



Aus dem Institut für Neurogenetik  
der Universität zu Lübeck

- Direktorin: Prof. Dr. med. Christine Klein -

# **Über den Einsatz der Exom-Sequenzierung zur Diagnostik neurogenetischer Erkrankungen**

## **Inauguraldissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

**Leopold Alexander Schawe**

aus Hamburg

Lübeck 2021

**1. Berichterstatterin:** Priv-Doz. Dr. Sc. (Universität Belgrad) Ana Westenberger

**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Malte Spielmann

**Tag der mündlichen Prüfung** 13.1.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.1.2023

Promotionskommission der Sektion Medizin

## Gliederung

Abbildungsverzeichnis .....	6
Tabellenverzeichnis .....	6
Abkürzungsverzeichnis .....	7
1 Einleitung und Fragestellung.....	8
1.1 Vorwort.....	8
1.2 Parkinson-Syndrom .....	8
1.2.1 Parkinson-Krankheit.....	10
1.2.2 Genetische Ursachen der Parkinson-Krankheit.....	10
1.2.3 Pathophysiologie des M. Parkinson.....	12
1.2.3.1.1 Lewy-Körper .....	13
1.2.3.1.2 Mechanismen der $\alpha$ -Synuclein-Aggregation.....	14
1.2.4 Atypische Parkinson-Syndrome .....	15
1.3 Ataxie .....	16
1.3.1 Rezessiv vererbte Ataxien.....	17
1.3.2 Ataxie als Folge von Repeat-Expansionen .....	17
1.3.3 Parkinson-Syndrom in SCAs .....	19
1.4 Das menschliche Genom .....	19
1.4.1 Filterung und Priorisierung von WES-Varianten.....	22
1.5 Fragestellung .....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Patienten und Proben.....	26
2.2 Materialien .....	28
2.2.1 Geräte .....	28
2.2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	29
2.2.3 Puffer .....	30
2.2.4 Kits.....	31
2.2.5 Antikörper .....	31
2.2.6 Primer.....	31
2.2.7 Software.....	32
2.3 Nukleotid-basierte Untersuchungsmethoden.....	32
2.3.1 DNA-Extraktion .....	32
2.3.2 Exom-Sequenzierung .....	33
2.3.2.1 Filterung der Varianten.....	33

2.3.2.2	Priorisierung der Varianten .....	34
2.3.3	Sanger-Sequenzierung .....	35
2.3.4	Segregationsanalyse .....	36
2.3.5	<i>TGM6</i> -Screening von EOPD-Patienten .....	36
2.4	Molekulardynamik-Simulation .....	37
2.5	Klonierung.....	37
2.5.1	Mutagenese ( <i>site-directed</i> ).....	37
2.5.2	DNA-Gelextraktion.....	39
2.5.3	Transformation in <i>E.coli</i> .....	39
2.5.4	Plasmidextraktion .....	40
2.6	Zellkultur und funktionelle Analysen.....	41
2.6.1	Transfektion und Proteinbestimmung.....	41
2.6.2	Stabilitätsanalyse .....	42
2.6.3	Messung der Transamidierungs-Aktivität.....	43
2.7	Statistische Auswertung .....	44
3	Ergebnisse .....	45
3.1	Familie A. Parkinson-Syndrom.....	45
3.1.1	Analyse des <i>Whole-Exome Sequencing</i> .....	45
3.1.2	Segregationsanalyse .....	46
3.1.3	Screening von <i>TGM6</i> -Mutationen in EOPD-Patienten .....	47
3.1.4	Molekulardynamik-Simulation .....	48
3.1.5	Klonierung.....	50
3.1.6	Transfektion .....	51
3.1.7	Stabilität von p.P359L <i>TGM6</i> .....	52
3.1.8	Einfluss der P359L-Variante auf die Enzymaktivität .....	53
3.2	Familie B. Ataxie .....	55
4	Diskussion.....	57
4.1	Familie A. Parkinson-Syndrom.....	57
4.1.1	c.1076C>T-Variante in <i>TGM6</i> führt zu Parkinson-Syndrom .....	57
4.1.2	Transglutaminasen in neurodegenerativen Erkrankungen .....	58
4.1.3	Einfluss der P359L-Variante auf die Transamidierungsaktivität.....	60
4.1.4	Struktur und Aktivierung der Transglutaminase 6 .....	61
4.1.5	P359L-Mutation erhöht die Stabilität der Transglutaminase 6 .....	63
4.1.6	Screening in EOPD-Patienten deckt weitere <i>TGM6</i> -Varianten auf .....	64

4.1.7	Ausblick .....	65
4.2	Familie B. Ataxie .....	66
4.2.1	Phänotyp und genetische Untersuchung .....	66
4.2.2	Varianten in Ataxie-verursachenden Genen – <i>ACO2</i> und <i>SPTBN2</i> .....	67
4.2.3	Fazit der genetischen Untersuchung .....	69
4.3	Filter- und Priorisierungsmethoden .....	70
5	Zusammenfassung.....	72
6	Literaturverzeichnis.....	73
7	Anhang .....	83
7.1	Fallbeschreibungen (Kasuistiken).....	83
7.1.1	Familie A: Parkinson-Syndrom.....	83
7.1.2	Familie B: Ataxie.....	86
7.2	Berechnung der maximalen Allelfrequenz .....	87
7.3	Prädiktionswerte weiterer Prädiktionsprogramme .....	89
8	Danksagungen .....	91
9	Veröffentlichungen .....	92

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Pathophysiologie des Morbus Parkinson. ....	14
<b>Abbildung 2.</b> Das menschliche Genom. ....	21
<b>Abbildung 3.</b> Stammbaum der Familie A. ....	26
<b>Abbildung 4.</b> Stammbaum der Familie B. ....	27
<b>Abbildung 5.</b> Plasmid pcDNA™ 3.1 myc-His(-) A mit Insertion von TGM6. ....	38
<b>Abbildung 6.</b> Übersicht über funktionelle Studien. ....	43
<b>Abbildung 7.</b> c.1076C>T-Variante in <i>TGM6</i> . ....	47
<b>Abbildung 8.</b> MD-Simulation der Transglutaminase 6 im aktiven Zustand. ....	49
<b>Abbildung 9.</b> Elektropherogramm nach Mutagenese. ....	50
<b>Abbildung 10.</b> Western Blots als Nachweis der TGM6-Expression. ....	51
<b>Abbildung 11.</b> Stabilitätsanalyse. ....	52
<b>Abbildung 12.</b> Transglutaminase-Assay. ....	54
<b>Abbildung 13.</b> Proteinstruktur der Transglutaminase 6 und mögliche Pathomechanismen. .....	62
<b>Abbildung 14.</b> STRING-Netzwerk. ....	90

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Ursachen eines Parkinson-Syndroms. ....	9
<b>Tabelle 2.</b> Genetische Ursachen eines Parkinson-Syndroms. ....	11
<b>Tabelle 3.</b> Übersicht über die verwendeten Geräte. ....	28
<b>Tabelle 4.</b> Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien. ....	30
<b>Tabelle 5.</b> Übersicht über die verwendeten Puffer. ....	30
<b>Tabelle 6.</b> Übersicht über die verwendeten Kits. ....	31
<b>Tabelle 7.</b> Übersicht über die verwendeten Antikörper. ....	31
<b>Tabelle 8.</b> Übersicht über die verwendeten Primer. ....	32
<b>Tabelle 9.</b> Übersicht über die verwendete Software. ....	32
<b>Tabelle 10.</b> Übersicht über die Filterkriterien und -parameter. ....	33
<b>Tabelle 11.</b> Übersicht über die Priorisierungskriterien und -parameter. ....	34
<b>Tabelle 12.</b> Priorisierungsgrade. ....	35
<b>Tabelle 13.</b> Standard-PCR-Protokoll für die Taq-Polymerase und die „Sequenz“-PCR. ....	36
<b>Tabelle 14.</b> PCR-Protokoll für die Mutagenese mittels Pfu-Polymerase. ....	38
<b>Tabelle 15.</b> Priorisierung der Kandidatengene in Familie A. ....	45
<b>Tabelle 16.</b> TGM6-Varianten in EOPD-Patienten. ....	48
<b>Tabelle 17.</b> Priorisierung der Kandidatenvarianten in Familie B. ....	56
<b>Tabelle 18.</b> Klinische Befunde in Familie A. ....	85
<b>Tabelle 19.</b> Erweiterte Prädiktionswerte der analysierten Varianten in dieser Arbeit. ....	89

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
AT	<i>annealing temperature</i> (Anlagegerungstemperatur)
bp	Basenpaare
CADD	<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CBD	Corticobasale Degeneration
CNV	<i>copy number variation</i> (Kopienzahlvariation)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
EOPD	<i>early onset Parkinson's disease</i> (früh auftretende Parkinson-Krankheit)
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
LB	<i>Lewy body</i> (Lewy-Körperchen)
LBD	<i>Lewy body dementia</i> (Demenz mit Lewy-Körperchen)
MAF	<i>minor allele frequency</i> (Allelfrequenz des zweithäufigsten Allels)
MD	Molekulardynamik
MSA	Multisystematrophie
NGS	<i>next-generation sequencing</i> (Sequenzierung der nächsten Generation)
OD	Optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PD	<i>Parkinson's disease</i> (Parkinson-Krankheit)
PolyQ	Polyglutamin
PSP	<i>progressive supranuclear palsy</i> (Progressive supranukleäre Blickparese)
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SNpc	Pars compacta der Substantia nigra
SNV	<i>single-nucleotide variant</i> (Einzelnukleotidvariante)
SV	<i>structural variation</i> (Strukturvariation)
UPR	<i>unfolded protein response</i> (Reaktion auf fehlgefaltete Proteine)
WES	<i>whole-exome sequencing</i> (Exomsequenzierung)
WGS	<i>whole-genome sequencing</i> (Genomsequenzierung)

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Vorwort

Die vorliegende Arbeit erforscht den Stellenwert der Exom-Sequenzierung in der genetischen Diagnostik neurologischer Erkrankungen ungeklärter Ursache. Dabei wurden zwei unterschiedliche neurologische Erkrankungen in zwei Familien betrachtet: erstens ein Parkinson-Syndrom in einer serbischen Familie und zweitens eine Ataxie in einer südkoreanischen Familie. Die betroffenen Patienten wurden extern klinisch untersucht, Blutproben zur DNA-Extraktion gewonnen und Sequenzierungen der Exome durchgeführt. Die Auswertung und Interpretation dieser Daten sowie die Durchführung funktioneller Studien sind die Grundlage dieser Dissertation. Zur allgemeinen Verständlichkeit werden zunächst die entsprechenden Krankheitsbilder vorgestellt. Im Anschluss folgen die genetischen Grundlagen sowie die Fragestellungen, die diese Arbeit beantworten soll.

## 1.2 Parkinson-Syndrom

Unter einem Parkinson-Syndrom versteht man eine Bewegungsstörung, die durch das gleichzeitige Auftreten von Bradykinese und Ruhetremor oder Rigor definiert ist [109] und zahlreiche unterschiedliche Ursachen haben kann.

In seiner Abhandlung „*An essay on the Shaking Palsy*“ beschrieb James Parkinson 1817 erstmalig den Phänotyp einer Erkrankung, die im Verlauf nach ihm als Morbus Parkinson benannt worden ist [43]. Im Folgenden wird der englischsprachige Begriff *Parkinson's disease* (PD) bevorzugt, unter dem sowohl die idiopathische PD (iPD) als auch hereditäre (hPD) Formen zu verstehen sind [70]. Aufgrund eines breiten phänotypischen Spektrums der iPD und vor allem der hereditären Formen [70], ist die Differenzierung häufig nur durch die Ermittlung des Genotyps möglich. Da zudem genetische Risikofaktoren einer iPD auch in den Genen liegen, die mit den hereditären Formen assoziiert sind [33, 54], ist eine Trennung zwischen der idiopathischen und hereditären Formen erschwert.

Weitere Ursachen eines Parkinson-Syndroms und von der PD abzugrenzen sind atypische und sekundäre Parkinson-Syndrome sowie jene im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen (s. Tab. 1). Atypische Parkinson-Syndrome stellen eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen dar, die sich klinisch und histopathologisch von der PD unterscheiden (s. Abschnitt 1.2.4). Hiervon abzugrenzen sind andere neurodegenerative

Erkrankungen, bei denen ein Parkinson-Syndrom Teil des Phänotyps sein kann. Bei sekundären Parkinson-Syndromen handelt es sich um erworbene, eindeutig zuordenbare Ursachen. Hierunter fallen medikamentöse, ischämische, toxische und metabolische Ursachen. Bei diesen Erkrankungen liegt zwar ein Parkinson-Syndrom vor, andere PD-typische Symptome sind jedoch nicht präsent.

Aufgrund der Mannigfaltigkeit der Ursachen ist eine gründliche neurologische und diagnostische Untersuchung notwendig zur Differenzierung. Eine iPD ist damit immer auch eine Ausschlussdiagnose, bei der einige Symptome zum Verwerfen der Diagnose führen können [109].

Parkinsonform	Ursachen
<b>(1) Parkinson-Krankheit (PD)</b>	Idiopathisch (sporadisch) = M. Parkinson Hereditär (genetisch)
<b>(2) Atypische Parkinson-Syndrome</b>	Lewy-Körper-Demenz (LBD) Multisystematrophie (MSA) Progressive supranukleäre Blickparese (PSP) Kortikobasale Degeneration (CBD)
<b>(3) Parkinson-Syndrom im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen</b>	Alzheimer-Krankheit Frontotemporale Demenz Huntington-Krankheit (Westphal-Variante) Spinocerebelläre Ataxien (SCA), z.B. SCA3 Neuroakanthozytose Prionerkrankungen Dystonien (Dopa-responsive Dystonie, XDP) Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn
<b>(4) Sekundäre Parkinson-Syndrome</b>	Medikamentös (Antipsychotika, MCP, u.a.) Vaskulär (Infarkte, Blutungen) Toxisch (CO, Mn, MPTP, Pestizide) Neoplastisch Entzündlich (MS, SLE, postenzephalitisch) Normaldruckhydrozephalus Trauma Morbus Wilson

**Tabelle 1. Ursachen eines Parkinson-Syndroms.** Nach Balestrino *et al.* [30], Berlit [31] und Schapira *et al.* [32], ohne Ansprüche auf Vollständigkeit. Parkinson-Syndrome können durch unterschiedliche Ursachen bedingt sein: Die Parkinson-Krankheit (1), atypische Parkinson-Syndrome (2), andere neurodegenerative Erkrankungen (3) oder sekundäre Ursachen (4).

**Abkürzungen:** XDP: *X-linked dystonia parkinsonism*, MCP: Metoclopramid, CO: Kohlenstoffmonoxid, Mn: Mangan kann zum gleichnamigen Manganismus führen, MPTP: 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (Neurotoxin, inhibiert Atmungskette), MS: Multiple Sklerose, SLE: Systemischer Lupus erythematosus.

### **1.2.1 Parkinson-Krankheit**

Die PD stellt die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar und tritt zunehmend im hohen Alter auf [76]. Die Prävalenz in Industrienationen liegt schätzungsweise bei 0,3% in der gesamten Bevölkerung, bei den über 60-Jährigen bei 1% und in den höchsten Altersgruppen sogar bei 4% [76]. Bei 10% tritt die PD bereits vor dem 40. Lebensjahr auf [116], dies bezeichnet man als *early onset Parkinson's disease* (EOPD).

Die Ursachen der sporadischen Form sind unbekannt. Als Risikofaktoren kommen neben dem Alter noch genetische [93] und Umweltfaktoren hinzu [9, 76].

Man differenziert grundsätzlich die motorischen Kardinalsymptome von den nichtmotorischen Symptomen [13]. Die Kardinalsymptome sind Bradyhypokinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität [13]. Diese führen meist zur Diagnose der Erkrankung. Dennoch handelt es sich bei der PD um eine systemische Erkrankung, die nicht nur im zentralen Nervensystem (ZNS), sondern auch im peripheren autonomen und enterischen Nervensystem (ANS, ENS) zu pathologischen Veränderungen führt [20, 137, 139]. Vegetative Störungen gehen damit einher. Obstipation stellt neben Geruchsstörungen ein wichtiges Frühsymptom dar. Beide gehen den Kardinalsymptomen um einige Jahre voraus [112]. Weitere nichtmotorische Störungen sind neuropsychiatrische Störungen wie Depression, Angst und Demenz [13]. Typisch für die PD ist das gute Ansprechen auf die Therapie mit Levodopa und motorische Fluktuationen im Krankheitsverlauf als Nebenwirkung auf die Therapie [70]. Die Diagnose wird vor allem klinisch gestellt. Zur Abgrenzung differentialdiagnostischer Erkrankungen können bildgebende Verfahren die Diagnose unterstützen. Befunde sind beispielsweise eine reduzierte striatale Dopaminrezeptordichte im DaTSCAN™ [100] oder eine hyperechogene Substantia nigra in der transkranialen Sonographie [125]. Der Goldstandard für die Diagnose ist jedoch die Autopsie postmortem [121].

### **1.2.2 Genetische Ursachen der Parkinson-Krankheit**

Bei 5% der PD-Patienten können monogene Ursachen identifiziert werden, d.h. Mutationen in einem Gen, die als krankheitsverursachend gelten [77]. Diese lassen sich insbesondere bei frühen und familiären Verläufen finden. So lassen sich bei 50% der Patienten mit einer PD, die vor dem 21. Lebensjahr auftritt (*young-onset Parkinson's*

disease, YOPD) und einer positiven Familienanamnese krankheitsverursachende Mutationen in dem Gen *PARKIN* finden [122].

Ein Durchbruch in der Parkinson-Forschung gelang Polymeropoulos *et al.* mit der Entdeckung einer Punktmutation im Gen *SNCA* in vier unabhängigen Familien im Jahr 1997 [108]. In den Folgejahren wurden weitere neue Gene und Chromosomenabschnitte (Loci) entdeckt, welche in aufsteigender Reihenfolge mit der Zusatzbezeichnung PARK nummeriert worden sind. Hinzu kamen Gene, deren Variationen als ursächlich für Phänotypen angesehen wurden, die der PD ähnelten, aber zusätzliche klinische Erscheinungen zeigten. Da manche Gene oder Loci nicht bestätigt werden konnten, andere mehrfach genannt wurden, entwickelte die *MDS Task Force for Nomenclature of Genetic Movement Disorders* eine Neubenennung und Ordnung dieser genetischen Ursachen [85]. Unterschieden werden genetische Ursachen für Phänotypen, die (1) dem klassischen Bild der PD entsprechen, (2) dem Bild der PD entsprechen, aber vor dem 40. Lebensjahr auftreten und (3) die ein Parkinson-Syndrom als wichtiges und häufig beobachtetes Merkmal zeigen, jedoch andere für die PD atypische Symptome aufweisen [85] (s. Tab. 2). Genetische Ursachen für Erkrankungen mit gewöhnlich anderem Phänotyp, der aber auch ein Parkinson-Syndrom als charakteristisches Merkmal haben kann, stellen eine vierte Gruppe (4) dar [85]. Hinzu kommen Erkrankungen, bei denen ein Parkinson-Syndrom als Begleitsymptom auftritt (5) [85]. Hierzu zählen beispielsweise der Morbus Wilson, die Westphal-Variante der Huntington-Krankheit oder die Ataxien SCA2 und 3.

Phänotyp	Gene
(1) <b>Klassischer Parkinsonismus</b>	<i>LRRK2; SNCA; VPS35</i>
(2) <b>Early onset Parkinsonismus</b>	<i>DJ1; Parkin; PINK1</i>
(3) <b>Atypischer Parkinsonismus oder komplexe Phänotypen</b>	<i>ATP13A2; ATP1A3; CP; DCTN1; DNAJC6; FBXO7; GCH1; GLB1; PLA2G6; PTS; QDPR; SCL30A10; SLC6A3; SPR; SYNJ1; TAF1; TH; VPS13C; WDR45</i>
(4) <b>Parkinson-Syndrom als seltener Phänotyp</b>	<i>ATXN2; C19orf12; GBA; FA2H; FTL; KIAA1840; PANK2; POLG; ZFYVE26</i>
(5) <b>Parkinson-Syndrom als Begleitsymptom</b>	<i>ATN1; ATP7B; ATXN3; c9orf72; GCDH; GLB1; HTT; KIF5A; PDGFRB; PDHA1; PRKRA; PTS; SLC19A3; SLC20A2; VPS13A</i>

**Tabelle 2. Genetische Ursachen eines Parkinson-Syndroms.** Nach Marras *et al.* [85] und Wittke *et al.* [143].

Die Gene sind alphabetisch sortiert. Ein Phänotyp, der einer Parkinson-Krankheit ähnelt, wird als klassischer Parkinsonismus bezeichnet und kann durch Mutationen in *SNCA*, *LRRK2* oder *VPS35* bedingt sein. Mutationen in *Parkin*, *PINK1* und *DJ1* können zu einem Auftreten vor dem 40. Lebensjahr führen. Hinzu kommen

Varianten in Genen, die atypische Parkinson-Syndrome verursachen (3), bei denen das Parkinson-Syndrom ein seltener Phänotyp ist (4) oder phänomenologisch ein Begleitsymptom darstellt (5).

Abzugrenzen von diesen monogenen Ursachen sind genetische Risikofaktoren, die beispielsweise in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) erforscht worden sind, und ein idiopathisches Parkinson-Syndrom begünstigen können [93, 94]. Hierbei handelt es sich um genetische Varianten, die in großen Kohortenstudien mit einer PD assoziiert worden sind. Varianten in *SNCA* und *LRRK2* zählen dabei sowohl zu monogenen Ursachen der PD als auch zu den Risikofaktoren der iPD [85, 93].

Für die Trennung zwischen Varianten mit einer reduzierten Penetranz, die also nicht bei allen Trägern zu dem entsprechenden Phänotyp führen, und Risikofaktoren, bei denen ebenfalls nicht alle Träger den Phänotyp aufweisen, gibt es bisher keinen klaren Grenzwert hinsichtlich der Penetranz.

### **1.2.3 Pathophysiologie des M. Parkinson**

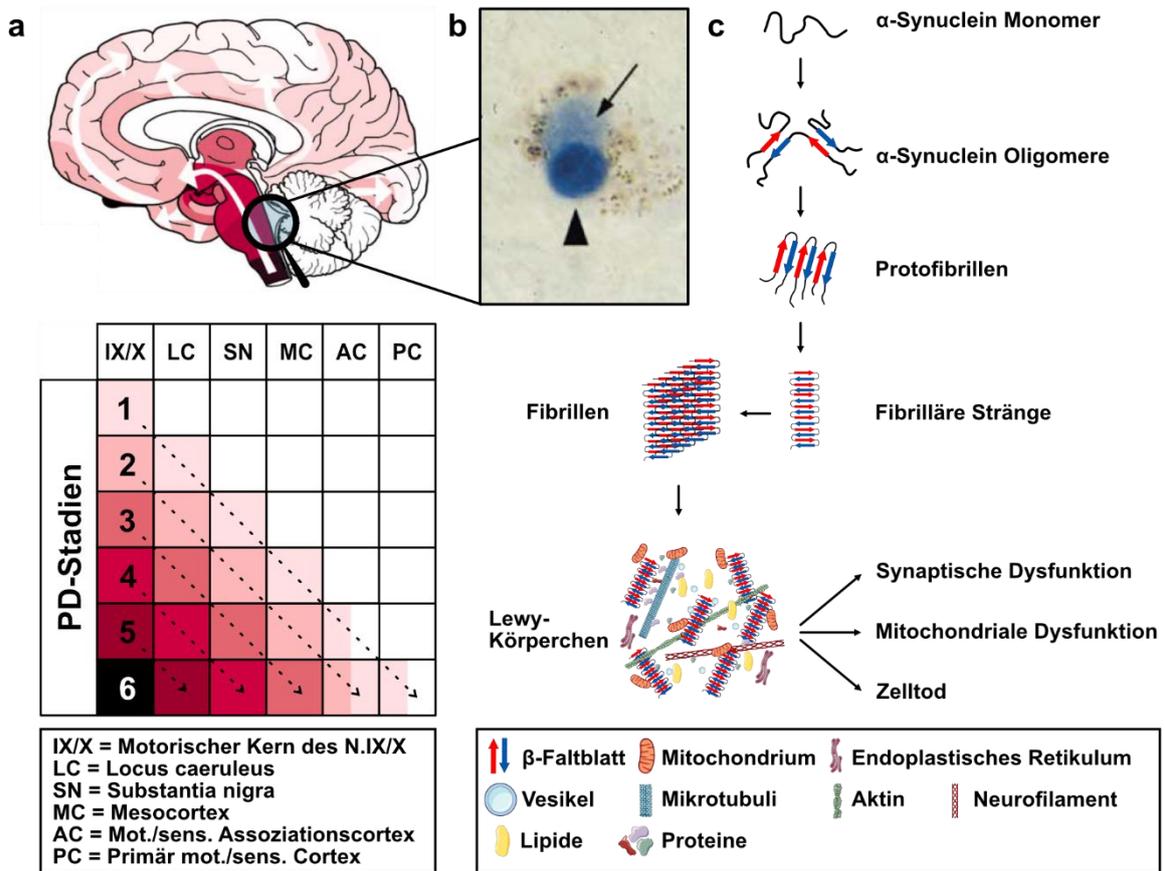
Friedrich H. Lewy beschrieb 1912 im „Handbuch der Neurologie“ bei Patienten mit einer *Paralysis agitans* (Schüttellähmung) intrazelluläre eosinophile Einschlusskörperchen, die er im Zellkern und in den Fortsätzen von Nervenzellen beschrieb. Erstere wurden ihm zu Ehren später als Lewy-Körperchen (*Lewy bodies*, LBs), letztere als Lewy-Neuriten benannt (LNs) [43]. Diese galten und gelten auch heute noch als histopathologisches Kennzeichen der PD, obgleich diese auch bei anderen Erkrankungen gefunden werden können [40, 121]. Erst 1997 wurde dann die Bedeutung des Proteins  $\alpha$ -Synuclein in Pathogenese der PD entdeckt: Zunächst durch die oben genannte *missense*-Mutation im kodierenden Gen *SNCA* [108] und zwei Monate später durch den immunhistochemischen Nachweis des Proteins als Bestandteil der LBs [128]. Im weiteren Verlauf konnten mehr als 90 weitere Proteine als Bestandteil der LBs identifiziert werden, die von Wakabayashi *et al.* anhand ihrer Zuordnung zu bestimmten Proteinen und Stoffwechselwegen in 13 Gruppen unterteilt worden sind [139]. Dies deutet bereits auf eine Komplexität der Pathophysiologie hin, die bis heute nicht vollständig geklärt ist. Unter diesen Proteinen finden sich viele der Proteine, die von Genen kodiert werden, die mit den hereditären Formen der PD assoziiert sind. Hierin zeigt sich, wie die Funde bei hereditären Formen auf die iPD übertragen werden können, trotz klinischer und pathologischer Unterschiede [110].

Aufgrund der Komplexität der Pathophysiologie beschränke ich mich hier auf die Entstehung und Verteilung der LBs und auf die Mechanismen, die zur Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein beitragen.

#### **1.2.3.1.1 Lewy-Körper**

Ein Hauptbestandteil der LBs ist  $\alpha$ -Synuclein, ein präsynaptisch lokalisiertes zytosolisches Protein, das sich in LBs zu unlöslichen Polymeren zusammenlagert [138]. Nicht alle Gehirnareale weisen bei PD-Patienten LBs auf, bestimmte Areale sind jedoch prädisponiert im Verlauf der Erkrankung LBs zu entwickeln, insbesondere Neuromelanin-haltige Zellen sind betroffen [19]. Braak *et al.* charakterisierten die Pathologie in den Gehirnen von PD-Patienten und sahen eine Ausbreitung der LBs, die bestimmten Mustern zuzuordnen waren [19] (s. Abb. 1). Sie teilten diese Muster in sechs Stadien, die als Braak-Stadien bezeichnet werden. Initial finden sich LBs zunächst in den viszeromotorischen Kernen der Hirnnerven IX und X (ab Stadium 1), später auch in der Pars compacta der Substantia nigra (SNpc) (ab Stadium 3) und erst terminal im Neocortex (ab Stadium 5). Mit fortschreitender Erkrankung ist ein neuronaler Untergang, insbesondere dopaminerg Neurone, assoziiert, der auch die mit LBs befallene SNpc betrifft [51]. Erst der Untergang der dopaminergen nigrostriatalen Neurone der SNpc führt zum Auftreten des Parkinson-Syndroms [115] und entspricht aus pathologischer Sicht einem mittleren Stadium der Erkrankung. Bei Diagnosezeitpunkt sind bereits circa 30% der dopaminergen Neurone und 50-60% ihrer terminalen Axone untergegangen [22]. Die genaue Rolle der LBs in der Pathophysiologie ist noch unklar, auch ob LBs ursächlich, Begleiterscheinung oder sogar zytoprotektiv sein können [136].

Neben der PD gibt es weitere Erkrankungen, in denen sich LBs entdecken lassen und die aufgrund ihres Hauptbestandteils  $\alpha$ -Synuclein als Synucleinopathien bezeichnet werden. Dazu zählen u.a. die Demenz mit Lewy-Körperchen (*Lewy body dementia*, LBD) und die Multisystematrophie (MSA) [139]. Im Unterschied zu diesen findet sich jedoch eine andere Verteilung und Ausbreitung der LBs [19].



**Abbildung 1. Pathophysiologie des Morbus Parkinson.** Modifiziert nach Braak *et al.* [18], Mahul-Mellier *et al.* [81] und Mehra *et al.* [87].

Histopathologisches Spezifikum des Morbus Parkinson sind intrazelluläre azidophile Einschlusskörperchen in Neuronen und Gliazellen, die als Lewy-Körperchen (LB) bezeichnet werden (b, Pfeilkopf [18]). Vorläufer dieser Lewy-Körperchen können sogenannte *pale bodies* sein (b, Pfeil [18]). Obgleich die Entstehung der Lewy-Körperchen noch nicht vollends geklärt ist, bildet eine Grundlage die Aggregation des Proteins  $\alpha$ -Synuclein (c). Durch eine sterische Transformation aus einer vorwiegend  $\alpha$ -helikalen Form zu einer Form mit  $\beta$ -Faltblattstrukturen, kann sich  $\alpha$ -Synuclein zu Oligomeren, später zu Protofibrillen und fibrillären Strängen zusammenlagern. Durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung (z.B. Ser129), Acetylierung, Ubiquitylierung und Transglutaminierung können sich diese Fibrillen lateral assoziieren. Durch eine weitere Assoziation mit weiteren Proteinen, Lipiden, Zellorganellen (Mitochondrien, Lysosomen, endoplasmatisches Retikulum) und Teilen des Zytoskeletts (Mikrotubuli, Aktin, Neurofilament) kommt es zur Entstehung von *pale bodies* und LBs. Nach der Ausbreitung der LBs im Gehirn lassen sich 6 Stadien unterscheiden (a, [18]). Initial finden sich LBs in den dorsalen motorischen Kernen des *Nervus vagus* und *Nervus glossopharyngeus*. Im weiteren Verlauf kommt es dann zur Ausbreitung in den *Locus caeruleus* und *Nucleus subcaeruleus*. Erst im Stadium 3 ist dann auch die *Substantia nigra* betroffen, deren Schädigung dann zur klinischen Ausprägung des Parkinson-Syndroms führt. Im weiteren Verlauf breiten sich die LBs im Neocortex aus (Mesocortex, motorischer und sensorischer Assoziations- und Primärcortex).

### 1.2.3.1.2 Mechanismen der $\alpha$ -Synuclein-Aggregation

$\alpha$ -Synuclein ist ein 140 Aminosäure (AS) cytosolisches langes Protein, dass im zentralen Nervensystem hoch exprimiert wird [136]. In Neuronen ist es dabei hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert [136]. Hier spielt es eine wichtige Rolle bei der Vesikel-Exozytose und Freisetzung von Neurotransmittern [57, 80].

Die Mechanismen der Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein-Monomeren zu Fibrillen und zur Organisation von Lewy-Körperchen ist bisher nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass  $\alpha$ -Synuclein als Monomer größtenteils  $\alpha$ -helikale Strukturen aufweist [136] und unter unbekanntem Einflüssen  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausbildet, die eine Aggregation zu Fibrillen ermöglichen [16] (s. Abb.1). Posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, insbesondere des Ser129-Restes [4], Acetylierungen [4], Ubiquitinylierungen [4, 52, 132] und Transglutaminierungen [5, 27, 63, 95] können diese Fibrillen stabilisieren und vergrößern [82]. Durch die Rekrutierung weiterer Proteine, Lipide und Organellen wie Mitochondrien und Lysosomen reifen sie dann zu Lewy-Körperchen heran (s. Abb. 1). Zeitgleich mit der Entstehung der LBs kommt es zu einer mitochondrialen Dysfunktion [120], zu einer Abnahme der synaptischen Dichte und zu einer Störung der Plasmamembranintegrität [82]. Hieraus kann schließlich der Zelltod resultieren.

Die Bedeutung von  $\alpha$ -Synuclein in der Pathophysiologie der PD wurde zudem durch die Entdeckung von Mutationen, Multiplikationen und Polymorphismen im kodierenden Gen *SNCA* untermauert, die eine PD verursachten [117] oder begünstigten [93].

#### **1.2.4 Atypische Parkinson-Syndrome**

Die atypischen Parkinson-Syndrome stellen eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen dar, die trotz charakteristischer Unterschiede oft in ihrer klinischen Erscheinung überlappen, teilweise auch mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen. Gemeinsames Charakteristikum dieser Erkrankungen ist das mögliche, aber nicht notwendige, Auftreten eines Parkinson-Syndroms und ein schlechtes Ansprechen auf eine Therapie mit Levodopa [6, 42, 55, 87].

Bei der LBD stehen neben der Demenz visuelle Halluzinationen und eine fluktuierende kognitive Störung im Vordergrund [87].

Bei der MSA lassen sich zwei Subtypen unterscheiden, eine Form mit vorherrschendem Parkinson-Syndrom (MSA-P) und eine mit vorherrschendem zerebellärem Syndrom (MSA-C). Daneben sind autonome Störungen früh und stark ausgeprägt [42].

Die progressive supranukleäre Blickparese (*progressive supranuclear palsy*, PSP) ist durch eine vertikale Blickparese, frühe Stürze, eine Akinesie und Sprachstörungen charakterisiert. Auch hier lassen sich zahlreiche Subtypen differenzieren [55].

Typisch für die kortikobasale Degeneration (CBD) ist ein kortikobasales Syndrom (CBS), das eine Störung der Basalganglien – Parkinson-Syndrom, Dystonie, Myoklonien – mit einer kognitiven Störung – Apraxie, Gedächtnisstörung, Aphasie, Verhaltensänderung – kombiniert [6]. Die klinische Diagnose einer CBD ist auch deshalb schwer zu stellen, da ein CBS durch einige andere Erkrankungen ausgelöst werden kann und sich eine CBD auch mit anderen Phänotypen präsentieren kann [6].

Trotz der klinischen Unterschiede der atypischen Parkinson-Syndrome, finden sich bei allen dieser Erkrankungen zerebrale Proteinablagerungen [40]. Wie bei der PD, lassen sich bei einer LBD und einer MSA  $\alpha$ -Synuclein-Ablagerungen finden [40]. Bei PSP und CBD kommt es zu Ablagerung des Proteins Tau, weshalb sie als Tauopathien klassifiziert werden [40].

Obgleich diese Erkrankungen insbesondere im höheren Lebensalter auftreten, gibt es eine Vielzahl genetischer Ursachen, die atypische Parkinson-Syndrom verursachen können [36] und die es in der genetischen Untersuchung zu berücksichtigen gilt.

### **1.3 Ataxie**

Ataxie bezeichnet eine gestörte Koordination von willkürlichen Bewegungen, die in unterschiedlichen Symptomen resultieren und viele unterschiedliche Ursachen haben kann. Ursächlich sind dabei Schädigungen des Kleinhirns (zerebelläre Ataxie), eine fehlerhafte propriozeptive (sensorische Ataxie) oder vestibuläre Informationszufuhr [13]. Die klinische Symptomatik ergibt sich aus dem genauen Schädigungsort. Dabei kann es zu Unsicherheiten im Sitzen, Stehen oder Gehen (Rumpf-, Stand- oder Gangataxie), zu unkoordinierten Bewegungen der Extremitäten (Extremitätenataxie mit Dysmetrie, Intentionstremor, Dysdiadochokinese) oder der Augen (z.B. Nystagmus, Dysmetrie) kommen.

Schädigungen können erworben sein, hereditär bedingt oder idiopathisch auftreten.

Zu den erworbenen Schädigungen zählen vaskuläre (Infarkte, Blutungen), neoplastische, infektiöse, immunvermittelte (Multiple Sklerose, paraneoplastisch, Zöliakie), toxische (z.B. Ethanol) und neurodegenerative (z.B. MSA-C) Ursachen sowie Hypovitaminosen [13].

Eine chronisch progressive Ataxie, insbesondere mit frühem Erkrankungsbeginn und positiver Familienanamnese sollte an eine hereditäre Form denken lassen, obgleich auch hereditäre Ataxien erstmalig familiär und im höheren Alter auftreten können. Hereditäre Ataxien lassen sich anhand ihres Vererbungsgangs und nach dem mit ihnen assoziierten

Gen unterschieden. Bird listet dabei über 100 unterschiedliche genetische Ursachen auf [15]. Es handelt sich um seltene Erkrankungen mit einer geschätzten weltweiten Prävalenz von jeweils 3 : 100.000 bei den autosomal dominanten und rezessiven Formen [119].

Bei einer idiopathischen Ataxie können keine Ursachen ermittelt werden.

### **1.3.1 Rezessiv vererbte Ataxien**

Rezessiv vererbte Ataxien stellen eine Untergruppe der hereditären Ataxien dar und sind genetisch und klinisch heterogen. Zur phänotypischen Ausprägung einer Erkrankung kommt es bei rezessiven Erbgängen nur wenn beide Allele genotypisch betroffen sind. Analog zu der Nomenklatur für die Parkinson-Syndrome [85] hat die *International Parkinson and Movement Disorder Society Task Force on Classification and Nomenclature of Genetic Movement Disorders* ebenfalls eine Einteilung für rezessive zerebelläre Ataxien vorgenommen [118]. Sie unterscheiden dabei 62 Erkrankungen mit im Vordergrund stehender Ataxie, 30 mit kombinierter Ataxie und weitere 89 bei denen die Ataxie nur ein Nebensymptom darstellt. Die häufigste Form ist die Friedreich-Ataxie [119]. Manche der Gene bedingen nicht nur rezessiv, sondern auch dominant vererbte Ataxien. So können bestimmte Mutationen im Gen *SPTBN2* nur homozygot, andere aber auch heterozygot zur Krankheitsausprägung führen [91, 118, 146].

Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sind entsprechend vielfältig, dennoch finden sich häufig Defekte der mitochondrialen Funktion oder der DNA-Reparatur [11]. Dabei korreliert die pathophysiologische Einteilung gut mit der klinischen Ausprägung der Erkrankungen: Mutationen in ähnlichen Stoffwechselwegen führen zu ähnlichen Phänotypen. Bei mitochondrialer Dysfunktion, z.B. bei einer Friedreich-Ataxie, findet sich beispielsweise häufig eine Kardio- und proximale Myopathie, eine Optikusatrophie, eine Taubheit und ein Diabetes mellitus.

### **1.3.2 Ataxie als Folge von Repeat-Expansionen**

Die zugrundeliegenden Ursachen der häufigsten genetischen Ataxieformen, SCA3 und Friedreich-Ataxie, sind Ausbreitungen repetitiver Nukleotidsequenzen (*repeat expansions*), sogenannte Mikrosatelliten [103]. Bei diesen beiden Erkrankungen handelt es sich um Vervielfältigungen der Sequenzen CAG (SCA3) bzw. GAA (Friedreich-Ataxie), es sind jedoch viele weitere Sequenzmotive im pathogenen Kontext beschrieben worden [103]. Diese

Wiederholungen sind per se nicht pathogen, führen jedoch ab einer bestimmten Länge zum entsprechenden Phänotyp, bei SCA3 sind dies etwa 60 CAG-Wiederholungen [103]. Diese Wiederholungen können sich, abhängig vom Gen, sowohl in Introns als auch in Exons befinden [103]. CAG-Wiederholungen finden sich hierbei fast ausschließlich in Exons und beeinflussen so die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins. Hier führen sie zu einer verlängerten Glutamin-Sequenz, weshalb darauf beruhende Erkrankungen als Polyglutaminerkrankungen (PolyQ) bezeichnet werden. Sieben der bisher neun beschriebenen PolyQ-Erkrankungen können dabei zu einer Ataxie führen: die SCAs 1-3, 6, 7 und 17 sowie die Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie (DRPLA) [71, 103]. Ein pathogenetisches Charakteristikum dieser Erkrankungen sind, wie bei der PD, neuronale Proteinablagerungen, die zum neuronalen Zelltod führen [71, 89].

Die Rolle der Glutamin-Reste könnte dabei in der Verknüpfung mit Lysin-Resten zu intra- oder intermolekularen Quervernetzungen liegen, die durch Transglutaminasen katalysiert werden können [47]. Poly-Q-Proteine, wie Ataxin-1 (SCA1), Ataxin-3 (SCA3), Atrophin-1 (DRPLA) oder Huntingtin (HD), stellen nachgewiesenermaßen Substrate für Transglutaminasen wie TG2 oder TG6 dar [32, 47, 64, 147] und können zu unlöslichen PolyQ-Aggregaten vernetzt werden [32, 47]. Das Ausmaß der Quervernetzung und Aggregation steigt dabei mit der Anzahl der Glutamin-Reste [64, 68]. Darüber hinaus steigt mit zunehmender Expansion der Allele die Wahrscheinlichkeit der Penetranz, die Geschwindigkeit der Progression und es sinkt der Zeitpunkt des Symptombeginns [104]. Dies könnte durch die Zunahme der Aggregate erklärt werden. Analog zu LBs in der Pathogenese der PD, ist die Zytotoxizität der Proteinaggregate in Ataxien noch nicht abschließend geklärt [89]. Obgleich auch der Verlust der Proteinfunktion zur Pathogenität beitragen kann, zeigten Ordway *et al.* in einem Mausmodell, dass CAG-Wiederholungen auch in nicht für PolyQ-Erkrankungen beschriebenen Proteinen zu einem entsprechenden Phänotyp führen. Dies unterstützt die Hypothese, dass Proteinaggregate für sich toxisch sein können [99].

Aufgrund der toxischen Wirkung der Proteine reicht eine genotypische Veränderung von einem Allel zur phänotypischen Ausprägung aus. Dies bezeichnet man als dominante Merkmalsausprägung. PolyQ-Erkrankungen werden daher häufig dominant vererbt.

Punktmutationen in *TGM6* führen ebenfalls zu einer autosomal dominanten Ataxie (SCA35) [48, 78, 83, 134, 140, 144] und unterstützen die Idee der pathogenetische Rolle von Transglutaminasen im Kontext von Ataxien.

### 1.3.3 Parkinson-Syndrom in SCAs

Betrachtet man die pathogenetische Ähnlichkeit von PolyQ-SCAs und der PD, überrascht es nicht, dass sich viele SCAs ebenfalls mit einem Parkinson-Syndrom präsentieren können. Dies ist für die PolyQ-SCAs 2, 3, 6 und 17 sowie für die nicht-PolyQ-SCAs 8, 10 und 35 beschrieben worden [24, 102, 123]. Obgleich sich bei der SCA8 Expansionen eines CTG-Triplets finden lassen [92], entspricht dies auf dem komplementären Strang (*anti-sense strand*) einem CAG-Triplet. In einem Mausmodell der SCA8 konnten zudem intranukleäre Einschlüsse gefunden werden, die ein PolyQ-Protein enthielten, das durch diesen komplementären Strang kodiert worden ist [92].

Diese Funde unterstreichen, dass sowohl Ataxien als auch Parkinson-Syndrome Symptome darstellen, nicht jedoch eigenständige Erkrankungen. Der Phänotyp ist dabei variabel und wird vor allem durch die zugrunde gehenden Zellen bestimmt: Kommt es zu einem Untergang zerebellärer Purkinje-Zellen zeigen sich ataktische Symptome [61, 92]. Gehen hingegen dopaminerge Neurone der Substantia nigra unter zeigt sich ein Parkinson-Syndrom [72, 73]. Obgleich diese Dichotomie etwas vereinfachend ist, unterstreicht sie dennoch die Bedeutung des Schädigungsorts für den Phänotyp. Viele der SCA-Proteine werden ubiquitär zerebral exprimiert [89]. Dies wirft die Frage auf, was bestimmte Gehirnareale vulnerabler macht als andere.

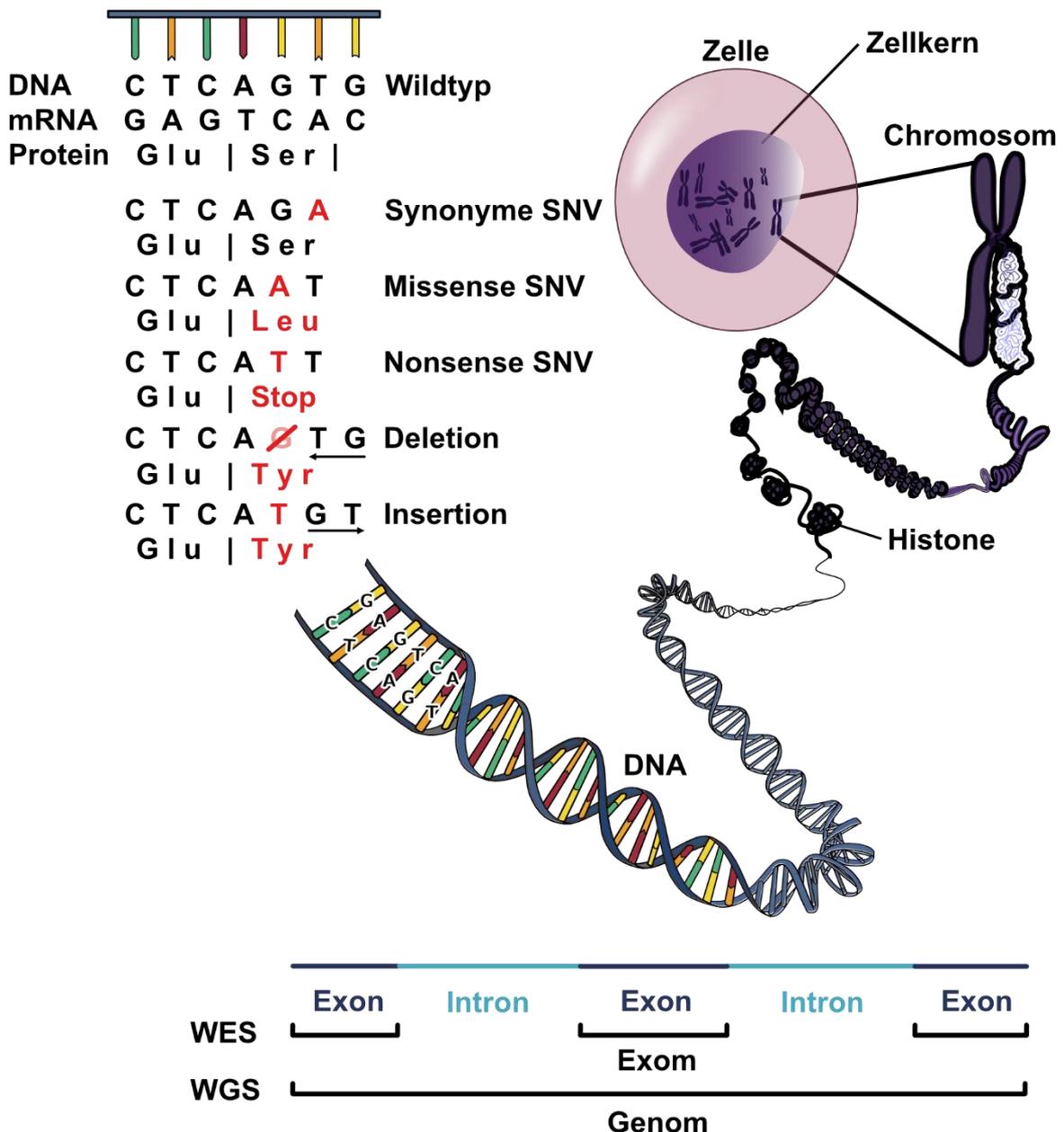
## 1.4 Das menschliche Genom

Die Genetik umfasst die Lehre, die sich mit der Vererbung von Merkmalen beschäftigt. Grundlage für den Erhalt dieser Merkmale ist die Speicherung der Informationen in Form von DNA im Genom. Die Kodierung erfolgt mittels der Abfolge (Sequenz) vierer unterschiedlicher Basen bzw. Basenpaaren (bp). Das menschliche Genom besteht aus etwa 3,1 Milliarden solcher Basenpaare [56], wovon 1-2% kodierend sind (Exom), d.h. für Proteine kodieren (Gene) [1]. Dies bedeutet eine theoretische Informationsvielfalt von  $4^{3.100.000.000}$  Möglichkeiten. Natürlich ist die reale Informationsvielfalt weitaus geringer, da viele Basen lebensnotwendig und daher evolutionär hochkonserviert sind, insbesondere im

Exom. Mithilfe neuer, schnellerer und kosteneffizienterer Sequenzierungsmethoden (*next-generation sequencing*, NGS) gelang es im Rahmen des *Human Genome Projects* [75] das menschliche Genom fast vollständig zu sequenzieren (*whole-genome sequencing*, WGS). Die Fertigstellung der Sequenzierung führte 2004 zu einer Veröffentlichung eines fast vollständigen Referenzgenoms [59], welches seither aktualisiert und vervollständigt worden ist. Abweichungen von dieser Referenzsequenz stellen Varianten dar und gewährleisten die genetische Variabilität. Dabei kann es sich um Punktmutationen (*single-nucleotide variant*, SNV; s. Abb. 2), Einschübe oder Deletionen (*insertion* und *deletion*, *indel*; s. Abb. 2), Unterschiede in der Anzahl von Nukleotid-Wiederholungen (*copy-number variant*, CNV) oder große strukturelle Varianten handeln (SV). Varianten können jedoch auch krankheitsbegünstigend oder -verursachend sein. Richards et al. [114] schlugen daher eine Einteilung der Varianten nach ihrer Pathogenität vor. Die zu Missverständnissen führenden Begriffe *Mutation* und *Polymorphismus* sollen zu Gunsten der Begriffe *wahrscheinlich benigne*, *benigne*, *wahrscheinlich pathogene*, *pathogene* oder *Variante unklarer Signifikanz* weichen [114].

Das NGS ermöglicht jedoch nicht nur die Sequenzierung des gesamten Genoms, sondern auch gewünschter, spezifischer Abschnitte (Panel-Diagnostik) oder der für Proteine kodierende Abschnitte des Genoms (Exom; *whole exome sequencing*, WES) [1]. Diese drei Anwendungsmöglichkeiten des NGS führten nicht nur zur Aufdeckung neuer Varianten, sondern auch zur Erschaffung großer Genom- und Exomdatenbanken, wie ExAC (*Exome Aggregation Consortium*) [65] bzw. gnomAD (*Genome Aggregation Database*) [66]. Mithilfe dieser Datenbanken ist es möglich die Frequenz eines alternativen Allels (*minor allele frequency*, MAF) im Genpool einer regionalen oder weltweiten Population zu ermitteln.

Monogene Erkrankungen beruhen auf pathogenen Varianten in einem bestimmten Gen. Viele dieser Erkrankungen sind selten. Die Europäische Union definiert dabei eine Erkrankung als selten, wenn ihre Prävalenz geringer als 5 pro 10.000 ist [8]. Es wird geschätzt, dass es 6.000 bis 7.000 seltene genetische Erkrankungen gibt, sowie 7.000 bis 15.000 dafür ursächliche Gene [18].



**Abbildung 2. Das menschliche Genom.** Die genetische Information jeder Zelle befindet sich im Zellkern in den Chromosomen. Aufgereiht auf Histonen befindet sich dort die DNA, dessen Bausteine unter anderem vier Basen (Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C)) sind, die über die Abfolge ihrer Reihenfolge die Information codieren. Sie sind Grundlage für die Transkription in messenger RNA (mRNA), diese wiederum für die Translation in Aminosäuren für die Proteinsynthese. Kommt es zu einem Austausch einer dieser Basen bezeichnet man dies als Einzelnukleotidvariante (*single nucleotide variant, SNV*). Dies kann entweder zu keiner Veränderung der codierten Aminosäure (*synonyme SNV*), zu einer veränderten Aminosäure (*missense SNV*) oder zu einem Stoppcodon (*nonsense SNV*) führen. Es kann außerdem zu Deletion oder Insertionen von einzelnen Basen kommen, die ebenfalls die Aminosäuresequenz verändern können. Kommt es zu einer Veränderung der Basenzahl ungleich  $3 \times n$ , kommt es aufgrund der Codon-Triplets zu einem Verschiebung des Leserasters bei der Translation (*frameshift mutation*).

Die für Proteine kodierenden Abschnitte bezeichnet man als Exone, die dazwischenliegenden nicht-translatierten Abschnitte als Introne. Zusammen mit weiteren nicht-kodierenden Abschnitten der DNA (hier nicht dargestellt) bilden sie in ihrer Gesamtheit das Genom und werden im *whole genome sequencing* (WGS) abgelesen. Die Gesamtheit aller Exone bezeichnet man als Exom und kann mittels des *whole exome sequencing* (WES) analysiert werden.

Abkürzungen: Ser = Serin, Leu = Leucin, Tyr = Tyrosin

Mithilfe großer Studien familiärer Erkrankungen konnten über Kopplungsanalysen (*linkage analysis*) etwa die Hälfte aller Loci identifiziert werden [10]. Da die meisten monogene Erkrankungen jedoch selten sind, können solche großen Studien vielfach nicht durchgeführt werden. Erschwerend hinzu kommen Mechanismen wie eine reduzierte Penetranz oder reduzierte reproduktive Fitness der Mutationsträger [10]. Das umfassende Aufdecken genetischer Varianten machte das NGS zu einem wichtigen Instrument bei der Aufklärung monogener und seltener Erkrankungen [18]. Insbesondere das WES ist dabei von Interesse, da erstens die meisten krankheitsverursachenden Varianten in kodierenden Abschnitten liegen [129] und zweitens diese besser erforscht sind als die nicht-kodierenden und damit die Interpretation gefundener Varianten einfacher ist. Die Anzahl der neuen Gene, die durch das WES einem pathologischen Phänotypen zugeordnet werden konnten belief sich im Zeitraum von 2010 bis 2012 auf 180 Gene, 130 davon wurden im Jahr 2012 publiziert [18]. Dies zeigt die zunehmende Anwendung und den Erfolg der Methode.

#### **1.4.1 Filterung und Priorisierung von WES-Varianten**

Bei der Sequenzierung des Exoms, also von etwa 36 Millionen Basen [10], und einer aktuellen Populationsgröße von über sieben Milliarden Menschen überrascht es nicht entsprechend viele unterschiedliche Varianten mittels WES zu entdecken. Durchschnittlich werden dabei, abhängig von der genetischen Subpopulation, durch das WES über 20.000 Varianten pro Individuum detektiert, wovon jeweils etwa 300-500 Varianten bisher unbeschrieben sind [10]. Um die größtenteils benignen von den pathogenen Varianten zu trennen, braucht es Kriterien diese zu filtern und zu priorisieren.

Bei der genetischen Untersuchung von Familien mit mehreren betroffenen Mitgliedern kann nach Varianten gesucht werden, die betroffene Familienmitglieder tragen, bei nicht betroffenen Familienmitgliedern jedoch nicht (bei dominanten Erbgängen) oder nur heterozygot (bei rezessiven Erbgängen) vorliegen [10]. Dabei gilt: Je höher die Entfernung der Verwandtschaft, desto aussichtsreicher das WES, da sie weniger Varianten teilen und sich so weniger Kandidatenvarianten ergeben [10]. Des Weiteren können Kontrollpopulationen dazu dienen die Häufigkeit von Varianten zu ermitteln. Durch die Größe der heutigen Exom- und Genomdatenbanken lässt sich dadurch die Genauigkeit bei der Suche krankheitsverursachender Gene erhöhen [10]. Auch in einer Kontrollpopulation können jedoch krankheitsverursachende Allele vorkommen, insbesondere bei rezessiven

Erkrankungen, da nur homozygote Träger erkranken. Daher werden bereits beschriebene Varianten nicht ausgeschlossen, sondern die MAF zum Filtern verwendet. Für autosomal dominante gilt dabei, dass der Anteil der Mutationsträger nicht größer als die Prävalenz der untersuchten Erkrankung sein darf. Entsprechend darf für autosomal rezessive der Anteil der homozygoten Träger nicht höher als die Prävalenz der untersuchten Erkrankung sein. Der vermutete Erbgang spielt beim Filtern von Varianten eine große Rolle. Da es durchschnittlich 50-mal weniger homozygote als heterozygote neue Protein-verändernde Varianten gibt [10], müssen Filterkriterien bei rezessiven Erbgängen weniger strikt sein als bei dominanten Erbgängen. Ebenfalls müssen vermutete *de novo*-Varianten nicht so strikt gefiltert werden, da es sich nur extrem wenige Varianten pro Exom finden lassen [10]. Häufig werden MAFs von 1% für rezessive und 0,1% für dominante Erbgänge als obere Grenzwerte verwendet [10].

Zudem gilt: Je niedriger die Fallzahl, desto strikter muss gefiltert werden um eine vergleichbare Power zu erzielen [10].

Varianten können weiterhin anhand ihres erwarteten funktionellen Einflusses priorisiert werden. Dabei haben nicht-synonyme Varianten – v.a. *nonsense*-, *frameshift*- und *splice site*-Varianten - einen schädlicheren funktionellen Einfluss als synonyme Varianten, da sie zu einer veränderten Aminosäuresequenz der Proteine führen. [10, 69]. *Missense*-Varianten können anhand der Art des Aminosäureaustausches im Kontext des entsprechenden Proteins in ihrer Pathogenität beurteilt werden. Dabei werden beispielsweise Veränderungen der Ladung, Polarität, Größe oder funktioneller Gruppen analysiert [44]. Da sich Basen und Aminosäuren, die wichtig für die Funktion eines Gens bzw. Proteins sind, evolutionär im Rahmen der Phylogenese erhalten haben, können Sequenzanalysen mit verwandten Genen in verwandten Arten, Rückschlüsse über die evolutionäre Konservierung und damit über die Bedeutung einer Variante geben.

Es gibt eine Vielzahl an Prädiktionsprogrammen, die die funktionelle Beeinträchtigung und evolutionäre Konservierung *in silico* berechnen können. Vielfach kommen Prädiktionsprogramme, aufgrund unterschiedlicher Stärken und Schwächen, zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Pathogenitätseinstufung. Infolgedessen wurden integrative Prädiktionsprogramme entworfen, die die einzelnen Werte der Programme gewichten und zu einem neuen Wert vereinen. Hierdurch lässt sich die

Genauigkeit der Vorhersage erhöhen. Bekannte und häufig verwendete Programme sind CADD (*Combined Annotation Dependent Depletion*), MetaLR und REVEL (*Rare Exome Variant Ensemble Learner*) [31, 69, 107], wobei die letzten beiden die höchsten Genauigkeiten unter den Prädiktionsprogrammen besitzen und damit als gute Priorisierungskriterien dienen [31, 60]. CADD hingegen besitzt die Möglichkeit auch in nicht-kodierenden Abschnitten eine Einschätzung der Pathogenität zu liefern.

Dennoch können für bestimmte Zwecke auch die nicht-integrativen Prädiktionsprogramme verwendet werden. FATHMM (*Functional Analysis through Hidden Markov Models*) [126] weist dabei eine hohe Spezifität auf [31, 60] und eignet sich daher zur Bestätigung von Kandidatenvarianten. PolyPhen2 [2] und MutationTaster2 [124] hingegen sind sehr sensitiv und können zur Filterung von Varianten dienen [31, 60].

Nach Filterung der Varianten können die resultierenden Kandidatenvarianten nach den oben bereits genannten ACMG-Standards [114] in pathogene, wahrscheinlich pathogene, benigne, wahrscheinliche benigne und Varianten unklarer Signifikanz (VUS) eingeteilt werden. Als Kriterien für die Einteilung dienen dabei unter anderem die bereits erwähnte resultierende Proteinveränderung, die Lage und evolutionäre Konservierung der Variante, der Erbgang sowie die Allelfrequenz in Kontrollpopulationen.

Darüber hinaus müssen bereits bekannte Varianten für ähnliche Phänotypen, Co-Segregationen und funktionelle Studien betrachtet werden, um die Pathogenität der Varianten einzustufen: Sind Gene bereits für andere Phänotypen als verursachend beschrieben worden, steigt die Wahrscheinlichkeit der pathogenen Relevanz, insbesondere bei ähnlichen Phänotypen [23]. Hierfür können Datenbanken genetischer Erkrankungen, wie die *Online Mendelian Inheritance in Man*<sup>®</sup> (OMIM<sup>®</sup>), genutzt werden [98]. Um zu analysieren, ob die Kandidatenvarianten mit der Erkrankung segregieren, muss deren Vorliegen in möglichst vielen Familienmitgliedern getestet werden. Den endgültigen Nachweis über die Pathogenität einer Variante können funktionelle Studien liefern. Dies beinhaltet auch die Genexpression im hauptsächlich betroffenen Gewebe, die Beteiligung in für den Phänotyp wichtigen Signal- und Stoffwechselwegen und die Interaktion mit anderen Proteinen in diesen Stoffwechselwegen [23].

Limitation des WES sind komplexe Erbgänge, eine hohe genetische Heterogenität des Phänotyps, sehr diskrete Phänotypen, eine reduzierte Penetranz von Varianten, die

geringere Qualität als die Sanger-Sequenzierung und die fehlende vollständige Abdeckung des Exons [10].

### **1.5 Fragestellung**

Diese Dissertation behandelt die genetische Ursachenfindung mithilfe des WES in zwei unabhängigen Fällen von Bewegungsstörungen. Im ersten Fall handelt es sich um ein familiäres Parkinson-Syndrom, im zweiten Fall um eine familiäre Ataxie. Die Annahme dabei ist, dass den Erkrankungen eine monogene Ursache zugrunde liegt, die in den protein-kodierenden Genabschnitten liegt und keiner größeren strukturellen Veränderung unterliegt. Die zugrundeliegenden Fragestellungen lauten:

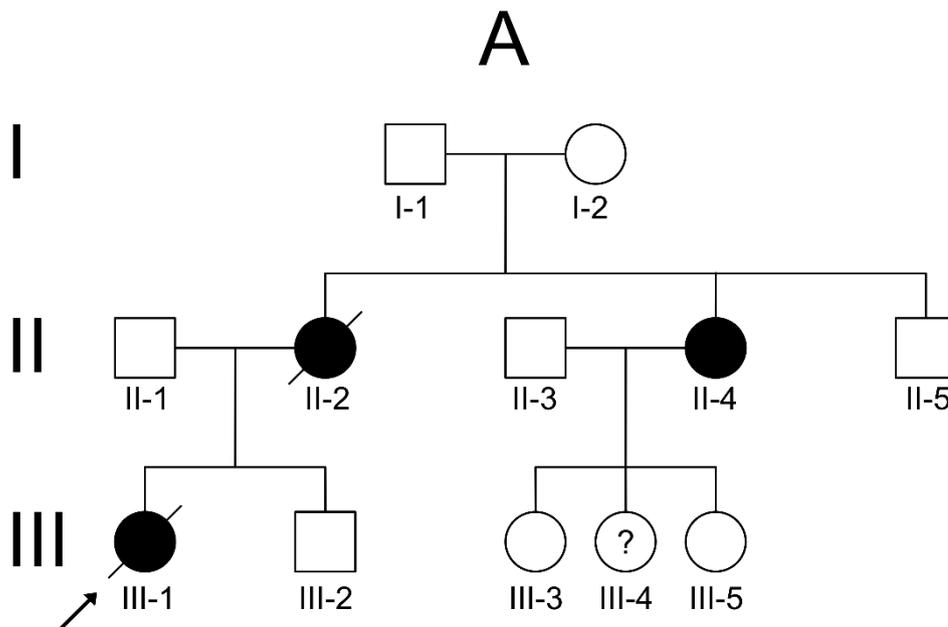
- (1) Lässt sich durch den Einsatz des WES in einer serbischen Familie mit familiärem Parkinson-Syndrom mithilfe von Filter- und Priorisierungskriterien eine Kandidatenvariante ermitteln, die als wahrscheinliche Ursache der Erkrankung zugrundliegt?
- (2) Lässt sich durch den Einsatz des WES in einer koreanischen Familie mit familiärer Ataxie mithilfe von Filter- und Priorisierungskriterien eine Kandidatenvariante ermitteln, die als wahrscheinliche Ursache der Erkrankung zugrundliegt?
- (3) Können ermittelte Kandidatengene und funktionelle Studien neue Einblicke in die pathogenetischen Mechanismen der beiden Erkrankungen gewähren?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Proben

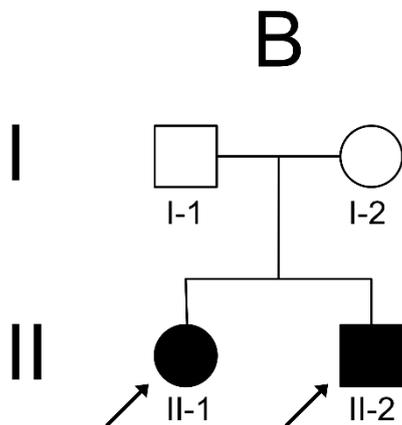
Durch Ärzte der Klinik für Neurologie der Universität Belgrad wurden drei Patienten einer Familie serbischer Herkunft (Familie A, s. Abb. 3) identifiziert, neurologisch untersucht und ihre Anamnesen erhoben. Bei allen lag ein Parkinson-Syndrom mit jeweils unterschiedlicher Begleitsymptomatik vor. Anamnestisch ergab sich keine bekannte Bewegungsstörung in der Parenteral-Generation (I) oder bei weiteren Familienmitgliedern. Bei der Person III-4 wurde der Verdacht auf eine Fußdystonie geäußert. Aufgrund medizin-ethischer Gründe erfolgte hier jedoch keine neurologische Untersuchung. Hinweise für eine Konsanguinität gab es nicht. Ausführliche klinische Informationen finden sich im Anhang (A1).

Es wurden zudem 50 weitere Patienten (durchschnittlicher Erkrankungsbeginn: 28,3 Jahre, Standardabweichung (SD): 6,5 Jahre, Spannweite: 10-35 Jahre) mit einer EOPD ungeklärter Ursache eingeschlossen, deren DNA und Einverständnis bereits dem Institut für Neurogenetik vorlag. Bei zwölf Patienten lag eine positive Familienanamnese hinsichtlich eines Parkinson-Syndroms vor. Zuvor wurden andere bekannte hereditäre und nicht-hereditäre Ursachen ausgeschlossen.



**Abbildung 3. Stammbaum der Familie A.** Kreise entsprechen weiblichen Familienmitgliedern, Quadrate männlichen Familienmitgliedern. Schwarz ausgefüllte Symbole signalisieren an einem Parkinson-Syndrom erkrankte Familienmitglieder, nicht ausgefüllte Symbole die nicht Betroffenen. Das Fragezeichen symbolisiert eine unklare Ausprägung des Phänotyps. Der Pfeil zeigt die Index-Patientin an.

Durch Ärzte des *Asan Medical Center* der Universität von Ulsan in Südkorea wurden zwei Patienten einer Familie südkoreanischer Herkunft (Familie B, s. Abb. 4) identifiziert, neurologisch untersucht und ihre Anamnesen erhoben. Bei beiden wurde eine schwere zerebelläre Ataxie mit Beginn im Kleinkindalter (2. und 4.-5. Lebensjahr) diagnostiziert. Anamnestisch waren bis zur Großelterngeneration keine Bewegungsstörungen in der Familie zu erheben (in Abb. 4 nicht dargestellt). Bekannte hereditäre Ataxieursachen wurden zuvor ausgeschlossen. Die Kasuistik wird ebenfalls im Anhang näher geschildert (A1).



**Abbildung 4. Stammbaum der Familie B.** Kreise entsprechen weiblichen Familienmitgliedern, Quadrate männlichen Familienmitgliedern. Ausgefüllte Symbole entsprechen Patienten mit zerebellärer Ataxie, leere Symbole entsprechen gesunden Probanden. Die Pfeile zeigen die Index-Patienten an.

Für alle Patienten der Familien A und B wurden detaillierte Beschreibungen der behandelnden Neurologen und Videoaufzeichnungen der körperlichen Untersuchung angefertigt (Aufnahmezeitpunkt 2015). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Videoaufzeichnungen reevaluiert und mit den klinischen Beschreibungen zusammengefasst.

Alle Probanden erklärten sich nach einer detaillierten Aufklärung einverstanden mit der zweckbezogenen wissenschaftlichen Verwendung ihrer Daten. Die genetischen Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (Aktenzeichen: 11-021). Die Entnahme der Blutproben wurden vor Ort vom klinischen Personal durchgeführt.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage ACS	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Autoklav Systec™ V-150	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Chemilumineszenz-Geldokumentationssystem ChemiDoc™ MP	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Elektrophorese Spannungsquelle - EPS 301	GE Healthcare, Chicago, USA
Elektrophoresekammer Mini horizontal	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland
Elektrophoresesystem XCell SureLock Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Flockeneisbereiter AF 80	Scotsman® Ice Systems, Vernon Hills, USA
Folienschweißgerät FS 3261	Clatronic®, Kempen, Deutschland
Gelkamera Canon EOS 700D	Canon, Ota, Japan
Heizblock Digital Heatblock	VWR® International, Radnor, USA
Inkubator B 5042	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kapillarelektrophoresegeräte ( <i>sequencer</i> )	
3130xL Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
3500xL Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Kühlzentrifuge Multifuge™ 1 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop BX53	Olympus®, Tokio, Japan
Magnetrührer	IKA®, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikrozentrifuge Fresco™ 21	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Mini PCR Plate Spinner MPS1000	Labnet International, Edison, USA
Minizentrifuge, Sprout®	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Minizentrifuge/-Vortex Combi-Spin FVL-2400N	BioSan, Riga, Lettland
Mikrowelle	SEVERIN, Sundern, Deutschland
Multi-Detektions-Reader Synergy™ HT	BioTek®, Winooski, USA
Multifuge 1 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
NanoDrop™ 1000 Mikrovolumen-Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
pH-Meter inoLAB® pH 7110	Xylem, Rye Brook, USA
Pipetten Research® und Research® plus: 0,1 - 1000 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfer pipetus®	VWR® International, Radnor, USA
Plattenzentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, Germany
Präzisionswaage 572	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Rotator für Reagenz- und Probenröhrchen	VWR™ International, Radnor, USA
Sicherheitswerkbank HeraSafe™	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Spannungsquelle PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Thermo CO <sub>2</sub> -Inkubator Heracell™	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Thermocycler	
FlexCycler Thermocycler	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Mastercycler pro, vapo.protect	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
MJ Mini™ Personal Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PTC-100™ Programmable Thermal Controller	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PTC-200® Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Thermomixer Biometra TS1 ThermoShaker	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Vortex-Mischer lab dancer	IKA®, Staufen im Breisgau, Deutschland
Wasserbad	VWR™ International, Radnor, USA

**Tabelle 3. Übersicht über die verwendeten Geräte.**

## 2.2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenz, Material	Hersteller
100 bp DNA-Leiter	New England BioLabs, Ipswich, USA
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampuwa Wasser	Fresenius, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
Bacto™ Agar	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Bacto™ Hefeextrakt	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Betain (5 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
cOplete™, Mini Proteasehemmer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Desoxyribonukleotid-Mix (dNTPs) (je 10 mM)	MP Biomedicals™, Santa Ana, USA
Diethiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dpnl Restriktionsenzym	New England BioLabs, Ipswich, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 4.5 g/l D-Glucose + L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS)	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
E.coli One Shot™ TOP10 Chemokompetente Zellen	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Essigsäure, 3M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol, J.T. Baker™	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,5 M, pH = 8,0	Invitrogen, Carlsbad, USA
Exonuklease I (20 U/μl)	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/μl)	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Fetales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
FuGENE®HD Transfektionsreagenz	Promega, Madison, USA
Formamid HiDi™	Applied Biosystems, Foster City, USA
HPLC-Wasser, J.T.Baker™	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Kryokonserviergefäße CryoPure 2,0 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Methanol, J.T.Baker™	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Midori Green Advance	Nippon Genetics, Dueren, Deutschland
Mikrotiterplatte Costar® 6-Well	Corning, New York, USA
Mikrozentrifugenröhrchen (0,5, 1,5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Milchpulver, Botting Grade, fettarm	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat, 3 M, pH = 5,0	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumbikarbonat Puffer (NaHCO <sub>3</sub> ) 0,1 M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NuPAGE™ 4 bis 12% Bis-Tris-Polyacrylamid-Gel	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
NuPAGE™ LDS Probenpuffer	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
NuPAGE™ MES SDS Laufpuffer	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
NuPAGE™ Transfer Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Pasteurpipetten ABSOLUTE®	Th.Geyer, Höxter-Stahle, Deutschland
PCR-Deckelketten (8er) Multiply® (0,2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Platte, Multiply®, 96-well without skirt	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Platte, Multiply®, 96-well with half skirt	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

PCR-Puffer (10x) mit MgCl <sub>2</sub>	MP Biomedicals™, Santa Ana, USA
Peha-soft® Nitrilhandschuhe	Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Petrischalen	Corning, New York, USA
PhosSTOP™	Roche, Basel, Schweiz
Pipettenspitzen Biosphere® (plus) (10, 200 und 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® (10/20 µL, 200 µL 1000 µL)	Starlab, Hamburg, Deutschland
pmaxGFP Vektor	Lonza, Basel, Schweiz
Proteinstandard Precision Plus Protein™	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Serologische Pipetten (5, 10, 25 mL und 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S.O.C. Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Opti-MEM I Serummedium	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Roti® Free Stripping Buffer	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
StemPro™ Accutase™ Zell-Dissoziationsreagenz	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
SuperSignal™ West Pico Plus Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Taq DNA polymerase (5 U/µl)	MP Biomedicals™, Santa Ana, USA
TRIS	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tween® 20	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Western-Blotting-Membranen Amersham™ Protran™	GE Healthcare, Chicago, USA
Zentrifugenröhrchen Falcon™ (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

**Tabelle 4. Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien**

### 2.2.3 Puffer

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
Ladepuffer für Agarosegele (10x)	19,2 mL Ampuwa®-Wasser, 10 mL Glycerin, 0,01 g Bromphenolblau oder 4 µL Midori Green pro 100 mL Agarosegel
LB-Medium	1 L: 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl gelöst in dH <sub>2</sub> O (pH = 7,0)
LB-Agar (2%)	+ 20 g Agar gelöst in LB-Medium
LB-Ampicillin-Agar (100 µg/mL)	+ 10 mL Ampicillin (10 mg/mL)
MES-Puffer	40 mL MES (20x), 760 mL Aqua Dest
RIPA-Lysepuffer	150 mM NaCl, 1 % Nonidet P40, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-HCl (pH = 7,4)
Mit Protease- und Phosphataseinhibitor	10 mL RIPA, 1 Tbl. cOmplete™, 1 Tbl. PhosSTOP™
TBE-Puffer (10x)	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA gelöst in dH <sub>2</sub> O
TBS-Puffer (10x)	500 mM TRIS-HCl (pH = 7,5), 1,5 M NaCl gelöst in dH <sub>2</sub> O
TBS-T (1x)	100 mL TBS (10), 900 mL a.d., 1mL Tween 20
Transferpuffer	45 mL NuPAGE™ Transfer Buffer (20x), 90 mL Methanol, 765 mL dH <sub>2</sub> O
Tris-Acetat-Puffer	200 mM Tris-Acetat (pH = 6,0) gelöst in dH <sub>2</sub> O
TAX-Puffer	+ 1% Triton X-100

**Tabelle 5. Übersicht über die verwendeten Puffer.**

dH<sub>2</sub>O = Destilliertes Wasser

## 2.2.4 Kits

Kit	Hersteller
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Transglutaminase-Assay-Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

**Tabelle 6. Übersicht über die verwendeten Kits.**

## 2.2.5 Antikörper

Antikörper	Ursprung	Hersteller
Anti-β-Actin	Maus	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Anti-Myc-Tag	Hase	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Neomycin Phosphotransferase II	Hase	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
HRP-linked anti-mouse	Pferd	Cell Signaling, Danvers, USA
HRP-linked anti-rabbit	Ziege	Cell Signaling, Danvers, USA

**Tabelle 7. Übersicht über die verwendeten Antikörper.**

HRP = *horseradish peroxidase* (Meerrettich-Peroxidase)

## 2.2.6 Primer

Die Primer wurden manuell mithilfe des Ensembl Genombrowsers [145] erstellt, mit einem Mindestabstand von 150 bp zur Zielsequenz. Die Länge der Oligonukleotide betrug zwischen 18 und 24 bp mit angestrebten Anlagerungstemperaturen (*annealing temperature*, AT) von  $60 \pm 4^\circ\text{C}$  (eine Ausnahme stellen die Primer für die Mutagenese dar). Der GC-Gehalt lag zwischen 40 und 60%. Um eine unspezifische Amplifikation zu vermeiden, wurden die Primer zuvor in einer *in silico* PCR (NCBI Primer Blast, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) getestet. Die Primer wurden im Auftrag von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Primer-Name	Forward Primer (F)	Reverse Primer (R)	AT [°C]
AADAC_c.1087	CTTACCCCTGACCTATGTC	ACATGTGGAACCTAACTAGACC	57
ACO2_c.1965	CCTCTGGAGGGCTTGTCATC	CTCCTCCCAGTTTCCACTCC	62
ARHGEF6_c.833	CGACCACTCCATTCTTTAGG	TGTATTGCTACTTTGTTCCAGAGC	58
CENPL_c242	CCTGCAAACCTATTGGTTG	CATGATTTTGTACACAACTACC	56
CENPL_c872	TGTCTGCCCTTATTCCTTG	GTTGAAACACGAACTAATCTTG	56
DROSHA_c.2010	CTTCCTGTAGTCTCCTCATTGC	CATTTCCGTGCCTAACCTGAG	60
GRK4_c.1859	CCTCTTCAGAGGACACATTCTG	CTCGAACTCCTGACCTCATG	60
pcDNA3.1_F <sup>3</sup>	GTTTTGGCACAAAATCAACGG		58
SYTL4_c.86	GGTCAGATACTTCTACTTTGTC	TGAGAGGTAAGACAGTAAGAC	57

SPTBN2_c.6277	GAGTTGAGACATTTTCAGCTCTC	TGACCAAAGGCAACACAGAATC	58
TGM6_AvrII <sup>3</sup>	ATAGGCCTAGGTCCTGCCG	ATAGGACCTAGGCCCTCTTAC	62
TGM6_cDNA <sup>3</sup>	ATGGCAGGGATCAGAGTCAC	TCACTTGGCAGTGGCCACAT	58
TGM6_c331t	gtgctgtcattggctgctacctgctgagc <sup>1</sup>	gctcagcaggtagcagccaatgacagcac <sup>2</sup>	78
TGM6_c1076t	ctggatgccaccctccaggaggagagt <sup>1</sup>	actctcctctggagggtggcatccag <sup>2</sup>	78
TGM6_c210-230_R <sup>3</sup>		GATGTCTGGAACACAGCTTTG	58
TGM6_c768-789_F <sup>3</sup>	CATTCTGCAGAAGTGGCTCAAG		60
TGM6_Ex1	GATGATTTTGTGTCTCGTGGGTG	TTCATGGTGGACTATCCAGCTG	60
TGM6_Ex2	CTGGATGAACAAATGACTGGCC	GTCTACCTACAGTGACTTGCTTC	61
TGM6_Ex3	CCAAAGCCTCCCAGAAGTTC	TTTAACCCACCTCCCAGGC	59
TGM6_Ex4	AAGCCCCCTCTTGACCTCTCC	CCCCTTGTCCTCCTGAGAAG	64
TGM6_Ex5	CAAACCTGCCCTGCACAGATGG	CACCACTGAGTTTTGGGGTGG	62
TGM6_Ex6	CAGACAGTTAAAAAGCAAGAGTG	GTTCTCCCTGTCAATGAATCC	58
TGM6_Ex7	AGAGGGCTTTGGCCACAAATG	CTTGAAGAGGCACCACTATC	60
TGM6_Ex8-9	CAGTTCTGTGGAAAGTAGGGAG	TGAATGGAAGCTGCTGTGAGC	60
TGM6_Ex10	CTCTCAGAGAAGCTGGAAATTTGC	GATGAATGCAGTCCCTGGGAAATC	61
TGM6_Ex11	GCAAGGACCAGAGAGAAAGG	CACCCATCCCCTTATGTCC	59
TGM6_Ex12	GGTGGACATGACTAATGATCC	ATGAAGGCTGATATGTATAGTCTG	58
TGM6_Ex13	CAGTGTGCTGGGATTACAGG	CATGGGGATGAGAGATGAAGG	60

**Tabelle 8. Übersicht über die verwendeten Primer.**

Die Sequenzen der Primer sind von 5'- in 3'-Richtung angegeben. Dabei sind die erprobten Anlagerungstemperaturen (*annealing temperature*, AT) angegeben. Die Primer für die Mutagenese sind in kleinen Buchstaben angegeben (<sup>1</sup>*sense primer*, <sup>2</sup>*antisense primer*). Mit <sup>3</sup> sind die Primer für die Sequenzierung des Klonierungsvektors pcDNA3.1 markiert.

## 2.2.7 Software

Software	Hersteller
Affinity Designer und Photo 1.8 bis 1.10	Serif, Nottingham, United Kingdom
Argus X1 v7.14.6	Biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland
Citavi v6.8	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Chromas v2.6.6	Technelysium, South Brisbane, Australien
Gen5™ Datenerfassungs- und Analysesoftware (v. 1.05)	BioTek™, Winooski, USA
Image Lab™ 6.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
jamovi® v.1.6.15	
Mutation Surveyor® v3.25	SoftGenetics, State College, USA
Sequencing Analysis v5.4	Applied Biosystems, Foster City, USA
Office 2016 und 365	Microsoft, Redmond, USA
Prism 9	GraphPad, San Diego, USA

**Tabelle 9. Übersicht über die verwendete Software.**

## 2.3 Nukleotid-basierte Untersuchungsmethoden

### 2.3.1 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus den Leukozyten der Blutproben durch Personal des Instituts für Neurogenetik extrahiert und für diese Doktorarbeit zur Verfügung gestellt. Zur Extraktion wurde das QIAamp DNA Mini Kit verwendet. Die Nukleotidkonzentrationen wurden für alle DNA-Proben spektrophotometrisch mit dem NanoDrop™ 1000 gemessen. Für die PCR wurden Aliquots mit einer DNA-Konzentration von 10 ng/μL hergestellt.

### 2.3.2 Exom-Sequenzierung

In beiden Familien wurden eine Exom-Sequenzierung (WES) durchgeführt. Bei Familie A wurden hierfür die betroffenen Mitglieder III-1 (Index-Patientin) und II-4 sowie der nicht betroffene II-5 ausgewählt. Bei Familie B wurde die DNA der betroffenen Geschwister (II-1, II-2) und der nicht-betroffenen Eltern (I-1, I-2) untersucht. Die DNA-Proben wurden mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) durch die Firma Centogene (Rostock, Deutschland) sequenziert. Über die Funktionsweise des WES sei auf das Paper von Bamshad *et al.* [10] verwiesen.

#### 2.3.2.1 Filterung der Varianten

Durch das Institut für integrative und experimentelle Genomik (Dr. rer. nat. Ingrid Braenne, IIEG, Lübeck) erfolgte eine Verarbeitung der NGS-Rohdaten (Familie A: Qualität  $\geq 30$ ) und Benennung der Varianten mittels ANNOVAR [141]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Varianten nach von mir modifizierten, institutsinternen Standards gefiltert, um geeignete Kandidatenvarianten und daraus resultierend Kandidatengene zu bestimmen (s. Tab. 10). Berücksichtigt wurden Varianten, bei denen der Genotyp passend zu dem jeweils untersuchten Erbgang war, die zudem selten und proteinverändernd waren und nicht in segmentalen Duplikationen, aber in evolutionär konservierten Regionen lagen. Um häufige Fehler des WES auszublenden, wurden Varianten mit einer Allelfrequenz von  $\geq 5\%$  in einer

Filterkriterium	Filterparameter
(1) Genotyp	Familie A: AD/XLD Familie B: AR (homo- und heterozygot)/AD/XLD ( <i>de novo</i> )
(2) MAF (ExAC [65] und gnomAD [66]) Population: Gesamt und Europäisch (nicht-finnisch) (Fam. A) bzw. Ostasien (Fam. B)	$f_{AD} \leq 0,00025$ ; $f_{AR} \leq 0,022$ ; $f_{XLD} \leq 0,00033$ (s. Abschnitt 6.2)
(3) Art der Mutation	<i>missense/nonsense/stop loss/indel</i> in Exons $\pm 2$ bp
(4) <i>GenomicSuperDups</i> <sup>1</sup> [7]	$\leq 0.9$
(5) <i>PhastCons Conserved Elements, 46-way</i>	$\neq$ Nicht vorhanden
(6) Allelfrequenz (WES-in-house-Datenbank) <sup>2</sup>	$\leq 0,05$

**Tabelle 10. Übersicht über die Filterkriterien und -parameter.** <sup>1</sup>Bezeichnung der Benennungssoftware ANNOVAR: der Wert der *GenomicSuperDups* gibt die Ähnlichkeit der Sequenz, in der die Variante liegt, zu einer segmentalen Duplikationsregion von  $>1000$  Basenpaaren an. Der Wert für *PhastCons Conserved Elements* zeigt den Grad der evolutionären Konservierung eines humanen Genomabschnitts an, durch Abgleich der Sequenzen 45 anderer Vertebraten. <sup>2</sup>Nur für das WES der Familie B vorhanden und angewandt. Abkürzungen: AD: autosomal dominant, XLD: X-linked dominant, AR: autosomal rezessiv, MAF: *minor allele frequency*; ExAC: Exome Aggregation Consortium, v.1.0; gnomAD: Genome Aggregation Database, v.2.1.1; bp: Basenpaare.

hausinternen WES-Datenbank ( $n = 555$ ) ausgeschlossen. Alle resultierenden Varianten wurden hinsichtlich ihrer Korrektheit geprüft und mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt.

### 2.3.2.2 Priorisierung der Varianten

Die Priorisierung von Kandidatenvarianten erfolgte nach einer Überprüfung, ob die Varianten per se als funktionell bedeutsam anzusehen waren (1) und ob das zugehörige Gen bzw. das exprimierte Protein als bedeutsam in der Pathogenese zu vermuten war (2 a-d) (s. Tab. 11).

Priorisierungskriterium	Priorisierungsparameter
<b>1) Variante: schädlich oder tolerabel</b> LR [31] CADD [69]	> 0,5 (SNVs in Exonen) > 15 (alle anderen Varianten)
<b>2) Gen: Assoziation zum Phänotyp</b> a) Protein-Interaktion: STRING b) Assoziation zum Krankheitsbild: Medline c) Genotyp-Phänotyp-Korrelation: OMIM  d) Expression: The Brain Atlas	≥ 1 interagierendes Protein ≥ 1 Suchergebnisse Kandidatengen: ≥0 ≥0 ≥1 Σ der paralogen Gene: ≥0 ≥1 ≥0 oder ≥0 ≥0 ≥3 Fam. A: NX (Mittelhirn oder Striatum) ≥ ∅ + 2SE Fam. B: NX (Kleinhirn) ≥ ∅ + 2SE
<b>3) Qualitative Recherche</b>	

**Tabelle 11. Übersicht über die Priorisierungskriterien und -parameter.**

**1)** Für die Bewertung von *missense*-Varianten wurde das logarithmische Regressionsmodell (LR bzw. MetaLR) von Dong et al. [18] (pathogen ab > 0,5) genutzt, für alle weiteren Varianten die CADD-Werte [12, v.1.6] (pathogen ab ≥ 15).

**2a)** Mithilfe der STRING-Datenbank [102, v11.0] wurde die Anzahl der Interaktionen des Kandidatenproteins mit an den Erkrankungen beteiligten Proteinen ausgewertet (Konfidenz der Interaktion ≥ 0.7). Als Interaktionsproteine wurden jene gewählt, deren kodierende Gene für hereditäre Parkinson-Syndrome [45] (Familie A) oder Ataxien [74] (Familie B) beschrieben sind.

**2b)** Es wurde in Medline-gelisteten Veröffentlichungen unter dem Suchschema „(GENNAME[text word]) AND ((parkinson's disease[text word]) OR (parkinsonism[text word]))“ (Familie A) bzw. „(GENNAME[text word]) AND (ataxia[text word])“ (Familie B) die Anzahl der Treffer ausgewertet. Es wurden Publikationen bis zum 31.12.2016 eingeschlossen. Zudem erfolgte eine qualitative Auswertung der Veröffentlichungen.

**2c)** Mithilfe der Datenbank OMIM® [24] wurde die Anzahl an sicheren Genotyp-Phänotyp-Korrelationen des Kandidatengens sowie paraloger Gene zu Parkinson-Syndromen (Fam. A) bzw. Ataxie (Fam. B)|anderen Bewegungsstörungen|weiteren neurologischen Erkrankungen identifiziert. Paraloge Gene wurden mithilfe des Genombrowsers Ensembl [99] ermittelt.

**2d)** Die zerebrale Genexpression der Kandidatengene wurde in der Datenbank The Human Protein Atlas ermittelt [103]. Es wurden die normalisierten Konsensus-RNA-Transkriptionslevel (NX) verwendet, die sich aus den Datensätzen des HPA, GTEx und dem FANTOM5-Projekt zusammensetzen. Folgende Gehirnareale wurden berücksichtigt: Amygdala, Basalganglien, Kleinhirn, zerebraler Kortex, Hippocampus, Hypothalamus, Mittelhirn, olfaktorischer Kortex, Pons und Medulla oblongata und Thalamus. Zudem wurde geschaut, ob die Expression in den Basalganglien und dem Mittelhirn (Familie A) bzw. Kleinhirn (Familie B) signifikant höher war als durchschnittlich im Gehirn (∅).

**3)** Anschließend erfolgte eine qualitative Recherche in Medline-gelisteten Veröffentlichungen über die Proteinfunktion, Genotyp-Phänotyp-Korrelationen und eine Assoziation zu Stoffwechselwegen von Interesse.

Durch diese Priorisierungskriterien wurden die Varianten in drei Priorisierungsgrade eingeordnet (s. Tab. 12):

Priorisierungsgrad	Priorisierungskriterien
Hohe Priorität (A) A+ A A-	LR > 0,5 (SNV) oder CADD > 15 und 3-4/4 positiven Ergebnissen aus 2) 1-2/4 positiven Ergebnissen aus 2) 0/4 positiven Ergebnissen aus 2)
Mittlere Priorität (B)	LR ≤ 0,5 bzw. CADD ≤ 15 und ≥ 1/4 positiven Ergebnissen aus 2)
Niedrige Priorität (C)	LR ≤ 0,5 bzw. CADD ≤ 15 und 0/4 positiven Ergebnissen aus 2)

**Tabelle 12. Priorisierungsgrade.** Die Kandidatenvarianten wurden durch die Priorisierungskriterien 1) und 2) in Grade von A-C eingeteilt. Eine hohe Priorität (A) hatten Varianten mit pathogenen Prädiktionswerten (LR für *missense*-Varianten, CADD für alle weiteren). Anhand der Relevanz zu dem erforschten Phänotyp wurden diese in die Grade A+ bis A- subpriorisiert. Eine mittlere Priorität (B) erhielten Varianten, die zwar als tolerabel für den Organismus berechnet worden sind, jedoch eine Assoziation zu entsprechenden Stoffwechselwegen zeigten. Mit einer niedrigen Priorität (C) wurden jene Varianten eingestuft, die als tolerabel berechnet wurden und bei denen keine Assoziation ermittelbar war.

Zudem wurden Werte weiterer Prädiktionsprogramme ermittelt oder der ANNOVAR-Annotation [141] entnommen. Hierzu zählen REVEL (*Rare Exome Variant Ensemble Learner*) [60], PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*) [2], SNAP2 (*Screening for Non-Acceptable Polymorphisms, v2*) [53], FATHMM (*Functional Analysis Through Hidden Markov Models, v2.3*) [126], SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant, v.6.2.1*) [135], MutationTaster2 [124], MutationAssesor [113], MutPred2 [105], SNPs&GO [21], LRT (*Likelihood Ratio Test*) [26], GERP++ (*Genomic Evolutionary Rate Profiling*) [29], phyloP [107] und SiPhy [41].

### 2.3.3 Sanger-Sequenzierung

Initial wurde eine Amplifikation der DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt: 3 µL genomische DNA [10 ng/µL] wurden dabei mit je 0,4 µL Primer (vorwärts und rückwärts) [10 µM], 2 µL dNTPs [1 mM], 1 µL eines 10x Polymerase-Puffers und 0,05 µL Taq-Polymerase [5 U/µL] vermischt und mit ultrareinem Wasser (HPLC *grade*) auf ein Gesamtreaktionsvolumen von 10 µL aufgefüllt. Die PCR-Reaktion erfolgte in unterschiedlichen Thermocyclern in 35 Zyklen (s. Tab. 13). Der Erfolg der Amplifikation wurde elektrophoretisch auf einem 1,5% Agarosegel durch Zugabe von Midori Green visualisiert. Anschließend wurden die PCR-Produkte von DNA-Einzelsträngen durch Zugabe

von je 10 U Exonuklease I und 1 U FastAP (Exol-FastAP) befreit. Zunächst erfolgte eine Inkubation bei 37°C, danach eine Enzyminaktivierung bei 85°C. Für die Sequenzierungs-PCR wurde das BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet: Es wurden 1 µL Exol-FastAP-Produkt mit 0,5 µL Primer (vorwärts oder rückwärts), 1,5 µL 5x Sequenzierpuffer, 0,5 µL BigDye Terminator-v3.1-Reaktionsmix (enthält u.a. die fluoreszierenden ddNTPS) und 6,5 µL ultrareinem Wasser gemischt und bei 25 Zyklen (s. Tab. 13) im Thermocycler inkubiert. Die Produkte wurden anschließend kapillarelektrophoretisch sequenziert. Die Elektropherogramme wurden mithilfe der Programme Mutation Surveyor® und Chromas ausgewertet.

Phase	Denaturierung		Hybridisierung der Primer	Elongation		
Temperatur [°C]	95	95	Variabel (AT)	72	72	4
Dauer	5 Min.	30'	30'	Variabel	10 Min.	∞
Anzahl Zyklen	1		35		1	
<b>PCR für die Sequenzierung mittels BigDye® Terminator v3.1</b>						
Temperatur [°C]	96	96	60	4		
Dauer	1 Min.	10'	80'	∞		
Anzahl Zyklen	1		25			

**Tabelle 13. Standard-PCR-Protokoll für die Taq-Polymerase und die „Sequenz“-PCR.** Oben ist das Standard-Protokoll für eine PCR mittels *Taq*-Polymerase zur Amplifikation von DNA dargestellt. Die Temperatur für die Hybridisierung der Primer ist der Primerliste im Anhang zu entnehmen und wurde vor der Sequenzierung mittels Gel-Elektrophorese in ihrer Effektivität überprüft. Die Dauer der Elongationsphase hing von der Länge des PCR-Produkts ab. Es wurden 60 Sekunden pro 1000 bp gerechnet mit einer minimalen Dauer von 30'. Unten ist das Standard-Protokoll für eine PCR für die Sequenzierung mittels BigDye® Terminator v3.1 angegeben.

### 2.3.4 Segregationsanalyse

In Familie A wurde die Verteilung (Segregation) der Varianten in den Genen *AADAC*, *ARHGEF6*, *DROSHA*, *GRK4*, *SYTL4* und *TGM6* bei den Familienmitgliedern I-1, I-2, II-1, II-2, III-2, III-3, III-4, III-5 untersucht. Dafür wurden die entsprechenden Genabschnitte (s. Tab. 8) nach Sanger sequenziert.

### 2.3.5 TGM6-Screening von EOPD-Patienten

In 50 Patienten mit einer EOPD mit bisher ungeklärter Ursache (s. Abschnitt 2.1) wurden alle 13 Exone des Gens *TGM6* nach Sanger sequenziert. Für exonische und Spleißstellen-Varianten wurden die Allelfrequenzen in der Probandenpopulation mit der MAF in der gnomAD verglichen. Dass die Allelfrequenz der jeweiligen Variante in der Probandenpopulation erhöht ist, war die dabei zugrundeliegende Hypothese:

$H_0$ : Allelfrequenz<sub>EOPD-Probanden</sub> = Allelfrequenz<sub>gnomAD</sub>

$H_1$ : Allelfrequenz<sub>EOPD-Probanden</sub> > Allelfrequenz<sub>gnomAD</sub>

Zudem wurden Pathogenitätswerte für die Prädiktionsprogramme MetaLR, CADD und REVEL ermittelt.

## 2.4 Molekulardynamik-Simulation

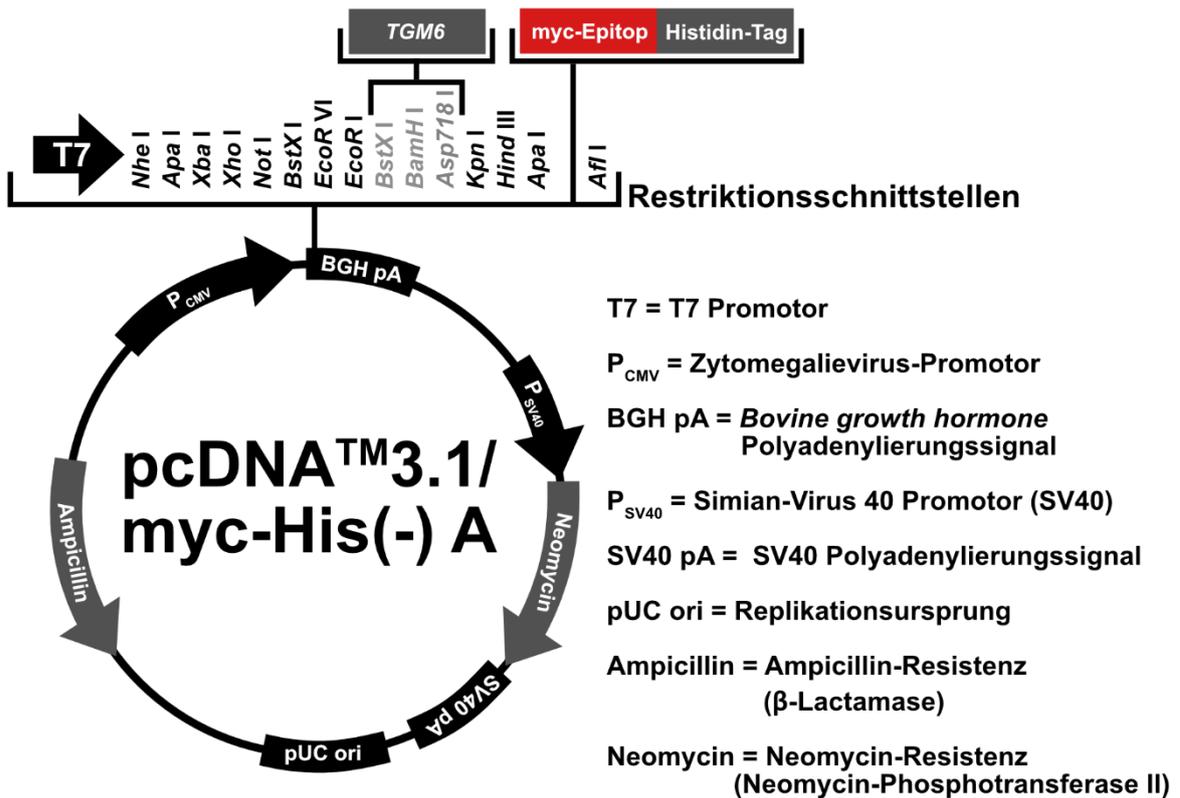
Durch das Institut für integrative und experimentelle Genomik (Michaela Müller, M.Sc., IIEG Lübeck) erfolgte die Durchführung und Auswertung einer Molekulardynamik-Simulation [67, 86] für das Wildtyp-Protein TGM6 und das mutierte Protein P359L-TGM6 auf Basis eines Homologiemodells von TGM3 (Protein Data Bank: 1L9N) [3, 101]. Dabei deckte das Homologiemodell die gesamte Aminosäuresequenz, bis auf die AS G464 bis P493 ab. Die Simulationsdauer betrug insgesamt 25 ns. Nach Stabilisierung des Modells nach 15 ns, gemessen an der *root-mean-square deviation* (RMSD), erfolgten die Analysen des Modells. Analysiert wurden Unterschiede zwischen dem Wildtyp- und dem P359L-TGM6 an der Calciumbindungsstelle 1 und der katalytischen Triade [131].

## 2.5 Klonierung

Unter Klonierung versteht man die Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts. In dieser Arbeit wurde dabei ein *TGM6*-beladenes Plasmid für den anschließenden Einsatz in humanen Zellen vervielfältigt.

### 2.5.1 Mutagenese (*site-directed*)

In Kollaboration mit dem Institut für klinische Medizin der nationalen Yang-Ming Universität in Taipeh (Herr Dr. B.-W. Soong) [48] wurde mir freundlicherweise ein mit Wildtyp-*TGM6* beladenes Plasmid (pcDNA™ 3.1/myc-His A Vektor, s. Abb. 5) zugesandt. In die DNA-Sequenz sollten die in der Familie A entdeckte Mutation c.1076C>T (p.P359L) sowie in einem weiteren Ansatz die von Guo *et al.* beschriebene Mutation c.331C>T (p.R111C) [48] eingebracht werden, die als Kontrolle für eine nachgewiesene verringerte Enzymaktivität diente. Hierfür wurden die Mutation-tragenden *sense*- (*s*) und *antisense*-Primer (*as*) online konstruiert ([www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp](http://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp)). Für die



**Abbildung 5. Plasmid pcDNA™ 3.1 myc-His(-) A mit Insertion von TGM6.** Grafik modifiziert nach dem Invitrogen Handbuch des genannten Vektors. Das Wildtyp-TGM6-Gen wurde durch die Arbeitsgruppe von Herr Dr. B.-W. Soong *in-frame* des c-myc-Epitops und Histidin-Tags (sechs Histidinreste) durch Nutzung der Restriktionsenzyme EcoR I und Kpn I integriert. Dargestellt sind außerdem die Promotoren, die der Transkription von TGM6 und des Vergleichsproteins Neomycin-Phosphotransferase II dienen sowie deren Polyadenylierungssignale. Das Ampicillin-Resistenzgen kodiert für eine β-Lactamase und ist notwendig für die Selektion der später transfizierten Zellen.

Mutagenese wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Vervielfältigung wurden 5 µL Reaktionspuffer (10x), 50 ng Plasmid-DNA, je 130 pmol der Primer, 1µL dNTP-Mix vermischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein finales Reaktionsvolumen von 49 µL aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µL der *PfuTurbo* DNA-Polymerase (2,5 U/µL) hinzugefügt und das Plasmid in 19 Zyklen im Thermocycler vervielfältigt (s. Tab. 14). Im Anschluss wurde 1 µL des Restriktionsenzym *DpnI* hinzugefügt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um das Ausgangsplasmid aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Der Erfolg wurde mittels Elektrophorese auf einem Agarosegel überprüft.

Phase	Denaturierung		Hybridisierung der Primer	Elongation		
Temperatur [°C]	95	95	55	68	68	4
Dauer	30'	30'	1 Min.	8 Min.	10 Min.	∞
Anzahl Zyklen	1		19		1	

**Tabelle 14. PCR-Protokoll für die Mutagenese mittels *Pfu*-Polymerase.**

### 2.5.2 DNA-Gelextraktion

Die Plasmide wurden mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert. Dafür wurde das Gel im Bereich der fluoreszierenden Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß durch Zugabe von 450 µL QG-Puffer gelöst. Dies erfolgte durch die Inkubation bei 50°C für 10 Minuten und das Vortexen alle 2-3 Minuten. Anschließend wurden 150 µL Isopropylalkohol hinzugefügt. Eine QIAquick *spin column* wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß gestellt und das Gemisch in die *spin column* überführt. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 13.000 U/Min (ca. 16.300 x g) wurde der Durchfluss verworfen und nach Zugabe von 500 µL QG-Puffer erneut für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die DNA mit 750 µL PE-Puffer inkubiert und erneut für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der restliche Waschpuffer durch erneutes Zentrifugieren für 1 Minute entfernt. Die *spin column* wurde in neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 50 µL EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) hinzugefügt. Nach vierminütiger Inkubation wurde die Plasmid-DNA durch eine einminütige Zentrifugation gewonnen.

### 2.5.3 Transformation in *E.coli*

Die Klonierung der Plasmide (WT, R111C, P359L) erfolgte daraufhin in *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*). Hierfür wurden die Plasmide mittels Transformation in chemokompetente One Shot™ TOP10 *E.coli* nach Angaben des Herstellers eingebracht: Ein Aliquot von 50 µL *E. coli* wurde auf Eis aufgetaut, mit 3 µL der Plasmid-Lösung vorsichtig vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad für 55 Sekunden bei 42°C chemisch transformiert (*heat shock*) und danach für 2 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden 250 µL vorgewärmtes S.O.C. Medium (RT) hinzugefügt und die Zellen bei 37°C für eine Stunde auf einem Schüttelinkubator (200 U/Min) inkubiert. Je 100 µL der transformierten Zellen wurden auf einer vorgewärmten (37°C) LB-Ampicillin-Agar-Platte (100 µg/mL) ausgesät und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die jeweils drei größten Kolonien wurden in 10 mL Ampicillin-haltigem (100 µg/mL) LB-Medium bei 37°C über Nacht vermehrt.

#### 2.5.4 Plasmidextraktion

Die klonierten Plasmide wurden mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers extrahiert. Hierfür wurden 9,5 mL die Bakterienkulturen für 5 Minuten bei 13.000 U/Min (ca. 16.300 x g) zentrifugiert und das Pellet in 250 µL RNase A-haltigem P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 250 µL des P2-Puffers hinzugefügt und die Suspension durch sechsmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes vorsichtig gemischt. 350 µL N3-Puffer wurden hinzugefügt, die Suspension durch zehnmaliges Invertieren gemischt und für 10 Minuten bei 13.000 U/Min zentrifugiert. 800 µL des Überstandes wurde in eine QIAprep 2.0 *spin colum* umgefüllt, für 1 Minute zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. 750 µL PE-Puffer wurden hinzugefügt, das Röhrchen für 1 Minute zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Um den verbliebenen Waschpuffer zu entfernen, wurde das Röhrchen erneut für 1 Minute bei 14.800 U/Min (ca. 21.000 x g) zentrifugiert. Die *spin column* wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 50 µL EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) hinzugefügt, um das Plasmid zu eluieren. Nach einminütiger Inkubation wurde das Röhrchen erneut für 1 Minute zentrifugiert. Um den Erfolg der Mutagenese zu überprüfen und Replikationsfehler durch die *Pfu*-Polymerase auszuschließen, wurde die Plasmid-DNA der jeweils drei Kolonien anschließend nach Sanger sequenziert.

Die restlichen 500 µL der Bakterienkulturen wurden indes in einem Glycerol-Wassergemisch (1:1) bei -80°C eingefroren.

Nach Auswahl einer korrekt klonierten Kolonie wurden die zugehörigen Bakterienkulturen aufgetaut und in 100 mL Ampicillin-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C bebrütet. 500 µL der Kulturen wurden erneut zur Lagerung in einem Glycerol-Wassergemisch eingefroren. Die restliche Kultur wurde genutzt, um die Plasmide mittels QIAprep Spin Maxiprep Kit nach Angaben des Herstellers zu extrahieren. Dafür wurde die Bakterienkultur bei circa 4500 x g für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 10 mL RNase A-haltigem P1-Puffer resuspendiert. 10 mL P2-Puffer wurden hinzugefügt und durch sechsmaliges Invertieren vorsichtig gemischt. 10 mL P3-Puffer wurden dem Röhrchen hinzugefügt, vorsichtig gemischt und bei 2000 x g für 5 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine QIAfilter Kartusche gefiltert, mit 2,5 mL ER-Puffer gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Äquilibrieren einer QIAGEN-tip (Filter-Zylinder) mit 10 mL

QBT-Puffer, wurde das Zelllysate durch den Zylinder gefiltert. Anschließend wurden 60 mL QN-Puffer schrittweise hinzugefügt. Die Proben wurden in 15 mL QN-Puffer gelöst und 10,5 mL Isopropylalkohol hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C und 13.000 U/Min (ca. 16.300 x g) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde in 70% Ethanol gelöst und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Verdunstung des Ethanols wurde das Pellet in 250 µL TE-Puffer resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt.

## **2.6 Zellkultur und funktionelle Analysen**

### **2.6.1 Transfektion und Proteinbestimmung**

HEK293-Zellen (*human embryonic kidney 293 cells*) wurden in DMEM mit 10% FBS und 100 U/mL Penicillin-Streptomycin bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> angezüchtet und für die Transfektion in *six well*-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen chemisch transfiziert. Hierfür wurden pro *well* 100 µL Opti-MEM, je 2 µg Plasmid (außer bei der nicht-transfizierten (NT) Kontrolle) und 8 µL Fugene® HD Transfektionsreagens gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde diese Suspension auf je ein *well* gegeben (NT, WT, p.R111C und p.P359L). Die Transfektionsbedingungen wurden vorweg optimiert und die Transfektionseffizienz durch Transfektion von 2 µg pmaxGFP™ Vektor (Lonza) mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops überprüft. Die Konfluenz wurde als 1 – Anteil schwarzer Pixel (Tonwert  $\leq 10/255$ ) berechnet.

48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 1 mL DPBS gewaschen und für 5-10 Minuten mit StemPro Accutase bei 37°C inkubiert, anschließend bei 4°C und 13.000 U/Min (ca. 16.300 x g) zentrifugiert, mit 500 µL DPBS gewaschen und erneut bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden dann für 30 Minuten auf Eis chemisch mittels RIPA-Puffer (zugemischt mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor) und mechanisch durch mehrfaches Pipettieren lysiert. Anschließend wurden die Zelllysate bei 4°C zentrifugiert und der Überstand überführt. Die Proteinkonzentration wurde durch Anwenden des Bio-Rad DC Protein Assay gemessen.

Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blotting nach institutsinternen Standards. Es wurden jeweils 10 µg Protein mit RIPA auf 6,5 µL aufgefüllt, und mit 1 µL DTT [500 mM] und 2,5 µL 4 x Ladepuffer vermischt und auf ein NuPAGE™ 4

bis 12% Bis-Tris-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die SDS-PAGE erfolgte in einem MES-Puffer mit DTT-Zusatz und einer Spannung von 100 V in den ersten 5 Minuten bzw. 150 V im Anschluss für 60 Minuten. Anschließend erfolgte der Transfer (*blotting*) auf eine Nitrozellulose-Membran in einem Methanol-haltigem Transferpuffer bei einer Spannung von 32V für 1 Stunde. Die Membranen wurden anschließend mit TBS-T für 2 Minuten gewaschen und für 1 Stunde mit einer 1% Milch-TBS-T-Lösung blockiert. Anschließend wurde die Membran mit den primären Antikörpern (anti-Myc-Tag [1:2000], anti- $\beta$ -Aktin [1:10.000]) gegen das darzustellende Protein in 1% Milch-TBS-T-Lösung für 1 Stunde inkubiert. Nach einem drei Mal fünfminütigem Waschen der Membran mit TBS-T, wurde diese mit dem sekundären AK (anti-*rabbit* und anti-*mouse* [jeweils 1:10.000] in einer 1% Milch-TBS-T-Lösung) für eine Stunde inkubiert und erneut dreimalig mit TBS-T gespült. Die Darstellung der Proteinbanden erfolgte durch Behandlung der Membran mit dem SuperSignal™ HPO Chemiluminescent Substrate. Die Chemilumineszenz der Reaktion wurde mit einer CCD-fähigen Kamera dargestellt und die Signalintensität mithilfe des Programms Image Lab™ bestimmt. Anschließend wurden die Antikörper durch eine 15-minütige Inkubation mit einem *stripping*-Puffer gelöst, die Membran einmalig mit TBS-T gewaschen und mit dem anti-Neomycin-Phosphotransferase II-AK [1:1000] in 1% Milch-TBS-T-Lösung inkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein anti-*rabbit*-AK [1:10.000]. Die Signalintensität wurde wie oben beschrieben bestimmt.

### 2.6.2 Stabilitätsanalyse

Für die Analyse der Enzymstabilität wurde die Transfektion wie oben geschildert durchgeführt. Jedoch wurden die Zellen vor dem Aussäen zentrifugiert und in DMEM resuspendiert um die StemPro™ Accutase™ auszuwaschen. 3 Stunden nach dem Plattieren, sobald die Zellen adhären aussahen, wurde das Medium durch Cyclohexamid-haltiges DMEM [0,1 mg/mL] ausgetauscht und die Zellen unmittelbar danach ( $t_0 = 0$  h), nach 3, 6 und 9 Stunden geerntet. Die Proteine wurden wie oben beschrieben extrahiert und mittels Western Blot semiquantitativ nachgewiesen. Die Signalintensität der myc-TGM6-Bande wurde zur NPII-Bande in Verhältnis gesetzt und auf den Zeitpunkt  $t_0 = 0$  h normiert mit folgender Hypothese:

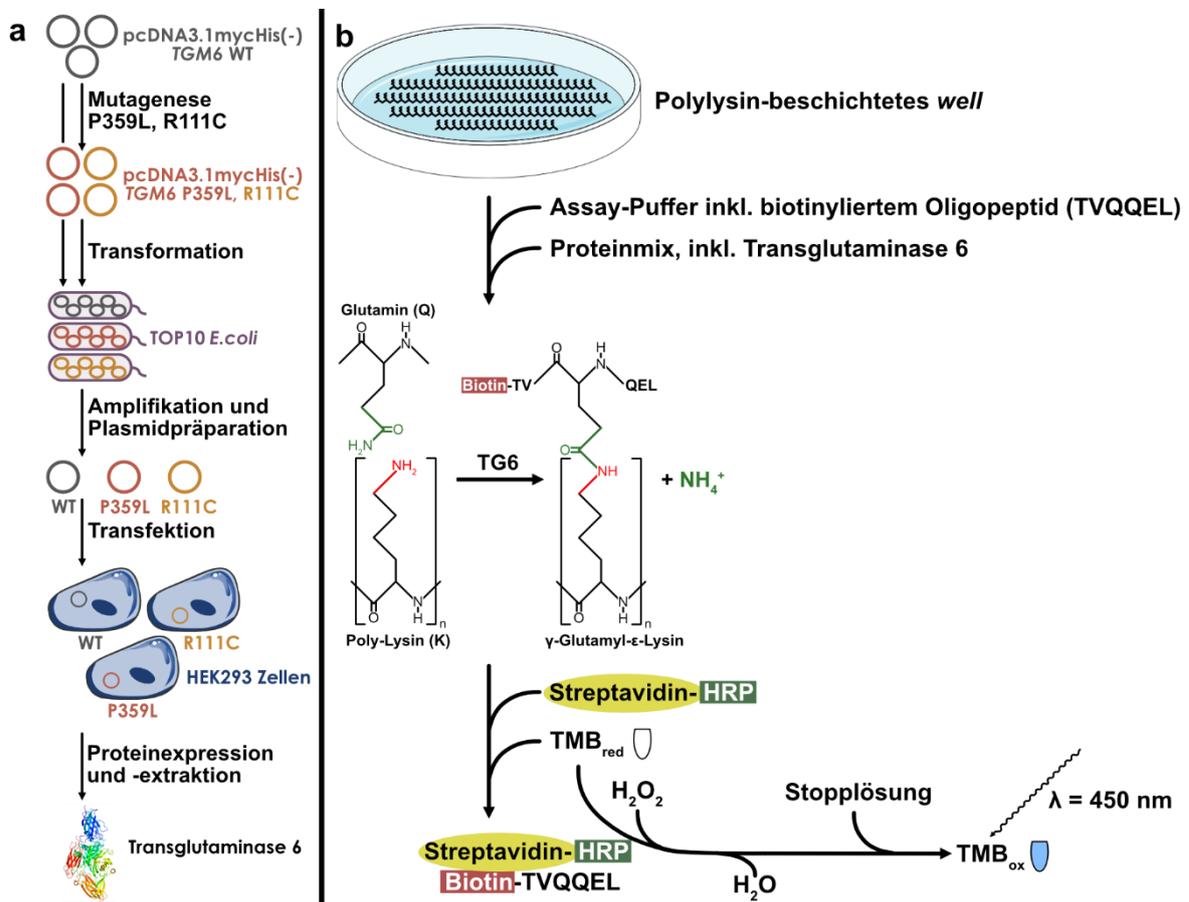
$$H_0: \text{Relative Signalintensität}_{WT} (t = 9h) = \text{Relative Signalintensität}_{P359L} (t = 9h)$$

$$H_1: \text{Relative Signalintensität}_{WT} (t = 9h) \neq \text{Relative Signalintensität}_{P359L} (t = 9h)$$

### 2.6.3 Messung der Transamidierungs-Aktivität

Für die Messung der Transamidierungs-Aktivität des TG6-Wildtyps und der Proteinvarianten P359L und R111C, wurde ein Transglutaminase Assay-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet (s. Abb. 6). Die Proteine wurden direkt nach Extraktion verwendet.

Pro *well* einer Poly-Lysin-beschichteten Platte wurden 50  $\mu$ L einer entsprechenden Proteinlösung (NT, WT, R111C, P359L) mit 10  $\mu$ g Proteinmenge befüllt. Für die Negativkontrolle wurde der Lysepuffer und für die Positivkontrolle rekombinante Transglutaminase vom Meerschweinchen verwendet. Es wurden jeweils 50  $\mu$ L eines Assay-Mixes, welcher 10  $\mu$ L Assay-Puffer, 1  $\mu$ L DTT [1M], 40  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O und in zwei Ansätzen 0,1 bzw. 0,3 M Calcium enthielt, hinzugefügt und für 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur



**Abbildung 6. Übersicht über funktionelle Studien.** Für die *in vitro* Synthese der Transglutaminase 6 (TG6) (a) erfolgte nach Mutagenese der Mutanten P359L und R111C eine Transformation und Amplifikation der Plasmide in One Shot™ TOP10 *Escherichia coli*. Anschließend erfolgte nach der Plasmidgewinnung eine Transfektion in HEK293-Zellen und Expression der Transglutaminase 6. Nach Proteinextraktion erfolgte die Zugabe des aufgereinigten Proteingemisches mit dem Assay-Puffer auf die Polylysinschichten (b). Hierbei katalysiert die Transglutaminase die kovalente Bindung der plattierten Lysinreste an die Glutaminreste des biotinylierten Hexapeptids. Nachdem die ungebundenen Oligopeptide herausgewaschen werden, kann hinzugegebenes Streptavidin an das Biotin binden. Die daran gekoppelte Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) katalysiert die Oxidation des Farbstoffs 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), der dadurch vermehrt Licht mit der Wellenlänge 450 nm absorbieren kann.

inkubiert. Anschließend wurden die *wells* dreimalig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 100 µL Streptavidin-Peroxidase-PBS-T-Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaliger Spülung mit PBS-T wurden je 200 µL TMB-Lösung hinzugefügt. Die Farbreaktion wurde nach 3 Minuten durch Zugabe einer Stopp-Lösung angehalten und die Absorption photometrisch bei 450 nm quantifiziert. Für die Analyse wurde die Absorption der Proben im Verhältnis zur Absorption des Leerwertes gesetzt. Vor Beginn der Messreihe wurde eine Standardkurve der Positivkontrolle (0,0625 bis 2 U/L) und des Wildtyps (0,625 bis 20 µg) durch eine Verdünnungsreihe durchgeführt.

Zur Optimierung des Assays wurde die Methode der Zellernte variiert. Dabei fanden die Methoden nach Guo *et al.* [48] (RIPA-Puffer ohne Zusätze) und nach Guan *et al.* [46] (1% Triton X-100 enthaltender Tris-Acetat-Puffer [200 mM, pH 6.0]) Anwendung.

Die Hypothese war dabei:

$$H_0: \frac{OD_{450}WT}{OD_{450}Leerwert} = \frac{OD_{450}P359L}{OD_{450}Leerwert}$$

$$H_1: \frac{OD_{450}WT}{OD_{450}Leerwert} \neq \frac{OD_{450}P359L}{OD_{450}Leerwert}$$

## 2.7 Statistische Auswertung

Die statische Auswertung erfolgte mithilfe der Programme jamovi® [130] und GraphPad Prism® 9. Für den Vergleich der Allelfrequenzen im *TGM6*-Screening (Abschnitt 2.3.5) wurden der  $\chi^2$ -Unabhängigkeitstest (erwartete Häufigkeit  $\geq 5$ , absolute Häufigkeit  $> 0$ ) und der exakte Fisher-Test verwendet. Für die Unterscheidung zweier Gruppen in der Stabilitätsanalyse (Abschnitt 2.62.) wurde der Welch-Test verwendet. Für die Analyse zweier Gruppen hinsichtlich der Transamidierungs-Aktivität wurde der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet (*two-tailed*). Statistisch signifikant waren p-Werte  $< 0,05$ , was einem maximalen  $\alpha$ -Fehler von 5% entspricht. Um den Zusammenhang zwischen Enzymaktivität bzw. Proteinmenge und Absorption zu ermitteln (Korrelation) wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Familie A. Parkinson-Syndrom

##### 3.1.1 Analyse des *Whole-Exome Sequencing*

Nach einer initialen qualitativen Auswertung durch das IIEG Lübeck ergaben sich in den drei Exomen zusammen 36.718 Varianten (35.091 SNVs, 1.627 Insertionen und Deletionen). Durch Anlegen der Filterkriterien resultierten acht Kandidatenvarianten, die allesamt *missense*-Varianten waren. Sechs der Varianten waren konform mit einem autosomal dominanten, zwei mit einem X-chromosomal dominanten Erbgang (s. Tab. 15). Zwei der Varianten waren in der gnomAD bisher nicht beschrieben (*DROSHA*, *GRK4*), die MAF aller

Gen	Erwartete Veränderung	MAF	1) Prädiktion		2) Assoziation zu PD				Priorisierungsgrad
			MetaLR	CADD	STRING	Medline	OMIM	Brain Atlas	
<b>Autosomal dominant</b>									
<i>AADAC</i>	c.1087G>A, p.V363M	$5 \cdot 10^{-5}$	0.258 (T)	23.6	0	0	$\frac{0 0 0}{0 0 0}$	∅0,2; 1,6; 0,1	B
<i>APC2</i>	c.1512G>C, p.E504D	$0,4 \cdot 10^{-5}$	0.422 (T)	17.23	0	0	$\frac{0 0 1}{0 0 0}$	∅18,7; 16,4; 15,0	B
<i>DROSHA</i>	c.2010A>C, p.E670D	0	0.083 (T)	22.8	1	4	$\frac{0 0 0}{0 0 0}$	∅19,5; 32,1; 13,6	B
<i>GRK4</i>	c.1516G>C, p.G506R	0	0.236 (T)	24.2	0	0	$\frac{0 0 0}{0 0 1}$	∅5,4; 5,1; 5,3	C
<i>RIC1</i>	c.2665A>G, p.K889E	$1 \cdot 10^{-5}$	0.063 (T)	18.3	1	0	$\frac{0 0 1}{0 0 0}$	∅8,1; 9,0; 9,1	B
<i>TGM6</i>	c.1076C>T, p.P359L	$12 \cdot 10^{-5}$	0.943 (D)	28.9	0	0	$\frac{0 1 0}{0 0 0}$	∅0; 0; 0	A
<b>X-chromosomal dominant</b>									
<i>ARHGEF6</i>	c.833G>A, p.S278N	$9 \cdot 10^{-5}$	0.074 (T)	20.3	0	0	$\frac{0 0 0}{0 0 0}$	∅13,6; 15,4; 20,7	B
<i>SYTL4</i>	c.86G>A, p.R29Q	$1 \cdot 10^{-5}$	0.308 (T)	22.5	0	0	$\frac{0 0 0}{0 0 1}$	∅7,3; 9,5; 9,8	B

**Tabelle 15. Priorisierung der Kandidatengene in Familie A.** Dargestellt sind die Kandidatengene mit der gefundenen Variante, alphabetisch sortiert nach dem zu ihnen passenden Erbgang. Zudem findet sich die MAF (*minor allele frequency*) in der gnomAD (v2.1.1) [66] und Prädiktionswerte von MetaLR [31] und CADD (v1.6) [69]. Der Grenzwert der Einteilung in tolerable (T) und krankheitsverursachende (*disease-causing*, D) liegt für MetaLR bei 0,5. Zur Priorisierung der Gene diente die Anzahl der Proteininteraktionen mit bekannten PD-verursachenden Genen (STRING), die Anzahl der Publikationen des Genes in Zusammenhang mit der PD (Medline), die Assoziation des Kandidatengens (oben) und der paralogen Gene (unten) zu den Phänotypen Parkinson-Syndrom | andere Bewegungsstörung | andere neurologische Erkrankungen (OMIM) und die durchschnittliche Expression im ZNS (∅), den Basalganglien und dem Mittelhirn, angegeben in NX (*normalized expression*). Daraus resultierend waren die Priorisierungsgrade A (hoch) bis C (niedrig). Priorisierende bzw. positive Einträge sind rot markiert.

Die erwarteten Veränderungen sind für das größte translatierte Transkript angegeben nach Transcript ID der Ensembl.org: *AADAC* (ENST00000232892.12), *APC2* (ENST00000535453.5), *DAAM2* (ENST00000274867.9), *DROSHA* (ENST00000511367.6), *GRK4* (ENST00000398052.9), *RIC1* (ENST00000414202.7), *TGM6* (ENST00000202625.7), *ARHGEF6* (ENST00000250617.7), *SYTL4* (ENST00000372989.5).

anderen lag unter 2 von 10.000 Allelen. Eine Variante (*TGM6*) wurde vom MetaLR-Modell als schädigend berechnet (0,926), zwei Varianten hatten REVEL-Werte über 0,5 (*GRK4*: 0,598, *TGM6*: 0,926, s. Anhang). Alle Varianten wiesen CADD-Werte über 15 auf ( $\emptyset$  22,6), der höchste Wert (28,9) trug die Variante in *TGM6*. Hinsichtlich der zehn verwendeten funktionellen Prädiktionsprogramme erzielten die Varianten in *TGM6* (10), *AADAC* (9) und *GRK4* (8) die höchste Anzahl an schädigenden Berechnungen (s. Anhang). Bis auf zwei Varianten (*APC2*, *SYTL4*) wurden alle Varianten mindestens von einem Programm als evolutionär konserviert erachtet.

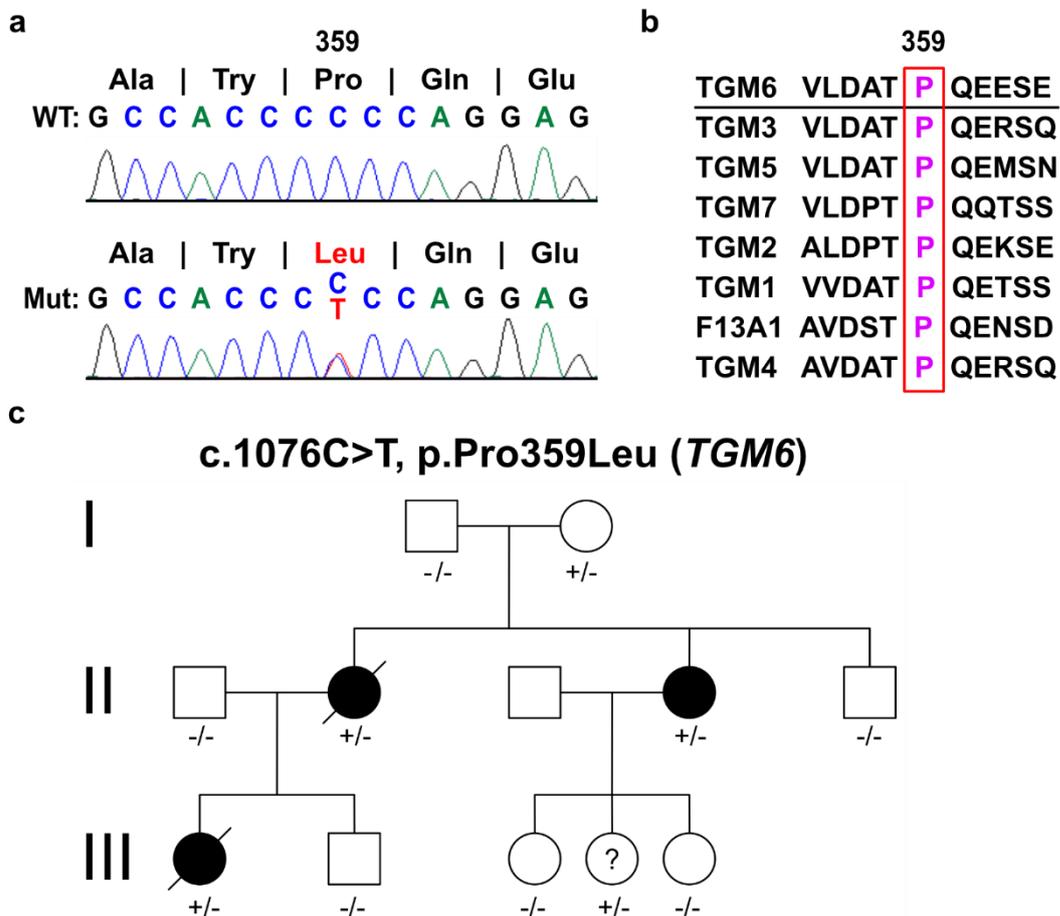
Zwei kodierte Proteine interagierten mit Proteinen, deren Gene als ursächlich für ein Parkinson-Syndrom gelten. Das Protein DROSHA interagiert mit PRKRA (Konfidenz = 0,943), RIC1 mit *c9orf72* (Konfidenz = 0,720). *PRKRA* und *c9orf72* gehören in die Gruppe der Gene, die Erkrankungen mit einem Parkinson-Syndrom als Begleitsymptom verursachen (s. Tab. 2). *DROSHA* war der einzige Suchbegriff, der mit einem Parkinson-Syndrom in Medline-gelisteten Veröffentlichungen zu Suchergebnissen führte (n = 4). Eine qualitative Recherche ergab, dass bisher keine genetischen Varianten mit einer PD assoziiert waren. Für drei Kandidatengene (*APC2*, *RIC1*, *TGM6*) sind Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu neurologischen Erkrankungen bekannt. *APC2* ist dabei mit einer kortikalen Dysplasie (AR), *RIC1* mit einem Catifa-Syndrom (führt u.a. zu einer zerebralen Atrophie, AR) und *TGM6* mit der spinocerebellären Ataxie 35 (SCA35, AD) assoziiert. Sieben der acht Kandidatengene werden gemäß *The Human Brain Atlas* zerebral exprimiert. Die Gene *AADAC*, *DROSHA* und *SYTL4* zeigen dabei eine regional erhöhte Expression in den Basalganglien, die Gene *ARHGEF6* und *SYTL4* eine erhöhte Expression im Mittelhirn.

Aus diesen Priorisierungsparametern wurden eine Variante (in *TGM6*) dem höchsten Priorisierungsgrad A zugeordnet, sechs dem Grad B (in *AADAC*, *APC2*, *ARHGEF6*, *DROSHA*, *RIC1*, *SYTL4*) und eine dem Grad C (in *GRK4*).

### 3.1.2 Segregationsanalyse

Die Varianten in *AADAC*, *ARHGEF6*, *DROSHA*, *GRK4*, *SYTL4*, *TGM6* wurden mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt und deren Segregation in der Familie überprüft. Die Variante c.1087G>A (*AADAC*) war heterozygot in I-1, II-2, II-4, III-1, III-2, III-3 und III-4. Die Variante c.2010A>C (*DROSHA*) fand sich heterozygot in I-1, II-2, II-4, III-1, III-4 und III-5. Die Variante c.1516G>C (*GRK4*) lag heterozygot in I-1, II-2, II-4, III-1, III-3 und III-4 vor. Die Variante

c.1076C>T (*TGM6*) war in I-2, II-2, II-4, III-1 und III-4 vorhanden (s. Abb. 7). Die Varianten c.833G>A (*ARHGEF6*) und c.86G>A (*SYTL4*) fanden sich hemizygot in I-1, heterozygot in II-2, II-4, III-1, III-3 und III-4 (*SYTL4*) bzw. III-5 (*ARHGEF6*).



**Abbildung 7. c.1076C>T-Variante in *TGM6*.** Das Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung (a) stellt die Nukleotidsequenz c.1069-1083 dar. Darüber finden sich die daraus translatierten AS 357 bis 361 im Dreiletter-Code. Oben ist dabei der Wildtyp (WT), unten die heterozygote c.1076C>T-Variante. Der Stammbaum der Familie (c) zeigt die Verteilung der Variante in der Familie an. Mutierte Allele werden mit einem +, Wildtyp-Allele mit einem - symbolisiert. Die *TGM6*-Proteinsequenz der AS 354 bis 364 wurde mit den korrespondierenden Sequenzabschnitten der paralogen Proteinen *TGM1-7* und *F13A1* verglichen (b). Die paralogen Gene sind absteigend nach dem Anteil der Übereinstimmung der Referenzsequenz mit der paralogen Sequenz geordnet. Dazu wurde der Genombrowser ensembl.org verwendet. In allen katalytisch aktiven paralogen Proteinen war der Prolinrest vorhanden.

### 3.1.3 Screening von *TGM6*-Mutationen in EOPD-Patienten

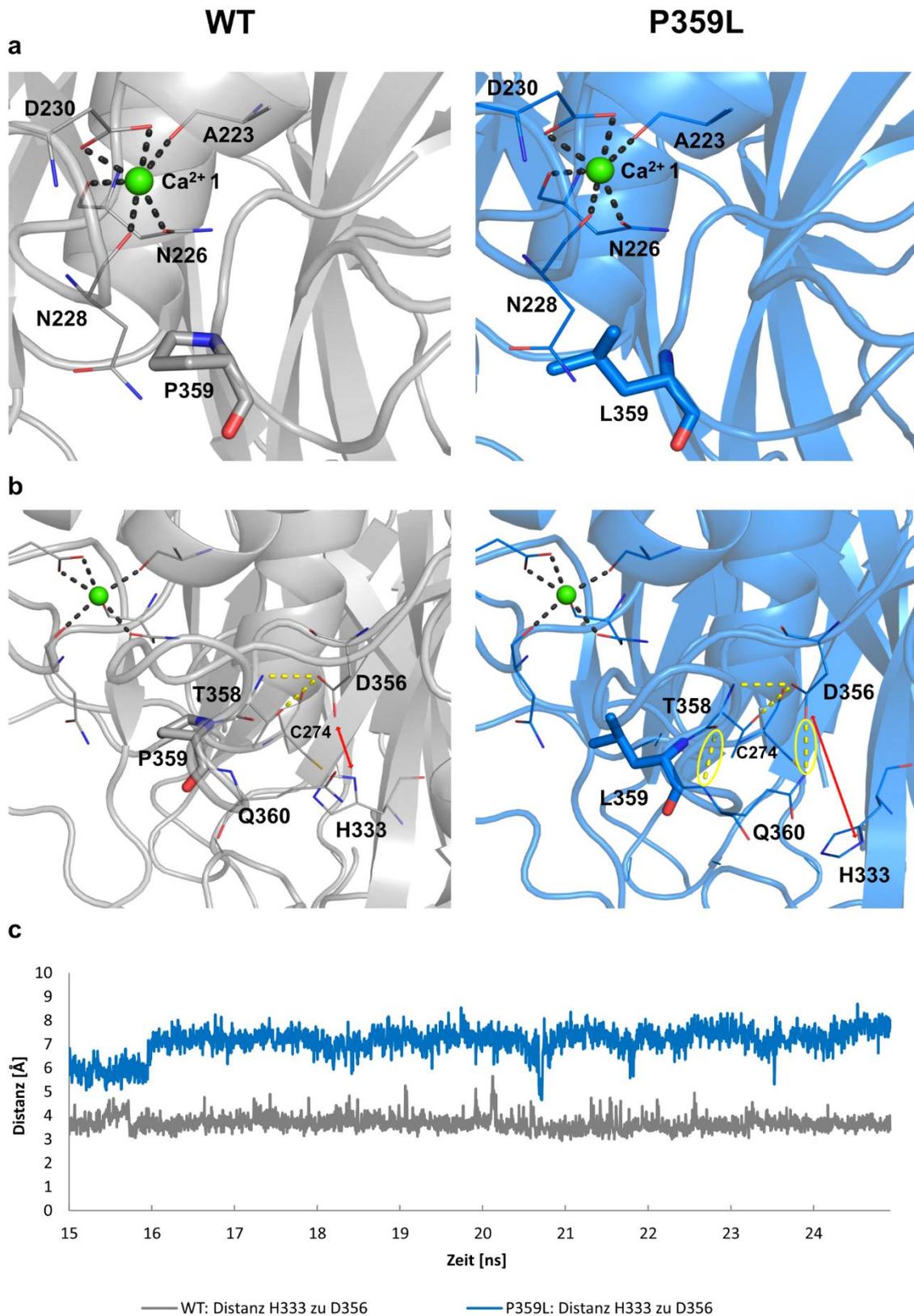
Es wurden alle 13 Exone des Gens *TGM6* in 50 Probanden mit ungeklärter EOPD nach Sanger sequenziert. Hierbei wurden acht exonische Varianten entdeckt, davon fünf synonyme und drei nicht synonyme Punktmutationen (s. Tab. 16). Keine der Varianten war signifikant häufiger in den Probanden vertreten als in der gnomAD. Zwei der Varianten erhielten CADD-Werte >15 (p.V391M, p.R448W), die Variante p.V391M wurde als einzige von MetaLR und REVEL als pathogen eingestuft (Werte: 0,544 bzw. 0,719).

Variante	MAF (gnomAD)	AF (EOPD)	p	CADD	MetaLR	REVEL
c.42G>A, p.S14S	0,7%	2%	0,15 <sup>1</sup>	0,1 (T)	-	-
c.172A>G, p.M58V	90,8%	90%	0,79 <sup>2</sup>	10,3 (T)	0,000 (T)	0,137 (T)
c.477C>T, p.S159S	1,7%	2%	0,69 <sup>1</sup>	8,2 (T)	-	-
c.789G>A, p.K263K	14,2%	12%	0,53 <sup>2</sup>	12,4 (T)	-	-
c.1171G>A, p.V391M	0,08%	1%	0,08 <sup>1</sup>	26,8 (D)	0,544 (D)	0,719 (D)
c.1342C>T, p.R448W	1,5%	3%	0,18 <sup>1</sup>	23,6 (D)	0,132 (T)	0,129 (T)
c.1452C>T, p.D484D	0,06%	1%	0,06 <sup>1</sup>	0,02 (T)	-	-
c.1476G>A, p.K492K	22,8%	25%	0,60 <sup>2</sup>	7,7 (T)	-	-

**Tabelle 16. TGM6-Varianten in EOPD-Patienten.** In 50 EOPD-Patienten wurden acht Varianten im Gen *TGM6* gefunden. Für jede Variante wurde die MAF der gnomAD mit der Allelfrequenz in der Patientenkohorte verglichen und die Signifikanz mittels <sup>1</sup>exaktem Fisher-Test oder <sup>2</sup> $\chi^2$ -Test nach Pearson berechnet. Zur Berechnung des funktionellen Einflusses dienten die Prädiktionsprogramme CADD, MetaLR und REVEL. Die Grenzwerte zur Unterscheidung von tolerablen (T) und schädigenden (*disease-causing*, D, rot markiert) Varianten lagen bei 15 (CADD) bzw. 0,5 (MetaLR, REVEL).

### 3.1.4 Molekulardynamik-Simulation

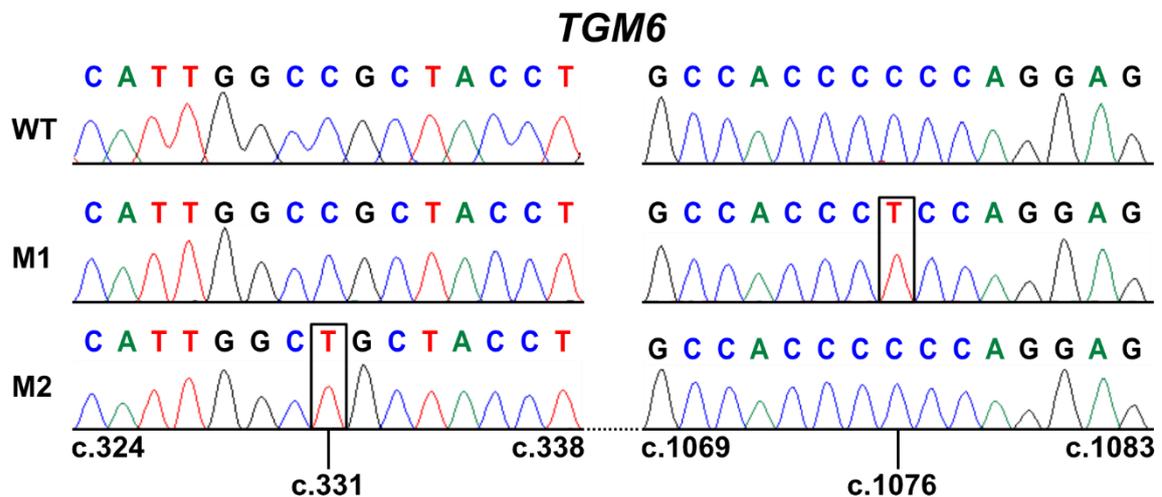
Zur Untersuchung des Einflusses der p.P359L-Mutation auf die molekulare Struktur von TGM6 wurde durch das IIEG eine Molekulardynamik-Simulation (MD-Simulation) durchgeführt. Es zeigte sich, dass sich die AS 359 in der Nähe der ersten Calciumbindungsstelle [131] und dem katalytischen Zentrum befindet (s. Abb. 8). Es konnte kein Unterschied in der Raumstruktur der Calcium-komplexierenden Aminosäuren A223, N226, N228 oder D230 zwischen Wildtyp und P359L-Mutante festgestellt werden (s. Abb. 8). Im Bereich der katalytischen Triade (C274, H333, D356) [131] zeigte sich eine räumliche Änderung durch veränderte Interaktionen der benachbarten AS Q360. Durch die höhere räumliche Flexibilität des Leucin-Restes, zeigte die AS Q360 im P359L-mutierten Protein stabilere Wasserstoffbrückenbindungen zu den AS T356 (WT: 15%, P359L: 54%) und D356 (WT: 7%, P359L: 80%). Hierdurch kam es zu einer Positionsänderung der AS Q360 und der räumlich benachbarten AS H333. Die Entfernung von H333 zu D356 änderte sich von 3-5 Å (WT) auf 5-8 Å (P359L) (s. Abb. 8).



**Abbildung 8. MD-Simulation der Transglutaminase 6 im aktiven Zustand.** Im Wildtyp-Protein (WT, grau) und in der P359L-Mutante (blau) befindet sich die AS 359 in der Nähe der ersten Calciumbindungsstelle (a) und dem katalytischen Zentrum (b). In der P359L-Mutante interagiert Q360 verstärkt über Wasserstoffbrückenbindungen (gelb-gestrichelte Linien) mit den AS T358 und D356. Die Distanz zwischen H333 und D356 vergrößert sich (roter Pfeil, b) auf 7 Ångström (Å) (c).

### 3.1.5 Klonierung

Mithilfe der modifizierten *sense*- und *antisense*-Primer wurden die Varianten c.1076C>T (p.P359L) und c.331C>T (p.R111C) in die Plasmid-kodierte *TGM6*-Wildtyp-DNA eingebracht. Nach einer gelelektrophoretischen Größenüberprüfung erfolgte die Gelextraktion des Plasmids und eine anschließende Sequenzierung nach Sanger. Hierbei zeigte sich die Plasmid- und *TGM6*-DNA, bis auf die jeweils eingebrachte Variante (s. Abb. 9), identisch zur Ausgangs- bzw. Wildtypsequenz. Nachdem die Plasmide in *E. coli* amplifiziert und gewonnen worden waren, erfolgte ein erneuter Sequenzabgleich mithilfe einer Sanger-Sequenzierung. Hierbei zeigten sich für den Wildtyp und die Mutanten M1 und M2 jeweils 2 von 3 Kolonien identisch mit der Ausgangsfrequenz.

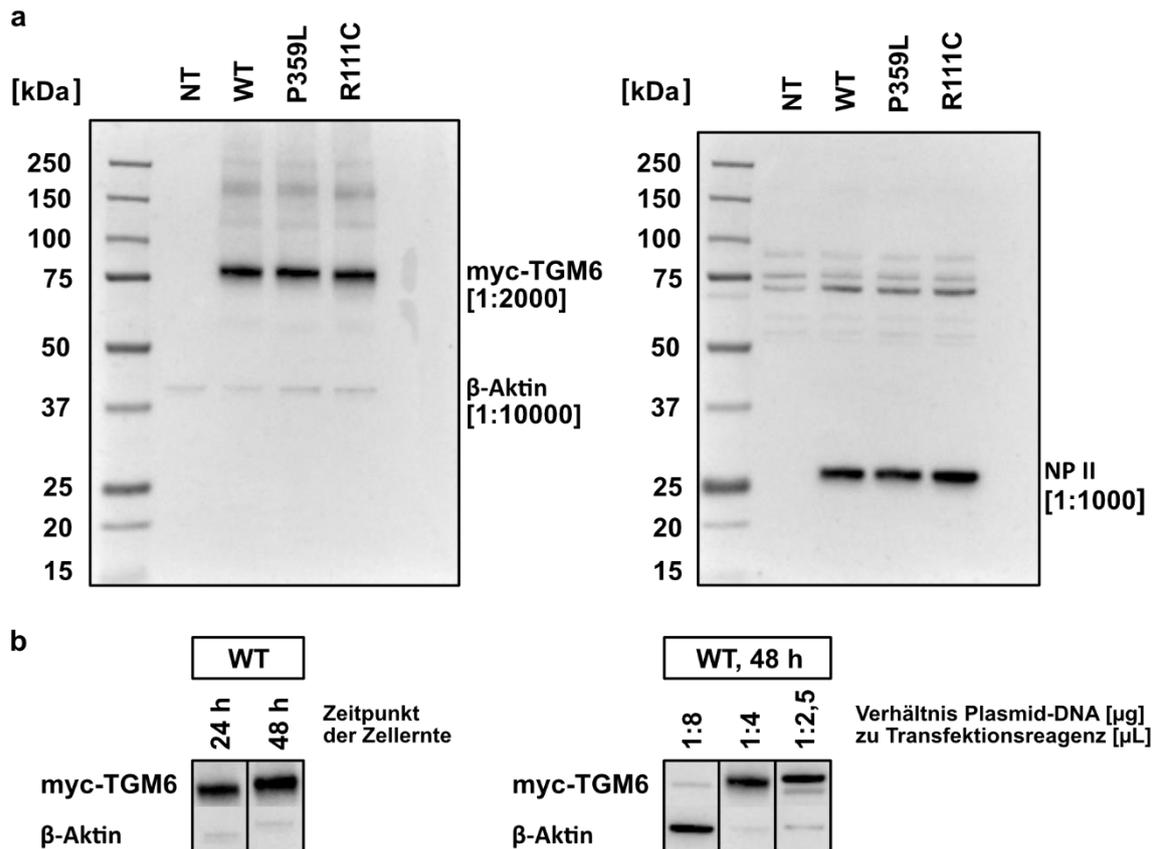


**Abbildung 9. Elektropherogramm nach Mutagenese.** Dargestellt sind die Basen der 324 bis 338 sowie 1069 bis 1083 im Plasmid-kodierten *TGM6*. Im Wildtyp (WT) zeigte sich hierbei die Referenzsequenz. In die Mutante M1 wurde die Mutation c.1076C>T eingebracht, in die Mutante M2 die Mutation c.331C>T (schwarzes Rechteck).

Abkürzungen: A: Adenosin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thyminidin.

### 3.1.6 Transfektion

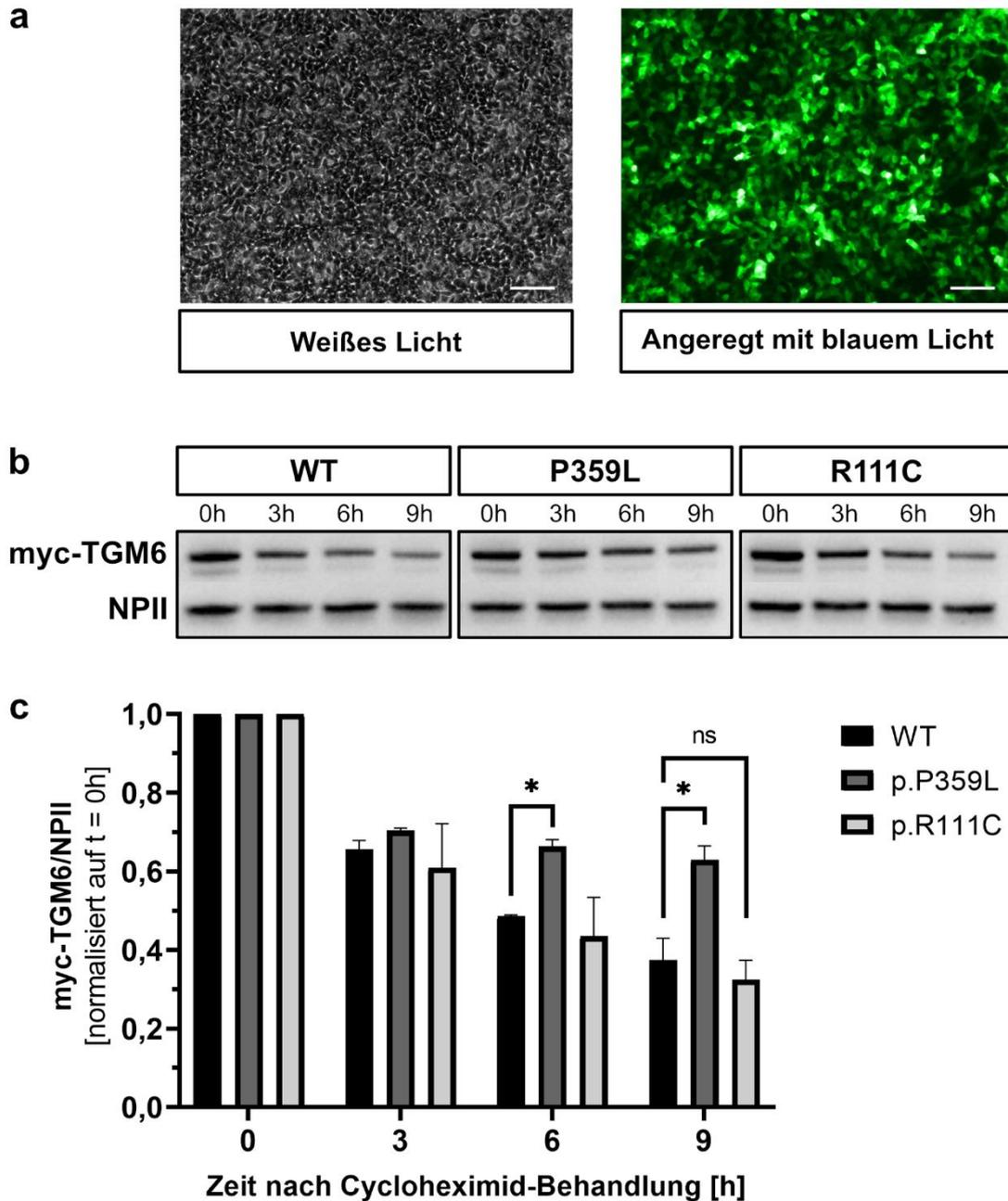
Um die Expression des Plasmids in HEK293-Zellen zu maximieren, erfolgte eine Optimierung der Transfektionsbedingungen. Dabei wurde das Verhältnis der myc-Tag-Bande (TGM6) zur  $\beta$ -Aktin-Bande analysiert. Die idealen Transfektionsbedingungen ergaben sich bei einem Plasmid-Transfektionsreagenz-Verhältnis von 1 : 4 (2  $\mu$ g : 8  $\mu$ L) und einem Erntezeitpunkt nach 48 Stunden (s. Abb. 10).



**Abbildung 10. Western Blots als Nachweis der TGM6-Expression.** Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot nach Transfektion von HEK293 mit dem *TGM6*-Wildtyp-Plasmid (WT) oder mit den zu den Mutanten P359L und R111C führenden Plasmiden. Als Negativkontrolle dienen nicht transfizierte Zellen (NT). Die Zellernte erfolgte nach 48 h, da sich hier eine im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin höhere Expression als nach 24 h zeigte (**b**, links). Es wurde ein Verhältnis von 1:4 Plasmid-DNA (2  $\mu$ g) zu Fugene HD Transfektionsreagenz (8  $\mu$ L) gewählt, da auch hier die relative Plasmidexpression erhöht war (**b**, rechts). Die Banden lagen bei etwa 80 kDa (TGM6), 40 kDa ( $\beta$ -Aktin) und 30 kDa (Neomycin-Phosphotransferase II, NP II) (**a**). Dies entspricht jeweils der bekannten molekularen Masse. Zudem ließen sich bei Verwendung der anti-myc-Antikörper unscharfe Banden, insbesondere bei 150-200 kDa, darstellen, was TGM6-Dimeren entsprechen könnte (**a**, links). Bei Verwendung des anti-NP II-Antikörpers fanden sich unspezifische Banden im Bereich von 75 kDa (**a**, rechts).

### 3.1.7 Stabilität von p.P359L TGM6

Zur Bestimmung des Transfektionserfolges wurden HEK293-Zellen mit Grünfluoreszierendem Protein (GFP) transfiziert und nach 48 h lichtmikroskopisch analysiert (Abb. 11a). Die Konfluenz der Zellen lag bei etwa 100% (linkes Bild). Durch Anregung des GFPs in den transfizierten Zellen mit blauem Licht wurde durch Messung des emittierten



**Abbildung 11. Stabilitätsanalyse.** HEK293-Zellen wurden mit dem pmaxGFP-Vektor transfiziert und nach 48 h im Weißlichtmikroskop (links) und im Fluoreszenzmikroskop unter Anregung mit blauem Licht betrachtet (a, Maßstab 50  $\mu$ m). HEK293-Zellen wurden mit *TGM6*-WT und den Varianten P359L und R111C transfiziert, die Proteinexpression durch Cycloheximid blockiert und die Signalintensität der myc-TGM6- und Neomycin-Phosphotransferase II-Bande (NPII) im Western Blot (b) nach 0, 3, 6 und 9 h bestimmt. Die Banden wurden graphisch nebeneinandergestellt. Das Verhältnis, normalisiert zum Zeitpunkt t = 0 h, zeigt die relative Stabilität der drei TGM6-Proteine an.

Lichts die Transfektionseffizienz abgeschätzt. Der Anteil nicht-schwarzer Flächen lag bei  $(1 - \frac{271.197}{1.443.520})$  Pixel) 81,2% und entspricht ungefähr der Transfektionseffizienz.

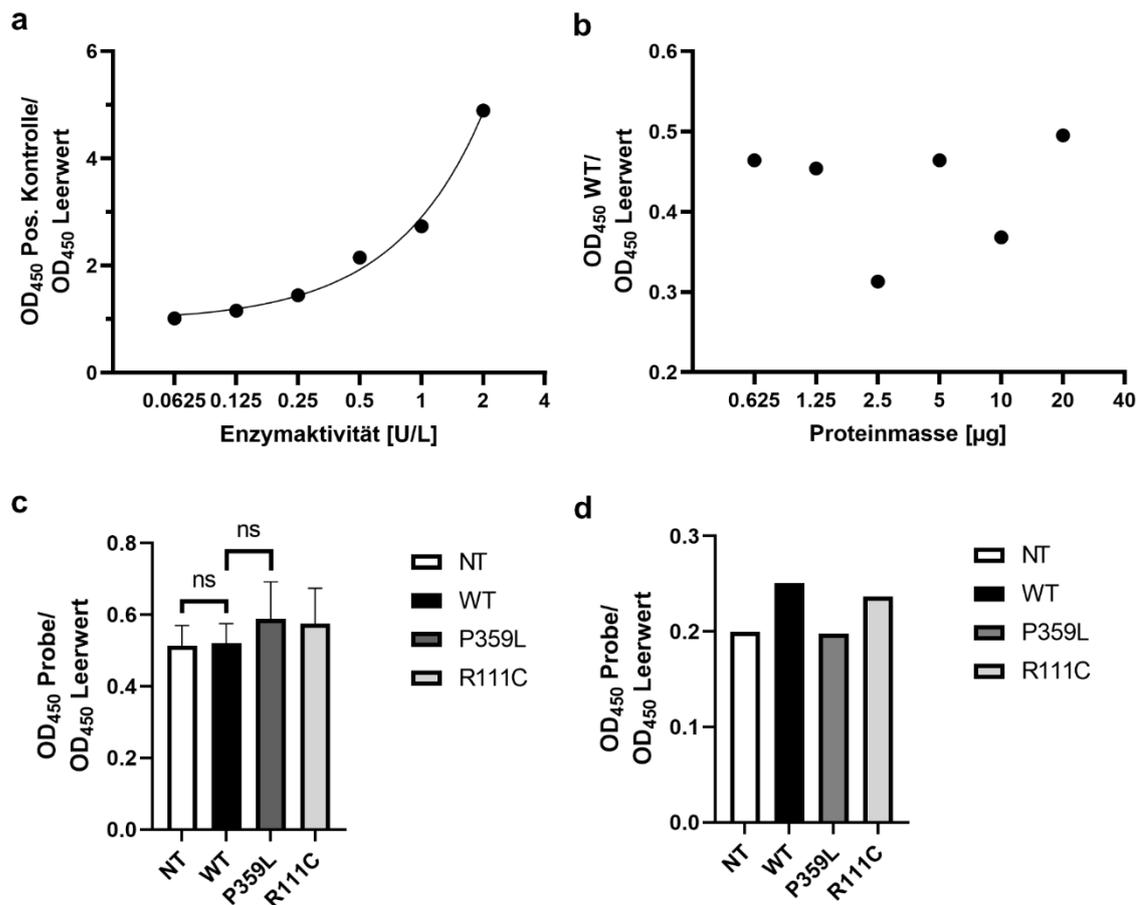
Zur Messung der Stabilität der TGM6-Proteinvarianten wurde die Proteinexpression mittels Cycloheximid inhibiert und das Verhältnis der Signalintensitäten der myc-TGM6-Bande zur Neomycin-Phosphotransferase II-Bande (NP-II, co-transkribiert durch pcDNA-Vektor) über die Zeit bestimmt. Es zeigten sich im Verlauf für alle Varianten eine reduzierte relative TGM6-Signalintensität. Nach 9h reduzierte sich das Verhältnis auf durchschnittlich 37,4% (WT), 62,9% (P359L) und 32,5% (R111C). Die relative Signalintensität der P359L-Variante war dabei nach 6 und 9 Stunden signifikant höher als die des Wildtyps ( $p = 0,041$  bzw.  $p = 0,045$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der R111C-Variante und dem Wildtyp konnte nicht festgestellt werden ( $p = 0,449$ ).

### **3.1.8 Einfluss der P359L-Variante auf die Enzymaktivität**

Zur Überprüfung des Einflusses der P359L-Variante auf die Enzymaktivität, wurde mittels eines Transglutaminase Assays die Transamidierungsaktivität, gemessen an der Lichtabsorption bei 450 nm ( $OD_{450}$ : *optic density* bei 450 nm), bestimmt.

Zunächst wurde der Einfluss zwischen theoretischer Enzymaktivität und  $OD_{450}$  mittels einer Verdünnungsreihe der Positivkontrolle (aufgereinigte Transglutaminase vom Hausmeerschweinchen) überprüft. Hierbei zeigte sich eine lineare positive Korrelation ( $R^2 = 0,99$ , s. Abb. 12a) zwischen Enzymaktivität und  $OD_{450}$ . Im Anschluss wurde der Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration bzw. -masse der Wildtyp-TGM6-transfizierten Zellen und der  $OD_{450}$  überprüft. Hier fand sich keine statistisch signifikante Korrelation ( $R^2 = 0,06$ ).

Trotz dieser fehlenden Beziehung zwischen Proteinkonzentration und Aktivität im Assay, sollten mögliche Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen den Proteinvarianten überprüft werden. Hierfür wurden unterschiedliche Puffer zur Lysierung der Zellen und damit der Proteingewinnung verwendet:



**Abbildung 12. Transglutaminase-Assay.** Unter Verwendung einer aufgereinigten Transglutaminase des Hausmeerschweinchens wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt (a) und die Absorption bei 450 nm gemessen (OD: optische Dichte). Die Korrelation ist linear ( $R^2 = 0,99$ ). Aufgrund der logarithmischen ( $2^x$ ) Darstellungsweise der Enzymaktivität handelt es sich um eine exponentielle Kurve. Zwischen der Proteinmasse der Wildtyp-transfizierten Zellen (WT) und der Absorption (b) gibt es keine Korrelation ( $R^2 = 0,06$ ). Die Transamidierungsaktivität von nicht transfizierten Zellen (NT) und transfizierten Zellen (TGM6 im WT, P359L- und R111C-Variante) wurde relativ zu der des Leerwerts gemessen. Für die Zellyse wurden unterschiedliche Puffer verwendet: RIPA mit Zusätzen ( $n = 3$  für Transamidierungszeit = 20 Min. (c);  $n = 1$  für Transamidierungszeit = 30 Min. (nicht dargestellt), RIPA ohne Zusätze ( $n = 1$ , nicht dargestellt) und mit Tris-Acetat-Puffer und 1% Triton X-100 ( $n = 1$ , Transamidierungszeit 30 Min. (d)). Es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen.

### (1) Lysepuffer: RIPA mit Zusätzen, Transamidierungszeit = 20 Minuten ( $n = 3$ )

Die durchschnittliche Absorption im Verhältnis zum Leerwert lag bei 0,513 (NT, SD: 0,057), 0,520 (WT, SD: 0,055), 0,588 (P359L, SD: 0,103) und 0,575 (R111C, SD: 0,099) (s. Abb. 12c). Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den nicht-transfizierten Zellen (NT) und den Wildtyp-transfizierten Zellen (WT) ( $p = 0,880$ ), zwischen dem WT und der P359L-Variante ( $p = 0,369$ ) sowie zwischen dem WT und der R111C-Variante ( $p = 0,446$ ).

### **(2) Lysepuffer: RIPA mit Zusätzen, Transamidierungszeit = 30 Minuten (n=1)**

Die Absorption im Verhältnis zum Leerwert lag bei 0,456 (NT), 0,380 (WT), 0,423 (P359L) und 0,352 (R111C).

### **(3) Lysepuffer: Tris-Acetat + 1% Triton X-100, Transamidierungszeit = 30 Minuten (n =1)**

Die Absorption im Verhältnis zum Leerwert lag bei 0,200 (NT), 0,251 (WT), 0,198 (P359L) und 0,237 (R111C) (s. Abb. 12d).

Da die Enzymaktivität calciumabhängig ist, erfolgte eine Erprobung mit 0,1 und 0,3 M Calcium in der Assaylösung. Die zum Leerwert normierten OD<sub>450</sub> lagen bei 0,246 (ohne Calciumzusatz), 0,233 (0,1 M) und 0,252 (0,3 M).

## **3.2 Familie B. Ataxie**

Bei den vier Familienmitgliedern wurden insgesamt 111.815 Varianten durch das WES detektiert, davon 88.885 SNVs und 22.930 Insertionen und Deletionen. Durch das Anlegen der Filterkriterien resultierte eine Kandidatenvariante für einen autosomal rezessiven Erbgang (*TGM2*, c.227G>A, p.R76H), jedoch keine für autosomal oder X-chromosomal dominante Erbgänge mit einer *de novo*-Mutation in den Patienten (II-1, II-2). Für eine gemischt heterozygote Vererbung (*compound heterozygous*) fand sich ein Gen (*CENPL*) mit je einem Allel von Vater und Mutter (c.242A>T, p.Y81F; c.872G>C, p.C291S), die die Filterkriterien erfüllten. Bei der Suche nach Varianten in bekannten Ataxie-verursachenden Genen unter Annahme der Filterkriterien, jedoch ohne Berücksichtigung des Erbgangs, fanden sich zwei Varianten (*ACO2*, c.1943G>A, p.R648H; *SPTBN2*, c. 6277G>A, p.E2093K). Beide Varianten fanden sich heterozygot in der Mutter (I-2) und den beiden Kindern (II-1 und II-2).

Die Variante c. 242A>T (*CENPL*) war in der gnomAD bisher nicht beschrieben, die Allelfrequenzen aller anderen Varianten lagen zwischen  $0,01 \times 10^{-3}$  und  $5 \times 10^{-3}$ . Die Varianten c.227G>A (*TGM2*) und c.872G>C (*CENPL*) waren in der ostasiatischen Population gehäuft mit einer MAF von jeweils  $21 \cdot 10^{-3}$ .

Die berechneten CADD-Werte lagen zwischen 14,9 (*TGM2*) und 32,0 (*ACO2*). Keine der Varianten wurden durch MetaLR als pathogen eingestuft (s. Tab. 17 im Anhang). c.1943G>A (*ACO2*) war die einzige von REVEL als schädigend eingestufte Variante (s. Tab. 17) und wurde durch 11 von 13 Prädiktionsprogrammen als schädigend eingestuft (s. Tab. 17). Die

Variante c.227G>A (*TGM2*) wurde von zwei, die Varianten c.872G>C (*CENPL*) und c.6277G>A (*SPTBN2*) von jeweils drei Prädiktionsprogrammen als schädigend beurteilt. Die Variante c.242A>T (*CENPL*) wurde durch acht Programme als schädigend eingestuft.

Für die Gene *ACO2* und *SPTBN2* wurde keine Assoziation zu einer Ataxie-Erkrankung überprüft, da diese Gene bereits als Ataxie-verursachend beschrieben sind. Für *TGM2* zeigte sich ein positives Priorisierungskriterium durch das paraloge Gen *TGM6*, das mit einer SCA35 assoziiert ist. Das Gen *CENPL* zeigte eine regional erhöhte Proteinexpression im Kleinhirn und erfüllte damit auch ein Priorisierungskriterium der Kategorie 2. Daher wurden alle Varianten dem Priorisierungsgrad B zugeordnet.

Vor dem Hintergrund der Fragestellung einer bigenetischen Erkrankung mit *ACO2* und *SPTBN2* als eine der genetischen Ursachen, konnte zu 88 paternal heterozygot vererbten Varianten, die die Filterkriterien erfüllten, bzw. deren Genen keine Interaktion durch die STRING-Datenbank gefunden werden (s. Abb. 14 im Anhang).

Gen	Erwartete Veränderung	MAF	1) Prädiktion		2) Assoziation zu Ataxie				Priorisierungsgrad
			MetaLR	CADD	STRING	Medline	OMIM	Brain Atlas	
<b>Autosomal rezessiv</b>									
<i>TGM2</i>	c.227G>A; p.R76H	$5 \cdot 10^{-3}$ $21 \cdot 10^{-3}$	0,283 (T)	14,9	0	2	$\frac{0 0 0}{1 0 0}$	∅5,6; 4,3	B
<b>Gemischt heterozygot</b>									
<i>CENPL</i>	c.242A>T; p.Y81F	0 0	0,194 (T)	22,5	0	0	$\frac{0 0 0}{- - -}$	∅3,2; 5,0	B
	c.872G>C; p.C291S	$2,1 \cdot 10^{-3}$ $21 \cdot 10^{-3}$	0,050 (T)	20,3					B
<b>Bekannte Ataxie-verursachenden Gene</b>									
<i>ACO2</i>	c.1943G>A; p.R648H	$0,01 \cdot 10^{-3}$ 0	0,388 (T)	32,0	-	-	$\frac{-}{-}$	-	B
<i>SPTBN2</i>	c.6277G>A; p.E2093K	$0,01 \cdot 10^{-3}$ 0	0,145 (T)	22,1	-	-	$\frac{-}{-}$	-	B

**Tabelle 17. Priorisierung der Kandidatenvarianten in Familie B.** Dargestellt sind die Kandidatengene mit den gefundenen Varianten, sortiert nach dem zu ihnen passenden Erbgang. Zudem findet sich die MAF (*minor allele frequency*) in der gnomAD in der gesamten (oben) und ostasiatischen Bevölkerung (unten) (v2.1.1) [66] sowie Prädiktionswerte von MetaLR [31] und CADD (v1.6) [69]. Der Grenzwert der Einteilung in tolerable (T) und krankheitsverursachende (*disease-causing*, D) liegt für MetaLR bei 0,5. Zur Priorisierung der Gene diente die Anzahl der Proteininteraktionen mit bekannten PD-verursachenden Genen (STRING), die Anzahl der Publikationen des Genes in Zusammenhang mit der PD (Medline), die Assoziation des Kandidatengens (oben) und der paralogen Gene (unten) zu den Phänotypen Ataxie-Erkrankung | andere Bewegungsstörung | andere neurologische Erkrankungen (OMIM) und die durchschnittliche Expression im ZNS (∅) und dem Kleinhirn, angegeben in NX (*normalized expression*). Daraus ergab sich für alle Varianten der Priorisierungsgrad B (mittlere Priorität). Priorisierende bzw. positive Einträge sind rot markiert.

Die erwarteten Veränderungen sind auf die Transkripte mit folgenden *Transcript IDs* nach Ensembl.org bezogen: *TGM2* (ENST00000361475.7), *CENPL* (ENST00000356198.6), *ACO2* (ENST00000216254.9), *SPTBN2* (ENST00000533211.6).

## 4 Diskussion

### 4.1 Familie A. Parkinson-Syndrom

#### 4.1.1 c.1076C>T-Variante in *TGM6* führt zu Parkinson-Syndrom

In der in dieser Arbeit untersuchten Familie serbischer Herkunft fanden sich vier Familienmitglieder mit Symptomen einer Bewegungsstörung. Die Index-Patientin III-1 zeigte ein Parkinson-Syndrom mit atypischen Begleitsymptomen mit einem Erkrankungsbeginn im Alter von 17 Jahren. Nach den MDS-Kriterien für eine PD [109], wies die Patientin keine absoluten Ausschlusskriterien auf. Aufgrund einer frühen bulbären Dysfunktion (3.), wiederholten Stürzen (6.), einer fokalen Dystonie (7.) und pathologisch gesteigerten Muskeleigenreflexen (9.), wies sie vier *red flag*-Symptome auf [109]. Aufgrund dessen konnte nach diesen Kriterien keine PD diagnostiziert werden. Das frühe Erkrankungsalter von 17 Jahren war zudem ein Ausschlusskriterium für die diagnostischen Kriterien einer MSA [42] und einer PSP [55]. Der Phänotyp erfüllte hingegen die Kriterien für eine mögliche CBD mit dem Syndrom einer progressiven supranukleären Blickparese (*progressive supranuclear palsy syndrome, PSPS*) und Symptomen eines kortikobasalen Syndroms (*corticobasal syndrome, CBS*) [6]. Von den klinischen Kollegen in Belgrad wurde die Diagnose eines PSP-Parkinsonismus (PSP-P) gestellt. Eine pathologische Diagnose konnte aufgrund einer fehlenden Obduktion nicht gestellt werden.

Die Mutter (II-2) erfüllte die Kriterien für eine klinisch etablierte PD [109] mit frühem Erkrankungsbeginn (EOPD) im Alter von 25 Jahren. Die in den Videoaufzeichnungen vermutete okulomotorische Störung wurde von den behandelnden Neurologen nicht beschrieben und daher nicht in der klinischen Diagnosestellung berücksichtigt.

Der Phänotyp der Tante (II-4) konnte als eine klinisch wahrscheinliche PD eingeordnet werden [109], ebenfalls mit frühem Erkrankungsbeginn (EOPD) bei einem Beginn der Symptome im Alter von 35 Jahren. Die fluktuierenden kognitiven Symptome, das symmetrische Parkinson-Syndrom sowie die REM-Schlafstörung erinnern an eine LBD. Da jedoch keine Demenz beschrieben worden ist, konnte diese nicht diagnostiziert werden [87].

Ob bei der Cousine ebenfalls ein ähnlicher Phänotyp vorlag, konnte aufgrund der fehlenden Anamnese und Untersuchung nicht eingeschätzt werden. Insbesondere für die Diagnose einer Dystonie ist die Erhebung des Muskeltonus durch eine körperliche Untersuchung unerlässlich. Sie wurde daher als unsicher betroffen eingestuft.

Bei etwa 5% aller PD-Patienten lässt sich eine monogene Ursache finden [77]. Bei positiver Familienanamnese und familiärer Häufung ist der Anteil deutlich höher [122]. Nachdem bei den Patientinnen die häufigsten monogenen Ursachen ausgeschlossen werden konnten, wurde eine Exom-Sequenzierung zur Erforschung neuer oder seltener monogener Ursachen durchgeführt. Da sich Patientinnen in zwei aufeinander folgenden Generationen fanden (II und III), wurde ein dominanter Erbgang angenommen. Acht Varianten erfüllten die Kriterien, die Variante c. 1076C>T (p.P359L) in *TGM6* wurde als einzige dem höchsten Priorisierungsgrad A zugeordnet und war infolgedessen die Kandidatenvariante. Als einzige Variante wurde diese von allen untersuchten Prädiktionsprogrammen als schädlich eingestuft. Insbesondere die hohen Prädiktionswerte von CADD, REVEL, MetaLR und FATHMM sollten hier beachtet werden, da sie die höchsten positiv prädiktiven Werte aufweisen [31, 60]. Die Spezifität des REVEL-Werts der Variante von 0,926 liegt bei 99,4% [60]. Je höher die Prädiktionswerte ausfallen, desto höher die Vorhersagegenauigkeit [31, 60, 126].

Die Variante segregierte dabei in der Familie mit dem Phänotyp. Jedoch wurde auch die Großmutter der Index-Patientin (I-2) als Allelträgerin identifiziert. Obgleich sie neurologisch nicht untersucht worden ist, zeigten sich familienanamnestisch keine Hinweise für eine Bewegungsstörung bei ihr. Eine reduzierte Penetranz der Variante stellt eine mögliche Ursache für die fehlende Symptomatik dar. Da sie zudem nicht untersucht worden ist, bestünde außerdem die Möglichkeit, dass sie eine leichte und nicht erwähnte Symptomatik aufwies.

Nach den ACMG-Leitlinien zur Interpretation von Sequenzvarianten [114] erfüllt die Variante die pathogenen Kriterien PP2, PP3 und PP4 sowie das benigne Kriterium BS2. Sie kann damit weder als (wahrscheinlich) pathogen oder benigne eingestuft werden und ist ohne weitere Studienergebnisse eine Variante unklarer Signifikanz (VUS). Zur Eruiierung der Pathogenität erfolgten daher die funktionellen Studien, also die Untersuchung der Enzymstabilität und -aktivität.

#### **4.1.2 Transglutaminasen in neurodegenerativen Erkrankungen**

*TGM6* ist eines von neun für Transglutaminasen kodierenden Genen des Menschen, von denen acht enzymatisch aktiv sind (TG1-7, FXIIIA) [45]. In murinen Gehirnen wird es in

zahlreichen Arealen exprimiert [131]. Transglutaminasen sind calciumabhängige Enzyme, die Transamidierungen, Desaminierungen und Veresterungen katalysieren [81]. Die Transamidierung stellt dabei die am besten untersuchte Reaktion dar. Sie bezeichnet die Bindung eines Carboxamids mit einem primären Amin unter Abspaltung von Ammoniak [81]. Als Substrate können dabei die Aminosäuren Glutamin ( $\gamma$ -Carboxamid) und Lysin ( $\epsilon$ -Amin) dienen, die zu Isodipeptidbindungen ( $\gamma$ -Glutamyl- $\epsilon$ -Lysin-Bindung) verknüpft werden. Diese Bindung ist dabei spezifisch für Transglutaminasen, die ihrem Substrat Glutamin ihren Namen verdanken. Durch eine intra- oder intermolekulare Quervernetzung führen sie so zu posttranslationalen Modifikationen von Proteinen. Ein bekanntes Beispiel stellt die Fibrinquervernetzung durch Faktor XIIIa dar [81]. Weitere physiologische Funktionen sind die Herstellung und Erhalt der Barrierefunktion der Haut (TG1, TG2) sowie die Mineralisation im Rahmen der Ossifikation (TG2) [81]. Mehr als über die physiologischen Funktionen, ist über die pathologischen Funktionen von Transglutaminasen bekannt. Ihre Bedeutung wurde in zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen gezeigt. Dazu zählen Poly-Q-Erkrankungen (Huntington-Krankheit, SCA1), die Parkinson- und Alzheimer-Krankheit sowie die PSP [5, 27, 32, 47, 62, 63, 95, 142, 147, 148]. Bei diesen Erkrankungen lassen sich Ablagerungen von Proteinen finden, deren Quervernetzung durch Transglutaminasen katalysiert werden. Im Kontext der PD konnte gezeigt werden, dass die TG2  $\alpha$ -Synuclein quervernetzen kann und damit zur Aggregation und zur Entstehung von Lewy-Körperchen beiträgt [5, 27, 63, 95]. Interessanterweise ähnelten die Phänotypen der betroffenen Patienten in dieser Arbeit unterschiedlichen Synucleopathien (PD, LBD, MSA) und Tauopathien (PSP, CBD), sodass Proteinablagerungen als Pathomechanismus vermutet werden können. Aufgrund der Bedeutung von Transglutaminasen für die Quervernetzung und Ablagerung der Proteine  $\alpha$ -Synuclein und Tau, könnte die P359L-Mutation in der TG6 die Schnittstelle zwischen den Erkrankungen sein und die heterogenen Phänotypen erklären. Darum wurde von mir ein *gain-of-function*-Mechanismus vermutet, aus dem eine gesteigerte Ablagerung von Proteinen resultiert. Dabei könnte dieser Mechanismus auf einer gesteigerten Transamidierungsaktivität, Enzym-Aktivierbarkeit, Stabilität oder Substratspezifität für die Proteine Tau und  $\alpha$ -Synuclein beruhen (s. Abb. 13). Toxische *gain-of-function*-Mutationen werden zudem i.d.R. dominant vererbt, wie beispielsweise Mutationen in SNCA, LRRK2 oder VPS35 [14, 34, 90], weshalb der Mechanismus zum vorliegenden Erbgang passen würde.

Darüber hinaus ist auch die TG6 bereits im Kontext von neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben worden. Anti-TG6-Antikörper waren in 73% der Patienten mit einer Gluten-Ataxie nachzuweisen [50] und waren auch in Patienten mit einer primär oder sekundär progredienten Multiplen Sklerose (PPMS, SPMS) erhöht [30]. Zudem konnte die TG6 bei Gehirnautopsien betroffener Gluten-Ataxie-Patienten in Ablagerungen des Hirnstamms und Kleinhirns nachgewiesen werden [49]. Für eine hereditäre Ataxie (SCA35) wurden bislang 16 Varianten in *TGM6* als krankheitsverursachend beschrieben [35, 48, 78, 79, 83, 134, 140, 144], obgleich manche dieser Varianten aufgrund einer hohen MAF in der ostasiatischen Bevölkerung fraglich pathogen zu sein scheinen [39]. Obgleich der Pathomechanismus bisher nicht vollständig aufgedeckt werden konnte, ist für neun der Varianten eine reduzierte Transamidierungsaktivität nachgewiesen worden [46, 48, 83, 134] und implizierte einen *loss-of-function*-Mechanismus. Ob die P359L-Variante aufgrund eines *gain-of-function*-Mechanismus statt einer SCA35 eine PD begünstigt, sollte u.a. mit der Bestimmung der Transamidierungsaktivität getestet werden.

#### **4.1.3 Einfluss der P359L-Variante auf die Transamidierungsaktivität**

In einer MD-Simulation konnte zunächst gezeigt werden, dass die AS 359 in unmittelbarer Umgebung der katalytischen Triade liegt. Durch den Aminosäureaustausch P359L verändert sich dabei die Distanz der an der Triade beteiligten AS H333 und D356. Eine veränderte Enzymaktivität oder Substratspezifität ist daher wahrscheinlich. Durch Nutzung eines erprobten Transglutaminase Assays [46, 48] konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und P359L-Variante gemessen werden. Die Aussagekraft des Versuchs ist jedoch anzuzweifeln, da zwar die Positivkontrolle, nicht aber das Zelllysate der Wildtyp-transfizierten Zellen eine konzentrationsabhängige Steigerung der absoluten Transamidierungsaktivität zeigten. Zudem lag die  $OD_{450}$  der Proben stets unter denen des Leerwerts. Die Verwendung anderer Puffer und Leerwerte änderte dieses Ergebnis nicht. Dies spricht zwar für ein grundsätzliches Funktionieren des Kits, lässt aber eine inhibitorische Komponente im Zelllysate vermuten, die auch durch den Einsatz von Calcium zur Aktivierung des Enzyms nicht aufgehoben werden konnte. Dabei könnten z.B. die Substrate (Poly-Lysin, Biotin-TVQQEL-Oligopeptid) gebunden oder bedeckt worden sein,

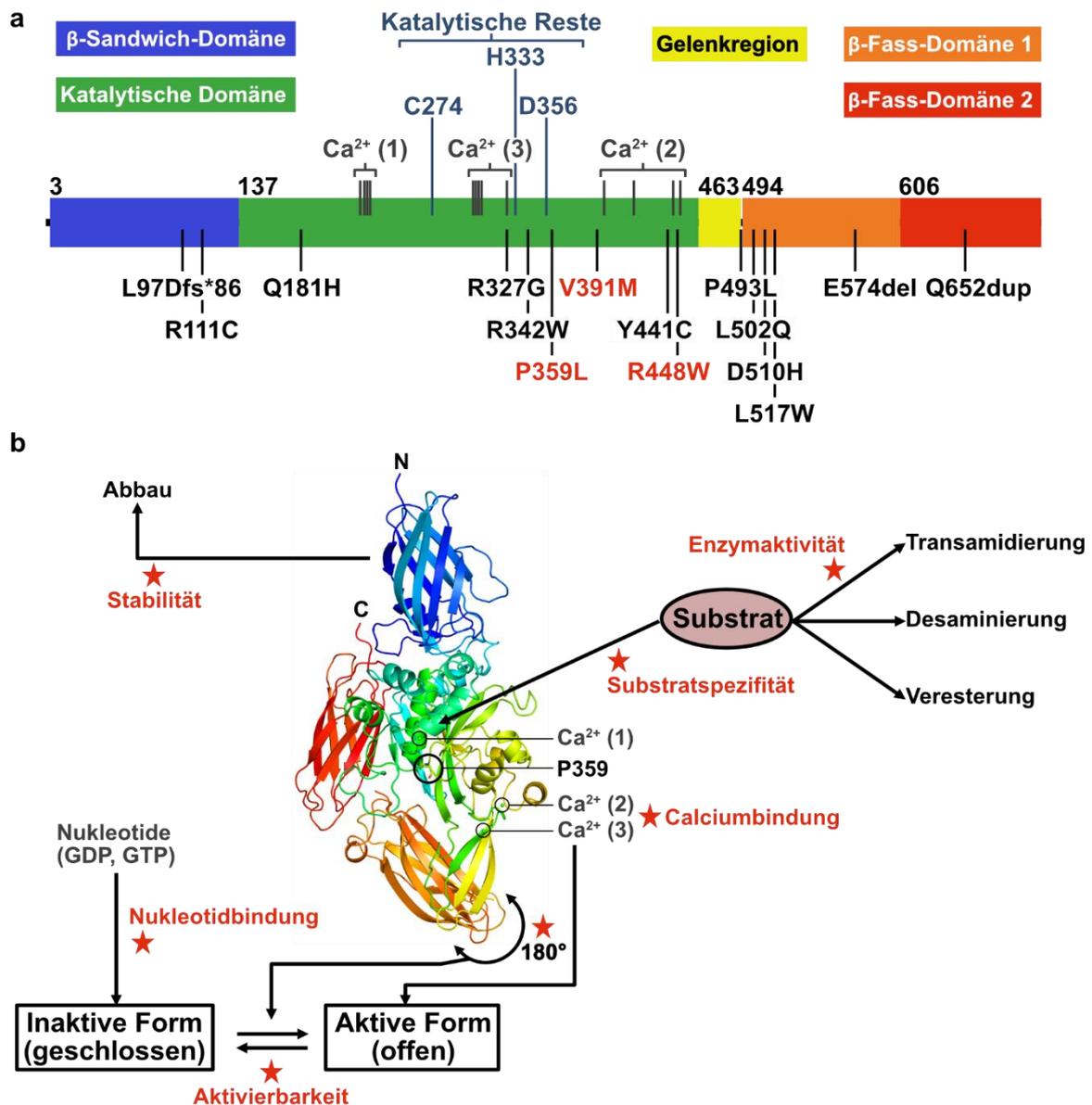
um damit für die TG6 nicht mehr zugänglich zu sein. Zudem könnte die TG6 nicht ausreichend aktiviert oder inhibiert worden sein.

Zeitgleich zu dieser Arbeit entdeckten Chen *et al.* 12 Varianten in PD-Patienten [24]. Für einige Varianten und die von uns zuvor auf einem internationalen Kongress beschriebene Variante P359L bestimmten sie die Transamidierungsaktivität. Dabei fanden sie eine im Vergleich zum Wildtyp erniedrigte Aktivität. Sie verwendeten dabei den gleichen Transglutaminase-Assay wie in dieser Arbeit. Die Proteine wurden hingegen durch einen mehrmaligen Einfrier-Auftau-Prozess extrahiert und mittels Dithiothreitol (DTT) stabilisiert. Die Transamidierungsaktivität von Transglutaminasen kann durch Oxidation freier Sulfhydrylgruppen zu intramolekularen Disulfidbrücken partiell oder komplett inhibiert werden, wie für die TG2 gezeigt werden konnte [12, 25, 28]. DTT kann als Reduktionsmittel vor dieser Oxidation schützen, Disulfidbrücken zu freien Sulfhydrylgruppen reduzieren und die Enzymaktivität wieder herstellen [25, 28]. DTT ist darum auch in meinen Versuchen dem Assay zugesetzt, ob dieses jedoch bereits bei der Zelllyse verwendet werden sollte, ist für zukünftige Studien zu erwägen.

Chen *et al.* konnten zudem erhöhte  $\alpha$ -Synuclein-Spiegel in P359L-exprimierenden Zellen im Vergleich zu WT-exprimierenden Zellen feststellen. Dies könnte die Bedeutung von  $\alpha$ -Synuclein in der Pathogenese der hier untersuchten Familie unterstreichen.

#### **4.1.4 Struktur und Aktivierung der Transglutaminase 6**

Beginnend vom N-Terminus setzt sich die TG6 aus einer  $\beta$ -Sandwich-Domäne und einem katalytischen Kern mit der katalytischen Triade (C274-H333-D356) zusammen, der durch eine Gelenkregion von zwei  $\beta$ -Fass-Domänen getrennt wird [131] (Abb. 13). Für die strukturell ähnliche TG2 konnte gezeigt werden, dass das Enzym in zwei Konformationszuständen vorliegen kann: geschlossen und offen [106]. Hohe Calciumkonzentrationen begünstigen dabei die offene und aktive Form, Purinnukleotide (z.B. GDP) und Disulfidbrücken hingegen die geschlossene und inaktive Konformation [12, 37, 106, 131]. Die  $\beta$ -Fass-Domänen verdecken im geschlossenen Zustand den Zugang zum aktiven Zentrum [62]. Bei Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung der Gelenkregion mit Rotation derselben und der anhängenden  $\beta$ -Fass-Domänen, die dann das aktive Zentrum freilegen [62]. Dieser Zustand kann dabei durch Bindung von Calcium an



**Abbildung 13. Proteinstruktur der Transglutaminase 6 und mögliche Pathomechanismen.** Die Transglutaminase setzt sich aus vier Domänen zusammen: eine N-terminale  $\beta$ -Sandwich-Domäne (Aminosäurereste (AS) 3-136), eine katalytische Domäne (AS 137-462), die durch eine bewegliche Gelenkregion (AS 463-492) von zwei  $\beta$ -Fass-Domänen getrennt ist. Die katalytische Triade wie auch alle drei Calciumbindungsstellen befinden sich in der katalytischen Domäne (a). Zu sehen sind 15 Varianten, die mit dem Auftreten einer SCA35 [67–69, 71, 131] oder einem Parkinson-Syndrom [70] assoziiert sind, inklusive der hier gefundenen Varianten P359L, V391M und R448W (a, rot). Die meisten der Varianten befinden sich dabei am C-terminalen Ende der katalytischen Domäne und am N-terminalen Ende der ersten  $\beta$ -Fass-Domäne. Hier findet sich auch die Gelenkregion, die durch eine 180° Rotation den molekularen Schalter zwischen der inaktiven, geschlossenen Form und aktiven, offenen Form bildet. Eine Bindung von Nucleotiden, wie GDP und GTP, begünstigt die inaktive Form, eine Calciumbindung begünstigt die aktive Form. Katalysierte Reaktion der aktiven Form (hier kristallographisch dargestellt, b) sind die Transamidierung, Desaminierung und Veresterung.

Mögliche molekulare Pathomechanismen, wie die P359L-Variante zu einem Parkinson-Syndrom führt (durch einen roten Stern symbolisiert), sind eine erhöhte Enzymstabilität, eine veränderte Enzymaktivität, eine Veränderung des katalysierten Reaktionstyps, eine veränderte Substratspezifität (z.B. für  $\alpha$ -Synuclein oder Protein Tau), eine veränderte Calcium- oder Nucleotidbindungsaffinität oder eine veränderte Aktivierbarkeit, beispielsweise durch sterische Änderungen der Gelenkregion.

der zweiten und dritten Calciumbindungsstelle begünstigt werden [62, 131]. Die durch die P359L-Mutation bedingte SCA35 [35, 48, 83, 140, 144] Positionsänderung der AS H333, die nah der dritten Calciumbindungsstelle liegt [131], kann daher auch die Calciumbindung dort beeinflussen. Dies konnte in der MD-Simulation jedoch nicht überprüft werden, da diese von der aktiven Form des Enzyms durchgeführt worden ist. Eine Veränderung der ersten Calciumbindungsstelle, an der Calcium auch im inaktiven Zustand gebunden ist, zeigte sich in der MD-Simulation nicht.

Begg *et al.* konnten zeigen, dass bestimmte Mutationen in TG2 die Aktivierung inhibieren konnten, indem sie die geschlossene Konformation stabilisierten [12]. Ob die Variante P359L im Sinne eines *gain-of-function* hingegen die offene Konformation begünstigt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Jeitner *et al.* postulierten eine cis-trans-Isomerisierung von Peptidbindungen als molekularen Schalter, der zur Konformationsänderung der Gelenkregion führt [62]. Alle bisher kristallographisch charakterisierten Transglutaminasen zeigten dabei drei Peptidbindungen in cis-Konformation [12]. Eine dieser cis-Peptidbindungen befindet sich in der TG2 zwischen den AS G372 und P373 [12], welche bei der TG6 den AS G370 und P371 entspricht. Aufgrund der energetisch ungünstigen Bindung muss diese durch Wasserstoffbrückenbindung und hydrophobe Wechselwirkungen benachbarter AS stabilisiert werden. Sie liegt zudem in der Nähe der Calciumbindungsstellen 2 und 3 [62], die durch Bindung von Calcium zur Aktivierung des Enzyms beitragen [131]. Die P359L-Mutation kann durch ihre in der MD-Simulation berechnete Konformationsänderung in der unmittelbaren Umgebung zu einer Destabilisierung dieser cis-Peptidbindung führen oder die Calciumaffinität der Bindungsstellen beeinflussen. Zukünftige Studien sollten daher nicht nur die Aktivität, sondern auch ein verändertes Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Deaktivierung des Enzyms betrachten.

#### **4.1.5 P359L-Mutation erhöht die Stabilität der Transglutaminase 6**

Passend zu einem toxischen *gain-of-function*-Mechanismus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die P359L-TG6-Variante *in vitro* stabiler als das Wildtyp-Protein war und in erhöhten zellulären Transglutaminasespiegeln resultierte. Erstens könnte dies zu einer absolut erhöhten, trotz relativ erniedrigten [24], Transamidierungsaktivität führen und so

die Quervernetzung von Proteinen begünstigen und zu Ablagerung, z.B. in Form Lewy-Körperchen, führen. Zweitens könnten die erhöhten P359L-TG6-Spiegel ein Resultat einer erschöpften Reaktion auf fehlgefaltete Proteine (*unfolded protein response*, UPR) gewesen sein, wie für die Variante R111C bereits beschrieben worden ist [24]. Durch diesen sogenannten Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress) werden zellerhaltende Stoffwechselwege induziert [97]. Das dauerhaften Übersteigen der UPR-Kapazität führt zum Zelltod [97, 134] und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen [97]. Die R111C-Variante führte in der von mir durchgeführten Stabilitätsanalyse jedoch nicht zu einer erhöhten Stabilität.

#### **4.1.6 Screening in EOPD-Patienten deckt weitere TGM6-Varianten auf**

Beim Screening nach weiteren TGM6-Varianten in 50 EOPD-Patienten konnten acht Varianten identifiziert werden. Keine der Varianten in der EOPD-Gruppe war gegenüber der gnomAD als Kontrollpopulation statistisch signifikant überrepräsentiert. Aufgrund der kleinen Patientenkohorte ist die Power jedoch ohnehin eher gering, sodass für solche Fragestellungen größere Patientenkohorten analysiert werden müssen.

Zwei der acht Varianten waren *missense*-Varianten mit einer Allelfrequenz von 1% (V391M) bzw. 3% (R448W) in der EOPD-Gruppe. Beide Varianten wurden durch Tripathy *et al.* [134] mit einer autosomal dominanten Ataxie assoziiert. Die V391M-Variante wurde zudem in einem EOPD- und einem PD-Patienten gefunden [24].

Dennoch sollte Vorsicht vor falsch positiven Befunden geboten sein. Mit einer MAF von 1,5% in der gnomAD ist die Variante P448W als monogene Ursache für einen autosomal dominanten Erbgang zu häufig, als Risikofaktor für eine PD jedoch denkbar. Bisherige genomweite Assoziationsstudien (GWAS) konnten für diesen Locus bisher aber noch keinen Zusammenhang herstellen [93, 94]. Darüber hinaus wurde die Variante nur von wenigen (5/12) Prädiktionsprogrammen als pathogen eingestuft. Insbesondere die MetaLR, REVEL und FATHMM stuften sie als neutral ein.

Die V391M-Variante zeigte hingegen in der gnomAD nur eine MAF von 0,0008, obgleich mit einer regional erhöhten MAF in der ostasiatischen Bevölkerung (0,09), aus der auch die Kohorte von Chen *et al.* [24] stammte. Ein Großteil der Prädiktionsprogramme (10/12) stuft die Variante zudem als pathogen ein. Sie liegt wie die P359L-Variante im aktiven Zentrum und damit in der Nähe der Calciumbindungsstellen und der katalytischen Reste.

Zudem ist sie ebenso evolutionär hochkonserviert wie die P359L-Variante (GERP, SiPhy, phyloP). Den funktionellen Einfluss unterstrichen Chen *et al.* durch Nachweis einer reduzierten Enzymaktivität [24]. Obgleich die Variante durch die ACMG-Standards als wahrscheinlich pathogen eingestuft werden kann [114], sollte Vorsicht bei der Einstufung gelten, da sie auch in einigen Gesunden bereits beschrieben worden ist [39].

#### 4.1.7 Ausblick

Zusammenfassend wurden hier viele Ideen für mögliche Pathomechanismen präsentiert, in welcher Weise die P359L-Variante bei den Patientinnen zu einem Parkinson-Syndrom beitragen konnte. Obgleich diese Arbeit insbesondere die genetische Plausibilität der Variante herausgestellt hat, können zukünftige Studien die funktionellen zellulären Mechanismen besser aufklären und zum Verständnis des Pathomechanismus beitragen. Da die Überexpression des TG6-WT für neuronale Zellen toxisch ist [134], sollten zukünftige Studien bei endogener Expression stattfinden. Um eine Interaktion mit  $\alpha$ -Synuclein zu beobachten, könnten SH-SY5Y zur Expression genutzt werden [24] oder von einer Patientin stammende Stammzellen, die zu dopaminergen Neuronen induziert werden.

Bei physiologischeren Bedingungen sollte erneut die Transamidierungsaktivität bestimmt werden (1). Darüber hinaus sollten auch Unterschiede in der Aktivierung zwischen WT und P359L-Variante, z.B. bei unterschiedlichen Calcium- oder GDP-Konzentrationen überprüft werden (2). Pinkas *et al.* beschrieben interessanterweise ein verändertes Reaktionsverhalten bei Mutationen der AS T360 in der TG2 (analog zur AS T358 in TG6) [106]. Anstatt von Transamidierungen katalysierte das Enzym durch die T360A- und T360W-Varianten bevorzugt Desaminierungen. Daher sollten auch andere Reaktionen in ihrer Aktivität überprüft werden (3). Um zu überprüfen, ob  $\alpha$ -Synuclein oder Protein Tau überhaupt Substrate der TG6 sind und ob es Unterschiede in der Substrataffinität zwischen WT und P359L gibt, könnte eine Co-Immunoprecipitation durchgeführt werden (4). Proteinaggregate könnten ER-Stress und eine UPR auslösen [97]. Bei der R111C-Variante war die UPR gesteigert [134]. Die Stabilität der P359L-Variante zeigte sich erhöht und könnte ebenfalls eine UPR auslösen. Die Expression von Schlüssel-Proteinen der UPR könnte mittels quantitativer PCR (qPCR) bestimmt werden (5). Transglutaminasen können gleichermaßen pro- wie auch antiapoptotisch wirken [46, 134]. Der Einfluss der P359L-

Variante auf die Apoptose könnte z.B. durch das Messen proapoptotischer Proteine (z.B. Caspasen) mittels Western Blotting gemessen werden [46] (6).

Tripathy *et al.* konnten zudem eine erhöhte Co-Lokalisierung der R111C-Variante mit im ER lokalisierten Chaperon-Protein Calnexin feststellen [134]. Die intrazelluläre Lokalisation veränderte sich von einer prädominanten intranukleären Verteilung (WT) zu einer perinukleären Verteilung (R111C). Immunhistochemisch könnte die Lokalisierung der P359L-Variante überprüft und mit der Lokalisierung wichtiger ER-Proteine verbunden werden (7).

Weitere interessante Fragestellungen sind, ob Monoaminylierungen in der PD eine pathomechanistische Rolle spielen. Es handelt sich dabei um eine Verknüpfung biogener Amine, wie Serotonin, Dopamin oder Noradrenalin, mit Proteinen, die durch Transglutaminasen katalysiert werden [58]. Hierdurch können zelluläre Signalwege, die Zusammenlagerung des Zytoskeletts und die Expression von Proteinen beeinflusst werden [74]. Inwiefern dies in der Pathogenese der PD eine Rolle spielt, müssen weitere Untersuchungen klären.

Aufgrund dieser Entdeckungen empfehle ich zukünftig Patienten mit einer ungeklärten und vermutet familiären Parkinson-Krankheit auf *TGM6*-Mutationen zu untersuchen.

## **4.2 Familie B. Ataxie**

### **4.2.1 Phänotyp und genetische Untersuchung**

In einer Familie koreanischer Herkunft fanden sich zwei Geschwister mit einer infantilen zerebellären Ataxie. Die Erkrankung begann im 2. (II-1) bzw. 4. Lebensjahr (II-2). Nachdem erworbene und hereditäre Ataxieursachen ausgeschlossen worden sind, erfolgte eine Exom-Sequenzierung, mit der Hypothese einer zugrundeliegenden monogenen Ursache. Aufgrund der ansonsten für neurologische Erkrankungen unauffällige Familienanamnese wurde ein rezessiver Erbgang oder ein dominanter Erbgang mit neu entstandener (*de novo*) Mutation angenommen.

Für einen autosomal rezessiven Erbgang erfüllte nur die Variante c.227G>A (p.R76H) in *TGM2* die Filterkriterien. Die meisten Prädiktionswerte schätzen sie zudem als tolerabel ein, darunter auch Programme mit hoher Sensitivität (PolyPhen-2, Mutation-Taster2). Die Variante zeigte ein regional gehäuftes Auftreten ( $MAF_{EA} = 2,1\%$ ) in der ostasiatischen

Kontrollpopulation (gnomAD). Nimmt man nicht die Obergrenze für die Definition einer seltenen Erkrankung zugrunde [8], sondern die Prävalenz hereditärer Ataxie-Syndrome von 3 : 100.000 [119], so ist die Allelfrequenz größer als für diese Erkrankung zu erwarten. Daraus resultiert die Einstufung als wahrscheinlich benigne Variante nach den ACMG-Standards [114].

Da sich für einen dominanten Erbgang keine *de novo*-Mutationen finden ließen, die die Filterkriterien erfüllten, wurde nach Varianten, die zu einem heterozygot rezessiven Erbgang passen, gesucht. Hierbei fanden sich zwei Varianten im Gen *CENPL*, die die Filterkriterien erfüllten und von denen eine maternal, die andere paternal vererbt worden ist. Die Variante c.242A>T (p.Y81F) war nicht in der Kontrollpopulation vorhanden und wurde auch von den meisten Prädiktionsprogrammen als funktionell beeinträchtigend eingestuft. Die Prädiktionswerte von REVEL, MetaLR und FATHMM, schätzten sie jedoch als tolerabel ein. Bei der zweiten Variante (c.872G>C, p.C291S) handelte es sich um eine in der ost-asiatischen Vergleichspopulation gehäuft auftretende Variante ( $MAF_{EA} = 2,1\%$ ), die von den meisten Prädiktionsprogrammen als tolerabel eingestuft wurde. Analog zu der Variante in *TGM2* (s. oben) gilt sie daher ebenfalls als wahrscheinlich benigne Variante, wodurch sich die Möglichkeit eines gemischt heterozygoten Erbgangs erübrigt.

Es sind bisher über 100 monogene Ursachen einer Ataxie beschrieben worden [15]. Alle bekannten Ataxiegene wurden daher auf Varianten überprüft, die zwar die Filterkriterien erfüllten, jedoch heterozygot in beiden Geschwistern und einem der beiden Elternteile vorlagen. Dies impliziert eine reduzierte Penetranz in der Parentalgeneration oder einen komplexeren Erbgang, wie eine bigenetische Ursache. In den Genen *ACO2* und *SPTBN2* wurde jeweils eine Variante entdeckt, beide wurden maternal vererbt.

#### **4.2.2 Varianten in Ataxie-verursachenden Genen – *ACO2* und *SPTBN2***

Etwa 20 Fälle von homozygoten und gemischt heterozygoten Mutationen im Gen *ACO2* sind bisher als Ursache einer infantilen zerebellär-retinalen Degeneration beschrieben worden [133]. Dabei zeigten viele Patienten ataktische Symptome und eine zerebelläre Atrophie [17, 38, 84, 88, 127, 133]. Weitere Symptome waren eine spastische Paraplegie, eine Entwicklungsverzögerung und eine Optikusatrophie [17, 38, 84, 88, 127, 133]. Bei fast alle Patienten zeigten sich erste Symptome bereits im ersten Lebensjahr. Auch bei den hier

beschriebenen Patienten kam es zu einer infantilen Ataxie, wenn auch erst im 2. und 4. Lebensjahr.

In dieser Arbeit wurde eine seltene Variante (c.1943G>A, p.R648H) detektiert, die hohe schädigende Werte in vielen Prädiktionsprogrammen erzielte, u.a. einen REVEL-Wert, der als pathogen eingestuft wurde. Zudem war die Variante in der Kontrollpopulation selten. Interessanterweise wurden viele Patienten auch mit gemischt heterozygoten *ACO2*-Varianten beschrieben [38, 84, 88, 133]. In den Ergebnissen des WES ließ sich jedoch in den hier beschriebenen Patienten keine zweite Variante identifizieren. Dennoch könnte eine gemischt heterozygote Vererbung die Ursache in diesen Patienten sein. Eine zweite, paternal vererbte, Variante könnte mittels des WES, aufgrund einer schlechten Qualität in Genabschnitten von *ACO2*, nicht erfasst worden sein. Eine Sequenzierung des gesamten Gens nach Sanger könnte durchgeführt werden, um nach einer weiteren Variante zu suchen. Auch könnten intronische Abschnitte oder regulatorische Elemente des *ACO2*-Gens Mutationen tragen und beispielweise die Expression des zweiten Allels reduzieren. Auch eine dominante Ausprägung des c.1943G>A-Allels wäre denkbar, wenn bei der Mutter eine reduzierte Penetranz vorliegen würde. Zuletzt käme auch eine bigenetische Ursache in Betracht, wenn sich eine zweite Mutation in einem anderen Gen, z.B. im gleichen Stoffwechselweg – d.h. im Citratzyklus [127], finden ließe. Zu den Genen der heterozygot paternal vererbten Varianten ließ sich jedoch keine Proteininteraktion ermitteln (s. Abb. 14 im Anhang).

Ähnlich lässt sich auch für die Variante c.6277G>A (p.E2093K) in *SPTBN2* argumentieren, bei der es sich ebenfalls um eine seltene Variante handelte, die maternal heterozygot vererbt worden ist. Mutationen im Gen *SPTBN2* können in unterschiedlichen Erbgängen zu einer Ataxie führen [96]. Sowohl heterozygote (SCA5 [111]), homozygote (SCAR14 [146]), als auch gemischt heterozygote Varianten [96] sind bisher beschrieben worden. Der Phänotyp der bisher beschriebenen Patienten entspricht einem zerebellären Syndrom mit zerebellärer Atrophie [96]. Insbesondere Patienten mit homozygoten oder gemischt heterozygoten Mutationen zeigten beginnende Beschwerden im Kindesalter, häufig auch im ersten Lebensjahr [96, 146]. Die beschriebenen Phänotypen ähneln daher den in der koreanischen Familie beschriebenen. Obgleich die Variante eher als tolerabel von den meisten Prädiktionsprogrammen eingestuft wurde, sollte eine Sequenzierung des

gesamten Gens nach Sanger durchgeführt werden, um eine etwaige zweite Mutation zu entdecken. Die oben beschriebenen Mechanismen der reduzierten Penetranz und bigenetischen Ursache gelten auch hier.

Aufgrund des Fehlens einer zweiten Mutation ist es zuletzt nicht möglich zu beurteilen, ob eine der beiden Varianten ursächlich für den Phänotyp beider Geschwister ist. Die Variante in *ACO2* ist zwar aufgrund der höheren errechneten Pathogenität zu bevorzugen, weitere genetische Untersuchungen sind aber notwendig, um den genauen genetischen Erkrankungs- und Vererbungsmechanismus zu entschlüsseln.

#### **4.2.3 Fazit der genetischen Untersuchung**

Die eingangs aufgestellte Fragestellung eine monogene Ursache mittels Exom-Sequenzierung zu entdecken konnte in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Die zu einem Vererbungsgang passenden Varianten in *TGM2* und *CENPL* wurden als Polymorphismen eingestuft. Für die Varianten in den bereits als krankheitsverursachenden Genen *ACO2* und *SPTBN2* wurde keine passende Segregation gefunden.

Das fehlende Auffinden einer genetischen Ursache kann viel Ursachen haben:

- (1) Die fehlende Genauigkeit des WES: 5-10% des Exoms werden nicht oder schlecht abgedeckt, zudem weisen manche eine Regionen eine schlechte Abdeckung der Sequenz (*coverage*) auf [10]. Die genetische Krankheitsursache könnte in diesen Regionen liegen. Es kann außerdem zu Fehlern in der Sequenzierung oder Annotation kommen. Eine Variante kann daher nicht detektiert werden. Darüber hinaus ist das WES verbesserungswürdig hinsichtlich der Detektion von kurzen Insertionen, Deletionen und CNVs [10] und kann große strukturelle Varianten nicht darstellen. Dies könnte die Krankheitsursache sein, zumal viele Ataxieerkrankungen durch *repeat expansions* verursacht werden (s. Abschnitt 1.3.1)
- (2) Die Beschränkung auf die Exone spart regulatorische Elemente wie Introns, miRNAs oder Promotoren gänzlich aus. Die genetische Ursache könnte auch nicht-exonisch liegen. Eine Sequenzierung des Genoms würde diese Bereiche inkludieren.
- (3) Die hier angelegten Filterkriterien könnten zu wenig sensitiv sein. Die Variante könnte so falsch-negativ erschienen sein.

(4) Eine reduzierte Penetranz von Varianten erschwert die Ursachensuche, insbesondere in kleinen familiären Untersuchungen, da die Segregation und der vermutete Erbgang schwerer zu beurteilen sind.

(5) Sowohl durch ein WES als auch durch ein WGS wird nur die genomische DNA sequenziert. Auch Mutationen der mitochondrialen DNA können insbesondere zu neurologischen Erkrankungen führen.

(6) Die Ursache der Ataxie kann auch nicht genetisch bedingt, sondern z.B. durch Umwelteinflüsse erworben sein.

### **4.3 Filter- und Priorisierungsmethoden**

Zuletzt sollen noch einmal die Filter- und Priorisierungskriterien beleuchtet werden, die in dieser Doktorarbeit vom Standard abweichen und neu geschaffen worden sind.

Für die maximale MAF von Kandidatenvarianten werden häufig Grenzwerte von 1% für rezessive Erbgänge und 0,1% für dominante Erbgänge gewählt. Obgleich die Power für diese Werte hoch ist [10], sollte sich die MAF an die erwartete Prävalenz einer Erkrankung richten [114]. Für neue genetische Ursache ist jedoch genau diese Prävalenz unbekannt und allenfalls abzuschätzen. Vereinfachend wurde daher in dieser Arbeit die Definition einer seltenen Erkrankung als höchstzulässige Prävalenz angenommen, die mit 5 pro 10.000 sicherlich deutlich höher liegt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass in Familie B zwei benigne Varianten gefunden worden sind, die Filterkriterien erfüllten.

Für die Parkinson-Erkrankung sind gute epidemiologische Daten vorhanden: die Prävalenz liegt bei etwa 0,3% [76], 5-10% der Fälle liegen monogene Ursachen zugrunde [77]. Die Prävalenz genetischer PD-Fälle sollte damit bei etwa 1,5-3 pro 10.000 liegen, die unterschiedliche Erkrankungsdauer und Inzidenz sei hierbei ausgeblendet. Diese Zahlen sparen jedoch nicht gefundene Ursachen aus. Hinzu kommt die genetische Heterogenität der Ursachen. All dies erschwert die Abschätzung der Prävalenz einer noch nicht entdeckten genetischen Krankheitsursache.

Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit für autosomale und gonosomale Erbgänge leicht veränderte MAFs verwendet.

Große Studien mit mehreren Familien und großen und zuverlässigen Stammbaumdaten können helfen die Rate falsch-negativer Varianten bei unterschiedlichen MAFs zu ermitteln, da sie eine größere Power aufweisen und eine höhere MAF annehmen können.

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Priorisierungskriterien wurden neu entworfen. Sie unterscheiden dabei gezielt die zwischen der Beurteilung als Kandidatenvariante und der Beurteilung als Kandidatengen. Idealerweise ist diese Unterscheidung nicht notwendig, da die Beurteilung als Kandidatengen auf bisherigem Wissen und Veröffentlichungen beruht und bisher publizierte Gene bevorzugt (Wissens-Bias). Die große Stärke von genetischen Analysen mittels WES ist aber die Identifikation unbekannter Gene. Daher sollten die Priorisierungskriterien immer mit Vorsicht verwendet werden. Da die Zusammenstellung der Kriterien neu ist, müssen zukünftige Studien diese verwenden, um deren Power zu bestimmen und eine Aussage über deren Stärken und Schwächen zu treffen.

## 5 Zusammenfassung

### Familie A. Parkinson-Syndrom

Parkinsonismus ist ein Syndrom, definiert durch das gleichzeitige Auftreten von Bradykinese und Ruhetremor oder Rigor. In 3-5% der Patienten der Fälle beginnt die Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr (*early onset*). Obgleich meist durch eine Parkinson-Krankheit bedingt, gibt es eine Vielzahl von anderen, auch genetischen Ursachen. In einer Familie serbischer Herkunft wurden drei Familienmitglieder in zwei Generationen mit einem *early onset* Parkinson-Syndrom sowie eine unsicher Betroffene identifiziert, die eine dominant vererbte Ursache nahelag. Mittels der Sequenzierung der Exome (WES) von zwei Betroffenen und einem nicht-Betroffenen sollte eine monogene Ursache identifiziert werden. Dabei wurde nach seltenen, konservierten und proteinverändernden Varianten gefiltert, die zu einem dominanten Erbgang passten. Kandidatenvarianten wurden priorisiert, die als pathogen eingestuft und deren Gene mit einem Parkinson-Syndrom assoziiert worden sind. Mittels Sanger-Sequenzierung wurde die Segregation der Varianten in der Familie analysiert. Die Punktmutation c.1076C>T (p.Pro359Leu) im Gen *TGM6* zeigte sich als plausibles Kandidatengen. Durch ein *in silico*-Modell konnte eine Veränderung des katalytischen Zentrums angenommen werden. In transformierten HEK293-Zellen zeigte die Variante eine erhöhte Proteinstabilität im Vergleich zum Wildtyp. Eine veränderte Proteinaktivität konnte mit einem die Transamidierung messenden Kit nicht festgestellt werden. Weitere Varianten im Gen *TGM6* sind bereits für die spinocerebelläre Ataxie 35 und die Parkinson-Krankheit beschrieben worden. Die hier entdeckte Mutation stellte eine neue Variante dar. Weitere Untersuchungen zur pathogenetischen Rolle sind notwendig.

### Familie B. Ataxie

Eine Ataxie ist ein Syndrom, das durch eine unkoordinierte Motorik definiert ist. Insbesondere bei Auftreten im Kindesalter müssen hereditäre Ursachen berücksichtigt werden. In einer Familie koreanischer Herkunft wurden zwei Familienmitglieder mit einer infantilen zerebellären Ataxie identifiziert. Unter Annahme eines rezessiven oder eines dominanten Erbgangs mit neu entstandener (*de novo*) Variante wurde eine WES der betroffenen Kinder und der nicht-betroffenen Eltern durchgeführt. Hierbei wurden jedoch nur zwei wahrscheinlich benigne Varianten identifiziert. In den Ataxie-verursachenden Genen *ACO2* und *SPTBN2* wurden die Varianten c.1943G>A (p.R648H) bzw. c.6277G>A (p.E2093K) identifiziert, deren ursächlicher Einfluss weiter erforscht werden sollte.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] D. R. Adams und C. M. Eng, „Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders“ (eng), *The New England journal of medicine*, Jg. 379, Nr. 14, S. 1353–1362, 2018, doi: 10.1056/NEJMra1711801.
- [2] I. A. Adzhubei *et al.*, „A method and server for predicting damaging missense mutations“ (eng), *Nature methods*, Jg. 7, Nr. 4, S. 248–249, 2010, doi: 10.1038/nmeth0410-248.
- [3] B. Ahvazi, H. C. Kim, S.-H. Kee, Z. Nemes und P. M. Steinert, „Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation“ (eng), *The EMBO journal*, Jg. 21, Nr. 9, S. 2055–2067, 2002, doi: 10.1093/emboj/21.9.2055.
- [4] J. P. Anderson *et al.*, „Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease“ (eng), *The Journal of biological chemistry*, Jg. 281, Nr. 40, S. 29739–29752, 2006, doi: 10.1074/jbc.M600933200.
- [5] G. Andringa, K. Y. Lam, M. Chegary, X. Wang, T. N. Chase und M. C. Bennett, „Tissue transglutaminase catalyzes the formation of alpha-synuclein crosslinks in Parkinson's disease“ (eng), *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Jg. 18, Nr. 7, S. 932–934, 2004, doi: 10.1096/fj.03-0829fje.
- [6] M. J. Armstrong *et al.*, „Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration“ (eng), *Neurology*, Jg. 80, Nr. 5, S. 496–503, 2013, doi: 10.1212/WNL.0b013e31827f0fd1.
- [7] J. A. Bailey *et al.*, „Recent segmental duplications in the human genome“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 297, Nr. 5583, S. 1003–1007, 2002, doi: 10.1126/science.1072047.
- [8] S. Baldovino, A. M. Moliner, D. Taruscio, E. Daina und D. Roccatello, „Rare Diseases in Europe: from a Wide to a Local Perspective“ (eng), *The Israel Medical Association journal : IMAJ*, Jg. 18, Nr. 6, S. 359–363, 2016.
- [9] R. Balestrino und A. H. V. Schapira, „Parkinson disease“ (eng), *European journal of neurology*, Jg. 27, Nr. 1, S. 27–42, 2020, doi: 10.1111/ene.14108.
- [10] M. J. Bamshad *et al.*, „Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery“ (eng), *Nature reviews. Genetics*, Jg. 12, Nr. 11, S. 745–755, 2011, doi: 10.1038/nrg3031.
- [11] M. Beaudin *et al.*, „The Classification of Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias: a Consensus Statement from the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias Task Force“ (eng), *Cerebellum (London, England)*, Jg. 18, Nr. 6, S. 1098–1125, 2019, doi: 10.1007/s12311-019-01052-2.
- [12] G. E. Begg *et al.*, „Mechanism of allosteric regulation of transglutaminase 2 by GTP“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 103, Nr. 52, S. 19683–19688, 2006, doi: 10.1073/pnas.0609283103.
- [13] P. Berlit, *Klinische Neurologie*, 3. Aufl. Springer, 2011.
- [14] D. C. Berwick *et al.*, „Pathogenic LRRK2 variants are gain-of-function mutations that enhance LRRK2-mediated repression of  $\beta$ -catenin signaling“ (eng), *Molecular neurodegeneration*, Jg. 12, Nr. 1, S. 9, 2017, doi: 10.1186/s13024-017-0153-4.
- [15] T. D. Bird, *Hereditary Ataxia Overview*. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/>.
- [16] D. N. Bloch und Y. Miller, „Study of Molecular Mechanisms of  $\alpha$ -Synuclein Assembly: Insight into a Cross- $\beta$  Structure in the N-Termini of New  $\alpha$ -Synuclein Fibrils“ (eng), *ACS omega*, Jg. 2, Nr. 7, S. 3363–3370, 2017, doi: 10.1021/acsomega.7b00459.
- [17] C. G. Bouwkamp *et al.*, „ACO2 homozygous missense mutation associated with complicated hereditary spastic paraplegia“ (eng), *Neurology. Genetics*, Jg. 4, Nr. 2, e223, 2018, doi: 10.1212/NXG.000000000000223.

- [18] K. M. Boycott, M. R. Vanstone, D. E. Bulman und A. E. MacKenzie, „Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation“ (eng), *Nature reviews. Genetics*, Jg. 14, Nr. 10, S. 681–691, 2013, doi: 10.1038/nrg3555.
- [19] H. Braak, K. D. Tredici, U. Rüb, R. A. de Vos, E. N. Jansen Steur und E. Braak, „Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson’s disease“, *Neurobiology of Aging*, Jg. 24, Nr. 2, S. 197–211, 2003, doi: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9.
- [20] H. Braak, R. A. I. de Vos, J. Bohl und K. Del Tredici, „Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology“ (eng), *Neuroscience letters*, Jg. 396, Nr. 1, S. 67–72, 2006, doi: 10.1016/j.neulet.2005.11.012.
- [21] R. Calabrese, E. Capriotti, P. Fariselli, P. L. Martelli und R. Casadio, „Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins“ (eng), *Human mutation*, Jg. 30, Nr. 8, S. 1237–1244, 2009, doi: 10.1002/humu.21047.
- [22] H.-C. Cheng, C. M. Ulane und R. E. Burke, „Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons“ (eng), *Annals of neurology*, Jg. 67, Nr. 6, S. 715–725, 2010, doi: 10.1002/ana.21995.
- [23] J. Chen, A. Althagafi und R. Hoehndorf, „Predicting Candidate Genes From Phenotypes, Functions, And Anatomical Site Of Expression“ (eng), *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2020, doi: 10.1093/bioinformatics/btaa879.
- [24] K. Chen *et al.*, „TGM6 variants in Parkinson's disease: clinical findings and functional evidence“ (eng), *Journal of integrative neuroscience*, Jg. 19, Nr. 1, S. 51–64, 2020, doi: 10.31083/j.jin.2020.01.1203.
- [25] S. I. Chung und J. E. Folk, „Mechanism of the inactivation of guinea pig liver transglutaminase by tetrathionate“ (eng), *The Journal of biological chemistry*, Jg. 245, Nr. 4, S. 681–689, 1970.
- [26] S. Chun und J. C. Fay, „Identification of deleterious mutations within three human genomes“ (eng), *Genome research*, Jg. 19, Nr. 9, S. 1553–1561, 2009, doi: 10.1101/gr.092619.109.
- [27] B. A. Citron, Z. Suo, K. SantaCruz, P. J. Davies, F. Qin und B. W. Festoff, „Protein crosslinking, tissue transglutaminase, alternative splicing and neurodegeneration“, *Neurochemistry International*, Jg. 40, Nr. 1, S. 69–78, 2002, doi: 10.1016/s0197-0186(01)00062-6.
- [28] J. M. Connellan und J. E. Folk, „Mechanism of the inactivation of guinea pig liver transglutaminase by 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)“ (eng), *The Journal of biological chemistry*, Jg. 244, Nr. 12, S. 3173–3181, 1969.
- [29] G. M. Cooper *et al.*, „Single-nucleotide evolutionary constraint scores highlight disease-causing mutations“ (eng), *Nature methods*, Jg. 7, Nr. 4, S. 250–251, 2010, doi: 10.1038/nmeth0410-250.
- [30] M. Cristofanilli *et al.*, „Transglutaminase-6 is an autoantigen in progressive multiple sclerosis and is upregulated in reactive astrocytes“ (eng), *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, Jg. 23, Nr. 13, S. 1707–1715, 2017, doi: 10.1177/1352458516684022.
- [31] C. Dong *et al.*, „Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies“ (eng), *Human molecular genetics*, Jg. 24, Nr. 8, S. 2125–2137, 2015, doi: 10.1093/hmg/ddu733.
- [32] D. R. D'Souza, J. Wei, Q. Shao, M. D. Hebert, S. H. Subramony und P. J. S. Vig, „Tissue transglutaminase crosslinks ataxin-1: possible role in SCA1 pathogenesis“ (eng), *Neuroscience letters*, Jg. 409, Nr. 1, S. 5–9, 2006, doi: 10.1016/j.neulet.2006.08.003.
- [33] T. L. Edwards *et al.*, „Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease“ (eng), *Annals of human genetics*, Jg. 74, Nr. 2, S. 97–109, 2010, doi: 10.1111/j.1469-1809.2009.00560.x.

- [34] J. L. Eriksen, T. M. Dawson, D. W. Dickson und L. Petrucelli, „Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease“ (eng), *Neuron*, Jg. 40, Nr. 3, S. 453–456, 2003, doi: 10.1016/s0896-6273(03)00684-6.
- [35] A. Fasano, M. Hodaie, R. P. Munhoz und M. Rohani, „SCA 35 presenting as isolated treatment-resistant dystonic hand tremor“ (eng), *Parkinsonism & related disorders*, Jg. 37, S. 118–119, 2017, doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.01.014.
- [36] B. L. Fogel, M. C. Clark und D. H. Geschwind, „The neurogenetics of atypical parkinsonian disorders“ (eng), *Seminars in neurology*, Jg. 34, Nr. 2, S. 217–224, 2014, doi: 10.1055/s-0034-1381738.
- [37] J. E. Folk, J. P. Mullooly und P. W. Cole, „Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. II. The role of metal in enzyme activation“ (eng), *The Journal of biological chemistry*, Jg. 242, Nr. 8, S. 1838–1844, 1967.
- [38] M. Fukada *et al.*, „Identification of novel compound heterozygous mutations in ACO2 in a patient with progressive cerebral and cerebellar atrophy“ (eng), *Molecular genetics & genomic medicine*, Jg. 7, Nr. 7, e00698, 2019, doi: 10.1002/mgg3.698.
- [39] J. L. F. Fung *et al.*, „A significant inflation in TGM6 genetic risk casts doubt in its causation in spinocerebellar ataxia type 35“ (eng), *Parkinsonism & related disorders*, Jg. 63, S. 42–45, 2019, doi: 10.1016/j.parkreldis.2019.01.013.
- [40] W. R. Galpern und A. E. Lang, „Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins“ (eng), *Annals of neurology*, Jg. 59, Nr. 3, S. 449–458, 2006, doi: 10.1002/ana.20819.
- [41] M. Garber, M. Guttman, M. Clamp, M. C. Zody, N. Friedman und X. Xie, „Identifying novel constrained elements by exploiting biased substitution patterns“ (eng), *Bioinformatics (Oxford, England)*, Jg. 25, Nr. 12, i54-62, 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btp190.
- [42] S. Gilman *et al.*, „Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy“ (eng), *Neurology*, Jg. 71, Nr. 9, S. 670–676, 2008, doi: 10.1212/01.wnl.0000324625.00404.15.
- [43] M. Goedert, M. G. Spillantini, K. Del Tredici und H. Braak, „100 years of Lewy pathology“ (eng), *Nature reviews. Neurology*, Jg. 9, Nr. 1, S. 13–24, 2013, doi: 10.1038/nrneurol.2012.242.
- [44] R. Grantham, „Amino acid difference formula to help explain protein evolution“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 185, Nr. 4154, S. 862–864, 1974, doi: 10.1126/science.185.4154.862.
- [45] P. Grenard, M. K. Bates und D. Aeschlimann, „Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z“ (eng), *The Journal of biological chemistry*, Jg. 276, Nr. 35, S. 33066–33078, 2001, doi: 10.1074/jbc.M102553200.
- [46] W.-J. Guan *et al.*, „Spinocerebellar ataxia type 35 (SCA35)-associated transglutaminase 6 mutants sensitize cells to apoptosis“ (eng), *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 430, Nr. 2, S. 780–786, 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.069.
- [47] W.-J. Guan *et al.*, „Transglutaminase 6 interacts with polyQ proteins and promotes the formation of polyQ aggregates“ (eng), *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 437, Nr. 1, S. 94–100, 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.044.
- [48] Y.-C. Guo, J.-J. Lin, Y.-C. Liao, P.-C. Tsai, Y.-C. Lee und B.-W. Soong, „Spinocerebellar ataxia 35: novel mutations in TGM6 with clinical and genetic characterization“ (eng), *Neurology*, Jg. 83, Nr. 17, S. 1554–1561, 2014, doi: 10.1212/WNL.0000000000000909.

- [49] M. Hadjivassiliou, P. Aeschlimann, A. Strigun, D. S. Sanders, N. Woodroffe und D. Aeschlimann, „Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase“ (eng), *Annals of neurology*, Jg. 64, Nr. 3, S. 332–343, 2008, doi: 10.1002/ana.21450.
- [50] M. Hadjivassiliou *et al.*, „Transglutaminase 6 antibodies in the diagnosis of gluten ataxia“ (eng), *Neurology*, Jg. 80, Nr. 19, S. 1740–1745, 2013, doi: 10.1212/WNL.0b013e3182919070.
- [51] G. M. Halliday *et al.*, „Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease“ (eng), *Annals of neurology*, Jg. 27, Nr. 4, S. 373–385, 1990, doi: 10.1002/ana.410270405.
- [52] M. Hasegawa *et al.*, „Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions“ (eng), *The Journal of biological chemistry*, Jg. 277, Nr. 50, S. 49071–49076, 2002, doi: 10.1074/jbc.M208046200.
- [53] M. Hecht, Y. Bromberg und B. Rost, „Better prediction of functional effects for sequence variants“ (eng), *BMC genomics*, 16 Suppl 8, S1, 2015, doi: 10.1186/1471-2164-16-S8-S1.
- [54] D. G. Hernandez, X. Reed und A. B. Singleton, „Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance“ (eng), *Journal of neurochemistry*, 139 Suppl 1, S. 59–74, 2016, doi: 10.1111/jnc.13593.
- [55] G. U. Höglinger *et al.*, „Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: The movement disorder society criteria“ (eng), *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, Jg. 32, Nr. 6, S. 853–864, 2017, doi: 10.1002/mds.26987.
- [56] [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Info/Annotation](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Annotation) (Zugriff am: 17. April 2021).
- [57] C.-C. Huang, T.-Y. Chiu, T.-Y. Lee, H.-J. Hsieh, C.-C. Lin und L.-S. Kao, „Soluble  $\alpha$ -synuclein facilitates priming and fusion by releasing  $\text{Ca}^{2+}$  from the thapsigargin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  pool in PC12 cells“ (eng), *Journal of cell science*, Jg. 131, Nr. 23, 2018, doi: 10.1242/jcs.213017.
- [58] R. Hummerich, J.-O. Thumfart, P. Findeisen, D. Bartsch und P. Schloss, „Transglutaminase-mediated transamidation of serotonin, dopamine and noradrenaline to fibronectin: evidence for a general mechanism of monoaminylation“ (eng), *FEBS letters*, Jg. 586, Nr. 19, S. 3421–3428, 2012, doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.062.
- [59] International Human Genome Sequencing Consortium, „Finishing the euchromatic sequence of the human genome“ (eng), *Nature*, Jg. 431, Nr. 7011, S. 931–945, 2004, doi: 10.1038/nature03001.
- [60] N. M. Ioannidis *et al.*, „REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants“ (eng), *American journal of human genetics*, Jg. 99, Nr. 4, S. 877–885, 2016, doi: 10.1016/j.ajhg.2016.08.016.
- [61] H. Ito *et al.*, „Clinicopathologic investigation of a family with expanded SCA8 CTA/CTG repeats“ (eng), *Neurology*, Jg. 67, Nr. 8, S. 1479–1481, 2006, doi: 10.1212/01.wnl.0000240256.13633.7b.
- [62] T. M. Jeitner, N. A. Muma, K. P. Battaile und A. J. Cooper, „Transglutaminase activation in neurodegenerative diseases“ (eng), *Future neurology*, Jg. 4, Nr. 4, S. 449–467, 2009, doi: 10.2217/fnl.09.17.
- [63] E. Junn, R. D. Ronchetti, M. M. Quezado, S.-Y. Kim und M. M. Mouradian, „Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 100, Nr. 4, S. 2047–2052, 2003, doi: 10.1073/pnas.0438021100.
- [64] P. Kahlem, C. Terré, H. Green und P. Djian, „Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous

- system“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 93, Nr. 25, S. 14580–14585, 1996, doi: 10.1073/pnas.93.25.14580.
- [65] K. J. Karczewski *et al.*, „The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes“, *Nucleic acids research*, Jg. 45, D1, D840–D845, 2017, doi: 10.1093/nar/gkw971.
- [66] K. J. Karczewski *et al.*, „The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans“, *Nature*, Jg. 581, Nr. 7809, S. 434–443, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2308-7.
- [67] M. Karplus und J. A. McCammon, „Molecular dynamics simulations of biomolecules“ (eng), *Nature structural biology*, Jg. 9, Nr. 9, S. 646–652, 2002, doi: 10.1038/nsb0902-646.
- [68] M. V. Karpuj *et al.*, „Transglutaminase aggregates huntingtin into nonamyloidogenic polymers, and its enzymatic activity increases in Huntington's disease brain nuclei“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 96, Nr. 13, S. 7388–7393, 1999, doi: 10.1073/pnas.96.13.7388.
- [69] M. Kircher, D. M. Witten, P. Jain, B. J. O'Roak, G. M. Cooper und J. Shendure, „A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants“, *Nature genetics*, Jg. 46, Nr. 3, S. 310–315, 2014, doi: 10.1038/ng.2892.
- [70] C. Klein, S. A. Schneider und A. E. Lang, „Hereditary parkinsonism: Parkinson disease look-alikes--an algorithm for clinicians to "PARK" genes and beyond“ (eng), *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, Jg. 24, Nr. 14, S. 2042–2058, 2009, doi: 10.1002/mds.22675.
- [71] T. Klockgether, „Sporadic adult-onset ataxia“ (eng), *Handbook of clinical neurology*, Jg. 155, S. 217–225, 2018, doi: 10.1016/B978-0-444-64189-2.00014-7.
- [72] A. H. Koeppen, „The Neuropathology of Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease“ (eng), *Advances in experimental medicine and biology*, Jg. 1049, S. 233–241, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-71779-1\_11.
- [73] A. H. Koeppen, „The neuropathology of the adult cerebellum“ (eng), *Handbook of clinical neurology*, Jg. 154, S. 129–149, 2018, doi: 10.1016/B978-0-444-63956-1.00008-4.
- [74] T.-S. Lai, C.-J. Lin und C. S. Greenberg, „Role of tissue transglutaminase-2 (TG2)-mediated aminylation in biological processes“ (eng), *Amino acids*, Jg. 49, Nr. 3, S. 501–515, 2017, doi: 10.1007/s00726-016-2270-8.
- [75] E. S. Lander *et al.*, „Initial sequencing and analysis of the human genome“ (eng), *Nature*, Jg. 409, Nr. 6822, S. 860–921, 2001, doi: 10.1038/35057062.
- [76] L. M. L. de Lau und M. M. B. Breteler, „Epidemiology of Parkinson's disease“, *The Lancet Neurology*, Jg. 5, Nr. 6, S. 525–535, 2006, doi: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.
- [77] C. M. Lill und C. Klein, „Epidemiologie und Ursachen der Parkinson-Erkrankung“ (ger), *Der Nervenarzt*, Jg. 88, Nr. 4, S. 345–355, 2017, doi: 10.1007/s00115-017-0288-0.
- [78] M. Li, S. Y. Y. Pang, Y. Song, M. H. W. Kung, S.-L. Ho und P.-C. Sham, „Whole exome sequencing identifies a novel mutation in the transglutaminase 6 gene for spinocerebellar ataxia in a Chinese family“ (eng), *Clinical genetics*, Jg. 83, Nr. 3, S. 269–273, 2013, doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01895.x.
- [79] C.-C. Lin, S.-R. Gan, D. Gupta, A. Alaedini, P. H. Green und S.-H. Kuo, „Hispanic Spinocerebellar Ataxia Type 35 (SCA35) with a Novel Frameshift Mutation“ (eng), *Cerebellum (London, England)*, Jg. 18, Nr. 2, S. 291–294, 2019, doi: 10.1007/s12311-018-0978-6.
- [80] T. Logan, J. Bendor, C. Toupin, K. Thorn und R. H. Edwards, „ $\alpha$ -Synuclein promotes dilation of the exocytotic fusion pore“ (eng), *Nature neuroscience*, Jg. 20, Nr. 5, S. 681–689, 2017, doi: 10.1038/nn.4529.

- [81] L. Lorand und R. M. Graham, „Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions“ (eng), *Nature reviews. Molecular cell biology*, Jg. 4, Nr. 2, S. 140–156, 2003, doi: 10.1038/nrm1014.
- [82] A.-L. Mahul-Mellier *et al.*, „The process of Lewy body formation, rather than simply  $\alpha$ -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 117, Nr. 9, S. 4971–4982, 2020, doi: 10.1073/pnas.1913904117.
- [83] A. Manini *et al.*, „A case report of late-onset cerebellar ataxia associated with a rare p.R342W TGM6 (SCA35) mutation“ (eng), *BMC neurology*, Jg. 20, Nr. 1, S. 408, 2020, doi: 10.1186/s12883-020-01964-1.
- [84] C. Marelli *et al.*, „ACO2 mutations: A novel phenotype associating severe optic atrophy and spastic paraplegia“ (eng), *Neurology. Genetics*, Jg. 4, Nr. 2, e225, 2018, doi: 10.1212/NXG.0000000000000225.
- [85] C. Marras *et al.*, „Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force“ (eng), *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, Jg. 31, Nr. 4, S. 436–457, 2016, doi: 10.1002/mds.26527.
- [86] J. A. McCammon, B. R. Gelin und M. Karplus, „Dynamics of folded proteins“ (eng), *Nature*, Jg. 267, Nr. 5612, S. 585–590, 1977, doi: 10.1038/267585a0.
- [87] I. G. McKeith *et al.*, „Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium“ (eng), *Neurology*, Jg. 89, Nr. 1, S. 88–100, 2017, doi: 10.1212/WNL.0000000000004058.
- [88] M. D. Metodiev *et al.*, „Mutations in the tricarboxylic acid cycle enzyme, aconitase 2, cause either isolated or syndromic optic neuropathy with encephalopathy and cerebellar atrophy“ (eng), *Journal of medical genetics*, Jg. 51, Nr. 12, S. 834–838, 2014, doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102532.
- [89] A. Michalik und C. van Broeckhoven, „Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited“ (eng), *Human molecular genetics*, 12 Spec No 2, R173-86, 2003, doi: 10.1093/hmg/ddg295.
- [90] R. Mir *et al.*, „The Parkinson's disease VPS35D620N mutation enhances LRRK2-mediated Rab protein phosphorylation in mouse and human“ (eng), *The Biochemical journal*, Jg. 475, Nr. 11, S. 1861–1883, 2018, doi: 10.1042/BCJ20180248.
- [91] T. Mizuno *et al.*, „Infantile-onset spinocerebellar ataxia type 5 associated with a novel SPTBN2 mutation: A case report“ (eng), *Brain & development*, Jg. 41, Nr. 7, S. 630–633, 2019, doi: 10.1016/j.braindev.2019.03.002.
- [92] M. L. Moseley *et al.*, „Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8“ (eng), *Nature genetics*, Jg. 38, Nr. 7, S. 758–769, 2006, doi: 10.1038/ng1827.
- [93] M. A. Nalls *et al.*, „Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease“ (eng), *Nature genetics*, Jg. 46, Nr. 9, S. 989–993, 2014, doi: 10.1038/ng.3043.
- [94] M. A. Nalls *et al.*, *Expanding Parkinson's disease genetics: novel risk loci, genomic context, causal insights and heritable risk*, 2018.
- [95] Z. Nemes, G. Petrovski, M. Aerts, K. Sergeant, B. Devreese und L. Fésüs, „Transglutaminase-mediated intramolecular cross-linking of membrane-bound alpha-synuclein promotes amyloid formation in Lewy bodies“ (eng), *The Journal of biological chemistry*, Jg. 284, Nr. 40, S. 27252–27264, 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.033969.

- [96] F. Nicita *et al.*, „Heterozygous missense variants of SPTBN2 are a frequent cause of congenital cerebellar ataxia“ (eng), *Clinical genetics*, Jg. 96, Nr. 2, S. 169–175, 2019, doi: 10.1111/cge.13562.
- [97] S. A. Oakes und F. R. Papa, „The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology“ (eng), *Annual review of pathology*, Jg. 10, S. 173–194, 2015, doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649.
- [98] *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). <https://omim.org/>* (Zugriff am: 31.04.2021).
- [99] J. M. Ordway *et al.*, „Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse“ (eng), *Cell*, Jg. 91, Nr. 6, S. 753–763, 1997, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80464-x.
- [100] G. Pagano, F. Niccolini und M. Politis, „Imaging in Parkinson's disease“ (eng), *Clinical medicine (London, England)*, Jg. 16, Nr. 4, S. 371–375, 2016, doi: 10.7861/clinmedicine.16-4-371.
- [101] L.-L. Pan *et al.*, „Positional cloning and next-generation sequencing identified a TGM6 mutation in a large Chinese pedigree with acute myeloid leukaemia“ (eng), *European journal of human genetics : EJHG*, Jg. 23, Nr. 2, S. 218–223, 2015, doi: 10.1038/ejhg.2014.67.
- [102] H. Park, H.-J. Kim und B. S. Jeon, „Parkinsonism in spinocerebellar ataxia“ (eng), *BioMed research international*, Jg. 2015, S. 125273, 2015, doi: 10.1155/2015/125273.
- [103] H. Paulson, „Repeat expansion diseases“ (eng), *Handbook of clinical neurology*, Jg. 147, S. 105–123, 2018, doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00009-9.
- [104] H. L. Paulson, V. G. Shakkottai, H. B. Clark und H. T. Orr, „Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments“ (eng), *Nature reviews. Neuroscience*, Jg. 18, Nr. 10, S. 613–626, 2017, doi: 10.1038/nrn.2017.92.
- [105] V. Pejaver *et al.*, „Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2“ (eng), *Nature communications*, Jg. 11, Nr. 1, S. 5918, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-19669-x.
- [106] D. M. Pinkas, P. Strop, A. T. Brunger und C. Khosla, „Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation“ (eng), *PLoS biology*, Jg. 5, Nr. 12, e327, 2007, doi: 10.1371/journal.pbio.0050327.
- [107] K. S. Pollard, M. J. Hubisz, K. R. Rosenbloom und A. Siepel, „Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies“ (eng), *Genome research*, Jg. 20, Nr. 1, S. 110–121, 2010, doi: 10.1101/gr.097857.109.
- [108] M. H. Polymeropoulos *et al.*, „Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 276, Nr. 5321, S. 2045–2047, 1997, doi: 10.1126/science.276.5321.2045.
- [109] R. B. Postuma *et al.*, „MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease“ (eng), *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, Jg. 30, Nr. 12, S. 1591–1601, 2015, doi: 10.1002/mds.26424.
- [110] A. Puschmann, „Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations“ (eng), *Parkinsonism & related disorders*, Jg. 19, Nr. 4, S. 407–415, 2013, doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.01.020.
- [111] G. Rea, S. Tirupathi, J. Williams, P. Clouston und P. J. Morrison, „Infantile Onset of Spinocerebellar Ataxia Type 5 (SCA-5) in a 6 Month Old with Ataxic Cerebral Palsy“ (eng), *Cerebellum (London, England)*, Jg. 19, Nr. 1, S. 161–163, 2020, doi: 10.1007/s12311-019-01085-7.

- [112] H. Reichmann, „Premotor Diagnosis of Parkinson's Disease“ (eng), *Neuroscience bulletin*, Jg. 33, Nr. 5, S. 526–534, 2017, doi: 10.1007/s12264-017-0159-5.
- [113] B. Reva, Y. Antipin und C. Sander, „Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics“ (eng), *Nucleic acids research*, Jg. 39, Nr. 17, e118, 2011, doi: 10.1093/nar/gkr407.
- [114] S. Richards *et al.*, „Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology“ (eng), *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, Jg. 17, Nr. 5, S. 405–424, 2015, doi: 10.1038/gim.2015.30.
- [115] P. Riederer *et al.*, „ $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease: causal or bystander?“ (eng), *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, Jg. 126, Nr. 7, S. 815–840, 2019, doi: 10.1007/s00702-019-02025-9.
- [116] M. C. de Rijk *et al.*, „Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group“ (eng), *Neurology*, Jg. 54, 11 Suppl 5, S21-3, 2000.
- [117] K. Rosborough, N. Patel und L. V. Kalia, „ $\alpha$ -Synuclein and Parkinsonism: Updates and Future Perspectives“ (eng), *Current neurology and neuroscience reports*, Jg. 17, Nr. 4, S. 31, 2017, doi: 10.1007/s11910-017-0737-y.
- [118] M. Rossi *et al.*, „The genetic nomenclature of recessive cerebellar ataxias“ (eng), *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, Jg. 33, Nr. 7, S. 1056–1076, 2018, doi: 10.1002/mds.27415.
- [119] L. Ruano, C. Melo, M. C. Silva und P. Coutinho, „The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies“ (eng), *Neuroepidemiology*, Jg. 42, Nr. 3, S. 174–183, 2014, doi: 10.1159/000358801.
- [120] A. H. Schapira und P. Jenner, „Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease“ (eng), *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, Jg. 26, Nr. 6, S. 1049–1055, 2011, doi: 10.1002/mds.23732.
- [121] S. A. Schneider und R. N. Alcalay, „Neuropathology of genetic synucleinopathies with parkinsonism: Review of the literature“ (eng), *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, Jg. 32, Nr. 11, S. 1504–1523, 2017, doi: 10.1002/mds.27193.
- [122] A. Schrag und J. M. Schott, „Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism“, *The Lancet Neurology*, Jg. 5, Nr. 4, S. 355–363, 2006, doi: 10.1016/S1474-4422(06)70411-2.
- [123] B. Schüle *et al.*, „Parkinson's disease associated with pure ATXN10 repeat expansion“ (eng), *NPJ Parkinson's disease*, Jg. 3, S. 27, 2017, doi: 10.1038/s41531-017-0029-x.
- [124] J. M. Schwarz, D. N. Cooper, M. Schuelke und D. Seelow, „MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age“ (eng), *Nature methods*, Jg. 11, Nr. 4, S. 361–362, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2890.
- [125] A. Y. Sheng *et al.*, „Transcranial sonography image characteristics in different Parkinson's disease subtypes“ (eng), *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, Jg. 38, Nr. 10, S. 1805–1810, 2017, doi: 10.1007/s10072-017-3059-6.
- [126] H. A. Shihab *et al.*, „Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models“ (eng), *Human mutation*, Jg. 34, Nr. 1, S. 57–65, 2013, doi: 10.1002/humu.22225.

- [127] R. Spiegel *et al.*, „Infantile cerebellar-retinal degeneration associated with a mutation in mitochondrial aconitase, ACO2“ (eng), *American journal of human genetics*, Jg. 90, Nr. 3, S. 518–523, 2012, doi: 10.1016/j.ajhg.2012.01.009.
- [128] M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes und M. Goedert, „Alpha-synuclein in Lewy bodies“ (eng), *Nature*, Jg. 388, Nr. 6645, S. 839–840, 1997, doi: 10.1038/42166.
- [129] P. D. Stenson, E. V. Ball, K. Howells, A. D. Phillips, M. Mort und D. N. Cooper, „The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalized genomics“ (eng), *Human genomics*, Jg. 4, Nr. 2, S. 69–72, 2009, doi: 10.1186/1479-7364-4-2-69.
- [130] The jamovi project (2021). jamovi (Version 1.6) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.
- [131] H. Thomas *et al.*, „Transglutaminase 6: a protein associated with central nervous system development and motor function“ (eng), *Amino acids*, Jg. 44, Nr. 1, S. 161–177, 2013, doi: 10.1007/s00726-011-1091-z.
- [132] G. K. Tofaris, A. Razzaq, B. Ghetti, K. S. Lilley und M. G. Spillantini, „Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function“ (eng), *The Journal of biological chemistry*, Jg. 278, Nr. 45, S. 44405–44411, 2003, doi: 10.1074/jbc.M308041200.
- [133] T. Tozawa *et al.*, „Complex hereditary spastic paraplegia associated with episodic visual loss caused by ACO2 variants“ (eng), *Human genome variation*, Jg. 8, Nr. 1, S. 4, 2021, doi: 10.1038/s41439-021-00136-y.
- [134] D. Tripathy *et al.*, „Mutations in TGM6 induce the unfolded protein response in SCA35“ (eng), *Human molecular genetics*, Jg. 26, Nr. 19, S. 3749–3762, 2017, doi: 10.1093/hmg/ddx259.
- [135] R. Vaser, S. Adusumalli, S. N. Leng, M. Sikic und P. C. Ng, „SIFT missense predictions for genomes“ (eng), *Nature protocols*, Jg. 11, Nr. 1, S. 1–9, 2016, doi: 10.1038/nprot.2015.123.
- [136] A. Villar-Piqué, T. Da Lopes Fonseca und T. F. Outeiro, „Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies“ (eng), *Journal of neurochemistry*, 139 Suppl 1, S. 240–255, 2016, doi: 10.1111/jnc.13249.
- [137] K. Wakabayashi und H. Takahashi, „Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease“ (eng), *European neurology*, 38 Suppl 2, S. 2–7, 1997, doi: 10.1159/000113469.
- [138] K. Wakabayashi *et al.*, „Accumulation of alpha-synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy“ (eng), *Acta neuropathologica*, Jg. 96, Nr. 5, S. 445–452, 1998, doi: 10.1007/s004010050918.
- [139] K. Wakabayashi, K. Tanji, S. Odagiri, Y. Miki, F. Mori und H. Takahashi, „The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders“ (eng), *Molecular neurobiology*, Jg. 47, Nr. 2, S. 495–508, 2013, doi: 10.1007/s12035-012-8280-y.
- [140] J. L. Wang *et al.*, „TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing“ (eng), *Brain : a journal of neurology*, Jg. 133, Pt 12, S. 3510–3518, 2010, doi: 10.1093/brain/awq323.
- [141] K. Wang, M. Li und H. Hakonarson, „ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data“ (eng), *Nucleic acids research*, Jg. 38, Nr. 16, e164, 2010, doi: 10.1093/nar/gkq603.
- [142] M. M. M. Wilhelmus, M. de Jager, E. N. T. P. Bakker und B. Drukarch, „Tissue transglutaminase in Alzheimer's disease: involvement in pathogenesis and its potential as a

- therapeutic target“ (eng), *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 42 Suppl 3, S289-303, 2014, doi: 10.3233/JAD-132492.
- [143] C. Wittke *et al.*, „Genotype-Phenotype Relations for the Atypical Parkinsonism Genes: MDSGene Systematic Review“ (eng), *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, Jg. 36, Nr. 7, S. 1499–1510, 2021, doi: 10.1002/mds.28517.
- [144] Z.-H. Yang *et al.*, „TGM6 gene mutations in undiagnosed cerebellar ataxia patients“ (eng), *Parkinsonism & related disorders*, Jg. 46, S. 84–86, 2018, doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.001.
- [145] A. D. Yates *et al.*, „Ensembl 2020“ (eng), *Nucleic acids research*, Jg. 48, D1, D682-D688, 2020, doi: 10.1093/nar/gkz966.
- [146] E. Yıldız Bölükbaşı, M. Afzal, S. Mumtaz, N. Ahmad, S. Malik und A. Tolun, „Progressive SCAR14 with unclear speech, developmental delay, tremor, and behavioral problems caused by a homozygous deletion of the SPTBN2 pleckstrin homology domain“ (eng), *American journal of medical genetics. Part A*, Jg. 173, Nr. 9, S. 2494–2499, 2017, doi: 10.1002/ajmg.a.38332.
- [147] G. M. Zainelli, N. L. Dudek, C. A. Ross, S.-Y. Kim und N. A. Muma, „Mutant huntingtin protein: a substrate for transglutaminase 1, 2, and 3“ (eng), *Journal of neuropathology and experimental neurology*, Jg. 64, Nr. 1, S. 58–65, 2005, doi: 10.1093/jnen/64.1.58.
- [148] M. O. Zemaitaitis, S.-Y. Kim, R. A. Halverson, J. C. Troncoso, J. M. Lee und N. A. Muma, „Transglutaminase activity, protein, and mRNA expression are increased in progressive supranuclear palsy“ (eng), *Journal of neuropathology and experimental neurology*, Jg. 62, Nr. 2, S. 173–184, 2003, doi: 10.1093/jnen/62.2.173.

## 7 Anhang

### 7.1 Fallbeschreibungen (Kasuistiken)

#### 7.1.1 Familie A: Parkinson-Syndrom

##### III-1:

**Anamnese:** Die Patientin III-1 wurde erstmalig im Alter von 20 Jahren mit progressiven neurologischen Symptomen untersucht. Sie berichtete von Sprach- und später Gangschwierigkeiten, die im Alter von 17 Jahren begonnen und sich langsam verschlechtert hätten. Zu Stürzen sei es nicht gekommen. Im Verlauf sei es auch zu Zittern und kognitiven Problemen gekommen. Seit dem 20. Lebensjahr kam zu Schluckstörungen, epileptischen Anfällen und einem Gewichtsverlust von 20 Kilogramm innerhalb der letzten drei Jahre.

**Klinische Untersuchung:** Die Patientin zeigte eine beidseitige Hypobradikinesie, inklusive Hypomimie und Hypophonie. Zudem fand sich ein beidseitiger, aber rechts betonter Rigor, Tremor und eine posturale Instabilität. Die Okulomotorik war regulär, die Blinzelfrequenz erniedrigt. Sie zeigte zudem einen Torticollis. Bei der Untersuchung der Extremitäten, waren ein taktiler Stimulus-sensitiver Myoklonus und beidseits gesteigerte Reflexe feststellbar.

**Bildgebung:** Im MRT zeigten sich bilaterale thalamische Signalhyperintensitäten. Durch eine DAT-SPECT zeigte sich eine reduzierte Dopaminaufnahme im Striatum. Mittels FDG-PET wiesen wir einen reduzierten Glucosestoffwechsel rechts kortikal und subkortikal nach. Elektroenzephalographisch ließen sich generalisierte epilepsietypische Potentiale finden.

**Therapie:** Das Ansprechen auf die L-Dopa-Therapie war gut, jedoch kam es zu aggressiven Verhaltensänderungen, die mit Risperidon und Quetiapin behandelt wurden.

**Differentialdiagnostik:** Es wurden *Parkin*- und *c9orf72*-Mutationen, eine Huntington-Krankheit, ein Morbus Wilson und eine Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ausgeschlossen.

**Verlauf:** Im Alter von 24 Jahren verstarb sie an den Folgen einer Pneumonie.

##### II-2:

**Anamnese:** Die Patientin A-II-2 berichtete über ein Zittern und eine Bewegungsverlangsamung ab dem Alter von 25 Jahren. Dies trat zunächst rechts und im weiteren Verlauf auch links auf.

**Klinische Untersuchung:** Beidseitig, jedoch rechtsbetont, zeigte sich ein Ruhetremor und eine Hypobradikinesie, zudem eine Dysdiadochokinese und eine leichte Gangstörung mit

reduziertem Schwingen der Arme und *freezing*. In der okulomotorischen Testung fiel eine leicht sakkardierte horizontale Blickfolge und ein fraglich eingeschränkter Blick nach oben auf.

**Bildgebung:** Im transkraniellen Ultraschall zeigten sich bilateral, jedoch links betont, hyperechogene Substantiae nigrae, rechts 29 mm<sup>2</sup>, links 51 mm<sup>2</sup> groß. In einer DAT-SPECT zeigte sich eine reduzierte Dopaminaufnahme im rechtem Striatum.

**Therapie:** Die L-Dopa-Therapie zeigte ein exzellentes Ansprechen. Nebenwirkungen waren choreodystone Dyskinesien und ein Wearing-off-Phänomen.

**Differentialdiagnostik:** Es wurden Mutationen in *SNCA*, *Parkin*, *PINK1*, *DJ1* ausgeschlossen, sowie eine Huntington-Krankheit, die Spinocerebellären Ataxien SCA1, 2, 3, 6 und 7 und ein Morbus Wilson.

#### **II-4:**

**Anamnese:** Die Patientin A-II-4 berichtete über erste Beschwerden im Alter von 35 Jahren. Initial kam es zu einer Tagesschläfrigkeit, aufgrund einer REM-Schlafstörung, und einer generellen Verlangsamung. Im Verlauf kam es zu einer Bewegungsverarmung und Fluktuationen zu psychotischen, verwirrten und somnolenten Zuständen mit abgeschwächtem Affekt.

**Klinische Untersuchung:** Es zeigte sich eine beidseitige symmetrische Hypokinese mit Hypomimie und Dysdiadochokinese. Okulomotorische Störungen fanden sich nicht.

**Bildgebung:** Im MRT zeigte sich eine kortikale Atrophie, in einer DAT-SPECT eine beidseitige Reduktion der Dopaminaufnahme.

**Therapie:** Das Ansprechen der L-Dopa-Therapie war exzellent.

**Differentialdiagnostik:** *Parkin*-Mutationen, wie auch eine Huntington-Krankheit, ein Morbus Wilson und eine Creutzfeldt-Jakob-Krankheit wurden ausgeschlossen.

#### **III-4:**

Bei Sichtung der Patientin A-II-4 fiel eine dystone Fußstellung bei der Tochter A-III-4 auf. Da sie selbst nicht darüber berichtete und bisher nicht in ärztlicher Behandlung war, erfolgte keine neurologische Untersuchung.

	Patient II-2	Patient II-4	Patient III-1	Patient III-4
<b>Geschlecht</b>	weiblich	weiblich	weiblich	Weiblich
<b>Alter bei Erkrankungsbeginn [Jahre]</b>	25	35	17	23
<b>Erkrankungsdauer [Jahre]</b>	22	11	6	2
<b>Initiale Symptome</b>	Tremor, Hypokinese	Somnolenz, Verlangsamung, REM-Schlafstörung	Dysarthrie, Gangunsicherheit	Fußdystonie
<b>Hypokinese</b>	+	+	+	-
<b>Rigor</b>	-	+	+	-
<b>Tremor</b>	+	-	+	-
<b>Posturale Instabilität</b>	-	-	+	-
<b>Muskeleigenreflexe</b>	-	-	↑	-
<b>Dystonie</b>	-	-	+	+
<b>Dysarthrie</b>	-	-	+	-
<b>Okulomotorische Störungen</b>	+	-	+	-
<b>Epileptische Anfälle</b>	-	-	+	-
<b>Kognitive Beeinträchtigung</b>	-	+	+	-
<b>Andere neuropsychologischen Symptome</b>	-	+	+	-
<b>L-Dopa-Ansprechen</b>	+++	+++	++	ND
<b>cMRT</b>		Bikortikale Atrophie	Bithalamische Hyperintensitäten	

**Tabelle 18. Klinische Befunde in Familie A.** + entspricht dem Vorhandensein eines Symptoms bzw. einem guten Ansprechen auf L-Dopa. - entspricht dem Fehlen eines Symptoms bzw. dem fehlenden Ansprechen auf die L-Dopa-Therapie. ↑ zeigt eine Erhöhung der Muskeleigenreflexe an.

Weitere Abkürzungen: ND = nicht durchgeführt; REM = *rapid eye movement* (Schlafphase); cMRT = kraniale Magnetresonanztomographie

### **7.1.2 Familie B: Ataxie**

#### **II-1:**

Die Patientin B-II-1 zeigte bereits seit dem 2. Lebensjahr Zeichen einer schweren zerebellären Ataxie mit Gangstörung und einem Nystagmus. In der körperlichen Untersuchung zeigten sich links- und rechtsbetonte hypometrische Bewegungen. Die Untersuchung der Okulomotorik zeigte einen beidseitigen, aber links betonten horizontalen Blickrichtungsnystagmus. Zudem fiel ein kleinschrittiges, breites Gangbild auf mit ungerichteter Fallneigung im Seiltänzerengang.

#### **II-2:**

Der Patient B-II-2 zeigte eine sehr ähnliche Symptomatik mit Beginn im 4. Lebensjahr. Er zeigte rechtsbetonte hypometrische Bewegungen und einen rechtsbetonten horizontalen Blickrichtungsnystagmus. Ebenfalls war das Gangbild unsicher mit Fallneigung nach links, ein Seiltänzerengang daher nicht durchführbar. Es zeigte sich ungleiche Patellarsehnenreflexe mit Steigerung rechts bzw. Abschwächung links.

**Differentialdiagnostik:** Es wurden die Erkrankungen SCA1, 2, 3, 6, 8, 12, 17, DRPLA und Friedreich-Ataxie ausgeschlossen.

## 7.2 Berechnung der maximalen Allelfrequenz

Die Allelfrequenz bezeichnet die Häufigkeit eines Allels in einer Population. Angenommen werden in einer Population ein Referenzallel  $a$  und ein krankheitsverursachendes Allel  $b$ . Die durch dieses Allel verursachte Erkrankung  $K$  sei selten [8], die Prävalenz entspricht damit  $\leq 0,0005$  [8], obgleich die erwartete Prävalenz beider untersuchter Erkrankungen sicherlich niedriger ist. Weitere Annahmen sind eine komplette Penetranz des Allels und kein Nachteil der reproduktiven Fitness der Allels  $b$  gegenüber dem Allel  $a$ .

**Für die Allelfrequenz gilt:**

$$(1) \quad 1 = a + b$$

$$1 = (a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2 \text{ (Hardy – Weinberg – Gesetz)}$$

**Für einen autosomal dominanten Erbgang ergibt sich damit für die Allelfrequenz  $f_{AD}(b)$ :**

$$(2) \quad P(K_{AD}) = 0,0005 = 2ab + b^2 = 1 - a^2$$

$$a = \sqrt{1 - 0,0005}$$

$$(3) \quad f_{AD}(b) = 1 - a = 1 - \sqrt{1 - 0,0005} = 0,00025$$

**Für einen autosomal rezessiven Erbgang ergibt sich damit für die Allelfrequenz  $f_{AR}(b)$ :**

$$(4) \quad P(K_{AR}) = 0,0005 = b^2 = 1 - (a^2 + 2ab)$$

$$(5) \quad f_{AR}(b) = \sqrt{0,0005} = 0,022$$

Für X-chromosomale Erbgänge muss aufgrund der Hemizygotie der männlichen Individuen die Berechnung leicht modifiziert werden:

Unterschieden werden eine weibliche Population  $Q_1$  und eine männliche Population  $Q_2$  mit den Allelen  $a$  und  $b$ . Für  $Q_1$  gilt dann  $1 = a^2 + 2ab + b^2$ , für  $Q_2$  gilt aufgrund der Hemizygotie des X-Chromosoms  $1 = a + b$ . Angenommen wird nun eine Population  $Q_3$ , in der die Populationen  $Q_1$  und  $Q_2$  jeweils 50% ausmachen, die Verteilung der Allele sei in beiden Populationen gleich. Damit ergibt sich für die Berechnung der Allelfrequenzen:

$$(6) \quad 1 = \frac{1}{2}(a^2 + 2ab + b^2) + \frac{1}{2}(a + b)$$

Für einen X-chromosomal dominanten Erbgang ergibt sich damit für die AF  $f_{XLD}(b)$ :

$$(7) \quad P(K_{XLD}) = \frac{1}{2}b^2 + ab + \frac{1}{2}b = 0,0005 \text{ und } a = 1 - b$$

$$0,001 = b^2 + 2b(1 - b) + b$$

$$0 = b^2 - 3b + 0,001$$

Unter Betrachtung des Intervalls  $[0,1] = \{b \in \mathbb{Q} \mid 0 \leq b \leq 1\}$

$$f_{XLD} = \frac{3}{2} - \sqrt{\left(\frac{3}{2}\right)^2 - 0,001} = 0,00033$$

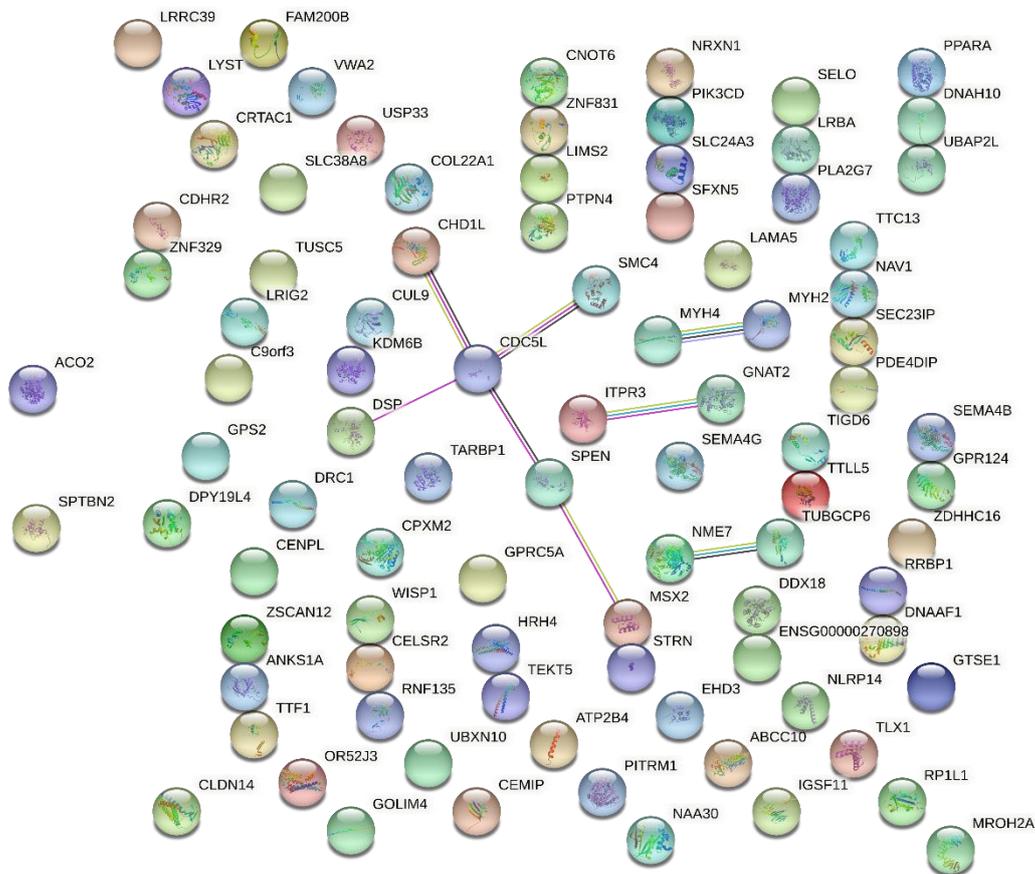
Häufig weisen homozygote Mutationsträger bei dominanten Erbgängen eine verringerte reproduktive Fitness aus. Damit würde ein solches Allel langfristig aus einer Population verschwinden. Die Allelfrequenz entspräche dann der Neumutationsrate und liege damit unter der errechneten maximalen Allelfrequenz. Bei Sinken der Penetranz hingegen steigt die Allelfrequenz proportional an. Die „wahre“ Allelfrequenz  $f(b)$  liegt also zwischen der Neumutationsrate  $N(b)$  und dem Quotienten aus der errechneten maximalen AF und der Penetranz  $P$ . Dies wurde in einer Setzung des oberen Grenzwerts vernachlässigt.

### 7.3 Prädiktionswerte weiterer Prädiktionsprogramme

Gen	Erwartete Veränderung	REVEL	PolyPhen-2		SNAP2	FATHMM	SIFT	Mutation Taster2	Mutation Assessor	MutPred2	SNPs&GO	LRT	GERP++	phyloP	SiPhy
			HVar	HDIV											
AADAC	c.1087G>A, p.V363M	0,522 (D)	0,998 (D)	1,000 (D)	28 (E)	2,23 (T)	0 (D)	1,000 (D)	4,575 (H)	0,671 (D)	D (1)	0,000 (D)	4,9	2,3	18,09
ACO2	c.1943G>A; p.R648H	0,508 (D)	0,940 (D)	0,999 (D)	7 (E)	0,93 (T)	0 (D)	1,000 (D)	3,92 (H)	0,803 (D)	D (2)	0,000 (D)	5,3	2,6	17,44
APC2	c.1512G>C, p.E504D	0,132 (T)	0,027 (B)	0,015 (B)	-57 (N)	-0,13 (T)	0,56 (T)	0,536 (D)	0,395 (N)	0,257 (T)	N (8)	0,000 (N)	2,4	0,9	4,53
ARHGEF6	c.833G>A, p.S278N	0,092 (T)	0,092 (B)	0,004 (B)	-26 (N)	2,18 (T)	0,13 (T)	1,000 (D)	2,315 (M)	0,303 (T)	N (2)	0,000 (N)	5,2	1,3	13,06
CENPL	c.242A>T; p.Y81F	0,194 (T)	0,915 (D)	0,998 (D)	24 (E)	0,82 (T)	0,01 (D)	0,892 (D)	1,935 (M)	0,165 (T)	D (0)	0,008 (N)	4,5	1,0	11,23
	c.872G>C; p.C291S	0,050 (T)	0,579 (P)	0,897 (P)	-33 (N)	1,63 (T)	0,39 (T)	0,866 (N)	1,1 (L)	0,216 (T)	NA	0,004 (N)	5,2	2,5	6,97
DROSHA	c.2010A>C, p.E670D	0,098 (T)	0,004 (B)	0,002 (T)	-60 (N)	1,44 (T)	0,39 (T)	1,000 (D)	0,295 (N)	0,493 (T)	N (9)	0,000 (D)	5,8	2,2	15,87
GRK4	c.1516G>C, p.G506R	0,598 (D)	1,000 (D)	1,000 (D)	77 (E)	1,85 (T)	0 (D)	1,000 (D)	3,315 (M)	0,769 (D)	D (7)	0,000 (U)	4,7	2,3	17,09
RIC1	c.2665A>G, p.K889E	0,284 (T)	0,355 (B)	0,851 (P)	-78 (N)	NA	1 (T)	1,000 (D)	-1,15 (N)	0,626 (D)	N (7)	0,000 (D)	5,9	2,3	16,35
SPTBN2	c.6277G>A; p.E2093K	0,145 (T)	0,131 (B)	0,393 (B)	-55 (N)	-0,57 (T)	0,4 (T)	1,000 (D)	-0,345 (N)	0,303 (T)	N (10)	0,001 (D)	5,5	2,7	15,30
SYTL4	c.86G>A, p.R29Q	0,184 (T)	0,506 (P)	0,983 (D)	-23 (N)	-1,07 (T)	NA	0,973 (N)	1,155 (L)	0,184 (T)	N (7)	0,000 (N)	2,4	0,1	9,70
TGM2	c.227G>A; p.R76H	0,283 (T)	0,003 (B)	0,014 (B)	22 (E)	-2,12 (D)	0,4 (T)	1,000 (N)	1,18 (L)	0,074 (T)	N (1)	0,859 (N)	3,4	1,2	4,20
TGM6	c.1076C>T, p.P359L	0,926 (D)	0,999 (D)	1,000 (D)	58 (E)	-4,08 (D)	0 (D)	1,000 (D)	3,025 (M)	0,864 (D)	D (5)	0,000 (D)	4,9	2,7	16,02
TGM6	c.1171G>A, p.V391M	0,719 (D)	0,999 (D)	1,000 (D)	0 (N)	-1,65 (D)	0 (D)	0,998 (D)	2,295 (M)	ND	N (4)	0,000 (D)	4,9	2,7	16,02
TGM6	c.1342C>T, p.R448W	0,129 (T)	0,613 (P)	0,998 (D)	-13 (N)	-0,03 (T)	0,02 (D)	0,928 (N)	1,39 (L)	ND	D (1)	0,920 (N)	1,2	0,1	10,05

**Tabelle 19. Erweiterte Prädiktionswerte der analysierten Varianten in dieser Arbeit.** Die Grenzwerte zur Einstufung als schädigend (D, *disease-causing*, rot markiert) wurde durch die Prädiktionsprogramme vorgegeben. Für REVEL (>0,5) wurden die Grenzwerte selbst festgelegt, für die Grenzwerte der evolutionären Prädiktionsprogramme (GERP++, phyloP, SiPhy) wurden die Werte von Dong *et al.* [31] verwendet. Abkürzungen: T = tolerabel; B = benigne; P = wahrscheinlich schädigend (*probably damaging*); L = niedrig (*low*); M = medium; H = hoch; ND = nicht durchführbar.

## 7.4 Interaktionen paternal vererbter Varianten mit *ACO2* und *SPTBN2*



**Abbildung 14. STRING-Netzwerk.** Dargestellt sind die Kandidatengene aller paternal heterozygot vererbten Varianten und der maternal vererbten Varianten in *ACO2* und *SPTBN2* in Familie B (Ataxie) zur Überprüfung einer bigenetischen Vererbung. Durchgezogenen Linien zeigen Interaktionen mit einer Konfidenz  $\geq 0,7$ . Die Proteine *ACO2* und *SPTBN2* interagieren mit keinem der dargestellten Proteine. Dies macht eine bigenetische Vererbung für diese Gene unwahrscheinlich.

## 8 Danksagungen

Zum Schluss möchte ich mich nun noch bei den Menschen bedanken, die mir ermöglicht haben, meine Dissertation in diesem Maße anzufertigen. Dabei möchte ich zuerst meine Doktormutter Ana nennen, die mir dieses Thema überlassen hat, mir immer eine große Unterstützung war und für meine Fragen zur Verfügung stand und für den Import serbischer Geleebananen. Bei Frau Prof. Klein möchte ich mich bedanken eine Promotion in ihrem Institut absolviert haben zu können, für die hilfreichen Ratschläge beim Halten von wissenschaftlichen Vorträgen und alle Kniffe und Verbesserung meiner englischen Sprache. Dazu möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken: bei Karen für die super Unterstützung und Betreuung im Labor und falls Ana doch mal nicht zu erreichen war. Bei Aloy für die wissenschaftliche Inspiration und Motivation, mein inneres Gleichgewicht, das Lehren der korrekten Kaffeezubereitung und seine gute Laune. Bei Heike möchte ich mich für die Einarbeitung in das DNA-Labor und für Beantworten meiner Fragen bedanken. Zudem möchte ich mich bei allen anderen Technischen Assistentinnen für das Lehren neuer Methoden bedanken. Natürlich ließe sich eine Promotion niemals ohne Leidensgenossen beschreiten, die sowohl die Laborarbeit als auch die Pausen versüßt haben, hierbei möchte ich insbesondere Christian, Jonas, Viktor, Hauke, Leonora und Julia danken.

Bei den Neurologinnen und Neurologen der Universität Belgrad und Ulsan, bei Ingrid Braenne, Michaela Müller und Herrn Dr. B.-W. Soong möchte ich mich für die fachliche Unterstützung bedanken.

Bei meiner treibenden Kraft, der schnellen Schreibe-Feder, Flora, bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich für die Unterstützung in auch mal frustrierenden Zeiten der Promotion.

## 9 Veröffentlichungen

### Publikationen

05/2018 M. Kasten, C. Hartmann, J. Hampf, S. Schaake, A. Westenberger, E.-J. Vollstedt, A. Balck, A. Domingo, F. Vulinovic, M. Dulovic, I. Zorn, H. adoev, H. Zehnle, C.M. Lembeck, L. Schawe, J. Reginold, J. Huang, I.R. König, L. Bertram, C. Marras, K. Lohmann, C.M. Lill, C. Klein, Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes Parkin, PINK1, DJ1: MDSGene Systematic Review, *Mov. Disord.* 33 (2018) 730–741. <https://doi.org/10.1002/mds.27352>.

### Vorträge

09/2017 90. DGN-Kongress, Leipzig  
Vortrag: “*TGM6*-Mutation p.Pro359Leu in einer serbischen Familie mit früh auftretendem Parkinson-Syndrom”

Lübeck, 13.1.2023