

**Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. O. Rieß
Abteilung Medizinische Genetik
Abteilungsleiter: Professor Dr. O. Rieß**

Mutationsanalyse im *ITCH*-Gen bei Parkinson-Patienten

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Simone Kopp, geb. Fingerle
aus
Tübingen**

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter:

Professor Dr. T. Gasser

*“Ich will jubeln, weil Gott mir hilft,
Gott selbst ist der Grund meiner Freude.
Ja, Gott der Herr macht mich stark;
Er beflügelt meine Schritte,
wie eine Gazelle kann ich über die Berge springen.”*

Die Bibel: Habakuk 3, 18+19

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Morbus Parkinson	1
1.2	Itch – itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog	20
1.3	Zielstellung der Arbeit.....	28
2	MATERIAL UND METHODEN	29
2.1	PCR	30
2.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.3	DHPLC	49
2.4	Zyklische Sequenzierung	56
3	ERGEBNISSE	61
3.1	Ergebnisübersicht.....	61
3.2	Exonische Sequenzvarianten	62
3.2.1	Die Variante c.83A>G, p.K28R in Exon 4	62
3.2.2	Die Variante c.2119G>A, p.V707I in Exon 21	65
3.2.3	Die Variante c.246T>C, p.R82R in Exon 5	67
3.2.4	Die Variante c.1269A>G, p.Q423Q in Exon 13.....	69
3.3	Intronische Sequenzvarianten	71
4	DISKUSSION	72
4.1.	Einordnung des Projekts	72
4.2	Diskussion der Methoden	73
4.3	Diskussion der Ergebnisse	76
4.4	Schlussfolgerungen	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	86
6	VERZEICHNISSE	88
6.1	Abbildungsverzeichnis	88
6.2	Tabellenverzeichnis.....	89
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	90
6.4	Literaturverzeichnis	93
7	ANHANG	109

1 EINLEITUNG

1.1 Morbus Parkinson

1.1.1 Überblick

Morbus Parkinson (Parkinson's Disease, PD) ist nach Morbus Alzheimer die **zweithäufigste altersassoziierte neurodegenerative Erkrankung** und betrifft ungefähr 1% der Population über 50 Jahre (Polymeropoulos, 2000). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 65 Jahren, 10% der Patienten entwickeln jedoch schon zwischen dem 40. und dem 50. Lebensjahr Symptome (www.epda.eu.com).

Weltweit leiden 6,3 Millionen Menschen an MP (www.epda.eu.com), wobei zu erwarten ist, dass in den nächsten Jahren durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung die Zahl der Patienten weiter ansteigen wird. Schätzungen gehen von einer Vervierfachung der Patientenzahlen in den westlichen Ländern aus (de Rijk et al., 1997).

Tritt die Krankheit vor dem 21. Lebensjahr auf, wird sie als juvenile Parkinson-Krankheit (JP) bezeichnet; bei einem Auftreten zwischen dem 21. und 40. Lebensjahr spricht man von einer Early-Onset-Parkinson-Krankheit (EOPD).

Die Häufigkeit des Auftretens des Morbus Parkinson nimmt mit steigendem Alter zu: Liegt die Prävalenz bei den 65- bis 69-jährigen noch bei 1,8%, steigt sie bei den 85- bis 89-jährigen auf 2,6% an, wobei es keine Geschlechtsunterschiede gibt (de Rijk et al., 2000).

1.1.2 Pathogenese

Die Parkinsonsche Erkrankung ist eine **progressive Basalganglienerkrankung**. Zu den Basalganglien zählen das Striatum, das sich aus dem Nucleus caudatus und dem Putamen zusammensetzt, und das Pallidum. Meist wird der Begriff Basalganglien noch um den Nucleus subthalamicus und die

EINLEITUNG

Substantia nigra (SN) erweitert und beschreibt dann eine Gruppe funktionell zusammengehöriger Kerne, die dem extrapyramidal-motorischen System zugeordnet sind und eine wichtige Rolle bei der Regulation der (Willkür-) Motorik spielen, nämlich die Steuerung von Ausmaß, Richtung, Kraft und Geschwindigkeit einer Bewegung (siehe Abb. 1.1). Dies geschieht dadurch, dass die Basalganglien zusammen mit dem Thalamus im Kortex entworfene motorische Impulse modulieren und so bei der Umsetzung eines Bewegungsentwurfs in einen koordinierten Bewegungsablauf mithelfen, wobei gewollte Bewegungen gefördert, ungewollte unterdrückt werden (Trepel, 2003).

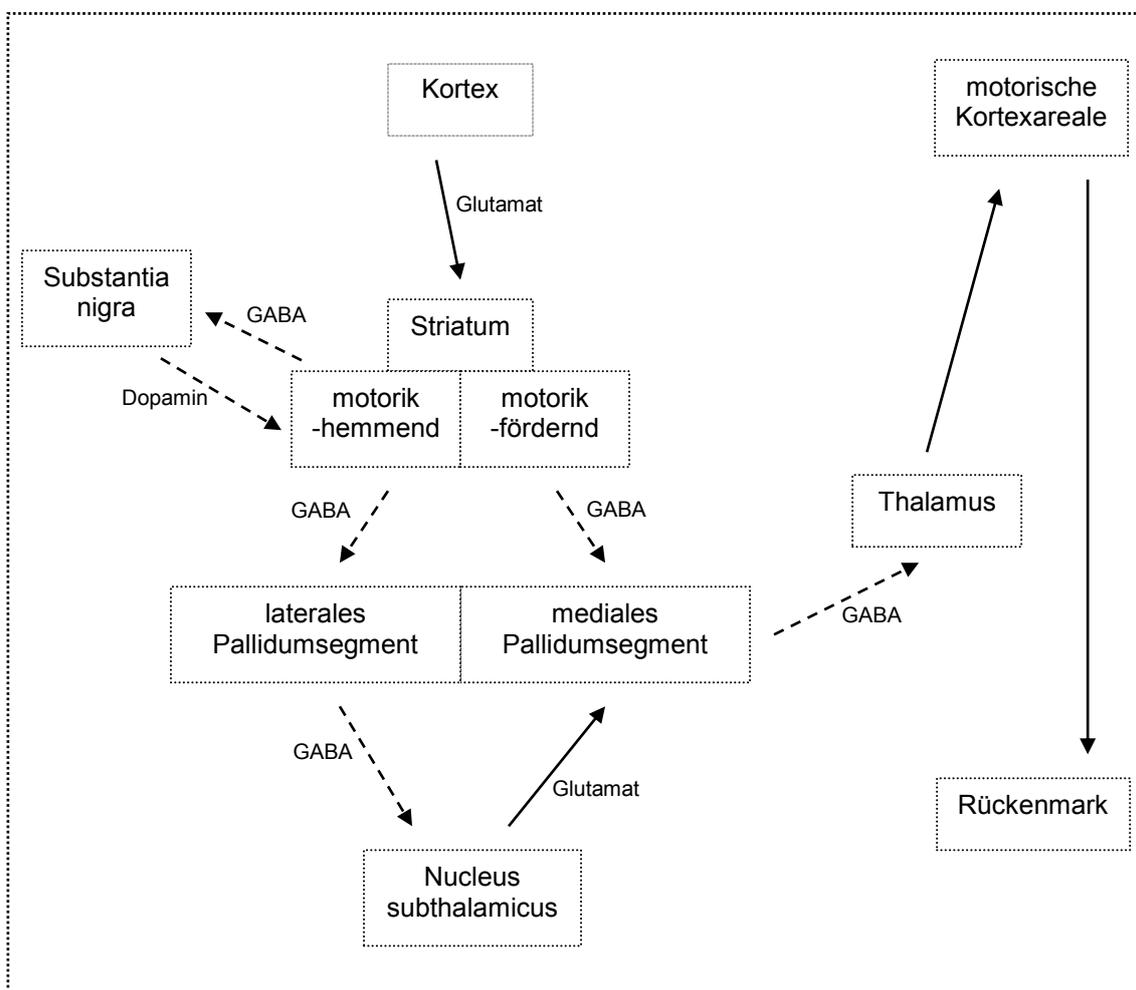


Abb. 1.1

Verschaltungsmuster der Basalganglien mit den beteiligten Transmittern

Quelle: nach Trepel, Neuroanatomie, Urban&Fischer)

—▶ erregende Projektion

--▶ hemmende Projektion

Beim Morbus Parkinson kommt es zur **Degeneration der dopaminergen melaninhaltigen Neurone der Substantia nigra pars compacta**, was auch an der daraus resultierenden **Depigmentierung** sichtbar wird. Diese Degeneration führt zum Ausfall der nigrostriatalen Projektion, wodurch es zu einem Neurotransmitter-Ungleichgewicht und somit zu einer sekundären Überfunktion des Striatums durch die fehlende Inhibition durch Dopamin kommt. Die Enthemmung des Striatums bewirkt über die gesamte Basalganglienschleife hinweg eine übermäßige Hemmung motorischer Impulse, was ein Grund für den reduzierten Bewegungsantrieb und die erschwerte Bewegungsinitiation bei der Parkinsonschen Erkrankung ist.

Die Degeneration dopaminergener Neurone findet jedoch nicht nur in der SN, sondern auch in anderen dopaminergen Bahnen des ZNS statt. Betroffen sind u.a. der dorsale Vagus Kern, der Hypothalamus, das mesokortikolimbische System und die Retina (Kuhn & Müller, 1998).

Weitere Degeneration findet auch in noradrenergen (Locus coeruleus), serotoninerger (Raphekerne), cholinerg (Nucleus basalis Meynert, dorsaler Vagus Kern) Zentren und im cerebralen Kortex, im Bulbus olfactorius und im autonomen Nervensystem statt (Hornykiewicz & Kish, 1987; Halliday et al., 1990; Jellinger, 1991).

Zusätzlich ist die Substantia nigra selbst nicht nur an der Regulation motorischer Impulse beteiligt, sie hat auch Funktionen bei der Verarbeitung sensorischer Informationen (psycho- oder lokomotorische Reaktion auf externe Reize) und bei der Projektion ins limbische System, also auch Einfluss auf sensorische und psychische Vorgänge.

Alle diese Faktoren tragen dazu bei, dass das durch den Dopaminmangel verursachte Neurotransmitter-Ungleichgewicht nicht nur zu motorischen, sondern auch zu den verschiedensten vegetativen, sensiblen und kognitiven Symptomen führt (Jellinger, 1999).

1.1.3 Formen

Die Ursachen für die Neurodegeneration der dopaminergen Neurone sind in mehr als 90% der Fälle nicht bekannt. Es werden neurodegenerative oder primäre Formen der Parkinson-Erkrankung von symptomatischen oder sekundären Formen mit bekannten Auslösern unterschieden, die in vier Gruppen eingeteilt werden können.

Zur **neurodegenerativen Form** gehört das **idiopathische Parkinson-Syndrom**, mit einem Anteil von 70-80% die größte Subgruppe bildet und für das multifaktorielle Ursachen angenommen werden (siehe Kapitel 1.1.7). Typisch ist hier das Auftreten von Lewy-Körperchen (siehe Kapitel 1.1.5).

Eine zweite sehr kleine Gruppe beschreibt das **familiäre Parkinson-Syndrom**, für das bis jetzt 13 verschiedene Loci bekannt sind (siehe Kapitel 1.1.8).

Zu den **symptomatischen Formen** gehören die medikamentös (durch Neuroleptika, Antiemetika u.a.), toxisch (durch Mangan, Kohlenmonoxid, Methylalkohol, Kobalt, Zyanid, u.a.), metabolisch (bei Hypoparathyroidismus, hepatolentikulärer Degeneration, u.a.), infektiös (postencephalitisches, z.B. nach CJD, AIDS-Encephalopathie) oder traumatisch (Boxerencephalopathie) bedingte Parkinson-Krankheit, außerdem Parkinson-Erkrankungen infolge von Stammganglieninfarkt, -blutung oder cerebraler Raumforderungen (Hirntumoren).

Zur vierten Gruppe gehören **Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen** (sog. **atypische Parkinson-Syndrome**) wie die diffuse Lewy-Körper-Krankheit, die Multisystematrophie (MSA), die progressive supranukleäre Blickparese, das Parkinson-Syndrom bei Morbus Alzheimer, die kortikobasalganglionäre Degeneration, die Chorea Huntington, die Neuroakanthozytose und die neuroaxonale Dystrophie (nach www.dgn.org und Pschyrembel, 259. Auflage).

1.1.4 Symptome

In seinem Aufsatz „An Essay on the Shaking Palsy“ beschrieb Dr. James Parkinson 1817 erstmals Symptome der Erkrankung, die später nach ihm benannt wurde. Die drei Kardinalsymptome des Morbus Parkinson sind Tremor, Rigor und Akinese (Thobois & Broussolle, 2005). Einige Autoren erweitern diese klassische Trias noch um die posturale Instabilität (Ransmayr, 2007).

Der **Tremor** ist ein initial meist einseitiger, kleinamplitudiger Ruhetremor mit einer Frequenz von 4-6/s (sog. Pillendrehtremor).

Rigor beschreibt eine Steifigkeit der Muskulatur infolge Erhöhung des Muskeltonus während des gesamten Bewegungsablaufs, oft mit ruckartigem Nachlassen des Widerstands, was als Zahnradphänomen bezeichnet wird.

Zur **Akinese** gehören kleinschrittiger Gang mit fehlender physiologischer Mitbewegung der Arme, Bradykinese oder Amplitudenminderung der Willkürbewegung, Hypomimie mit seltenem Lidschlag, Hypophonie und Mikrographie. Typisch sind auch reduzierte Stellreflexe.

Die **posturale Instabilität** macht sich durch Pro-, Retro-, und Lateropulsionen mit Fallneigung bemerkbar.

Zusätzlich können **vegetative Symptome** wie Seborrhoe („Salbengesicht“), orthostatische Hypotonie, Riechstörungen, Obstipation, Miktionsstörungen u.a. (Alimova & Golubev, 1992), Sensibilitätsstörungen (Schmerzen, Dysästhesien), **psychische Störungen** (Stimmungs labilität, Depression) und **kognitive Störungen** (Demenz) vorkommen (Riedel et al., 2008).

Obwohl die motorischen Symptome als typisch für Morbus Parkinson gelten, sind sie in den meisten Fällen nicht die ersten Symptome. Viele Autoren gehen von einer **mehnjährigen Prodromalphase** aus, in der vor allem Symptome wie Verstopfung, Riechstörungen/-verlust und Schlafstörungen im Vordergrund stehen (Gonera et al., 1997; Henderson et al., 2003; Tolosa et al., 2007).

1.1.5 Diagnosestellung

Die Diagnose Morbus Parkinson wird **klinisch** durch neurologische Untersuchung gestellt. Sie gilt als gesichert, wenn zwei der drei Kardinalsymptome Tremor, Rigor und Akinese vorhanden sind. Da die Erkrankung aber erst ausbricht, wenn bereits mehr als 50% der dopaminergen Neurone der SN untergegangen sind bzw. der striatale Dopamingehalt um etwa 70-80% vermindert ist (Bernheimer et al., 1973), sind frühzeitige Diagnose und Therapie eingeschränkt.

Mithilfe der **Bildgebung** kann heute die Diagnose in manchen Fällen schon präklinisch gestellt und gegen andere neurodegenerative Erkrankungen abgegrenzt werden. Relativ neue diagnostische Möglichkeiten sind PET (Positronen-Emissions-Tomographie) und SPECT (single photon emission computed tomography, Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie), mit denen neurochemische, hämodynamische und metabolische Folgen der Neurodegeneration in der SN sichtbar gemacht werden können (Thobois et al., 2001). Quantifiziert werden kann der Verlust dopaminergener Neurone in der SN mit Hilfe des ¹⁸F-Dopa- PET (Thobois et al., 2001).

Eine weitere Methode der Früherkennung ist die transkraniale Sonographie (TCS), bei der die SN von Parkinson-Patienten eine erhöhte Echogenität zeigt (Berg, 2006).

Ein pathologisches, jedoch erst post mortem nachweisbares Kennzeichen des Morbus Parkinson sind **Lewy-Körperchen**. Lewy-Körperchen sind runde, 8-30 µm große, eosinophile Einschlusskörperchen mit schmalem, blassem Rand (Halo), die im Zytoplasma der verbleibenden Neuriten der Substantia nigra, aber auch in anderen Gehirnregionen auftreten (Olanow & Tatton, 1999). Sie bestehen aus über 70 verschiedenen Molekülen (Wakabayashi et al., 2007), darunter als Hauptbestandteil α-Synuklein (Spillantini et al., 1998), außerdem Synphilin-1 (Wakabayashi et al., 2000), Parkin (Schlossmacher et al., 2002), UCH-L1 (Lowe et al., 1990), Ubiquitin (Forno, 1996), Neurofilamente (Forno, 1996), alphaB-Crystallin (Rekas et al., 2004), HTRA2 (Strauss et al., 2005),

Parkin Co-Regulated Gene (PACRG) (Taylor et al., 2007) und andere Proteine, wobei die Entstehung der Einschlusskörperchen ebenso wie ihre Funktion noch unklar ist (McNaught et al., 2006). Diskutiert wird, ob Lewy-Körperchen toxisch für die Zelle sind bzw. Zelltod auslösen (Taylor et al., 2002; Takeuchi & Takahashi, 2007), oder ob sie die Zelle durch die Akkumulierung und Ablagerung von eventuell schädlichen Proteinen vor dem Zelltod schützen (Tompkins et al., 1997; Gispert-Sanchez & Auburger, 2006; Nunomura, 2007).

1.1.6 Therapie

Die heutige Therapie zielt hauptsächlich darauf ab, die Symptome des Morbus Parkinson durch Substitution des Dopamindefizits zu lindern, wobei das Fortschreiten der Erkrankung nicht aufgehalten werden kann.

Hauptsubstanz ist **L-Dopa** (Levodopa), das im Gehirn durch die Aromatische Aminosäure-Decarboxylase in Dopamin umgewandelt wird, in Kombination mit Decarboxylasehemmern, die den Umbau von L-Dopa in der Peripherie verhindern. L-Dopa beeinflusst alle Parkinson-Symptome, vor allem die Akinese und psychische Störungen.

Eine zweite wichtige Substanzklasse sind **Dopaminagonisten** („Dopaminergika“). Sie wirken im ZNS durch Stimulation des Dopaminrezeptors direkt dopaminerg und beeinflussen wie L-Dopa alle Parkinson-Symptome.

Zu den Dopaminergika gehören auch **MAO-B-Hemmer** und **COMT-Hemmer**. MAO-B-Hemmer vermindern im ZNS den Abbau von Dopamin durch Hemmung der Monoaminoxidase B und erhöhen dadurch den Dopamingehalt im Striatum, COMT-Hemmer erhöhen den L-Dopa-Plasmaspiegel in der Peripherie durch Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase.

Zusätzlich stehen zentral wirksame **Anticholinergika** (Reduktion von Tremor und Rigor), **Glutamatrezeptorantagonisten** (Reduktion von Akinese und Rigor) und **NMDA-Antagonisten** (Reduktion des Tremors) zur Verfügung (www.epda.eu.com).

Ist die pharmakologische Behandlung ausgeschöpft, ist auch eine chirurgische Intervention möglich: Bei einer stereotaktischen Operation werden Elektroden im Nucleus subthalamicus, ggf. auch im Globus pallidus internus oder in spezifischen Thalamuskernen platziert, über die mit 100-180 Hz stimuliert wird. Diese „**Deep-Brain-Stimulation**“ genannte Methode reduziert alle motorischen Symptome (www.epda.eu.com; www.dgn.org).

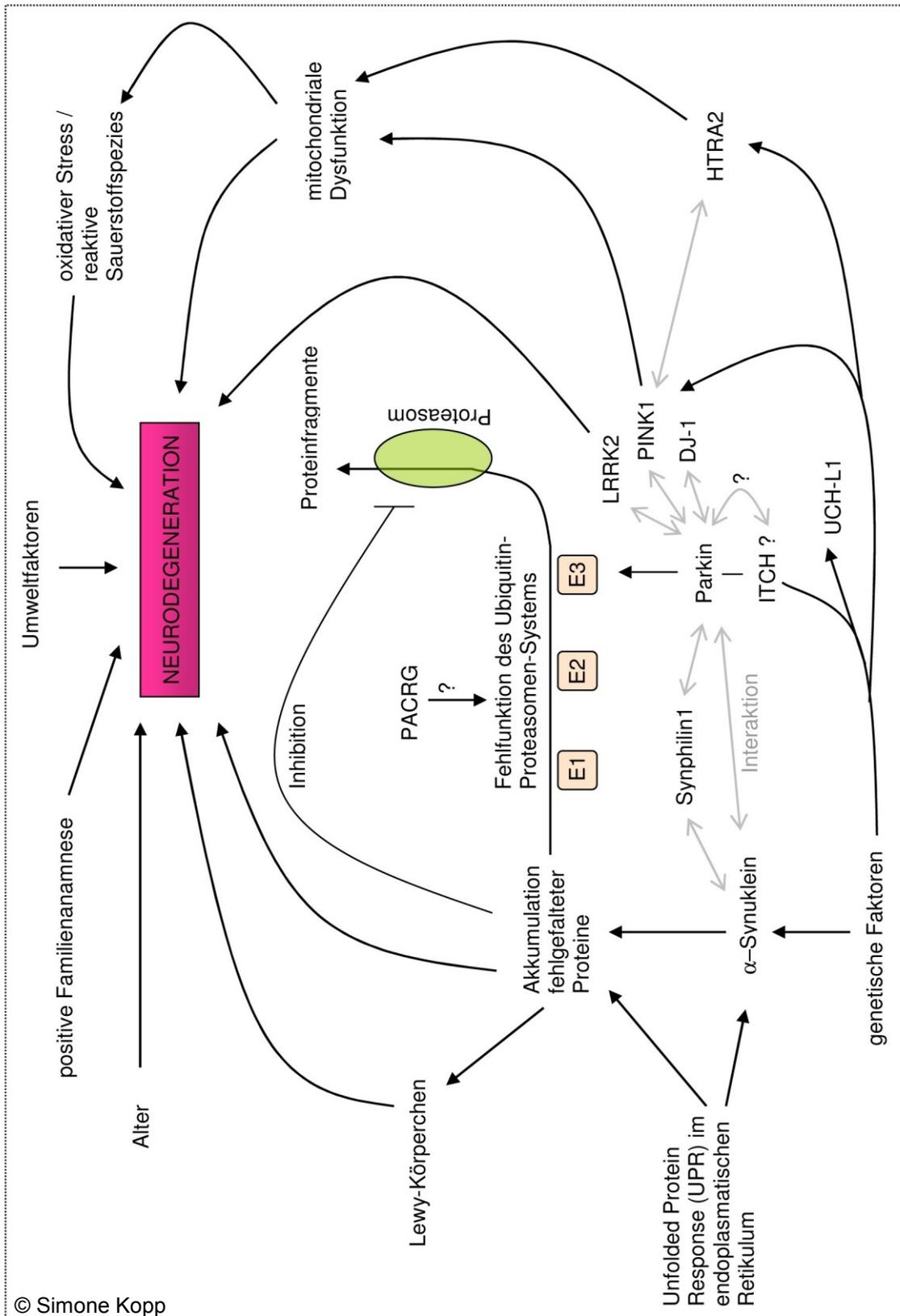
Außerdem werden zusätzliche Maßnahmen wie Diät, Krankengymnastik/physikalische Therapie und Logopädie empfohlen (www.epda.eu.com; www.dgn.org).

1.1.7 Ursachen der Neurodegeneration

Die genauen Ursachen der Neurodegeneration beim MP sind noch unbekannt, es wird jedoch angenommen, dass ein komplexes Zusammenspiel multifaktorieller Ursachen vorliegt (Sulzer, 2007; Olanow, 2007). Abb. 1.2 gibt einen Überblick über den heutigen Wissensstand.

Sicher ist, dass **Alter** und **positive Familienanamnese** eine Rolle spielen (Marder et al., 1996; De Michele et al., 1997; Sundquist et al., 2006).

Diskutiert werden neben **genetischen Faktoren** (siehe Kapitel 1.1.8) auch die **Falschfaltung von Proteinen** (Taylor et al., 2002; Aigelsreiter et al., 2007) und eine **Fehlfunktion des Ubiquitin-Proteasomen-Systems** (siehe Kapitel 1.1.9). Außerdem können **Umweltfaktoren** (Warner & Schapira, 2003), **oxidativer Stress** (LaVoie, 2007; Nunomura, 2007; Olanow, 2007) und **mitochondriale Dysfunktion** (Manfredi & Beal, 2000; Baron et al., 2007; Schapira, 2008) an der Neurodegeneration beteiligt sein.



© Simone Kopp

Abb. 1.2

Übersicht über die Ursachen der PD

Die Neurodegeneration bei Morbus Parkinson ist multifaktoriell bedingt. Die genauen Zusammenhänge der hier dargestellten Ursachen werden – soweit bekannt – im Text erklärt.

Kürzlich wurde gezeigt, dass fehlgefaltete Proteine auch eine Stressreaktion im endoplasmatischen Retikulum auslösen, die ***Unfolded Protein Response (UPR)*** genannt wird. Bei Parkinson-Patienten wurde diese Stressreaktion in der Substantia nigra nachgewiesen. Außerdem wurde entdeckt, dass die Aktivierung der UPR mit der Akkumulation und Aggregation von α -Synuklein verbunden ist (Hoozemans et al., 2007).

1.1.8 Genetische Aspekte des Morbus Parkinson

Epidemiologische Studien, Zwillingsstudien und die Entdeckung mehrerer Familien mit Mendelschem Vererbungsmuster stützen die Hypothese, dass genetische Ursachen bei Morbus Parkinson eine Rolle spielen. Heute sind **13 Loci (PARK1-13)** und einige weitere Kandidatengene bekannt, die bei der Pathogenese von Parkinson als ursächlich angesehen werden. Einen Überblick über den heutigen Kenntnisstand gibt Tab. 1.1. Es ist zu erwarten, dass durch Kopplungsanalysen oder durch Entdeckung neuer Interaktionspartner bereits bekannter Gene neue Kandidatengene und weitere Erkenntnisse zur Pathogenese des Morbus Parkinson gewonnen werden.

EINLEITUNG

Tab. 1.1

Übersicht über die bisher bekannten PARK-Loci und weitere Kandidatengene

Dargestellt sind, soweit bekannt, die zugehörigen Gene, ihre Lokalisation, ihre Vererbung, das Vorkommen von Lewy-Körperchen und die Hauptreferenzen. Die jeweiligen übrigen Referenzen sind in den folgenden Abschnitten angegeben.

V* = Vererbung; AD = autosomal dominant; AR = autosomal rezessiv; ? = unbekannt;
LK** = Vorkommen von Lewy-Körperchen; + = ja; - = nein; ? = unbekannt

Locus	Gen	Lokalisation	V*	LK**	Referenz
PARK1	SNCA / α -Synuklein	4q21	AD	+	Polymeropoulos et al., 1996
PARK2	Parkin	6q25-q27	AR	-	Jones et al., 1998 Kitada et al., 1998
PARK3	SPR ?	2p13	AD	+	Gasser et al., 1998
PARK4	SNCA / α -Synuklein	4q21	AD	+	Waters & Miller, 1994 Chartier-Harlin et al., 2004
PARK5	UCH-L1	4p14	AD	+	Edwards et al., 1991
PARK6	PINK1	1p36	AR	?	Valente et al., 2001 Hatano et al., 2004
PARK7	DJ1	1p36	AR	?	van Duijn et al., 2001
PARK8	LRRK2	12p12	AD	+	Paisan-Ruiz et al., 2004 Zimprich et al., 2004
PARK9	ATP13A2	1p36	AR	?	Schultheis et al., 2004 Ramirez et al., 2006
PARK10	EIF2B3 ? USP24 ? RNF11 ? HIVEP3 ?	1p32	AD	?	Hicks et al., 2002 Li et al., 2002 Oliveira et al., 2005 Li et al., 2007
PARK11	?	2q35-q36	AD	+	Pankratz et al., 2002 Pankratz et al., 2003b
PARK12	MAO-A ? MAO-B ?	Xq21-q25	AR	?	Scott et al., 2001 Hicks et al., 2002 Pankratz et al., 2002 Pankratz et al., 2003a Kang et al., 2006
PARK13	HTRA2	2p12	AD	?	Faccio et al., 2000
weitere Kandidatengene					
	Gen	Lokalisation	V	LK	
	ADH3	4q22	?	?	Buervenich et al., 2005
	NDUFV2	18p11.31- p11.2	?	?	Hattori et al., 1998
	NR4A2	2q22-q23	AD ?	?	Mages et al., 1994
	PACRG	6q25-q27	?	?	West et al., 2003
	SNCAIP / Synphilin1	5q23.1-q23.3	?	?	Engelender et al., 1999

1.1.8.1 Autosomal-dominante Formen

PARK1

α -Synuklein ist Hauptbestandteil der für Parkinson typischen Lewy-Körperchen (Spillantini et al., 1998). Die Akkumulation von mutiertem α -Synuklein hat verschiedene Auswirkungen: Zum einen wird in dopaminergen Neuronen dopaminabhängige und durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelte Apoptose ausgelöst (Xu et al., 2002), zum zweiten wird zusätzlich die Funktion des 26S-Proteasoms beeinträchtigt und so zur Akkumulation anderer Proteine und möglicherweise zur Bildung von Lewy-Körperchen beigetragen (Petrucci et al., 2002; Snyder et al., 2003; Hattori & Mizuno, 2004).

Zu den Interaktionspartnern von α -Synuklein gehören Parkin (Shimura et al., 2001), UCH-L1 (Liu et al., 2002), Synphilin1 (Engelender et al., 1999; Chung et al., 2001), Calmodulin (Martinez et al., 2003), der humane Dopaminrezeptor hDAT (Lee et al., 2001), das proteosomale Protein S6' (Snyder et al., 2003), die Ligase SIAH (Rott et al., 2008) und noch etliche andere.

Heute sind 3 verschiedene Mutationen in α -Synuklein bekannt (Golbe et al., 1990; Polymeropoulos et al., 1997; Krüger et al., 1998; Krüger et al., 2001; Zarranz et al., 2004).

PARK3

Das Gen für den Locus PARK3 ist noch unbekannt, es wird jedoch diskutiert, ob die Sepiapterin-Reduktase (SPR) eine Rolle spielen könnte (Karamohamed et al., 2003; Sharma et al., 2006; Tobin et al., 2007; Takazawa et al., 2008).

PARK4

Das Gen für den PARK4-Locus ist ebenfalls α -Synuklein, wobei eine Genduplikation (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibanez et al., 2004; Nishioka et al., 2006; Fuchs et al., 2007) oder -triplikation (Waters & Miller, 1994; Singleton et al., 2003; Farrer et al., 2004) vorliegt und als Pathomechanismus Gendosiseffekte vermutet werden.

PARK5

Die Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolase L1 (UCH-L1) ist eines der häufigsten Proteine im Gehirn, es macht 1-2% der Hirnsubstanz aus (Wilkinson et al., 1989) und wurde außerdem in Lewy-Körperchen nachgewiesen (Lowe et al., 1990). UCH-L1 gehört zu einer Genfamilie, deren Aufgabe die Hydrolyse von Polyubiquitinketten zu Ubiquitin-Monomeren sind (Doran et al., 1983), es wirkt also innerhalb des UPS an der Degradation fehlgefalteter Proteine mit. Mutationen in UCH-L1 führen zu partiellem Funktionsverlust des Enzyms und somit vermutlich zur Aggregation von Proteinen, die nicht mehr entsorgt werden können (Leroy et al., 1998; Gong & Leznik, 2007). Vorsichtigerweise muss man anmerken, dass eine potentiell kausale Mutation bisher nur in einer Familie weltweit nachgewiesen werden konnte.

PARK8

LRRK2 (Leucine-rich repeat Kinase 2) kommt in allen Hirnregionen vor (Zimprich et al., 2004). Im Moment sind weder die genauen Funktionen von LRRK2 noch die Pathomechanismen, die zu Parkinson führen, bekannt (Lee et al., 2007). Sicher ist, dass LRRK2 mit Parkin interagiert (Smith et al., 2005).

Für LRRK2 wurde eine Vielzahl von Mutationen gefunden (Wszolek et al., 1995; Hasegawa & Kowa, 1997; Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004; Di Fonzo et al., 2005; Funayama et al., 2005; Gasser, 2005; Mata et al., 2005; Zabetian et al., 2005; Spanaki et al., 2006; Lesage et al., 2007; Tan et al., 2007a), die derzeit die häufigste genetische Ursache bei autosomal dominantem Parkinson (mit reduzierter Penetranz) darstellen; sie konnten aber auch bei Patienten mit sporadisch auftretendem Parkinson nachgewiesen werden.

PARK10

Das zugehörige Gen ist noch unbekannt, im Moment untersucht werden die γ -Untereinheit des Translation-initiiierenden Faktors (EIF2B3) (Oliveira et al., 2005); die Ubiquitin-spezifische Protease 24 (USP24) (Oliveira et al., 2005); das RING-Finger Protein 11 (RNF11) (Anderson et al., 2007); und HIVEP3 (human

immunodeficiency virus enhancer-binding protein 3 gene) (Oliveira et al., 2005; Li et al., 2007).

PARK11

Der Locus PARK11 wird mit familiärer Demenz mit Lewy-Körperchen (Dementia with Lewy bodies, DLB) in Zusammenhang gebracht (Bogaerts et al., 2007). Das zugehörige Gen ist noch unbekannt.

PARK13

HTRA2 wurde bei Parkinson-Patienten in Lewy-Körperchen nachgewiesen (Strauss et al., 2005). Bis jetzt wurden 2 Mutationen identifiziert (Strauss et al., 2005). Kürzlich wurde entdeckt, dass HTRA2 mit PINK1 (PARK6) interagiert (Plun-Favreau et al., 2007).

1.1.8.2 Autosomal-rezessive Formen

PARK2

Parkin gehört zur Familie der E3-Ligasen, deren Aufgabe im Ubiquitin-Proteasomen-System die Markierung der zur Degradation im Proteasom bestimmten Proteine mit Polyubiquitinketten ist. Liegen in Parkin Mutationen vor, geht die Ligasefunktion verloren, was zur Akkumulation von eigentlich abzubauenen Proteinen führt. Es wird diskutiert, ob diese Proteinakkumulationen, in der Parkin-Substrate wie Pael-R und glykosyliertes α -Synuklein enthalten sind, neuronalen Zelltod auslösen können (Shimura et al., 2000; Imai et al., 2001; Shimura et al., 2001; von Coelln et al., 2004).

Eine Besonderheit ist, dass bei der durch Mutationen in Parkin verursachten Form von Parkinson keine Lewy-Körperchen ausgebildet werden (Takahashi et al., 1994). Es scheint, dass Parkin zur Bildung von Lewy-Körperchen notwendig ist (Sasaki et al., 2004; Hattori et al., 2006), somit wäre erklärt, warum bei Mutationen in Parkin keine Lewy-Körperchen vorkommen. Allerdings wurde bei

einem Patienten mit Parkin-Mutation Lewy-Körperchen nachgewiesen (Farrer et al., 2001).

Heute sind mehr als 20 verschiedene Mutationen in Parkin bekannt (Kitada et al., 1998; Abbas et al., 1999; Klein et al., 2000; Lucking et al., 2001; Nisipeanu et al., 2001; Hoenicka et al., 2002; Bertoli-Avella et al., 2005; Pramstaller et al., 2005; Chien et al., 2006; Clark et al., 2006; Deng et al., 2006; Sun et al., 2006). Mutationen im Parkin-Gen stellen die häufigste Ursache bei juvenilem und early-onset-Parkinson dar.

PARK6

PINK1 (PTEN-induced putative Kinase 1) codiert für eine mitochondrial lokalisierte Serin/Threonin-Kinase (Poole et al., 2008). Möglicherweise hat PINK1 eine neuroprotektive Funktion, die durch Mutationen verloren geht (Wang et al., 2007). Außerdem gibt es immer mehr Hinweise dafür, dass PINK1 mit mehreren Proteinen interagiert, die in der Pathogenese von PD und bei der mitochondrialen Dysfunktion eine Rolle spielen. Beispiele sind Parkin, HtrA2 und das mitochondriale Chaperon TRAP1 (Mills et al., 2008).

Für PINK1 wurden mehr als 10 Mutationen gefunden (Hatano et al., 2004; Rohe et al., 2004; Valente et al., 2004; Klein et al., 2005; Li et al., 2005; Abou-Sleiman et al., 2006; Chishti et al., 2006; Hedrich et al., 2006; Leutenegger et al., 2006).

PARK7

DJ1 wird im Thalamus, in der Substantia nigra und im Hippocampus besonders stark exprimiert (Bonifati et al., 2003).

DJ1 kann gegen oxidativen Stress schützen, wohingegen Mutationen, Kontakt zu oxidativen Giften und Veränderung von DJ1 in höherem Alter loss-of-function und somit erhöhte Anfälligkeit gegen oxidativen Stress bewirken, was wiederum erhöhte Suszeptibilität für Morbus Parkinson bedeuten könnte (Meulener et al., 2006). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass DJ1 in Gehirnen von Parkinson-Patienten durch Oxidation geschädigt wurde, was ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung zwischen DJ1 und Morbus Parkinson ist (Choi et al., 2006).

Es sind 6 Mutationen in DJ1 identifiziert (Abou-Sleiman et al., 2003; Bonifati et al., 2003; Hering et al., 2004; Annesi et al., 2005), wobei die mutierte Form von DJ1 mit Parkin interagiert (Moore et al., 2005).

PARK9

Das Enzym ATP13A2 gehört zur Familie der ATPasen vom P-Typ, die Kationen und andere Substrate durch Zellmembranen transportieren (Schultheis et al., 2004). Es wird überall, besonders stark aber im Gehirn – einschließlich der SN – exprimiert (Ramirez et al., 2006). Heute sind vier Mutationen in ATP13A2 bekannt, die das sog. Kufor-Rakeb Syndrom auslösen (Ramirez et al., 2006; Di Fonzo et al., 2007).

PARK12

Das Gen an Locus PARK12 ist noch unbekannt, es wird diskutiert, ob die X-chromosomal kodierten Enzyme MAO-A und MAO-B mögliche Faktoren in der Pathogenese der PD sind (Kang et al., 2006).

1.1.8.3 Weitere Kandidatengene

Weitere Kandidatengene, an denen geforscht wird, sind:

- **ADH3** (Buervenich et al., 2005)
- **NDUFV2** (Hattori et al., 1998)
- **NR4A2** (Zetterstrom et al., 1997; Le et al., 2003)
- **PACRG** (Taylor et al., 2007)
- **Synphilin1/SNCAIP** (Engelender et al., 1999; Chung et al., 2001; Marx et al., 2003; Eyal et al., 2006; Marx et al., 2007).

1.1.9 Das Ubiquitin-Proteasomen-System

Das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS, Abb. 1.3) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse wie Zellzyklus und Zellteilung, bei der Regulation von Transkriptionsfaktoren sowie dem **nicht-lysosomalen Abbau veränderter, fehlgefalteter oder geschädigter Proteine** (Ciechanover, 2007). Die abzubauenen Proteine werden zunächst mit einer Ubiquitinkette markiert, wofür eine dreistufige Enzymkaskade notwendig ist (Abb. 1.3):

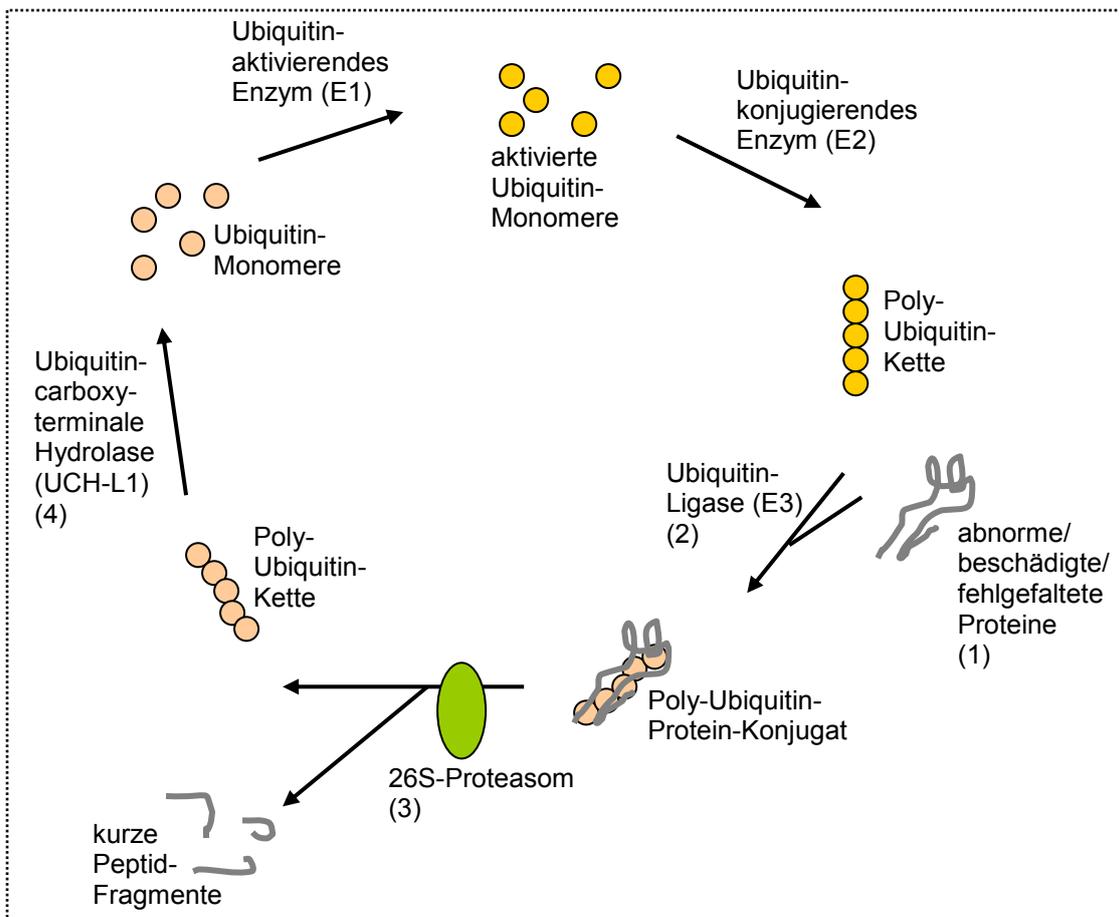


Abb. 1.3

Schema des UPS

Ubiquitin-Monomere werden aktiviert, zu einer Poly-Ubiquitin-Kette verknüpft und mit einem Protein verbunden, worauf das Protein im Proteasom degradiert wird. Die Poly-Ubiquitin-Kette wird zu Ubiquitin-Monomeren abgebaut und wiederverwertet.

Einige Komponenten des UPS werden in Zusammenhang mit der familiären PD gebracht:

- (1) Mutationen in α -Synuklein verursachen familiäre PD
- (2) Mutationen in Parkin verursachen juvenile PD
- (3) Inhibition des 26S-Proteasom bei PD (evtl. durch Ablagerungen von α -Synuklein), außerdem reduzierte Aktivität der proteolytischen Enzyme
- (4) Mutationen in UCH-L1 verursachen familiäre PD

Quelle: modifiziert nach McNaught et al., 2001

Ein ATP-abhängiges ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1), ein ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) und eine Ubiquitin-Ligase (E3), die die Ubiquitinkette auf das Substrat überträgt (Tanaka et al., 1998). Es ist bekannt, dass viele verschiedene Gene für E2- und E3-Enzyme existieren, was die vielfältigen spezifischen Aufgaben des UPS erklärt (Tanaka et al., 1998; Lecker et al., 2006).

Ist die Polyubiquitinkette schließlich mit dem Protein verknüpft, werden die markierten Proteine durch das 26S-Proteasom erkannt und zu kleinen Peptidfragmenten und Aminosäuren abgebaut, die ebenso wie die freiwerdenden Ubiquitinketten, die durch die Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolase L1 (UCH-L1) in Monomere gespalten werden, in der Zelle wiederverwertet werden können (Pickart, 2000).

Seit einigen Jahren existiert die stark umstrittene Hypothese, dass die Toxizität der akkumulierten Proteine, die aufgrund der Dysfunktion des UPS nicht abgebaut werden können, zum Zelltod beiträgt (Olanow & McNaught, 2006; Lim, 2007).

Eine andere Hypothese postuliert, dass die Fehlfaltung von Proteinen wie z.B. α -Synuklein, eventuell verursacht durch mitochondriale Dysfunktion und oxidativen Stress, und die Dysfunktion des UPS ausschlaggebende Faktoren für die Entstehung von Morbus Parkinson sind (Dauer & Przedborski, 2003; Tan & Skipper, 2007b). Es wird vermutet, dass die exzessive Produktion fehlgefalteter Proteine die Abbaukapazität des UPS übersteigt und es somit zur Ablagerung dieser Proteine kommt. Bei Parkinson-Patienten wurden in der Substantia nigra pars compacta nicht nur erniedrigte Raten der Untereinheit des 20S-Proteasoms, sondern zusätzlich auch eine reduzierte Aktivität der proteolytischen Enzyme nachgewiesen (Olanow, 2007).

Die Entdeckung von Mutationen in Genen wie α -Synuklein, Parkin, UCH-L1, u.a., die für die Funktion des UPS eine wichtige Rolle spielen, hat die

EINLEITUNG

Hypothese, dass das UPS ein Schlüsselsystem für die Neurodegeneration bei Morbus Parkinson ist, noch verstärkt (Ross & Pickart, 2004; Betarbet et al., 2005).

1.2 Itch – itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog

1.2.1 ITCH – Das Gen

Die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase Itch wird auch Atrophin-1-Interacting Protein 4 (AIP4), NFE2-assoziiertes Polypeptid 1 (NFE2-Associated Polypeptide 1; NAPP1), AIF4 oder dJ468O1.1 genannt (MIM:606409; Ensembl:ENSG00000078747). Itch wird in zahlreichen Geweben inklusive Herz, Gehirn, Plazenta, Leber, Lunge, Muskel, Niere und Pankreas exprimiert (Wood et al., 1998).

Das Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 20 (20q11.22-q11.23; Lokalisation 32,414,745-32,562,858). Es sind zwei verschiedene Transkripte bekannt. Das erste Transkript besteht bei einer Transkriptlänge von 6357 bp aus 25 Exonen, das zugehörige Protein ist aus 862 Aminosäuren aufgebaut (Ensembl:ENST00000374864). Das zweite Transkript besteht aus 26 Exonen; die Transkriptlänge beträgt 6480 bp, die Translationslänge 903 Aminosäuren (Ensembl:ENST00000262650).

Bei beiden Transkripten werden die ersten beiden Exone komplett nicht translatiert, zusätzlich sind im dritten und im letzten (25. bzw. 26.) Exon jeweils nichttranslatierte Sequenzen (UTR, untranslated region) enthalten (<http://www.ensembl.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>).

1.2.2 Itch – Das Protein

Das von ITCH codierte und ebenso benannte Protein mit einem Molekulargewicht von 102 kDa enthält eine C2-, vier WW- und eine HECTc-Domäne (Abb. 1.4).

Die **C2-Domäne** (Protein-Kinase C konservierte Region 2, CalB) ist ein Kalzium-Ionen (Ca^{2+})-bindendes Motiv und kommt in Phospholipasen,

Proteinkinasen, Synaptotagminen u.a. vor (Shao et al., 1996). Sie ist bei vielen Signalproteinen beschrieben, die mit der Zellmembran interagieren und intrazelluläre Prozesse wie den transmembranösen Transport, die Bildung von second-messengern, die Aktivierung von GTPasen und die Kontrolle der Proteinphosphorylierung vermitteln (Nalefski & Falke, 1996).

In Itch wird diese Domäne von den Aminosäuren 19 bis 114 gebildet (Abb. 1.5).

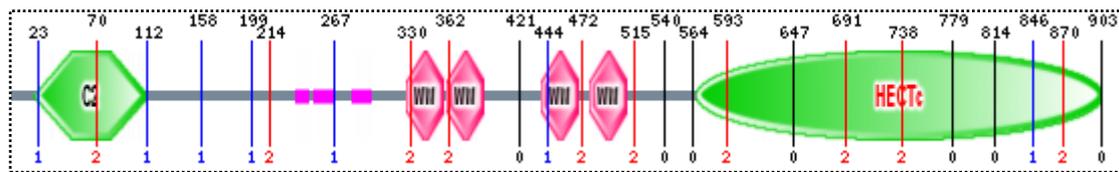


Abb. 1.4

Domänen von Itch

Itch enthält eine C2-, vier WW- und eine HECTc-Domäne.

Quelle: <http://smart.embl-heidelberg.de/>

Die **WW-Domäne**, auch WWP- oder rsp5-Domäne genannt, ist eine kurze konservierte Region von ca. 40 Aminosäuren, die in vielen verschiedenen Proteinen beschrieben ist und – wie z.B. in Itch – bis zu viermal vorkommen kann. Der Name dieser Domäne leitet sich vom Vorkommen zweier charakteristischer konservierter Tryptophane sowie eines konservierten Prolins ab. Die WW-Domäne bindet Prolin-reiche Polypeptide, spielt zusammen mit anderen Domänen eine Rolle in der Signaltransduktion und vermittelt spezifische Protein-Protein-Interaktionen (Andre & Springael, 1994; Macias et al., 1996; Pirozzi et al., 1997; Rotin, 1998).

In Itch werden die vier WW-Domänen von den Aminosäuren 327-359, 360-391, 439-471 und 479-511 gebildet (Abb. 1.5).

Die **HECTc-Domäne** besitzt die für E3-Ubiquitin-Ligasen charakteristische Enzymaktivität. Dieser Name steht als Abkürzung für 'Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus', also Ähnlichkeit zum C-Terminus der als erste identifizierte E3-Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP. E3-Ligasen übernehmen von E2-ubiquitinkonjugierenden Enzymen Ubiquitin in Form eines Thioesters und

transferieren es direkt auf das zu markierende Substrat (Huibregtse et al., 1995; Scheffner et al., 1995; Schwarz et al., 1998; Nuber & Scheffner, 1999), das dann im Proteasom abgebaut wird.

Itch ist nur eines von über 20 verschiedenen Proteinen, die eine HECTc-Domäne enthalten und die Sensitivität und Selektivität der ubiquitinabhängigen Proteolyse sichern (Schwarz et al., 1998). In Itch wird diese Domäne von den Aminosäuren 567-903 gebildet (Abb. 1.5).

Name	Begin	End	E-value
C2	19	114	2.04e-12
low complexity	236	247	-
low complexity	250	267	-
low complexity	282	298	-
WW	327	359	1.07e-12
WW	360	391	3.86e-10
WW	439	471	7.36e-16
WW	479	511	1.71e-11
HECTc	567	903	3.23e-178

Abb. 1.5
Aminosäurenkette und Domänen von Itch

Die Domänen von Itch werden jeweils durch einen bestimmten Abschnitt der Aminosäurenkette gebildet.

Quelle: <http://smart.embl-heidelberg.de/>

1.2.3 Interaktionspartner und Substrate von Itch

Itch ist in eine Vielzahl von zellulären Prozessen regulierend involviert. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über den heutigen Wissenstand gegeben (siehe auch Abb. 1.6).

Itch interagiert u.a. mit **Atrophin1**, weswegen es auch Atrophin-1-Interacting Protein 4 (AIP4) genannt wird. Atrophin1 enthält einen Polyglutamin-Repeat. Die Expansion dieses Repeats führt zu dentatorubraler pallidoluysischer Atrophie (DRPLA), einer neurodegenerativen erblichen Erkrankung, die genetische Antizipation zeigt (Koide et al., 1994; Wood et al., 1998).

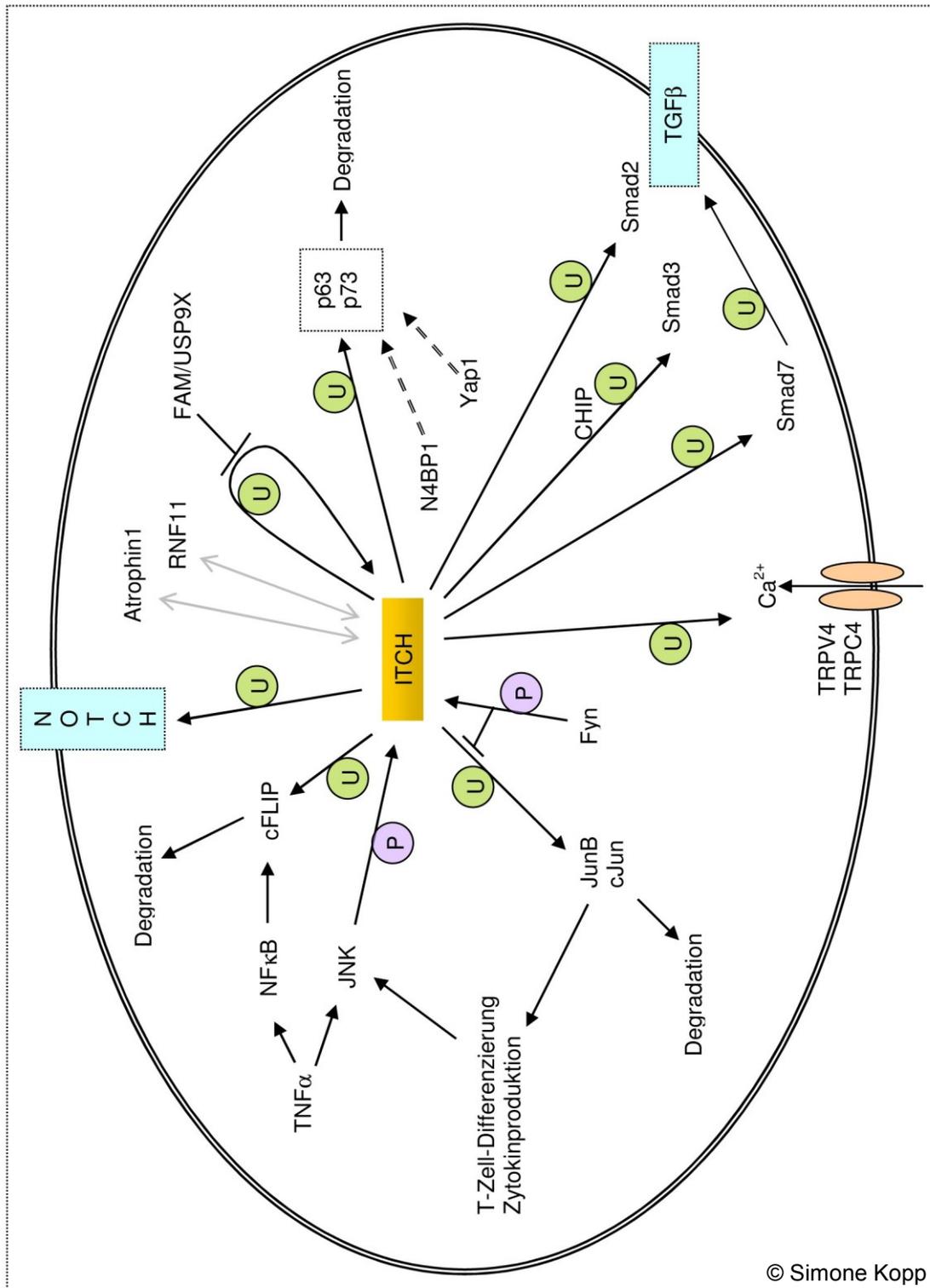
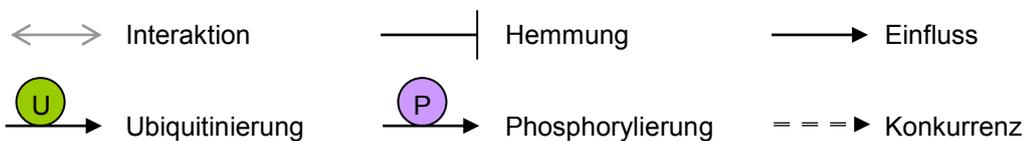


Abb. 1.6
Schema der Interaktionspartner und Funktionen von Itch
 Die genauen Zusammenhänge werden im Text erklärt.



Für die **T-Zell-Differenzierung** und die Entwicklung und Erhaltung der **Selbsttoleranz** des Immunsystems ist Itch ein wichtiger Faktor. Die Entwicklung und Erhaltung der klonalen Anergie wird durch die Ubiquitinierung bestimmter Komponenten der Antigen-Erkennung in T-Zellen vermittelt (Mueller, 2004; Liu, 2007). Außerdem wird die Produktion von Wachstumsfaktoren und die Proliferation von T-Zellen von Itch negativ reguliert (Mueller, 2004). Ist Itch inaktiviert, zeigen die T-Zellen einen aktivierten Phänotyp und verstärkte Proliferation sowie erhöhte Produktion von Interleukin 4 und 5 und Immunglobulin E und G1 (Fang et al., 2002).

Bestimmte regulatorische T-Zellen besitzen neuroprotektive Aktivität, indem sie die neuroinflammatorische Antwort der Mikroglia des nigrostriatalen Systems unterdrücken (Reynolds et al., 2007). Möglicherweise spielt Itch auch dabei eine Rolle.

Itch reguliert die Zytokinproduktion der T-Helfer-Zellen (Th2) über die Ubiquitinierung von **JunB** und **c-Jun** (Gallagher et al., 2006). Jun-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die in die TH2-Differenzierung involviert sind (Fang et al., 2002). Durch die Jun-vermittelte Stimulation der T-Zellen wird die Kinase **JNK1** (Jun amino-terminal kinase) aktiviert, die Itch phosphoryliert, was zu einer Konformationsänderung und dadurch zur Verstärkung der enzymatischen Aktivität der HECT-Domäne führt, wodurch dann wiederum Jun-Proteine ubiquitiniert und im Lysosom degradiert werden (Fang & Kerppola, 2004; Gao et al., 2004; Gallagher et al., 2006).

Itch wird neben JNK1 noch durch eine weitere Kinase phosphoryliert: Die Src-Kinase **Fyn** phosphoryliert Itch ebenfalls, was dessen Interaktion mit JunB reduziert. Diese Art der Phosphorylierung von Itch spielt also eine negative Rolle bei der Modulation der von Itch vermittelten Ubiquitinierung (Yang et al., 2006).

TNF α (Tumornekrosefaktor α) kann sowohl Zellüberleben als auch Zelltod signalisieren, was vom Gleichgewicht zwischen **NF- κ B** und **JNK** abhängt.

NF- κ B begünstigt Überleben, während JNK Zelltod bedeutet. Die durch TNF α vermittelte Aktivierung von JNK beschleunigt den Umsatz des durch NF- κ B induzierten antiapoptotischen Proteins **c-FLIP**, das Caspase-8 inhibiert. Dieser beschleunigte Umsatz hängt von der durch JNK vermittelten Phosphorylierung und Aktivierung von Itch ab, das c-FLIP ubiquitiniert und seine proteasomale Degradation induziert. JNK antagonisiert also NF- κ B, indem es über Itch die proteasomale Degradation von c-FLIP fördert (Chang et al., 2006).

Itch reguliert die Stabilität mehrerer Proteine, die in die Antwort auf genotoxischen Stress involviert sind. Zu diesen Proteinen gehören **p63** und **p73**, die mit anderen Proteinen zur Familie p53 zusammengefasst werden und gleichzeitig Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressorgene sind. Itch bindet und ubiquitiniert sowohl p63 als auch p73, was zur proteasomalen Degradation dieser Proteine führt (Rossi et al., 2005; Rossi et al., 2006; Hansen et al., 2007).

p73 wird bei DNA-Schädigung hochreguliert, was zum Stopp des Zellzyklus und zur Apoptose führt. Gleichzeitig wird Itch herunterreguliert, um die Hochregulation von p73 zu ermöglichen (Rossi et al., 2005). Außerdem interagiert p73 mit **Yap1** (Yes-associated protein 1) und erhöht dadurch die übergreifende Aktivierung von Apoptose-Genen. Yap1 konkurriert mit Itch und verhindert dadurch die Ubiquitinierung und Degradation von p73, wodurch p73 stabilisiert wird (Levy et al., 2007).

N4BP1 (Nedd4-binding partner-1) wurde ursprünglich als Substrat der E3 Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4 beschrieben. N4BP1 interagiert jedoch auch mit Itch, das mit Nedd4 strukturell verwandt ist. Dabei konkurriert N4BP1 mit p73, einem Substrat von Itch, um dieselbe Bindungsstelle und reduziert so die Fähigkeit von Itch, p73 zu ubiquitinieren. Außerdem inhibiert N4BP1 die Fähigkeit von Itch zur Autoubiquitinierung. Die von Itch vermittelte Ubiquitinierung von c-Jun und p63 werden durch N4BP1 auf ähnliche Weise gehemmt. N4BP1 ist also ein negativer Regulator von Itch, der kritische Zelltod-Regulatoren wie p73 und c-Jun stabilisiert (Oberst et al., 2007).

Ein weiterer Bindungspartner von Itch ist die Ubiquitin-Protease **FAM/USP9X**. Itch und FAM/USP9X sind in Trans-Golgi- sowie in peripheren Vesikeln kolokalisiert, wobei FAM/USP9X die Autoubiquitinierung von Itch und seine daraus resultierende Degradation im Proteasom verhindert; d.h. die Expression beider Proteine korreliert positiv (Mouchantaf et al., 2006).

Der **TGF β** -Signalweg spielt bei einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose eine entscheidende Rolle. TGF β fördert das Überleben dopaminerger Neurone und zeigt möglicherweise eine Assoziation mit PD (Goris et al., 2007). Dieser Signalweg wird durch eine Gruppe von Proteinen, zu denen TGF β -Rezeptoren und Smads gehören, vermittelt (Xin et al., 2005).

Itch erleichtert die Komplexbildung des TGF β -Rezeptors mit **Smad2** und verstärkt die durch TGF β induzierte Transkription. Außerdem fördert Itch die Ubiquitinierung von Smad2 (Bai et al., 2004).

Smad3 ist ein Schlüsselsignal des TGF-Signalwegs und als DNA-bindender Transkriptionsregulator bekannt. Außerdem interagiert Smad3 mit **HEF1** (human enhancer of filamentation 1), einem zytoplasmatischen Bindeprotein für viele Rezeptoren, und löst seine proteasomale Degradation aus (Liu et al., 2000). AIP4/Itch, Smad3 und HEF1 bilden dabei einen Komplex und HEF1 wird durch Itch ubiquitiniert (Feng et al., 2004).

CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein), das ein Substrat von Parkin ist (Kapitel 1.1.8.2), kontrolliert die Sensitivität des TGF β -Signalwegs, indem es die Ubiquitinierung und Degradation von **Smad3** vermittelt (Xin et al., 2005).

Smad7 ist ein intrazellulärer Antagonist des **TGF β** -Signalwegs. Es interagiert mit der aktivierten Form des TGF β -Typ 1-Rezeptors (T β RI), um Phosphorylierung der durch den Rezeptor regulierten Smads (Smad2 und Smad3) zu verhindern. Außerdem induziert Smad7 die Degradation von T β RI durch Assoziation mit verschiedenen E3-Ligasen, zu denen auch AIP4/Itch gehört. Itch vermittelt auch die Ubiquitin-abhängige Degradation von Smad7 (Lallemand et al., 2005).

Itch bindet über seine WW-Domänen an die intrazelluläre Domäne von **NOTCH1** und ubiquitiniert ihn mit seiner HECTc-Domäne. NOTCH1 gehört zu einer Familie von transmembranösen Rezeptoren, die während der Entwicklung vieler Zellarten, einschließlich der Zellen des Immunsystems, Entscheidungen zum Zellschicksal regulieren. Itch kann also NOTCH-vermittelte Signale modifizieren und so an sämtlichen durch diese Rezeptoren beeinflussten Entscheidungen teilhaben (Qiu et al., 2000; Matesic et al., 2006).

AIP4/Itch reguliert außerdem die Expression des **TRPV4**-Kanals an der Zelloberfläche. TRPV4 gehört einer Familie von Ionenkanälen, die den Einstrom von Kalzium (Ca²⁺)-Ionen in unerregbare Zellen erleichtern. Wird TRPV4 durch AIP4 ubiquitiniert, wird die Anzahl der Kanäle an der Plasmamembran durch Endozytose vermindert, wodurch die basale Aktivität von TRPV4 reduziert wird. Ein weiterer Kanal derselben Familie, **TRPC4**, wird ebenfalls auf diese Art reguliert (Wegierski et al., 2006). Dieser Mechanismus könnte eine neuroprotektive Funktion besitzen, da Störungen im Calcium-Haushalt mit Neurodegeneration in Verbindung gebracht werden (Mattson, 2007; Surmeier, 2007).

RNF11 (RING-Finger Protein 11) interagiert ebenfalls mit AIP4/Itch (Kitching et al., 2003). RNF11, das in Neuronen der SN vorkommt und bei Parkinson-Patienten in Lewy-Körperchen nachgewiesen wurde, wird als Kandidatengen für den Locus PARK10 diskutiert (Anderson et al., 2007).

1.3 Zielstellung der Arbeit

Itch ist eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase mit vielfältigen Aufgaben und nachgewiesener Aktivität im ZNS. Das Ubiquitin-Proteasomen-System, in dem E3-Ligasen eine zentrale Stellung einnehmen, spielt eine prominente Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson. Zusätzlich wurden bei Parkinson-Patienten in Genen des UPS wie Parkin und UCHL1 bereits krankheitsauslösende Mutationen identifiziert.

Es ist also aussichtsreich, weitere E3-Ligasen wie *Itch* einem **Mutationsscreening an Parkinson-Patienten** zu unterziehen, um über die Charakterisierung funktioneller Varianten in neuen Kandidatengenen ein immer besseres Verständnis der Pathogenese des Morbus Parkinson zu erlangen und damit Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten zu verbessern. Vielleicht kann dann diese bisher unheilbare Krankheit in Zukunft schon vor dem klinischen Erkrankungsbeginn therapeutisch oder sogar präventiv beeinflusst werden.

Für die molekulargenetischen Analysen stand ein Kollektiv von 286 Parkinson-Patienten zur Verfügung, für das alle kodierenden Exone des *ITCH*-Gens durch Heteroduplexanalysen auf Sequenzauffälligkeiten hin untersucht wurden.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Mutationsanalyse von ITCH wurde nach folgendem Schema durchgeführt (Abb. 2.1):

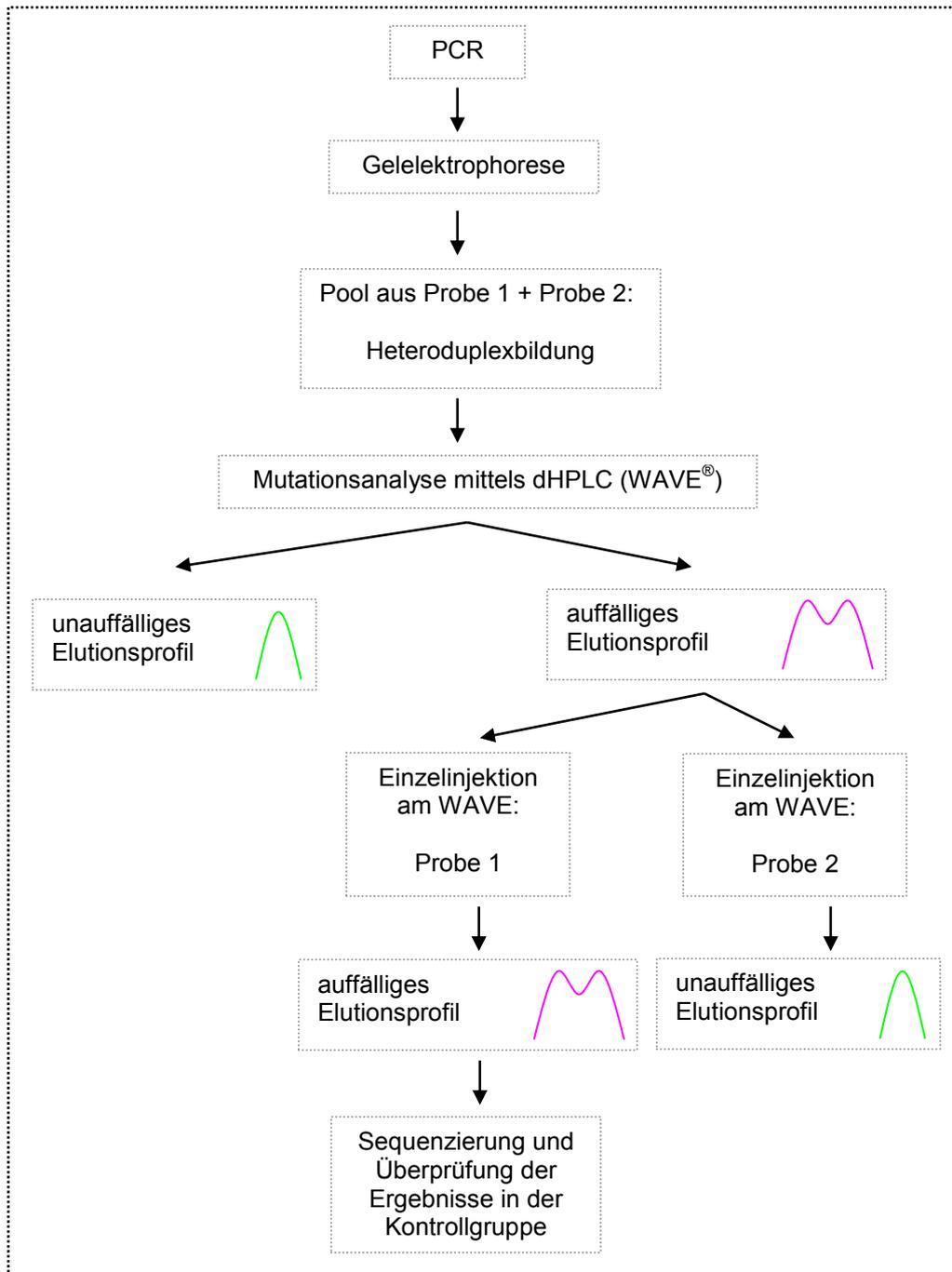


Abb. 2.1

Ablauf des Mutationsscreenings von ITCH an Parkinson-Patienten

Vervielfältigung der einzelnen Exone durch PCR, Überprüfung per Gelelektrophorese, Mutationsscreening nach Heteroduplexbildung mittels dHPLC (WAVE®), bei auffälligem Elutionsprofil Einzelinjektion und Sequenzierung der auffälligen Probe mit Vergleich in der Kontrollgruppe

2.1 PCR

2.1.1 Grundprinzip

Die PCR (polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion) wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt. Sie dient zur selektiven in vitro Amplifikation von DNA-Sequenzen.

Es handelt sich hierbei um eine zyklische Reaktion, bei der die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation ca. 30-40mal wiederholt werden. Statistisch gesehen liegen nach 35 Zyklen $2^{35} = 3,4 \times 10^{10}$, also ca. 34 Milliarden Kopien der gewünschten template-DNA vor.

Welcher Teil der DNA amplifiziert wird, hängt von der Auswahl der Primer ab. Die Primer umschließen die zu amplifizierende Region und werden so gewählt, dass sie eine Länge von ca. 20 bp („Oligonukleotide“) und einen ähnlichen Schmelzpunkt haben (Abb. 2.2).

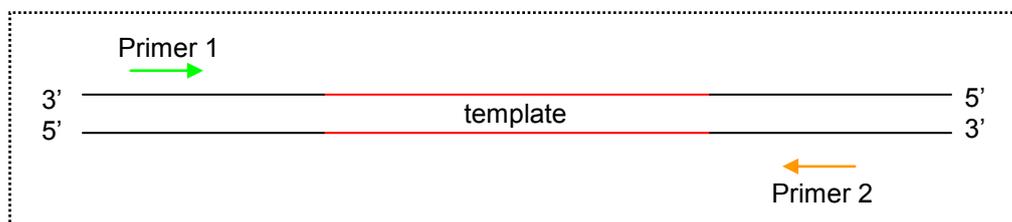
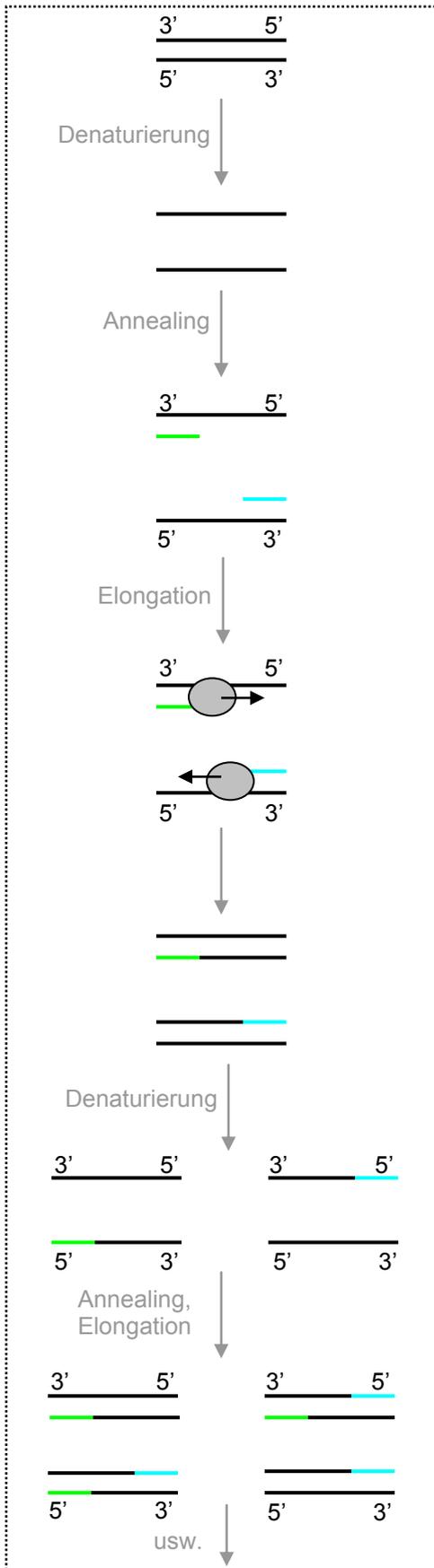


Abb. 2.2
Lage der Primer um das Template

Der genaue Ablauf der PCR sieht folgendermaßen aus: Ein Ansatz aus DNA (template), spezifischen Primern, Desoxynukleotiden (dNTPs), thermostabiler Taq-Polymerase und Mg^{2+} -haltigem Puffer wird im Thermocycler unter folgenden Bedingungen inkubiert (Abb. 2.3):



- Denaturierung bei 94°C
Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA (dsDNA) zu Einzelsträngen (ssDNA)
- Annealing
Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Matrize (template) bei spezifischer Hybridisierungstemperatur, die durch den Schmelzpunkt T_m der Primer festgelegt wird
- Elongation bei 72°C (Aktivitäts-optimum der Taq)
Synthese des komplementären Strangs in 5'-3'-Richtung, indem die im Überschuss zugegebenen dNTPs durch die hitzestabile Taq-Polymerase an die Primer angefügt werden
- Wiederholung der Schritte Denaturierung – Annealing – Elongation entsprechend der Anzahl der gewünschten Zyklen

Abb. 2.3
Schema der PCR

Denaturierung des Doppelstrangs, Annealing der Primer (farbig markiert), Elongation durch die Taq-Polymerase (durch Ellipse dargestellt), erneute Denaturierung, Annealing, Elongation usw. entsprechend der Anzahl der gewünschten Zyklen

Nach Beendigung der PCR wird mittels der Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2) überprüft, ob das gewünschte Amplifikat vorliegt; danach kann dieses weiterverarbeitet werden.

2.1.2 Material

2.1.2.1 DNA-Proben

Insgesamt wurden DNA-Proben von 286 Parkinson-Patienten und 260 gesunde Kontrollen („old people“) untersucht. Da die DNA-Proben in 96-well-Platten vorlagen, wurden sämtliche Arbeitsschritte im 96-Proben-Maßstab durchgeführt.

Für das Screening von ITCH standen 286 Proben von Parkinson-Patienten zur Verfügung, die von 145 Männern und 131 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 65,14 (+/-10.51) Jahren stammten. Bei 10 Probanden wurde das Geschlecht nicht mitgeteilt. Die Patienten, deren Diagnose jeweils durch einen Neurologen bestätigt wurde, zeigten alle typischen klinischen Symptome der PD. Das Durchschnittsalter bei Erkrankung betrug 57,27 (+/-11.33) Jahre.

Das Kontrollkollektiv („old people“) bestand aus 260 Proben mit ähnlicher Alters- und Geschlechtsverteilung sowie ethnischer Herkunft der Probanden. Symptome, die auf Morbus Parkinson oder andere neurodegenerative Erkrankungen hindeuten könnten, wurden durch standardisierte Tests ausgeschlossen.

Von allen Studienteilnehmern lag nach Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung vor (Referenz-Nummer der Ethikkommission: 2872004V).

2.1.2.2 Primer

Die Primer zur Amplifikation der einzelnen Exone wurden mit Hilfe der genomischen Sequenz von ITCH entweder über die Primer3 Software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) entworfen oder selbst designt und anhand einer In-Silicio PCR (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>) überprüft. Die Referenzsequenz von ITCH wurde vom Sanger-Institut bezogen (Ensembl Genome Data Resources, <http://www.ensembl.org/index.html>; ENSG00000078747, Transkript ID ENST00000374862).

Eine Übersicht über die verwendeten Primer gibt Tabelle 2.1.

Tab. 2.1

Sequenzen und Eigenschaften der Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der 24 codierenden Exons von ITCH

Die Primer wurden von der Firma Metabion international AG (Martinsried) synthetisiert und in einer Konzentration von 100 pmol/µl ausgeliefert. Die Primerpaare wurden in einem Primermix aus Forward- (F) und Reverse- (R) Primer in der Konzentration 10 pmol/µl eingesetzt.

Die aufgeführte Schmelztemperatur T_m wurde von Metabion angegeben und zur Abschätzung der PCR-Bedingungen herangezogen.

Die Länge des PCR-Produkts wurde zur Kontrolle bei der Gelelektrophorese verwendet.

Exon	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	T_m [°C]	PCR-Produkt [bp]
3	6068_ITCH_Ex03_F	TGGTCTTCAGTAATAAATAGCCAGG	59,7	263
	6069_ITCH_Ex03_R	ATGCCTGGCCCTCTCAG	57,6	
4	7881_ITCH_Ex04_F	AAGTTAAATTGATTTTCATGA	45,0	229
	7878_ITCH_Ex04_R	AAATACTTCCAAGCTTACAC	51,1	
5	7891_ITCH_Ex05_F	TTTCACTTTTAGTATCGTTA	45,5	175
	7892_ITCH_Ex05_R	ACAGCTAAGTGCAATTC	48,5	
6	7882_ITCH_Ex06_F	TTTCTGTAACCTTATTTTCT	45,0	179
	7879_ITCH_Ex06_R	AAAGGTAGTCACTTACTTTC	51,1	
7	7760_ITCH_Ex07_F	TTTTAGATGGGGTTTCGCT	55,3	222
	7204_ITCH_Ex07_R	CTGAGGTCGGGAGTTCAAAG	59,4	
8	6078_ITCH_Ex08_F	AAAGGCTTTGCTTACATGG	55,3	281
	6079_ITCH_Ex08_R	TTGCAAATATTTCCCTTCTTGAG	55,3	

MATERIAL UND METHODEN

9	6080_ITCH_Ex09_F	GAAGTTTTTCATCCTCCTGCTG	57,9	310
	6081_ITCH_Ex09_R	TGAGGATTAATTGCCAACCAG	55,9	
10	6082_ITCH_Ex10_F	AAGTAATTTTCACCTGTGCATCTAC	58,1	440
	6083_ITCH_Ex10_R	AAAACAGTCATCAAACAATGGAG	55,9	
11	6084_ITCH_Ex11_F	GGTCATTTAATGGAAATGCAAAG	55,3	298
	6085_ITCH_Ex11_R	TGGACAGAGAAAGGGCTGAC	59,4	
12	7262_ITCH_Ex12_F	TTCTGATTTGGCTGGGAACG	55,3	254
	6087_ITCH_Ex12_R	ATGACATATGCTGGAAGGGG	57,3	
13	6088_ITCH_Ex13_F	TATACATTGCCAGGGAAGGG	57,3	287
	6089_ITCH_Ex13_R	CCAGACATTCACTCAAGCAAG	57,9	
14	6090_ITCH_Ex14_F	GCAAGAAGACTATGCCAATGC	57,9	215
	6091_ITCH_Ex14_R	GATCTTCTTCAGTTGTTAGAAATAAGG	58,9	
15	6092_ITCH_Ex15_F	CTTCTGTACTTGGCAAACAAGC	58,4	281
	6093_ITCH_Ex15_R	TTCCACTCCTTGCTAATACAAATC	57,6	
16	6094_ITCH_Ex16_F	GAGAGGGTGGGATATTTTGC	57,3	206
	7880_ITCH_Ex16_R	GCAACACAACAAAGTTAAGGC	55,9	
17	6096_ITCH_Ex17_F	GAATACTCACAGATGCATTGGTAAAC	60,1	385
	6097_ITCH_Ex17_R	CTAAGGTGGCTGGCAATGAG	59,4	
18	7883_ITCH_Ex18_F	TTTAGATAATGAGCTTCA	44,6	129
	7884_ITCH_Ex18_R	AGGAACTAAGTTCTGAGTAT	51,1	
19	7000_ITCH_Ex19_F	GAGGGGTATAGATCCCTGAGAAC	62,4	327
	7001_ITCH_Ex19_R	TGTTATGGCACCTAAGAGAAAATTTAG	58,9	
20	7885_ITCH_Ex20_F	TTTCATAGGCTCTGTTCCAT	53,2	154
	7886_ITCH_Ex20_R	AAAGAACTTACTTAACCCAG	52,0	
21	7004_ITCH_Ex21_F	TTAAGAACATGGGCCTTTTCG	55,3	288
	7005_ITCH_Ex21_R	AAGCAATTATCAATGTGCTGTAGTC	58,1	
22	7006_ITCH_Ex22_F	TGGGCATTGTGATGAAGC	53,7	411
	7007_ITCH_Ex22_R	TTCAAACATTTTGCCCCAG	53,2	
23	7008_ITCH_Ex23_F	TGATAAGTCAAAGCCTACTGATTG	57,6	349
	7009_ITCH_Ex23_R	AATGCATGGACTAAGGGGTC	57,3	
24	7010_ITCH_Ex24_F	CCTGGGACACCTCACCTC	60,5	319
	7011_ITCH_Ex24_R	TGGCTATCCCTGTCTTTGTTG	57,9	

MATERIAL UND METHODEN

25	7012_ITCH_Ex25_F	CTTGT TGGAT TGGGG AACAC	57,3	268
	7013_ITCH_Ex25_R	TGCTATGATGGCTGTGCTATTC	58,4	
26	7018_ITCH_Ex26_F	ACTACACTACTCATTGATTCTTTGC	58,5	240
	7019_ITCH_Ex26_R	CAAGATGTGCAACAGGCAG	56,7	

2.1.2.3 Reagenzien

Tab. 2.2

Verwendete Reagenzien für die PCR

Reagenzien und Hersteller

Reagenz	Firma
Ampuwa Injektionswasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
BioTherm™ DNA Polymerase 5U/µl	GeneCraft Germany, Münster
10x Puffer BioTherm™ (enthält 15 mM MgCl ₂)	GeneCraft Germany, Münster
100 mM dATP Solution	Invitrogen, Karlsruhe
100 mM dCTP Solution	Invitrogen, Karlsruhe
100 mM dGTP Solution	Invitrogen, Karlsruhe
100 mM dTTP Solution	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 25 mM	Qiagen, Hilden
Q-Solution 5x	Qiagen, Hilden

2.1.2.4 Geräte

Tab. 2.3

Verwendete Geräte für die PCR

Geräte und Hersteller

Gerät	Firma
GeneAmp® PCR System 9700	Perkin Elmer, Weiterstadt
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research Inc., Waltham, Mass. (USA)

2.1.3 Etablierung der PCR-Bedingungen

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen werden für jedes Exon optimierte Bedingungen bezüglich der Annealing-Temperatur, der Anzahl der PCR-Zyklen und der eingesetzten $MgCl_2$ -Konzentration benötigt. Daher wurde jedes codierende Exon von ITCH zunächst von zwei Normalproben amplifiziert, um diese Bedingungen zu etablieren.

2.1.3.1 Ansätze

In der Regel wurde mit 25 μ l-Ansätzen mit der folgenden Zusammensetzung gearbeitet (Tab. 2.4):

Tab. 2.4
Standard-Zusammensetzung der PCR-Ansätze

Komponenten	Volumen [μ l]	Konzentration im 25 ml-Ansatz
Puffer (10x)	2,5	1x
dNTPs (10 mM)	0,5	200 μ M
Primer (je 10 pmol/ μ l)	2,0	0,8 pmol
DNA (ca. 30 ng/ μ l)	3,0	ca. 100 ng
Taq-Polymerase (5 U)	0,2	1 U
$MgCl_2$ (25 mM)	bei Bedarf	
aqua dest.	ad 25,0	

Wasser, Puffer, dNTPs, Primer, DNA und bei Bedarf $MgCl_2$ wurden auf Eis zusammenpipettiert, gevortext und abzentrifugiert. Danach wurde die Taq-Polymerase hinzugefügt, nochmals kurz vorsichtig gemischt und abzentrifugiert und der Ansatz sofort in den Thermocycler überführt.

Für die Masterplatten im 96-well-Maßstab wurden nach dem gleichen Schema Mastermixe hergestellt, jedoch ohne die Zugabe von DNA. Die Mastermixe wurden auf Eis in die einzelnen Kavitäten verteilt und die Patienten- oder Kontroll-DNA mit der 8-Kanal-Pipette hinzugefügt.

Bei jeder PCR wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen nachzuweisen. Dazu wurde in einer Kavität anstatt DNA die entsprechende Menge aqua dest zugegeben.

2.1.3.2 Touchdown-Protokoll

Beim Screening von ITCH wurden sämtliche PCRs nach einem sog. Touchdown-Protokoll (Tab. 2.5) gefahren, bei dem mit einer hohen Annealing-Temperatur begonnen wird, was eine höhere Bindungsspezifität der Primer bewirkt. In den ersten 10 Zyklen wird die Annealing-Temperatur jeweils um 1°C gesenkt, die restlichen 30 Zyklen erfolgen bei gleichbleibender Temperatur. Nach Beendigung der 40 Zyklen wird noch eine Elongationsphase von 7 Minuten angeschlossen, um alle doppelsträngigen Hybride aufzufüllen.

Tab. 2.5
Standard-Schema des Touchdown-Protokolls

Phase	Zeit	Temperatur	Zyklen	
Denaturieren	4 min	94°C	1	
Denaturieren	30 s	94°C		insgesamt 40 Zyklen
Annealing	30 s	65°C, pro Zyklus je 1°C erniedrigt bis 56°C	10	
		55°C	30	
Elongation	30 s	72°C		
Schluss- Elongation	7 min	72°C	1	
Kühlen	∞	10°C		

Die Durchführung der ersten PCR unter diesen Bedingungen ergab bei den meisten Exonen kein zufriedenstellendes Ergebnis (Abb. 2.4):

- Da die PCR für die Exone 5, 12, 20 und 21 (teilweise) gar kein Amplifikat ergab, wurde sie unter denselben Bedingungen wiederholt. Ergab die

Wiederholung ebenfalls kein Amplifikat, wurde mit Hilfe einer Gradienten-PCR versucht, die Annealing-Temperatur der Primer besser anzupassen. Schlug dies ebenfalls fehl, wurden andere Primer benötigt.

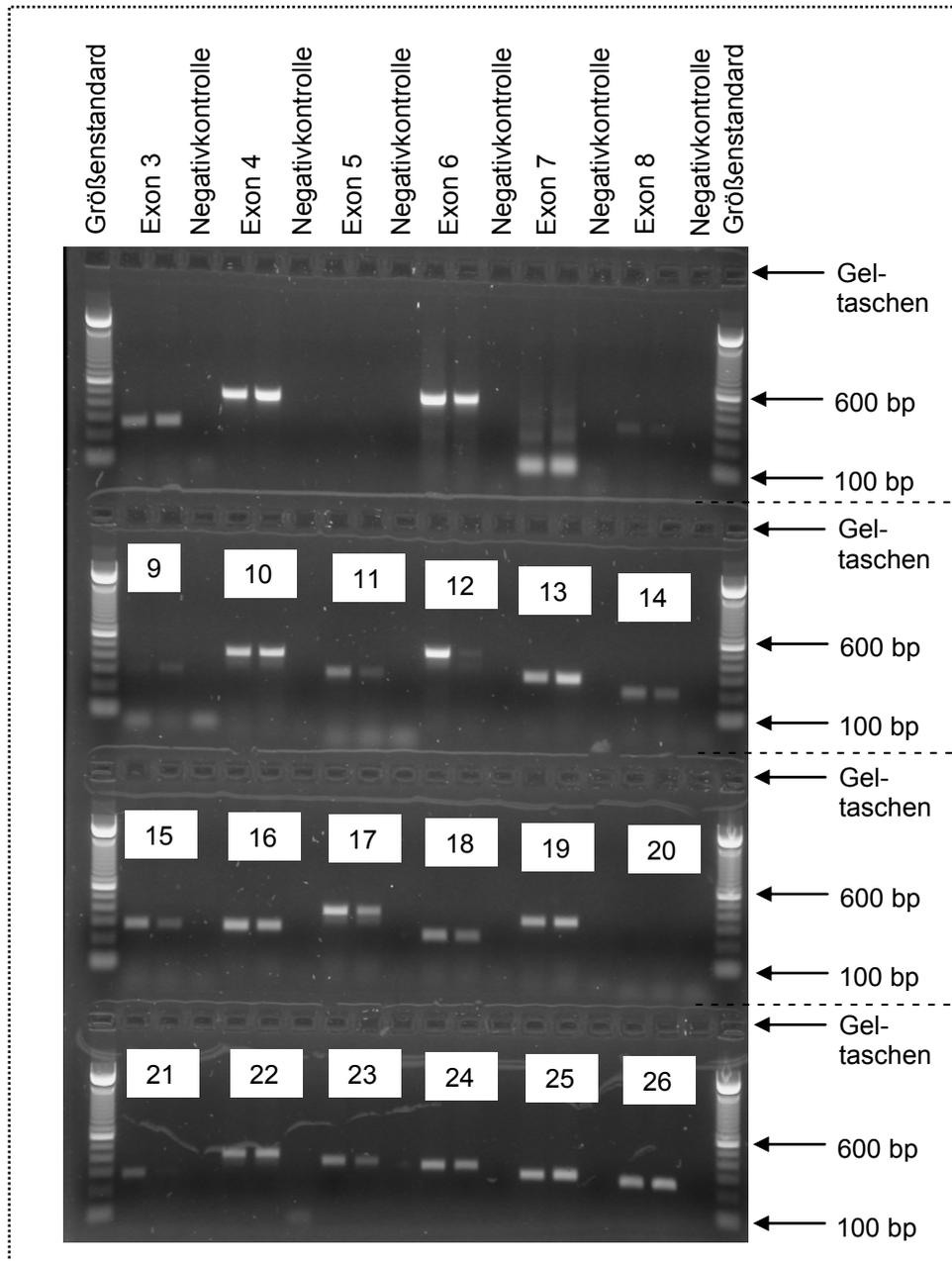


Abb. 2.4

Ergebnis der ersten PCR (Gelelektrophorese)

Dargestellt ist die Vervielfältigung jedes Exons aus zwei Normalproben, rechts neben dem jeweiligen PCR-Fragment befindet sich die zugehörige Negativkontrolle. Aus Platzgründen wurden die Amplifikate der Exons 9 bis 26 samt der zugehörigen Negativkontrolle nur mit Nummern bezeichnet.

Die Erklärung der PCR-Ergebnisse findet sich im Text.

- Die PCR für Exon 7 zeigte viele Nebenbanden (unspezifische Amplifikate), sie musste anderen Bedingungen wiederholt werden (siehe Kapitel 2.1.3.3).
- Die PCR für die Exone 3, 8, 9, 11, 13-19 und 21-26 zeigte ein zu schwaches Amplifikat, hier musste die $MgCl_2$ -Konzentration angepasst werden (siehe Kapitel 2.1.3.4). Eventuell war auch die Anzahl von 40 Zyklen nicht ausreichend, daher wurde bei einigen Exonen zusätzlich die Zyklusanzahl gesteigert, um die Amplifikatmenge zu erhöhen.
- Die PCR für die Exone 4, 6 und 10 zeigte ein gutes Amplifikat und wurde wiederholt. Bestätigte sich das Ergebnis, waren die Bedingungen für diese Exone etabliert und wurden für alle weiteren PCRs übernommen.

In der Übersicht am Ende des Kapitels (Tab. 2.6) sind die etablierten Bedingungen für alle Exone zusammengefasst.

2.1.3.3 Lage der Primer

In der Regel sollten die Primer jeweils 30-50 bp außerhalb der Exone platziert werden, so dass das Exon – der für das Mutationsscreening bedeutendste Bereich – möglichst in der Mitte des Amplifikats liegt, da bei der dHPLC die Randbereiche der PCR-Fragmente nicht immer ganz genau gescreent werden können. In einigen Fällen mussten die Primer jedoch wegen Längenpolymorphismen oder erfolglosen Etablierungsversuchen am WAVE[®] so verschoben werden, dass sie in das Exon hineinragten.

Die Problematik wird am Beispiel von Exon 7 verdeutlicht: Die Amplifizierung von Exon 7 zeigte beim ersten Versuch multiple Nebenbanden (unspezifische Amplifikate) (Abb. 2.4). Zunächst wurde versucht, diese Nebenbanden mit Hilfe von Q-Solution zu unterdrücken, dies zeigte jedoch nicht den gewünschten Effekt (Abb. 2.5). Danach wurde mit einer Gradienten-PCR versucht, die

Annealing-Temperatur zu optimieren, um eine spezifischere Anlagerung der Primer zu ermöglichen, jedoch traten auch hier bei allen Temperaturen Nebenbanden auf (Abb. 2.7). Der Grund hierfür ist aus der Sequenz um Exon 7 ersichtlich (Abb. 2.6): Direkt neben dem Exon (upstream) liegt ein Längenpolymorphismus (Poly-T), dessen Amplifizierung die Nebenbanden verursachte. Nachdem ein anderer Primer gewählt wurde, der den Längenpolymorphismus ausschloss, konnte Exon 7 ohne Probleme amplifiziert werden (Abb. 2.8). Bei der Etablierung der dHPLC für PCR-Fragment 7 wurde dann darauf geachtet, dass die für das Screening gewählte Temperatur auch für den Randbereich genau passend war.

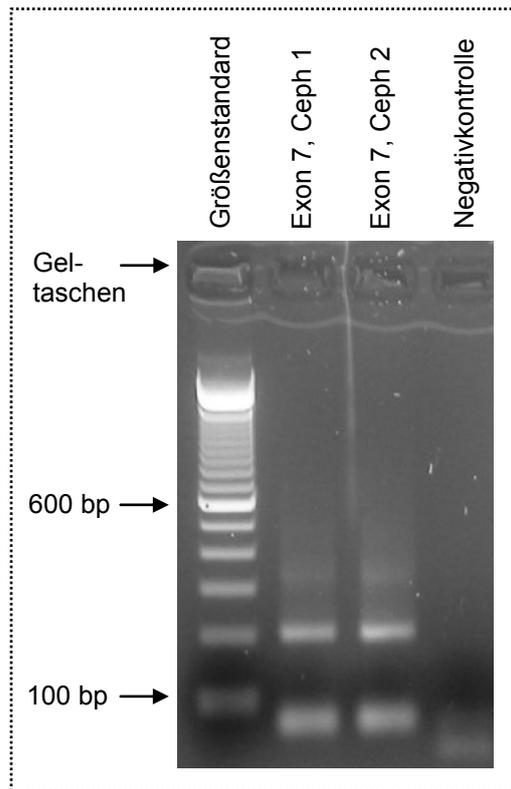


Abb. 2.5
PCR von Exon 7 mit Zusatz von Q-Solution

Zusatz von Q-Solution zum PCR-Ansatz kann Nebenbanden unterdrücken. Bei der Amplifizierung von Exon 7 mit Q-Solution zeigten sich jedoch immer noch Nebenbanden, so dass als Nächstes eine Gradienten-PCR durchgeführt wurde.

```

tacaggcatctgccacca cacctggctaattttaatttgctatttaggtagacTTTTTT
TTTTTTTTagatgggggttcgctctgtttgccaggctggagtgcaatagtc
gatctcggtcactgcaacctctgcctccgggttaagtgattctcctatctcag
cctcccgaqtagctgggtttacagggtatgcaccaccacgctggctaattttgtatfff
tagtagagacagggtttctccgtgttgccaggctggctttgaactcccgacctcag
    
```

Abb. 2.6

Basensequenz um Exon 7 mit Längenpolymorphismus und Primern

Die PCR von Exon 7 (Exonsequenz fett und unterstrichen, Intronsequenz normal geschrieben) mit Primer forward 1 (grün markiert) und Primer reverse (blau markiert) ergab unzählige Nebenbanden, weil ein Längenpolymorphismus (Poly-T, großgeschrieben) eingeschlossen war. Mit Primer forward 2 (gelb markiert) ergab sich das gewünschte Amplifikat ohne Nebenbanden.

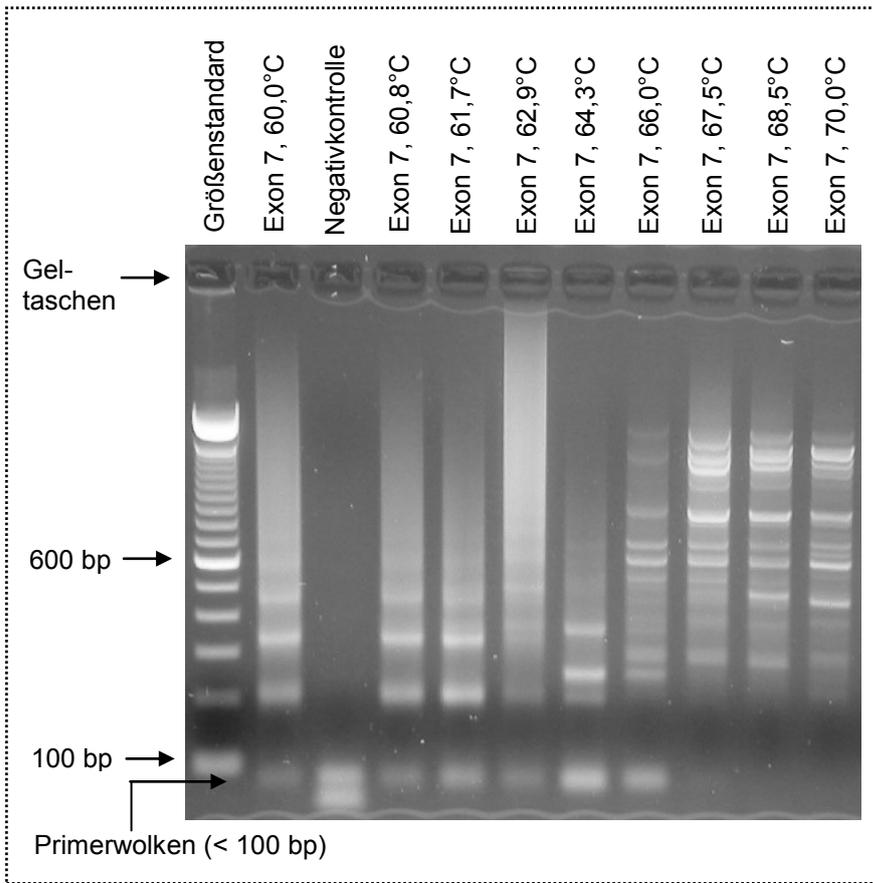


Abb. 2.7
Gradienten-PCR von Exon 7

Bei der Gradienten-PCR wird versucht, die Annealing-Temperatur zu optimieren, um eine spezifischere Anlagerung der Primer zu ermöglichen.

Bei der Amplifizierung von Exon 7 traten jedoch (aufgrund eines Längenpolymorphismus, siehe Text) bei allen Temperaturen unspezifische Nebenbanden auf, so dass hier andere Primer notwendig waren.

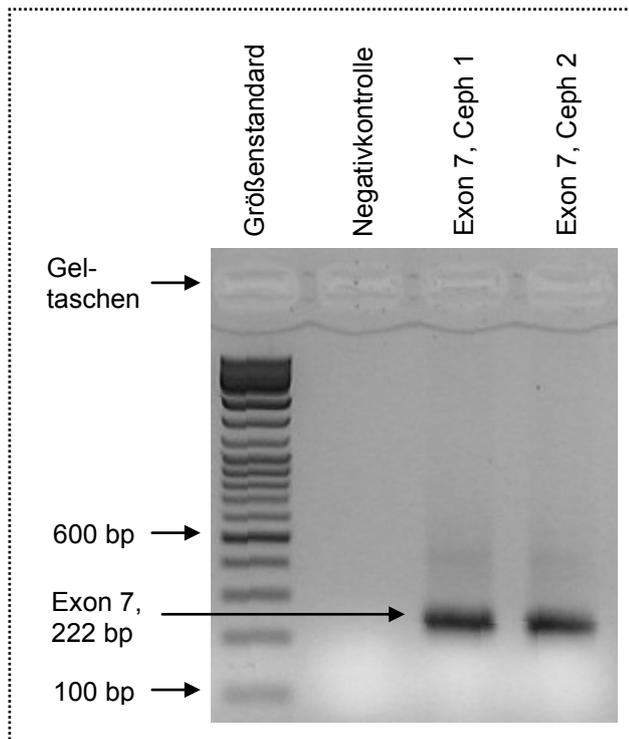


Abb. 2.8
PCR von Exon 7 mit neuem forward-Primer

Die Amplifizierung von Exon 7 mit dem neuen forward-Primer, der den Längenpolymorphismus ausschließt, ergab das gewünschte Amplifikat von 222 bp.

Eine ähnliche Problematik zeigte sich bei Exon 12, das sich zwar zunächst problemlos amplifizieren, aber nicht am WAVE (dHPLC) etablieren ließ. Nachdem ein hier ebenfalls vorliegender Längenpolymorphismus durch einen neuen Primer von der Amplifizierung ausgeschlossen wurde, konnte die dHPLC für PCR-Fragment 12 nach sorgfältiger Temperatur-Anpassung ebenfalls etabliert werden.

2.1.3.4 MgCl₂-Konzentration

Bei der Vervielfältigung einiger PCR-Fragmente, die zu wenig Amplifikat ergaben, wurde die MgCl₂-Konzentration schrittweise um je 0,5 mM erhöht, um eine größere Amplifikatmenge zu erhalten. Magnesium-Ionen sind für die DNA-Polymerase notwendig, um den Einbau der dNTPs während der Elongation zu gewährleisten. Sie bilden lösliche Komplexe mit den dNTPs, stimulieren die Polymerase-Aktivität und erhöhen die Bindung zwischen Primer und Template ebenso wie die Schmelztemperatur des DNA-Doppelstrangs.

Bei zu hoher MgCl₂-Konzentration steigt jedoch auch die Wahrscheinlichkeit für Nebenbanden (unspezifische Amplifikate) an, d.h. die Konzentration muss für jede einzelne PCR sorgfältig angepasst werden: Gewählt wird jeweils die Konzentration, bei der das Amplifikat stark genug ist, jedoch noch keine Nebenbanden auftreten.

Für die Amplifizierung der Exone 3, 8, 9, 11, 13-19 und 21-26 wurde jeweils eine Reihen-PCR mit aufsteigender MgCl₂-Konzentration von 1,5 – 3,0 mM durchgeführt und so die ideale Magnesiumchlorid-Konzentration ermittelt (Abb. 2.9).

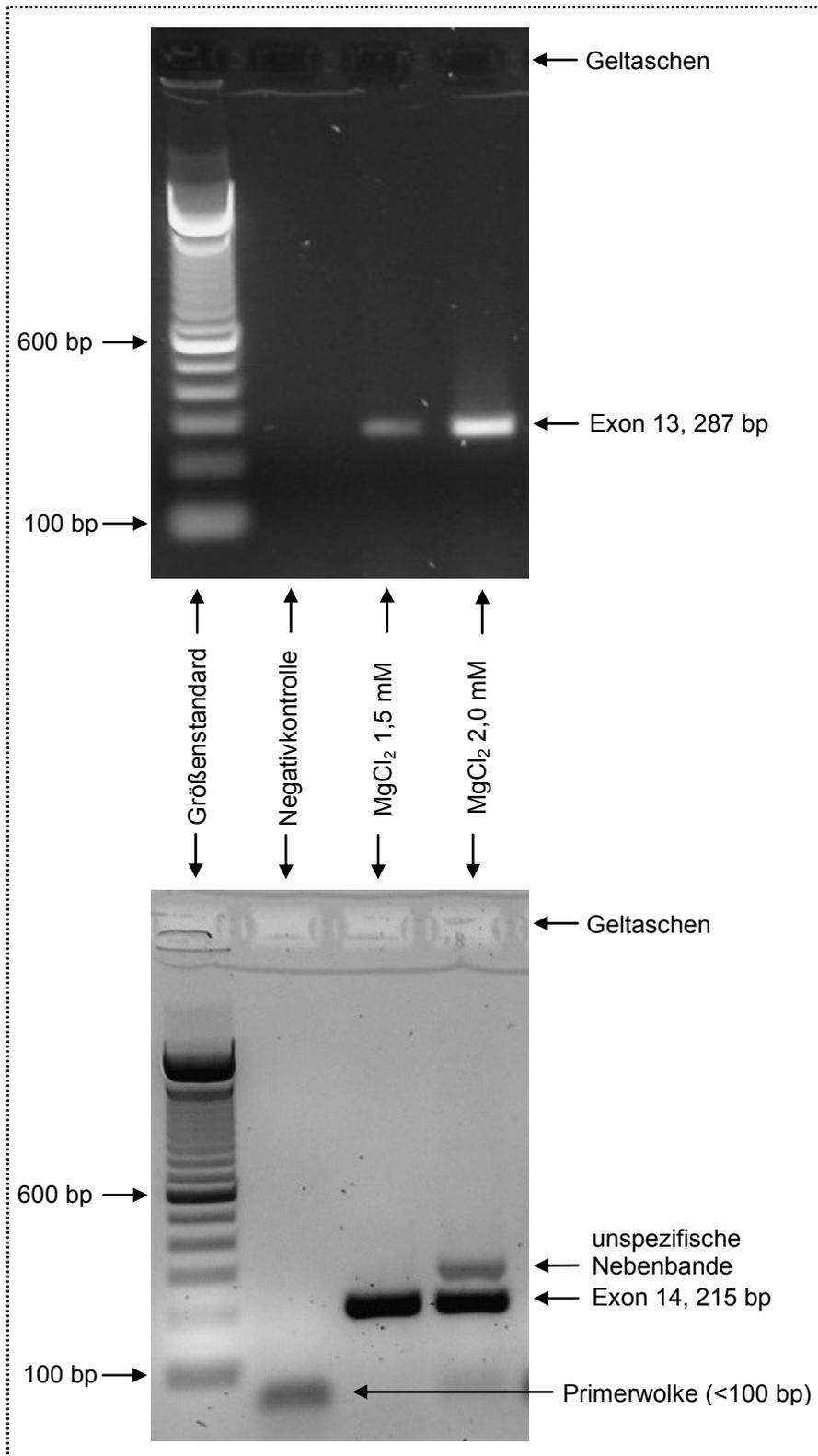


Abb. 2.9
Einfluss der Magnesiumkonzentration auf das Amplifikat

Eine höhere Magnesiumkonzentration ergibt ein stärkeres Amplifikat, jedoch steigt die Wahrscheinlichkeit für unspezifische Nebenbanden an.

Es muss also die Konzentration gewählt werden, bei der das Amplifikat stark genug ist, jedoch noch keine Nebenbanden auftreten.

Bei der Amplifizierung von Exon 13 (oberer Bildteil) wird eine Magnesiumkonzentration von 2,0 mM benötigt, weil das Amplifikat bei einer Konzentration von 1,5 mM zu schwach ist.

Bei der Amplifizierung von Exon 14 hingegen (unterer Bildteil) treten bereits bei einer Magnesiumkonzentration von 2,0 mM Nebenbanden auf, hier sind 1,5 mM ausreichend.

2.1.3.5 Optimierte PCR-Bedingungen

In der Tabelle 2.6 sind die optimierten Bedingungen für die einzelnen Exone bezüglich Annealing-Temperatur, Zyklanzahl und $MgCl_2$ -Konzentration zusammengefasst.

Tab. 2.6

PCR-Bedingungen für die einzelnen Exone

Für jedes Exon werden Temperaturspanne der ersten 10 Zyklen, Annealingtemperatur, Anzahl der Zyklen und $MgCl_2$ -Konzentration dargestellt

Exon	Touchdown Annealing- Temperaturspanne [°C] Zyklus 1-10	Annealing- Temperatur restliche Zyklen [°C]	Zyklen insgesamt	$MgCl_2$ [mM]
3	65-56	55	40	2,0
4	65-56	55	40	2,0
5	50-41	40	45	2,5
6	50-41	40	45	2,5
7	65-56	55	40	1,5
8	65-56	55	40	1,5
9	65-56	55	40	1,5
10	65-56	55	40	1,5
11	65-56	55	40	2,0
12	65-56	55	40	1,5
13	65-56	55	40	2,0
14	65-56	55	40	1,5
15	65-56	55	40	2,0
16	65-56	55	40	2,0
17	65-56	55	40	1,5
18	52-43	42	45	2,0
19	65-56	55	40	2,0
20	60-51	50	45	2,0
21	65-56	55	40	1,5
22	65-56	55	40	1,5
23	65-56	55	40	1,5
24	65-56	55	40	1,5
25	65-56	55	40	1,5
26	65-56	55	40	1,5

2.2 Agarose-Gelelektrophorese

2.2.1 Grundprinzip

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung unterschiedlich langer DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Da DNA durch ihr Kohlenhydrat-Phosphat-Gerüst negativ geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld zur Anode. Dabei trennen sich innerhalb einer Gelmatrix die unterschiedlichen Fragmente nach ihrer Größe auf, weil kürzere Fragmente schneller durch das Gel wandern als längere. Während dem Lauf interkaliert die DNA mit dem im Gel enthaltenen Ethidiumbromid. Dieses emittiert unter UV-Licht (254-366 nm) Licht im orange-roten Bereich (590 nm) und macht somit nach Beendigung des Trennvorgangs die einzelnen Banden unterschiedlicher Größe sichtbar.

Die Gelelektrophorese wurde hier zur Kontrolle der PCRs eingesetzt: Ist das richtige Amplifikat (Abschätzung der Größe) vorhanden, wurde der Ansatz kontaminiert (Negativkontrolle), wieviel Amplifikat wurde erzielt und daraus abgeleitet: Wie ist die einzusetzende Menge bei den weiteren Versuchen, insbesondere bei der Sequenzierung.

2.2.2 Material

Tab. 2.7
Verwendete Reagenzien für die Gelelektrophorese
 Reagenzien und Hersteller

Reagenz	Hersteller
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
0,5 M EDTA pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid 1%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ficoll Type 400 20%-Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
UltraPure Agarose	Invitrogen, Karlsruhe

2.2.2.1 Herstellung und Verwendung der Pufferlösung

Es wurde eine 10fach konzentrierte Stammlösung (10x TBE) hergestellt, die zur weiteren Verwendung entsprechend mit ddH₂O verdünnt wurde (Tab. 2.8):

Tab. 2.8

Verwendung des 10x TBE-Puffers

Einsatzgebiete des TBE-Puffers und benötigte Konzentration

für die...	benötigte Konzentration
Befüllung der Elektrophoresekammer	1x
Herstellung des Agarose-Gels	1x
Herstellung des Blaupuffers	5x

Komponenten (10x TBE): 108 g Tris base
 55 g Borsäure
 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
 ad 1 l H₂O

Die festen Bestandteile abwiegen, EDTA zugeben, unter Rühren mit dem Magnetrührer langsam H₂O zugeben, wenn alles aufgelöst ist auf 1 Liter auffüllen.

2.2.2.2 Herstellung und Verwendung des Agarose-Gels

Es wurden 1,5%ige Agarose-Gele verwendet (Tab. 2.9).

Tab. 2.9

Komponenten des Agarose-Gels

Menge der benötigten Reagenzien zur Herstellung des Gels

	Agarose	1x TBE	Ethidiumbromid
kleines Gel (ca. 7x8 cm)	0,6 g	40 ml	1,5 µl
großes Gel (ca. 12x13 cm)	1,2 g	80 ml	3 µl

Agarose in Erlenmeyer-Kolben abwiegen, in entsprechender Menge TBE lösen, in der Mikrowelle erhitzen bis keine Schlieren mehr sichtbar sind, kurz abkühlen

lassen, Zugabe der entsprechenden Menge Ethidiumbromid, Gel in die entsprechende Form mit eingesetzten Kämmen gießen, aushärten lassen, Gel in die mit Puffer (1x TBE) befüllte Elektrophoresekammer überführen, die Kämmen ziehen und die gebildeten Taschen mit den Proben befüllen.

Große Gele laufen 30-45 min bei 120 V, kleine Gele 30-45 min bei 90 V.

2.2.2.3 Herstellung und Verwendung des Blaupuffers

Komponenten: 20 ml 5x TBE
 40 ml 20% Ficoll (Type 400, Sigma)
 100 µl 0,1% Bromphenolblau
 ad 50 ml aqua dest.

Alle Komponenten mischen und gut vortexen, dann weiterverwenden.

Für die Gelelektrophorese wurden 5 µl Blaupuffer mit 2-5 µl Amplifikat gemischt und in die Geltasche gegeben.

Der verwendete Blaupuffer hat hierbei zwei Aufgaben: Zum einen beschwert er die Amplifikate, so dass sie gut in die Geltasche absinken, zum anderen markiert der blaue Farbstoff die Lauffront bei der Gelelektrophorese, wodurch das Hinauslaufen der Amplifikate aus dem Gel vermieden wird.

2.2.2.4 Größenstandards

Tab. 2.10

Größenstandards für die Gelelektrophorese

Größenstandards, Hersteller und eingesetzte Verdünnung

Größenstandard	Hersteller	Verdünnung
peqGOLD Leiter-Mix	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen	1:10
100bp DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe	1:20

Die Größenstandards wurden mit Blaupuffer entsprechend der Angaben in Tabelle 2.10 verdünnt, danach wurden bei jeder Gelelektrophorese 10 µl in einer am Rand liegenden Geltasche mitgeführt, um die Größe der Amplifikate abschätzen zu können.

2.2.2.5 Elektrophoresezubehör

Tab. 2.11
Verwendete Geräte für die Gelelektrophorese
 Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
Electrophoresis Power Supply EPS Consort E835	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer 40-0708	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer 40-1214	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

2.2.2.6 Dokumentation

Tab. 2.12
Dokumentationssystem für die Gelelektrophorese
 Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
Geldokumentationssystem Transilluminator	Biostep, Jahnsdorf
Digitalkamera Camedia C-5050	Olympus, Hamburg

2.3 DHPLC

2.3.1 Grundprinzip

Die dHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography, denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) ist eine Methode, mit der bekannte und unbekannte Sequenzvarianten schnell, kostengünstig und mit hoher Sensivität und Spezifität nachgewiesen werden können. Daher ist die dHPLC, die nach dem Prinzip der Ionen-Paar-Umkehrphasenchromatographie funktioniert, beim Screening nach Mutationen (Einzelbasenaustausch, kleine Deletionen bzw. Insertionen) sehr effizient (O'Donovan et al., 1998; Gross et al., 2000).

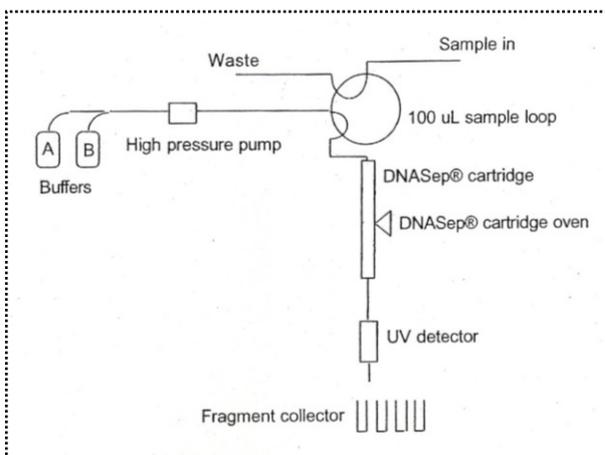


Abb. 2.10

Schema des WAVE®-Systems

Quelle: An Introduction to the Transgenomic WAVE DNA Fragment Analysis System

Das dHPLC-System, auch WAVE® genannt, funktioniert nach dem folgenden Prinzip: Über eine Injektionsnadel gelangt die Probe in das ständig mit Puffer (mobile Phase) durchspülte Schlauchsystem. DNA-Fragmente dieser Probe werden im bei definierter Temperatur auf die Polymer-Oberfläche der Säule (DNASep® cartridge, stationäre Phase) gebunden. Nach der

Lösemittelgradient-abhängigen Elution von der Säule werden die einzelnen Fragmente bei einer Wellenlänge von 260 nm durch einen UV-Detektor erfasst und in ein Elutionsprofil umgesetzt (Abb. 2.10).

Vor der Analyse im WAVE® müssen die DNA-Fragmente einer Heteroduplexbildung unterzogen werden. Dazu werden Wildtyp und Mutante (oder 2 Patienten- oder Kontrollproben) gemischt, auf 95°C erhitzt und sehr langsam abgekühlt, wodurch sich Hetero- und Homoduplexe ausbilden (Abb. 2.11).

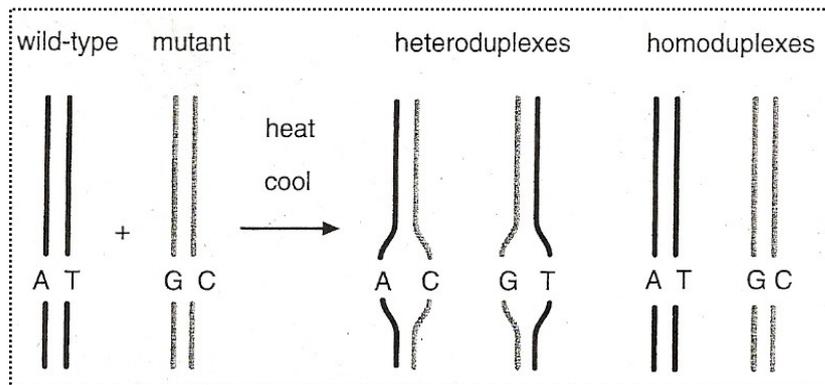


Abb. 2.11
**Heteroduplex-
 Bildung durch
 Hybridisierung**

Quelle:
 An Introduction to
 the Transgenomic
 WAVE DNA
 Fragment Analysis
 System

Damit die DNA-Fragmente an die Säule (DNASep[®] cartridge, Polymermatrix aus Polystyren-Divinylbenzol) gebunden werden können, ist ein Brückenmolekül – das im Puffer enthaltene TEAA (Triethylammoniumacetat) – notwendig: Die hydrophilen Ammonium-Kationen binden an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA, die Alkylgruppen binden an die hydrophobe Oberfläche der Polymermatrix der Säule.

Die Ablösung der DNA-Fragmente von der Säule erfolgt durch die während der Messung kontinuierlich steigende Acetonitril (AcN)-Konzentration, wobei kürzere Fragmente früher als längere eluiert werden. Dies liegt daran, dass längere Fragmente über mehr Bindungsstellen für die TEAA-Moleküle verfügen, über die sie wiederum an die Säule gebunden werden. Somit haften längere Fragmente fester und damit im Gradienten länger an der Säule als kürzere.

Zur Mutationsanalyse müssen meist Fragmente identischer Länge getrennt werden, daher ist hier der Erfolg abhängig von der Säulentemperatur: Je höher die Temperatur, desto kürzer die Retentionszeit, d.h. desto früher die Elution. Erfolgt die Analyse bei nichtdenaturierenden Bedingungen, ist die Retentionszeit für Homo- und Heteroduplices gleich, d.h. es zeigt sich nur ein Elutionssignal.

Wird die Ofentemperatur schrittweise erhöht, eluieren teilweise denaturierte Fragmente (Heteroduplices nahe der Schmelztemperatur) vor den intakten Doppelstrangfragmenten (Homoduplices).

Bei weiterer Temperaturerhöhung kommt es zur kompletten Denaturierung der Fragmente, es zeigt sich wieder nur ein Signal (Abb. 2.12).

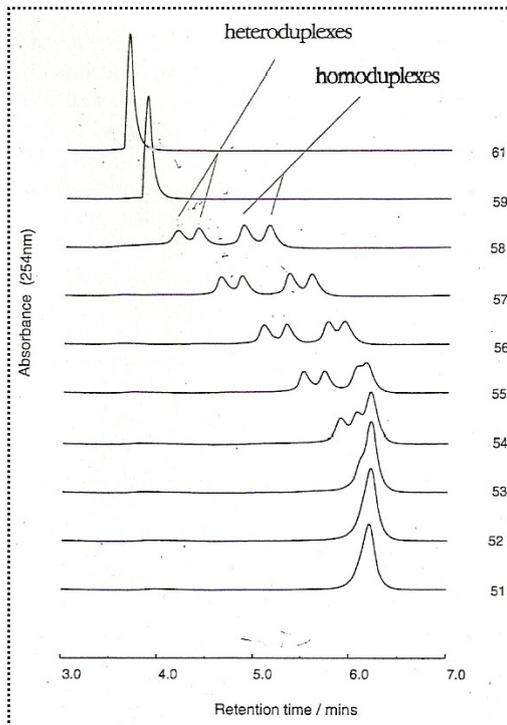


Abb. 2.12
Effekt der Temperatur auf die Trennung von Homo- und Heteroduplexen

61 Zur Analyse der DNA-Fragmente am WAVE
59 muss die Temperatur sorgfältig angepasst
werden.

58 Ist die Temperatur zu niedrig (nicht-
57 denaturierende Bedingungen), eluieren alle
56 Fragmente gleichzeitig.

55 Bei optimaler Temperatur eluieren Hetero-
54 vor Homoduplexen.

53 Ist die Temperatur zu hoch, werden die
52 Fragmente komplett denaturiert und eluieren
wiederum gleichzeitig.

51

Quelle:

An Introduction to the Transgenomic WAVE
DNA Fragment Analysis System

Enthält eine gepoolte und der Heteroduplexbildung unterzogene Probe keine Heterozygotie, so zeigt sich bei allen Temperaturen nur ein Peak.

2.3.2 Etablierung der dHPLC-Parameter

Um die bestmögliche Auftrennung von Homo- und Heteroduplexen zu ermöglichen, müssen Ofentemperatur und AcN-Gradient genau eingestellt werden. Dazu wird die WAVEMAMKER™-Software benutzt: Nach Vorgabe der Basensequenz des entsprechenden Fragments berechnet die Software die Temperatur, die zu partiell denaturierenden Bedingungen führt. In den meisten Fällen wurden zwei verschiedene Säulentemperaturen benötigt, um alle Bereiche des Fragments genau abzudecken.

Der geeignete AcN-Gradient wird ebenfalls über die WAVEMAMKER™-Software festgelegt; er wird gegebenenfalls über die Time-Shift-Einstellung so

angepasst, dass die Elution der Fragmente ca. 1,7 Minuten nach Injektion erfolgt.

Die Optimierung der dHPLC-Parameter wurde mit den Amplifikaten aus der PCR-Etablierung (Ceph-DNA) durchgeführt. Tabelle 2.13 gibt einen Überblick über die etablierten Parameter für jedes PCR-Fragment.

Tab. 2.13
Etablierte Temperaturen und Shift-Einstellungen für die einzelnen PCR-Fragmente

PCR-Fragment	Temperatur 1_Shift	Temperatur 2_Shift	Temperatur 3_Shift
3	58,3°C_+0,3		
4	54,5°C_-0,4	57,5°C_+0,35	
5	54,0°C_-0,5	56,0°C_-0,3	
6	55,0°C_-0,35	57,0°C_-0,3	
7	52,0°C_-0,5	61,0°C_-0,5	
8	56,0°C_+0,1		
9	58,8°C_+0,25		
10	54,0°C_+0,2	57,0°C_+1,0	
11	55,8°C_+0,2	57,5°C_+0,6	
12	58,3°C_-0,15	60,3°C	
13	55,5°C_-0,4		
14	56,5°C_+0,1	58,5°C_+0,25	
15	54,5°C_-0,1	56,0°C_+0,1	
16	57,5°C_-0,35		
17	57,0°C_+0,4		
18	43,0°C_-0,25	50,0°C_-0,45	56,5°C_-0,35
19	55,2°C_-0,25	57,0°C_+0,2	
20	53,0°C_-0,5	55,0°C_-0,45	
21	54,5°C		
22	55,0°C_+0,3	57,0°C_+0,6	
23	55,5°C_-0,15		
24	52,8°C_-0,4	56,0°C_+0,4	
25	56,0°C_-0,2		
26	54,0°C_-0,4	58,5°C_+0,1	

2.3.3 Auswertung der Elutionsprofile

Enthält ein durch dHPLC überprüfetes Amplifikat eine Heterozygotie, lässt sich das zugehörige Elutionsprofil leicht von dem eines Wildtyps unterscheiden: Idealerweise zeigen sich vier Peaks, meistens jedoch nur zwei bis drei.

Dies liegt daran, dass die Auflösung aller vier Peaks nur bei einer sehr spezifischen Temperatur, die vom spezifischen Nukleotid-Mismatch sowie dem Schmelzverhalten der umliegenden Basen abhängt, gelingt. Da jedoch die Analysetemperatur nach dem Schmelzverhalten der gesamten Sequenz ausgewählt wird, ist diese weniger genau.

Bei einigen Elutionsprofilen war ein „Vorpeak“ oder eine Schulter, d.h. eine Erhöhung des Signals vor dem eigentlichen Peak zu erkennen. Kommen diese Vorpeaks bei allen Elutionsprofilen vor, handelt es sich am ehesten um eine Verunreinigung, beispielsweise um PCR-Artefakte durch Fehler der Polymerase oder um Primer-Dimere. Diese Form der Vorpeaks kommt sehr häufig vor.

Eine eher unwahrscheinliche aber dennoch nicht außer Acht zu lassende andere Möglichkeit ist ein Heteroduplex-Peak bei unspezifischer Analysetemperatur, die zu einer schlechten Auflösung des Doppelpeaks führt, so dass dieser als Schulter imponieren kann.

Zeigte das Elutionsprofil einer gepoolten Probe ein Muster, das auf eine Variante hinwies (z.B. Doppelpeak), wurden die beiden zugehörigen Proben einzeln durch dHPLC analysiert, um zu klären, welche der beiden die Auffälligkeit zeigte. In den meisten Fällen wies eine Probe einen Einzelpeak (Wildtyp), die andere einen Doppelpeak (Variante) auf; dies weist am ehesten auf eine heterozygote Position hin.

Falls beide Proben Einzelpeaks zeigten, wurde die Retentionszeit verglichen, da eine vom Wildtyp abweichende Retentionszeit ein Hinweis für eine homozygote Veränderung sein kann.

Proben mit ähnlichem Elutionsprofil wurden in Gruppen zusammengefasst, da nachgewiesen wurde, dass ein und dieselbe Sequenzvariante in der Regel nur

ein Elutionsprofil hervorbringt (O'Donovan et al., 1998; Gross et al., 2000). Bei großer Gruppenszahl wurden einige Vertreter, ansonsten alle auffälligen Einzelproben sequenziert.

2.3.4 Material

2.3.4.1 Reagenzien

Tab. 2.14
Verwendete Reagenzien für die Mutationsanalyse
 Reagenzien und Hersteller

Reagenz	Firma
Acetonitril	Merck, Darmstadt
ddH ₂ O, 18,2 MΩ	Millipore, Eschborn
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomic, Crewe (UK)
WAVE Mutationsstandard 56°C	Transgenomic, Crewe (UK)
WAVE Mutationsstandard 70°C	Transgenomic, Crewe (UK)

2.3.4.2 Herstellung und Verwendung der dHPLC-spezifischen Lösungen

Tab. 2.15
Zusammensetzung der dHPLC-spezifischen Lösungen

	Puffer A	Puffer B	Puffer C (75% AcN)	Puffer D (8% AcN)
Acetonitril	250 µl	250 ml	750 ml	80 ml
TEAA	50 ml	50 ml	-	-
ddH ₂ O, 18,2 MΩ	ad 1 l	ad 1 l	ad 1 l	ad 1 l

Alle Komponenten der einzelnen Lösungen werden in 1 l-Glasflaschen vorgelegt, kräftig durchmischt und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Verwendung der Lösungen:

Puffer A+B

- Transport- und Spülmedium
- im Ruhezustand Mischverhältnis 50:50, Fließrate 0,05 ml/min
- bei den Messungen Mischverhältnis entsprechend dem AcN-Gradienten, Fließrate 1,5 ml/min

Puffer C

- Durchspülen des Systems nach jeweils 100 Injektionen, um Kontamination und Ablagerungen zu vermeiden
- „Hot Wash Reverse“: spezielle Reinigung der Säule

Puffer D

- kurzer Reinigungsschritt zwischen den Injektionen (Spülen der Nadel)

2.3.4.3 Geräte

Tab. 2.16
Verwendete Geräte für die Mutationsanalyse
 Geräte und Hersteller

Gerät	Firma
WAVE [®] DNA Fragment Analysis System	Transgenomic, Crewe (UK)
Milli-Q	Millipore, Eschborn

2.4 Zyklische Sequenzierung

2.4.1 Grundprinzip

Die Sequenzierung erlaubt die Analyse der Basenabfolge eines DNA-Fragments. Sie ermöglicht somit die Erkennung von Varianten, indem sequenzierte Genabschnitte mit der Wildtypsequenz verglichen werden.

Die zyklische Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977), auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotid-Verfahren bekannte Methode setzt das Vorliegen eines aufgereinigten DNA-Fragments (üblicherweise eines PCR-Produktes) voraus. Die im Ansatz vorliegende DNA (PCR-Produkt) wird denaturiert, so dass ein DNA-Einzelstrang vorliegt. Danach erfolgt am 3'-Ende des PCR-Produkts die komplementäre Hybridisierung des Sequenzier-Primers und von dort aus die Synthese eines komplementären Stranges durch die Taq-Polymerase. Im Gegensatz zur PCR enthält der Ansatz nur diesen einen Primer (lineare Amplifikation) und neben den vier dNTPs zusätzlich ddNTPs (2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate), die jeweils an ein unterschiedliches Fluorochrom gekoppelt sind. Die dNTPs und die ddNTPs werden durch die Polymerase per Zufall in den komplementären Strang eingebaut. Wenn ein ddNTP eingebaut wird, kommt es zum Kettenabbruch, weil keine freie 3'-Hydroxygruppe zur Bildung einer Phosphodiester-Brücke mit dem nächsten einzubauenden dNTP mehr vorhanden ist. Somit enthält der Ansatz schließlich Fragmente unterschiedlicher Länge mit dem Primer am 5'-Ende und mit einem Fluorochrom-markierten ddNTP am 3'-Ende.

Der Ansatz wird aufgereinigt und die neu entstandenen Sequenzierfragmente durch Kapillar-Elektrophorese analysiert: Die Fragmente durchlaufen im elektrischen Feld ein Gel in einer Glaskapillare, wo sie der Länge nach aufgetrennt werden. Am Ende der Auftrennstrecke werden die Fluorochrom-gekoppelten ddNTPs durch einen Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt. Die gemessenen Emissionen werden als farbstoffspezifisches und somit

basenspezifisches Intensitätsprofil dargestellt, aus dem die DNA-Sequenz abgelesen werden kann (Abb. 2.13).

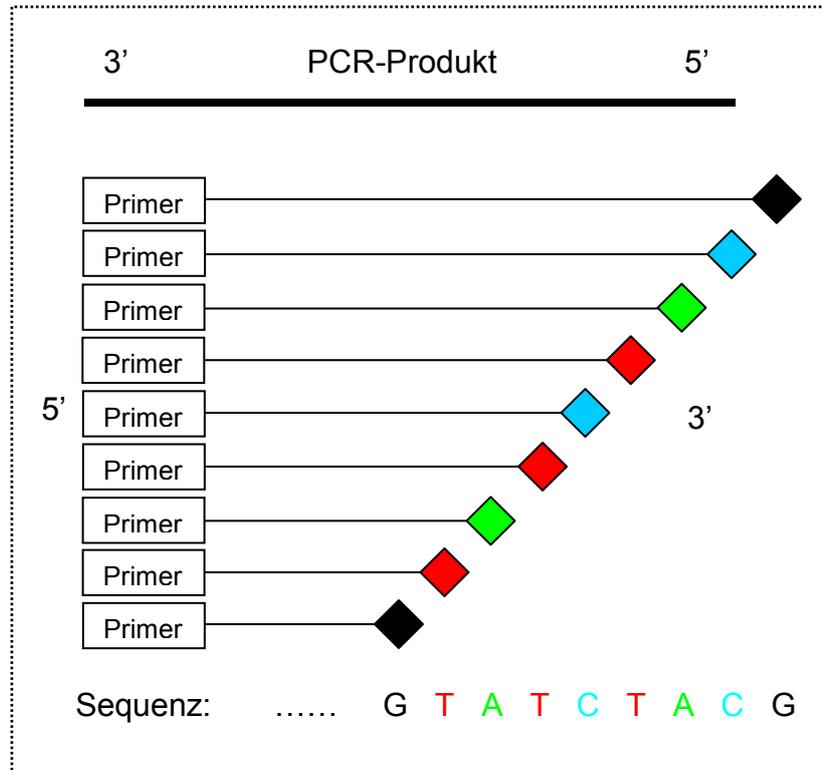


Abb. 2.13

Schematische Darstellung der Sequenzierung

Die Primer hybridisieren am 3'-Ende des PCR-Produkts. Wird ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP (durch farbige Rauten dargestellt) eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch. Die einzelnen Fragmente werden der Länge nach aufgetrennt; danach werden die Fluorochrom-gekoppelten ddNTPs zur Fluoreszenz angeregt, wodurch die DNA-Sequenz abgelesen werden kann.

2.4.2 Material

2.4.2.1 Reagenzien

Tab. 2.17

Verwendete Reagenzien für die Sequenzierung

Reagenzien und Hersteller

*Es wurden dieselben Primer wie für die PCR verwendet, ebenfalls 1:10 verdünnt (Kap. 2.1.2.2); jedoch wurde immer nur ein Primer (F oder R) eingesetzt.

Reagenz	Firma
AMPure® Volume	Agencourt® Bioscience Corporation
CleanSEQ	Agencourt® Bioscience Corporation
Ethanol	Merck, Darmstadt
Genome Lab [™] DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing) Quick Start Master Mix	Beckman Coulter®, Unterschleissheim-Lohdorf
Genome Lab [™] Sample Loading Solution	Beckman Coulter®, Unterschleissheim-Lohdorf
Genome Lab [™] Separation Buffer	Beckman Coulter®, Unterschleissheim-Lohdorf
Mineral Oil	Beckman Coulter®, Unterschleissheim-Lohdorf
Primer *, 100 pmol/µl	Metabion international AG, Martinsried

2.4.2.2 Geräte

Tab. 2.18

Verwendete Geräte für die Sequenzierung

Geräte und Hersteller

Gerät	Firma
CEQ 8000 Kapillar-Sequencer	Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohdorf
GeneAmp® PCR System 9700	Perkin Elmer, Weiterstadt

2.4.3 Durchführung der Sequenzierung

Vor der Sequenzierreaktion wurden die Amplifikate aus der entsprechenden PCR nach folgendem Schema aufgereinigt:

Aufreinigung (1)

- Zugabe von 36 μl AMPure zum 25 μl -PCR-Ansatz, mischen
- 5 min stehen lassen
- 10 min auf Magnetplatte stehen lassen
- Überstand abpipettieren
- 2x mit je 200 μl 70% Ethanol waschen
- 10-20 min trocknen lassen
- in 40 μl ddH₂O eluieren

Nach der Aufreinigung wurden 5 μl des Eluats auf ein Gel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die im Ansatz enthaltene Amplifikatmenge und somit das in die Sequenzierreaktion einzusetzende Volumen (zwischen 0,5 und 5 μl) abzuschätzen.

Der Ansatz für die Sequenzierreaktion (Endvolumen 10 μl) wurde folgendermaßen angesetzt (Tab. 2.19):

Tab. 2.19
Standard-Zusammensetzung der Sequenzier-Ansätze

Komponenten	Volumen [μl]
Primer (F oder R, 10 pmol/ μl)	2
aufgereinigtes Amplifikat	0,5 – 5,0
DTCS Quick Start Master Mix	1,5
ddH ₂ O	ad 10

Wasser, Amplifikat und Primer wurden auf Eis vorgelegt und gevortext, danach der Master Mix zupipettiert, kurz zentrifugiert und die Sequenzierreaktion mit folgenden Bedingungen im Thermocycler (ABI9700; Laufmodus 9600) gestartet (Tab. 2.20):

Tab. 2.20

Standard-Schema der Sequenzier-Reaktion

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	90 s	1
Denaturierung	96°C	20 s	30
Annealing	57°C	20 s	
Elongation	60°C	60 s	
Kühlen	10°C	∞	1

Nach der Sequenzierreaktion wurde nochmals aufgereinigt, um die Sequenzierprodukte von restlichen Primern, dNTPs und überschüssigen Komponenten aus dem DTCS Quick Start Master Mix zu befreien. Hierbei musste darauf geachtet werden, die Sequenzierprodukte nicht zu lange dem Licht auszusetzen, weil die ddNTP-gekoppelten Fluorochrome durch Licht zerstört werden.

Aufreinigung (2)

- Zugabe von 10 µl CleanSEQ
- Zugabe von 42 µl 85% Ethanol, mischen
- 3 min auf Magnetplatte stehen lassen
- Überstand abpipettieren
- 1x mit 100 µl 85% Ethanol waschen
- maximal 10 min im Dunklen trocknen lassen
- in 40 µl Sample Loading Solution eluieren
- 5 min stehen lassen

Danach wurden die Proben in die Sequenzierplatte überführt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um Verdunstung zu vermeiden.

Sequenziert wurde im CEQ 8000 Kapillar-Sequencer von Beckman Coulter unter folgenden Bedingungen: Die Denaturierung erfolgte für 120 s bei 90°C. Die Kapillartemperatur betrug 50°C, die Injektion dauerte 15 s bei 2,0 kV, schließlich folgte die Separierung für 85 min bei 4,2 kV.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisübersicht

Beim Screening der 24 PCR-Fragmente von ITCH wurden vier exonische und acht verschiedene intronische Sequenzvarianten detektiert (Tab. 3.1). 13 PCR-Fragmente zeigten keine Auffälligkeiten. Exon 1 und 2 wurden nicht untersucht, da sie keine kodierenden Abschnitte enthalten (5' untranslatierte Region).

Tab. 3.1

Übersicht über die Screening-Ergebnisse der einzelnen PCR-Fragmente

Häufigkeit im Patientenkollektiv, Lage der Sequenzvariante, Probennummer und Beschreibung

PCR-Fragment	Häufigkeit der auffälligen Proben von 286	Lage	Probennummer	Beschreibung
3	3	Intron	021724	?
			030064	IVS2–33delT
			539	
4	1	Exon	030053	c.83A>G, p.K28R (homozygot)
5	1	Exon	217	c.246T>C, p.R82R
8	1	Intron	208	IVS8+89delA
9	1	Intron	355	?
10	1	Intron	571	IVS10+54A>G
11	3	Intron	054040	IVS10–49C>T
			572	
			354	IVS10–28T>C
13	122	Intron	020828 u.a.	IVS13+51C>T (homozygot)
13	4	Exon	203 **	c.1269A>G, p.Q423Q **zusätzlich im Intron IVS13+51C>T
			539	
			213 **	
			574	
21	1	Exon	547	c.2119G>A, p.V707I
23	1	Intron	030473	IVS22–4A>G
26	1	Intron	239	IVS26+47T>A

3.2 Exonische Sequenzvarianten

Die Ergebnisse werden in diesem Kapitel nach ihrer Wichtigkeit geordnet, wobei für die einzelnen Exone jeweils direkt nacheinander die dHPLC-Elutionsprofile, das Sequenzierergebnis und der Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt werden, um eine bessere Übersichtlichkeit der Ergebnisse zu erreichen.

3.2.1 Die Variante c.83A>G, p.K28R in Exon 4

3.2.1.1 Mutationsanalyse (dHPLC)

Bei der Analyse des PCR-Fragments 4 zeigte sich am dHPLC ein auffälliges Elutionsprofil einer Probe (Pool aus Probe 030053 und 031785) sowohl bei 54,5°C als auch bei 57,5°C (Abb. 3.1).

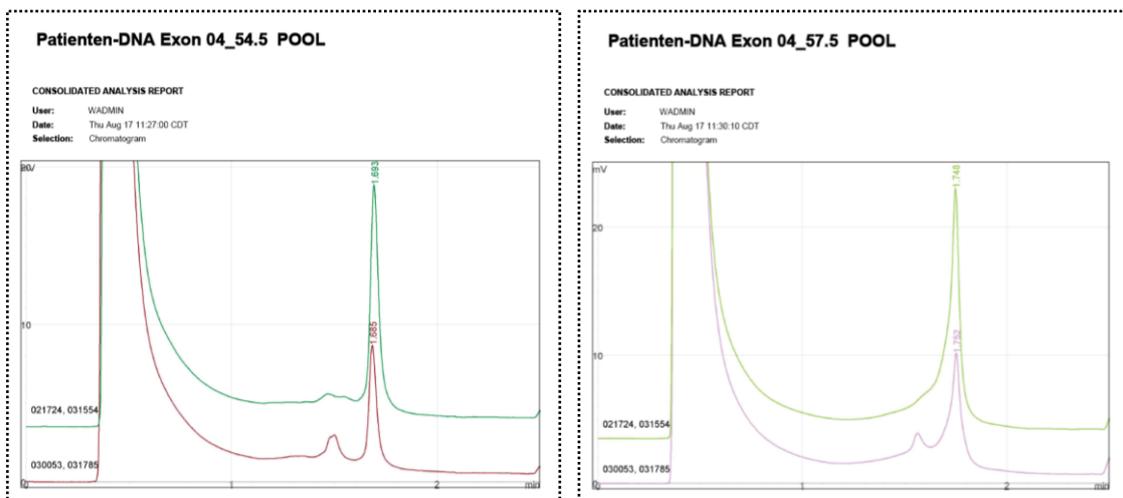


Abb. 3.1

Analyse der Pools bei 54,5°C (links) und bei 57,5°C (rechts):

oben jeweils das unauffällige Elutionsprofil, unten jeweils das auffällige Elutionsprofil

Da bei 54,5°C das Elutionsprofil durch die bessere Auftrennung des Doppelpeaks einfacher als auffällig zu bewerten war als bei 57,5°C, wurden die beiden zugehörigen Proben bei dieser Temperatur einzeln analysiert. Probe 030053 zeigte wiederum ein auffälliges Profil (Abb. 3.2) und wurde sequenziert (siehe Kapitel 3.2.1.2), Probe 031785 war unauffällig.

ERGEBNISSE

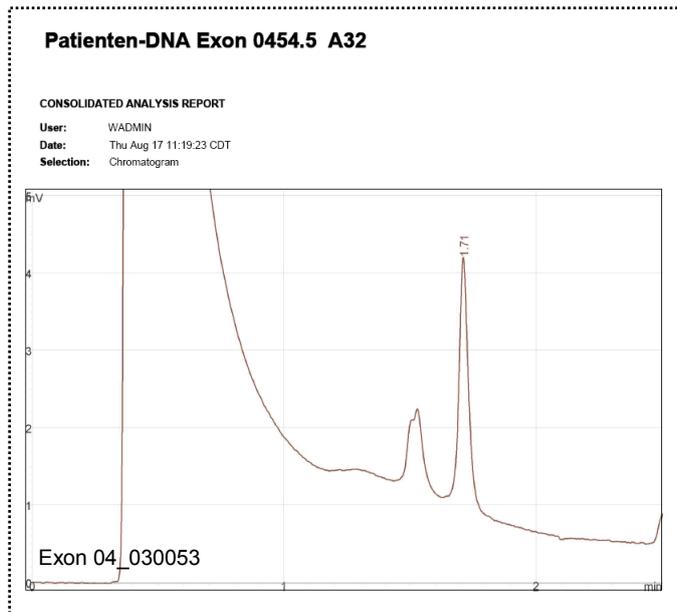


Abb. 3.2
Analyse der Probe 030053 bei 54,5°C:
auffälliges Elutionsprofil

3.2.1.2 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung zeigte Probe 030053 im Vergleich zum Wildtyp (Ceph 88415, Abb. 3.3 rechts) sowohl bei der forward- als auch bei der reverse-Sequenzierung an Position 83 eine homozygote Sequenzvariante mit einem Basenaustausch von A nach G (Abb. 3.3 links und Mitte, siehe auch Alignment Report, Abb. 3.4). Diese Variante bewirkt im zugehörigen Protein einen Aminosäurenaustausch von Lysin nach Arginin (c.83A>G, p.K28R).

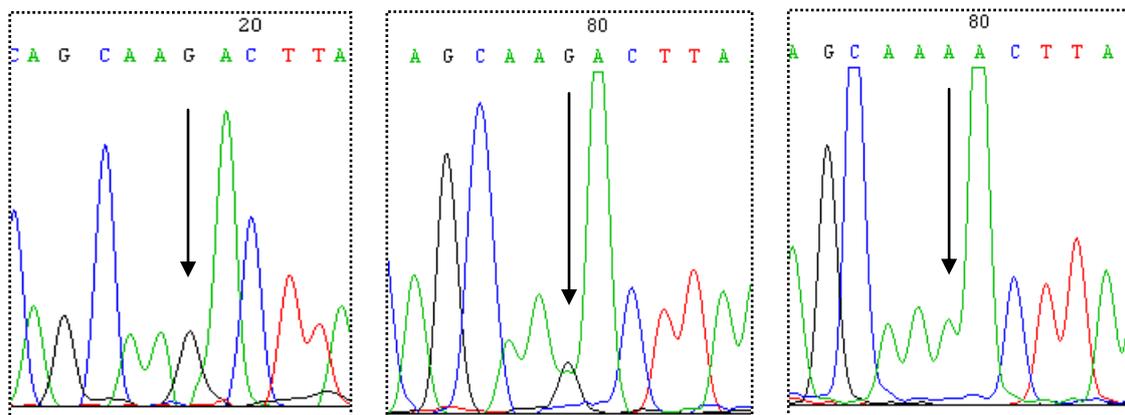


Abb. 3.3
Chromatogramm der Probe 030053, Exon 4, forward Sequenzierung (links)
Chromatogramm der Probe 030053, Exon 4, reverse Sequenzierung (Mitte)
Chromatogramm der Ceph 88415, Exon 4, reverse Sequenzierung (rechts)
Die durch die Sequenzvariante betroffene Position ist durch Pfeile markiert.

ERGEBNISSE

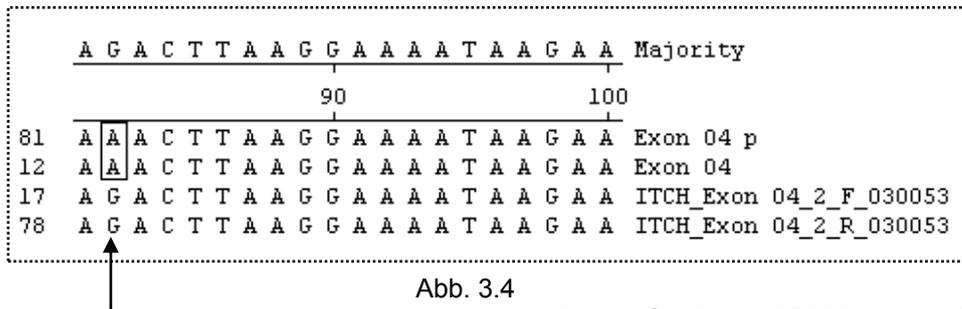


Abb. 3.4

Alignment Report für Probe 030053, Exon 4

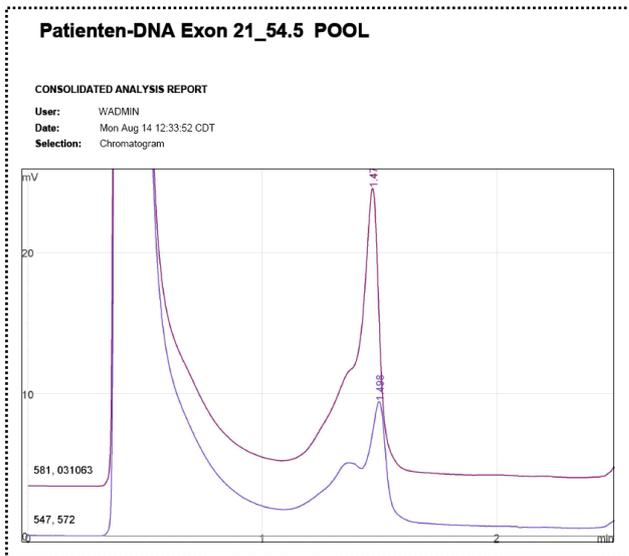
3.2.1.3 Kontrollgruppe (“old people”)

In der Kontrollgruppe wurden bei der Mutationsanalyse des PCR-Fragments 4 am dHPLC ein auffälliges Elutionsprofil gefunden. Bei der Sequenzierung zeigte sich eine intronische heterozygote Sequenzvariante (IVS3–50A>T), die im Patientenkollektiv nicht vorkam. Elutionsprofil und Chromatogramm finden sich im Anhang (siehe Kapitel 7.1).

Die bei Probe 030053 gefundene exonische Sequenzvariante kam in der Kontrollgruppe nicht vor.

3.2.2 Die Variante c.2119G>A, p.V707I in Exon 21

3.2.2.1 Mutationsanalyse (dHPLC)



Bei der Analyse von PCR-Fragment 21 im dHPLC zeigte der Pool aus Probe 547 und 572 bei 54,5°C ein auffälliges Elutionsprofil (Abb. 3.5). Nach den Einzelinjektionen beider Proben konnte aufgrund der sehr ähnlichen Elutionsprofile (Abb. 3.6) keine exakte Entscheidung darüber getroffen werden,

Abb. 3.5
Analyse der Pools bei 54,5°C: oben unauffälliges Elutionsprofil, unten auffälliges Elutionsprofil

welche der beiden Proben die auffällige war. Vermutet wurde wegen der etwas prominenteren Schulter am ehesten Probe 547 – was sich bei der Sequenzierung auch bestätigte (siehe Kapitel 3.2.2.2) - dennoch wurden zur Sicherheit beide Proben sequenziert.

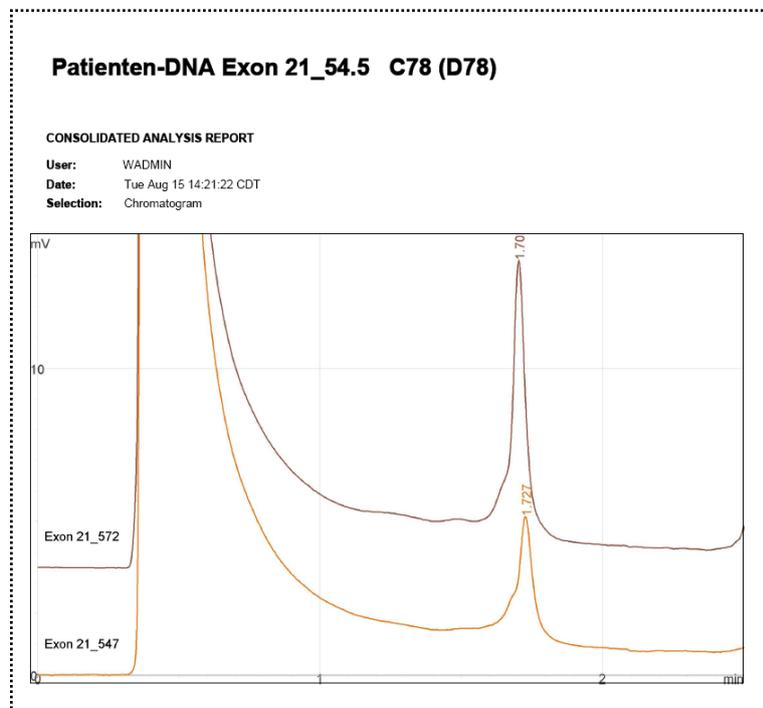


Abb. 3.6
Analyse der Proben 547 und 572 bei 54,5°C: keine Aussage möglich, welches der beiden Elutionsprofile das auffällige ist

3.2.2.2 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung war Probe 572 unauffällig.

Bei der Probe 547 fand sich im Vergleich zum Wildtyp (Ceph 136206, Abb. 3.7 rechts) an Position 2119 eine heterozygote Sequenzvariante mit einem Basenaustausch von G nach A (Abb. 3.7 links, siehe auch Alignment Report, Abb. 3.8). Diese Variante bewirkt im Protein einen Aminosäureaustausch von Valin nach Isoleucin (c.2119G>A, p.V707I).

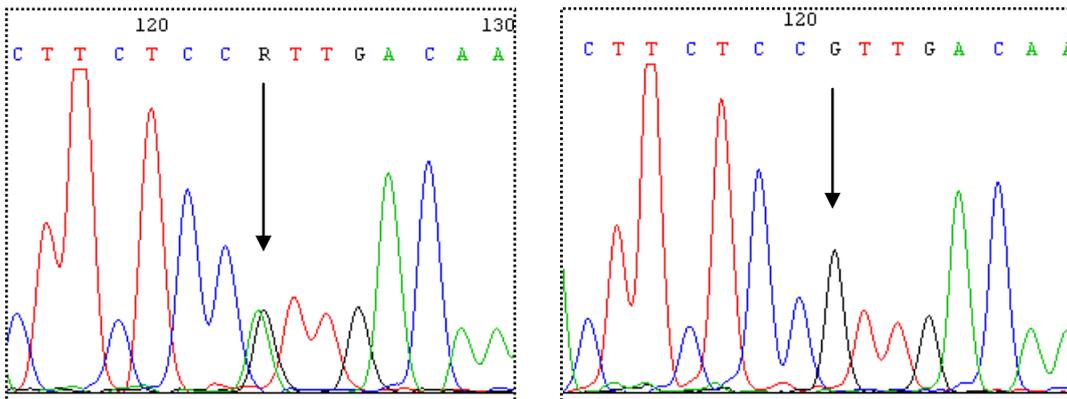


Abb. 3.7

Chromatogramm der Probe 547, Exon 21, forward Sequenzierung (links)
Chromatogramm der Ceph 136206, Exon 21, reverse Sequenzierung (rechts)
 Die durch die Sequenzvariante betroffene Position ist durch Pfeile markiert.

	T	A	C	T	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	C	A	A	A	G	A	Majority
121	T	A	C	T	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	C	A	A	A	G	A	Exon 21 p
35	T	A	C	T	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	C	A	A	A	G	A	Exon 21
34	T	A	C	T	T	C	T	C	C	R	T	T	G	A	C	A	A	A	G	A	ITCH Exon 21 2 F 547

Abb. 3.8

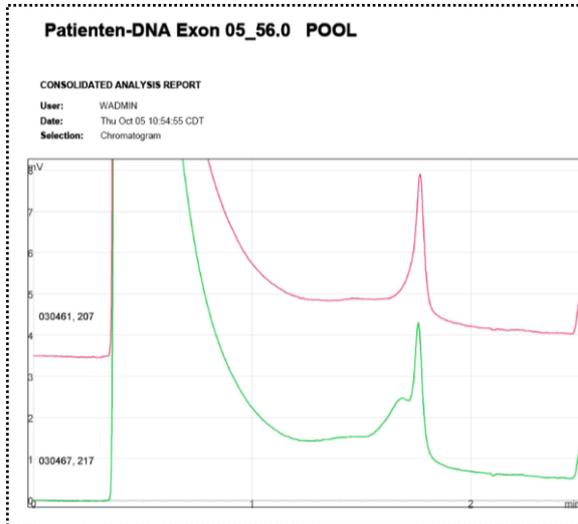
Alignment Report für Probe 547, Exon 21

3.2.2.3 Kontrollgruppe (“old people”)

In der Kontrollgruppe wurden bei der Mutationsanalyse des PCR-Fragments 21 am dHPLC keine auffälligen Elutionsprofile gefunden.

3.2.3 Die Variante c.246T>C, p.R82R in Exon 5

3.2.3.1 Mutationsanalyse (dHPLC)



Bei der Analyse von PCR-Fragment 5 am dHPLC fiel bei 56,0°C bei einer gepoolten Probe ein verändertes Elutionsprofil auf (Abb. 3.9), also wurden die Proben 030467 und 217 einzeln analysiert. Probe 217 zeigte dabei ein auffälliges Elutionsprofil (Abb. 3.10) und wurde sequenziert, Probe 030467 war unauffällig.

Abb. 3.9
Analyse der Pools bei 56,0°C:
 oben unauffälliges Elutionsprofil, unten
 auffälliges Elutionsprofil

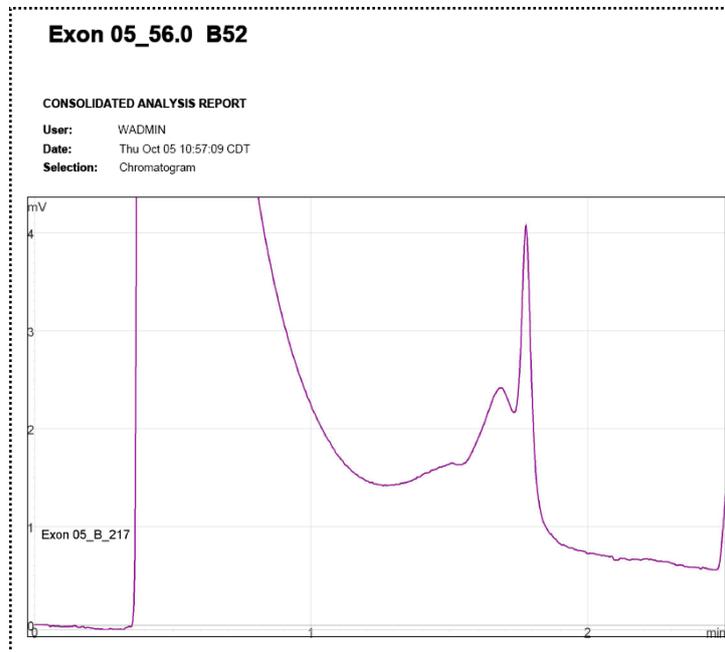


Abb. 3.10
Analyse der Probe 217 bei 56,0°C:
 auffälliges Elutionsprofil

3.2.3.2 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung der Probe 217 wurde im Vergleich zum Wildtyp (Ceph 88415, Abb. 3.11 rechts) an Position 246 eine heterozygote Sequenzvariante mit einem Basenaustausch von T nach C nachgewiesen (Abb. 3.11 links, siehe auch Alignment Report, Abb. 3.12). Es handelt sich hierbei um eine sog. stille Variante, die im Protein keinen Aminosäureaustausch bewirkt (c.246T>C, p.R82R).

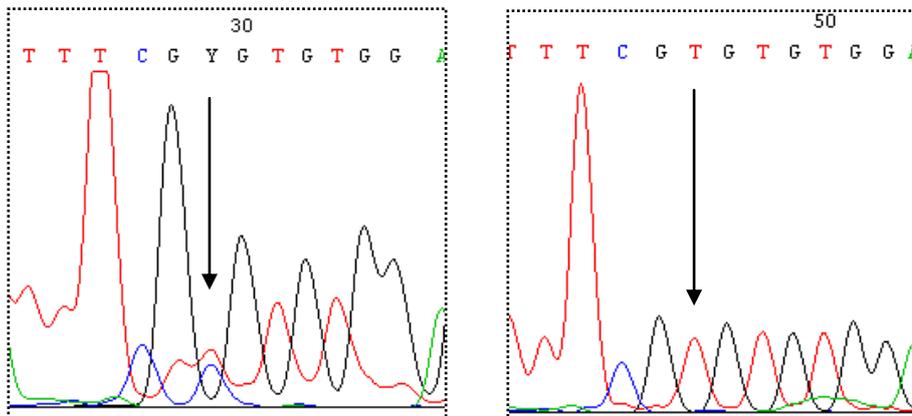


Abb. 3.11

Chromatogramm der Probe 217, Exon 5, reverse Sequenzierung (links)

Chromatogramm der Ceph 88415, Exon 5, reverse Sequenzierung (rechts)

Die durch die Sequenzvariante betroffene Position ist durch Pfeile markiert.

	T	T	T	C	G	T	G	T	G	T	G	G	A	G	T	C	A	C	C	A	Majority		
											50											60	
41	T	T	T	C	G	T	G	T	G	T	G	G	A	G	T	C	A	C	C	A	Exon 05 p		
29	T	T	T	C	G	T	G	T	G	T	G	G	A	G	T	C	A	C	C	A	Exon 05		
25	T	T	[-]	C	G	[Y]	G	T	G	T	G	G	A	G	T	C	A	C	C	A	ITCH_Exon 05 R_217		

Abb. 3.12

Alignment Report für Probe 217, Exon 5

3.2.3.3 Kontrollgruppe (“old people”)

In der Kontrollgruppe wurden bei der Mutationsanalyse des PCR-Fragments 5 am dHPLC keine auffälligen Elutionsprofile gefunden.

3.2.4 Die Variante c.1269A>G, p.Q423Q in Exon 13

3.2.4.1 Mutationsanalyse (dHPLC)

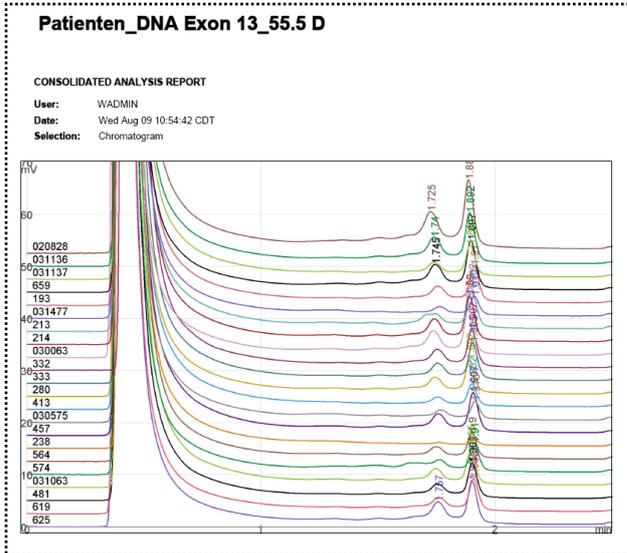


Abb. 3.13
Analyse der Einzelproben bei 55,5°C: auffällige Elutionsprofile

Bei PCR-Fragment 13 zeigten fast alle Patientenproben bei 55,5°C ein auffälliges Elutionsprofil, deswegen wurden alle Proben einzeln injiziert. Bei den Einzelinjektionen waren 122 von 286 Proben auffällig (Abb. 3.13), vier davon zeigten ein geringfügig anderes Profil als die restlichen Proben, wobei die Proben 203 und 213 und die Proben 539 und 574 jeweils ähnlich aussahen (Abb. 3.14). Diese vier und einige Vertreter der 122 auffälligen Proben wurden sequenziert.

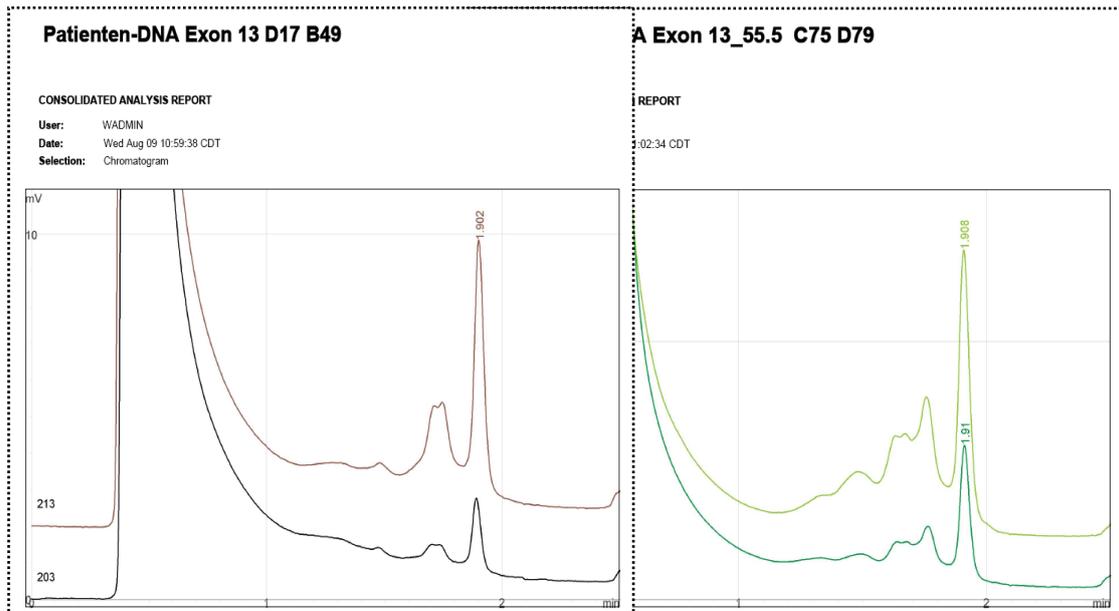


Abb. 3.14
Analyse der Proben 203 und 213 bei 55,5°C: auffällige Elutionsprofile (links)
Analyse der Proben 539 und 574 bei 55,5°C: auffällige Elutionsprofile (rechts)

3.2.4.2 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung der Proben 203, 213, 539 und 574 fand sich im Vergleich zum Wildtyp (Ceph 136206, Abb. 3.15 rechts) eine heterozygote Sequenzvariante mit einem Basenaustausch von A nach G an Position 1269 (Abb. 3.15 links und Alignment Report, Abb. 3.16). Es handelt sich hierbei um eine stille Variante ohne Aminosäurenaustausch (c.1269A>G, p.Q423Q).

Die Variante wird hier an Probe 574 exemplarisch für alle vier Proben dargestellt, die übrigen Elutionsprofile und Chromatogramme finden sich im Anhang (siehe Kapitel 7.2).

Bei den Proben 203 und 213 lag außerdem eine intronische Sequenzvariante vor, was das veränderte Elutionsprofil im Vergleich zu den Proben 539 und 574 erklärt (Abb. 3.14). Dieselbe intronische Variante zeigte sich auch bei den sequenzierten Vertretern der 122 übrigen auffälligen Proben (siehe Kapitel 3.3 und Anhang).

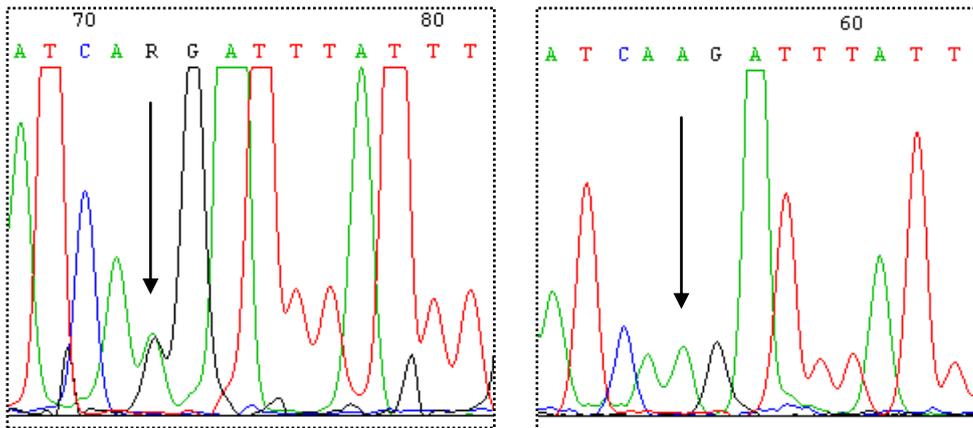


Abb. 3.15

Chromatogramm der Probe 574, Exon 13, forward Sequenzierung (links)

Chromatogramm der Ceph 136206, Exon 13, forward Sequenzierung (rechts)

Die durch die Sequenzvariante betroffene Position ist durch Pfeile markiert.

	T	C	A	A	G	A	T	T	T	A	T	T	T	G	C	T	A	C	A	T	Majority
100	T	C	A	A	G	A	T	T	T	A	T	T	T	G	C	T	A	C	A	T	Exon 13 p
3	T	C	A	A	G	A	T	T	T	A	T	T	T	G	C	T	A	C	A	T	Exon 13
69	T	C	A	R	G	A	T	T	T	A	T	T	T	G	C	T	A	C	A	T	ITCH_Exon 13F_574

Abb. 3.16

Alignment Report für Probe 574, Exon 13

3.2.4.3 Kontrollgruppe (“old people”)

In der Kontrollgruppe kam die bei den Patienten gefundene exonische Sequenzvariante bei 12 von 260 Proben vor. 6 dieser Proben zeigten zusätzlich dieselbe intronische Sequenzvariante wie die Patientenproben 203 und 213 (siehe Kapitel 3.3 und Anhang).

3.3 Intronische Sequenzvarianten

Da intronische Sequenzvarianten ohne Einfluss auf Splice-Elemente für dieses Screening keine Rolle spielten, werden die gefundenen Auffälligkeiten hier nur tabellarisch dargestellt (Tab. 3.2), die zugehörigen Elutionsprofile und Chromatogramme finden sich im Anhang (siehe Kapitel 7.3). Außerdem wurden die gefundenen Varianten – ebenfalls aus o.g. Grund – nicht in der Kontrollgruppe überprüft.

Tab. 3.2

Übersicht über die intronischen Sequenzvarianten in ITCH

Lage der Sequenzvariante, Häufigkeit im Patientenkollektiv, Probennummer und Beschreibung

Intron	Anzahl von 286	Probennummer	Beschreibung
2	2	539	IVS2–33delT
		030064	
2 / 3	1	021724	?
8	1	208	IVS8+89delA
8 / 9	1	355	?
10	4	054040	IVS10–49C>T
		572	
		354	IVS10–28T>C
		571	IVS10+54A>G
13	122	020828 u.a.	IVS13+51C>T (homozygot)
22	1	030473	IVS22–4A>G
26	1	239	IVS26+47T>A

4 DISKUSSION

4.1. Einordnung des Projekts

Morbus Parkinson ist eine altersassoziierte progressive neurodegenerative Erkrankung, bei der in erster Linie die Basalganglien betroffen sind. Die typischen Symptome wie Tremor, Rigor und Akinese sowie die Neuropathologie (Nachweis von Lewy-Körperchen) sind schon lange bekannt, die Ätiologie dagegen ist nach wie vor nicht aufgeklärt. Auch eine kausale Therapie existiert noch nicht, weswegen die Erkrankung bis heute nicht heilbar ist.

Es wird angenommen, dass Morbus Parkinson durch eine Vielzahl von Faktoren, die komplex zusammenspielen, ausgelöst wird. Dazu zählen neben Alter und Geschlecht vor allem Umweltfaktoren, mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, genetische Faktoren und Fehlfunktion des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (UPS). Das UPS ist ein wichtiges System zur ubiquitinabhängigen Markierung und Degradation von Proteinen im Proteasom, wobei E3-Ligasen eine entscheidende Rolle spielen.

Ebenso wie Parkin, für das viele parkinsonspezifische Mutationen detektiert wurden, ist auch Itch eine E3-Ubiquitin-Ligase. Vor diesem Hintergrund wurde ITCH im Rahmen des vorliegenden Projekts erstmals einem Mutationsscreening an Parkinson-Patienten unterzogen.

Für dieses Screening wurden die 26 Exone von ITCH aus DNA-Proben von 286 Parkinson-Patienten zunächst mittels PCR vervielfältigt, per Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und danach mithilfe der dHPLC (denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, WAVE[®]) auf Sequenzvarianten gescreent. Am WAVE[®] auffällige Proben wurden sequenziert und mit der Referenzsequenz von ITCH verglichen. Die detektierten exonischen Auffälligkeiten wurden in einer Kontrollgruppe von 260 Proben nach dem gleichen Schema überprüft.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Patienten- und Kontrollkollektiv

Die für das Screening von ITCH verwendeten 286 Proben stammten von Parkinson-Patienten mit klinisch gesicherter Diagnose, wohingegen bei den 260 Proben des Kontrollkollektivs („old people“) aufgrund des hohen Alters und des familiären Hintergrunds der Probanden anzunehmen ist, dass eine spätere Erkrankung an Morbus Parkinson eher unwahrscheinlich, aber nicht hundertprozentig auszuschließen ist.

Sollte ein Auswahlfehler vorliegen, wird er somit vermutlich im Kontrollkollektiv zu finden sein – wenn nämlich ein Proband vor seiner möglichen späteren Erkrankung ins Kollektiv aufgenommen wurde. Sämtliche dort gefundenen Varianten sollten also genau überprüft und kritisch beurteilt werden.

Die Studiengröße von 286 Patienten und 260 Kontrollen sowie die Auswahlkriterien der Patienten und Kontrollen lassen auf eine hohe Trefferquote hoffen und erlauben eine repräsentative Auswertung der Ergebnisse.

4.2.2 Mutationsscreening

Die für das Mutationsscreening von ITCH eingesetzte Kombination aus PCR und Heteroduplexanalysen mittels denaturierender Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (dHPLC) bietet gegenüber anderen Detektionsmethoden wie SSCP (single-stranded conformation polymorphism) oder alleiniger Sequenzierung viele Vorteile: Eine große Probenanzahl kann schnell, automatisiert und kostengünstig mit hoher Sensitivität und Spezifität auf SNPs, Mutationen und kleine Insertionen oder Deletionen gescreent werden. Sensitivität und Spezifität der dHPLC übersteigen 96% (Xiao & Oefner, 2001),

somit ist anzunehmen, dass alle relevanten Sequenzvarianten detektiert wurden.

Bei zwei Proben mit auffälligem Elutionsprofil ergab die Sequenzierung keine Sequenzvariante (falsch positive Ergebnisse) (siehe Anhang). Möglicherweise liegen die beiden Varianten im Randbereich der PCR-Fragmente, wo die Sequenzierqualität nicht ausreichend ist. Würde eine erneute Sequenzierung mit weiter außen liegenden Primern durchgeführt, ließen sich die Varianten sicher detektieren. Da aber intronische Sequenzvarianten für dieses Screening keine Rolle spielten, wurde darauf verzichtet.

Des Weiteren ist es relativ unwahrscheinlich, dass homozygote Varianten übersehen wurden (falsch negative Ergebnisse): Zum einen sinkt diese Wahrscheinlichkeit durch das Poolen und die anschließende Heteroduplexbildung der Proben, zum anderen wurden in ITCH einige homozygote Sequenzvarianten nachgewiesen, was für die Effizienz dieser Methode spricht.

Denkbare Grenzen der Kombination dHPLC/Sequenzierung sind bei einer Hemizygotie gegeben; d.h. eine ursprünglich heterozygot vorliegende Variante erscheint durch den Verlust eines Allels (allelic drop out einer heterozygoten Deletion) homozygot (siehe Kapitel 4.3.1.1).

Ebenfalls problematisch ist die durch manchmal sehr ähnliche Elutionsprofile bedingte unmögliche Unterscheidung zwischen homo- und heterozygoten Varianten anhand des Elutionsprofils: Die in Intron 13 detektierte homozygote Sequenzvariante (IVS13+51C>T) lag bei 43% der Patienten und 24% der Kontrollpersonen vor, heterozygote Varianten wurden nicht gefunden. Vermutlich war die Analysetemperatur so gewählt, dass homo- und heterozygote Proben ein sehr ähnliches Elutionsprofil zeigten. Da von großen Gruppen nur einige Vertreter sequenziert wurden, wurden viele heterozygote Proben wohl als homozygot deklariert. Wegen der weit intronischen Lage dieser

Variante wurde auf eine weitere Untersuchung jedoch verzichtet (siehe Kapitel 3.3).

4.2.3 Schlussfolgerungen

Da die für das Mutationsscreening von ITCH verwendete DNA von Parkinson-Patienten stammte und sämtliche für dieses Projekt eingesetzten Methoden sorgfältig für ITCH etabliert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die vorliegenden Ergebnisse valide sind.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Beim Screening der 286 Patientenproben mittels dHPLC fanden sich einige auffällige Elutionsprofile.

Bei der Sequenzierung der entsprechenden Proben wurden acht verschiedene intronische, zwei stumme exonische und zwei exonische Sequenzvarianten mit resultierendem Aminosäuren-Austausch detektiert.

Abbildung 4.1 gibt einen Überblick über die Lokalisation der detektierten Sequenzvarianten in ITCH, die Diskussion der einzelnen Ergebnisse erfolgt in den nächsten Abschnitten.

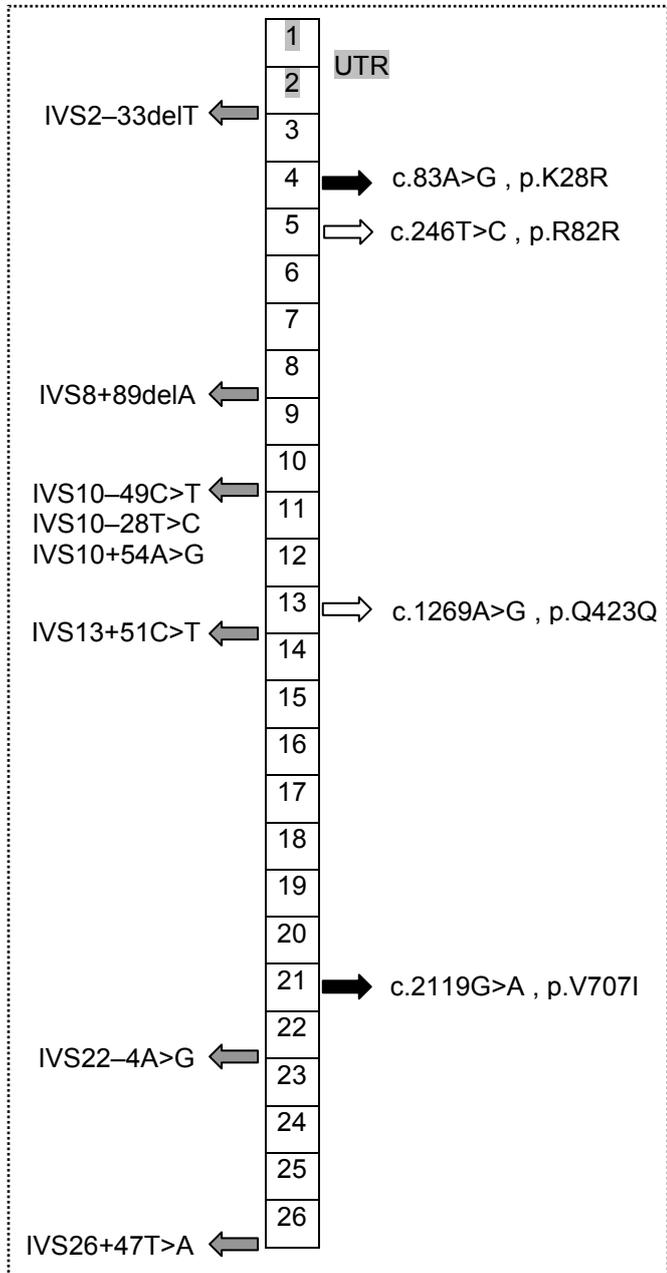


Abb. 4.1
Schematische Darstellung der detektierten Sequenzvarianten innerhalb der 26 Exone von ITCH bei Parkinson-Patienten

- ⇨ Intronische Sequenzvariante
- ⇨ Exonische stumme Sequenzvariante
- ➡ Exonische Sequenzvariante mit AS-Austausch
- UTR** Untranslated Region

4.3.1 Bedeutung der exonischen Sequenzvarianten

4.3.1.1 Die homozygote Variante p.K28R in Exon 4

In Exon 4 wurde an Position 83 ein homozygoter Basenaustausch von Adenin nach Guanin detektiert, der einen Aminosäureaustausch von Lysin nach Arginin bewirkt (c.83A>G, p.K28R). Diese bisher nicht beschriebene Sequenzvariante (Abb. 4.2, vgl. auch Abb. 4.12) liegt in einer konservierten Region (Abb. 4.3), die für die C2-Domäne von Itch kodiert (siehe Kapitel 1.2.2). Mögliche Auswirkungen auf das Protein durch die Bildung neuer Splice-Sites sind eher unwahrscheinlich, da der Splice-Score durch die o.g. Variante nicht verändert wird (<http://www.interactive-biosoftware.com/alamut/doc/splicing.html>).

```

241 TCATCTCAGCAAAACTTAAAGGAAAATAAGAAGAATTGGTTTGGACCAAGTCCTTACGTAG
71 TCATCTCAGCAAAACTTAAAGGAAAATAAGAAGAATTGGTTTGGACCAAGTCCTTACGTAG
24 V--I--S--A--K--L--K--E--N--K--K--N--W--F--G--P--S--P--Y--V--

```

Abb. 4.2

Bekannte Sequenzvarianten in Exon 4

Die erste Zeile enthält die Exons (Farbe der Buchstaben) und Codons (unterschiedlich unterlegt), die zweite die Sequenz, die translatiert wird. In der dritten Zeile findet sich die Aminosäuresequenz. In diesem Abschnitt sind bisher keine SNPs beschrieben (siehe auch Abb. 4.12).

Die Position der in Exon 4 detektierten Sequenzvariante ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Quelle:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/protview?db=core;peptide=ENSP00000262650

	MSDSGSQLGS	MGSLTMKSQL	QITVISAKLK	ENKKNWFGPS	PYVEVTVDGQ
protein_human	MSDSGSQLGS	MGSLTMKSQL	QITVISAKLK	ENKKNWFGPS	PYVEVTVDGQ
protein_Canis_famili	MSGSGSQLGS	MGSLTMKSQL	QITVISAKLK	ENKKNWFGPS	PYVEVTVDGQ
protein_mouse	MGSLTMKSQL	QITVISAKLK	ENKKNWFGPS	PYVEVTVDGQ
protein_mus_musculus	MSDSGPQLDS	MGSLTMKSQL	QITVISAKLK	ENKKNWFGPS	PYVEVTVDGQ
protein_rattus_norve	MGSLTMKSQL	QITVISAKLK	ENKKNWFGPS	PYVEVTVDGQ
protein_Pan_troglody	MSDSGSQLGS	MGSLTMKSQL	QITVISAKLK	ENKKNWFGPS	PYVEVTVDGQ
protein_Gallus_gallu	MAGTGSKSGS	PGGLYMKSQL	QITVISAKLK	EKNK.WFGPS	PYVEVSVDGQ
Consensus	ms.sgsqqlgs	mGsLtMKSQL	QITVISAKLK	EnkKnWFGPS	PYVEVtVDGQ

Abb. 4.3

Vergleich der Proteinsequenzen von Itch in Mensch, Hund, Maus, Ratte, Schimpanse und Huhn

Die in Exon 4 aufgrund der Sequenzvariante ausgetauschte konservierte Aminosäure 28 ist markiert.

Quelle: <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

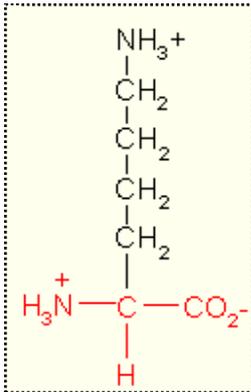


Abb. 4.4
Lysin

Quelle:
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/topics/de/vlu/index.html>

Der Einbau von Arginin (Abb. 4.5) statt Lysin (Abb. 4.4) führt zwar nicht zu einer veränderten Ladung an dieser Stelle, weil beide Aminosäuren basische Komponenten enthalten, dennoch könnte es durch die unterschiedliche Größe und die veränderten Seitenketten zu einer veränderten Struktur des Proteins kommen; insbesondere, weil die o.g. Variante homozygot nachgewiesen wurde. Denkbare Ursachen hierfür wären neben der Heterozygotie beider

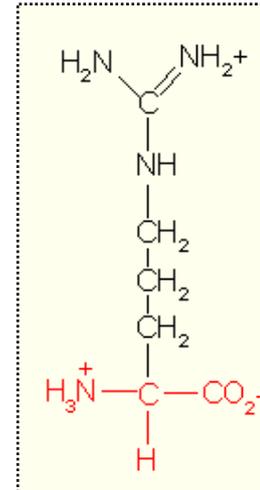


Abb. 4.5
Arginin

Quelle:
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/topics/de/vlu/index.html>

Eltern eine Hemizygotie von ITCH – d.h. ein allelic drop out

einer heterozygoten Deletion, eine UPD des Chromosoms 20 oder die Blutsverwandtschaft der Eltern. Da die DNA der Eltern aber nicht zur Verfügung steht, ist dies nicht abzuklären.

Angesichts dessen, dass die Sequenzvariante außerdem in der Kontrollgruppe nicht detektiert wurde, ist es durchaus möglich, dass der Einbau von Arginin statt Lysin in das Protein eine Konformationsänderung in der C2-Domäne von Itch bewirkt. Dies könnte zu reduzierter oder gar fehlender Aktivität der C2-Domäne führen, was wiederum sämtliche zelluläre Prozesse, in die Itch involviert ist, beeinflussen könnte (siehe Kapitel 1.2.3). Eine klinische Relevanz des detektierten Aminosäureaustausches in Exon 4 ist daher nicht auszuschließen, obwohl diese Substitution eher als benigne eingestuft wird (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>). Ein sinnvoller Ansatz zur genaueren Überprüfung wären Funktionsanalysen des veränderten Itch-Proteins im Vergleich zum „normalen“ Protein.

4.3.1.2 Die heterozygote Variante p.V707I in Exon 21

In Exon 21 wurde an Position 2119 ein heterozygoter Basenaustausch von Guanin nach Adenin detektiert, der einen Aminosäureaustausch von Valin nach Isoleucin bewirkt (c.2119G>A, p.V707I). Diese bisher nicht beschriebene Sequenzvariante (Abb. 4.6, vgl. auch Abb. 4.12) liegt in einer konservierten Region (Abb. 4.7), die für die HECTc-Domäne von Itch kodiert (siehe Kapitel 1.2.2).

Denkbare Auswirkungen auf das Protein durch die Bildung neuer Splice-Sites sind eher unwahrscheinlich, da der Splice-Score durch die o.g. Variante nicht verändert wird (<http://www.interactive-biosoftware.com/alamut/doc/splicing.html>).

2281	ACTTCTCCGTTGACAAAAGAAATTC	TAGGTTAAAGAGTCATGATCTGAAACCTAATG
2111	ACTTCTCCGTTGACAAAAGAAATTC	TAGGTTAAAGAGTCATGATCTGAAACCTAATG
704	Y--F--S--V--D--K--E--I--L--G--E--I--K--S--H--D--L--K--P--N--	

Abb. 4.6

Bekannte Sequenzvarianten in Exon 21

Die erste Zeile enthält die Exons (Farbe der Buchstaben) und Codons (unterschiedlich unterlegt), die zweite die Sequenz, die translatiert wird. In der dritten Zeile findet sich die Aminosäuresequenz. In diesem Abschnitt sind bisher keine SNPs beschrieben (siehe auch Abb. 4.12).

Die Position der in Exon 21 detektierten Sequenzvariante ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Quelle:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/protview?db=core;peptide=ENSP00000262650

			707		
protein_human	PEFYNSLIWV	KENNIIECDL	EMYFSVDKEI	LGEIKSHDLK	PNGGNILVTE
protein_Canis_famili	PEFYNSLIWV	KENNIIECGL	EMYFSVDKEI	LGEIKSHDLK	PNGGNILVTE
protein_mouse	PEFYNSLIWV	KENNIIECGL	EMYFSVDKEI	LGEIKSHDLK	PNGGNILVTE
protein_mus_musculus	PEFYNSLIWV	KENNIIECGL	EMYFSVDKEI	LGEIKSHDLK	PNGGNILVTE
protein_rattus_norve	PEFYNSLIWV	KENNIIECGL	EMYFSVDKEI	LGEIKSHDLK	PNGGNILVTE
protein_Pan_troglody	PEFYNSLIWV	KENNIIECDL	EMYFSVDKEI	LGEIKSHDLK	PNGGNILVTE
protein_Gallus_gallu	PEFYNSLIWV	KENDIEECGL	EMFFSVDKEI	LGEIKSHDLK	PNGSNILVTE
Consensus	PEFYNSLIWV	KEN#IEECgL	EM*FSVDKEI	LGEIKSHDLK	PNGgNILVTE

Abb. 4.7

Vergleich der Proteinsequenzen von Itch in Mensch, Hund, Maus, Ratte, Schimpanse und Huhn

Die in Exon 21 aufgrund der Sequenzvariante ausgetauschte konservierte Aminosäure 707 ist markiert.

Quelle: <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

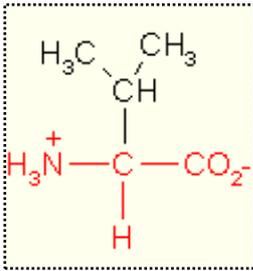


Abb. 4.8
Valin

Quelle:
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/topics/de/vlu/index.html>

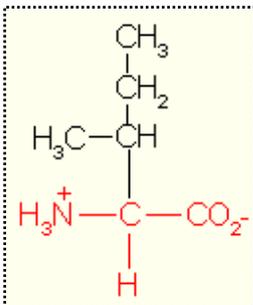


Abb. 4.9
Isoleucin

Quelle:
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/topics/de/vlu/index.html>

Die HECTc-Domäne besitzt die für Itch als E3-Ubiquitin-Protein-Ligase charakteristische Enzymaktivität: Von E2-Enzymen wird eine Ubiquitinkette übernommen und auf das zu markierende Substrat transferiert.

Wird in das Protein Itch Isoleucin (Abb. 4.9) anstatt Valin (Abb. 4.8) eingebaut, kommt es zwar nicht zu einer Veränderung der Ladung, weil beide Aminosäuren ungeladen sind, dennoch könnte sich durch die unterschiedliche Größe und Struktur der Aminosäuren eine Konformationsänderung der HECTc-Domäne ergeben, was zu reduzierter oder fehlender Aktivität der E3-Ligase führen könnte.

Ein weiteres Indiz für diese Überlegung ist die Einstufung dieser Substitution als „möglicherweise schädlich“ für das Protein (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)

Sollte sich Verbindung von Itch zu Morbus Parkinson bestätigen, könnte diese Sequenzvariante innerhalb der HECT-Domäne ein auslösender Faktor sein, da dann derselbe Pathomechanismus wie bei den in Parkinson detektierten Mutationen vorliegen würde: Proteine können nicht mehr ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut werden, was zur Akkumulation und eventuell zum Zelltod führt (Shimura et al., 2000; Imai et al., 2001; Shimura et al., 2001; von Coelln et al., 2004).

Die Tatsache, dass die Sequenzvariante zudem nicht in der Kontrollgruppe nachgewiesen wurde, untermauert die Annahme, dass diese Sequenzvariante klinisch relevant sein könnte. Auch hier wären Funktionsanalysen des veränderten Itch-Proteins - und speziell der HECTc-Domäne - im Vergleich zum „normalen“ Protein ein sinnvoller Ansatz für weiterführende Studien.

4.3.1.3 Der stumme Polymorphismus p.R82R in Exon 5

In Exon 5 wurde an Position 246 ein heterozygoter Basenaustausch von Thymin nach Cytosin detektiert, der keinen Aminosäureaustausch bewirkt (c.246T>C, p.R82R), d.h. diese Sequenzvariante ist stumm. Dennoch wären durch die Bildung neuer Splice-Sites Auswirkungen auf das Protein möglich. Bei der o.g. Variante wird jedoch der Splice-Score nicht verändert (<http://www.interactive-biosoftware.com/alamut/doc/splicing.html>), d.h. sie hat weder Auswirkungen auf die Proteinstruktur und die Funktion von Itch noch klinische Relevanz.

Die Sequenzvariante liegt in einer konservierten Region (Abb. 4.11) und wurde bis jetzt noch nicht beschrieben, jedoch ist für dieselbe Position ein Basenaustausch von Thymin nach Guanin bekannt (Abb. 4.10, vgl. auch Abb. 4.12), der ebenfalls stumm ist; es handelt sich an dieser Position also um eine Stelle, die häufig von Varianten betroffen ist.

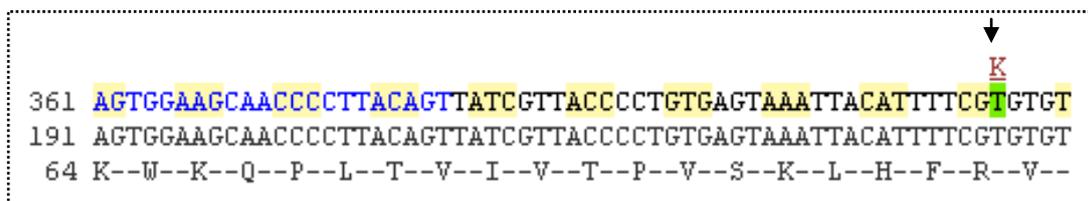


Abb. 4.10

Bekannte Sequenzvarianten in Exon 5

Die erste Zeile enthält die Exons (Farbe der Buchstaben) und Codons (unterschiedlich unterlegt), die zweite die Sequenz, die translatiert wird. In der dritten Zeile findet sich die Aminosäuresequenz.

Die Position der in Exon 5 detektierten Sequenzvariante ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. An derselben Position ist ein weiterer SNP beschrieben (grün unterlegt; siehe auch Abb. 4.12).

Quelle:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/protview?db=core;peptide=ENSP00000262650

DISKUSSION

	protein_human	protein_Canis_famili	protein_mouse	protein_mus_musculus	protein_rattus_norve	protein_Pan_troglody	protein_Gallus_gallu	Consensus
	SKKTEKCNNT	SKKTEKCNNT	SKKTEKCNNT	SKKTEKCNNT	SKKTEKCNNT	SKKTEKCNNT	SKKTEKCNNT	SKKTEKCNNT
	NSPKWKQPLT	NSPKWKQPLT	NSPKWKQPLT	NSPKWKQPLT	NSPKWKQPLT	NSPKWKQPLT	NSPKWKQPLT	NSPKWKQpLT
	VIVTPVSKLH	VIVTPVSKLH	VIVTPVSKLH	VIVTPVSKLH	VIVTPVSKLH	VIVTPVSKLH	VIVTPVSKLH	VIVTP.SKL.
	FRVWSHQLK	FRVWSHQLK	FRVWSHQLK	FRVWSHQLK	FRVWSHQLK	FRVWSHQLK	FRVWSHQLK	FRVWSHQLK
	SDVLLGTAAL	SDVLLGTAAL	SDVLLGTAAGL	SDVLLGTAAGL	SDVLLGTAAGL	SDVLLGTAAL	SDVLLGSAAL	SDVLLGtAaL

Abb. 4.11

Vergleich der Proteinsequenzen von Itch in Mensch, Hund, Maus, Ratte, Schimpanse und Huhn

Die in Exon 5 betroffene konservierte Aminosäure 82 ist markiert.

Quelle: <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

Variations on ENSP00000262650						
Residue	SNP ID	SNP type	Alleles	Ambiguity code	Alternate residues	
8	rs11552867	Non-synonymous	T/C	Y	P, L	
82	rs3761146	Synonymous	T/G	K	-	
464	rs1052275	Non-synonymous	C/T	Y	T, I	
656	rs7268389	Non-synonymous	A/T	W	D, V	
739	rs6059862	Non-synonymous	G/A	R	K, R	
901	rs4911428	Synonymous	A/T	W	-	

Abb. 4.12

Bekannte exonische SNPs in ITCH

Quelle:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/protview?db=core;peptide=ENSP00000262650

4.3.1.4 Der stumme Polymorphismus p.Q423Q in Exon 13

In Exon 13 wurde bei vier Patienten-Proben an Position 1269 ein heterozygoter Basenaustausch von Adenin nach Guanin detektiert, der keinen Aminosäureaustausch bewirkt (c.1269A>G, p.Q423Q). Diese stumme Sequenzvariante, die bisher nicht beschrieben wurde (Abb. 4.13., vgl. auch Abb. 4.12), liegt in einer konservierten Region (Abb. 4.14).

Durch die Bildung neuer Splice-Sites wären dennoch Auswirkungen auf das Protein möglich. Bei der o.g. Variante entsteht ein neuer Donor (5') mit einem Score von 61,72 (SpliceSiteFinder-like). Allerdings finden MaxEntScan und

DISKUSSION

GeneSplicer keine Auffälligkeiten. (<http://www.interactive-biosoftware.com/alamut/doc/splicing.html>). Angesichts dessen, dass dieselbe Sequenzvariante auch in der Kontrollgruppe in ähnlicher Häufigkeit vorkam, kann vermutet werden, dass der neue Donor keine Relevanz hat. Es handelt sich hier wohl am ehesten um eine Variante, die keine Auswirkungen auf die Proteinstruktur und die Funktion von Itch hat und die bei manchen Menschen unabhängig von Erkrankungen vorkommt.

```

1381 GTAGTCAGCTTCAAGGAGCAATGCAGCAGTTTAACCAGAGATTTCATTTATGGGAATCAAG
1211 GTAGTCAGCTTCAAGGAGCAATGCAGCAGTTTAACCAGAGATTTCATTTATGGGAATCAAG
404 R--S--Q--L--Q--G--A--M--Q--Q--F--N--Q--R--F--I--Y--G--N--Q--

```

Abb. 4.13

Bekannte Sequenzvarianten in Exon 13

Die erste Zeile enthält die Exons (Farbe der Buchstaben) und Codons (unterschiedlich unterlegt), die zweite die Sequenz, die translatiert wird. In der dritten Zeile findet sich die Aminosäuresequenz. In diesem Abschnitt sind bisher keine SNPs beschrieben (siehe auch Abb. 4.12).

Die Position der in Exon 13 detektierten Sequenzvariante ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Quelle:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/protview?db=core;peptide=ENSP00000262650

	protein human	RTT	WQR	P	T	L	ESV	R	NYE	EQ	W	Q	LQR	S	Q	L	Q	G	A	M	QQF	N	Q	R	F	I	Y	G	N	CDL	F	A	T	S	Q
protein human	RTT	WQR	P	T	L	ESV	R	NYE	EQ	W	Q	LQR	S	Q	L	Q	G	A	M	QQF	N	Q	R	F	I	Y	G	N	CDL	F	A	T	S	Q	
protein_Canis_famili	RTT	WQR	P	T	L	ESV	R	NYE	EQ	W	Q	LQR	S	Q	L	Q	G	A	M	QQF	N	Q	R	F	I	Y	G	N	CDL	F	T	T	S	Q	
protein_mouse	RTT	WQR	P	T	L	ESV	R	NYE	EQ	W	Q	LQR	S	Q	L	Q	G	A	M	QQF	N	Q	R	F	I	Y	G	N	CDL	F	A	T	S	Q	
protein_mus_musculus	RTT	WQR	P	T	L	ESV	R	NYE	EQ	W	Q	LQR	S	Q	L	Q	G	A	M	QQF	N	Q	R	F	I	Y	G	N	CDL	F	A	T	S	Q	
protein_rattus_norve	RTT	WQR	P	T	L	ESV	R	NYE	EQ	W	Q	LQR	S	Q	L	Q	G	A	M	QQF	N	Q	R	F	I	F	G	N	CDL	F	A	T	S	Q	
protein_Pan_troglody	RTT	WQR	P	T	L	ESV	R	NYE	EQ	W	Q	LQR	S	Q	L	Q	G	A	M	QQF	N	Q	R	F	I	Y	G	N	CDL	F	A	T	S	Q	
protein_Gallus_gallu	RTT	WQR	P	T	L	ESV	R	NYE	EQ	W	Q	LQR	S	Q	L	Q	G	A	M	QQF	N	Q	R	F	I	Y	G	N	CD	.	F	S	S	T	Q
Consensus	RTT	WQR	P	T	L	ESV	R	NYE	EQ	W	Q	LQR	S	Q	L	Q	G	A	M	QQF	N	Q	R	F	I	G	N	CD	I	F	A	T	S	Q	

Abb. 4.14

Vergleich der Proteinsequenzen von Itch in Mensch, Hund, Maus, Ratte, Schimpanse und Huhn

Die in Exon 13 betroffene konservierte Aminosäure 423 ist markiert.

Quelle: <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

4.3.2 Bedeutung der intronischen Sequenzvarianten

Beim Screening von ITCH wurden acht verschiedene intronische Sequenzvarianten detektiert (Kapitel 3.3 und Anhang). Es handelt sich teilweise um Längenpolymorphismen, wie sie bei jedem Menschen vorkommen, teilweise um Basenaustausche.

Es ist unwahrscheinlich, dass die detektierten intronischen Sequenzvarianten einen Einfluss auf die Funktion von Itch und die Pathogenese des Morbus Parkinson haben. Es sind jedoch Fälle beschrieben, bei denen intronische Sequenzvarianten durch Beeinträchtigungen des Splice-Vorgangs zum Exonverlust oder zur kompletten Inaktivierung des mutierten Allels führen (Pagenstecher et al., 2006). Möglich ist auch die Aktivierung verborgener intronischer Splice-Sites, die die Bildung neuer Exone oder die Bildung eines z.B. durch vorzeitige Beendigung der Translation veränderten Transkripts bewirken (Scholl et al., 1999; Dehainault et al., 2007). In einigen Fällen kann eine intronische Variante sogar selbst krankheitsauslösend sein (Zhang et al., 2004). Es wäre somit sicherlich sinnvoll, bei weiteren Untersuchungen von ITCH auch die intronischen Sequenzvarianten mit einzubeziehen.

4.4 Schlussfolgerungen

Mit dieser Studie wurden in ITCH erstmals zwei bisher nicht beschriebene exonische Sequenzvarianten (c.83A>G, p.K28R und c.2119G>A, p.V707I) bei Parkinson-Patienten detektiert, die in der Kontrollgruppe nicht vorkamen. Diese Sequenzvarianten führen zu einer veränderten Aminosäuresequenz und somit eventuell zu einer veränderten Funktion der E3-Ubiquitin-Protein-Ligase Itch. Die durch dieses Projekt gewonnenen Erkenntnisse geben also neuen Einblick in genetische Varianten bei Patienten mit Morbus Parkinson und liefern auch Ansatzpunkte für weiterführende Studien.

Da Morbus Parkinson eine multifaktoriell bedingte Erkrankung ist, wäre es vorstellbar, dass Sequenzvarianten in ITCH entweder direkt, in Zusammenhang mit anderen Genen oder als zusätzlicher Faktor zu umweltbedingten Einflüssen an der Ätiologie des Morbus Parkinson beteiligt sind.

Eine endgültige Aussage über die Relevanz von ITCH bei der Pathogenese des Morbus Parkinson kann erst getroffen werden, wenn weitere Untersuchungen von Itch erfolgt sind. Denkbar wären Analysen auf mRNA- und Proteinebene inklusive der Untersuchung der Auswirkungen der hier detektierten Sequenzvarianten auf die Funktion der jeweiligen betroffenen Domäne, die Identifikation neuer Interaktionspartner von Itch, die möglicherweise ebenfalls eine Rolle im Ubiquitin-Proteasomen-System spielen, E3-Ligasen sein oder bereits als parkinsonrelevante Gene bekannt sein könnten, sowie die Überprüfung der vermuteten Pathogenese im Tiermodell. Es wäre auch interessant zu überprüfen, ob Itch – eventuell auch als funktionsunfähige Form – in Lewy-Körperchen nachgewiesen werden kann.

Es bleibt abzuwarten, was weitere Analysen von Itch ergeben, dennoch lassen die Ergebnisse dieses Projekts einen Zusammenhang zwischen Itch und Morbus Parkinson vermuten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Morbus Parkinson (Parkinson's Disease, PD) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die durch die Degeneration dopaminergener Neurone der Substantia nigra und die Bildung von Lewy-Körperchen charakterisiert ist. Die genauen Ursachen der Neurodegeneration sind noch immer unbekannt; es wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen, wobei neben Alter und Geschlecht vor allem genetische und umweltbedingte Faktoren eine Rolle spielen. Aufgrund der Entdeckung von Mutationen in Genen wie Parkin und UCH-L1 ist außerdem anzunehmen, dass Dysfunktionen im Ubiquitin-Proteasomen-System von zentraler pathogenetischer Bedeutung sind.

Itch ist – ebenso wie Parkin – eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase mit vielfältigen Aufgaben und nachgewiesener Aktivität im ZNS. Daher wurde ITCH im Rahmen dieser Arbeit einem Mutationsscreening unterzogen.

Für die molekulargenetischen Analysen stand ein Kollektiv von 286 Parkinson-Patienten und 260 Kontrollen zur Verfügung, für das alle kodierenden Exone des ITCH-Gens mittels PCR vervielfältigt und durch Heteroduplexanalysen mittels denaturierender Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (dHPLC) auf Sequenzauffälligkeiten hin untersucht wurden. Auffällige Proben wurden sequenziert, mit der Referenzsequenz von ITCH verglichen und in der Kontrollgruppe überprüft. Dabei wurden neben einigen intronischen vier bislang unbekannte exonische Sequenzvarianten detektiert, die in der Kontrollgruppe nicht vorkamen und von denen zwei einen Aminosäureaustausch zur Folge haben (c.83A>G, p.K28R ; c.246T>C, p.R82R ; c.1269A>G, p.Q423Q ; c.2119G>A, p.V707I). Die durch die Variante an Position 2119 ausgetauschte Aminosäure liegt dabei innerhalb der HECT-Domäne, die für die Ligase-Funktion von Itch essentiell ist.

Möglicherweise bewirken die beiden Aminosäuresubstitutionen eine Konformationsänderung des Proteins, was zu reduzierter oder

ZUSAMMENFASSUNG

fehlender Aktivität der E3-Ligase Itch führen und somit von pathogenetischer Bedeutung für den Morbus Parkinson sein könnte.

Es bleibt abzuwarten, was zukünftige funktionelle Analysen von Itch ergeben, dennoch haben die hier durchgeführten Analysen eine Assoziation zwischen seltenen Sequenzvarianten und dem Morbus Parkinson ergeben. Sollten sich diese Ansatzpunkte funktionell bestätigen, so wäre die Bedeutung des Ubiquitin-Proteasomen-Systems für den Morbus Parkinson erneut bekräftigt und die Suche nach therapeutischen Ansatzpunkten in diesem funktionellen System erweitert.

6 VERZEICHNISSE

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Verschaltungsmuster der Basalganglien mit den beteiligten Transmittern.....	2
Abb. 1.2	Übersicht über die Ursachen der PD.....	9
Abb. 1.3	Schema des UPS.....	17
Abb. 1.4	Domänen von Itch.....	21
Abb. 1.5	Aminosäurenkette und Domänen von Itch.....	22
Abb. 1.6	Schema der Interaktionspartner und Funktionen von Itch.....	23
Abb. 2.1	Ablauf des Mutationsscreenings von ITCH an Parkinson-Patienten.....	29
Abb. 2.2	Lage der Primer um das Template.....	30
Abb. 2.3	Schema der PCR.....	31
Abb. 2.4	Ergebnis der ersten PCR (Gelelektrophorese).....	38
Abb. 2.5	PCR von Exon 7 mit Zusatz von Q-Solution.....	40
Abb. 2.6	Basensequenz um Exon 7 mit Längenpolymorphismus und Primern.....	40
Abb. 2.7	Gradienten-PCR von Exon 7.....	41
Abb. 2.8	PCR von Exon 7 mit neuem forward-Primer.....	41
Abb. 2.9	Einfluss der Magnesium-konzentration auf das Amplifikat.....	43
Abb. 2.10	Schema des WAVE [®] -Systems.....	49
Abb. 2.11	Heteroduplex-Bildung durch Hybridisierung.....	50
Abb. 2.12	Effekt der Temperatur auf die Trennung von Homo- und Heteroduplices.....	51
Abb. 2.13	Schematische Darstellung der Sequenzierung.....	57
Abb. 3.1	Analyse der Pools bei 53,5°C (links) und bei 57,5°C (rechts).....	62
Abb. 3.2	Analyse der Probe 030053 bei 54,5°C.....	63
Abb. 3.3	Chromatogramme.....	63
Abb. 3.4	Alignment Report für Probe 030053, Exon 4.....	64
Abb. 3.5	Analyse der Pools bei 54,5°C.....	65
Abb. 3.6	Analyse der Proben 547 und 572 bei 54,5°C.....	65
Abb. 3.7	Chromatogramme.....	66
Abb. 3.8	Alignment Report für Probe 547, Exon 21.....	66
Abb. 3.9	Analyse der Pools bei 56,0°C.....	67
Abb. 3.10	Analyse der Probe 217 bei 56,0°C.....	67
Abb. 3.11	Chromatogramme.....	68
Abb. 3.12	Alignment Report für Probe 217, Exon 5.....	68
Abb. 3.13	Analyse der Einzelproben bei 55,5°C.....	69
Abb. 3.14	Analyse der Proben 203 und 213 bei 55,5°C.....	69

VERZEICHNISSE

Abb. 3.15	Chromatogramme.....	70
Abb. 3.16	Alignment Report für Probe 574, Exon 13.....	70
Abb. 4.1	Schematische Darstellung der detektierten Sequenzvarianten innerhalb der 26 Exone von ITCH bei Parkinson-Patienten.....	76
Abb. 4.2	Bekannte Sequenzvarianten in Exon 4.....	77
Abb. 4.3	Vergleich der Proteinsequenzen von Itch in Mensch, Hund, Maus, Ratte, Schimpanse und Huhn.....	77
Abb. 4.4	Lysin.....	78
Abb. 4.5	Arginin.....	78
Abb. 4.6	Bekannte Sequenzvarianten in Exon 21.....	79
Abb. 4.7	Vergleich der Proteinsequenzen von Itch in Mensch, Hund, Maus, Ratte, Schimpanse und Huhn.....	79
Abb. 4.8	Valin.....	80
Abb. 4.9	Isoleucin.....	80
Abb. 4.10	Bekannte Sequenzvarianten in Exon 5.....	81
Abb. 4.11	Vergleich der Proteinsequenzen von Itch in Mensch, Hund, Maus, Ratte, Schimpanse und Huhn.....	82
Abb. 4.12	Bekannte exonische SNPs in ITCH.....	82
Abb. 4.13	Bekannte Sequenzvarianten in Exon 13.....	83
Abb. 4.14	Vergleich der Proteinsequenzen von Itch in Mensch, Hund, Maus, Ratte, Schimpanse und Huhn.....	83
Abb. 7.1	Analyse der Probe OP284 bei 54,5°C.....	109
Abb. 7.2	Chromatogramme.....	109
Abb. 7.3	Analyse der Proben 203 und 213 bei 55,5°C.....	110
Abb. 7.4	Chromatogramme.....	110
Abb. 7.5	Analyse der Proben 539 und 574 bei 55,5°C.....	111
Abb. 7.6	Chromatogramme.....	111

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Übersicht über die bisher bekannten PARK-Loci und weitere Kandidatengene.....	11
Tab. 2.1	Sequenzen und Eigenschaften der Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der 24 codierenden Exons von ITCH.....	33

VERZEICHNISSE

Tab. 2.2	Verwendete Reagenzien für die PCR.....	35
Tab. 2.3	Verwendete Geräte für die PCR.....	35
Tab. 2.4	Standard-Zusammensetzung der PCR-Ansätze.....	36
Tab. 2.5	Standard-Schema des Touchdown-Protokolls.....	37
Tab. 2.6	PCR-Bedingungen für die einzelnen Exone.....	44
Tab. 2.7	Verwendete Reagenzien für die Gelelektrophorese.....	45
Tab. 2.8	Verwendung des 10x TBE-Puffers.....	46
Tab. 2.9	Komponenten des Agarose-Gels.....	46
Tab. 2.10	Größenstandards für die Gelelektrophorese.....	47
Tab. 2.11	Verwendete Geräte für die Gelelektrophorese.....	48
Tab. 2.12	Dokumentationssystem für die Gelelektrophorese.....	48
Tab. 2.13	Etablierte Temperaturen und Shift-Einstellungen für die einzelnen PCR-Fragmente.....	52
Tab. 2.14	Verwendete Reagenzien für die Mutationsanalyse.....	54
Tab. 2.15	Zusammensetzung der dHPLC-spezifischen Lösungen.....	54
Tab. 2.16	Verwendete Geräte für die Mutationsanalyse.....	55
Tab. 2.17	Verwendete Reagenzien für die Sequenzierung.....	58
Tab. 2.18	Verwendete Geräte für die Sequenzierung.....	58
Tab. 2.19	Standard-Zusammensetzung der Sequenzier-Ansätze.....	59
Tab. 2.20	Standard-Schema der Sequenzier-Reaktion.....	60
Tab. 3.1	Übersicht über die Screening-Ergebnisse der einzelnen PCR-Fragmente.....	61
Tab. 3.2	Übersicht über die intronischen Sequenzvarianten in ITCH.....	71
Tab. 7.1	Übersicht über die intronischen Sequenzvarianten in ITCH.....	113

6.3 Abkürzungsverzeichnis

∞	unendlich
ad	auf
Abb.	Abbildung
AcN	Acetonitril
aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
Bromphenolblau	Tetrabromphenolsulfonphthalein
bp	base pair (Basenpaar)
°C	Grad Celsius

VERZEICHNISSE

Ceph	Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (Referenz-DNA)
cm	Zentimeter
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes, vollentsalztes Wasser
d.h.	das heißt
dHPLC	denaturing high-performance liquid chromatography (denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
DNA	desoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP = Desoxy- Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin-Triphosphat)
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotid-5'-triphosphat
ds	double strand (Doppelstrang)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
et al.	et alii (und andere Mitarbeiter)
F	forward
g	Gramm
IVS	intervening sequence
l	Liter
Mg ²⁺	zweifach positiv geladene Magnesiumionen
μ	mikro
ml	Milliliter
mM	millimolar
MΩ	Megaohm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
M	molar
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
o.g.	oben genannte/r/s
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD	Parkinson's disease (Morbus Parkinson, Parkinsonsche Erkrankung)
pmol	Pikomol
%	Prozent
R	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
sog.	sogenannt

VERZEICHNISSE

ss	single strand (Einzelstrang)
SLS	sample loading solution
SNP	single nucleotide polymorphism
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Thermophilus aquaticus-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEAA	Triethylammoniumacetat
T _m	melting temperature (Schmelzpunkt)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPR	Unfolded Protein Response
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System
UTR	untranslated region
UV	ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Purin-/Pyrimidinbasen

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

Aminosäuren

Ala, A: Alanin	Gly, G: Glycin	Pro, P: Prolin
Arg, R: Arginin	His, H: Histidin	Ser, S: Serin
Asn, N: Asparagin	Ile, I: Isoleucin	Thr, T: Threonin
Asp, D: Aspartat	Leu, L: Leucin	Trp, W: Tryptophan
Cys, C: Cystein	Lys, K: Lysin	Tyr, Y: Tyrosin
Gln, Q: Glutamin	Met, M: Methionin	Val, V: Valin
Glu, E: Glutamat	Phe, F: Phenylalanin	

6.4 Literaturverzeichnis

Abbas N, Lucking CB, Ricard S, Durr A, Bonifati V, De Michele G, Bouley S, Vaughan JR, Gasser T, Marconi R, Broussolle E, Brefel-Courbon C, and 13 others: **A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe.** Hum. Molec. Genet. 1999;8: 567-574.

Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW: **The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease.** Ann. Neurol. 2003;54:283-286.

Abou-Sleiman PM, Muqit MMK, McDonald NQ, Yang YX, Gandhi S, Healy DG, Harvey K, Harvey RJ, Deas E, Bhatia K, Quinn N, Lees A, Latchman DS, Wood NW: **A heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson's disease?** Ann. Neurol. 2006;60:414-419.

Aigelsreiter A, Janig E, Stumptner C, Fuchsbichler A, Zatloukal K, Denk H: **How a cell deals with abnormal proteins. Pathogenetic mechanisms in protein aggregation diseases.** Pathobiology 2007;74(3):145-58.

Alimova EI, Golubev VL: **Autonomic disorders in parkinsonism.** Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova 1992;92(5-12):48-52.

Anderson LR, Betarbet R, Gearing M, Gulcher J, Hicks AA, Stefánsson K, Lah JJ, Levey AI: **PARK10 candidate RNF11 is expressed by vulnerable neurons and localizes to Lewy bodies in Parkinson disease brain.** J Neuropathol Exp Neurol 2007;66(10):955-64.

Andre B, Springael JY: **WWP, a new amino acid motif present in single or multiple copies in various proteins including dystrophin and the SH3-binding Yes-associated protein YAP65.** Biochem Biophys Res Commun. 1994;205:1201-1205.

Annesi G, Savettieri G, Pugliese P, D'Amelio M, Tarantino P, Ragonese P, La Bella V, Piccoli T, Civitelli D, Annesi F, Fierro B, Piccoli F, Arabia G, Caracciolo M, Canadiano ICC, Quattrone A: **DJ-1 mutations and parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex.** Ann. Neurol. 2005;58:803-807.

Bai Y, Yang C, Hu K, Elly C, Liu YC: **Itch E3 ligase-mediated regulation of TGF-beta signaling by modulating smad2 phosphorylation.** Mol Cell. 2004;15(5):825-31.

Baron M, Kudin AP, Kunz WS: **Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders.** Biochem Soc Trans. 2007;35(Pt 5):1228-31.

Berg D: **Transcranial sonography in the early and differential diagnosis of Parkinson's disease.** J Neural Transm Suppl. 2006;(70):249-54.

Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F: **Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations.** J Neurol Sci. 1973;20(4):415-55.

Bertoli-Avella AM, Giroud-Benitez JL, Akyol A, Barbosa E, Schaap O, van der Linde HC, Martignoni E, Lopiano L, Lamberti P, Fincati E, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Squitieri F, Marini P, Abbruzzese G, Fabbrini G, Marconi R, Dalla Libera A, Trianni G, Guidi M, De Gaetano A, Boff Maegawa G, De Leo A, Gallai V, de Rosa G, Vanacore N, Mecocci G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P, Bonifati V, Italian Parkinson Genetics Network: **Novel parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease.** Mov Disord. 2005;20(4):424-31.

Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT: **Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases.** Exp Neurol. 2005;191 Suppl 1:17-27.

Bogaerts V, Engelborghs S, Kumar-Singh S, Goossens D, Pickut B, van der Zee J, Sleegers K, Peeters K, Martin JJ, Del-Favero J, Gasser T, Dickson DW, Wszolek ZK, De Deyn PP, Theuns J, Van Broeckhoven C: **A novel locus for dementia with Lewy bodies: a clinically and genetically heterogeneous disorder.** Brain 2007;130(Pt 9):2277-91.

Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MCJ, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meo G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P: **Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism.** Science 2003;299:256-259.

Buervenich S, Carmine A, Galter D, Shahabi HN, Johnels B, Holmberg B, Ahlberg J, Nissbrandt H, Eerola J, Hellstrom O, Tienari PJ, Matsuura T, and 12 others: **A rare truncating mutation in ADH1C (G78stop) shows significant association with Parkinson disease in a large international sample.** Arch. Neurol. 2005;62:74-78.

Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M: **The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover.** Cell. 2006;124(3):601-13.

Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A: **Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease.** Lancet 2004;364:1167-1169.

Chien HF, Rohe CF, Costa MDL, Breedveld GJ, Oostra BA, Barbosa ER, Bonifati V: **Early-onset Parkinson's disease caused by a novel mutation in a genetic isolate from north-eastern Brazil.** Neurogenetics 2006;7:13-19.

Chishti M A, Bohlega S, Ahmed M, Loualich A, Carroll P, Sato C, St George-Hyslop P, Westaway D, Rogaeva E: **T313M PINK1 mutation in an extended highly consanguineous Saudi family with early-onset Parkinson disease.** Arch. Neurol. 2006;63:1483-1485.

Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, Gearing M, Levey AI, Chin LS, Li L: **Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases.** J Biol Chem. 2006;281(16):10816-10824.

Chung KKK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM: **Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease.** Nature Med. 2001;7:1144-1150.

Ciechanover A: **Intracellular protein degradation from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and on to human diseases and drug targeting.** Ann N Y Acad Sci. 2007;1116:1-28.

Clark LN, Afridi S, Karlins E, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K: **Case-control study of the parkin gene in early-onset Parkinson disease.** Arch. Neurol. 2006;63:548-552.

Dauer W, Przedborski S: **Parkinson's disease: mechanisms and models.** Neuron. 2003;39(6):889-909.

De Gruyter W: **Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch.** 259. Auflage, 2002

Dehainault C, Michaux D, Pagès-Berhouet S, Caux-Moncoutier V, Doz F, Desjardins L, Couturier J, Parent P, Stoppa-Lyonnet D, Gauthier-Villars M, Houdayer C: **A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation.** Eur J Hum Genet. 2007;15(4):473-477.

VERZEICHNISSE

De Michele G, Filla A, Volpe G, De Marco V, Gogliettino A, Ambrosio G, Marconi R, Castellano AE, Campanella G: **Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in southern Italy.** *Mov Disord.* 1996;11(1):17-23.

Deng H, Le WD, Hunter CB, Ondo WG, Guo Y, Xie WJ, Jankovic J: **Heterogeneous phenotype in a family with compound heterozygous parkin gene mutations.** *Arch. Neurol.* 2006;63:273-277.

De Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A, Rocca WA: **Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997;62(1):10-15.

De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A: **Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group.** *Neurology.* 2000;54(11 Suppl 5):21-23.

Di Fonzo A, Rohe CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, Guedes L, Fabrizio E, Manfredi M, Vanacore N, Goldwurm S, Breedveld G, Sampaio C, Meco G, Barbosa E, Oostra BA, Bonifati V, Italian Parkinson Genetics Network: **A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease.** *Lancet* 2005;365:412-415.

Di Fonzo A, Chien HF, Socal M, Giraudo S, Tassorelli C, Iliceto G, Fabbrini F, Marconi R, Fincati E, Abbruzzese F, Marini P, Squitieri F, and 14 others: **ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease.** *Neurology* 2007;68:1557-1562.

Doran JF, Jackson P, Kynoch P, Thompson RJ: **Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high resolution two-dimensional electrophoresis.** *J. Neurochem.* 1983;40:1542-1547.

Edwards YH, Fox MF, Povey S, Hinks LJ, Day INM, Thompson RJ: **The gene for human neuron specific ubiquitin C-terminal hydrolase maps to chromosome 4p14.** *Cytogenet. Cell Genet.* 1991;58:1886-1887.

Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, Sharp AH, Amaravi RK, Kleiderlein JJ, Margolis RL, Troncoso JC, Lanahan AA, Worley PF, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA: **Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions.** *Nature Genet.* 1999;22:110-114.

Eyal A, Szargel R, Avraham E, Liani E, Haskin J, Rott R, Engelender S: **Synphilin-1A: an aggregation-prone isoform of synphilin-1 that causes neuronal death and is present in aggregates from alpha-synucleinopathy patients.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2006;103:5917-5922.

Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV, Zervos AS: **Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia.** *J. Biol. Chem.* 2000;275:2581-2588.

Fang D, Elly C, Gao B, Fang N, Altman Y, Joazeiro C, Hunter T, Copeland N, Jenkins N, Liu YC: **Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation.** *Nat Immunol.* 2002;3(3):281-287.

Fang D, Kerppola TK: **Ubiquitin-mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch/AIP4 is localized to lysosomes.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(41):14782-14787.

Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang D-S, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D, Langston JW: **Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications.** Ann. Neurol. 2004;55:174-179.

Farrer M, Chan P, Chen R, Tan L, Lincoln S, Hernandez D, Forno L, Gwinn-Hardy K, Petrucelli L, Hussey J, Singleton A, Tanner C, Hardy J, Langston JW: **Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations.** Ann. Neurol. 2001;50:293-300.

Feng L, Guedes S, Wang T: **Atrophia-1-interacting protein 4/human Itch is a ubiquitin E3 ligase for human enhancer of filamentation 1 in transforming growth factor-beta signaling pathways.** J Biol Chem. 2004;279(28):29681-29690.

Forno LS: **Neuropathology of Parkinson's disease.** J Neuropathol Exp Neurol. 1996;55(3):259-272.

Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J, Munz M, Larsson EM, Schule B, Langston JW, Middleton FA, Ross OA, Hulihan M, Gasser T, Farrer MJ: **Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication.** Neurology 2007;68:916-922.

Funayama M, Hasegawa K, Ohta E, Kawashima N, Komiyama M, Kowa H, Tsuji S, Obata F: **An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family.** Ann. Neurol. 2005;57:918-921.

Gallagher E, Gao M, Liu YC, Karin M: **Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(6):1717-1722.

Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC, Karin M: **Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch.** Science. 2004;306(5694):271-275.

Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznaï B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD: **A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13.** Nature Genet. 1998;18:262-265.

Gasser, T: **Genetics of Parkinson's disease.** Curr. Opin. Neurol. 2005;18:363-369.

Gispert-Sanchez S, Auburger G: **The role of protein aggregates in neuronal pathology: guilty, innocent, or just trying to help?** J Neural Transm Suppl. 2006;(70):111-117.

Golbe LI, Di Iorio G, Bonavita V, Miller DC, Duvoisin RC: **A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease.** Ann. Neurol. 1990;27:276-282.

Gonera EG, van't Hof M, Berger HJ, van Weel C, Horstink MW: **Symptoms and duration of the prodromal phase in Parkinson's disease.** Mov Disord. 1997;12(6):871-876.

Gong B, Leznik E: **The role of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in neurodegenerative disorders.** Drug News Perspect. 2007;20(6):365-370.

Goris A, Williams-Gray CH, Foltynie T, Brown J, Maranian M, Walton A, Compston DA, Barker RA, Sawcer SJ: **Investigation of TGFB2 as a candidate gene in multiple sclerosis and Parkinson's disease.** J Neurol. 2007;254(7):846-848.

VERZEICHNISSE

Gross E, Arnold N, Pfeifer K, Bandick K, Kiechle M: **Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC.** Hum. Mutat. 2000;16:345-353

Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC, Joh TH, Cotton RG, Howe PR, Blessing WW, Geffen LB: **Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease.** Ann Neurol. 1990;27(4):373-385.

Hansen TM, Rossi M, Roperch JP, Ansell K, Simpson K, Taylor D, Mathon N, Knight RA, Melino G: **Itch inhibition regulates chemosensitivity in vitro.** Biochem Biophys Res Commun. 2007;361(1):33-36.

Hasegawa K, Kowa H: **Autosomal dominant familial Parkinson disease: older onset of age, and good response to levodopa therapy.** Europ. Neurol. 1997;38(suppl.1):39-43.

Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Hassin-Baer S, Lu CS, Ng AR, Rosales RL, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N: **Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism.** Ann. Neurol. 2004;56:424-427.

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

Hattori N, Mizuno Y: **Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease.** Lancet. 2004;364(9435):722-724.

Hattori N, Machida Y, Sato S, Noda K, Iijima-Kitami M, Kubo S, Mizuno Y: **Molecular mechanisms of nigral neurodegeneration in Park2 and regulation of parkin protein by other proteins.** J Neural Transm Suppl. 2006;(70):205-208.

Healy DG, Abou-Sleiman PM, Casas JP, Ahmadi KR, Lynch T, Gandhi S, Muqit MMK, Foltynie T, Barker R, Bhatia KP, Quinn NP, Lees AJ, Gibson JM, Holton JL, Revesz T, Goldstein DB, Wood NW: **UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene.** Ann. Neurol. 2006;59:627-633.

Hedrich K, Hagenah J, Djarmati A, Hiller A, Lohnau T, Lasek K, Grunewald A, Hilker R, Steinlechner S, Boston H, Kock N, Schneider-Gold C, Kress W, Siebner H, Binkofski F, Lencer R, Munchau A, Klein C: **Clinical spectrum of homozygous and heterozygous PINK1 mutations in a large German family with Parkinson disease: role of a single hit?** Arch. Neurol. 2006;63:833-838.

Henderson JM, Lu Y, Wang S, Cartwright H, Halliday GM: **Olfactory deficits and sleep disturbances in Parkinson's disease: a case-control survey.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003;74(7):956-958.

Hering R, Strauss KM, Tao X, Bauer A, Voitalla D, Mietz EM, Petrovic S, Bauer P, Schaible W, Muller T, Schols L, Klein C, Berg D, Meyer PT, Schulz JB, Wollnik B, Tong L, Kruger R, Riess O: **Novel homozygous p.E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7).** Hum. Mutat. 2004;24:321-329.

Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K, Sveinbjornsdottir S: **A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease.** Ann. Neurol. 2002;52:549-555.

Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD, Hearing VJ: **MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes.** J. Biol. Chem. 2005;280:14006-14016.

VERZEICHNISSE

Hoehnck J, Vidal L, Morales B, Ampuero I, Jimenez-Jimenez FJ, Berciano J, del Ser T, Jimenez A, Ruiz PG, de Yébenes JG: **Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain.** Arch. Neurol. 2002;59:966-970.

Hoozemans JJ, van Haastert ES, Eikelenboom P, de Vos RA, Rozemuller JM, Scheper W: **Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease.** Biochem Biophys Res Commun. 2007;354(3):707-711.

Hornykiewicz O, Kish SJ: **Biochemical pathophysiology of Parkinson's Disease.** In: Yahr M, Bergmann KJ(eds): Parkinson's Disease. Raven Press 1987:19-34

Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM: **A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:2563-2567.

Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Durr A, Brice A, French Parkinson's disease genetics study group: **Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease.** Lancet 2004;364:1169-1171.

Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R: **An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin.** Cell. 2001;105(7):891-902.

Iwakura Y, Piao YS, Mizuno M, Takei N, Kakita A, Takahashi H, Nawa H: **Influences of dopaminergic lesion on epidermal growth factor-ErbB signals in Parkinson's disease and its model: neurotrophic implication in nigrostriatal neurons.** J Neurochem. 2005;93(4):974-983.

Jellinger KA: **Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway.** Mol Chem Neuropathol. 1991;14(3):153-197.

Jellinger KA: **Post mortem studies in Parkinson's disease--is it possible to detect brain areas for specific symptoms?** J Neural Transm Suppl. 1999;56:1-29.

Jin J, Li GJ, Davis J, Zhu D, Wang Y, Pan C, Zhang J: **Identification of novel proteins associated with both alpha-synuclein and DJ-1.** Mol Cell Proteomics. 2007;6(5):845-859.

Jones AC, Yamamura Y, Almsy L, Bohlega S, Elibol B, Hubble J, Kuzuhara S, Uchida M, Yanagi T, Weeks DE, Nygaard TG: **Autosomal recessive juvenile parkinsonism maps to 6q25.2-q27 in four ethnic groups: detailed genetic mapping of the linked region.** Am. J. Hum. Genet. 1998;63:80-87.

Kalia SK, Lee S, Smith PD, Liu L, Crocker SJ, Thorarinsdottir TE, Glover JR, Fon EA, Park DS, Lozano AM: **BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration.** Neuron 2004;44:931-945.

Kang SJ, Scott WK, Li YJ, Hauser MA, van der Walt JM, Fujiwara K, Mayhew GM, West SG, Vance JM, Martin ER: **Family-based case-control study of MAOA and MAOB polymorphisms in Parkinson disease.** Mov Disord. 2006;21(12):2175-2180.

Karamohamed S, DeStefano AL, Wilk JB, Shoemaker CM, Golbe LI, Mark MH, Lazzarini AM, Suchowersky O, Labelle N, Guttman M, Currie LJ, Wooten GF, and 22 others: **A haplotype at the PARK3 locus influences onset age for Parkinson's disease: the GenePD study.** Neurology 2003;61:1557-1561.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N: **Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.** Nature 1998;392:605-608.

Kitching R, Wong MJ, Koehler D, Burger AM, Landberg G, Gish G, Seth A: **The RING-H2 protein RNF11 is differentially expressed in breast tumours and interacts with HECT-type E3 ligases.** *Biochim Biophys Acta.* 2003;1639(2):104-112.

Klein C, Pramstaller PP, Kis B, Page CC, Kann M, Leung J, Woodward H, Castellan CC, Scherer M, Vieregge P, Breakefield XO, Kramer PL, Ozellus LJ: **Parkin deletions in a family with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype.** *Ann. Neurol.* 2000;48:65-71.

Klein C, Djarmati A, Hedrich K, Schafer N, Scaglione C, Marchese R, Kock N, Schule B, Hiller A, Lohnau T, Winkler S, Wiegers K, Hering R, Bauer P, Riess O, Abbruzzese G, Martinelli P, Pramstaller PP: **PINK1, parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism.** *Europ. J. Hum. Genet.* 2005;13:1086-1093.

Ko HS, von Coelln R, Sriram SR, Kim SW, Chung KK, Pletnikova O, Troncoso J, Johnson B, Saffary R, Goh EL, Song H, Park BJ, Kim MJ, Kim S, Dawson VL, Dawson TM: **Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death.** *J Neurosci.* 2005;25(35):7968-7798.

Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, Saito M, Tomoda A, Miike T, Naito H, Ikuta F, Tsuji S: **Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA).** *Nature Genet.* 1994;6:9-13.

Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O: **A1a30-to-pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease.** *Nature Genet.* 1998;18:106-108.

Kruger R, Kuhn W, Leenders KL, Sprengelmeyer R, Muller T, Woitalla D, Portman AT, Maguire RP, Veenma L, Schroder U, Schols L, Epplen JT, Riess O, Przuntek H: **Familial parkinsonism with synuclein pathology: clinical and PET studies of A30P mutation carriers.** *Neurology* 2001;56:1355-1362.

Kuhn W, Müller T: **Morbus Parkinson: Medikamentöse Therapie, diagnostische und klinische Grundlagen.** Thieme-Verlag, Stuttgart, 1998

Lallemand F, Seo SR, Ferrand N, Pessah M, L'Hoste S, Rawadi G, Roman-Roman S, Camonis J, Atfi A: **AIP4 restricts transforming growth factor-beta signaling through a ubiquitination-independent mechanism.** *J Biol Chem.* 2005;280(30):27645-27653.

LaVoie MJ, Cortese GP, Ostaszewski BL, Schlossmacher MG: **The effects of oxidative stress on parkin and other E3 ligases.** *J Neurochem.* 2007;103(6):2354-2368.

Le W, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK: **Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease.** *Nature Genet.* 2003;33:85-89.

Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE: **Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States.** *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1807-1819.

Lee FJ, Liu F, Pristupa ZB, Niznik HB: **Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis.** *FASEB J.* 2001;15(6):916-926.

Lee SB, Kim W, Lee S, Chung J: **Loss of LRRK2/PARK8 induces degeneration of dopaminergic neurons in Drosophila.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(2):534-539.

Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD,

- Polymeropoulos MH: **The ubiquitin pathway in Parkinson's disease.** Nature 1998;395:451-452.
- Lesage S, Janin S, Lohmann E, Leutenegger AL, Leclere L, Viallet F, Pollak P, Durif F, Thobois S, Layet V, Vidailhet M, Agid Y, Durr A, Brice A, French Parkinson's Disease Genetics Study Group: **LRRK2 exon 41 mutations in sporadic Parkinson disease in Europeans.** Arch. Neurol. 2007;64:425-430.
- Leutenegger AL, Salih MAM, Ibanez P, Mukhtar MM, Lesage S, Arabi A, Lohmann E, Durr A, Ahmed AEM, Brice A: **Juvenile-onset parkinsonism as a result of the first mutation in the adenosine triphosphate orientation domain of PINK1.** Arch. Neurol. 2006;63:1257-1261.
- Levy D, Adamovich Y, Reuven N, Shaul Y: **The Yes-associated protein 1 stabilizes p73 by preventing Itch-mediated ubiquitination of p73.** Cell Death Differ. 2007;14(4):743-751.
- Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hatano Y, Yoshino H, Atsumi M, Kitaguchi M, Sasaki S, Kawaguchi S, Miyajima H, Toda T, Mizuno Y, Hattori N: **Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism.** Neurology 2005;64:1955-1957.
- Li YJ, Scott WK, Hedges DJ, Zhang F, Gaskell PC, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, and 20 others: **Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled.** Am. J. Hum. Genet. 2002;70:985-993.
- Li YJ, Deng J, Mayhew GM, Grimsley JW, Huo X, Vance JM: **Investigation of the PARK10 gene in Parkinson disease.** Ann Hum Genet. 2007;71(Pt 5):639-647.
- Liani E, Eyal A, Avraham E, Shemer R, Szargel R, Berg D, Bornemann A, Riess O, Ross CA, Rott R, Engelender S: **Ubiquitylation of synphilin-1 and alpha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(15):5500-5505.
- Lim KL: **Ubiquitin-proteasome system dysfunction in Parkinson's disease: current evidence and controversies.** Expert Rev Proteomics. 2007;4(6):769-781.
- Lincoln S, Vaughan J, Wood N, Baker M, Adamson J, Gwinn-Hardy K, Lynch T, Hardy J, Farrer M: **Low frequency of pathogenic mutations in the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase gene in familial Parkinson's disease.** Neuroreport 1999;10:427-429.
- Liu X, Elia AE, Law SF, Golemis EA, Farley J, Wang T: **A novel ability of Smad3 to regulate proteasomal degradation of a Cas family member HEF1.** EMBO J. 2000;19(24):6759-6769.
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr.: **The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility.** Cell. 2002;111(2):209-218
- Liu YC: **The E3 ubiquitin ligase Itch in T cell activation, differentiation, and tolerance.** Semin Immunol. 2007;19(3):197-205.
- Lowe J, McDermott H, Landon M, Mayer RJ, Wilkinson KD: **Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases.** J Pathol. 1990;161(2):153-160.
- Lucking CB, Bonifati V, Periquet M, Vanacore N, Brice A, Meco G: **Pseudo-dominant inheritance and exon 2 triplication in a family with parkin gene mutations.** Neurology 2001;57:924-927.

VERZEICHNISSE

Macias MJ, Hyvönen M, Baraldi E, Schultz J, Sudol M, Saraste M, Oschkinat H: **Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide.** Nature. 1996;382(6592):646-649.

Mages, HW, Rilke O, Bravo R, Senger G, Kroczeck RA: **NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3.** Molec. Endocr. 1994;8:1583-1591.

Manfredi G, Beal MF: **The role of mitochondria in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.** Brain Pathol. 2000;10(3):462-72.

Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H, Benovic JL: **The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4.** Dev Cell. 2003;5(5):709-722.

Marder K, Tang MX, Mejia H, Alfaro B, Côté L, Louis E, Groves J, Mayeux R: **Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study.** Neurology. 1996;47(1):155-160.

Martinez J, Moeller I, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Luring B: **Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is a calmodulin substrate.** J Biol Chem. 2003;278(19):17379-87.

Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, Li L, Eberhardt O, Gerhardt E, Cookson MR, Hernandez D, Farrer MJ, Kachergus J, Engelender S, Ross CA, Berger K, Schols L, Schulz JB, Riess O, Krüger R: **Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease.** Hum. Molec. Genet. 2003;12:1223-1231.

Marx FP, Soehn AS, Berg D, Melle C, Schiesling C, Lang M, Kautzmann S, Strauss KM, Franck T, Engelender S, Pahnke J, Dawson S, von Eggeling F, Schulz JB, Riess O, Krüger R: **The proteasomal subunit S6 ATPase is a novel synphilin-1 interacting protein--implications for Parkinson's disease.** FASEB J. 2007;21(8):1759-1767.

Mata IF, Kachergus JM, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Lynch T, Hulihan MM, Cobb SA, Wu RM, Lu CS, Lahoz C, Wszolek ZK, Farrer MJ: **Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease.** Neurogenetics 2005;6:171-177.

Matesic LE, Haines DC, Copeland NG, Jenkins NA: **Itch genetically interacts with Notch1 in a mouse autoimmune disease model.** Hum Mol Genet. 2006;15(24):3485-3497.

Mattson MP: **Calcium and neurodegeneration.** Aging Cell. 2007;6(3):337-50.

McEvoy AN, Murphy EA, Ponnio T, Conneely OM, Bresnihan B, FitzGerald O, Murphy EP: **Activation of nuclear orphan receptor NURR1 transcription by NF-kappaB and cyclic adenosine 5-prime-monophosphate response element-binding protein in rheumatoid arthritis synovial tissue.** J. Immun. 2002;168:2979-2987.

McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P: **Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease.** Nat Rev Neurosci. 2001;2(8):589-94.

McNaught KS, Olanow CW: **Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease.** Neurobiol Aging. 2006;27(4):530-545.

Meulener MC, Xu K, Thompson L, Ischiropoulos H, Bonini NM: **Mutational analysis of DJ-1 in Drosophila implicates functional inactivation by oxidative damage and aging.** Proc. Nat. Acad. Sci. 2006;103:12517-12522.

VERZEICHNISSE

Mills RD, Sim CH, Mok SS, Mulhern TD, Culvenor JG, Cheng HC: **Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of Pten-Induced Kinase-1 (PINK1).** J Neurochem. 2008;105(1):18-33.

Moore, DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson T M, Dawson VL: **Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress.** Hum. Molec. Genet. 2005;14:71-84.

Mouchantaf R, Azakir BA, McPherson PS, Millard SM, Wood SA, Angers A: **The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X.** J Biol Chem. 2006;281(50):38738-38747.

Mueller DL: **E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors.** Nat Immunol. 2004;5(9):883-90.

Najim Al-Din AS, Wriekat A, Mubaidin A, Dasouki M, Hiari M: **Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome.** Acta Neurol. Scand. 1994;89:347-352.

Nalefski EA, Falke JJ: **The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity.** Protein Sci. 1996;5:2375-90

Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, Hattori N: **Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease.** Ann. Neurol. 2006;59: 298-309.

Nisipeanu P, Inzelberg R, Mouch SA, Carasso RL, Blumen SC, Zhang J, Matsumine H, Hattori N, Mizuno Y: **Parkin gene causing benign autosomal recessive juvenile parkinsonism.** Neurology 2001;56:1573-1575.

Nuber U, Scheffner M: **Identification of determinants in E2 ubiquitin-conjugating enzymes required for hect E3 ubiquitin-protein ligase interaction.** J Biol Chem. 1999;274(11):7576-7582.

Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Smith MA, Perry G: **Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases.** CNS Neurol Disord Drug Targets. 2007;6(6):411-423.

Oberst A, Malatesta M, Aqeilan RI, Rossi M, Salomoni P, Murillas R, Sharma P, Kuehn MR, Oren M, Croce CM, Bernassola F, Melino G: **The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(27):11280-11285.

O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS und McGuffin P: **Blind analysis of denaturing high-performace liquid chromatography as a tool for mutation detection.** Genomics 1998;52:44-49.

Olanow CW: **The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease - 2007.** Mov Disord. 2007;22(S17):335-342

Olanow CW, McNaught KS: **Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease.** Mov Disord. 2006;21(11):1806-1823.

Olanow CW, Tatton WG: **Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease.** Annu Rev Neurosci. 1999;22:123-44.

VERZEICHNISSE

Oliveira SA, Li YJ, Noureddine MA, Zuchner S, Qin X, Pericak-Vance MA, Vance JM: **Identification of risk and age-at-onset genes on chromosome 1p in Parkinson disease.** Am J Hum Genet. 2005;77(2):252-264.

Pagenstecher C, Wehner M, Friedl W, Rahner N, Aretz S, Friedrichs N, Sengteller M, Henn W, Buettner R, Propping P, Mangold E: **Aberrant splicing in MLH1 and MSH2 due to exonic and intronic variants.** Hum Genet. 2006;119(1-2):9-22.

Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Martinez Gil A, Khan N, Johnson J, Martinez JR, and 9 others: **Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease.** Neuron 2004;44:595-600.

Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T, the Parkinson Study Group: **Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations.** Am. J. Hum. Genet. 2002;71:124-135.

Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T, Parkinson Study Group: **Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families.** Hum. Molec. Genet. 2003a;12:2599-2608.

Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T, the Parkinson Study Group: **Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37.** Am. J. Hum. Genet. 2003b;72:1053-1057.

Parkinson J: **An essay on the shaking palsy.** Sherwood, Neely and Jones, London 1817

Petrucelli, L, O'Farrell C, Lockhart PJ, Baptista M, Kehoe K, Vink L, Choi P, Wolozin B, Farrer M, Hardy J, Cookson MR: **Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons.** Neuron 2002;36:1007-1019.

Pickart CM: **Ubiquitin in chains.** Trends Biochem Sci. 2000;25(11):544-548.

Pirozzi G, McConnell SJ, Uveges AJ, Carter JM, Sparks AB, Kay BK, Fowlkes DM: **Identification of novel human WW domain-containing proteins by cloning of ligand targets.** J. Biol. Chem. 1997;272:14611-14616.

Plun-Favreau H, Klupsch K, Moiso N, Gandhi S, Kjaer S, Frith D, Harvey K, Deas E, Harvey RJ, McDonald N, Wood NW, Martins LM, Downward J: **The mitochondrial protease Htra2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1.** Nat Cell Biol. 2007;9(11):1243-1252.

Polymeropoulos MH: **Genetics of Parkinson's disease.** Ann N Y Acad Sci. 2000;920:28-32.

Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC: **Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23.** Science 1996;274:1197-1198.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papepetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL: **Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.** Science 1997;276:2045-2047.

Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ: **The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(5):1638-1643.

Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, Scaravilli F, Eskelson C, Pepivani I, Hedrich K, Adel S, Gonzales-McNeal M, Hilker R, Kramer PL, Klein C: **Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 parkin mutation carriers.** Ann. Neurol. 2005;58:411-422.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 259. Auflage; De Gruyter, 2002

Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang HY, Elly C, Altman Y, Fang D, Hunter T, Liu YC: **Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase.** J Biol Chem. 2000;275(46):35734-35737.

Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C: **Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase.** Nature Genet. 2006;38:1184-1191.

Ransmayr G: **Clinical criteria of Parkinson's disease.** Ther Umsch. 2007;64(1):5-8.

Rekas A, Adda CG, Andrew Aquilina J, Barnham KJ, Sunde M, Galatis D, Williamson NA, Masters CL, Anders RF, Robinson CV, Cappai R, Carver JA: **Interaction of the molecular chaperone alphaB-crystallin with alpha-synuclein: effects on amyloid fibril formation and chaperone activity.** J Mol Biol. 2004;340(5):1167-1183.

Reynolds AD, Banerjee R, Liu J, Gendelman HE, Mosley RL: **Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease.** J Leukoc Biol. 2007;82(5):1083-1094.

Riedel O, Klotsche J, Spottke A, Deuschl G, Förstl H, Henn F, Heuser I, Oertel W, Reichmann H, Riederer P, Trenkwalder C, Dodel R, Wittchen HU: **Cognitive impairment in 873 patients with idiopathic Parkinson's disease: Results from the German Study on Epidemiology of Parkinson's Disease with Dementia (GEPAD).** J Neurol. 2008;255(2):255-264.

Rohe CF, Montagna P, Breedveld G, Cortelli P, Oostra BA, Bonifati V: **Homozygous PINK1 C-terminus mutation causing early-onset parkinsonism.** Ann. Neurol. 2004;56:427-431.

Ross CA, Pickart CM: **The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases.** Trends Cell Biol. 2004;14(12):703-711.

Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, Cesareni G, Melino G: **The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability.** EMBO J. 2005;24(4):836-848.

Rossi M, Aqeilan RI, Neale M, Candi E, Salomoni P, Knight RA, Croce CM, Melino G: **The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(34):12753-12758.

Rotin D: **WW (WWP) domains: from structure to function.** Curr Top Microbiol Immunol. 1998;228:115-133.

Rött R, Szargel R, Haskin J, Shani V, Shainskaya A, Manov I, Liani E, Avraham E, Engelender S: **Monoubiquitylation of alpha-Synuclein by Seven in Absentia Homolog (SIAH) Promotes Its Aggregation in Dopaminergic Cells.** J Biol Chem. 2008;283(6):3316-3328.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 1977;74:5463-5467.

VERZEICHNISSE

- Sasaki S, Shirata A, Yamane K, Iwata M: **Parkin-positive autosomal recessive juvenile parkinsonism with alpha-synuclein-positive inclusions.** *Neurology* 2004;63:678-682.
- Schapira AH: **Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease.** *Lancet Neurol.* 2008;7(1):97-109.
- Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM: **Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade.** *Nature.* 1995;373(6509):81-83.
- Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, Medina M, Sharma N, Forno L, Ochiishi T, Shimura H, Sharon R, Hattori N, Langston JW, Mizuno Y, Hyman BT, Selkoe DJ, Kosik KS: **Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies.** *Am J Pathol.* 2002;160(5):1655-1667.
- Scholl T, Pyne MT, Russo D, Ward BE: **BRCA1 IVS16+6T-->C is a deleterious mutation that creates an aberrant transcript by activating a cryptic splice donor site.** *Am J Med Genet.* 1999;85(2):113-116.
- Schultheis PJ, Hagen TT, O'Toole KK, Tachibana A, Burke CR, McGill DL, Okunade GW, Shull GE: **Characterization of the P5 subfamily of P-type transport ATPases in mice.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;323:731-738.
- Schwarz SE, Rosa JL, Scheffner M: **Characterization of human hect domain family members and their interaction with Ubch5 and Ubch7.** *J Biol Chem.* 1998;273:12148-12154.
- Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, and 20 others: **Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes.** *JAMA* 2001;286:2239-2244.
- Shao X, Davletov BA, Sutton RB, Sudhof TC, Rizo J: **Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C.** *Science.* 1996;273:248-51.
- Sharma M, Mueller JC, Zimprich A, Lichtner P, Hofer A, Leitner P, Maass S, Berg D, Durr A, Bonifati V, De Michele G, Oostra B, Brice A, Wood NW, Muller-Myhsok B, Gasser T, European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease (GSPD): **The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations.** *J. Med. Genet.* 2006;43:557-562.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T: **Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase.** *Nature Genet.* 2000;25:302-305.
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ: **Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease.** *Science.* 2001;293(5528):263-269.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, and 10 others: **Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease.** *Science* 2003;302:841.
- Slagsvold T, Marchese A, Brech A, Stenmark H: **CISK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4.** *EMBO J.* 2006;25(16):3738-3749.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA: **Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2005;102:18676-18681.

VERZEICHNISSE

Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B: **Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function.** J Biol Chem. 2003;278(14):11753-11759.

Spanaki C, Latsoudis H, Plaitakis A: **LRRK2 mutations on Crete: R1441H associated with PD evolving to PSP.** Neurology 2006;67:1518-1519.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M: **alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(11):6469-6473.

Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Muller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Kruger R: **Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease.** Hum. Molec. Genet. 2005;14:2099-2111.

Sun M, Latourelle JC, Wooten GF, Lew MF, Klein C, Shill HA, Golbe LI, Mark MH, Racette BA, Perlmutter JS, Parsian A, Guttman M, and 25 others: **Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson disease: the GenePD study.** Arch. Neurol. 2006;63:826-832.

Sundquist K, Li X, Hemminki K: **Familial risks of hospitalization for Parkinson's disease in first-degree relatives: a nationwide follow-up study from Sweden.** Neurogenetics. 2006;7(4):231-237.

Sulzer D: **Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease.** Trends Neurosci. 2007;30(5):244-250.

Surmeier DJ: **Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease.** Lancet Neurol. 2007;6(10):933-938.

Takahashi H, Ohama E, Suzuki S, Horikawa Y, Ishikawa A, Morita T, Tsuji S, Ikuta F: **Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family.** Neurology 1994;44:437-441.

Takazawa C, Fujimoto K, Homma D, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Ichinose H, Katoh S: **A brain-specific decrease of the tyrosine hydroxylase protein in sepiapterin reductase-null mice-as a mouse model for Parkinson's disease.** Biochem Biophys Res Commun. 2008;367(4):787-792.

Takeuchi H, Takahashi R: **Pathogenesis of Parkinson disease.** Nippon Ronen Igakkai Zasshi. 2007;44(4):415-421.

Tan EK, Zhao Y, Skipper L, Tan MG, Di Fonzo A, Sun L, Fook-Chong S, Tang S, Chua E, Yuen Y, Tan L, Pavanni R, Wong MC, Kolatkar P, Lu CS, Bonifati V, Liu JJ: **The LRRK2 gly2385-to-arg variant is associated with Parkinson's disease: genetic and functional evidence.** Hum. Genet. 2007a;120:857-863.

Tan EK, Skipper LM: **Pathogenic mutations in Parkinson disease.** Hum Mutat. 2007b;28(7):641-653.

Tanaka K, Suzuki T, Chiba T: **The ligation systems for ubiquitin and ubiquitin-like proteins.** Mol Cells. 1998;8(5):503-512.

Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH: **Toxic proteins in neurodegenerative disease.** Science. 2002;296(5575):1991-1995.

Taylor JM, Song YJ, Huang Y, Farrer MJ, Delatycki MB, Halliday GM, Lockhart PJ: **Parkin Co-Regulated Gene (PACRG) is regulated by the ubiquitin-proteasomal system and is present in the pathological features of Parkinsonian diseases.** Neurobiol Dis. 2007;27(2):238-247.

Thobois S, Guillouet S, Broussolle E: **Contributions of PET and SPECT to the understanding of the pathophysiology of Parkinson's disease.** Neurophysiol Clin. 2001;31(5):321-340.

Thobois S, Broussolle E: **Circumstances of Parkinson's disease diagnosis.** Rev Prat. 2005;55(7):717-722.

Tobin JE, Cui J, Wilk JB, Latourelle JC, Laramie JM, McKee AC, Guttman M, Karamohamed S, DeStefano AL, Myers RH: **Sepiapterin reductase expression is increased in Parkinson's disease brain tissue.** Brain Res. 2007;1139:42-47.

Transgenomic Inc.: **An Introductino to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System.** Transgenomic, 1998

Trepel M: **Neuroanatomie, Struktur und Funktion.** Urban & Fischer, 3. Auflage, 2004

Tolosa E, Compta Y, Gaig C: **The premotor phase of Parkinson's disease.** Parkinsonism Relat Disord. 2007;13 Suppl:2-7.

Tompkins MM, Basgall EJ, Zamrini E, Hill WD: **Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons.** Am J Pathol. 1997;150(1):119-131.

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

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, and 10 others: **Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1.** Science 2004;304:1158-1160.

van Duijn CM, Dekker MCJ, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJLM, Testers L, Breedveld GJ, Horstink M, Sandkuijl LA, van Swieten JC, Oostra BA, Heutink P: **PARK7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36.** Am. J. Hum. Genet. 2001;69:629-634.

von Coelln R, Dawson VL, Dawson TM: **Parkin-associated Parkinson's disease.** Cell Tissue Res. 2004;318(1):175-184.

Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H: **Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease.** Ann Neurol. 2000;47(4):521-523.

Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H: **The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates.** Neuropathology. 2007;27(5):494-506.

Wang HL, Chou AH, Yeh TH, Li AH, Chen YL, Kuo YL, Tsai SR, Yu ST: **PINK1 mutants associated with recessive Parkinson's disease are defective in inhibiting mitochondrial release of cytochrome c.** Neurobiol Dis. 2007;28(2):216-226.

Warner TT, Schapira AH: **Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease.** Ann Neurol. 2003;53 Suppl 3:16-23.

VERZEICHNISSE

- Waters CH, Miller CA: **Autosomal dominant Lewy body parkinsonism in a four-generation family.** Ann. Neurol. 1994;35:59-64.
- Wegierski T, Hill K, Schaefer M, Walz G: **The HECT ubiquitin ligase AIP4 regulates the cell surface expression of select TRP channels.** EMBO J. 2006;25(24):5659-5669.
- West AB, Lockhart PJ, O'Farell C, Farrer MJ: **Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter.** J. Molec. Biol. 2003;326:11-19.
- Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J: **The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase.** Science 1989;246:670-672.
- Williams DR, Hadeed A, Najim al-Din AS, Wreikat AL, Lees AJ: **Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia.** Movement Disord. 2005;20:1264-1271.
- Wood JD, Yuan J, Margolis RL, Colomer V, Duan K, Kushi J, Kaminsky Z, Kleiderlein JJ, Sharp AH, Ross CA: **Atrophin-1, the DRPLA gene product, interacts with two families of WW domain-containing proteins.** Mol Cell Neurosci. 1998;11(3):149-160.
- Wszolek ZK, Pfeiffer B, Fulgham JR, Parisi JE, Thompson BM, Uitti RJ, Calne DB, Pfeiffer RF: **Western Nebraska family (family D) with autosomal dominant parkinsonism.** Neurology 1995;45:502-505.
- Xiao W, Oefner PJ: **Denaturing high-performance liquid chromatography: A review.** Hum Mutat. 2001;17(6):439-74.
- Xin H, Xu X, Li L, Ning H, Rong Y, Shang Y, Wang Y, Fu XY, Chang Z: **CHIP controls the sensitivity of transforming growth factor-beta signaling by modulating the basal level of Smad3 through ubiquitin-mediated degradation.** J Biol Chem. 2005;280(21):20842-20850.
- Xu J, Kao SY, Lee FJS, Song W, Jin LW, Yankner BA: **Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease.** Nature Med. 2002;8:600-606.
- Yang C, Zhou W, Jeon MS, Demydenko D, Harada Y, Zhou H, Liu YC: **Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation.** Mol Cell. 2006;21(1):135-141.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yébenes JG: **The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes parkinson and Lewy body dementia.** Ann. Neurol. 2004;55:164-173.
- Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T: **Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice.** Science 1997;276:248-250.
- Zhang L, Vincent GM, Baralle M, Baralle FE, Anson BD, Benson DW, Whiting B, Timothy KW, Carlquist J, January CT, Keating MT, Splawski I: **An intronic mutation causes long QT syndrome.** J Am Coll Cardiol. 2004;44(6):1283-1291.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carballo Carbajal I, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T: **Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology.** Neuron 2004;44:601-607.

7 ANHANG

7.1 Elutionsprofil und Chromatogramme OP284, Exon 04 (Kontrollgruppe)

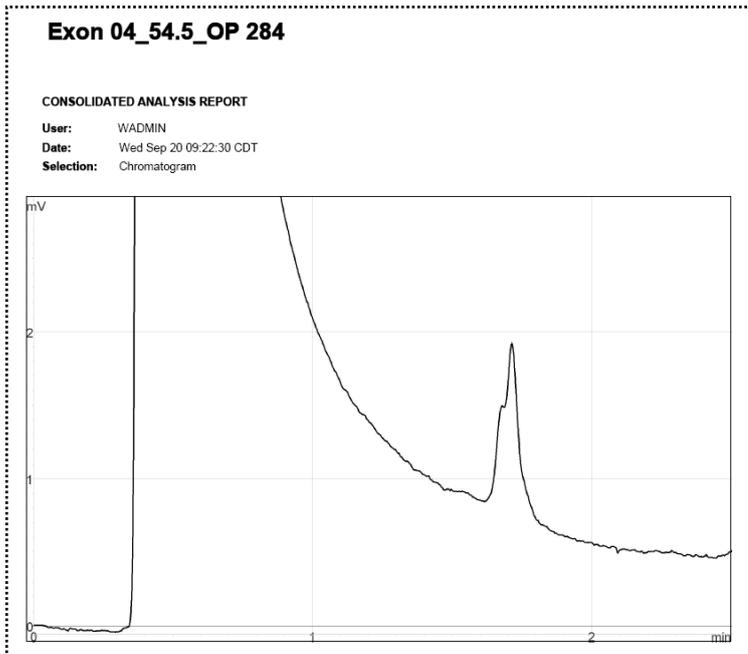


Abb. 7.1
Analyse der Probe OP284 bei 54,5°C:
 auffälliges Elutionsprofil

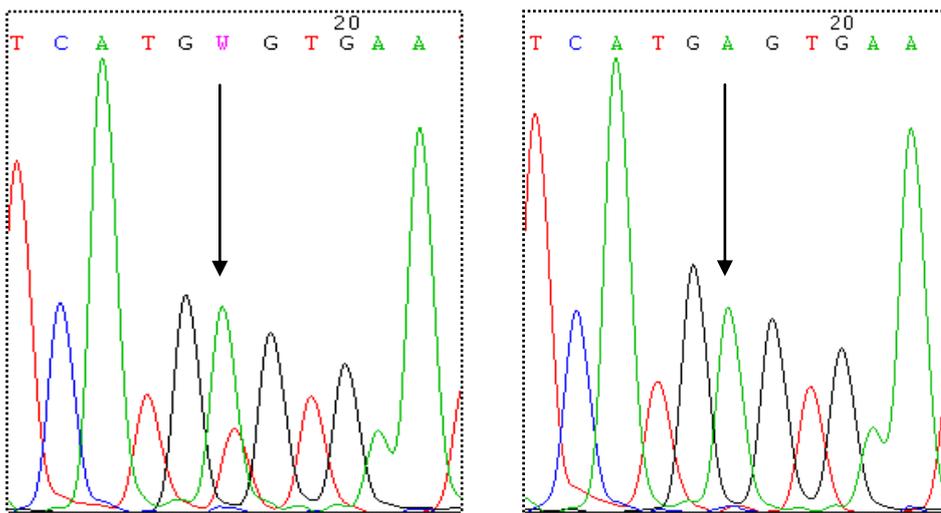


Abb. 7.2
Chromatogramm der Probe OP284, Exon 04, reverse Sequenzierung:
 IVS3–50A>T (links)
Chromatogramm der Ceph 88415, Exon 04, reverse Sequenzierung (rechts)
 Die durch die Sequenzvariante betroffene Position ist durch Pfeile markiert.

7.2 Elutionsprofile und Chromatogramme Exon 13

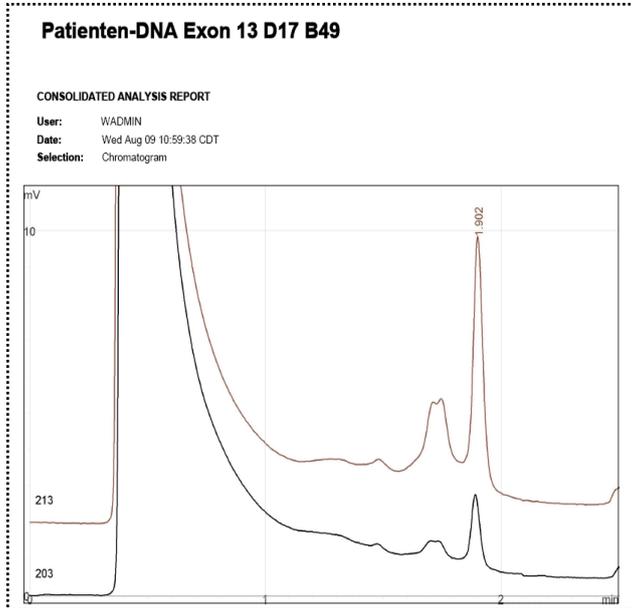


Abb. 7.3
 Analyse der Proben
 203 und 213 bei
 55,5°C:
 auffällige Elutions-
 profile

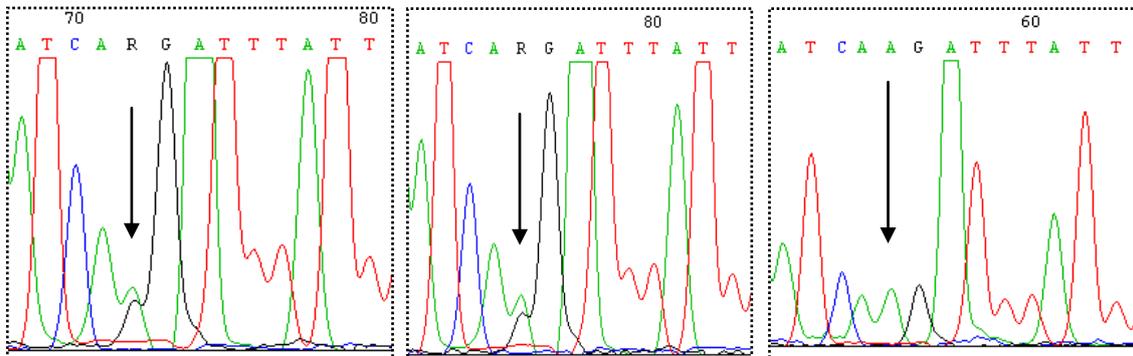


Abb. 7.4
Chromatogramm der Probe 213, Exon 13, forward Sequenzierung (links)
Chromatogramm der Probe 203, Exon 13, forward Sequenzierung (Mitte)
Chromatogramm der Ceph 136206, Exon 13, forward Sequenzierung (rechts)
 Die durch die Sequenzvariante betroffene Position ist durch Pfeile markiert.

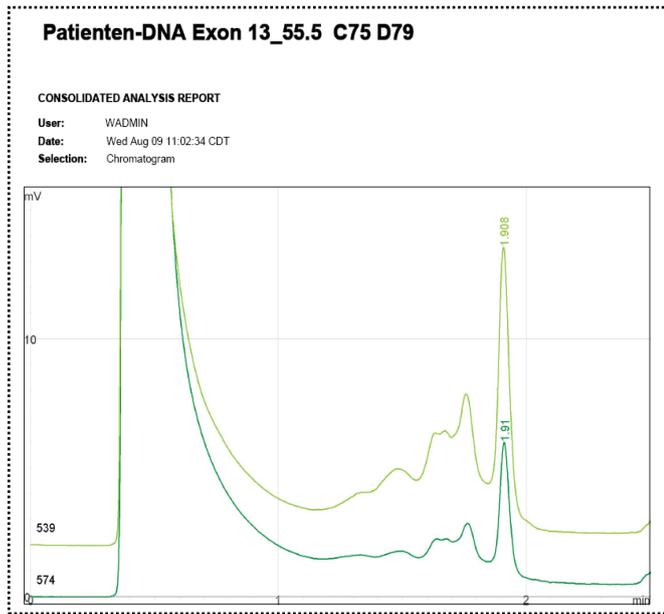


Abb. 7.5
Analyse der Proben 539 und 574 bei 55,5°C:
 auffällige Elutionsprofile

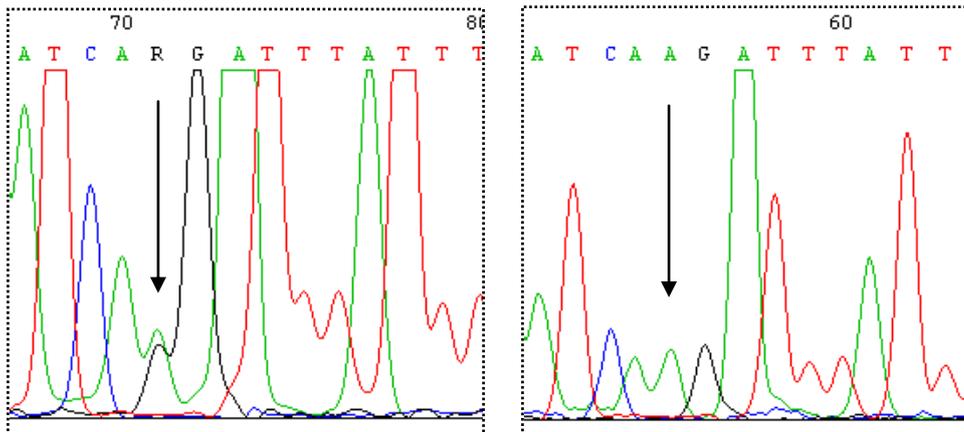


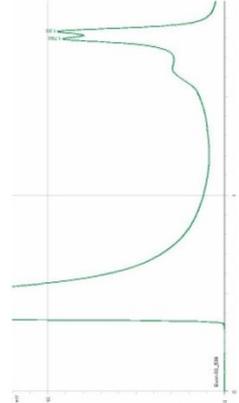
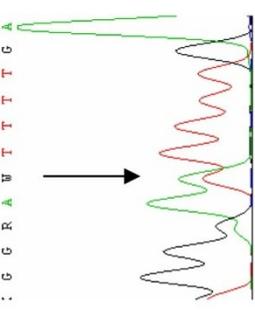
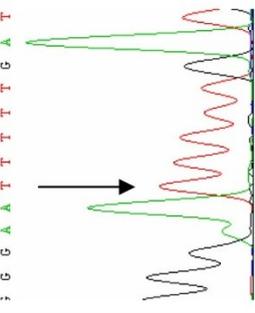
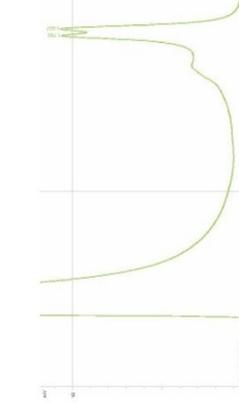
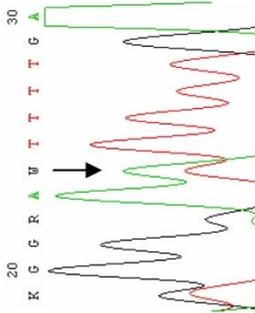
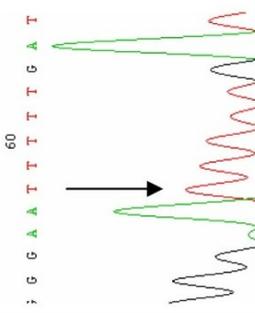
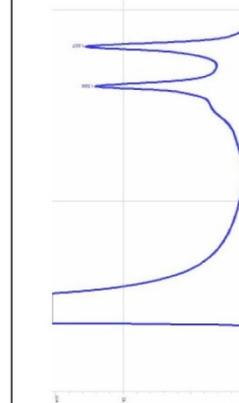
Abb. 7.6
Chromatogramm der Probe 539, Exon 13, forward Sequenzierung (links)
Chromatogramm der Ceph 136206, Exon 13, forward Sequenzierung (rechts)
 Die durch die Sequenzvariante betroffene Position ist durch Pfeile markiert.

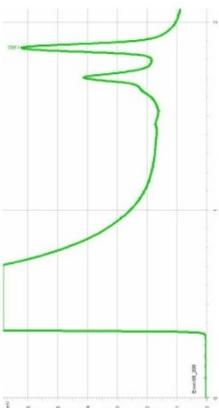
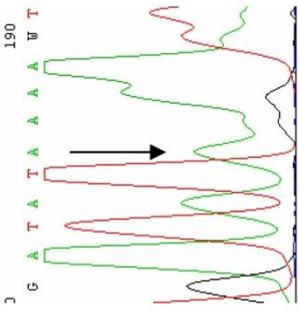
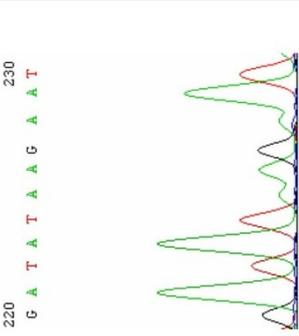
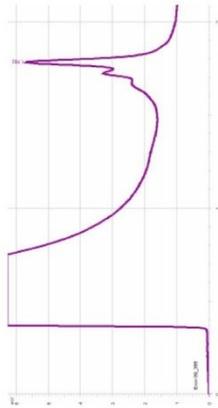
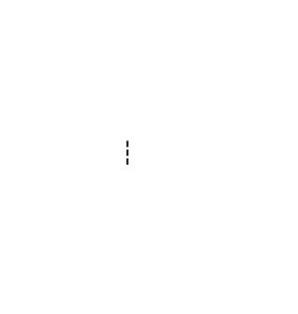
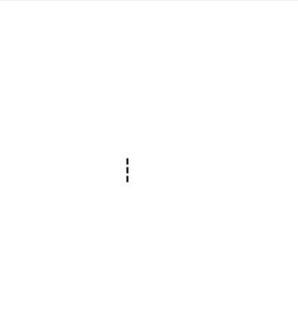
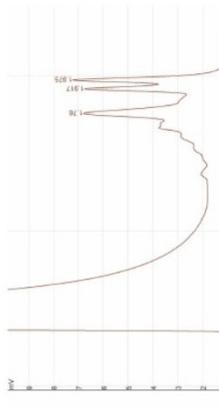
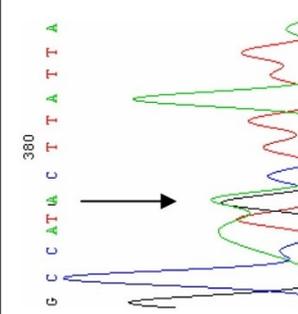
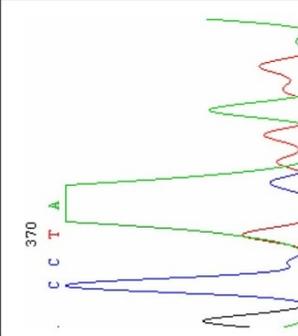
7.3 Elutionsprofile und Chromatogramme der detektierten intronischen Sequenzvarianten in Itch

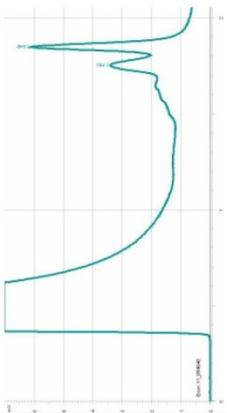
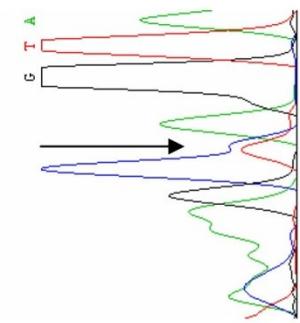
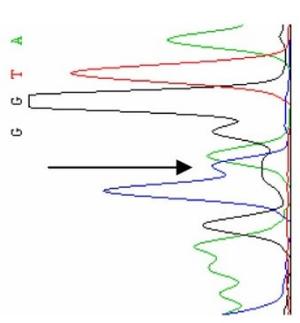
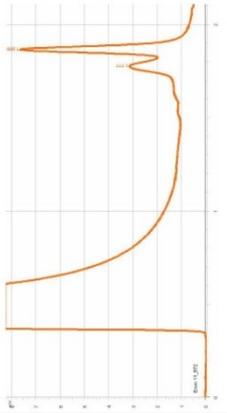
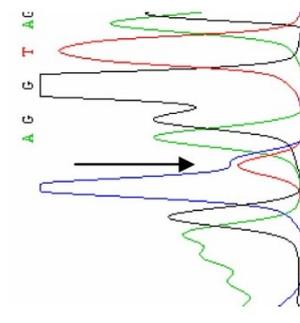
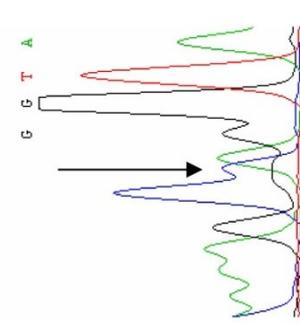
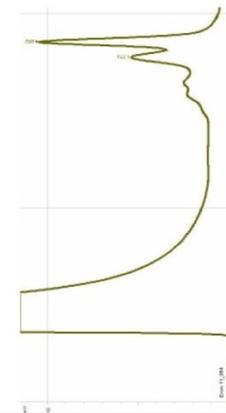
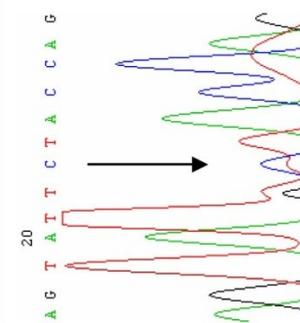
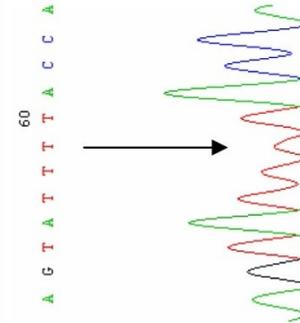
In Tabelle 7.1 werden die detektierten intronischen Sequenzvarianten mit Probennummer, Elutionsprofil, Chromatogramm und Beschreibung dargestellt.

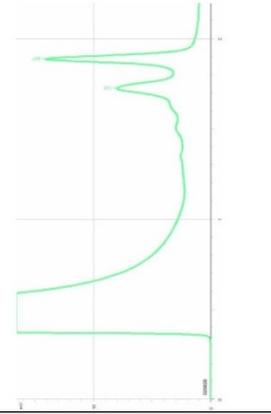
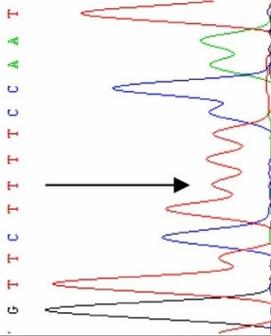
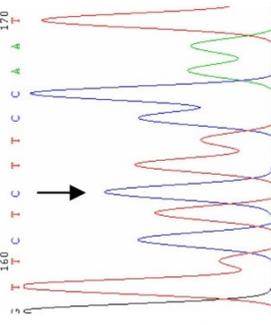
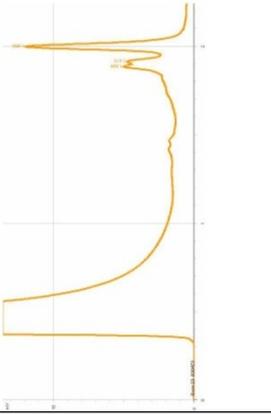
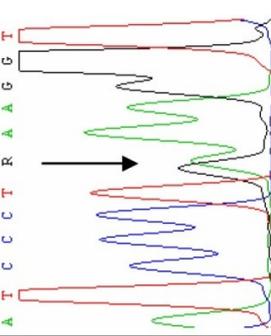
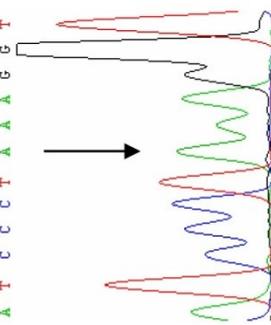
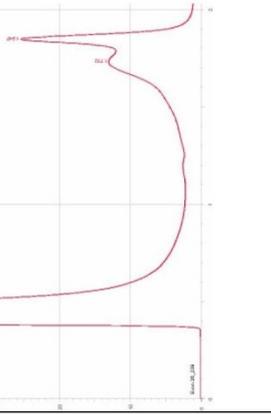
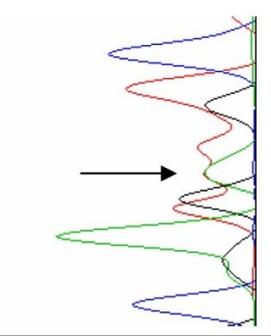
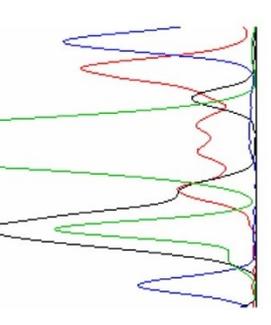
Tab. 7.1

Übersicht über die intronischen Sequenzvarianten in ITCH

Intron	Probe	Elutionsprofil	Chromatogramm der Probe	Chromatogramm des Wildtyps (WT)	Lage / Beschreibung
2	539		<p>20 : G G R A W T T T T G A</p> 	<p>60 : G G A A T T T T T G A T</p> 	<p>IVS2-33delIT</p> <p>Bei dieser intronischen Sequenzvariante handelt es sich um einen Längenpolymorphismus.</p>
2	030064		<p>20 K G G R A W T T T T G A</p> 	<p>60 : G G A A T T T T T G A T</p> 	<p>IVS2-33delIT</p> <p>Bei dieser intronischen Sequenzvariante handelt es sich um einen Längenpolymorphismus.</p>
2 / 3	021724		<p>---</p>	<p>---</p>	<p>Mit den vorhandenen Primern war keine genaue Aussage über eine Sequenzvariante zu treffen; die Variante liegt sicher weit intronisch und könnte evtl. mit weiter intronisch liegenden Primern detektiert werden. Da es sich aber um eine intronische und somit eher unbedeutende Variante handelt, wurde keine weitere Analyse durchgeführt.</p>

Intron	Probe	Elutionsprofil	Chromatogramm der Probe	Chromatogramm des Wildtyps (WT)	Lage / Beschreibung
8	208				IVS8+89delA Bei dieser intronischen Sequenzvariante handelt es sich um einen Längenpolymorphismus.
8 / 9	355				Mit den vorhandenen Primern war keine Sequenzvariante zu finden; die Variante liegt sicher weit intronisch und könnte evtl. mit weiter intronisch liegenden Primern detektiert werden. Da es sich aber um eine intronische und somit eher unbedeutende Variante handelt, wurde keine weitere Analyse durchgeführt.
10	571				IVS10+54A>G

Intron	Probe	Elutionsprofil	Chromatogramm der Probe	Chromatogramm des Wildtyps (WT)	Lage / Beschreibung
10	054040				IVS10-49C>T
10	572				IVS10-49C>T
10	354				IVS10-28T>C

Intron	Probe	Elutionsprofil	Chromatogramm der Probe	Chromatogramm des Wildtyps (WT)	Lage / Beschreibung
13	020828 und 121 andere		<p>190 G T T C T T T T T C C A A T</p> 	<p>160 T T C T C T T C C A A T</p> 	<p>IVS13+51C>T (homozygot)</p> <p>Bei dieser Sequenzvariante handelt es sich um einen homozygoten Basenaustausch von C nach T, der bei 122 von 286 (43%) Patientenproben vorkam. In der Kontrollgruppe wurde die Variante bei 63 von 260 Proben (24%) detektiert.</p>
22	030473		<p>80 A T C C C T R A A G G T</p> 	<p>80 A T C C C T A A A G G T</p> 	<p>IVS22-4A>G</p>
26	239				<p>IVS26+47T>A</p>

Danksagungen

Prof. Dr. Olaf Rieß bin ich dankbar für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, meine Dissertation im Institut für Humangenetik Tübingen durchführen zu können. Außerdem bedanke ich mich herzlich für alle Ratschläge zur Auswertung der Ergebnisse sowie für die Übernahme der Erstkorrektur.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Peter Bauer für alle Hilfestellung beim Erlernen selbständigen Arbeitens, für die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen und für seinen engagierten Einsatz bei der Korrektur meiner Arbeit.

Prof. Dr. Rejko Krüger vom Hertie-Institut Tübingen danke ich für die Überlassung der Patienten-DNA zur Durchführung dieser Mutationsanalyse.

Daniela Lenz bin ich dankbar für die Einführung ins Labor, in die PCR, die Gelelektrophorese und die Sequenzierung sowie für die Einweihung in sämtliche Tipps, Tricks und Kniffe, die das Laborleben erleichtern.

Bei Is Jentsch möchte ich mich für die ausführliche Einführung in die Arbeitsweise am WAVE[®] bedanken. Ein großes Dankeschön für alle Hilfe und (auch telefonischen) Antworten bei akuten Notfällen, wenn „Stan“ mal wieder streikte....

Allen Mitarbeitern der Abteilung Medizinische Genetik und besonders Claudia Bauer, Anne Söhn, Carina Häbig und Janine Magg danke ich für die nette Aufnahme ins Labor, die tolle Arbeitsatmosphäre dort und ihre stets erwiesene Hilfsbereitschaft.

Alex („Frau Kollegin Dr. Ruoff“) danke ich, dass sie sich als meine Freundin jederzeit meine Sorgen und Nöte anhörte und mir bei etlichen Treffen sowie endlosen Telefonaten mit vielen hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand.

Bei Marko Jüttner und Jens Rödel bedanke ich mich für ihre Hilfe beim Drehen der Grafiken und beim Ausdrucken der Arbeit sowie für sämtliche Ideen zur Überlistung von Microsoft Word.

Meinen Eltern, Schwiegereltern und Großeltern – ich freue mich, dass es euch gibt! Danke für eure Liebe und Unterstützung!

Markus – mein Freund, mein Verlobter und jetzt mein Mann: ich danke Dir für Deine Liebe und Deine Ermutigungen!

Mein größter Dank gehört Gott, der mich geschaffen hat, der mich liebt und der seine Zusagen immer hält. Habakuk 3, 17+18 ...

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Simone Kopp, geb. Fingerle
Geburtsdatum	10.08.1982
Geburtsort	Tübingen
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1989 – 1990	Dorfschule Ohmenhausen
1990 – 1993	Freie Evangelische Schule Reutlingen
1993 – 2002	Johannes-Kepler-Gymnasium Reutlingen Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

10/2002 – 07/2004	Vorklinischer Studienabschnitt
08.09.2004	Ärztliche Vorprüfung
ab 10/2004	Klinischer Studienabschnitt
03/2006 – 09/2006	Forschungssemester am Institut für Humangenetik der Universität Tübingen, Abteilung Medizinische Genetik
02/2008 – 05/2008	Praktisches Jahr
05/2008 – 01/2009	Unterbrechung des Praktischen Jahres
01/2009 – 10/2009	Praktisches Jahr
11.05.2010	Ärztliche Prüfung (2. Abschnitt)