

Aus dem Institut für Neurogenetik

(Prof. Dr. med. C. Klein)

**Molekulargenetische Untersuchungen des
ATP13A2/PARK9-assoziierten Parkinson-Syndroms
und
des Suszeptibilitätslocus des idiopathischen Parkinson-
Syndroms *PARK16***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Roland Giesen

aus Berlin

Lübeck 2012

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christine Klein
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Eberhard Schwinger
- Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2014**
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.06.2014**
- Promotionskommission der Sektion Medizin-**

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Monogenetische und komplexe genetische Erkrankungen	1
1.2	Morbus Parkinson: genetischer Hintergrund.....	2
1.3	Kufor-Rakeb-Syndrom	6
1.4	Suszeptibilitätslocus <i>PARK16</i>	10
1.5	Spleißen und <i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>	11
1.6	Zielsetzung und Hypothesen	13
2	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Patienten der Assoziationsstudie	14
2.2	Patienten der Expressionsanalyse.....	15
2.3	Material	16
2.3.1	Chemikalien.....	16
2.3.2	Kulturmedium, Puffer und Lösungen.....	17
2.3.3	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.3.4	Kommerzielle Reagenziensysteme.....	18
2.3.5	Geräte.....	18
2.3.6	Software.....	19
2.4	Methoden	20
2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion	20
2.4.2	Gelelektrophorese.....	21
2.4.3	Schmelzkurvenanalyse	22
2.4.4	Sequenzierung	23
2.4.5	RNA-Isolierung, c-DNA Synthese, quantitative Echtzeit-PCR	26
2.4.6	Zellkultur	30
2.4.7	Statistische Methoden der Assoziationsstudie.....	31

3	ERGEBNISSE	32
3.1	Assoziationsstudie zum <i>PARK16</i>-Locus	32
3.1.1	Genotypisierung des SNP rs823128	32
3.1.2	Genotypisierung des SNP rs947211	33
3.2	Expressionsanalyse von <i>ATP13A2</i> beim KRS	36
3.2.1	Verifizierung der Mutationen der Patienten	36
3.2.2	<i>ATP13A2</i> -Expressionsbestimmung und Untersuchung auf NMD	38
3.2.3	Spezifische Quantifizierung der Spleißvarianten	42
3.2.4	Auswirkungen der Mutation c.3253delC auf das Spleißen	44
4	DISKUSSION	47
4.1	Assoziationsstudie zum <i>PARK16</i>-Locus	47
4.2	Expressionsanalyse von <i>ATP13A2</i> beim KRS	49
4.2.1	Verifizierung der Mutationen der Patienten	50
4.2.2	<i>ATP13A2</i> -Expressionsbestimmung und Untersuchung auf NMD	51
4.2.3	Spezifische Quantifizierung der Spleißvarianten	54
4.2.4	Auswirkungen der Mutation c.3253delC auf das Spleißen	56
5	AUSBLICK	60
6	ZUSAMMENFASSUNG	61
7	LITERATURVERZEICHNIS	62
8	ANHANG	76
8.1	Abkürzungsverzeichnis	76
8.2	<i>Primer</i> und Sonden	78
8.3	Danksagung	80
8.4	Lebenslauf	81
8.5	Eidesstattliche Erklärung.....	82

1 EINLEITUNG

1.1 Monogenetische und komplexe genetische Erkrankungen

Die moderne Genetik hat einen großen Beitrag für die klinische Medizin geleistet. Sie hat vor allem die Identifizierung von Krankheiten, die entweder durch chromosomale Defekte oder einzelne Genedefekte verursacht werden, vorangebracht. Krankheiten, die durch die Mutation eines einzelnen Genes, also monogenetisch bedingt sind, folgen oft charakteristischen Vererbungsmustern – sie sind jedoch selten. Viele, häufig auftretende Krankheiten hingegen, die ihre Erstmanifestation im Erwachsenenalter haben, weisen erbliche Komponenten auf, die nicht den klassischen Vererbungsregeln folgen. Man geht bei häufig auftretenden Krankheiten vom Einfluss verschiedener Gene und deren Interaktion mit zahlreichen Umwelteinflüssen aus. Daher spricht man von komplexen Krankheiten. Bei vielen komplexen Krankheiten gibt es eine Minderheit von Erkrankten, deren Pathologie sich jedoch durch eine Mutation in einem einzigen Gen erklären lässt. Typisch für diese exzeptionellen Patienten sind ein früher Krankheitsbeginn und ein ausgeprägter klinischer Phänotyp. Es besteht die Hoffnung, nach der Identifizierung seltener Unterformen einer komplexen Krankheit ein Krankheitsmodell zu etablieren, von dem auf die häufigere idiopathische Form geschlossen werden kann. Ein Paradebeispiel für diesen Dualismus von seltenen und häufigen Erkrankungen ist der Morbus Parkinson (MP).

Diese Arbeit besteht aus zwei unabhängigen Teilen, die den MP von zwei Seiten betrachten. Zum einen wurde eine seltene familiäre Form des Parkinson-Syndroms, das mit *ATP13A2/PARK9*-assoziierte Parkinson-Syndrom, untersucht. Zum anderen befasst sich die Arbeit mit dem Suszeptibilitätslocus *PARK16*, der häufigen idiopathischen Form des Parkinson-Syndroms.

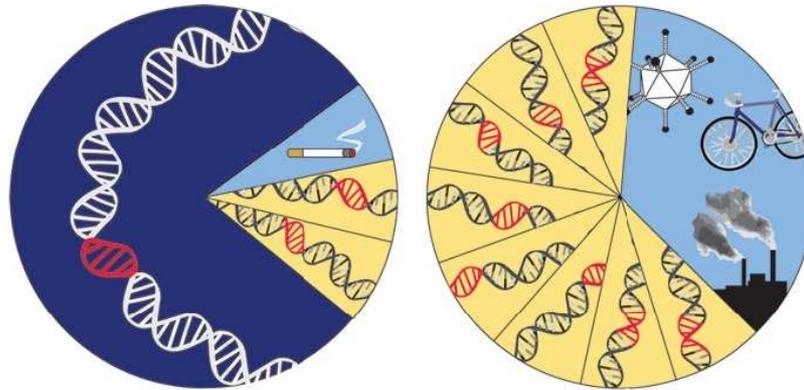


Abb. 1.1: Veranschaulichung der Beiträge umweltbedingter und genetischer Faktoren zur Krankheitsentstehung von monogenetischen und komplexen Erkrankungen. Auf dem linken Schaubild wird eine monogenetische Krankheit gezeigt. Hierbei ist eine Variante in einem einzigen Gen die primäre Determinante der Erkrankung (dunkelblauer Bereich). Die Einflüsse anderer modifizierender Gene (gelbe Bereiche) und der Umwelt (hellblauer Bereich) auf die Krankheitsentstehung sind gering. Im rechten Schaubild sieht man eine komplexe Erkrankung, bei der viele Varianten mit kleinem Effekt (gelbe Bereiche) und zahlreiche Umweltfaktoren (hellblauer Bereich) zur Pathogenese beitragen (Manolio et al., 2008).

1.2 Morbus Parkinson: genetischer Hintergrund

In seinem *Essay on the Shaking Palsy* beschrieb der Londoner Arzt James Parkinson 1817 ein bis dahin nicht dokumentiertes Krankheitsbild, das er als *paralysis agitans* (Schüttellähmung) bezeichnete (Parkinson, 2002). Erst zum Ende des 19. Jahrhunderts beschäftigte sich der Pariser Neurologe Jean-Martin Charcot erneut mit dem von Parkinson beschriebenen Syndrom. Charcot führte die Bezeichnung, *maladie de Parkinson* in die Literatur ein (Goetz et al., 2001). Aus epidemiologischer Sicht ist der MP nach dem Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Mit zunehmendem Alter zeigt sich eine vermehrte Prävalenz.

Bei über 65-Jährigen liegt diese laut einer europaweiten Studie bei 1,6 Prozent, bei den über 80-Jährigen beträgt die Prävalenz bis zu 3,5 Prozent (de Rijk et al., 1995).

Das neuropathologische Korrelat des MP ist die selektive Degeneration dopaminerger Neurone im Mittelhirn, insbesondere in der *Pars compacta* der *Substantia nigra* (Braak et al., 2000). Der daraus resultierende Mangel an Dopamin im nigrostriatalem System führt zu Dysbalancen in den Funktionen der Basalganglien. Letztlich kommt es daher zu einer Überfunktion des medialen Pallidums, eines bewegungsinhibierenden Teils der Basalganglien (Crossman, 2000).

Die Leitsymptome eines MP sind: Bradykinese, Ruhetremor, Rigor und posturale Instabilität. Als erstes Symptom zeigt sich meist die Bradykinese. Aktivitäten des täglichen Lebens werden von den betroffenen Patienten verlangsamt ausgeführt. Der Ruhetremor tritt oft mit einer Frequenz von vier bis sechs Hertz an einer der Extremitäten auf. Bei der Prüfung des Muskeltonus ist dieser oft erhöht, man spricht vom Rigor. In der Regel zeigt sich die posturale Instabilität, also der Verlust der Haltereфлекse, erst nach anderen Symptomen (Jankovic, 2008).

Um eine theoretische Einordnung der Krankheit vorzunehmen, ist es wichtig, zwischen den Begriffen Parkinson-Syndrom und MP zu differenzieren. Bei dem Terminus Parkinson-Syndrom handelt es sich um einen Sammelbegriff. Dieser umfasst Bewegungsstörungen verschiedener Ätiologien, die den Symptomkomplex: Bradykinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität gemeinsamen haben.

Nach dieser Definition ist der Morbus Parkinson mit etwa 75 Prozent die häufigste Form des Parkinson-Syndroms. Aufgrund der unbekanntes Ätiologie wird der klassische MP auch als idiopathisches Parkinson-Syndrom bezeichnet. Liegt dem klinischen Bild jedoch eine bestimmbar äußere Ursache zu Grunde, wie dies zum Beispiel bei dem durch Neuroleptika induzierten Parkinson-Syndrom der Fall ist, spricht man von sekundären Formen des Parkinson-Syndroms.

Als atypische Parkinson-Formen oder auch Parkinson-Plus-Syndrome bezeichnet man Erkrankungen, die neben anderen Symptomen das klinische Bild eines Parkinson-Syndroms aufweisen. Fortschritte der Genetik ermöglichten zusätzlich die Identifizierung monogenetischer familiärer Parkinson-Syndrome, die einen Paradigmenwechsel in der Forschung zur Folge hatten.

Bis Anfang der 1990er Jahre ging man von einer nicht genetischen Ätiologie des MP aus. Untersuchungen festigten diese Ansicht, weil Studien mit eineiigen Zwillingen keine übereinstimmenden Erkrankungen zeigten (Duvoisin et al., 1981). Ein Umdenken in der Forschung erfolgte nachdem vor etwa 15 Jahren verschiedene Gene als Ursache von familiären Formen des Parkinsons identifiziert werden konnten. Als erste identifizierten 1997 Polymeropoulos et al. eine autosomal-dominant vererbte Form des Parkinson-Syndroms mit einer Mutation im α -Synuclein-Gen (Polymeropoulos, 1997).

Weitere identifizierte Loci und Gene wurden unter dem Kopfwort *PARK* zusammengefasst (vgl. Tabelle 1.1). Bis dato konnten 18 genetische Loci (*PARK1-18*) mit autosomal-dominanten, autosomal-rezessiven und X-chromosomalen Vererbungsmuster identifiziert werden.

Bei sieben dieser Loci (*PARK1*(=4), 3, 5, 8, 13, 17 und 18) zeigt sich eine autosomal-dominante Vererbung. *PARK2*, 6, 7, 9, 14 und 15 werden autosomal-rezessiv vererbt, *PARK12* X-chromosomal. Bei *PARK10*, 11 und 16 ist der Vererbungsmodus bislang unbekannt. Es handelt sich am ehesten um Risikovarianten (Suszeptibilitätsloci). Für 13 der 18 Loci konnte das krankheitsverursachende Gen identifiziert werden.

Dies sind: α -Synuclein (*SNCA*) (*PARK1*), *Parkin* (*PARK2*), *Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L1* (*UCH-L1*) (*PARK5*), *PTEN induzierte Kinase-1* (*PINK1*) (*PARK6*), *DJ-1* (*PARK7*), *Leucine-rich repeat kinase 2* (*LRRK2*) (*PARK8*), *ATP13A2* (*PARK9*) *Grb10-Interacting GYF Protein 2* (*GIGYF2*) (*PARK11*), *HtrA Serin Peptidase 2* (*Omi/HtrA2*) (*PARK13*), *PLA2G6* (*PARK14*), *FBXO7* (*PARK15*), *VPS35* (*PARK17*) und *EIF4G1* (*PARK18*)

Tabelle 1.1 Übersicht der *PARK*-Gene und Suszeptibilitätsloci

Akronym (<i>Gen</i>)	Region	Erbgang	Referenzen
<i>PARK1/PARK4 (SNCA)</i>	4q21	dominant	(Polymeropoulos, 1997) (Singleton et al., 2003)
<i>PARK2 (Parkin)</i>	6q25	rezessiv	(Kitada et al., 1998)
<i>PARK3</i> (n.b.)	2p13	dominant	(Gasser et al., 1998)
<i>PARK5 (UCH-L1)</i>	4p14	dominant	(Leroy et al., 1998)
<i>PARK6 (PINK1)</i>	1p35-36	rezessiv	(Valente et al., 2004)
<i>PARK7 (DJ-1)</i>	1p36	rezessiv	(Bonifati et al., 2003)
<i>PARK8 (LRRK2)</i>	12q12	dominant	(Paisan-Ruiz et al., 2004) (Zimprich et al., 2004)
<i>PARK9 (ATP13A2)</i>	1p36	rezessiv	(Ramirez et al., 2006)
<i>PARK10</i> (n.b.)	1p32	n.b.	(Hicks et al., 2002)
<i>PARK11 (GIGYF2)</i>	2q36-37	n.b.	(Pankratz et al., 2002) (Pankratz et al., 2003) (Lautier et al., 2008)
<i>PARK12</i> (n.b.)	Xq21-25	X-chromosomal	(Pankratz et al., 2003)
<i>PARK13 (Omi/HtrA2)</i>	2p12	dominant	(Strauss et al., 2005)
<i>PARK14 (PLA2G6)</i>	22q12-13	rezessiv	(Paisan-Ruiz et al., 2009)
<i>PARK15 (FBXO7)</i>	22q12-13	rezessiv	(Shojaee et al., 2008)
<i>PARK16</i> (n.b.)	1q32	n.b.	(Satake et al., 2009)
<i>PARK17 (VPS35)</i>	16q12	dominant	(Vilarino-Guell et al., 2011)
<i>PARK18 (EIF4G1)</i>	3q27	dominant	(Chartier-Harlin et al., 2011)

n.b. = nicht bekannt

Es wird vermutet, dass etwa fünf bis zehn Prozent aller MP-Fälle auf eines der *PARK*-Gene zurückzuführen sind (Lesage und Brice, 2009). Mutationen im *LRRK*-Gen (*PARK8*) sind hierbei die häufigste Ursache für dominante familiäre Formen des Parkinson-Syndroms. Die betroffenen Patienten erkranken typischerweise nach dem 50. Lebensjahr. Klinisch ist eine Abgrenzung zur sporadischen Form des MP kaum möglich (Haugarvoll et al., 2008). Nicht alle familiären Parkinson-Syndrome sind jedoch mit dem klassischen klinischen Bild des MP identisch.

Bei Patienten mit einer Mutation im *PINK1* oder *Parkin*-Gen beginnt die Krankheit charakteristischerweise bereits zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Dabei schreitet die Krankheit allerdings langsamer voran als bei der idiopathischen Form (Marongiu et al., 2008). Die Heterogenität des klinischen Bildes der familiären Parkinson-Formen wird vor allem am Beispiel von Mutationen im *PARK9*-Gen deutlich. Betroffene Patienten weisen neben den typischen Symptomen weitere neurologische Beeinträchtigungen auf. Auf dieses als Kufor-Rakeb-Syndrom bezeichnete Krankheitsbild wird aufgrund der Relevanz für diese Arbeit gesondert eingegangen.

1.3 Kufor-Rakeb-Syndrom

1994 berichteten Najim Al-Din et al. von einer Verwandtenehe im jordanischen Dorf Kufor Rakeb. Die Nachkommen zeigten eine ausgeprägte Parkinson-Symptomatik mit starker Hypokinese und Rigor. Neben diesen extrapyramidalen Symptomen wiesen die Patienten eine supranukleäre Blickparese sowie Pyramidenbahnzeichen auf.

Die Krankheit manifestierte sich nach einer zunächst unauffälligen motorischen Entwicklung. Bei den fünf betroffenen Individuen zeigten sich etwa ab dem 13. Lebensjahr erste Symptome. Gewohnte Aktivitäten und Abläufe verlangsamten sich. Die Krankheit verlief progressiv, innerhalb von sechs bis zwölf Monaten kam es bei den Patienten zu erheblichen motorischen und kognitiven Einschränkungen, sodass alle Patienten ans Bett gebunden waren. Die Behandlung mit L-Dopa verminderte bei allen Erkrankten die extrapyramidalen Symptome deutlich.

Mit zunehmender Behandlungsdauer entwickelten die Patienten für L-Dopa typische Nebenwirkungen wie Dyskinesien. Benannt nach dem Heimatdorf der betroffenen Familie, ging der beschriebene Phänotyp als Kufor-Rakeb-Syndrom (KRS) in die Literatur ein (Najim al-Din et al., 1994).

Im weiteren Krankheitsverlauf wurden die Patienten erneut neurologisch untersucht. Minimyoklonien, die im Gesichts- Schlund- und Fingerbereich auftraten und visuelle Halluzinationen wurden beobachtet, ansonsten zeigte sich ein ähnlicher Phänotyp wie bei der klinischen Erstevaluation. Somit ist anzunehmen, dass ein Großteil der neurologischen Schäden in den ersten Monaten der Krankheit entstehen (Williams et al., 2005). Bildgebende Verfahren zeigten bei KRS-Patienten eine generalisierte Hirnatrophie (Bruggemann et al., 2010) (vgl. Abb. 1.2).

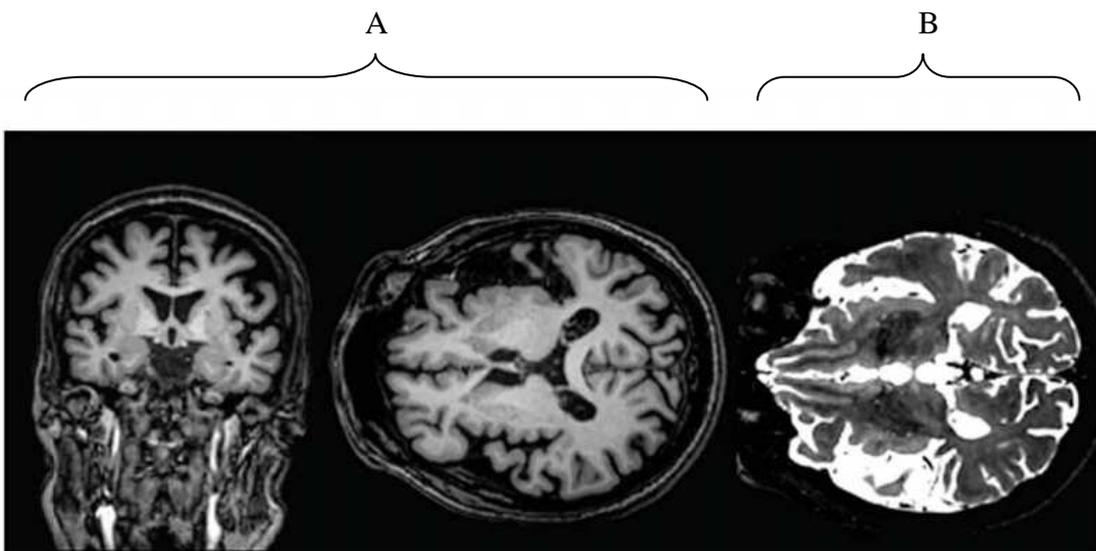


Abb. 1.2: (A) Links sind T1-gewichtete koronare und axiale Magnetresonananzbilder des Gehirns eines 14-jährigen Patienten mit KRS zu sehen. Bei dem *compound*-heterozygoten Mutationsträger stellt sich eine generalisierte Hirnatrophie dar. (B) Die axiale T2*-gewichtete Aufnahme zeigt eine vermehrte bilaterale Eisen-Akkumulation im *Nucleus caudatus* und *Putamen*. Die Darstellung folgt der neurologischen Konvention (der rechte Bildteil entspricht der rechten Seite des Gehirns) (Bruggemann et al. 2010).

Das krankheitsverursachende Gen für das autosomal-rezessiv vererbte Syndrom konnte später auf den Locus 1p36 eingrenzt werden. Dieser Genlocus wird seitdem *PARK9* genannt (Hampshire et al., 2001).

Die genetische Ursache des KRS konnte schließlich anhand einer aus Chile stammenden Familie aufgeklärt werden. Sowohl in der chilenischen als auch in der jordanischen Familie konnten bei den erkrankten Personen Mutationen im *ATP13A2*-Gen nachgewiesen werden. In der jordanischen Familie lag eine homozygote *ATP13A2*-Mutation vor (c.1632_1653dup22). Die chilenischen Patienten waren *compound*-heterozygot. Damit wiesen sie zwei *ATP13A2* Mutationen (c.3057delC bez. c.1306+5G→A) auf.

Das krankheitsverursachende *ATP13A2*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des ersten Chromosoms (1p36). Das Gen schließt 26 Kilobasen ein und besitzt 29 Exons. Das Genprodukt von *ATP13A2* ist eine lysosomal lokalisierte P-Typ-V-ATPase, die ubiquitär exprimiert wird. Die stärkste Proteinexpression lässt sich im Gehirn nachweisen. Auch in der *Substantia nigra Pars compacta* konnte die Expression von *ATP13A2* gezeigt werden. Sowohl die Funktion als auch die Substratspezifität sind derzeit unbekannt (Ramirez et al., 2006). Die lysosomale Lokalisation des Proteins lässt jedoch eine Beteiligung bei zellulären Degradierungsprozessen, wie dies für andere PARK-Gene beschrieben ist, vermuten (Narendra et al., 2008).

Nach den Informationen der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) gibt es mindestens drei Isoformen des Proteins, die beim Menschen exprimiert werden. Isoform-1 zeichnet sich durch zehn Transmembrandomänen aus.

Die Isoform-1 besteht aus 1180 Aminosäuren und hat damit ein molekulares Gewicht von etwa 130 Kilodalton. Isoform-2 unterscheidet sich von der ersten lediglich durch eine fünf Aminosäuren umfassende Deletion in der Nähe des N-Terminus, die keinen Einfluss auf den Leserahmen hat. Die Isoform-3, die 1158 Aminosäuren beinhaltet, weist verglichen mit der Isoform-1 größere Unterschiede auf: erstens eine *downstream* gelegene Deletion von 117 Basen, die das Leseraster nicht verschiebt und zweitens eine weitere 170 Basen umfassende Deletion mit Verschiebung des Leserasters. Diese Verschiebung führt zu einem stark veränderten C-Terminus des Proteins. So fehlt der Isoform-3 das Exon 28 (Pruitt et al., 2012).

Bis heute wurden außer bei den erkrankten Angehörigen der chilenischen und jordanischen Familien noch bei weiteren Individuen unterschiedlicher Ethnien Mutationen im *ATP13A2*-Gen nachgewiesen. Einen klinischen Überblick bietet die Tabelle 1.2.

Tabelle 1.2 Klinische Befunde der Patienten mit KRS

Familienherkunft Homozygotie/ Heterozygotie	chinesisch <i>compound- heterozygot</i>	japanisch homozygot	Chilenisch <i>compound- heterozygot</i>	jordanisch homozygot	brasilianisch homozygot	italienisch homozygot	afghanisch homozygot	pakistanisch homozygot	inuit homozygot
Mutation	c.3176T>G/ c.3253delC	c.546C>A	c.3057delC/ c.1306+5G→A	c.1632_1653dup22	c.1510G>C	c.2629G>A	c.2742_2743delTT	c.1103–1104insGA	c.2473C>AA
Referenzen	(Park et al., 2011)	(Ning et al., 2008)	(Ramirez et al.,2006) (Behrens et al., 2010)	(Williams et al., 2005)	(Di Fonzo et al., 2007)	(Santoro et al., 2011)	(Crosiers et al., 2011)	(Schneider et al., 2010)	(Eiberg et al., 2012)
Alter bei Krankheitsbeginn	17	22	12-18	12-15	12	10	10	16	10-29
Initiale Symptome	Soziale Angststörung	Gangstörung	Bradykinese, Rigor	Bradykinese, Rigor	Bradykinese	Gangstörung	Verlangsamte Handschrift	Bradykinese, Rigor	Gangstörung
Erhöhter Tonus	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Babinski-Zeichen	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Bradykinese	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tremor	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Rigor	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Minimyoklonien	+	+	+/-	+	-	+	+	+	+
Supranukleäre Blickparese	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Pyramiden- bahnzeichen	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kognitive Beeinträchtigung/ Demenz	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Halluzinationen	-	+	+	+	+	-	+	-	+/-
L-Dopa Responsivität	ja	Ja	inkonsistente Responsivität	ja	ja	ja	ja	ja	k.A.
Bildgebung	MRT normal	MRT diffuse zerebrale/spinale Atrophie	MRT leichte diffuse Hirnatrophie	MRT generalisierte Hirnatrophie	CT diffuse Hirnatrophie	MRT diffuse Hirnatrophie	MRT normal	MRT generalisierte Hirnatrophie	MRT normal bis leichte Hirnatrophie

k.A. = keine Angabe

1.4 Suszeptibilitätslocus *PARK16*

Die Suche nach genetischen Varianten, die zur Krankheitsentstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms beitragen, ist neben der Charakterisierung monogenetischer Parkinson-Syndrome - wie dem KRS - ein weiterer Schwerpunkt der Parkinson-Forschung. Assoziationsstudien sind der gängigste Ansatz, um genetischen Varianten aufzudecken, die Einfluss auf die Pathogenese, den Erkrankungsbeginn, die Penetranz oder den Verlauf der Krankheit nehmen. Mit dieser Methode werden häufig auftretende Varianten bei verschiedenen Individuen untersucht. In der Regel handelt es sich dabei um sogenannte *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), Variationen eines einzelnen Basenpaares in der DNA. Diese Polymorphismen sind zum Großteil für die Vielfalt im menschlichen Genom verantwortlich (Shastry, 2009). Somit werden bei Assoziationsstudien die Häufigkeiten potentieller Risikoallele von Patienten- und Kontrollkollektiven miteinander verglichen. Je mehr Risikovarianten vorhanden sind, desto höher ist die Suszeptibilität (Anfälligkeit) für die Krankheit.

Neue Verfahren wie die DNA-*Microarray*-Technologie haben es der Forschung in den vergangenen Jahren erleichtert, genomweite Assoziationsstudien durchzuführen. So konnten zahlreiche Kandidatengene untersucht werden. Bei den meisten dieser Gene konnte jedoch eine Assoziation mit MP in weiterführenden Untersuchungen nicht repliziert werden. Mögliche Ursachen für diese Unstimmigkeiten sind zum Beispiel zu kleine Kollektive oder andere verzerrende Störgrößen wie Stratifizierungen innerhalb der untersuchten Population. Über 800 Assoziationsstudien für die idiopathische Form des MP wurden bis dato publiziert (Lill et al., 2012).

In einer dieser Assoziationsstudien konnte in einem japanischen Kollektiv eine Assoziation mehrerer SNPs mit dem Locus 1q32 und dem idiopathischen Parkinson-Syndrom gezeigt werden. Dieser neue Suszeptibilitätslocus von genomweiter Signifikanz wurde als *PARK16* bezeichnet (Satake et al., 2009). Eine weitere genomweite Studie bestätigte diese Assoziation auch bei einer europäischen Population (Simon-Sanchez et al., 2009).

1.5 Spleißen und *Nonsense-mediated mRNA decay*

Seit die Sequenz des humanen Genoms entschlüsselt wurde, ist bekannt, dass es etwa 23000 Gene enthält, die die Proteine kodieren (Venter et al., 2001). Verglichen mit anderen weniger komplexen Organismen ist diese Zahl relativ gering. Beispielsweise konnten bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* circa 20000 Gene identifiziert werden (Plasterk, 1999).

Dieser Widerspruch zwischen der Komplexität eines Organismus und der Anzahl der Gene erweckte ein erhöhtes Interesse am Spleißprozess, insbesondere am alternativen Spleißen. Beim Spleißen handelt es sich um eine Prozessierung der RNA. Die noch Introns und Exons enthaltende prä-mRNA wird so bearbeitet, dass die Introns entfernt und die verbleibenden Exons aneinandergesetzt werden.

Man unterscheidet zwischen konstitutivem und alternativem Spleißen. Im Gegensatz zum konstitutiven Spleißen werden beim alternativen Spleißen nicht die gängigen Exon-Intron-Relationen eingehalten. Es kann zum Überspringen von Exons (*Exon-Skipping*), dem Beibehalten von Introns oder dem Benutzen unterschiedlicher 5' oder 3' Spleißstellen kommen. Das alternative Spleißen befähigt den Organismus, aus einer prä-mRNA verschiedene mRNAs herzustellen. Dies trägt somit zu einer vermehrten Proteindiversität bei (Cartegni et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Transkription in etwa 95 Prozent der Fälle zum alternativen Spleißen kommt (Pan et al., 2008).

Für den Vorgang des Spleißens ist das Spleißosom, ein aus snRNAs und verschiedenen Proteinen bestehender Komplex, wichtig. Es hat zwei Funktionen: Das Erkennen von Spleißstellen und die Katalyse der Reaktionen, die zu dem Herausschneiden der Introns und dem Aneinanderfügen der Exons führen. Kennzeichnend für Spleißstellen sind konservierte Nukleotid-Sequenzen, die die Interaktion mit dem Spleißosom ermöglichen. Die Effizienz des Spleißprozesses hängt neben den übereinstimmenden Nukleotidsequenzen zwischen Spleißosom und Spleißstelle von zusätzlichen Regulationselementen ab.

Diese beeinflussen das Erkennen einer Sequenz als Spleißstelle positiv oder negativ. Entsprechend ihres Effekts und ihrer Lokalisation spricht man von *exonic splicing enhancers/silencers* oder *intronic splicing enhancers/silencers*. Viele dieser Motive üben ihren Einfluss durch Interaktionen mit Proteinen aus. So konnte für zahlreiche *exonic splicing enhancer* (ESE)-Motive nachgewiesen werden, dass sie Serin/Arginin-reiche Proteine (SR) binden (Blencowe, 2000).

Diese Proteinfamilie besteht aus einer Reihe von Polypeptiden, die in der Phylogenese stark konserviert wurden. Viele SR-Proteine sind sowohl beim konstitutiven, als auch beim alternativen Spleißen von Bedeutung. So können SR-Proteine, die an ESE-Sequenzen binden, über ihre charakteristische Serin/Arginin-reiche Domäne mit anderen Proteinen der Spleißmaschiene interagieren und so in den Spleißprozess regulierend eingreifen (Long und Caceres, 2009).

Da es sich beim Spleißen um einen hochkomplexen Vorgang handelt, gibt es zelluläre Kontrollmechanismen, die die Qualität der mRNA sicherstellen sollen. Ein protektiver Mechanismus, bei dem defekte mRNA abgebaut wird, ist der *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Hierbei werden *nonsense*-Mutationen in der mRNA erkannt und die fehlerhafte mRNA abgebaut. Dies geschieht, um die Zelle vor trunkeierten und damit möglicherweise in ihrer Funktion eingeschränkten bzw. toxischen Proteinen zu schützen (Maquat, 2004).

1.6 Zielsetzung und Hypothesen

Diese Arbeit besteht aus zwei unabhängigen Teilen: Der erste Teil befasst sie sich mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom **auf genetischer Ebene**.

Durch die Realisierung einer Assoziationsstudie sollte der Suszeptibilitätslocus *PARK16* (vgl. Abschnitt 1.4) in einer Population mit einem multiethnischen Hintergrund charakterisiert werden. Hierzu wurde eine Fall-Kontroll-Studie in einem chilenischen Kollektiv durchgeführt. Bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom und gesunden Kontrollprobanden wurde die Genotypfrequenz zweier SNPs des Suszeptibilitätslocus *PARK16* bestimmt. Die Nullhypothese war, dass kein Zusammenhang zwischen den Genotypfrequenzen der SNPs und dem idiopathischen Parkinson-Syndrom besteht. Entsprechend ging die Alternativhypothese von einem Zusammenhang aus.

Der zweite Teil dieser Arbeit wendet sich dem familiären Parkinson-Syndrom KRS auf der **Ebene der RNA-Expression** zu.

Der Phänotyp des KRS ist zum einen per se durch die *loss of function* von ATP13A2 zu erklären. Zum anderen könnte jedoch eine Anhäufung von Proteinen toxisch für die Zelle sein. Daher wurde für diesen Teil der Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Störungen zellulärer Abbaumechanismen eine Überladung der Zelle mit mutiertem ATP13A2 zur Folge haben könnten.

Um den Pathomechanismus der Erkrankung näher zu charakterisieren, wurde eine Expressionsanalyse des krankheitsverursachenden *ATP13A2*-Gens in Hautfibroblasten von drei KRS-Patienten durchgeführt. Im Rahmen dieser Expressionsanalyse interessierte insbesondere, welche Bedeutung den Mechanismen NMD und alternatives Spleißen bei Mutationsträgern zukommt.

2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten der Assoziationsstudie

364 Personen chilenischer Herkunft bildeten das Kollektiv der Assoziationsstudie. Hierunter waren 195 gesunde Kontrollindividuen und 169 Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom. Alle beteiligten Patienten gaben nach vorheriger Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis. Die Untersuchungen wurden von den lokalen Ethikkommissionen genehmigt.

In Schwerpunktzentren für Bewegungsstörungen in Santiago de Chile und in Concepción wurde das idiopathische Parkinson-Syndrom anhand der *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank Criteria* (Gibb und Lees, 1988) diagnostiziert. Von den 169 rekrutierten Patienten waren 83 (49,1 %) männlich und 86 (50,9 %) weiblich. Zum Zeitpunkt des Einschlusses betrug das Durchschnittsalter 68 Jahre mit einer Standardabweichung von 11,4 Jahren. Das mittlere Erkrankungsalter der Patienten lag bei 60 Jahren, mit einer Standardabweichung von 11,5 Jahren.

Die Gruppe der Kontrollindividuen setzte sich aus gesunden Freiwilligen zusammen, die aus denselben Regionen stammten wie die Patienten. Um neurologische Erkrankungen bei den Kontrollpersonen auszuschließen, wurden sie zuvor neurologisch untersucht. 62 (31,8 %) der Kontrollindividuen waren Männer, 133 (68,2 %) Frauen. Das Durchschnittsalter aller Kontrollen lag bei 66 Jahren, die Standardabweichung betrug 10,8 Jahre.

In Chile erfolgte die unmittelbare Isolierung der DNA aus dem Vollblut der Studienteilnehmer. Anschließend wurden die bei -80 Grad Celsius gelagerten Proben für die genetischen Untersuchungen nach Deutschland geschickt. Hier wurden die Proben vom Autor der vorliegenden Dissertation erstmalig bearbeitet.

2.2 Patienten der Expressionsanalyse

Für die Expressionsanalyse wurden durch Park et al., Ramirez et al. sowie Crosiers et al. drei KRS-Patienten nach deren schriftlichem Einverständnis Hautbiopsien entnommen und daraus jeweils Hautfibroblastenzelllinien hergestellt. Alle drei nicht miteinander verwandten Patienten hatten eine ausgeprägte klinische Symptomatik des KRS-Syndroms. In der Tabelle 2.1 sind klinische Daten der Patienten zusammengefasst.

Zwei der drei Patienten (aus Gründen der Anonymität PARK9-1 und PARK9-2 genannt), tragen *compound*-heterozygote Mutationen im *ATP13A2*-Gen. Der Patient PARK9-1 trägt eine *missense*-Mutation (c.3176T>G) sowie eine Deletion eines Cytosins (c.3253delC). Die Deletion hat die Verschiebung des Leserasters zur Folge, wodurch es zu einem vorzeitigen Stopcodon kommt (Park et al., 2011).

Gleichermaßen führt eine Deletion (c.3057delC) zu einem vorzeitigen Stopcodon beim Patienten PARK9-2. Außerdem ruft eine Guanin- zu Adenin-Transition (c.1036+5G>A), an der Donor-Spleißstelle, das Überspringen des Exons 13 hervor. (Ramirez et al., 2006). Der Patient PARK9-3 ist Träger einer homozygoten Mutation, eine Deletion zweier Thyminen (c.2552_2553delTT) (Crosiers et al. 2011).

Tabelle 2.1 Klinische Daten der KRS-Patienten der Expressionsanalyse

Patientenkennung	Park9-1		Park9-2		Park9-3
Homozygotie/Heterozygotie	<i>compound</i> -heterozygot		<i>compound</i> -heterozygot		homozygot
Mutation	c.3176T>G	c.3253delC	c.1036+5G>A	c.3057delC	c.2742_2743delTT
Intron- Exonposition	Exon 27	Exon 28	Intron 13	Exon 26	Exon 23
Mutationseffekt	<i>missense</i>	<i>frameshift/</i> trunkierend	Überspringen von Exon 13	<i>frameshift/</i> trunkierend	<i>frameshift/</i> trunkierend
Krankheitsbeginn	17		12		10
Erste Symptome	Soziale Angststörung		Bradykinese, Rigor		Bradykinese, Tremor
Supranukleäre Blickparese	+		+		+
Demenz	+		+		+
Psychiatrische Symptome	-		Halluzinationen		Halluzinationen
L-Dopa Responsivität	+		+		+

2.3 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Geräte und Software sind nachfolgend aufgeführt.

2.3.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
Accutase	PAA Laboratories
Acrylamid/Bisacrylamid	BioRad
Agarose	Biozym
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Merck
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Cycloheximid (C ₁₅ H ₂₃ NO ₄)	Alomone Labs
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Qbiogene
DNA Längenstandard (100 bp)	Invitrogen
Dithiothreitol (DTT)	Merck
<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> (DMEM)	PAA Laboratories
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	J.T.Baker
Ethidiumbromid (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
<i>ExoSAP-IT</i>	USB
fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
Formamid (CH ₃ NO)	Sigma-Aldrich
<i>LightCycler</i> -Sonden	Roche Diagnostics
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck
Oligonukleotide, <i>Primer</i>	TIB Molbiol
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories
phosphatgepufferte Salzlösung	PAA Laboratories
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase und Puffer	Qbiogene
Terminator-Mix v3.1	Applied Biosystemes
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	BDH

2.3.2 Kulturmedium, Puffer und Lösungen

	Zusammensetzung
Kulturmedium:	500 ml DMEM; 50 ml FKS; 5ml Penicillin/Streptomycin
TRIS-Borat-EDTA (TBE)- Puffer (10x):	890 mM TRIS; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA
Formamid-Farbstoff:	47,5 ml Formamid; 2,0 ml 0,5 M EDTA; 0,01 g Bromphenolblau; pH 8,0

2.3.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Probenplatten der Firma Sigma-Aldrich sowie Zellkulturflaschen und –schalen von Sarstedt wurden verwendet.

2.3.4 Kommerzielle Reagenziensysteme

Reagenziensystem	Hersteller
<i>Light Cycler DNA Master SYBR Green I</i>	Roche Diagnostics
<i>RNeasy Mini</i>	Qiagen
<i>Superscript First-Strand Synthesis</i>	Invitrogen

2.3.5 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Brutschrank	Hera Cell 150	Heraeus
Geldokumentationssystem	BioDocAnalyze	Biometra
<i>LightCycler</i>	LightCycler 480	Roche Diagnostics
Mikroskop	Axiovert 200 M	Zeiss
Nukleinsäuremessgerät	Nano Drop 1000	PeqLab
RT-PCR-System	Light Cycler 2.0	Roche Diagnostics
Sequenziergerät	3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems

Gerät	Typ	Hersteller
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf
	PTC 100 und PTC 200	Biozym
Zellzähler	Countess Cell Counter	Invitrogen
Zentrifugen	Biofuge Pico	Heraeus
	Microfuge 22R	Beckman Coulter

2.3.6 Software

In dieser Arbeit wurde die Software *Splice site prediction* eingesetzt, die vom *Berkeley Drosophila Genome Project* entwickelt wurde. Diese Arbeitsgemeinschaft bietet unter anderem Programme an, die es ermöglichen, DNA Bereiche näher zu charakterisieren. Im Speziellen hilft das Programm *Splice site prediction*, die Übergänge zwischen Introns und Exons innerhalb eines DNA-Abschnittes zu erkennen. Für mögliche Spleißstellen werden Werte zwischen 0,1 und 1,0 ermittelt. Die Spleißstelle ist umso stärker, je höher der Wert ist (Reese et al., 1997).

Des Weiteren wurde das Programm *ESEfinder 3.0* verwendet. Es ermöglicht, ESE-Sequenzen innerhalb eines Exons zu erkennen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, Mutationen, die ESE-Motive betreffen, zu identifizieren und den Einfluss dieser Mutationen auf verschiedene SR-Proteine darzustellen (Cartegni, 2003).

Außerdem wurde für die Auswertung der Sequenzierungen das Programm *Sequencing Analysis 5.3.1* verwendet. Für die Genotypisierung der SNPs wurde die im *Light Cycler* integrierte Software *Light Cycler 3 Software (Roche Diagnostics)* eingesetzt.

2.4 Methoden

2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine enzymatische Methode zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA (Saiki et al., 1985). Die Spezifität der Amplifikation ist auf zwei Oligonukleotide (*Primer*) zurückzuführen. Diese binden die DNA komplementär an den Randbereichen der Zielsequenz. Um den *Primern* die Bindung zu ermöglichen, muss die DNA bei 95 °C denaturiert werden. Nach Absenken der Temperatur auf 58 °C kommt es anschließend zur Primeranlagerung (*Annealing*). Die *Primer* lagern sich beim *Annealing* an die komplementären Einzelstränge, die durch die Denaturierung entstanden sind. Anschließend synthetisiert eine thermostabile Polymerase bei 72 °C die komplementäre DNA zwischen den *Primern*. Die Wiederholung dieser drei Schritte: Denaturierung, *Annealing*, Extension führt zu einer exponentiellen Zunahme der gewünschten Sequenz.

Nachfolgend ist schematisch der Ablauf einer PCR dargestellt. In der Tabelle 2.2 ist der Reaktionsansatz einer Standard-PCR wiedergegeben und im Anhang sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Primer* aufgeführt.

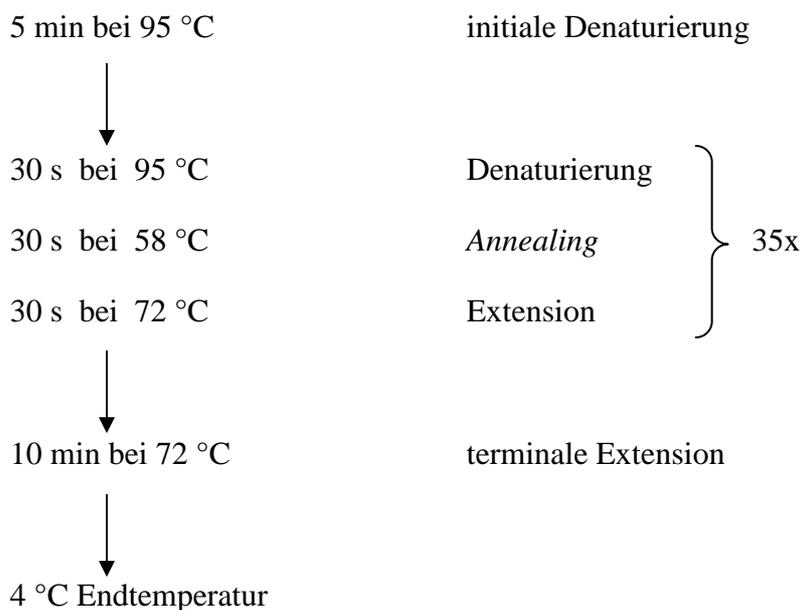


Tabelle 2.2 Reaktionsansatz für eine Standard-PCR

Reagenz	Konzentration	Volumen
dH ₂ O		3,83 µl
Puffer	10x	1,50 µl
dNTPs	1 mM	3,00 µl
Vorwärts- <i>Primer</i>	10 µM	0,80 µl
Rückwärts- <i>Primer</i>	10 µM	0,80 µl
<i>Taq</i>	5 U/µl	0,07 µl
DNA	~ 5 ng/µl	5,00 µl
Gesamt		Σ 15 µl

2.4.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren für Moleküle. Unter Einfluss eines elektrischen Feldes wandern die zu separierenden Moleküle dabei durch eine Matrix. Die elektrophoretische Wandergeschwindigkeit der Moleküle ist letztlich abhängig von Molekülgröße und -ladung sowie der Beschaffenheit der Matrix. Aufgrund ihrer negativen Ladung ist die elektrophoretische Auftrennung von DNA möglich. Abhängig von ihrer Größe wandert die DNA unterschiedlich weit.

Daher wurde die Agarose-Gelelektrophorese im Anschluss einer PCR zur Überprüfung der molekularen Größe eines PCR-Produktes im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Um die DNA sichtbar zu machen, wird dem Agarosegel Ethidiumbromid hinzugefügt. Dieser Farbstoff interkaliert mit den Basen der DNA. Bei Anregung im ultravioletten Bereich (365 nm) lassen sich rote DNA-Banden sichtbar machen. Die Banden wurden mit Hilfe einer Videokamera mit einem integrierten Bildverarbeitungsprogramm aufgenommen.

Das Mitlaufen eines definierten DNA-Längenstandards ermöglichte eine Aussage über die Größe der Fragmente.

Für die Agarose-Gelelektrophorese musste zunächst ein Gel hergestellt werden. Hierzu wurden 6 g Agarose in 400 ml 1x TBE (1,5-prozentig) suspendiert. Die Gelsuspension wurde aufgekocht und 7,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Danach wurde das Gel in eine Kammer mit ein oder zwei Kämmen gegossen. Nach der Zugabe von 1/3 Vol. Formamid-Farbstoff zu den Proben erfolgte das Pipettieren des Längenstandards und der Proben in die durch die Kämmen geformten Ladetaschen. Anschließend fand eine Elektrophorese für 30 min bei 120 V in 1x TBE-Puffer statt.

2.4.3 Schmelzkurvenanalyse

Für die Schmelzkurvenanalyse wurde der *LightCycler480*, ein Echtzeit-PCR-System, genutzt. Bei diesem Verfahren wird die Schmelztemperatur eines amplifizierten DNA-Fragments und einer daran hybridisierten Sonde ermittelt. Die Schmelztemperatur ist definiert als jene Temperatur, bei der 50 Prozent der Sonden hybridisiert und 50 Prozent dissoziiert an ihrer Zielsequenz vorliegen. Wichtige Parameter, die die Schmelztemperatur beeinflussen, sind unter anderem der Grad der Homologie zwischen Sonde und DNA-Fragment sowie die Länge und der CG-Gehalt der Sequenz. Wären die Sonde und der zugehörige DNA-Strang exakt komplementär, würde mehr Wärmeenergie zum Auflösen dieser Bindung notwendig. Ist dagegen die Sequenz beispielsweise durch einen SNP verändert, verringert sich die Schmelztemperatur.

Das bedeutet also, dass eine geringere ausgeprägte Homologie zwischen Sonde und DNA-Strang die Schmelztemperatur vermindert. Die bei dieser Methode eingesetzten Sonden sind sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide. Basierend auf dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) werden zwei Sonden benötigt: der *Sensor* und der *Anchor*.

Der *Sensor* trägt an seinem 3'-Ende den Farbstoff Fluorescein während der *Anchor* an seinem 5'-Ende mit einem spezifischen Farbstoff (LC640, LC705) ausgestattet ist.

Der *Sensor* ist so konzipiert, dass er mit der fraglich mutationstragenden Sequenz hybridisiert. Wird der *Sensor*-Farbstoff mit der Leuchtdiode des *LightCylers* angeregt, emittiert der am Sensor gebundene Farbstoff grünes Licht (530 nm). Während des *Annealings* der PCR bindet der *Sensor* die Zielsequenz. In unmittelbarer Nachbarschaft des *Sensors* hybridisiert der *Anchor* an den DNA-Einzelstrang. Das vom Farbstoff des *Sensors* emittierte Licht regt den *Anchor*-Farbstoff nun selbst zur Emission von rotem Licht der Wellenlänge 640 nm an. Dieser Prozess der Energieübertragung wird FRET genannt.

Dem *LightCycler* ist es möglich, das rote Licht zu detektieren. Weiteres Erwärmen der Probe führt zum Dissoziieren von der Zielsequenz. Die Fluoreszenz nimmt ab, je weiter sich die Sonden voneinander entfernen.

In Bezug auf die vorliegende Arbeit wurde die Schmelzkurvenanalyse mit Hilfe des *LightCylers* bei der Genotypisierung zweier SNPs des Locus 1q32 (*PARK16*) angewandt. Die Amplifikation der DNA erfolgte zunächst durch eine konventionelle PCR im *Thermocycler* (vgl. Abschnitt 2.4.1). Für jede Probe wurden 9 µl des PCR-Produktes mit je 0,5 µl der beiden Sonden zusammengegeben.

Nachfolgend schloss sich folgendes Programm an:

10 s bei 95° C // 6 Zyklen: (10 s bei 40° C; 10 s bei 95°) // 20 s bei 40° C // 40° C → 90° C // Endtemperatur bei 40° C.

Abschließend wurden die Schmelzkurven mit der Software des *LightCylers* ausgewertet. Die verwendeten Sonden sind im Anhang aufgelistet.

2.4.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung beruht auf dem enzymatischen Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977). Die hierbei im Reaktionsansatz enthaltenen 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTP) führen zum Kettenabbruch während einer PCR.

Die ddNTPs besitzen anstelle einer freien Hydroxylgruppe an der 3'-Position des Zuckerrestes lediglich ein H-Atom. Somit kann die Polymerase ohne freie Hydroxylgruppe keine Phosphodiesterbindung zum nächsten regulären Desoxynukleotid aufbauen. Folglich kommt es zum Erliegen der DNA-Synthese. Es entstehen bei der Kettenabbruchreaktion n viele PCR-Produkte, die sich nach Wahrscheinlichkeitsberechnungen genau um eine Basenlänge unterscheiden.

Um die Sequenz zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit fluoreszenzmarkierte Nukleotide verwendet. Wobei jedes ddNTP mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert war. Anhand automatischer gelelektrophoretischer Auftrennungen in einer Kapillare des Sequenziergerätes konnte mittels eines Lasers eine spezifische Farbabfolge ermittelt werden, die der Sequenz entspricht.

Vor Beginn der eigentlichen Sequenzierung erfolgte zunächst eine Amplifikation des Zielproduktes mit Hilfe der PCR (vgl. Abschnitt 2.4.1). Die nachfolgende Auftrennung auf einem Agarosegel diente der Größenkontrolle des PCR-Produktes (vgl. Abschnitt 2.4.2). Um eine Verunreinigung durch überschüssige Nukleotide und *Primer* auszuschließen, fand zur Aufreinigung eine *ExoSAP*-Behandlung statt. Bei diesem Enzymverdau wurden 5 μ l PCR-Produkt und 2 μ l *ExoSAP-IT* gemischt.

Anschließend lief in einem *Thermocycler* folgendes Programm ab:

15 min bei 37 °C // 15 min bei 80 °C // 4 °C bis zur Lagerung bei -20 °C.

Die eigentliche Kettenabbruchreaktion erfolgte nun in einer weiteren PCR unter Zugabe der fluoreszenzmarkierten ddNTPs.

1 min bei 96 °C // 25 Zyklen: (10 s bei 96 °C; 1 min bei 60 °C) // Endtemperatur 4 °C.

Im Folgenden sind das PCR-Programm und der Reaktionsansatz in der Tabelle 2.3 für die Sequenzierung dargestellt:

Tabelle 2.3 Reaktionsansatz für die Sequenzierung

Reagenz	Konzentration	Volumen
dH ₂ O		5,00 µl
Puffer	5x	1,50 µl
<i>Primer</i>	10 µM	0,50 µl
Terminator-Mix	20x	1,00µl
<i>ExoSAP</i> -Produkt	~ 5-10 ng/µl	2,00 µl
Gesamt		Σ 10 µl

Das Produkt des Sequenzierungsansatzes wurde anschließend durch eine Natriumacetat-Fällung aufgereinigt. Hierzu wurden 10 µl des PCR-Produkts, 10 µl dH₂O, 50 µl 100-prozentiges Ethanol und 2 µl 3 M Natriumacetat gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand abpipitiert und 50 µl 70-prozentiges Ethanol hinzugeben. Abschließend wurden 15 µl Formamid hinzugefügt und es folgte eine nächtliche Inkubation bei 4 °C. Am nächsten Tag fanden die Sequenzierung und die softwaregestützte Auswertung statt.

Für diese Arbeit wurden bei der Genotypisierung zweier SNPs des Locus 1q32 (*PARK16*) Proben, deren Genotyp nicht eindeutig durch die Schmelzkurvenanalyse bestimmt werden konnte, sequenziert. Weitere Sequenzierungen wurden bei der Expressionsanalyse von Hautfibroblasten bei KRS-Patienten vorgenommen (siehe Abschnitt 3.2).

Hierunter fallen: 1) die Verifizierung des Genotyps der Hautfibroblasten der drei KRS-Patienten in Abschnitt 3.2.1; 2) der Nachweis eines stabilisierenden Effekts von Cycloheximid auf die mutierten Allele in Abschnitt 3.2.3 und 3) im Abschnitt 3.2.5 die Untersuchung des allelspezifischen Anteils einer Spleißvariante beim Patienten PARK9-1.

2.4.5 RNA-Isolierung, c-DNA Synthese, quantitative Echtzeit-PCR

Die RNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des *RNeasy*-Kits. Die Zellen wurden zunächst mit einem Puffer, der Guanidiniumthiocyanat enthielt, lysiert. Dem Lysat wurde Ethanol hinzugefügt, um die Aufreinigung der RNA in den nachfolgenden Waschschriften zu erleichtern. Das nun ethanolhaltige Lysat wurde in die mitgelieferte Minisäule gegeben, die zur Bindung der RNA eine kiesegelhaltige Membran besaß. Nach mehreren Waschschriften, um Kontaminierungen auszuwaschen, konnte die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert werden.

Die isolierte RNA entsprach zum Zeitpunkt der Extraktion fast vollständig der in der Zelle enthaltenen mRNA. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die anderen RNA-Typen, die ungefähr 15-20 Prozent der gesamten zellulären RNA ausmachen, bei dem verwendeten Verfahren aufgrund ihrer zu geringen Größe nicht isoliert wurden. Direkt im Anschluss konnte die Konzentration der RNA photometrisch bei einer Wellenlänge von 230 nm bestimmt werden.

Aufgrund der im Lambert-Beerschen Gesetz beschriebenen proportionalen Beziehung zwischen Lichtabsorption und Konzentration ist die photometrische Bestimmung der Menge an Nukleinsäuren möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RNA von drei Patienten- (vgl. Abschnitt 2.2) sowie vier gesunden Kontrollzelllinien isoliert.

Nachdem die RNA erfolgreich isoliert war, konnte mit der reversen Transkription der RNA fortgefahren werden. Das Umschreiben der RNA in die komplementäre, einzelsträngige cDNA fand gemäß dem Herstellerprotokoll mit Hilfe des *SUPERSCRIPT™ First-Strand Synthesis*-Kits statt. Hierbei ermöglichten Oligo-Desoxythymidin (dT)-*Primer* die Bindung an den Poly-A-Schwanz der mRNA.

Im Folgenden sind die Reaktionsansätze aufgelistet:

Tabelle 2.4 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese: Mix 1

Reagenz	Konzentration	Volumen
Rnase-freies H ₂ O		ad 10 µl
RNA	5 µg/µl	x µl (Volumen für 5 µg)
dNTP-Mix	10 mM	1 µl
Oligo- <i>Primer</i> (dT)	50 µM	1 µl
Gesamt		Σ 10,00µl

Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Zugabe von RNA hergestellt. Nachfolgend wurden die Ansätze für 5 min bei 65 °C denaturiert und für 1 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Mix 2.

Tabelle 2.5 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese: Mix 2

Reagenz	Konzentration	Volumen
<i>RNaseOUT</i>	40 U/µl	1 µl
DTT	0.1 M	2 µl
MgCl ₂	25 mM	4 µl
RT-Puffer	10x	2 µl
Gesamt		Σ 10,00µl

Die 9 µl des Mix 2 wurden zu jedem Mix 1 hinzugegeben. Nachdem die Proben behutsam gemischt und kurz zentrifugiert waren, fand eine zweiminütige Inkubation der Reaktionsansätze bei 42 °C statt. Die reverse Transkription wurde nun durch die Zugabe von 1 µl reverser Transkriptase (*SUPERSCRIPT II RT*) gestartet:

50 min bei 42 °C // 15 min bei 70 °C.

Zur abschließenden Degradierung des RNA-Templates wurde zu jedem Reaktionsansatz 1 µl RNase H hinzugegeben. Es schloss sich eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C an. Die hergestellte cDNA konnte entweder bei –20 °C eingefroren oder direkt anschließend für die quantitative Echtzeit-PCR (RT-PCR) verwendet werden.

Die RT-PCR ist ein Verfahren, das sowohl die DNA-Amplifikation als auch die gleichzeitige Quantifizierung der Nukleinsäuren erlaubt. Die RT-PCR Experimente wurden am *Light Cycler 2.0* einem RT-PCR-System mit dem *Light Cycler DNA Master SYBR Green I* Kit durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green* bildet hierbei einen Komplex mit einem DNA-Doppelstrang. Dieser DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert Licht mit der Wellenlänge 521 nm. Zur Quantifizierung der DNA-Menge dienen Fluoreszenzmessungen nach jedem Zyklus der PCR.

Wenn man die Fluoreszenzintensität über die Anzahl der PCR-Zyklen aufträgt, weist die Kurve einen s-förmigen Verlauf auf. Nur zu Beginn ergibt sich ein nahezu linearer Kurvenverlauf. Lediglich an dieser Stelle ist es möglich, eine quantitative Aussage über die DNA-Menge zu treffen. Ein Rückschluss auf die DNA-Konzentration ist über DNA-Standards bekannter Konzentrationen gegeben.

Ein Reaktionsansatz enthielt 10µl: jeweils 1µl des Vorwärts- bzw. Rückwärts-*Primers*, 2µl *SYBR Green Supermix*, 2µl cDNA sowie 4µl H₂O.

Folgendes PCR-Programm schloss sich an:

10 min bei 95 °C // 40 Zyklen: (94 °C 15 s; 68 °C 60 s).

Im Anschluss an den letzten Elongationsschritt der PCR erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Die RT-PCRs wurden zur Bestimmung des endogenen Expressionsniveaus von *ATP13A2* in Hautfibroblasten durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden zwei voneinander unabhängige RNA-Präparationen eines jeden Probanden herangezogen.

Zwei Fragmente, die die Exons 6-7 bzw. 16-17 umfassten, wurden amplifiziert. Um vergleichende Aussagen zu ermöglichen, wurde außerdem die Expression des konstitutiv exprimierten Gens *YWHAZ* bestimmt. Die Linearität der Proben wurde über Verdünnungsreihen bekannter cDNA-Konzentrationen sichergestellt. Die Datenanalyse erfolgte unter Anwendung der *Light Cycler 3 Software (Roche Diagnostics)*.

Zur Bestätigung der mit dem konstitutiv exprimierten Gen *YWHAZ* gemachten Ergebnisse wurden die Experimente mit einem anderen unabhängigen konstitutiv exprimierten Gen (*HPRT1*) wiederholt. Da das Expressionsniveau beider *ATP13A2* Fragmente (Exon 6-7 bzw. Exon 16-17) in den ersten RT-PCR Experimenten mit *YWHAZ* als Referenz keine signifikanten Unterschiede zeigte, wurde zur Bestätigung lediglich das Fragment mit den Exons 6-7 amplifiziert und quantifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit war es notwendig, verschiedene Spleißvarianten von *ATP13A2* gezielt zu amplifizieren und zu quantifizieren. Für die Spleißvariante A13A2.FL wurde ein, die Exons 28-29, umfassendes Fragment hergestellt.

Um jedoch die Variante A13A2.Sk gezielt zu amplifizieren, wurde ein kürzeres Fragment zwischen den Exons 26-29, ohne das Exon 28, amplifiziert. Hierzu wurde ein Vorwärts-*Primer*, der in Exon 26 liegt und ein Rückwärts-*Primer*, der am Verbindungspunkt der Exons 27 und 29 ansetzt, verwendet. Lediglich drei Nukleotide des 3' Endes waren komplementär zu Exon 27. Alle anderen Nukleotide waren komplementär zu Exon 29.

Die Expressionsniveaus der Fragmente von A13A2.FL und A13A2.Sk wurden mit dem konstitutiv exprimierten Gen *YWHAZ* normalisiert. Auch alle isoformspezifischen RT-PCR-Experimente wurden in zwei unabhängigen RNA-Präparationen durchgeführt und wie oben beschrieben ausgeführt und quantifiziert. Die bei den RT-PCR-Experimenten verwendeten *Primer* sind im Anhang aufgelistet.

2.4.6 Zellkultur

Für die Zellkultur wurden primäre humane Hautfibroblasten verwendet, die aus Hautbiopsien von Patienten bzw. gesunden Kontrollpersonen gewonnen wurden (vgl. Abschnitt 2.2). Die Arbeit mit den Zellen erforderte sterile Bedingungen, um die Gefahr von Kontaminationen zu minimieren. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen verschiedener Größen mit *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) als Nährmedium kultiviert. Das Nährmedium wurde durch die Zugabe der Antibiotika Penicillin und Streptomycin (einprozentig) sowie von zehenprozentigem fetalem Kälberserum (FKS) modifiziert. Die Antibiotika reduzierten die Kontaminierungsgefahr und das FKS mit seinen niedermolekularen Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Hormonen sollte das Wachstum der Zellen verbessern.

In regelmäßigen Abständen wurde das Nährmedium der Zellen erneuert. Inkubiert wurden die Zellen bei 37 °C und 5 Prozent CO₂. Bei etwa 80-prozentiger Konfluenz der Zellen erfolgte die Überführung in eine neue Zellpassage. Dazu wurde das alte Nährmedium verworfen, die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und 1-2 ml des Enzyms Accutase zur Ablösung der adhärennten Zellen hinzugegeben. Nach zehnmünütiger Inkubationszeit bei 37 °C und 5 Prozent CO₂ inaktivierte die Zugabe des frischen Nährmediums die Accutase. Die entstandene Zellsuspension wurde in neue Zellkulturflaschen gefüllt. Sollten die Zellen mit einem Stressor behandelt werden, wurde die Zellzahl mit einem Zellzähler bestimmt und anschließend die gleiche Anzahl Zellen in Versuchsschalen ausplattiert.

In dieser Arbeit wurden humane Hautfibroblasten mit der Chemikalie Cycloheximid, einem bekannten NMD-Inhibitor, behandelt (Noensie und Dietz, 2001). Die Hautfibroblasten von KRS-Patienten und gesunden Kontrollindividuen wurden für 12 Stunden mit Cycloheximid (100µg/ml) inkubiert. Wie im Abschnitt 2.4.5 beschrieben, erfolgten danach mRNA-Isolierung und cDNA-Synthese. Um die stabilisierende Wirkung des Cycloheximids auf die trunkierenden Mutationen nachzuweisen, wurden die PCR-Fragmente anschließend sequenziert (vgl. Abschnitt 2.4.4).

2.4.7 Statistische Methoden der Assoziationsstudie

Ziel dieser Fall-Kontroll-Studie war es, eine mögliche Assoziation zweier SNPs des Genlocus *PARK16* mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom aufzuzeigen. Die Nullhypothese war, dass kein Zusammenhang zwischen den Genotypfrequenzen der SNPs und dem idiopathischen Parkinson-Syndrom besteht. Entsprechend ging die Alternativhypothese von einem Zusammenhang aus.

Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ für alle Tests festgelegt. Sämtliche inferenzstatistischen Auswertungen sind als deskriptiv anzusehen, da eine Adjustierung des Alpha-Fehlers nicht erfolgte. Die festgestellten Genotypenfrequenzen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Zur statistischen Auswertung wurde die logistische Regressionsanalyse herangezogen. Dieses Verfahren wird in der medizinischen Forschung aufgrund der häufig binären Zielvariablen oft angewandt. Hierbei lässt sich der Einfluss erklärender Variablen, wie dies im vorliegenden Fall der Genotyp eines bestimmten SNPs ist, auf eine binäre Zielvariable (ein Proband ist am idiopathischen Parkinson-Syndrom erkrankt: ja/nein) untersuchen. Gerade bei retrospektiven Fall-Kontroll-Studien erhält man durch dieses statistische Modell sinnvolle Effektschätzer.

So können aus den Regressionskoeffizienten direkt die *Odds Ratios* als Maß für den Zusammenhang ermittelt werden. Es kann somit eine Bestimmung des p -Wertes erfolgen (Bender et al., 2007). Durch die Ermittlung der Konfidenzintervalle ist es möglich, eine Genauigkeit des jeweiligen Schätzwertes anzugeben.

Die statistischen Auswertungen der Assoziationsstudie wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität Lübeck durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Assoziationsstudie zum *PARK16*-Locus

In dieser Arbeit wurde im Rahmen einer Assoziationsstudie der Suszeptibilitätslocus *PARK16* in einem chilenischen Kollektiv untersucht. Dafür wurden zwei SNPs - rs823128 und rs947211 - bei insgesamt 169 Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom und 195 Kontrollindividuen genotypisiert. Die experimentellen Arbeiten dieser Assoziationsstudie wurden in Zusammenarbeit mit Herrn cand. med. Jan Kottwitz, medizinischer Doktorand des Instituts für Neurogenetik der Universität zu Lübeck, durchgeführt. Der Arbeitsbeiträge zu der Assoziationsstudie waren gleichmäßig aufgeteilt.

3.1.1 Genotypisierung des SNP rs823128

Die Ergebnisse der Genotypisierung für den SNP rs823128 zeigten in der Fall- und in der Kontrollgruppe unterschiedliche Verteilungen der Genotypen:

Der Wildtyp A/A war in beiden Gruppen der am häufigsten beobachtete Genotyp. In der Gruppe der Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom waren 139 der 166 Individuen Träger des Wildtyps. Dies entspricht 83,7 Prozent der untersuchten Patienten. In der Kontrollgruppe wiesen 138 von 193 Personen den Wildtyp auf (71,5 %). Der heterozygote Genotyp A/G ließ sich bei 23 der 166 Personen (13,9 %) in der Fallgruppe nachweisen. Bei der Kontrollgruppe hingegen wurde bei 46 der 193 Personen der Genotyp A/G festgestellt. Demnach kommt dieser Genotyp bei 23,8 Prozent der Kontrollindividuen vor. Für die heterozygoten Träger berechnete sich eine *Odds Ratio* von 0,56 (95 % Konfidenzintervall: 0,37–0,87).

Die genetische Variante G/G war kaum zu beobachten. Lediglich bei 4 der 166 Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom konnte dieser Genotyp ermittelt werden. Das entspricht 2,4 Prozent aller Fallgruppenindividuen.

Bei 4,7 Prozent oder in absoluten Zahlen ausgedrückt, bei 9 der 193 in der Kontrollgruppe erfassten Personen war der Genotyp G/G vorhanden. Eine *Odds Ratio* von 0,32 (95 % Konfidenzintervall: 0,13–0,75) konnte für homozygote Träger ermittelt werden.

Die Allelfrequenz G stellte die *minor allele frequency* (MAF), also das Allel mit der geringsten Häufigkeit in einer Population, in dem untersuchten Kollektiv dar. Mit 9,3 Prozent war die MAF bei den Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom kleiner als bei den Kontrollen, in denen sie 16,5 Prozent betrug.

Anhand der statistischen Berechnungen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe (p -Wert = 0,0093). Demnach konnte die Assoziation des SNP rs823128 mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom in der multiethnischen Population Chiles bestätigt werden.

3.1.2 Genotypisierung des SNP rs947211

Die Bestimmung der Genotypfrequenzen des SNP rs947211 zeigte folgende Verteilung der Genotypen:

Der seltenste Genotyp war sowohl in der Fall- als auch in der Kontrollgruppe der Genotyp A/A. In der Gruppe der Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom wiesen 23 der 168 Individuen diesen Genotyp auf. Das entspricht 13,6 Prozent aller in der Patientengruppe erfassten Personen. Der Genotyp A/A war hingegen in der Kontrollgruppe häufiger vertreten. Bei 40 von 195 Personen bestätigte sich diese genetische Variante. Demnach besitzen 20,5 Prozent aller Kontrollgruppenindividuen diesen Genotyp. Von insgesamt 168 Patienten zeigten 88 die Variante A/G. Das sind 52,4 Prozent der Erkrankten. In der Kontrollgruppe trat bei 92 der 195 Personen (47,2 %) der A/G Genotyp auf.

Für die heterozygoten Träger berechnete sich eine *Odds Ratio* von 1,19 (95 % Konfidenzintervall: 0,88–1,61).

Der homozygote Genotyp G/G war bei 57 der 168 an idiopathischem Parkinson-Syndrom Erkrankten nachzuweisen (33,9 %). In der Kontrollgruppe war der Genotyp G/G bei 63 der 195 Personen (32,3 %) zu finden. Eine *Odds Ratio* von 1,42 (95 % Konfidenzintervall: 0,78–2,59) konnte für homozygote Träger ermittelt werden.

Die MAF war mit 44,1 Prozent bei den Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom größer als bei den Kontrollindividuen, bei denen sie 39,9 Prozent betrug.

Mit einem p -Wert = 0,2473 ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe aufzeigen. Entsprechend konnte die Assoziation des SNP rs947211 mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom in dem untersuchten chilenischen Kollektiv nicht bestätigt werden. Die hier dargestellten Ergebnisse der Assoziationstudie können nochmals anhand der Tabelle 3.1 nachvollzogen werden.

Tabelle 3.1 Statistische Auswertung der Assoziationsstudie

SNP		Kontrollen		Fälle		Kontrollen		Fälle		OR	95 % KI	p-Wert
rs-Nummer	Genotyp	n	Prozent	n	Prozent	REH	95 % KI	REH	95 % KI			
rs823128	A/A	138	71,50	139	83,73	0,65	0,36-1,18	0,49	0,16-1,46	1,00		0,0093
	A/G	46	23,84	23	13,86					0,56	0,37-0,87	
	G/G	9	4,66	4	2,41					0,32	0,13-0,75	
rs947211	A/A	40	20,51	23	13,69	0,92	0,68-1,24	1,22	0,91-1,62	1,00		0,2473
	A/G	92	47,18	88	52,28					1,19	0,88-1,61	
	G/G	63	32,31	57	33,93					1,42	0,78-2,59	

rs = *reference* SNP, REH = *relative excess heterozygosity*, KI = Konfidenzintervall, OR = *Odds Ratio*

3.2 Expressionsanalyse von *ATP13A2* beim KRS

In diesem Abschnitt der Arbeit werden die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von *ATP13A2* in primären Hautfibroblasten bei Krankheitsträger des KRS dargestellt.

3.2.1 Verifizierung der Mutationen der Patienten

Zu Beginn erfolgte die Verifizierung des Genotyps der kultivierten Hautfibroblasten der drei KRS-Patienten. Für jeden Patienten wurde ein kurzes, die Mutation enthaltendes Fragment des *ATP13A2*-Gens amplifiziert und anschließend sequenziert.

Um die Mutation des homozygoten Patienten PARK9-3 zu bestätigen, wurde ein Fragment amplifiziert, das die Exons 21 bis 24 umfasste. Die anschließende Sequenzierung konnte die homozygote Mutation in Exon 23, eine Deletion zweier Thyminen (c.2552_2553delTT), nachweisen.

Nach der Amplifikation eines Fragmentes (Exon 12-14) bestätigte die Sequenzierung das Überspringen von Exon 13 bei dem *compound*-heterozygoten Patienten PARK9-2. Das Überspringen des Exons wird durch eine Transition von Guanin zu Adenin (c.1036+5G>A) hervorgerufen. Um bei dem selben Patienten die Mutation des anderen Allels aufzuzeigen, wurde ein die Exons 25 bis 27 umfassendes Fragment amplifiziert. Das Elektropherogramm der Sequenzierung bestätigte, wie in der Abb. 3.1 dargestellt, die Deletion c.3057delC. Des Weiteren deutete das verminderte Signal des mutierten Allels in der Sequenzierung auf einen Abbau dieses Allels durch NMD hin.

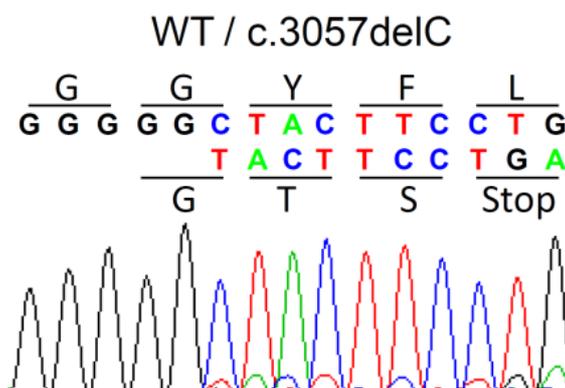


Abb 3.1: Die Abbildung zeigt das Elektropherogramm der Sequenzierung, die die Mutation c.3057delC beim Patienten PARK9-2 bestätigt. Das verminderte Signal des mutierten Allels deutet auf den Abbau dieses Allels durch NMD hin.

Die Sequenzierung eines Amplifikats (Exon 26-29) konnte bei dem *compound*-heterozygoten Patienten PARK9-1 die in Exon 27 liegende Substitution, eines Thymins gegen ein Guanin (c.3176T>G), bestätigen.

Während des Versuchs ließ die elektrophoretische Auftrennung der PCR neben dem zu erwartenden PCR-Produkt ein kleineres Fragment erkennen. Nach einer Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine Spleißvariante, die Isoform-3 von ATP13A2 handelt (vgl. Abschnitt 1.3). Im Folgenden wird die Spleißvariante als A13A2.Sk (Sk für *skipped*) bezeichnet, da ihr das Exon 28 fehlt. Diese Spleißvariante wies beim Patienten PARK9-1, verglichen mit gesunden Kontrollzellen und anderen Patientenzellen, eine stärkere Bande auf (vgl. Abb. 3.2).

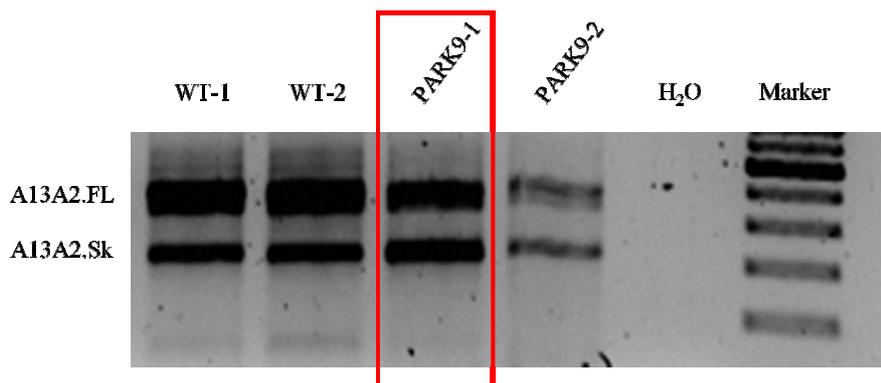


Abb. 3.2: Elektrophoretische Auftrennung einer PCR

Legende: WT-1, WT-2 gesunde Kontrollindividuen; PARK9-1, PARK9-2 KRS Patienten; A13A2.FL, A13A2.Sk Spleißvarianten von ATP13A2

Um die Mutation des anderen Allels von PARK9-1, die in Exon 28 liegt, einwandfrei nachzuweisen, wurde gezielt die Spleißvariante A13A2.FL (FL für *full length*) amplifiziert, die das Exon 28 enthält (vgl. Abschnitt 2.4.5). Die anschließende Sequenzierung zeigte die Mutation c.3253delC. Außerdem ließ das schwache Signal des mutationstragenden Allels vermuten, dass das Allel dem NMD unterliegt (vgl. Abb.3.3).

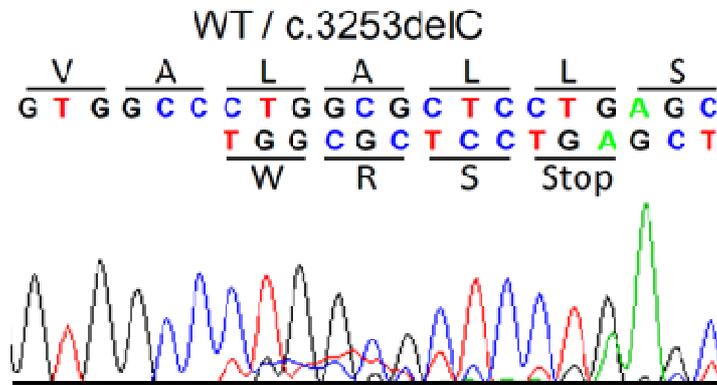


Abb. 3.3: Die Abb. zeigt das Elektropherogramm der Sequenzierung, das die Mutation c.3253delC beim Patienten PARK9-1 bestätigt. Das verminderte Signal des mutierten Allels deutet auf den Abbau durch NMD hin.

3.2.2 *ATP13A2*-Expressionsbestimmung und Untersuchung auf NMD

Nach der Sequenzierung der mutierten Allele erfolgte nun die Quantifizierung der endogenen *ATP13A2*-mRNA durch RT-PCR-Experimente in Patienten- und Kontrollzellen. Dazu wurden Abschnitte von *ATP13A2* amplifiziert und quantifiziert, die die Exons 6-7 bzw. 16-17 enthielten. Danach fand eine Normierung der Expression des Transkripts von *ATP13A2* mit dem konstitutiv exprimierten Gen *YWHAZ* statt (vgl. Abschnitt 2.4.5).

Alle drei Zelllinien der KRS-Erkrankten wiesen einen verminderten Gehalt an *ATP13A2*-Transkript gegenüber gesunden Kontrollfibroblasten auf. Die beiden Zelllinien PARK9-1 und PARK9-2 zeigten eine etwa 40-prozentige Reduktion des Transkripts im Vergleich mit den Kontrollzellen.

Dagegen konnte bei den Zellen des Patienten PARK9-3 verglichen mit gesunden Kontrollzellen eine etwa 80-prozentige Abnahme beobachtet werden. Interessanterweise korrelierte die verminderte Expression mit der Anzahl trunkierender Mutationen des jeweiligen Allels.

So war bei den Zellen des Patienten PARK9-3, der auf beiden Allelen dieselbe trunkierende Mutation an Position c.2742_2743delTT trägt, kaum eine Expression von *ATP13A2* nachweisbar.

Die *compound*-heterozygoten Patienten PARK9-1 und PARK9-2, die lediglich eine trunkierende Mutation besitzen, zeigten hingegen eine etwa um die Hälfte verminderte Expression, verglichen mit den Kontrollzellen.

Die Expression von *ATP13A2* der drei Patientenzellen und der vier gesunden Kontrollzellen ist in Abb. 3.4 dargestellt.

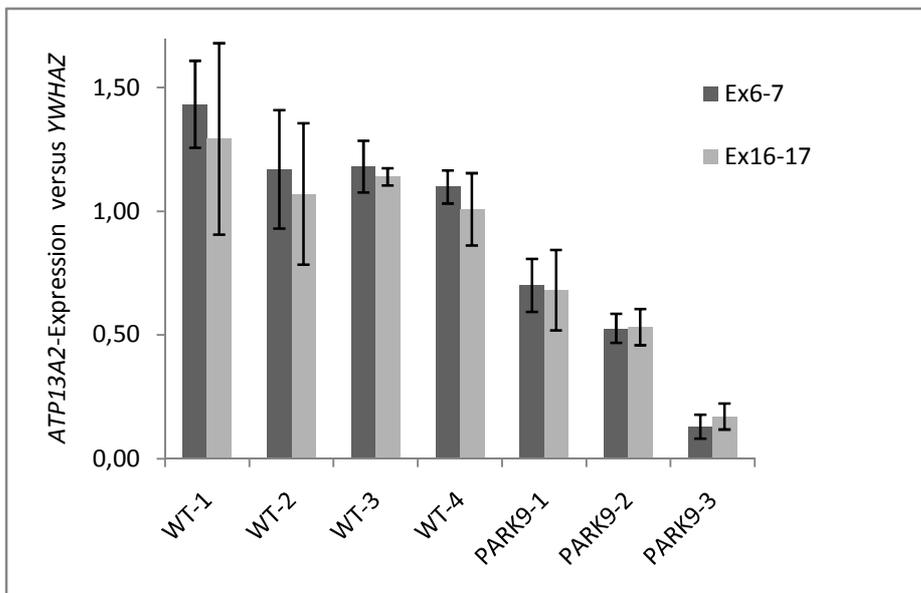


Abb. 3.4: Histogramm der Ergebnisse der quantitativen *ATP13A2*-mRNA-Analyse (*ATP13A2* versus *YWHAZ*): Alle drei Mutationsträger zeigten eine geringere *ATP13A2*-Expression als die gesunden Kontrollfibroblasten.

Zwei verschiedene *Primer*-Kombinationen wurden genutzt: 1) Exon 6-7, hier dunkelgrau dargestellt 2) Exon 16-17, hier hellgrau dargestellt. WT 1-4 = Wildtyp 1-4 repräsentieren gesunde Zellen ohne Mutationen in *ATP13A2*. Die letzten drei Proben (PARK9-1, PARK9-2, PARK9-3) kamen von unterschiedlichen KRS-Patienten mit verschiedenen Mutationen (vgl. Abschnitt 2.2). Es erfolgte eine Normierung der Expression der *ATP13A2*-mRNA mit dem konstitutiv exprimierten Gen *YWHAZ*.

Um die verminderte Expression von *ATP13A2* in den Patientenzellen zu bestätigen, wurden die RT-PCR Experimente mit *HPRT1*, einem anderen konstitutiv exprimierten Gen als Referenz, erneut durchgeführt.

Da bei den vorangegangenen RT-PCR Experimenten kein signifikanter Unterschied bei der Expression von *ATP13A2* zwischen den Fragmenten, die die Exons 6-7 bzw. Exons 16-17 umfassten, festgestellt werden konnte, wurde zur Bestätigung der Ergebnisse lediglich der Abschnitt zwischen den Exons 6-7 amplifiziert und quantifiziert. Abschließend wurde die mRNA-Expression von *ATP13A2* mit dem konstitutiv exprimierten Gen *HPRT1* normiert.

Hierbei zeigte sich erneut die verminderte *ATP13A2*-Expression in den Patientenzellen gegenüber gesunden Kontrollfibroblasten (vgl. Abb.3.5). Somit konnte dieses Ergebnis in zwei, voneinander unabhängigen, konstitutiv exprimierten Genen als Referenz gezeigt werden.

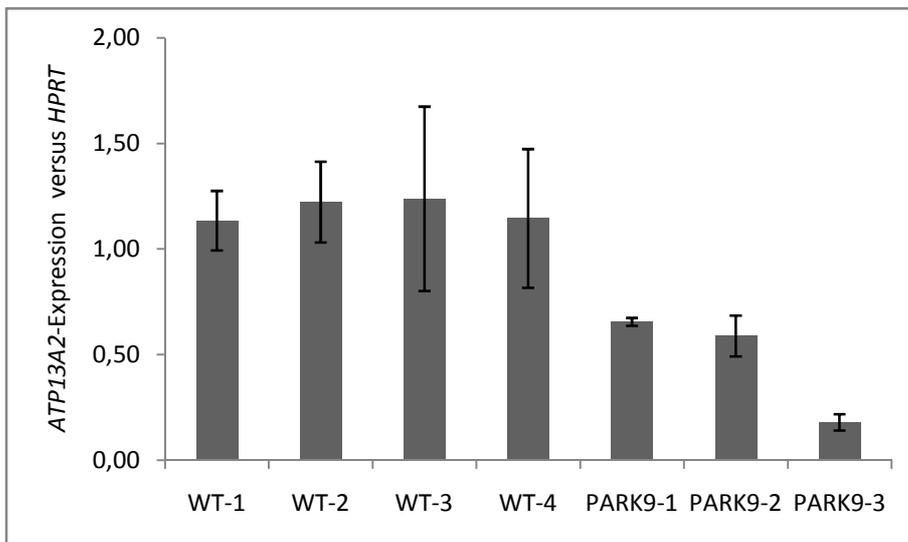


Abb. 3.5: Histogramm der Ergebnisse der quantitativen *ATP13A2*-mRNA-Analyse (*ATP13A2* versus *HPRT1*): Alle drei Mutationsträger wiesen eine geringere Expression von *ATP13A2* auf als die gesunden Kontrollfibroblasten.

Zur Quantifizierung der Expression von *ATP13A2* wurde ein Fragment (Exons 6-7) genutzt. WT 1-4 = Wildtyp 1-4 repräsentieren gesunde Zellen ohne Mutationen in *ATP13A2*. Die letzten drei Proben (PARK9-1, PARK9-2, PARK9-3) kamen von unterschiedlichen KRS-Patienten mit verschiedenen Mutationen (vgl. Abschnitt 2.2). Es erfolgte eine Normierung der Expression der *ATP13A2*-mRNA mit dem konstitutiv exprimierten Gen *HPRT1*.

Um festzustellen, ob die verminderte *ATP13A2*-Expression in den Patientenzellen auf NMD zurückzuführen ist, wurden die Zellen vor der mRNA-Isolierung und der cDNA-Synthese für 12 h mit Cycloheximid (100 µg/ml) (vgl. Abschnitt 2.4.6) behandelt. Mit der nachfolgenden Sequenzierung der PCR-Fragmente sollte der stabilisierende Effekt von Cycloheximid auf die mutierten Allele aufgezeigt werden. Es stellte sich heraus, dass die zwölfstündige Behandlung einen merklichen Anstieg des Transkripts von PARK9-1 (c.3057delC) und PARK9-2 (c.3253delC) zur Folge hatte (vgl. Abb. 3.6 und Abb. 3.7). Dagegen konnte bei dem Patienten PARK9-3, wie zu vermuten war, kein stabilisierender Effekt in der Sequenz nachgewiesen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei diesem Patienten eine homozygote Mutation vorliegt und somit beide Allele stabilisiert wurden. Der verminderte *ATP13A2*-mRNA-Gehalt bei den Patienten-Fibroblasten und der stabilisierende Effekt von Cycloheximid auf die mutationstragenden Allele legen einen Abbau dieser Allele durch NMD nahe.

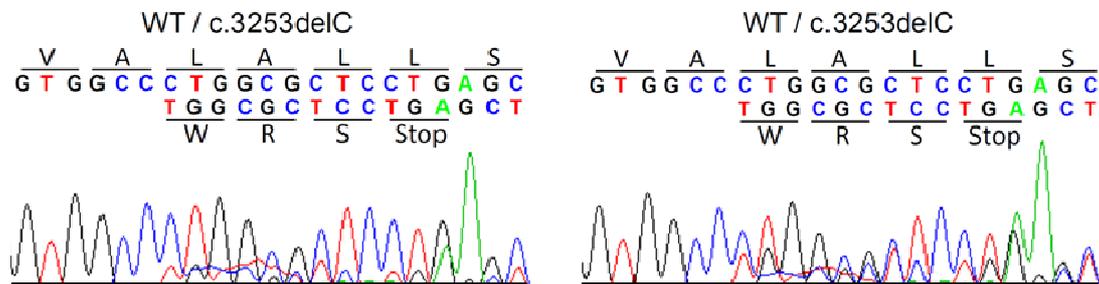


Abb. 3.6: Elektropherogramme der Sequenzierung, die die Mutation c.3253delC bei dem Patienten PARK9-1 zeigen (links: ohne Behandlung; rechts: nach zwölfstündiger Behandlung mit Cycloheximid (100 µg/ml). Rechts ist die stabilisierte Sequenz des mutationstragenden Allels erkennbar.

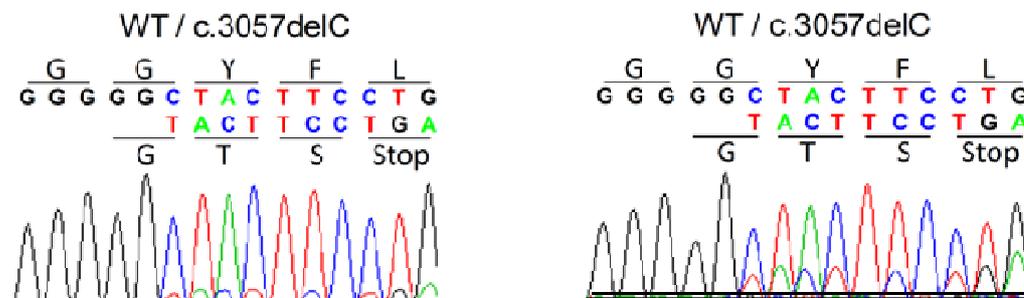


Abb. 3.7: Elektropherogramme der Sequenzierung, die die Mutation c.3057delC bei dem Patienten PARK9-2 zeigen (links: ohne Behandlung; rechts: nach zwölfstündiger Behandlung mit Cycloheximid (100 µg/ml). Rechts ist die stabilisierte Sequenz des mutationstragenden Allels erkennbar.

3.2.3 Spezifische Quantifizierung der Spleißvarianten

Im Abschnitt 3.2.1 wurde erwähnt, dass die Patientenzellen PARK9-1 eine scheinbar stärkere Expression der Spleißvariante A13A2.Sk aufwiesen als gesunde Kontroll- und andere Patientenzellen (vgl. Abb. 3.2). Um diese Beobachtung zu erhärten, wurde eine spezifische Quantifizierung der beiden Spleißvarianten (A13A2.FL und A13A2.Sk) sowohl in Kontroll-, als auch in KRS-Zellen vorgenommen. Daran schloss sich eine Normierung der Expression der *ATP13A2*-mRNA mit dem konstitutiv exprimierten Gen *YWHAZ* an. Die durch die spezifische Quantifizierung gewonnenen Expressionsmuster der Variante A13A2.FL waren mit den Ergebnissen, die durch die Quantifizierung zweier Fragmente (Exon 6-7 und Exon 16-17) für die gesamte *ATP13A2*-Expression gemacht wurden, vergleichbar. Ebenso konnte spezifisch für die Spleißvariante A13A2.FL eine geringere Expression bei den Mutationsträgern gezeigt werden, was den Abbau dieser Spleißvariante durch NMD nahe legt.

Auch für die Variante A13A2.Sk konnte bei den Mutationsträgern PARK9-2 und PARK9-3, verglichen mit Kontrollindividuen, eine reduzierte Expression festgestellt werden. Die reduzierte Expression deckt sich mit den Ergebnissen für die gesamte *ATP13A2*-Expression (vgl. Abschnitt 3.2.2).

Beim Patienten PARK9-1 wurde jedoch die Variante A13A2.Sk auf einem ähnlichen Niveau wie bei den Wildtypzellen exprimiert. Eine Übersicht der Ergebnisse der spezifischen Quantifizierung beider Spleißvarianten ist in Abb. 3.8 dargestellt. Berücksichtigt man, dass der Patient PARK9-1 eine trunkierende und eine *missense* Mutation trägt, ist die Expression der Variante doppelt so stark wie erwartet. Bezogen auf die gesamte Expression von *ATP13A2* war bei dem Patienten PARK9-1 der Anteil der Spleißvariante A13A2.Sk im Vergleich mit gesunden Kontrollen signifikant erhöht (vgl. Abb. 3.9).

Somit ergab sich die Frage, wie die vermehrte Expression der Spleißvariante A13A2.Sk beim Patienten PARK9-1 zu deuten ist. Als möglicher Erklärungsansatz wurde im Folgenden ein Einfluss der Mutation c.3253delC auf das Spleißen untersucht, da diese Mutation sich im Exon 28 befindet und das Exon bei der Spleißvariante A13A2.Sk übersprungen wird.

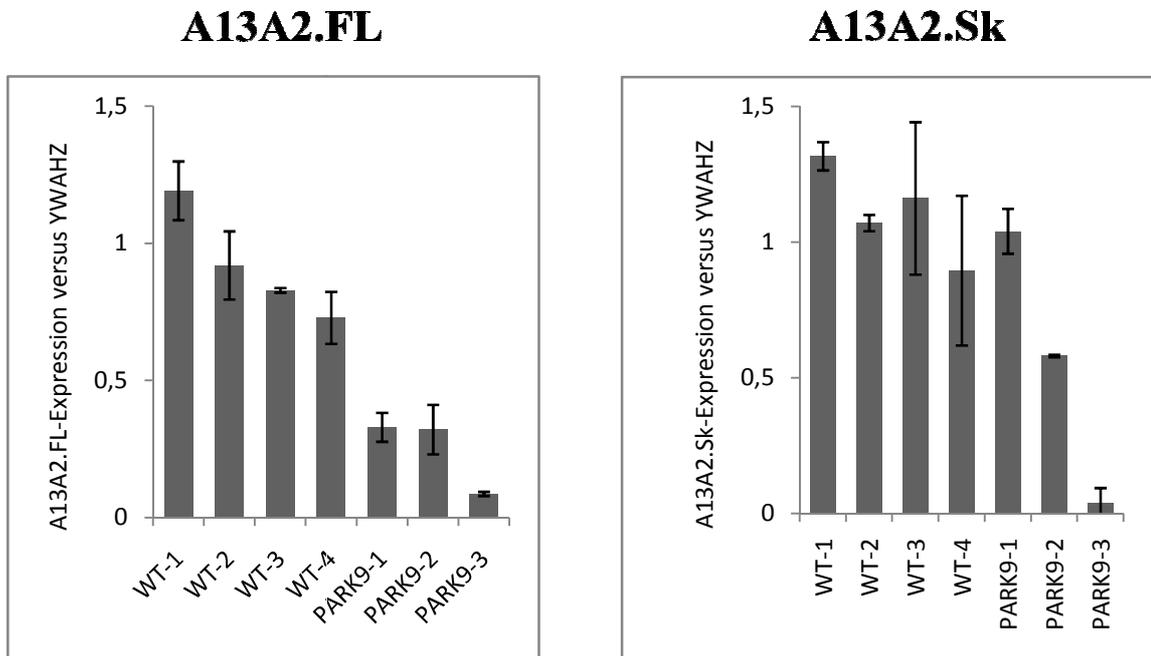


Abb. 3.8: Histogramme der Ergebnisse der quantitativen mRNA-Analyse der Spleißvarianten A13A2.FL und A13A2.Sk (A13A2.FL bzw. A13A2.Sk versus YWAHZ): Links: Alle Individuen wiesen ein Expressionsmuster der Spleißvariante A13A2.FL, ähnlich der in der Abb. 3.4 dargestellten Ergebnisse für die gesamte Expression von *ATP13A* auf. Rechts: PARK9-1 zeigte ein ähnliches Expressionsniveau von *ATP13A2.Sk* wie die gesunden Kontrollfibroblasten. WT 1-4 = Wildtyp 1-4 repräsentieren gesunde Zellen ohne Mutationen in *ATP13A2*. Die letzten drei Proben (PARK9-1, PARK9-2, PARK9-3) kamen von unterschiedlichen KRS-Patienten mit verschiedenen Mutationen (vgl. Abschnitt 2.2). Es erfolgte eine Normierung der Expression der *ATP13A2*-mRNA mit dem konstitutiv exprimierten Gen *YWAHZ*.

A13A2.Sk/A13A2

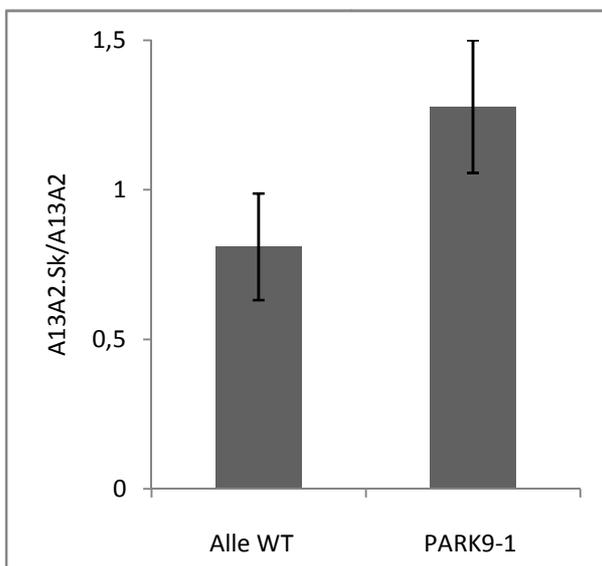


Abb. 3.9: Histogramm der Expression von *ATP13A2.Sk* bezogen auf die gesamte Expression von *ATP13A2*: Die mRNA-Expression von *ATP13A2.Sk* ist in PARK9-1 signifikant erhöht, verglichen mit allen gesunden Kontrollzellen (Alle WT) (1.46 ± 0.13 gegenüber 0.87 ± 0.16 , $p < 0.001$).

3.2.4 Auswirkungen der Mutation c.3253delC auf das Spleißen

Da die isoformspezifische Quantifizierung eine vermehrte Expression der Spleißvariante A13A2.Sk beim Patienten PARK9-1 erkennen ließ, ergab sich die Frage, ob die Mutation c.3253delC, die in Exon 28 liegt, das Spleißen beeinflusst.

Mit Hilfe des Programms *Splice site prediction* (vgl. Abschnitt 2.3.5) wurde die vorhergesagte Effizienz des Spleißprozesses von Exon 28 mit und ohne Mutation an der Position c.3253delC bestimmt. Das Programm gibt mögliche Spleißstellen als Werte zwischen 0,1 und 1,0 wieder. Je höher der Wert, desto stärker ist die dazugehörige Spleißstelle. So betrug der ermittelte Wert bei der Sequenz ohne Mutation 0,43, mit ihr ergab sich ein Wert von 0,45. Demzufolge hat die Mutation c.3253delC keinen nennenswerten Einfluss auf die Effizienz des Spleißprozesses.

Der ermittelte Wert für die Effizienz des Spleißens von Exon 28 war interessanterweise bereits ohne die Mutation mit 0,43 gering. Demnach könnte man erwarten, dass die Variante A13A2.Sk bei allen Zelllinien ähnlich stark exprimiert werde, wie die Variante A13A2.FL. Die PCR Experimente zeigten jedoch ein stärkeres Signal von A13A2.FL. mit der Ausnahme des Patienten PARK9-1 (vgl. Abb. 3.2).

Diese Beobachtungen könnten durch das Vorhandensein regulatorischer Sequenzen für das Spleißen in Exon 28 erklärt werden. Solche regulatorischen Sequenzen, sogenannte Exonic splicing enhancer, spielen sowohl beim alternativen, als auch beim konstitutiven Spleißen eine Rolle (vgl. Abschnitt 1.5).

Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der Software *ESEfinder 3.0* (vgl. Abschnitt 2.3.5) getestet, ob die Mutation 3253delC einen Einfluss auf ein ESE-Motiv im Exon 28 hat. Hierbei konnte eine mutmaßliche Bindungsstelle des SR-Proteins SC35 gefunden werden, welche durch die Mutation bei c.3253delC beeinträchtigt ist (vgl. Abb. 3.10).

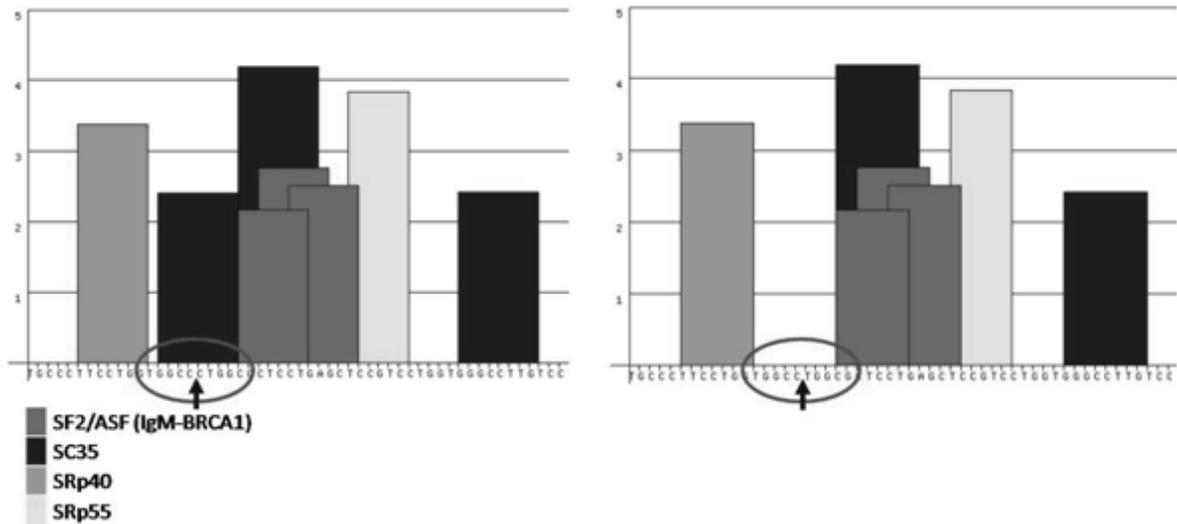


Abb. 3.10: Graphische Darstellung aus dem Programm *ESEfinder 3.0*: Zu sehen sind die Bindungsstellen der aufgeführten SR-Proteine in der Nähe der Mutation c.3253delC im Exon 28. Der Pfeil deutet auf die Stelle der Mutation. Auf der rechten Seite erkennt man, dass die Deletion ein ESE-Motiv des Proteins SC35 betrifft.

Um die Hypothese, dass die Mutation c.3253delC das Spleißen des Exon 28 beeinflusst, zu überprüfen, wurde eine spezifische Amplifizierung beider Spleißvarianten und deren anschließende Sequenzierung durchgeführt. Hierbei kam der *missense*-Mutation c.3176T>G, die sich auf dem anderen Allel des Patienten PARK9-1 befindet, besondere Bedeutung zu. Diese Mutation liegt in Exon 27 und die Amplifikate wurden so gewählt, dass sie die Position c.3176 einschlossen. Wie der Abb. 3.11 des Haplotyps von PARK9-1 zu entnehmen ist, ist der Wildtyp, also ein Thymin an der Position c.3176, gleichbedeutend mit dem Allel mit der Deletion an Position c.3253. Somit konnte anhand der Intensität des Signals der Sequenzierung an der Position c.3176 der unterschiedliche Beitrag der beiden Allele für die verschiedenen Spleißvarianten dargestellt werden.

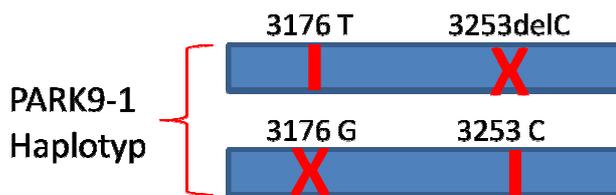


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des Haplotyps des KRS-Patienten PARK9-1

Die Abb. 3.12 zeigt das Signal der Sequenzierung an der Position c.3176 für beide Spleißvarianten. Die Sequenzierung der Variante A13A2.FL wies bei Position c.3176 ein vermindertes Signal für die WT-Variante Thymin auf. Somit war der Beitrag des Allels mit der Mutation c.3253delC für diese Spleißvariante gering. Dieses Ergebnis lässt sich mit dem vorher beschriebenen NMD vereinbaren.

Auf der rechten Seite ist die Sequenzierung der spezifischen Amplifizierung der Spleißvariante A13A2.Sk dargestellt. Hier waren die Signale für Guanin und Thymin bei der Position c.3176 annähernd gleich groß. Folglich war der Beitrag des Allels mit der Deletion c.3253delC für diese Spleißvariante stärker. Demnach liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Mutation ein Überspringen des Exons 28 bedingt. Dies erlaubt neue Rückschlüsse auf die Pathophysiologie des KRS, auf die im Abschnitt 4.3 näher eingegangen wird.

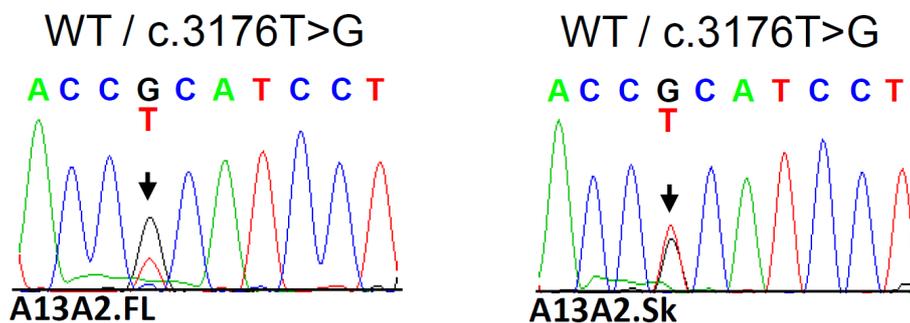


Abb. 3.12: Elektropherogramm des Sequenzabschnitts, der die Mutation c. 3176T>G beim Patienten **PARK9-1** darstellt, auf der linken Seite für die Spleißvariante A13A2.FL und auf der rechten Seite für die Spleißvariante A13A2.Sk. Der Beitrag des Allels mit der Deletion c.3253delC ist für die Spleißvariante A13A2.Sk stärker.

4 DISKUSSION

In diesem Abschnitt der Arbeit werden zunächst die Ergebnisse der Assoziationsstudie diskutiert. Anschließend erfolgt die Diskussion der Expressionsanalyse.

4.1 Assoziationsstudie zum *PARK16*-Locus

In der vorliegenden Arbeit konnte für den SNP rs823128 des Locus 1q32 eine signifikante Assoziation mit MP in einer chilenischen Population aufgezeigt werden. Die beobachtete Genotypverteilung für diesen SNP ist im untersuchten chilenischen Kollektiv ähnlich dem Verteilungsmuster einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) von 2009. Diese GWAS identifizierte in einem japanischen Kollektiv den Suszeptibilitätslocus (*PARK16*) für das idiopathische Parkinsonsyndrom. Als einer von 7 SNPs zeigte rs823128 in der zweiten Phase der GWAS eine signifikante Assoziation mit MP. Die MAF für diesen SNP betrug 9 Prozent bei den Patienten und 14 Prozent bei den Kontrollindividuen in der japanischen Studie (Satake et al., 2009). Mit einer MAF des SNP rs823128 von 9,3 Prozent bei den Patienten und 16,5 Prozent bei den Kontrollindividuen zeigte das untersuchte chilenische Kollektiv ähnliche Häufigkeiten der Allele. In einer Fall-Kontroll-Studie mit 1349 Individuen chinesischer Herkunft, von denen 433 an MP erkrankt waren, wurde eine MAF von 12 Prozent in der Kontroll- und 15 Prozent in der Patientengruppe beschrieben (Tan et al., 2010). Damit ist der Gedanke nahe liegend, dass das Allel der MAF als eine protektive Genvariante anzusehen ist.

Die Assoziation des SNPs rs823128 mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom konnte ebenso in einem europäischen Kollektiv beschrieben werden. Allerdings war die Assoziation schwächer als in der asiatischen Population. Dies könnte mit der Tatsache zusammenhängen, dass die genetische Variante mit 3 Prozent bei den Patienten und 4 Prozent bei den Kontrollindividuen insgesamt weniger häufig und damit schwieriger aufzuzeigen ist (Simón-Sánchez et al., 2009).

Die Unterschiede zwischen den Ethnien bezüglich des SNP werden außerdem durch eine weitere Studie gestützt, die in einem taiwanesischen Kollektiv - also ethnischen Chinesen - eine MAF von 13 Prozent ausmachte.

In der gleichen Studie konnte bei europäischen Probanden sowie Nordamerikanern europäischer Abstammung eine MAF von 2-5 Prozent festgestellt werden (Vilarino-Guell et al., 2010). Die asiatischen Kollektive und die in dieser Arbeit untersuchte chilenische Population weisen ähnliche Allelverteilungen auf. Auch populationsgenetische Untersuchungen heben genetische Gemeinsamkeiten zwischen ostasiatischen und indigenen Ethnien Amerikas hervor (Mulligan et al., 2004).

Für den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SNP rs947211 konnte keine Assoziation mit MP im chilenischen Kollektiv festgestellt werden. Die GWAS von Satake et al. berichtete hingegen über eine Assoziation. Ebenso bestätigte eine Metaanalyse zweier Fall-Kontroll-Studien bei japanischen und chinesischen Patienten diesen Zusammenhang (Satake et al., 2009, Tan et al., 2010). Eine Erklärung für die nicht beobachtete Assoziation wäre eine erheblich geringere Effektstärke von rs947211 im Gegensatz zum SNP rs823128. Übereinstimmend mit dieser Hypothese zeigte rs947211 keine Signifikanz in der europäischen GWAS, wofür eine verminderte Effektstärke in der europäischen Population verantwortlich sein könnte (Simón-Sánchez et al., 2009). Demnach könnte, bedingt durch die relativ geringe Größe des untersuchten chilenischen Kollektivs und die verminderte Effektstärke, eine mögliche Assoziation zwischen MP und dem SNP rs947211 nicht aufgedeckt worden sein. Hierfür spricht auch eine chinesische Fall-Kontroll-Studie mit 634 MP-Patienten und 510 nicht verwandten Kontrollindividuen, in der keine Assoziation des SNP rs947211 repliziert werden konnte (Chang et al., 2011).

Diese teils widersprüchlichen Ergebnisse der genannten Assoziationsstudien bezüglich des SNP rs947211 werden durch viele Faktoren beeinflusst. Zu nennen sind unter anderem die Struktur des untersuchten Kollektivs, die Teststärke sowie populationspezifische Umweltinteraktionen. Zum Beispiel besteht die Möglichkeit, in einer oder beiden der untersuchten Gruppen eine mit ihrer eigenen Genotypfrequenz überrepräsentierte Subgruppe zu finden. Man spricht in diesem Zusammenhang von Stratifizierung.

Diese systematischen Unterschiede zwischen den Subpopulationen und einer Gesamtpopulation lassen sich unter anderem durch ihre unterschiedliche Herkunft erklären (Hirschhorn und Daly, 2005). Bezogen auf die chilenische Bevölkerung könnte die Vermischung von europäischen und indigenen Vorfahren zu solchen Subgruppen führen.

Einen alternativen Erklärungsansatz für die fehlende Signifikanz der Assoziation des SNPs rs947211 mit MP in der chilenischen Population bietet die Haplotyp-Struktur des *PARK16*-Locus. Meist werden SNPs nicht einzeln vererbt, sondern in Form von sog. Haplotyp-Blöcken (Daly et al., 2001). Im *PARK16*-Locus konnten mehrere unabhängige Assoziationssignale aufgezeigt werden (Satake et al., 2009). Folglich wäre es möglich, dass sich das Suszeptibilitätsallel in einem Haplotyp-Block mit rs823128 befindet. Der Haplotyp-Block mit rs947211 wäre in diesem Fall unabhängig davon.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der SNP rs823128 nicht nur in der asiatischen und europäischen Population mit MP assoziiert ist. Die Assoziation im chilenischen Kollektiv erweitert die Kenntnis des populationsgenetischen Hintergrunds des MP. Die Interpretation dieser Assoziation in Bezug auf die Krankheitsentstehung ist schwierig. Bereits bekannt ist jedoch, dass der Genlocus *PARK16* einige Kandidatengene (*SLC41A1*, *RAB7L1*, *NUCKS1*) enthält und der SNP rs823128 im *SLC41A1*-Gen liegt (Satake et al., 2009). Die Assoziation der MAF mit einem geringeren Risiko für MP lässt an mögliche protektive Genvarianten oder Gene in dieser Region denken. Die mutmaßlich protektive Wirkung könnte auch indirekt über die Interaktion mit unbekanntem Genen ausgeübt werden (Tan et al., 2010).

4.2 Expressionsanalyse von *ATP13A2* beim KRS

Für die Expressionsanalyse von *ATP13A2* wurden in dieser Arbeit Hautfibroblasten von KRS-Patienten verwendet. Fibroblasten eignen sich insbesondere durch ihre einfache Verfügbarkeit als In-vitro-Modell. So können sie durch eine komplikationsarme Biopsie gewonnen werden. Ein weiterer Vorteil ist die Robustheit dieses Gewebes während der Kultivierung.

Von besonderer Relevanz für diese Arbeit war es, dass *ATP13A2*, wie die anderen *PARK*-Gene auch, in relevanten Mengen in Fibroblasten exprimiert wird (Auburger et al., 2012).

Bei der Kultivierung der Hautfibroblasten wirkt sich allerdings die Anfälligkeit für *Mycoplasma*-Infektionen nachteilig aus. Hierdurch können Ergebnisse verfälscht werden (Harlin und Gajewski, 2008). Aus diesem Grund ist eine sterile Arbeitsweise unentbehrlich, um Kontaminierungen zu vermeiden. Gegen Hautfibroblasten als In-vitro-Modell für Parkinson-Syndrome spricht, dass neuronale Zellen, in denen sich die Krankheitsprozesse abspielen, nicht das gleiche Expressionsmuster aufweisen wie Fibroblasten. Da jedoch ethische Gründe eine Untersuchung humaner Neuronen unmöglich machten, stellten Hautfibroblasten eine praktikable Alternative für die Untersuchungen dar.

4.2.1 Verifizierung der Mutationen der Patienten

Anhand der durchgeführten Sequenzierungen konnten die Genotypen der drei KRS-Patienten bestätigt werden. Bei zwei der drei Patienten, PARK9-1 und PARK9-2, bestätigten sich die *compound*-heterozygoten Mutationen im *ATP13A2*-Gen (Park et al., 2011 Ramirez et al., 2006). Ebenso konnte die homozygote, zwei Basen umfassende Mutation des Patienten PARK9-3 verifiziert werden (Crosiers et al. 2011) (vgl. auch Abschnitt 2.2).

Die drei untersuchten Patienten ordnen sich in eine Reihe von weiteren Individuen unterschiedlicher Ethnien ein, bei denen Mutationen im *ATP13A2* Gen nachgewiesen wurden. Dazu gehören Patienten mit juvenilem Parkinson-Syndrom oder *young onset Parkinson's disease* (YOPD). Diese Begriffe sollen bei Patienten mit einem frühen Krankheitsbeginn des Parkinson-Syndroms (vor dem 40. Lebensjahr) eine genauere Differenzierung ermöglichen. Vom juvenilen Parkinson-Syndrom spricht man bei einem Erkrankungsbeginn vor dem 21. Lebensjahr. Wenn sich die Krankheit zwischen dem 21. und 40. Lebensjahr manifestiert, wird die Bezeichnung YOPD bevorzugt (Quinn et al., 1987).

Nach den in dieser Arbeit bereits beschriebenen Fällen von Mitgliedern einer jordanischen und einer chilenischen Familie mit juvenilem Parkinson-Syndrom (Najim al-Din et al., 1994, Ramirez et al., 2006) wiesen Di Fonzo et al. eine weitere pathogene Mutation im *ATP13A2*-Gen bei einem Patienten nach. Diese homozygote Mutation wurde bei einem brasilianischen Patienten mit juvenilem Parkinson-Syndrom festgestellt.

Im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Fällen traten bei diesem Patienten keine Pyramidenbahnzeichen sowie kaum kognitiven Einschränkungen auf (Di Fonzo et al., 2007). Eine weitere homozygote Mutation wurde in einer Studie mit 117 japanischen Parkinson-Syndrom-Patienten mit frühem Krankheitsbeginn identifiziert. Die Krankheit tritt also weltweit auf (Ning et al., 2008). Bis heute konnten zusätzliche homozygote und *compound*-heterozygote Mutationen identifiziert werden (vgl. Tabelle 1.2).

4.2.2 *ATP13A2*-Expressionsbestimmung und Untersuchung auf NMD

Verglichen mit gesunden Kontrollindividuen wiesen die KRS-Patienten einen verminderten *ATP13A2*-mRNA-Gehalt auf. Zur Bestimmung des mRNA-Gehalts wurde die RT-PCR eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine sensitive und etablierte Methode zur Analyse der Genexpression (VanGuilder et al., 2008). Mögliche Unterschiede zwischen den Proben, die sich beispielsweise während der Bearbeitung ergeben, können durch die Verwendung interner Referenzgene ausgeglichen werden. Idealerweise sollten diese Referenzgene in dem untersuchten Gewebe konstant exprimiert und vom Versuchsaufbau unbeeinträchtigt sein. Für diese Arbeit wurden *YWHAZ* und *HPRT1* als Referenzgene ausgewählt. Diese Gene besitzen in Fibroblasten eine stabile Expression, wodurch sich die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhöht (Vandesompele et al., 2002).

So konnte für die beiden *compound*-heterozygoten Zelllinien PARK9-1 und PARK9-2, mit *YWHAZ* und *HPRT1* als Referenzgene, eine etwa 40-prozentige Abnahme der *ATP13A2*-mRNA - verglichen mit gesunden Kontrollindividuen - beobachtet werden.

Die verminderte *ATP13A2*-Expression stimmt bei dem *compound*-heterozygoten Patienten PARK9-1 mit den Ergebnissen einer weiteren Expressionsanalyse dieses Patienten überein (Park et al., 2011).

Beim homozygoten Patienten PARK9-3 war die *ATP13A2*-Expression auf etwa 20 Prozent der Kontrollzellen reduziert. Zusätzlich wurden die Patienten-Fibroblasten mit Cycloheximid behandelt, um das Vorhandensein von NMD zu bestätigen.

In den Patientenzellen PARK9-1 und PARK9-2 führte dieser Versuch zu einer deutlichen Erhöhung des mutierten Transkripts. Wie erwartet, brachte die Behandlung mit Cycloheximid bei dem Patienten PARK9-3, der Träger einer homozygoten Mutation ist, keine Veränderung der Sequenz, weil beide Allele stabilisiert wurden. Somit legten die Expressionsdaten den Abbau der trunkeierten Allele durch NMD nahe. Insbesondere die starke Reduktion der Expression beim Patienten PARK9-3 spricht für die Tatsache, dass eine *loss of function* des lysosomalen Proteins *ATP13A2* per se zur Pathophysiologie des KRS beiträgt.

Ein Ausfall der physiologischen Funktionen von *ATP13A2* beeinflusst damit wahrscheinlich den lysosomalen Abbauweg in der Zelle. Verschiedene Anhaltspunkte deuten daraufhin. So ist bei vielen neurologischen Erkrankungen eine gestörte lysosomale Funktion von Bedeutung.

Der Zusammenhang zwischen Defekten im lysosomalen System der Zelle und einem pathologischen Phänotyp ist bei den lysosomalen Speicherkrankheiten unmittelbar zu beobachten. Dies ist eine heterogene Gruppe, meist autosomal-rezessiv vererbter Stoffwechselerkrankungen, die sich in vielen Organsystemen manifestieren. Sie beruhen auf dem Funktionsverlust von Enzymen, die direkt in lysosomalen Stoffwechselwegen involviert sind. Über zwei Drittel der Betroffenen entwickeln neurologische Symptome (Schultz et al., 2011).

Funktionierende lysomale Stoffwechselwege sind für die Zellhomöostase, insbesondere für ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen der Bildung und dem Abbau zellulärer Proteine, unentbehrlich. Auch neurodegenerative Erkrankungen werden mit Dysfunktionen in diesen Abbauwegen in Verbindung gebracht (Rubinsztein, 2006).

So konnte bei der häufigsten neurodegenerativen Erkrankung, dem Morbus Alzheimer, der lysosomale Stoffwechselweg als wichtiger Regulator der Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins erkannt werden (Funderburk et al., 2010).

Eine weitere neurodegenerative Erkrankung, die familiäre Form der Amyotrophen Lateralsklerose, steht mit dem Protein Superoxid-Dismutase 1 in Verbindung. Diesem Protein wird eine mögliche Funktion im Rahmen der Makroautophagie - dem lysosomalen Abbauweg von Makromolekülen und Zellorganellen - zugesprochen (Li et al., 2008).

Auch bei anderen monogenetischen Formen des Parkinson-Syndroms scheint das Lysosom pathophysiologisch involviert zu sein. Beispielsweise ist α -Synuclein das Substrat verschiedener zellulärer Abbauwege. Unter anderem wird α -Synuclein durch Makroautophagie und *chaperone-mediated autophagy*, einem zellulären Vorgang, bei dem Hitzeschockproteine selektiv Proteine zum Lysosom rekrutieren, degradiert (Lee et al., 2004, Cuervo et al., 2004). Darüber hinaus wurden andere *PARK*-Gene mit gestörten lysosomalen Funktionen in Verbindung gebracht.

So führt der Funktionsverlust von DJ-1, der mit einer rezessiven Form des familiären Parkinson-Syndroms einhergeht, zu einem erhöhten Flux der Makroautophagie in murinen und humanen Zellen (Irrcher et al., 2010). Ein weiteres rezessives, familiäres Parkinson-Syndrom wird durch Mutationen in Parkin verursacht. Parkin ist an einem selektiven Abbauprozess, der Mitophagie, beteiligt. Hierbei werden nicht mehr funktionsfähige Mitochondrien in den Lysosomen degradiert. Selektiv wird Parkin zu den geschädigten Mitochondrien, die durch ein niedrigeres Membranpotential gekennzeichnet sind, rekrutiert. Nach der Rekrutierung vermittelt Parkin den selektiven Abbau der Mitochondrien durch die Effektoren der Autophagie (Narendra et al., 2008). Außerdem wirkt Parkin bei der Beseitigung dysfunktionaler Mitochondrien in einem gemeinsamen Signalweg mit der PTEN-induzierten putativen Kinase 1 (PINK1), einem weiteren *PARK*-Gen, zusammen (Narendra et al., 2010).

Relevant für die Pathophysiologie des KRS ist die Tatsache, dass einige der oben beschriebenen zellulären Mechanismen bei familiären Formen des Parkinson-Syndroms Schnittmengen mit ATP13A2 aufweisen. So konnten bei KRS-Patienten ein verminderter Adenosintriphosphat-Synthese-Level, eine erhöhte Frequenz mitochondrialer DNA-Läsionen sowie ein erhöhter Sauerstoff-Verbrauch in Fibroblasten nachgewiesen werden.

Die Überexpression von Wildtyp-ATP13A2 wirkte den pathologischen Veränderungen der Zellatmung entgegen. Diese Beobachtungen lassen auf eine Funktion von ATP13A2 bei der Aufrechterhaltung eines gesunden mitochondrialen Pools schließen (Grunewald et al., 2012).

Eine weitere Schnittmenge besteht zwischen ATP13A2 und α -Synuclein. So konnte eine Interaktion zwischen dem Ortholog zu ATP13A2 in *Saccharomyces cerevisiae* - YPK9 - und α -Synuclein aufgezeigt werden. Des Weiteren kann die Überexpression des Hefeproteins YPK9 die durch α -Synuclein ausgelöste Zelltoxizität unterdrücken (Gitler et al., 2009).

Dass der Funktionsverlust von ATP13A2 einen direkten Einfluss auf lysosomale Abbauewege hat, legen kürzlich gemachte Veröffentlichungen nahe. So konnten eine abnorme Ansäuerung der Lysosomen, eine verlangsamte proteasomale Prozessierung lysosomaler Proteine sowie ein verlangsamter Abbau lysosomaler Substrate in Fibroblasten mit mutiertem ATP13A2 beobachtet werden. Die Ergebnisse wurden auch in dopaminergen Zelllinien bestätigt, denen ATP13A2 fehlte (Dehay et al., 2012). In die gleiche Richtung weisen Ergebnisse, die eine verminderte lysosomale Degradierung in primären neuronalen Zellen ohne ATP13A2 zeigen konnten (Usenovic und Krainc, 2012). Somit scheint der Funktionsverlust von ATP13A2 entscheidend zur Krankheitsentstehung des KRS beizutragen.

4.2.3 Spezifische Quantifizierung der Spleißvarianten

Die Spleißvarianten A13A2.FL (Isoform-1) und A13A2.Sk (Isoform-3) wurden im Rahmen dieser Arbeit spezifisch quantifiziert. Im Vergleich mit gesunden Kontrollindividuen zeigte sich bei dem Patienten PARK9-1 bezogen auf die gesamte *ATP13A2*-Expression ein signifikant erhöhter Anteil der Spleißvariante A13A2.Sk.

Das C-terminale Ende dieser auch als Isoform-3 bezeichneten Variante ist stark verändert, verglichen mit der Isoform-1. Die Folgen dieser Veränderungen bezüglich der Funktion des Proteins sind unbekannt.

Für die Isoformen-1 und -3 von Wildtyp-ATP13A2 zeigte sich, dass sie in der Zelle eine unterschiedliche Lokalisation aufweisen. Die Isoform-1 konnte im Lysosom lokalisiert werden, Isoform-3 respektive im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Möglicherweise gehen die unterschiedlichen zellulären Lokalisationen der beiden Isoformen mit verschiedenen Funktionen einher (Ugolino et al., 2011).

Darüber hinaus konnte die Retention mutierter ATP13A2-Proteine im ER nachgewiesen werden (Ramirez et al., 2006).

Da die Isoform-3 genauso wie die mutierten Proteine im ER zu finden war, könnte diese Spleißvariante ein fehlerhaftes Produkt des normalen Spleißvorgangs darstellen. Die Tatsache, dass der Spleißvariante die beiden letzten vorhergesagten Transmembrandomänen fehlen, lässt vermuten, dass sich diese Veränderungen auf die Funktion des Proteins auswirken. Ferner führt die Überexpression der Isoform-3 in HeLa-Zellen anscheinend zu vermehrtem Zelltod. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Spleißvariante als toxische Proteinvariante zur Pathogenese des KRS beiträgt. (Ugolino et al., 2011).

Sollte es sich bei der Isoform-3 um eine aberrante Variante handeln, liegt die Vermutung nahe, dass sie durch NMD abgebaut wird. Im Fall des Patienten PARK9-1 und der Kontrollindividuen war die Expression der Isoform-3 jedoch stabil und scheint nicht NMD zu unterliegen. Weshalb die für die Zelle möglicherweise toxische Variante nicht durch NMD abgebaut wird, liegt in den Triggermechanismen des NMD begründet. NMD wird normalerweise durch Stopcodons aktiviert, wenn sich deren Lokalisation innerhalb der mRNA mehr als 50-55 Nukleotide stromaufwärts einer Exon-Exon-Verbindungsstelle befindet (Maquat, 2005). Bei der Isoform-3 befindet sich das vorzeitige Stopcodon jedoch im letzten Exon, sodass es keine zusätzliche Exon-Exon-Verbindungsstelle stromabwärts gibt. Daher aktiviert dieses Transkript wahrscheinlich nicht den NMD.

Ein Beispiel für einen solchen Fall stellt das menschliche *β -Globin*-Gen dar. Mutationen innerhalb des letzten Exons dieses Gens haben keinen NMD zur Folge, da keine Exon-Exon-Verbindungsstelle folgt. Das resultierende trunkierte β -Globin kann sich nicht ordnungsgemäß an α -Globin anlagern. Folglich kommt es zu einer dominant vererbten Form der Thalassämie. Mutationen in den anderen Exons, die ein Stopcodon herbeiführen, verursachen hingegen rezessiv vererbte Formen der Thalassämie (Thein, 2004).

Unter Umständen entsteht somit in Folge des nicht stattfindenden Abbaus der Spleißvariante ein Protein mit einer gestörten Proteinfaltung. Dieses sollte von den Qualitätskontrollmechanismen des ERs erkannt und wie bei den mutierten ATP13A2-Proteinen durch das Proteasom abgebaut werden (Ramirez et al., 2006).

Interessanterweise wurde beim Patienten PARK9-1 eine erhöhte Expression von *unfolded protein response*-Markern bei neuronalen Stammzellen aus der Riechschleimhaut beschrieben (Park et al., 2011). Die Expression dieser Marker wird bei ER-Stress, ausgelöst durch fehlgefaltete Proteine, hochreguliert (Kaufman, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass ER-Stress unter anderem mit Neurodegeneration assoziiert ist (Lindholm et al., 2006). Somit trägt die *loss of function* von ATP13A2 möglicherweise nicht ausschließlich zum Phänotyp des KRS bei. Es ist denkbar, dass fehlgefaltete ATP13A2-Proteine negative Auswirkungen auf die ER-Homöostase haben, wodurch es zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber ER-Stress kommt. Der erhöhte ER-Stress könnte zum Zelltod beitragen. Somit wäre es denkbar, dass eine Kombination verschiedener Pathomechanismen am Phänotyp des KRS beteiligt ist.

Möglicherweise geht aus der Spleißvariante Isoform-3 auch ein aktives ATP13A2-Protein hervor, das eine spezifische zelluläre Verteilung und Funktion besitzt. Dies erscheint aufgrund der zuvor beschriebenen Annahmen jedoch weniger wahrscheinlich.

4.2.4 Auswirkungen der Mutation c.3253delC auf das Spleißen

Eine oft zitierte Studie von 1992 schätzt, dass 15 Prozent aller Punktmutationen, die zu genetischen Krankheiten beim Menschen führen, einen Einfluss auf den Spleißprozess haben. Diese Untersuchung berücksichtigte damals jedoch lediglich Mutationen, die direkt die Spleißstellen betreffen (Krawczak et al., 1992). Heute ist ersichtlich, dass eine Vielzahl weiterer Mutationen, das Spleißen beeinflusst. Dazu zählen beispielsweise Mutationen, die kryptischen Spleißstellen oder veränderte Sekundärstrukturen der RNA hervorrufen (Pagani und Baralle, 2004).

Nach Lopez-Bigas et al. sind 60 Prozent aller krankheitsverursachenden Mutationen auf eine Störung des Spleißprozesses zurückzuführen (Lopez-Bigas et al., 2005). Dieser Zusammenhang zwischen Defekten des Spleißens und humanen Krankheiten konnte zahlreich belegt werden, beispielsweise für die Zystische Fibrose oder die frontotemporale Demenz (Faustino und Cooper, 2003).

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der Software *ESEfinder 3.0* ein Einfluss der Mutation des Patienten PARK9-1 auf den Spleißprozess gezeigt werden. Die Deletion 3253delC beeinträchtigt ein ESE-Motiv. ESE-Motive sind regulatorische Elemente, die zusätzlich mit den schwach konservierten intronischen Sequenzen – den 5' und 3' Spleißstellen sowie der Verzweigungsstelle (*branch site*) - für die Intron-Exon-Definition wichtig sind. ESE-Motive scheinen sehr häufig vorzukommen und sind auch in den kodierenden Abschnitten konstitutiv gespleißter prä-mRNA anzutreffen (Schaal und Maniatis, 1999). Insbesondere die große Anzahl verschiedener Sequenzen, die als ESE fungieren können, spricht für eine weite Verbreitung im Genom (Liu et al., 1998). ESE dienen vermutlich als Bindungsstellen für spezifische SR-Proteine (vgl. Abschnitt 1.5).

Die Mutation 3253delC hat nach der softwaregestützten Analyse einen Einfluss auf die Bindung des SR-Proteins SC35. Wie in Abschnitt 3.2.5 anhand einer spezifischen Amplifizierung und anschließender Sequenzierung der Spleißvarianten A13A2.FL und A13A2.Sk gezeigt werden konnte, begünstigt die Mutation 3253delC das Überspringen des Exons 28. Interessanterweise konnte die Analyse einer Datenbank von 50 Einzelbasensubstitutionen, die mit einem Exon-Skipping assoziiert waren, darlegen, dass mehr als 50 Prozent dieser Mutationen Zielmotive von SR-Proteinen betrafen (Liu et al., 2001).

Beispielsweise konnte für das SR-Protein SC35 bei Pyruvat-Dehydrogenase-Mangel, eine Störung im Stoffwechsel der Kohlenhydrate, eine Mutation nachgewiesen werden, die zu einer verstärkten Bindung dieses Proteins führt (Gabut et al., 2005).

SR-Proteine werden auch mit anderen Krankheiten in Verbindung gebracht. Es gibt zunehmend Hinweise auf eine Verbindung zwischen Fehlexpression von SR-Proteinen und der Entwicklung von Malignomen.

So konnte ein verändertes Expressionsmuster mit höherem Gehalt an phosphorylierten SR-Proteinen sowie eine Induktion der SR-Proteine SC35 und ASF/SF2 in malignem Ovarialgewebe nachgewiesen werden (Fischer et al., 2004).

Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen sind SR-Proteine beteiligt. Ein Beispiel ist die Spinale Muskelatrophie. Die Erkrankung ist bedingt durch Mutationen im *survival of motor neuron 1 (SMN1)*-Gen.

Die fehlende Expression des Genprodukts von *SMN1* könnte teilweise durch ein *SMN1*-Paralog, *SMN2* genannt, kompensiert werden. Die beiden Paraloge unterscheiden sich lediglich durch eine Einzelbasensubstitution, eine Cytosin zu Thymin Transition, in Exon 7. Die Transition hat ein Exon-Skipping zur Folge, sodass nur geringe Mengen an funktionellem Protein entstehen. Einerseits wurde das Exon-Skipping auf den Verlust eines ESE-Motivs, das mit dem SR-Protein SF2/ASF interagiert, zurückgeführt (Cartegni und Krainer, 2002). Andererseits wurde das Überspringen des Exons mit der Generierung eines *Exonic splicing silencers* erklärt (Kashima und Manley, 2003).

In ähnlicher Weise könnte es, bedingt durch die Mutation 3253delC des Patienten PARK9-1, zum Exon-Skipping kommen, indem die Bindung des Proteins SC35 beeinträchtigt wird. So konnte 2011 der Mechanismus des Exon-Skippings auch im *ATP13A2* des Tibet-Terriers, einer Hunderasse, aufgezeigt werden. Die Deletion einer Base in Exon 8 hatte das Überspringen des entsprechenden Exons zur Folge. Diese Mutation führte zu einer um 69 Aminosäuren kürzeren alternativen Spleißvariante und nicht zu einer *frameshift*-Mutation mit vorzeitigem Stopcodon, wie vorhergesagt (Wohlke et al., 2011).

Erstaunlicherweise verursachen trunkierende Mutationen im *ATP13A2*-Gen beim Tibet-Terrier eine rezessive, im Erwachsenenalter auftretende Form der Neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL). Generalisierte Hirnatrophie, Verhaltensänderungen und der Verfall der kognitiven Fähigkeiten sind Charakteristika, die die menschlichen Mutationsträger mit KRS und die tierischen mit NCL gemeinsam haben. Unterschiede im Phänotyp sind insbesondere im Bereich der Bewegungsstörungen auszumachen.

Hunde mit NCL entwickelten eine zerebelläre Ataxie, die bei KRS-Patient nicht beschrieben ist. Die Parkinson-Symptomatik und die Pyramidenbahnzeichen traten hingegen bei den Tieren nicht auf (Farias et al., 2011).

Da es bei den NCLs zu einer intrazellulären Anhäufung von autofluoreszierendem Material (Ceroid-Lipofuscin) kommt, könnten histopathologische Untersuchungen des Hirngewebes von KRS-Patienten klären, ob die Krankheitsbilder weitere Gemeinsamkeiten aufweisen.

Der beim Patienten PARK9-1 beobachtete Effekt des Exon-Skippings, könnte alternativ auch auf eine indirekte Wirkung des NMD anstelle einer unabhängigen Folge der Mutation zurückzuführen sein.

In mehreren Fällen konnte gezeigt werden, dass die Korrelation zwischen vorzeitigem Stopcodon und Exon-Skipping ein Artefakt der RT-PCR war. Wegen des vorzeitigen Stopcodons wurde eine im Überschuss vorhandene mRNA, die das mutierte Exon trägt, gezielt durch NMD abgebaut (Valentine, 1998). Folglich konnte eine seltenere konstitutiv exprimierte mRNA-Spezies, bei der das Exon übersprungen wird, vermehrt detektiert werden. Zurückzuführen war die vermehrte Detektion auf den Abbau der normalerweise im Überschuss vorhandenen Variante. Allerdings beziehen sich diese Artefakte auf RT-PCR-Verfahren von 1998, wodurch eine Übertragung auf heutige präzisere Verfahren schwierig ist. Dennoch wäre eine funktionelle Identifizierung des ESE-Motivs in zukünftigen Versuchen sinnvoll. Dafür wäre die *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* (SELEX)-Methode ein etabliertes Verfahren. Hierbei binden Oligonukleotide entweder einzelsträngige DNA oder RNA spezifisch an einen Zielliganden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die mutierten Allele der KRS-Patienten einem Abbau durch NMD unterliegen. Dies stützt die Hypothese des *loss of function* von ATP13A2. Insbesondere die homozygote Mutation des Patienten PARK9-3 verdeutlicht aufgrund der kaum vorhandenen Expression von ATP13A2, dass *loss of function* des Proteins an der Pathophysiologie des KRS beteiligt ist.

Darüber hinaus konnte mit dem Überspringen des Exon 28 ein neuartiger Pathomechanismus der Mutation c.3253delC aufgezeigt werden. Dies führt zur erhöhten Expression einer aberranten ATP13A2-Variante. Im Einklang mit der Hypothese, dass eine Überlastung zellulärer Abbauege zur Pathogenese des KRS beiträgt, ist ein Beitrag der aberranten Variante hierzu denkbar.

5 AUSBLICK

Sowohl häufige, als auch seltene genetische Varianten werden mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom in Verbindung gebracht. In verschiedenen Ethnien waren die Assoziationen jedoch unterschiedlich ausgeprägt. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit konnten diese populationsspezifischen Unterschiede verdeutlichen. Die biologische Relevanz solcher populationsspezifischen Suszeptibilitätsallele zu erkennen, ist für ein besseres Verständnis der Pathophysiologie des idiopathischen Parkinson-Syndroms notwendig. Um allerdings die biologische Grundlage dieser Suszeptibilitätsloci zu ermitteln, sind zukünftige, funktionelle Studien erforderlich. Die funktionelle Klärung der Varianten erweist sich indes oft als schwierig. So sind viele Varianten in nicht kodierenden Regionen des Genoms zu finden. Vielversprechend sind daher Forschungsansätze wie das ENCODE-Projekt, das die Identifizierung funktioneller Elemente des menschlichen Genoms zum Ziel hat. Es ist vorstellbar, dass die genetischen Unterschiede der verschiedenen Populationen in naher Zukunft klinische Relevanz erlangen könnten. Denkbar sind auf die jeweilige Population zugeschnittene genetische Tests. Unter Umständen könnte dies auch individualisierte Therapien zur Folge haben.

Eine genetische oder pharmakologische Intervention ist auch beim KRS denkbar. Sollte sich die Einbeziehung von *ATP13A2* in lysosomalen Abbauwegen weiter bestätigen, ist der Eingriff in diese Stoffwechselwege als therapeutische Strategie nicht ausgeschlossen.

Weitere Perspektiven für das weitergehende Verständnis des KRS bieten die Fortschritte der Stammzellbiologie. Diese haben zu Techniken geführt, die es ermöglichen, somatische adulte Zellen in einen Zustand der Pluripotenz zu reprogrammieren. Durch diese Reprogrammierung können unter anderem leicht zu gewinnende Fibroblasten in pluripotente Stammzellen umgewandelt werden und dann in Neurone transdifferenziert werden.

So wäre, bezogen auf die Aussagen dieser Arbeit, die Untersuchung der Expression von *ATP13A2* in neuronalen Zellen von KRS-Patienten denkbar. Da eine solche Analyse der *ATP13A2*-Expression direkt in dem von der Neurodegeneration betroffenen Gewebe stattfände, wäre die Aussagekraft solcher Ergebnisse valider. Insbesondere aber die physiologische Funktion könnte in einem neuronalen Kontext besser geklärt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten 15 Jahren hat der genetische Fortschritt die Sichtweise auf das Parkinson-Syndrom erheblich verändert. Genetische Ursachen für familiäre Parkinson-Formen konnten aufgeklärt werden. So führen Mutationen im *ATP13A2*-Gen zum Kufor-Rakeb-Syndrom (KRS), eine mit Demenz einhergehende juvenile Form des Parkinson-Syndroms. Parallel zu dieser Entwicklung konnten beim „klassischen“ idiopathischen Parkinson-Syndrom zahlreiche genetische Suszeptibilitätsvarianten identifiziert werden. Diese Arbeit beschäftigte sich zum einen mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom, zum anderen mit dem KRS.

Die Auseinandersetzung mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom fand anhand einer Fall-Kontroll-Studie statt. In einem chilenischen Kollektiv wurde der in einer japanischen Assoziationsstudie determinierte Suszeptibilitätslocus *PARK16* untersucht. Hierzu fand die Genotypisierung zweier Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) statt. Die Assoziation des Locus mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom konnte zum Teil in dem chilenischen Kollektiv bestätigt werden.

Zudem befasste sich diese Arbeit mit dem KRS auf der Ebene der RNA-Expression. Um den Pathomechanismus der Erkrankung näher zu charakterisieren, wurde eine Expressionsanalyse des krankheitsverursachenden *ATP13A2*-Gens in Hautfibroblasten bei drei KRS-Patienten durchgeführt. Zwei zur Pathophysiologie des KRS aufgestellte Hypothesen sollten geklärt werden. Handelt es sich per se um eine *loss of function* von *ATP13A2* und/oder trägt die Überlastung zellulärer Abbauwege durch mutiertes *ATP13A2* zur Krankheit bei? Die Hypothese des *loss of function* stützend wurden drei verschiedene trunkierende mutationstragende Allele durch *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), einen Kontrollmechanismus, der die Expression verkürzter Proteine verhindert, abgebaut. Bei einem homozygoten Mutationsträger verdeutlicht die kaum vorhandene *ATP13A2*-Expression, dass *loss of function* von *ATP13A2* an der Pathophysiologie des KRS beteiligt ist. Darüber hinaus konnte für eine Mutation gezeigt werden, dass sie zum Überspringen des Exons 28 führt. Somit kommt es bei diesem Patienten zu einer erhöhten Expression einer aberranten *ATP13A2*-Variante. Zusammenfassend zeigen die Daten der Expressionsanalyse, dass mehrere Mechanismen am Prozess der Neurodegeneration beim KRS beteiligt sein können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Auburger, G.; Klinkenberg, M.; Drost, J.; Marcus, K.; Morales-Gordo, B.; Kunz, W. S.; Brandt, U.; Broccoli, V.; Reichmann, H.; Gispert, S. und Jendrach, M. (2012): Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease, *Molecular neurobiology* (Band 46), Nr. 1, Seite 20-7
- Behrens, M. I.; Bruggemann, N.; Chana, P.; Venegas, P.; Kagi, M.; Parrao, T.; Orellana, P.; Garrido, C.; Rojas, C. V.; Hauke, J.; Hahnen, E.; Gonzalez, R.; Seleme, N.; Fernandez, V.; Schmidt, A.; Binkofski, F.; Kompf, D.; Kubisch, C.; Hagenah, J.; Klein, C. und Ramirez, A. (2010): Clinical spectrum of Kufor-Rakeb syndrome in the Chilean kindred with ATP13A2 mutations, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* (Band 25), Nr. 12, Seite 1929-37
- Bender, R.; Ziegler, A. und Lange, S. (2007): [Logistic regression], *Dtsch Med Wochenschr.* (Band 132 Suppl 1), Seite e33-5
- Blencowe, B. J. (2000): Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases, *Trends Biochem Sci* (Band 25), Nr. 3, Seite 106-10
- Bonifati, V.; Rizzu, P.; van Baren, M. J.; Schaap, O.; Breedveld, G. J.; Krieger, E.; Dekker, M. C.; Squitieri, F.; Ibanez, P.; Joosse, M.; van Dongen, J. W.; Vanacore, N.; van Swieten, J. C.; Brice, A.; Meco, G.; van Duijn, C. M.; Oostra, B. A. und Heutink, P. (2003): Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism, *Science* (Band 299), Nr. 5604, Seite 256-9
- Braak, H.; Rub, U. und Braak, E. (2000): [Neuroanatomy of Parkinson disease. Changes in the neuronal cytoskeleton of a few disease-susceptible types of neurons lead to progressive destruction of circumscribed areas in the limbic and motor systems], *Nervenarzt* (Band 71), Nr. 6, Seite 459-69
- Bruggemann, N.; Hagenah, J.; Reetz, K.; Schmidt, A.; Kasten, M.; Buchmann, I.; Eckerle, S.; Bahre, M.; Munchau, A.; Djarmati, A.; van der Vegt, J.; Siebner, H.; Binkofski, F.; Ramirez, A.; Behrens, M. I. und Klein, C. (2010): Recessively inherited parkinsonism: effect of ATP13A2 mutations on the clinical and neuroimaging phenotype, *Arch Neurol* (Band 67), Nr. 11, Seite 1357-63
- Cartegni, L. (2003): ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers, *Nucleic Acids Research* (Band 31), Nr. 13, Seite 3568-3571

- Cartegni, L.; Chew, S. L. und Krainer, A. R. (2002): Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing, *Nature reviews. Genetics* (Band 3), Nr. 4, Seite 285-98
- Cartegni, L. und Krainer, A. R. (2002): Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1, *Nature genetics* (Band 30), Nr. 4, Seite 377-84
- Chang, X. L.; Mao, X. Y.; Li, H. H.; Zhang, J. H.; Li, N. N.; Burgunder, J. M.; Peng, R. und Tan, E. K. (2011): Association of GWAS loci with PD in China, *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* (Band 156B), Nr. 3, Seite 334-9
- Chartier-Harlin, M. C.; Dachsel, J. C.; Vilarino-Guell, C.; Lincoln, S. J.; LePrete, F.; Hulihan, M. M.; Kachergus, J.; Milnerwood, A. J.; Tapia, L.; Song, M. S.; LeRhun, E.; Mutez, E.; Larvor, L.; Duflot, A.; Vanbesien-Mailliot, C.; Kreisler, A.; Ross, O. A.; Nishioka, K.; Soto-Ortolaza, A. I.; Cobb, S. A.; Melrose, H. L.; Behrouz, B.; Keeling, B. H.; Bacon, J. A.; Hentati, E.; Williams, L.; Yanagiya, A.; Sonenberg, N.; Lockhart, P. J.; Zubair, A. C.; Uitti, R. J.; Aasly, J. O.; Krygowska-Wajs, A.; Opala, G.; Wszolek, Z. K.; Frigerio, R.; Maraganore, D. M.; Gosal, D.; Lynch, T.; Hutchinson, M.; Bentivoglio, A. R.; Valente, E. M.; Nichols, W. C.; Pankratz, N.; Foroud, T.; Gibson, R. A.; Hentati, F.; Dickson, D. W.; Destee, A. und Farrer, M. J. (2011): Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease, *Am J Hum Genet* (Band 89), Nr. 3, Seite 398-406
- Crosiers, D.; Ceulemans, B.; Meeus, B.; Nuytemans, K.; Pals, P.; Van Broeckhoven, C.; Cras, P. und Theuns, J. (2011): Juvenile dystonia-parkinsonism and dementia caused by a novel ATP13A2 frameshift mutation, *Parkinsonism & related disorders* (Band 17), Nr. 2, Seite 135-8
- Crossman, A. R. (2000): Functional anatomy of movement disorders, *J Anat* (Band 196 (Pt 4)), Seite 519-25
- Cuervo, A. M.; Stefanis, L.; Fredenburg, R.; Lansbury, P. T. und Sulzer, D. (2004): Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy, *Science* (Band 305), Nr. 5688, Seite 1292-5
- Daly, M. J.; Rioux, J. D.; Schaffner, S. F.; Hudson, T. J. und Lander, E. S. (2001): High-resolution haplotype structure in the human genome, *Nature genetics* (Band 29), Nr. 2, Seite 229-32

- de Rijk, M. C.; Breteler, M. M.; Graveland, G. A.; Ott, A.; Grobbee, D. E.; van der Meche, F. G. und Hofman, A. (1995): Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study, *Neurology* (Band 45), Nr. 12, Seite 2143-6
- Dehay, B.; Ramirez, A.; Martinez-Vicente, M.; Perier, C.; Canron, M. H.; Doudnikoff, E.; Vital, A.; Vila, M.; Klein, C. und Bezdard, E. (2012): Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 109), Nr. 24, Seite 9611-6
- Di Fonzo, A.; Chien, H. F.; Socal, M.; Giraud, S.; Tassorelli, C.; Iliceto, G.; Fabbrini, G.; Marconi, R.; Fincati, E.; Abbruzzese, G.; Marini, P.; Squitieri, F.; Horstink, M. W.; Montagna, P.; Libera, A. D.; Stocchi, F.; Goldwurm, S.; Ferreira, J. J.; Meco, G.; Martignoni, E.; Lopiano, L.; Jardim, L. B.; Oostra, B. A.; Barbosa, E. R. und Bonifati, V. (2007): ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease, *Neurology* (Band 68), Nr. 19, Seite 1557-62
- Duvoisin, R. C.; Eldridge, R.; Williams, A.; Nutt, J. und Calne, D. (1981): Twin study of Parkinson disease, *Neurology* (Band 31), Nr. 1, Seite 77-80
- Eiberg, H.; Hansen, L.; Korbo, L.; Nielsen, I. M.; Svenstrup, K.; Bech, S.; Pinborg, L. H.; Friberg, L.; Hjermand, L. E.; Olsen, O. R. und Nielsen, J. E. (2012): Novel mutation in ATP13A2 widens the spectrum of Kufor-Rakeb syndrome (PARK9), *Clinical Genetics* (Band 82), Nr. 3, Seite 256-263
- Farias, F. H.; Zeng, R.; Johnson, G. S.; Wininger, F. A.; Taylor, J. F.; Schnabel, R. D.; McKay, S. D.; Sanders, D. N.; Lohi, H.; Seppala, E. H.; Wade, C. M.; Lindblad-Toh, K.; O'Brien, D. P. und Katz, M. L. (2011): A truncating mutation in ATP13A2 is responsible for adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis in Tibetan terriers, *Neurobiology of disease* (Band 42), Nr. 3, Seite 468-74
- Faustino, N. A. und Cooper, T. A. (2003): Pre-mRNA splicing and human disease, *Genes & development* (Band 17), Nr. 4, Seite 419-37
- Fischer, D. C.; Noack, K.; Runnebaum, I. B.; Watermann, D. O.; Kieback, D. G.; Stamm, S. und Stickeler, E. (2004): Expression of splicing factors in human ovarian cancer, *Oncol Rep* (Band 11), Nr. 5, Seite 1085-90
- Funderburk, S. F.; Marcellino, B. K. und Yue, Z. (2010): Cell "self-eating" (autophagy) mechanism in Alzheimer's disease, *The Mount Sinai journal of medicine, New York* (Band 77), Nr. 1, Seite 59-68

- Gabut, M.; Mine, M.; Marsac, C.; Brivet, M.; Tazi, J. und Soret, J. (2005): The SR protein SC35 is responsible for aberrant splicing of the E1alpha pyruvate dehydrogenase mRNA in a case of mental retardation with lactic acidosis, *Molecular and cellular biology* (Band 25), Nr. 8, Seite 3286-94
- Gasser, T.; Muller-Myhsok, B.; Wszolek, Z. K.; Oehlmann, R.; Calne, D. B.; Bonifati, V.; Bereznoi, B.; Fabrizio, E.; Vieregge, P. und Horstmann, R. D. (1998): A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13, *Nature genetics* (Band 18), Nr. 3, Seite 262-5
- Gibb, W. R. und Lees, A. J. (1988): The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* (Band 51), Nr. 6, Seite 745-52
- Gitler, A. D.; Chesi, A.; Geddie, M. L.; Strathearn, K. E.; Hamamichi, S.; Hill, K. J.; Caldwell, K. A.; Caldwell, G. A.; Cooper, A. A.; Rochet, J. C. und Lindquist, S. (2009): Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity, *Nature genetics* (Band 41), Nr. 3, Seite 308-15
- Goetz, C. G.; Chmura, T. A. und Lanska, D. J. (2001): Seminal figures in the history of movement disorders: Sydenham, Parkinson, and Charcot: Part 6 of the MDS-sponsored history of Movement Disorders exhibit, Barcelona, June 2000, *Mov Disord* (Band 16), Nr. 3, Seite 537-40
- Grunewald, A.; Arns, B.; Seibler, P.; Rakovic, A.; Munchau, A.; Ramirez, A.; Sue, C. M. und Klein, C. (2012): ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with Kufor-Rakeb syndrome, *Neurobiol Aging* (Band 33), Nr. 8, Seite 1843 e1-7
- Hampshire, D. J.; Roberts, E.; Crow, Y.; Bond, J.; Mubaidin, A.; Wriekat, A. L.; Al-Din, A. und Woods, C. G. (2001): Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36, *J Med Genet* (Band 38), Nr. 10, Seite 680-2
- Harlin, H. und Gajewski, T. F. (2008): Diagnosis and treatment of mycoplasma-contaminated cell cultures, *Curr Protoc Cytom* (Band Appendix 3), Seite Appendix 3C

- Haugarvoll, K.; Rademakers, R.; Kachergus, J. M.; Nuytemans, K.; Ross, O. A.; Gibson, J. M.; Tan, E. K.; Gaig, C.; Tolosa, E.; Goldwurm, S.; Guidi, M.; Riboldazzi, G.; Brown, L.; Walter, U.; Benecke, R.; Berg, D.; Gasser, T.; Theuns, J.; Pals, P.; Cras, P.; De Deyn, P. P.; Engelborghs, S.; Pickut, B.; Uitti, R. J.; Foroud, T.; Nichols, W. C.; Hagenah, J.; Klein, C.; Samii, A.; Zabetian, C. P.; Bonifati, V.; Van Broeckhoven, C.; Farrer, M. J. und Wszolek, Z. K. (2008): Lrrk2 R1441C parkinsonism is clinically similar to sporadic Parkinson disease, *Neurology* (Band 70), Nr. 16 Pt 2, Seite 1456-60
- Hicks, A. A.; Petursson, H.; Jonsson, T.; Stefansson, H.; Johannsdottir, H. S.; Sainz, J.; Frigge, M. L.; Kong, A.; Gulcher, J. R.; Stefansson, K. und Sveinbjornsdottir, S. (2002): A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease, *Ann Neurol* (Band 52), Nr. 5, Seite 549-55
- Hirschhorn, J. N. und Daly, M. J. (2005): Genome-wide association studies for common diseases and complex traits, *Nature reviews. Genetics* (Band 6), Nr. 2, Seite 95-108
- Irrcher, I.; Aleyasin, H.; Seifert, E. L.; Hewitt, S. J.; Chhabra, S.; Phillips, M.; Lutz, A. K.; Rousseaux, M. W.; Bevilacqua, L.; Jahani-Asl, A.; Callaghan, S.; MacLaurin, J. G.; Winklhofer, K. F.; Rizzu, P.; Rippstein, P.; Kim, R. H.; Chen, C. X.; Fon, E. A.; Slack, R. S.; Harper, M. E.; McBride, H. M.; Mak, T. W. und Park, D. S. (2010): Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics, *Human molecular genetics* (Band 19), Nr. 19, Seite 3734-46
- Jankovic, J. (2008): Parkinson's disease: clinical features and diagnosis, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* (Band 79), Nr. 4, Seite 368-76
- Kashima, T. und Manley, J. L. (2003): A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy, *Nature genetics* (Band 34), Nr. 4, Seite 460-3
- Kaufman, R. J. (1999): Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls, *Genes & development* (Band 13), Nr. 10, Seite 1211-33
- Kitada, T.; Asakawa, S.; Hattori, N.; Matsumine, H.; Yamamura, Y.; Minoshima, S.; Yokochi, M.; Mizuno, Y. und Shimizu, N. (1998): Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature* (Band 392), Nr. 6676, Seite 605-8

- Krawczak, M.; Reiss, J. und Cooper, D. N. (1992): The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences, *Hum Genet* (Band 90), Nr. 1-2, Seite 41-54
- Lautier, C.; Goldwurm, S.; Durr, A.; Giovannone, B.; Tsiaras, W. G.; Pezzoli, G.; Brice, A. und Smith, R. J. (2008): Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease, *Am J Hum Genet* (Band 82), Nr. 4, Seite 822-33
- Lee, H. J.; Khoshaghideh, F.; Patel, S. und Lee, S. J. (2004): Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* (Band 24), Nr. 8, Seite 1888-96
- Leroy, E.; Boyer, R.; Auburger, G.; Leube, B.; Ulm, G.; Mezey, E.; Harta, G.; Brownstein, M. J.; Jonnalagada, S.; Chernova, T.; Dehejia, A.; Lavedan, C.; Gasser, T.; Steinbach, P. J.; Wilkinson, K. D. und Polymeropoulos, M. H. (1998): The ubiquitin pathway in Parkinson's disease, *Nature* (Band 395), Nr. 6701, Seite 451-2
- Lesage, S. und Brice, A. (2009): Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors, *Human molecular genetics* (Band 18), Nr. R1, Seite R48-59
- Li, L.; Zhang, X. und Le, W. (2008): Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice, *Autophagy* (Band 4), Nr. 3, Seite 290-3
- Lill, C. M.; Roehr, J. T.; McQueen, M. B.; Kavvoura, F. K.; Bagade, S.; Schjeide, B. M.; Schjeide, L. M.; Meissner, E.; Zauft, U.; Allen, N. C.; Liu, T.; Schilling, M.; Anderson, K. J.; Beecham, G.; Berg, D.; Biernacka, J. M.; Brice, A.; DeStefano, A. L.; Do, C. B.; Eriksson, N.; Factor, S. A.; Farrer, M. J.; Foroud, T.; Gasser, T.; Hamza, T.; Hardy, J. A.; Heutink, P.; Hill-Burns, E. M.; Klein, C.; Latourelle, J. C.; Maraganore, D. M.; Martin, E. R.; Martinez, M.; Myers, R. H.; Nalls, M. A.; Pankratz, N.; Payami, H.; Satake, W.; Scott, W. K.; Sharma, M.; Singleton, A. B.; Stefansson, K.; Toda, T.; Tung, J. Y.; Vance, J.; Wood, N. W.; Zabetian, C. P.; Young, P.; Tanzi, R. E.; Khoury, M. J.; Zipp, F.; Lehrach, H.; Ioannidis, J. P. und Bertram, L. (2012): Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database, *PLoS Genet* (Band 8), Nr. 3, Seite e1002548
- Lindholm, D.; Wootz, H. und Korhonen, L. (2006): ER stress and neurodegenerative diseases, *Cell Death Differ* (Band 13), Nr. 3, Seite 385-92

- Liu, H. X.; Cartegni, L.; Zhang, M. Q. und Krainer, A. R. (2001): A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes, *Nature genetics* (Band 27), Nr. 1, Seite 55-8
- Liu, H. X.; Zhang, M. und Krainer, A. R. (1998): Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins, *Genes & development* (Band 12), Nr. 13, Seite 1998-2012
- Long, J. C. und Caceres, J. F. (2009): The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression, *The Biochemical journal* (Band 417), Nr. 1, Seite 15-27
- Lopez-Bigas, N.; Audit, B.; Ouzounis, C.; Parra, G. und Guigo, R. (2005): Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease?, *FEBS letters* (Band 579), Nr. 9, Seite 1900-3
- Manolio, T. A.; Brooks, L. D. und Collins, F. S. (2008): A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease, *J Clin Invest* (Band 118), Nr. 5, Seite 1590-605
- Maquat, L. E. (2004): Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics, *Nature reviews. Molecular cell biology* (Band 5), Nr. 2, Seite 89-99
- Maquat, L. E. (2005): Nonsense-mediated mRNA decay in mammals, *Journal of cell science* (Band 118), Nr. Pt 9, Seite 1773-6
- Marongiu, R.; Ferraris, A.; Ialongo, T.; Michiorri, S.; Soleti, F.; Ferrari, F.; Elia, A. E.; Ghezzi, D.; Albanese, A.; Altavista, M. C.; Antonini, A.; Barone, P.; Brusa, L.; Cortelli, P.; Martinelli, P.; Pellicchia, M. T.; Pezzoli, G.; Scaglione, C.; Stanzone, P.; Tinazzi, M.; Zecchinelli, A.; Zeviani, M.; Cassetta, E.; Garavaglia, B.; Dallapiccola, B.; Bentivoglio, A. R. und Valente, E. M. (2008): PINK1 heterozygous rare variants: prevalence, significance and phenotypic spectrum, *Hum Mutat* (Band 29), Nr. 4, Seite 565
- Mulligan, C. J.; Hunley, K.; Cole, S. und Long, J. C. (2004): Population genetics, history, and health patterns in native americans, *Annu Rev Genomics Hum Genet* (Band 5), Seite 295-315
- Najim al-Din, A. S.; Wriekat, A.; Mubaidin, A.; Dasouki, M. und Hiari, M. (1994): Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome, *Acta Neurol Scand* (Band 89), Nr. 5, Seite 347-52

- Narendra, D. P.; Jin, S. M.; Tanaka, A.; Suen, D. F.; Gautier, C. A.; Shen, J.; Cookson, M. R. und Youle, R. J. (2010): PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin, *PLoS Biol* (Band 8), Nr. 1, Seite e1000298
- Narendra, D.; Tanaka, A.; Suen, D. F. und Youle, R. J. (2008): Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy, *The Journal of cell biology* (Band 183), Nr. 5, Seite 795-803
- Ning, Y. P.; Kanai, K.; Tomiyama, H.; Li, Y.; Funayama, M.; Yoshino, H.; Sato, S.; Asahina, M.; Kuwabara, S.; Takeda, A.; Hattori, T.; Mizuno, Y. und Hattori, N. (2008): PARK9-linked parkinsonism in eastern Asia: mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype, *Neurology* (Band 70), Nr. 16 Pt 2, Seite 1491-3
- Noensie, E. N. und Dietz, H. C. (2001): A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition, *Nat Biotechnol* (Band 19), Nr. 5, Seite 434-9
- Pagani, F. und Baralle, F. E. (2004): Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers, *Nature reviews. Genetics* (Band 5), Nr. 5, Seite 389-96
- Paisan-Ruiz, C.; Bhatia, K. P.; Li, A.; Hernandez, D.; Davis, M.; Wood, N. W.; Hardy, J.; Houlden, H.; Singleton, A. und Schneider, S. A. (2009): Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism, *Ann Neurol* (Band 65), Nr. 1, Seite 19-23
- Paisan-Ruiz, C.; Jain, S.; Evans, E. W.; Gilks, W. P.; Simon, J.; van der Brug, M.; Lopez de Munain, A.; Aparicio, S.; Gil, A. M.; Khan, N.; Johnson, J.; Martinez, J. R.; Nicholl, D.; Carrera, I. M.; Pena, A. S.; de Silva, R.; Lees, A.; Marti-Masso, J. F.; Perez-Tur, J.; Wood, N. W. und Singleton, A. B. (2004): Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease, *Neuron* (Band 44), Nr. 4, Seite 595-600
- Pan, Q.; Shai, O.; Lee, L. J.; Frey, B. J. und Blencowe, B. J. (2008): Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing, *Nature genetics* (Band 40), Nr. 12, Seite 1413-5
- Pankratz, N.; Nichols, W. C.; Uniacke, S. K.; Halter, C.; Murrell, J.; Rudolph, A.; Shults, C. W.; Conneally, P. M. und Foroud, T. (2003): Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families, *Human molecular genetics* (Band 12), Nr. 20, Seite 2599-608

- Pankratz, N.; Nichols, W. C.; Uniacke, S. K.; Halter, C.; Rudolph, A.; Shults, C.; Conneally, P. M. und Foroud, T. (2002): Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations, *Am J Hum Genet* (Band 71), Nr. 1, Seite 124-35
- Pankratz, N.; Nichols, W. C.; Uniacke, S. K.; Halter, C.; Rudolph, A.; Shults, C.; Conneally, P. M. und Foroud, T. (2003): Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37, *Am J Hum Genet* (Band 72), Nr. 4, Seite 1053-7
- Park, J. S.; Mehta, P.; Cooper, A. A.; Veivers, D.; Heimbach, A.; Stiller, B.; Kubisch, C.; Fung, V. S.; Krainc, D.; Mackay-Sim, A. und Sue, C. M. (2011): Pathogenic effects of novel mutations in the P-type ATPase ATP13A2 (PARK9) causing Kufor-Rakeb syndrome, a form of early-onset parkinsonism, *Human mutation* (Band 32), Nr. 8, Seite 956-64
- Parkinson, J. (2002): An essay on the shaking palsy. 1817, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* (Band 14), Nr. 2, Seite 223-36; discussion 222
- Plasterk, R. H. (1999): The year of the worm, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* (Band 21), Nr. 2, Seite 105-9
- Polymeropoulos, M. H. (1997): Mutation in the -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease, *Science* (Band 276), Nr. 5321, Seite 2045-2047
- Pruitt, K. D.; Tatusova, T.; Brown, G. R. und Maglott, D. R. (2012): NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy, *Nucleic Acids Research* (Band 40), Nr. Database issue, Seite D130-5
- Quinn, N.; Critchley, P. und Marsden, C. D. (1987): Young onset Parkinson's disease, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* (Band 2), Nr. 2, Seite 73-91
- Ramirez, A.; Heimbach, A.; Grundemann, J.; Stiller, B.; Hampshire, D.; Cid, L. P.; Goebel, I.; Mubaidin, A. F.; Wriekat, A. L.; Roeper, J.; Al-Din, A.; Hillmer, A. M.; Karsak, M.; Liss, B.; Woods, C. G.; Behrens, M. I. und Kubisch, C. (2006): Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase, *Nat Genet* (Band 38), Nr. 10, Seite 1184-1191
- Reese, M. G.; Eeckman, F. H.; Kulp, D. und Haussler, D. (1997): Improved splice site detection in Genie, *J Comput Biol* (Band 4), Nr. 3, Seite 311-23

- Rubinsztein, D. C. (2006): The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration, *Nature* (Band 443), Nr. 7113, Seite 780-6
- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* (Band 230), Nr. 4732, Seite 1350-4
- Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 74), Nr. 12, Seite 5463-7
- Santoro, L.; Breedveld, G. J.; Manganeli, F.; Iodice, R.; Pisciotta, C.; Nolano, M.; Punzo, F.; Quarantelli, M.; Pappata, S.; Di Fonzo, A.; Oostra, B. A. und Bonifati, V. (2011): Novel ATP13A2 (PARK9) homozygous mutation in a family with marked phenotype variability, *Neurogenetics* (Band 12), Nr. 1, Seite 33-9
- Satake, W.; Nakabayashi, Y.; Mizuta, I.; Hirota, Y.; Ito, C.; Kubo, M.; Kawaguchi, T.; Tsunoda, T.; Watanabe, M.; Takeda, A.; Tomiyama, H.; Nakashima, K.; Hasegawa, K.; Obata, F.; Yoshikawa, T.; Kawakami, H.; Sakoda, S.; Yamamoto, M.; Hattori, N.; Murata, M.; Nakamura, Y. und Toda, T. (2009): Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease, *Nature genetics* (Band 41), Nr. 12, Seite 1303-7
- Schaal, T. D. und Maniatis, T. (1999): Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA, *Mol Cell Biol* (Band 19), Nr. 1, Seite 261-73
- Schneider, S. A.; Paisan-Ruiz, C.; Quinn, N. P.; Lees, A. J.; Houlden, H.; Hardy, J. und Bhatia, K. P. (2010): ATP13A2 mutations (PARK9) cause neurodegeneration with brain iron accumulation, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* (Band 25), Nr. 8, Seite 979-84
- Schultz, M. L.; Tecedor, L.; Chang, M. und Davidson, B. L. (2011): Clarifying lysosomal storage diseases, *Trends in neurosciences* (Band 34), Nr. 8, Seite 401-10
- Shastry, B. S. (2009): SNPs: impact on gene function and phenotype, *Methods Mol Biol* (Band 578), Seite 3-22

- Shojaee, S.; Sina, F.; Banihosseini, S. S.; Kazemi, M. H.; Kalhor, R.; Shahidi, G. A.; Fakhrai-Rad, H.; Ronaghi, M. und Elahi, E. (2008): Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays, *Am J Hum Genet* (Band 82), Nr. 6, Seite 1375-84
- Simon-Sanchez, J.; Schulte, C.; Bras, J. M.; Sharma, M.; Gibbs, J. R.; Berg, D.; Paisan-Ruiz, C.; Lichtner, P.; Scholz, S. W.; Hernandez, D. G.; Kruger, R.; Federoff, M.; Klein, C.; Goate, A.; Perlmutter, J.; Bonin, M.; Nalls, M. A.; Illig, T.; Gieger, C.; Houlden, H.; Steffens, M.; Okun, M. S.; Racette, B. A.; Cookson, M. R.; Foote, K. D.; Fernandez, H. H.; Traynor, B. J.; Schreiber, S.; Arepalli, S.; Zonozi, R.; Gwinn, K.; van der Brug, M.; Lopez, G.; Chanock, S. J.; Schatzkin, A.; Park, Y.; Hollenbeck, A.; Gao, J.; Huang, X.; Wood, N. W.; Lorenz, D.; Deuschl, G.; Chen, H.; Riess, O.; Hardy, J. A.; Singleton, A. B. und Gasser, T. (2009): Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease, *Nature genetics* (Band 41), Nr. 12, Seite 1308-12
- Singleton, A. B.; Farrer, M.; Johnson, J.; Singleton, A.; Hague, S.; Kachergus, J.; Hulihan, M.; Peuralinna, T.; Dutra, A.; Nussbaum, R.; Lincoln, S.; Crawley, A.; Hanson, M.; Maraganore, D.; Adler, C.; Cookson, M. R.; Muentner, M.; Baptista, M.; Miller, D.; Blancato, J.; Hardy, J. und Gwinn-Hardy, K. (2003): alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, *Science* (Band 302), Nr. 5646, Seite 841
- Strauss, K. M.; Martins, L. M.; Plun-Favreau, H.; Marx, F. P.; Kautzmann, S.; Berg, D.; Gasser, T.; Wszolek, Z.; Muller, T.; Bornemann, A.; Wolburg, H.; Downward, J.; Riess, O.; Schulz, J. B. und Kruger, R. (2005): Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease, *Hum Mol Genet* (Band 14), Nr. 15, Seite 2099-111
- Tan, E. K.; Kwok, H. H.; Tan, L. C.; Zhao, W. T.; Prakash, K. M.; Au, W. L.; Pavanni, R.; Ng, Y. Y.; Satake, W.; Zhao, Y.; Toda, T. und Liu, J. J. (2010): Analysis of GWAS-linked loci in Parkinson disease reaffirms PARK16 as a susceptibility locus, *Neurology* (Band 75), Nr. 6, Seite 508-12
- Thein, S. L. (2004): Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia, *Br J Haematol* (Band 124), Nr. 3, Seite 264-74
- Ugolino, J.; Fang, S.; Kubisch, C. und Monteiro, M. J. (2011): Mutant Atp13a2 proteins involved in parkinsonism are degraded by ER-associated degradation and sensitize cells to ER-stress induced cell death, *Human molecular genetics* (Band 20), Nr. 18, Seite 3565-77

-
- Usenovic, M. und Krainc, D. (2012): Lysosomal dysfunction in neurodegeneration: the role of ATP13A2/PARK9, *Autophagy* (Band 8), Nr. 6, Seite 987-8
- Valente, E. M.; Abou-Sleiman, P. M.; Caputo, V.; Muqit, M. M.; Harvey, K.; Gispert, S.; Ali, Z.; Del Turco, D.; Bentivoglio, A. R.; Healy, D. G.; Albanese, A.; Nussbaum, R.; Gonzalez-Maldonado, R.; Deller, T.; Salvi, S.; Cortelli, P.; Gilks, W. P.; Latchman, D. S.; Harvey, R. J.; Dallapiccola, B.; Auburger, G. und Wood, N. W. (2004): Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1, *Science* (Band 304), Nr. 5674, Seite 1158-60
- Valentine, C. R. (1998): The association of nonsense codons with exon skipping, *Mutat Res* (Band 411), Nr. 2, Seite 87-117
- Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A. und Speleman, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol* (Band 3), Nr. 7, Seite RESEARCH0034
- VanGuilder, H. D.; Vrana, K. E. und Freeman, W. M. (2008): Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, *BioTechniques* (Band 44), Nr. 5, Seite 619-26

Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Mural, R. J.; Sutton, G. G.; Smith, H. O.; Yandell, M.; Evans, C. A.; Holt, R. A.; Gocayne, J. D.; Amanatides, P.; Ballew, R. M.; Huson, D. H.; Wortman, J. R.; Zhang, Q.; Kodira, C. D.; Zheng, X. H.; Chen, L.; Skupski, M.; Subramanian, G.; Thomas, P. D.; Zhang, J.; Gabor Miklos, G. L.; Nelson, C.; Broder, S.; Clark, A. G.; Nadeau, J.; McKusick, V. A.; Zinder, N.; Levine, A. J.; Roberts, R. J.; Simon, M.; Slayman, C.; Hunkapiller, M.; Bolanos, R.; Delcher, A.; Dew, I.; Fasulo, D.; Flanigan, M.; Florea, L.; Halpern, A.; Hannenhalli, S.; Kravitz, S.; Levy, S.; Mobarry, C.; Reinert, K.; Remington, K.; Abu-Threideh, J.; Beasley, E.; Biddick, K.; Bonazzi, V.; Brandon, R.; Cargill, M.; Chandramouliswaran, I.; Charlab, R.; Chaturvedi, K.; Deng, Z.; Di Francesco, V.; Dunn, P.; Eilbeck, K.; Evangelista, C.; Gabrielian, A. E.; Gan, W.; Ge, W.; Gong, F.; Gu, Z.; Guan, P.; Heiman, T. J.; Higgins, M. E.; Ji, R. R.; Ke, Z.; Ketchum, K. A.; Lai, Z.; Lei, Y.; Li, Z.; Li, J.; Liang, Y.; Lin, X.; Lu, F.; Merkulov, G. V.; Milshina, N.; Moore, H. M.; Naik, A. K.; Narayan, V. A.; Neelam, B.; Nusskern, D.; Rusch, D. B.; Salzberg, S.; Shao, W.; Shue, B.; Sun, J.; Wang, Z.; Wang, A.; Wang, X.; Wang, J.; Wei, M.; Wides, R.; Xiao, C.; Yan, C.; Yao, A.; Ye, J.; Zhan, M.; Zhang, W.; Zhang, H.; Zhao, Q.; Zheng, L.; Zhong, F.; Zhong, W.; Zhu, S.; Zhao, S.; Gilbert, D.; Baumhueter, S.; Spier, G.; Carter, C.; Cravchik, A.; Woodage, T.; Ali, F.; An, H.; Awe, A.; Baldwin, D.; Baden, H.; Barnstead, M.; Barrow, I.; Beeson, K.; Busam, D.; Carver, A.; Center, A.; Cheng, M. L.; Curry, L.; Danaher, S.; Davenport, L.; Desilets, R.; Dietz, S.; Dodson, K.; Doup, L.; Ferriera, S.; Garg, N.; Gluecksmann, A.; Hart, B.; Haynes, J.; Haynes, C.; Heiner, C.; Hladun, S.; Hostin, D.; Houck, J.; Howland, T.; Ibegwam, C.; Johnson, J.; Kalush, F.; Kline, L.; Koduru, S.; Love, A.; Mann, F.; May, D.; McCawley, S.; McIntosh, T.; McMullen, I.; Moy, M.; Moy, L.; Murphy, B.; Nelson, K.; Pfannkoch, C.; Pratts, E.; Puri, V.; Qureshi, H.; Reardon, M.; Rodriguez, R.; Rogers, Y. H.; Romblad, D.; Ruhfel, B.; Scott, R.; Sitter, C.; Smallwood, M.; Stewart, E.; Strong, R.; Suh, E.; Thomas, R.; Tint, N. N.; Tse, S.; Vech, C.; Wang, G.; Wetter, J.; Williams, S.; Williams, M.; Windsor, S.; Winn-Deen, E.; Wolfe, K.; Zaveri, J.; Zaveri, K.; Abril, J. F.; Guigo, R.; Campbell, M. J.; Sjolander, K. V.; Karlak, B.; Kejariwal, A.; Mi, H.; Lazareva, B.; Hatton, T.; Narechania, A.; Diemer, K.; Muruganujan, A.; Guo, N.; Sato, S.; Bafna, V.; Istrail, S.; Lippert, R.; Schwartz, R.; Walenz, B.; Yooseph, S.; Allen, D.; Basu, A.; Baxendale, J.; Blick, L.; Caminha, M.; Carnes-Stine, J.; Caulk, P.; Chiang, Y. H.; Coyne, M.; Dahlke, C.; Mays, A.; Dombroski, M.; Donnelly, M.; Ely, D.; Esparham, S.; Fosler, C.; Gire, H.; Glanowski, S.; Glasser, K.; Glodek, A.; Gorokhov, M.; Graham, K.; Gropman, B.; Harris, M.; Heil, J.; Henderson, S.; Hoover, J.; Jennings, D.; Jordan, C.; Jordan, J.; Kasha, J.; Kagan, L.; Kraft, C.; Levitsky, A.; Lewis, M.; Liu, X.; Lopez, J.; Ma, D.; Majoros, W.; McDaniell, J.; Murphy, S.; Newman, M.; Nguyen, T.; Nguyen, N.; Nodell, M.; Pan, S.; Peck, J.; Peterson, M.; Rowe, W.; Sanders, R.; Scott, J.; Simpson, M.; Smith, T.; Sprague, A.; Stockwell, T.; Turner, R.; Venter, E.; Wang, M.; Wen, M.; Wu, D.; Wu, M.; Xia, A.; Zandieh, A. und Zhu, X. (2001): The sequence of the human genome, *Science* (Band 291), Nr. 5507, Seite 1304-51

- Vilarino-Guell, C.; Ross, O. A.; Aasly, J. O.; White, L. R.; Rajput, A.; Rajput, A. H.; Lynch, T.; Krygowska-Wajs, A.; Jasinska-Myga, B.; Opala, G.; Barcikowska, M.; Lee, M. C.; Hentati, F.; Uitti, R. J.; Wszolek, Z. K.; Farrer, M. J. und Wu, R. M. (2010): An independent replication of PARK16 in Asian samples, *Neurology* (Band 75), Nr. 24, Seite 2248-9
- Vilarino-Guell, C.; Wider, C.; Ross, O. A.; Dachsel, J. C.; Kachergus, J. M.; Lincoln, S. J.; Soto-Ortolaza, A. I.; Cobb, S. A.; Wilhoite, G. J.; Bacon, J. A.; Behrouz, B.; Melrose, H. L.; Hentati, E.; Puschmann, A.; Evans, D. M.; Conibear, E.; Wasserman, W. W.; Aasly, J. O.; Burkhard, P. R.; Djaldetti, R.; Ghika, J.; Hentati, F.; Krygowska-Wajs, A.; Lynch, T.; Melamed, E.; Rajput, A.; Rajput, A. H.; Solida, A.; Wu, R. M.; Uitti, R. J.; Wszolek, Z. K.; Vingerhoets, F. und Farrer, M. J. (2011): VPS35 mutations in Parkinson disease, *Am J Hum Genet* (Band 89), Nr. 1, Seite 162-7
- Williams, D. R.; Hadeed, A.; al-Din, A. S.; Wreikat, A. L. und Lees, A. J. (2005): Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* (Band 20), Nr. 10, Seite 1264-71
- Wohlke, A.; Philipp, U.; Bock, P.; Beineke, A.; Lichtner, P.; Meitinger, T. und Distl, O. (2011): A one base pair deletion in the canine ATP13A2 gene causes exon skipping and late-onset neuronal ceroid lipofuscinosis in the Tibetan terrier, *PLoS Genet* (Band 7), Nr. 10, Seite e1002304
- Zimprich, A.; Biskup, S.; Leitner, P.; Lichtner, P.; Farrer, M.; Lincoln, S.; Kachergus, J.; Hulihan, M.; Uitti, R. J.; Calne, D. B.; Stoessl, A. J.; Pfeiffer, R. F.; Patenge, N.; Carbajal, I. C.; Vieregge, P.; Asmus, F.; Muller-Myhsok, B.; Dickson, D. W.; Meitinger, T.; Strom, T. M.; Wszolek, Z. K. und Gasser, T. (2004): Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology, *Neuron* (Band 44), Nr. 4, Seite 601-7

8 ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

In diesem Verzeichnis sind nicht aufgeführt:

1. SI-Einheiten sowie entsprechende SI-Präfixe
2. Elementsymbole chemischer Formeln
3. im DUDEN zu findende Abkürzungen

A	Adenin
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
del	Deletion
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
dup	Duplikation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>
FKS	fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfers
G	Guanin
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
h	Stunde

<i>HPRT1</i>	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
ins	Insertion
k.A.	keine Angabe
KRS	Kufor-Rakeb-Syndrom
M	Stoffmengenkonzentration
MAF	<i>minor allele frequency</i> (Frequenz des selteneren Allels)
min	Minute
MP	Morbus Parkinson
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
n.b.	nicht bekannt
NCL	Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
q	langer Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i> (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
<i>SMN1</i>	<i>survival of motor neuron 1</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SR	<i>serine/arginine-rich</i> (Serin/Arginin-reich)
T	Thymin
<i>Taq.</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Maß für die katalytische Aktivität)
V	Volt
vgl.	Vergleiche
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
YOPD	<i>young onset Parkinson's disease</i>
<i>YWHAZ</i>	<i>Tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>

8.2 Primer und Sonden

Tabelle 8.1 Primer für 1q32 (*PARK16*)

<u>SNP</u>	<u>Vorwärts-Primer (F)/Rückwärts-Primer (R)</u>	<u>Annealing-Temperatur [°C]</u>
rs823128	F: GCT AAC ACC GTG ACA AAG TGT ACC R: AAA TCA TGC ACA ACT CTT AAA GGC A	58
rs947211	F: TCT GTG GCT ACC CTC CTT R: GCT TTT CTC ACC TCC TAG AGA GT	58

Tabelle 8.2 LightCycler-Sonden

<u>SNP</u>	<u>Sondensequenz und Fluorophormarkierung</u>	<u>Sensor/Anchor</u>
rs823128	GGA ATT TGT ATC CCA CTG TGA AC—FL	<i>Sensor</i>
	LC640-ACC CAA AGC CAG TTC GTG ATC TT--PH	<i>Anchor</i>
rs947211	AAT TTT GCT TCA AAG AAC TGG T—FL	<i>Sensor</i>
	LC640-GTG TGG TTC CCA ACT GTC CAT ATG--PH	<i>Anchor</i>

Tabelle 8.3 Primer der Referenzgene der RT-PCR-Versuche

<u>Gen</u>	<u>Vorwärts-Primer (F)/Rückwärts-Primer (R)</u>	<u>Annealing-Temperatur [°C]</u>
<i>HPRT1</i>	F: TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA R: GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT	60
<i>YWHAZ</i>	F: CAG AGA GAA AAT TGA GAC GGA GCT R: CTT TGC TCT CTG CTT GTG AAG	60

Tabelle 8.4 Primer für *ATP13A2* der RT-PCR-Versuche

<u>Exon</u>	<u>Vorwärts-Primer (F)/Rückwärts-Primer (R)</u>	<u>Annealing-Temperatur [°C]</u>
25-29	F: AGT ACA TGG CTC TGT ACA GCC R: CGG TCG AGA GCA AGG TCG ACG	60
26-28	F: CTG CAG ATG GTC CTG GTG ACC R: GGT CGT CGT CGT CGA ACT TCG	58
26-29 (ohne 28)	F: ACA GTG GCA GTG CTC ATG AGC R: CGT GAC CAG ATC GTG CGA GTA	60
28-29	F: CTG AGG AAC ATC ACT GAC ACC R: CGG TCG AGA GCA AGG TCG ACG	58

8.3 Danksagung

Herzlich danken möchte ich vor allem Frau Prof. Christine Klein, die mir die Möglichkeit gab, mich mit den Themen dieser Arbeit auseinander zu setzen, den Arbeitsplatz bereitstellte und bei allen Fragen als konstruktive Gesprächspartnerin zur Verfügung stand. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Neurogenetik bedanken. Das angenehme und produktive Arbeitsklima hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. med. habil. Alfredo Ramirez hervorheben, dem ich für die persönliche und umfassende Betreuung danke.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir immer wieder neue Kraft gibt.

8.4 Lebenslauf

Die Seite 81 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

8.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich bestätige, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen 04-155 vom 11.08.2009) genehmigt wurden.

Lübeck, den 26. Dezember 2012