

Aus dem Institut für Neurogenetik  
der Universität zu Lübeck  
Direktorin: Prof. Dr. med. Christine Klein

---

# Untersuchungen zur Identifizierung genetischer Ursachen des Parkinson-Syndroms

Inauguraldissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
aus der Medizinischen Fakultät

vorgelegt von  
Tobias Löchte  
aus Coesfeld

Lübeck 2017

1. Berichterstatterin:  
2. Berichterstatter:  
Tag der mündlichen Prüfung:  
Zum Druck genehmigt.

Prof. Dr. rer. nat. Katja Lohmann  
Prof. Dr. med. Wolfgang Heide  
15. November 2017  
Lübeck, den 15. November 2017

Promotionskommission der Sektion Medizin

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung und Fragestellung .....	1
1.1 Genetische Grundbegriffe .....	1
1.2 Das Parkinson-Syndrom .....	2
1.2.1 Morbus Parkinson .....	2
1.2.2 Genetische Parkinson-Syndrome .....	4
1.2.3 Das Parkinson-Kandidatengen <i>RAB39B</i> .....	10
1.3 Next-generation sequencing.....	11
1.4 Vorarbeiten .....	13
1.5 Fragestellung.....	13
2 Patienten, Material und Methoden .....	15
2.1 Patienten.....	15
2.1.1 Indexfamilien .....	15
2.1.2 Patienten- und Kontrollgruppen .....	21
2.2 Material .....	22
2.2.1 Chemikalien .....	22
2.2.2 Kits .....	22
2.2.3 Lösungen .....	23
2.2.4 Geräte .....	23
2.2.5 Software .....	24
2.3 Methoden .....	25
2.3.1 Probenvorbereitung für NGS .....	25
2.3.2 Mutationsanalyse bei Exom-Sequenzierung .....	26
2.3.3 Primerdesign .....	28
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.3.6 Sanger-Sequenzierung im ABI3130XL/3500XL-System.....	31
2.3.7 Analyse der Rohdaten .....	33
2.3.8 RNA-Extraktion .....	33
2.3.9 cDNA-Synthese.....	33

---

3	Ergebnisse .....	35
3.1	Monogenetische Ursachenforschung mittels NGS .....	35
3.1.1	Projekt 1: Biallelische Mutation im Gen <i>PLA2G6</i> bei Familie M mit früh beginnendem PS .....	35
3.1.2	Projekt 2: PS-Familie B .....	42
3.1.3	Projekt 3: Tremor-Familie G .....	48
3.1.4	Projekt 4: Diskordante Zwillingspaare .....	52
3.2	Projekt 5: Screening-Studie zum Parkinson-Gen <i>RAB39B</i> .....	53
4	Diskussion .....	57
5	Schlussfolgerungen .....	70
6	Zusammenfassung .....	71
7	Ausblick .....	72
	Literaturverzeichnis .....	73
	Anhang .....	88
	Verwendete Primer .....	88
	Danksagungen .....	91
	Eidesstattliche Erklärung .....	92

## Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
CADD	Combined Annotation Depended Depletion
CMS	Kongenitales Myasthenes Syndrom
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ExAC	Exome Aggregation Consortium
HCAD	Hirschsprung disease, cardiac defects and autonomic dysfunction
HPLC	high performance liquid chromatography
ID	intellectual disability
INAD	Infantile neuroaxonale Dystrophie
kb	Kilobasen (1000 Basen)
KRS	Kufor-Rakeb-Syndrom
MRT	Magnetresonanztomografie
MUT	Mutation
NAD	Neuroaxonale Dystrophie
NBIA	neurodegeneration with brain iron accumulation
NGS	next-generation sequencing
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PLAN	<i>PLA2G6</i> -assoziierte Neurodegeneration
PS	Parkinson-Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure
SNP	single nucleotide polymorphism
TBE	TRIS-Borat-EDTA
THS	Tiefe Hirnstimulation
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
WT	Wildtyp
XDP	X-chromosomal gekoppelter Dystonie-Parkinsonismus

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Loci genetischer Parkinson-Syndrome.....	5
Tab. 2: Klinische Angaben der Familienmitglieder .....	16
Tab. 3: Klinische Daten der Familie B. ....	17
Tab. 4: Übersicht über die Familienmitglieder der Familie G .....	19
Tab. 5: Klinische Daten zu Zwillingspaaren .....	20
Tab. 6: Reaktionsansatz der Standard-PCR.....	29
Tab. 7: Reaktionsansatz der optimierten PCR.....	30
Tab. 8: Reaktionsansatz der Sequenz-PCR .....	32
Tab. 9: Filterung der Exom-Datensätze der Familie M.....	36
Tab. 10: Gefundene Mutationen bei Familie M .....	37
Tab. 11: Übersicht über nach Literaturrecherche gefundene Fälle mit Mutationen im Gen <i>PLA2G6</i> und <i>post-mortem</i> Befunden .....	41
Tab. 12: Untersuchte Kandidatenvarianten bei Familie B .....	42
Tab. 13: Die für die Kandidatengene bei Fam. B detektierten Varianten der PS-Stichprobe.....	46
Tab. 14: Vergleich der Segregation der Mutationen rs104894299 ( <i>RAPSN</i> ) und rs34637584 ( <i>LRRK2</i> ) .....	47
Tab. 15: Kandidatenvarianten nach Exom-Sequenzierung .....	48
Tab. 16: Segregationsanalyse der Kandidatenvarianten bei Familie G.....	49
Tab. 17: Kandidatenvarianten bei Familie G.....	50
Tab. 18: Detektierte Varianten in der untersuchten PS-Stichprobe (Fam. G.).....	51
Tab. 19: Kandidatenvarianten bei Zwillingspaar L-3856/L-3857.....	52
Tab. 20: Kandidatenvarianten bei Zwillingspaar L-2893/L-2894.....	53
Tab. 21: Detektierte Varianten in Screening des Gens <i>RAB39B</i> .....	56
Tab. 22: Aktuelle Stärken und Limitierungen des NGS.....	59

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Spektrum der <i>PLA2G6</i> -assoziierten Neurodegeneration (PLAN).....	9
Abb. 2: Schematische Darstellung des Gens <i>RAB39B</i> .....	10
Abb. 3: Stammbaum der Indexfamilie M.....	16
Abb. 4: Stammbaum der Indexfamilie B.....	18
Abb. 5: Stammbaum der Indexfamilie G.....	20
Abb. 6: Probenvorbereitung für das NGS .....	25
Abb. 7: Algorithmus zur Mutationsanalyse bei Exom-Sequenzierung .....	27
Abb. 8: Algorithmus zur Optimierung der PCR.....	31
Abb. 9: Aufnahmen der pathologischen Befunde bei Patientin L-2478.....	36
Abb. 10: Konservierung der Aminosäure des Wildtyps am Locus der Mutation p.Arg543Cys .....	38
Abb. 11: Die Elektropherogramme der erkrankten Schwester L-2479.....	38
Abb. 12: Stammbaum der Indexfamilie M.....	39
Abb. 13: Suchalgorithmus der Literaturrecherche zu <i>PLA2G6 post-mortem</i> Befunden	40
Abb. 14: Segregation der Kandidatenvarianten in Familie B.....	45
Abb. 15: Stammbaum der Familie P mit der p.Gly2019Ser-Mutation in <i>LRRK2</i> .....	47
Abb. 16: Die Elektropherogramme der cDNA im Bereich der synonymen Variante c.543A>G.....	55
Abb. 17: Elektropherogramm der Variante c.215+61G>A .....	55
Abb. 18: Schematische Darstellung des Proteins Phospholipase A2 .....	63
Abb. 19: Modell zur Mosaikentstehung. ....	67

# 1 Einleitung und Fragestellung

In dieser Arbeit sollten genetische Ursachen des Parkinson-Syndroms (PS) unter Anwendung zweier verschiedener Ansätze in fünf Einzelprojekten untersucht werden. Zum einen standen in drei Projekten Indexfamilien mit in mehreren Generationen auftretendem PS sowie ein diskordantes Zwillingspaar zur Verfügung. Hierbei sollte die Untersuchung seltener familiärer PS mittels Exom-Sequenzierung Rückschlüsse auf die Pathogenese des idiopathischen PS ermöglichen. Zum anderen erfolgte eine Screening-Studie zum Vorliegen von Mutationen im neu publizierten Parkinson-Gen *RAB39B* bei PS-Patienten der hiesigen Kohorte. Der folgende Abschnitt bietet einen kurzen Überblick über die genetischen Grundlagen und die Thematik der Parkinson-Syndrome, gefolgt von einer Einführung in die Methodik des *next-generation sequencing* (NGS) sowie die Vorstellung der bereits erfolgten Vorarbeiten zu den einzelnen Projekten. Zuletzt werden die jeweiligen Fragestellungen formuliert.

## 1.1 Genetische Grundbegriffe

Für das erleichterte Verständnis der in dieser Arbeit verwendeten Begrifflichkeiten erfolgt an dieser Stelle eine kurze Einführung in die grundlegenden genetischen Mechanismen.

Zum überwiegenden Teil sind die menschlichen Erbinformationen in Form von 23 verschiedenen Chromosomenpaaren gespeichert. Dabei handelt es sich um 22 Autosomen und einem geschlechtsspezifischen Gonosom. Bis auf die haploiden, d. h. mit einfachem Chromosomensatz ausgestatteten Keimzellen liegt die Erbinformation in den übrigen somatischen Zellen diploid, also doppelt vor. Betrifft eine Mutation beide Allele wird sie als homozygot bezeichnet, ist nur ein Allel verändert handelt es sich um einen heterozygoten Mutationsstatus. Ein Gen besteht aus den Exons, welche die für das Genprodukt kodierenden Sequenz-Abschnitte enthalten, und den nicht kodierenden Introns, welche beim Spleißvorgang entfernt werden. Ein Basentriplett, welches in eine der 20 Aminosäuren übersetzt wird, bildet ein Codon. Dabei können mehrere Triplets für dieselbe Aminosäure kodieren, wobei meist die dritte Stelle des Codons variabel ist, wodurch trotz einer Veränderung der Basenabfolge synonyme Varianten möglich sind. Kommt es aufgrund eines Basenaustauschs zum Einbau einer anderen Aminosäure spricht man von einer *missense-*

Mutation. Ein vorzeitiger Abbruch der Polypeptidkette durch die Entstehung eines Stopp-Codons wird als *nonsense*-Mutation bezeichnet. Die Verschiebung des Leserasters, beispielsweise durch eine Deletion, Insertion oder Duplikation abweichend vom Triplett-Code, wird *frameshift*-Mutation genannt.

## 1.2 Das Parkinson-Syndrom

Das Parkinson-Syndrom (PS) gehört zu den extrapyramidalen Bewegungsstörungen und ist neben dem Symptom der Hypo- bzw. Bradykinesie durch die Leitsymptome Rigor, (Ruhe-) Tremor und posturale Instabilität charakterisiert. Es bildet dabei einen syndromatischen Oberbegriff, welcher je nach Ätiologie in Untergruppen unterteilt wird (AWMF, 2016). Das idiopathische PS (Morbus Parkinson) stellt mit 75 % der PS die größte Gruppe dar und zählt zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen (Pringsheim *et al.*, 2014). Ein atypisches PS tritt im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen auf und zeigt weitere, spezifische Symptome, wie im Falle der Lewy-Body Demenz, der Multisystematrophie, der kortikobasalen Degeneration und der supranukleären Blickparese. Einem symptomatischen (sekundären) PS liegen definierbare Ursachen (vaskulär, medikamentös, metabolisch, toxisch, entzündlich u.a.) zugrunde.

### 1.2.1 Morbus Parkinson

Die erstmalige Beschreibung des Morbus Parkinson wurde von dem englischen Arzt James Parkinson im Jahre 1817 in einer Monografie unter dem Titel „*An Essay on the Shaking Palsy*“ (Parkinson, 1817) verfasst und jährt sich bei Veröffentlichung dieser Arbeit zum zweihundertsten Male. Eine Metastudie weltweiter epidemiologischer Daten ergab, dass bei Europäern die Prävalenz in der Altersgruppe 50 bis 59 Jahren bei 0,11 %, 1,60 % bei den 70 bis 79-Jährigen und in der Gruppe der über 80-Jährigen bei 2,95 % liegt. Auch scheinen ein männliches Geschlecht und europäische Herkunft mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert zu sein (Pringsheim *et al.*, 2014). Die Zahl der Erkrankten in Deutschland wird auf 250.000 bis 400.000 geschätzt (Gerlach *et al.*, 2007), wobei aufgrund der demografischen Entwicklung bis zum Jahre 2030 mit einer Verdoppelung der Prävalenz zu rechnen ist (Dorsey *et al.*, 2007).

Die eingangs beschriebenen motorischen Symptome treten initial meist unilateral auf. Der Ruhetremor ist durch eine Frequenz von vier bis sechs Hertz charakteristisch und tritt unter psychischer Belastung verstärkt hervor. Eine Bradykinesie äußert sich neben einer allgemeinen Verlangsamung auch durch eine Verkleinerung des Schriftbildes (Mikrografie) und eine Verminderung der Mimik (Hypomimie). Der Rigor zeigt sich peripher oft zusammen mit einem Zahnradphänomen und einer kleinschrittigen Gangstörung, welche, bedingt durch den Verlust der Stellreflexe (posturale Instabilität) im Verlauf häufig zu Stürzen führt (Jankovic, 2008). Neben den motorischen Kardinalsymptomen zählen auch nicht-motorische Symptome zum Krankheitsbild (Berg *et al.*, 2015). Bereits mehr als zehn Jahre vor Diagnosestellung können Geruchsverlust, REM-Schlaf-Verhaltensstörungen, Tagesmüdigkeit, Obstipation (Sunyer *et al.*, 2015) sowie Depression und Angststörungen (Chen *et al.*, 2013) auftreten. Im weiteren Verlauf tritt oft auch eine demenzielle Entwicklung zu Tage. Autonome Funktionsstörungen wie die orthostatische Hypotension, Obstipation, Inkontinenz und gesteigerter Speichelfluss können die Lebensqualität teils stärker beeinträchtigen als die motorischen Symptome (Sveinbjornsdottir, 2016). Der Score der *Unified Parkinson Disease Rating Scale* (UPDRS) ermöglicht die systematische Erfassung der Krankheitsschwere und wird sowohl im Rahmen von Studien als auch im klinischen Alltag eingesetzt (MDS, 2003).

Auf pathophysiologischer Ebene stehen die Degeneration dopaminerger Neurone der *Substantia nigra pars compacta* und des *Locus ceruleus* sowie Proteinablagerungen in überlebenden Neuronen in Form von Lewy-Körpern im Vordergrund. Diese Lewy-Körper enthalten vor allem das Protein  $\alpha$ -Synuclein (*SNCA*). Neuropathologisch können dabei sechs Stadien unterschieden werden (Braak *et al.*, 2003). Der neuronale Untergang führt zum Mangel des Neurotransmitters Dopamin im nigro-striatalen System und einer Überaktivität cholinerg, den Bewegungsablauf hemmender Neurone. Für die Notwendigkeit einer präklinischen Früherkennung spricht, dass beim Auftreten motorischer Symptome bereits 50 bis 70 % der Neurone degeneriert sind (Postuma *et al.*, 2010). Eine therapeutische Intervention vor diesem Stadium wäre daher erstrebenswert.

### 1.2.2 Genetische Parkinson-Syndrome

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung der (mono-) genetischen Formen des PS (PARK1-23), für die mittlerweile 18 Gene identifiziert wurden (Tab. 1). Alle bisher bekannten monogenetischen Formen zusammengenommen erklären etwa 30 % der familiären und 3-5 % der sporadischen Fälle (Kumar *et al.*, 2011). Die im Laufe der vergangenen Jahre stetig gewachsene Klassifikation der genetischen PS weist Schwächen auf. So enthält sie zurzeit gleichermaßen Genorte, welche Risikofaktoren oder monogen krankheitsverursachend sind, wie auch nicht replizierte Befunde. Auch erfolgte die Nummerierung chronologisch entsprechend dem Zeitpunkt der Erstbeschreibung. Daher ist eine Revision der Klassifikation zurzeit Gegenstand der Arbeit einer Taskforce im Auftrag der *International Parkinson and Movement Disorder Society* (Marras *et al.*, 2016) mit dem Ziel, eine bessere Konsistenz zu erreichen. Die vorgeschlagene neue Systematik der Bezeichnung der hereditären PS ist in Tabelle 1 aufgeführt. Hierbei wird der Phänotyp (Parkinson Syndrom, PARK) als Präfix vor den Gennamen (z. B. *SNCA*) gestellt. Bei komplexen Erkrankungen werden mehrere Suffixe verwendet (z. B. NBIA/DYT/PARK-*PLA2G6*). Dies soll den Zusammenhang zwischen Gen und Phänotyp deutlicher kenntlich machen und die Nutzung im klinischen Alltag vereinfachen. Die in jüngerer Zeit identifizierten Genorte zu PARK19 bis PARK23 werden voraussichtlich aufgrund der eingangs erwähnten Revision der Nomenklatur nicht mehr in die Liste des *HUGO Genome Nomenclature Committees* (HGNC) aufgenommen, auch wenn sie unter Umgehung dieses offiziellen Weges (HGNC) bereits ihren Weg in die Datenbank OMIM gefunden haben.

Ein autosomal-dominanter Erbgang konnte für Mutationen in den Genen *SNCA* (PARK1), *LRRK2* (PARK8) und *VPS35* (PARK17) nachgewiesen werden. Die Identifizierung des Gens *SNCA*, welches für das Protein  $\alpha$ -Synuclein kodiert, brachte im Jahre 1997 den ersten Beweis für eine erbliche Komponente in der Pathogenese des PS (Polymeropoulos *et al.*, 1997).  $\alpha$ -Synuclein ist Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen, welche als pathologisches Kennzeichen auch bei der idiopathischen Form des PS vorkommen (Spillantini *et al.*, 1997). Die Penetranz variiert in Abhängigkeit der vorliegenden Mutation im *SNCA*-Gen. Aufgrund der Korrelation des Vorliegens genomischer Duplikationen und Triplikationen des *SNCA*-Locus mit früherem Beginn und größerer Schwere der Erkrankung wird von einem Gen-Dosis-Effekt ausgegangen (Ross *et al.*, 2008). Die physiologische Funktion des  $\alpha$ -Synuclein ist bisher nur unzureichend verstanden. Dennoch konnte beobachtet werden, dass eine Überexpression von  $\alpha$ -Synuclein eine reduzierte Neurotransmitterausschüttung

Tab. 1: Loci genetischer Parkinson-Syndrome (vgl. Marras *et al.* 2016)

Altes Symbol	Gen	Neues Symbol	Erbgang	Region	Phänotyp
PARK1 *	<i>SNCA</i>	PARK- <i>SNCA</i>	AD	4q21-22	bestätigt als klassisches PS
PARK2 *	<i>Parkin</i>	PARK- <i>Parkin</i>	AR	6q25.2-q27	bestätigt als <i>early-onset</i> PS
PARK3 *	n. b.		AD	2p13	unbestätigt, evtl. RF
PARK4 *	<i>SNCA</i>	PARK- <i>SNCA</i>	AD	4q21-q23	identisch zu PARK1 (Kartierungsfehler)
PARK5 *	<i>UCHL1</i>		AD	4p13	unbestätigt
PARK6 *	<i>PINK1</i>	PARK- <i>PINK1</i>	AR	1p35-p36	bestätigt als <i>early-onset</i> PS
PARK7 *	<i>DJ-1</i>	PARK- <i>DJ-1</i>	AR	1p36	bestätigt als <i>early-onset</i> PS
PARK8 *	<i>LRRK2</i>	PARK- <i>LRRK2</i>	AD & RF	12q12	bestätigt als klassisches PS
PARK9 *	<i>ATP13A2</i>	PARK- <i>ATP13A2</i>	AR	1p36	bestätigt als atypisches/komplexes PS
PARK10 *	n. b.		RF	1p32	n. b.
PARK11 *	<i>GIGFY2</i>	folgt nicht	AD oder RF	2q36-27	widerlegt
PARK12 *	n. b.		RF	Xq21-q25	n. b.
PARK13 *	<i>HTRA2</i>	folgt	AD oder RF	2p12	bestätigt
PARK14 *	<i>PLA2G6</i>	NBIA/DYT/PARK- <i>PLA2G6</i>	AR	22q13.1	bestätigt als atypisches/komplexes PS
PARK15 *	<i>FBXO7</i>	PARK- <i>FBXO7</i>	AR	22q12-q13	bestätigt als atypisches/komplexes PS
PARK16 *	n. b.		RF	1q32	n. b.
PARK17 *	<i>VPS35</i>	PARK- <i>VPS35</i>	AD	4p16	bestätigt als klassisches PS
PARK18 *	<i>EIF4G1</i>		AD	6p21.3	unbestätigt
PARK19	<i>DNAJC6</i>	PARK- <i>DNAJC6</i>	AR	1p31.3	bestätigt als atypisches/komplexes PS
PARK20	<i>SYNJ1</i>	PARK- <i>SYNJ1</i>	AR	21q22.11	bestätigt als atypisches/komplexes PS
PARK21	<i>DNAJC13</i>		AD	3q22.1	unbestätigt
PARK22	<i>CHCHD2</i>		AD	7p11.2	noch unklar
PARK23	<i>VPS13C</i>		AR	15q22.2	unbestätigt
	<i>RAB39B</i>		XLR	Xq28	nicht bei klassischem PS (vgl. Löchte <i>et al.</i> 2016)

n. b.- nicht bekannt; AD - autosomal dominant; AR - autosomal rezessiv; XLR - X-chromosomal rezessiv; RF - Risikofaktor; \* - in HGNC gelistet; vgl. <http://www.genenames.org>, <http://www.omim.org>, Marras *et al.*, 2016; grau hinterlegt – in dieser Arbeit untersucht

und Anzahl synaptischer Vesikel zur Folge hat (Nemani *et al.*, 2010). Darüber hinaus konnten SNPs im *SNCA*-Gen mithilfe von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) auch als Risikofaktor in sporadischen PS-Patienten identifiziert werden (Edwards *et al.*, 2010; Nalls *et al.*, 2011; Trotta *et al.*, 2012).

Mutationen im *LRRK2*-Gen (PARK8) sind mit 10 % der Fälle die häufigste Ursache für ein familiäres (*late-onset*) PS (Paisan-Ruiz *et al.*, 2008; Lesage *et al.*, 2009). Sie treten jedoch auch bei 3,6 % der sporadischen (nicht-familiär) Erkrankten und bei 1,8 % der Gesunden auf (Lesage *et al.*, 2006). Die Penetranz der p.Gly2019Ser Mutationen nimmt altersabhängig zu und beträgt bei 79 Jahren 74 % (Hernandez *et al.*, 2016). Erst kürzlich konnte von Trinh *et al.* gezeigt werden, dass die Variante rs2421947 im Gen *DNM3* die Penetranz der *LRRK2* Gly2019Ser-Mutation beeinflusst und als Haplotyp-Marker genutzt werden kann (Trinh *et al.*, 2016). Der klinische Verlauf und das Erkrankungsalter der *LRRK2*-Mutationsträger gleicht dem der idiopathischen PS-Patienten (Haugarvoll und Wszolek, 2009). Auch wenn bereits über 100 verschiedene *nonsense* und *missense* *LRRK2*-Varianten bekannt sind, ist nur für einen Bruchteil (p.Arg1441Cys/Gly/His, p.Tyr1699Cys, p.Ser1761Arg, p.Ile2012Thr, p.Gly2019Ser, und p.Ile2020Thr) eine eindeutige Pathogenität nachgewiesen (Healy *et al.*, 2008; Aasly *et al.*, 2010; Nuytemans *et al.*, 2010; Barden *et al.*, 2011; Lorenzo-Betancor *et al.*, 2012). Dabei tritt die Mutation p.Gly2019Ser in Abhängigkeit der untersuchten Ethnie am häufigsten auf. Eine besondere Verbreitung findet sich unter der Bevölkerung Nordafrikas, des Nahen Ostens und den aschkenasischen Juden, wobei man davon ausgeht, dass die Träger dieser Mutation von einer Founder-Population in Nordafrika abstammen (Healy *et al.*, 2008). Auch konnte gezeigt werden, dass das p.Gly2019Ser mutierte Protein eine dauerhaft erhöhte Kinase-Aktivität aufweist (Greggio, 2012). Neben der autosomal-dominanten Vererbung wurden *LRRK2*-Varianten mittels genomweiter Assoziationsstudien auch als Risikofaktoren in asiatischen Populationen identifiziert (Wu *et al.*, 2012).

*VPS35* (PARK17) war der erste durch NGS-Methoden entdeckte Parkinson-Locus, wobei Mutationen autosomal-dominant segregieren. Insgesamt sind *VPS35*-Mutationen mit etwa 1 % der familiären und 0,2 % der sporadischen Fälle eine eher seltene Ursache für ein PS (Zimprich *et al.*, 2011; Lesage *et al.*, 2012; Nuytemans *et al.*, 2013). Auch im Falle des *VPS35*-assoziierten PS ähnelt das klinische Bild dem idiopathischen PS mit einem mittleren Erkrankungsalter von 53 Jahren. Die einzige etablierte Mutation p.Asp620Asn konnte bei mehreren Familien als krankheitsverursachend identifiziert werden, weist jedoch,

ähnlich wie *LRRK2*-Mutationen, eine reduzierte Penetranz auf (Kumar *et al.*, 2012). Untersuchungen an von PS-Patienten gewonnenen, induzierten pluripotenten Stammzellen aus Fibroblasten zeigten, dass p.Asp620Asn-Mutanten einen gestörten Abbau von  $\alpha$ -Synuclein aufweisen (Follett *et al.*, 2014).

Zu den autosomal-rezessiven Parkinson-Genen zählen *Parkin* (PARK2), *PINK1* (PARK6), *DJ-1* (PARK7) und deutlich seltener *ATP13A2* (PARK9), *PLA2G6* (PARK14) sowie *FBXO7* (PARK15), welche für etwa 20 % der *early-onset* PS verantwortlich sind. Etwa die Hälfte der an rezessivem *early-onset* PS Erkrankten sind Träger von Mutationen im *Parkin*-Gen, welches als zweiter PS-Locus erstmals 1998 beschrieben (Kitada *et al.*, 1998) wurde. Mittlerweile sind über 140 verschiedene exonische Mutationen bekannt, von denen mehr als die Hälfte größere Deletionen bzw. Duplikationen eines oder mehrerer kompletter Exons, 13 % kleinere Deletionen und ein Drittel Punktmutationen darstellen (Hedrich *et al.*, 2001; Hedrich *et al.*, 2004; Grunewald *et al.*, 2010). Klinisch fallen die Patienten durch ein Erkrankungsalter von unter 40 Jahren, fokale Dystonien, psychiatrische Symptome und ein deutliches Ansprechen auf die anticholinerge sowie dopaminerge Therapie, was an die L-Dopa-responsive Dystonie erinnert (Khan *et al.*, 2003; Lohmann *et al.*, 2003), auf. *Parkin* kodiert für eine Ubiquitin-Protein-Ligase (E3-Protein), welche nach der Phosphorylierung durch *PINK1* die Einleitung der Phagozytose geschädigter Mitochondrien (Mitophagie) vermittelt und so einer Apoptose der Zelle vorbeugt (Narendra *et al.*, 2008; Narendra *et al.*, 2010; Kane *et al.*, 2014).

Mutationen im Gen *PINK1* (PTEN-induced putative kinase 1) sind mit 3,7 % die zweithäufigste Ursache für ein autosomal-rezessives *early-onset* PS (Klein *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 2016) und auch hier ähnelt das klinische Bild dem des idiopathischen PS ohne Demenz (Ibanez *et al.*, 2006). Funktionelle Studien konnten in Zellen mit einer Überexpression des *PINK1*-Wildtyps (*rescue*-Intervention) im Gegensatz zu p.Gly309Asp-Mutanten eine Mitophagie-vermittelte Verminderung der Apoptose-Rate beobachten (Valente *et al.*, 2004). *PINK1* akkumuliert dabei an der äußeren Membran geschädigter Mitochondrien und aktiviert *Parkin*, welches darauf die membranständigen Proteine ubiquitiniert und somit die Mitophagie auslöst (Pickrell und Youle, 2015). Mit dem wachsenden Verständnis des Zusammenspiels von *PINK1* und *Parkin* könnte der mitochondriale Abbauprozess ein Ansatzpunkt für mögliche therapeutische Optionen sein.

Sowohl homozygote, als auch compound-heterozygote Mutationen im *DJ-1*-Gen (PARK7) führen zu einem Funktionsverlust des Proteins und sind in < 1 % der Fälle ursächlich für ein *early-onset* PS (Abou-Sleiman *et al.*, 2003; Bonifati *et al.*, 2003; Pankratz *et al.*, 2006). Die Patienten erkranken im jungen Erwachsenenalter, zeigen ein positives Ansprechen auf die dopaminerge Therapie und ähneln damit phänotypisch den *Parkin*- und *PINK1*-Formen. Es bestehen bereits mehrere bekannte Assoziationen zu vermuteten PS-Pathomechanismen. So konnte nachgewiesen werden, dass *DJ-1* die den Lewy-Körperchen zugrundeliegende  $\alpha$ -Synuclein Aggregation hemmt und unter oxidativem Stress als Chaperon aktiv ist (Shendelman *et al.*, 2004). Auch ist bekannt, dass *DJ-1* in Interaktion mit *PINK1* die Stress-induzierte Apoptose (Tang *et al.*, 2006) sowie den Glucose-Stoffwechsel und die Zellproliferation reguliert (Requejo-Aguilar *et al.*, 2015).

Die deutlich seltener auftretenden Mutationen im *ATP13A2*-Gen (ATPase type 13A2; PARK9) führen zum Kufor-Rakeb-Syndrom (KRS). Auffällig sind bei den jungen Patienten das Auftreten von Symptomen im Sinne eines atypischen PS, wie ein vermindertes Ansprechen auf die dopaminerge Therapie, Dystonie und eine supranukleäre Blickparese. Auch konnte das Vorliegen von Eisenablagerungen in den Basalganglien nachgewiesen werden (Ramirez *et al.*, 2006; Bruggemann *et al.*, 2010). Es sind bisher mindestens elf Familien bekannt, in denen eine Vielzahl verschiedener *missense*-, *nonsense*- und Deletionsmutationen gefunden wurden, wobei die hohe phänotypische Variabilität von der Art der Mutation abhängig ist (Park *et al.*, 2015). Die Funktionen des Proteins sind vielfältig und mit den zuvor beschriebenen PS-Pathomechanismen assoziiert. Auch eine Überexpression von *ATP13A2* hemmt die  $\alpha$ -Synuclein Aggregation, weiterhin ist es in der mitochondrialen Homöostase (Grunewald *et al.*, 2012), dem endo-lysosomalen Stoffwechsel und der Zellprotektion gegen metallinduzierte Toxizität beteiligt (Kong *et al.*, 2014).

Im Jahre 2008 wurde das *FBXO7* als PS-Gen (PARK15) mittels genomweiter Kopplungsanalysen identifiziert (Shojaee *et al.*, 2008). Es kodiert für das Protein *F-box only protein 7*, welches ebenfalls im Zusammenspiel mit *PINK1* die mitochondriale Homöostase und Mitophagie reguliert. Als Ursache für ein autosomal-rezessives PS sind Mutationen in *FBXO7* selten, liegen dann jedoch homozygot oder compound-heterozygot vor (Di Fonzo *et al.*, 2009).

Ein besonderer Schwerpunkt in dieser Arbeit liegt auf dem in Familie M als krankheitsursächlich identifizierten PS-Gen *PLA2G6*, welches auf Chromosom 22 lokalisiert ist und für die *Phospholipase A2 Gruppe IV* kodiert. Diese ist ein wichtiger Bestandteil des Arachidonsäure-Stoffwechsels und reguliert weiterhin die mitochondriale Membran und intrazelluläre Kalziumhomöostase (Kinghorn *et al.*, 2015). Zusammengefasst werden die sehr heterogenen Phänotypen unter dem Begriff der *PLA2G6*-assoziierten Neurodegeneration (PLAN, siehe Abb. 1) (Giri *et al.*, 2016). Ursprünglich wurden Mutationen bei Patienten mit infantiler neuroaxonaler Dystrophie (INAD, NBIA2A) berichtet (Khateeb *et al.*, 2006). Die in früher Kindheit Erkrankenden fallen durch Entwicklungsverzögerung und eine Gangstörung auf, später treten eine Optikus-Atrophie und eine spastische Tetraparese hinzu. Weitere Phänotypen sind die (atypische) neuroaxonale Dystrophie (NAD, NBIA2B), welche durch einen protrahierteren Verlauf mit Kleinhirnzeichen bei späterem Erkrankungsalter gekennzeichnet ist. Aufgrund der in MRT- und neuropathologischen Untersuchungen nachweisbaren Eisenablagerungen in den Basalganglien werden diese Formen auch zu den NBIA-Erkrankungen (*neurodegeneration with brain iron accumulation*) gezählt. Der dritte, in Familie M vorliegende, und deutlich seltenere Phänotyp des L-Dopa-responsiven Dystonie-Parkinsonismus (PLAN-DP) tritt mit variierender Ausprägung der namensgebenden Symptome auf, wobei neben Störungen der Okulomotorik, kognitivem Abbau und psychiatrischen Auffälligkeiten auch Eisenablagerungen und Tau-Pathologie beobachtet werden. Dabei kommen in den Patienten *missense*-, *frameshift*-, Spleißstellen- und Stopp-Mutationen sowohl homozygot, als auch compound-heterozygot vor (Paisan-Ruiz *et al.*, 2009; Paisan-Ruiz *et al.*, 2012).

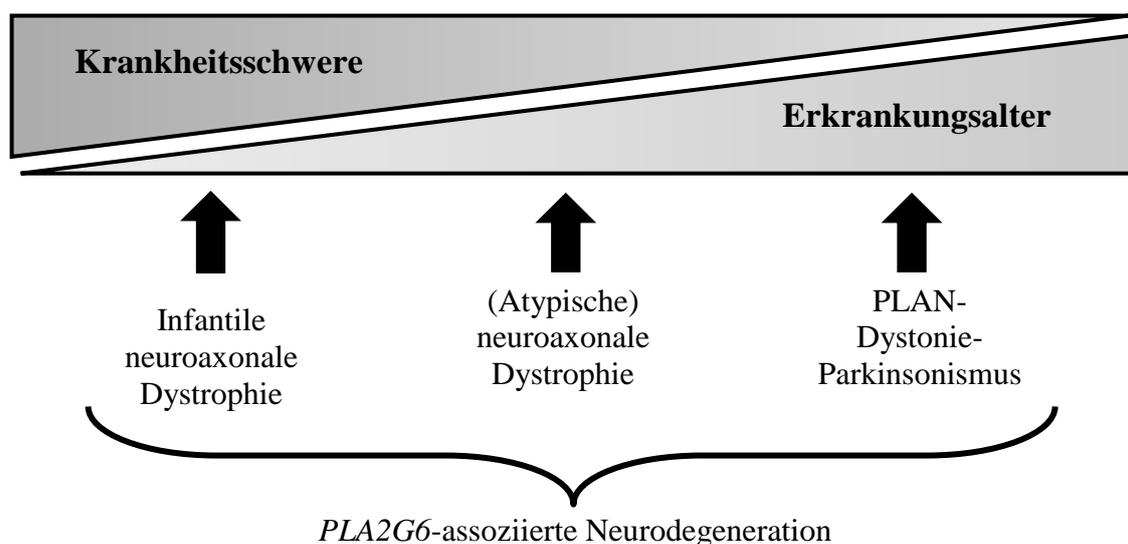


Abb. 1: Spektrum der *PLA2G6*-assoziierten Neurodegeneration (PLAN)

### 1.2.3 Das Parkinson-Kandidatengen *RAB39B*

Die Proteine der RAB-Familie zählen zur Gruppe der kleinen GTP-asen, welche den vesikulären Transport innerhalb der Zelle sowie die  $\alpha$ -Synuclein Homöostase regulieren (Wilson *et al.*, 2014), wobei im Gehirn eine hohe Expression nachgewiesen werden konnte (Cheng *et al.*, 2002). In Bezug auf die Zugehörigkeit des auf dem X-Chromosom lokalisierten Gens *RAB39B* zu den PS-Loci herrscht in der Literatur noch Unklarheit. Ein Zusammenhang von Mutationen im Gen *RAB39B* wurde bereits für die X-chromosomal gekoppelte mentale Retardierung (MRX72) mit Epilepsie und Autismus nachgewiesen (Giannandrea *et al.*, 2010).

Zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten stellten sich in zwei Publikationen jedoch auch eine Assoziation zum *early-onset* PS heraus. Wilson *et al.* konnten in einer australischen Familie mit drei männlichen, von einem *early-onset* PS betroffenen Patienten mit kognitiven Defiziten eine ca. 45-kb große Deletion nachweisen, welche zu einem kompletten Verlust des Genprodukts führte. *Post-mortem* Untersuchungen an einem der Mutationsträger zeigten die pathologischen Zeichen eines PS. In einer weiteren Familie aus Wisconsin, USA mit sieben erkrankten Männern, welche einen ähnlichen Phänotyp zeigten, fanden die Autoren die Mutation c.503C>A; p.Thr168Lys (siehe Abb. 2). In Zellkultur-Versuchen mittels Ausschaltung von *RAB39B* konnten sie eine Reduktion der  $\alpha$ -Synuclein-Spiegel nachweisen (Wilson *et al.*, 2014). Mata *et al.* berichteten von einer *missense*-Mutation (c.574G>A; p.Gly192Arg) in einer Familie mit sieben an einem klassischem PS erkrankten Individuen, von denen lediglich zwei Männer leichte kognitive Defizite aufwiesen, wobei eine reduzierte Penetranz in weiblichen Patienten vorlag. Funktionelle Studien zeigten eine veränderte Lokalisation des mutierten Proteins (Mata *et al.*, 2015).

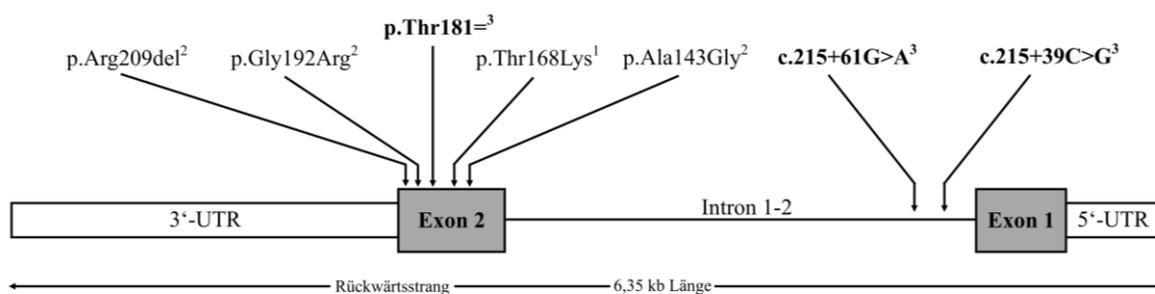


Abb. 2: Schematische Darstellung des Gens *RAB39B* (Transkript ENST00000369454) mit den bereits in der Literatur publizierten Mutationen sowie den in dieser Arbeit gefundenen Varianten (fett gedruckt).

<sup>1</sup>Wilson *et al.*, 2014, <sup>2</sup>Mata *et al.*, 2015, <sup>3</sup>Löchte *et al.*, 2016

Quelle: vgl. ENSEMBL: [http://static.ensembl.org/img-tmp/2016\\_02\\_12/session\\_224505389/PavxTwCC.png](http://static.ensembl.org/img-tmp/2016_02_12/session_224505389/PavxTwCC.png)

### 1.3 Next-generation sequencing

Die erstmalige „Entschlüsselung“ bzw. Sequenzierung des gesamten menschlichen genetischen Erbgutes gelang mithilfe des Humangenomprojekts, an dem anfangs über 1000 Forscher aus 60 Ländern beteiligt waren. Im Jahre 1990 gegründet, dauerte es bis 2003, kostete rund drei Milliarden US-Dollar und wurde mittels der Sanger-Sequenzierung durchgeführt, bei der pro Reaktion nur circa 500 von insgesamt 3 Milliarden Basen gelesen werden konnten. In der letzten Dekade erlaubte der technologische Fortschritt durch den Einsatz stark parallelisierter Sequenzieretechniken eine deutliche Senkung der Kosten und des Zeitaufwandes. Diese unter dem Begriff des *next-generation sequencing* (NGS) zusammengefassten, post-Sanger-Methoden erlauben eine Genom-Sequenzierung innerhalb von 24 Stunden für weniger als 1000 Euro (Muzzey *et al.*, 2015). Die technische Entwicklung lässt NGS-Verfahren auch in der klinischen Praxis Einzug erhalten, beispielsweise bei der Pränataldiagnostik (Fan *et al.*, 2012), der Tumordiagnostik (Newman *et al.*, 2014) oder auch, wie im Falle der vorliegenden Arbeit, der Diagnostik seltener Erkrankungen. So können *de-novo* Mutationen ohne Hypothese eines Kandidatengens oder auch Mutationen in kleineren Familien entdeckt werden (Lohmann und Klein, 2014).

Bei der Beschreibung der Technologie wird auf das *sequencing-by-synthesis* bzw. Brückensynthese-Verfahren Bezug genommen, welches vom in dieser Arbeit zur Anwendung kommenden *HiSeq2000* Sequenziergerät des Herstellers *Illumina* genutzt wird (Illumina, 2016). Daneben existieren mit *sequencing-by-ligation* (Shendure *et al.*, 2005), *ion-semiconductor sequencing* (Rothberg *et al.*, 2011) und *pyrosequencing* (Ronaghi, 2001) weitere Hochdurchsatz-Technologien. Für eine vergleichende Gegenüberstellung verweise ich auf die nachstehende Publikation (Liu *et al.*, 2012).

Nach erfolgter Probenvorbereitung (siehe Abschnitt 2.3.1) werden die entstandenen DNA-Fragmente auf die Trägerplatte gegeben und binden mithilfe von Adapter-Sequenzen an die auf deren Oberfläche angebrachten Oligonukleotide. Zwischen diesen bilden die DNA-Fragmente Brücken aus und werden *in situ* amplifiziert, wodurch sich an den einzelnen Bereichen der Trägerplatte *cluster* derselben Sequenzabschnitte bilden. Die eigentliche Sequenzierung erfolgt durch die Zugabe von je nach Base (A, C, T, G) unterschiedlich fluoreszierenden, um die Bindung konkurrierenden dNTPs und einer Polymerase. Nach jeder Anlagerung eines komplementären Nukleotids führt eine chemische Modifikation der dNTPs zu einer kurzen Unterbrechung der Kettenverlängerung und die ungebundenen

Nukleotide werden ausgewaschen. Mithilfe einer Hochgeschwindigkeitskamera erfolgt die Aufnahme des Fluoreszenzsignals, welches für jede Base eine spezifische Wellenlänge besitzt. In einem weiteren Reaktionsschritt wird die Blockade entfernt, das Nukleotid verliert seine Fluoreszenz und die Kettenverlängerung setzt sich mit der Anlagerung der nächsten komplementären Base fort. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass nur eine Base pro Sequenzierzyklus eingebaut und nur eine einzelne Position registriert wird. Dieser Prozess aus Anlagerung, Aufnahme des Lichtsignals und Deblockade des dNTPs wiederholt sich bis zum Ende des gebundenen Sequenzabschnitts, welcher eine Länge von bis zu 300 bp erreichen kann. Der Komplementärstrang wird entfernt, wodurch der *read* komplett ist und ein weiterer Zyklus erneut beginnen kann. Da die Abschnitte verschiedener Sequenzen in *clustern* räumlich voneinander getrennt sind, lässt sich aus den zeitlich getrennten Kameraaufnahmen einer Koordinate auf der Trägerplatte die zugehörige Basensequenz ableiten. Die Anzahl der *reads* an einer Position des Genoms definiert seine *depth* bzw. *coverage*, das heißt Redundanz der Abdeckung desselben Sequenzabschnitts. Eine *coverage* von mehr als 25-30 *reads* wird als ein ausreichender Kompromiss zwischen Wirtschaftlichkeit und Zuverlässigkeit des Ergebnisses angesehen (Muzzey *et al.*, 2015). Es werden sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärtsstrang sequenziert, um die spätere Rekonstruktion zu erleichtern (*paired-end sequencing*).

Zur Rekonstruktion der Gesamtsequenz aus den Einzelsequenzen werden diese überlappt und mit dem Referenzgenom abgeglichen. Abweichungen von dieser Referenz werden als Variante registriert und im genetischen Koordinatensystem eingeordnet (*variant calling*). Sofern diese im kodierenden Bereich liegt, wird der Aminosäureaustausch benannt sowie das betroffene Gen und, wenn die Variante bereits in der Datenbank dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> ; 21.08.2016) gelistet ist, mit einer eindeutigen ID versehen (*variant annotation*). Die Interpretation des Effektes der Variante auf das kodierte Protein erfolgt auch unter Berücksichtigung von Prädiktionsprogrammen, einer Recherche in der Literatur und Datenbanken (Lohmann und Klein, 2014).

## 1.4 Vorarbeiten

Da an einigen der Projekte bereits mittels herkömmlicher Sequenzierung-Methoden gearbeitet wurde, konnte teilweise auf Vorarbeiten zurückgegriffen werden. Die Extraktion sämtlicher DNA-Proben, welche im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, erfolgte im Vorfeld. Ebenso wurden die Exom-Sequenzierungen mittels NGS vor Beginn dieser Arbeit vorgenommen. Sofern vorhanden, wurde auf die durch die rekrutierenden Ärzte erhobenen klinischen Daten zurückgegriffen, worauf im Einzelnen bei der Vorstellung der Indexfamilien hingewiesen wird (siehe Abschnitt 2.1.1). Insbesondere im Falle der Indexfamilie M wurden im Rahmen der Dissertationsarbeit von Dr. Katja Jansen, geb. Zschiedrich im hiesigen Institut umfangreiche Kandidatengen-Analysen durchgeführt mit dem Ziel, das krankheitsverursachende Gen zu finden (Zschiedrich, 2007). Dabei erfolgte eine Haplotypisierung der Genorte PARK1-8 sowie eine teils auf einzelne Exons fokussierte Sequenzierung der Gene *SNCA*, *Parkin*, *DJ-1* und *LRRK2*, ohne jedoch eine genetische Klärung zu erreichen. Des Weiteren konnte auf die durch Prof. Suzanne de la Monte (Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, USA) erstellten neuropathologischen Befunde und Abbildungen der Patienten L-2491 und L-2478 zurückgegriffen werden.

## 1.5 Fragestellung

Die Zielsetzung der Arbeit war die Aufklärung der genetischen Ursachen für das Vorliegen des PS, wobei die praktischen Arbeiten in fünf Teilprojekte aufgeteilt wurden. Dabei sah die Herangehensweise in vier Projekten vor, die ein PS verursachenden Mutationen unter Einsatz des NGS aufzuklären. In den Projekten 1 bis 3 standen dazu drei Indexfamilien mit Exomdaten von jeweils mindestens vier Individuen zur Verfügung. In Projekt 4 wurde auf die Exom-Datensätze von zwei monozygoten, jedoch für die Parkinsonerkrankung diskordanten Zwillingspaaren zurückgegriffen, die auf das Vorliegen eines Mosaiks bzw. somatischer Mutationen überprüft wurden. Mithilfe eines systematischen Algorithmus, gestützt durch Literaturrecherchen, erfolgte die Filterung der erhaltenen Varianten. Diese Befunde galt es dabei mittels Sanger-Sequenzierung zu validieren und die Mutationen auf ihre Segregation innerhalb der Familien zu prüfen. Im Anschluss wurden die Kandidatengene jeweils durch die Sanger-Sequenzierung einer rund 300 PS-Patienten umfassenden Stichprobe auf das Vorliegen einer erhöhten Mutationslast hin untersucht, um Rückschlüs-

se auf die sporadische Form des PS gewinnen zu können. Im Zentrum des fünften Projekts stand die Validierung des neuen PS-Gens *RAB39B*, gestützt durch eine Literaturrecherche.

#### 1.5.1 Projekt 1 (Familie M)

Welche Mutation liegt dem PS bei Familie M zugrunde? Zur Analyse standen Exomdaten von vier Familienmitgliedern zur Verfügung. Zusätzlich lagen DNA-Proben von insgesamt fünf Familienangehörigen vor.

#### 1.5.2 Projekt 2 (Familie B)

Welche (heterozygote) Mutation liegt dem PS bei Familie B zugrunde? Es standen Exomdaten von drei Familienmitgliedern zur Analyse zur Verfügung. Zudem lagen DNA-Proben von insgesamt sechs Familienangehörigen vor.

#### 1.5.3 Projekt 3 (Familie G)

Welche heterozygote Mutation liegt der Tremor-Erkrankung bei Familie G zugrunde? Zur Analyse standen Exomdaten von vier Familienmitgliedern sowie DNA-Proben von insgesamt vierzehn Familienangehörigen zur Verfügung.

#### 1.5.4 Projekt 4 (Diskordante Zwillinge)

Die Klärung der genetischen Ursache des PS in zwei monozygoten Zwillingspaaren, in denen jeweils ein Zwilling erkrankt ist, sollte mithilfe der vorliegenden Exomdaten sowie der Validierung der erhaltenen Daten durch Sanger-Sequenzierung erfolgen. Die Hypothese des Vorliegens einer Diskordanz infolge somatischer Mutationen sollte somit überprüft werden.

#### 1.5.5 Projekt 5 (Screening-Studie)

Welche Häufigkeit haben Mutationen im neuen PS-Gens *RAB39B* bei PS-Patienten? Zur Validierung aktuell publizierter NGS-Befunde standen für eine Screening-Untersuchung DNA-Proben von rund 650 PS- und 100 XDP-Patienten (X-chromosomal gekoppelter Dystonie-Parkinsonismus) des hiesigen Kollektivs zur Verfügung.

## 2 Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Für die genetischen Untersuchungen, welche im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen wurden, stand Probenmaterial von vier Familien zur Verfügung. Darüber hinaus erfolgte die Analyse von DNA-Proben aus Stichproben von Patienten mit Parkinson-Syndrom (PS) und X-chromosomal vererbtem Dystonie-Parkinsonismus (XDP, Lubag-Syndrom) sowie einer Kohorte mit gesunden Kontrollprobanden. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Referenznummer: 04-155, 11-021) genehmigt. Alle Teilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis.

#### 2.1.1 Indexfamilien

##### Projekt 1: Familie M

Diese Familie wird von Herrn Dr. Joseph H. Friedman (Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, USA) betreut und wurde insbesondere im Hinblick auf die klinischen Daten erstmals vor 16 Jahren publiziert (Tabamo *et al.*, 2000). Sie besteht aus einem gesunden Elternpaar (L-2477 und L-2480) mit vier Töchtern, von denen drei an einem PS erkrankten (vgl. Abb. 3). Die Herkunft ist väterlicherseits portugiesisch (Azoren) und mütterlicherseits französisch-kanadisch, sodass eine konsanguine Verwandtschaft äußerst unwahrscheinlich ist. Die zwei ältesten Geschwister erkrankten beide bereits im Alter von 21 Jahren und verstarben mit 26 Jahren an einer Pneumonie (L-2491) bzw. nach längerem Krankheitsverlauf mit 52 Jahren (L-2478). Einen späteren Erkrankungsbeginn hatte die jüngste betroffene Tochter (L-2479) mit 41 Jahren.

Die motorische Symptomatik zeigte sich bei allen Betroffenen asymmetrisch. Bei beiden älteren Geschwistern war nur in den ersten 12 (L-2491) bzw. 36 (L-2478) Monaten der Erkrankung ein gutes Ansprechen auf die orale L-Dopa-Therapie zu verzeichnen. Der weitere Verlauf war durch das Auftreten von schwer zu beherrschenden motorischen Fluktuationen, teils auch schmerzhaften Dystonien und Dyskinesien gekennzeichnet. Im Falle der zweitältesten Schwester (L-2478) brachten die Versorgung mit einer intraduodenalen L-Dopa-Sonde sowie eine rechtsseitige Pallidotomie nur vorübergehende Besserung. Neben einer leichten Demenz traten Halluzinationen und psychotische Symptome beson-

ders bei der jüngsten Schwester hinzu und waren aufgrund einer Unverträglichkeit von Clozapin nur begrenzt kontrollierbar. Bemerkenswerterweise trat bei der ältesten Schwester (L-2491) unter der intravenösen Gabe von Eisensulfat zur Behandlung einer Eisenmangelanämie eine deutliche Verschlechterung der Symptome auf, welche durch Abbruch der Therapie wieder rückläufig war. Weitere klinische Angaben sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Klinische Angaben der Familienmitglieder

Code	Geschlecht	Geburts-jahr	Erkrankungs-alter (Jahre)	Erkrankungs-dauer (Jahre)	Symptomatik
L-2480	m	1937	-	-	gesund
L-2477	w	1941	-	-	gesund
L-2491	w	1954	21	5, verst. 1980	PS mit Tremor, Rigidity, Bradykinese und Dystonie
L-2478	w	1962	21	30, verst. 2014	PS mit Tremor, Rigidity, Bradykinese und Dystonie
L-2479	w	1964	41	12, lebt (2016)	Hypokinetisch-rigides PS, leichte Demenz, psychot. Symptome

w - weiblich; m - männlich; verst. - verstorben; PS - Parkinson-Syndrom

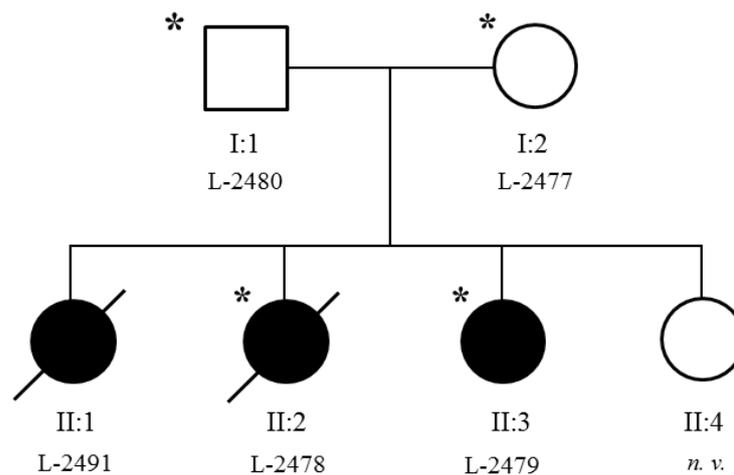


Abb. 3: Stammbaum der Indexfamilie M; Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienangehörige. Ein Schrägstrich zeigt verstorbene Personen an. Nicht erkrankte Familienmitglieder sind weiß, erkrankte schwarz gekennzeichnet. Die römischen Zahlen (I-II) zeigen die Generation an, arabische Zahlen (1-4) die einzelnen Individuen innerhalb dieser. Nicht vorhandene Angaben sind mit n. v. vermerkt. Ein Stern (\*) markiert Personen, bei denen ein *next-generation sequencing* durchgeführt wurde.

## Projekt 2: Familie B

Die Familie B ist deutscher Herkunft und wurde im Jahre 2004 von Prof. Meike Kasten (UKSH, Campus Lübeck) aufgrund des Auftretens der Parkinsonerkrankung bei einem männlichen Zwillingsspaar und einer älteren Schwester untersucht und rekrutiert. Im weiteren Verlauf der Betreuung erfolgten genetische und bildgebende Untersuchungen bei einzelnen Familienmitgliedern sowie im Falle des Zwillingssbruders L-1960 die Implantation einer tiefen Hirnstimulation. Die Symptomatik des PS war bei allen Erkrankten typisch mit asymmetrischer Verteilung von Tremor, Rigor, Bradykinesie und Hypomimie. Im Verlauf traten eine Gangstörung und posturale Instabilität hinzu, was bei den Erkrankten L-1959 und L-1962 etwa zwei Jahre und bei den Zwillingen (L-1960 und L-1961) sieben bis zehn Jahre nach Auftreten der ersten Krankheitszeichen der Fall war. Der Zwillingssbruder L-1960 berichtete darüber hinaus vom phasenweisen Auftreten depressiver Reaktionen schon vor Beginn der motorischen Symptome.

Eine Exom-Sequenzierung wurde für den Zwilling L-1960, die betroffene Schwester (L-1962) sowie die erkrankte Tante väterlicherseits (L-1959) durchgeführt. Die Annotation der Exomdaten erfolgte durch Dr. rer. nat. Ingrid Brænne (Institut für Integrative und Experimentelle Genomik, Universität zu Lübeck).

Tab. 3: Klinische Daten der Familie B.

Code	Geschlecht	Geburts-jahr	Erkrankungs-alter	Symptomatik	weiteres
L-1958	w	1957	-	gesund	Ehefrau von L-1960
L-1959	w	1926	75 J.	typisches PS	-
L-1960	m	1953	36 J.	typisches PS	THS, depressive Episode, M. Crohn
L-1961	m	1953	38 J.	typisches PS	-
L-1962	w	1947	54 J.	typisches PS	-
L-1963	w	1941	-	gesund	-

w - weiblich; m - männlich; J - Jahre; PS - Parkinson-Syndrom; THS - tiefe Hirnstimulation

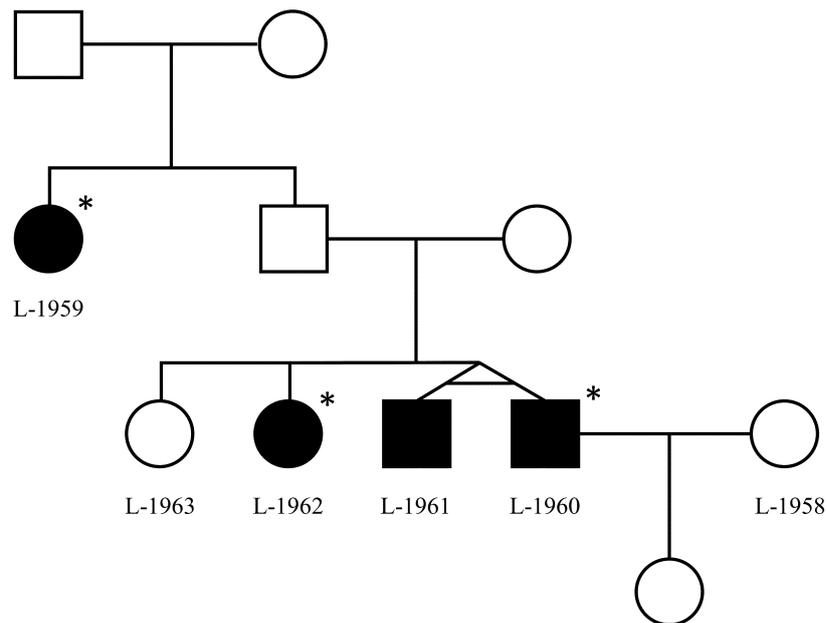


Abb. 4: Stammbaum der Indexfamilie B. Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienangehörige. Ein Schrägstrich zeigt verstorbene Personen an. Nicht erkrankte Familienmitglieder sind weiß, erkrankte schwarz gekennzeichnet. Ein Stern (\*) symbolisiert ein erfolgtes *next-generation sequencing*.

### Projekt 3: Familie G

Diese Familie mit einem über vier Generationen vermehrt auftretenden Tremor wurde im Jahre 1999 von Prof. Dr. med. Johann Hagenah (damals Universitätsklinikum Lübeck) untersucht. Bei einem Teil der Familienmitglieder erfolgte die DNA-Extraktion aus Vollblut (siehe Abb. 5 und Tab. 4). Neben diesen Proben standen für die Analysen auch die bereits im Vorfeld erhobenen Exomdaten zu vier Familienmitgliedern zur Verfügung (L-8324, L-8327, L-8329 und L-8333). Bei den betroffenen Familienmitgliedern stand ein (Halte-) Tremor der Hände im Vordergrund. Weiterhin ließen sich ein „Nein“-Kopftremor (L-3825, L-8329 und L-8333), ein Schreibtremor (L-8325 und L-8332) sowie ein Aktions-tremor (L-8326 und L-8333) beobachten. Bemerkenswert war bei L-8325 eine auf einen Essentiellen Tremor hinweisende Alkoholresponsivität, welche von den übrigen Betroffenen jedoch nicht berichtet wurde. Auf einen dystonen Tremor deutet bei L-8329 das Auftreten eines Torticollis mit spasmodischer Dysphonie hin. Zusammenfassend ist bei Familie G von heterogenen Tremorursachen auszugehen.

Tab. 4: Übersicht über die Familienmitglieder der Familie G

Code	Geschl.	Geburtsjahr	Erkrankungs- alter	Tremor	weitere Symptome
L-759	m	1929	-	-	-
L-8323	w	1978	-	-	-
L-8324	m	1977	n. b.	feinschlägiger Haltetremor	-
L-8325	m	1943	Jugend	feinschlägiger „Nein“- Kopftremor, Stimmtremor, Schreibtremor,	Nach Alkohol- konsum deutliche Besserung
L-8326	w	1918	n. b.	Aktionstremor der rechten Hand, intermittierend	-
L-8327	w	1953	n. b.	feinschlägiger Haltetremor	kein typischer ET
L-8328	m	1980	-	-	-
L-8329	w	1954	40 J.	feinschlägiger Haltetremor der Hände, „Nein“- Kopftremor	Torticollis nach rechts, spasmo- dische Dysphonie
L-8330	m	1977	4 J.	fraglich feinschlägiger Haltetremor der Hände	V.a. Rolando- Epilepsie
L-8331	w	1975	6 J.		Migräne
L-8332	m	1929	40 J.	Haltetremor der Hände, Schreibtremor	-
L-8333	w	1907	40 J.	Halte- und Aktionstremor der Hände, „Nein“- Kopftremor	-
L-8334	w	1951	-	-	-
L-8335	w	1929	-	-	-

Geschl. - Geschlecht; w - weiblich; m. - männlich; J. - Jahre; n. b. - nicht bekannt; ET - Essentieller Tremor

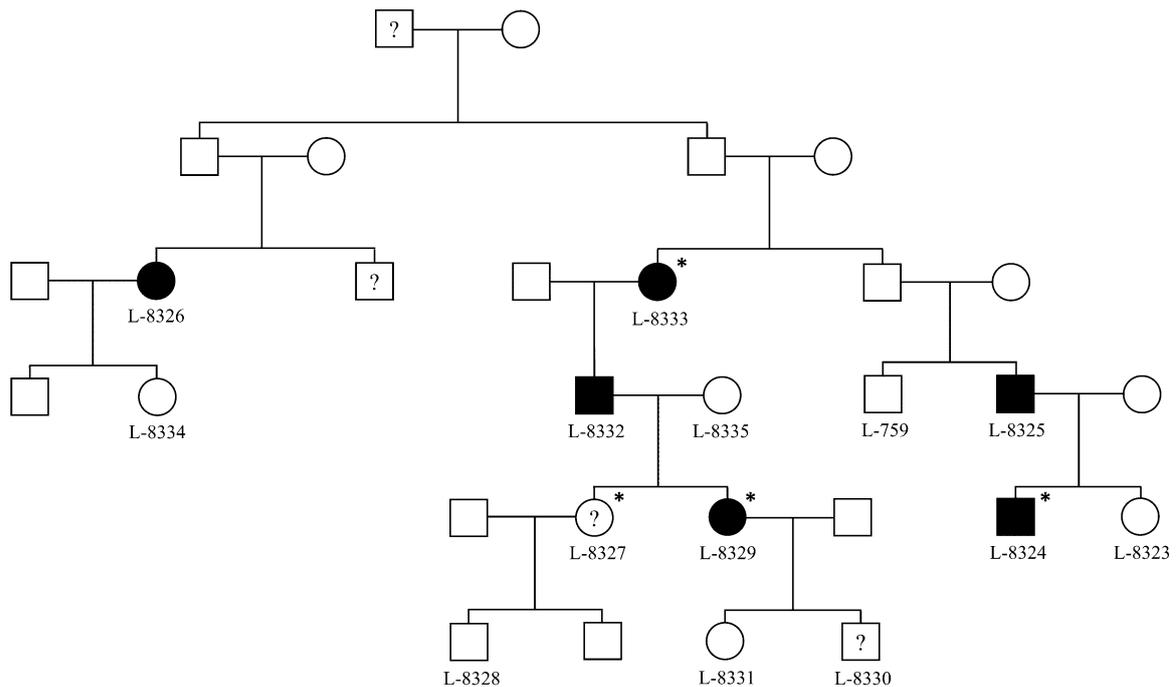


Abb. 5: Stammbaum der Indexfamilie G. Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienangehörige. Nicht erkrankte Familienmitglieder sind weiß und erkrankte Familienmitglieder schwarz, ein unklarer Erkrankungsstatus ist durch ein Fragezeichen gekennzeichnet. Ein Stern (\*) zeigt ein erfolgtes NGS an.

#### Projekt 4: Zwillingsstudie

Im Rahmen der Zwillingsstudie bot sich die (sehr seltene) Möglichkeit, an zwei monozygoten (eineiigen) Zwillingspaaren, von denen jeweils ein Zwilling an einem PS erkrankt ist, genetische Studien durchzuführen. Insbesondere das Aufspüren von somatischen bzw. Mosaik-Mutationen wurde durch die unmittelbar verfügbare genetische Kontrolle des gesunden Zwilling ermöglicht. Dazu wurden die Exome aller vier Individuen sequenziert. Die verfügbaren klinischen Daten sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: Klinische Daten zu Zwillingspaaren

Code	Geschl.	Ethnie	Geburtsjahr	Status	Erkrankungsalter
L-2893	w	kaukasisch	1963	erkrankt	n. b.
L-2894	w	kaukasisch	1963	gesund	gesund
L-3856	w	kaukasisch	1927	erkrankt	61 Jahre
L-3857	w	kaukasisch	1927	gesund	gesund

Geschl. - Geschlecht; n. b. - nicht bekannt

## 2.1.2 Patienten- und Kontrollgruppen

### Populations-Kontrollen

Die Überprüfung der Häufigkeit der gefundenen Varianten innerhalb einer gesunden, norddeutschen Kontrollpopulation wurde für die Projekte 1 und 5 durchgeführt. Dazu standen 186 DNA-Proben aus der Kohorte der EPIPARK-Studie Lübeck (Kasten *et al.*, 2013) zur Verfügung. Davon waren 97 (52,2 %) Männer und 89 Frauen (47,8 %). Der Altersdurchschnitt bei Einschluss in die Kohorte im Jahre 2010 lag bei  $67,5 \pm 5,8$  Jahren. Alle Individuen dieser Gruppe waren zuvor neurologisch untersucht worden.

### Parkinson-Syndrom-Patienten

Die Stichprobe der Screening-Studie (Projekt 5) enthielt 552 am Parkinson-Syndrom erkrankte Patienten, von denen 330 männlich und 222 weiblich waren. Der überwiegende Anteil, neben acht philippinischen Patienten, war deutscher Herkunft. Das durchschnittliche Erkrankungsalter (bekannt bei 365 Patienten) lag bei  $50,9 \pm 15,3$  Jahren. Bei 22,2 % der Patienten (bekannt bei 357 Patienten) wurde eine positive Familienanamnese für Verwandte ersten und zweiten Grades angegeben, wobei es keine Hinweise auf einen X-chromosomal gekoppelten Erbgang gab.

Zur Validierung der Kandidatenvarianten in Projekt 2 wurde eine Stichprobe aus 277 PS-Patienten untersucht, von denen 164 männlich und 108 weiblich waren. Das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug  $48,8 \pm 22,3$  Jahre. In Projekt 3 wurden 281 DNA-Proben Sanger-sequenziert, von denen 166 von männlichen und 110 von weiblichen PS-Patienten stammten. Bei fünf Proben fehlten Angaben bezüglich des Geschlechts, das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug hierbei  $48,8 \pm 22,4$  Jahre.

### XDP-Patienten

Weiterhin wurden 99 Proben philippinischer XDP-Patienten mit untersucht, wobei 91 Patienten den XDP-Haplotyp trugen (Domingo *et al.*, 2015). Die Patienten werden unter anderem von der XDP Study Group (Philippine Children's Medical Center, Quezon City, Philippinen) betreut. Der X-chromosomal gekoppelte Vererbungsgang dieser Erkrankung ist dafür verantwortlich, dass die Stichprobe fast ausschließlich aus Männern (96 Männer, 3 Frauen) zusammengesetzt war. Das mittlere Alter lag im Jahre 2016 bei  $51,5 \pm 12,8$  Jahren, das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug  $42,4 \pm 9,0$  Jahre.

## 2.2 Material

Die während der Laboranalysen verwendeten Reagenzien, Kits und Geräte sowie die während der Auswertung genutzte Software werden in den folgenden Tabellen aufgeführt.

### 2.2.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
5X Sequencing Buffer	Applied Biosystems
Agarose	Biozym
Betaine [5 M]	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Serva
Desoxynukleosid-Triphosphat (dNTP) Mix [10 nM]	MP
Dimethylsulfoxid (DMSO) [99,9 %]	Sigma-Aldrich
Ethanol [96 %]	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Exonuclease I [20U/μl]	Thermo Scientific
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase [1 U/μl]	Thermo Scientific
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems
HPLC grade H <sub>2</sub> O	J. T. Baker
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen
Midori Green advance DNA stain	Nippon Genetics
Molekulargewichtstandard [100 bp]	New England Bio Labs
Natrium-Acetat (NaAc) [3 M]	Merck
Oligonukleotide / Primer [10 μM]	Eurofins MWG Synthesis GmbH
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Bio Labs
Taq-DNA-Polymerase [5 U/μl] und Puffer	MP

### 2.2.2 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Big Dye® Terminator v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems
GC-Rich PCR System, dNTPack	Roche
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
QIAamp RNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit 250	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen

### 2.2.3 Lösungen

Substanz	Zusammensetzung
Agarose-Gel [300 ml]	300 ml 1-fach TBE-Puffer 4,5 g Agarose 20µl Midori Green
Formamid-Farbstoff	47,5 ml Formamid 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8) 0,01 g Bromphenolblau
TBE-Puffer [10-fach]	890 mM TRIS 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
ExoFast [150 µl]	50 µl Exonuclease I [20U/µl] 100 µl FastAP [1 U/µl]

### 2.2.4 Geräte

Gerätename	Hersteller
Centrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Centrifuge 5804	Eppendorf
Dark Hood DH 50	Biostep
Genetic Analyzer ABI 3130XL und 3500XL	Applied Biosystems
Pipetten	Eppendorf
Thermocycler Flex Cycler	Analytik Jena
Thermocycler Master Cycler Pro	Eppendorf
Thermocycler MJ Mini	BIO-RAD
Thermocycler PTC-100 und PTC-200	Biozym
UV Kamera	BioDoc Analyse

## 2.2.5 Software

Bezeichnung (URL)	Funktion	Hersteller/Urheber
ExAC Browser ( <a href="http://exac.broadinstitute.org/">http://exac.broadinstitute.org/</a> )	Datenbank für genetische Varianten	Exome Aggregation Consortium
Fruitfly Splice Site Prediction ( <a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a> )	Analyse von Spleißstellenmutationen	BDGP Genome Informatics
Gene Runner v5.1	Sequenzdarstellung	Frank Buquicchio/ Helio Genetics
ENSEMBL ( <a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a> )	Genom Browser	EMBI-EBI & WTSI
Mutation Surveyor v3.30	Sequenzanalyse	Soft Genetics
Oligo Explorer v1.1.0	Primerdesign	Gene Link
SNPCheck <a href="https://secure.ngrl.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm">https://secure.ngrl.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm</a> )	Prüfung der Primer auf das Vorliegen von SNPs	NGRL Manchester
UCSC <i>In-silico</i> PCR ( <a href="http://rohsdb.cmb.usc.edu/GBshape/cgi-bin/hgPcr">http://rohsdb.cmb.usc.edu/GBshape/cgi-bin/hgPcr</a> )	<i>In-silico</i> PCR	Jim Kent, University of California
UCSC LiftOver ( <a href="https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver">https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver</a> )	Konversion der genetischen Koordinatensysteme	Jim Kent, University of California
PolyPhen-2: Polymorphism Phenotyping v2 ( <a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a> )	Prädiktionsprogramm	(Adzhubei <i>et al.</i> , 2010)
SIFT: Sorting Tolerant From Intolerant ( <a href="http://sift.jcvi.org">http://sift.jcvi.org</a> )	Prädiktionsprogramm	(Kumar <i>et al.</i> , 2009)
CADD: Combined Annotation Dependent Depletion ( <a href="http://cadd.gs.washington.edu/">http://cadd.gs.washington.edu/</a> )	Prädiktionsprogramm	(Kircher <i>et al.</i> , 2014)
MutationTaster2 ( <a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a> )	Prädiktionsprogramm	(Schwarz <i>et al.</i> , 2014)

Stand der URL vom 10.10.2016

Zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit eines proteinverändernden Effektes der Varianten bzw. Mutationen wurden die oben aufgeführten *in-silico* Analysewerkzeuge genutzt, welche online frei verfügbar sind. Insbesondere der CADD Score (siehe unten) gewinnt an Bedeutung und wurde daher favorisiert. Dieser bildet einen Meta-Score aus SIFT, PolyPhen und 60 weiteren Parametern und erstellt ein Ranking aller bekannten Varianten und ordnet diese nach ihrer wahrscheinlichen Pathogenität. Ein Wert (C-Score) von 20, bedeutet, dass die Variante genomweit zu den pathogensten 1 % zählt, ein Wert von 30 entsprechend 0,1 %. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für eine wahrscheinlich pathogene Variante ein Grenzwert von 15 Punkten angenommen (Kircher, 2014).

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Probenvorbereitung für das NGS

Wie bereits eingangs erwähnt, wurden die Aufbereitung der DNA sowie die Exom-Sequenzierungen im Vorfeld und daher nicht selbst durchgeführt. Um ein vollständiges Bild des Arbeitsablaufs zu geben, werden diese Schritte dennoch im Folgenden dargestellt.

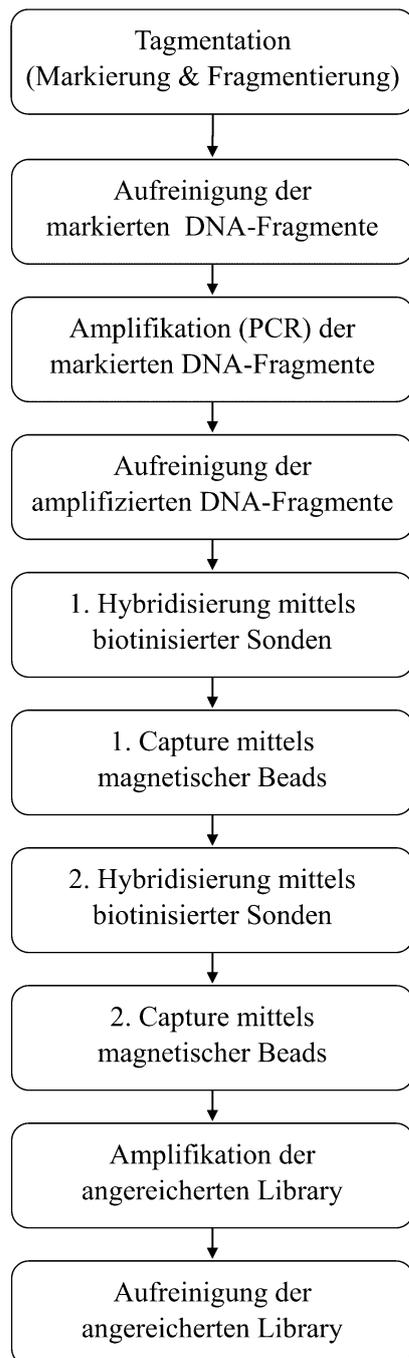


Abb. 2: Probenvorbereitung für das NGS

Ausgangspunkt ist die extrahierte und aufgereinigte genomische DNA. Da im Falle dieser Arbeit die Sequenzierung auf den kodierenden Anteil des Genoms, das Exom, begrenzt werden sollte, kam zur Anreicherung exonischer Abschnitte das *Nextera Rapid Capture Exome (37 Mb) Kit* des Herstellers *Illumina* zur Anwendung. Den Herstellerangaben entsprechend werden 214.405 kodierende Exons erfasst, was 97,8 % des in der Datenbank ENSEMBL aufgeführten Exoms entspricht. Die benötigten Reagenzien sind im Kit enthalten. Der Reaktionsablauf besteht aus einer Reihe von Schritten, deren Funktionsweise im Folgenden erläutert wird (siehe Abb. 6). Für detailliertere Informationen sei auf das verwendete dem Kit beiliegende Herstellerprotokoll verwiesen.

Im ersten Schritt (*tagmentation*), wird die genomische DNA mithilfe von speziellen, Doppelstrang-trennenden Enzymen (Transposomen) in circa 300 bp lange Fragmente geteilt und die Enden dabei mit einer Primer-, einem Index und einer Adapter-Sequenz versehen, welche eine Bindung mit auf der Oberfläche der Trägerplatte angebrachten Oligonukleotiden ermöglicht. Die so gebundenen DNA-Fragmente bilden bei der später erfolgenden Sequenzierung Brücken aus und werden *in-situ* amplifiziert, wodurch sich an den einzelnen Bereichen der Trägerplatte *cluster* derselben Se-

quenzabschnitte bilden. Die Verwendung von Indices erlaubt bei der parallelen Sequenzierung verschiedener Patientenproben die nachträgliche Zuordnung. Mittels PCR werden die so modifizierten DNA-Fragmente (*library*) amplifiziert. Bei 98°C werden die Doppelstränge in Einzelstränge denaturiert. Die Exom-Anreicherung gelingt durch die Zugabe von Biotin-gekoppelten Sonden, welche spezifisch an die exonischen Ziel-Sequenzen binden (Hybridisierung). Streptavidin-tragende, magnetische Beads binden an die Sonden und ermöglichen mithilfe eines Magnetfeldes die Extraktion der exonischen DNA-Fragmente (*capture*). Im nächsten Schritt werden die Beads ausgewaschen und das *capture*-Verfahren wird ein zweites Mal wiederholt. Danach sind die Fragmente bereit für die Sequenzierung.

### 2.3.2 Mutationsanalyse bei der Exom-Sequenzierung

Die bei der Anwendung moderner NGS-Verfahren gewonnenen Daten ermöglichen eine neue Herangehensweise bei der Diagnostik und Erforschung von Erbkrankheiten. Gleichzeitig erfordert die große Menge an detektierten Varianten einen systematischen Algorithmus, um die tatsächlich relevanten Funde herauszufiltern. Das vom Autor dieser Arbeit verwendete Vorgehen zur Eingrenzung und Untersuchung der Kandidatenvarianten wird im Folgenden dargestellt (siehe Abb. 7).

Zunächst erfolgte die Filterung der Rohdaten, welche durch das NGS gewonnen wurden. Dabei wurde entsprechend folgender Bedingungen gefiltert:

- 1) Nur Varianten, welche in Exons oder Spleißregionen liegen, wurden berücksichtigt, da diese mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Proteinveränderungen führen.
- 2) Synonyme, also nicht zum Aminosäureaustausch führende, Varianten wurden herausgefiltert.
- 3) Da es sich bei den (mono-) genetischen PS um sehr seltene Erkrankungen handelt, sollte die Allelfrequenz der Variante in der Datenbank ExAC unter 1 % liegen.
- 4) Die Variante sollte bei allen sequenzierten Erkrankten Familie vorkommen (in der Regel jedoch nicht bei den Gesunden).

Die verbleibenden Kandidatenvarianten bzw. ihre Gene wurden in den Datenbanken PubMed und OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) nachgeschlagen, um nähere In-

formationen zur Genfunktion und Krankheitsassoziation zu erhalten und so eine Rangfolge der zu untersuchenden Varianten zu erstellen.

Anschließend wurden die Kandidatenvarianten mittels Sanger-Sequenzierung validiert, um falsch-positive Funde auszuschließen und durch Einbeziehung weiterer Familienangehöriger die Segregation der Variante untersucht. Die Verifizierung in einer Kontrollpopulation (EPIPARK-Kohorte) durch Sanger-Sequenzierung des betreffenden Sequenzabschnitts diente der Frequenzanalyse bei Gesunden. Zuletzt wurden DNA-Proben einer Stichprobe von etwa 300 an PS erkrankten Patienten auf die Trägerschaft der Variante hin analysiert.

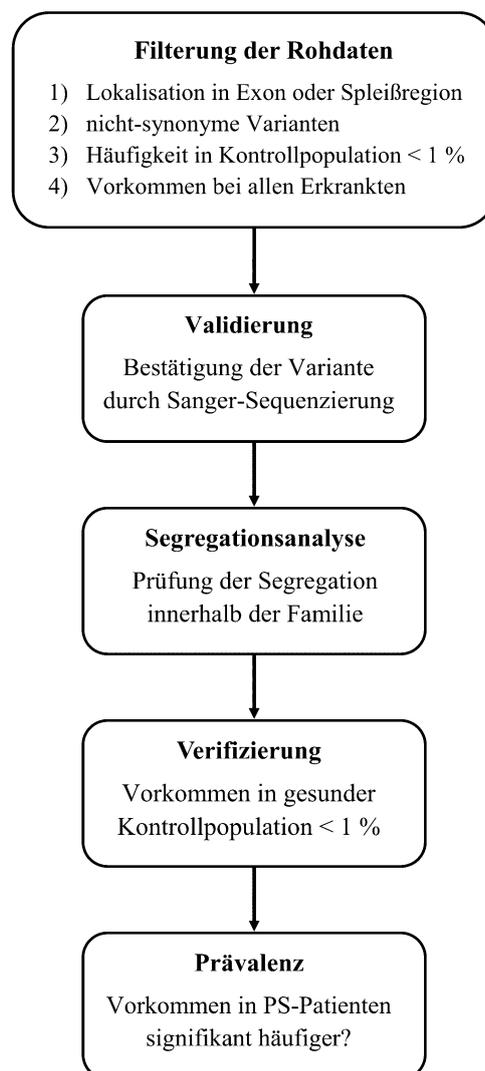


Abb. 7: Algorithmus zur Mutationsanalyse bei Exom-Sequenzierung

### 2.3.3 Primerdesign

Zur Vervielfältigung ausgewählter DNA-Sequenz-Abschnitte werden ein Vorwärts- (F-) und ein Rückwärts- (R)-Primer benötigt, welche komplementär zu beiden Seiten der Variante an die Doppelstränge binden. Aus der Sequenzdatenbank des ENSEMBL Genombrowsers wird die Zielregion sowie die flankierende Sequenz (plus/minus 300 bp) kopiert und mithilfe der Software *Oligo Explorer* ein passendes Primerpaar (F- und R-Primer) erstellt. Dabei sind bestimmte Kriterien für ein optimales Ergebnis zu beachten: Die Länge eines Primers sollte zwischen 18- und 24 bp betragen. Die Annealingtemperatur sollte im Bereich von 55 °C und 65 °C liegen und sich innerhalb des Primerpaares nicht um mehr als 1 °C unterscheiden. Zudem sollten die Primer untereinander möglichst wenige Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, insbesondere nicht am 3'-Ende des Primers. Für eine optimale Bindung sollten sich am Ende die Basen Guanin oder Cytosin befinden und die Bindungsstelle sollte mindestens 70 bp vor der zu untersuchenden Region liegen.

Mithilfe der online verfügbaren Software *SNPCheck* wurde zusätzlich überprüft, dass keine bekannten SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) im Bereich der Bindungssequenz des ausgewählten Primerpaares liegen. Ein Probelauf *in-silico*, also im Computer, erfolgte in der ebenfalls online ausführbaren Software *UCSC In-silico PCR*. Die Synthese der Primer wurde bei der Firma *Eurofins MWG Synthesis GmbH* in Auftrag gegeben.

### 2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Sequenzierung eines Genabschnittes erfordert zuvor die spezifische Vervielfältigung, um eine ausreichende Menge des Untersuchungsmaterials zu erhalten. Durch die Auswahl des Primerpaares wird dieser Bereich innerhalb des Genoms eindeutig definiert. Die PCR erfolgt in mehreren sich wiederholenden Zyklen, welche sich in drei Phasen unterteilen.

- 1) Denaturierung: Durch Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 95 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen des DNA-Doppelstranges und der Primer untereinander getrennt, sodass nur noch Einzelstränge vorliegen.
- 2) Anlagerung der Primer: Die Absenkung auf eine für das Primerpaar individuell zu bestimmende, optimale Temperatur (55–72 °C) ermöglicht die Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge.

- 3) **Elongation:** Eine Erhöhung der Temperatur auf 72 °C erzeugt ideale Reaktionsbedingungen für die Synthese des komplementären Stranges durch die hitzestabile taq-DNA-Polymerase. Dabei werden die sich im Reaktionsgemisch befindlichen Desoxyribonukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP im Anschluss an den Primer in 5'–3'-Richtung an den als Matrize dienenden DNA-Einzelstrang angelagert.

Tab. 6: Reaktionsansatz der Standard-PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen [ $\mu$ l]
HPLC H <sub>2</sub> O	–	–	4,23
dNTPs	1 mM	0,2 mM	3,0
taq-Puffer	10-fach	1-fach	1,5
F-Primer	10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,6
R-Primer	10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,6
Taq-Polymerase	5 U/ $\mu$ l	0,023 U/ $\mu$ l	0,07
DNA	10 ng/ $\mu$ l	3,3 ng/ $\mu$ l	5,0
Gesamtansatz			15,0

## Standard-PCR Programm:

	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer	Funktion
	95 $^{\circ}$ C	5 min	initiale Denaturierung
35 Zyklen	95 $^{\circ}$ C	30 sec	Denaturierung
		30 sec	Annealing (abhängig vom Primer)
	72 $^{\circ}$ C	45 sec	Elongation
		10 min	terminale Elongation
	4 $^{\circ}$ C	unendlich	Endtemperatur

## 2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose Gelelektrophorese lassen sich die amplifizierte PCR-Produkte durch Anlegen einer Spannung abhängig von ihrer Länge auftrennen. Die negativ geladene DNA wandert entlang des elektrischen Feldes in Richtung der Kathode, wobei sich kürzere PCR-Produkte schneller im Gel bewegen als längere. Produkte gleicher Länge sammeln sich so in einer Bande. Somit lassen sich u. a. der Erfolg der PCR und die Spezifität der Primerbindung beurteilen. Als Interkalator bindet der im Gel enthaltene Farbstoff Midori Green

an die DNA-Doppelstränge. Unter UV-Bestrahlung fluoresziert dieser und lässt die Banden sichtbar werden, welche mithilfe einer Kamera aufgenommen werden.

- 1) Suspendieren von 4,5 g Agarose mit 300 ml 1-fach TBE-Puffer (1,5 %)
- 2) Aufkochen der Gelsuspension und Zugabe von 15 µl Midori Green
- 3) Gießen des Gels in eine mit Kämmen bestückte Gelkammer und Entnahme der Kämmen nach Erkalten des Gels
- 4) Einlegen des Gels in eine mit 1-fach TBE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer
- 5) Versetzen von 3 µl des PCR-Produkts mit 3 µl Formamid-haltigen Farbstoff
- 6) Pipettieren der Proben sowie 4 µl eines Längenstandards (100-bp-Leiter) in die Geltaschen
- 7) Elektrophorese bei 120 V für 20-25 min.

Zur Optimierung der PCR bei fehlendem Produkt oder dem Vorliegen von Doppelbanden, d. h. unspezifischer Produkte, wurde folgendem Algorithmus entsprechend vorgegangen (siehe Abb. 8). Die verwendeten Primer und ihre jeweiligen Reaktionsbedingungen sind dem Anhang Abschnitt A zu entnehmen.

Tab. 7: Reaktionsansatz der optimierten PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen [µl]
HPLC H <sub>2</sub> O	–	–	3,73
dNTPs	1 mM	0,2 mM	3,0
taq-Puffer	10-fach	1-fach	1,5
F-Primer	10 µM	0,4 µM	0,6
R-Primer	10 µM	0,4 µM	0,6
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,023 U/µl	0,07
Betaine bzw. DMSO	5 M bzw. 99,9 %	0,17 M bzw. 3,3 %	0,5
DNA	10 ng/µl	3,3 ng/µl	5,0
Gesamtansatz			15,0

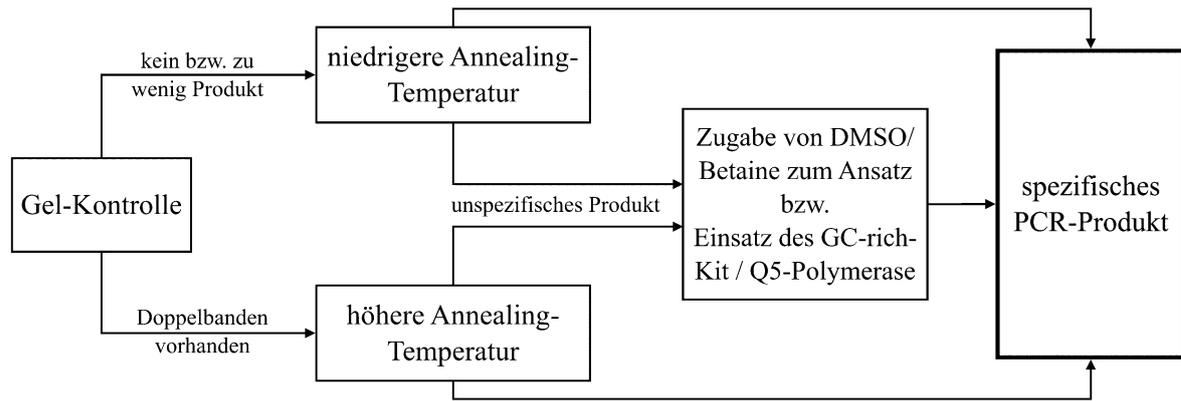


Abb. 8: Algorithmus zur Optimierung der PCR

### 2.3.6 Sanger-Sequenzierung im ABI3130XL/3500XL-System

Das von Sanger etablierte Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) kam zur Sequenzierung der amplifizierten DNA-Abschnitte zum Einsatz. Das in Abschnitt 2.3.4 erzeugte PCR-Produkt (12 µl verbleibend) wurde zur Aufreinigung mit 1,5 µl ExoFast-Lösung versetzt und mit dem ABI37-Programm eines Thermocyclers aktiviert. Hierbei verdaut der Exonuclease I-Anteil endständige Einzelstrang-DNA-Reste und der *Fast Alkaline Phosphatase*-Anteil ungebundene dNTPs in der Lösung.

ABI37-Programm:

Temperatur [°C]	Dauer	Funktion
37	15 min	Inkubation
85	15 min	Inaktivierung
4	unendlich	Endtemperatur

Im folgenden Schritt wurde die amplifizierte und aufgereinigte DNA in der Sequenz-PCR mittels des Kettenabbruchverfahrens für die eigentliche Sequenzierung vorbereitet. Hierzu wurde das unten aufgeführte ABISEQ-Programm genutzt. Im Reaktionsansatz befindet sich dazu ein Terminormix, welcher neben der taq-Polymerase, dem jeweiligen F- bzw. R-Primer sowie den dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) auch die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP enthält. An diese kann die Polymerase aufgrund des Fehlens der Hydroxylgruppe an ihrem 3'-Ende keine Phosphodiesterbindungen zu weiteren Nukleotiden knüpfen, was in der Folge zum Abbruch der Polymerisationsreaktion führt. dNTPs und ddNTPs besitzen

die gleiche Affinität zur Polymerase und werden somit zufällig verbaut. Daher entstehen bei ausreichend langer Prozessdauer mit dem endständigen, fluoreszierenden ddNTP markierte DNA-Fragmente, welche der Länge nach aufgetrennt jede Position der Sequenz darstellen.

Tab. 8: Reaktionsansatz der Sequenz-PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen [ $\mu$ l]
HPLC H <sub>2</sub> O	–	–	5,5
Sequenz-Puffer	5-fach	0,75-fach	1,5
F- bzw. R-Primer	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	0,5
Terminatormix 3.1			0,5
Exo-Fast-Produkt			2,0
Gesamtansatz			10,0

## ABISEQ-Programm:

	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer	Funktion
	96	1 min	Denaturierung
25 Zyklen {	96	10 sec	Annealing
	60	60 sec	Elongation
	4	unendlich	Endtemperatur

Zur Trennung der DNA von den Reagenzien erfolgte im Folgenden die Fällung mit einer Natriumacetat-Ethanol-Lösung, welche die Löslichkeit der DNA herabsetzt, indem sie die Hydrathülle der DNA vermindert. Weiterhin wurde 70%-iger Ethanol hinzugegeben.

- 1) Zugabe von 2  $\mu$ l NaAc [3 M], 50  $\mu$ l Ethanol [96%], 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O zum Sequenz-PCR-Produkt
- 2) Inkubationszeit von 15 min
- 3) Zentrifugation bei 13.000 rpm (16.060 g) für 15 min
- 4) Abnehmen des Überstandes
- 5) Zugabe von 100  $\mu$ l Ethanol [70 %]
- 6) Zentrifugation bei 13.000 rpm (16060 g) für 10 min
- 7) Abnehmen des Überstandes und Trocknen bei 55  $^{\circ}$ C für 5 min
- 8) Zugabe von 15  $\mu$ l HiDi-Formamid und lichtgeschütztes Lösen über Nacht bei 4  $^{\circ}$ C

Die Sequenzierung des auf diese Weise aufbereiteten DNA-Abschnitts erfolgte im Sequenzer *Genetic Analyzer 3130XL* bzw. *3500XL*. Dabei werden die DNA-Fragmente in eine Gel-gefüllte Kapillare gezogen und ihrer Länge nach elektrophoretisch aufgetrennt. Die endständigen, fluoreszierenden ddNTPs der im elektrischen Feld wandernden DNA-Fragmente werden durch einen Laser erfasst, sodass die Farbabfolge (A=grün, C=blau, G=schwarz, T=rot) in eine Basensequenz übersetzt werden kann. Die Sequenzen werden als Abfolge von Kurven, sog. *peaks*, dargestellt, welche die Fluoreszenzintensität der ddNTPs bzw. die Anzahl der Fragmente der jeweiligen Länge widerspiegeln.

### 2.3.7 Analyse der Rohdaten

Mithilfe der Software *Mutation Surveyor v3.30* erfolgte die Auswertung der Sequenzen. Durch den Vergleich mit einer Referenzsequenz, welche das Programm aus der Online-Datenbank abrufen kann, können Veränderungen in der Probensequenz festgestellt werden. Ein homozygoter Basenaustausch resultiert beispielsweise in einem entsprechend andersfarbigen *Peak*, ein heterozygoter Basenaustausch zeigt sich im Auftreten zweier gleich hoher *Peaks* an derselben Position. Ebenso können Insertionen und Deletionen vom Programm erkannt und dargestellt werden (siehe Abb. 11, 16 und 17).

### 2.3.8 RNA-Extraktion

Für die Untersuchung einer Variante, welche sich in einer Spleißregion befindet, kann die Sequenzierung der aus der RNA generierten cDNA Aufschlüsse über die Auswirkungen auf das Spleißverhalten geben. Zur Extraktion der RNA aus der Vollblutprobe wurde das *QIAmp RNA Extraction Kit* genutzt und entsprechend des Herstellerprotokolls (*Qiagen*) angewendet.

### 2.3.9 cDNA-Synthese

Mithilfe des *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* erfolgte die Umwandlung der extrahierten RNA in sequenzierbare cDNA mittels der im Enzym-Mix enthaltenen *Maxima Reverse Transcriptase* (siehe Herstellerprotokoll). Die dabei erhaltene cDNA wurde in einer PCR amplifiziert und das Produkt im Agarosegel elektrophoretisch überprüft. Bereits die Länge des Produkts ermöglichte Rückschlüsse auf ein verändertes Spleißen der mRNA.

Die im Anschluss folgende Sequenzierung nach oben beschriebenem Standardprotokoll erlaubte die weitere Analyse der Sequenz im Hinblick auf eine Veränderung der Anordnung der Exons. Hierbei würde sich eine relevante Mutation im Falle eines alternativen Spleißens in einer veränderten Basenfolge darstellen.

## 3 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Versuche nach Projekten aufgeschlüsselt präsentiert und erläutert.

### 3.1 Monogenetische Ursachenforschung mittels NGS

#### 3.1.1 Projekt 1: Biallelische Mutation im Gen *PLA2G6* bei Familie M mit früh beginnendem PS

Bei den beiden ältesten Schwestern wurden durch Frau Dr. Suzanne M. de la Monte (Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, USA) *post-mortem* Untersuchungen des Hirngewebes durchgeführt. Dabei zeigten sich bei der älteren Schwester (L-2491) Lewy-Körperchen in der *Pars compacta* der *Substantia nigra*, im *Locus ceruleus* und im *Nucleus basalis Meynert*, passend zur Diagnose eines idiopathischen PS. Auch im Falle der zweiten, bereits verstorbenen Schwester (L-2478) ergab die pathologische Untersuchung des Gehirns Lewy-Körperchen in der *Substantia nigra* und im *Locus ceruleus*. Darüber hinaus zeigten sich jedoch auch eine Atrophie des Cortex und der limbischen Strukturen, *neurofibrillary tangles* im Temporallappen, wie sie beim Morbus Alzheimer zu finden sind, sowie eine ausgedehnte Gliose. Bemerkenswert waren in diesem Falle insbesondere eine deutliche Eisenablagerung in der *Pars reticularis* der *Substantia nigra*, dem *Globus pallidus* und der *Amygdala*, welche zur Diagnose einer *Neurodegeneration with brain iron accumulation* (NBIA) passen (siehe Abb. 9).

Bei vier Mitgliedern der Familie M erfolgte durch die Firma Atlas Biolabs eine Exom-Sequenzierung. Im Falle der ältesten Tochter (L-2491) war bedauerlicherweise für eine Untersuchung nicht mehr ausreichend genetisches Material in der erforderlichen Qualität vorhanden, da mit diesem bereits im Vorfeld dieser Arbeit umfangreiche Studien durchgeführt worden waren (Zschiedrich, 2007). Im Rohdatensatz befanden sich bei jedem der vier Familienmitglieder ungefähr 40.000 Varianten. Diese wurden zunächst nach dem im Abschnitt 2.3.2 geschilderten Verfahren schrittweise gefiltert. Die Exomdaten der Schwestern wurden anschließend überlappt, um gemeinsame Varianten zu finden.

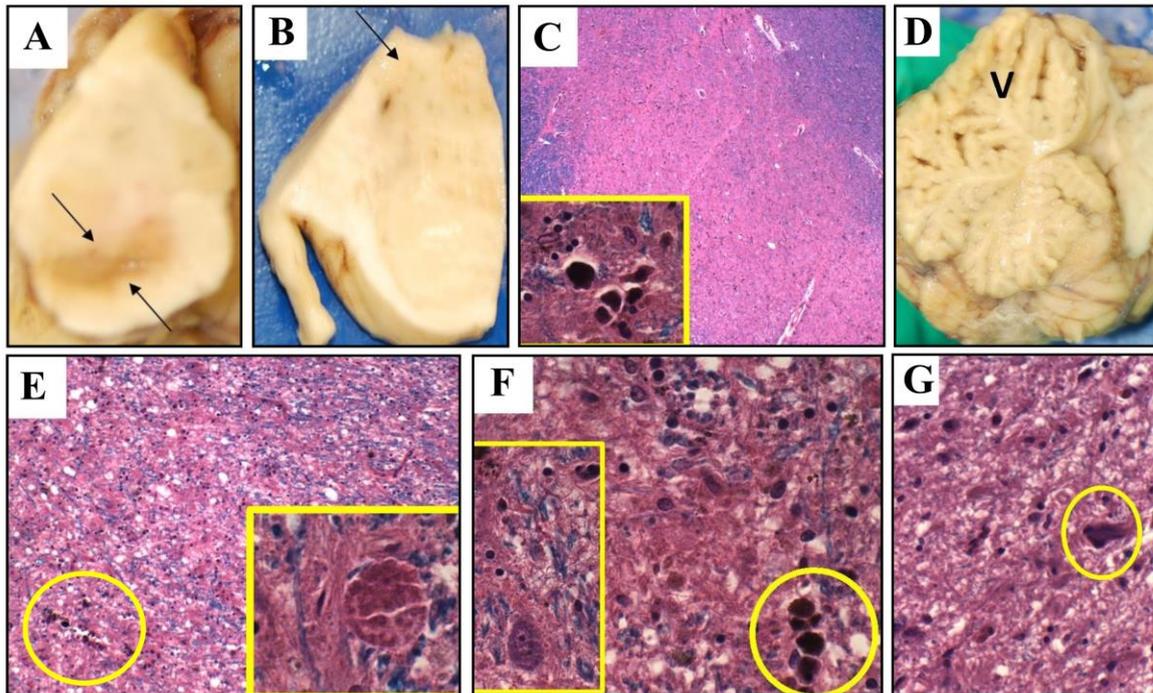


Abb. 9: Aufnahmen der pathologischen Befunde bei Patientin L-2478. (A) Die makroskopische Ansicht eines Mittelhirn-Schnittes der *Substantia nigra* (SN) zeigt den Verlust der Pigmentierung in der *Pars compacta* (oberer Pfeil) und rostige Verfärbung in der *Pars reticularis* (unterer Pfeil). (B) zeigt eine Depigmentierung des *Locus ceruleus* (Pfeil). (C) Die 40-fache Vergrößerung der SN zeigt den deutlichen Verlust (pigmentierter) dopaminergener Neurone in Form des breiten pinkfarbenen Bandes und freies sowie makrophagen-inkorporiertes Neuro-Melanin (Kasten). (D) Ein median-sagittaler Schnitt durch das Kleinhirn offenbart eine schwere Atrophie insbesondere im Bereich des *Vermis* (V). (E) Die 160-fache Vergrößerung der SN *Pars compacta* zeigt schweren Neuronenverlust mit ersetzender Gliose, vereinzelt Lewy-Lörperchen (Kreis) und verstreuten granulären Spheroiden (Kasten). (F) Die 400-fache Vergrößerung der SN *Pars reticularis* mit Neurodegeneration und Gliose, Vakuolisierung des Neuropils zwischen vitalen Neuronen (Kasten) sowie Eisenaggregation (Kreis). (G) Die Aufnahme des ventralen Kerngebietes des Thalamus zeigt den deutlichen Neuronenverlust, Gliose und eine gesteigerte Eisenablagerung (Kreis). Die Färbung der histologischen Schnitte erfolgte mit Luxol Fast Blue und Hämatoxylin-Eosin. Freundlicherweise bereitgestellt durch Prof. Suzanne de la Monte, MD, MPH.

Tab. 9: Filterung der Exom-Datensätze der Familie M

Code	Varianten gesamt	exonische Varianten	nicht-synonyme Varianten	QC	Frequenz < 0,5 %	Überlappung L-2478 & L-2479	NBIA-Gen* Varianten
L-2477	39752	23018	11774	7218	625	-	1
L-2478	39303	22725	11562	6919	616	} 338	2
L-2479	39716	22946	11754	7138	627		2
L-2480	40018	22954	11716	7257	627	-	1

\*NBIA-Gene: *PANK2*, *PLA2G6*, *C19orf12*, *FA2H*, *ATP13A2*, *WDR45*, *COASY*, *FTL*, *CP*, *DCAF17*; QC – Qualitätskontrollfilter (HaplotypeScore > 13.0, MQRankSum < -12.5, ReadPosRankSum < -8.0, QD < 2, MQ < 40, DP < 10, GQ < 13) vgl. GATK Best Practices (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>)

Dabei ließ sich jedoch keine ausreichende Reduktion der zu untersuchenden Kandidatengene erzielen. Wie nach den in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen Vorarbeiten zu erwarten, waren keine Varianten in den PARK-Genen *SNCA*, *Parkin* und *DJ-1* zu finden. Die Informationen des *post-mortem* Befundes der jüngst verstorbenen Schwester (L-2478) über die ausgedehnten Eisenablagerungen in den Kerngebieten erlaubten eine weitere Eingrenzung. Die Rohdaten der Exom-Sequenzierung wurden erneut gefiltert, indem Gene favorisiert wurden, deren Mutationen in der Literatur bereits mit Eisenablagerungen in Verbindung gebracht wurden (Gregory und Hayflick, 2014). Insbesondere die Gruppe der NBIA-Erkrankungen (*Neurodegeneration with brain iron accumulation*) war unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Befunde im Fokus der Suche. Dabei stellte sich heraus, dass das Gen *PLA2G6*, welches für die Phospholipase A2 kodiert, in der Elterngeneration zwei verschiedene heterozygote Mutationen aufwies, welche in den erkrankten Töchtern compound-heterozygot vorlagen (siehe Tab. 10). Im Falle der ersten Mutation handelte es sich um einen Basenaustausch von Guanin zu Thymin, welcher im Aminosäureaustausch von Arginin zu Cystein resultiert, wobei der Wildtyp in vielen Spezies konserviert ist (Abb. 10). Die zweite Mutation betraf die 3'-Spleißstelle des vierten Introns und besteht in einem Basenaustausch von Cytosin zu Thymin. Die *in-silico* Analyse unter Berücksichtigung der Werte der Prädiktionsprogramme PolyPhen, SIFT und CADD deutete auf eine funktionsverändernde Auswirkung der Mutationen hin. In ExAC war lediglich ein Allel für die exonische Mutation gelistet, welche bei einem Europäer gefunden wurde, wobei die Spleißmutation nicht aufgeführt war.

Tab. 10: Gefundene Mutationen bei Familie M

Gen	Position (hg38)	Exon	Variante	PolyPhen	SIFT	CADD	Allelfrequenz (ExAC)
<i>PLA2G6</i>	chr22:38120874	12	c.1627C>T; p.Arg543Cys	0 (deleterious)	0.952 (prob. dmg)	34,0	0,000015
<i>PLA2G6</i>	chr22:38140170	Intron 4	c.610-1G>T; splice-site	n. v.	n.v.	23,09	0

chr - Chromosom; CADD - Combined Annotation Dependent Depletion, n. v. - nicht vorhanden; prob. dmg - probably damaging

Die Validierung der Varianten mittels Sanger-Sequenzierung bestätigte die NGS-Befunde. Exemplarisch sind die Sequenzen der jüngsten erkrankten Schwester (L-2479) in Abbildung 10 dargestellt. Eine gezielte Sequenzierung der betroffenen *PLA2G6*-Mutation im Falle der ältesten bereits verstorbenen Schwester (L-2491) blieb trotz umfangreicher Bemühungen bei verschiedenen Reaktionsbedingungen aufgrund der mangelhaften Qualität und Quantität des Probenmaterials erfolglos. In Kenntnis der genetischen Daten ergibt sich der unten abgebildete Stammbaum (Abb. 12) mit gesichert compound-heterozygotem Mutationsstatus bei den untersuchten Schwestern.

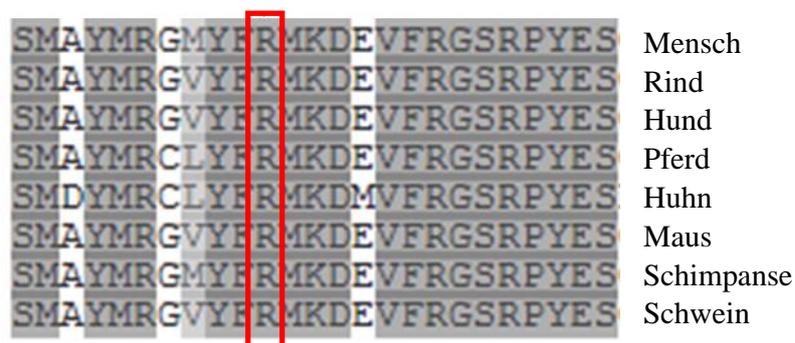


Abb. 3: Konservierung der Aminosäure des Wildtyps am Locus der Mutation p.Arg543Cys

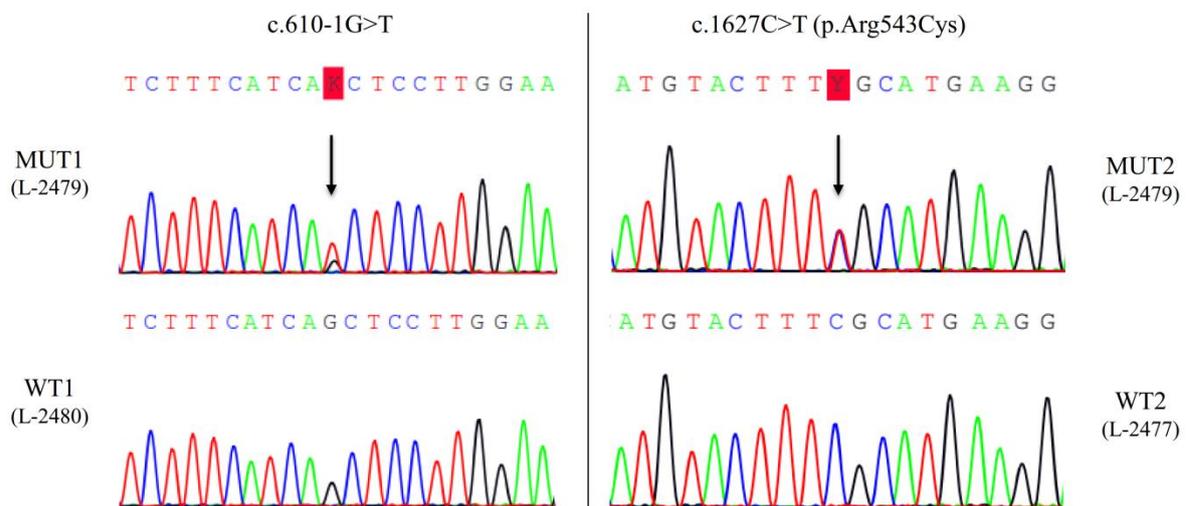


Abb. 11: Die Elektropherogramme der erkrankten Schwester L-2479 zeigen den compound-heterozygoten Mutationsstatus. Gegenübergestellt sind die korrespondierenden Wildtypsequenzen des Vaters (L-2480) und der Mutter (L-2477), welche heterozygote Träger der jeweils anderen Mutation sind. MUT1 steht für die Spleißstellen-Mutation (c.610-1G>T), MUT2 für die Punktmutation in Exon 12 (c.1627C>T, p.Arg543Cys, rs753874848). Farben: blau=Cytosin, rot=Thymin, grün=Adenin, schwarz=Guanin.

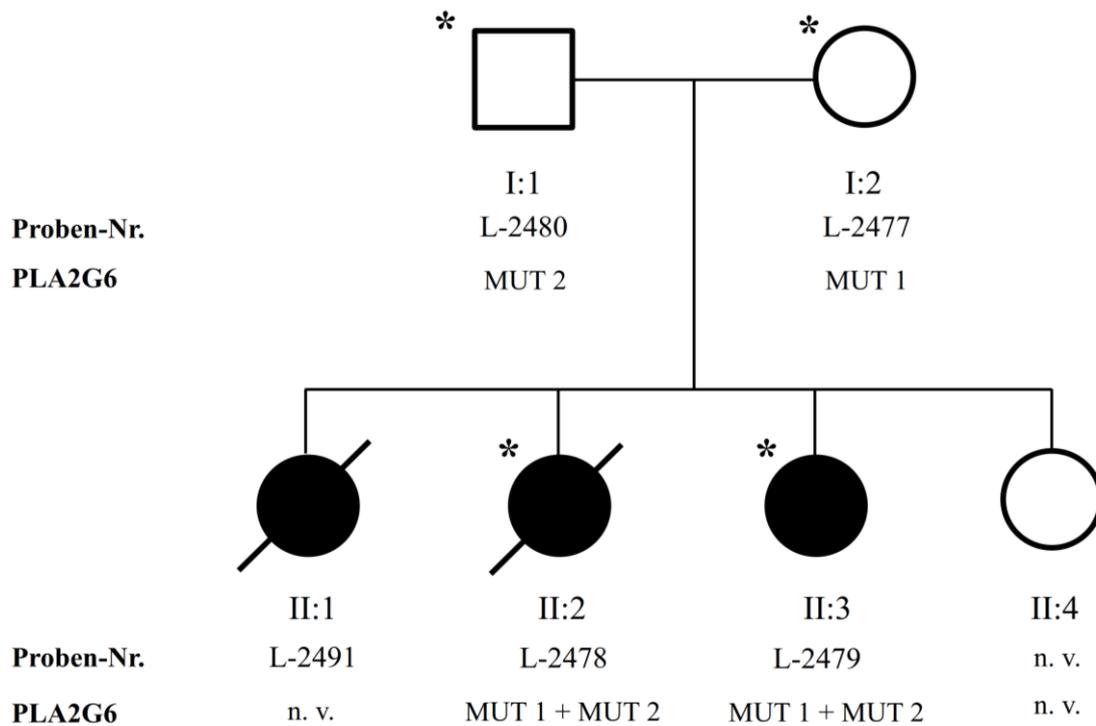


Abb. 12: Stammbaum der Indexfamilie M; Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Familienangehörige. Ein Querstrich zeigt verstorbene Personen an. Nicht erkrankte Familienmitglieder sind weiß und erkrankte schwarz gekennzeichnet. Die römischen Zahlen (I-II) zeigen die Generation an, arabische Zahlen (1-4) die einzelnen Individuen innerhalb dieser. Nicht vorhandene Angaben sind mit n. v. vermerkt. Ein durchgeführtes *next-generation sequencing* zeigt ein Asterix (\*) an. Die gefundenen Mutationen sind wie folgt gekennzeichnet: MUT1 (c.610-1C>A) und MUT2 (c.1627G>A, p.Arg543Cys, rs753874848).

Um einen Überblick über die bisher beschriebenen Fälle von *PLA2G6*-Mutationen in Zusammenhang mit Eisenablagerungen zu gewinnen erfolgte eine systematische Literaturrecherche (Stand: 20.09.2015) mit dem Fokus auf Publikationen, welche *post-mortem* Befunde enthielten. Der Suchalgorithmus ist der Abbildung 13 zu entnehmen. Dabei wurde deutlich, dass alle gefundenen bisher berichteten Fälle der (infantilen) neuroaxonalen Dystrophie zuzuordnen sind. Ablagerungen von  $\alpha$ -Synuclein waren bei allen und Eisenablagerungen bei 75 % der Fälle vorhanden (Tab. 11).

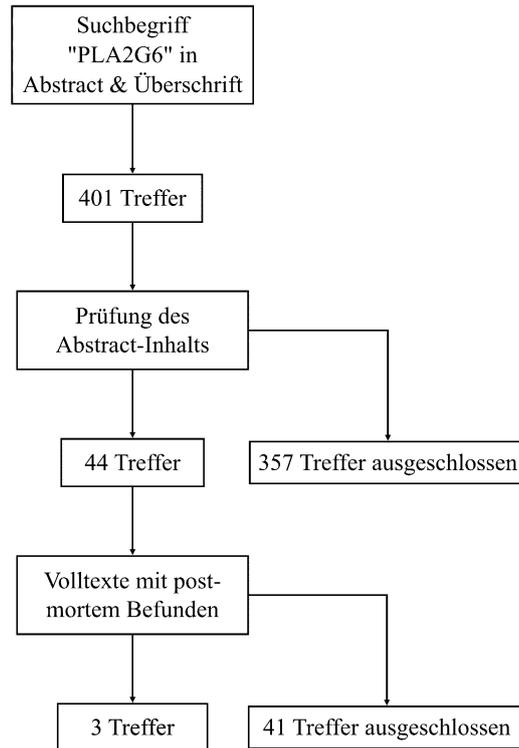


Abb. 13: Suchalgorithmus der Literaturrecherche zu *PLA2G6* *post-mortem* Befunden (Stand: 20.09.2015)  
Es erfolgte die strukturierte Recherche mithilfe der Literaturdatenbank PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) unter Eingabe des Suchbegriffs „*PLA2G6*“. Der Inhalt des Abstracts wurde auf Relevanz geprüft und die verbleibenden Volltexte auf das Vorliegen von *post-mortem*-Befunden untersucht. Am Ende wurden drei Publikationen eingeschlossen (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Übersicht über nach Literaturrecherche gefundene Fälle mit Mutationen im Gen *PLA2G6* und *post-mortem* Befunden

Fall-Nr. (original)	Geschl.	Erkrankungs- alter	Lebens- alter	Diagnose	Parkinson-Symptome	Eisen- ablagerung	$\alpha$ -Synuclein	Referenz
1	w	3 Jahre	23 Jahre	INAD	k. A.	+	+	(Gregory <i>et al.</i> , 2008)
2 (1)	w	18 Jahre	36 Jahre	juvenile NAD	Bradykinesie, Rigor, Dysphagie, kognitiver Abbau	+	+	(Paisan-Ruiz <i>et al.</i> , 2012)
3 (3)	m	Säuglingsalter	8 Jahre	INAD	Dystonien	-	+	(Paisan-Ruiz <i>et al.</i> , 2012)
4 (4)	m	Kindesalter	18 Jahre	juvenile NAD	Dystonien, Dysphagie	+	+	(Paisan-Ruiz <i>et al.</i> , 2012)
5 (5)	m	1,2 Jahre	8 Jahre	INAD	Dysphagie	+	+	(Paisan-Ruiz <i>et al.</i> , 2012)
6	w	3 Jahre	23 Jahre	INAD	Bradykinesie, Rigor, Hypomimie	+	+	(Riku <i>et al.</i> , 2013)
L-2491*	w	21 Jahre	26 Jahre	PS	Bradykinesie, Rigor, Tremor, Hypomimie, posturale Instabilität, Dyskinesien	-	+	(Klein <i>et al.</i> , 2016)
L-2478*	w	21 Jahre	52 Jahre	PS	Bradykinesie, Rigor, Tremor des linken Armes, Dyskinesien	+	+	(Klein <i>et al.</i> , 2016)

Stern (\*) - eigene Fälle; INAD - (infantile) neuroaxonale Dystrophie; PS - Parkinson-Syndrom; k.A. - keine Angabe; + - vorhanden; - - nicht vorhanden.

Adaptiert von Riku Y *et al.*, Acta Neuropathol Commun 2013, Table 1

## 3.1.2 Projekt 2: PS-Familie B

Die in der Exom-Sequenzierung erhaltenen Varianten wurden annotiert und nach dem Auftreten bei allen untersuchten Familienmitgliedern gefiltert (siehe Abschnitt 2.3.2). Dabei wurden nur exonische, proteinverändernde *single nucleotide* Varianten (SNV) eingeschlossen, welche eine Allelfrequenz von unter 0,01 bzw. 1 % in den Datenbanken des *Exome Sequencing Projects* sowie des *1000 Genome Projects* aufwiesen. Aus den verbleibenden 26 Varianten wurden jene vier Kandidaten zur weiteren Untersuchung ausgewählt, welche unter Berücksichtigung der Funktion sowie des Pathogenitätsscores SIFT, PolyPhen und CADD als aussichtsreiche Kandidaten verblieben. Durch eine Recherche in den Datenbanken UniProt (<http://www.uniprot.org/>) und OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man; <http://www.omim.org/>) wurden Informationen zur Krankheitsassoziation, Expression und Funktion der betroffenen Gene gewonnen (siehe Tab. 12).

Tab. 12: Untersuchte Kandidatenvarianten bei Familie B

Gen	Position (hg38)	Variante	Expres- sion	Krankheits- assoziation	Funktion	CADD
<i>RAPSN</i>	11:47448079 Exon 2	c.264C>A; p.Asn88Lys	Skelett- muskel	kongenitales myasthenes Syndrom, Fetales Akine- sie Syndrom	Stabilisierung von postsynap- tischen Acetyl- cholin- Rezep- toren	28,3
<i>SALL3</i>	18:78993121 Exon 2	c.1130T>C; p.Leu377Pro	ubiquitär	nicht bekannt	Transkriptions- faktor	28,8
<i>TPI1</i>	12:6869174 Exon 3	c.426G>C; p.Glu142Asp	Blutzellen	hämolytische Anämie	Glycolyse und Gluconeogene- se	26
<i>SHANK2</i>	11:70473428 Exon 11	c.3227T>C; p.Ile1076Thr	Colon- epithel	erhöhte Sus- zeptibilität für Autismus	Verankerung von postsynpa- tischen Rezep- toren	12,19
<i>ECE1</i>	2:21341759 Exon 11	c.1349G>A; p.Ser450Asn	Placenta, Lunge, Neben- niere, Herz	HCAD, Essentieller Hypertonus	Proteolytische Prozessierung von Endothelin-1	10,13
<i>KIAA0040</i>	1:175160812 -175160819 Exon 4	c.195_202delCAA GAAGA; p.Asn65Lysfs	ubiquitär	n. b.	T-Zell-Epitop HLA-DR11	33
<i>RPL29</i>	3:51993843 Exon 4	c.385_386insCCA AGG; p.Lys130_Asp131i nsAlaLys	Uterus	n. b.	Heparin- bindung	15,48

Gen	Position (hg38)	Variante	Expres- sion	Krankheits- assoziation	Funktion	CADD
<i>KIAA2018</i>	3:113659763 Exon 7	c.1919C>T; p.Pro640Leu	n. b.	n. b.	Transkriptions- faktor	26,1
<i>PLOD2</i>	3:146106560 Exon 5	c.587C>T; p.Thr196Ile	Pancreas, Skellet- muskel, Herz, Placenta, Niere	Bruck Syn- drom 2	Kollagensyn- these	28,2
<i>ARH- GEF38</i>	4:105659156 Exon 10	c.1336G>A; p.Asp446Asn	ubiquitär	n. b.	Guanin- Nucleotid releasing factor	33
<i>TBP</i>	6:170561950 -170561952 Exon 3	c.216_218delACA; p.Gln95del	ubiquitär	Spinocerebel- läre Ataxie 17	Transkrip- tionsfaktor	9,79
<i>SBSPON</i>	8:73067420 Exon 5	c.716G>T; p.Arg239Leu	Aorta	n. b.	n. b.	24,7
<i>SLC27A4</i>	9:128348650 Exon 4	c.662T>A; p.Leu221Gln	Hirn, Colon, Niere, Hoden	Ichthyosis prematurity syndrome	Fettsäure- transport- Protein	25,3
<i>BMS1</i>	10:42796740 Exon 10	c.1496C>T; p.Pro499Leu	ubiquitär	Aplasia cutis congenita	Ribosomale Biosynthese	15,27
<i>PGA3</i>	11:61203569 Exon 1	c.5A>G; p.Lys2Arg	Magen, Pancreas	n. b.	Pepsinogen-3- Synthese	19,82
<i>C2CD3</i>	11:74057414 Exon 25	c.5082G>T; p.Gln1694His	ubiquitär	Orofa- ciodigitales Syndrome 14	Regulator für Zilienbildung, hedgehog- Signalweg und Embryonal- entwicklung	14,06
<i>APLP2</i>	11:13013009 3 Exon 11	c.1511G>T; p.Arg504Leu	Placenta, Hirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Endothel	n. b.	Membran- protein in Spermien	35
<i>TMPO</i>	12:98544517 Exon 6	c.859G>C; p.Ala287Pro	ubiquitär, Thymus	Dilalative Kardiomyopa- thie	Strukturprotein des Nucleus	23,2
<i>MAP3K9</i>	14:70742411 Exon 6	c.1507G>A; p.Gly503Ser	Epithelien	Ösophagus- karzinom	MAP-Kinase Signalweg	34
<i>CX3CLI</i>	16:57379748 Exon 2	c.185C>T; p.Ala62Val	Hirn, Herz	n. b.	Leukozytenmi- gration und Adhäsion	23,5
<i>FHOD1</i>	16:67238216 Exon 5	c.533G>A; p.Ser178Asn	ubiquitär, Milz	n. b.	Zellformierung und Extremitäten- entwicklung	15,43

Gen	Position (hg38)	Variante	Expres- sion	Krankheits- assoziation	Funktion	CADD
<i>RAI1</i>	17:17793789 -17793791 Exon 3	c.841_843delCAG; p.Gln281del	Hirn, Herz, ubiquitär	Smith-Magenis syndrome	Zirkadianer Rhythmus	12,8
<i>CDC27</i>	17:47157041 Exon 7	c.714delT; p.Val239Terfs	ubiquitär	n. b.	Zellzyklus- regulation	29,2
<i>PRKCSH</i>	19:11447529 -11447531 Exon 11	c.940_942delGAG; p.Glu325del	ubiquitär	Polycystische Leber- erkrankung 1	Qualitäts- kontrolle der Protein- synthese	10,85
<i>MED15</i>	22:20566527 -20566529 Exon 7	c.751_753delCAG; p.Gln262del	ubiquitär	n. b.	RNA- Polymerase II- Mediator	15,49
<i>MNI</i>	chr22:277989 48 Exon 1	c.1596_1597insTG C; p.Gln532dup	ubiquitär	Meningeom	Knochenent- wicklung des Schädels	1,094

grau hinterlegt - für die Validierung ausgewählte Kandidatenvarianten; n.b. - nicht bekannt; HCAD - Hirschsprung disease, cardiac defects and autonomic dysfunction

Diese Kandidatenvarianten wurden mittels der Sanger-Sequenzierung validiert und bei den übrigen nicht in der Exom-Sequenzierung eingeschlossenen Familienmitgliedern ebenfalls untersucht. Die Segregation der Varianten kann der Abbildung 14 entnommen werden. Jede der vier untersuchten Varianten taucht bei den erkrankten Familienmitgliedern in heterozygoter Form auf. Die nicht erkrankte Schwester (L-1963) ist ebenfalls Trägerin der Varianten in den Genen *RAPSN*, *TPII* und *SHANK2*. Einzig die Variante im Gen *SALL3* segregiert dem klinischen Bild entsprechend. Zu beachten ist allerdings die inkomplette Penetranz der Erkrankung ausgehend von der Hypothese eines autosomal-dominanten Erbganges, welche besonders im Falle des nicht erkrankten Vaters deutlich wird. Die lückenlose Segregation ist somit nicht maßgeblich. Eine *in-silico* Analyse der gefundenen Varianten mithilfe des CADD-Scores im folgenden Schritt ergab für die Varianten in *RAPSN*, *TPII* und *SALL3* Werte von über 15 Punkten (siehe Abschnitt 2.3.2), *SHANK2* lag mit 12,19 Punkten unter dem Grenzwert und schied somit als Kandidat aus.

Zur Erfassung der Prävalenz von Varianten in den verbleibenden Kandidatengenen *RAPSN*, *TPII* und *SALL3* in an PS erkrankten Patienten erfolgte die Sanger-Sequenzierung von 277 DNA-Proben aus der institutseigenen Stichprobe, von denen 164 männlich und 108 weiblich waren. Das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug  $48,8 \pm 22,3$  Jahre. Der zu untersuchende Sequenzbereich wurde, sofern es die Länge zuließ, auf das komplette, die Variante tragende Exon erweitert. Für *SALL3* betrug er 326 bp (Anteil des Exon 2), für

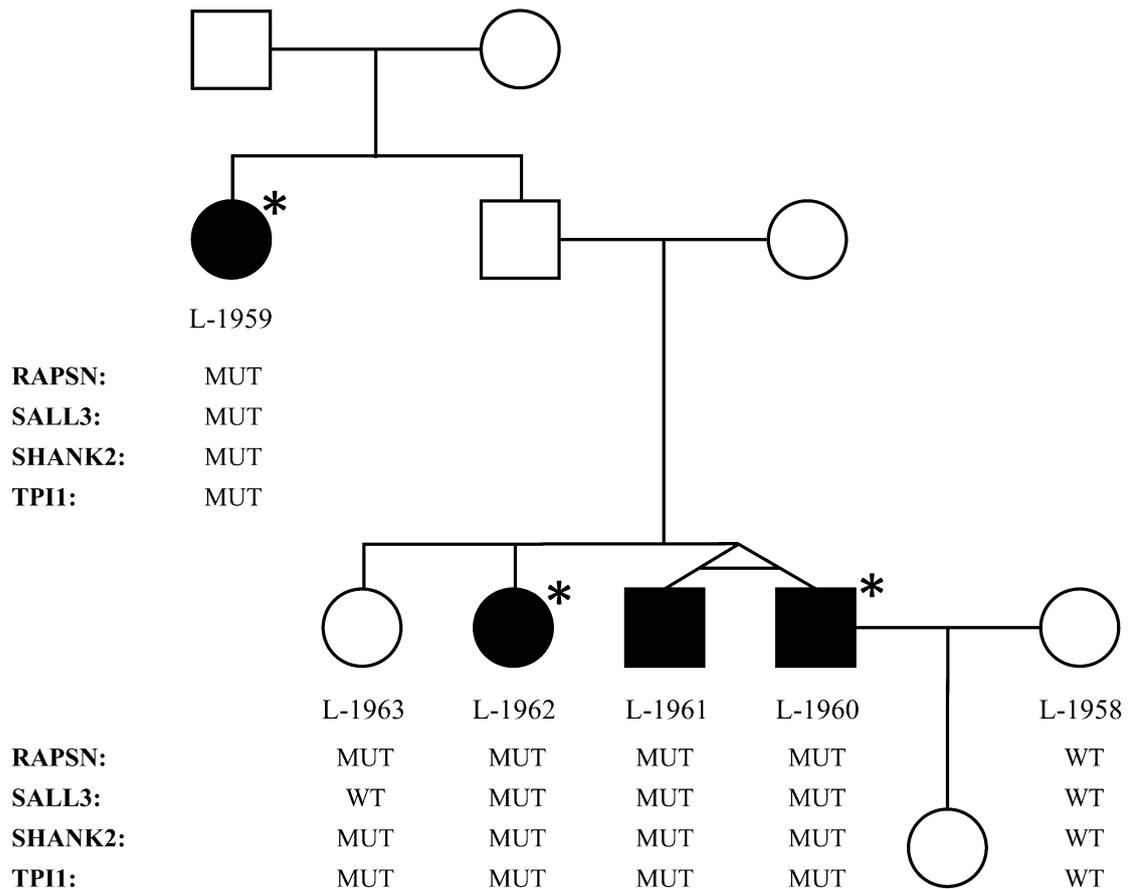


Abb. 14: Segregation der Kandidatenvarianten in Familie B. MUT kennzeichnet heterozygote Träger der Variante, WT symbolisiert den Wildtyp. Der Stern (\*) zeigt durch NGS untersuchte Individuen an.

*TPI1* (Exon 3 und 4) 633 bp und für *RAPSN* (Exon 2) 612 bp. Die detektierten Varianten mit ihren Allelfrequenzen in der PS-Stichprobe im Vergleich zur in ExAC gelisteten Population (nicht finnische Europäer, Abfrage am 18.04.2016) sowie die erhobenen *in-silico* Scores sind in Tabelle 13 dargestellt.

Hervorzuheben ist die Kandidatenvariante im Gen *RAPSN* (p.Asn88Lys; rs104894299), welche im Zuge der Stichprobenuntersuchung bei einem weiteren männlichen Patienten (L-2572) gefunden wurde, welcher selbst auch Träger einer *LRRK2*-Mutation ist. In der Familie dieses an *early-onset* PS erkranktem Indexpatienten segregiert die *LRRK2*-Mutation (p.Gly2019Ser; rs34637584) mit reduzierter Penetranz. Die Sanger-Sequenzierung der *RAPSN*-Variante p.Asn88Lys zur Untersuchung der Segregation in der *LRRK2*-Mutation tragenden Familie ergab das in Abbildung 15 gezeigte Bild.

Tab. 13: Die für die Kandidatengene bei Fam. B detektierten Varianten der PS-Stichprobe

Gen	Exon	Variante (dbSNP ID)	MUT-Träger (PS-St)	Allelfreq. (PS-St)	Allelfreq. (ExAC)	SIFT	PolyPhen	CADD
<i>RAPSN</i>	2	c.456T>C; p.Tyr152Tyr (rs7111873)	140/277 (hom.) 115/277 (het.)	0,7130	0,7234	n. v.	n. v.	0,09
<i>RAPSN</i>	Intron	c.193-15C>T (rs45547231)	6/277 (hom.) 66/277 (het.)	0,1408	0,1475	n. v.	n. v.	9,435
<i>RAPSN</i>	2	c.241T>C; p.Phe81Leu (rs57878668)	4/277 (het.) L-583, L-3246, L-2804, L-3371	0,0072	0,0065	0,68 (tol.)	0,005 (benign)	16,99
<i>RAPSN</i>	2	c.264C>A; p.Asn88Lys (rs104894299)	2/277 (het.) L-608, L-2572	0,0036	0,0024	0 (del.)	0,994 (prob. dmg.)	28,6
<i>RAPSN</i>	2	c.474C>T; p.Asp158Asp (rs56245238)	1/277 (het.) L-1369	0,0018	0,0020	n. v.	n. v.	5,340
<i>SALL3</i>	2	c.1072C>T; p.Leu358Leu (rs2472643)	2/277 (hom.) 51/277 (het.)	0,0996	0,1460	n. v.	n. v.	10,5
<i>SALL3</i>	2	c.987G>A; p.Pro329Pro (rs137944092)	2/277 (hom.) 36/277 (het.)	0,0722	0,3429*	n. v.	n. v.	7,457
<i>SALL3</i>	2	c.1130T>C; p.Leu377Pro (rs143063115)	0/277	0	0,0020	0 (del.)	0,999 (prob. dmg.)	28,8
<i>TPII</i>	3	c.426G>C; p.Glu142Asp (rs121964845)	0/277	0	0,0001	0,02 (del.)	0,947 (prob. dmg.)	26
<i>TPII</i>	3	c.432T>C; p.Asp144Asp (rs141972556)	2/277 (het.) L-510, L-1788	0,0036	0,0017	1 (tol.)	n. v.	5,853
<i>TPII</i>	4	c.477C>T; p.Leu159Leu (rs138131191)	1/277 (het.) L-1590	0,0018	0,0010	1 (tol.)	n. v.	16,79
<i>TPII</i>	4	c.552_555delGACA; p.(Thr185Argfs*7)	1/277 L-2645	0,0018	0	n. v.	n. v.	35
<i>TPII</i>	Intron	c.568+119G>A	1/277 (het.) L-1997	0,0018	0	n. v.	n. v.	7,967
<i>TPII</i>	Intron	c.436-12_436- 11delGT (rs782457320)	1/277 (het.) L-3277	0,0018	0,0001	n. v.	n. v.	9,737
<i>SHANK2</i>	11	c.3227T>C; p.Ile1076Thr	n. u.	n. u.	0,0014	0,63 (tol.)	0,003 (benign)	12,19

het. - heterozygot; hom. - homozygot; ExAC - Exome Aggregation Consortium; Allelfreq. - Allelfrequenz; PS-St - PS-Patienten-Stichprobe; n. v. - nicht verfügbar; n. u. - nicht untersucht; tol. - tolerated; del. - deleterious; grau hinterlegt - Kandidatenvarianten; \* - sehr geringe Abdeckung der Variante in ExAC (nur 24 von insgesamt 70 Allelen gelistet)

Ein Vergleich des Segregationsverhaltens innerhalb der Familien B und P ergab das Auftreten von weniger Phänokopien, mehr betroffenen und weniger gesunden positiven Mutationsträgern im Falle der *RAPSN*-Mutation (siehe Tab. 14).

Insgesamt betrachtet, lag keine der Kandidatenvarianten in der PS-Patientengruppe im Vergleich zur ExAC-Population signifikant häufiger vor.

Tab. 14: Vergleich der Segregation der Mutationen rs104894299 (*RAPSN*) und rs34637584 (*LRRK2*)

Mutationsstatus	<i>LRRK2</i>	<i>RAPSN</i>
Betroffene <b>Mutationsträger</b>	1	2
Betroffene <b>Wildtypträger</b> (Phänokopie)	1	0
Möglich betroffene <b>Mutationsträger</b>	2	1
Möglich betroffene <b>Wildtypträger</b>	0	1
Gesunde <b>Mutationsträger</b>	3	1
Gesunde <b>Wildtypträger</b>	4	6
<b>Gesamt</b>	<b>11</b>	<b>11</b>

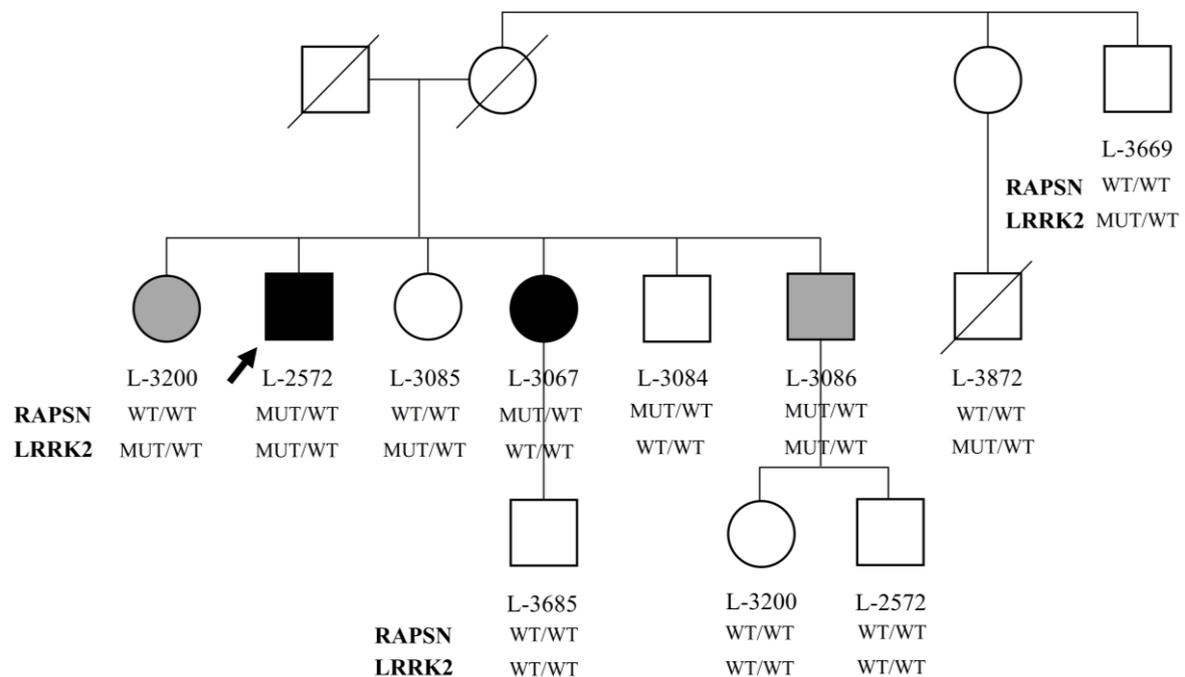


Abb. 15: Stammbaum der Familie P mit der p.Gly2019Ser-Mutation in *LRRK2*. Kreise symbolisieren weibliche, Quadrate männliche und Querstriche verstorbene Familienmitglieder. Eine weiße Füllung kennzeichnet gesunde, eine schwarze sicher erkrankte und eine graue möglich erkrankte Individuen. Der Pfeil markiert den in der Stichprobe detektierten Indexpatienten L-2572. Der Mutationsstatus der p.Asn88Lys-Mutation im *RAPSN* Gen bzw. der p.Gly2019Ser-Mutation im *LRRK2*-Gen ist jeweils unterhalb angegeben. MUT/WT zeigt die heterozygote Mutations-, WT/WT die homozygote Wildtypträgerschaft an.

## 3.1.3 Projekt 3: Tremor-Familie G

Um das krankheitsverursachende Gen in dieser großen Familie zu ermitteln, wurde im Vorfeld dieser Arbeit bei vier Mitgliedern (L-8324, L-8327, L-8329 und L-8333) eine Exom-Sequenzierung durchgeführt. Die am Ende des in Abschnitt 2.1.3 dargestellten Filteralgorithmus verbliebenen zehn Kandidatenvarianten (siehe Tab. 15) wurden unter Hinzunahme der DNA-Proben zehn weiterer Familienmitglieder einer Segregationsanalyse mittels Sanger-Sequenzierung unterzogen (siehe Tab. 16). Die Literaturrecherche zur Krankheitsassoziation der Kandidatenvarianten erfolgte unter Nutzung der online verfügbaren Datenbanken PubMed, OMIM und UniProt (Abfrage am 07.10.2016).

Tab. 15: Kandidatenvarianten nach Exom-Sequenzierung

Gen	Position (hg38)	Exon	Variante	Krankheitsassoziation
<i>ACOXL</i>	chr2:110908791	11	c.791G>A; p.Arg264Gln	fraglich Prostatakarzinom (O'Hurley <i>et al.</i> , 2015), chronisch lymphatische Leukämie (Lan <i>et al.</i> , 2010)
<i>ALDH1L1</i>	chr3:126160912	2	c.98G>A; p.Gly33Asp	n. b.
<i>APBB1</i>	chr11:6403380	5	c.979A>G; p.Met327Val	Morbus Alzheimer (Kajiwara <i>et al.</i> , 2009)
<i>CPNE3</i>	chr8:86529041	4	c.229T>C; p.Phe77Leu	Tumormetastasierung (Heinrich <i>et al.</i> , 2010; Lin <i>et al.</i> , 2013; Mo <i>et al.</i> , 2013)
<i>HSDL2</i>	chr9:112438497	7	c.665A>G; p.Asp222Gly	fraglich Gliomwachstum (Ruokun <i>et al.</i> , 2016)
<i>KIF9</i>	chr3:47277340	3	c.35G>T; p.Arg12Leu	n. b.
<i>PDPR</i>	chr16:70156559	19	c.2320G>A; p.Asp774Asn	fraglich Joubert-Syndrom (Alazami <i>et al.</i> , 2015)
<i>SLC2A4</i>	chr17:7283558	3	c.236C>G; p.Thr79Ser	Insulin-unabhängiger Diabetes mellitus (NIDDM) (O'Rahilly <i>et al.</i> , 1992)
<i>ZBTB47</i>	chr3:42661537	3	c.1526A>G; p.Asn509Ser	n. b.
<i>ZNF660</i>	chr3:44594411	3	c.218C>T; p.Thr73Met	n. b.

chr - Chromosom; n. b. - nicht bekannt

Tab. 16: Segregationsanalyse der Kandidatenvarianten bei Familie G

Code	ACOXL	ALDH1L1	APBB1	CPNE3	HSDL2	KIF9	PDPR	SLC2A4	ZBTB47	ZNF660
<b>L-8324*</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>L-8325</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>L-8326</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-8329*</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>L-8332</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>L-8333*</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-8323	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
L-8327*	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
L-8328	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-8330	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
L-8331	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
L-8334	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-8335	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-759	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-

Stern (\*) - NGS erfolgt; + - Träger der Variante; — - Träger des Wildtyps; fett gedruckt - Erkrankte

Die Auswahl der Kandidatenvarianten, welche in der folgenden Analyse bei der PS-Patienten-Stichprobe untersucht wurde, erfolgte nach verschiedenen Kriterien.

- 1) Segregation der Variante in der Indexfamilie, d. h. Vorkommen bei allen Betroffenen und möglichst nicht bei Gesunden
- 2) Allelfrequenz der Variante in ExAC-Population (Europäer) < 1 %
- 3) Maximale Allelfrequenz in einer Ethnie in ExAC-Population < 1 %
- 4) Quotient: Anzahl der Träger von *loss-of-function* Mutationen im Kandidatengen geteilt durch den Mittelwert aller Allel-Träger in ExAC
- 5) *In-silico* Scores von PolyPhen, SIFT und CADD für die Variante
- 6) Expression des Genprodukts in Nervengewebe (OMIM, UniProt, Pubmed; Abfrage am 18.02.2016)
- 7) Proteinfunktion (OMIM, PubMed, Abfrage am 18.02.2016)

Die Übersicht über die Auswertung der Kandidatenvarianten ist Tabelle 17 zu entnehmen.

Tab. 17: Kandidatenvarianten bei Familie G

Kandidaten-Variante	MUT-Träger Erkr./ Ges.	MAF (Europäer)	Max. MAF (Ethnie)	LoF MUT / alle MUT-Allele	LoF-Allele: erw./beob.	SIFT	Poly- Phen	CADD	Expression	Funktion	Inter- pretation
<i>ACOXL</i> rs116012262	5/3 1,7	0,0022	0,0022 (Europäer)	247 Träger (2 hom.) 0,00478	22,0 / 17 pLI = 0,00	0,07 (toler.)	0,319 (benign)	23,7	Nebenhoden, Harnblase, Lunge, Plazenta	Fettsäure-β- Oxidation, Lipid-Homöostase	-
<i>ALDH1L1</i> rs143122118	5/3 1,7	0,0066	0,0066 (Europäer)	284 Träger (5 hom.) 0,00528	32,1 / 14 pLI = 0,00	0,03 (delet.)	1 (prob. dmg.)	30,0	Leber, Niere, Skelettmuskel	Regulation von Apoptose und Zellmotilität	-
<i>APBB1</i> rs1800423	4/2 2	0,0074	0,0074 (Europäer)	10 Träger (0 hom.) 0,00025	21,7 / 2 pLI = 0,99	0,71 (toler.)	0,009 (benign)	1,216	<b>Hirn</b>	Induzierung der Apoptose	-
<i>CPNE3</i>	5/1 5	0	0	128 Träger (0 hom.) 0,00213	21,7 / 20 pLI = 0,00	0,03 (delet.)	0,168 (benign)	25,7	<b>Hirn, Ovar,</b> Brustdrüse,	Kalzium-abhängiges Lipidbindeprotein	+
<i>HSDL2</i> rs143512191	5/1 5	0,0007	0,0007 (Europäer)	43 Träger (0 hom.) 0,00077	14,3 / 9 pLI = 0,00	0,01 (delet.)	0,618 (poss. dmg.)	27,5	<b>Hirn, Leber Niere,</b> Hoden, Prostata, Ovar	Biosynthese von Steroidhormonen	+
<i>KIF9</i> rs76198671	5/1 5	0,00005	0,0094 (Ostasien)	96 Träger (0 hom.) 0,00160	29,5 / 21 pLI = 0,00	0 (delet.)	1 (prob. dmg.)	34,0	<b>Hirn, Kolon,</b> Herz, Hoden, Niere, Lunge	Kinesinmotor, Regulation der Mitose-Spindellänge	+ / -
<i>PDPR</i> rs201562825	5/2 2,5	0,0003	0,0003 (Europäer)	100 Träger (0 hom.) 0,00178	31,2 / 17 pLI = 0,00	0,14 (toler.)	0,652 (poss. dmg.)	26,8	<b>Hirn, Ovar,</b> Hoden, (Neben)- Niere, Skelett- muskel	Regulierung des mitochondrialen PDH-Multienzym- Komplexes	+ / -
<i>SLC2A4</i> rs8192703	5/1 5	0,0044	0,0067 (Finnisch)	27 Träger (0 hom.) 0,00046	18,4 / 5 pLI = 0,14	0,68 (toler.)	0,021 (benign)	1,995	Skelett- und Herzmuskel, Fett- gewebe	Insulin-abhängiger Glucosetransporter (GLUT4)	-
<i>ZBTB47</i> rs199627048	5/1 5	0,0022	0,0022 (Europäer)	2 Träger (0 hom.) 0,00004	11,0 / 0 pLI = 0,97	0,21 (toler.)	0,824 (poss. dmg.)	15,7	in allen Geweben	zinc finger and BTB domain containing 47	+
<i>ZNF660</i> rs147042905	5/1 5	0,00004	0,0080 (Ostasien)	470 Träger (2 hom.) 0,00776	7,1 / 3 pLI = 0,05	0 (delet.)	0,924 (prob. dmg.)	28,9	<b>Hirn, Rektum,</b> Uterus, Lunge	Zink-Finger Protein, Regulation der Transkription	+ / -

Erkr. - Erkrankte; Ges. - Gesunde; erw. - erwartet; beob. - beobachtet; grau hinterlegt - ausgewählte Kandidatenvarianten; hom. - homozygot; toler. - tolerated; delet. - deleterious; poss. dmg. - possibly damaging; prob. dmg.— probably damaging; LoF - *loss-of-function*; pLI - *propability of LoF intolerance*

Mithilfe des unter Punkt 4 genannten Quotienten sollte die Pathogenität eines Funktionsverlustes des Kandidatengens abgeschätzt werden, wobei ein hoher Anteil von *loss-of-function*-Mutationen an der Gesamtheit der gelisteten Mutationen eher gegen eine krankheitsverursachende Wirkung sprach.

Für die weitere Untersuchung der Relevanz innerhalb der PS-Patienten-Stichprobe wurden die Varianten in den Genen *HSDL2* (hydroxysteroid dehydrogenase like 2), *CPNE3* (copine III) und *ZBTB47* (zinc finger and BTB domain containing 47) ausgewählt. Es wurden jeweils 281 DNA-Proben Sanger-sequenziert, von denen 166 von männlichen und 110 von weiblichen PS-Patienten stammten. Bei fünf Proben fehlten diesbezügliche Angaben. Das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug  $48,8 \pm 22,4$  Jahre. Der untersuchte Sequenzabschnitt der Gene *HSDL2* und *ZBTB47* umfasste jeweils das komplette die Kandidatenvariante tragende Exon, vom Kandidatengen *CPNE3* wurden 169 bp des Exons 4 untersucht. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 18.

Tab. 18: Detektierte Varianten in der untersuchten PS-Stichprobe (Fam. G.)

Gen	Exon	Variante (dbSNP ID)	Mutationsträger (PS-Stichprobe)	Allelfrequenz (PS-Stichprobe)	Allelfrequenz (ExAC)
<i>HSDL2</i>	7	c.665A<G; p.Asp222Gly (rs143512191)	1/281 (het.) L-3328	0,00178	0,00069
<i>CPNE3</i>	4	c.229T>C; p.Phe77Leu	0/281	0	0
<i>ZBTB47</i>	3	c.1526A>G; p.Asn509Ser (rs199627048)	3/281 (het.) L-246, L-1432, L-3302	0,00534	0,00219
<i>ZBTB47</i>	Intron	c.1474-70G>A (rs73085343)	1/281 (het.) L-3207	0,00178	0

het. - heterozygot; grau hinterlegt - Kandidatenvarianten

Insgesamt konnte für keine der Varianten eine signifikante Häufung innerhalb der PS-Patienten Stichprobe im Vergleich zum ExAC-Datensatz gefunden werden. Im Gen *HSDL2* wurde lediglich ein Träger der Kandidatenvariante entdeckt ( $p=0,3266$ ; Fisher's exact test). Während im Kandidatengen *CPNE3* kein weiterer Träger detektiert wurde, konnten im untersuchten Sequenzbereich des Gens *ZBTB47* neben einer Variante weit im intronischen Bereich auch drei Träger der Kandidatenvariante aus der Indexfamilie gefunden werden ( $p=0,1296$ ; Fisher's exact test).

## 3.1.4 Projekt 4: Diskordante Zwillingspaare

Die im Vorfeld gewonnenen Exom-Daten der eineiigen Zwillingspaare wurden unter der Hypothese des Vorliegens somatischer Mutationen im erkrankten Individuum untersucht. Bei der Filterung der Datensätze wurden jeweils beide Zwillinge miteinander verglichen und jene Varianten ausgewählt, welche in den Exom-Daten nicht von beiden geteilt wurden. In den Folgeschritten wurde diese 81 (L-2893/L-2894) bzw. 18 (L-3856/L-3857) Varianten nach exonischen und Spleißstellen-Mutationen, nicht-synonymen Varianten und einem CADD-Score größer als 20 gefiltert. Dieser Algorithmus ergab fünf (L-2893/L-2894) und 18 (L-3856/L-3857) Kandidatenvarianten, die nicht vom jeweils anderen Zwilling geteilt wurden und die festgelegten Anforderungen erfüllten (siehe Tab. 19 und 20). Die Validierung der Kandidatenvarianten erfolgte per Sanger-Sequenzierung der Loci und konnte in keinem Falle die Diskordanz der jeweiligen Zwillingproben replizieren.

Tab. 19: Kandidatenvarianten bei Zwillingpaar L-3856/L-3857

Gen	Chr.	Position (hg38)	Exon	Variante	Status
<i>ATG4B</i>	2	241653596	4	c.G269A; p.Arg90Gln (NM_178326)	+
<i>CCDC66</i>	3	56615155	12	c.C1594A; p.Leu532Ile (NM_001141947)	-
<i>TTYH3</i>	7	2652921	9	c.C931A; p.Leu311Met (NM_025250)	-
<i>ZNF680</i>	7	64521225	4	c.A1529G; p.Lys510Arg (NM_178558)	-
<i>ABLIM1</i>	10	114491791	7	c.G982T; p.Gly328Cys (NM_002313)	-
<i>TMEM5</i>	12	63802352	4	c.C690A; p.Asp230Glu (NM_014254)	-
<i>ATXN2</i>	12	111598952	1	c.563A>C; p.Gln188Pro (NM_002973.3)	+
<i>SLC8B1</i>	12	113321066	5	c.352G>A; p.Ala118Thr (NM_024959.2)	-
<i>FAM155A</i>	13	107866379	1	c.218A>G; p.Gln73Arg (NM_001080396.2)	+
<i>KLHL36</i>	16	84661738	5	c.C1456A; p.His486Asn (NM_024731)	-
<i>ANKFY1</i>	17	4195452	9	c.A1249G; p.Ile417Val (NM_001257999)	+
<i>SPNS3</i>	17	4445082	3	c.G316A; p.Asp106Asn (NM_182538)	+
<i>MAP2K3</i>	17	21300629	4	c.G250A; p.Ala84Thr (NM_145109)	+
<i>CDC27</i>	17	47151891	9	c.A1003G; p.Thr335Ala (NM_001114091)	-
<i>CDC27</i>	17	47158232	5	c.C449G; p.Ser150Cys (NM_001114091)	-
<i>PPM1E</i>	17	58756130	1	c.T133C; p.Ser45Pro (NM_014906)	-
<i>EXOC7</i>	17	76088891	10	c.G1233T; p.Glu411Asp (NM_001145297)	-
<i>HAUS5</i>	19	35615264	6	c.C363A; p.Asp121Glu (NM_015302)	-

Chr. - Chromosom; + Status - Variante liegt bei beiden vor; - Status - Wildtyp liegt bei beiden vor

Tab. 20: Kandidatenvarianten bei Zwillingspaar L-2893/L-2894

Gen	Chr.	Position (hg38)	Exon	Variante	Status
<i>TMTC1</i>	12	29783516	1	c.G236T; p.Trp79Leu (NM_001193451):	-
<i>ELMO3</i>	16	67203765	20	c.A2210G; p.Lys737Arg (NM_024712)	+
<i>MAP2K3</i>	17	21314198	12	c.T1012C; p.Phe338Leu (NM_145109)	-
<i>PHLPP1</i>	18	62830160	2	c.T1702C; p.Cys568Arg (NM_194449)	+
<i>TST</i>	22	37011068	3	c.C853G; p.Phe285Ala (NM_003312)	+

Chr. - Chromosom; + Status - Variante liegt bei beiden vor; - Status - Wildtyp liegt bei beiden vor

### 3.2 Projekt 5: Screening-Studie zum Parkinson-Gen *RAB39B*

Um die Häufigkeit von *RAB39B*-Mutationen bei PS-Patienten zu erheben, erfolgte die Sanger-Sequenzierung der beiden Exons sowie der angrenzenden intronischen Bereiche (NM\_171998.2). Die verwendeten Primer sind in der Tabelle im Anhang aufgelistet. Insgesamt wurden DNA-Proben von 651 Erkrankten untersucht, worunter sich 552 PS- und 99 XDP Patienten befanden. Zudem wurde eine Kontrollgruppe von 186 gesunden Individuen auf Mutationen im Gen *RAB39B* gescreent. Die detaillierte Charakterisierung der Stichprobe ist Abschnitt 2.1.2 zu entnehmen.

In der XDP-Patientengruppe sowie in der gesunden Kontrollgruppe ließen sich keine Varianten detektieren. In der Stichprobe der PS-Patienten wurden insgesamt drei unterschiedliche Varianten bei vier nicht verwandten Patienten gefunden (siehe Tab. 21). Darunter war eine synonyme Variante in Exon 2 (c.543A>G; p.Thr181=, rs369970931), welche bei einem männlichen und einer weiblichen PS-Patientin vorhanden war. Auch wenn synonyme Varianten nicht unmittelbar die kodierende Sequenz verändern, könnte die Prozessierung der mRNA und infolge dessen auch die Proteinsequenz durch die Aktivierung einer alternativen Spleißstelle beeinflusst werden. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, erfolgte die Untersuchung der cDNA, welche aus RNA generiert wurde. Diese wurde zuvor aus Vollblut des männlichen rs369970931-Trägers (L-3456) extrahiert. Von der weiblichen Trägerin der Variante (L-1127) war keine RNA-Probe vorhanden. Die Sequenzierung der cDNA zeigte, abgesehen von der Variante selbst, jedoch keine Veränderung der Basenabfolge im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 16), sodass die Hypothese einer aktivierten alternativen Spleißstelle nicht bestätigt werden konnte. Auch die reguläre Spleißstelle zwischen Exon 1 und 2 entspricht dem Referenztranskript (ENST00000369454). Die in der

ExAC-Datenbank aufgeführte Allelfrequenz von 0,0006 unter den europäischen Individuen zeigt, dass es sich um eine seltene Variante handelt. Darüber hinaus wurden zwei weitere Varianten detektiert, welche sich im an Exon 1 angrenzenden intronischen Bereich befinden. Zum einen handelt es sich um die Variante c.215+39C>G, die in der ExAC-Datenbank bisher nicht berichtet wurde. Die andere Variante c.215+61G>A liegt mit 61 bp schon relativ weit im intronischen Bereich und ist daher in den ExAC Exom-Datensätzen nicht abgedeckt. Durch den Austausch der Base Guanin zu Adenin ist im Kontext der folgenden Base Guanin ebenfalls eine Veränderung des Spleißvorganges denkbar, da sich hierdurch das für eine Akzeptor-Spleißstelle typische AG-Motiv ergibt (Abb. 17). Die *in-silico* Analyse mithilfe des Programmes *Fruitfly Splice Site Prediction* (Reese *et al.*, 1997) bestätigte das Vorliegen einer alternativen Spleißstelle, welche mit einem Score von 0,73 angegeben wird (auf einer Skala zwischen 0 und 1). Allerdings erhält die Wildtyp-Spleißstelle mit 0,98 einen höheren Score, was bedeutet, dass diese bevorzugt genutzt würde. Weiterhin ergab die Analyse mittels des CADD-Scores für keine der Varianten einen Anhalt auf eine proteinverändernde Auswirkung unter der Annahme eines Schwellenwerts von 15 Punkten. Das Programm *Mutation Taster* (Schwarz *et al.*, 2014) stufte hingegen alle drei Varianten als „disease-causing“, also krankheitsverursachend, ein. Eine Sequenzierung der cDNA zur Überprüfung der Hypothese *in-vitro* war in beiden Fällen aufgrund nicht verfügbarer RNA-Proben der Patienten L-1134 und L-1915 leider unmöglich.

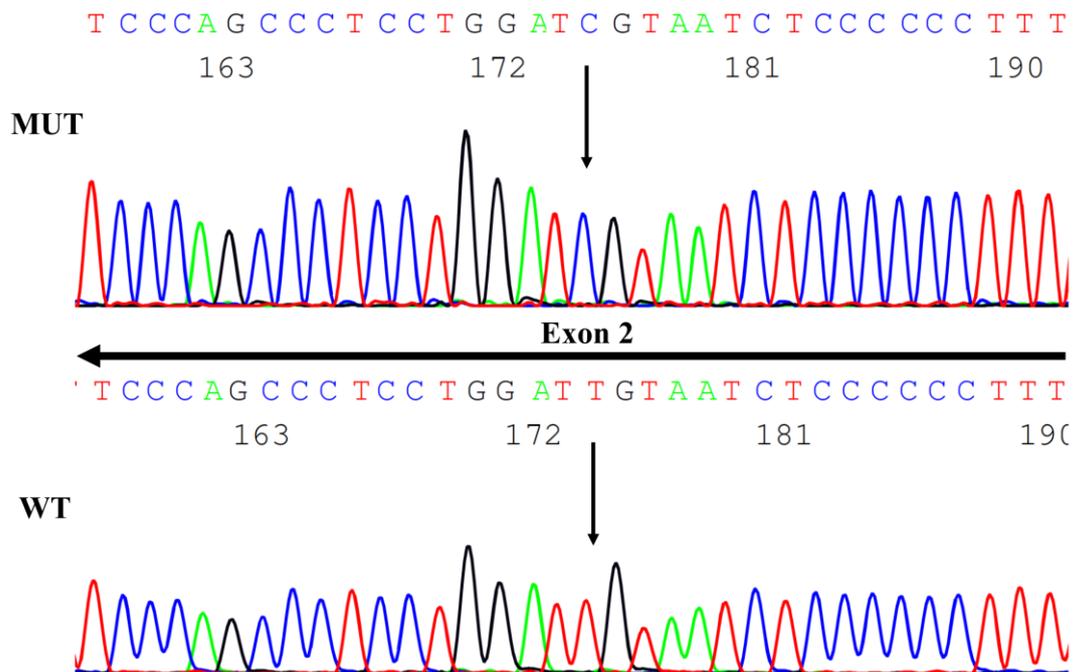


Abb. 16: Die Elektropherogramme der cDNA im Bereich der synonymen Variante c.543A>G; p.Thr181= in Exon 2 (rs369970931) des Patienten L-3456. Der Pfeil zeigt die Position der hemizygoten Variante in der Sequenz an. Eine Veränderung der Basenabfolge des mutierten Allels (oben) im Vergleich zum Wildtyp (unten) infolge eines alternativen Spleißens liegt nicht vor. Zu beachten ist, dass die abgebildete Sequenz den komplementären Gegenstrang des Referenztranskripts (ENST00000369454) darstellt.

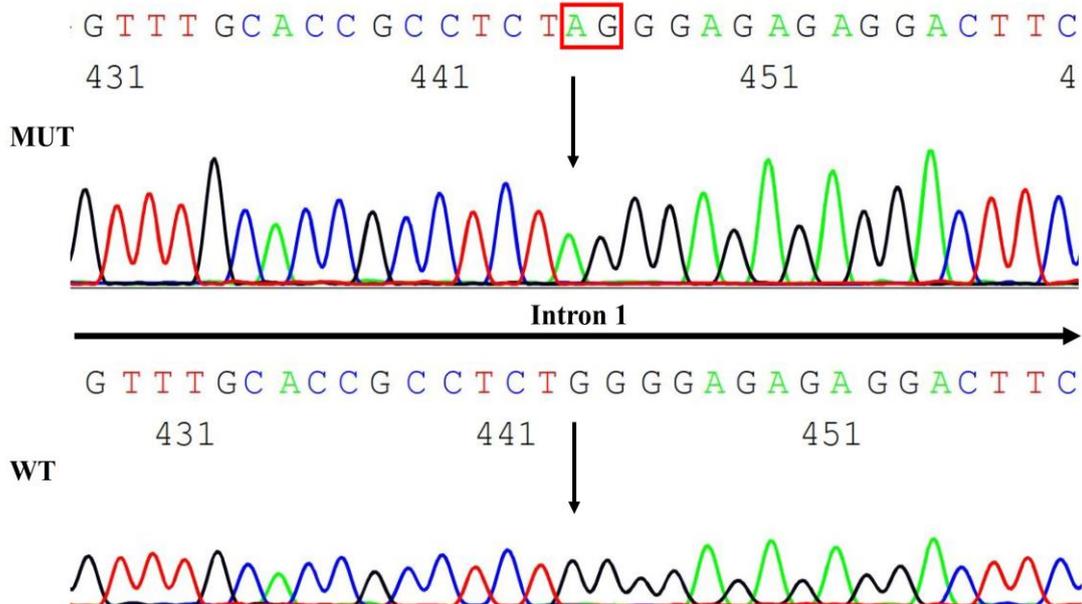


Abb. 17: Elektropherogramm der Variante c.215+61G>A im Intron des Gens *RAB39B* bei der Probe L-1915. Die alternative Akzeptor-Spleißstelle mit der Abfolge „AG“ entsteht durch den Basenaustausch von Guanin zu Adenin und ist durch den roten Kasten gekennzeichnet.

Tab. 21: Detektierte Varianten in Screening des Gens *RAB39B*

Code	EA (Jahre)	Familien- anamnese	Geschl.	Koordinaten (hg38)	Variante (CDS)	Variante (Protein)	Position	SNP ID	MAF ExAC (Europäer)	CADD	Mutation Taster	Fruitfly (MUT/WT)
L-1127	53	n. b.	w	X:155260902	c.543A>G	p.Thr181Thr	Exon 2	rs369970931	0,0006	0,13	disease- causing (0,999)	nicht erkannt
L-3456	58	positiv	m									
L-1134	63	positiv	m	X:155264035	c.215+39C>G	kein Effekt	Intron	n. b.	nicht berichtet	1,976	disease- causing (0,999)	nicht erkannt
L-1915	40	negativ	m	X:155264013	c.215+61G>A	mögliche Splice- veränderung	Intron	n. b.	nicht abgedeckt	11,94	disease- causing (0,999)	0,73/0,98

Geschl. - Geschlecht; EA - Erkrankungsalter; MAF - minor allele frequency in ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000155961>); n. b.- nicht bekannt; CADD - Combined Annotation Dependent Depletion Score

## 4 Diskussion

Im Rahmen meiner Doktorarbeit konnte ich bei einer von drei Familien die genetische Ursache für die Erkrankung an einem Tremor- bzw. Parkinson-Syndrom identifizieren. Die Hypothese des Vorliegens einer somatischen Mutation bei den diskordanten Zwillingspaaren konnte nicht bestätigt werden. Im Rahmen der Validierung des PS-Gens *RAB39B* konnte die durchgeführte Screening-Untersuchung keine klare Mutation in der analysierten PS-Patienten-Stichprobe detektieren. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der einzelnen Projekte diskutiert. Als grundlegende Methodik dieser Arbeit werden im Weiteren die Stärken und Limitierungen der NGS dargelegt sowie der familienbasierte Ansatz eingehender beleuchtet.

### *NGS als Methodik*

Die NGS-Technologie, auf der ein Großteil dieser Arbeit beruht, soll im Folgenden kritisch betrachtet werden. Denn auch wenn NGS-Verfahren in der heutigen genetischen Forschung unverzichtbar geworden sind und ihren Weg in die klinische Diagnostik gefunden haben, sind Limitierungen zu beachten (siehe Tab. 22).

Der hohe Durchsatz der NGS-Verfahren ermöglicht eine Sequenzierung des gesamten Genoms bzw. Exoms bei einer zeitgleichen Analyse von bis zu 400 Patienten-Proben – dies bedeutet neben geringeren Kosten von ca. 800 bis 1000 Euro eine deutliche Zeitersparnis im Vergleich zu einer klassischen Sanger-Sequenzierung. Dabei verkürzt sich nicht nur die Zeit für den eigentlichen Prozess der Untersuchung, sondern auch der Diagnoseweg für den Patienten. Während zuvor teils Dutzende im Verdacht stehende Gene bzw. Loci einzeln und nacheinander analysiert wurden, liegen beim NGS mit einem einzigen Schritt sämtliche genetische Informationen vor. Dies erlaubt eine unvoreingenommene Herangehensweise insbesondere auch in Unkenntnis eines Kandidatengens sowie das Aufspüren von *de-novo*-Mutationen, wofür bereits ein Trio bestehend aus den Eltern und dem Patienten ausreicht (Veltman und Brunner, 2012; Lohmann und Klein, 2014). Auch Mosaik, d. h. unterschiedliche Genotypen in verschiedenen Körperzellen, wie sie beispielsweise beim Cornelia de Lange-Syndrom vorkommen, können detektiert werden, sofern die Sequenziertiefe (*depth*) hoch genug ist (Pagnamenta *et al.*, 2012; Tapper *et al.*, 2014). Sogar die Umkehr des sonst üblichen Ansatzes ist möglich: Ausgehend von den

Ergebnissen der NGS wird in Kenntnis der vorliegenden Mutationen gezielt der Phänotyp bei den Trägern gesucht, was auch als *reverse phenotyping* beschrieben wird (Gilissen *et al.*, 2011). Eine unvoreingenommene klinische Untersuchung ist dabei allerdings gefährdet. Weiterhin fanden Djemie *et al.* in einer Re-Sequenzierungs-Studie von *SCN1A*-Mutationen mittels NGS heraus, dass die Automatisierung auch Fehlerquellen bei der manuellen Auswertung, wie sie in der Sanger-Sequenzierung nötig ist, reduziert (Djemie *et al.*, 2016). Ein weiterer Vorteil der hohen Geschwindigkeit des Verfahrens ist, dass Forschungsergebnisse deutlich schneller ihren Weg in die kommerziellen *gene panels* und somit in die klinische Diagnostik finden (Lohmann und Klein, 2014). Aufgrund der dauerhaften Verfügbarkeit der gewonnenen genetischen Daten ist die Möglichkeit der Wiederauswertung bei neuen Erkenntnissen zu einem späteren Zeitpunkt wie auch die mehrfache Nutzung im Rahmen verschiedenster Forschungsprojekte weltweit gegeben.

Die Parameter der *coverage* und *depth* sind wichtige Kenngrößen, um die Qualität eines NGS-Datensatzes zu beurteilen. Da Wildtyp- und Mutanten-Allel stochastisch gleich häufig sequenziert werden, minimiert eine höhere *depth* die Wahrscheinlichkeit, ausschließlich das eine oder andere Allel zu erfassen. Bei zu geringer *depth* würde im Falle des Wildtyp-Allels die Anzahl der falsch-negativen Ergebnisse, im Falle des Mutanten-Allels die Zahl der fälschlich als homozygot erkannten Allele bei eigentlich vorliegender Heterozygotie steigen. Zudem werden längst nicht alle Abschnitte des Exoms mit derselben Häufigkeit abgelesen, sodass die *depth* in manchen Regionen unter 10 liegen kann. Der Hersteller Illumina gibt für die in dieser Arbeit vorwiegend verwendete Technologie (*HiSeq2000*) eine *coverage* von mindestens 85 % aller Sequenzen bei einer *depth* von 30-fach an (Illumina, 2014). In diesem Bereich beträgt die Wahrscheinlichkeit einer falsch erkannten Base 0,1 %, für die gesamte Sequenz berichten Liu *et al.* eine Fehlerrate von 2 % bzw. eine Genauigkeit von 98 % (Liu *et al.*, 2012). Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Qualität der im Rahmen dieser Arbeit genutzten im Jahre 2014 erzeugten Sequenzen höher ist, da sich die Technologien und Protokolle stetig verbessern. Dennoch gilt: Aufgrund der großen Datenmenge führt auch eine Fehlerrate im Promillebereich in der Summe zu einer relevanten Zahl von Lesefehlern. Somit rechtfertigt sich auch die Notwendigkeit einer Validierung der gefunden Kandidatenvarianten mittels Sanger-Sequenzierung, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurde. Beck *et al.* fanden jedoch heraus, dass dieses Vorgehen angesichts der verbesserten Leistung aktueller *next-generation* Sequenziergeräte zu hinterfragen ist, da die einfache Sanger-Sequenzierung

neben höheren Kosten und meist redundanten Daten auch häufiger falsch-negative Ergebnisse liefere und damit positive Funde widerlege (Baudhuin *et al.*, 2015; Beck *et al.*, 2016). Der Ausschluss einer wahren pathogenen Mutation ist insbesondere im Zwillingsprojekt in der vorliegenden Arbeit als mögliche Fehlerquelle zu berücksichtigen.

Im Verlauf der vergangenen Jahre haben sich mehrere Hersteller auf dem Markt der Entwicklung von NGS-Maschinen etabliert, welche auf unterschiedlichen Technologien basieren. Durch die technischen Weiterentwicklungen und die Konkurrenz der Hersteller konnten die Preise sinken. Gleichzeitig ist jedoch durch die Diversität der NGS-Technologien der Anspruch hinsichtlich der Deutung der Ergebnisse und Berücksichtigung der jeweiligen Stärken und Schwächen gewachsen. Auch gilt es, einheitliche Standards zu etablieren, welche eine hohe Zuverlässigkeit der Ergebnisse insbesondere im diagnostischen Rahmen garantieren müssen (Lohmann und Klein, 2014).

Tab. 22: Aktuelle Stärken und Limitierungen des NGS

Stärken von NGS im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren	noch bestehende Herausforderungen für die Weiterentwicklung des NGS
Kosten pro Analyse	Abdeckung des gesamten Genoms möglich (jedoch aktuell noch häufig Fokussierung auf Exom aus Kostengründen)
Durchsatz / Zeitfaktor	Detektion von CNV und strukturellen Umlagerungen durch die Standardverfahren nicht gewährleistet
hypothesenfreier Ansatz möglich	Etablierung von Standards, insbesondere für Filteralgorithmen & NGS-Technologien
schnell wachsende Zahl der Genom-Datensätze	weitere Verbesserung der Fehlerraten
dauerhafte Verfügbarkeit großer Datenmengen	Validierung weiterhin notwendig

CNV – *copy number variant*

### *Filteralgorithmus*

Bei der Sequenzierung eines kompletten Genoms finden sich nach Abgleich mit dem Referenzgenom etwa drei bis vier Millionen Varianten, bei einer Eingrenzung auf das Exom verbleiben immer noch 20.000 bis 50.000 Varianten (Gilissen *et al.*, 2012). Die Problemstellung hat sich somit von der Detektion der Mutation zur Interpretation dieser Daten verlagert, sie gleicht der sprichwörtlichen Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Daher ist ein strukturiertes Vorgehen bei der Auswertung der gefundenen Varianten erforderlich.

Der in dieser Arbeit zur Anwendung kommende familienbasierte Ansatz ermöglicht, eine präzise Anamnese und Beschreibung des Phänotyps vorausgesetzt, die weitere Eingrenzung der Anzahl der Varianten. Dabei wird angenommen, dass die krankheitsverursachende Mutation von allen Betroffenen geteilt wird und gleichzeitig nicht (homozygot) bei Gesunden zu finden ist. Phänokopien, also dem zu untersuchenden Phänotyp ähnelnde, jedoch nicht durch die familiäre Mutation begründete PS, sowie eine reduzierte Penetranz erschweren unter Umständen dieses Vorgehen. Ebenfalls sollte die Familie ausreichend viele Angehörige haben. Für die Aufklärung von *de-novo*-Mutationen genügen Trios aus dem erkrankten Indexpatienten und dem gesunden Elternpaar. Dieser Ansatz wurde bereits vielfach erfolgreich eingesetzt und führte beispielsweise zur Identifikation von *de-novo*-Mutationen in den Genen *WDR45* (Haack *et al.*, 2012), verantwortlich für die NBIA-Erkrankung *Beta-propeller Protein-Associated Neurodegeneration* (BPAN), *TUBB4A* [Leukenzephalopathie (Simons *et al.*, 2013)] oder auch *SHANK3* [Autismus, (Nemirovsky *et al.*, 2015)].

Durch die Fokussierung der analysierten Sequenz auf das Exom, also den kodierenden Anteil des Genoms, wurde bereits eine Eingrenzung auf 1 % der Erbsubstanz vorgenommen, in der geschätzt 85 % der pathogenen Varianten zu finden sind (Wang *et al.*, 2013). Somit stehen keine Informationen über Varianten in den intronischen Bereichen zur Verfügung, welche jedoch potentiell die verbleibenden 15 % der Varianten enthalten und durch räumliche Umlagerung regulatorisch Einfluss auf die kodierende Sequenz nehmen können (Schierding *et al.*, 2014).

Synonyme Varianten, welche nicht in einer Änderung der Aminosäuresequenz resultieren, wurden ebenfalls ausgeschlossen, da der überwiegende Anteil der krankheitsverursachenden Mutationen nach heutigem Wissensstand nicht-synonyme, *missense*- und Stopp-Codon erzeugende *nonsense*-Mutationen sowie Deletionen und Duplikationen sind (Makrythanasis und Antonarakis, 2013). Dennoch ist eine Beeinflussung des Spleißvorganges durch einen synonymen Basenaustausch möglich, wie im Falle des die Zystische Fibrose verursachenden Gens *CFTR* beobachtet wurde (Pagani *et al.*, 2005; Faa *et al.*, 2010). Weiterhin berichteten Carlini *et al.*, dass nicht alle synonymen Codons bei der Translation mit gleicher Präferenz verwendet werden, was in einer Veränderung der Expression des kodierten Protein resultiert. So führte beispielsweise ein synonymer Basenaustausch in den für die Aminosäure Leucin kodierenden präferierten Codons CTG und CTC zu CTA in Fruchtfliegen zu einer reduzierten Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase

(Carlini und Stephan, 2003). Auch können synonyme Codons durch die kotranslationale Faltung zu unterschiedlichen Proteinkonformationen führen (Buhr *et al.*, 2016).

Die Filterung nach dem Kriterium der Allelfrequenz kleiner 1 % geht von der Annahme aus, dass hinter seltenen monogenen Erkrankungen, wie genetische PS es sind, seltene Mutationen mit einer hohen Effektstärke stehen (Hernandez *et al.*, 2016). Dabei wurde in dieser Arbeit meist die übliche 1-%-Grenze als Definition seltener Varianten angewendet (Brookes, 1999). Eine Fehlerquelle könnte einerseits darin bestehen, dass die gesuchte Variante über dem Grenzwert liegt und somit fälschlicherweise aussortiert wurden, andererseits könnte die Grundannahme sich als falsch erweisen. Aufgrund des Gründer- bzw. Founder-Effektes kann die Häufigkeit einer in der Allgemeinbevölkerung seltenen Variante in geografisch oder kulturell isolierten Populationen deutlich höher liegen. Dies trifft beispielsweise auf die Mutation p.Gly2019Ser im Gen *LRRK2* (PARK8) zu, welche bei sporadischen PS-Patienten unter aschkenasischen Juden in 13,3 % und nordafrikanischen Arabern in 40,8 % der Fälle zu finden ist, während sie bei europäischen PS-Patienten bei 0,7 % – 1,6 % liegt (Zabetian *et al.*, 2006). In der Allgemeinbevölkerung ist die Verbreitung dieser Mutation in Europa mit einer Allelfrequenz von 0,06 % (ExAC Abfrage am 16.10.2016; Change *et al.* 2008) selten, während sie unter aschkenasischen Juden mit 1,3 % (Ozelius *et al.*, 2006) und unter nordafrikanischen Arabern mit 2,2 % (Change *et al.*, 2008) relativ verbreitet ist. Ein weiteres Mittel zur Eingrenzung und Priorisierung war die Anwendung der Prädiktionsprogramme SIFT, PolyPhen und CADD, welche durch Angabe von Scores die Wahrscheinlichkeit einer Pathogenität der jeweiligen gefundenen Variante angeben. Da diese jedoch nicht immer konsistente Ergebnisse liefern (beispielsweise im Falle der analysierten Kandidatengens *CPNE3*, siehe Tab. 17) und die zugrundeliegenden Algorithmen nur eine Abschätzung erlauben, könnte eine Fehleinschätzung zum Ausschluss einer in Wirklichkeit wahren Kandidatenvariante geführt haben. Zuletzt sollte die Expression des Gens auch im Gehirn zu finden sein, was mithilfe der Datenbank OMIM und UniProt überprüft wurde.

In Familie G (Projekt 3) wurde der Filteralgorithmus durch die Berücksichtigung der Frequenzen von *loss-of-function*-Mutationen (LoF) in den Kandidatengenen ergänzt, um die in der PS-Patienten Stichprobe zu untersuchenden Varianten von zehn auf drei reduzieren zu können. Hierzu wurde jeweils der Quotient aus der in ExAC gelisteten Anzahl der *loss-of-function*-Mutationsträger und der Anzahl aller Träger mutierter Allele desselben Gens gebildet. Der erhaltene Wert gibt Auskunft über den Anteil der schwerwiegenden Mutatio-

nen im Kandidatengen, wobei ein hoher Wert eher gegen dessen pathogene Relevanz spricht. Ebenfalls gering sollte die Zahl der homozygoten Träger von *loss-of-function*-Mutationen sein. Insbesondere das in ExAC berichtete Verhältnis der erwarteten *loss-of-function*-Mutationen zur Anzahl der beobachteten sollte bei einer erneuten Filterung einbezogen werden, da es die tatsächliche Mutationslast in Relation zur Größe des Gens angibt. Ein starkes Missverhältnis bzw. ein hoher Quotient (erwartete LoF-MUT/beobachtete LoF-MUT) würde auf eine geringe Toleranz für LoF-Mutationen hinweisen. In ExAC wird hierfür der Parameter „*probability of LoF-intolerance*“ (pLI) angegeben, welcher eine Unterteilung der gelisteten Gene in LoF-tolerant (pLI-Wert  $\leq 0,1$ ;  $n = 10.374$ ) und LoF-intolerant (pLI-Wert  $\geq 0,9$ ,  $n = 3.230$ ) zulässt (Lek *et al.*, 2016). Lek *et al.* stellten fest, dass Gene, welche an grundlegenden biologischen Prozessen mit einer hohen Anzahl an Interaktionspartnern beteiligt sind, hohe pLI-Werte aufweisen. Dass dieser jedoch nicht gleichbedeutend mit dem Status als Krankheitsgen zu werten ist, zeigt das zu familiärem Brustkrebs führende Gen *BRCA1* (pLI-Wert = 0). Unter den untersuchten Kandidatengen lagen lediglich die pLI-Werte der Gene *APBB1* und *ZBTB47* über 0,9. *APBB1* schied jedoch aufgrund der niedrigen Pathogenitätsscores des beobachteten *missense*-Variante im Verlauf der Filterung aus. *ZBTB47* hingegen wurde der Validierung bzw. Frequenzanalyse bei 300 PS-Patienten unterzogen, welche jedoch negativ ausfiel (siehe unten).

#### *Aufklärung von genetischen Ursachen bei den untersuchten PS-Familien*

Durch den erfolgreichen Einsatz des NGS-Verfahrens bei Familie M (Projekt 1) konnte die genetische Ursache der Parkinson-Erkrankung gefunden und die ursprüngliche Diagnose eines idiopathischen PS korrigiert werden. Es konnte ein compound-heterozygoter Mutationsstatus im Parkinson-Gen *PLA2G6* (PARK14) bei den beiden jüngeren erkrankten Schwestern nachgewiesen werden, wobei im Falle der ältesten Schwester nicht ausreichend Material für eine Sequenzierung vorhanden war. Weiterhin fehlten die genetischen Daten zur jüngsten, nach letztem Wissensstand nicht betroffenen Schwester. Dieser Umstand hinterlässt eine Restunsicherheit in Bezug auf die Segregation der Mutationen und somit der Krankheitsursache. Für die Richtigkeit der Hypothese, dass die gefundenen Mutationen krankheitsursächlich sind, sprechen jedoch die folgenden Erkenntnisse. Die Spleißstellenmutation c.610-1G>T wurde bereits bei einem Patienten mit infantiler neuroaxonaler Dystrophie (INAD) und compound-heterozygotem Mutationsstatus als pathogen publiziert (Paisan-Ruiz *et al.*, 2012). Auch die Tatsache, dass sie stromaufwärts der funk-

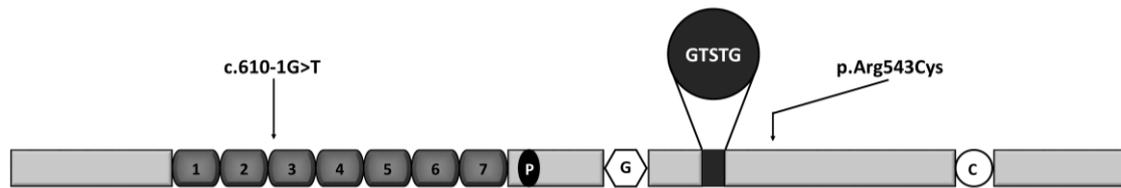


Abb. 18: Schematische Darstellung des Proteins Phospholipase A2 mit der Lokalisation der gefundenen Mutationen. Dargestellt sind die Ankyrin-repeat-Domäne (1-7), eine Prolin- (P) und Glycin- (G) reiche Domäne, das katalytische Zentrum (Aminosäuren GTSTG) sowie eine Calmodulin-bindende Domäne (C).

tionellen Domänen des kodierten Proteins lokalisiert ist, spricht für eine proteinverändernde Wirkung der Mutation (siehe Abb. 18).

Die Aminosäure der *missense*-Mutation rs753874848 (c.1627C>T; p.Arg543Cys) ist in vielen Spezies konserviert und daher mit höherer Wahrscheinlichkeit funktionsrelevant. Die *in-silico* Analysen ergaben zudem pathogene Scores für diese Mutationen. Anhand dieses Projektes wird die Stärke des NGS deutlich, insbesondere vor dem Hintergrund der bereits im Vorfeld erfolglos durchgeführten, aufwändigen hypothesenbasierten Kandidatengen-Analysen. Dieser Fall zeigt weiterhin sehr deutlich, wie wichtig eine genaue klinische Beschreibung und Dokumentation der Befunde für die genetische Diagnostik ist, da erst der entscheidende Hinweis auf die Eisenablagerungen in den Basalganglien das PS-Gen *PLA2G6* in den Fokus rückte. Im Hinblick auf das klinische Bild ist die Diagnose einer *PLA2G6*-assoziierten Neurodegeneration mit Dystonie Parkinsonismus (PLAN-DP) plausibel und stimmt mit den Angaben in der Literatur überein. Die Befunde der neuropathologischen Untersuchungen waren bei der ältesten Schwester (L-2491) mit der Diagnose eines idiopathischen PS vereinbar. Im Falle der jüngeren untersuchten Schwester (L-2478) fielen neben Lewy-Körperchen in der *Substantia nigra* Eisenablagerungen in den Basalganglien und tau-Pathologien im Temporallappen auf und stützen die Diagnose einer PLAN-DP (Paisan-Ruiz *et al.*, 2012; Riku *et al.*, 2013; Karkheiran *et al.*, 2015). Das Fehlen dieser Befunde im ersten Falle lässt sich möglicherweise auf die sich deutlich unterscheidende vorangegangene Krankheitsdauer zurückführen, welche bei der älteren Schwester nur fünf Jahre betrug und damit 25 Jahre kürzer war. Dies bedeutet, dass sich die Erkrankung in frühen Stadien neuropathologisch wie ein idiopathisches PS präsentieren kann. Dieser neuartige Befund wurde in der Zeitschrift *Movement Disorders* (Klein *et al.*, 2016) publiziert, um auf diese Besonderheit aufmerksam zu machen. Ein zeitabhängiger Zusammenhang zum Vorliegen der Eisenablagerung wurde bereits von den Autoren der Erstbeschreibung des PARK14-Locus vermutet (Paisan-Ruiz *et al.*, 2009) und konnte

somit bestätigt werden. In einer 23 PLAN-DP Fälle umfassenden Literaturübersicht waren Eisenablagerungen nur in 33 % der Fälle nachweisbar (Karkheiran *et al.*, 2015). Ein Indiz für eine Störung des Eisenstoffwechsels bei der Patientin L-2491 lag in der Symptomverschlechterung unter intravenöser Eisensulfat-Gabe vor. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang das höhere Erkrankungsalter der dritten Schwester (40 Jahre), welches die bisher berichtete Altersspanne von vier bis 37 Jahren überschreitet (Karkheiran *et al.*, 2015). Dies ordnet sich jedoch in die vielfach berichtete (Tab. 11) hohe klinische Heterogenität der PLAN ein (Bohlega *et al.*, 2016). Somit lässt sich die Aussage der genetischen Analysen unter Berücksichtigung der neuropathologischen und klinischen Befunde hinreichend untermauern.

Bei den anderen beiden PS-Familien mit autosomal-dominantem Erbgang (Projekte 2 und 3) konnte hingegen keine eindeutige Krankheitsursache identifiziert, jedoch Kandidatengene ermittelt werden. Im Falle der Familie B (Projekt 2) wurden infolge des NGS vier Kandidatenvarianten und deren Wahrscheinlichkeit krankheitsursächlich zu sein, untersucht. Die Rolle der Kandidatenvariante rs104894299 (p.Asn88Lys) im Gen *RAPSN*, welches für das Protein *Rapsyn* kodiert, wurde vertiefend untersucht. *Rapsyn* stabilisiert und verankert als postsynaptisches Protein den Acetylcholin-Rezeptor an der motorischen Endplatte (Apel *et al.*, 1995). Homozygote bzw. compound-heterozygote Mutationen im Gen *RAPSN* sind ursächlich für das kongenitale myasthene Syndrom (CMS) aufgrund einer Fehlfunktion des Acetylcholin-Rezeptors. Die Mutation rs104894299 weist eine hohe Verbreitung unter europäischen CMS-Patienten auf und führt sie zu einem eher milderen Phänotyp, wenn sie homozygot oder compound-heterozygot vorliegt (Muller *et al.*, 2003). In der Exom-Datenbank ExAC wird sie mit einer Allelfrequenz von 0,0024 aufgeführt (Abfrage am 25.09.2016). Bei der Untersuchung der institutseigenen PS-Patienten-Stichprobe auf das Vorliegen der Kandidatenvariante rs104894299 wurden zwei weitere heterozygote Träger gefunden (Allelfrequenz: 0,0072), von denen einer aus der PS-Familie P stammt, in welcher die Segregation der autosomal-dominanten *LRRK2*-Mutation rs34637584 (p.Gly2019Ser) nachgewiesen wurde. Über diese *LRRK2*-Mutation ist bekannt, dass sie bei nordeuropäischen und US-amerikanischen sporadischen PS-Patienten mit einer Häufigkeit von 2-3 % sowie einer reduzierten Penetranz beobachtet wird (Bardien *et al.*, 2011). Ein Vergleich des Segregationsverhaltens innerhalb der Familie P ergab einen augenscheinlich passenderen Befund, da im Falle der *RAPSN*-Mutation mehr Erkrankte und weniger Gesunde vorlagen (siehe Tab. 14). Eine alleinige Berücksichtigung

dieses Parameters lässt diese Mutation daher als aussichtsreicheren Kandidaten erscheinen, *LRRK2* ist jedoch im Gegensatz zu *RAPSN* bereits als Parkinson-Gen etabliert und umfangreich charakterisiert (PARK8, siehe Abschnitt 1.2.2). Andererseits wird am Beispiel des *GBA*-Gens, welches für das lysosomale Enzym  $\beta$ -Glucocerebrosidase kodiert, dennoch deutlich, dass Mutationen im selben Gen in Abhängigkeit von der Zygote sehr unterschiedliche Phänotypen hervorrufen können. So führen biallelische *loss-of-function*-Mutationen, infolge eines gestörten Abbaus und Anhäufung des Lipids Glucocerebrosid, zum Morbus Gaucher. Von dieser systemischen Erkrankung ist neben der Leber, Milz, Nieren, Lungen und dem Knochenmark auch das Nervensystem betroffen, wodurch sich eine Vielzahl verschiedener Symptome zeigen. Heterozygote *GBA*-Mutationen konnten jedoch auch als Risikofaktor mit einer Odds Ratio von 5,43 für das Erkranken an einem PS identifiziert werden. So entwickelten Verwandte von Morbus Gaucher-Erkrankten häufiger ein PS. Unter PS-Patienten erkrankten Träger einer *GBA*-Mutation zudem früher als nicht-Träger (Sidransky, 2006; Sidransky *et al.*, 2009). Eine Assoziation von *RAPSN*-Mutationen zum PS wäre daher denkbar, auch wenn in der Literaturdatenbank PubMed bisher kein vermehrtes Auftreten von PS-Fällen bei heterozygoten Trägern — beispielsweise bei den Eltern von Patienten mit kongenitalem myasthenem Syndrom — berichtet wurde (Abfrage vom 14.10.2016). Die auf Exon 2 des Gens *RAPSN* beschränkte Untersuchung von 277 PS-Patienten ergab weiterhin keine erhöhte Mutationsfrequenz.

Bei Familie G war keines der zehn gefilterten Gene bisher als PS-assoziiert berichtet worden. Die Wahl fiel nach Anwendung der genannten Kriterien (Frequenz, *in-silico* Scores, Expression, Funktion) auf die Varianten in den Kandidatengen *CPNE3*, *HSDL2* und *ZBTB47*. *CPNE3* kodiert für das Protein Copine III, welches zur Familie der kalzium-abhängigen Lipid-bindenden Copine-Proteinen gehört (Ramsey *et al.*, 2008). Es konnte zudem gezeigt werden, dass es evolutionär konserviert ist und eine Kinaseaktivität besitzt (Creutz *et al.*, 1998; Caudell *et al.*, 2000). Die durch das elf Exons enthaltende Gen *HSDL2* kodierte Protein Hydroxysteroid dehydrogenase like 2 gehört der Familie der Sterol carrier protein-2 (SCP-2) (Edqvist und Blomqvist, 2006) an und ist in die Synthese von Steroidhormonen sowie in den fetalen Entwicklungsprozess involviert. *HSDL2* wird in vielen Geweben exprimiert, unter anderem im fetalen Hirn sowie Leber, Niere, Prostata, Hoden und Ovar (Dai *et al.*, 2003). Für das vom Gen *ZBTB47* kodierte Protein Zinc finger and BTB domain containing 47 konnte gezeigt werden, dass es als Transkriptionsfaktor bzw.

Repressor fungiert. Die Expression wurde im Hirngewebe, aber auch in Auge, Leber, Hoden und Ovar nachgewiesen (Kumar *et al.*, 2010)

In den Projekten 2 und 3 wurden die die oben genannten Kandidatenvarianten tragenden Exons in einer Stichprobe von jeweils etwa 300 PS-Patienten untersucht, um die Prävalenz bei PS-Patienten zu überprüfen. Im Vergleich zur ExAC-Population ergaben sich jedoch in keinem Falle signifikant höhere Allelfrequenzen. Gründe hierfür können in der Auswahl der Varianten und der Anwendung der zuvor diskutierten Kriterien liegen. Weiterhin ist es möglich, dass die auch unter Abwägung der Kosten und des zeitlichen Aufwandes gewählte Größe der untersuchten Patienten-Stichprobe zu klein war. Eine Erweiterung könnte daher im Falle einer nur geringen Effektstärke der gesuchten Mutation die Power der Untersuchung erhöhen und möglicherweise richtungsweisendere Ergebnisse bereithalten. Die aus denselben Gründen auf einzelne Exons der Kandidatengene beschränkte Sequenzierung erlaubt weiterhin keine Aussage über das Vorliegen von Mutationen in der übrigen kodierenden Sequenz. Weiterhin sind die im Filterprozess aussortierten Kandidatengene zu berücksichtigen und müssten gegebenenfalls ebenfalls in einer Stichprobe überprüft werden. Durch die nun gegebene Verfügbarkeit der Exomdaten kann bei zukünftigen Berichten in der Literatur über neue PS-Gene problemlos eine erneute Auswertung der Datensätze erfolgen. An dieser Stelle ist auch die bereits eingangs erläuterte Stärke der durch das NGS ermöglichten unvoreingenommenen Herangehensweise zu erkennen.

Zusammenfassend gelang die Aufklärung in einer der drei untersuchten PS- bzw. Tremor-Familien, was eine Aufklärungsrate von 33 % ergibt. Diese Quote entspricht dem zu erwartenden und für die Methodik der Exom-Sequenzierung in der Literatur berichteten Wert (Levenson, 2014; Yang *et al.*, 2014).

#### *Genetische Analyse diskordanter, eineiiger Zwillinge*

Der Untersuchung der monozygoten Zwillingspaare lag das Paradoxon zugrunde, dass die Geschwister genetisch identisch sind, jedoch nur ein Zwilling an einem PS erkrankt war. Es bestand daher die Hypothese, dass eine somatische Mutation für das Erkranken des betroffenen Zwillinges verantwortlich ist (Abb. 19). Dabei kann sich das, meist durch Mitosefehler, entstehende genetische Mosaik entweder in einzelnen, im Organismus verteilten mutierten Zellen niederschlagen (A), denkbar ist jedoch auch eine auf bestimmte Zellpopulationen (z. B. Neuronen) beschränkte Trägerschaft (B). Abhängig ist dies vom Zeitpunkt des Auftretens der Mutation und der betroffenen Zellgattung.

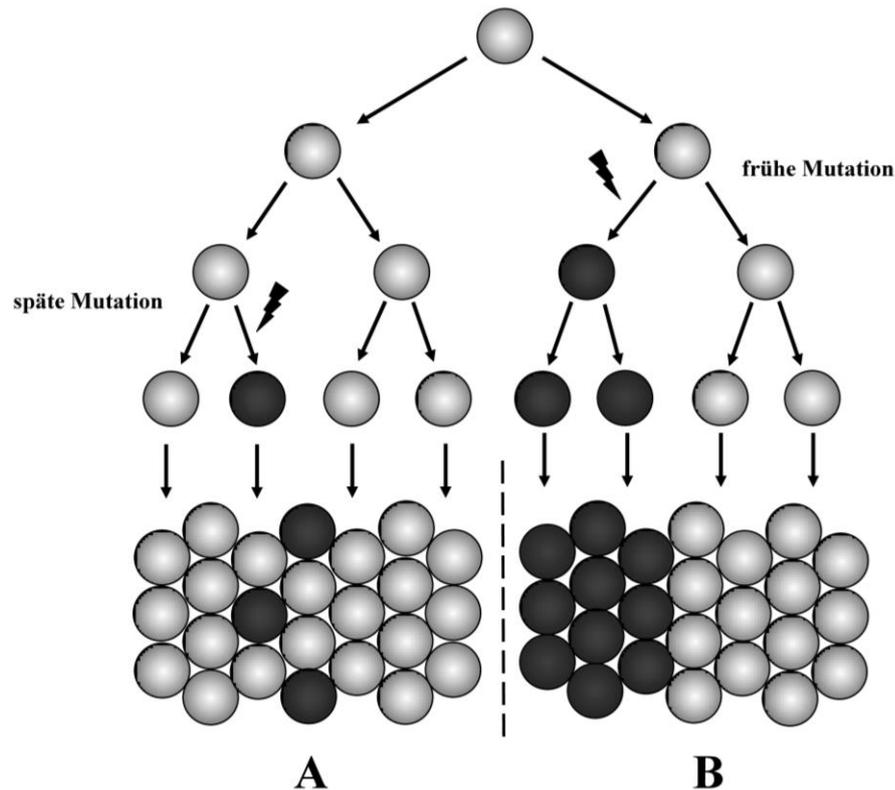


Abb. 19: Modell zur Mosaikentstehung. Bei einer sich erst in späteren Zellteilungen ereigneten Mutation (Blitz) sind nur einzelne Zellen von dieser betroffen (A) und mit den Wildtypzellen vermischt. In frühen Stadien auftretende Mutationen (B) können eine komplette Zellpopulation betreffen (z. B. Neuronen), in anderen (z. B. Blutzellen) jedoch nicht zu finden sein.

Hierzu wurden die Varianten der Exom-Sequenzierung miteinander verglichen und jene Varianten ausgewählt, welche nicht von beiden Zwillingen geteilt wurden. Die Validierung der gefilterten Varianten in der Sanger-Sequenzierung konnte jedoch in keinem Falle die in der NGS festgestellte Diskordanz bestätigen. Gründe hierfür können im Filteransatz zu finden sein, welcher durch die Konzentrierung auf die Unterschiede in zwei theoretisch genetisch identischen Organismen zwar einerseits in der Lage ist, im Laufe des Lebens erworbene (somatische) Mutationen aufzuspüren, andererseits jedoch auch falsch positive Funde anreichert. Für das verwendete Sequenziergerät (*HiSeq2000*) des Herstellers *Illumina* wird eine Fehlerrate von etwa 2 % berichtet (Liu *et al.*, 2012), was bei 40.000 Varianten 800 Lesefehler bedeutet. Die Sanger-Sequenzierung wurde kein zweites Mal wiederholt, da ihre Fehlerrate auch in Anbetracht der kurzen Sequenzlänge mit 99.999 % sehr gering ist (Shendure und Ji, 2008). Da die untersuchte DNA aus Vollblut bzw. Leukozyten extrahiert wurde, konnten lediglich Mutationen innerhalb dieser Zellpopulation analysiert wer-

den. Durch den oben beschriebenen Mechanismus der Mosaikentstehung besteht die Möglichkeit, dass zu wenige bzw. keine mutationstragende Zellen erfasst wurden. Aufgrund der schweren Verfügbarkeit von aus Nervengewebe gewonnener DNA konnte diese Möglichkeit im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer „blinder Fleck“ der Analysen ist das mitochondriale Erbgut. Gendefekte in den „Kraftwerken der Zellen“ manifestieren sich aufgrund des hohen Energiebedarfs der Nervenzellen klinisch häufig in Form neurologischer Erkrankungen, wie beispielsweise dem MELAS- und MERFF-Syndrom, der Leber'schen Optikusatrophie oder auch der subakuten nekrotisierenden Enzephalomyopathie (Leigh-Syndrom). Weiterhin könnte die Krankheitsursache auch in Umweltbedingungen begründet sein, denen beide Zwillinge in unterschiedlichem Maße ausgesetzt waren. Pathogenetisch relevante Umweltfaktoren sind häufig schwer bzw. nur in aufwendigen Studien nachweisbar, jedoch stehen verschiedene Chemikalien und Metalle, wie beispielsweise Blei, im Verdacht ein PS auslösen zu können. Insbesondere für Pestizide, welche zunehmend in ländlichen Regionen das Trink- bzw. Brunnenwasser belasten, konnte eine krankheitsverursachende Wirkung nachgewiesen werden. So wurde in einer großen Kohortenstudie mit 143.325 Teilnehmern ein relatives Risiko von 1,7 für eine Parkinson-Erkrankung nach einer Pestizidbelastung berichtet (Ascherio *et al.*, 2006). Weiterhin konnte in einer 99 diskordante Zwillingspaare einschließenden Studie festgestellt werden, dass eine Trichlorethylen-Exposition (TCE), ein weitläufig verbreitetes, umweltkontaminierendes Lösungsmittel, signifikant mit einem höheren Erkrankungsrisiko (Odds-Ratio = 6,1,  $p = 0,0034$ ) assoziiert ist (Goldman *et al.*, 2012).

#### *Bedeutung der unabhängigen Replikation*

Aufgrund des hypothesenfreien Untersuchungsansatzes der NGS-Technologie sind Zufallsbefunde nicht selten und bedürfen einer unabhängigen Validierung, wie sie im Rahmen des Projektes 5 erfolgte. Berichte über mittels NGS gefundene Mutationen im Gen *RAB39B* bei einer PS-Familie (Mata *et al.*, 2015) gaben Anlass zur Screening-Untersuchung der hiesigen PS-Patienten-Kohorte (Löchte *et al.*, 2016). *RAB39B* ist im System des vesikulären Transports involviert und beeinflusst möglicherweise dabei die Entstehung der pathologischen  $\alpha$ -Synuclein Ablagerungen, wie auch kürzlich für das im Abschnitt 1.2.2 vorgestellte PS-Gen *VPS35* berichtet wurde (Dhungel *et al.*, 2015; Lesage *et al.*, 2015). Mittels Sanger-Sequenzierung wurde der komplette kodierende Bereich samt angrenzenden Regionen des Kandidatengens *RAB39B* bei PS-Patienten ohne kognitives Defizit, XDP-Patienten sowie bei gesunden Kontrollen auf Mutationen untersucht. Die

dabei erhobenen Befunde deuten auf keine erhöhte Trägerrate sowohl in PS-Patienten ohne kognitives Defizit, als auch in XDP-Patienten hin. Gestützt wird diese Schlussfolgerung durch weitere Publikationen, die sich mit derselben Frage auseinandergesetzt haben. So konnten in 502 Han-chinesischen PS-Patienten keine Mutationen im kodierenden Bereich gefunden werden (Yuan *et al.*, 2015). Hodges *et al.* kommen nach einem Screening von 884 PS- und 778 Lewy-Body-Demenz-Patienten kaukasischer Herkunft ebenfalls zu dem Ergebnis, dass *RAB39B*-Mutationen nicht häufiger in diesen Gruppen zu finden sind (Hodges *et al.*, 2016). Die Mehrheit der Studien, welche eine Assoziation zum PS herstellen konnten, wurden an Patienten mit kognitiven Defiziten durchgeführt (Wilson *et al.*, 2014; Lesage *et al.*, 2015), auch wenn Mata *et al.* ausdrücklich darauf hinweisen, dass lediglich zwei ihrer sechs Mutationsträger Zeichen einer mentalen Retardierung zeigten (Mata *et al.*, 2015). Die bisher veröffentlichten Publikationen deuten daher darauf hin, dass sich die Assoziation auf diese Untergruppe (*intellectual disability*, ID) beschränkt und die Defizite eher auf eine Entwicklungsstörung beruhen als auf einer neurodegenerativen Demenz. Eine Vergrößerung der Screening-Stichprobe könnte diese Aussage stärken, da die Möglichkeit besteht, nur zufällig keine Mutationsträger gefunden zu haben.

Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass sich der erhobene Befund schlüssig in die vorhandene Literatur einordnen lässt und die Aussagekraft hinsichtlich der geringeren Bedeutung von *RAB39B*-Mutationen in PS-Patienten untermauert (Löchte *et al.*, 2016).

## 5 Schlussfolgerungen

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Identifizierung genetischer Ursachen des Parkinson-Syndroms unter Anwendung des *next-generation sequencing*. Dabei wurde einerseits auf genetisches Material von drei Familien und zwei Zwillingspaaren zurückgegriffen, andererseits eine Screening-Studie zur Validierung des potentiellen Parkinson-Gens *RAB39B* durchgeführt.

Das compound-heterozygote Auftreten der Spleißstellenmutation c.610-1G>T in Kombination mit der *missense*-Mutationen c.1627C>T (p.Arg543Cys) konnte im Falle der erkrankten Töchter der Familie M (Projekt 1) als Auslöser einer *PLA2G6*-assoziierten Neurodegeneration identifiziert werden. Die neuropathologischen Befunde legen einen zeitabhängigen Zusammenhang für das Vorkommen von Eisenablagerungen in der histologischen Untersuchung nahe. Bei Familie B (Projekt 2) konnte unter Anwendung der zugrundeliegenden Auswertungsstrategie für keine der gefilterten und in der PS-Patientenstichprobe kontrollierten Kandidatenvarianten in den Genen *RAPSN*, *SALL3* und *TPII* eine Krankheitsassoziation zweifelsfrei nachgewiesen werden. Auch in Familie G (Projekt 3) konnte dieser Nachweis nach Untersuchung der ausgewählten Kandidatengene *CPNE3*, *HSDL2* und *ZBTB47* nicht erbracht werden.

Weiterhin konnte im Rahmen einer Screening-Untersuchung (Projekt 5) die Prävalenz von *RAB39B*-Mutationen innerhalb einer Stichprobe von 650 Parkinson- bzw. XDP-Patienten ermittelt werden. Es wurden in vier PS-Patienten drei Varianten ohne krankheitsverursachende Auswirkung im Kandidatengen *RAB39B* gefunden. Somit wurde gezeigt, dass bei Parkinson-Patienten ohne kognitive Defizite sowie in XDP-Patienten keine Erhöhung der Häufigkeit von *RAB39B*-Mutationen vorliegt.

In Zusammenschau der oben genannten Ergebnisse dieser Arbeit gelang die Aufklärung in einer der drei PS-Familien, was eine Aufklärungsrate von 33 % ergibt. Diese Quote entspricht dem zu erwartenden und für die Methodik der Exom-Sequenzierung in der Literatur berichteten Wert (Levenson, 2014; Yang *et al.*, 2014). Im Falle der diskordanten Zwillingspaare (Projekt 4) konnte die der Untersuchung zugrundeliegende Hypothese des Vorliegens einer krankheitsverursachenden somatischen Mutation mit der angewendeten Methodik nicht bestätigt werden.

## 6 Zusammenfassung

Das Parkinson-Syndrom (PS) ist eine heterogene neurodegenerative Erkrankung, welche ursprünglich als Lehrbuchmodell einer nicht-genetischen Erkrankung galt. Im Verlauf der zurückliegenden 20 Jahre konnte jedoch eine stetig wachsende Anzahl krankheitsverursachender Gene identifiziert werden. Mittlerweile konnten unter anderem auch mithilfe der *next-generation sequencing* (NGS)-Technologie für die Gruppe der genetischen PS 23 Loci (PARK1-23) und 18 Gene gefunden werden. Die Untersuchung familiärer PS kann dabei helfen, die Pathomechanismen der idiopathischen Formen zu verstehen.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, unter Einsatz des NGS bzw. der Exomsequenzierung in drei Familien (I) sowie zwei Zwillingspaaren (II) die genetische Ursache des aufgetretenen PS bzw. des Tremors aufzudecken, wobei die Datensätze gefiltert und die Kandidatenvarianten mittels Sanger-Sequenzierung validiert wurden. (III) Weiterhin sollte die Prävalenz von Mutationen im kürzlich publizierten PS-Kandidatengens *RAB39B* im Rahmen einer Screening-Untersuchung ermittelt werden. Dazu wurde eine institutseigene Stichprobe bestehend aus 552 PS- sowie 99 XDP- (X-chromosomal gekoppelter Dystonie-Parkinsonismus) Patienten durch Sanger-Sequenzierung der kodierenden Sequenz auf Träger von Mutationen hin analysiert.

(I) In einer (Familie M) der drei PS-Familien konnte die Diagnose einer *PLA2G6*-assoziierte Neurodegeneration (PLAN, PARK14) gestellt werden. Untermauert wurden die genetischen Befunde durch neuropathologische Untersuchungen der Erkrankten. In den Familien G und B sowie in den Zwillingspaaren (II) konnte nach Analyse der gefilterten Varianten keine als krankheitsursächlich identifiziert werden. Eine Neuauswertung der Exom-Datensätze unter Berücksichtigung neuer Forschungsergebnisse könnte die Aufklärung dennoch ermöglichen. (III) In der gescreenten Stichprobe konnten keine eindeutigen *RAB39B*-Mutationen bei XDP- sowie PS-Patienten gefunden werden.

Zusammenfassend wurde die Methodik des NGS erfolgreich eingesetzt und führte zur Aufklärung des genetischen PS bei Familie M (Klein *et al.*, 2016). Zudem konnten Erkenntnisse über die Bedeutung des Kandidatengens *RAB39B* gewonnen werden, welches für die Routinediagnostik von familiären PS ohne ausgeprägte kognitive Defizite weniger relevant erscheint (Löchte *et al.*, 2016).

## 7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die genetischen Hintergründe des Parkinson-Syndroms unter Einsatz zweier verschiedener Technologien, dem *next-generation sequencing* sowie der herkömmlichen Sanger-Sequenzierung, untersucht. Durch das Verständnis der Pathogenese und Krankheitsursache soll die Erforschung genetischer Erkrankungen helfen, zum einen neue diagnostische Werkzeuge zu entwickeln und zum anderen neue therapeutische Ansätze aufzudecken, beispielsweise durch das wachsende Verständnis des  $\alpha$ -Synuclein-Stoffwechsels mithilfe der Identifizierung neuer Parkinson-Gene.

Im Zuge dieser Arbeit wurden Familien genetisch untersucht, die bereits mehrere Jahre zuvor phänotypisiert wurden. Eine Nachuntersuchung dieser Individuen könnte neue Erkenntnisse hinsichtlich der Krankheitsentwicklung Erkrankter sowie ereigneter Neuerkrankungen vermeintlich gesunder Familienmitglieder liefern. Somit könnten durch erneute Untersuchungen Phänokopien besser identifiziert werden und die Filterung von Kandidatenvarianten erleichtert werden.

Aufgrund der ständig wachsenden Anzahl neuer Parkinson-(Kandidaten)-Gene ist eine Re-Evaluation und Filterung der untersuchten Exom-Datensätze sinnvoll. Zudem wäre eine Re-Sequenzierung der Familienmitglieder unter dem Einsatz aktuellster NGS-Technologien zu erwägen, da sich die Fehlerraten und Sensitivität neuerer Sequenzier-Geräte im Laufe der vergangenen Jahre weiter verbessert haben.

Das Kandidaten-Gen *RAB39B* wurde hinsichtlich der Prävalenz in einer Stichprobe kognitiv nicht eingeschränkter PS-Patienten untersucht. Eine Erweiterung der Stichprobengröße und Analyse der Subgruppen mit und ohne kognitive Defizite würde die Schlussfolgerung dieser Arbeit weiter unterstützen.

Darüber hinaus könnten funktionelle Studien die tatsächliche Auswirkung der gefundenen Mutationen und Kandidatenvarianten auf das kodierte Protein näher beleuchten, als es mit den durchgeführten *in-silico* Analysen möglich ist.

## Literaturverzeichnis

Aasly JO, Vilarino-Guell C, Dachsel JC, Webber PJ, West AB, Haugarvoll K, Johansen KK, Toft M, Nutt JG, Payami H, Kachergus JM, Lincoln SJ, Felic A, Wider C, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, White LR, Ross OA und Farrer MJ (2010). "Novel pathogenic LRRK2 p.Asn1437His substitution in familial Parkinson's disease." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 25(13): 2156-2163.

Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ und Wood NW (2003). "The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease." *Annals of neurology* 54(3): 283-286.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS und Sunyaev SR (2010). "A method and server for predicting damaging missense mutations." *Nature methods* 7(4): 248-249.

Alazami AM, Patel N, Shamseldin HE, Anazi S, Al-Dosari MS, Alzahrani F, Hijazi H, Alshammari M, Aldahmesh MA, Salih MA, Faqeih E, Alhashem A, Bashiri FA, Al-Owain M, Kentab AY, Sogaty S, Al Tala S, Temsah MH, Tulbah M, Aljelaify RF, Alshahwan SA, Seidahmed MZ, Alhadid AA, Aldhalaan H, AlQallaf F, Kurdi W, Alfadhel M, Babay Z, Alsogheer M, Kaya N, Al-Hassnan ZN, Abdel-Salam GM, Al-Sannaa N, Al Mutairi F, El Khashab HY, Bohlega S, Jia X, Nguyen HC, Hammami R, Adly N, Mohamed JY, Abdulwahab F, Ibrahim N, Naim EA, Al-Younes B, Meyer BF, Hashem M, Shaheen R, Xiong Y, Abouelhoda M, Aldeeri AA, Monies DM und Alkuraya FS (2015). "Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families." *Cell reports* 10(2): 148-161.

Apel ED, Roberds SL, Campbell KP und Merlie JP (1995). "Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex." *Neuron* 15(1): 115-126.

Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, Schwarzschild MA und Thun MJ (2006). "Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease." *Annals of neurology* 60(2): 197-203.

AWMF. (2016). "DGN-S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom." Abruf am 25.08.2016, [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-010k\\_S3\\_Parkinson\\_Syndrome\\_Idiopathisch\\_2016-06.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-010k_S3_Parkinson_Syndrome_Idiopathisch_2016-06.pdf).

Bardien S, Lesage S, Brice A und Carr J (2011). "Genetic characteristics of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) associated Parkinson's disease." *Parkinsonism & related disorders* 17(7): 501-508.

Baudhuin LM, Lagerstedt SA, Klee EW, Fadra N, Oglesbee D und Ferber MJ (2015). "Confirming Variants in Next-Generation Sequencing Panel Testing by Sanger Sequencing." *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 17(4): 456-461.

Beck TF, Mullikin JC und Biesecker LG (2016). "Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants." *Clinical chemistry* 62(4): 647-654.

- Berg D, Postuma RB, Adler CH, Bloem BR, Chan P, Dubois B, Gasser T, Goetz CG, Halliday G, Joseph L, Lang AE, Liepelt-Scarfone I, Litvan I, Marek K, Obeso J, Oertel W, Olanow CW, Poewe W, Stern M und Deuschl G (2015). "MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 30(12): 1600-1611.
- Bohlega SA, Al-Mubarak BR, Alyemni EA, Abouelhoda M, Monies D, Mustafa AE, Khalil DS, Al Haibi S, Abou Al-Shaar H, Faquih T, El-Kalioby M, Tahir AI und Al Tassan NA (2016). "Clinical heterogeneity of PLA2G6-related Parkinsonism: analysis of two Saudi families." *BMC research notes* 9: 295.
- 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 (2003). "DJ-1( PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism." *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 24(3): 159-160.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN und Braak E (2003). "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." *Neurobiology of aging* 24(2): 197-211.
- Brookes AJ (1999). "The essence of SNPs." *Gene* 234(2): 177-186.
- Bruggemann N, Hagenah J, Reetz K, Schmidt A, Kasten M, Buchmann I, Eckerle S, Bahre M, Munchau A, Djarmati A, van der Veegt J, Siebner H, Binkofski F, Ramirez A, Behrens MI und Klein C (2010). "Recessively inherited parkinsonism: effect of ATP13A2 mutations on the clinical and neuroimaging phenotype." *Archives of neurology* 67(11): 1357-1363.
- Buhr F, Jha S, Thommen M, Mittelstaet J, Kutz F, Schwalbe H, Rodnina MV und Komar AA (2016). "Synonymous Codons Direct Cotranslational Folding toward Different Protein Conformations." *Molecular cell* 61(3): 341-351.
- Carlini DB und Stephan W (2003). "In vivo introduction of unpreferred synonymous codons into the Drosophila Adh gene results in reduced levels of ADH protein." *Genetics* 163(1): 239-243.
- Caudell EG, Caudell JJ, Tang CH, Yu TK, Frederick MJ und Grimm EA (2000). "Characterization of human copine III as a phosphoprotein with associated kinase activity." *Biochemistry* 39(42): 13034-13043.
- Change N, Mercier G und Lucotte G (2008). "Genetic screening of the G2019S mutation of the LRRK2 gene in Southwest European, North African, and Sephardic Jewish subjects." *Genetic testing* 12(3): 333-339.
- Chen H, Burton EA, Ross GW, Huang X, Savica R, Abbott RD, Ascherio A, Caviness JN, Gao X, Gray KA, Hong JS, Kamel F, Jennings D, Kirshner A, Lawler C, Liu R, Miller GW, Nussbaum R, Peddada SD, Rick AC, Ritz B, Siderowf AD, Tanner CM, Troster AI und Zhang J (2013). "Research on the premotor symptoms of Parkinson's disease: clinical and etiological implications." *Environmental health perspectives* 121(11-12): 1245-1252.

Cheng H, Ma Y, Ni X, Jiang M, Guo L, Ying K, Xie Y und Mao Y (2002). "Isolation and characterization of a human novel RAB (RAB39B) gene." *Cytogenetic and genome research* 97(1-2): 72-75.

Creutz CE, Tomsig JL, Snyder SL, Gautier MC, Skouri F, Beisson J und Cohen J (1998). "The copines, a novel class of C2 domain-containing, calcium-dependent, phospholipid-binding proteins conserved from Paramecium to humans." *The Journal of biological chemistry* 273(3): 1393-1402.

Dai J, Xie Y, Wu Q, Wang L, Yin G, Ye X, Zeng L, Xu J, Ji C, Gu S, Huang Q, Zhao RC und Mao Y (2003). "Molecular cloning and characterization of a novel human hydroxysteroid dehydrogenase-like 2 (HSDL2) cDNA from fetal brain." *Biochemical genetics* 41(5-6): 165-174.

Dhungel N, Eleuteri S, Li LB, Kramer NJ, Chartron JW, Spencer B, Kosberg K, Fields JA, Stafa K, Adame A, Lashuel H, Frydman J, Shen K, Masliah E und Gitler AD (2015). "Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on alpha-synuclein." *Neuron* 85(1): 76-87.

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 und Bonifati V (2009). "FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome." *Neurology* 72(3): 240-245.

Djemie T, Weckhuysen S, von Spiczak S, Carvill GL, Jaehn J, Anttonen AK, Brilstra E, Caglayan HS, de Kovel CG, Depienne C, Gaily E, Gennaro E, Giraldez BG, Gormley P, Guerrero-Lopez R, Guerrini R, Hamalainen E, Hartmann C, Hernandez-Hernandez L, Hjalgrim H, Koeleman BP, Leguern E, Lehesjoki AE, Lemke JR, Leu C, Marini C, McMahon JM, Mei D, Moller RS, Muhle H, Myers CT, Nava C, Serratos JM, Sisodiya SM, Stephani U, Striano P, van Kempen MJ, Verbeek NE, Usluer S, Zara F, Palotie A, Mefford HC, Scheffer IE, De Jonghe P, Helbig I und Suls A (2016). "Pitfalls in genetic testing: the story of missed SCN1A mutations." *Molecular genetics & genomic medicine* 4(4): 457-464.

Domingo A, Westenberger A, Lee LV, Braenne I, Liu T, Vater I, Rosales R, Jamora RD, Pasco PM, Cutiongco-Dela Paz EM, Freimann K, Schmidt TG, Dressler D, Kaiser FJ, Bertram L, Erdmann J, Lohmann K und Klein C (2015). "New insights into the genetics of X-linked dystonia-parkinsonism (XDP, DYT3)." *European journal of human genetics : EJHG* 23(10): 1334-1340.

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A und Tanner CM (2007). "Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030." *Neurology* 68(5): 384-386.

Edqvist J und Blomqvist K (2006). "Fusion and fission, the evolution of sterol carrier protein-2." *Journal of molecular evolution* 62(3): 292-306.

Edwards TL, Scott WK, Almonte C, Burt A, Powell EH, Beecham GW, Wang L, Zuchner S, Konidari I, Wang G, Singer C, Nahab F, Scott B, Stajich JM, Pericak-Vance M, Haines

J, Vance JM und Martin ER (2010). "Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease." *Annals of human genetics* 74(2): 97-109.

Faa V, Coiana A, Incani F, Costantino L, Cao A und Rosatelli MC (2010). "A synonymous mutation in the CFTR gene causes aberrant splicing in an Italian patient affected by a mild form of cystic fibrosis." *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 12(3): 380-383.

Fan HC, Gu W, Wang J, Blumenfeld YJ, El-Sayed YY und Quake SR (2012). "Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome." *Nature* 487(7407): 320-324.

Follett J, Norwood SJ, Hamilton NA, Mohan M, Kovtun O, Tay S, Zhe Y, Wood SA, Mellick GD, Silburn PA, Collins BM, Bugarcic A und Teasdale RD (2014). "The Vps35 D620N mutation linked to Parkinson's disease disrupts the cargo sorting function of retromer." *Traffic* 15(2): 230-244.

Gerlach M, Reichmann H, Riederer P, Dietmaier O, Götz W, Laux G und Storch A (2007). *Die Parkinson-Krankheit Grundlagen, Klinik, Therapie*. Vienna, Springer Vienna.

Giannandrea M, Bianchi V, Mignogna ML, Sirri A, Carrabino S, D'Elia E, Vecellio M, Russo S, Cogliati F, Larizza L, Ropers HH, Tzschach A, Kalscheuer V, Oehl-Jaschkowitz B, Skinner C, Schwartz CE, Gecz J, Van Esch H, Raynaud M, Chelly J, de Brouwer AP, Toniolo D und D'Adamo P (2010). "Mutations in the small GTPase gene RAB39B are responsible for X-linked mental retardation associated with autism, epilepsy, and macrocephaly." *American journal of human genetics* 86(2): 185-195.

Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG und Veltman JA (2011). "Unlocking Mendelian disease using exome sequencing." *Genome biology* 12(9): 228.

Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG und Veltman JA (2012). "Disease gene identification strategies for exome sequencing." *European journal of human genetics : EJHG* 20(5): 490-497.

Giri A, Guven G, Hanagasi H, Hauser AK, Erginul-Unaltuna N, Bilgic B, Gurvit H, Heutink P, Gasser T, Lohmann E und Simon-Sanchez J (2016). "PLA2G6 Mutations Related to Distinct Phenotypes: A New Case with Early-onset Parkinsonism." *Tremor and other hyperkinetic movements* 6: 363.

Goldman SM, Quinlan PJ, Ross GW, Marras C, Meng C, Bhudhikanok GS, Comyns K, Korell M, Chade AR, Kasten M, Priestley B, Chou KL, Fernandez HH, Cambi F, Langston JW und Tanner CM (2012). "Solvent exposures and Parkinson disease risk in twins." *Annals of neurology* 71(6): 776-784.

Greggio E (2012). "Role of LRRK2 kinase activity in the pathogenesis of Parkinson's disease." *Biochemical Society transactions* 40(5): 1058-1062.

Gregory A und Hayflick S (2014). Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders Overview. GeneReviews(R). R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger et al. Seattle (WA).

Gregory A, Westaway SK, Holm IE, Kotzbauer PT, Hogarth P, Sonek S, Coryell JC, Nguyen TM, Nardocci N, Zorzi G, Rodriguez D, Desguerre I, Bertini E, Simonati A,

Levinson B, Dias C, Barbot C, Carrilho I, Santos M, Malik I, Gitschier J und Hayflick SJ (2008). "Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A(2)." *Neurology* 71(18): 1402-1409.

Grunewald A, Arns B, Seibler P, Rakovic A, Munchau A, Ramirez A, Sue CM und Klein C (2012). "ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with Kufor-Rakeb syndrome." *Neurobiology of aging* 33(8): 1843 e1841-1847.

Grunewald A, Voges L, Rakovic A, Kasten M, Vandebona H, Hemmelmann C, Lohmann K, Orolicki S, Ramirez A, Schapira AH, Pramstaller PP, Sue CM und Klein C (2010). "Mutant Parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts." *PloS one* 5(9): e12962.

Haack TB, Hogarth P, Kruer MC, Gregory A, Wieland T, Schwarzmayr T, Graf E, Sanford L, Meyer E, Kara E, Cuno SM, Harik SI, Dandu VH, Nardocci N, Zorzi G, Dunaway T, Tarnopolsky M, Skinner S, Frucht S, Hanspal E, Schrandt-Stumpel C, Heron D, Mignot C, Garavaglia B, Bhatia K, Hardy J, Strom TM, Boddaert N, Houlden HH, Kurian MA, Meitinger T, Prokisch H und Hayflick SJ (2012). "Exome sequencing reveals de novo WDR45 mutations causing a phenotypically distinct, X-linked dominant form of NBIA." *American journal of human genetics* 91(6): 1144-1149.

Haugarvoll K und Wszolek ZK (2009). "Clinical features of LRRK2 parkinsonism." *Parkinsonism & related disorders* 15 Suppl 3: S205-208.

Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AH, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ und Wood NW (2008). "Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study." *The Lancet. Neurology* 7(7): 583-590.

Hedrich K, Eskelson C, Wilmot B, Marder K, Harris J, Garrels J, Meija-Santana H, Vieregge P, Jacobs H, Bressman SB, Lang AE, Kann M, Abbruzzese G, Martinelli P, Schwinger E, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C und Kramer P (2004). "Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 19(10): 1146-1157.

Hedrich K, Kann M, Lanthaler AJ, Dalski A, Eskelson C, Landt O, Schwinger E, Vieregge P, Lang AE, Breakefield XO, Ozelius LJ, Pramstaller PP und Klein C (2001). "The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the parkin gene in early-onset parkinsonism." *Human molecular genetics* 10(16): 1649-1656.

Heinrich C, Keller C, Boulay A, Vecchi M, Bianchi M, Sack R, Lienhard S, Duss S, Hofsteenge J und Hynes NE (2010). "Copine-III interacts with ErbB2 and promotes tumor cell migration." *Oncogene* 29(11): 1598-1610.

Hernandez DG, Reed X und Singleton AB (2016). "Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance." *Journal of neurochemistry*.

Hodges K, Brewer SS, Labbe C, Soto-Ortolaza AI, Walton RL, Strongosky AJ, Uitti RJ, van Gerpen JA, Ertekin-Taner N, Kantarci K, Lowe VJ, Parisi JE, Savica R, Graff-Radford J, Jones DT, Knopman DS, Petersen RC, Murray ME, Graff-Radford NR, Ferman TJ,

- Dickson DW, Wszolek ZK, Boeve BF, Ross OA und Lorenzo-Betancor O (2016). "RAB39B gene mutations are not a common cause of Parkinson's disease or dementia with Lewy bodies." *Neurobiology of aging* 45: 107-108.
- Ibanez P, Lesage S, Lohmann E, Thobois S, De Michele G, Borg M, Agid Y, Durr A und Brice A (2006). "Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa." *Brain : a journal of neurology* 129(Pt 3): 686-694.
- Illumina I. (2014). "HiSeq™ Sequencing Systems." Abruf am 28.09.2016, [http://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet\\_hiseq\\_systems.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_hiseq_systems.pdf).
- Illumina I. (2016). "Next-Generation Sequencing (NGS)." Abruf am 25.08.2016, <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>.
- Jankovic J (2008). "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79(4): 368-376.
- Kajiwara Y, Akram A, Katsel P, Haroutunian V, Schmeidler J, Beecham G, Haines JL, Pericak-Vance MA und Buxbaum JD (2009). "FE65 binds Teashirt, inhibiting expression of the primate-specific caspase-4." *PloS one* 4(4): e5071.
- Kane LA, Lazarou M, Fogel AI, Li Y, Yamano K, Sarraf SA, Banerjee S und Youle RJ (2014). "PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity." *The Journal of cell biology* 205(2): 143-153.
- Karkheiran S, Shahidi GA, Walker RH und Paisan-Ruiz C (2015). "PLA2G6-associated Dystonia-Parkinsonism: Case Report and Literature Review." *Tremor and other hyperkinetic movements* 5: 317.
- Kasten M, Hagenah J, Graf J, Lorwin A, Vollstedt EJ, Peters E, Katalinic A, Raspe H und Klein C (2013). "Cohort Profile: a population-based cohort to study non-motor symptoms in parkinsonism (EPIPARK)." *International journal of epidemiology* 42(1): 128-128k.
- Khan NL, Graham E, Critchley P, Schrag AE, Wood NW, Lees AJ, Bhatia KP und Quinn N (2003). "Parkin disease: a phenotypic study of a large case series." *Brain : a journal of neurology* 126(Pt 6): 1279-1292.
- Khateeb S, Flusser H, Ofir R, Shelef I, Narkis G, Vardi G, Shorer Z, Levy R, Galil A, Elbedour K und Birk OS (2006). "PLA2G6 mutation underlies infantile neuroaxonal dystrophy." *American journal of human genetics* 79(5): 942-948.
- Kinghorn KJ, Castillo-Quan JI, Bartolome F, Angelova PR, Li L, Pope S, Cocheme HM, Khan S, Asghari S, Bhatia KP, Hardy J, Abramov AY und Partridge L (2015). "Loss of PLA2G6 leads to elevated mitochondrial lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction." *Brain : a journal of neurology* 138(Pt 7): 1801-1816.
- Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM und Shendure J (2014). "A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants." *Nature genetics* 46(3): 310-315.

Kircher MW, DM; Jain, P; O'Roak, BJ; Cooper, GM; Shendure, J. . (2014 ). "Combined Annotation Dependent Depletion (CADD): Information." Abruf am 24.10.2016, <http://cadd.gs.washington.edu/info>: <http://cadd.gs.washington.edu/info>.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y und Shimizu N (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." *Nature* 392(6676): 605-608.

Klein C, Djarmati A, Hedrich K, Schafer N, Scaglione C, Marchese R, Kock N, Schule B, Hiller A, Lohnau T, Winkler S, Wiegers K, Hering R, Bauer P, Riess O, Abbruzzese G, Martinelli P und Pramstaller PP (2005). "PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism." *European journal of human genetics : EJHG* 13(9): 1086-1093.

Klein C, Löchte T, Delamonte SM, Braenne I, Hicks AA, Zschiedrich-Jansen K, Simon DK, Friedman JH und Lohmann K (2016). "PLA2G6 mutations and Parkinsonism: Long-term follow-up of clinical Features and Neuropathology." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*.

Kong SM, Chan BK, Park JS, Hill KJ, Aitken JB, Cottle L, Farghaian H, Cole AR, Lay PA, Sue CM und Cooper AA (2014). "Parkinson's disease-linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes alpha-Synuclein externalization via exosomes." *Human molecular genetics* 23(11): 2816-2833.

Kumar KR, Djarmati-Westenberger A und Grunewald A (2011). "Genetics of Parkinson's disease." *Seminars in neurology* 31(5): 433-440.

Kumar KR, Weissbach A, Heldmann M, Kasten M, Tunc S, Sue CM, Svetel M, Kostic VS, Segura-Aguilar J, Ramirez A, Simon DK, Vieregge P, Munte TF, Hagenah J, Klein C und Lohmann K (2012). "Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease." *Archives of neurology* 69(10): 1360-1364.

Kumar P, Henikoff S und Ng PC (2009). "Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm." *Nature protocols* 4(7): 1073-1081.

Kumar R, Cheney KM, Neilsen PM, Schulz RB und Callen DF (2010). "CBFA2T3-ZNF651, like CBFA2T3-ZNF652, functions as a transcriptional corepressor complex." *FEBS letters* 584(5): 859-864.

Lan Q, Au WY, Chanock S, Tse J, Wong KF, Shen M, Siu LP, Yuenger J, Yeager M, Hosgood HD, 3rd, Purdue MP, Liang R und Rothman N (2010). "Genetic susceptibility for chronic lymphocytic leukemia among Chinese in Hong Kong." *European journal of haematology* 85(6): 492-495.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D,

- Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ und MacArthur DG (2016). "Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans." *Nature* 536(7616): 285-291.
- Lesage S, Bras J, Cormier-Dequaire F, Condroyer C, Nicolas A, Darwent L, Guerreiro R, Majounie E, Federoff M, Heutink P, Wood NW, Gasser T, Hardy J, Tison F, Singleton A und Brice A (2015). "Loss-of-function mutations in RAB39B are associated with typical early-onset Parkinson disease." *Neurology. Genetics* 1(1): e9.
- Lesage S, Condroyer C, Klebe S, Honore A, Tison F, Brefel-Courbon C, Durr A und Brice A (2012). "Identification of VPS35 mutations replicated in French families with Parkinson disease." *Neurology* 78(18): 1449-1450.
- Lesage S, Condroyer C, Lannuzel A, Lohmann E, Troiano A, Tison F, Damier P, Thobois S, Ouvrard-Hernandez AM, Rivaud-Pechoux S, Brefel-Courbon C, Destee A, Tranchant C, Romana M, Leclere L, Durr A und Brice A (2009). "Molecular analyses of the LRRK2 gene in European and North African autosomal dominant Parkinson's disease." *Journal of medical genetics* 46(7): 458-464.
- Lesage S, Durr A und Brice A (2006). "[LRRK2 is a major gene in North African parkinsonism]." *Medicine sciences : M/S* 22(5): 470-471.
- Levenson D (2014). "Whole-exome sequencing emerges as clinical diagnostic tool: testing method proves useful for diagnosing wide range of genetic disorders." *American journal of medical genetics. Part A* 164A(1): ix-x.
- Lin HC, Zhang FL, Geng Q, Yu T, Cui YQ, Liu XH, Li J, Yan MX, Liu L, He XH, Li JJ und Yao M (2013). "Quantitative proteomic analysis identifies CPNE3 as a novel metastasis-promoting gene in NSCLC." *Journal of proteome research* 12(7): 3423-3433.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L und Law M (2012). "Comparison of next-generation sequencing systems." *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012: 251364.
- Löchte T, Bruggemann N, Vollstedt EJ, Krause P, Domingo A, Rosales R, Lee LV, Hopfner F, Westenberger A, Kuhn A, Klein C und Lohmann K (2016). "RAB39B mutations are a rare finding in Parkinson disease patients." *Parkinsonism & related disorders* 23: 116-117.
- Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, Wood NW, De Michele G, Bonnet AM, Fraix V, Broussolle E, Horstink MW, Vidailhet M, Verpillat P, Gasser T, Nicholl D, Teive H, Raskin S, Rascol O, Destee A, Ruberg M, Gasparini F, Meo G, Agid Y, Durr A und Brice A (2003). "How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype?" *Annals of neurology* 54(2): 176-185.
- Lohmann K und Klein C (2014). "Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis." *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 11(4): 699-707.

Lorenzo-Betancor O, Samaranch L, Ezquerra M, Tolosa E, Lorenzo E, Irigoyen J, Gaig C, Pastor MA, Soto-Ortolaza AI, Ross OA, Rodriguez-Oroz MC, Valldeoriola F, Marti MJ, Luquin MR, Perez-Tur J, Burguera JA, Obeso JA und Pastor P (2012). "LRRK2 haplotype-sharing analysis in Parkinson's disease reveals a novel p.S1761R mutation." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27(1): 146-151.

Makrythanasis P und Antonarakis SE (2013). "Pathogenic variants in non-protein-coding sequences." *Clinical genetics* 84(5): 422-428.

Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, Mercimek-Mahmutoglu S, Ebrahimi-Fakhari D, Warner TT, Durr A, Assmann B, Lohmann K, Kostic V und Klein C (2016). "Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 31(4): 436-457.

Mata IF, Jang Y, Kim CH, Hanna DS, Dorschner MO, Samii A, Agarwal P, Roberts JW, Klepitskaya O, Shprecher DR, Chung KA, Factor SA, Espay AJ, Revilla FJ, Higgins DS, Litvan I, Leverenz JB, Yearout D, Inca-Martinez M, Martinez E, Thompson TR, Cholerton BA, Hu SC, Edwards KL, Kim KS und Zabetian CP (2015). "The RAB39B p.G192R mutation causes X-linked dominant Parkinson's disease." *Molecular neurodegeneration* 10: 50.

MDS (2003). "Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease; The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 18(7): 738-750.

Mo W, Zhang J, Li X, Meng D, Gao Y, Yang S, Wan X, Zhou C, Guo F, Huang Y, Amente S, Avvedimento EV, Xie Y und Li Y (2013). "Identification of novel AR-targeted microRNAs mediating androgen signalling through critical pathways to regulate cell viability in prostate cancer." *PloS one* 8(2): e56592.

Muller JS, Mildner G, Muller-Felber W, Schara U, Krampfl K, Petersen B, Petrova S, Stucka R, Mortier W, Bufler J, Kurlemann G, Huebner A, Merlini L, Lochmuller H und Abicht A (2003). "Rapsyn N88K is a frequent cause of congenital myasthenic syndromes in European patients." *Neurology* 60(11): 1805-1810.

Muzzey D, Evans EA und Lieber C (2015). "Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling." *Current genetic medicine reports* 3(4): 158-165.

Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, Saad M, Simon-Sanchez J, Schulte C, Lesage S, Sveinbjornsdottir S, Stefansson K, Martinez M, Hardy J, Heutink P, Brice A, Gasser T, Singleton AB und Wood NW (2011). "Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies." *Lancet* 377(9766): 641-649.

Narendra D, Tanaka A, Suen DF und Youle RJ (2008). "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy." *The Journal of cell biology* 183(5): 795-803.

- Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR und Youle RJ (2010). "PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin." *PLoS biology* 8(1): e1000298.
- Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, Chaudhry FA, Nicoll RA und Edwards RH (2010). "Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis." *Neuron* 65(1): 66-79.
- Nemirovsky SI, Cordoba M, Zaiat JJ, Completa SP, Vega PA, Gonzalez-Moron D, Medina NM, Fabbro M, Romero S, Brun B, Revale S, Ogara MF, Pecci A, Marti M, Vazquez M, Turjanski A und Kauffman MA (2015). "Whole genome sequencing reveals a de novo SHANK3 mutation in familial autism spectrum disorder." *PloS one* 10(2): e0116358.
- Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, Liu CL, Neal JW, Wakelee HA, Merritt RE, Shrager JB, Loo BW, Jr., Alizadeh AA und Diehn M (2014). "An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage." *Nature medicine* 20(5): 548-554.
- Nuytemans K, Bademci G, Inchausti V, Dressen A, Kinnamon DD, Mehta A, Wang L, Zuchner S, Beecham GW, Martin ER, Scott WK und Vance JM (2013). "Whole exome sequencing of rare variants in EIF4G1 and VPS35 in Parkinson disease." *Neurology* 80(11): 982-989.
- Nuytemans K, Theuns J, Cruts M und Van Broeckhoven C (2010). "Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update." *Human mutation* 31(7): 763-780.
- O'Hurley G, Busch C, Fagerberg L, Hallstrom BM, Stadler C, Tolf A, Lundberg E, Schwenk JM, Jirstrom K, Bjartell A, Gallagher WM, Uhlen M und Ponten F (2015). "Analysis of the Human Prostate-Specific Proteome Defined by Transcriptomics and Antibody-Based Profiling Identifies TMEM79 and ACOXL as Two Putative, Diagnostic Markers in Prostate Cancer." *PloS one* 10(8): e0133449.
- O'Rahilly S, Krook A, Morgan R, Rees A, Flier JS und Moller DE (1992). "Insulin receptor and insulin-responsive glucose transporter (GLUT 4) mutations and polymorphisms in a Welsh type 2 (non-insulin-dependent) diabetic population." *Diabetologia* 35(5): 486-489.
- Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M, Hunt AL, Klein C, Henick B, Hailpern SM, Lipton RB, Soto-Valencia J, Risch N und Bressman SB (2006). "LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews." *The New England journal of medicine* 354(4): 424-425.
- Pagani F, Raponi M und Baralle FE (2005). "Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(18): 6368-6372.
- Pagnamenta AT, Lise S, Harrison V, Stewart H, Jayawant S, Quaghebeur G, Deng AT, Murphy VE, Sadighi Akha E, Rimmer A, Mathieson I, Knight SJ, Kini U, Taylor JC und Keays DA (2012). "Exome sequencing can detect pathogenic mosaic mutations present at low allele frequencies." *Journal of human genetics* 57(1): 70-72.

- Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW, Hardy J, Houlden H, Singleton A und Schneider SA (2009). "Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism." *Annals of neurology* 65(1): 19-23.
- Paisan-Ruiz C, Li A, Schneider SA, Holton JL, Johnson R, Kidd D, Chataway J, Bhatia KP, Lees AJ, Hardy J, Revesz T und Houlden H (2012). "Widespread Lewy body and tau accumulation in childhood and adult onset dystonia-parkinsonism cases with PLA2G6 mutations." *Neurobiology of aging* 33(4): 814-823.
- Paisan-Ruiz C, Nath P, Washecka N, Gibbs JR und Singleton AB (2008). "Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neurologically normal controls." *Human mutation* 29(4): 485-490.
- Pankratz N, Pauciulo MW, Elsaesser VE, Marek DK, Halter CA, Wojcieszek J, Rudolph A, Shults CW, Foroud T und Nichols WC (2006). "Mutations in DJ-1 are rare in familial Parkinson disease." *Neuroscience letters* 408(3): 209-213.
- Park JS, Blair NF und Sue CM (2015). "The role of ATP13A2 in Parkinson's disease: Clinical phenotypes and molecular mechanisms." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 30(6): 770-779.
- Parkinson J (1817). "An Essay on the Shaking Palsy " *Wittingham and Rowland, London*.
- Pickrell AM und Youle RJ (2015). "The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease." *Neuron* 85(2): 257-273.
- 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 und Nussbaum RL (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." *Science* 276(5321): 2045-2047.
- Postuma RB, Gagnon JF und Montplaisir J (2010). "Clinical prediction of Parkinson's disease: planning for the age of neuroprotection." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 81(9): 1008-1013.
- Pringsheim T, Jette N, Frolkis A und Steeves TD (2014). "The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 29(13): 1583-1590.
- 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." *Nature genetics* 38(10): 1184-1191.
- Ramsey CS, Yeung F, Stoddard PB, Li D, Creutz CE und Mayo MW (2008). "Copine-I represses NF-kappaB transcription by endoproteolysis of p65." *Oncogene* 27(25): 3516-3526.

- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D und Haussler D (1997). "Improved splice site detection in Genie." *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 4(3): 311-323.
- Requejo-Aguilar R, Lopez-Fabuel I, Jimenez-Blasco D, Fernandez E, Almeida A und Bolanos JP (2015). "DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally up-regulating Pink1." *The Biochemical journal* 467(2): 303-310.
- Riku Y, Ikeuchi T, Yoshino H, Mimuro M, Mano K, Goto Y, Hattori N, Sobue G und Yoshida M (2013). "Extensive aggregation of alpha-synuclein and tau in juvenile-onset neuroaxonal dystrophy: an autopsied individual with a novel mutation in the PLA2G6 gene-splicing site." *Acta neuropathologica communications* 1: 12.
- Ronaghi M (2001). "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing." *Genome research* 11(1): 3-11.
- Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, Kachergus J, Hulihan MM, Middleton FA, Nishioka K, Fuchs J, Gasser T, Maraganore DM, Adler CH, Larvor L, Chartier-Harlin MC, Nilsson C, Langston JW, Gwinn K, Hattori N und Farrer MJ (2008). "Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism." *Annals of neurology* 63(6): 743-750.
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, Simons JF, Marran D, Myers JW, Davidson JF, Branting A, Nobile JR, Puc BP, Light D, Clark TA, Huber M, Branciforte JT, Stoner IB, Cawley SE, Lyons M, Fu Y, Homer N, Sedova M, Miao X, Reed B, Sabina J, Feierstein E, Schorn M, Alanjary M, Dimalanta E, Dressman D, Kasinskas R, Sokolsky T, Fidanza JA, Namsaraev E, McKernan KJ, Williams A, Roth GT und Bustillo J (2011). "An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing." *Nature* 475(7356): 348-352.
- Ruokun C, Yake X, Fengdong Y, Xinting W, Laijun S und Xianzhi L (2016). "Lentivirus-mediated silencing of HSDL2 suppresses cell proliferation in human gliomas." *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12): 5463-5467.
- Schierding W, Cutfield WS und O'Sullivan JM (2014). "The missing story behind Genome Wide Association Studies: single nucleotide polymorphisms in gene deserts have a story to tell." *Frontiers in genetics* 5: 39.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M und Seelow D (2014). "MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age." *Nature methods* 11(4): 361-362.
- Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T und Abeliovich A (2004). "DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation." *PLoS biology* 2(11): e362.

- Shendure J und Ji H (2008). "Next-generation DNA sequencing." *Nature biotechnology* 26(10): 1135-1145.
- Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, Wang MD, Zhang K, Mitra RD und Church GM (2005). "Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome." *Science* 309(5741): 1728-1732.
- Shojaee S, Sina F, Banihosseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi GA, Fakhrai-Rad H, Ronaghi M und Elahi E (2008). "Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays." *American journal of human genetics* 82(6): 1375-1384.
- Sidransky E (2006). "Heterozygosity for a Mendelian disorder as a risk factor for complex disease." *Clinical genetics* 70(4): 275-282.
- 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, Durr 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 und Ziegler SG (2009). "Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease." *The New England journal of medicine* 361(17): 1651-1661.
- Simons C, Wolf NI, McNeil N, Caldovic L, Devaney JM, Takanohashi A, Crawford J, Ru K, Grimmond SM, Miller D, Tonduti D, Schmidt JL, Chudnow RS, van Coster R, Lagae L, Kisler J, Sperner J, van der Knaap MS, Schiffmann R, Taft RJ und Vanderver A (2013). "A de novo mutation in the beta-tubulin gene TUBB4A results in the leukoencephalopathy hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum." *American journal of human genetics* 92(5): 767-773.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R und Goedert M (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." *Nature* 388(6645): 839-840.
- Sunyer P, Boixadera E, Munoz A, Bonal R und Espelta JM (2015). "The Interplay among Acorn Abundance and Rodent Behavior Drives the Spatial Pattern of Seedling Recruitment in Mature Mediterranean Oak Forests." *PloS one* 10(6): e0129844.
- Sveinbjornsdottir S (2016). "The clinical symptoms of Parkinson's disease." *Journal of neurochemistry*.
- Tabamo RE, Fernandez HH, Friedman JH und Simon DK (2000). "Young-onset Parkinson's disease: a clinical pathologic description of two siblings." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 15(4): 744-746.
- Tang B, Xiong H, Sun P, Zhang Y, Wang D, Hu Z, Zhu Z, Ma H, Pan Q, Xia JH, Xia K und Zhang Z (2006). "Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease." *Human molecular genetics* 15(11): 1816-1825.

Tapper WJ, Foulds N, Cross NC, Aranaz P, Score J, Hidalgo-Curtis C, Robinson DO, Gibson J, Ennis S, Temple IK und Collins A (2014). "Megalencephaly syndromes: exome pipeline strategies for detecting low-level mosaic mutations." *PloS one* 9(1): e86940.

Trinh J, Gustavsson EK, Vilarino-Guell C, Bortnick S, Latourelle J, McKenzie MB, Tu CS, Nosova E, Khinda J, Milnerwood A, Lesage S, Brice A, Tazir M, Aasly JO, Parkkinen L, Haytural H, Foroud T, Myers RH, Sassi SB, Hentati E, Nabli F, Farhat E, Amouri R, Hentati F und Farrer MJ (2016). "DNM3 and genetic modifiers of age of onset in LRRK2 Gly2019Ser parkinsonism: a genome-wide linkage and association study." *The Lancet. Neurology* 15(12): 1248-1256.

Trotta L, Guella I, Solda G, Sironi F, Tesei S, Canesi M, Pezzoli G, Goldwurm S, Duga S und Asselta R (2012). "SNCA and MAPT genes: Independent and joint effects in Parkinson disease in the Italian population." *Parkinsonism & related disorders* 18(3): 257-262.

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 und Wood NW (2004). "Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1." *Science* 304(5674): 1158-1160.

Veltman JA und Brunner HG (2012). "De novo mutations in human genetic disease." *Nature reviews. Genetics* 13(8): 565-575.

Wang Z, Liu X, Yang BZ und Gelernter J (2013). "The role and challenges of exome sequencing in studies of human diseases." *Frontiers in genetics* 4: 160.

Wilson GR, Sim JC, McLean C, Giannandrea M, Galea CA, Riseley JR, Stephenson SE, Fitzpatrick E, Haas SA, Pope K, Hogan KJ, Gregg RG, Bromhead CJ, Wargowski DS, Lawrence CH, James PA, Churchyard A, Gao Y, Phelan DG, Gillies G, Salce N, Stanford L, Marsh AP, Mignogna ML, Hayflick SJ, Leventer RJ, Delatycki MB, Mellick GD, Kalscheuer VM, D'Adamo P, Bahlo M, Amor DJ und Lockhart PJ (2014). "Mutations in RAB39B cause X-linked intellectual disability and early-onset Parkinson disease with alpha-synuclein pathology." *American journal of human genetics* 95(6): 729-735.

Wu X, Tang KF, Li Y, Xiong YY, Shen L, Wei ZY, Zhou KJ, Niu JM, Han X, Yang L, Feng GY, He L und Qin SY (2012). "Quantitative assessment of the effect of LRRK2 exonic variants on the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis." *Parkinsonism & related disorders* 18(6): 722-730.

Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, Ward P, Braxton A, Wang M, Buhay C, Veeraraghavan N, Hawes A, Chiang T, Leduc M, Beuten J, Zhang J, He W, Scull J, Willis A, Landsverk M, Craigen WJ, Bekheirnia MR, Stray-Pedersen A, Liu P, Wen S, Alcaraz W, Cui H, Walkiewicz M, Reid J, Bainbridge M, Patel A, Boerwinkle E, Beaudet AL, Lupski JR, Plon SE, Gibbs RA und Eng CM (2014). "Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing." *JAMA* 312(18): 1870-1879.

Yuan L, Deng X, Song Z, Yang Z, Ni B, Chen Y und Deng H (2015). "Genetic analysis of the RAB39B gene in Chinese Han patients with Parkinson's disease." *Neurobiology of aging* 36(10): 2907 e2911-2902.

Zabetian CP, Hutter CM, Yearout D, Lopez AN, Factor SA, Griffith A, Leis BC, Bird TD, Nutt JG, Higgins DS, Roberts JW, Kay DM, Edwards KL, Samii A und Payami H (2006). "LRRK2 G2019S in families with Parkinson disease who originated from Europe and the Middle East: evidence of two distinct founding events beginning two millennia ago." *American journal of human genetics* 79(4): 752-758.

Zimprich A, Benet-Pages 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, Brucke T, Poewe W, Auff E, Trenkwalder C, Rost B, Ransmayr G, Winkelmann J, Meitinger T und Strom TM (2011). "A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease." *American journal of human genetics* 89(1): 168-175.

Zschieidrich K (2007). Molekulargenetische Untersuchungen bei spinocerebellärer Ataxie und Parkinsonsyndromen, Universität zu Lübeck.

# Anhang

## Verwendete Primer

Projekt	Variante im Gen	Vorwärts- (F) und Rückwärts- primer (R) (5' → 3')	Produkt Länge (bp)	Annealing- temperatur (°C)
1	<i>CSF1R</i>	(F) ATCACACCTGGCAAAAGC (R) GGAAGTAGGTACTGGGAGATTG	317	60
1	<i>PLA2G6 Var.1</i>	(F) GGAGGTCTTACCCCTTCTGAG (R) GGTTCAAGCGATTCTCTTTCC	461	60
1	<i>PLA2G6 Var.2</i>	(F) GGTGTGCTCCCCAAACTC (R) CTTAGGCCTCGGTAAACCC	248	60
2	<i>RAPSN_Ex2</i>	(F) GCCTTTTTGCTCTCTGATTCTC (R) TTTGGGATCTGCTGCTTTG	612	62
2	<i>TPI1</i>	(F) GACCCTTCCCTCACTTTCCCTC (R) GAGATACCTGCGATGACCTTTG	381	62
2	<i>TPI1_Ex3-4</i>	(F) TGACTAATGGGGCTTTTACTGG (R) GTGGACATTGGGGGATTTC	633	62
2	<i>SALL3</i>	(F) CTGTCCCGGCCGAGTCT (R) TTGCCCTTGCGGTGCTTC	326	60 (GC-rich-Kit)
2	<i>SHANK2</i>	(F) TGGAAGGCTAAAGACATCTGAG (R) GGCAAATCATTCTGTTCACTG	402	58
3	<i>ACOXL</i>	(F) CTGCATTCTGGAGTCTTTG (R) CTCATGCCAGGGTATCAC	288	61
3	<i>ALDH1L1</i>	(F) CCTACTGCTTCCCTTCTACC (R) ATGAACTGCCCTGTCTTG	304	58
3	<i>APBB1</i>	(F) GGCTGTCTGACAAATAAGAGG (R) GGCTTTGAGGATGGAGAAT	428	58
3	<i>CPNE3</i>	(F) CAAGTGCACCTTTGATCTG (R) TTGTCCAAGGGTACATTCAC	232	60
3	<i>HSDL2</i>	(F) TGGTGCTTGCTTGTTACTTCC (R) GTGTTGGTATGGGTTTTCTTCC	430	61
3	<i>KIF9</i>	(F) GGTTGCTTGGAATAACGG (R) TCTCTCTGGGGTCATTGG	428	61
3	<i>PDPR</i>	(F) GTCTGAGTGTCGCTGGATGA (R) TAGGCACTGCTGGTGGTCTT	220	61
3	<i>SLC2A4</i>	(F) CCCCAGGTGATTGAACAGA (R) GGCAGGCAGACAGAGTGA	269	66
3	<i>ZBTB47</i>	(F) GTTTTTCATCCCCAACCTTAG (R) GACTTACCAACCATGTGCTTAC	323	61
3	<i>ZBTB47_Ex3</i>	(F) TCCCCAACCTTAGAAACATCAG (R) TCCTCACCCCTTCACATTG	416	56

Projekt	Variante im Gen	Vorwärts- (F) und Rückwärts- primer (R) (5' → 3')	Produkt Länge (bp)	Annealing- temperatur (°C)
3	<i>ZNF660</i>	(F) AGACTAGAGAGGACACTGGTATG (R) GTGCCGAATAAGATGTGAC	411	61
4	<i>ELMO</i>	(F) TTCCCCAGGACCTCTATGAG (R) GCCAGCCACACTGTCAAG	402	66
4	<i>MAP2K3_L28</i>	(F) GAGGAGGAGCCACAGATG (R) CCTCAGTCCAGGATCTCAG	544	66 (+DMSO)
4	<i>PHLPP1</i>	(F) ACGGATTCAGCTCTCAGGAA (R) GACCACGCCACTACACTTGA	245	66 (+DMSO)
4	<i>TMTC1</i>	(F) GGATCCCGGAGCAAAGTG (R) TGGGCGATCGTGAACAAC	307	59
4	<i>TST</i>	(F) GTAAGAACCGGCTGTAAGTC (R) TCTGTTCCAGACCAAGAAG	272	59
4	<i>ABLIM1</i>	(F) GCATCACAAGTTCATTCGTG (R) TGTTGGTGTAGGAAGTTTGTC	460	58
4	<i>ANKFY1</i>	(F) AAGCAGAAGCAGTGTCAACAG (R) TGGGTCATGGTTTTAGAAGC	431	58
4	<i>ATG4B</i>	(F) GGCGTTACTGAGTCCTAAGAG (R) CAAGAAACCCCAAGTTC	387	58
4	<i>ATXN2</i>	(F) ACAGGCCTGACAATCCCA (R) CCTTCGTCGTCCTCCTTCT	626	60 (GC-rich-Kit)
4	<i>CCDC66</i>	(F) ACAAGTGCCTGATACATAGGAG (R) CCTGTGCAACAGAATGAGTC	356	58
4	<i>CDC27</i> <i>rs77467652</i>	(F) GGGGTAGATGATCTGTATTGCTC (R) CGCTTTCACTTGATTTGGAG	366	58
4	<i>CDC27</i> <i>rs199890121</i>	(F) GGGGAAGGGGAGTATGAAACC (R) TAGATGGGAGCGTTGTGTTG	506	66
4	<i>EXOC7</i>	(F) GCACCTGGTCAAACCTCAG (R) CAGCAAGAGCTGTCACAAC	364	66
4	<i>FAM155A</i>	(F) CGGGCTTGGCAGAGTTTC (R) CTTGGATGTGTCCGCAGTATG	480	66 (+DMSO)
4	<i>HAUS5</i>	(F) GGAGCCAATACCCTAATG (R) GTGACTGAGATGACAAAACC	646	58
4	<i>KLHL36</i>	(F) GGGCACCATCTACAAAGAC (R) TTGGAGAAGGCAGTGTTTC	375	58
4	<i>MAP2K3_L38</i>	(F) ATGCTGCCAGGTATCTC (R) GAAGGACTGCCATTCAGAG	407	58
4	<i>PPM1E</i>	(F) CCACCAACTTTCCTCCAGAT (R) AGGCACAGGTCCAGGCTTT	684	58 (+DMSO)
4	<i>SLC8B1</i>	(F) CTATCCTTCCCCAAACTG (R) ACCGCTGTGACTTCATCC	357	58
4	<i>SPNS3</i>	(F) CATTCAAGTCCCATCTCAC (R) TGTGCTCTCACCTTCTCTC	613	58

---

Projekt	Variante im Gen	Vorwärts- (F) und Rückwärts- primer (R) (5' → 3')	Produkt Länge (bp)	Annealing- temperatur (°C)
4	<i>TMEM5</i>	(F) CAGGGTACTTCTCCGTTGATG (R) CCACACCCTGTTTTTATCTCTG	437	60
4	<i>TTYH3</i>	(F) CCGTGTGACTGTGCTTTG (R) GGGGAGGAAAAAATGAGG	546	58
4	<i>ZNF680</i>	(F) GGTTTCTCAACAGGATGGTGT (R) GCGGCAAAGCTTTTATACAGTC	487	66
5	<i>RAB39B_Ex1</i>	(F) CTGCCATTTTCATCACCTTTG (R) TCGGCAGAATCCTCAAGAC	549	58
5	<i>RAB39B_Ex2</i>	(F) TGTCACTAACCAGGAACACTTG (R) CCAAATGGAGGTTGAGTTCTC	623	58

---

## Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Christine Klein für die großartige Möglichkeit im Institut für Neurogenetik die vorliegende Arbeit anfertigen zu können und die nötigen Mittel zur Verfügung gestellt zu bekommen. In gleicher Weise bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Katja Lohmann für die exzellente Einarbeitung und Betreuung sowie für die hilfreiche und geduldige Beratung während der Anfertigung der Dissertationsschrift. Auch für die Unterstützung bei der Publikation der erhobenen Daten möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Weiterhin danke ich Frauke Hinrichs, Heike Pawlack und Thora Lohnau für die freundliche und kompetente Anleitung bei den praktischen Arbeiten im Labor. Auch der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für das angenehme und stets kollegiale Arbeitsklima danken.

Für die Ermöglichung des Medizinstudiums und uneingeschränkte moralische und materielle Unterstützung, welche mir die Arbeit an dieser Dissertation erst erlaubte, möchte ich mich bei meiner Familie besonders bedanken.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

---

Ort, Datum, Unterschrift