63	12,63	-1,87	-1,84
2	EndC02	269,07	8,44	0,00	-0,77
3	StartC03	0,00		0,00	-0,29
3	D3S2387	5,54	5,54	-0,17	-0,63
3	D3S3630	10,70	5,16	-0,93	-1,91
3	D3S3706	18,97	8,27	-0,18	-1,82
3	D3S1304	22,33	3,36	-0,76	-1,96
3	D3S1263	36,10	13,77	1,06	-1,28
3	D3S3726	42,64	6,54	-0,89	-1,61
3	D3S3727	56,07	13,43	-2,26	-2,48
3	D3S3521	63,12	7,05	1,09	1,01
3	D3S1613	72,21	9,09	1,17	1,46
3	D3S1300	80,32	8,11	1,57	1,69
3	D3S4542	90,27	9,95	-0,45	-0,26
3	D3S2406	103,00	12,73	-1,63	-2,23
3	D3S4529	112,78	9,78	-0,13	-2,79
3	D3S3045	124,52	11,74	-0,34	-1,06
3	D3S2460	135,00	10,48	-0,56	-1,19
3	D3S3606	143,94	8,94	-0,17	-1,80
3	D3S1764	152,98	9,04	-2,30	-2,26
3	D3S1744	161,40	8,42	-1,64	-2,25
3	D3S1280	170,14	8,74	-1,61	-1,99
3	D3S1282	180,80	10,66	0,88	-1,17
3	D3S2427	188,65	7,85	0,16	-0,71
3	D3S1262	201,50	12,85	0,98	0,57
3	D3S2398	209,77	8,27	0,64	0,48
3	D3S2418	216,20	6,43	0,94	0,50
3	D3S1311	225,24	9,04	-1,70	-1,42
3	ENDC03	228,50	3,26	0,00	-0,92

Fortsetzung der Tabelle 8.2

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. (cM)	Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	Spt LOD score	Mpt LOD score
4	StartC04	0,00		0,00	1,27
4	D4S2366	12,93	12,93	0,82	1,70
4	D4S2639	21,00	8,07	0,93	1,67
4	D4S403	25,90	4,90	-0,43	0,36
4	D4S1546	35,03	9,13	-0,68	-0,36
4	D4S2632	40,00	4,97	-0,84	-0,87
4	D4S405	56,95	7,48	-0,06	-1,51
4	D4S1627	60,16	3,21	-2,33	-2,66
4	D4S3248	72,52	12,36	0,65	-0,95
4	D4S3042	83,29	10,77	0,02	-1,25
4	D4S2361	93,48	10,19	-1,09	-1,55
4	D4S2986	105,29	11,81	-0,78	-2,18
4	D4S2623	114,04	8,75	-0,77	-2,32
4	D4S427	124,45	10,41	-2,26	-2,73
4	D4S3039	132,72	8,27	-1,30	-1,46
4	D4S1625	145,98	13,26	-0,90	-0,76
4	D4S2934	155,41	9,43	-0,04	0,42
4	D4S2368	167,55	12,14	0,80	0,53
4	D4S2431	176,19	8,64	-1,03	-0,73
4	D4S2417	181,93	5,74	-0,64	-0,75
4	D4S408	195,06	13,13	-0,36	-2,50
4	GATA129D03	204,00	8,94	-1,06	-2,73
4	D4S1652	208,07	4,07	-2,16	-2,73
4	ENDC04	211,66	3,59	0,00	-1,92
5	StartC05	0,00		0,00	0,07
5	D5S2488	0,01	0,01	-0,11	0,07
5	D5S2505	14,31	14,30	0,87	1,13
5	D5S817	22,89	8,58	-0,52	0,20
5	D5S1997	30,51	7,62	-0,85	-1,02
5	D5S2848	40,00	9,49	0,79	-0,06
5	D5S1470	45,35	5,35	-1,07	-0,79
5	D5S1457	59,31	13,96	-0,55	-0,74
5	D5S2500	69,24	9,93	0,76	-0,45
5	D5S2003	78,32	9,08	-2,15	-2,54
5	D5S2067	92,38	14,06	-1,33	-0,98
5	D5S1725	97,83	5,45	-1,03	-0,89
5	D5S1462	105,30	7,47	-1,25	-0,92
5	D5S492	116,98	11,68	0,74	-0,56
5	D5S1453	123,01	6,03	0,63	-0,70
5	D5S1505	129,84	6,83	-1,04	-0,72
5	D5S2098	131,49	1,65	0,24	0,36
5	D5S816	139,33	7,84	-1,13	-3,32
5	D5S1480	147,50	8,17	-0,27	-3,18
5	D5S2090	150,35	2,85	-2,14	-3,29
5	D5S422	164,20	13,85	-1,21	-2,35
5	D5S1456	174,81	10,61	-0,39	-1,40
5	D5S211	182,90	8,09	-0,55	-2,07
5	D5S408	195,50	12,60	-0,99	-1,85
5	ENDC05	197,55	2,05	0,00	-1,28
6	StartC06	0,00		0,00	0,34
6	D6S-F13A1	9,00	9,00	-0,26	0,06
6	D6S1660	40,14	10,21	-0,75	-0,17

Fortsetzung der Tabelle 8.2

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. (cM)	Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	Spt LOD score	Mpt LOD score
6	D6S2427	53,81	13,67	-0,45	-1,49
6	D6S426	60,44	6,63	-1,32	-3,30
6	D6S1689	71,77	11,33	-0,73	-1,96
6	D6S1053	80,45	8,68	-0,98	-0,75
6	D6S1031	88,63	8,18	-0,29	-0,06
6	D6S1056	102,81	14,18	0,98	0,35
6	D6S1021	112,20	9,39	-0,80	-1,59
6	D6S474	118,64	6,44	-0,15	-1,11
6	D6S1040	128,93	10,29	-1,18	-1,49
6	D6S1009	137,74	8,81	-1,13	-1,57
6	D6SB	147,00	9,26	-1,64	-2,47
6	D6S2436	154,64	7,64	-0,96	-1,68
6	D6S1035	164,78	10,14	-0,31	-0,86
6	D6S1277	173,31	8,53	-0,73	-0,69
6	D6S503	184,51	11,20	0,63	0,18
6	ENDC06	193,14	8,63	0,00	0,20
7	StartC07	0,00		0,00	-1,53
7	D7S1819	0,01	0,01	-1,28	-1,54
7	D7S517	7,45	7,44	-0,25	-1,37
7	D7S2514	13,38	5,93	1,05	-0,06
7	D7S513	17,75	4,37	-2,07	-1,45
7	D7S2508	27,67	9,92	-1,09	-1,44
7	D7S2562	34,16	6,49	1,34	1,78
7	D7S2515	43,85	9,69	0,73	1,75
7	D7S2251	54,85	11,00	-0,67	-0,05
7	D7S691	63,68	8,83	-0,81	-0,06
7	D17S1830	72,79	9,11	0,89	0,41
7	D7S3046	78,66	5,87	-2,13	-1,53
7	D7S2518	86,13	7,47	-1,37	-1,98
7	D7S2212	95,44	9,31	-0,47	-1,26
7	D7S657	104,87	9,43	-1,10	-1,53
7	D7S821	109,13	4,26	-1,65	-1,59
7	D7S2420	119,81	10,68	-2,31	-1,64
7	D7S635	130,18	10,37	-1,71	-2,77
7	D7S1804	136,96	6,78	-2,47	-2,87
7	D7S1824	149,91	12,95	-0,78	-2,16
7	D7S2195	162,01	12,10	-1,01	-1,89
7	D7S3070	163,02	1,01	-2,32	-2,11
7	D7S1823	173,70	10,68	-1,18	-1,27
7	ENDC07	181,96	8,26	0,00	-0,83
8	StartC08	0,00		0,00	-1,19
8	D8S264	0,73	0,73	0,12	-1,24
8	D8S1819	9,96	9,23	-1,19	-1,69
8	D8S1130	22,41	12,45	-1,04	-1,22
8	D8S1106	26,42	4,01	0,50	-1,24
8	D8S136	43,95	6,92	-0,52	-0,37
8	D8S1771	50,05	6,10	1,04	0,50
8	D8S1477	60,33	10,28	0,88	0,29
8	D8S1833	67,27	6,94	-0,21	-1,54
8	D8S1113	77,88	10,61	-0,81	-1,25
8	D8S2324	94,07	11,82	-0,83	-1,81
8	D8S273	102,62	8,55	-0,32	-1,33

Fortsetzung der Tabelle 8.2

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. (cM)	Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	Spt LOD score	Mpt LOD score
8	D8S-A-	110,99	8,37	-0,30	-1,06
8	D8S1132	121,99	11,00	-0,03	-0,76
8	D8S592	125,26	3,27	0,73	-0,47
8	D8S1179	135,07	9,81	-1,15	-1,21
8	D8S256	148,11	13,04	0,07	-0,34
8	D8S1837	156,59	8,48	-0,18	0,05
8	D8S373	164,46	7,87	-1,30	-0,97
8	ENDC08	167,90	3,44	0,00	-0,46
9	StartC09	0,00		0,00	0,67
9	D9S1779	0,01	0,01	0,70	0,67
9	D9S1813	9,84	9,83	1,14	0,40
9	D9S286	18,07	8,23	-1,21	-1,01
9	D9S274	28,43	10,36	0,15	-0,17
9	D9S1684	34,43	6,00	-0,43	-1,29
9	D9S171	42,74	8,31	-0,60	-2,56
9	D9S169	49,21	6,47	-1,71	-2,68
9	D9S1118	58,27	9,06	-2,30	-2,65
9	D9S1876	67,94	9,67	-2,10	-1,65
9	D9S1123	77,57	9,63	-0,48	-2,23
9	D9S152	79,07	1,50	-0,02	-0,33
9	D9S257	91,88	12,81	0,07	0,02
9	D9S1815	99,40	7,52	-0,86	-1,38
9	D9S1690	106,64	7,24	-1,22	-1,68
9	D9S930	120,05	13,41	-2,14	-2,75
9	D9S934	127,99	7,94	-0,83	-1,64
9	D9S1881	135,85	7,86	-0,62	-1,29
9	D9S1827	140,87	5,02	-0,83	-1,37
9	D9S159	142,51	1,64	0,58	-1,28
9	D9S1818	150,93	8,42	-2,32	-2,62
9	D9S1826	159,62	8,69	-0,89	-1,45
9	D9S1838	163,85	4,23	-1,89	-2,20
9	ENDC09	168,99	5,14	0,00	-1,19
10	StartC10	0,00		0,00	-1,29
10	D10S1435	3,00	3,00	-1,17	-2,09
10	D10S591	13,49	10,49	-0,92	-0,74
10	D10S189	19,00	5,51	0,76	0,11
10	D10S1412	28,31	9,31	0,99	0,10
10	D10S1430	33,18	4,87	-1,02	-0,76
10	D10S1423	46,00	3,50	-0,79	-1,67
10	D10S600	54,23	8,23	-2,23	-2,36
10	D10S208	60,64	6,41	-0,86	-1,41
10	D10S220	70,23	9,59	-0,44	0,44
10	D10S1225	80,77	10,54	-0,13	0,50
10	D10S-A-	88,00	7,23	-0,18	0,51
10	D10S1432	93,92	5,92	0,66	0,55
10	D10S1777	101,76	7,84	-0,33	0,45
10	D10S541	109,33	7,57	0,12	-1,29
10	D10S677	117,42	8,09	-0,03	-2,47
10	D10S1239	125,00	7,58	0,63	-2,23
10	D10S1230	142,78	8,61	-0,83	-1,78
10	D10S1213	148,17	5,39	-0,93	-1,53
10	D10S1782	156,27	8,10	-0,06	-1,98

Fortsetzung der Tabelle 8.2

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. (cM)	Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	Spt LOD score	Mpt LOD score
10	D10S1248	165,27	9,00	-1,97	-2,39
10	D10S212	170,94	5,67	-2,38	-2,40
10	ENDC10	173,13	2,19	0,00	-1,93
11	StartC11	0,00		0,00	0,52
11	D11S1984	2,11	2,11	-0,27	0,38
11	D11S2362	8,90	6,79	-0,16	0,38
11	D11S1999	17,19	8,29	-0,27	0,36
11	D11S915	30,88	13,69	-0,22	0,43
11	D11S1392	43,16	12,28	0,69	0,37
11	D11S905	51,95	8,79	-0,77	-1,09
11	D11S1985	58,40	6,45	-2,31	-2,72
11	D11S1765	61,78	3,38	0,86	-2,65
11	D11S1883	65,05	3,27	-2,38	-2,70
11	D11S4178	67,48	2,43	-0,63	-2,68
11	D11S4113	68,01	0,53	-2,17	-2,70
11	D11S4136	71,60	3,59	-0,07	-2,23
11	D11S2371	76,13	4,53	-1,45	-1,43
11	D11S1989	84,31	8,18	-0,88	-1,72
11	D11S2002	85,48	1,17	-0,12	-2,65
11	D11S4118	93,12	7,64	-0,42	-1,31
11	D11S1778	101,75	8,63	-0,71	-1,52
11	D11S1986	105,74	3,99	-2,78	-2,82
11	D11S1998	113,13	7,39	-0,30	-1,30
11	D11S4464	123,00	9,87	-1,52	-1,38
11	D11S4150	132,95	9,95	-0,86	-0,73
11	D11S874	140,18	7,23	0,82	-0,39
11	D11S4125	147,77	7,59	-0,90	-0,83
11	ENDC11	147,78	0,01	0,00	-0,83
12	StartC12	0,00		0,00	0,16
12	D12S372	6,42	6,42	0,68	0,15
12	D12S77	20,27	13,85	-1,11	-0,97
12	D12S364	30,60	4,37	1,39	-0,17
12	D12S373	36,06	5,46	-0,60	-0,33
12	D12S1591	43,38	7,32	-0,08	-0,93
12	D12S345	53,09	9,71	-1,83	-1,48
12	D12S339	64,43	11,34	-2,18	-1,48
12	D12S90	71,61	7,18	0,68	0,27
12	D12S375	80,52	8,91	-1,26	-0,71
12	D12S1052	83,19	2,67	0,47	-0,70
12	D12S1064	95,03	11,84	-1,24	-0,76
12	D12S1044	98,60	3,57	-0,44	-0,95
12	D12S78	111,87	13,27	-1,25	-0,96
12	D12S1605	116,66	4,79	-0,83	-0,80
12	D12S369	125,31	8,65	-0,51	-0,71
12	D12S395	136,82	11,51	-1,20	-1,05
12	D12S1639	148,24	11,42	-0,74	-2,30
12	D12S2078	150,00	1,76	-1,85	-2,32
12	D12S367	159,59	9,59	-1,27	-2,16
12	D12S392	165,69	6,10	0,10	-1,06
12	ENDC12	168,79	3,10	0,00	-0,75
13	StartC13	0,00		0,00	-0,54
13	D13S1316	0,01	0,01	-0,31	-0,54

Fortsetzung der Tabelle 8.2

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. (cM)	Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	Spt LOD score	Mpt LOD score
13	D13S787	8,88	8,87	-1,32	-1,17
13	D13S1250	17,22	8,34	-0,65	-1,18
13	D13S1493	25,81	8,59	-1,19	-0,62
13	D13S1253	34,56	8,75	-1,35	-1,75
13	D13S788	45,56	11,00	-1,01	-1,04
13	D13S1296	52,65	7,09	0,65	-0,68
13	D13S162	58,55	5,90	-0,02	-1,30
13	D13S1235	64,98	6,43	-1,32	-3,48
13	D13S793	76,01	11,03	-1,20	-1,94
13	D13S779	82,94	6,93	-0,70	-1,96
13	D13S796	93,53	10,59	-0,10	-1,69
13	D13S1315	102,74	9,21	-0,61	-1,10
13	D13S285	110,56	7,82	-1,37	-1,63
13	ENDC13	114,99	4,43	0,00	-1,17
14	StartC14	0,00		0,00	-0,64
14	D14S742	12,46	12,46	-0,38	-1,45
14	D14S1280	25,87	13,41	-0,81	-0,04
14	D14S608	28,01	2,14	-1,08	-0,04
14	D14S1014	42,81	14,80	0,03	0,00
14	D14S1048	45,12	2,31	-0,03	0,00
14	D14S976	50,50	5,38	-0,42	-0,29
14	D14S1057	55,82	5,32	0,24	-0,90
14	D14S980	60,43	4,61	-2,21	-2,24
14	D14S592	66,81	6,38	0,19	0,08
14	D14S1069	73,03	6,22	-0,02	0,09
14	D14S606	91,62	9,06	-1,36	-1,47
14	GATA193A07	96,00	4,38	-1,16	-1,08
14	D14S1015	105,00	9,00	-0,94	-0,88
14	D14S1434	113,17	8,17	0,48	-0,16
14	D14S267	121,95	8,78	-0,82	-0,69
14	D14S118	133,03	11,08	-0,78	-0,65
14	ENDC14	138,19	5,16	0,00	-0,29
15	StartC15	0,00		0,00	-0,77
15	D15S822	12,30	12,30	-0,60	-1,94
15	D15SACTC	17,00	4,70	-0,80	-2,35
15	D15S165	20,24	3,24	-1,02	-2,17
15	D15S971	31,46	11,22	0,95	-0,31
15	D15S994	40,25	8,79	-0,97	-0,89
15	D15S643	52,33	12,08	-0,07	-0,57
15	D15S1507	60,17	7,84	-0,81	-1,00
15	D15S818	71,82	11,65	-0,82	-1,45
15	D15S211	75,85	4,03	-1,00	-2,35
15	D15S655	82,84	6,99	0,81	0,46
15	D15S652	90,02	7,18	-0,16	-0,47
15	D15S816	100,59	10,57	-0,58	-0,52
15	D15S657	104,86	4,27	-0,28	-0,64
15	D15S966	112,58	7,72	-0,87	-1,35
15	ENDC15	122,15	0,01	0,00	-1,58
16	StartC16	0,00		0,00	-0,22
16	D16S3024	7,05	7,05	-0,17	-0,63

Fortsetzung der Tabelle 8.2

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. (cM)	Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	Spt LOD score	Mpt LOD score
16	D16S2616	11,46	4,41	-0,81	-0,64
16	D16S3052	15,32	3,86	-1,08	-1,13
16	D16S519	20,77	5,45	-0,64	-0,38
16	D16S500	28,30	7,53	0,02	-0,39
16	D16S3041	38,51	10,21	-1,20	-0,86
16	D16S403	43,89	5,38	0,55	0,43
16	D16S769	50,60	6,71	1,01	0,28
16	D16S753	57,79	7,19	-1,07	-1,99
16	D16S-A-	63,78	5,99	-0,34	-1,98
16	D16S3253	71,77	7,99	-1,12	-0,84
16	D16S496	85,94	14,17	-0,07	0,48
16	D16S3018	90,65	4,71	1,03	0,97
16	D16S516	100,39	9,74	0,69	0,15
16	D16S402	113,52	13,13	-0,72	-1,10
16	D16S539	124,73	11,21	-1,03	-0,73
16	D16S621	130,41	5,68	-1,10	-0,74
16	ENDC16	134,13	3,72	0,00	-0,41
17	StartC17	0,00		0,00	0,76
17	D17S1308	0,63	0,63	0,64	0,76
17	D17S1832	13,07	6,47	-1,02	-0,86
17	D17S1303	23,56	10,49	0,57	-0,68
17	D17S947	31,96	8,40	-0,98	-1,00
17	D17S2196	44,62	12,66	-1,64	-0,96
17	D17S1294	50,74	6,12	-0,61	-0,80
17	D17S1293	56,48	5,74	-1,27	-0,80
17	D17S1299	62,01	5,53	0,80	-0,79
17	D17S806	66,85	4,84	-1,04	-0,95
17	D17S2180	66,86	0,01	-1,25	-0,95
17	D17S943	68,42	1,56	-0,90	-0,95
17	D17S787	74,97	6,55	-1,21	-0,96
17	D17S1606	80,36	5,39	-1,03	-0,78
17	D17S1604	81,44	1,08	-0,21	-2,24
17	D17S1290	82,00	0,56	1,15	-2,24
17	D17S948	82,57	0,57	-1,29	-2,25
17	D17S794	83,38	0,81	0,78	-2,25
17	D17S807	85,92	2,54	1,15	-2,24
17	D17S2193	89,30	3,38	-2,35	-2,25
17	D17S1301	100,00	10,70	-0,79	-0,68
17	D17S802	106,08	6,08	0,49	0,34
17	D17S784	116,84	10,76	0,60	1,09
17	D17S928	126,44	9,60	1,00	1,32
17	ENDC17	126,45	0,01	0,00	1,32
18	StartC18	0,00		0,00	-0,77
18	D18S-A-	3,00	3,00	-1,01	-1,32
18	D18S54	8,30	5,30	-0,29	-0,20
18	D18S452	18,70	10,40	-0,26	-0,14
18	D18S843	28,10	9,40	-2,61	-2,59
18	D18S453	43,49	8,03	-1,37	-1,86
18	D18S877	54,40	10,91	-0,48	-1,75
18	D18S1124	61,17	6,77	1,15	-1,01
18	D18S535	64,48	3,31	-1,03	-1,22

Fortsetzung der Tabelle 8.2

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. (cM)	Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	Spt LOD score	Mpt LOD score
18	D18S1127	77,36	12,88	-0,31	-1,46
18	D18S858	80,41	3,05	-0,94	-1,40
18	D18S1147	90,60	10,19	-1,32	-1,64
18	D18S878	102,00	11,40	-1,51	-1,92
18	D18S844	116,44	14,44	-1,03	-0,89
18	ENDC18	126,00	9,56	0,00	-0,16
19	StartC19	0,00		0,00	-0,58
19	D19S591	9,84	9,84	-0,70	-1,26
19	D19S1034	20,75	10,91	0,98	-1,39
19	D19S884	26,37	5,62	-1,23	-2,25
19	D19S413	32,39	6,02	-1,54	-2,25
19	D19S586	32,94	0,55	-1,08	-2,25
19	D19S394	34,25	1,31	-2,13	-2,84
19	D19S433	51,88	9,88	-0,57	0,04
19	D19S197	63,10	11,22	-0,58	0,05
19	D19S574	69,50	6,40	1,47	0,48
19	D19S879	75,41	5,91	-0,56	0,06
19	D19S866	77,54	2,13	-2,03	-1,42
19	D19S246	78,08	0,54	-0,46	0,06
19	D19S888	85,87	7,79	-0,03	0,40
19	D19S589	87,66	1,79	-0,15	0,41
19	D19S254	100,61	12,95	-1,48	-1,17
19	ENDC19	105,02	4,41	0,00	-0,53
20	StartC20	0,00		0,00	-0,79
20	D20S1155	0,01	0,01	-0,47	-0,79
20	D20S482	10,00	9,99	0,75	-1,66
20	D20S194	18,26	8,26	-2,83	-3,14
20	D20S851	24,70	6,44	1,11	-1,55
20	D20S604	32,94	8,24	-1,30	-3,01
20	D20S470	39,25	6,31	-1,00	-2,14
20	D20S478	54,09	14,84	-0,53	-1,62
20	D20S888	64,88	10,79	-0,08	-0,18
20	D20S857	77,75	12,87	-0,14	0,15
20	D20S100	84,78	7,03	0,04	-0,14
20	D20S171	95,70	10,92	-2,73	-2,77
20	ENDC20	101,22	5,52	0,00	-1,49
21	StartC21	0,00		0,00	-1,11
21	D21S1911	0,00	0,00	-1,23	-1,11
21	D21S1899	9,72	9,72	-1,27	-1,16
21	D21S1257	17,67	7,95	-1,81	-2,58
21	D21S1909	28,48	10,81	-1,33	-2,56
21	D21S1252	35,45	6,97	-0,90	-2,04
21	D21S1889	45,26	9,81	-1,59	-1,72
21	D21S1446	57,77	12,51	-0,23	-1,11
21	ENDC21	57,78	0,01	0,00	-1,11
22	D22S420	4,06	4,06	-1,56	-1,50
22	D22S345	19,00	14,94	0,74	0,52
22	D22S689	28,57	9,57	-1,10	-0,50
22	D22S683	36,22	7,65	0,91	0,66

Fortsetzung der Tabelle 8.2

Chromosom	Marker	Position auf dem Chr. (cM)	Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)	Spt LOD score	Mpt LOD score
22	D22S445	45,82	9,60	-0,33	-0,43
22	D22S1141	52,61	6,79	-0,54	-0,24
22	D22S1169	60,61	8,00	-1,34	-1,64
22	ENDC22	62,31	1,70	0,00	-1,15

Angegeben ist neben dem zugehörigen Chromosom der Name des *STR*-Markers, seine Position auf dem Chromosom und der Abstand zu dem vorhergehenden *STR*-Marker in cM. Für die statistische Auswertung wurden für jeden Marker der *Singlepoint*- (*Spt*) und der *Multipoint*- (*Mpt*) *LOD score* berechnet. *LOD score*-Werte > 0,5 sind hellgrau unterlegt, *LOD score*-Werte ≥ 1 dunkelgrau.

Tabelle 8.3: Informationen zu den *STR*-Markern der Feinkartierung

	Marker	Position auf dem Chr.		Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)
		physikalische Karte (Mb)	genetische Karte (cM)	
Region 1 Chr. 1	D1S1665	72,36	102,02	
	D1S464	73,86	104,23	2,21
	D1S2841	77,61	106,45	2,22
	D1S1728	n. bek.	109,04	2,59
Region 2 Chr. 1	D1S206	99,81	134,20	
	D1S2626	101,12	136,34	0,14
	D1S1631	103,61	136,88	0,54
	D1S3723	n. bek.	140,39	3,51
	D1S221	108,17	142,24	1,85
	D1S418	n. bek.	147,60	5,36
	D1S1675	112,59	149,20	1,60
	D1S534	117,53	151,88	2,68
Region 3 Chr. 3	D3S3521	38,86	63,12	
	D3S3026	51,97	70,61	7,49
	D3S1613	55,00	72,21	1,60
	D3S3616	57,38	76,48	4,27
	D3S1300	60,60	80,32	3,84
	D3S4542	n. bek.	89,91	9,59
Region 4 Chr. 3	D3S1763	164,61	176,54	
	D3S1282	166,26	180,8	4,26
	D3S2421	172,45	186,68	5,88
	D3S2427	173,16	188,29	1,61
	D3S2412	174,44	189,00	0,71

Fortsetzung der Tabelle 8.3

	Marker	Position auf dem Chr.		Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)
		physikalische Karte (Mb)	genetische Karte (cM)	
Region 5 Chr. 4	D4S3360	0,08	0,00	
	D4S2963	75,69	1,48	1,48
	D4S3038	1,06	1,48	0,00
	D4S432	n. bek.	6,84	5,36
	D4S3023	4,23	8,24	1,40
	D4S431	6,31	12,35	4,11
	D4S2366	6,41	12,93	0,58
	D4S394	6,88	16,01	3,08
	D4S2923	8,12	17,49	1,48
	D4S1582	10,03	23,76	0,59
	D4S2949	10,85	23,17	5,68
	D4S2906	12,04	24,29	0,53
	D4S403	13,08	25,90	1,61
Region 6 Chr. 5	D5S817	11,56	22,88	
	D5S2845	22,35	36,25	13,37
	D5S2061	29,94	41,06	4,81
	D5S1994	36,37	51,99	10,93
Region 8 Chr. 8	D8S1771	23,98	50,05	
	D8S1477	30,61	60,34	10,29
	D8S1722	36,19	62,47	2,13
	D8S1833	48,57	67,27	4,80
	D8S1828	52,26	71,00	3,73
Region 9 Chr. 9	D9S1779	n. bek.	0,00	
	D9S1813	4,08	9,83	9,83
	D9S2169	n. bek.	14,23	4,40
	D9S286	8,01	18,06	3,83
	D9S925	18,25	32,24	14,18
Region 10 Chr. 16	D16S3095	55,82	87,06	
	D16S3106	57,95	88,18	1,12
	D16S3018	59,93	90,65	2,47
	D16S516	64,88	100,39	9,74
	D16S402	69,04	113,52	13,13
Region 11 Chr. 17	D17S1308	0,53	0,63	
	D17S1528	1,91	6,60	6,03
	D17S1298	3,55	10,72	4,12
	D17S1832	5,86	13,07	2,35
	D17S974	10,41	22,24	9,17
	D17S1303	10,75	23,56	1,32

Fortsetzung der Tabelle 8.3

	Marker	Position auf dem Chr.		Entfernung zum vorhergehenden Marker (cM)
		physikalische Karte (Mb)	genetische Karte (cM)	
Region 12 Chr. 17	D17S2193	61,93	89,32	
	D17S1301	68,08	100,02	10,70
	D17S937	71,94	105,68	5,66
	D17S802	233,42	106,80	1,12
	D17S1822	73,22	116,86	10,06
	D17S928	75,65	126,46	9,60
Region 13 Chr. 22	D22S427	2,40	8,32	
	D22S345	7,43	n. bek.	
	D22S689	11,82	28,57	
	D22S683	19,48	36,22	7,65
	D22S1177	n. bek.	42,81	6,59

Für jede feinkartierte Region sind die verwendeten *STR*-Marker angegeben, deren Lokalisation auf dem Chromosom - sowohl auf der physikalischen Karte (nach HuRef laut <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) als auch auf der genetischen Karte (nach Marshfield Map) - sowie der Abstand zu dem vorangegangenen *STR*-Marker in cM.

8.6. Gene in der identifizierten Kandidatenregion

Im Folgenden werden zunächst alle Gene aufgeführt, die sich zum Zeitpunkt der Sequenzierung (Januar 2008) in der Kandidatenregion auf Chromosom 7 befanden und bekannt waren (Tabelle 8.4) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Stand Januar 2008). Angegeben sind neben der umspannenden Region (Beginn und Ende des Gens) die Kurzbezeichnung, die Position und der vollständige Genname, der z. T. Hinweise auf die Funktion gibt. Die untersuchten Kandidatengene sind in der Tabelle 8.4 grau unterlegt. Anschließend werden Informationen zu den für die Sequenzierung der Kandidatengene angefertigten *Primer* angeführt (Tabelle 8.5).

Tabelle 8.4: In der Kandidatenregion befindliche Gene (Stand Januar 2008)

Beginn (bp)	Ende (bp)	Genname Abkürzung	Position auf dem Chrom.	Genname/Funktion
18501894	19003518	HDAC9	7p21.1	histone deacetylase 9
18954753	18956003	NPM1P13	7p21.3	nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) pseudogene 13
19121616	19123820	TWIST1	7p21.2	twist homolog 1 (Drosophila)
19150930	19151569	FERD3L	7	Fer3-like (Drosophila)
19701610	19715185	TWISTNB	7	TWIST neighbor
19725463	19779541	MGC42090	7	hypothetical protein MGC42090
20008871	20009440	LOC728501	7	similar to 60S ribosomal protein L21
20146776	20223538	7A5	7	putative binding protein 7a5
20336811	20337856	LOC729972	7	hypothetical protein LOC729972
20337250	20421907	ITGB8	7	integrin, beta 8

Fortsetzung der Tabelle 8.4

Beginn (bp)	Ende (bp)	Genname Abkürzung	Position auf dem Chrom.	Genname/Funktion
20628648	20629544	LOC402641	7	similar to ras related v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A
20687216	20795296	ABCB5	7	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5
20821894	20826508	SP8	7p21.2	Sp8 transcription factor
20866917	20867439	RPL23P8	7	ribosomal protein L23 pseudogene 8
20883249	20883586	RPS26P30	7p15.3	ribosomal protein S26 pseudogene 30
21259597	21261152	ASSP11	7	argininosuccinate synthetase pseudogene 11
21420981	21421112	RNU1P8	7	RNA, U1 small nuclear pseudogene 8
21467689	21554162	SP4	7p15.3	Sp4 transcription factor
21510676	21510764	MIR1183	7	microRNA 1183
21582833	21941457	DNAH11	7p21	dynein, axonemal, heavy chain 11
21940517	21985542	CDC47L	7	cell division cycle associated 7-like
22157908	22396533	RAPGEF5	7	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5
22526422	22544077	MGC87042	7	similar to Six transmembrane epithelial antigen of prostate
22549936	22551681	EEF1A4	7	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 4
22765802	22765957	LOC541472	7p21	hypothetical LOC541472
22766818	22771620	IL6	7p21	interleukin 6 (interferon, beta 2)
22813189	22813638	RPS26P32	7	ribosomal protein S26 pseudogene 32
22852251	22862421	TOMM7	7	translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog (yeast)
22896232	22896305	SNORD93	7p15.3	small nucleolar RNA, C/D box 93
22921440	22922051	RPL12P10	7	ribosomal protein L12 pseudogene 10
22980878	23053770	FAM126A	7p15.3	family with sequence similarity 126, member A
23145353	23215040	KLHL7 7	7	kelch-like 7 (Drosophila)
23221446	23240630	NUPL2	7p15	nucleoporin like 2
23242018	23247664	LOC730020	7	hypothetical protein LOC730020
23286316	23314729	GNPMB	7p15	glycoprotein (transmembrane) nmb
23338940	23349180	C7orf30	7	chromosome 7 open reading frame 30
23349828	23509995	IGF2BP3	7p11	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3
23520202	23522188	LOC389473	7	similar to Neuronal protein 3.1 (p311 protein)
23530007	23531047	RPS2P32	7	ribosomal protein S2 pseudogene 32
23544399	23571656	TRA2A	7	transformer 2 alpha homolog (Drosophila)
23602011	23603985	LOC442517	7	similar to ATP-binding cassette, sub-family E, member 1
23624335	23626146	CLK2P	7p15.3	CDC-like kinase 2, pseudogene
23636998	23684327	CCDC126	7	coiled-coil domain containing 126
23719749	23742269	C7orf46	7	chromosome 7 open reading frame 46
23749838	23872127	STK31	7	serine/threonine kinase 31
24323809	24331477	NPY	7p15.1	neuropeptide Y
24613085	24727498	MPP6	7p15	membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6)
24737974	24797639	DFNA5	7p15	deafness, autosomal dominant 5
24836159	25019760	OSBPL3	7p15	oxysterol binding protein-like 3
25158275	25164955	CYCS	7	cytochrome c, somatic
25174316	25219817	C7orf31	7	chromosome 7 open reading frame 31
25251783	25252604	RPL7AP41	7p15.2	ribosomal protein L7a pseudogene 41
25264189	25268105	NPVF	7p21-p15	neuropeptide VF precursor
25305541	25305908	LOC100131016	7	similar to C1orf19
25729016	25729690	UBA52P1	7	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 pseudogene 1
25989539	25989606	MIR148A	7	microRNA 148a
26191860	26225907	NFE2L3	7p15-p14	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3
26229556	26240413	HNRNPA2B1	7p15	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
26241099	26252976	CBX3	7	chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)

Fortsetzung der Tabelle 8.4

Beginn (bp)	Ende (bp)	Genname Abkürzung	Position auf dem Chrom.	Genname/Funktion
26315781	26316286	RPL23P7	7	ribosomal protein L23 pseudogene 7
26331515	26413949	SNX10 7	7	sorting nexin 10
26411661	26416414	LOC100129036	7	hypothetical LOC100129036
26437325	26519642	LOC100289338	7	hypothetical protein LOC100289338
26526288	26535987	LOC441204	7	hypothetical locus LOC441204
26572740	26578444	KIAA0087	7	KIAA0087
26677490	26686924	LOC285941	7	hypothetical protein LOC285941
26706687	26904341	SKAP2	7p21-p15	src kinase associated phosphoprotein 2
26961723	26962585	RPL7AP38	7	ribosomal protein L7a pseudogene 38
27022387	27034836	LOC442661	7	similar to mCG10155
27063289	27066099	LOC402643	7	tropomyosin 3 pseudogene
27087754	27088508	LOC442290	7	nucleolar protein family A, member 2 pseudogene 2
27132612	27135625	HOXA1	7p15.3	homeobox A1
27139973	27142394	HOXA2	7p15-p14	homeobox A2
27145809	27166639	HOXA3	7p15-p14	homeobox A3
27154967	27162506	LOC285943	7	hypothetical protein LOC285943
27168126	27170399	HOXA4	7p15-p14	homeobox A4
27170641	27192345	LOC100133311	7	similar to hCG1644697
27180996	27183287	HOXA5	7p15-p14	homeobox A5
27185116	27187368	HOXA6	7p15-p14	homeobox A6
27193335	27196296	HOXA7	7p15-p14	homeobox A7
27199952	27209863	LOC100289444	7	hypothetical protein LOC100289444
27202057	27205149	HOXA9	7p15-p14	homeobox A9
27209099	27209182	MIR196B	7	microRNA 196b
27210210	27219876	HOXA10	7p15-p	homeobox A10
27220776	27224835	HOXA11	7p15-p14	homeobox A11
27225027	27228912	HOXA11AS	7	HOXA11 antisense RNA (non-protein coding)
27236499	27239725	HOXA13	7p15-p14	homeobox A13
27274968	27286750	LOC100129463		hypothetical LOC100129463
27282164	27286192	EVX1	7p15-p14	even-skipped homeobox 1
27308934	27309372	RPL35P4	7p15.2	ribosomal protein L35 pseudogene 4
27368127	27373527	LOC100129606	7	similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
27495991	27498476	LOC401316	7	eukaryotic translation initiation factor 4H pseudogene
27500671	27506646	LOC442291	7	hypothetical LOC442291
27531301	27532382	LOC442292	7	hypothetical LOC442292
27565061	27702602	HIBADH	7	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase
27779738	27869386	TAX1BP1	7p15	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1
27870192	28220437	JAZF1	7	JAZF zinc finger 1
28219947	28280478	LOC100128081	7	hypothetical LOC100128081
28318842	28319318	LOC402644	7	hypothetical LOC402644
28338940	28865511	CREB5	7p15.1	cAMP responsive element binding protein 5
28654714	28655481	RPS2P30	7p15.1	ribosomal protein S2 pseudogene 30
28992974	28998029	KIAA0644	7	KIAA0644 gene product
29035247	29186153	CPVL	7p15-p14	carboxypeptidase, vitellogenic-like
29234121	29553944	CHN2	7	7p15.3 chimerin (chimaerin) 2
29251737	29253503	NANOGP4	7p15	Nanog homeobox pseudogene 4

Tabelle 8.5: Informationen zu den für die Sequenzierung verwendeten *Primern*

	Exon	Vorwärts-Primer (F) Rückwärts-Primer (R)	Größe (bp)	Annealing- Temperatur (°C)
ABC5	4	F: TGCCCATCTACCAGAAAAAGTC R: CCTTATATTGGAATGTCGCAGC	452	55
	5	F: ATTTGATCACGCTGCCTTCT R: CTTCTGTCCTCTAAACCACTTCC	403	55
	6	F: CCGGGTCAACAAAGATTTCT R: AACCTTGGTTGCTTTTTGAAA	364	55
	7	F: CAATAGCAAAGGCGATAACAG R: AGTGAAATTTGGGAAAGACATG	383	55
	8	F: CCCTGCTGTCTGTTATGTTTG R: AATTTTCCCCTTGTGGTTTAG	358	55
	9	F: TGTTTCTTTTATATTTTCCCCC R: AGCAAACAAACAAAAATCTACG	280	55
	10	F: TGTTTCTTTTATATTTTCCCCC R: TCACACTTTTGGACTTGCTTC	553	55
	11	F: CAGCAGAAAAATCACAAGTCAG R: ACAGCTCACATATATGCACAGAC	246	55
	12	F: TCTCAAAGTATAAATTCAAGGCA R: AATTGGTCTGTATGCATTTCTC	517	55
	13	F: AATATGTCCCCAGTGTGAGTG R: GACATTATTAGGAAAGGCTCAAG	317	55
	14	F: AAAAATGCCTTTCCACCAA R: AGATGGGGTTTTATTATGTTGG	393	55
	15	F: TGTGCCTGCTTTTTTCTTTA R: GTTAGTTTTTCAGCCCTTGC	350	55
	16	F: AATTAAAAGGGCTCTGGAAAC R: TTTTGTGATGGTTTGCTTGT	487	55
	17	F: TTATGAGCCTTCCTTGGGTA R: GGTTTTTCGCATCTGACTTC	517	55
	18	F: TGGGACACAAATTTCAAGAG R: AATTGGAAGTGGTGACCTTAGA	398	55
	19	F: AAGCAAATAAAGCAAAGAAGG R: ATGCAATAAAAGAGATCAAAGC	399	55
IL-6	1,2	F: TCAACCCCCAATAAATATAGGAC R: TGACACCAGCAAAGGATAAATAC	652	55
	3	F: CTAGTGGTGTTTGTGTTTAGGGAC R: CACTTTTTGTTGCTGCCTG	275	55
	4	F: GGAGCAGAGGGGAAAAGATGTC R: GCAGAAGAGAGCCAACCAAC	438	55
	5	F: ACATCATCCCATAGCCCAG R: ACGCTCATACTTTTAGTTCTCCA	368	55

Fortsetzung Tabelle 8.5

	Exon	Vorwärts-Primer (F) Rückwärts-Primer (R)	Größe (bp)	Annealing- Temperatur (°C)
STK31	1	F: CCACGTGACTCCCGCTAACA R: CAAAACTGGGGCATCTGGC	352	55
	2,3	F: TGTAGTTTAGTCTTCATTCATTA R: TTTTATTTTTGTTTTTGTTG	329	45
	4	F: TAGAACCCTCAAGCGTGTAAC R: CCAGGAACTCCAAAACTAAAT	254	55
	5	F: AAGTACCTGCCTGATAGGATTG R: TACTACGAATAAGCAATGAAGGG	324	55
	6	F: GGAAACATTTAATCTGGGGTC R: GTTTACCTAGCAAAGATGAGCAT	384	55
	7	F: TGGGTAGGAACAAAATAAGGG R: GGATTCCAAAAGCATAAGCCT	516	55
	8	F: GGCATAAAAGGACCAAGATAA R: CAGAAAAATAAATAGCAGCAGAT	340	55
	9	F: GCTCAAACCATCTGTCCTCCT R: CAAAAATGGCAAGCACACAAT	351	55
	10	F: GTACCCCTTCAAAGCCAGTG R: GGAGGGAATTTAGAGGACAGG	454	55
	11	F: TATGCGGAAAAGACCTGATG R: CTTTTGCAACCATCACAGAAC	285	55
	12	F: CATACTGCTTTTCTACCCCTT R: AAAAGGAGCAATCTGACTAAAA	446	50
	13	F: AGTTCTTTTACATTGCCCAGG R: AAGAATAAGACTTTGCATGGTGT	429	55
	14	F: GGCCTTAGCTGTTTTGGATA R: AAAAATCACCATTTCAGTTG	322	55
	15	F: AGAAACATGGATTA AAAAGGAAA R: TTTTATGAAGCAGAGACCAAGTA	382	50
	16	F: TGAAGGATACATAGAAACCACAC R: GTCCACTTCATAAAACGGGTA	292	50
	17	F: TGGTTTTCACTTGTTATTTCTT R: GAAAAAGTTCTAATACCCATAAAA	388	50
	18	F: TAAGTGCTGGGATTGTTTGG R: CAGTGAGGTTTTTTCTTTCTTGA	267	55
	19,20	F: TTATAATGAGATTTTCATCTTGGA R: ACAAATAGAATACCATGAGTCAAA	593	50
	21	F: AGCCTTCATCTGGTCTTTCTCT R: GCATCTAGCTGAGGGCAAATA	467	55
	22	F: AAAAATATTTGAAAGCAAGGG R: ACACAATAGGTAATAGGAAGCATA	418	50
	23	F: CTTTAGGAGCCCCAGGAAC R: CTTAGAAAACTGGAGGACAACCTT	355	55
	24	F: GTCCACTTCCTTCTTCATTACAG R: CTCAACTAGTCCCAGAACATTC	394	55

Fortsetzung der Tabelle 8.5

	Exon	Vorwärts-Primer (F) Rückwärts-Primer (R)	Größe (bp)	Annealing- Temperatur (°C)
CYC5	2	F: CTTCTGGTCTGAAATACTGAGGCA R: AGGGGAATTCATGCTTGACAC	464	55
	3	F: GCCAATAAGAACAAAGGTAAGAG R: TCATTTAACCACAAGCCAGTC	434	55
CREB5	2	F: TTTCTTCCTAATCTTGCTGGTG R: AGGAAACTGACAAAAGCAACAT	259	52
	4	F: ATTGGCATAGAAAGGGGGCT R: ATGGCGATGAAAATGATGATGAT	350	55
	5	F: TTAAAACTGAATGGCTCCTCTT R: CAATTTACCAGTGGGACTCG	245	55
	6	F: ATGCTTGCTACTGGCTTTTG R: CAAGGCCACATCAACACAAT	284	55
	7	F: GCCGGAAGCCATAACTCTCTA R: CCCATCAAAGCATCACTCTG	444	55
	8	F: CACATTACATCATCGCTTGG R: AATGAAGAGGAGGAGGAGGA	256	55
	9	F: ATTGTTGTCCCTGCTGTTCTG R: CAGTCGCCTTCTTTCCCAT	323	55
	10	F: TGCTTACCACACACCAAACC R: CAAAACAAAGATGGAGCCCT	366	55
	11	F: AGCAAGATAGCTACTGGTAGGAA R: TGAGATAGAACACCTGGGCT	582	55
	12	F: TGCTGACTGAAACGATAGACTT R: GTGTGTGGTATCACTGCTTAGG	449	55
	13	F: GTGGGTTTGTATCCTCTGGTC R: GATCCCCTTGGAAGAATAGTCT	330	55
	14	F: TCCACAAGTCCATACAAAAAAG R: GAACTGAGGAGTCTTCCAGGT	345	60

Angegeben ist die jeweilige Bezeichnung des Kandidatengens sowie das Exon, für welches jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärts-Primer hergestellt wurde. Die *Primer* sind in 5' - 3' Richtung angeführt. Des Weiteren ist sowohl die Länge des Produkts in Basenpaaren angeführt, als auch die mittlere Bindungstemperatur der *Primer* in °C angegeben.

8.7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Wiebe Ulrike Külper
Geburtsort: Hamburg

Berufs- und Schulausbildung

10. 2004 - 5. 2011 **Universität zu Lübeck**
Studium der Humanmedizin; Lübeck

8. 1994 - 6. 2003 **Hansa-Gymnasium Hamburg-Bergedorf**
Schulbesuch, Abschluss: Abitur; Hamburg

Doktorarbeit

9. 2007 - 7. 2013 **Sektion für Klinische und Molekulare Neurogenetik der Klinik für Neurologie der Universität zu Lübeck**
Leiterin: Frau Prof. Dr. med. C. Klein
Titel: Molekulargenetische Untersuchung einer deutsch-stämmigen Familie mit einem familiären Parkinson-Syndrom

9. 2007 - 4. 2009 experimenteller Teil der Doktorarbeit

Veröffentlichungen

Originalarbeiten Brüggemann N, **Külper W**, Hagenah J, Bauer P, Pattaro C, Tadic V, *et al.* Autosomal dominant Parkinson's disease in a large German pedigree. *Acta Neurol Scand* 2011; [Epub ahead of print]

Kongressbeiträge **Külper W**, Brüggemann N, Vieregge P, Hagenah J, Lohmann K, Klein C. Klinische und genetische Untersuchung eines familiären Parkinson-Syndroms. *Akt Neurol* 2008; (Suppl.1): 93

Rondorf K, **Külper W**, Brüggemann N, Vieregge P, Hagenah J, Klein C, Lohmann K. Clinical and genetic investigation of a multigenerational Parkinson disease family. im Rahmen der *DGNG* 2008, Lübeck

Brüggemann N, **Külper W**, Hagenah J, Tadic V, Tönnies H, Bauer P, Riess O, Rolf A, Siebert R, Vieregge P, Lohmann K, Klein C. Autosomal dominant late-onset parkinsonism with dementia – association with a novel PD gene. *Neurology* 2010;74(Suppl.2):A499

8.8. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle ganz herzlich der Familie SP für die Teilnahme an der Studie danken. Sie hat es mir erst ermöglicht, diese Arbeit durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Lohmann, die mich während dieser Doktorarbeit auf großartige Weise betreut, unterstützt, motiviert und an den richtigen Stellen vorangetrieben hat.

Danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. Klein für das Überlassen des Themas der Doktorarbeit und für ihr ambitioniertes und fröhliches Wesen, mit welchem sie mir immer wieder vor Augen geführt hat, dass man nicht aufhören sollte, an sich, seinen Zielen und der Erreichung derselben zu arbeiten. Meinen großen Dank möchte ich auch Herrn Dr. Brüggemann aussprechen, der mir mit viel Geduld die klinischen Aspekte des PS erläuterte und es stets vermochte, mich nach Misserfolgen wieder aufzurichten und zu motivieren.

Ich danke allen Mitarbeitern der Sektion für Klinische und Molekulare Neurogenetik, für die vielen schönen und sehr lehrreichen Stunden im Labor, für ihre große Hilfsbereitschaft und ihre nicht enden wollende Geduld mit mir. Ich habe die Zeit sehr genossen und vieles, nicht nur molekulartechnisches gelernt. Insbesondere möchte ich hierbei Frau Dr. Grünewald danken, die mir in vielen Abendstunden geduldig und stets fröhlich gezeigt hat, wie man einer Arbeit das nötige Erscheinungsbild verleiht.

Ich danke meinen Eltern und meinen Schwestern, für ihre moralische und tatkräftige Unterstützung während meines gesamten Studiums, vor allem aber während der Anfertigung dieser Arbeit. Ich danke ihnen für ihren Rat, ihre Kritik, ihre Korrekturen und Anmerkungen und vor allem für ihr unerschütterliches Vertrauen in mich.

Ich danke Kristina Albers, die mir seit dem ersten Tag meines Studiums mit unglaublich viel Nachsicht, Ausdauer und gutem Rat zur Seite steht, die auf meine Fragen stets eine richtige Antwort weiß und wie kein anderer es vermag sie in die richtigen Worte zu fassen. Sie hat mich in all diesen Jahren viel Menschliches gelehrt. Für die seelische Unterstützung danke ich auch Maria Maaß, die mir immer wieder die wesentlichen Dinge außerhalb der Medizin vor Augen führt. In ganz besonderem Maße möchte ich mich auch bei Konstantin Bach für seine großartige Unterstützung und seine außerordentliche Geduld mit mir bedanken. Ich danke ihm vor allem für seine stets kritischen Fragen bezogen auf meine Arbeit und meine Person, deren Antwortsuche mich immer wieder herausgefordert hat.

8.9. 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 andernorts vorgelegt habe.

Ich habe mich bisher keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Hamburg, den

8.10. Votum der Ethikkommission



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Frau
Prof. Dr. med. Klein
Klinik für Neurologie

im Hause

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500- 4639
Fax: (0451) 500- 3026
email: erdmann@zuv.uni-luebeck.de

Datum: 02.03.06

Aktenzeichen:
(immer angeben !) 04-155

nachrichtlich:
Herr Prof. Kömpf
Direktor der Klinik für Neurologie

Sitzung der Ethik-Kommission am 09. November 2004

Antragsteller: Frau Prof. Klein / Herr Prof. Kömpf

Titel: Molekulargenetische Untersuchung zu Ursachen des Parkinson-Syndroms als Grundlage für Phänotyp-Genotyp-Korrelationen

Sehr geehrte Frau Prof. Klein,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder: ☒

☒ Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
☒ Prof. Dr. F. Hohagen
(Psychiatrie)
☒ Prof. Dr. Dominiak
(Pharmakologie)

☒ Frau H. Müller
(Pflege)
Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)
Herr Dr. Fieber
(Richter am Landgericht Lübeck)
☒ Prof. Schwinger
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. H. L. Fehm
(Medizinische Klinik I)
☒ Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)
☒ Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)