

**Mutationsanalyse und Assoziationsstudie  
im Mortalin/GRP75-Gen  
bei deutschen Parkinson-Patienten**

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

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

**vorgelegt von**

**Carina Schelling, geb. Hemminger**

**2014**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. R. Krüger

2. Berichtstatter: Professor Dr. H.-U.Häring

Meiner Großmutter Adelheid, die an Parkinson erkrankt war



# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Die Parkinson-Krankheit (PK) und ihre Geschichte .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Epidemiologie .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Klinik.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Diagnostik .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Therapie.....</b>	<b>16</b>
<b>1.6 Genetische Analysen .....</b>	<b>19</b>
1.6.1 Die Kopplungsanalyse .....	20
1.6.2 Whole exome und whole genome sequencing (WEA/WGA) .....	21
1.6.2.1 Whole exome sequencing.....	21
1.6.2.2 Whole genome sequencing (WGA) .....	21
1.6.3 Der Kandidatengenansatz .....	22
1.6.4 Assoziationsanalyse .....	23
<b>1.7 Biochemischer und genetischer Hintergrund.....</b>	<b>24</b>
1.7.1 PARK1 und PARK4 ( $\alpha$ -Synuklein) .....	27
1.7.2 PARK2 (Parkin) .....	30
1.7.3 PARK3.....	31
1.7.4 PARK5 (UCH-L1).....	32
1.7.5 PARK6 (PINK1) .....	33
1.7.6 PARK7 (DJ-1).....	34
1.7.7 PARK8 (LRRK2).....	35
1.7.8 PARK9 (ATP13A2) .....	37
1.7.9 PARK10.....	37
1.7.10 PARK11 (GIGYF2) .....	37
1.7.11 PARK12.....	38
1.7.12 PARK13 (Omi = HtrA2).....	38
1.7.13 PARK14 (PLA2G6) .....	40
1.7.14 PARK15 (FBXO7).....	40
1.7.15 PARK16.....	40
1.7.16 PARK17 (VPS35) .....	41
1.7.17 PARK18 (EIF4G1) .....	41
1.7.18 Weitere Suszeptibilitätsgene .....	42
<b>1.8 Molekulare Pathophysiologie .....</b>	<b>46</b>
1.8.1 Abnormale Proteinaggregation und gestörter Proteinabbau.....	47
1.8.2 Vermehrter oxidativer Stress .....	47
1.8.3 Mitochondriale Dysfunktion.....	48

<b>1.9</b>	<b>Das Mitochondrium .....</b>	<b>49</b>
1.9.1	Aufbau und Funktion.....	49
1.9.2	Rolle in der Pathogenese der PK.....	51
<b>1.10</b>	<b>Mortalin (HSPA9, GRP75, mtHsp70, PBP74) .....</b>	<b>54</b>
<b>1.11</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>57</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>59</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>59</b>
2.1.1	Chemikalien.....	59
2.1.2	Lösungen und Puffer .....	60
2.1.3	Verwendete Enzyme und dazu gehörende Puffer .....	60
2.1.4	Längenstandard.....	61
2.1.5	Reagenzienset (Kit) .....	61
2.1.6	Geräte.....	61
2.1.7	Verbrauchsmaterialien.....	63
2.1.8	DNA.....	63
2.1.9	Oligonukleotide.....	64
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>67</b>
2.2.1	DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion .....	67
2.2.1.1	Etablierung der PCR.....	69
2.2.1.2	<i>Touchdown</i> -Protokoll .....	71
2.2.1.3	Etablierung einer <i>Proofreading</i> -Polymerase.....	73
2.2.1.4	Etablierung der PCR zur Verwendung der Patienten-DNA .....	74
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	75
2.2.3	Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (DHPLC).....	76
2.2.4	Sequenzierung .....	81
2.2.4.1	Prinzip .....	81
2.2.4.2	Vorgehensweise.....	82
2.2.5	Restriktionsverdau .....	84
2.2.6	Statistik .....	86
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>89</b>
<b>3.1</b>	<b>Kodierender Basenaustausch in Exon 12 .....</b>	<b>89</b>
<b>3.2</b>	<b>Nicht kodierende Basenaustausche .....</b>	<b>92</b>
3.2.1	Analyse von Exon 16.....	92
3.2.2	Analyse von Exon 9.....	94
3.2.3	Analyse von Exon 8.....	97
3.2.4	Analyse von Exon 4.....	100
<b>3.3</b>	<b>Intronische Veränderungen .....</b>	<b>102</b>
3.3.1	Intron 11 (innerhalb des Amplifikats von Exon 12).....	102
3.3.2	Intron 8 (innerhalb des Amplifikats von Exon 9) .....	104
3.3.3	Intron 8 (innerhalb des Amplifikats von Exon 8) .....	107

3.3.3.1 Nachweis eines Basenaustauschs in Intron 8 .....	107
3.3.3.2 Nachweis einer Duplikation in Intron 8 .....	109
3.3.4 Intron 7 (innerhalb des Amplifikats von Exon 8) .....	111
3.3.5 Intron 1 (innerhalb des Amplifikats von Exon 1) .....	112
3.3.6 5'-nicht-kodierender Bereich/ Promotor-Region.....	114
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>117</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>130</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>132</b>
<b>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....</b>	<b>158</b>
<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>159</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>160</b>



## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\chi$	Chi
%	Prozent
'	Minute
”	Sekunde
°C	Grad Celsius
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
$\infty$	unendlich
AADC	<i>aromatic acid decarboxylase</i>
AcN	Acetonitril
AD	Alzheimer-Krankheit
AD	autosomal dominant
ADAGIO	<i>Attenuation of Disease progression with Azilect Given Once-daily</i>
AG	Arbeitsgruppe
AR	autosomal rezessiv
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATP13A2	ATPase type 13A2
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbumin
C	Cytosin
c.	<i>coding sequence</i>
Ca	Calcium
CBD	kortikobasale Degeneration
cDNA	kodierende DNA
CEPH	<i>Centre d'Etude du Polymorphisme Humain</i>
CI	Konfidenzintervall
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
CSGE	<i>conformation sensitive gel electrophoresis</i>

d.h.	das heißt
DAT	Dopamintransporter
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxyribonukleinsäuren
Del	Deletion
DHPLC	denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Engl.: <i>denaturing high performance liquid chromatography</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonucleasen
dNTPs	Desoxyribonukleotidphosphate
Drp1	<i>dynamin-related protein 1</i>
Dupl	Duplikation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIF4G1	<i>eucaryotic translation initiation factor 4-gamma</i>
engl.	Englisch
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ERK 1/2	<i>extracellular-signal-regulated kinase 1/2</i>
EtBr <sup>-</sup>	Ethidiumbromid
F	Fluor
FBXO7	<i>F-box only protein 7</i>
FDU	<i>FastDigest® Unit</i>
frz.	französisch
FTD	familiär vererbte frontotemporale Demenz
fwd	<i>forward</i> , vorwärts
G	Gonosomal
g	Gramm
G	Guanosin
GBA	Glukocerebrosidase
GIGYF2	<i>Grb10-interacting GYF protein 2</i>
GRP75	<i>glucose-regulated protein 75</i>
GWAS	<i>genome-wide association study</i>

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
hfis1	<i>human mitochondrial fission 1 protein</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
HSPA9	<i>heat shock 70kDa protein 9</i>
HtrA2	<i>high temperature requirement A2</i>
ID	Identifikator, eine Kennung
Ins	Insertion
IVS	<i>intervening sequence</i> (nicht-kodierend)
k	Kilo-, 10 <sup>3</sup> -
KO	<i>knockout</i>
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin, Synonym: Levodopa
LK	Lewy-Körper
LRRK2	<i>Leucine rich repeat kinase 2</i>
M	Mol
MAO-A	Monoaminoxidase-A
MAO-B	Monoaminoxidase-B
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau
Mfn	<i>Mitofusin</i>
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
MgCl <sup>2</sup>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenyl-pyridin
MPPP	1-Methyl-4-phenyl-4-propion-oxy-piperidin
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MRT	Magnetresonanztomographie
MSA	Multi-System-Atrophie
mtHsp70	mitochondriales Hitzeschockprotein 70
MTS	<i>mitochondrial targeting sequence</i> , mitochondriale Signalsequenz

Mut	Mutante
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; deutsch: Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation
NFM	Neurofilament-Untereinheit M
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nurr1	<i>nuclear receptor related 1</i>
OPA1	<i>optic atrophy 1</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
p	Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms
p	<i>probability</i> , Wahrscheinlichkeitswert
PBP74	<i>peptide binding protein 74</i>
pc	korrigierter p-Wert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	potentia hydrogenii (lat.: Stärke des Wasserstoffs)
PINK1	<i>PTEN (phosphatase and tensin homologue)-induced kinase 1</i>
PITX3	<i>Pituitary homeobox 3</i>
PK	Parkinson-Krankheit
PLA2G6	Phospholipase A2, Gruppe 6
PM	Punktmutation
PSP	<i>Progressive Supranuclear Palsy</i>
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i> , thermophiles Archaeobakterium
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
rev	<i>reverse</i> , rückwärts

RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
S	<i>sticky ends</i>
SNC	Substantia nigra pars compacta
SNCA	Alpha-Synuklein
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SPR3	<i>sporulation-regulated genes of yeast</i>
SSCP	<i>single strand conformational polymorphism analysis</i>
TAE	Trisacetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> , thermophiles Bakterium
TDGS	<i>two dimensional gene scanning</i>
TEAA	Triethylammoniumacetat
TH	<i>tyrosine hydroxylase</i>
TIM	<i>translocase of the inner membrane</i>
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
TRAP1	TNF-Rezeptor assoziiertes Protein-1
Tripl	Triplikation
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
UCH-L1	Ubiquitin-C-terminale Hydrolase-L1
UPDRS	<i>Unified Parkinson Disease Rating Scale</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
USA	<i>United States of America</i>
UTR	untranslatierter Bereich der DNA
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
VIM	ventrointermediäre Kerngebiete des Thalamus
VPS35	<i>vacuolar sorting protein 35</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WEA	<i>whole exome amplification</i>

WGA	<i>whole genome amplification</i>
Wt	Wildtyp
X	X-Chromosom
z.B.	zum Beispiel

Desweiteren wurden der Ein- sowie Dreibuchstabencode für Aminosäuren, die Standardabkürzungen für chemische Elemente sowie für DNA- und RNA-Basen als auch die Zeitschriftenabkürzungen des Index medicus verwendet.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Parkinson-Krankheit (PK) und ihre Geschichte

Die Parkinson-Krankheit wurde zum ersten Mal im Jahre 1817 von dem Londoner Arzt und Apotheker James Parkinson (1755 bis 1824) beschrieben. Der Titel seiner Abhandlung lautete „*An Essay on the Shaking Palsy*“ (Eine Abhandlung über die Schüttellähmung). Er beschrieb darin erstmals die Symptome der später nach ihm benannten neurodegenerativen Erkrankung, nämlich Tremor, Bradykinesie und posturale Instabilität. Der französische Nervenarzt Jean Marie Charcot ergänzte die Kardinalsymptome der Erkrankung um den Muskelrigor und gab ihr 1884 den Namen „Morbus Parkinson“, die Parkinson-Krankheit (PK). Über hundert Jahre später, im Jahre 1919, wurde die Ursache der PK von Tetriakoff krankhaften Veränderungen in der sogenannten schwarzen Substanz des Gehirns („*Substantia nigra*“) zugeschrieben. In den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurde ein Mangel des Botenstoffs Dopamin als biochemische Ursache der Erkrankung aufgedeckt. Bis heute stellt die kompensatorische Einnahme von L-Dopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin, Synonym: Levodopa), einer Vorläufersubstanz von Dopamin, die am besten wirksame Therapie (Goldstandard) dar.

## 1.2 Epidemiologie

Die Parkinson-Krankheit ist die häufigste neurodegenerative Bewegungsstörung und die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des Menschen nach der Alzheimer-Krankheit(AD) weltweit (Übersicht in Krüger, 2004). Mit zunehmender Lebensdauer nehmen dabei auch die Inzidenz (Zahl der Neuerkrankungen/ Zeitraum) und die Prävalenz (Zahl der Erkrankten zu einem Zeitpunkt) der PK zu. Die Prävalenz wird mit 100-200 Erkrankten pro 100.000 Einwohner angegeben, bei den über 80-Jährigen sind es sogar 4000 pro 100.000 Einwohner (Übersicht in Clarke, 2007). Damit ist die Prävalenz der 80-Jährigen mehr als zwanzigmal so hoch wie im Bevölkerungsdurchschnitt. Dies zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit, an Parkinson zu erkranken, mit zunehmendem Alter steigt und somit auch insgesamt eine Zunahme der Zahl

Betroffener in der Bevölkerung auf Grund der demographischen Entwicklung zu erwarten ist (Bower et al., 1999).

In den meisten Studien konnte eine höhere Inzidenz der Erkrankung beim männlichen Geschlecht gezeigt werden, ca. 1,5 bis 2 mal so hoch als beim weiblichen Geschlecht (Bower et al., 1999; Kuopio et al., 1999; Übersicht in Shulman, 2007).

Familiäre Formen machen insgesamt 5 bis 15% der Erkrankungen aus (Übersicht in Krüger, 2004). Dabei beläuft sich die Zahl der monogenetischen Erkrankungen derzeit bei 5-10%, diese dürfte in den nächsten Jahren durch die Entdeckung weiterer Genmutationen noch zunehmen. Für die Mehrzahl der Fälle ist allerdings von einer multifaktoriellen Genese, also einer Kombination von genetischer Prädisposition und dem Einfluss von Umweltfaktoren, auszugehen (Bower et al., 1999; Kuopio et al., 1999; Übersicht in Burbulla und Krüger, 2011). Kuopio und Kollegen konnten 1999 bei ihrer Studie in Finnland zeigen, dass es eine Häufung der PK im ländlichen Raum gibt, was möglicherweise durch Umweltfaktoren, wie z.B. der Exposition mit Pestiziden, zu erklären ist (Kuopio et al., 1999).

Bei Beginn der Erkrankung vor dem 50. Lebensjahr spricht man von einer *early-onset* Manifestation oder auch dem juvenilen Parkinson-Syndrom. Die Inzidenz hierfür wird mit 10 bis 20 pro 100.000 Einwohner angegeben (Übersicht in Krüger, 2004).

### **1.3 Klinik**

Unter dem Begriff „Parkinson-Syndrome“ wird eine heterogene Gruppe von Erkrankungen zusammengefasst, deren Gemeinsamkeit in der klinischen Symptomatik liegt. Die klassische Symptom-Trias, bestehend aus Tremor, Rigor und Akinese, wird häufig noch durch die posturale Instabilität ergänzt.

Schon Jahre vor dem Auftreten der ersten Symptome kommt es zu einem Untergang neuromelaninhaltiger dopaminergener Nervenzellen. Wenn mehr als 30% dieser Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra zugrunde gegangen sind (Ma et al., 1997; Greffard et al., 2006), kommt es, verursacht durch einen konsekutiven 50-70%igen Verlust an dopaminergen Markern im Striatum (Lee et al., 2000; de la Fuente-Fernandez et al., 2011), zu Störungen

im Zusammenspiel basalganglionärer Schaltkreise. Dies ist verantwortlich für die oben genannten klinischen Symptome. Meist liegt dem Parkinson-Syndrom ein neurodegenerativer Prozess zugrunde. Wenn die Ursache der Erkrankung nicht bekannt ist, spricht man *per definitionem* von einem idiopathischen Parkinson-Syndrom.

Es gibt auch sogenannte sekundäre Parkinson-Syndrome, bei denen im Vergleich zum idiopathischen Parkinson-Syndrom bzw. der Parkinson-Krankheit im engeren Sinn eine Ursache bekannt ist. Wichtige Beispiele hierfür sind der seltene posttraumatische Parkinsonismus, der unter anderem bei Boxern auftreten kann, oder der Parkinsonismus, der durch selektiv die dopaminergen Nervenzellen schädigende Umweltgifte, wie z.B. das 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP), hervorgerufen wird (Paulus, 2002), aber auch der häufiger beobachtete, durch Medikamente, etwa Neuroleptika, induzierte Parkinsonismus, der durch die antagonistische Wirkung an den Dopaminrezeptoren ausgelöst wird. Darüber hinaus können Parkinson-Syndrome auch im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen auftreten, was bei ca. einem Viertel der Fälle zu primären Fehldiagnosen im Frühstadium führt (Übersicht in Poewe und Wenning, 2002). Man spricht dabei von sogenannten Parkinson-plus-Syndromen. Darunter werden beispielsweise die Multi-System-Atrophie (MSA), das Steele-Richardson-Olszewski-Syndrom (auch *Progressive Supranuclear Palsy*, PSP, genannt) oder die kortikobasale Degeneration (CBD) zusammengefasst. Bei diesen Erkrankungen ist das Ansprechen auf eine L-Dopa-Therapie meist schlecht, da sich die Pathophysiologie oft nicht auf ein dopaminerges Defizit durch Schädigung der Substantia nigra beschränkt, sondern auch andere Hirnregionen und Transmittersysteme früh im Krankheitsverlauf betroffen sind (Übersicht in Wenning und Colosimo, 2010).

Die Parkinson-Krankheit zeigt häufig einen schleichenden und einseitigen Beginn. Die Hauptsymptome betreffen die Motorik, es kommt zu Tremor, unsicherem und kleinschrittigem Gangbild, posturaler Instabilität, Erstarren in der Bewegung sowie Mikrographie. Vor allem der zunehmende Verlust der Mimik und die Monotonie der Stimme, die oft als Interessellosigkeit fehlgedeutet

werden, wirken sozial behindernd. So treten häufig auch Depressionen auf, Psychosen sind nicht nur als Nebenwirkung der Medikation möglich (Übersicht in Clarke, 2007). Auch wenn die Parkinson-Krankheit nicht zwingend mit einer Demenz einhergeht, so ist sie doch bei Parkinson-Patienten sechs Mal häufiger als in der Normalbevölkerung (Übersicht in Emre, 2003). Zusätzlich treten vegetative Symptome wie Sialorrhoe, Hyperhidrosis, Seborrhoe und Obstipation auf, aber auch sensible Symptome wie Hyposmie, Parästhesien und Dysästhesien (Jost, 2008c, Müller, 2005a). Mit dem Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu einer zunehmenden Einschränkung der Lebensqualität, sowohl durch die zunehmende soziale Isolation als auch durch die abnehmenden motorischen Fähigkeiten.

#### **1.4 Diagnostik**

In den meisten Fällen wird die Diagnose durch die Untersuchung eines erfahrenen Neurologen über die typischen klinischen Symptome gestellt. Es sollen symptomatische Ursachen ausgeschlossen werden, auch eine kraniale Bildgebung ist für die Diagnosefindung wichtig. Verschiedene Skalen haben sich nicht nur bei der Diagnosestellung, sondern auch bei der Verlaufsbeobachtung als hilfreich erwiesen. Im Rahmen wissenschaftlicher Arbeiten wird überwiegend die *Unified Parkinson Disease Rating Scale* (UPDRS) eingesetzt. Der Skala liegt ein Punktesystem zugrunde. Die Einordnung der Patienten erfolgt im Interview. Es werden Fragen zu kognitiver Funktion, Verhalten und Stimmung sowie den Aktivitäten des täglichen Lebens gestellt, dann folgt noch eine motorische Untersuchung. Die Antworten bzw. Untersuchungsergebnisse werden jeweils mit einer bestimmten Punktzahl bewertet. Eine Zusammenstellung der abgefragten und untersuchten Inhalte sowie die Auswertung der erzielten Punkte sind beispielsweise auf der Webseite des *Massachusetts General Hospital* zu finden (<http://neurosurgery.mgh.harvard.edu/functional/pdstages.htm> am 18.10.2011). Das Ansprechen auf L-Dopa stellt ein weiteres wichtiges Diagnosekriterium dar, überprüft durch einen Levodopa- oder Apomorphintest (Müller, 2005b). Wie bereits erwähnt, sollte in die Diagnostik aber auch mindestens einmal ein kranial bildgebendes Verfahren mit einbezogen werden.

Die konventionelle Magnetresonanztomographie (MRT) kann zwar keine Aufschlüsse über intrazerebrale Stoffwechselfvorgänge bringen, ist jedoch gerade bei Erkrankungsbeginn unverzichtbar zum Ausschluss einer symptomatischen Genese des Parkinson-Syndroms, wie z.B. als Folge vaskulärer Läsionen oder anderer struktureller Schädigungen im Bereich der Basalganglien.

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) erlaubt hingegen einen Einblick in das Geschehen auf Zellebene. Über eine Analyse der [<sup>18</sup>F]-Dopa-Aktivität kann auf die Zahl der vorhandenen dopaminergen Nervenzellen und den Dopamingehalt in der Substantia nigra zurückgeschlossen werden (Übersicht in Snow, 1996). Dies ermöglicht sowohl eine frühe Diagnosestellung, auch schon in der präklinischen Phase, als auch eine Therapiekontrolle bei der manifesten Erkrankung (Gerhard, 2003; Snow et al., 1993).

Eine neuere, ebenfalls in der Differentialdiagnose einsetzbare Methode mit hoher Sensitivität aber geringem positivem prädiktivem Wert ist der transkraniale Ultraschall. Damit lässt sich bei ca. 90% der Parkinsonpatienten eine erhöhte Echogenität der Substantia nigra nachweisen im Vergleich zu ca. 10% bei gesunden Kontrollen. Eine erhöhte Echogenität der Substantia nigra kann bei Patienten mit atypischen oder symptomatischen Parkinson-Syndromen nur selten gefunden werden. Neuropathologisch ist dieses Phänomen mit erhöhten Eisenkonzentrationen und einem erniedrigten Melanin Gehalt zu erklären, dies konnte in Tierstudien und *post mortem*-Analysen von menschlichem Gehirngewebe gezeigt werden. Es könnte somit ein wichtiges Instrument bei der Früherkennung der PK werden. Auch stellt die Sonographie eine nicht invasive Untersuchung zur Verlaufsbeurteilung dar, die langsam immer mehr in die Routineuntersuchung integriert wird (Berg et al., 2006a und 2006b).

Der postmortale Nachweis von Lewykörpern im Gehirn ist charakteristisch und beweisend für die Erkrankung. Diese Einschlusskörper kommen zunächst im Zytoplasma von Nervenzellen vor, insbesondere in der Substantia nigra und dem Locus coeruleus, im weiteren Krankheitsverlauf finden sie sich aber auch in sehr vielen anderen Hirnregionen, einschließlich des Kortex.

Von der Symptomatik her würde man erwarten, dass die Pathologie der Erkrankung in der Substantia nigra beginnt. Braak und Kollegen konnten allerdings beweisen, dass die Entwicklung von Lewyneuriten und Lewykörpern im Bereich der Hirnnervenkerne beginnt und erst später auch die Basalganglien und kortikale Bereiche betrifft (Braak et al., 2002 und 2003). Somit ist von einer prodromalen Phase auszugehen, bevor die motorischen Symptome sichtbar werden.

### 1.5 Therapie

Trotz intensiver Bemühungen in der Forschung, vielen neuen Erkenntnissen über die Erkrankung und einer zwischenzeitlich effektiven symptomatischen Therapie ist eine Heilung der PK bisher noch Wunschdenken. Es kann lediglich eine Unterdrückung und Linderung der Symptomatik und allenfalls ein geringes Hinauszögern des Fortschreitens der Erkrankung erreicht werden. Dies konnte in der ADAGIO (*Attenuation of Disease progression with Azilect Given Once-daily*)-Studie demonstriert werden. Dabei wurden zwei Patientengruppen verglichen. Die erste Patientengruppe erhielt 1mg Rasagilin für 72 Wochen, die zweite bekam in den ersten 36 Wochen Placebo und ab der 37. Woche dieselbe Menge Rasagilin wie die erste Gruppe. Die Patienten, bei denen erst nach 36 Wochen mit der Rasagilin-Therapie begonnen wurde und zunächst Placebo erhielten, zeigten eine signifikant schlechtere motorische Funktion, gemessen mit der UPDRS, als die Patienten, bei denen sofort mit Rasagilin therapiert wurde. Derselbe Vergleich wurde auch mit einem Therapieschema mit jeweils 2mg Rasagilin durchgeführt. Unerwarteterweise gab es dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Olanow et al., 2009). Der Effekt gilt daher noch als unsicher.

Seit den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts wird die Vorläufersubstanz des Dopamins, das L-Dopa, als Medikament eingesetzt. Es kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und damit zum Ort des Dopaminmangels vordringen. Dies war der Durchbruch für eine effektive symptomatische Therapie. Im Laufe der Zeit wurde allerdings erkannt, dass die symptomatische Therapie mit L-Dopa periphere Nebenwirkungen hat (Übersicht in Barbeau, 1969) und es mit anhaltender Therapie zu einem Wirkungsverlust mit motorischen Fluktuationen

kommt. Es mussten also neue Medikamente entwickelt und ausgetestet werden. Das Prinzip der pharmakologischen Therapie ist allerdings dasselbe geblieben, Ziel bleibt der Ausgleich des striatalen Dopamindefizits (Eggert et al., 2008; Übersicht in Clarke, 2007; Jost, 2008a; Müller, 2005c).

Einen Überblick über die gängigen Medikamente, die häufig auch miteinander kombiniert werden, gibt Tabelle 1.1.

**Tabelle 1.1: Überblick über in der Therapie des idiopathischen Parkinson-Syndroms häufig eingesetzte Medikamente sowie deren Wirkmechanismus und Wirkprinzip (modifiziert nach Gerlach et al., 2007b)**

Wirkstoff	Wirkmechanismus	Wirkprinzip
L-Dopa	Vorstufe des Dopamins, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann	Erhöhte Dopaminkonzentration
Carbidopa	Hemmung der peripheren DOPA-Decarboxylase	Erhöhte Dopaminkonzentration
Dopaminagonisten, z.B. Bromocriptin	D2-Rezeptor-Agonisten	Synergistische Dopaminwirkung
NMDA-Antagonisten, z.B. Amantadin	NMDA-Rezeptor-Antagonisten	Bessere Dopaminwirkung durch verminderte Glutamatwirkung
COMT-Hemmer, z.B. Entacapon	Hemmung der Catechol-O-Methyl-Transferase	Verzögerter Dopaminabbau
MAO-B-Hemmer, z.B. Selegilin	Hemmung der Monoaminoxidase B	Verzögerter Dopaminabbau
Anticholinergika, z.B. Biperiden (wegen kognitiver Nebenwirkungen kaum eingesetzt)	Muskarin-Rezeptor-Antagonist	Bessere Dopaminwirkung durch Unterdrückung der cholinergen Aktivität

Aber auch supportive, nicht medikamentöse Therapien wie beispielsweise Physiotherapie, Ergotherapie und Logopädie sollten in die Behandlung der PK mit einbezogen werden. Sie sind ein unverzichtbarer Bestandteil einer ganzheitlichen Therapie, um möglichst viele Fertigkeiten der Patienten zu erhalten, die für das tägliche Leben notwendig sind.

Desweiteren werden seit einigen Jahren auch operative Therapiemöglichkeiten angeboten, die häufig allerdings erst nach Ausschöpfen der Pharmakotherapie in Erwägung gezogen werden. Aber auch das ist kein kurativer Therapieansatz,

sondern eine rein symptomatische Behandlung (Übersicht in Clarke, 2007; Müller, 2005c).

Ein erfolgreich angewandtes Verfahren stellt die Neurostimulation oder Tiefe Hirnstimulation dar. Dabei werden den Parkinson-Patienten von Neurochirurgen Elektroden im Bereich des Nucleus subthalamicus implantiert, die an einen Impulsgenerator – ähnlich einem Schrittmacher – angeschlossen werden. Dieser wirkt dann hemmend auf die im Krankheitsfalle überaktiven Neurone im Nucleus subthalamicus und reduziert somit pathologische Oszillationen in den Basalganglien. Eine Verbesserung der Symptomatik ist mit dieser Methode auch im Langzeitverlauf zu erreichen. Im Gegensatz zur alleinigen medikamentösen Therapie mit L-Dopa hat die Neurostimulation den Vorteil, dass die Wirkung gleichmäßiger ist und so Fluktuationen und Dyskinesien verbessert werden. Die Patienten müssen aber weiterhin Antiparkinsonmedikamente einnehmen, die Medikation kann aber meist deutlich verringert werden. Ein weiterer Vorteil dieser Behandlungsmethode ist, dass sie an die Bedürfnisse des Patienten zu jeder Zeit durch eine Änderung der Stimulationsparameter angepasst werden kann (Kleiner-Fisman et al., 2003; Jost, 2008b).

Bis vor einigen Jahren wurde auch noch ein anderes operatives Verfahren angewandt, die Thermokoagulation. Es wurden dabei Sonden in das Zielgewebe des Gehirns eingebracht und dort kleine Areale des Nervengewebes durch Hitzeeinwirkung mittels Hochfrequenzstrom irreversibel zerstört. Zielgebiete waren dabei der Globus pallidus internus (Pallidotomie), ventrointermediäre Kerngebiete (VIM) des Thalamus (Thalamotomie) oder der Subthalamus (Subthalamotomie). Großer Nachteil dieses Läsionsverfahrens ist seine Irreversibilität, zusätzlich hat es eine hohe Nebenwirkungsrate, mit Dysarthrie, Paresen, Gesichtsfelddefekten oder neuropsychologischen Veränderungen, die *post interventionem* nicht mehr adjustierbar sind. Daher wurden die läsionellen Verfahren meist nur einseitig angewandt (Übersicht in Koller et al., 1999; Jost, 2008b).

Die Transplantation dopaminergischer Zellen in das Gehirn hat bislang nicht den erhofften Erfolg gebracht. Versuche mit Zellen aus dem Nebennierenmark

gelangen nicht. Bei der Verwendung von fetalen Zellen wurde das nigrale Gewebe von 6-8 Föten benötigt, um eine erwünschte Wirkung zu erreichen. Im Falle einer Überdosierung waren die Nebenwirkungen praktisch nicht zu beherrschen. Darüber hinaus wirft diese Methode viele ethische Fragen auf, so wird sie nur von wenigen weiterverfolgt (Levy et al., 2004; Übersicht in Wang et al., 2007). Inwieweit alternativ pluripotente Stammzellen als Zellersatztherapie eingesetzt werden können, muss die Zukunft erweisen (Übersicht in Preynat-Seauve et al., 2009; Übersicht in Ganz et al., 2011).

## 1.6 Genetische Analysen

Große Fortschritte hat es in den letzten Jahrzehnten bei der Erforschung der genetischen Ursachen der Parkinson-Krankheit gegeben. Um genetische Veränderungen zu entdecken, wäre es naheliegend, die gesamte Erbinformation verschiedener Parkinson-Patienten systematisch auf genetische Auffälligkeiten zu untersuchen. Das Genom einer großen Anzahl Patienten komplett zu sequenzieren, wäre zwar aktuell technisch machbar, ist aber zur Zeit noch finanziell schwierig umsetzbar, da beim Menschen, wie durch das *Human Genome Project* herausgefunden wurde, die DNA ca. 20-25.000 Gene enthält und das Genom auf Grund der vielen nicht kodierenden Abschnitte aus etwa drei Milliarden Basenpaaren besteht ([http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/home.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml) am 20.10.2011; Strachan und Read, 2005c).

Daher behilft man sich bei der Untersuchung genetischer Zusammenhänge mit verschiedenen Strategien: der Kopplungsanalyse (Polymeropoulos et al., 1997; Kitada et al., 1998) sowie *whole exome* oder *whole genome sequencing* (Zimprich et al., 2011; Vilariño-Güell et al., 2011) bei Familien, in denen viele Familienzugehörige von der Erkrankung betroffen sind, oder dem Kandidatengenansatz (Strauss et al., 2005), bei dem Patienten mit sporadischer und familiärer PK auf Mutationen in Genen untersucht werden, die theoretisch in den Pathomechanismus der Erkrankung involviert sein könnten.

### 1.6.1 Die Kopplungsanalyse

Von Kopplung spricht man, wenn Gene oder allgemein DNA-Sequenzen auf Grund ihrer räumlichen Nähe auf einem Chromosom miteinander vererbt werden. Je näher sich zwei Genorte sind, desto wahrscheinlicher ist eine Kopplung. Umgekehrt ist eine zufällige Trennung wahrscheinlicher, je weiter sie auf dem Chromosom voneinander entfernt liegen. Verantwortlich dafür ist die Meiose, die Reifeteilung einer Zelle. Dabei bilden mütterliche und väterliche Chromosomen Überkreuzungsstrukturen, was man auch Crossing-over nennt, und es kommt zum zufälligen Austausch entsprechender homologer Chromosomensegmente. Dieser Vorgang führt also zu einer Rekombination von Erbgut. Wenn sich zwei Loci auf zwei verschiedenen Chromosomen befinden, werden sie unabhängig voneinander vererbt, befinden sie sich dagegen auf demselben Chromosom, werden sie umso häufiger miteinander vererbt, je näher sie beieinander liegen. Denn die Wahrscheinlichkeit für *Crossing-over*-Ereignisse, die die Genloci voneinander trennen, steigt mit der Entfernung. Diese Eigenschaft macht man sich bei Kopplungsanalysen zunutze. Es werden also zwei Loci, die nahe beieinander auf dem Chromosom liegen, häufig gekoppelt vererbt. Bei der Kopplungsanalyse werden Mikrosatellitenmarker oder andere bekannte Gensequenzen, sogenannte genetische Marker, eingesetzt, die sich über das gesamte Genom verteilen. Nun gilt es die Marker herauszufinden, die mit dem genetischen Defekt gekoppelt sind, also am häufigsten gemeinsam vererbt werden. Häufig wird die Kopplungsanalyse bei Familien mit vielen erkrankten Mitgliedern angewandt. Es werden dabei die genetischen Marker bei betroffenen und gesunden Familienmitgliedern analysiert. Wenn man nun die genetischen Merkmale innerhalb der Familie vergleicht, kann man Rückschlüsse auf einen chromosomalen Abschnitt ziehen, da z.B. ein bestimmtes Merkmal immer gemeinsam mit der Erkrankung an betroffene, nicht aber an gesunde Nachkommen weitervererbt wurde. Innerhalb dieses Chromosomenabschnitts kann dann die krankheitsverursachende Mutation mittels einer Sequenzanalyse von Kandidatengenen (siehe Kapitel 1.6.3) ermittelt werden. Die Gene, die sich auf diesem Abschnitt befinden, können z.B. mit Hilfe von cDNA-Datenbanken

oder über GC-reiche Regionen, die vor allem in häufig transkribierten DNA-Bereichen zu finden sind, identifiziert werden. Oft lässt sich aber der Bereich nicht eng genug eingrenzen, so dass in einem Locus meistens viele Gene liegen (Strachan und Read, 2005f).

Die Identifikation der PARK-Loci zeigt, wie wertvoll die Kopplungsanalysen zur Ermittlung von Krankheitsgenen sind. In der Zwischenzeit konnten fast allen Loci Gene zugeordnet werden.

## **1.6.2 Whole exome und whole genome sequencing (WEA/WGA)**

### **1.6.2.1 Whole exome sequencing**

Beim *whole exome sequencing* werden nur die kodierenden Regionen der DNA sequenziert. Das menschliche Genom besteht aus ca. 180.000 Exons. Dies entspricht ca. 1% des Gesamtgenoms des Menschen und hat eine Länge von 30 Megabasen (Ng et al., 2009). Es wird geschätzt, dass die Protein kodierenden Regionen des Genoms ca. 85% der krankheitsverursachenden Genveränderungen enthalten (Choi et al., 2009).

Im Vergleich zu *whole genome sequencing* stellt diese Methode auf Grund des geringeren Umfangs der Sequenzierung eine günstigere Alternative dar, die trotzdem sehr effektiv ist. Allerdings entgehen dabei Genveränderungen in nicht-kodierenden Bereichen.

Auch bei Familien mit autosomal dominant vererbter PK wurde dieses Verfahren schon erfolgreich angewandt. So konnte bei einer österreichischen und schweizerischen Familie ein neuer PARK-Locus mit zugehörigem Gen identifiziert werden (PARK17/ VPS35) (Zimprich et al., 2011; Vilariño-Güell et al., 2011).

### **1.6.2.2 Whole genome sequencing (WGA)**

Beim *whole genome sequencing* wird das gesamte Genom eines Individuums, also kodierende und nicht-kodierende DNA, zu einem Zeitpunkt sequenziert.

Da diese Methode bisher noch sehr kostenintensiv ist, wird sie bisher noch nicht standardmäßig zur Detektion von Mutationen angewandt. Zukünftig könnte diese Methode aber auf Grund der fallenden Kosten der

Sequenzierungstechnologie die Microarray-basierte Genotypisierung ablösen (Übersicht in Ng und Kirkness, 2010).

### **1.6.3 Der Kandidatengenansatz**

Zur Bestimmung unbekannter Krankheitsgene zieht man einen sogenannten Kandidatengenansatz zu Hilfe (Strachan und Read, 2005e). Auf der Basis grundlagenwissenschaftlicher Erkenntnisse wird eine Hypothese zur Entstehung einer Erkrankung aufgestellt. Ein möglicher Krankheitslokus könnte ein Gen sein, das ein Protein kodiert, was mit der Krankheitsentstehung in Verbindung gebracht worden ist. Es wird nun versucht, diese Hypothese zu beweisen oder zu widerlegen.

Oft werden als potentielle Kandidaten auch Gene ausgesucht, die eine strukturelle Verwandtschaft (z.B. ähnlicher Aufbau) oder eine verbindende Pathogenese (z.B. Partizipation am gleichen Stoffwechselweg) mit Genen haben, deren Genlokus bereits bekannt ist und deren Mitwirken an der Pathogenese der Erkrankung bereits nachgewiesen werden konnte.

Auch Gene, die bestimmte Funktionen oder Expressionsmuster besitzen, sind geeignet für einen Kandidatengenansatz. Dabei handelt es sich etwa um Gene, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Embryogenese aktiv sind, oder solche, die das Protein kodieren, das bei der untersuchten Krankheit defekt ist.

Oft wurde auch schon ein Krankheitslokus auf einem Chromosom entdeckt, aber bisher noch kein passendes Gen dazu gefunden. Liegt ein Gen nun in chromosomaler Nähe zu diesem Lokus, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass dieses Gen eine Veränderung aufweist, die krankheitsverursachend ist.

Sehr selten ist zu einem Tiermodell, das mit einer Krankheit in Verbindung steht, ein Gen bekannt. Es kann dann das entsprechende menschliche Gen untersucht werden. Dieses Prinzip ist z.B. bei PARK13 erfolgreich angewandt worden: Auf Grund eines Parkinson-ähnlichen Phänotyps bei Omi/HtrA2-*knockout*-Mäusen wurde ein Mutationsscreening bei Parkinsonpatienten initiiert, das Genveränderungen im Omi-Gen nachweisen konnte (Strauss et al., 2005).

Ist das Kandidatengen ausgewählt, kann mit dem Screening begonnen werden. Dazu muss von einer großen Anzahl Patienten, aber auch gesunder Kontrollen, die DNA auf Mutationen untersucht werden. Es sollte gezeigt werden, dass das

Kandidatengen bei erkrankten Personen tatsächlich verändert ist, nicht jedoch bei den gesunden Kontrollen, was sonst auf eine Normvariante hindeuten könnte (Strachan und Read, 2005e).

Dennoch kann von einer veränderten Sequenz nicht sofort auf die Pathogenität geschlossen werden. Wie bereits erwähnt, sollte die Mutation nicht bei gesunden Kontrollen gefunden werden. Hinweis auf eine pathogene Rolle ist zum einen eine gefundene Genveränderung in einem hochkonservierten Bereich (dies lässt sich im Interspezies-Vergleich zeigen), zum anderen eine Veränderung der Proteinfunktion (*in vitro*, besser *in vivo*).

#### **1.6.4 Assoziationsanalyse**

Um herauszufinden, ob ein gefundenes Merkmal tatsächlich mit einer Krankheit in Verbindung steht, muss statistisch bestätigt werden, dass es im untersuchten Kollektiv häufiger auftritt als in der durchschnittlichen Bevölkerung. Dazu zieht man als Vergleich eine Kontrollgruppe hinzu, die von den nicht zu untersuchenden Merkmalen wie beispielsweise Alter und Geschlecht (im Idealfall sogar mit den gleichen Umweltbedingungen) möglichst nahe an das Patienten-Kollektiv herankommt. Mit Hilfe einer Vier-Felder-Tafel (siehe hierzu auch das Kapitel 2.2.6 Statistik) wird dann ein Zusammenhang bestätigt oder ausgeschlossen.

Heutzutage werden auch groß angelegte genomweite Assoziationsstudien (GWAS, engl. *genome-wide association study*) durchgeführt. Dabei werden ebenfalls zwei Gruppen gebildet: Eine Gruppe, welche den Phänotyp von Interesse zeigt, sowie eine Vergleichsgruppe. Anhand von DNA-Markern (meist SNPs) werden die beiden Gruppen auf genomische Variationen untersucht. Tritt eine DNA-Variante gehäuft bei den Merkmalsträgern auf, dagegen selten oder nicht in der Kontrollgruppe, kann von einer Assoziation mit der Erkrankung/ dem Phänotyp ausgegangen werden (Simón-Sánchez et al., 2009).

Eine kausale Verbindung kann mit der Assoziationsanalyse nicht nachgewiesen werden, jedoch kann sie eine pathogenetische Relevanz des Merkmals andeuten. Diese Methode wird angewandt, wenn wie bei Patienten mit der sporadischen Form der PK kein ausreichend großer Stammbaum für Kopplungsanalysen zur Verfügung steht (Strachan und Read, 2005f).

## **1.7 Biochemischer und genetischer Hintergrund**

Der Pigmentverlust der Substantia nigra und des Nucleus coeruleus gilt heutzutage als patho-anatomisches Merkmal der Parkinson-Krankheit. Zusätzlich findet man bei Patienten mit der PK eosinophile intrazytoplasmatische Proteineinschlüsse in Neuronen der betroffenen Hirnregionen, die zum ersten Mal 1913 von dem Berliner Neuropathologen Lewy beschrieben und dann auch nach ihm als Lewy-Körper (LK) benannt wurden (Gerlach et al., 2007a).

Sano und Kollegen fanden 1959 heraus, dass die Konzentration von Dopamin im Striatum bei Parkinsonpatienten erniedrigt ist.

Weitere Erkenntnisse gewann man durch die sogenannten „erstarrten Süchtigen“. Im Jahre 1983 stellten sich mehrere junge Drogenabhängige in einer Klinik vor, nachdem sie nach Verabreichung von selbst hergestelltem synthetischem Heroin plötzlich nahezu bewegungsunfähig geworden waren (Langston et al., 1983). Bei der Analyse des selbst hergestellten Heroins wurde neben dem eigentlichen Wirkstoff auch MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) gefunden. Bereits 1979 fanden Davis und Kollegen heraus, dass eine Intoxikation mit MPTP (Davis und Kollegen selbst hatten die toxische Substanz allerdings noch nicht identifiziert, sondern gingen noch von MPPP aus) eine selektive Schädigung dopaminerger Nervenzellen der Substantia nigra und eine Depletion von Dopamin aus dem Striatum verursacht und damit zu ähnlichen Symptomen wie bei der PK führt (Davis et al., 1979).

Dies konnte in Versuchen mit Mäusen und Affen reproduziert werden. Somit hatte man erstmals Tiermodelle zur Verfügung, die einen Teil der Pathophysiologie der Erkrankung wiedergaben und somit die Entwicklung von Medikamenten mit dem Ziel des Dopamin-Ersatzes ermöglichten (Gerlach et al., 2007c).

Interessanterweise zeigen ältere Tiere im Allgemeinen eine empfindlichere Reaktion auf MPTP als jüngere und sind weniger regenerationsfähig (Gerlach et al., 2007c).

In weiteren Untersuchungen fand man heraus, dass MPTP durch die körpereigenen Enzyme Monoaminoxidase-A (MAO-A) und

Monoaminoxidase-B (MAO-B) in MPP<sup>+</sup> (1-Methyl-4-phenyl-pyridin), den eigentlichen toxischen Metaboliten, umgewandelt und dann über einen aktiven Transportmechanismus durch den Dopamintransporter (DAT) in die dopaminerge Zelle eingeschleust wird. Der aktive Metabolit MPP<sup>+</sup> führt in diesen Zellen über eine irreversible Hemmung des mitochondrialen Komplex I der Atmungskette zum sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose) dieser Nervenzellen (Salach et al., 1984; Javitch et al., 1985; Nicklas et al., 1985; Singer et al., 1986; Schapira et al., 1990; Cleeter et al., 1992; Richardson et al., 2007).

Wie bereits erwähnt geht man heutzutage von einer multifaktoriellen Genese der Parkinson-Krankheit aus. Neben dem Einfluss von Umweltfaktoren wie z.B. der Exposition von Neurotoxinen wie dem MPTP wird ebenso eine genetische Prädisposition für die idiopathische Form der PK diskutiert. Ende der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und genetischen Veränderungen bewiesen werden. Polymeropoulos und Kollegen gelang es im Jahre 1996 über klinisch-genetische Analysen des Stammbaums einer großen italienisch-amerikanischen Familie mit autosomal-dominant-vererbter PK, einen Locus auf Chromosom 4 als krankheitsverursachend zu identifizieren (Polymeropoulos et al., 1996). Zu diesem Genort wurde kurze Zeit später die zugehörige Mutation mit Aminosäurenaustausch von Alanin nach Threonin an Position 53 (Ala53Thr) im  $\alpha$ -Synuklein-Gen gefunden (Polymeropoulos et al., 1997).

Inzwischen gelang die Identifikation weiterer Gene für erbliche Formen der Parkinson-Krankheit. Diese sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst. Diese intensive Forschung trug auch dazu bei, neue Hypothesen zur Pathophysiologie der PK zu gewinnen.

**Tabelle 1.2: Zusammenfassung der bereits identifizierten Genloci in der Parkinson-Krankheit**

Lokus	MIM Nr.	Erbgang	Genort	Gen	Mutationstyp	Beschreiber
PARK1	168601	AD	4q21	$\alpha$ -Synuklein	PM	Polymeropoulos et al., 1997
PARK2	600116	AR	6q25.2-q27	Parkin	Del/Ins/Tripl/PM	Kitada et al., 1998
PARK3	602404	AD	2p13	-	-	Gasser et al., 1998
PARK4	605543	AD	4q21	$\alpha$ -Synuklein	Dupl/Tripl	Singleton et al., 2003
PARK5	191342	AD	4p14	UCH-L1	PM	Leroy et al., 1998
PARK6	605909	AR	1p36	PINK1	PM/Ins	Valente et al., 2001 und 2004
PARK7	606324	AR	1p36	DJ-1	Del/PM	van Duijn et al., 2001 Bonifati et al., 2002 und 2003a
PARK8	607060	AD	12q12	LRRK2/ Dardarin	PM	Funayama et al., 2002 und 2005 Zimprich et al., 2004
PARK9	606693	AR	1p36	ATP13A2	PM	Hampshire et al., 2001 Ramirez et al., 2006
PARK10	606852	AD	1p32	-	-	Hicks et al., 2002
PARK11	607688	AD	2q37.1	GIGYF2	PM	Pankratz et al., 2002 und 2003 Lautier et al., 2008
PARK12	300557	G	Xq21-q25	-	-	Pankratz et al., 2003
PARK13	610297	AD	2p12	OMI/ HtrA2	PM	Strauss et al., 2005
PARK14	612953	AR	22q13.1	PLA2G6	PM	Gregory et al., 2009 Paisan-Ruiz et al., 2009
PARK15	260300	AR	22q12-q13	FBXO7	PM	Shojaee et al., 2008 Di Fonzo et al., 2009
PARK16	613164	AR	1q32	-	-	Satake et al., 2009

Lokus	MIM Nr.	Erbgang	Genort	Gen	Mutationstyp	Beschreiber
						Simón-Sánchez et al., 2009
PARK17	614203	AD	16q11.2	VPS35	PM	Wider et al., 2008 Vilariño-Güell et al., 2011 Zimprich et al., 2011
PARK18	614251	AD	3q27.1	EIF4G1	PM	Chartier-Harlin et al., 2011

AD=autosomal dominant, AR=autosomal rezessiv, G=gonosomal, PM=Punktmutation, Del=Deletion, Ins=Insertion, Tripl=Triplikation, Dupl=Duplikation

### 1.7.1 PARK1 und PARK4 ( $\alpha$ -Synuklein)

Das erste Gen, bei dem ein Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit bestätigt werden konnte, war das  $\alpha$ -Synuklein-Gen. Folgerichtig wird es auch das PARK1-Gen genannt. Es liegt auf dem langen Arm von Chromosom 4 (4q21). Mutationen dieses Gens werden autosomal dominant vererbt. Insgesamt sind nur wenige Familien mit einer Punktmutation in PARK1 bekannt. Die meisten dieser Familien stammen aus dem Mittelmeerraum und sind Genträger des Aminosäureaustauschs von Alanin zu Threonin an Position 53 der Proteinsequenz (Ala53Thr), der als erstes entdeckt worden war. Klinisch zeichnet sich diese Form der vererbten PK durch einen frühen Beginn und einen rasch progredienten Verlauf aus (Polymeropoulos et al., 1997).

Später wurden im gleichen Gen noch weitere Genveränderungen mit Krankheitswert gefunden. Bei einer deutschen Familie konnten Krüger und Kollegen 1998 den Aminosäureaustausch Ala30Pro nachweisen, deren Klinik der sporadischen PK sehr ähnlich ist (Krüger et al., 1998).

Zarranz und Kollegen stießen 2004 auf einen weiteren Aminosäureaustausch (Glu46Lys), der neben der PK auch zu einer Demenz vom Lewykörper-Typ führt. Dies unterstreicht erneut den engen pathophysiologischen Zusammenhang dieser beiden Erkrankungen (Zarranz et al., 2004).

Aktuell wurden zwei weitere Mutationen entdeckt. Appel-Cresswell und Kollegen fanden einen Aminosäureaustausch von Histidin zu Glutamin an Position 50 der Aminosäuresequenz (Appel-Cresswell et al., 2013), die

Arbeitsgruppe um Lesage konnte den Aminosäureaustausch Gly51Asp nachweisen (Lesage et al., 2013).

Aber auch bei Patienten mit sporadischer PK spielt das  $\alpha$ -Synuklein eine große Rolle. Es ist ein Hauptbestandteil der Lewy-Körper, auch bei Patienten, bei denen keine Mutation nachgewiesen werden konnte (Spillantini et al., 1997). Die Bildung von Lewy-Körpern findet also unabhängig von einer Mutation im  $\alpha$ -Synuklein-Gen statt. In den Gehirnschnitten von Patienten mit Multisystematrophien, Demenz vom Lewykörper-Typ sowie der Lewykörpervariante der Alzheimer-Krankheit konnten ebenfalls  $\alpha$ -Synuklein-positive Aggregate gefunden werden (Spillantini et al., 1997).

Obwohl Mutationen im  $\alpha$ -Synuklein-Gen bei sporadischen Parkinsonpatienten nicht nachgewiesen werden konnten (Berg et al., 2005), beobachtet man wie bereits erwähnt auch bei Patienten mit sporadischer PK eine Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein in betroffenen Hirnarealen, was darauf hindeutet, dass auch Wildtyp- $\alpha$ -Synuklein eine Rolle bei der Neurodegeneration spielt.

Tatsächlich wurde neben den bereits beschriebenen Punktmutationen gezeigt, dass Duplikationen und Triplikationen des Wildtyp-Gens auch eine autosomal-dominant vererbte Form der PK mit charakteristischen  $\alpha$ -Synuklein-positiven Lewykörpern hervorrufen können (Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004). Das deutet darauf hin, dass nicht nur die seltenen pathogenen Mutationen die PK verursachen, sondern auch erhöhte Level von Wildtyp- $\alpha$ -Synuklein auf Grund von genomischer Vervielfachung zu Neurodegeneration führen, was den Beweis für einen Dosis-Effekt des nicht-mutierten Proteins darstellt. Dies konnte anhand einer Familie mit autosomal-dominant vererbter PK bewiesen werden. Die betroffenen Mitglieder der ‚Iowa Kindred‘, einer großen Familie aus Iowa, haben die Besonderheit, dass das  $\alpha$ -Synuklein-Gen gleich dreimal auf einem Chromosom vorhanden ist, als sogenannte Triplikation, und damit also in einer diploiden Zelle vier Kopien gleichzeitig vorliegen. Es scheinen alle vier Allele abgelesen zu werden, denn bei diesen Triplikationsträgern ist die Konzentration von  $\alpha$ -Synuklein im Blut und Gehirn etwa doppelt so hoch wie bei Menschen, die nur zwei Kopien pro Zelle besitzen

(Miller et al., 2004). In weiteren Familien konnte auch eine Duplikation des PARK1-Gens nachgewiesen werden (Chartier-Harlin et al., 2004).

Da zunächst der Genlocus der Mutation der ‚*lowa Kindred*‘ auf den kurzen Arm von Chromosom 4 kartiert worden war, wurde dieser PARK 4 genannt. Später wurde herausgefunden, dass PARK 1 und PARK 4 Variationen in demselben Gen beschreiben (<http://www.dpg-news.de/hauptNews.htm> am 15.04.2011). Deshalb werden aus historischen Gründen alle Mutationen, die mit einer Vervielfachung des  $\alpha$ -Synuklein-Allels einhergehen, als PARK 4 bezeichnet.

Bei den Betroffenen mit einer Duplikation oder Triplikation des  $\alpha$ -Synuklein-Gens reicht klinisch der Phänotyp von den typischen Parkinson-Symptomen bis zur Lewy-Körper-Demenz (Singleton et al., 2003). Während Duplikationen meist die typischen Symptome der Parkinson-Krankheit nach sich ziehen, verursachen Triplikationen dagegen einen schwereren Phänotyp, mit schnellem Fortschreiten der Erkrankung, früher Demenz und verkürzter Lebenserwartung (Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004; Nishioka et al., 2006). Es reicht also eine erhöhte Menge an Wildtyp- $\alpha$ -Synuklein aus, um an der PK zu erkranken.

Auch am Tiermodell, z.B. an *Drosophila melanogaster*, konnte demonstriert werden, dass eine Überexpression des Gens durch eine Kumulation von  $\alpha$ -Synuklein in dopaminergen Neuronen zu einer fortschreitenden Bewegungsstörung sowie zu einem selektiven Zelltod dieser Nervenzellen führt (Feany und Bender, 2000). Dies entspricht den typischen Symptomen beim Menschen und stellt damit ein genetisches Modell der Erkrankung beim Tier dar.

Abgesehen von den seltenen Mutationen, die für einen Aminosäureaustausch kodieren, konnten verschiedene Polymorphismen in der Promotorregion des PARK1-Gens nachgewiesen werden (Holzmann et al., 2003). Diese werden als Risikofaktor für die Entwicklung der sporadischen Form der PK angesehen. Eine groß angelegte gemeinschaftliche Studie konnte nachweisen, dass ein Polymorphismus mit Wiederholung eines Dinukleotid (Rep1) innerhalb der Promotorregion des  $\alpha$ -Synuklein-Gens ein Suszeptibilitätsfaktor für die PK in der Population weltweit darstellt (Maragnore et al., 2006). Dieser

Polymorphismus kann die Expression des  $\alpha$ -Synuklein-Gens *in vitro*, als auch 2009 von Cronin und Kollegen gezeigt *in vivo*, erhöhen und damit einen ähnlichen pathogenen Effekt durch Hochregulation und Überexpression des Gens erzielen, wie es für Multiplikationen des  $\alpha$ -Synuklein-Gens gezeigt werden konnte (Cronin et al., 2009). Eine genomweite Assoziationsstudie bei über 1700 Parkinsonpatienten bestätigte die sichere Rolle der bekannten genetischen Varianten im  $\alpha$ -Synuklein-Gen als Risikofaktor für die sporadische PK und unterstrich die Rolle der genetischen Faktoren mit niedriger Penetranz (Simón-Sánchez et al., 2009).

Die physiologische Bedeutung des  $\alpha$ -Synukleins ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, man vermutet jedoch eine wichtige Rolle bei der Speicherung und dem Transport von Dopamin über eine Regulierung der Vesikel (Abeliovich et al., 2000). Diese Annahme wird auch durch die präsynaptische Lage des  $\alpha$ -Synukleins untermauert (Kahle et al., 2000).

### **1.7.2 PARK2 (Parkin)**

Bei einer japanischen Familie mit autosomal rezessiv vererbter juveniler PK wurde eine Veränderung der Erbsubstanz auf dem langen Arm von Chromosom 6 entdeckt. Der Genlocus wird auch als PARK2 bezeichnet und kodiert das sogenannte Parkin-Gen. Mutationen in diesem Gen sind die häufigste Ursache für die familiär auftretende autosomal-rezessive juvenile PK mit etwa 49% und die sporadische PK vom *early-onset*-Typ mit etwa 19% (Lücking et al., 2000). Diese Form der Parkinson-Krankheit unterscheidet sich durch ein frühes Auftreten der ersten Symptome von der sporadischen Form, meist vor dem Alter von 40 Jahren. Lewykörper im Gehirn von Betroffenen stellen eine Ausnahme dar (Farrer et al., 2003). Häufig kommt es zu zusätzlichen Symptomen wie Dystonien im Bereich der unteren Extremität oder L-Dopa-induzierten Dyskinesien.

Auch wenn man zuerst angenommen hatte, dass Veränderungen im Parkin-Gen keinen Einfluss auf den spät auftretenden Parkinsonismus haben (Oliveri et al., 2001), gibt es inzwischen Hinweise, dass heterozygote Mutationen im Parkin-Gen einen Risikofaktor darstellen können, an der PK zu erkranken (Klein et al., 2000; Oliveira et al., 2003). Bei einigen Patienten mit Erkrankungsbeginn

in höherem Lebensalter mit Tremor-dominantem Parkinsonismus oder Hemiparkinson-Hemiatrophie-Syndromen wurden ebenfalls Gensequenz-Veränderungen beschrieben (Pramstaller et al., 2002).

Das PARK2-Gen kodiert eine Ubiquitin-E3-Ligase. Diese verbindet Ubiquitin mit abzubauenen Proteinen, die dann über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut werden. Diese Markierung ist das Signal für die Degradation des Proteins über das Proteasom. Parkin ist also als Ubiquitin-E3-Ligase ein wichtiger Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom-Abbauweges. Eine homozygote Mutation in diesem Gen hat einen Verlust der Ligasefunktion zur Folge, und somit einen Verlust der Ubiquitinierungsfunktion. Es wird angenommen, dass es dadurch zu einer Anhäufung von Proteinen in der Zelle kommt, die eigentlich für den Abbau bestimmt sind, und die dann toxisch wirken.

Auch beim Abbau von dysfunktionalen Mitochondrien spielt Parkin eine zentrale Rolle. Das normalerweise primär im Zytosol vorliegende Parkin wird selektiv zu dysfunktionalen Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential rekrutiert und bewirkt deren Autophagie. Es ist somit für die selektive Beseitigung geschädigter Mitochondrien verantwortlich (Narendra et al., 2008 und 2009).

Inzwischen konnte auch eine Verbindung zwischen Parkin und PINK1 (PARK6) hergestellt werden. PINK1 akkumuliert auf geschädigten Mitochondrien und signalisiert dadurch Parkin, dass es sich hierbei um ein dysfunktionales Mitochondrium handelt, dass der Makroautophagie zugeführt werden muss (Kim et al, 2008; Narendra et al., 2010; Geisler et al., 2010; Übersicht in Burbulla et al., 2010a).

### **1.7.3 PARK3**

Gasser und Kollegen sind 1998 bei einer Studie mit 6 Familien, deren Mitglieder an autosomal dominant vererbter PK litten, auf einen Genlocus des kurzen Arms von Chromosom 2 gestoßen, der auch PARK3-Lokus genannt wird. Obwohl die meisten Mitglieder dieser Familien Träger der Mutation sind, zeigen nur ca. 40% Symptome, was auf eine reduzierte Penetranz hindeutet (Gasser et al., 1998).

Die betroffenen Familienmitglieder zeigen typische Anzeichen der Parkinson-Krankheit. Diese lassen sich kaum von der sporadischen Form der PK

unterschieden. Auch das Alter bei Erkrankungsbeginn liegt im selben Bereich mit durchschnittlich 61 Jahren. Obwohl bereits im Jahre 2001 von West und Kollegen 14 Gene der Kandidatenregion untersucht worden sind, konnte bislang keine Mutation gefunden werden, die mit der PK in Verbindung gebracht werden konnte (West et al., 2001). Trotzdem unterstützen mehrere Assoziationsstudien und Kopplungsanalysen bei einer großen Anzahl Patienten das Vorliegen eines Gens des PARK3-Lokus, das eine Rolle bei der Parkinson-Krankheit spielt, auch wenn das kürzlich implizierte SPR3 Gen wahrscheinlich nicht den PARK3 Locus definiert (DeStefano et al., 2002; Karamohamed et al., 2003; Pankratz et al., 2004; Sharma et al., 2011).

#### **1.7.4 PARK5 (UCH-L1)**

Das PARK5-Gen wurde anhand eines Kandidatengenansatzes gefunden und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 4. Bei einer deutschen Familie mit autosomal dominant vererbter PK wurde der Aminosäureaustausch Ile93Met im Gen der Ubiquitin-C-terminalen Hydrolase-L1 (UCH-L1) gefunden. Die klinischen Symptome der betroffenen Familienmitglieder gleichen denen einer idiopathischen PK (Leroy et al., 1998).

Auch dieses Enzym spielt im Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg eine Rolle, es hat die Aufgabe Ubiquitin zu recyceln. Es fungiert als Hydrolase und spaltet das Ubiquitin von den zerkleinerten Proteinfragmenten ab, um es damit für weitere Ubiquitinierungs-Reaktionen zur Verfügung zu stellen.

Gleichzeitig übernimmt die UCH-L1 auch die Funktion einer Ligase mit Bevorzugung der Position K63, die entgegen K48-markierten Proteinen nicht dem proteasomalen Abbau zugeführt werden. Bei der Ile93Met-Mutation scheint diese Rolle im Vordergrund zu stehen, somit lagern sich vermehrt K63-ubiquitinierte Proteine in der Zelle ab (Liu et al., 2002).

Aber auch bei der sporadischen Form der PK scheint die UCH-L1 von Bedeutung zu sein. Ein Aminosäureaustausch von Serin zu Tyrosin an Position 18 des PARK5-Gens scheint protektiv gegenüber der PK zu wirken (Wintermeyer et al., 2000; Maraganore et al., 2004). Diese Variante begünstigt die Hydrolase-Funktion der UCH-L1, dadurch könnte unter Umständen der protektive Effekt erklärt werden. Es geht weniger Ubiquitin in Aggregaten

verloren. Daraus resultiert ein vermindert arbeitender Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg, der die abzubauenen Produkte besser erkennen kann.

### 1.7.5 PARK6 (PINK1)

Auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 haben Valente und Kollegen 2001 bei einer italienischen Familie mit autosomal rezessiv vererbter PK erstmals den Locus PARK6 beschrieben (Valente et al., 2001). Dort ist die Proteinkinase PINK1 kodiert, die nahezu ausschließlich in Mitochondrien gefunden wird (Singleton, 2004) und eine Rolle bei der zellulären Stressantwort spielt. Anhand von *in vitro*-Studien konnte demonstriert werden, dass PINK1 protektiv gegen oxidativen Stress und den dadurch verursachten Zelltod (Apoptose) wirkt (Valente et al., 2004a). Auch die Funktion als Proteinkinase ist deutlich beeinflusst, was auf eine *loss of function*-Mutation schließen lässt (Beilina et al., 2005).

Durch die im PINK1-Gen nachgewiesenen Mutationen konnte erstmals eine direkte molekulare Verbindung zwischen mitochondrialer Dysfunktion und der PK belegt werden.

Gandhi und Kollegen konnten 2006 nachweisen, dass PINK1 auch ein Bestandteil der Lewykörper ist (Gandhi et al., 2006).

Die klinische Symptomatik der Familienmitglieder, die eine Genmutation im PINK1-Gen aufweisen, ist geprägt von einem frühen Krankheitsbeginn mit den typischen Symptomen der PK, einem frühen Auftreten von Levodopa-assoziierten Dyskinesien sowie einer langsamen Progression der Erkrankung.

Zunächst wurden zwei Genveränderungen gefunden, die für einen Aminosäureaustausch von Glycin nach Asparaginsäure an Position 309 sowie eine trunkierende W473OPA-Mutation kodieren (Valente et al., 2001 und 2004a und b).

Danach wurden noch weitere Mutationen identifiziert, wobei es sich dabei fast ausschließlich um *Nonsense*-Mutationen im Bereich der Proteinkinase-Domäne handelt (Bonifati et al., 2005; Hatano et al., 2004, Valente et al., 2004b).

Wie bereits erwähnt ist heute bekannt, dass PINK1 mit Parkin beim Abbau dysfunktionaler Mitochondrien interagiert und damit die mitochondriale Qualität sicherstellt. Erste Beweise für einen PINK1-Parkin-Pathway lieferten *in vivo*

Studien mit *Drosophila melanogaster* (Clark et al., 2006). Sowohl beim Verlust der PINK1- als auch der Parkin-Funktion zeigten die *Drosophila*-Fliegen apoptotische Muskeldegeneration, Defekte in der Mitochondrienmorphologie, erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress und männliche Sterilität. Interessanterweise konnten diese Veränderungen, wenn sie durch einen Verlust von PINK1 hervorgerufen wurden, durch eine Überexpression von Parkin rückgängig gemacht werden (Park et al., 2006; Clark et al., 2006; Exner et al.; 2007). Umgekehrt funktionierte das Experiment aber nicht, einen Verlust von Parkin konnte nicht durch eine Überexpression von PINK1 ausgeglichen werden. Daraus folgerte man, dass PINK1 *upstream* von Parkin agiert. Die Mitochondrien mit PINK1- oder Parkin-Verlust waren dabei verlängert und geschwollen, mit ungewöhnlichem *Christae*-Aufbau im Sinne einer Fragmentierung. Dies konnte von unabhängigen Studien bestätigt werden (Poole et al., 2008; Matsuda et al., 2010).

#### **1.7.6 PARK7 (DJ-1)**

Auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 liegt das PARK7-Gen. Dieser Locus wurde erstmals von van Duijn und seinen Kollegen 2001 beschrieben, zwei Jahre später konnten Bonifati und Kollegen Mutationen und das dazugehörige Gen nachweisen (van Duijn et al., 2001; Bonifati et al., 2003a). Im Verlauf wurden noch weitere Mutationen entdeckt (z.B. Abou-Sleiman et al., 2003, Hering et al., 2004b).

Die Form der Parkinson-Krankheit, die mit dem PARK7-Locus verbunden ist, zeichnet sich ebenfalls durch einen frühen Erkrankungsbeginn aus (die betroffenen Mitglieder der holländischen Familie waren unter 40 Jahre alt). Auch hier kommt es zur typischen Symptomatik der PK, jedoch treten vergleichbar mit der Parkinmutation häufiger Merkmale einer Dystonie auf, wie z.B. Torticollis und Blepharospasmus. Zusätzlich wurden bei wenigen Individuen auch neurotische und psychotische Episoden beschrieben.

Die von Bonifati und Kollegen bei einer niederländischen und italienischen Familie gefundenen Mutationen sind eine große, das Exon 1 bis 5 einschließende Deletion und eine Punktmutation, die zu einem Leu166Pro-Aminosäureaustausch führt (Bonifati et al., 2003b).

Eine besondere Eigenschaft des ubiquitär vorkommenden Proteins DJ-1 ist die Anhäufung einer azidischen Proteinform als Antwort auf oxidativen Stress. Dabei wird ein Cysteinrest an Position 106 des Proteins oxidiert, was eine Relokalisation des DJ-1 in die Mitochondrien nach sich zieht. Canet-Aviles und Kollegen haben 2004 herausgefunden, dass dieser Vorgang *in vitro* eine entscheidende Rolle bei der protektiven Funktion von DJ-1 bei oxidativem Stress innehat (Canet-Aviles et al., 2004). Es scheint eine *Chaperone*-Funktion auszuüben, also falsch gefaltete Proteine zurückzufalten oder zu eliminieren. Taira und Kollegen konnten 2004 zeigen, dass Mutationen im DJ-1-Gen zum Zelltod führen, wie es auch bei der PK beobachtet werden kann (Taira et al., 2004)). Oxidativer Stress auf zellulärer Ebene und Neurodegeneration stehen also in enger Verbindung zueinander. Versuche mit Zellmodellen von DJ-1-KO (knockout) Mäusen und menschlichen Trägern der E64D Mutation im DJ-1-Gen zeigten eine neue Funktion von DJ-1 in der Integrität sowohl der Mitochondrien als auch der Lysosomen (Krebiehl et al., 2010). Ein Verlust von DJ-1 beeinträchtigte die mitochondriale Respiration und hatte eine erhöhte Rate intramitochondrialer Sauerstoffradikale, ein reduziertes Membranpotential der Mitochondrien und eine charakteristische Veränderung der Mitochondrienform zur Folge. Auch die lysosomale Aktivität wurde im Sinne einer reduzierten basalen Autophagozytoserate und der damit verbundenen Akkumulation von defekten Mitochondrien in DJ-1-KO Zellen beeinträchtigt. DJ-1 spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung eines mitochondrialen Gleichgewichts und verknüpft damit die Autophagozytose mit der Integrität der Mitochondrien bei der Parkinson-Krankheit. Neueste Erkenntnisse ergaben, dass DJ-1 parallel zum PINK1-Parkin-Pathway agiert, um die mitochondriale Funktion sicherzustellen (Thomas et al., 2011).

### **1.7.7 PARK8 (LRRK2)**

In einer japanischen Familie mit autosomal-dominant vererbter PK konnten Funayama und Kollegen im Jahre 2002 den Locus für ein weiteres PARK-Gen dem langen Arm von Chromosom 12 anhand von Kopplungsanalysen zuordnen (Funayama et al., 2002). Die klinische Symptomatik unterscheidet sich bei dieser Familie nicht von der sporadischen Form der PK. Die Erkrankung

begann durchschnittlich im Alter von etwa 51 Jahren. Die überwiegende Anzahl der Patienten sprachen gut auf die Therapie mit L-Dopa an. Neuropathologisch fanden sich jedoch Besonderheiten. Es fanden sich in den Gehirnschnitten der Patienten neben den typischen  $\alpha$ -Synuklein-positiven Lewykörpern welche mit aggregiertem Tau-Protein, als auch solche mit einer reinen Degeneration der Substantia nigra ohne eine Ausbildung von Lewykörpern. Dies wird auch *pure nigral degeneration* genannt (Funayama et al., 2005).

Zimprich und Kollegen konnten dem PARK8-Lokus im Jahre 2004 das Gen LRRK2 (*Leucine rich repeat kinase 2*) zuordnen (Zimprich et al., 2004).

Eine Veränderung im PARK8-Gen ist die häufigste Ursache für ein autosomal-dominant vererbtes Parkinson-Syndrom. Auch wenn Veränderungen im LRRK2-Gen ursprünglich bei großen Familien mit autosomal-dominant vererbter PK entdeckt wurden, werden immer mehr Mutationsträger unter Patienten mit der sporadischen Form der PK gefunden (Di Fonzo et al., 2005; Goldwurm et al., 2007; Latourelle et al., 2008). In bestimmten Populationen in Nordafrika und in der Askenazi-jüdischen Bevölkerung sind sogar bis zu 40% der Parkinson-Patienten Träger einer spezifischen G2019S Mutation (Krüger, 2008). Smith und Kollegen fanden 2005 heraus, dass LRRK2 mit Parkin interagiert und die mutierten Formen (R1441C, Y1699C und G2019S) in Zellkultur zu einem verfrühten Zelltod führen (Smith et al., 2005).

Die häufigste Genmutation bei Parkinson-Patienten überhaupt findet sich in diesem Gen, ein Aminosäureaustausch von Glycin zu Serin an Position 2019 der Aminosäuresequenz. Reinhardt und Kollegen gelang es, diese Mutation funktionell zu charakterisieren und mittels isogener Kontrolle zu untersuchen (Reinhardt et al., 2013). Nachdem sie Hautzellen von Genträgern der G2019S-Mutation zu Nervenzellen „umprogrammiert“ hatten, korrigierten sie in vitro die Mutation mit sogenannten Zinkfinger-Nukleasen. Die Gen-korrigierten Nervenzellen wurden mit gesunden Kontrollen verglichen. Sie verhielten sich in den Experimenten genau gleich und zeigten keine Anzeichen des typischen Zelluntergangs bei Parkinson-Erkrankten im Gegensatz zu den nicht „umprogrammierten“ Nervenzellen. Zusätzlich entdeckten Reinhardt und Kollegen, dass die G2019S-Mutation eine Überaktivierung der extrazellulär

regulierten Kinase Signalkaskade (ERK 1/2) bedingt, was zum frühzeitigen Nervenzelltod führt.

### **1.7.8 PARK9 (ATP13A2)**

Hampshire und Kollegen fanden im Jahre 2001 bei der Untersuchung einer arabischen Familie mit einem seltenen autosomal rezessiv vererbten atypischen Parkinson-Syndrom einen weiteren Genort auf dem kurzen Arm von Chromosom 1, den PARK9-Lokus (Hampshire et al., 2001). Dieses atypische Parkinson-Syndrom, auch Kufor-Rakeb-Syndrom genannt, ist charakterisiert durch einen akinetisch-rigiden Parkinsonismus und weiteren atypischen Symptomen wie supranukleärer Blicklähmung, Spastizität und Demenz. Es tritt bereits in sehr jungen Jahren auf, oft bereits im Teenageralter. Es wird ein Ansprechen der extrapyramidalen Symptome auf L-Dopa berichtet.

Fünf Jahre später konnte dem PARK9-Lokus bei der Untersuchung einer chilenischen Familie mit Kufor-Rakeb-Syndrom das ATP13A2-Gen zugeordnet werden, in dem Mutationen gefunden wurden (Ramirez et al., 2006). Das Kufor-Rakeb-Syndrom wird auch den neurodegenerativen Syndromen mit Eisenablagerung im Gehirn zugeordnet, da bei den Betroffenen Eisenablagerungen in den Basalganglien nachgewiesen werden konnten (Schneider et al., 2010; Brüggemann et al., 2010)

### **1.7.9 PARK10**

Eine genomweite Mikrosatellitenanalyse bei 117 isländischen Parkinson-Patienten aus 51 Familien mit mehr als einem betroffenen Familienmitglied ermittelte einen neuen Genlokus auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (Hicks et al., 2002). Die Betroffenen zeigten die typischen Merkmale der sporadischen PK mit spätem Erkrankungsbeginn. Ein Gen konnte dem PARK10-Lokus bisher noch nicht zugeordnet werden.

### **1.7.10 PARK11 (GIGYF2)**

Bei einer Untersuchung von Geschwisterpaaren mit typischer Parkinsonsymptomatik entdeckten Pankratz und Kollegen 2002 einen neuen Genort auf dem langen Arm von Chromosom 2 (Pankratz et al., 2002). Dabei waren 150 Familien unter strengen diagnostischen Kriterien für die PK

ausgewählt worden. Es konnte weiter gezeigt werden, dass sich der Genort von PARK3 unterscheidet und das zugehörige Gen autosomal-dominant vererbt wird (Pankratz et al., 2003a). Im Jahre 2008 gelang es Lautier und Kollegen auch das dazugehörige Gen zu identifizieren, nämlich das GIGYF2-Gen. Es gibt Hinweise, dass das Gen nur mit inkompletter Penetranz vererbt wird (Lautier et al., 2008).

#### **1.7.11 PARK12**

Auch auf dem Geschlechtschromosom X konnte in verschiedenen Studien eine Assoziation mit der Parkinson-Krankheit bestätigt werden. Der Genort befindet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Pankratz et al., 2002 und 2003b; Hicks et al., 2002; Scott et al., 2001). Bislang konnte diesem Locus noch kein Gen zugeordnet werden, allerdings könnte dies eine Erklärung für die leicht erhöhte Prävalenz bei Männern darstellen.

#### **1.7.12 PARK13 (Omi = HtrA2)**

Auch dieses Gen wurde wie PARK5 anhand eines reinen Kandidatengenansatzes entdeckt und befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 2. Die erste Verbindung zwischen Neurodegeneration und Omi/HtrA2 konnte auf Grund von Beobachtungen bei *loss-of-function*-Mutationen und *knockout*-Mäusen hergestellt werden. Diese zeigten einen Parkinson-ähnlichen Phänotyp (Martins et al., 2004; Jones et al., 2003). Bisher wurden drei kodierende Punktmutationen (Ala141Ser, Gly399Ser und Arg404Trp) bei deutschen und belgischen Parkinsonpatienten als mögliche Risikofaktoren für die PK in diesem Gen gefunden (Strauss et al., 2005; Bogaerts et al., 2008). Zusätzlich konnten neun heterozygote Mutationen im Bereich der 5'- und 3'-Kontrollregion des Gens nur bei Parkinsonpatienten nachgewiesen werden, was eine unterschiedliche Transkriptionsregulation dieses Gens bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der PK nahelegt. Der Aminosäureaustausch Gly399Ser wurde auch bei gesunden Kontrollen gefunden, was auf eine unvollständige Penetranz hinweist (Simón-Sánchez et al., 2008). Strauss und Kollegen konnten 2005 bei funktionellen *in vitro*-Charakterisierungen der heterozygoten Gly399Ser-Mutation und des

gefundenen Polymorphismus Ala141Ser eine gestörte Proteaseaktivität nachweisen (Strauss et al., 2005). Omi/HtrA2 ist eine nukleär kodierte Serinprotease, die aktiv in die Mitochondrien transportiert wird und sich dort im Intermembranraum befindet. Omi/HtrA2 hat auch eine proapoptotische Funktion inne. Bei Stimuli, die den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten, verlässt Omi/HtrA2 das Mitochondrium (Suzuki et al., 2001) und wirkt dann im Zytosol beschleunigend auf die Aktivierung der Caspase-Kaskaden, die zum programmierten Zelltod durch Apoptose führen (Verhagen et al., 2002). Als hauptsächlicher Grund für die Neurodegeneration bei *in vivo*- und *in vitro*-Modellen mit Verlust der Serinproteasefunktion von Omi/HtrA2 wurde dessen protektive Funktion innerhalb der Mitochondrien erkannt (Martins et al., 2004; Jones et al., 2003). Auch bei Omi/HtrA2 konnte eine Interaktion mit PINK1 nachgewiesen werden. PINK1 beeinflusst die Aktivierung der Serinproteaseaktivität von Omi/HtrA2 dadurch, dass es für die Phosphorylierung von Omi/HtrA2 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verantwortlich ist (Plun-Favreau et al., 2007). *In vitro*-Modelle von bei Parkinsonpatienten entdeckten Mutationen, die einen Funktionsverlust von Omi/HtrA2 nach sich ziehen, zeigten typische mitochondriale Veränderungen wie ein reduziertes mitochondriales Membranpotential und ein Anschwellen sowie eine Elongation der Mitochondrien (Kieper et al., 2010; Tain et al., 2009). Desweiteren wurde ein Zusammenhang zwischen Omi/HtrA2 und OPA1 gefunden. Der Verlust von Omi/HtrA2 führte zu einer gesteigerten Fusion der Mitochondrien mit signifikant erhöhter Anzahl elongierter Mitochondrien. Dieses Phänomen war auch mit erhöhten Levels von OPA1 in den Mitochondrien assoziiert. Transfizierte man die Omi/HtrA2-KO-Modelle von Mäusen und menschlichen Zellen wieder mit Wildtyp-Omi/HtrA2 wurde nicht nur der Phänotyp der Mitochondrien normalisiert, sondern auch die Levels von OPA1 (Kieper et al., 2010). Omi/HtrA2 spielt also neben PINK1, Parkin und DJ-1 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen mitochondrialer Fusion und Fission (Burbulla et al., 2010a).

### **1.7.13 PARK14 (PLA2G6)**

Anhand eines Kandidatengenansatzes wurde das PARK14-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 22 entdeckt. Es kodiert für PLA2G6, eine Phospholipase. Die betroffenen Familienmitglieder, bei denen eine Mutation im PARK14-Gen nachgewiesen werden konnte, zeigten eine schnell fortschreitende neurodegenerative Erkrankung mit Parkinsonismus, Dystonie und schweren kognitiven Beeinträchtigungen. Der Krankheitsbeginn liegt im frühen Erwachsenenalter. Die Erkrankung ist autosomal-rezessiv vererbt und spricht gut auf eine Behandlung mit L-Dopa an, häufig kommt es dabei aber auch zu schweren Dyskinesien. Auch hier wird diskutiert, ob es zu den neurodegenerativen Syndromen mit Eisenablagerung im Gehirn gezählt werden muss, denn bei einem Teil der Patienten konnte mittels MRT eine Eisenansammlung in der Substantia nigra und im Striatum nachgewiesen werden (Paisan-Ruiz et al., 2009; Übersicht in Gregory et al., 2009; Yoshino et al., 2010).

### **1.7.14 PARK15 (FBXO7)**

Bei einer genomweiten Kopplungsanalyse einer iranischen Familie mit Parkinson-pyramidalem Syndrom entdeckten Shojaee und seine Kollegen 2008 den PARK15-Lokus auf dem langen Arm von Chromosom 22 (Shojaee et al., 2008). Das dazugehörige Gen heißt FBXO7. Die Erkrankung ist autosomal-rezessiv vererbt und schreitet meist nur langsam fort. Die extrapyramidalen Symptome treten 5-20 Jahre nach den pyramidalen Symptomen auf, der Erkrankungsbeginn liegt im juvenilen bis jungen Erwachsenenalter (Di Fonzo et al., 2009). Das Parkinson-pyramidale Syndrom wurde erstmals 1954 von Davison beschrieben (Davison, 1954). Als Synonym wird auch Pallido-pyramidales Syndrom verwendet.

### **1.7.15 PARK16**

Im Jahre 2009 führten Satake und Kollegen eine genomweite Assoziationsstudie in der japanischen Population bei Parkinsonpatienten und gesunden Kontrollen durch (Satake et al., 2009). Sie entdeckten unter anderem den neuen Genlokus PARK16 auf dem langen Arm von Chromosom 1. Simón-

Sánchez und Kollegen konnten diesen Suszeptibilitätslokus bei einer Assoziationsstudie in der europäischen Bevölkerung bestätigen (Simón-Sánchez et al., 2009). Bislang konnte diesem Lokus noch kein Gen zugeordnet werden.

#### **1.7.16      PARK17 (VPS35)**

Wider und Kollegen beschrieben 2008 eine mehrere Generationen übergreifende Familie mit autosomal-dominant vererbter, tremor-prädominanter PK, die gut auf L-Dopa anspricht (Wider et al., 2008). Bis auf ein niedrigeres Manifestationsalter sowie einer höheren Inzidenz bei Frauen verglichen mit den Männern konnte der Phänotyp nicht von einer sporadischen PK unterschieden werden. Eine genetische Untersuchung auf alle bis dato bekannten Gene, die eine autosomal-dominante Parkinson-Erkrankung verursachen, erbrachte keinen Erfolg.

Durch Exon-Sequenzierung der DNA betroffener Mitglieder dieser Schweizer Familie konnten Vilariño-Güell und Kollegen im Jahre 2011 eine heterozygote Mutation im VPS35-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 16 (16q11.2) identifizieren (c.1858G>A, Asp620Asn) (Vilariño-Güell et al., 2011). Diesem Gen wurde der PARK17-Lokus zugeordnet.

Unabhängig voneinander und mit derselben Methode konnten Zimprich und Kollegen gleichzeitig dieselbe Mutation bei einer Familie mit autosomal-dominanter PK aus Österreich nachweisen (Zimprich et al., 2011).

VPS35 ist eine zentrale Komponente des *Retromer Cargo-Recognition* Komplexes und ist für den retrograden Transport zwischen Endosomen und dem trans-Golgi-Netzwerk zuständig. Auch beim Membranprotein-Recycling spielt es eine Rolle. Das VPS35-Gen liegt in einem evolutionär hoch konservierten Bereich (Vilariño-Güell et al., 2011).

#### **1.7.17      PARK18 (EIF4G1)**

Bei der Untersuchung einer französischen Familie mit autosomal-dominant vererbter Parkinson-Krankheit fanden Chartier-Harlin und Kollegen im Jahre 2011 durch eine genomweite Kopplungsanalyse eine heterozygote Mutation auf dem langen Arm von Chromosom 3 im EIF4G1-Gen (c.3614G>A

(p.Arg1205His)) (Chartier-Harlin et al., 2011). Bei Ausweitung der genetischen Analysen auf eine größere Kohorte entdeckten sie vier weitere Veränderungen der Aminosäuresequenz (c.1505C>T (p.Ala502Val), c.2056G>T (p.Gly686Cys), c.3490A>C (p.Ser1164Arg) und c.3589C>T (p.Arg1197Trp)).

Ko-Immunopräzipitations-Studien deuteten darauf hin, dass die Genveränderungen Arg1205His und Ala502Val die Formierung des größeren Translations-Initiations-Komplexes beeinflussen. Behandlungen mit Hydroperoxid zeigten einen starken Verlust des mitochondrialen Membranpotentials bei Zellen der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Arbeitsgruppe um Chartier-Harlin folgerte daraus, dass diese beiden Genveränderungen die Zellen daran hindern, schnell und wirksam auf Stress zu reagieren (Chartier et al., 2011).

Die betroffenen Familienmitglieder zeigen die klassische Form der PK mit einem durchschnittlichen Krankheitsbeginn mit 64 Jahren (allerdings mit großer Streubreite von 50-80 Jahren) und gutem Ansprechen auf L-Dopa. Die Erkrankung weist einen langsamen und milden Verlauf auf. Das Denkvermögen bleibt erhalten.

### **1.7.18 Weitere Suszeptibilitätsgene**

Neben den Genveränderungen in den PARK-Loci, die für die erblichen Formen der PK ursächlich sind, gibt es auch Suszeptibilitätsgene, die als genetische Risikofaktoren für die Entstehung der sporadischen PK gelten. Bei den Mutationen in diesen Genen handelt es sich nicht um krankheitsverursachende Genveränderungen, sondern um genetische Risikofaktoren, die die Anfälligkeit, an der PK zu erkranken, um den Faktor 1,5 bis 2 erhöht (Brockmann und Gasser, 2010).

#### **SNCA**

Auch als Suszeptibilitätsfaktor für die sporadische Form der PK spielt das  $\alpha$ -Synuklein-Gen wieder eine Rolle. In der von Simón-Sánchez und Kollegen durchgeführten großen genomweiten Assoziationsstudie wurden genetische Varianten in den Genen für  $\alpha$ -Synuklein (SNCA) und Tau (MAPT, siehe weiter unten) als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung der sporadischen Form der

PK identifiziert (Simón-Sánchez et al., 2009). Interessanterweise erhöhen die gleichen genetischen Varianten des  $\alpha$ -Synuklein-Gen, die als Risikofaktoren für die sporadische Form der PK entdeckt wurden, auch das Risiko für die Entwicklung einer Multi-System-Atrophie (MSA). Überhaupt ist dies das erste Indiz für eine genetische Ursache der MSA. Ist eine Person für eine Risikovariante im  $\alpha$ -Synuklein-Gen heterozygot, steigt die Wahrscheinlichkeit an einer MSA zu erkranken um den Faktor 1,5. Bei einem homozygoten Träger ist sie sogar um das 6-fache erhöht (Scholz et al., 2009; Brockmann und Gasser, 2010).

### **MAPT**

MAPT ist die Abkürzung für Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau. Das dazugehörige Gen befindet sich auf Chromosom 17. Veränderungen in diesem Gen erhöhen sowohl das Risiko für das sporadische Parkinson-Syndrom als auch für die progressive supranukleare Blickparese (PSP). Desweiteren ist bekannt, dass es die Ursache der familiär vererbten frontotemporalen Demenz (FTD) darstellt (Brockmann und Gasser, 2010).

### **GBA**

Heterozygote Mutationen im Gen, das die Glukocerebrosidase kodiert, sind ein weiterer wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung eines sporadischen Parkinson-Syndroms (Sidransky et al., 2009). Bei etwa zwei bis vier Prozent der Patienten mitteleuropäischer Herkunft konnte eine Mutation im GBA-Gen nachgewiesen werden. Homozygote oder *compound*-heterozygote Mutationen sind die Ursache für eine lysosomale Speichererkrankung mit vielgestaltigen neurologischen Ausfällen namens Morbus Gaucher. Denkbar wäre, dass ein gestörter lysosomaler Abbau fehlgefalteter Proteine, wie z.B.  $\alpha$ -Synuklein, an der Entstehung des Parkinson-Syndroms beteiligt ist (Brockmann und Gasser, 2010). Interessanterweise begann die Erkrankung bei Parkinson-Patienten mit einer GBA-Mutation früher als bei Parkinson-Patienten, bei denen keine Mutation nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnten die Mutationsträger häufiger ebenso von der PK betroffene Familienmitglieder aufweisen und

zeigten öfters atypische klinische Manifestationen der PK (Sidransky et al., 2009).

### **Synphilin-1**

Wakabayashi und Kollegen war es gelungen, dieses Protein in immunhistochemischen Präparaten als ein Bestandteil der Lewykörper nachzuweisen (Wakabayashi et al., 2000). Es konnte sowohl eine Interaktion mit  $\alpha$ -Synuklein als auch mit Parkin beschrieben werden (Engelender et al., 1999; Chung et al., 2001). Es könnte sich also um ein Bindeglied zwischen den beiden mit der PK assoziierten Proteinen  $\alpha$ -Synuklein und Parkin handeln. Die genaue Funktion von Synphilin-1 ist allerdings bisher noch unklar. Das Protein ist aus 919 Aminosäuren aufgebaut und enthält diverse Regionen, die Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen.

Ein weiterer Hinweis für einen engen Zusammenhang zwischen Synphilin-1,  $\alpha$ -Synuklein und Parkin fanden 2002 Ribeiro und Kollegen. Experimentell wurde Synphilin-1 in den gleichen Kompartimenten wie die beiden anderen Proteine exprimiert, nämlich vor allem im Zytosol und in den präsynaptischen Nervenenden. Daraus kann abgeleitet werden, dass diese Protein-Protein-Interaktion vermutlich auch *in vivo* relevant sein wird. Eine Hypothese besagt, dass Synphilin-1 möglicherweise das Adapter-Protein zwischen  $\alpha$ -Synuklein und den Vesikeltransportproteinen darstellt.

Nach einem erfolglosen Versuch von Bandopadhyay und Kollegen im Jahre 2001, eine Mutation im Synphilin-1-Gen bei Parkinson-Patienten nachzuweisen, gelang dies Marx und Kollegen zwei Jahre später (Bandopadhyay et al., 2001; Marx et al., 2003). Sie fanden den Aminosäureaustausch Arg621Cys bei zwei deutschen Parkinson-Patienten. Weiterführende Studien zeigten, dass dieser Austausch bei verminderter Aggregatbildung zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress führt.

### **Neurofilament M**

Neurofilamente sind ein Hauptbestandteil der Lewykörper. Sie sind die gewebsspezifischen Neurofilamente der Nervenzellen und geben diesen als Teil des Zytoskeletts ihre Stabilität und Form. Sowohl Lavedan und Kollegen im

Jahre 2002 als auch Krüger und Kollegen 2003 konnten bei Parkinsonfamilien Mutationen im NFM-Gen der Neurofilament-Untereinheit M nachweisen (Lavedan et al., 2002; Krüger et al., 2003). Eine sichere Aussage zur pathogenetischen Bedeutung dieser Varianten bedarf weiterer Studien.

### **Nurr1/ NR4A2**

Nurr1 steht für *nuclear receptor related 1* und ist ein Transkriptionsfaktor. Während der embryonalen Entwicklung spielt er unter anderem bei der Differenzierung dopaminerger Neuronen eine entscheidende Rolle (Übersicht in Perlmann und Wallén-Mackenzie, 2004). *Knock-out* Mäuse besitzen keine neuronalen Dopaminmarker und sterben bereits kurz nach der Geburt (Baffi et al., 1999). Durch Steuerung der beiden Proteine TH (*tyrosine hydroxylase*) und AADC (*aromatic acid decarboxylase*) reguliert Nurr1 die Dopaminsynthese (Tornqvist et al., 2002). Heterozygote Mäuse überleben postnatal ohne erkennbare lokomotorische Defizite, zeigen aber im Vergleich zu ihren gesunden Artgenossen eine verstärkte Reaktion auf MPTP (Le et al., 1999).

Auch im Nurr1-Gen wurden 2003 von Le und Kollegen Mutationen bei Parkinsonpatienten gefunden, die aber bislang nicht bestätigt werden konnten (Le et al., 2003; Hering et al., 2004a; Tan et al., 2004). Sowohl Grimes und Kollegen, Jacobsen und Kollegen als auch Sleiman und Kollegen konnten weitere Mutationen entdecken (Grimes et al., 2006; Jacobsen et al., 2008; Sleiman et al., 2009). Auch hier gilt die pathogenetische Bedeutung bislang nicht als erwiesen.

### **PITX3**

PITX3 steht für *Pituitary homeobox 3* und ist ein weiteres Gen, das mit der PK assoziiert wird. Es ist wie Nurr1 ein Transkriptionsfaktor und an der Ausdifferenzierung mesenzephaler dopaminerger Nervenzellen beteiligt. Außer im Gehirn, wo es insbesondere in den dopaminergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert wird, kommt PITX3 auch in Linse und Skelettmuskel vor (Brockmann und Gasser, 2010). Mutationen in diesem Gen führen bei Mäusen zu einem ophthalmologischen Phänotyp mit Aphakie und Blindheit, sie sind aber auch für motorische Beeinträchtigungen und nicht-motorische Symptome wie

Angststörung und gesteigerte Schmerzempfindlichkeit verantwortlich. Diese Merkmale haben eine große Ähnlichkeit mit der PK (Rosemann et al., 2010). Als histologisches Korrelat fand man einen Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta sowie deren efferenter Projektionen in die Basalganglien. Fuchs und Kollegen konnten 2009 eine genetische Variante im PITX3-Gen als möglichen Suszeptibilitätsfaktor für die sporadische Form der PK identifizieren (Fuchs et al., 2009).

## **1.8 Molekulare Pathophysiologie**

Im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses gehen sukzessive Zellen zugrunde. Normalerweise werden diese durch Teilung von entsprechenden Stammzellen ersetzt. Bei Nervenzellen ist dies im Gegensatz zu anderen menschlichen Zellen meist nicht möglich, da sie bis auf wenige Ausnahmen nicht teilungsfähig und somit auch nicht regenerationsfähig sind.

Man geht davon aus, dass es zur Erkrankung kommt, wenn die Zahl dopaminerger Neurone in der Substantia nigra unter 60% der Ausgangsmenge liegt (Übersicht in Berg, 2006c). Diese kritische Zahl wird physiologischerweise erst in sehr hohem Lebensalter unterschritten oder extrapolierend gedacht sogar erst nach dem Tod. Wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen geht man auch bei der PK von einem beschleunigten Ablauf dieses Prozesses aus.

Bei den genetischen Untersuchungen geht es nicht nur darum, Mutationen zu finden, die letztendlich nur für einen kleinen Teil der Erkrankungen ursächlich sind, sondern man erhofft sich auch ein tieferes Verständnis der pathophysiologischen und molekularbiologischen Zusammenhänge zur Entwicklung der Erkrankung. Aus den bereits gewonnenen Erkenntnissen lassen sich folgende Mechanismen ableiten, die bei der Entstehung der PK involviert sind: vermehrter oxidativer Stress, abnormale Proteinaggregation und gestörter Proteinabbau sowie mitochondriale Dysfunktion (Übersicht in Burbulla und Krüger, 2011).

### 1.8.1 Abnormale Proteinaggregation und gestörter Proteinabbau

Die Proteine einer Zelle sind einem Kreislauf von Synthese und Abbau unterworfen. Proteine werden eigentlich nur dann synthetisiert, wenn sie tatsächlich benötigt werden, danach werden sie wieder abgebaut. Der Proteinabbau ist auch zum Schutz der Zelle wichtig. Falsch gefaltete Proteine, wie sie z.B. gehäuft unter Stressbedingungen auftreten, werden eliminiert und/oder recycelt, so dass sie keine unerwünschten Reaktionen hervorrufen können. Für die Regulation von Enzymen und anderen Eiweißen stehen den Zellen verschiedene Wege zur Verfügung, unter anderem das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und das lysosomale System (Übersicht in Pan et al., 2008).

Ein wichtiger Hinweis, dass dieser Pathomechanismus bei der PK eine Rolle spielt, ist das Auftreten von intrazellulären Eiweiß-Ablagerungen in Form von Lewykörpern, welche aus  $\alpha$ -Synuklein und anderen Eiweißen bestehen. Da das UPS den wichtigsten bekannten Abbauweg von Proteinen beim Menschen darstellt, ist es in den Mittelpunkt des Interesses bei der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen mit Proteinablagerungen, wie der PK oder auch der Alzheimer-Krankheit, gerückt. Auch wurde herausgefunden, dass Parkin und UCH-L1, die zu den PARK-Genen gehören, ebenfalls Bestandteile der Lewykörper sind und diese eine eigene enzymatische Funktion im UPS einnehmen (Schlossmacher et al., 2002; Shimura et al., 2000).

### 1.8.2 Vermehrter oxidativer Stress

Unter oxidativem Stress versteht man ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung und dem Abbau von Sauerstoffradikalen (ROS = *reactive oxygen species*) sowie die konsekutive Schädigung der Zellen durch die ROS. Oxidativer Stress ist verantwortlich für DNA-Schäden und -Mutationen, Membranschäden durch Lipid-Peroxidation und Proteinveränderungen, die einen irreversiblen Funktionsverlust und den Zelluntergang zur Folge haben (Gerlach et al., 2007d). Auch dies scheint eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der PK zu spielen. Bei der Metabolisierung von Dopamin durch die Enzyme MAO-B und die COMT kommt es physiologischerweise zur Entstehung von  $H_2O_2$  und anderen ROS. Da die SNc überwiegend aus

dopaminergen Neuronen besteht und dort ein hoher Dopamin-Umsatz stattfindet, könnte dies die Erklärung für den typischen Befall der SNc bei der Neurodegeneration der PK sein. Zusätzlich sind erhöhte Eisenwerte in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten nachgewiesen worden (Berg et al., 2006a), was auf Grund der sogenannten Fenton-Reaktion von zweiwertigem zu dreiwertigem Eisen ebenfalls zu einer vermehrten Bildung von ROS führt.

Eine weitere Ursache für die vermehrte Bildung von ROS kann auch in einem gestörten Ablauf der mitochondrialen Atmungskette liegen. Reichmann und Riederer konnten bereits 1989 zeigen, dass selektiv in der SNc ein Mangel an Komplex-I-Aktivität vorliegt (Reichmann und Riederer, 1989). Konsekutiv führt dies auch zu einer Veränderung des intrazellulären Ionenmilieus zugunsten einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dies wiederum würde eine erhöhte Nekroserate zur Folge haben (Niquet et al., 2006).

### **1.8.3 Mitochondriale Dysfunktion**

Der spezifische und selektive Verlust der Komplex-I-Aktivität der mitochondrialen Atmungskette in der Substantia nigra bei Parkinsonpatienten ist hinweisend für eine wichtige Rolle der Mitochondrien in der Pathogenese der Erkrankung. In der Zwischenzeit konnten mehrere Mutationen in nukleär kodierten Genen für mitochondriale Proteine bei Parkinson-Patienten nachgewiesen werden, was die Theorie dieses Entstehungsmechanismus der Erkrankung weiter stützt (siehe Kapitel 1.9).

Einen Überblick über das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten gibt Abbildung 1.1. Der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Krankheitsentstehung wird wahrscheinlich in der Erhöhung des oxidativen Stresses liegen. Man vermutet, dass es meist erst durch das Zusammenspiel von genetischen Suszeptibilitätsfaktoren und umweltbedingten Risikofaktoren zu der Erkrankung kommt, dagegen rufen wohl die Umweltfaktoren als auch eine genetische Disposition allein noch keine Symptome hervor (Übersicht in Burbulla und Krüger, 2011).

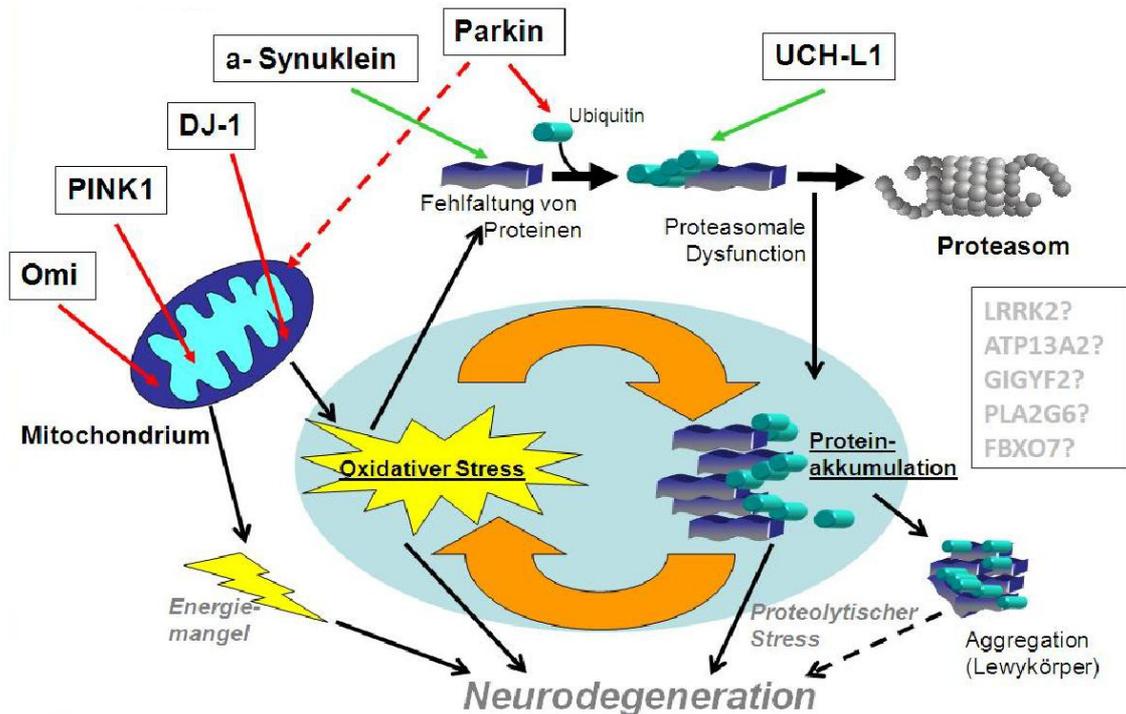


Abbildung 1.1: Modell für die Pathophysiologie der PK. Dargestellt sind die drei vermuteten Mechanismen (vermehrter oxidativer Stress, abnormale Proteinaggregation und gestörter Proteinabbau sowie mitochondriale Dysfunktion) in der Entstehung der Erkrankung und ihr Zusammenspiel. Die bereits bekannten Krankheitsgene und ihre Rolle bei der Neurodegeneration sind mit einbezogen. Modifiziert nach Krüger, 2005.

## 1.9 Das Mitochondrium

### 1.9.1 Aufbau und Funktion

Das Mitochondrium wird auch häufig als das „Kraftwerk“ einer Zelle bezeichnet. Es ist also die Organelle, die eine Zelle mit Energie in Form des universalen Energieträgers ATP (Adenosin-Triphosphat) versorgt. Das menschliche Gehirn ist besonders auf Energie angewiesen. Es benötigt etwa 20% des basalen Sauerstoffbedarfs. Die Mitochondrien sind dabei dafür verantwortlich, große Mengen an ATP zu synthetisieren, das die Nervenzellen für die Erzeugung von Aktionspotentialen und die Freisetzung von Neurotransmittern benötigen.

Die Mitochondrien sind aus zwei Doppellipidschichten aufgebaut, einer äußeren glatten Membran und einer inneren gefalteten Membran. Die äußere Membran ist von Poren durchsetzt und für die meisten Stoffe durchlässig, die innere Membran ist praktisch undurchlässig, sie besitzt aber zahlreiche Transportsysteme, die einen kontrollierten Stoffaustausch sicherstellen. Durch

die gefaltete Oberfläche können mehr Reaktionen gleichzeitig ablaufen. Der Innenraum der Mitochondrien wird als Matrixraum bezeichnet, auch in ihm finden Stoffwechselreaktionen statt (Übersicht in Frey und Manella, 2000; Logan, 2007).

Die Hauptfunktion der Mitochondrien liegt also in der Bereitstellung von Energie. Vor allem für den aeroben Energiestoffwechsel sind sie von Bedeutung, sie enthalten sämtliche Enzyme der Atmungskette und des Citratzyklus. Die Endstrecken des Abbaus von Nahrungsstoffen wie Glukose und Fettsäuren spielen sich alle in den Mitochondrien ab. Die Endprodukte der Glykolyse und der  $\beta$ -Oxidation werden im Citratzyklus in sogenannte Reduktionsäquivalente abgebaut, die dann von der Atmungskette, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, verarbeitet und in ATP umgewandelt werden (Horn et al., 2003).

Die Mitochondrien besitzen eine eigene ringförmige DNA bestehend aus 16569 Basenpaaren. Sie kodiert für mitochondriale Proteine wie die mitochondrialen RNA-Typen als auch für 13 mitochondriale Enzyme, nämlich Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V. Sie besitzen auch ihre eigenen Ribosomen, so dass die Mitochondrien selbst zur Proteinbiosynthese fähig sind. Der Rest der Enzyme (etwa 85%) ist kernkodiert, sie werden an freien Ribosomen im Zellplasma synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien transportiert. Das mitochondriale Genom wird maternal vererbt, da Spermien ihre Mitochondrien vor allem im Schwanzteil enthalten, aber nur der Kopfteil mit der nukleären Erbsubstanz in die Eizelle eindringt. Sollte doch mitochondriale DNA in die Eizelle eingedrungen sein, wird sie dort sofort abgebaut (Gerlach et al., 2007a).

Mitochondrien haben eine Lebensdauer von ca. 10-20 Tagen, anschließend werden sie von Lysosomen abgebaut. Sie vermehren sich unabhängig von der Zelle durch Vergrößerung und anschließende Teilung (Horn et al., 2003). Bei einer Zellteilung werden sie zufällig auf die beiden neu entstehenden Zellen aufgeteilt.

### 1.9.2 Rolle in der Pathogenese der PK

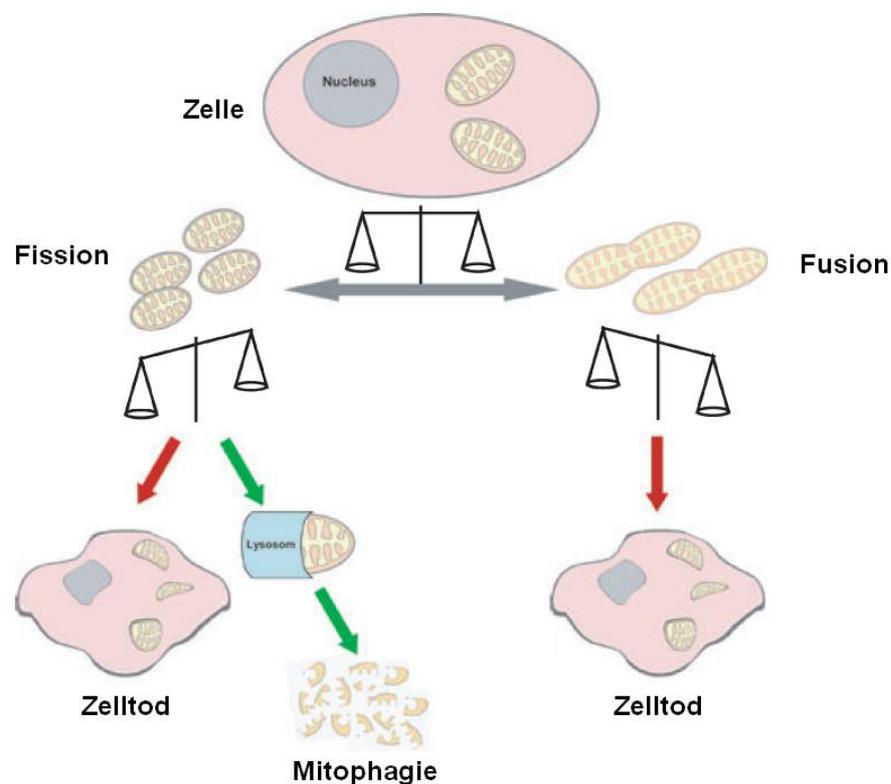
Erste Hinweise, dass Mitochondrien an der Pathogenese der PK beteiligt sind, hatten die Erkenntnisse der Erforschung der „erstarrten Süchtigen“ geliefert (siehe Kapitel 1.7 Biochemischer und genetischer Hintergrund). Es wurde herausgefunden, dass der mitochondriale Komplex I der Atmungskette durch den aktiven Metaboliten MPP<sup>+</sup> irreversibel gehemmt wird und dadurch parkinsonoide Symptome hervorgerufen werden. Reichmann und Riederer, aber auch Schapira und Kollegen, gelang es nachzuweisen, dass die Komplex-I-Aktivität bei Parkinson-Patienten signifikant vermindert ist (Reichmann und Riederer, 1989; Schapira et al., 1990). Zunächst hatte man eine Mutation im mitochondrialen Genom vermutet, ein Nachweis dafür konnte bislang aber noch nicht erbracht werden. Nach und nach konnten allerdings Veränderungen in nukleär kodierten Genen für mitochondriale Proteine bei Parkinson-Patienten entdeckt werden. So konnten erstmals verschiedene biochemische Erkenntnisse, die eine gestörte Mitochondrienfunktion bei der Pathogenese der PK vermuteten, genetisch gestützt werden (Schapira, 1999; Strauss et al., 2005; Valente et al., 2004).

Insgesamt wurden bisher Mutationen in vier nukleär kodierten Genen gefunden, deren Genprodukte aktiv entweder zu den Mitochondrien (Parkin) oder in die Mitochondrien (PINK1, Omi/HtrA2 und DJ-1) transportiert werden (Rothfuss et al., 2009; Weihofen et al., 2009; Strauss et al., 2005; Zhang et al., 2005; Canet-Aviles et al., 2004; Martins et al., 2004; Bonifati et al., 2003b). Diese Proteine haben bei der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Gleichgewichts wichtige Funktionen inne. Funktionsverlust- (sog. *Loss-of-function*)-Mutationen dieser Gene, die bei Parkinson-Patienten gefunden wurden, führen zu vermehrtem oxidativem Stress, einem reduzierten mitochondrialen Energiemetabolismus sowie zu mitochondrialer Dysfunktion *in vitro* und *in vivo* verbunden mit apoptotischem Zelltod (Grünewald et al., 2010; Irrcher et al., 2010; Krebiehl et al., 2010; Exner et al., 2007; Strauss et al., 2005). Somit stellen diese Gene die erste molekulare Verbindung zwischen der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Gleichgewichts und der Neurodegeneration bei der Parkinson-Krankheit dar.

Desweiteren spielen diese Proteine eine zentrale Rolle bei der mitochondrialen Qualitätskontrolle. Wenn diese beeinträchtigt ist, kommt es zum Nervenzelltod. Bei einer Schädigung der Mitochondrien akkumuliert PINK1 auf deren Oberfläche und bewirkt damit eine Rekrutierung von Parkin aus dem Zytosol zu den geschädigten Mitochondrien. Daraufhin werden diese der Autophagozytose zugeführt (Übersicht in Narendra und Youle, 2011; Narendra et al., 2010). Darüber hinaus ist PINK1 bei zellulärem Stress auch für die Phosphorylierung anderer mitochondrialer Proteine wie Omi/HtrA2 oder TRAP1 (TNF-Rezeptor assoziiertes Protein-1) verantwortlich und spielt damit bei der mitochondrialen Qualitätskontrolle eine wichtige Rolle (Plun-Favreau et al., 2007; Pridgeon et al., 2007).

Auch ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen mitochondrialen Fissions- und Fusionsvorgängen ist für die Integrität einer Nervenzelle von enormer Bedeutung. Bei den Mitochondrien handelt es sich um sehr dynamische Organellen, die sich durch Fission und Fusion in der Zelle fortbewegen und durch selektiven Abbau dysfunktionaler Organellen die Qualität der Mitochondrien-Population sicherstellen (Übersicht in Mandemakers et al., 2007; Übersicht in Tatsuta und Langer, 2008). Während der Fusion zweier Mitochondrien werden lösliche Proteine des Intermembran- und Matrixraums ausgetauscht. Dies ermöglicht ihnen, miteinander zu interagieren, toxische Metabolite zu verdünnen und sich durch die Formierung von Netzwerken zu schützen. Die Fission ist für den Abbau geschädigter Organellteile verantwortlich, auch stellt sie die Erneuerung und Umverteilung der Mitochondrienpopulation sowie die Ausbreitung in den synaptischen Spalt sicher (Übersicht in Knott und Bossy-Wetzel, 2008). Für die Aufrechterhaltung der metabolischen Funktion der Mitochondrien sowie für die schnelle Anpassung an sich ändernde zelluläre Verhältnisse ist ein ausgeglichener Mechanismus vonnöten, der beide Prozesse kontrolliert (Abbildung 1.2). Wird dieses System z.B. durch toxische Metaboliten oder auf Grund eines genetischen Defekts zugunsten der Fusion aus dem Gleichgewicht gebracht, resultieren daraus eine Elongation der Mitochondrien sowie eine erhöhte Produktion von Sauerstoffradikalen, was wiederum zum Zelltod und damit zur

Neurodegeneration führen kann. Dagegen hat ein Ungleichgewicht zugunsten der Fission die Fragmentation der Mitochondrien gefolgt von Autophagozytose dieser geschädigten und inaktiven Organellen zur Konsequenz (Lee et al., 2007; Dagda et al., 2009). Die beiden Proteine Drp1 (*dynamamin-related protein 1*) und hfis1 (*human mitochondrial fission 1 protein*) spielen dabei eine Schlüsselrolle bei der Fission der Mitochondrien, OPA1, Mfn1 und Mfn2 (*Mitofusin 1* und *2*) sind für die Fusionsprozesse von innerer und äußerer Mitochondrienmembran verantwortlich (Übersicht in Burbulla et al., 2010a).



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung des mitochondrialen Gleichgewichts von Fusions- und Fissionsprozessen sowie die Folgen einer Imbalance. Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Fusion und Fission, um die Homöostase der Zelle sicherzustellen. Gerät dieses Gleichgewicht zugunsten einer der beiden Prozesse aus der Balance, ist die Funktionalität der Zelle gefährdet. Ein Ungleichgewicht zugunsten der Fission hat entweder den lysosomalen Abbau der geschädigten Mitochondrien zur Folge, wobei die zelluläre Integrität erhalten bleibt (grüner Pfeil), oder aber den Zelltod durch Apoptose, falls die Beschädigung des Mitochondriums schwerer ist und die Ausschüttung pro-apoptotischer Proteine ausgelöst wird (roter Pfeil). Im Gegensatz dazu führt eine Imbalance zugunsten der Fusion zu einem Verlust der zellulären Integrität und damit zum Zelltod, denn Lysosomen sind nicht in der Lage strukturell intakte Mitochondriennetzwerke abzubauen, lediglich einzelne dieser Organellen. Der Grund für den Zelltod ist eine ineffektive Beseitigung dysfunktionaler Mitochondrien (modifiziert nach Burbulla et al., 2010a).

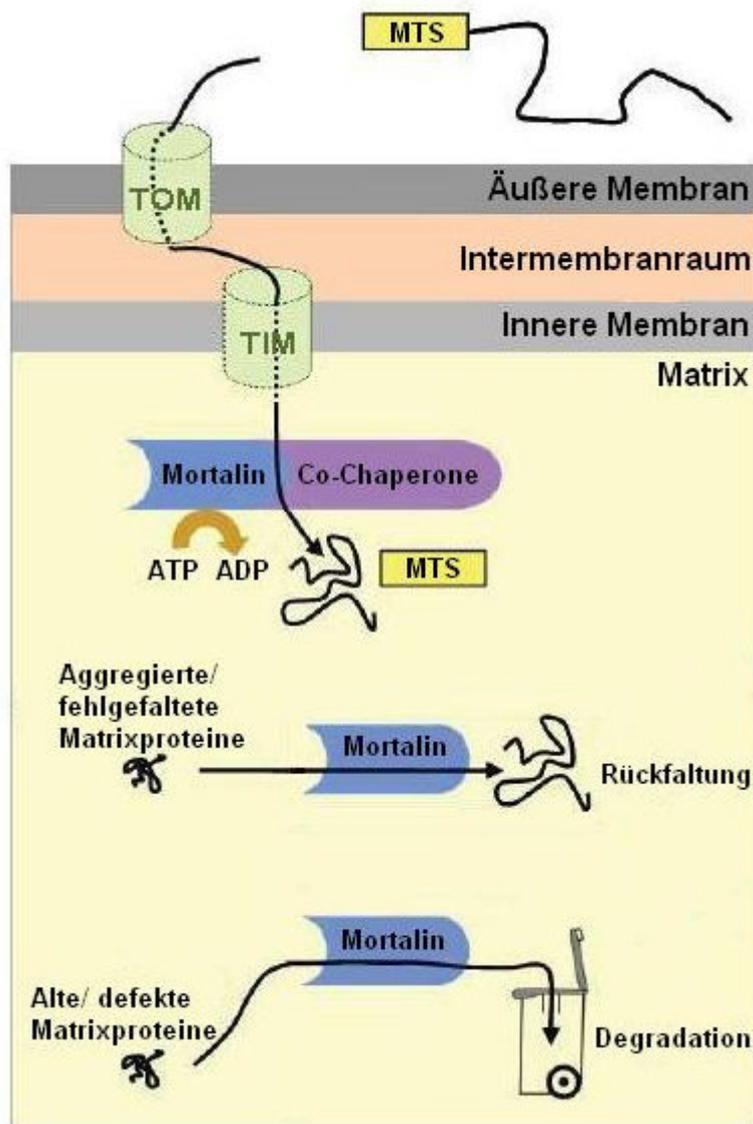
### **1.10 Mortalin (HSPA9, GRP75, mtHsp70, PBP74)**

In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde ein Protein entdeckt, das im Zusammenhang mit Zelltod steht und in malignen Tumorzellen hochreguliert wird (Takano et al., 1997; Kaul et al., 1998). Es hat den Namen Mortalin erhalten (Wadhwa et al., 1993; Kaul et al., 1993) und ist auch unter den Synonymen GRP75 (*glucose-regulated protein 75*), PBP74 (*peptide binding protein 74*) sowie HSPA9 (*heat shock 70kDa protein 9*) bekannt. Auch wurde herausgefunden, dass eine Überexpression von Mortalin die Lebensdauer von Fadenwürmern und diversen menschlichen Zellen erhöht (Kaula et al., 2000; Yokoyama et al., 2002; Kaul et al., 2003; Yaguchi et al., 2007).

Mortalin ist ein mitochondriales Hitzeschockprotein und gehört zur Familie der Hitzeschockproteine 70, darum auch die Abkürzung mtHsp70 (= mitochondriales Hitzeschockprotein 70). Hitzeschockproteine werden auch als Stressantwortproteine bezeichnet, da sie sowohl bei Hitze als auch bei anderen Arten von zellulärem Stress hochreguliert werden und so der Zelle helfen, den Stress zu überleben. Dies ist eng mit ihrer Funktion als Chaperone verknüpft. Chaperone (frz./ engl. = Anstandsdamen) helfen anderen Proteinen bei der korrekten Faltung ihrer Tertiärstruktur. Dadurch werden Fehlfaltungen und somit die Aggregation dieser Proteine verhindert. Diese Funktion ist vermehrt bei zellulärem Stress durch Hitze oder andere Faktoren notwendig, wo Proteine häufig fehlgefaltet werden und denaturieren. Die Chaperone helfen dabei, die Proteine wieder in ihre richtige Konformation zu überführen.

Mortalin besteht aus 679 Aminosäuren und kommt in verschiedenen Zellkompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum, zytoplasmatischen Vesikeln und dem Zellplasma vor (Wadhwa et al., 1995; Ran et al., 2000), was seine Multifunktionalität widerspiegelt. Hauptsächlich ist es aber im mitochondrialen Matrixraum lokalisiert. Da Mortalin ein kernkodiertes Protein ist, muss es durch die beiden Transmembrankomplexe TOM (= *translocase of the outer membrane*) und TIM (= *translocase of the inner membrane*) in die Mitochondrien eingeschleust werden (Webster et al., 1994; Übersicht in Rehling et al., 2004). Auch dort hat Mortalin eine wichtige Funktion inne. Man hat herausgefunden, dass das mitochondriale Hitzeschockprotein 70 und die

Translokase der inneren Mitochondrienmembran einen Komplex bilden, den Tim44/mtHsp70-Komplex und damit Mortalin direkt am Proteinimport in die Mitochondrien beteiligt ist (Schneider et al., 1994; Liu et al., 2003; D'Silva et al., 2004). Es ist das einzige Protein des mitochondrialen Import-Komplexes, das eine ATPase-Funktion besitzt, und ist damit unentbehrlich für den effektiven Import von nukleär kodierten Proteinen in das Mitochondrium (Schneider et al., 1994; Brunner et al., 1995). Hier kommt es dann auch seiner Chaperon-Funktion nach und stellt die richtige Faltung von neuen in das Mitochondrium transportierten, kernkodierten Proteinen sicher. Diese Reaktion ist ATP-abhängig (Übersicht in Voos und Röttgers, 2002). Zusätzlich ist Mortalin an der mitochondrialen Qualitätskontrolle beteiligt, indem es falsch gefaltete und aggregierte Proteine zurückfaltet (siehe Abbildung 1.3). So stellt es die Aufrechterhaltung der Mitochondrienfunktion sicher. Im Gehirn ist Mortalin hauptsächlich in den Neuronen zu finden, in Gliazellen dagegen nur bei pathologischer Aktivierung (Takano et al., 1997; Jin et al., 2006; Übersicht in Deocaris et al., 2008).



MTS = *mitochondrial targeting sequence*

**Abbildung 1.3:** Lokalisation und physiologische Funktion von Mortalin innerhalb der mitochondrialen Matrix. Mortalin bildet mit der Translokase der inneren Mitochondrienmembran einen Komplex, den Tim44/mtHsp70-Komplex und ist damit direkt am Proteinimport in die Mitochondrien beteiligt. Es besitzt als einziges Protein des mitochondrialen Import-Komplexes eine ATPase-Funktion. Zusätzlich hat Mortalin eine Chaperon-Funktion inne, die die richtige Faltung von neuen in das Mitochondrium transportierten, nukleär kodierten Proteinen sicherstellt. Diese Reaktion ist ATP-anhängig. Auch ist Mortalin an der mitochondrialen Qualitätskontrolle beteiligt, indem es falsch gefaltete und aggregierte Proteine zurückfaltet als auch alte und defekte Matrixproteine dem Abbau zuführt (modifiziert nach Burbulla et al., 2014).

Wie bereits erwähnt, ist Mortalin an der Regulation von zellulärer Alterung und Immortalisierung beteiligt. Proteine, die die Lebensdauer von Zellen regulieren, stehen in engem Zusammenhang mit der mitochondrialen Funktion, deren Energiemetabolismus und Produktion von Sauerstoffradikalen.

Interessanterweise werden die zelluläre Stressantwort und der Alterungsprozess als Hauptrisikofaktor angesehen, eine neurodegenerative Erkrankung wie Alzheimer oder Parkinson zu entwickeln (Übersicht in Söti und Csermely, 2002; Liu et al., 2005; Übersicht in Thal et al., 2004; Hajnóczky und Hoek, 2007). Eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion ist eng mit einer Dysbalance zwischen Fusions- und Fissionsprozessen sowie einem erniedrigten Energielevel verbunden. Dies kann die Aktivierung von Mechanismen nach sich ziehen, die den programmierten Zelltod einleiten.

Inzwischen wurde herausgefunden, dass Mortalin mit drei der durch PARK-Gene kodierten Proteine interagiert, nämlich Parkin, PINK1 und DJ-1, die, wie bereits in Kapitel 1.9.2 erwähnt, alle eine Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle spielen (Li et al., 2005; Jin et al., 2007; Yang et al., 2011; Rakovic et al., 2011; Davison et al., 2009; Burbulla, Schelling et al., 2010b).

Desweiteren fanden Jin und Kollegen im Jahre 2006 heraus, dass Mortalin in Gehirnen von Parkinson-Patienten erniedrigt vorkommt, im Gegensatz zu den ersten Beobachtungen in Tumorzellen (Jin et al., 2006). Auch ist es am Alterungsprozess des menschlichen Gehirns beteiligt (Jin et al., 2005). Zusätzlich könnte es mit dem Fortschreiten der Erkrankung in Verbindung stehen (Shi et al., 2008). So scheint eine Ausgewogenheit der Mortalin-Menge in einer Zelle elementar für die richtige Funktion und das Überleben derselben zu sein.

### **1.11 Ziel der Arbeit**

Nachdem Mortalin durch seine vielfältigen Eigenschaften und Aufgaben wie dem mitochondrialen Proteinimport, der Generierung von Energie, seiner Chaperonfunktion, der mitochondrialen Qualitätskontrolle, seinen protektiven Eigenschaften bei zellulärem Stress, seiner Interaktion mit DJ-1, PINK und Parkin sowie seinem Schutz vor Alterung immer mehr mit neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere der PK, in Verbindung gebracht worden ist, stellte es ein gutes Kandidatengem dar, um auf mögliche PK-verursachende Mutationen untersucht zu werden (Li et al., 2005; Jin et al., 2007; Kaul et al., 2007; Shi et al., 2008).

Mittels molekulargenetischer Methoden sollte somit ein möglicher pathogenetischer Zusammenhang zwischen Mortalin und der Parkinson-Krankheit nachgewiesen werden.

Hierzu wurde ein Kollektiv von 286 Parkinsonpatienten und 290 gesunden Kontrollen einem Mutationsscreening der kodierenden Sequenz des Mortalin-Gens sowie angrenzender intronischer Bereiche unterzogen. Dies geschah mittels denaturierender Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (DHPLC) und nachfolgender direkter Sequenzierung. Die dabei gefundenen Sequenzveränderungen sollten soweit möglich anhand einer unabhängigen Methode bestätigt werden.

Bei den Mitgliedern der Kontrollgruppe handelte es sich um gesunde Personen, bei denen die PK oder eine andere extrapyramidale Erkrankung klinisch neurologisch ausgeschlossen wurde und die in Alter und Geschlecht dem Patientenkollektiv ähnlich waren.

Nach der Identifikation von Sequenzvarianten im Mortalin-Gen wurden deren Häufigkeiten sowohl im Patienten- als auch im Kontrollkollektiv bestimmt. Die Allelfrequenzen beider Kollektive wurden dabei miteinander verglichen, um anhand möglicher signifikanter Unterschiede eine Assoziation mit der PK bestätigen zu können. Damit wurde die pathogenetische Relevanz verschiedener Varianten definiert.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Aufklärung der Bedeutung des Mortalin-Gens für die PK und damit zum Verständnis der molekularen Pathogenese der PK leisten und potentielle Angriffspunkte für neue neuroprotektive Therapiestrategien aufdecken.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden für diese Arbeit verwendet:

Acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose (UltraPure <sup>®</sup> )	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ampuwa injection water	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
BSA	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
ddH <sub>2</sub> O, 18,2 MΩ	Millipore, Eschborn
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat, Na <sub>2</sub> -Salz (EDTA)	BioWhittaker, USA
Natriumacetat (NaOAc)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomic, Omaha, USA
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
WAVE Mutationsstandard 56°C	Transgenomic, Omaha, USA
WAVE Mutationsstandard 70°C	Transgenomic, Omaha, USA
Xylencyanol	Merck KGaA, Darmstadt

Chemikalien, die hier nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen.



TspRI (10u/μl)/ 10x NEBuffer 4      New England Biolabs GmbH,  
Frankfurt am Main

#### **2.1.4 Längenstandard**

BenchTop 100bp DNA Ladder      Promega GmbH, Mannheim  
Fragmentlängen [bp]: 100, 200, 300,  
400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000,  
1500

#### **2.1.5 Reagenzienset (Kit)**

ABI BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle  
Sequencing Kit      Applied Biosystems Inc, Foster City,  
USA

#### **2.1.6 Geräte**

##### Autoclav:

V 50      Systec, Wetzlar

##### DHPLC:

WAVE<sup>®</sup> DNA Fragment Analysis System Transgenomic, Omaha, USA

##### Elektrophoresekammern:

Classic<sup>TM</sup> CSSU911      Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Classic<sup>TM</sup> CSSU2025      Thermo Fisher Scientific Inc., USA

##### Elektrophorese Spannungsgeber:

Consort Power Supply E861      Cleaver Scientific Ltd, UK

##### Geldokumentationsanlage

VILBER Lourmat Deutschland GmbH

##### PCR-Platten-Heiß-Versiegler:

Thermosealer      ABgene, Epsom, Surrey, UK

Heatsealer      Eppendorf, Hamburg

Photometer:

Biophotometer Eppendorf, Hamburg

Pipetten:

Gilson Pipetman Gilson, USA  
Eppendorf Reference Eppendorf, Hamburg  
Electronic Multichannel Pipette 2-20µl Rainin, Mettler-Toledo GmbH, Gießen  
Electronic Multichannel Pipette 20-200µl Rainin, Mettler-Toledo GmbH, Gießen  
Mehrfachdispenser HandyStep® Brand GmbH + Co KG, Wertheim

Sequenzierautomat:

3100-Avant Genetic Analyzer Applied Biosystems Inc, Foster City, USA

Thermocycler:

PTC-200 Peltier Thermal Cycler MJ Research Inc, Waltham, USA  
MJ Research PTC-220Dyad Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf  
GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems Inc, Foster City, USA

Thermomixer:

Thermomixer Comfort Eppendorf, Hamburg

Vortexer:

Vortex-GenieR-2 Scientific Industries, Toronto, Kanada

Waagen:

Universal Sartorius, Göttingen  
Micro Sartorius, Göttingen

Wasseraufbereitung:

Milli-Q Millipore GmbH, Eschborn

Zentrifugen:

Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
Biofuge pico	Haeraeus, Osterode
Multifuge 3S-R	Haeraeus, Osterode
FVL-2400	PeqLab, Erlangen

**2.1.7 Verbrauchsmaterialien**

Thermo-Fast <sup>®</sup> 96 Non-Skirted	ABgene, Epsom, Surrey, UK
Easy Peel Heat Sealing Foil	ABgene, Epsom, Surrey, UK
Adhesive PCR Sealing Foil	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Safe-Lock Tubes 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Combitipps 1,25ml	Eppendorf, Hamburg
PCR Softstrips 0,2ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

**2.1.8 DNA**

Untersucht wurden DNA-Proben von 286 Patienten, die entweder an einem klinisch gesicherten idiopathischen oder familiären Parkinson-Syndrom erkrankt waren. Die Patienten wurden von erfahrenen Neurologen der Universitätskliniken in Tübingen und Bochum untersucht und haben ihr Einverständnis für die Teilnahme an verschiedenen Studien nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch gegeben. Sowohl die Einverständniserklärung als auch die Genehmigung der molekulargenetischen Studien durch die Ethikkommission in Bochum und Tübingen lagen bereits vor, so dass keine weiteren Bewilligungen erforderlich waren.

Im Mittel waren die Patienten 65,14 ( $\pm$  10.51) Jahre alt, bei Diagnosestellung betrug das Durchschnittsalter 57,27 ( $\pm$  11.33) Jahre. Davon waren 145 Patienten männlich und 131 weiblich, das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug also 1,1:1.

Die Kontrollgruppe (*Old People*) bestand aus 290 Personen, die in der Alters- und Geschlechtsverteilung weitestgehend auf das Patientenkollektiv

abgestimmt waren. Auch sie waren einer standardisierten neurologischen Untersuchung unterzogen worden, um erste klinische Zeichen der Parkinson-Krankheit oder andere extrapyramidale Erkrankungen auszuschließen. Das mittlere Alter lag hier bei 72 ( $\pm$  4.34) Jahren. 52% davon waren Männer und 48% Frauen, das Verhältnis war damit ebenso ca. 1,1:1.

Zur vereinfachten Anwendung der Patienten-DNA-Proben wurden diese auf vier 96-Well-Platten verteilt, je zwei mit 80 und zwei mit 63 Proben. Die Kontroll-DNA lag ebenfalls in 96-well-Platten vor. Die in der Untersuchung verwendeten DNA-Proben lagen bereits in Form einer DNA-Bank im Labor für Funktionelle Neurogenomik des Hertie-Instituts für Klinische Hirnforschung vor. Zuvor wurden sie aus Leukozyten im Blut nach Standardmethoden isoliert (Miller et al., 1988). Für die nachfolgenden Analysen lag die genomische DNA in einer Konzentration von ca. 30 ng/ $\mu$ l vor.

Für die Etablierung der PCR wurde DNA des *Centre d'étude du polymorphisme humain* in Paris (kurz: *CEPH*, jetzt in *Fondation Jean Dausset* umbenannt) verwendet. Durch immortalisierte Zelllinien von jeder Person wird garantiert, dass ein uneingeschränkter Zugriff auf die jeweilige DNA für Forschungszwecke vorhanden ist. Neben der Größe der Familien und der zunehmenden Erkenntnis über deren Genom ist das ein Grund dafür, dass sie vielen genetischen Studien als Grundlage bzw. Kontrollbedingung dienen (Strachan und Read, 2005c).

### 2.1.9 Oligonukleotide

Anhand der zur Verfügung stehenden kodierenden Konsensus-Sequenz (CCDS4208.1) des Mortalin/GRP75-Gens wurde die genomische Sequenz identifiziert

([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000113013;r=5:137918923-](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000113013;r=5:137918923-)

137939014;t=ENST00000297185;time=1247486790750.75 am 21.07.2009)

und auf der Basis der den Exons benachbarten nicht-kodierenden Bereiche (Introns) die Primer für die Amplifikation der Exons ausgewählt. Bei jedem Primerpaar sollte die Schmelztemperatur in etwa übereinstimmen. Außerdem war es wichtig, die Fragmentlänge so zu wählen, dass der amplifizierte

Abschnitt so wenig intronische Sequenz wie möglich beinhaltet. Dadurch sollte die Detektion von häufigen Polymorphismen in den nicht-kodierenden Abschnitten vermieden werden. Da diese unter einem geringeren Selektionsdruck stehen, zeigen sie meist eine größere Variabilität, was aber in den meisten Fällen keine funktionellen Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz oder Expressionsstärke nach sich zieht. Durch die Einbeziehung der direkt an die Exons anschließenden intronischen Bereiche sollten jedoch auch Veränderungen in den intronischen Abschnitten detektiert werden, die für das Spleißen der Exons wichtig sind. Als weiteres Kriterium war die amplifizierte Fragmentlänge zu beachten. Sie durfte nicht größer als die für die Sensitivität der DHPLC-Methode kritische Länge von ungefähr 500 Basenpaaren sein. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms *Primer 3* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) am 21.07.2009) ausgewählt und sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

**Tabelle 2.1: Zusammenstellung der zur Amplifikation der entsprechenden Exon-Abschnitte verwendeten Primerpaare mit den zugehörigen Fragmentgrößen der Amplifikate**

Exon	Fragmentlänge	Exonlänge	Primersequenz fwd.	Primersequenz rev.
1	275bp	81bp	5'-tgg ttg gag gtt tcc aga ag-3'	5'-aat tca aac cct aaa ggg cg-3'
2	152bp	59bp	5'-ttc tct ttt tcc tcc cag gat-3'	5'-ttc cct ctc aaa gga aat ga-3'
3	246bp	88bp	5'-tcc agt gac ttt ggt cta tca aga-3'	5'-aaa gcg caa atc agg ttc tc-3'
4	278bp	182bp	5'-ctc tct atc aca ttt tgg gag ttt-3'	5'-cat gct gag gct ctt ctg tg-3'
5	259bp	125bp	5'-tgg tat gtg gta att ttg tca tgg-3'	5'-cta gtg atc tca cag gaa tca ttg-3'
6-7	447bp	74bp, 106bp	5'-gct gca aaa gga tga cac ag-3'	5'-cag taa aag cac tgt aaa agg ctc-3'
8	348bp	163bp	5'-atc ctg gtg ata ggg ttt gtt c-3'	5'-aag agt atc tgt gtc tag aat aag ggg-3'
9	235bp	93bp	5'-tgt gtt gtt cca cct tat tac tgc-3'	5'-ttt taa ata agc tcc ggc tg-3'
10	350bp	210bp	5'-aaa tgt aac cgt cat ttg gc-3'	5'-ggc cat ata ttt gtg cca cc-3'
11	368bp	228bp	5'-aca cgt gct ccc ttt tgt tc-3'	5'-ggc tgc aat tac atc cgt c-3'
12	305bp	105bp	5'-tct tgg aat gta aac ctt tgg c-3'	5'-cag tat gta tgt gta tgc cag cag-3'
13	234bp	118bp	5'-aat agc act gga ccc ctc tg-3'	5'-ggg tct att ccc aag acc tcc-3'
14	229bp	95bp	5'-tgc aat gga gga aga aga gg-3'	5'-ccc aaa ctc cca ctg tca ag-3'
15	225bp	93bp	5'-tgg ttg att gga aag tct tcg-3'	5'-ccc cta tca aaa ccc aca ga-3'
16	213bp	141bp	5'-tgg tac agg aga cct gga aaa-3'	5'-aaa atc cac ttc agc cct tg-3'
17	166bp	78bp	5'-aac gtt aaa tct gag tgg ctc t-3'	5'-tgt tgt cct tct ggc ttc aa-3'

**Tabelle 2.2:** Zusammenstellung der nur für die Etablierung der Amplifikation der verschiedenen Exon-Abschnitte verwendeten Primersequenzen. Da die PCRs, die mit diesen Primern etabliert werden sollten, zum Teil keine ausreichenden oder wenig spezifische Amplifikate ergaben, wurden diese Oligonukleotide für das Screening nicht benutzt, sondern durch andere Primer ersetzt.

Exon	Primersequenz
2-3 forward	5'-cta agt gag ccc aag ttt tct c-3'
4 forward	5'-ttg gga gct gtt tct gtg tc-3'
15-16 forward	5'-ctc tct caa agc cat ccc ag-3'
15-16 reverse	5'-gag tca aga cgg cag gag ac-3'

Die Synthetisierung der Primer erfolgte durch die Firma Metabion GmbH (Martinsried), sie wurden in einer Konzentration von 100pmol/µl verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht es, jedes beliebige DNA-Fragment *in vitro*, d.h. außerhalb eines lebenden Organismus, schnell und in großer Zahl zu amplifizieren (Mullis und Faloona, 1987; Strachan und Read, 2005a; Mülhardt, 2006b).

Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung der PCR war die Entdeckung thermophiler Bakterien (Taq), deren hitzestabile DNA-Polymerasen auch bei über 90°C noch aktiv sind. Zur Ausgangs-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt (*Template*) enthält, werden synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die als spezifische *Primer* fungieren, sowie die vier Desoxyribonukleinsäuren im Überschuss und die thermostabile DNA-Polymerase hinzugefügt. Für optimale Reaktionsbedingungen wird ein auf die DNA-Polymerase abgestimmter Puffer zugegeben, der für einen konstanten pH-Spiegel sorgt und unter anderem Mg<sup>2+</sup> enthält.

Die Grundlage der PCR ist ein rascher zyklischer Temperaturwechsel bestehend aus den Schritten *Denaturierung*, *Annealing* und *Elongation*. Am Beginn jeder PCR wird der Ansatz auf über 90°C erhitzt, wodurch eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA stattfindet. Dadurch liegt sie in Einzelsträngen vor und die *Primer* können sich bei der anschließenden

Abkühlung auf ungefähr 50-60°C daran anlagern und spezifische Wasserstoffbrückenbindungen mit den ihnen komplementären DNA-Strängen eingehen. Dieser zweite Schritt wird auch als *Annealing* bezeichnet. Für ein optimales Ergebnis muss die Annealing-Temperatur auf die verwendeten Primer abgestimmt sein. Eine zu hohe Temperatur führt zu einer unvollständigen Hybridisierung. Wählt man die Temperatur zu niedrig, entstehen viele unspezifische Produkte, die sich im Gel als zusätzliche Banden oder als Schmierspuren darstellen. Als dritter Schritt folgt die Elongationsphase. Die Temperatur liegt dabei meist zwischen 65°C und 75°C und stellt das Temperaturoptimum für die Polymerase dar. Sie wird vom Hersteller angegeben und liegt in der Regel bei 72°C. Ausgehend von den 3'-Enden der Oligonukleotide wird der komplementäre DNA-Strang aus den dNTPs gebildet. Die Syntheserate der Taq liegt in etwa bei 1,5-2 kbp pro Minute.

Durch die Verwendung von zwei entgegengesetzten Oligonukleotiden entsteht in Verlängerung vom *forward*-Primer der Sinnstrang (oder ‚sense‘-Strang) und gleichzeitig vom *reverse*-Primer ausgehend der Gegensinnstrang (oder ‚antisense‘-Strang). Dadurch werden beide Stränge des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts repliziert und dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrize.

Das Magnesium wird von der Taq für den Einbau der dNTPs während der Elongation benötigt. Die Magnesium-Ionen bilden dafür lösliche Komplexe mit den Desoxyribonukleinsäuren. Sie stimulieren außerdem die Aktivität der Polymerase, beeinflussen *Primerannealing* ebenso wie die Denaturierung der Doppelstränge und sind mitverantwortlich für Produktspezifität und Fehlerrate (Mülhardt, 2006b).

Bei zu hoher Magnesium-Konzentration steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit für unspezifische Amplifikate an, d.h. die richtige Konzentration muss sorgfältig ausgewählt werden.

Meist werden diese Schritte 30-35 mal wiederholt und dadurch der gewünschte DNA-Abschnitt potenziert. Je höher die Anzahl der Zyklen gewählt wird, desto mehr Kopien erhält man. Dabei steigt aber auch die Rate der Synthesefehler, so dass es bei früh auftretenden Fehlern zu artifizieller Heterozygotie kommen kann.

Um alle angefangenen Synthesen zu vervollständigen, wird nach dem letzten Zyklus ein weiterer Elongationsschritt angefügt. Danach wird das PCR-Produkt auf unter 10°C gekühlt und bis zur Weiterverwendung bei 4°C oder auch -20°C aufbewahrt.

### 2.2.1.1 Etablierung der PCR

Um möglichst optimale Bedingungen für die Amplifikation zu erreichen, wurden verschiedene Parameter variiert. Zum im Puffer enthaltenen Magnesium wurden  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen von 0mM, 1mM oder 2mM addiert. Auch die Annealing-Temperatur wurde verändert und das Ergebnis verglichen. Als Puffer wurde immer der zum Enzym mitgelieferte Reaktionspuffer verwendet. Meist wurde die BioTherm-Taq-Polymerase verwendet, wenige Male zum Vergleich die Polymerase von Fermentas.

**Tabelle 2.3: PCR-Ansatz für die Methodenetablierung mit verschiedenen  $MgCl_2$ -Konzentrationen**

	Menge in $\mu$ l für 25 $\mu$ l Ansätze
Template-DNA [ca. 30ng/ $\mu$ l]	0.5
Puffer [10x]	2.5
dNTPs [2mM]	1.0
Primer forward [10 $\mu$ M]	2.0
Primer reverse [10 $\mu$ M]	2.0
Taq-Polymerase [5u/ $\mu$ l]	0.5
Magnesiumchlorid [50mM]	0.0; 0.5; 1.0
Wasser	ad 25 $\mu$ l

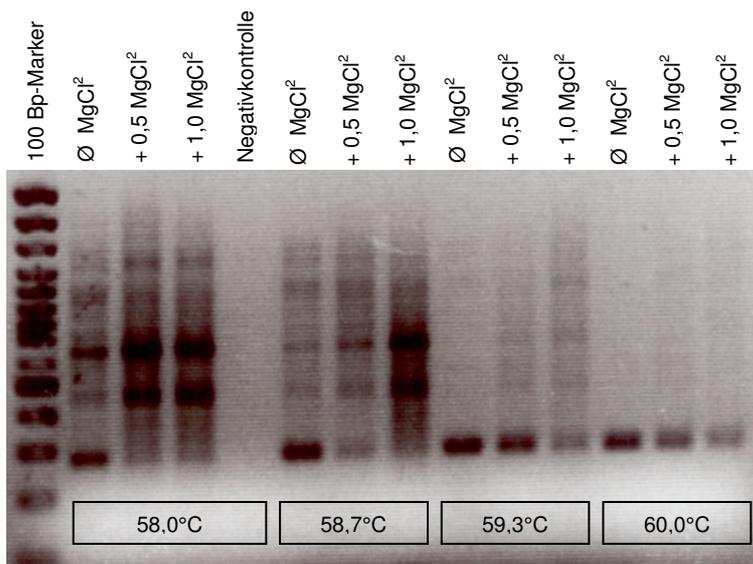
Konnte mit der errechneten Annealing-Temperatur kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden, wurde zusätzlich die beste Annealing-Temperatur über eine Gradienten-PCR ermittelt. Je nach zuvor errechneter Anlagerungstemperatur war der Gradient von 50-60°C oder von 55-65°C eingestellt. Zur noch genaueren Ermittlung der richtigen Temperatur, wurde dieser teilweise weiter eingeschränkt. Der Gradient war nur in der Annealing-Phase angelegt, die anderen Temperaturen wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen konstant gehalten (Tabelle 2.4).

**Tabelle 2.4: Beispiel für ein Cycler-Programm mit Temperaturgradient in der Annealing-Phase zur verbesserten Primeretablierung**

1	95° C	3'	Denaturierung	1x
2	95° C	30"	Denaturierung	30x
3	50°C→60°C	30"	Annealing	
4	72° C	30"	Elongation	
5	72° C	3'	Elongation	1x
6	8° C	∞	Kühlung	1x

Die Qualität der PCR wurde anhand einer Gelelektrophorese durch Nachweis einer distinkten Produktbande und möglicher Nebenprodukte ermittelt.

Im Vergleich zeigte sich, dass bei allen Primern ohne zusätzliches Magnesium die besten Ergebnisse erzielt wurden. Das Magnesium, das schon im Puffer enthalten war, reichte aus.



**Abbildung 2.1: PCR-Etablierung von Exon 1 mit einem Temperaturgradienten von 58-60°C in der Anlagerungsphase. Ganz links ist der 100 Bp-Marker aufgetragen, er dient als Größenvergleich. Es folgen vier Spuren bei 58,0°C und jeweils drei Spuren bei 58,7°C, 59,3°C und 60,0°C. Die drei Bahnen entsprechen jeweils einer zum mitgelieferten Puffer hinzugefügten  $MgCl_2$ -Konzentration von 0mM, 0,5mM und 1,0mM. Spur 5 zeigt die Negativkontrolle.**

Der ermittelte PCR-Ansatz und das PCR-Programm für Exon 3 sind in Tabelle 2.5 und Tabelle 2.6 zusammengefasst.

**Tabelle 2.5: PCR-Ansatz für Exon 3 mit BioTherm-Taq-Polymerase**

	Menge in $\mu\text{l}$ für 25 $\mu\text{l}$ Ansätze
Template-DNA [ca. 30ng/ $\mu\text{l}$ ]	0.5
Puffer [10x]	2.5
dNTPs [2mM]	1.0
Primer forward [10 $\mu\text{M}$ ]	2.0
Primer reverse [10 $\mu\text{M}$ ]	2.0
Taq-Polymerase [5u/ $\mu\text{l}$ ]	0.5
Wasser	16.5 (ad 25 $\mu\text{l}$ )

**Tabelle 2.6: PCR-Programm für Exon 3**

1	95° C	3'	Denaturierung	1x
2	95° C	30"	Denaturierung	35x
3	60° C	30"	Annealing	
4	72° C	30"	Elongation	
5	72° C	3'	Elongation	1x
6	8° C	$\infty$	Kühlung	1x

Auf Grund unspezifischer Amplifikationsergebnisse bei der Etablierung einiger Exons wurde im Ansatz versuchsweise auch DMSO, Formamid oder Betain verwendet. Diese können die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Template-DNA verhindern und so die Amplifikation GC-reicher Sequenzen erleichtern (Mülhardt, 2006b). Aber auch das brachte keine Verbesserung der Ergebnisse.

Daher wurde auf eine andere Polymerase umgestellt und ein anderes Protokoll ausprobiert.

### 2.2.1.2 *Touchdown*-Protokoll

Nach Testung verschiedener PCR-Bedingungen wurden mit Ausnahme von Exon 3 alle PCRs nach dem *Touchdown*-Protokoll etabliert, bei dem mit einer hohen *Annealing*-Temperatur begonnen wird, was eine höhere Bindungsspezifität der Primer bedeutet. Dadurch werden Primer-Dimere und Nebenprodukte durch Fehlanlagerung verringert. In den nächsten 10 Zyklen wird die Temperatur um je 1°C pro Zyklus gesenkt, in den folgenden 30-35

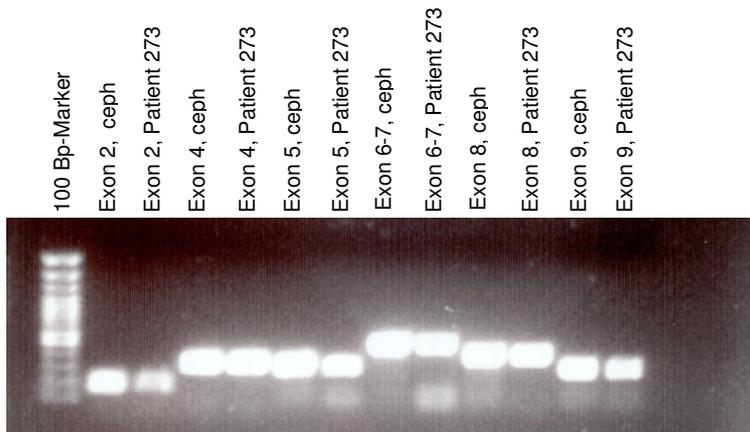
Zyklen bleibt die *Annealing*-Temperatur konstant. Da nach den ersten 10 Zyklen viele spezifische Replikate vorliegen, besteht bei diesem Überschuss nur ein geringes Risiko der unspezifischen Bindung. Damit wird eine übermäßige Amplifikation unspezifischer Sequenzen verhindert. Nach Beendigung wird noch, wie oben schon erwähnt, eine weitere Elongationsphase angeschlossen, um alle angefangenen Synthesen zu komplettieren. Wie auch in der Literatur beschrieben, stellt es eine Vereinfachung der PCR-Etablierung dar (Korbie und Mattick, 2008; Hecker und Roux, 1996). Mit einem einzigen Protokoll (siehe Tabelle 2.8) konnte die PCR für alle Exons etabliert werden.

**Tabelle 2.7: Ansatz für die Etablierung der Touchdown-PCR mit Taq-Polymerase von Promega**

	Menge in $\mu\text{l}$ für 25.5 $\mu\text{l}$ Ansätze
Template-DNA [ca. 30ng/ $\mu\text{l}$ ]	0.5
Puffer [5x]	5.2
dNTPs [2mM]	2.0
Primer forward [10 $\mu\text{M}$ ]	2.0
Primer reverse [10 $\mu\text{M}$ ]	2.0
Taq-Polymerase [5u/ $\mu\text{l}$ ]	0.1
Wasser	13.7 (ad 25.5 $\mu\text{l}$ )

**Tabelle 2.8: PCR-Touchdown-Protokoll**

1	94°C	5'	Denaturierung	1x
2	94°C	30"	Denaturierung	10x
3	65°C	30" (-1°C pro Zyklus)	Annealing	
4	72°C	30"	Elongation	
5	94°C	30"	Denaturierung	30-35x
6	55°C	30"	Annealing	
7	72°C	30"	Elongation	
8	72°C	6'	Elongation	1x
9	8°C	$\infty$	Kühlung	1x



**Abbildung 2.2:** Ergebnisse der Amplifikation mittels Touchdown-PCR von Exon 2, 4, 5, 6-7, 8 und 9. In Spur 1 ist der 100 Bp-Marker aufgetragen, dann folgen jeweils zwei Spuren für jedes Exon. Die erste der beiden mit CEPH-DNA, die zweite mit DNA von Patient 273.

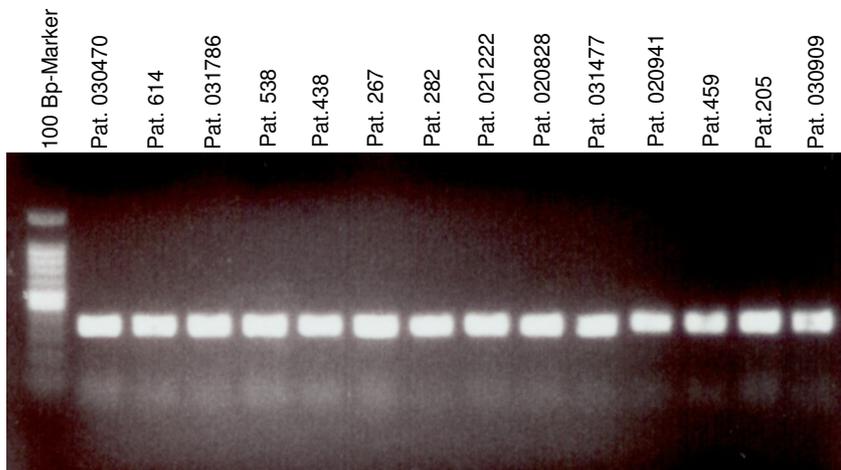
### 2.2.1.3 Etablierung einer *Proofreading*-Polymerase

Manche DNA-Polymerasen haben noch zusätzlich eine Korrekturlese-Funktion (engl. *proof-reading*), um zu verhindern, dass es zu Fehlern beim Ablesen der DNA-Matrize kommt. Sie sind in der Lage, den Einbau eines falschen Nukleotids zu registrieren und dieses wieder zu entfernen. Diese Funktion bezeichnet man auch als 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. Je nach verwendetem Enzym kann man mit einer bis zu 10fach höheren Genauigkeit rechnen.

Da beim Exon 8 sehr viele unterschiedliche Kurvenverläufe in der DHPLC als Hinweis auf Amplifikationsartefakte aufgetreten waren und auch die Sequenzierung auf Grund störender Fehlamplikate häufig keine Basensequenz ergeben hatte, wurde hier zusätzlich die PCR mit einer *Proofreading*-Polymerase etabliert, um das Risiko für artifizielle Mutationen so gering wie möglich zu halten. Als PCR-Programm wurde das Touchdown-Protokoll (Tabelle 2.8) verwendet.

**Tabelle 2.9: PCR-Ansatz mit *Proofreading*-Polymerase**

	Menge in $\mu\text{l}$ für 25 $\mu\text{l}$ Ansätze
Template-DNA [ca. 30ng/ $\mu\text{l}$ ]	1.0
Puffer [5x]	2.5
dNTPs [2mM]	2.0
Primer forward [10 $\mu\text{M}$ ]	2.0
Primer reverse [10 $\mu\text{M}$ ]	2.0
Pwo-Polymerase [1u/ $\mu\text{l}$ ]	0.5
Wasser	15.0 (ad 25 $\mu\text{l}$ )



**Abbildung 2.3: PCR-Etablierung mit pwo (steht für *Pyrococcus woesei*, ein thermophiles Archaeobakterium, aus dem diese Polymerase isoliert wurde) bei Exon 8. Ganz links ist der 100 Bp-Marker aufgetragen, danach folgen die Amplifikate von Patienten.**

#### 2.2.1.4 Etablierung der PCR zur Verwendung der Patienten-DNA

Bevor mit der Etablierung der PCR zur Verwendung der Patienten-DNA begonnen werden konnte, musste zuerst die Original-DNA verdünnt werden. Um herauszufinden, was die niedrigst mögliche Verdünnung ist, um Original-DNA zu sparen, die Konzentration aber auch noch hoch genug ist, um ein gutes Ergebnis zu erhalten, wurde eine Verdünnungsreihe mit Verdünnungen von 1:20, 1:40 und 1:60 hergestellt. Für jede Verdünnung wurde eine PCR angesetzt und das Ergebnis anhand einer Gelelektrophorese verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass bei der Verdünnung mit 1:60 nur noch wenig Ausbeute erwartet werden konnte, aber eine Verdünnung mit 1:40 noch ausreichend war, um Original-DNA gegenüber einer Verdünnung mit 1:20 zu sparen. So wurde

also die Original-DNA 1:40 verdünnt und sowohl für die Etablierung der PCR mit Patienten-DNA als auch für das Screening eingesetzt.

Das Protokoll und das Rezept aus Abschnitt 2.2.1.1 konnten für Exon 3 ohne Veränderung auf die PCR mit Patienten-DNA angewandt werden, ebenso war es möglich, das Touchdown-Protokoll und das Rezept aus Abschnitt 2.2.1.2 auf die restlichen Exons unverändert zu übertragen.

Einige wenige Proben waren nicht amplifizierbar, was sich am ehesten mit dem Probenalter und damit verbundenen Qualitätseinbußen durch Scherung in Folge häufigen Einfrierens und Auftauens erklären lässt oder auch auf eine mögliche Kontamination mit DNAsen (Enzyme, die DNA abbauen) oder DNA-Degradation durch Pilzbefall hinweisen kann.

## **2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Um das Ergebnis einer DNA-Amplifikation oder einer Restriktion zu überprüfen, wurde die Methode der Gelelektrophorese angewandt, mit der DNA-Fragmente von 100-10000bp der Größe nach aufgetrennt werden können. Dabei bewegt sich die negativ geladene DNA in einem angelegten Spannungsfeld zur Anode, kurze Fragmente wandern schneller als längere. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid wandert in entgegengesetzter Richtung und interkaliert mit der DNA. An Orten mit erhöhter DNA-Konzentration befindet sich folglich mehr Ethidiumbromid. Dieses emittiert unter UV-Licht (254-366 nm) Licht im sichtbaren, orange-roten Bereich (590 nm). DNA-Fragmente werden dadurch indirekt sichtbar gemacht. Das Ergebnis konnte dann mit einer Digitalkamera festgehalten werden.

Meist wurden 1,5- bis 2%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose mit dem zugehörigen Volumen 1xTAE vermischt und in der Mikrowelle solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nachdem das Gemisch auf ca. 50-60°C abgekühlt war, wurde 0,5-1µg EtBr<sup>-</sup> pro ml Agaroselösung zugefügt, gut vermischt und blasenfrei in einen Gelschlitten mit entsprechenden Kämmen (zur Bildung der Geltaschen) gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurden die Kämmen entfernt und der Schlitten mit dem Gel in eine Elektrophoresekammer gebracht. In der Zwischenzeit waren die Proben wie folgt vorbereitet worden:

Der DNA wurde ein Ladepuffer zugefügt, der die Proben zum besseren Auftragen in die Geltaschen beschwert und die Diffusion derselben verhindert. Das enthaltene Bromphenolblau und Xylencyanol zeigen an, wie weit das Produkt im Gel gelaufen ist. Als Längenstandard wurde meist der 100bp-DNA-Standard aufgetragen. Die Agarosegel-Elektrophorese erfolgte mit 1x TAE überschichtet bei ca. 100V (Mülhardt, 2006a).

**Tabelle 2.10: Ansatz für ein kleines Agarosegel mit 1,5% und 2%**

Agarosegel (w/v)	1,5%	2%
Agarosepulver	0,6g	0,8g
TAE Puffer [1x]	40ml	40ml
Ethidiumbromid [10mg/ml in H <sub>2</sub> O]	2,5µl	2,5µl

Bei dementsprechend größeren Gelen wurde die Menge hochgerechnet.

### 2.2.3 Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (DHPLC)

Die denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*denaturing high performance liquid chromatography*) wurde wegen ihrer Effizienz, Schnelligkeit, hoher Sensitivität und Spezifität für die Untersuchung von Sequenzauffälligkeiten in den Kandidatengenomen als sogenannte Hochdurchsatztechnik ausgewählt (Oefner und Underhill, 1995; Kuklin et al., 1997-1998; Übersicht in Xiao und Oefner, 2001; Übersicht in Oefner und Huber, 2002).

Das Verfahren der DHPLC beruht auf der Auftrennung von DNA in unterschiedliche Fraktionen auf Grund verschiedener Bindungsfähigkeiten von Homo- und Heteroduplices an eine Matrix.

Als stationäre Phase dient eine hydrophobe, unpolare Säule (DNASep<sup>®</sup> Cartridge, Transgenomic, Omaha, USA), welche aus einer Polymermatrix aus Polystyrendivinylbenzol besteht. In der mobilen Phase übernimmt das amphiphile Triethylammoniumacetat (TEAA) die Funktion eines Brückenmoleküls. Es bindet mit seinen hydrophoben Alkylgruppen an die Polymermatrix der Säule, seine hydrophilen Ammoniumkationen treten über

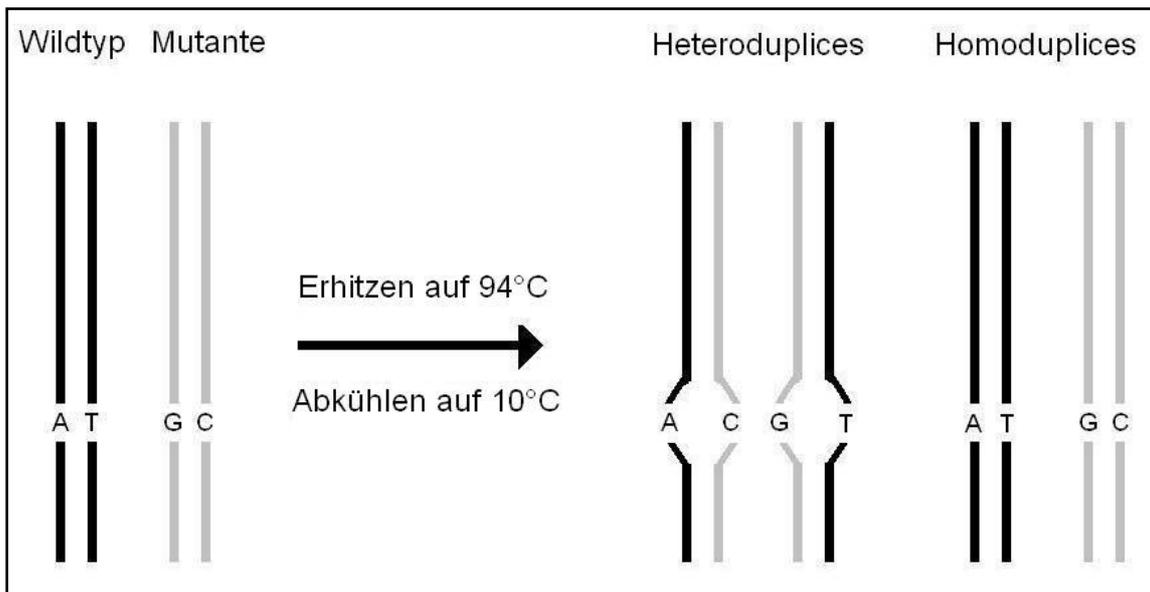
elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA in Verbindung.

Durch eine kontinuierlich ansteigende Acetonitrilkonzentration wird die DNA von der Säule verdrängt und in das Photometer gespült. Die von der Säule eluierte DNA wird von einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 260nm registriert und computergestützt über ein Absorptions-Zeit-Chromatogramm ausgewertet.

**Tabelle 2.11: Programm zur Vorbereitung der Proben auf den DHPLC-Lauf in einem Thermocycler**

Temperatur	Dauer	
94°C	2min	Denaturierung
Langsames Abkühlen auf 10°C	ca. 20min	Renaturierung
10°C	dauerhaft	Kühlung

Bevor die Proben die Säule durchlaufen, muss die Bildung der Homo- und Heteroduplices erfolgen (Tabelle 2.11). Zunächst wird die zuvor amplifizierte DNA bei 94°C denaturiert und anschließend wieder langsam auf 10°C abgekühlt und damit renaturiert. Treffen bei diesem Vorgang die beiden ursprünglichen Stränge aufeinander, passen sie wieder optimal zusammen und bilden einen sogenannten Homoduplex. Treffen verschiedene Allele aufeinander, kommt es im Falle einer heterozygoten Mutation durch die unvollständige Aneinanderlagerung zu einem Heteroduplex (Abbildung 2.4). Bei einer homozygoten Veränderung würde sich wiederum ein Homoduplex ergeben.



**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung der Entstehung von Homo- und Heteroduplices. Bei heterozygoten Anlageträgern sind Wildtyp und Mutante im Verhältnis 1:1 vorhanden. Nach Denaturierung entstehen durch Hybridisierung Homo- und Heteroduplices in gleicher Menge. Heteroduplices enthalten Basen-Mismatches und sind dadurch thermoinstabiler. (Abbildung nach Schwarzer, 2000)

Homoduplices sind in ihrem Grundgerüst stabiler und binden deshalb besser an die Matrix der Säule. Aus diesem Grund wird auch eine höhere Acetonitrilkonzentration benötigt, um sie von der Polymermatrix herunter zu waschen als bei den instabileren Heteroduplices.

Die Ursache hierfür ist die Freilegung eines hydrophilen Kerns in der DNA bei einer fehlerhaften Aneinanderlagerung zweier Basen. Dieser Kern interagiert mit dem Acetonitril in der mobilen Phase und führt so zu einem schnelleren Ablösen des DNA-Strangs von der stationären Phase. Durch Wahl der geeigneten Analysetemperatur wird der Vorgang noch weiter beschleunigt. Ergebnis ist ein signifikant schnelleres Ablösen der Heteroduplices im Vergleich mit den Homoduplices, was in der Elutionskurve erkennbar ist.

Um den zeitlichen Abstand zum Ablösen der Homoduplices so groß wie möglich zu halten, musste die optimale Temperatur ermittelt werden. Auf Grund der nicht homologen Basenpaarung haben Heteroduplices einen niedrigeren Schmelzpunkt. Verglichen mit Homoduplices denaturieren sie also schon bei niedrigeren Temperaturen. Bei Temperaturen knapp unterhalb dieses Schmelzpunktes ist demzufolge die teilweise Denaturierung der Heteroduplices

schon weiter fortgeschritten als die der Homoduplices. Im Idealfall sind die Heteroduplices schon komplett denaturiert, während die Homoduplices noch als Doppelstrang vorliegen. Die Temperatur sollte daher um den Schmelzpunkt der DNA herum gewählt werden und hängt vom GC-Gehalt der untersuchten Probe ab. Da einzelne Abschnitte eines Amplifikats ein unterschiedliches Schmelzverhalten zeigen können, war es manchmal notwendig zwei Temperaturen zu wählen (Tabelle 2.12).

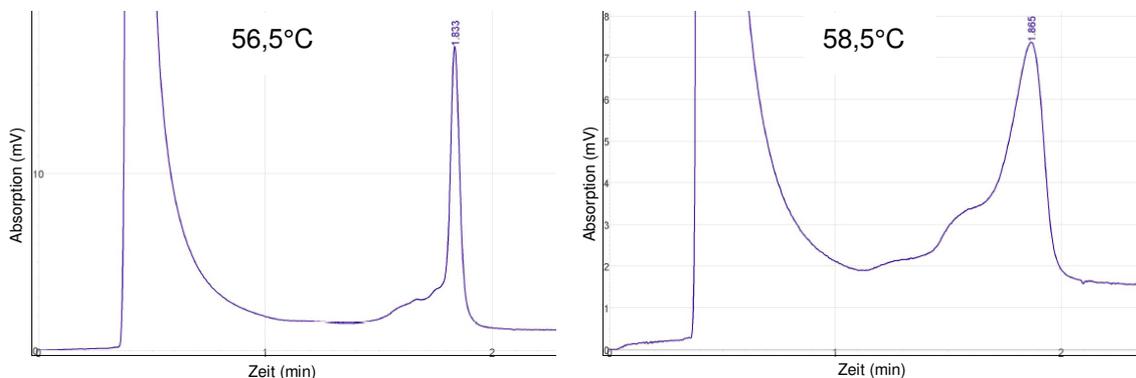
**Tabelle 2.12: Temperaturwahl und zugehörige Time-Shifts zur DHPLC-Analyse**

Untersuchte Region (Exon)	Temperatur [°C]	Time Shift [min]
1	63,5 + 66,6	(-0,1) + (Ø)
2	56,0 + 58,0	(-0,3) + (+0,25)
3	55,2 + 57,4	(-0,4) + (-0,1)
4	58,2 + 61,4	(-0,2) + (+0,5)
5	54,6 + 58,0	(-0,4) + (+0,5)
6-7	55,0 + 57,3	(-0,1) + (+0,3)
8	54,6 + 58,0	(Ø) + (+0,9)
9	57,3 + 59,2	(-0,2) + (+0,2)
10	57,8	(-0,45)
11	56,5 + 60,0	(-0,3) + (+0,6)
12	55,7 + 57,7	(+0,2) + (+0,7)
13	55,8 + 57,8	(-0,4) + (-0,1)
14	55,9	(-0,25)
15	56,2	(-0,2)
16	56,0 + 58,4	(-0,2) + (+0,2)
17	56,5 + 58,5	(-0,1) + (+0,4)

Um zu gewährleisten, dass keine homozygoten Mutationen entgehen, wurden die PCR-Produkte zweier Patienten vor dem Screening vermischt (sogenanntes *Pooling*). Wie weiter oben schon erwähnt, würden bei einer homozygoten Veränderung nach De- und anschließender Renaturierung nur Homoduplices entstehen. Durch das *Pooling* von Wildtyp und Mutante entstehen Heteroduplices, die als auffällig detektiert werden können. Die

Wahrscheinlichkeit, dass die DNA zweier homozygoter Mutationsträger vermischt wird, kann auf Grund der niedrigen Frequenz bislang gefundener Genveränderungen und der hohen genetischen Heterogenität bei der Parkinson-Krankheit als vernachlässigbar gering angesehen werden (Übersicht in Schiesling et al., 2008).

Für eine möglichst optimale Auftrennung von Hetero- und Homoduplices, müssen die Ofentemperatur und der AcN-Gradient genau eingestellt werden. Über ein Schmelzkurven-Profil der Ziel-DNA, wurde mit Hilfe der Software WAVEMAKER® von Transgenomic, Omaha, USA die optimale Temperatur für jede Schmelzdomäne eines Amplifikats ermittelt. Dazu gibt man die Basensequenz des entsprechenden Fragments vor, das Programm schlägt eine Temperatur vor, die zu partiell denaturierenden Bedingungen führt. Ziel ist es, mit so wenig verschiedenen Temperaturen wie möglich, das komplette Amplifikat abzudecken. Nach Eingabe von verschiedenen Temperaturen, die von der Software graphisch umgesetzt und dargestellt werden, werden so die Bedingungen ermittelt.

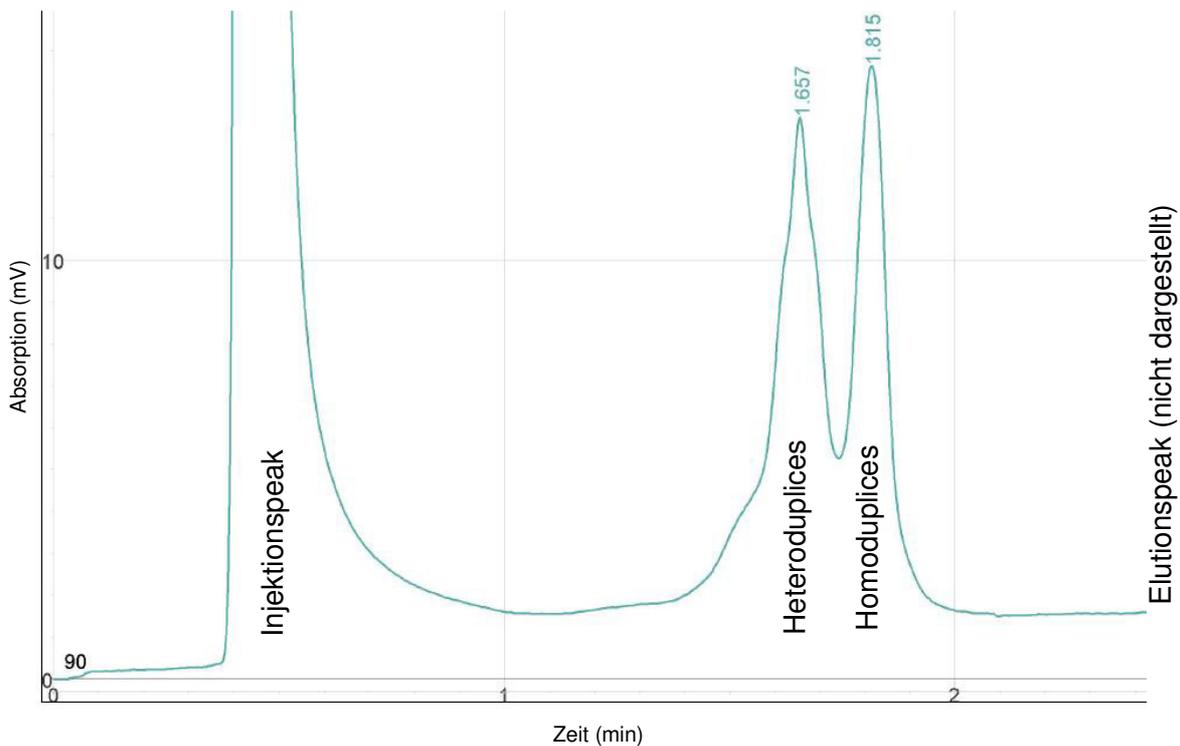


**Abbildung 2.5: DHPLC-Kurven für Exon 17 mit CEPH. Links: Elutionsprofil bei 56,5°C; rechts: Elutionsprofil bei 58,5°C. Der Vergleich zeigt, dass sich dieselbe Probe bei Variation der Temperatur unterschiedlich auftrennt.**

Der passende AcN-Gradient wird ebenfalls von WAVEMAKER® vorgeschlagen. Gegebenenfalls kann er über einen *Time-Shift* verändert werden, damit der Elutionspeak ungefähr 1,7min nach Injektion erfolgt. Die gewählten Time-Shifts können ebenfalls Tabelle 2.12 entnommen werden.

Jede Messung wurde aufgezeichnet und in Form einer Kurve dargestellt. Dabei repräsentiert der erste Gipfel den Injektionspeak. Er entsteht durch die

Detektion von dNTPs, Primern, Enzym und Ionen etc.. Anschließend löst sich das Amplifikat selbst, zuerst die Heteroduplices, dann die Homoduplices. Schließlich folgt der Elutionspeak, bei dem alles, was noch an der Säule bindet, abgewaschen wird, um sie für die nächste Probe vorzubereiten. Er wird bei den gezeigten Kurven nicht dargestellt.



**Abbildung 2.6:** Beispiel für eine DHPLC-Kurve zur Erläuterung des Kurvenaufbaus (hier: Pat. 90, Exon 6-7). Der erste Gipfel, der wegen seiner extremen Absorptionshöhe nicht vollständig abgebildet ist, entspricht dem *Injektionspeak*. Dabei werden sämtliche kleine Partikel, wie Ionen, Primer, überschüssige dNTPs, die in der Probe enthalten sind, von der Säule detektiert. Der zweite *Peak* entsteht durch die Ablösung der Heteroduplices von der Säule. Dies geschieht auf Grund ihrer instabilen Struktur schneller als bei den Homoduplices, die den dritten Hochpunkt darstellen. Zuletzt folgt der *Elutionspeak* nach ca. 2,5min, der aber auf Grund fehlender Information immer abgeschnitten wird. Alles, was noch an der Säule haftet, wird dabei durch eine hohe Acetonitrilkonzentration abgewaschen. Damit ist die Säule für die nächste Probe vorbereitet.

## 2.2.4 Sequenzierung

### 2.2.4.1 Prinzip

Die in der DHPLC auffälligen Proben wurden mit Hilfe der zyklischen DNA-Sequenzierung überprüft (Strachan und Read, 2005b; Mülhardt, 2006c). Die Methode basiert auf der Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977). Zu

Beginn steht die Hitzedenaturierung der DNA zur Bildung von Einzelsträngen. Durch Zugabe nur eines Primers wird durch die Polymerase einer der beiden komplementären DNA-Stränge linear vervielfältigt. Neben den normalen dNTPs enthält der Ansatz auch Didesoxyribonukleinsäuren (ddNTPs), deren Einbau in die entstehenden DNA-Stränge zu Abbrüchen führt, da am 3'-Ende die Hydroxylgruppe für die Phosphodiesterbildung fehlt. Die vier verschiedenen ddNTPs sind jeweils an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Durch zufälligen Einbau dieser Nukleotide entstehen DNA-Fragmente jeder Länge, die sich teilweise in ihrer Größe um nur eine einzige Base unterscheiden. Anschließend werden die Fragmente mit Formamid denaturiert und auf eine Sequenzierplatte aufgetragen. Durch die Denaturierung anhand des Formamids wird gewährleistet, dass das Laufverhalten im Sequenziergel nur vom Molekulargewicht bestimmt und nicht von Sekundärstrukturen oder Aggregatbildung beeinflusst wird. Lichtsignale von kurzen Fragmenten werden vor denen der längeren Fragmente detektiert. Da alle den gleichen Anfangspunkt haben, werden die Basen linear aufgezeichnet.

### 2.2.4.2 Vorgehensweise

Für die Sequenzierreaktion wurde das *ABI BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems Inc) verwendet. Es enthält dNTPs, an Fluoreszenzfarbstoffe gebundene ddNTPs, AmpliTaq<sup>®</sup>DNA Polymerase, Salze und Puffer.

Als *Template* wurde die durch PCR vervielfältigte DNA eingesetzt, als *Primer* wurde entweder der entsprechende *forward* oder *reverse Primer* beigefügt (Tabelle 2.13). Wegen der lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe und der Enzyme wurde der Ansatz auf Eis und unter lichtarmen Bedingungen pipettiert.

**Tabelle 2.13: PCR-Ansatz für die Sequenzierreaktion**

	Menge in µl pro 10µl-Ansatz
BigDye <sup>®</sup> v3.1 (ABI)	2.0
5x Puffer (ABI)	2.0
Primer [10µM]; <i>fwd</i> oder <i>rev</i>	0.5
Template-DNA	1.0
Wasser	ad 10µl

Bei der anschließenden PCR (Programm siehe Tabelle 2.14) entstehen durch den Einbau der ddNTPs die oben erwähnten Fragmente unterschiedlicher Länge.

**Tabelle 2.14: PCR-Programm für die Sequenzierreaktion**

1	94° C	1'	Denaturierung	1x
2	94° C	10"	Denaturierung	30x
3	50°C	5"	Annealing	
4	60° C	4'	Elongation	
5	8° C	∞	Kühlung	1x

Nach der Amplifizierung erfolgte eine Ethanolfällung. Dafür wurden jeder Probe 1µl einer 3M Natrium-Acetat-Lösung (pH 4,8) und 25µl 100%iges Ethanol hinzugefügt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 45 min bei 4600 Umdrehungen pro Minute und 22°C zentrifugiert und danach der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 40µl 70%igem Ethanol versetzt und nochmals bei 4600/min und 22°C 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Waschung mit 70%igem Ethanol wiederholt. Ein letztes Mal wurde der Überstand abpipettiert. Das Pellet musste vollständig trocken sein, bevor man es in 15µl Wasser resuspendieren konnte.

Im Folgenden wurde die Hälfte des Ansatzes mit 20µl Formamid versetzt und auf die Sequenzierplatte eines ABI Prism<sup>®</sup> Sequenzierautomaten (3100-Avant Genetic Analyzer von Applied Biosystems Inc, Foster City, USA) aufgetragen.

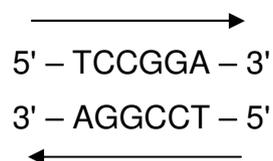
Nach erfolgter Sequenzierung wurden die Dateien mit Hilfe von Chromas lite Version 2.01 ([www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au) am 01.03.2014) ausgewertet.

### 2.2.5 Restriktionsverdau

Um eine DNA-Veränderung, die bei der Sequenzierung gefunden worden war, zu bestätigen, bedurfte es einer zweiten, unabhängigen Methode. Die Wahl fiel auf den Restriktionsverdau wegen seiner kostengünstigen, einfachen und schnellen Durchführbarkeit. Bedingung dafür war, dass die Veränderung zu einer Modifizierung der Erkennungssequenz eines bekannten Restriktionsenzym führte.

Diese Restriktionsenzyme sind die Grundlage für diese Methode. Es sind Endonukleasen unterschiedlichster Bakterien, die normalerweise das Bakterium vor eindringender Fremd-DNA schützen, indem sie es selektiv zerstören. Die Enzyme schneiden die DNA an jeder Stelle, an der die entsprechende spezifische Erkennungssequenz von vier bis acht Basenpaaren vorkommt. Meist handelt es sich bei der Erkennungssequenz um ein sogenanntes *Palindrom*. Das ist eine DNA-Sequenz, die auf beiden Strängen in 5' → 3' Richtung gelesen, dieselbe Basenfolge ergibt.

Zum Beispiel:



Von den Positionen der Schnittstellen abhängig, gibt es zwei Möglichkeiten: Befinden sich die Schnittstellen genau auf der Symmetrieachse, entstehen glatte Enden, auch *‚blunt ends‘* genannt, liegen die Schnittstellen nicht auf der Symmetrieachse und die Stränge werden versetzt geschnitten, resultieren überlappende oder auch *‚klebrige‘* Enden, sogenannte *‚sticky ends‘* (Strachan und Read, 2005a).

Die spezifische Erkennungssequenz ermöglicht, dass entweder nur das Wildtyp- oder das mutierte Allel im PCR-Produkt geschnitten wird und somit im heterozygoten Fall zwei unterschiedliche Produkte beobachtet werden. In Exon 9 zeigte sich in der Sequenzierung ein heterozygoter Basenaustausch an Position 948 der kodierenden Sequenz von Alanin nach Guanin (c.948A>G).

Dadurch entstand eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym Ddel (siehe Tabelle 2.15). Das Allel Wildtyp wird nicht geschnitten, während das Allel mit dem Austausch geschnitten wird. Nach dem Verdau können die Fragmente auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden. So lässt sich beurteilen, ob der Verdau stattgefunden hat – dafür muss man immer eine Positivkontrolle mitführen – und es kann entschieden werden, ob die untersuchte DNA dem Wildtyp oder der Mutante zuzuordnen ist.

Bei der Ddel-Restriktion wären die Proben mit den Fragmentgrößen 147 und 88bp der Mutante zuzuweisen, die mit nur einer Bande bei 235bp hingegen dem Wildtyp. Erkennt man alle drei Banden auf dem Agarosegel, handelt es sich um heterozygote Proben. Wie weiter oben erwähnt, wurde während der Restriktion immer einer Positivkontrolle mitgeführt, um sicherzustellen, dass der Verdau auch tatsächlich stattgefunden und das Enzym seine Fähigkeit zu schneiden nicht eingebüßt hatte, was zum Beispiel nach falscher Lagerung vorkommen kann.

Die benutzten Restriktionsenzyme wurden mit Hilfe des Webcutters 2.0 ermittelt (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> am 01.03.2014). Dieser zeigt nach Eingabe einer Zielsequenz alle Restriktionsenzyme an, die in diesem DNA-Abschnitt eine Schnittstelle besitzen. Durch aufeinanderfolgende Eingabe der Sequenz von Wildtyp und Mutante können die jeweils aufgelisteten Restriktionsenzyme verglichen und ein Enzym ermittelt werden, welches entweder nur eine Schnittstelle im Allel der Mutante oder im Allel des Wildtyps aufweist. Einen Überblick über die gewählten Restriktionsenzyme, ihre Schnittstellen, Reaktionsansätze und zugehörigen Reaktionsbedingungen sowie die resultierenden Fragmentgrößen geben Tabelle 2.15 und Tabelle 2.16.

**Tabelle 2.15: Zusammenstellung der Merkmale der verschiedenen Restriktionsenzyme (Wt = Wildtyp, Mut = Mutante, S = sticky ends)**

	FastDigest® DdeI	SatI	TspRI
Polymorphismus	Lys316Lys	Ala476Thr	Leu645Leu
DNA-Ebene	c.948A>G	c.1426G>A	c.1933C>T
unverdaute Fragmentlänge	235bp	305bp	213bp
Schnittstelle	5'-C <sup>^</sup> T N A G-3' 3'-G A N T <sup>^</sup> C-5' <b>S</b>	5'-G C <sup>^</sup> N G C-3' 3'-C G N <sup>^</sup> C G-5' <b>S</b>	5'- NNCAMTGNN <sup>^</sup> -3' 3'- <sup>^</sup> NNGTMACNN -5' <b>S</b> (M= C oder G)
Schneidet:	Mut	Wt	Wt
Resultierende Fragmente	88 und 147bp	106 und 199bp	48 und 165bp
Inkubationstemp.	37°C	37°C	65°C
Inkubationszeit	5 min	90 min	70 min
Abstoppen	bei 65°C für 5 min	bei 65°C für 20 min	nein

**Tabelle 2.16: Reaktionsansätze für den Restriktionsverdau der verschiedenen Enzyme**

	FastDigest® DdeI	SatI	TspRI
PCR-Produkt [µl]	5.0	5.0	5.0
Puffer [µl]	2.0 (10X FastDigest® Puffer)	1.0 (Puffer G)	5.0 (10X NEBuffer 4)
Enzym [µl]	1.0	0.2	1.0
Wasser [µl]	12.0	8.8	38.5
BSA	-	-	0.5

## 2.2.6 Statistik

Um eine mögliche Assoziation zwischen den Variablen DNA-Veränderung und Parkinson-Krankheit zu überprüfen, wurden die erhobenen Daten zur Häufigkeitsverteilung mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests mit denen des gesunden Kontroll-Kollektivs verglichen. Dabei wurden zunächst die Allel- und Genotypenfrequenzen sowie das Hardy-Weinberg-Equilibrium mit Hilfe der Genepop Software (<http://genepop.curtin.edu.au/> am 01.03.2014) ermittelt

(Raymond und Rousset, 1995). Hierfür wurden die ermittelten Häufigkeiten in eine Vierfeldertafel übertragen (siehe Tabelle 2.17) und mit Hilfe der Formel des Chi-Quadrat-Tests ausgewertet ( $\chi^2 = N(AD-BC)^2 : [(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)]$ ). Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha=0.05$  festgelegt. Mit Hilfe einer Microsoft Excel gestützten Auswertung wurde die Unabhängigkeit bestätigt oder ausgeschlossen (Krüger et al., 2000).

**Tabelle 2.17: Vier-Felder-Tafel, mit deren Hilfe die Häufigkeitsverteilung berechnet wurde**

	Parkinsonpatienten	gesunde Kontrollen	Summe
DNA-Veränderung	A	B	A+B=N1
Wildtyp	C	D	C+D=N2
Summe	A+C	B+D	N1+N2=N

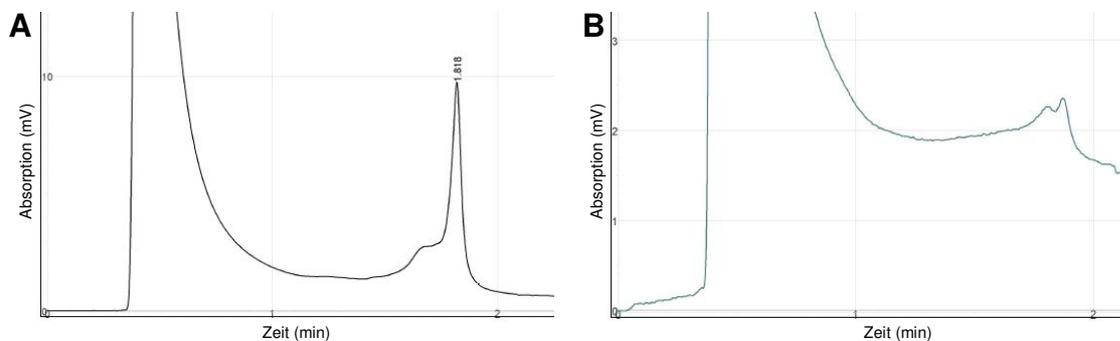
Zu beachten ist, dass ein signifikantes Ergebnis lediglich eine Aussage über die Häufung eines Genmerkmals in einem Kollektiv zulässt, jedoch nichts über den kausalen Zusammenhang der beiden Merkmale besagt (Werner, 1992). Dieser müsste funktionell überprüft werden, wie zum Beispiel durch veränderte Eigenschaften in der Zellkultur oder durch Symptome bei transgenen Tieren. Unter der Annahme eines mendelnden Merkmals lassen sich die Häufigkeiten der Haplotypen anhand des Hardy-Weinberg-Gesetzes ( $p+q=1$  und  $(p+q)^2=1$ ) berechnen.



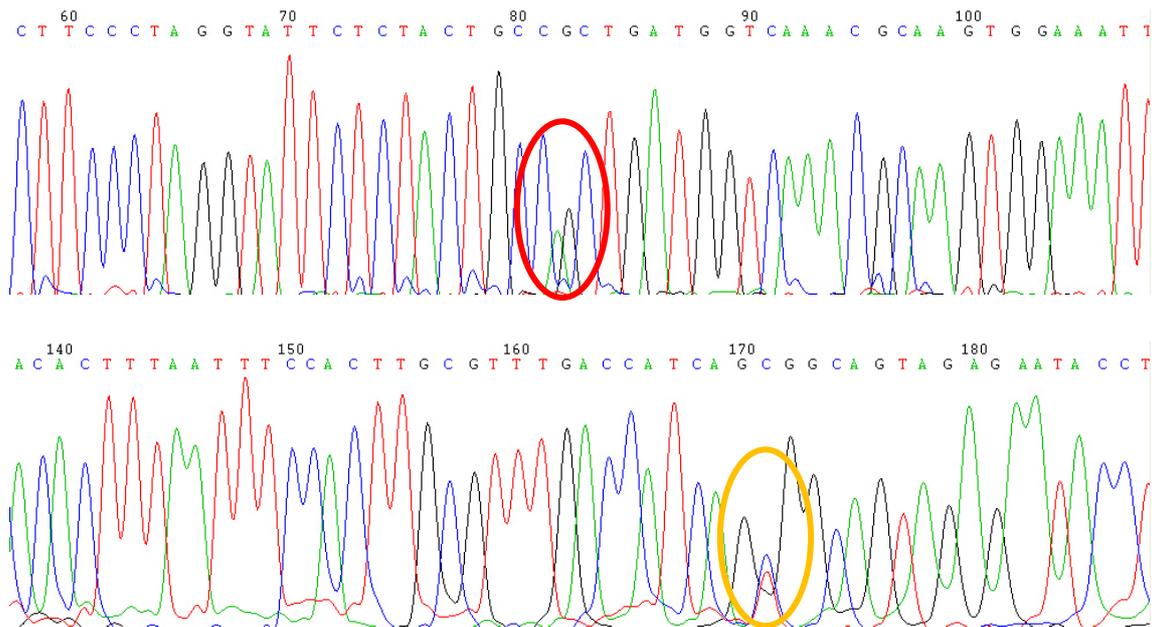
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Kodierender Basenaustausch in Exon 12

Auf Grund eines auffälligen DHPLC-Kurvenverlaufs der vereinigten DNA-Proben 020873 und 031138 (Abbildung 3.1) wurde eine Sequenzierung angeschlossen, die einen heterozygoten Basenaustausch c.1426G>A in Exon 12 der DNA des Patienten mit der Kodierung 031138 zeigte (Abbildung 3.2). Dieser Basenaustausch liegt in der kodierenden Sequenz und hat einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an Position 476 des Mortalin/GRP75-Proteins zur Folge (Ala476Thr).

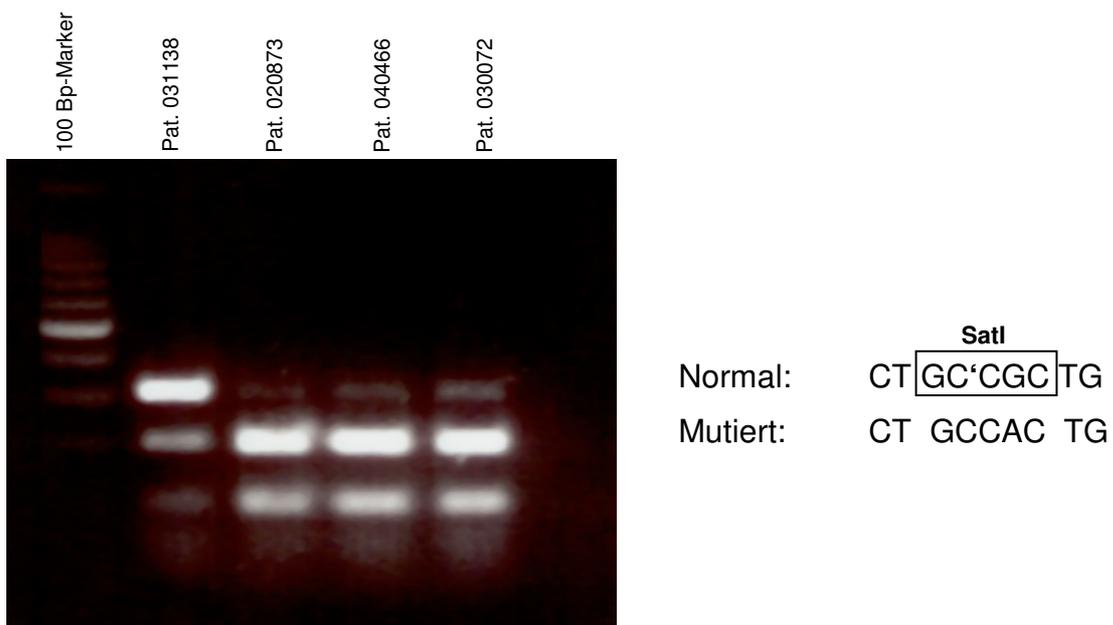


**Abbildung 3.1: DHPLC-Analyse des Exon 12 einschließenden PCR-Amplifikats bei 57,7°C. A: Die Etablierungskurve mit CEPH-DNA zeigt den typischen eingipfligen Kurvenverlauf mit Schulter für Exon 12. Im Gegensatz dazu ist in B, wo das Bindeverhalten der Amplifikate aus den DNA-Proben 020873 und 031138 aufgetragen wurde, die DHPLC-Kurve insgesamt erniedrigt und es ist ein zweigipfliger Verlauf nachweisbar.**



**Abbildung 3.2: Sequenzierung des Sinn- (oben) und Gegensinnstrangs (unten) von Exon 12 aus der DNA Probe des Patienten 031138. Das Basenpaar an Position 1426 der kodierenden Sequenz in Exon 12 zeigt einen heterozygoten Austausch G → A (c.1426G>A). Dies entspricht dem rot umrandeten Bereich. Analog der Austausch von C → T auf dem Gegensinnstrang (orange umrandeter Bereich).**

Da diese Mutation im Bereich einer Restriktionsschnittstelle des Enzyms *SatI* liegt, wurde ein Restriktionsverdau zur Bestätigung des Basenaustauschs gewählt. Das Enzym hat als Erkennungssequenz das Wildtyp-Allel und verliert somit durch die gefundene Mutation die Schnittstelle (Abbildung 3.3). Wenn ein Mutationsträger-Status vorliegt, würde das den Bereich einschließende PCR-Produkt nicht verdaut werden, sondern es würde weiterhin auf dem Gel als eine Bande auf Höhe der ursprünglichen, unverdauten Produktlänge (305 bp) sichtbar sein. Bei einem heterozygoten Mutationsträger wären demnach drei Banden auf dem Gel zu erwarten, nämlich entsprechend den Fragmentlängen 305, 199 und 106bp. Diese Konstellation konnte tatsächlich bei dem Patienten mit der Kodierung 031138 nachgewiesen werden, so dass die Sequenzierung unabhängig bestätigt wurde.



**Abbildung 3.3:** Restriktionsverdau des PCR-Amplifikats von Exon 12 mit dem Enzym *SmaI*: In Spur 1 ist der 100 Basenpaar-Marker aufgetragen. In Spur 2 ist das Amplifikat der DNA von Patient Nr. 031138 zu sehen, der heterozygot für die Mutation ist. In Spur 3 bis 5 sind Amplifikate von Patienten zu erkennen, die homozygot das Wildtyp-Allel tragen. Neben der Abbildung sind die Erkennungssequenz und die Schnittstelle von *SmaI* dargestellt.

Zur Bestimmung der Bedeutung der Mutation wurde im Folgenden die Häufigkeitsverteilung bei Patienten und Kontrollen mit Hilfe des etablierten Restriktionsverdaus definiert. Dabei wurde immer eine Probe des Patienten 031138 als Positiv-Kontrolle mitgeführt. Die PCR-Amplifikate von Exon 12 aller Patientenproben sowie von 290 gesunden Kontrollen wurden dem Verdau mit *SmaI* unterzogen. Die Mutation wurde bei keinem weiteren Patienten und keiner gesunden Kontrolle gefunden, so dass es sich formal um eine seltene Variante im Mortalin-Gen handelt.

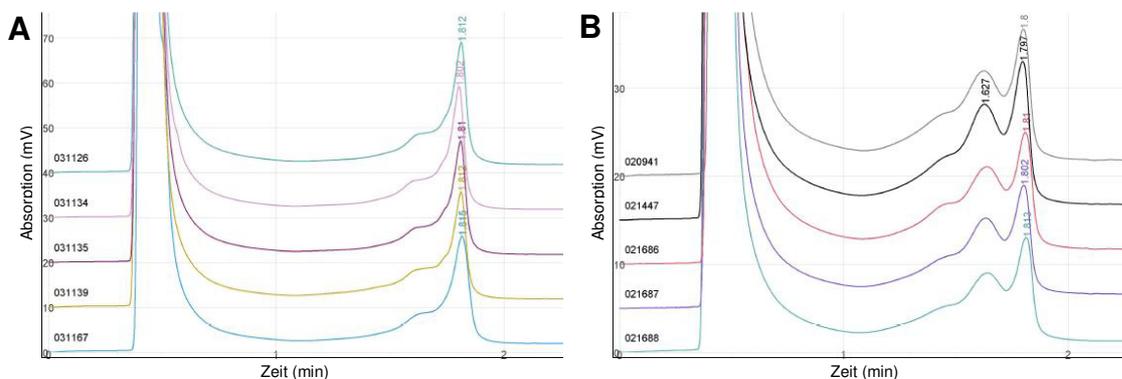
**Tabelle 3.1: Häufigkeitsverteilung der A476T Mutation ermittelt durch Restriktionsverdau von Exon 12 mit dem Enzym SatI. Homozygote Träger der A476T Mutation sind in keiner der beiden Gruppen identifiziert worden.**

	Genotyp			Allelträger	
	G/G	G/A	A/A	G	A
Parkinsonpatienten (n=286)	285 (99,65%)	1 (0,35%)	0	571 (99,83%)	1 (0,17%)
Kontrollpersonen (n=286)	286 (100%)	0	0	572 (100%)	0

## 3.2 Nicht kodierende Basenaustausche

### 3.2.1 Analyse von Exon 16

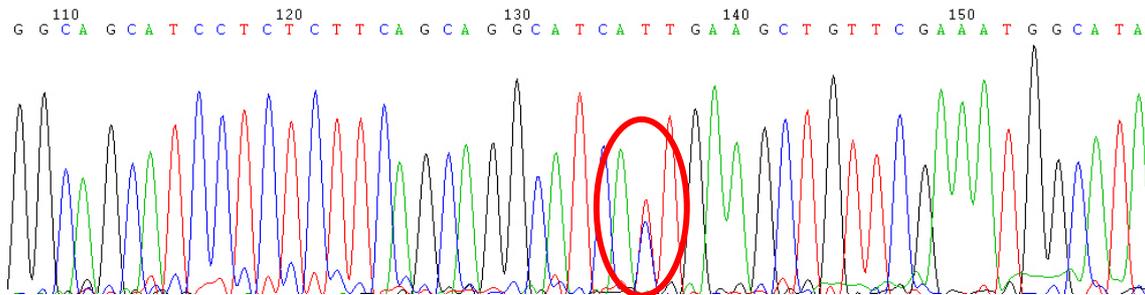
Beim DHPLC-Screening von Exon 16 traten bei der höheren der beiden gewählten Temperaturen zwei verschiedene Kurven auf, ein einzelner Gipfel und ein zweiter mit einem kleinen Vor-Gipfel. Bei der niedrigeren gewählten Temperatur waren nur geringe Unterschiede zu erkennen, so dass in Abbildung 3.4 nur die Kurven der höheren Temperatur dargestellt sind.



**Abbildung 3.4: DHPLC-Analyse des Exon 16 bei 58,4°C. In A sind Kurvenverläufe mit nur einem Gipfel und einer Schulter davor abgebildet, sie konnten nachfolgend dem Wildtyp-Allel zugeordnet werden. Auf der rechten Seite sieht man Kurven mit einem zusätzlichen zweiten kleineren Gipfel vor dem Haupt-Gipfel. Hier zeigte die Sequenzierung einen Basenaustausch als Ursache der Konformationsänderung der DHPLC-Kurve.**

In der Folge wurden anhand der Kurvenverläufe Gruppen gleicher Konformation gebildet und aus jeder Gruppe einige Proben sequenziert. Hierbei erwies sich die Gruppe mit dem schmalen Gipfel und der Schulter als Wildtyp, während die Sequenzierungen des Doppelpeaks einen Basenaustausch von Cytosin nach Thymin zeigten (c.1933C>T) (Abbildung 3.5). Diese Sequenzalteration führte

jedoch zu keinem Aminosäurenaustausch, so dass es sich hier um eine stille Mutation (Leu645Leu) handelt.



**Abbildung 3.5:** Elektropherogramm des Sinnstrangs des Amplifikats von Exon 16 der DNA-Probe des Patienten mit der Kodierung 030065. Das Basenpaar in Position 1933 der kodierenden Sequenz von Exon 16 zeigt einen heterozygoten Austausch C → T (c.1933C>T). Dies entspricht dem rot umrandeten Bereich.

Als dritte unabhängige Nachweismethode wurde das Restriktionsenzym *TspRI* ausgewählt. Seine Erkennungssequenz und Schnittstelle befindet sich auf dem Wildtyp-Allel, dieses wird in zwei verschiedene Fragmente von einer Größe von 48 und 165bp geschnitten. Besitzt ein Patient oder eine Kontrolle das Mutante-Allel, sind drei Banden auf dem Gel zu erkennen, zusätzlich zu den Banden bei 48 und 165bp tritt eine Bande bei 213bp auf, was der ursprünglichen Amplifikatlänge entspricht. Bei einem homozygoten Mutationsträger wäre nur eine Bande bei 213bp zu finden.

Da die Schnittstelle des Enzyms auf dem Wildtyp-Allel lag und nur kleine Fragmentgrößen daraus resultierten, konnte der Verdau nicht eindeutig ausgewertet werden. Die DHPLC-Elutionsprofile waren aber sehr gut gegeneinander abgrenzbar, so wurde die Häufigkeitsverteilung anhand der DHPLC-Kurven bestimmt. Die Kurven mit dem schmalen Gipfel und der Schulter wurden dem Wildtyp zugeordnet, das Elutionsprofil mit dem *Doppelpeak* einem heterozygoten Träger des Basenaustauschs. Da bei den beispielhaft sequenzierten Proben beider Elutionsprofile kein homozygoter Träger zu finden war, wird davon ausgegangen, dass sich in diesem Patienten- und Kontrollkollektiv kein homozygoter Anlagenträger befand. Ein drittes Elutionsprofil war nicht aufgetreten, letztendlich kann aber nicht mit endgültiger Sicherheit ausgeschlossen werden, dass der Kurvenverlauf eines homozygoten

Trägers einer der beiden detektierten Elutionsprofilen gleicht. Unter dieser Annahme und mit dieser Einschränkung wurden die in Tabelle 3.2 genannten Häufigkeiten und die statistischen Werte ermittelt.

**Tabelle 3.2: Häufigkeitsverteilung des Basenaustauschs c.1933C>T in Exon 16. Da die Allelhäufigkeit im Kontrollkollektiv bei 22,25% liegt, ist die Definition eines Polymorphismus erfüllt. Das Ergebnis ist bei einem Konfidenzintervall von 95% nicht signifikant ( $\chi^2=0,137$ ;  $p=0,71$ ).**

	Genotyp			Allelträger	
	C/C	C/T	T/T	C	T
Parkinsonpatienten (n=279)	150 (53,76%)	129 (46,24%)	0	429 (76,88%)	129 (23,12%)
Kontrollpersonen (n=191)	106 (55,50%)	85 (44,50%)	0	297 (77,75%)	85 (22,25%)

Wie der Tabelle 3.2 zu entnehmen ist, zeigte sich eine Häufigkeit heterozygoter Merkmalsträger von ungefähr 45% sowohl bei Patienten als auch im Kontrollkollektiv. Da die Allelfrequenz mit 22,25% bei den gesunden Kontrollen deutlich über 1% liegt, ist die Definition eines Polymorphismus formal erfüllt. Homozygote Allelträger konnten in keinem der beiden Kollektive nachgewiesen werden (s.o.). Der Chi-Quadrat-Test ergab keinen signifikanten Unterschied in der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen ( $\chi^2=0,137$ ,  $p=0,71$ ). Daraus ist zu schließen, dass kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des exonischen Basenaustauschs zwischen Patienten und gesunden Kontrollen besteht und somit keine Assoziation mit der PK vorliegt.

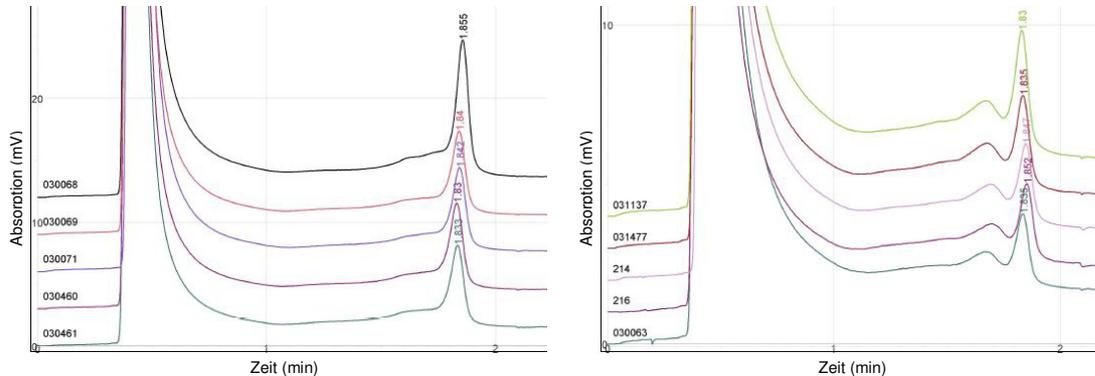
Dieser Basenaustausch in Exon 16 ist bereits in der NCBI-Datenbank unter der Variation-ID „rs10117“ bekannt

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=10117](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10117) am 30.05.2012).

### 3.2.2 Analyse von Exon 9

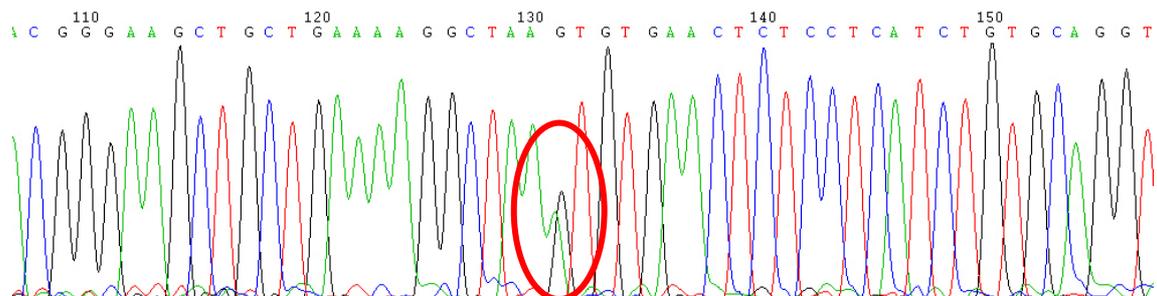
Auch bei der DHPLC-Analyse der PCR-Amplifikate von Exon 9 waren zwei verschiedene Kurven bei der höheren Temperatur detektierbar, während bei der niedrigeren Temperatur keine sicheren Unterschiede erkennbar waren. In

Abbildung 3.6 sind typische Kurvenverläufe bei Verwendung der höheren Temperatur dargestellt.



**Abbildung 3.6: DHPLC-Analyse des Exon 9 bei 59,2°C.** Auf der linken Seite sieht man Kurven mit nur einem *Peak*, dies entspricht dem Wildtyp, auf der rechten Seite welche mit einem zusätzlichen *Vor-Peak*, in deren Sequenzierung sich ein Basenaustausch herausstellte.

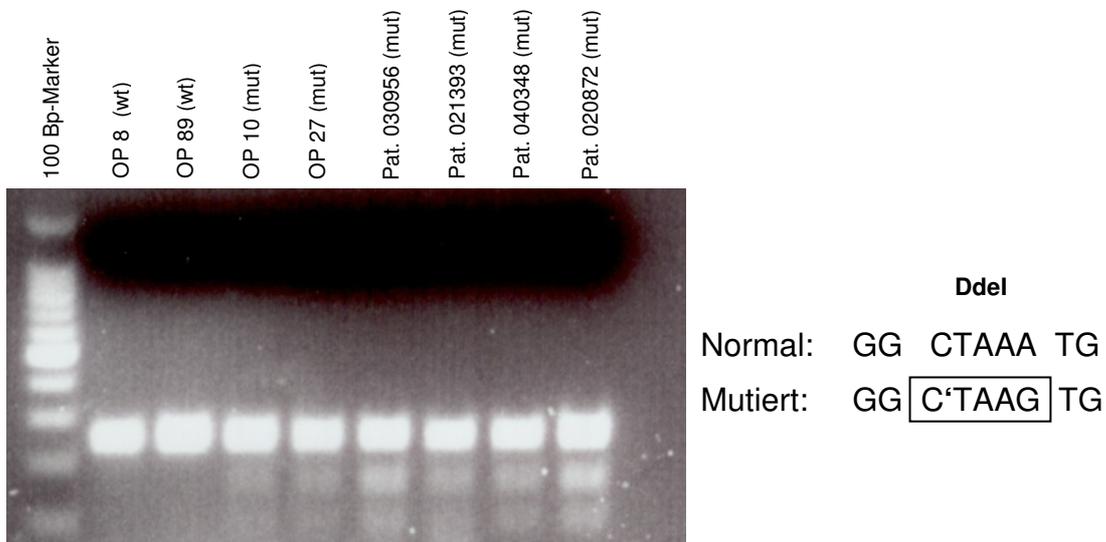
Aus beiden Gruppen wurden jeweils einige Proben sequenziert. Dabei stellten sich die Kurven mit dem einzelnen *Peak* als die Elektropherogramme des Wildtyps heraus, hinter den Kurven mit dem zusätzlichen *Vor-Peak* verbarg sich ein Basenaustausch von A → G (c.948A>G) (Abbildung 3.7). Dieser Wechsel zieht keinen Aminosäureaustausch nach sich (Lys316Lys), es ist also eine stumme Mutation.



**Abbildung 3.7: Sequenzierung des Sinnstrangs von Exon 9 der DNA Probe von Patient Nr. 030956.** In Position 948 der kodierenden Sequenz in Exon 9 findet sich ein heterozygoter Austausch A → G (c.948A>G). Dies entspricht dem rot umrandeten Bereich.

Um diesen Basenaustausch zu bestätigen, wurde nach einem Restriktionsenzym mit entsprechender Erkennungssequenz gesucht und *DdeI* ausgewählt. Es schneidet die mutierte Sequenz in zwei Fragmente mit 88 und 147bp Länge. Das Wildtyp-Allel wird nicht verdaut. Sind beide Allele eines Amplifikats dem Wildtyp zuzuordnen, ist nur eine Bande auf dem Gel bei 235bp

sichtbar. Handelt es sich um eine heterozygote Probe erscheinen drei Banden bei 88, 147 und 235bp (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:** Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung zur Darstellung des Verdaus des Amplifikats von Exon 9 mit FastDigest® Ddel: In Spur 1 ist der 100 Bp-Marker aufgetragen. Die übrigen Proben sind beschriftet. Spur 2 und 3 zeigen homozygote Allelträger für das Wildtyp-Allel. Hier ist nur eine Bande zu sehen, da das Restriktionsenzym nur die mutierte Sequenz schneidet. Die Amplifikate der übrigen Spuren sind auf Grund des Bandenmusters als heterozygot für den Basenaustausch zu betrachten. Man erkennt eine starke Bande bei 235bp (wie bei den beiden wt-Proben) und darunter zwei weitere schwächere Banden bei 147 und 88bp. Neben der Abbildung sind die Erkennungssequenz und die Schnittstelle von FastDigest® Ddel dargestellt.

Die Häufigkeitsverteilung des gefundenen Basenaustauschs wurde mit Hilfe der DHPLC bestimmt, da die Elutionsprofile sehr gut den beiden verschiedenen Gruppen zuzuordnen waren.

**Tabelle 3.3:** Häufigkeitsverteilung des Basenaustauschs c.948A>G in Exon 9. Der unkorrigierte p-Wert liegt mit p=0,015 im statistisch signifikanten Bereich ( $\chi^2=5,902$ ; OR= 1,628), allerdings bleibt der Wert nach Korrektur für multiples Testen nicht signifikant (pc=0.059).

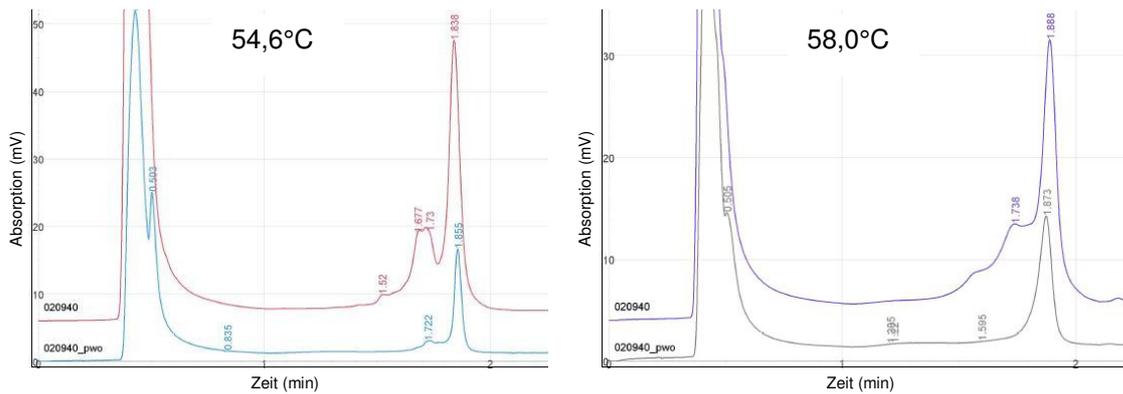
	Genotyp			Allelträger	
	A/A	A/G	G/G	A	G
Parkinsonpatienten (n=157)	72 (45,86%)	85 (54,14%)	0	229 (72,93%)	85 (27,07%)
Kontrollpersonen (n=276)	160 (57,97%)	116 (42,03%)	0	436 (78,99%)	116 (21,01%)

Insgesamt waren 85 von 157 Patienten (27,07%) und 116 von 276 gesunden Kontrollen Merkmalsträger. Mit einer Allelfrequenz von 21,01% im Kontrollkollektiv erfüllt die beobachtete Sequenzvariante die Definition eines Polymorphismus. Dabei treten Allelträger für die neu gefundene Variante häufiger bei Patienten als im Vergleich zu Kontrollen auf, allerdings ist dieser Unterschied nach Korrektur für die durchgeführten Tests (Bonferroni) nicht mehr signifikant (Chi-Quadrat-Test,  $\chi^2=5,902$ , Odds ratio (OR)= 1,628 (95% CI: 1,097-2,416)  $p= 0,015$ ;  $p_c=0.159$ ). Auch dieser Basenaustausch in Exon 9 ist bereits unter der Variation-ID „rs1042665“ in der NCBI-Datenbank bekannt ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1042665](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1042665) am 30.05.2012).

### 3.2.3 Analyse von Exon 8

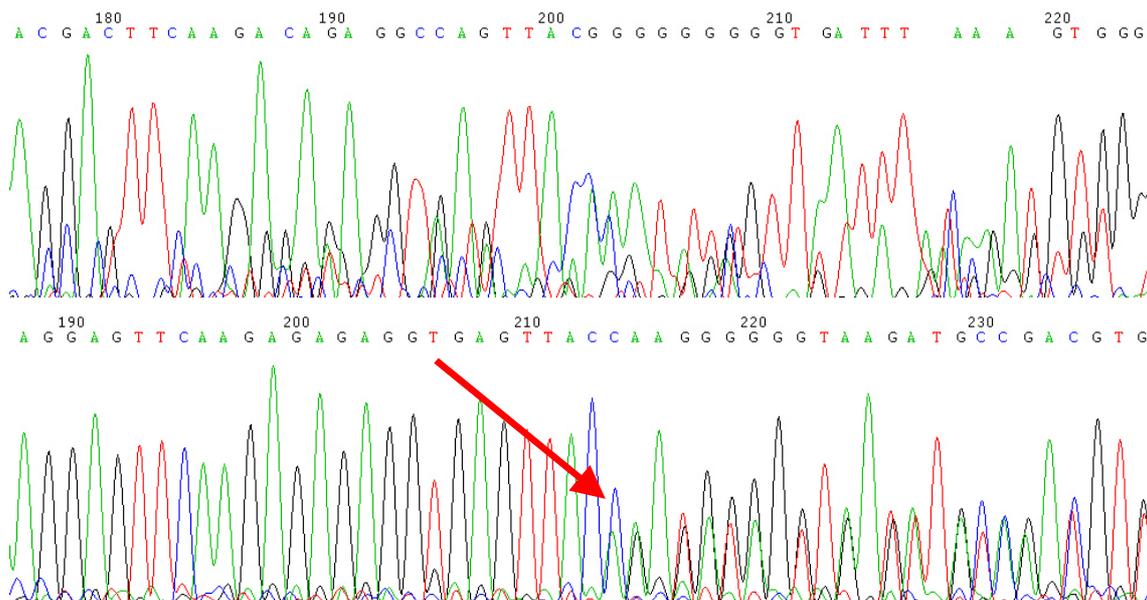
Exon 8 und die angrenzenden Intronabschnitte stellten sich als sehr variables Amplifikat heraus. Es gab eine Vielfalt verschiedener DHPLC-Kurvenverläufe, die nach Zuordnung zu Gruppen beispielhaft sequenziert wurden. Um auszuschließen, dass Veränderungen im DHPLC-Kurvenverlauf auf Polymeraselesefehler während der PCR zurückzuführen waren, wurden die PCR-Reaktionen nochmals mit einem besonders fehlerarmen DNA-Polymerase-Enzym (*Proofreading-Taq*) durchgeführt und die Ergebnisse erneut verglichen. So wurde aufgedeckt, bei welchen auffälligen Kurvenverläufen es sich nur um Artefakte auf Grund von Polymeraselesefehlern handelte. Die Auffälligkeiten, die in den DHPLC-Elutionsprofilen darauf zurückzuführen waren, waren bei den Proben mit der Polymerase *Pwo* verschwunden (Abbildung 3.9).

### 3 ERGEBNISSE



**Abbildung 3.9: DHPLC-Analyse des Exon 8. Im Vergleich die Kurven von Pat. 020940 bei beiden Temperaturen mit und ohne *Proofreading*-Taq. Die untere Kurve entspricht jeweils der Probe mit *Pwo*. Man erkennt, dass Unebenheiten, für die Polymeraselesefehler verantwortlich waren, verschwinden.**

Danach wurden die in der DHPLC-Analyse auffälligen Proben nach Sanger sequenziert. Auch hier waren teilweise Wiederholungen der PCR-Reaktionen mit *Proofreading*-Taq notwendig, wodurch die zugrundeliegende Sequenzalteration teilweise erst nachweisbar wurde (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10: Demonstration des Unterschieds zwischen einer Sequenzierreaktion des PCR-Ampifikats von Pat. 205 ohne *Pwo* (oben) und mit *Pwo* als *Proofreading* Polymerase (unten). Dargestellt ist derselbe Abschnitt. Auf der unteren Abbildung erkennt man eindeutig den Beginn einer Rasterverschiebung (Pfeil).**

Nachfolgend dargestellt ist eines der beim DHPLC-Screening von Exon 8 aufgetretenen Elutionsprofile (Abbildung 3.11):

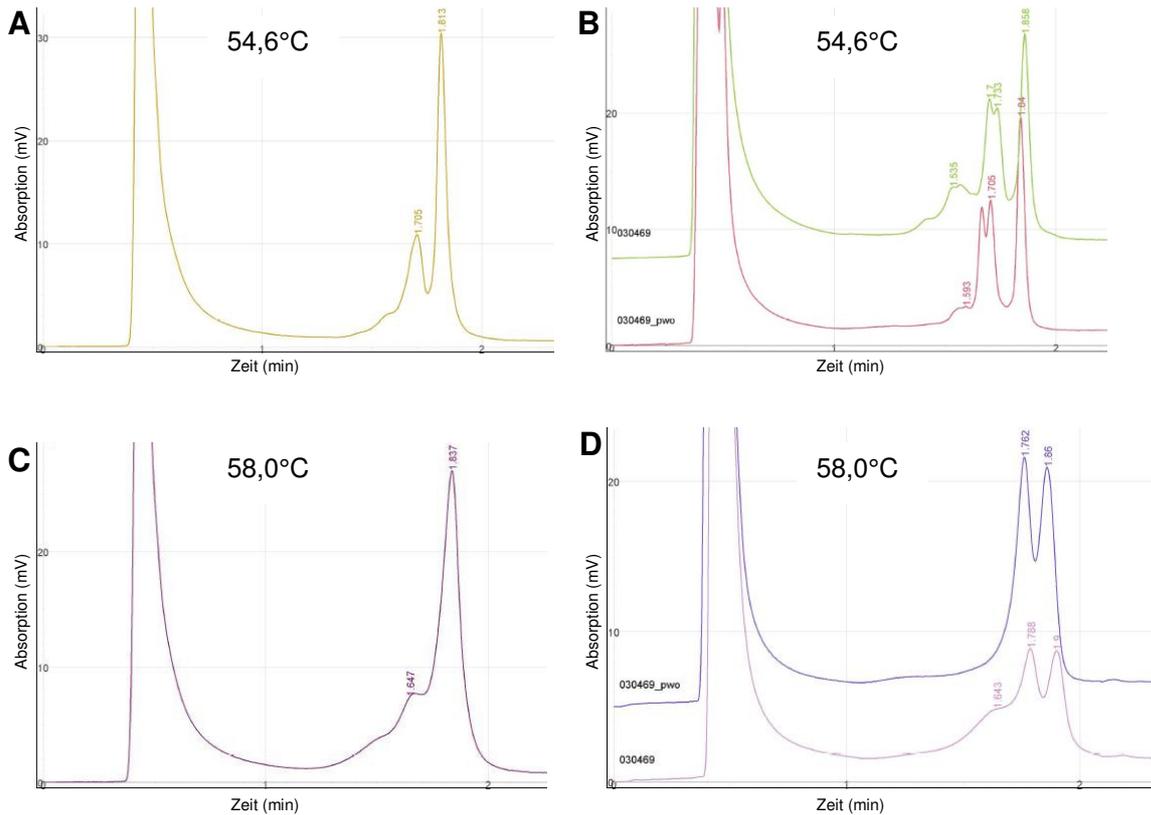


Abbildung 3.11: DHPLC-Analyse des Exon 8. Etablierungspeaks mit CEPH-DNA bei 54,6°C (A) und 58,0°C (C). DHPLC-Kurven der Probe 030469 bei 54,6°C (B) und 58,0°C (D), die untere der beiden Kurven entspricht der Probe mit *Pwo*.

Bei 54,6°C sieht man eine Schulter, auf die zwei Gipfel folgen, von denen der erste eine Inzision zeigt und der zweite höher und schmaler ist. Bei 58,0°C findet man ebenfalls zwei Gipfel vor, die annähernd gleich hoch sind. Bei der Sequenzierung der Proben mit diesem Elutionsprofil fand sich ein Basenaustausch von Guanin nach Adenin an Position 774 der kodierenden Basensequenz (c.774G>A) (Abbildung 3.12). Diese Veränderung führt zu keinem Aminosäureaustausch (Gln258Gln) und ist somit ‚still‘.

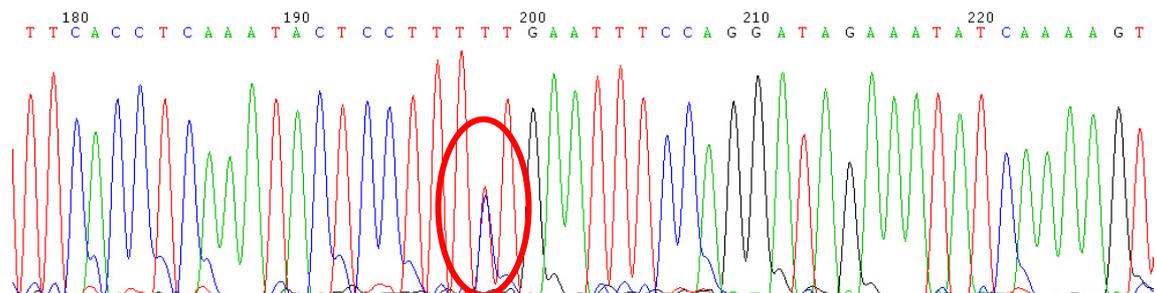


Abbildung 3.12: Sequenzierung des Gegensinnstrangs von Exon 8 der Probe 030053. Das Basenpaar 774 der kodierenden Sequenz in Exon 8 zeigt einen heterozygoten Austausch G → A (c.774G>A). Dies entspricht dem rot umrandeten Bereich.

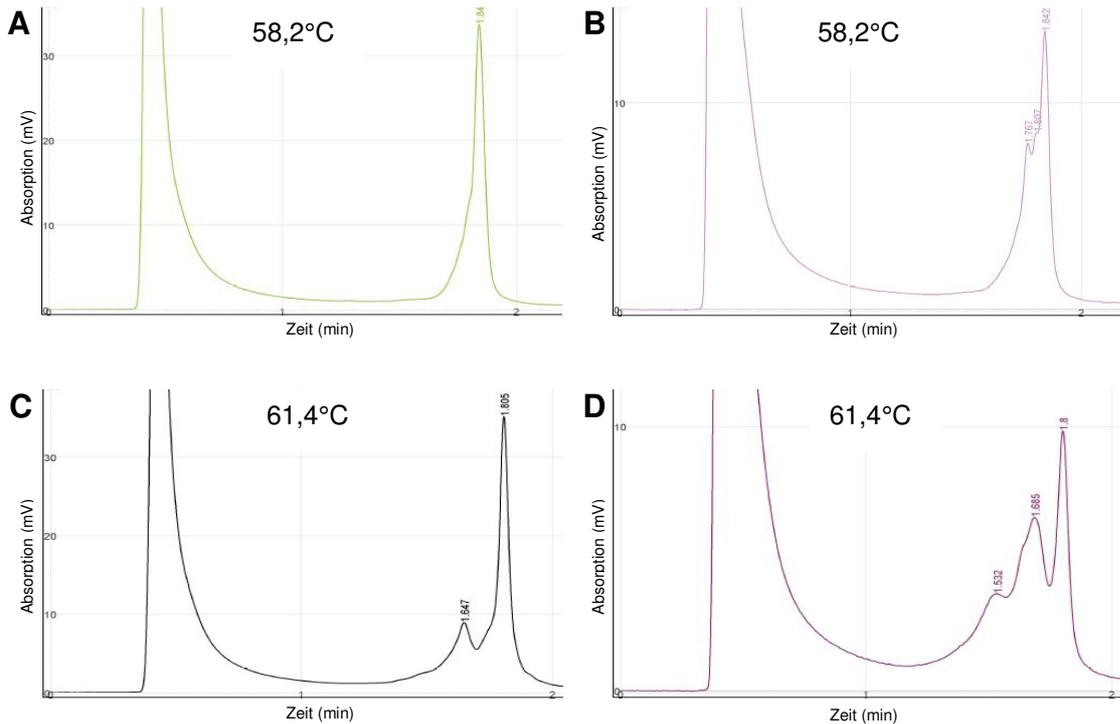
Da dieser Basenaustausch nicht zu einer Veränderung von Restriktionsschnittstellen bekannter Enzyme führt (ermittelt durch Webcutter 2.0), konnte die Mutation nicht als Restriktionslängen-Polymorphismus nachgewiesen werden.

Auf Grund weiterer Elutionsprofile bei diesem Amplifikat konnte keine sichere Häufigkeitsverteilung dieser Sequenzabweichung mit Hilfe der DHPLC bestimmt werden.

Unter der Variation-ID „rs41295717“ ist dieser Basenaustausch in Exon 8 bereits in der NCBI-Datenbank gelistet ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=41295717](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=41295717) am 30.05.2012).

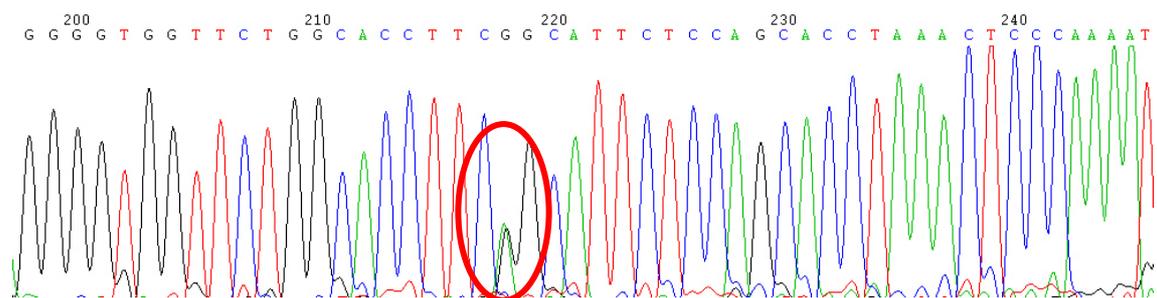
#### **3.2.4 Analyse von Exon 4**

Bei der DHPLC-Analyse von Exon 4 fand sich bei einigen Proben ein Kurvenverlauf, der in auffälliger Weise vom normalen Kurvenverlauf abwich. Dabei zeigten sich bei 58,2°C Extra-Zacken im aufsteigenden Schenkel der Kurve, bei 61,4°C war ein weiterer Vorgipfel aufgetreten, insgesamt war die Kurve deutlich verbreitert (siehe Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13:** DPHLC-Analyse des Exon 4. Etablierung der Elutionskurve mit CEPH-DNA bei 58,2°C (A) und 61,4°C (C). DHPLC-Kurven der gepoolten Proben 030554 und 411 bei 58,2°C (B) und 61,4°C (D). Man erkennt darauf eindeutig die Veränderungen, die auf eine Mutation hinweisen.

Die Sequenzierung der Proben, die dieses Elutionsprofil aufwiesen, zeigten einen Basenaustausch von Cytosin nach Thymin an Position 243 der kodierenden Sequenz (c.243C>T) (Abbildung 3.14). Auf Ebene der Aminosäuren führt dieser zu keinem Austausch, es ist also ein nicht kodierender, stiller Basenaustausch (Ala81Ala).



**Abbildung 3.14:** Sequenzierung des Gegensinnstrangs von Exon 4 der Probe 456. Das Basenpaar 243 der kodierenden Sequenz in Exon 9 zeigt einen heterozygoten Austausch C → T (c.243C>T). Dies entspricht dem rot umrandeten Bereich.

Da kein Restriktionsenzym die entsprechende Erkennungssequenz eines der beiden Allele aufwies, konnte keine unabhängige Bestätigung der Variante

durchgeführt werden. Allerdings waren die DHPLC-Kurven zwischen Wildtyp und mutiertem Allel eindeutig zu unterscheiden, so dass die Häufigkeitsverteilung mit Hilfe der DHPLC-Kurven bestimmt wurde (siehe Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4: Häufigkeitsverteilung des Basenaustauschs c.243C>T in Exon 4.**

	Genotyp			Allelträger	
	C/C	C/T	T/T	C	T
Parkinsonpatienten (n=286)	280 (97,90%)	6 (2,10%)	0	566 (98,95%)	6 (1,05%)
Kontrollpersonen	97,4%*	2,6%*	0		

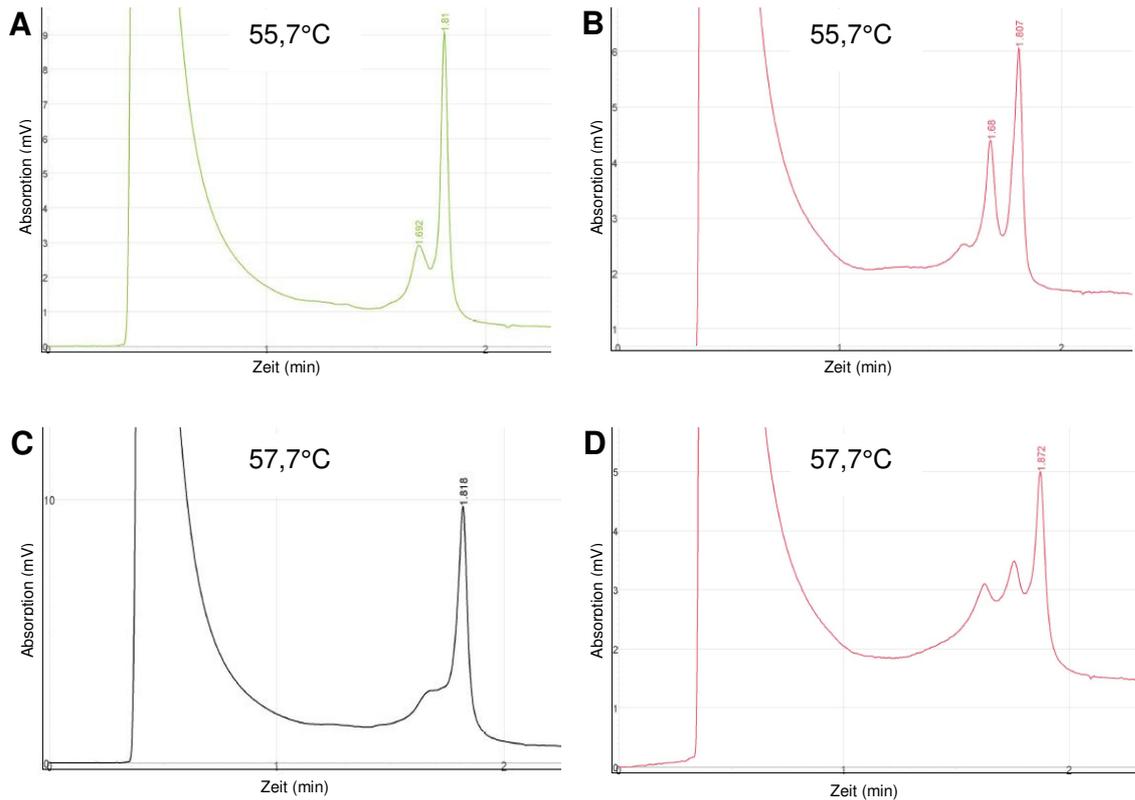
\*Diese Häufigkeit wurde von folgender Seite übernommen:  
[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSG00000113013;r=5:137918923-137939014;t=ENST00000297185](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSG00000113013;r=5:137918923-137939014;t=ENST00000297185) am 19.08.2009

Da dieser Basenaustausch in der Literatur bereits unter der Variation-ID „rs34916633“ bekannt war ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSG00000113013;r=5:137918923-137939014;t=ENST00000297185](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSG00000113013;r=5:137918923-137939014;t=ENST00000297185) am 19.08.2009), wurde bei den Kontrollen auf die Häufigkeitsangabe einer Datenbank zurückgegriffen. Dabei ergab sich kein Unterschied zwischen der beobachteten Allelverteilung bei den untersuchten Patienten und den publizierten Kontrollen.

### 3.3 Intronische Veränderungen

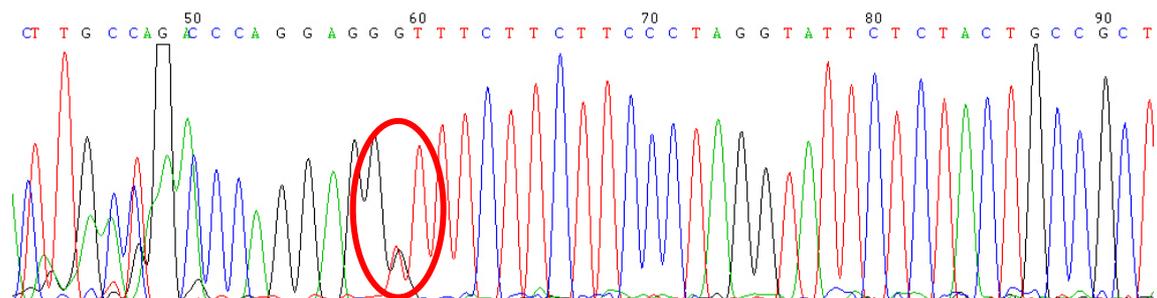
#### 3.3.1 Intron 11 (innerhalb des Amplifikats von Exon 12)

Beim DHPLC-Screening sind drei gepoolte Proben durch einen abweichenden Kurvenverlauf aufgefallen (Abbildung 3.15). Bei 55,7°C zeigten sich 2 schmale Gipfel, wobei der erste niedriger war als der zweite. Bei 57,7°C war die Kurve durch einen mehr oder weniger ausgeprägten dreigipfligen Verlauf gekennzeichnet. Der letzte Gipfel war hoch und schmal, während die beiden anderen etwas breiter und viel kleiner waren.



**Abbildung 3.15:** DHPLC-Analyse des Exon 12 mit angrenzenden Intronabschnitten. Etablierungspeaks mit CEPH-DNA bei 55,7°C (A) und 57,7°C (C). DHPLC-Kurven der gepoolten Proben 030072 und 040466 bei 55,7°C (B) und 57,7°C (D).

Als Korrelat zu den veränderten Kurven fand sich in der direkten Sequenzierung ein Basenaustausch in Intron 11 sechzehn Basenpaare vor Beginn von Exon 12 von G → T (c.1411 – 16G>T) (Abbildung 3.16).



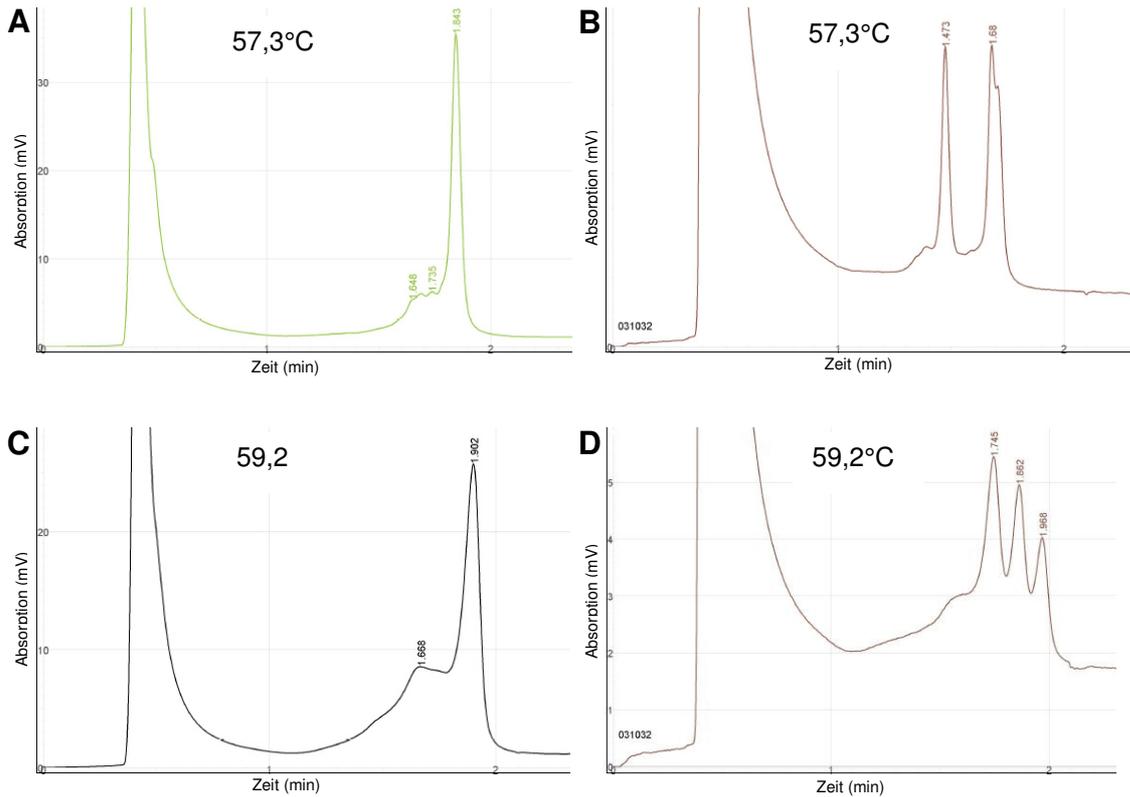
**Abbildung 3.16:** Sequenzierung des Sinnstrangs von Exon 12 der Probe 030484. Sechzehn Basenpaare vor Beginn von Exon 12 findet sich in Intron 11 ein Basenaustausch von G → T (c.1411 – 16G>T). Dies entspricht dem rot umrandeten Bereich.

Da dieser Basenaustausch keine Veränderung von Erkennungssequenzen bekannter Restriktionsenzyme ergab, war kein unabhängiger Nachweis mittels Fragmentanalyse möglich.

Insgesamt fand sich diese Sequenzalteration nach Auswertung aller DHPLC-Elutionskurven bei 3 von 286 Patienten. Aufgrund der intronischen Lage und fehlenden sicheren Einbeziehung von Spleiß-Erkennungssequenzen (Analyse und Vorhersage durch *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org> am 30.05.2012)) wurde wegen unzureichender Evidenz für eine pathogenetische Bedeutung auf eine Bestimmung der Häufigkeitsverteilung bei den gesunden Kontrollen mittels DHPLC verzichtet. Dieser Austausch in Intron 11 ist bereits unter der Variation-ID „rs112933980“ in der NCBI-Datenbank vorbekannt ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=112933980](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=112933980) am 30.05.2012).

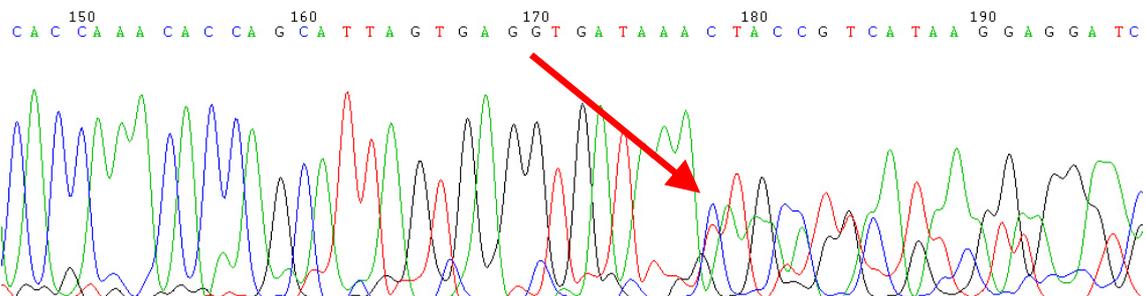
#### **3.3.2 Intron 8 (innerhalb des Amplifikats von Exon 9)**

Beim DHPLC-Screening fand sich bei vier Patienten ein auffälliges Elutionsprofil bei beiden Temperaturen (Abbildung 3.17). Bei der niedrigeren Temperatur waren es zwei Peaks, wobei der zweite zusätzlich eine Inzisur zeigte. Bei der höheren Temperatur stellte sich der Kurvenverlauf als Dreizack dar.

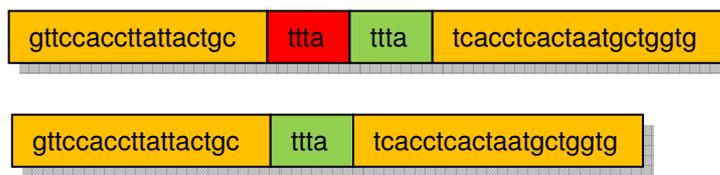


**Abbildung 3.17:** DHPLC-Analyse des Exon 9 mit angrenzenden Intronabschnitten. Etablierungspeaks mit CEPH-DNA bei 57,3°C (A) und 59,2°C (C). DHPLC-Kurven der Probe 031032 bei 57,3°C (B) und 59,2°C (D).

In der anschließenden Sequenzierung der auffälligen Proben fand sich eine Rasterverschiebung am Ende des Gegensinnstrangs. Es stellte sich heraus, dass es sich um eine Deletion von 4 Basenpaaren am Ende von Intron 8 handelte, die in der physiologischen Sequenz zweimal hintereinander vorkommen und somit bei der Mutante (c.880 – 49\_52delTTTA) nur einmal vorhanden sind (Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.18:** Sequenzierung des Gegensinnstrangs von Exon 9 und der angrenzenden Intronbereiche der Probe 031032. Ab dem Pfeil nimmt die Höhe der Peaks ab und sie sind nicht mehr so klar gegeneinander abgrenzbar wie zuvor. Ursache hierfür ist eine Deletion von den 4 Basenpaaren TTTA (in der dargestellten Sequenz des Gegensinnstrangs entspricht das den Basen TAAA). Nach dem Pfeil überlagert die verkürzte Sequenz der Mutante die physiologische Sequenz des Wildtyp-Allels.



**Abbildung 3.19:** Schema für die Deletion in Intron 8. Die obere Zeile entspricht der Sequenz des Wildtyps, die untere der Sequenz der Deletionsvariante. In der physiologischen Sequenz wiederholen sich die 4 Basen TTTA, während diese bei der Mutante einmal deletiert sind (im Schema der rote Bereich).

Die Deletion führte zu keiner Veränderung definierter Restriktionsstellen bekannter Enzyme, so dass keine weitere Bestätigung der Mutation mittels unabhängiger Methode gelang. Die DHPLC-Elutionsprofile des Wildtyp-Allels und der Deletion ließen sich aber eindeutig unterscheiden und das Sequenzierergebnis war sowohl für die dem Wildtyp als auch der Mutante zugeordneten Kurven konstant reproduzierbar. Somit wurde auf eine dritte Nachweismethode verzichtet.

Zur Ermittlung der Häufigkeit bei Gesunden wurden die DNA-Proben des Kontrollkollektivs ebenfalls mit Hilfe der DHPLC-Methode untersucht (Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5:** Häufigkeitsverteilung der Deletionsmutation in Intron 8. Die 1 entspricht dem Wildtyp, die 2 der Mutation c.880 – 49\_52delTTTA. Da die Allelfrequenz im Kontrollkollektiv mit 0,54% unter einem Prozent liegt, ist die Definition für einen Polymorphismus nicht erfüllt. Der p-Wert liegt mit  $p=0,25$  außerhalb des statistisch signifikanten Bereichs von  $p<0,05$  (OR= 2,379). Damit ist diese genetische Variante nicht mit der PK assoziiert.

	Genotyp			Allelträger	
	1/1	1/2	2/2	1	2
Parkinsonpatienten (n=157)	153 (97,45%)	4 (2,55%)	0	310 (98,73%)	4 (1,27%)
Kontrollpersonen (n=276)	273 (98,91%)	3 (1,09%)	0	549 (99,46%)	3 (0,54%)

Als Merkmalsträger wurden 4 von 153 Patienten (2,55%) und 3 von 273 Kontrollen (1,09%) identifiziert. Da die Allelfrequenz im Kontrollkollektiv mit 0,54% unter einem Prozent liegt, ist die Definition eines Polymorphismus nicht erfüllt, es handelt sich somit um eine seltene intronische Variante. Der Chi-

Quadrat-Wert beträgt  $\chi^2=0,247$ , der p-Wert liegt mit  $p= 0,25$  nicht im statistisch signifikanten Bereich von  $p<0,05$ , damit besteht keine Assoziation zwischen dieser DNA-Veränderung und der PK.

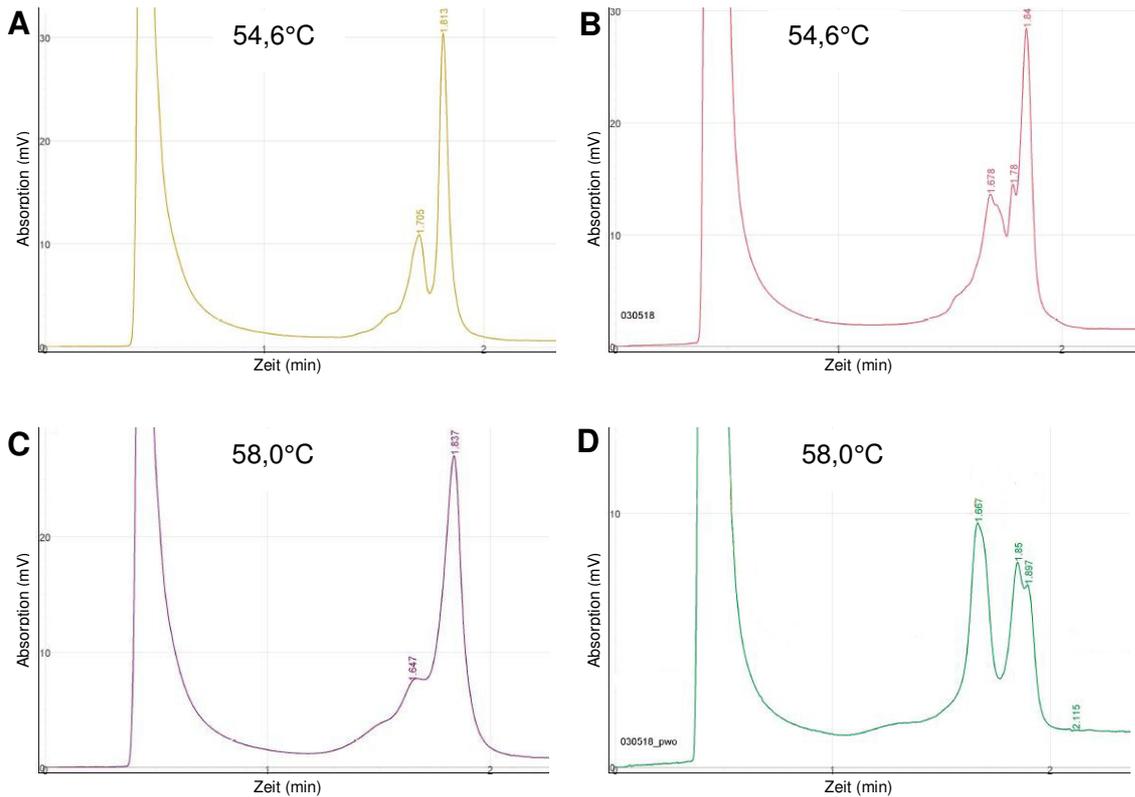
Anhand des Vorhersageprogramms *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org> am 30.05.2012) wurde überprüft, ob die DNA-Veränderung möglicherweise krankheitsverursachend und damit pathogenetisch relevant sein könnte. *MutationTaster* prognostiziert, dass es sich dabei um einen Polymorphismus handeln wird (Schwarz et al., 2010). Dieser Austausch ist bisher in der Literatur noch nicht bekannt.

### **3.3.3 Intron 8 (innerhalb des Amplifikats von Exon 8)**

Wie bereits in Kapitel 3.2.3 erwähnt, resultierten bei der DHPLC-Analyse von Exon 8 und seinen angrenzenden Intronabschnitten viele verschiedenartig aussehende Elutionsprofile. Zum einen waren diese durch Polymeraselesefehler bedingt, was aber durch die Durchführung der PCR mit *Proofreading*-Taq weitgehend minimiert werden konnte. Zum anderen konnte darauf geschlossen werden, dass sich in diesem Amplifikat mehrere unterschiedliche DNA-Veränderungen befanden, die bei einem Patienten auch in Kombination vorkommen konnten, was die vielen unterschiedlichen Kurvenverläufe erklärte.

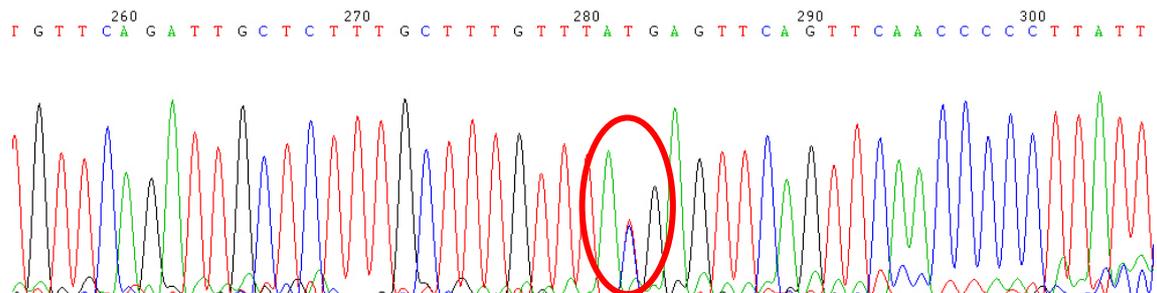
#### **3.3.3.1 Nachweis eines Basenaustauschs in Intron 8**

Im Bereich von Intron 8 konnte bezüglich eines auffälligen Kurvenverlaufs ein Basenaustausch bestätigt werden. Der DHPLC-Kurvenverlauf stellte sich bei 54,6°C mit einem großen schmalen Hauptgipfel dar, dem zwei kleinere Spitzen vorausgingen. Das Elutionsprofil bei 58,0°C zeigte einen ersten breiteren Peak mit einer Schulter davor und einen zweiten höheren Peak mit einer Inzisur des absteigenden Schenkels (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20:** DHPLC-Analyse des Exon 8 mit angrenzenden Intronabschnitten. Etablierungspeaks mit CEPH-DNA bei 54,6°C (A) und 58,0°C (C). DHPLC-Kurven der Probe 030518 bei 54,6°C (B) und 58,0°C (D).

Bei der anschließenden Analyse der Sequenz fand sich ein Basenaustausch von Cytosin nach Thymin (c.879 + 80C>T) in Intron 8 (Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21:** Sequenzierung des Sinnstrangs von Exon 8 der Probe 030518. Das Basenpaar 80 von Intron 8 zeigt einen heterozygoten Basenaustausch von C → T (c.879 + 80C>T). Dies entspricht dem rot umrandeten Bereich.

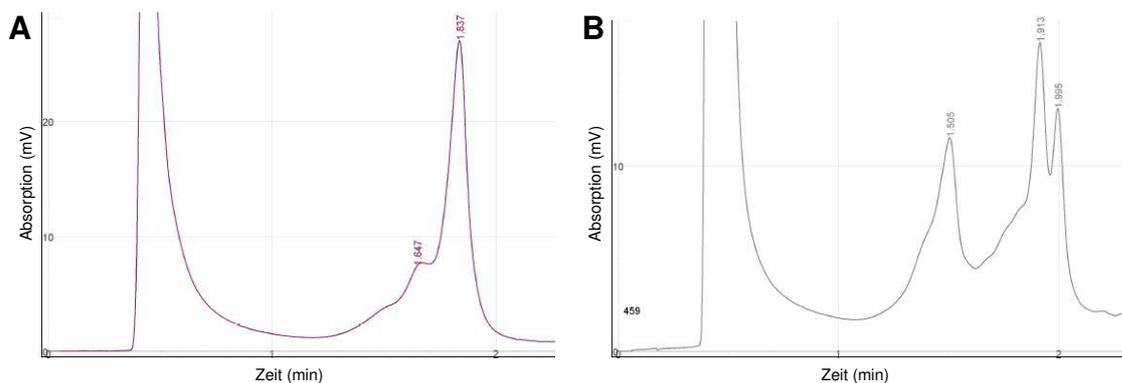
Zur Bestätigung durch eine unabhängige Methode wurde nach einem Restriktionsenzym mit entsprechender Erkennungssequenz gesucht. Es wurde jedoch kein entsprechendes Enzym gefunden, da dieser Basenaustausch nicht zu einer Veränderung der Schnittstellen führt.

Auf Grund der vielfältigen Kurvenverläufe bei der DHPLC-Analyse von Exon 8 war es nicht möglich, diese eindeutig einer spezifischen Mutation zuzuordnen, so dass mit Hilfe der DHPLC keine sichere Zuordnung zu Allel-Häufigkeiten gelang.

Da dieser Basenaustausch in Intron 8 bereits unter der Variation-ID „rs256015“ in der NCBI-Datenbank bekannt war ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=256015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=256015) am 30.05.2012), wurde auf den Aufwand der Sequenzierung der gesunden Kontrollen verzichtet.

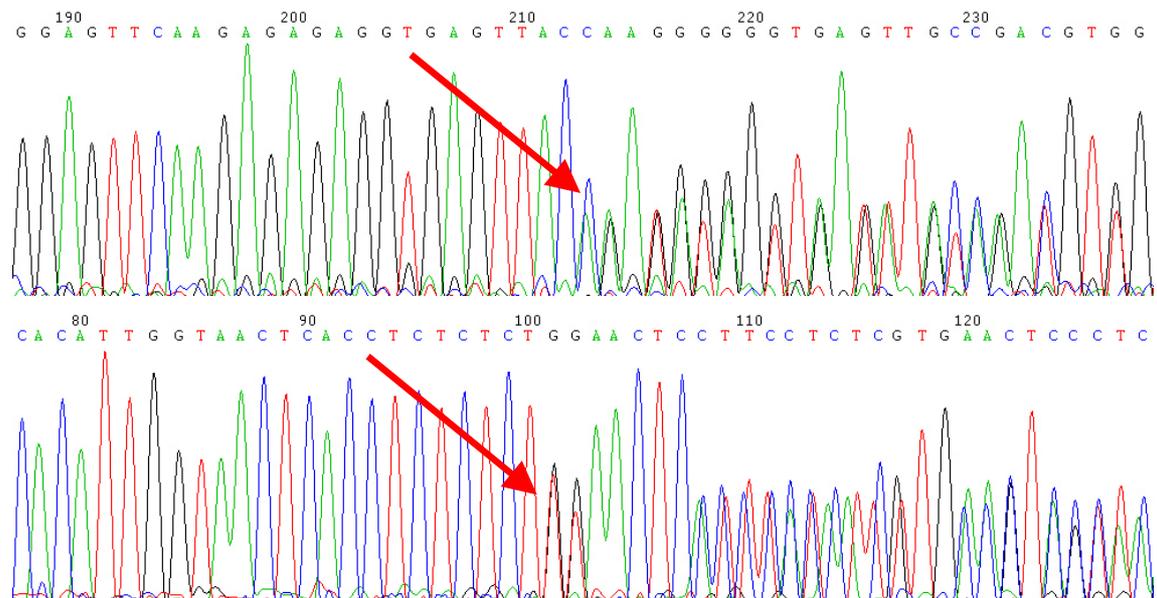
### 3.3.3.2 Nachweis einer Duplikation in Intron 8

Unter den verschiedenen DHPLC-Kurvenverläufen von Exon 8 war eine dreigipflige Kurve mit einer Senke zwischen dem ersten und dem zweiten Peak bei der höheren Temperatur aufgefallen. Diese Auffälligkeit, die mit einer DNA-Veränderung einherging, stellte ein konstantes Merkmal dar und war selbst dann abgrenzbar, wenn sie mit einer anderen Veränderung kombiniert war. Bei der niedrigeren Temperatur war kein exakt konstantes Muster zu erkennen. Es variierte je nach Kombination der DNA-Veränderungen, allerdings war das Motiv stets mit Hilfe der Kurve der höheren Temperatur in der DHPLC-Analyse abgrenzbar (Abbildung 3.22).

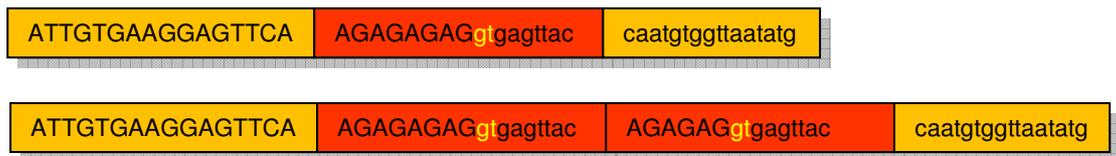


**Abbildung 3.22:** DHPLC-Analyse des Exon 8 bei 58,0°C. A stellt den Etablierungspeak mit CEPH-DNA dar. In B sieht man die für diese DNA-Veränderung typische dreigipflige Kurve mit der Senke zwischen dem ersten und zweiten Peak.

In der Sequenzierung zeigte sich dann eine komplexe DNA-Veränderung, die erst mit Hilfe von PCR-Amplifikaten einer *Proofreading*-Taq entschlüsselt werden konnte. Es handelt sich dabei um eine Duplikation von 17bp, die unter anderem die Spleißstelle zwischen Exon 8 und Intron 8 enthält (Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.23:** Beispielhafte Sequenzierung der Probe 380 des Sinn- (oben) und Gegensinnstrangs (unten). Die beiden Pfeile deuten jeweils auf den Abschnitt, ab dem die beiden DNA-Stränge nicht mehr deckungsgleich sind. Da an dieser Stelle 17 Basenpaare eingefügt sind, lässt sich die Rasterverschiebung bis zum Ende der Sequenzierung verfolgen.



**Abbildung 3.24:** Schema für die Duplikation in Intron 8. Die obere Zeile entspricht der Sequenz des Wildtyps, in der Mitte sind die 17 Basenpaare rot gekennzeichnet, die dupliziert werden. In der unteren Zeile sieht man, dass die 17 Basenpaare doppelt vorhanden sind und direkt aufeinander folgen. Die Spleißstelle entspricht dem gelb geschriebenen ‚gt‘, auch diese wurde dupliziert.

Für diese Duplikation in Intron 8 prognostizierte *MutationTaster* ebenfalls einen Polymorphismus ohne funktionelle Bedeutung, auch war diese komplexe DNA-Veränderung bereits unter der Variation-ID „rs41295719“ zu finden ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Variation\\_Transcript?db=core;g=ENSG00000113013;r=5:137918923-](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Variation_Transcript?db=core;g=ENSG00000113013;r=5:137918923-)

137939014;t=ENST00000297185#INTRONIC\_tablePanel am 30.05.2012). Darum wurde auf eine Sequenzierung aller Proben verzichtet.

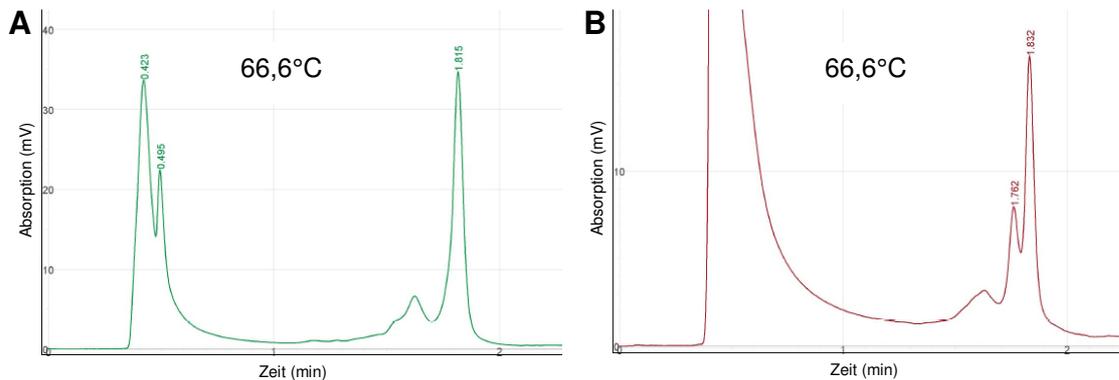
### **3.3.4 Intron 7 (innerhalb des Amplifikats von Exon 8)**

Viele der auf Grund eines auffälligen DHPLC-Kurvenverlaufs beispielhaft sequenzierten Proben wiesen die gleiche Sequenzalteration auf, ohne dass dieser ein typisches Elutionsprofil zugeordnet werden konnte. Dabei kam für die Auswertung erschwerend hinzu, dass diese DNA-Veränderung häufig mit den weiteren, oben genannten Sequenzauffälligkeiten im Amplifikat von Exon 8 kombiniert war und die entsprechenden Elutionskurven eine Kombination verschiedener Motive darstellten. So wurden mehr unterschiedlich aussehende DHPLC-Kurvenverläufe nachgewiesen als zugrundeliegende DNA-Veränderungen identifiziert werden konnten. Aus diesem Grund kann für folgende Sequenzvariation kein typisches Elutionsprofil abgebildet werden.

In der Sequenzierung fand sich 26 Basenpaare vor Beginn des Exons 8 eine T-Deletion in Intron 7 (c.717 – 26delT) (Abbildung 3.25).

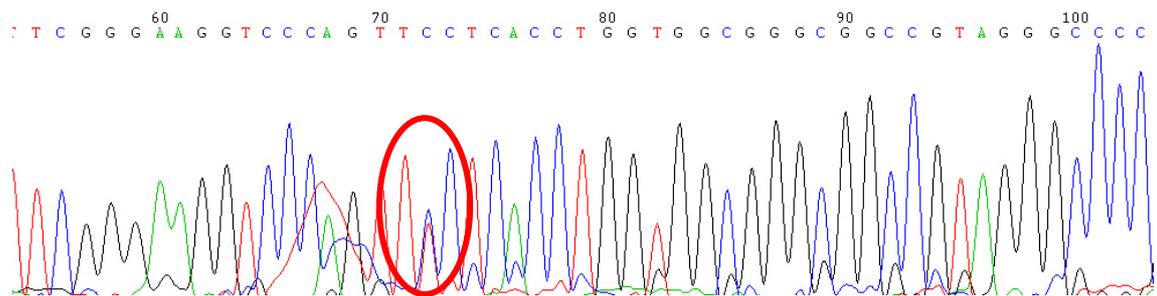


gefunden (siehe Abbildung 3.26). Statt eines einzelnen schlanken Peaks fand sich ein Doppelgipfel mit einem deutlich kleineren ersten Peak.



**Abbildung 3.26:** DHPLC-Analyse des Exon 1 bei 66,6°C. A stellt den Etablierungspeak mit CEPH-DNA dar. In B sieht man das für diese DNA-Veränderung typische zweigipflige Elutionsprofil. Abgebildet ist die Kurve der gepoolten Proben 030071 und 040377.

In der anschließenden Sequenzierung stellte sich ein heterozygoter intronischer Basenaustausch als Ursache der Elutionskurven-Veränderung dar. Dabei war 6 Basenpaare nach Exon 1 Guanin nach Adenin verändert (c.81 + 6G>A) (Abbildung 3.27).



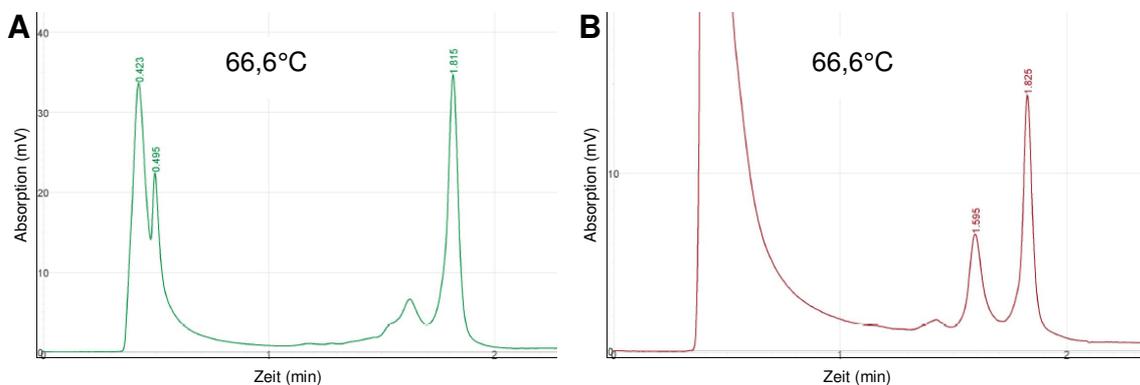
**Abbildung 3.27:** Sequenzierung des Gegensinnstrangs von Exon 1 der Probe 030477. Das intronische Basenpaar 6 nach Exon 1 zeigt einen heterozygoten Basenaustausch von G → A (c.81 + 6G>A). Dies entspricht dem rot umrandeten Bereich.

Auch hier gelang es nicht, mittels Enzymsuche eine differentielle Restriktionsschnittstelle zu identifizieren, die eine Bestätigung durch eine unabhängige Methode ermöglicht hätte.

Insgesamt wurde diese DNA-Veränderung bei 2 von 286 Patienten gefunden. Dieser Basenaustausch in Intron 1 ist bisher in den Datenbanken nicht unbekannt. *MutationTaster* prognostiziert, dass er krankheitsauslösend sein könnte.

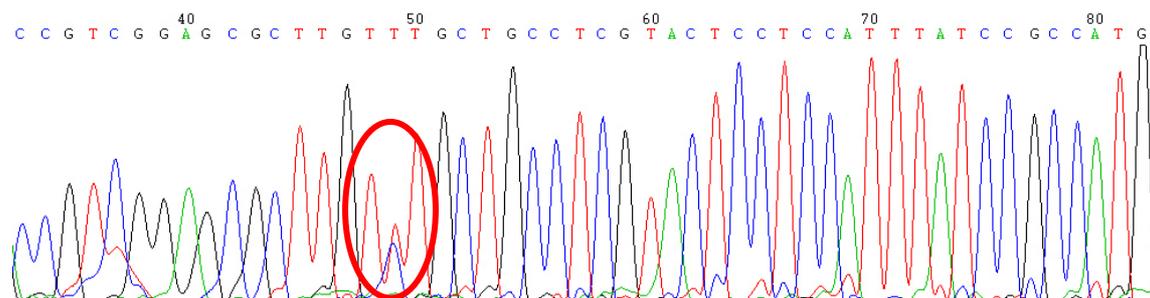
### 3.3.6 5'-nicht-kodierender Bereich/ Promotor-Region

Beim DHPLC-Screening des Amplifikats von Exon 1 und den direkt daran anschließenden nicht-kodierenden Bereichen fand sich ein weiteres auffälliges Elutionsprofil, das nur bei der Amplifikation aus 2 gepoolten Patientenproben detektiert wurde. Es handelt sich wie bei der in Kapitel 3.3.5 beschriebenen Elutionskurve auch um einen Doppelgipfel mit einem niedrigeren ersten Gipfel. Der Unterschied zu der zuvor beschriebenen Veränderung liegt aber darin, dass der Peak dieses Mal keine gemeinsame Basis hat (siehe Abbildung 3.28).



**Abbildung 3.28:** DHPLC-Analyse des Exon 1 bei 66,6°C. A stellt den Etablierungspeak mit CEPH-DNA dar. In B sieht man das Elutionsprofil mit zwei Peaks und einer Senke dazwischen. Abgebildet ist die Kurve der gepoolten Proben 030053 und 031785.

Hinter diesem Elutionsprofil verbarg sich ein Basenaustausch von T → C im 5'-nicht-kodierenden Bereich des Gens 31 Basenpaare vor Beginn von Exon 1 (c. – 31T>C) (Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.29:** Sequenzierung des Sinnstrangs von Exon 1 der Probe 031785. Innerhalb des 5'-nicht-kodierenden Bereichs fand sich 31 Basen vor Beginn von Exon 1 ein heterozygoter Basenaustausch von T → C (c. – 31T>C). Dies entspricht dem rot umrandeten Bereich.

Dieser intronische Basenaustausch fand sich nur bei einem Patienten. Ein geeignetes Restriktionsenzym gab es nicht, um diese DNA-Veränderung durch eine unabhängige Methode zu bestätigen.

Der in der Promotor-Region liegende Basenaustausch ist bisher in den Datenbanken nicht vorbekannt, *MutationTaster* sagte auch hier voraus, dass es sich um eine krankheitsauslösende Veränderung handeln könnte.



## 4 Diskussion

Die Pathogenese der Parkinson-Krankheit ist bis heute nicht vollständig geklärt. Nur bei einem geringen Anteil der Patienten, häufig mit einer familiären Form der PK, kann bislang eine Mutation in einem der 18 Parkinson-Gene (PARK1-18) gefunden werden, die ursächlich für die Erkrankung ist. Bei der Mehrzahl der Patienten wird daher von der sporadischen Form der PK gesprochen. Man geht davon aus, dass die Erkrankung durch ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren und genetischen Suszeptibilitätsfaktoren entsteht.

In den letzten Jahren sind die Mitochondrien und ihre Aufgaben immer mehr in das Interesse der Forschung gerückt. Es wurden Veränderungen in drei zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase wichtigen Genen (PINK1, DJ-1 und Parkin) entdeckt, die zum einen in homozygoter Form als rezessive Merkmale mit der familiären, früh beginnenden PK in Verbindung stehen, zum anderen aber auch in heterozygoter Form als Suszeptibilitätsfaktoren bei der sporadischen PK eine Rolle spielen könnten (Grünwald et al., 2013; Marongiu et al., 2008; Übersicht in Klein et al., 2007a; Übersicht in Klein und Schlossmacher 2007b; Übersicht in Mata et al.; 2004). In diesem Zusammenhang ist auch das mitochondriale Hitzeschockprotein 70 (Hsp 70), auch Mortalin genannt, in den Blickpunkt der Wissenschaft geraten. Es wurde als Interaktionspartner dieser drei Parkinson-assoziierten Proteine identifiziert (Jin et al., 2007; Li et al., 2005; Yang et al., 2011; Rakovic et al., 2011; Davison et al., 2009; Burbulla, Schelling et al., 2010b), und war zuvor schon als ein Protein bekannt, das eine wichtige Rolle im Alterungsprozess von Zellen innehat. Dabei scheint ein ausgewogenes Gleichgewicht von Mortalin für das Überleben einer Zelle elementar zu sein. Zu viel Mortalin lässt einerseits Zellen länger leben (Kaula et al., 2000; Yokoyama et al., 2002; Kaul et al., 2003; Yaguchi et al., 2007), führt aber auch zu maligner Transformation (Takano et al., 1997; Kaul et al., 1998), andererseits wird zu wenig Mortalin für neurodegenerative Prozesse und Alterungsvorgänge verantwortlich gemacht (Jin et al., 2005; Jin et al., 2006; Yaguchi et al., 2007).

Mortalin stellte damit ein interessantes Gen für einen Kandidatenansatz bei der Identifikation von Ursachen der PK dar. Dieses Mutationscreening mit

anschließender genetischer Assoziationsstudie sollte Krankheits-assoziierte molekulargenetische Veränderungen im Mortalin-Gen bei Parkinson-Patienten identifizieren, damit anschließend deren mögliche Bedeutung für die Pathogenese der PK funktionell untersucht werden kann.

Da es sich bei der Parkinson-Krankheit um eine heterogene Erkrankung handelt, bei der viele Gene monokausal oder als Suszeptibilitätsfaktoren an der Krankheitsgenese beteiligt sind, können einem Kandidatengenansatz in einem begrenzten Patientenkollektiv auf Grund der Seltenheit von Genveränderungen diese entgehen. Die Ala30Pro-Mutation im  $\alpha$ -Synuklein-Gen wurde beispielsweise nur bei einer Familie weltweit nachgewiesen (Krüger et al., 1998). Je seltener eine Genveränderung gefunden wird, desto stärker ist der genetische Effekt anzunehmen (Übersicht in Manolio et al., 2009). Meist handelt es sich dabei um eine monogene, mendelnde Veränderung. Mutationen, die häufig gefunden werden, bzw. Polymorphismen wird nur ein geringer genetischer Effekt zugeschrieben (Übersicht in Manolio et al., 2009). Die hier verwendeten Methoden für das Mutationscreening können als geeignet zur hochsensitiven Detektion von möglichen Genveränderungen angesehen werden, da sie allgemein etabliert und validiert sind (Strachan und Read, 2005a-f; Mülhardt, 2006a-c; Sanger et al., 1977; Mullis und Faloona, 1987; O'Donovan et al., 1998; Übersicht in Xiao und Oefner, 2001; Gross et al., 1999; Eng et al., 2001).

Mögliche Limitationen der verwendeten Methoden wurden gründlich abgewogen und wie folgt berücksichtigt.

Ein allgemeines Problem stellt die Lagerung der DNA dar. Wiederholte Temperaturschwankungen während des Einfrierens auf  $-20^{\circ}\text{C}$  und Auftauens auf  $+4^{\circ}\text{C}$  können DNA-Brüche hervorrufen, welche eine fehlerfreie DNA-Vervielfältigung erschweren. Um eine DNA-Fragmentation zu verhindern, wurden vor Beginn des Screenings Masterplatten mit genomischer DNA in einer Konzentration von ca. 30 ng/ $\mu\text{l}$  pipettiert. Diese wurden konstant bei  $+4^{\circ}\text{C}$  gelagert, um sie vor DNA-Brüchen durch Temperaturschwankungen zu schützen. Da teilweise allerdings auf ältere DNA zurückgegriffen wurde, zeigten

manche Amplifikate zusätzliche unspezifische Bandenmuster, was zu falsch positiven Detektionen bei der DHPLC führen kann, oder waren in seltenen Fällen nicht amplifizierbar.

Auch die PCR selbst kann zu falsch positiven Ergebnissen beitragen. Auf Grund der relativ hohen Fehlerrate der Taq-Polymerase (ca.  $10^{-5}$  – laut Herstellerangaben; Promega GmbH, Mannheim) kann es nicht nur zum Verlust von Mutationen kommen, sondern auch zum Einbau neuer Pseudomutationen. Polymerase-Lesefehler bereiteten sowohl bei der DHPLC-Analyse als auch bei der Sequenzierung des Amplifikats von Exon 8 und seinen angrenzenden Intron-Bereichen Schwierigkeiten. Dieses Problem konnte mit Hilfe einer *Pwo*-Polymerase eingegrenzt werden. Sie besitzt eine *Proofreading*-Funktion und ist im Vergleich mit einer Taq-DNA-Polymerase um den Faktor 10 genauer (laut Herstellerangaben; PeqLab, Erlangen)

Die denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde bereits für viele Gene als Methode für ein effektives Screening nach DNA-Veränderungen erfolgreich eingesetzt, sowohl in unserer Arbeitsgruppe (Omi, Strauss et al., 2005; S6-ATPase, Wahl et al., 2008), in mit uns zusammenarbeitenden Arbeitsgruppen (DJ-1, Hering et al, 2004b; Nurr1, Hering et al., 2004a;  $\alpha$ -Synuklein, Berg et al., 2005) als auch darüber hinaus (z.B. VHL-Suppressor-Gen, Klein et al, 2001; BRCA1, Eng et al, 2001). Im Vergleich mit anderen Screeningmethoden wie *single strand conformational polymorphism analysis* (SSCP), *conformation sensitive gel electrophoresis* (CSGE) und *two dimensional gene scanning* (TDGS) schnitt die DHPLC als überlegene Methode ab. Sie war die einzige Methode, mit der in unterschiedlichen Studien alle untersuchten Polymorphismen vollständig detektiert wurden (Gross et al, 1999; Eng et al., 2001). Insgesamt hat die DHPLC eine Detektionswahrscheinlichkeit von DNA-Veränderungen von über 95% (Jones et al., 1999). Ihre hohe Sensitivität führt somit eher zum Nachweis einer falsch positiven Probe im Sinne einer verringerten Spezifität. Daher ist nach der Detektion auffälliger DHPLC-Elutionsprofile der anschließende direkte Nachweis einer Veränderung der Basenfolge in der Sequenzierreaktion zur Bestätigung notwendig. Die Durchführung eines Screenings mit Hilfe der DHPLC erfordert nicht nur

Erfahrung bei der Auswertung der Kurven sondern auch bereits bei der dem eigentlichen Screening vorausgehenden Etablierungsphase. Dabei muss der richtige Temperatur- und Konzentrationsgradient gewählt werden, bei dem die Heteroduplices partiell denaturiert sind (Jones et al., 1999). Diese Erfahrung im Umgang mit der Methode war im Labor in hohem Maß vorhanden und hat die Etablierungsphase erleichtert.

Nachdem eine auf Grund einer auffälligen DHPLC-Kurve vermutete DNA-Veränderung in der direkten Sequenzierung nachgewiesen worden war, wurde diese nach Möglichkeit durch Restriktionsverdau bestätigt, d.h. wenn ein geeignetes Enzym gefunden werden konnte. Die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)- Methode ist robust und bereits seit Langem etabliert (Mülhardt, 2006a; Strachan und Read, 2005a). Um das Übersehen einer Schnittstelle durch verminderte oder erloschene Enzymaktivität zu verhindern, wurde jeweils auf das Mitführen einer Positivkontrolle geachtet.

In unserer Studie wurden insgesamt zwölf DNA-Veränderungen im Mortalin-Gen gefunden. Ein kodierender Basenaustausch in Exon 12 (c.1426G>A), der einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an Position 476 des Mortalin/GRP75-Proteins zur Folge (Ala476Thr) hat, vier weitere exonische nicht-kodierende Basenaustausche, die bereits als Polymorphismus bekannt waren, sowie 7 intronische DNA-Veränderungen. Einen Überblick gibt Tabelle 4.1.

**Tabelle 4.1: Überblick über die beim DHPLC-Screening gefundenen DNA-Veränderungen im Mortalin-Gen**

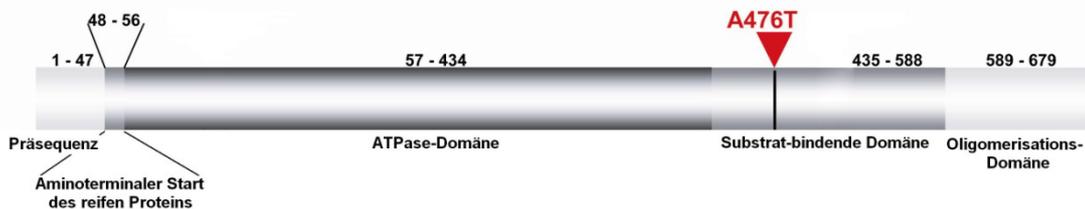
Variation-ID	DNA-Veränderung
neu	5'UTR: c. – 31T>C
neu	Intron 1: c.81 + 6G>A
rs34916633	Exon 4: c.243C>T, Ala81Ala
rs71574426	Intron 7: c.717 – 26delT
rs41295717	Exon 8: c.774G>A, Gln258Gln
rs41295719	Intron 8: c.872_879+9dupAGAGAGAGGTTAGTTAC bzw. c.872_IVS8+9dup17 nach Freimann et al.
rs256015	Intron 8: c.879 + 80C>T
neu	Intron 8: c.880 – 49_52delTTTA
rs1042665	Exon 9: c.948A>G, Lys316Lys
rs112933980	Intron 11: c.1411 – 16G>T
neu	Exon 12: c.1426G>A, Ala476Thr
rs10117	Exon 16: c.1933C>T, Leu645Leu

Der Aminosäurenaustausch Ala476Thr liegt beim Interspezies-Vergleich von der Hefe bis zu den Vertebraten in einem hoch konservierten Bereich des Mortalin-Gens (siehe Abbildung 4.1). Dies spricht dafür, dass dieser Austausch pathogenetisch relevant sein könnte.

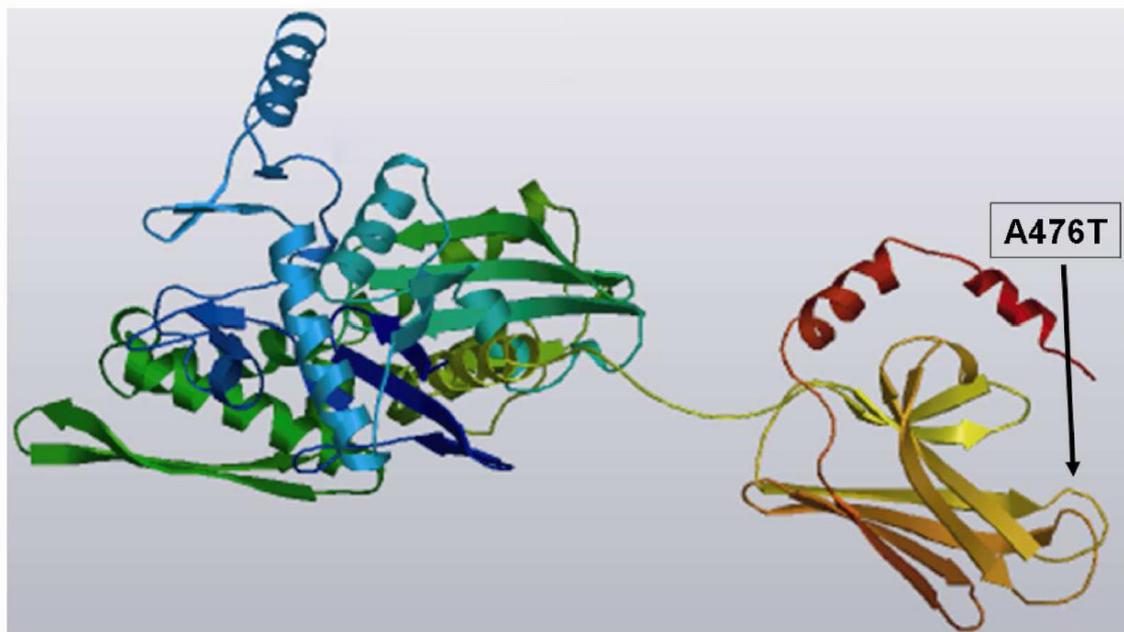
H. sapiens	469	SQVFSTA	A	DGQTQVE	483	HSPA9
<b>MUTATION</b>		SQVFSTA	<b>T</b>	DGQTQVE		
M. musculus		SQVFSTA	A	DGQTQVE		Hspa9
R. norvegicus		SQVFSTA	A	DGQTQVE		Hspa9
B. taurus		SQVFSTA	A	DGQTQVE		HSPA9
G. gallus		SQVFSTA	A	DGQTQVE		HSPA9
C. familiaris		SQVFSTA	A	DGQTQVE		HSPA9
C. elegans		SQVFSTA	A	DGQTQVQ		hsp-6
S. cerevisiae		SQIFSTA	A	AGQTSVE		SSC1p

**Abbildung 4.1: Interspeziesvergleich der Aminosäuresequenz des Mortalin-Gens im Bereich des Ala476Thr-Austauschs (Burbulla, Schelling et al., 2010b).**

Das Protein Mortalin besitzt zwei funktionelle Domänen, die ATPase-Domäne und die Substrat-bindende Domäne. Der gefundene Aminosäureaustausch liegt in der Substrat-bindenden Domäne (siehe Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.2:** Schema für den strukturellen Aufbau des Proteins Mortalin mit seinen verschiedenen Domänen. Der gefundene Aminosäureaustausch Ala476Thr liegt in der Substrat-bindenden Domäne (modifiziert nach Burbulla, Schelling et al., 2010b).



**Abbildung 4.3:** Modell für die dreidimensionale Struktur des Proteins Mortalin, abgeleitet durch Homologie-Modellierung von *G. kaustophilus* HTA426 durch SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org> am 27.06.2012). Der Pfeil deutet auf die Lokalisation des gefundenen Aminosäureaustauschs Ala476Thr (modifiziert nach Burbulla, Schelling et al., 2010).

De Mena und Kollegen haben im Jahre 2009 zwei weitere DNA-Veränderungen im Mortalin-Gen bei Parkinson-Patienten gefunden, die einen Aminosäureaustausch von Arginin nach Tryptophan an Position 126 und von Prolin nach Serin an Position 509 kodieren (De Mena et al., 2009). Während Pro509Ser wie die von uns gefundene Mutation in der Substrat-bindenden

Domäne liegt, ist Arg126Trp in der ATPase-Domäne lokalisiert. In Folgearbeiten unserer Arbeitsgruppe zu funktionellen Auswirkungen von Mortalin-Varianten konnte Dr. Burbulla zeigen, dass alle drei mit der PK assoziierten Mortalin-Varianten *in vitro* regelrecht in die Mitochondrien transportiert werden, was darauf schließen lässt, dass der mitochondriale Import unabhängig von der Lokalisation der Proteinveränderung nicht beeinflusst wird (Burbulla, Schelling et al., 2010b). Es konnte aber nachgewiesen werden, dass in neuronalen und nicht-neuronalen menschlichen Zellen durch die Mutationen erhöhte ROS-Levels und ein vermindertes Membranpotential der Mitochondrien verursacht werden, die unter proteolytischem Stress zunehmen (Burbulla, Schelling et al., 2010b). Dies spricht dafür, dass die Mortalinvarianten zwar an ihren Wirkungsort gelangen, ihre protektive Funktion in der mitochondrialen Matrix aber nicht richtig erfüllen können. Diese funktionellen Einschränkungen gingen mit einem gestörten Aufbau des mitochondrialen Netzwerks einher, was auch in Fibroblasten eines heterozygoten Trägers der Ala476Thr-Mutation nachgewiesen werden konnte (Burbulla, Schelling et al., 2010b).

Dass alle bisher gefundenen, mit der PK assoziierten Varianten im Mortalin-Gen im heterozygoten Zustand entdeckt worden sind, impliziert zunächst einen autosomal dominanten Effekt. Dabei handelt es sich am ehesten um ein genetisches Merkmal mit reduzierter Penetranz, was für einen genetischen Suszeptibilitätsfaktor für die PK spricht, da die Patienten, bei denen die Genveränderungen gefunden wurden, formal keine positive Familienanamnese für eine Parkinson-Erkrankung aufweisen konnten. Der komplette Verlust der physiologischen Funktion von Mortalin ist nicht mit einem Zellüberleben in verschiedenen Modellen von der Hefe bis zum Vertebraten vereinbar. (Slater und Craig, 1987; Übersicht in Deocaris et al., 2008; Übersicht in Macario et al., 2010). Dies könnte erklären, warum bislang keine homozygoten Funktionsverlustvarianten im Mortalin-Gen beim Menschen beschrieben sind.

Die bisher bekannten Mortalin-Varianten sind nicht in der Lage die Funktion und den normalen Phänotyp der Mitochondrien eines *Knockdown*-Modells in menschlichen Zellen wiederherzustellen. Dies weist auf das Konzept des Funktionsverlusts von Mortalin durch die Genveränderungen hin. Verglichen mit

Kontrollzellen konnte eine *Knockdown*-Effizienz von nahezu 60% erreicht werden, eine höhere *Knockdown*-Effizienz war nicht mehr mit dem Überleben der untersuchten Zellen vereinbar (Burbulla, Schelling et al., 2010b). Da die Expression des Wildtyp-Allels bei einem heterozygoten Träger der Ala476Thr-Mutation nicht für eine normale Mortalinfunktion ausreichte, sondern die Mitochondrien auch ein vermindertes Membranpotential, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber zellulärem Stress und eine veränderte Mitochondrienstruktur zeigten, könnte eine Haploinsuffizienz als Pathomechanismus zugrundeliegen (Burbulla, Schelling et al., 2010b). Interessanterweise zeigt dieser Mutationsträger bisher noch keine klinischen Symptome einer Parkinson-Erkrankung, obwohl die Mitochondrien bereits die typischen Veränderungen einer beeinträchtigten Mortalinfunktion zeigen. Dies könnte auf einen präsymptomatischen Phänotyp hindeuten und in Zukunft möglicherweise eine Rolle als präklinischer Marker in der Neurodegeneration der PK spielen (Burbulla, Schelling et al., 2010b).

Anders als bei dem initialen, dieser Arbeit zugrundeliegenden Screening, bei dem die Ala476Thr-Mutation nur bei einem Patienten gefunden wurde, nicht aber unter den gesunden Kontrollen, wurden bei einem unabhängigen größer angelegten Screening von 1008 deutschen Parkinson-Patienten und 1342 gesunden Kontrollen, die in Alter und Geschlecht weitgehend mit dem Patientenkollektiv übereinstimmten, vier weitere Patienten sowie sechs aus dem Kontrollkollektiv als Träger der Variante identifiziert. Interessant ist dabei, dass bei vier von den sechs Mutationsträgern aus dem Kontrollkollektiv extrapyramidale Symptome festgestellt wurden, die aber zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht die Diagnosekriterien der Parkinsonkrankheit erfüllten (mittleres Alter  $72,6 \pm 5,3$  Jahre). Die beiden anderen Kontrollen, die ebenfalls die Genveränderung besitzen, sind bisher asymptomatisch, aber deutlich jünger (mittleres Alter  $44,5 \pm 9$  Jahre) als das mittlere Erkrankungsalter von Parkinson-Patienten (ca. 58 Jahre). Der Aminosäureaustausch Ala476Thr im Mortalin-Gen könnte also als Risikofaktor für die Entwicklung einer PK im Laufe des Alters angesehen werden (Burbulla, Schelling et al., 2010b).

Heterozygote Varianten im Mortalin-Gen stellen möglicherweise ein Risiko für die Entwicklung einer *late-onset*-Variante der neurodegenerativen Erkrankung dar. Genetische Studien zu Suszeptibilitätsfaktoren bei der idiopathischen *late-onset*-Form der PK konnten zeigen, dass das sporadische Auftreten der Erkrankung eine Mitbeteiligung von genetischen Faktoren bei der Entwicklung der Parkinson-Krankheit nicht ausschließt (Hicks et al., 2002). Heterozygote Mutationen im GBA-Gen konnten als bislang häufigster Suszeptibilitätsfaktor für die Entwicklung eines sporadischen Parkinson-Syndroms identifiziert werden (Sidransky et al., 2009), die G2019S-Mutation im LRRK2-Gen ist die häufigste autosomal dominante Ursache der PK (Di Fonzo et al., 2005; Goldwurm et al., 2007; Latourelle et al., 2008; Übersicht in Krüger, 2008).

Eine beachtliche Anzahl genomischer Untersuchungen wiesen übereinstimmend einen Suszeptibilitätsloкус für die Parkinson-Krankheit auf dem langen Arm von Chromosom 5 nach, der den Lokus für das Mortalin-Gen 5q31.1 einschließt. Dies untermauert die potentielle Rolle von Mortalin in der Pathogenese der PK (Hicks et al., 2002; Scott et al., 2001; Pankratz et al., 2003; Martinez et al., 2004).

Da die Mitochondrien einen hohen metabolischen Umsatz vorweisen, sind sie in besonderem Maße freien Sauerstoffradikalen ausgesetzt und dadurch gefährdet, durch oxidativ veränderte Moleküle wie Lipide, Proteine und DNA beschädigt zu werden. Liang und Kollegen fanden im Jahre 2007 heraus, dass dopaminerge Neurone der Substantia nigra pars compacta weniger Mitochondrien haben, verglichen mit nicht-dopaminergen Neuronen oder dopaminergen Neuronen anderer Gehirnareale (Liang et al., 2007). Dies könnte ein Grund sein, warum gerade die Pars compacta der Substantia nigra so schwer von der Neurodegeneration betroffen ist. Umso wichtiger ist eine voll funktionstüchtige Proteinclearance-Maschinerie und Stress-Antwort für die Mitochondrien, um sich vor Schäden durch oxidativen Stress zu schützen. Die Mitochondrien sind auf spezifische Proteine angewiesen, die falsch gefaltete Proteine zurückfalten oder diese dem proteolytischen Abbau zuführen, sog. Chaperone. Vor wenigen Jahren wurde herausgefunden, dass Omi/HtrA2 eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Qualitätskontrolle spielt (Radke et al.,

2008). Auch für Mortalin ist bekannt, dass es eine Chaperonfunktion in der Mitochondrienmatrix innehat und beschädigte Proteine zurückfaltet, indem es eine Verbindung mit dem mitochondrialen Hitzeschockprotein Hsp60 eingeht (Übersicht in Deocaris et al., 2006). Das Homolog der Hefe von Mortalin ist bekannt dafür, dass es falsch gefaltete Proteine den mitochondrialen Proteasen zum Abbau zuführt (Wagner et al., 1994). Eine Überexpression von Wildtyp-Mortalin wirkt protektiv bei proteolytischem Stress gemessen am mitochondrialen Membranpotential und der Menge an ROS. Im Gegensatz dazu fehlte diese protektive Funktion den Zellen, die eine der drei bisher gefundenen Mutationen im Mortalin-Gen trugen (Burbulla, Schelling et al., 2010b).

Man kann also annehmen, dass fehlgefaltetes Mortalin und/oder eine beeinträchtigte Interaktion zwischen Mortalin und seinen Interaktionspartnern und Substraten innerhalb der Mitochondrien die protektive Rolle des mitochondrialen Hitzeschockproteins zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion beeinträchtigen (Burbulla, Schelling et al., 2010b). Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass vermehrter proteolytischer Stress zu einer Fehlfaltung von Mortalin führt, was einen gestörten Proteinimport in die Mitochondrien und eine veränderte mitochondriale Morphologie zur Folge hat (Sanjuán Szklarz et al., 2005).

Ebenso wurde eine gestörte Mitochondrienfunktion bei DNA-Veränderungen der PK-assoziierten Proteine DJ-1, PINK1 und Parkin nachgewiesen. Eine Interaktion von Mortalin mit diesen drei Proteinen konnte bereits belegt werden (Li et al., 2005; Jin et al., 2007; Davison et al., 2009; Burbulla, Schelling et al., 2010b; Krebiehl et al., 2010; Rakovic et al., 2011). Allerdings konnte bisher nicht sicher geklärt werden, wo innerhalb der Zelle und in welcher Art und Weise Mortalin mit diesen Proteinen interagiert. Knockdown- sowie Knockout-Studien mit diesen drei PK-assoziierten Proteinen zeigten nicht nur Veränderungen der mitochondrialen Morphologie, Funktion und Dynamik, sondern hatten auch Auswirkungen auf die mitochondriale Clearance mittels Autophagie (Narendra et al., 2008; Geisler et al., 2010; Irrcher et al., 2010; Krebiehl et al., 2010; Rakovic et al., 2011; Thomas et al., 2011).

Viele Studien untermauern das Vorhandensein eines PINK1-Parkin-Pathways, der sich an der mitochondrialen Degradation sowie an der Aufrechterhaltung der Funktion und Integrität beteiligt. PINK1 agiert dabei *upstream* von Parkin (Clark et al., 2006; Park et al., 2006; Exner et al., 2007; Kim et al., 2008; Shiba et al., 2009). Unklar ist bislang die Beziehung zwischen DJ-1 und diesen beiden Proteinen bei der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase und der Autophagie. DJ-1 selbst agiert als mitochondrialer Stress-Sensor, erhält damit die mitochondriale Funktion und Integrität und hat Einfluss auf die basale Autophygozytoserate (Irrcher et al., 2010; Krebiehl et al., 2010; Thomas et al., 2011). McCoy und Cookson stellten 2011 die Hypothese auf, dass DJ-1 in erster Linie für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion während oxidativem Stress verantwortlich ist und nur indirekt die mitochondriale Dynamik und Autophagie beeinflusst (McCoy und Cookson, 2011). Die Beziehungen zwischen DJ-1 und Parkin beziehungsweise PINK1 werden kontrovers diskutiert. Interessanterweise konnte *in vitro* eine reduzierte mitochondriale Konnektivität durch eine Überexpression von PINK1 in menschlichen und murinen Zellen, denen DJ-1 fehlte, effektiv ausgeglichen werden (Irrcher et al., 2010; Thomas et al., 2011), während dies nach einer Überexpression von PINK1 in Fliegen mit DJ-1 Funktionsverlust nicht beobachtet werden konnte (Hao et al., 2010). Auch für die Beziehung zwischen DJ-1 und Parkin gibt es kontroverse Untersuchungsergebnisse. Während das Erscheinungsbild, das durch einen Verlust von DJ-1 verursacht wurde, durch überexprimiertes Parkin in humanen Zellen *in vitro* ausgeglichen werden konnte (Irrcher et al., 2010; Thomas et al., 2011), konnten Hao und Kollegen dies 2010 *in vivo* in *Drosophila* nicht bestätigen (Hao et al., 2010).

Ein PINK1-Verlust ist verantwortlich für eine verminderte Konnektivität zwischen den Mitochondrien, was nach Behandlung mit Rotenon bei den Zellen (hier: Neuroblastom-Zellen) mit PINK1-Verlust im Vergleich zu den Kontrollzellen sogar noch zunahm (Thomas et al., 2011). Dieser Phänotyp nach Behandlung mit Rotenon konnte sowohl in den humanen Kontrollzellen als auch den Zellen, denen PINK1 fehlte, durch DJ-1-Überexpression rückgängig gemacht werden. Dies zeigt, dass DJ-1 schützend gegen Schäden wirkt, die durch Rotenon

verursacht werden, unabhängig davon, ob PINK1 exprimiert wird oder nicht (Thomas et al., 2011). Auch bei humanen Zellen (hier: HeLa-Zellen), denen PINK1 fehlte, konnten morphologische Veränderungen unter basalen Bedingungen durch eine Überexpression von Wildtyp-PINK1 und Parkin ausgeglichen werden, aber nicht durch DJ-1 (Exner et al., 2007). Hao und Kollegen gelang es im Jahre 2010 nachzuweisen, dass ein Verlust der PINK1-Funktion bei Fruchtfliegen nur zum Teil durch DJ-1 aufgehoben werden konnte. So konnte die abnormale Flügelhaltung bei den Fliegen, die kein PINK1 exprimierten, rückgängig gemacht werden, nicht aber die verminderte Fertilität der PINK1-Mutanten (Hao et al., 2010).

Xiong und Kollegen stellten 2009 die Hypothese auf, dass ein funktionaler Ubiquitin-E3-Ligase-Komplex existiert, der aus den drei Parkinson-assoziierten Proteinen PINK1, DJ-1 und Parkin besteht. Dieser Komplex sollte am Abbau fehlgefalteter Proteine beteiligt sein und könnte somit einen relevanten Pathomechanismus darstellen, der zur Neurodegeneration bei der PK führt (Xiong et al., 2009). Über die Existenz eines solchen PINK1/DJ-1/Parkin-Komplexes wird aktuell noch debattiert, unabhängige Studien konnten bislang diese Entdeckung nicht bestätigen (Thomas et al., 2011). Laut aktueller Datenlage scheint DJ-1 eher parallel zum PINK1-Parkin-Pathway zu agieren als in einer direkten Verbindung zu diesen beiden zu stehen.

Wie bereits erwähnt wurde inzwischen herausgefunden, dass Mortalin mit den drei PK-assoziierten Proteinen PINK1, DJ1 und Parkin interagiert. Dies unterstreicht die potentielle Rolle dieses mitochondrialen Chaperons in einem Modell für einen Pathomechanismus bestehend aus PK-assoziierten Proteinen (Li et al., 2005; Jin et al., 2007; Burbulla, Schelling et al., 2010b; Rakovic et al., 2011; Yang et al., 2011).

Yang und Kollegen führten dabei erste funktionelle Studien durch, um das Zusammenspiel zwischen Mortalin und anderen PK-assoziierten Proteinen zu untersuchen. Sie fanden heraus, dass eine Überexpression von Parkin mitochondriale Veränderungen in menschlichen Zellen, die durch einen Mortalin-Verlust verursacht wurden, unter Stressbedingungen bedingt durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung rückgängig macht. Unter basalen Bedingungen stellten

allerdings weder PINK1 noch DJ-1 oder Parkin die beeinträchtigte Funktion der Mitochondrien wieder her, die durch ein *Knockdown* von Mortalin in menschlichen Zellen hervorgerufen wurde (Yang et al., 2011).

Es muss also weiterhin geklärt werden, ob Mortalin als direkter Partner an den bestehenden Signalwegen beteiligt ist oder parallel zu diesen agiert.

Das vorliegende Mutationsscreening hat durch den Nachweis der A476T Variante gemeinsam mit PK-assoziierten Varianten in der spanischen Bevölkerung Mortalin als Chaperon in Zusammenhang mit der Neurodegeneration bei der PK gebracht. Seither sind weitere Mutationen beschrieben worden (z.B. Leu358Pro und Thr333Lys durch Freimann et al., 2013), deren Bedeutung für die PK noch etabliert werden muss. Bisher zeigten die funktionellen Untersuchungen zu diesen beiden Genveränderungen noch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante, weder zur subzellulären Lokalisierung, noch zur mitochondrialen Morphologie oder respiratorischen Funktion (Freimann et al., 2013). Goswami und Kollegen untersuchten die beiden von De Mena gefundenen Mutationen Pro509Ser und Arg126Trp in einem Hefe-Modell und konnten einen Funktionsverlust von Mortalin in diesen Mutanten zeigen (De Mena et al., 2009; Goswami et al., 2012). Weitere funktionelle Studien sind nötig, um einen möglichen Pathomechanismus der Mortalin-Mutationen zu definieren, der zur Entstehung der PK führt.

## **Zusammenfassung**

Die Parkinson-Krankheit ist nach der Alzheimer-Krankheit (AD) die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des Menschen weltweit. In den letzten Jahren konnten bei der Erforschung der genetischen Ursachen der Parkinson-Krankheit mit der Entdeckung von 18 PARK-Loci und mehr als 20 weiteren Suszeptibilitätsgenen große Fortschritte erzielt werden.

Bei weiterführenden funktionellen Studien fand man heraus, dass mehrere der enkodierten Genprodukte (u.a. PINK1, Parkin und DJ-1) eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Qualitätskontrolle spielen (Exner et al., 2007; Krebiehl et al., 2010; Grünewald et al., 2010; Irrcher et al., 2010). Das mitochondriale Hitzeschockprotein mtHsp70, auch Mortalin genannt, wurde als Interaktionspartner dieser Proteine identifiziert (Jin et al., 2007; Li et al., 2005; Yang et al., 2011; Rakovic et al., 2011; Davison et al., 2009; Burbulla, Schelling et al., 2010b). Es ist ein mitochondriales Chaperon, das durch die Bildung des Tim44/mtHsp70-Komplex mit der Translokase der inneren Mitochondrienmembran direkt am Proteinimport in die Mitochondrien beteiligt ist (Schneider et al., 1994; Liu et al., 2003; D'Silva et al., 2004). Es ist das einzige Protein des mitochondrialen Import-Komplexes, das eine ATPase-Funktion besitzt, und ist damit unentbehrlich für den effektiven Import von nukleär kodierten Proteinen in das Mitochondrium (Schneider et al., 1994; Brunner et al., 1995). Mortalin stellt durch seine Chaperonfunktion die richtige Faltung von neuen in das Mitochondrium transportierten, kernkodierten Proteinen sicher (Übersicht in Voos und Röttgers, 2002).

Da die mitochondriale Dysfunktion bei der Pathogenese der Parkinson-Krankheit eine entscheidende Rolle spielt, stellte das mitochondriale Hitzeschockprotein Mortalin ein geeignetes Kandidaten-Gen für eine Mutationsanalyse dar. Nach Amplifizierung der 17 kodierenden Exons und angrenzender Intron-Abschnitte des Mortalin-Gens wurde die Mutationsanalyse mit Hilfe der denaturierenden Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durchgeführt.

Untersucht wurden DNA-Proben von 286 Patienten, die entweder an einem klinisch gesicherten idiopathischen oder familiären Parkinson-Syndrom erkrankt

waren, sowie von 290 Kontrollpersonen, die in der Alters- und Geschlechtsverteilung weitestgehend auf das Patientenkollektiv abgestimmt waren. Jede Person der beiden Gruppen war einer standardisierten neurologischen Untersuchung unterzogen worden, um erste klinische Zeichen der Parkinson-Krankheit oder andere extrapyramidale Erkrankungen auszuschließen. Die in der DHPLC auffälligen Proben wurden mit Hilfe der zyklischen DNA-Sequenzierung überprüft.

Es wurden dabei ein kodierender Basenaustausch in Exon 12, vier nicht-kodierende Basenaustausche sowie sieben intronische Veränderungen gefunden. Wo es möglich war, wurden die gefundenen DNA-Veränderungen durch einen Restriktionsverdau als zweite, unabhängige Methode bestätigt. Der heterozygote Basenaustausch c.1426G>A in Exon 12, der einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an Position 476 des Mortalin/GRP75-Proteins zur Folge (Ala476Thr) hat, war bisher in der Literatur unbekannt. Die vier nichtkodierenden Basenaustausche in Exon 4, 8, 9 und 16 waren bereits in der NCBI-Datenbank bekannt, ebenso vier der intronischen DNA-Veränderungen.

Weiterführende funktionelle Studien haben gezeigt, dass Mortalinvarianten (sowohl die hier gefundene Ala476Thr, als auch die beiden von de Mena und Kollegen gefundenen Arg126Trp und Pro509Ser (De Mena et al., 2009)) zwar an ihren Wirkungsort gelangen, ihre protektive Funktion in der mitochondrialen Matrix aber nicht richtig erfüllen können. Diese funktionellen Einschränkungen gingen mit einem gestörten Aufbau des mitochondrialen Netzwerks einher, was auch in Fibroblasten eines heterozygoten Trägers der Ala476Thr-Mutation nachgewiesen werden konnte (Burbulla, Schelling et al., 2010b)

Ob Mutationen im Mortalin-Gen als Suszeptibilitätsfaktor für die sporadische Form der PK gelten können, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen. Zumindest wiesen bereits eine beachtliche Anzahl genomischer Untersuchungen übereinstimmend einen Suszeptibilitätsloкус für die Parkinson-Krankheit auf dem langen Arm von Chromosom 5 nach, der den Lokus für das Mortalin-Gen 5q31.1 einschließt (Hicks et al., 2002; Scott et al., 2001; Pankratz et al., 2003; Martinez et al., 2004).

## Literaturverzeichnis

- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho W-H, Castillo PE, Shinsky N, Garcia Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D und Rosenthal A** (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* **25**: 239-252.
- Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ und Wood NW** (2003). The role of pathogenetic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **54**: 283-286.
- Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J, Aasly JO, Rajput A, Rajput AH, Jon Stoessl A, Farrer MJ** (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenetic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord* **28**: 811-813.
- Baffi JS, Palkovits M, Castillo SO, Mezey E, Nikodem VM** (1999). Differential expression of tyrosine hydroxylase in catecholaminergic neurons of neonatal wild-type and Nurr1-deficient mice. *Neuroscience* **93**: 631-642.
- Bandopadhyay R, de Silva R, Khan N, Graham E, Vaughan J, Engelender S, Ross C, Morris H, Morris C, Wood NW, Daniel S, Lees A** (2001). No pathogenic mutations in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **307**: 125-127.
- Barbeau A** (1969). L-Dopa Therapy in Parkinson's Disease. A Critical Review of Nine Years' Experience. *Can Med Assoc J* **101**: 59-68.
- Beilina A, Van Der Brug M, Ahmad R, Kesavapany S, Miller DW, Petsko GA, Cookson MR** (2005). Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5703-5708.
- Berg D, Niwar M, Maass S, Zimprich A, Möller JC, Wuellner U, Schmitz-Hübsch T, Klein C, Tan EK, Schöls L, Marsh L, Dawson TM, Janetzky B, Müller T, Voitalla D, Kostic V, Pramstaller PP, Oertel WH, Bauer P, Krueger R, Gasser T, Riess O** (2005). Alpha-synuclein and Parkinson's disease: implications from the screening of more than 1,900 patients. *Mov Disord* **20**: 1191-1194.
- Berg D, Hochstrasser H, Schweitzer KJ und Riess O** (2006a). Disturbance of iron metabolism in Parkinson's disease -- ultrasonography as a biomarker. *Neurotox Res* **9**: 1-13.
- Berg D** (2006b). Transcranial sonography in the early and differential diagnosis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **70**: 249-254.
- Berg D** (2006c). Marker for a preclinical diagnosis of Parkinson's disease as a basis for neuroprotection. *J Neural Transm Suppl* **71**: 123-132.
- Bogaerts V, Nuytemans K, Reumers J, Pals P, Engelborghs S, Pickut B, Corsmit E, Peeters K, Schymkowitz J, De Deyn PP, Cras P, Rousseau F, Theuns J, Van Broeckhoven C** (2008). Genetic variability in the mitochondrial serine protease HTRA2 contributes to risk for Parkinson disease. *Hum Mutat* **29**: 832-840.

- Bonifati V, Breedveld GJ, Squitieri F, Vanacore N, Brustenghi P, Harhangi BS, Montagna P, Cannella M, Fabbrini G, Rizzu P, van Duijn CM, Oostra BA, Meco G, Heutink P** (2002). Localization of autosomal recessive early-onset parkinsonism to chromosome 1p36 (PARK7) in an independent dataset. *Ann Neurol* **51**: 253-256.
- Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G und Heutink P** (2003a). DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* **24**: 159-160.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P** (2003b). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* **299**: 256-259.
- Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Tassorelli C, Tavella A, Marconi R, Nicholl DJ, Chien HF, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, De Gaetano A, Horstink MW, Maat-Kievit JA, Sampaio C, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Toni V, Guidi M, Dalla Libera A, Tinazzi M, De Pandis F, Fabbrini G, Goldwurm S, de Klein A, Barbosa E, Lopiano L, Martignoni E, Lamberti P, Vanacore N, Meco G, Oostra BA; Italian Parkinson Genetics Network.** (2005). Early-onset Parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* **65**: 87-95.
- Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA** (1999). Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology* **52**: 1214-1220.
- Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U** (2002). Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* **249** Suppl 3: III/1-5.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Steur ENHJ und Braak E** (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol of Aging* **24**: 197-211.
- Brockmann K und Gasser T** (2010). Genetische Hintergründe der Parkinsonerkrankung. – In: *BIOspektrum* **3/2010**: S. 260-265.
- Brüggemann N, Hagenah J, Reetz K, Schmidt A, Kasten M, Buchmann I, Eckerle S, Bähre M, Münchau A, Djarmati A, van der Vegt J, Siebner H, Binkofski F, Ramirez A, Behrens MI, Klein C** (2010). Recessively inherited parkinsonism: effect of ATP13A2 mutations on the clinical and neuroimaging phenotype. *Arch Neurol* **67**: 1357-1363.
- Brunner M, Schneider HC, Lill R, Neupert W** (1995). Dissection of protein translocation across the mitochondrial outer and inner membranes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**: 619-627.

- Burbulla LF, Krebiehl G, Krüger R** (2010a). Balance is the challenge - The impact of mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Eur J Clin Invest* **40**: 1048-1060.
- Burbulla LF, Schelling C, Kato H, Rapaport D, Voitalla D, Schiesling C, Schulte C, Sharma M, Illig T, Bauer P, Jung S, Nordheim A, Schöls L, Riess O, Krüger R** (2010b). Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis. *Hum Mol Genet* **19**: 4437-4452.
- Burbulla LF, Krüger R** (2011). Converging environmental and genetic pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **306**: 1-8.
- Burbulla LF, Fitzgerald JC, Stegen K, Westermeier J, Thost AK, Kato H, Mokranjac D, Sauerwald J, Martins LM, Voitalla D, Rapaport D, Riess O, Proikas-Cezanne T, Rasse TM, Krüger R** (2014). Mitochondrial proteolytic stress induced by loss of mortalin function is rescued by Parkin and PINK1. *Cell Death Dis.* *in press*.
- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA und Cookson MR** (2004). The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Sci U S A* **101**: 9103–9108.
- 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 und Destee A** (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* **364**: 1167-1169.
- Chartier-Harlin MC, Dachsel JC, Vilariño-Güell C, Lincoln SJ, Leprêtre F, Hulihan MM, Kachergus J, Milnerwood AJ, Tapia L, Song MS, Le Rhun E, Mutez E, Larvor L, Dufлот A, Vanbesien-Mailliot C, Kreisler A, Ross OA, Nishioka K, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Melrose HL, Behrouz B, Keeling BH, Bacon JA, Hentati E, Williams L, Yanagiya A, Sonenberg N, Lockhart PJ, Zubair AC, Uitti RJ, Aasly JO, Krygowska-Wajs A, Opala G, Wszolek ZK, Frigerio R, Maraganore DM, Gosal D, Lynch T, Hutchinson M, Bentivoglio AR, Valente EM, Nichols WC, Pankratz N, Foroud T, Gibson RA, Hentati F, Dickson DW, Destée A, Farrer MJ** (2011). Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **89**: 398-406.
- Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloğlu A, Ozen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S, Lifton RP** (2009). Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19096-19101.
- Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM** (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* **7**: 1144-1150.

- Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M** (2006). *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* **441**: 1162-1166.
- Clarke CE** (2007). Parkinson's disease. *BMJ* **335**: 441-445.
- Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AH** (1992). Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem* **58**: 786-789.
- Cronin KD, Ge D, Manninger P, Linnertz C, Rossoshek A, Orrison BM, Bernard DJ, El-Agnaf OM, Schlossmacher MG, Nussbaum RL, Chiba-Falek O** (2009). Expansion of the Parkinson disease-associated SNCA-Rep1 allele upregulates human alpha-synuclein in transgenic mouse brain. *Hum Mol Genet* **18**: 3274-3285.
- Dagda RK, Cherra SJ 3rd, Kulich SM, Tandon A, Park D, Chu CT** (2009). Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem* **284**: 13843-13855.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ** (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* **1**: 249-254.
- Davison C** (1954). Pallido-pyramidal disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **13**: 50-59.
- Davison EJ, Pennington K, Hung CC, Peng J, Rafiq R, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Ardley HC, Banks RE, Robinson PA** (2009). Proteomic analysis of increased Parkin expression and its interactants provides evidence for a role in modulation of mitochondrial function. *Proteomics* **9**: 4284-4297.
- de la Fuente-Fernández R, Schulzer M, Kuramoto L, Cragg J, Ramachandiran N, Au WL, Mak E, McKenzie J, McCormick S, Sossi V, Ruth TJ, Lee CS, Calne DB, Stoessl AJ** (2011). Age-specific progression of nigrostriatal dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **69** : 803-810.
- De Mena L, Coto E, Sánchez-Ferrero E, Ribacoba R, Guisasola LM, Salvador C, Blázquez M, Alvarez V** (2009). Mutational screening of the mortalin gene (HSPA9) in Parkinson's disease. *J Neural Transm* **116**: 1289-1293.
- Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R** (2006). On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones* **11**: 116-128.
- Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R** (2008). From proliferative to neurological role of an hsp70 stress chaperone, mortalin. *Biogerontology* **9**: 391-403.
- DeStefano AL, Lew MF, Golbe LI, Mark MH, Lazzarini AM, Guttman M, Montgomery E, Waters CH, Singer C, Watts RL, Currie LJ, Wooten GF, Maher NE, Wilk JB, Sullivan KM, Slater KM, Saint-Hilaire MH, Feldman RG, Suchowersky O, Lafontaine AL, Labelle N, Growdon JH, Vieregge P, Pramstaller PP, Klein C, Hubble JP, Reider CR, Stacy M, MacDonald**

- ME, Gusella JF, Myers RH** (2002). PARK3 influences age at onset in Parkinson disease: a genome scan in the GenePD study. *Am J Hum Genet* **70**: 1089-1095.
- Di Fonzo A, Rohé 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** (2005). A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* **365**: 412-415.
- Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L, Szczerbinska A, Zhao T, Dubbel-Hulsman LO, Wouters CH, de Graaff E, Oyen WJ, Simons EJ, Breedveld GJ, Oostra BA, Horstink MW, Bonifati V** (2009). FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* **72**: 240-245.
- D'Silva P, Liu Q, Walter W, Craig EA** (2004). Regulated interactions of mtHsp70 with Tim44 at the translocon in the mitochondrial inner membrane. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1084-1091.
- Eggert KM, Oertel WH, Reichmann H, Arnold G, Baas H, Berg D, Braune S, Deuschl G, Dodel R, Gasser T, Gerlach M, Höglinger G, Jost W, Mehdorn M, Müngersdorf M, Przuntek H, Reuther P, Riederer P, Schulz J, Spieker S, Storch A, Tatsch K, Trenkwalder C** (2008). Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie. In: **Diener HC, Putzki N** (2008). Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. *Thieme-Verlag, Stuttgart*, 4.Auflage, ISBN 978-3-13-132414-6. S.82-112.
- Emre M** (2003). What causes mental dysfunction in Parkinson's disease? *Mov Disord* **18** Suppl 6: S.63-71.
- Eng C, Brody LC, Wagner TM, Devilee P, Vijg J, Szabo C, Tavtigian SV, Nathanson KL, Ostrander E, Frank TS; Steering Committee of the Breast Cancer Information Core (BIC) Consortium** (2001). Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1. *J Med Genet* **38**: 824-833.
- 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** (1999). Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet* **22**: 110-114.
- Exner N, Treske B, Paquet D, Holmström K, Schiesling C, Gispert S, Carballo-Carbajal I, Berg D, Hoepken HH, Gasser T, Krüger R, Winklhofer KF, Vogel F, Reichert AS, Auburger G, Kahle PJ, Schmid B, Haass C** (2007). Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* **27**: 12413-12418.
- 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 und Langston JW** (2003). Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* **50**: 293-300.

- Feany MB und Bender WW** (2000). A drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* **404**: 394-398.
- Freimann K, Zschiedrich K, Brüggemann N, Grünewald A, Pawlack H, Hagenah J, Lohmann K, Klein C, Westenberger A** (2013). Mortalin mutations are not a frequent cause of early-onset Parkinson disease. *Neurobiol Aging* **34**: 2694.e19-20.
- Frey TG, Mannella CA** (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**: 319-324.
- Fuchs J, Mueller JC, Lichtner P, Schulte C, Munz M, Berg D, Wüllner U, Illig T, Sharma M, Gasser T** (2009). The transcription factor PITX3 is associated with sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **30**: 731-738.
- Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Siato M, Tsuji S und Obata F** (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* **51**: 296-301.
- Funayama M, Hasegawa K, Ohta E, Kawashima N, Komiyama M, Kowa H, Tsuji S und Obata F** (2005). An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann Neurol* **57**: 918-921.
- Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, Heales S, Ganguly M, Parsons L, Lees AJ, Latchman DS, Holton JL, Wood NW und Revesz T** (2006). PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* **129**: 1720-1731.
- Ganz J, Lev N, Melamed E, Offen D** (2011). Cell replacement therapy for Parkinson's disease: how close are we to the clinic? *Expert Rev Neurother* **11**: 1325-1339.
- Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznoi B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD** (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* **18**: 262-265.
- Geisler S, Holmström KM, Treis A, Skujat D, Weber SS, Fiesel FC, Kahle PJ, Springer W** (2010). The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* **6**: 871-878.
- Gerhard A** (2003). Dopamin-Transporter-SPECT, Fluoro-Dopa-PET Klinische und experimentelle Anwendung; Möglichkeiten und Grenzen 2002. In: **Oertel WH** (Herausgeber) (2003). Neuropathologie des Parkinson-Syndroms und neue Entwicklungen in der Therapie. 13. Frankfurter Parkinson Symposium vom 28.2.-1.3.2002, *Editiones Roche, Basel/Grenzach-Wyhlen*, ISBN 3-88878-110-8. S.181-187.
- Gerlach M, Reichmann H, Riederer P** (2007a). Klinik. In: **Gerlach M, Reichmann H, Riederer P** (2007). Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie. *Springer-Verlag, Wien, New York*, 4.Auflage. ISBN 978-3-211-48307-7. S.1-37.
- Gerlach M, Reichmann H, Riederer P** (2007b). Präklinische und klinische Pharmakologie und Wirkungsmechanismen von Anti-Parkinson-

- Medikamenten. In: **Gerlach M, Reichmann H, Riederer P** (2007). Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie. *Springer-Verlag, Wien, New York*, 4.Auflage, ISBN 978-3-211-48307-7. S.81-104.
- Gerlach M, Reichmann H, Riederer P** (2007c). Tiermodelle der Parkinson-Krankheit. In: **Gerlach M, Reichmann H, Riederer P** (2007). Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie. *Springer-Verlag, Wien, New York*, 4.Auflage, ISBN 978-3-211-48307-7. S.105-136.
- Gerlach M, Reichmann H, Riederer P** (2007d). Hypothesen zur molekularen und zellulären Pathogenese der Parkinson-Krankheit. In: **Gerlach M, Reichmann H, Riederer P** (2007). Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie. *Springer-Verlag, Wien, New York*, 4.Auflage, ISBN 978-3-211-48307-7. S.137-163.
- Goldwurm S, Zini M, Mariani L, Tesei S, Miceli R, Sironi F, Clementi M, Bonifati V, Pezzoli G** (2007). Evaluation of LRRK2 G2019S penetrance: relevance for genetic counseling in Parkinson disease. *Neurology* **68**: 1141-1143.
- Goswami AV, Samaddar M, Sinha D, Purushotham J, D'Silva P** (2012). Enhanced J-protein interaction and compromised protein stability of mtHsp70 variants lead to mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **21**: 3317-3332.
- Greffard S, Verny M, Bonnet AM, Beinis JY, Gallinari C, Meaume S, Piette F, Hauw JJ, Duyckaerts C** (2006). Motor score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a good predictor of Lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra. *Arch Neurol* **63**: 584-588.
- Gregory A, Polster BJ, Hayflick SJ** (2009). Clinical and genetic delineation of neurodegeneration with brain iron accumulation. *J Med Genet* **46**: 73-80.
- Grimes DA, Han F, Panisset M, Racacho L, Xiao F, Zou R, Westaff K, Bulman DE** (2006). Translated mutation in the Nurr1 gene as a cause for Parkinson's disease. *Mov Disord* **21**: 906-909.
- Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M** (1999). A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* **105**: 72-78.
- Grünewald A, Voges L, Rakovic A, Kasten M, Vandebona H, Hemmelmann C, Lohmann K, Orolicki S, Ramirez A, Schapira AH, Pramstaller PP, Sue CM, Klein C** (2010). Mutant Parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts. *PLoS One* **5**: e12962.
- Grünewald A, Kasten M, Ziegler A, Klein C** (2013). Next-generation phenotyping using the parkin example: time to catch up with genetics. *JAMA Neurol* **70**: 1186-1191.
- Hajóczky G und Hoek JB** (2007). Cell signaling. Mitochondrial longevity pathways. *Science* **315**: 607-609.
- Hampshire DJ, Roberts E, Crow Y, Bond J, Mubaidin A, Wriekat AL, Al-Din A und Woods CG** (2001). Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal

- degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia maps to 1p36. *J Med Genet* **38**: 680-682.
- Hao LY, Giasson BI, Bonini NM** (2010). DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9747-9752.
- 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 und Hattori N** (2004). Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* **56**: 424-427.
- Hecker KH und Roux KH** (1996). High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* **20**: 478-485.
- Hering R, Petrovic S, Mietz EM, Holzmann C, Berg D, Bauer P, Voitalla D, Müller T, Berger K, Krüger R, Riess O** (2004a). Extended mutation analysis and association studies of Nurr1 (NR4A2) in Parkinson disease. *Neurology* **62**: 1231-1232.
- 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 und Riess O** (2004b). Novel homozygous p.E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7). *Hum Mutat* **24**: 321-329.
- Hicks AA, Pétursson H, Jónsson T, Stefánsson H, Jóhannsdóttir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefánsson K und Sveinbjörnsdóttir S** (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* **52**: 549-555.
- Holzmann C, Krüger R, Saecker AM, Schmitt I, Schöls L, Berger K, Riess O** (2003). Polymorphisms of the alpha-synuclein promoter: expression analyses and association studies in Parkinson's disease. *J Neural Transm* **110**: 67-76.
- Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B** (2003). Organe. In: **Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B** (2003). Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, 2.Auflage, ISBN 3-13-130882-6. S.433-579.
- Irrcher I, Aleyasin H, Seifert EL, Hewitt SJ, Chhabra S, Phillips M, Lutz AK, Rousseaux MW, Bevilacqua L, Jahani-Asl A, Callaghan S, MacLaurin JG, Winklhofer KF, Rizzu P, Rippstein P, Kim RH, Chen CX, Fon EA, Slack RS, Harper ME, McBride HM, Mak TW, Park DS** (2010). Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Hum Mol Genet* **19**: 3734-3746.
- Jacobsen KX, MacDonald H, Lemonde S, Daigle M, Grimes DA, Bulman DE, Albert PR** (2008). A Nurr1 point mutant, implicated in Parkinson's disease, uncouples ERK1/2-dependent regulation of tyrosine hydroxylase transcription. *Neurobiol Dis* **29**: 117-122.

- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH** (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 2173-2177.
- Jin J, Meredith GE, Chen L, Zhou Y, Xu J, Shie FS, Lockhart P, Zhang J** (2005). Quantitative proteomic analysis of mitochondrial proteins: relevance to Lewy body formation and Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* **134**: 119-138.
- Jin J, Hulette C, Wang Y, Zhang T, Pan C, Wadhwa R, Zhang J** (2006). Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75: relevance to Parkinson disease. *Mol Cell Proteomics* **5**: 1193-1204.
- Jin J, Li GJ, Davis J, Zhu D, Wang Y, Pan C, Zhang J** (2007). Identification of novel proteins associated with both alpha-synuclein and DJ-1. *Mol Cell Proteomics* **6**: 845-859.
- Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC** (1999). Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem* **45**: 1133-1140.
- Jones JM, Datta P, Srinivasula SM, Ji W, Gupta S, Zhang Z, Davies E, Hajnoczky G, Saunders TL, Van Keuren ML, Fernandes-Alnemri T, Meisler MH und Alnemri ES** (2003). Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature* **425**: 721-727.
- Jost W** (2008a). Grundlagen. In: **Jost W** (2008). Therapie des idiopathischen Parkinsonsyndroms. *UNI-MED Verlag AG, Bremen*, 5.Auflage, ISBN 978-3-8374-2064-7. S.18-21.
- Jost W** (2008b). Operative Verfahren. In: **Jost W** (2008). Therapie des idiopathischen Parkinsonsyndroms. *UNI-MED Verlag AG, Bremen*, 5.Auflage, ISBN 978-3-8374-2064-7. S.98-99.
- Jost W** (2008c). Autonome Regulationsstörungen beim Parkinson-Syndrom. In: **Jost W** (2008). Therapie des idiopathischen Parkinsonsyndroms. *UNI-MED Verlag AG, Bremen*, 5.Auflage, ISBN 978-3-8374-2064-7. S.122-138.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Müller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, Okochi M, Leimer U, van der Putten H, Probst A, Kremmer E, Kretschmar HA und Haass C** (2000). Subcellular Lokalisation of Wild-Type and Parkinson's Disease-Associated Mutant  $\alpha$ -Synuclein in Human and Transgenic Mouse Brain. *J Neurosci* **20**: 6365-6373.
- Karamohamed S, DeStefano AL, Wilk JB, Shoemaker CM, Golbe LI, Mark MH, Lazzarini AM, Suchowersky O, Labelle N, Guttman M, Currie LJ, Wooten GF, Stacy M, Saint-Hilaire M, Feldman RG, Sullivan KM, Xu G, Watts R, Growdon J, Lew M, Waters C, Vieregge P, Pramstaller PP, Klein C, Racette BA, Perlmutter JS, Parsian A, Singer C, Montgomery E, Baker K, Gusella JF, Fink SJ, Myers RH, Herbert A; GenePD study**

- (2003). A haplotype at the PARK3 locus influences onset age for Parkinson's disease: the GenePD study. *Neurology* **61**: 1557-1561.
- Kaul SC, Wadhwa R, Komatsu Y, Sugimoto Y, Mitsui Y** (1993). On the cytosolic and perinuclear mortalin: an insight by heat shock. *Biochem Biophys Res Commun* **193**: 348-355.
- Kaul SC, Duncan EL, Englezou A, Takano S, Reddel RR, Mitsui Y, Wadhwa R** (1998). Malignant transformation of NIH3T3 cells by overexpression of mot-2 protein. *Oncogene* **17**: 907-911.
- Kaul SC, Yaguchi T, Taira K, Reddel RR, Wadhwa R** (2003). Overexpressed mortalin (mot-2)/mthsp70/GRP75 and hTERT cooperate to extend the in vitro lifespan of human fibroblasts. *Exp Cell Res* **286**: 96-101.
- Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R** (2007). Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. *Exp Gerontol* **42**: 263-274.
- Kaul SC, Reddelb RR, Sugiharac T, Mitsui Y, Wadhwa R** (2000). Inactivation of p53 and life span extension of human diploid fibroblasts by mot-2. *FEBS Lett* **474**: 159-164.
- Kieper N, Holmström KM, Ciceri D, Fiesel FC, Wolburg H, Ziviani E, Whitworth AJ, Martins LM, Kahle PJ, Krüger R** (2010). Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor OPA1. *Exp Cell Res* **316**: 1213-1224.
- Kim Y, Park J, Kim S, Song S, Kwon SK, Lee SH, Kitada T, Kim JM, Chung J** (2008). PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **377**: 975-980.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N** (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**: 605-608.
- Klein B, Weirich G, Brauch H** (2001). DHPLC-based germline mutation screening in the analysis of the VHL tumor suppressor gene: usefulness and limitations. *Hum Genet* **108**: 376-384.
- Klein C, Pramstaller PP, Kis B, Page CC, Kann M, Leung J, Woodward H, Castellan CC, Scherer M, Vieregge P, Breakefield XO, Kramer PL, Ozelius LJ** (2000). Parkin deletions in a family with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype. *Ann Neurol* **48**: 65-71.
- Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE** (2007a). Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol* **6**: 652-662.
- Klein C und Schlossmacher MG** (2007b). Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder. *Neurology* **69**: 2093-2104.
- Kleiner-Fisman G, Fisman DN, Sime E, Saint-Cyr JA, Lozano AM und Lang AE** (2003). Long-term follow up of bilateral deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in patients with advanced Parkinson disease. *J Neurosurg* **99**: 489-495.

- Knott AB und Bossy-Wetzel E** (2008). Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* **1147**: 283-292.
- Koller WC, Pahwa R, Lyons KE, Albanese A** (1999). Surgical treatment of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **167**: 1-10.
- Korbie DJ und Mattick JS** (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* **3**: 1452-1456.
- Krebiehl G, Ruckerbauer S, Burbulla LF, Kieper N, Maurer B, Waak J, Wolburg H, Gizatullina Z, Gellerich FN, Voitalla D, Riess O, Kahle PJ, Proikas-Cezanne T, Krüger R** (2010). Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS One* **5**: e9367.
- Krüger R, Kuhn W, Muller T, Voitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L und Riess O** (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* **18**: 106-108.
- Krüger R, Hardt C, Tschentscher F, Jackel S, Kuhn W, Muller T, Werner J, Voitalla D, Berg D, Kuhn N, Fuchs GA, Santos EJ, Przuntek H, Epplen JT, Schols L und Riess O** (2000). Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm* **107**: 553-562.
- Krüger R, Fischer C, Schulte T, Strauss KM, Müller T, Voitalla D, Berg D, Hungs M, Gobbele R, Berger K, Epplen JT, Riess O, Schöls L** (2002). Mutation analysis of the neurofilament M gene in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **351**: 125-129.
- Krüger R** (2004). Parkinson disease, genetic types. *Orphanet Encyclopedia*. (<http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Parkinson.pdf> am 01.03.2011)
- Krüger R** (2005). Genetics of Parkinson's disease. In **Di Liegro I und Savettieri G** (2005). *Molecular Bases of Neurodegeneration. Research Signpost, Kerala*, ISBN 81-7736-261-5. S.1-19.
- Krüger R** (2008). LRRK2 in Parkinson's disease - drawing the curtain of penetrance: a commentary. *BMC Med* **6**: 33.
- Kuklin A, Munson K, Gjerde D, Haefele R, Taylor P** (1997-1998). Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system. *Genet Test* **1**: 201-206.
- Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Rinne UK** (1999). Changing epidemiology of Parkinson's disease in southwestern Finland. *Neurology* **52**: 302-308.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I** (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**: 979-980.
- Latourelle JC, Sun M, Lew MF, Suchowersky O, Klein C, Golbe LI, Mark MH, Growdon JH, Wooten GF, Watts RL, Guttman M, Racette BA, Perlmutter JS, Ahmed A, Shill HA, Singer C, Goldwurm S, Pezzoli G, Zini M, Saint-Hilaire MH, Hendricks AE, Williamson S, Nagle MW, Wilk**

- JB, Massood T, Huskey KW, Laramie JM, DeStefano AL, Baker KB, Itin I, Litvan I, Nicholson G, Corbett A, Nance M, Drasby E, Isaacson S, Burn DJ, Chinnery PF, Pramstaller PP, Al-hinti J, Moller AT, Ostergaard K, Sherman SJ, Roxburgh R, Snow B, Slevin JT, Cambi F, Gusella JF, Myers RH (2008).** The Gly2019Ser mutation in LRRK2 is not fully penetrant in familial Parkinson's disease: the GenePD study. *BMC Med* **6**: 32.
- Lautier C, Goldwurm S, Dürr A, Giovannone B, Tsiaras WG, Pezzoli G, Brice A, Smith RJ (2008).** Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **82**: 822-833.
- Lavedan C, Buchholtz S, Nussbaum RL, Albin RL, Polymeropoulos MH (2002).** A mutation in the human neurofilament M gene in Parkinson's disease that suggests a role for the cytoskeleton in neuronal degeneration. *Neurosci Lett* **322**: 57-61.
- Le W, Conneely OM, He Y, Jankovic J, Appel SH (1999).** Reduced Nurr1 expression increases the vulnerability of mesencephalic dopamine neurons to MPTP-induced injury. *J Neurochem* **73**: 2218-2221.
- Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK (2003).** Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* **33**: 85-89.
- Lee CS, Samii A, Sossi V, Ruth TJ, Schulzer M, Holden JE, Wudel J, Pal PK, de la Fuente-Fernandez R, Calne DB, Stoessl AJ (2000).** In vivo positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic dopaminergic nerve terminals in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **47**: 493-503.
- Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, Youle RJ, Cho H (2007).** Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* **282**: 22977-22983.
- 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 (1998).** The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* **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, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group, Bonnet AM, Borg M, Broussolle E, Damier P, Destée A, Martinez M, Penet C, Rasco O, Tison F, Tranchan C, Vérin M (2007).** LRRK2 exon 41 mutations in sporadic Parkinson disease in Europeans. *Arch Neurol* **64**: 425-430.
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honoré A, Rozas N, Pieri L, Madiona K, Dürr A, Melki R, Verny C, Brice A; for the French Parkinson's Disease Genetics (PDG) Study Group (2013).** G51D  $\alpha$ -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol*. 2013 Mar 22. doi: 10.1002/ana.23894. [Epub ahead of print]

- Levy YS, Stroomza M, Melamed E und Offen D** (2004). Embryonic and adult stem cells as a source for cell therapy in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* **24**: 353-386.
- Li HM, Niki T, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H** (2005). Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress. *Free Radic Res* **39**: 1091-1099.
- Liang CL, Wang TT, Luby-Phelps K, German DC** (2007). Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: implications for Parkinson's disease. *Exp Neurol* **203**: 370-380.
- Liu Q, D'Silva P, Walter W, Marszalek J, Craig EA** (2003). Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science* **300**: 139-141.
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z und Lansbury PT** (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* **111**:209–218.
- Liu Y, Liu W, Song XD, Zuo J** (2005). Effect of GRP75/mthsp70/PBP74/mortalin overexpression on intracellular ATP level, mitochondrial membrane potential and ROS accumulation following glucose deprivation in PC12 cells. *Mol Cell Biochem* **268**: 45-51.
- Logan DC** (2007). The mitochondrial compartment. *J Exp Bot* **58**: 1225-1243.
- Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y und Brice A** (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N Engl J Med* **342**: 1560-1567.
- Ma SY, Røyttä M, Rinne JO, Collan Y, Rinne UK** (1997). Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts. *J Neurol Sci* **151**: 83-87.
- Macario AJ, Cappello F, Zummo G, Conway de Macario E** (2010). Chaperonopathies of senescence and the scrambling of interactions between the chaperoning and the immune systems. *Ann N Y Acad Sci* **1197**: 85-93.
- Mandemakers W, Morais VA, De Strooper B** (2007). A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *J Cell Sci* **120**: 1707-1716.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM** (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* **461**: 747-753.
- Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Kruger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JP, de Andrade M, Rocca WA und das UCHL1 Global Genetics**

- Consortium** (2004). UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* **55**: 512-521.
- Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C; Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium** (2006). Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* **296**: 661-670.
- Marongiu R, Ferraris A, Ialongo T, Michiorri S, Soleti F, Ferrari F, Elia AE, Ghezzi D, Albanese A, Altavista MC, Antonini A, Barone P, Brusa L, Cortelli P, Martinelli P, Pellecchia MT, Pezzoli G, Scaglione C, Stanzione P, Tinazzi M, Zecchinelli A, Zeviani M, Cassetta E, Garavaglia B, Dallapiccola B, Bentivoglio AR, Valente EM; Italian PD Study Group** (2008). PINK1 heterozygous rare variants: prevalence, significance and phenotypic spectrum. *Hum Mutat* **29**: 565.
- Martinez M, Brice A, Vaughan JR, Zimprich A, Breteler MM, Meo G, Filla A, Farrer MJ, Bétard C, Hardy J, De Michele G, Bonifati V, Oostra B, Gasser T, Wood NW, Dürr A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease** (2004). Genome-wide scan linkage analysis for Parkinson's disease: the European genetic study of Parkinson's disease. *J Med Genet* **41**: 900-907.
- Martins LM, Morrison A, Klupsch K, Fedele V, Moiso N, Teismann P, Abuin A, Grau E, Geppert M, Livi GP, Creasy CL, Martin A, Hargreaves I, Heales SJ, Okada H, Brandner S, Schulz JB, Mak T, Downward J** (2004). Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* **24**: 9848-9862.
- 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, Schöls L, Schulz JB, Riess O, Krüger R** (2003). Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **12**: 1223-1231.
- Mata IF, Lockhart PJ, Farrer MJ** (2004). Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **13** Spec No 1: R127-133.
- Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, Kimura M, Komatsu M, Hattori N, Tanaka K** (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* **189**: 211-221.
- McCoy MK und Cookson MR** (2011). DJ-1 regulation of mitochondrial function and autophagy through oxidative stress. *Autophagy* **7**: 531-532.

- Miller DW, Hague SM, Clarimon J, Baptista M, Gwinn-Hardy K, Cookson MR und Singleton AB** (2004). Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* **62**: 1835-1838.
- Miller SA, Dykes DD und Polesky HF** (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215.
- Mülhardt C** (2006a). Das Werkzeug. In: **Mülhardt C** (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin*, 5.Auflage, ISBN 3-8274-1714-7. S.46-79.
- Mülhardt C** (2006b). Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: **Mülhardt C** (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin*, 5.Auflage, ISBN 3-8274-1714-7. S.80-116.
- Mülhardt C** (2006c). DNA-Analyse. in: **Mülhardt C** (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin*, 5. Auflage, ISBN 3-8274-1714-7. S.183-204.
- Müller T** (2005a). Klinische Symptome. In: **Müller T** (2005). *Medikamentöse Therapie des Morbus Parkinson. UNI-MED Verlag AG, Bremen*, 3.Auflage, ISBN 3-89599-864-8. S.14-16.
- Müller T** (2005b). Diagnose. In: **Müller T** (2005). *Medikamentöse Therapie des Morbus Parkinson. UNI-MED Verlag AG, Bremen*, 3.Auflage, ISBN 3-89599-864-8. S.22-30.
- Müller T** (2005c). Medikamentöse Therapie. In: **Müller T** (2005). *Medikamentöse Therapie des Morbus Parkinson. UNI-MED Verlag AG, Bremen*, 3.Auflage, ISBN 3-89599-864-8. S.42-108.
- Mullis KB und Faloona FA** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ** (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183**: 795-803.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ** (2009). Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy* **5**: 706-708.
- Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ** (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* **8**: e1000298.
- Narendra DP und Youle RJ** (2011). Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control. *Antioxid Redox Signal* **14**: 1929-1938.
- Ng PC und Kirkness EF** (2010). Whole genome sequencing. *Methods Mol Biol* **628**: 215-226.
- Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, Shaffer T, Wong M, Bhattacharjee A, Eichler EE, Bamshad M, Nickerson DA,**

- Shendure J** (2009). Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* **461**: 272-276.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE** (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* **36**: 2503-2508.
- Niquet J, Seo DW, Wasterlain CG** (2006). Mitochondrial pathways of neuronal necrosis. *Biochem Soc Trans* **34**: 1347-1351.
- 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** (2006). Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **59**: 298-309.
- O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P** (1998). Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* **52**: 44-49.
- Oefner PJ und Huber CG** (2002). A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **782**: 27-55.
- Oefner PJ und Underhill PA** (1995). Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* **57**: 1547.
- Olanow CW, Rascol O, Hauser R, Feigin PD, Jankovic J, Lang A, Langston W, Melamed E, Poewe W, Stocchi F, Tolosa E; ADAGIO Study Investigators** (2009). A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease. *N Engl J Med* **361**: 1268-1278.
- Oliveira SA, Scott WK, Martin ER, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Ondo WG, Allen FH Jr, Scott BL, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, Zhang F, Booze MW, Winn MP, Middleton LT, Haines JL, Pericak-Vance MA und Vance JM** (2003). Parkin mutations and susceptibility alleles in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* **53**: 624-629.
- Oliveri RL, Zappia M, Annesi G, Bosco D, Annesi F, Spadafora P, Pasqua AA, Tomaino C, Nicoletti G, Pirritano D, Labatte A, Gambardella A, Logroscino G, Manobianca G, Epifanio A, Morgante L, Savettiri G und Quattrone A** (2001). The parkin gene is not involved in late-onset Parkinson's disease. *Neurology* **57**: 359-362.
- Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW, Hardy J, Houlden H, Singleton A, Schneider SA** (2009). Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* **65**: 19-23.

- Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J** (2008). The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain* **131**: 1969-1978.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter CI, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T und die Parkinson Study Group** (2002). Genome Screen to Identify Susceptibility Genes for Parkinson Disease in a Sample without *parkin* Mutations. *Am J Hum Genet* **71**: 124-135.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T, Parkinson Study Group** (2003a). Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet* **72**: 1053-1057.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter CI, Murrell J, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T und die Parkinson Study Group** (2003b). Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet* **12**: 2599-2608.
- Pankratz N, Uniacke SK, Halter CA, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T, Nichols WC; Parkinson Study Group** (2004). Genes influencing Parkinson disease onset: replication of PARK3 and identification of novel loci. *Neurology* **62**: 1616-1618.
- Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim JM, Chung J** (2006). Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* **441**: 1157-1161.
- Paulus W** (2002). Systematrophien. In: **Peiffer J, Schröder JM, Paulus W** (2002). Neuropathologie: morphologische Diagnostik der Krankheiten des Nervensystems und der Skelettmuskulatur. *Springerverlag Berlin, Heidelberg, New York*, 3.Auflage, ISBN 3-540-41333-2. S.271-300.
- Perlmann T und Wallén-Mackenzie A** (2004). Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell Tissue Res* **318**: 45-52.
- 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** (2007). The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol* **9**: 1243-1252.
- Poewe W und Wenning G** (2002). The differential diagnosis of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* **9** Suppl 3: 23-30.
- 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** (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* **274**: 1197-1199.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM,**

- Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL** (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**: 2045-2047.
- Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ** (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 1638-1643.
- Pramstaller PP, König G, Leenders K, Kann M, Hedrich K, Vieregge P, Goetz CG und Klein C** (2002). Parkin mutations in a patient with hemiparkinsonism-hemiatrophy: A clinical-genetic and PET study. *Neurology* **58**: 808-810.
- Preynat-Seauve O, Burkhard PR, Villard J, Zingg W, Ginovart N, Feki A, Dubois-Dauphin M, Hurst SA, Mauron A, Jaconi M, Krause KH** (2009). Pluripotent stem cells as new drugs? The example of Parkinson's disease. *Int J Pharm* **381**: 113-121.
- Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L** (2007). PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol* **5**: e172.
- Radke S, Chander H, Schäfer P, Meiss G, Krüger R, Schulz JB, Germain D** (2008). Mitochondrial protein quality control by the proteasome involves ubiquitination and the protease Omi. *J Biol Chem* **283**: 12681-12685.
- Rakovic A, Grünewald A, Voges L, Hofmann S, Orolicki S, Lohmann K, Klein C** (2011). PINK1-Interacting Proteins: Proteomic Analysis of Overexpressed PINK1. *Parkinsons Dis* **2011**: 153979.
- 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 und Kubisch C** (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* **38**: 1184-1191.
- Ran Q, Wadhwa R, Kawai R, Kaul SC, Sifers RN, Bick RJ, Smith JR, Pereira-Smith OM** (2000). Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochem Biophys Res Commun* **275**: 174-179.
- Raymond M und Rousset F** (1995). Genepop (version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered* **86**: 248-249.
- Rehling P, Brandner K, Pfanner N** (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 519-530.
- Reichmann H und Riederer P** (1989). Biochemical analyses of respiratory chain enzymes in different brain regions of patients with Parkinson's disease. BMFT Symposium "Morbus Parkinson und andere Basalganglienerkrankungen", Bad Kissingen (Abstracts S.44).
- Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF, Schöndorf DC, Wagner L, Glatza M, Höing S, Hargus G, Heck SA, Dhingra A, Wu G, Müller S, Brockmann K, Kluba T, Maisel M, Krüger R, Berg D, Tsytsyura Y, Thiel CS, Psathaki**

- OE, Klingauf J, Kuhlmann T, Klewin M, Müller H, Gasser T, Schöler HR, Sternecker J** (2013). Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell* **12**: 354-367.
- Ribeiro CS, Carneiro K, Ross CA, Menezes JR, Engelender S** (2002). Synphilin-1 is developmentally localized to synaptic terminals, and its association with synaptic vesicles is modulated by alpha-synuclein. *J Biol Chem* **277**: 23927-23933.
- Richardson JR, Caudle WM, Guillot TS, Watson JL, Nakamaru-Ogiso E, Seo BB, Sherer TB, Greenamyre JT, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Miller GW** (2007). Obligatory role for complex I inhibition in the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol Sci* **95**: 196-204.
- Rosemann M, Ivashkevich A, Favor J, Dalke C, Hölter SM, Becker L, Rácz I, Bolle I, Klempt M, Rathkolb B, Kalaydjiev S, Adler T, Aguilar A, Hans W, Horsch M, Rozman J, Calzada-Wack J, Kunder S, Naton B, Gailus-Durner V, Fuchs H, Schulz H, Beckers J, Busch DH, Burbach JP, Smidt MP, Quintanilla-Martinez L, Esposito I, Klopstock T, Klingenspor M, Ollert M, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, de Angelis MH, Atkinson M, Heinzmann U, Graw J** (2010). Microphthalmia, parkinsonism, and enhanced nociception in Pitx3 ( 416insG ) mice. *Mamm Genome* **21**: 13-27.
- Rothfuss O, Fischer H, Hasegawa T, Maisel M, Leitner P, Miesel F, Sharma M, Bornemann A, Berg D, Gasser T, Patenge N** (2009). Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Hum Mol Genet* **18**: 3832-3850.
- Salach JI, Singer TP, Castagnoli N Jr, Trevor A** (1984). Oxidation of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) by monoamine oxidases A and B and suicide inactivation of the enzymes by MPTP. *Biochem Biophys Res Commun* **125**: 831-835.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sanjuán Szklarz LK, Guiard B, Rissler M, Wiedemann N, Kozjak V, van der Laan M, Lohaus C, Marcus K, Meyer HE, Chacinska A, Pfanner N, Meisinger C** (2005). Inactivation of the mitochondrial heat shock protein zim17 leads to aggregation of matrix hsp70s followed by pleiotropic effects on morphology and protein biogenesis. *J Mol Biol* **351**: 206-218.
- Sano I, Gamo T, Kakimoto Y, Taniguchi K, Takesada M, Nishinuma K** (1959). Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochim Biophys Acta* **32**: 586-587.
- Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T** (2009). Genome-wide

association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genet* **41**: 1303-1307.

- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD** (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* **54**: 823-827.
- Schapira AH** (1999). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **5**: 139-143.
- Schiesling C, Kieper N, Seidel K, Krüger R** (2008). Review: Familial Parkinson's disease--genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **34**: 255-271.
- 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** (2002). Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* **160**: 1655-1667.
- Schneider HC, Berthold J, Bauer MF, Dietmeier K, Guiard B, Brunner M, Neupert W** (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* **371**: 768-774.
- Schneider SA, Paisan-Ruiz C, Quinn NP, Lees AJ, Houlden H, Hardy J, Bhatia KP** (2010). ATP13A2 mutations (PARK9) cause neurodegeneration with brain iron accumulation. *Mov Disord* **25**: 979-984.
- Scholz SW, Houlden H, Schulte C, Sharma M, Li A, Berg D, Melchers A, Paudel R, Gibbs JR, Simon-Sanchez J, Paisan-Ruiz C, Bras J, Ding J, Chen H, Traynor BJ, Arepalli S, Zonozi RR, Revesz T, Holton J, Wood N, Lees A, Oertel W, Wüllner U, Goldwurm S, Pellecchia MT, Illig T, Riess O, Fernandez HH, Rodriguez RL, Okun MS, Poewe W, Wenning GK, Hardy JA, Singleton AB, Del Sorbo F, Schneider S, Bhatia KP, Gasser T** (2009). SNCA variants are associated with increased risk for multiple system atrophy. *Ann Neurol* **65**: 610-614.
- Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D** (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* **7**: 575-576.
- Schwarzer S** (2000). DHPLC spürt DNA-Mutationen auf. *LaborPraxis* **10**: 28-30.
- Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Masterman D, Mastaglia F, Laing NG, Stajich JM, Slotterbeck B, Booze MW, Ribble RC, Rampersaud E, West SG, Gibson RA, Middleton LT, Roses AD, Haines JL, Scott BL, Vance JM, Pericak-Vance MA** (2001). Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes. *JAMA* **286**: 2239-2244.

- Sharma M, Maraganore DM, Ioannidis JP, Riess O, Aasly JO, Annesi G, Abahuni N, Bentivoglio AR, Brice A, Van Broeckhoven C, Chartier-Harlin MC, Destée A, Djarmati A, Elbaz A, Farrer M, Ferrarese C, Gibson JM, Gispert S, Hattori N, Jasinska-Myga B, Klein C, Lesage S, Lynch T, Lichtner P, Lambert JC, Lang AE, Mellick GD, De Nigris F, Opala G, Quattrone A, Riva C, Rogaeva E, Ross OA, Satake W, Silburn PA, Theuns J, Toda T, Tomiyama H, Uitti RJ, Wirdefeldt K, Wszolek Z, Gasser T, Krüger R; Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease Consortium (2011).** Role of sepiapterin reductase gene at the PARK3 locus in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **32**: 2108.e1-5.
- Shi M, Jin J, Wang Y, Beyer RP, Kitsou E, Albin RL, Gearing M, Pan C, Zhang J (2008).** Mortalin: a protein associated with progression of Parkinson disease? *J Neuropathol Exp Neurol* **67**: 117-124.
- Shiba K, Arai T, Sato S, Kubo S, Ohba Y, Mizuno Y, Hattori N (2009).** Parkin stabilizes PINK1 through direct interaction. *Biochem Biophys Res Commun* **383**: 331-335.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000).** Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* **25**: 302-305.
- Shojaee S, Sina F, Banihosseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi GA, Fakhrai-Rad H, Ronaghi M, Elahi E (2008).** Genome-wide linkage analysis of a parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *Am J Hum Genet* **82**: 1375-1384.
- Shulman LM (2007).** Gender differences in Parkinson's disease. *Genet Med* **4**: 8-18.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, Chen CM, Clark LN, Condroyer C, De Marco EV, Dürr A, Eblan MJ, Fahn S, Farrer MJ, Fung HC, Gan-Or Z, Gasser T, Gershoni-Baruch R, Giladi N, Griffith A, Gurevich T, Januario C, Kropp P, Lang AE, Lee-Chen GJ, Lesage S, Marder K, Mata IF, Mirelman A, Mitsui J, Mizuta I, Nicoletti G, Oliveira C, Ottman R, Orr-Urtreger A, Pereira LV, Quattrone A, Rogaeva E, Rolfs A, Rosenbaum H, Rozenberg R, Samii A, Samaddar T, Schulte C, Sharma M, Singleton A, Spitz M, Tan EK, Tayebi N, Toda T, Troiano AR, Tsuji S, Wittstock M, Wolfsberg TG, Wu YR, Zabetian CP, Zhao Y, Ziegler SG (2009).** Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* **361**: 1651-1661.
- Simón-Sánchez J und Singleton AB (2008).** Sequencing analysis of OMI/HTRA2 shows previously reported pathogenic mutations in neurologically normal controls. *Hum Mol Genet* **17**: 1988-1993.
- Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Krüger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR,**

- Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T** (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature Genet* **41**: 1308-1312.
- Singer TP, Salach JI, Castagnoli N Jr, Trevor A** (1986). Interactions of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine with monoamine oxidases. *Biochem J* **235**: 785-789.
- Singleton A** (2004). What does PINK1 mean for Parkinson diseases? *Neurology* **63**: 1350-1351.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blacato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K** (2003). Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **302**: 841.
- Slater MR und Craig EA** (1987). Transcriptional regulation of an hsp70 heat shock gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**: 1906-1916.
- Sleiman PM, Healy DG, Muqit MM, Yang YX, Van Der Brug M, Holton JL, Revesz T, Quinn NP, Bhatia K, Diss JK, Lees AJ, Cookson MR, Latchman DS, Wood NW** (2009). Characterisation of a novel NR4A2 mutation in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett* **457**: 75-79.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA** (2005). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18676-18681.
- Snow BJ, Tooyama I, McGeer EG, Yamada T, Calne DB, Takahashi H und Kimura H.** (1993). Human positron emission tomographic [<sup>18</sup>F] fluorodopa studies correlate with dopamine cell counts and levels. *Ann Neurol* **34**: 324.
- Snow BJ** (1996). Fluorodopa PET scanning in Parkinson's disease. *Adv Neurol* **69**: 449-457.
- Söti C und Csermely P** (2002). Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochem Int* **41**: 383-389.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R und Goedert M** (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**: 839-840.
- Strachan T und Read AP** (2005a). DNA-Amplifizierung: PCR und DNA-Klonierung auf Zellbasis. In **Strachan T und Read AP** (2005). Molekulare Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford*, 3.Auflage, ISBN 3-8274-1493-8. S.141-180.
- Strachan T und Read AP** (2005b). Analyse von DNA und Genstruktur, Variation und Expression. In **Strachan T und Read AP** (2005). Molekulare

- Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford*, 3.Auflage, ISBN 3-8274-1493-8. S.209-234.
- Strachan T und Read AP** (2005c). Genomprojekte und Modellorganismen. In **Strachan T und Read AP** (2005). Molekulare Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford*, 3.Auflage, ISBN 3-8274-1493-8. S.237-274.
- Strachan T und Read AP** (2005d). Genetische Kartierung mendelnder Merkmale. In **Strachan T und Read AP** (2005). Molekulare Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford*, 3.Auflage, ISBN 3-8274-1493-8. S.461-482.
- Strachan T und Read AP** (2005e). Identifizierung menschlicher Krankheitsgene. In **Strachan T und Read AP** (2005). Molekulare Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford*, 3.Auflage, ISBN 3-8274-1493-8. S.483-506.
- Strachan T und Read AP** (2005f). Kartierung und Bestimmung von Genen, die eine Anfälligkeit für komplexe Krankheiten verursachen. In **Strachan T und Read AP** (2005). Molekulare Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford*, 3.Auflage, ISBN 3-8274-1493-8. S.507-541.
- 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 und Kruger R** (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **14**: 2099-2111.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K und Takahashi R** (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**: 613-621.
- Tain LS, Chowdhury RB, Tao RN, Plun-Favreau H, Moiso N, Martins LM, Downward J, Whitworth AJ, Tapon N** (2009). Drosophila HtrA2 is dispensable for apoptosis but acts downstream of PINK1 independently from Parkin. *Cell Death Differ* **16**: 1118-1125.
- Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Arigo SM, Takahashi K und Ariga H** (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* **5**: 213-218.
- Takano S, Wadhwa R, Yoshii Y, Nose T, Kaul SC, Mitsui Y** (1997). Elevated levels of mortalin expression in human brain tumors. *Exp Cell Res* **237**: 38-45.
- Tan EK, Chung H, Chandran VR, Tan C, Shen H, Yew K, Pavanni R, Puvan KA, Wong MC, Teoh ML, Yih Y, Zhao Y** (2004). Nurr1 mutational screen in Parkinson's disease. *Mov Disord* **19**: 1503-1505.
- Tatsuta T und Langer T** (2008). Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J* **27**: 306-314.
- Thal DR, Del Tredici K, Braak H** (2004). Neurodegeneration in normal brain aging and disease. *Sci Aging Knowledge Environ* **2004**: pe26.

- Thomas KJ, McCoy MK, Blackinton J, Beilina A, van der Brug M, Sandebring A, Miller D, Maric D, Cedazo-Minguez A, Cookson MR** (2011). DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Hum Mol Genet* **20**: 40-50.
- Tornqvist N, Hermanson E, Perlmann T, Stromberg I** (2002). Generation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in ventral mesencephalic tissue of Nurr1 deficient mice. *Brain Res Dev Brain Res* **133**: 37-47.
- Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Albanese A, Wood NW** (2001). Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* **68**: 895-900.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW** (2004a). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**: 1158-1160.
- Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B, Bentivoglio AR** (2004b). PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* **56**: 336-341.
- van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ, Testers L, Breedveld GJ, Horstink M, Sandkuijl LA, van Swieten JC, Oostra BA, Heutink P** (2001). PARK7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* **69**: 629-634.
- Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ und Vaux DL** (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* **277**: 445-454.
- Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM, Lincoln SJ, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Wilhoite GJ, Bacon JA, Behrouz B, Melrose HL, Hentati E, Puschmann A, Evans DM, Conibear E, Wasserman WW, Aasly JO, Burkhard PR, Djaldetti R, Ghika J, Hentati F, Krygowska-Wajs A, Lynch T, Melamed E, Rajput A, Rajput AH, Solida A, Wu RM, Uitti RJ, Wszolek ZK, Vingerhoets F, Farrer MJ** (2011). VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **89**: 162-167.
- Voos W und Röttgers K** (2002). Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 51-62.
- Wadhwa R, Kaul SC, Ikawa Y, Sugimoto Y** (1993). Identification of a novel member of mouse hsp70 family. Its association with cellular mortal phenotype. *J Biol Chem* **268**: 6615-6621.

- Wadhwa R, Pereira-Smith OM, Reddel RR, Sugimoto Y, Mitsui Y, Kaul SC** (1995). Correlation between complementation group for immortality and the cellular distribution of mortalin. *Exp Cell Res* **216**: 101-106.
- Wagner I, Arlt H, van Dyck L, Langer T, Neupert W** (1994). Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J* **13**: 5135-5145.
- Wahl C, Kautzmann S, Krebiehl G, Strauss K, Voitalla D, Müller T, Bauer P, Riess O, Krüger R** (2008). A comprehensive genetic study of the proteasomal subunit S6 ATPase in German Parkinson's disease patients. *J Neural Transm.* **115**: 1141-1148.
- Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H** (2000). Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **47**: 521-523.
- Wang Y, Chen S, Yang D, Le WD** (2007). Stem cell transplantation: a promising therapy for Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* **2**: 243-250.
- Webster TJ, Naylor DJ, Hartman DJ, Høj PB, Hoogenraad NJ** (1994). cDNA cloning and efficient mitochondrial import of pre-mtHSP70 from rat liver. *DNA Cell Biol* **13**: 1213-1220.
- Weihofen A, Thomas KJ, Ostaszewski BL, Cookson MR, Selkoe DJ** (2009). Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* **48**: 2045-2052.
- Wenning GK und Colosimo C** (2010). Diagnostic criteria for multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *Rev Neurol (Paris)* **166**: 829-833.
- Werner J** (1992). Biomathematik und Medizinische Statistik; eine praktische Anleitung für Studierende, Doktoranden, Ärzte und Biologen. *Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore*, 2.Auflage, ISBN 3-541-11422-3. S.87-90, 94, 224-231.
- West AB, Zimprich A, Lockhart PJ, Farrer M, Singleton A, Holtom B, Lincoln S, Hofer A, Hill L, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, Hardy J und Gasser T** (2001). Refinement of the PARK3 locus on chromosome 2p13 and the analysis of 14 candidate genes. *Eur J Hum Genet* **9**: 659-666.
- Wider C, Skipper L, Solida A, Brown L, Farrer M, Dickson D, Wszolek ZK, Vingerhoets FJ** (2008). Autosomal dominant dopa-responsive parkinsonism in a multigenerational Swiss family. *Parkinsonism Relat Disord* **14**: 465-470.
- Wintermeyer P, Krüger R, Kuhn W, Müller T, Voitalla D, Berg D, Becker G, Leroy E, Polymeropoulos M, Berger K, Przuntek H, Schöls L, Epplen JT, Riess O** (2000). Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients. *Neuroreport* **11**: 2079-2082.
- Xiao W und Oefner PJ** (2001). Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* **17**: 439-474.

- Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, Tang C, Xia K, Jiang W, Ronai Z, Zhuang X, Zhang Z** (2009). Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest* **119**: 650-660.
- Yaguchi T, Aida S, Kaul SC, Wadhwa R** (2007). Involvement of mortalin in cellular senescence from the perspective of its mitochondrial import, chaperone, and oxidative stress management functions. *Ann N Y Acad Sci* **1100**: 306-311.
- Yang H, Zhou X, Liu X, Yang L, Chen Q, Zhao D, Zuo J, Liu W** (2011). Mitochondrial dysfunction induced by knockdown of mortalin is rescued by Parkin. *Biochem Biophys Res Commun* **410**: 114-120.
- Yokoyama K, Fukumoto K, Murakami T, Harada S, Hosono R, Wadhwa R, Mitsui Y, Ohkuma S** (2002). Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75. *FEBS Lett* **516**: 53-57.
- Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N, Ogaki K, Li Y, Funayama M, Hashimoto T, Takashima S, Hattori N** (2010). Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. *Neurology* **75**: 1356-1361.
- Zarranz JJ, Alagre 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 und de Yébenes JG** (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* **55**: 153-156.
- Zhang L, Shimoji M, Thomas B, Moore DJ, Yu SW, Marupudi NI, Torp R, Torgner IA, Ottersen OP, Dawson TM, Dawson VL** (2005). Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet* **14**: 2063-2073.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T** (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **44**: 601-607.
- Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, Graf E, Eck SH, Offman MN, Haubenberger D, Spielberger S, Schulte EC, Lichtner P, Rossle SC, Klopp N, Wolf E, Seppi K, Pirker W, Presslauer S, Mollenhauer B, Katzenschlager R, Foki T, Hotzy C, Reinthaler E, Harutyunyan A, Kralovics R, Peters A, Zimprich F, Brücke T, Poewe W, Auff E, Trenkwalder C, Rost B, Ransmayr G, Winkelmann J, Meitinger T, Strom TM** (2011). A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **89**: 168-175.

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Hiermit erkläre ich, Carina Schelling, dass ich die Studie in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer Prof. Dr. med. Rejko Krüger konzipiert und die Versuche und Auswertungen selbstständig durchgeführt habe. Die in den Versuchen verwendete DNA der Patienten und Kontrollgruppe waren bereits in der Arbeitsgruppe Krüger vorhanden. Ebenso wurde die Datenrecherche selbstständig von mir durchgeführt.

## **Veröffentlichungen**

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

**Burbulla LF, Schelling C, Kato H, Rapaport D, Voitalla D, Schiesling C, Schulte C, Sharma M, Illig T, Bauer P, Jung S, Nordheim A, Schöls L, Riess O, Krüger R.** Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis. *Hum Mol Genet* **19**: 4437-4452.

## **Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Rejko Krüger. Nach Überlassung dieses interessanten Themas war er jederzeit ansprechbar und stand mit Rat und Tat zuverlässig zur Seite, sowohl im praktischen Teil als auch während der Schreibarbeit. Auch in langen Arbeitspausen hat er immer wieder nachgehakt und ist anschließend schnell wieder miteingestiegen. Er hat über die ganze Zeit nicht die Geduld mit mir verloren. Vielen Dank für Dein Engagement, Deine Geduld, Deine Ermutigungen, Deine fachlichen Anregungen sowie Korrekturen, und vieles mehr! Besser hätte die Betreuung nicht sein können!

Großer Dank gilt auch allen, die über die Zeit im Labor der AG Krüger des Hertie-Instituts gearbeitet haben. Vielen Dank Mira Lang, Carola Schiesling und Sabine Stortz für die ausführliche Einführung in das Laborleben und die Geduld bei den ständigen Nachfragen eines Labor-Neulings! Ebenso sollen Guido Krebiehl, Nicole Kieper, Brigitte Maurer und Lena Burbulla nicht unerwähnt bleiben, herzlichen Dank für die gute Zusammenarbeit!

Dem Team der Humangenetik in Tübingen (8.Stock) unter der Leitung von Prof. Dr. Olaf Riess und Dr. Peter Bauer danke ich für die Möglichkeit der Mitbenutzung des DHPLC-Gerätes, die gute Zusammenarbeit sowie die Unterstützung bei Etablierung, Durchführung und Auswertung des Screenings. Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Mann und meiner Familie bedanken, die mich begleitet, unterstützt, erinnert und ermutigt haben, das große Projekt Promotion doch noch zu Ende zu bringen.