

Aus der
Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt
Neurodegenerative Erkrankungen

**Die Rolle von Varianten in den Genen UQCRC1 und
NUS1 bei der Entstehung des Parkinson-Syndroms**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Maas, Jordana Noemi

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Gasser

2. Berichterstatter: Professorin J. Schulze-Hentrich

Tag der Disputation: 28.04.2023

Meinen Eltern

1 Verzeichnisse

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Verzeichnisse</i>	4
1.1	Tabellenverzeichnis	6
1.2	Abbildungsverzeichnis	7
1.3	Abkürzungsverzeichnis	7
2	<i>Einleitung</i>	9
2.1	Das Parkinson-Syndrom	9
2.1.1	Historischer Hintergrund	9
2.1.2	Symptomatik.....	9
2.1.3	Klassifikation	10
2.1.4	Diagnosekriterien	11
2.1.5	Epidemiologie	12
2.1.6	Ätiologie.....	13
2.1.7	Pathogenese	20
2.1.8	Therapie.....	23
2.2	Zielsetzung und Fragestellung	23
3	<i>Material</i>	24
3.1	Oligonucleotide	29
4	<i>Methoden und Patientenkollektiv</i>	30
4.1	Auswahl des Studienkollektivs	31
4.1.1	UQCRC1	32
4.1.2	NUS1	33
4.2	DNS-Analyse	33
4.2.1	Verdünnung der DNS-Proben	33
4.2.2	Primeretablierung.....	34
4.2.3	Polymerasekettenreaktion	36
4.2.4	Gelelektrophorese	39
4.2.5	Aufreinigung	40

4.2.6	Sanger-Sequenzierung.....	41
4.2.7	Bestimmung der DNS-Sequenz.....	43
4.2.8	High Resolution Melting	44
4.3	Auswertung.....	46
4.3.1	Terminologie.....	46
4.3.2	Allelfrequenzen.....	46
4.3.3	Datenbanken	47
4.3.4	Vorhersageprogramme	47
4.3.5	Stammbäume	49
4.3.6	Statistik.....	49
5	Ergebnisse	50
5.1	Demographie der Patientenkollektive	50
5.1.1	UQCRC1	50
5.1.2	NUS1	51
5.2	UQCRC1 Varianten.....	52
5.2.1	Gesuchte Varianten	52
5.2.2	Übersicht detektierte Varianten.....	52
5.2.3	p.R269H	52
5.2.4	p.N301S	55
5.2.5	p.G312S.....	57
5.2.6	p.E435K.....	60
5.2.7	Varianten in der untranslatierten Region.....	62
5.2.8	Intronische Varianten	62
5.3	NUS1 Varianten	62
5.3.1	p.P169R.....	63
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	65
6	Diskussion.....	66
6.1	Diskussion der Methodik	66
6.1.1	Diagnosesicherheit	66
6.1.2	Kriterien für die Kohorte von <i>UQCRC1</i>	66
6.1.3	Kriterien für die Kohorte von <i>NUS1</i>	68
6.1.4	Labormethoden	69
6.1.5	Auswertung	70

6.1.6	Vorhersageprogramme	71
6.2	Diskussion der Ergebnisse	72
6.2.1	UQCRC1	72
6.2.2	Pathophysiologische Hinweise auf eine Assoziation von <i>UQCRC1</i> - Varianten mit Morbus Parkinson	82
6.2.3	NUS1	84
6.3	Schlussfolgerung.....	86
6.4	Ausblick	88
7	Zusammenfassung	88
8	Literaturverzeichnis.....	90
9	Eigenanteilserklärung	101
10	Danksagung	102

1.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	verwendete Chemikalien	24
Tabelle 2:	verwendete Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3:	verwendete Enzyme und Kits	26
Tabelle 4:	gekaufte Puffer	27
Tabelle 5:	verwendete Geräte	27
Tabelle 6:	verwendete Software und Programme	28
Tabelle 7:	verwendete Primer	30
Tabelle 8:	PCR-Reaktionsansätze.....	35
Tabelle 9:	PCR Set-ups	36
Tabelle 10:	Protokoll der Touchdown-PCR TCHDOWN64 bzw. 68.....	37
Tabelle 11:	Protokolle der Sequenzier-PCR.....	42
Tabelle 12:	Reaktionsansatz Sequenzier-PCR	42
Tabelle 13:	Reaktionsansatz LightCycler Assay	44
Tabelle 14:	Protokoll für das High Resolution Melting	45
Tabelle 15:	Referenzsequenzen für die verschiedenen Spezies für die Gene <i>UQCRC1</i> und <i>NUS1</i>	48
Tabelle 16:	Definition der Variablen für die Berechnung der Odds Ratio	49
Tabelle 17:	Übersicht über die detektierten Varianten.....	52
Tabelle 18:	Übersicht über die Träger der Variante <i>p.R269H</i>	53

<i>Tabelle 19: Beurteilung der Pathogenität von Variante p.R269H und Darstellung ihrer Minor Allele</i>	
<i>Frequency (MAF)</i>	54
<i>Tabelle 20: Konservierungsanalyse der Aminosäure R an Pos. 269</i>	54
<i>Tabelle 21: Beurteilung der Pathogenität von Variante p.N301S und Darstellung ihrer Minor Allele</i>	
<i>Frequency (MAF)</i>	57
<i>Tabelle 22: Konservierungsanalyse der Aminosäure N an Pos. 301</i>	57
<i>Tabelle 23: Beurteilung der Pathogenität von Variante p.G312S und Darstellung ihrer Minor Allele</i>	
<i>Frequency (MAF)</i>	59
<i>Tabelle 24: Konservierungsanalyse der Aminosäure G an Pos. 312</i>	60
<i>Tabelle 25: Beurteilung der Pathogenität von Variante p.E435K und Darstellung ihrer Minor Allele</i>	
<i>Frequency (MAF)</i>	61
<i>Tabelle 26: Konservierungsanalyse der Aminosäure E an Pos. 435</i>	62
<i>Tabelle 27: detektierte Variante NUS1</i>	63
<i>Tabelle 28: Beurteilung der Pathogenität von Variante p.P169R und Darstellung ihrer Minor Allele</i>	
<i>Frequency (MAF)</i>	64
<i>Tabelle 29: Konservierungsanalyse der Aminosäure P an Pos. 169</i>	65

1.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Gelelektrophorese UQCRC1 Exon 5</i>	40
<i>Abbildung 2: Erkrankungsalter nach Geschlecht der Kohorte für UQCRC1</i>	51
<i>Abbildung 3: Erkrankungsalter nach Geschlecht der Kohorte für NUS1</i>	51
<i>Abbildung 4: Sequenzausschnitt von UQCRC1 Exon 7 um die Variante p.R269H (het.)</i>	54
<i>Abbildung 5: Stammbaum des Patienten mit der Variante p.N301S</i>	56
<i>Abbildung 6: Sequenzausschnitt von UQCRC1 Exon 8 um die Variante p.N301S (het.)</i>	56
<i>Abbildung 7: Stammbaum des Patienten mit der Variante p.G312S</i>	58
<i>Abbildung 8: Sequenzausschnitt von UQCRC1 Exon 8 um die Variante p.G312S (het.)</i>	59
<i>Abbildung 9: Sequenzausschnitt von UQCRC1 Exon 12 um die Variante p.E435K (het.)</i>	61
<i>Abbildung 10: Sequenzausschnitt von NUS1 Exon 2 um die Variante p.P169R (het.)</i>	64

1.3 Abkürzungsverzeichnis

<i>ATP</i>	<i>Adenosintri-phosphat</i>
<i>bp</i>	<i>Basenpaare</i>
<i>CBD</i>	<i>cortikobasale Degeneration</i>
<i>ddNTPs</i>	<i>Didesoxynucleotidtriphosphaten</i>
<i>DLB</i>	<i>Lewy-Körperchen-Demenz</i>
<i>DNS</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>

<i>dNTP</i>	<i>Desoxynucleotidtriphosphat</i>
<i>HRM</i>	<i>High Resolution Melting</i>
<i>LK</i>	<i>Lewy-Körperchen</i>
<i>MAF</i>	<i>Minor Allele Frequency</i>
<i>MP</i>	<i>Morbus Parkinson</i>
<i>MSA</i>	<i>Multisystematrophie</i>
<i>MoCA</i>	<i>Montreal Cognitive Assessment</i>
<i>OR</i>	<i>Odds Ratio</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
<i>PSP</i>	<i>progressive supranukleäre Parese</i>
<i>REM</i>	<i>Rapid Eye Movement</i>
<i>SNV</i>	<i>Einzelnukleotid-Polymorphismus</i>
<i>UTR</i>	<i>Untranslated Region</i>

2 Einleitung

2.1 Das Parkinson-Syndrom

2.1.1 Historischer Hintergrund

Das Parkinson-Syndrom, auch als Morbus Parkinson (MP) bezeichnet, wurde erstmals durch den britischen Arzt James Parkinson als „the Shaking Palsy“ im Jahre 1817 wissenschaftlich beschrieben.

Seine Beschreibung des nach ihm benannten Syndroms in „An Essay on the Shaking Palsy“ beinhaltete akkurate Beobachtungen einiger motorischer und nicht-motorischer Symptome. Beispielsweise nannte er unilateral beginnenden Ruhetremor, ein kleinschrittiges Gangbild, Anlauf- sowie Abbremshemmung und Propulsionstendenz als Charakteristika des Krankheitsbildes, ebenso wie Schlaf- und Verdauungsstörungen (Obeso et al., 2017, Parkinson, 1969).

2.1.2 Symptomatik

Die vier motorischen, klinischen Leitsymptome von MP sind Bradykinese, Ruhetremor, Rigor und posturale Instabilität (Ferreira and Massano, 2017). Es resultiert ein typisches Gang- und Standbild, welches etwa durch einen kleinschrittigen schlurfenden Gang, reduziertes Mitschwingen der Arme, eine Anlauf- und Abbremshemmung sowie eine Retro-, Latero- und Propulsionstendenz mit erhöhter Sturzgefahr charakterisiert ist (Sveinbjornsdottir, 2016).

Bei fortgeschrittenem Morbus Parkinson kommt es zudem häufig zu Hypomimie, Mikrographie, Dysphagie und Dysarthrie (Jankovic, 2008).

Bereits Jahre vor den ersten motorischen Symptomen kann es zum Auftreten nicht-motorischer Symptome kommen wie beispielsweise Rapid Eye Movement (REM)-Schlaf-Verhaltensstörungen, Obstipation, Hyposmie, Depression und kognitiver Abbau sowie exzessive Tagesschläfrigkeit (Armstrong and Okun, 2020). Mit Fortschreiten der Erkrankung sind es häufig die nicht-motorischen Symptome, die das klinische Bild dominieren und den größeren Einfluss auf die Lebensqualität der Betroffenen haben (Schapira et al., 2017).

2.1.3 Klassifikation

Der Begriff „Parkinsonismus“ beschreibt keine klar abzugrenzende, einheitliche Erkrankung, sondern umfasst eine Vielzahl verschiedener Krankheitsentitäten, die sich unter diesem Oberbegriff zusammenfassen lassen.

Parkinson-Syndrome lassen sich anhand ihrer klinischen Präsentation und der Ätiologie einteilen. So muss unterschieden werden zwischen dem idiopathischen Parkinson-Syndrom (gleichbedeutend mit Morbus Parkinson), genetisch bedingten Formen des Morbus Parkinson, sekundären Parkinson-Syndromen und atypischen Parkinson-Syndromen.

Die vorliegende Arbeit behandelt den Morbus Parkinson.

1. Morbus Parkinson

Die klinische Diagnose eines Morbus Parkinson erfolgt nach Ausschluss eines sekundären oder atypischen Parkinson-Syndroms und ist mit einem Anteil von etwa 75 % das häufigste Parkinson-Syndrom (Alvarez et al., 2007).

Schätzungsweise 5-10 % der Patienten erkranken an einer monogen bedingten Form von MP, wobei sowohl autosomal-dominante als auch autosomal-rezessive Varianten als Ursache ausgemacht werden konnten (Lill, 2016).

2. Sekundäre Parkinson-Syndrome

Sekundäre Parkinson-Syndrome hingegen sind medikamenteninduziert, etwa durch typische Antipsychotika, oder treten im Rahmen einer anderen Grunderkrankung auf.

3. Atypische Parkinson-Syndrome

Atypische Parkinson-Syndrome wie die Lewy-Körperchen-Demenz (DLB), die kortikobasale Degeneration (CBD), die progressive supranukleäre Parese (PSP) oder die Multisystematrophie (MSA) sind durch zusätzliche neurologische Befunde wie beispielsweise Blickparesen im Falle der PSP (Höglinger et al., 2017) oder einen anderen klinischen Verlauf

gekennzeichnet. Das Ansprechen auf Levodopa ist meist schlecht und häufig geht die Erkrankung mit einer frühen dementiellen Entwicklung einher (Levin et al., 2016).

2.1.3.1 Einteilung von Morbus Parkinson in Stadien

Zur besseren Vergleichbarkeit von Studienkohorten kann die Stadieneinteilung nach Hoehn und Yahr aus dem Jahr 1967 verwendet werden (Hoehn and Yahr, 1967).

Diese unterscheidet in:

- Stadium 1: unilaterale Symptomatik, keine oder wenig funktionelle Beeinträchtigung
- Stadium 1,5: unilaterale Symptomatik mit axialer Beteiligung
- Stadium 2: Bilaterale Beteiligung ohne Beeinträchtigung des Gleichgewichts
- Stadium 2,5: Bilaterale Symptomatik, Ausgleich beim Pull-Test
- Stadium 3: milde bis moderate Behinderung
- Stadium 4: Vollbild der Erkrankung mit starker Beeinträchtigung, Gehfähigkeit erhalten aber eingeschränkt
- Stadium 5: Bettlägerigkeit oder Rollstuhlbindung

2.1.4 Diagnosekriterien

Die Diagnose MP ist zu Lebzeiten des Patienten eine klinische Diagnose, erst post mortem kann eine histopathologische Sicherung erfolgen (Samii et al., 2004). In späten Stadien und zur Differenzierung von atypischen Parkinson-Syndromen kann eine Magnetresonanztomographie-Bildgebung Aufschluss geben (de Oliveira and Pereira, 2017), ebenso wie die cerebrale Einzel-Photonen-Emissions-Computertomographie mit Tracern für den Dopamintransporter (DaT-SPECT) oder die ¹⁸F-Dopa-Positronen-Emissions-Tomographie (Sakakibara et al., 2020).

In rund 75-95 % der Fälle kann die klinische Diagnose post mortem histopathologisch bestätigt werden (Hughes et al., 2001), die klinische

Diagnosesicherheit hängt dabei von der Expertise des Untersuchers, der Krankheitsdauer und dem Alter des Patienten ab.

Die „MDS Clinical Diagnostic Criteria for Parkinson´s Disease“ von 2015 unterscheiden in klinisch etablierten MP mit einer niedrigen Sensitivität und einer hohen Spezifität von 90 % und in klinisch wahrscheinlichen MP mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 80 %.

Die drei dort aufgeführten motorischen Leitsymptome sind Bradykinese, Rigor und ein Ruhetremor mit einer Frequenz von 4-6 Hertz, wobei Bradykinese in Kombination mit mindestens einem der beiden anderen Symptome die Grundvoraussetzung für die Diagnose ist (Postuma et al., 2015).

Die häufig in der Literatur mit genannte posturale Instabilität findet hier keine Nennung, da sie nicht spezifisch ist (Samii et al., 2004) und ihr Auftreten in frühen Stadien eine sogenannte Red Flag, ein Warnhinweis, für das Vorliegen der Alternativdiagnose einer PSP darstellt (Köllensperger et al., 2008).

Zusätzlich zu der vorhandenen Grundvoraussetzung darf kein absolutes Ausschlusskriterium wie beispielsweise eine cerebelläre okulomotorische Pathologie, eine unauffällige Bildgebung des präsynaptischen dopaminergen Systems (in der DaT-SPECT bzw. ¹⁸F-Dopa-Positronen-Emissions-Tomographie) oder eine Beschränkung des Parkinsonismus auf eine untere Extremität für mehr als drei Jahre vorliegen. Ein sehr rasches Voranschreiten der Erkrankung spricht ebenfalls gegen das Vorliegen eines MPs und zählt zu den Red Flags.

Zur genaueren Diagnostik finden noch supportive Kriterien wie etwa das gute Ansprechen auf Levodopa oder das Vorliegen einer Anosmie Anwendung (Postuma et al., 2015).

2.1.5 Epidemiologie

MP stellt die weltweit häufigste Bewegungsstörung und nach der Alzheimer-Demenz die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar (Lill, 2016) und hat einen stark negativen Einfluss auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität (Health Related Quality of Life) der Betroffenen (Saarni et al., 2006).

Weltweit beträgt die Inzidenz 8-18/100.000 Personenjahre (Lill, 2016), die Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter von etwa 1-2 % bei der Bevölkerung

über 60 Jahren auf ca. 3,5 % der Population zwischen 85 und 89 Jahren (Rizek et al., 2016).

Schätzungen zufolge könnte sich die Prävalenz in den zehn bevölkerungsreichsten Ländern der Welt bis 2030 im Vergleich zu 2005 mehr als verdoppeln, von ca. 4 Millionen auf rund 9 Millionen Betroffene (Lill, 2016). Dies könnte auf die Erhöhung der Lebenserwartung, aber auch die steigende Exposition gegenüber umweltbedingten Risikofaktoren zurückzuführen sein (Tysnes and Storstein, 2017).

Schon heute bringt die medizinische Versorgung von Parkinsonkranken hohe Kosten mit sich, die verbesserte Therapie und eine mögliche Prävention haben also nicht nur gesellschaftliche, sondern auch ökonomische Relevanz: allein in den USA betragen im Jahr 2017 die direkten und indirekten Kosten durch MP rund 25 Milliarden US Dollar jährlich (Fredericks et al., 2017).

2.1.6 Ätiologie

MP macht mit etwa 75 % den größten Anteil der Parkinson-Syndrome aus.

Es wird angenommen, dass ätiologisch ein komplexes Zusammenspiel aus Genetik, Epigenetik und Umweltfaktoren zu Grunde liegt, eine eindeutige genetische Ursache ist nicht zu determinieren.

Inzwischen konnten einige Risikofaktoren identifiziert werden welche die Erkrankungswahrscheinlichkeit erhöhen, beispielsweise Pestizide oder vorangegangene Kopfverletzungen (Noyce et al., 2012).

Auch legten einige Studien nahe, dass Depressionen die Erkrankungswahrscheinlichkeit erhöhen könnten (Wang et al., 2018), andererseits sind sie ein Symptom von MP, welches bereits im prodromalen Stadium auftreten kann (Berg et al., 2015).

Hingegen scheinen Koffein und körperliche Betätigung eher protektive Faktoren darzustellen (Delamarre and Meissner, 2017) (Bellou et al., 2016).

Schon lange gibt es die Feststellung, dass MP in einigen Familien auffällig gehäuft auftritt (Allan, 1937). Eine solche Häufung impliziert eine genetische Komponente bei der Manifestation der Erkrankung, und in den vergangenen

Jahrzehnten konnten einige dieser genetischen Einflussfaktoren identifiziert werden.

Die Spanne der Auswirkungen genetischer Veränderungen reicht hierbei von Polymorphismen, die definitionsgemäß mindestens mit einer Allelfrequenz von 1 % oder häufiger in der Bevölkerung zu finden sind und nur einen geringen Effekt auf das Erkrankungsrisiko haben, bis hin zu sehr seltenen Varianten mit starken Auswirkungen (Lill, 2016).

In Bezug auf den Vererbungsmodus wurden sowohl dominante als auch rezessive Erbgänge beschrieben, auch die Penetranz ist sehr variabel.

Zum momentanen Zeitpunkt konnten über 90 unabhängige genomweit signifikante Risikovarianten, verteilt auf 78 Genorte (Loci), identifiziert werden. Diese erklären etwa 16-36 % des erblichen Erkrankungsrisikos in Abhängigkeit von der Prävalenz (Nalls et al., 2019).

Ca. 5-10 % aller Fälle von MP lassen sich nach aktuellem Kenntnisstand auf seltene Mutationen mit starkem Effekt (monogene Ursachen) zurückführen (Lill, 2016). Im Folgenden finden sich einige Beispiele, die exemplarisch die Diversität genetischer Faktoren in der Ätiologie von MP darstellen sollen.

2.1.6.1 Etablierte pathogene Varianten

2.1.6.1.1 SNCA

Mutationen codierender Bereiche des Gens *SNCA*, welches für das Protein alpha-Synuclein codiert, wurden als erste genetische Veränderung im Jahre 1997 im Zusammenhang mit der Entstehung von MP beschrieben und folgen einem autosomal-dominanten Vererbungsmodus (von Bohlen und Halbach, 2004).

Sowohl bestimmte Punktmutationen als auch Duplikationen und Triplikationen des Wildtyps der entsprechenden Region gehen mit einem deutlich erhöhten Erkrankungsrisiko einher.

Der genaue Mechanismus, wie alpha-Synuclein die Entstehung von Parkinson beeinflusst, ist aktuell nicht bekannt. Eine veränderte Proteinstruktur von *SNCA*, etwa durch die Varianten p.A53T oder p.A30P, hemmt den Abbau des Proteins

alpha-Synuclein und führt somit zu seiner Akkumulation, ebenso wie eine Überexpression durch Duplikationen und Triplikationen (Cuervo et al., 2004). Die Aggregation des Monomers alpha-Synuclein führt zur Ausbildung von Oligomeren, denen Neurotoxizität zugeschrieben wird (Cremades et al., 2012). Die Oligomere können auf vielfältige Weise zytotoxisch wirken: die mitochondriale Atmungskette kann durch Beeinträchtigung von Komplex I gestört sein, das endoplasmatische Retikulum (ER) kann zellulären Stress erfahren, Proteasomen und Lysosomen können in ihrer Funktion gehemmt werden und die Akkumulation von alpha-Synuclein scheint die physiologische Funktion der Synapsen zu beeinträchtigen. Des Weiteren können die Oligomere über die Induktion der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies die Apoptose induzieren (Du et al., 2020).

Im Laufe der Zeit formen sich die Oligomere zu Fibrillen und schließlich zu Lewy-Körperchen (LK).

Speziell an *SNCA*-Varianten ist, dass sich ein Gendosiseffekt beobachten lässt, anders als beispielsweise bei *LRRK2* (Kasten and Klein, 2013).

Hierdurch sind Triplikationen für einen durchschnittlich 10 Jahre früheren Erkrankungsbeginn und einen schwereren Verlauf verantwortlich als Duplikationen.

Auch Duplikationen gehen allerdings mit einem im Vergleich zum IPS früheren Erkrankungsalter und einem allgemein rascheren Verlauf einher und sind häufig von früher dementieller Entwicklung begleitet (Schneider and Alcalay, 2017).

Die bekannten Punktmutationen unterscheiden sich ebenfalls in ihren klinischen Auswirkungen, so geht p.A53T beispielsweise mit einem im Mittel 10 Jahre früheren Erkrankungsalter einher als p.H50Q (Kasten and Klein, 2013).

Die Penetranz bei Trägern von Punkt-Varianten und Triplikationen ist fast vollständig, wohingegen die Penetranz bei Trägern der Duplikationen bei 30-50 % liegt (Schneider and Alcalay, 2017, Papadimitriou et al., 2016).

Häufige nicht-kodierende Varianten (sogenannte Common Variants) von *SNCA* erhöhen zudem das Erkrankungsrisiko für sporadischen Morbus Parkinson (Schulte and Gasser, 2011, Miyake et al., 2012). Beispielsweise sind Common Variants im Bereich von Intron 4 bis zum 3'Ende von *SNCA* mit einer Minor Allele

Frequency (MAF) von 38 % mit einem relativen Risiko von 1,4 und einem attributablen Risiko von ca. 29 % im Vergleich zum Wildtyp assoziiert (Mueller et al., 2005).

2.1.6.1.2 *PRKN*

Seit 1998 sind Varianten, insbesondere Deletionen, Copy Number Variations und Punkt-Mutationen die zum Funktionsverlust führen, im Gen *PRKN* (ehemals: *PARK2*) auf Chromosom 6q25.5-27 als Ursache für früh beginnende autosomal-rezessive Parkinson-Erkrankungen bekannt (Mizuno et al., 2001).

Bei dem Genprodukt handelt es sich um Parkin, eine Ubiquitin-Protein-Ligase (E3), die zusammen mit dem Protein PINK1 eine wichtige Rolle bei der selektiven Autophagie dysfunktionaler Mitochondrien spielt, indem es diese - stimuliert durch PINK1 - ubiquitiniert und damit für den Abbau markiert (Pickrell and Youle, 2015).

Parkin ist ebenfalls in die Ubiquitinierung verschiedener Proteine und in die Regulation von Genexpression involviert, weshalb es bei Fehlfunktion der Ligase zur Akkumulation von für den Abbau vorgesehenen Substraten kommen kann (Bonifati, 2012).

Die beschriebene Frequenz von möglicherweise kausalen Varianten in *PRKN* variiert: 8,6 % in einer britischen Kohorte mit einem Erkrankungsalter von unter 46 Jahren (Kilarski et al., 2012), 5,3 % in einer serbischen Kohorte mit Erkrankungsalter von unter 50 Jahre und/oder positiver Familienanamnese (Jankovic et al., 2018).

Klinische Merkmale sind ein medianes Erkrankungsalter von etwa 31 Jahren (Kasten et al., 2018) und ein im Vergleich zum sporadischen MP langsamerer Verlauf mit gutem Ansprechen auf Levodopa ohne atypische Symptome. Häufig ist keine Lewy-Körperchen Pathologie in der Autopsie festzustellen (Yu et al., 2021).

Meist sind zu Beginn der Symptomatik Dystonie und Rigor präsent (Bonifati, 2012).

2.1.6.1.3 *LRRK2*

Varianten, die das für die Leucine-Rich-Repeat-Kinase 2 (*LRRK2*) codierende Gen in Chromosom 12p11.2-q13.1 (Locus *PARK8*) betreffen, sind seit 2004 ebenfalls als Ursache für autosomal-dominant vererbte und für scheinbar sporadische Formen des spät beginnenden MP bekannt (Zimprich et al., 2004). Zahlreiche funktionelle Domänen sind auf dem *LRRK2*-Gen lokalisiert, unter anderem Kinase-Domänen. Es wird angenommen, dass eine gesteigerte Kinaseaktivität mit der Bildung von LK und nigrostrialer Degeneration einher geht und somit die Entstehung von MP fördert (Kim and Alcalay, 2017).

Substrate der Leucine-Rich-Repeat-Kinase 2 sind beispielsweise Rab GTPasen, welche die Funktion von Endosomen und verschiedene Signalkaskaden beeinflussen (Kim and Alcalay, 2017).

Eine *LRRK2*-Variante, p.G2019S, ist die weltweit häufigste Ursache des genetisch verursachten MPs und etwa bei 30% der scheinbar sporadischen MP-Fälle bei Ashkenazi-jüdischen sowie arabischen Patienten in Nordafrika zu finden. In Asien und Europa ist die Frequenz mit 0,1-4% wesentlich geringer (Trinh et al., 2018).

Die Angaben zur Penetranz variieren deutlich, auch in Abhängigkeit von der Ethnie. So entwickelten in einer tunesischen Kohorte 60 % der p.G2019S-Träger bis zum Alter von 60 Jahren MP, in einer norwegischen Population waren es lediglich 20 % (Hentati et al., 2014).

In Bezug auf die Neuropathologie mit LK und Lewy-Neuriten sowie Zelluntergang in vulnerablen Arealen und in Bezug auf das Therapieansprechen sind die Fälle von *LRRK2*-assoziiertem MP dem idiopathischen Parkinson sehr ähnlich (Tolosa et al., 2020). Was den klinischen Verlauf betrifft, so scheinen die motorischen und nicht-motorischen Symptome gar etwas geringer ausgeprägt zu sein als beim IPS (Healy et al., 2008).

Ein weitere Unterschied zum IPS ist, dass das männliche Geschlecht bei *LRRK2*-Mutationsträgern keinen Risikofaktor darstellt (Gan-Or et al., 2015).

Für Träger von *LRRK2*-Varianten sind sogenannte krankheitsmodifizierende Therapien des MPs vielversprechend: präklinische Studien haben gezeigt, dass die Reduktion der *LRRK2*-Aktivität mittels Small-Molecule-Inhibitoren neuroprotektiv wirken könnten (Tolosa et al., 2020).

2.1.6.2 In dieser Arbeit untersuchte Varianten

2.1.6.2.1 *UQCRC1*

Im April 2019 beschrieben Lin et al. einen möglichen Zusammenhang von Varianten des Gens *UQCRC1*, welches für das Ubiquinol-Cytochrome-C-Reductase-Core-1 Protein codiert, mit der Entstehung von MP.

Dieses Protein ist Bestandteil des Komplex III der mitochondrialen Atmungskette, seine genaue Funktion ist zum aktuellen Zeitpunkt unklar (Shan et al., 2019).

Eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette wird als eine mögliche Ursache für die Entstehung von MP schon lange diskutiert (Langston et al., 1983) und wurde hier auch für Varianten von *UQCRC1* postuliert (Lin et al., 2020a).

Die Arbeitsgruppe von Lin et al. führte eine Sequenzierung des gesamten Exoms bei drei betroffenen Mitgliedern einer taiwanesischen Familie mit spät beginnendem, autosomal-dominantem Parkinson-Syndrom und Polyneuropathie durch, wobei die heterozygote Substitution c.941A>C (p.Y314S) in dem Gen *UQCRC1* auffiel (Lin et al., 2020b).

Diese Variante cosegregierte in der Indexfamilie mit der Erkrankung, so lag die Variante bei den insgesamt fünf Betroffenen vor, nicht jedoch bei den ebenfalls untersuchten fünf gesunden Familienmitgliedern.

In einer größeren Patienten-Kohorte wurden weitere seltene Varianten detektiert, keine dieser Varianten kam in der von der Arbeitsgruppe untersuchten Kontrollgruppe aus taiwanesischen und koreanischen Probanden vor. Die anschließend durchgeführten Experimente am Tier- und Zellmodell erhärteten den Verdacht eines funktionellen Zusammenhangs; so waren beispielsweise altersabhängige motorische Defekte mit Ansprechen auf Levodopa, periphere Neuropathie und der Verlust dopaminergener Neurone bei Knock-in-Mäusen zu beobachten.

In weiteren Studien konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Varianten von *UQCRC1* und der Entstehung von MP in einer chinesischen und einer europäischen Kohorte hergestellt werden (Lin et al., 2020c) (Senkevich et al., 2020), so dass die Frage nach der Kausalität weiterhin kontrovers zu diskutieren bleibt.

2.1.6.2.2 *NUS1*

Im Oktober 2018 beschrieben Guo und Mitarbeiter einen möglichen Einfluss von de novo Varianten des Gens *NUS1* (Dehydrodolichyl-Diphosphate-Synthase-Subunit 1) auf die Entstehung von sporadischem MP mit frühem Erkrankungsbeginn (Guo et al., 2018).

Das Genprodukt ist ein transmembraner Rezeptor, eine Untereinheit der Cis-Prenyltransferase, welcher spezifisch für den neuronalen und kardiovaskulären Regulator Reticulon 4B (Nogo-B) ist.

Nogo-B spielt eine Rolle bei der Glykosylierung von Proteinen und bei der Synthese von Dolichol (Park et al., 2014) und ist an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, wo es zur Erhaltung der physiologischen Form beiträgt (Rämö et al., 2016).

Außerdem interagiert *NUS1* mit dem Cholesterol-bindenden Protein Niemann-Pick Typ C2 (*NPC2*), welches eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport von Low Density Lipoproteins spielt (Harrison et al., 2009).

Seltene Varianten der Gene *NPC1* und *NPC2* wurden bereits vereinzelt im Zusammenhang mit der Entstehung von MP beschrieben (Kluenemann et al., 2013).

Die Studie von Guo et al. untersuchte 39 chinesische MP-Patienten mit frühem Erkrankungsbeginn, hier definiert mit einem Erkrankungsalter von unter 40 Jahren, mittels Sequenzierung des gesamten Exoms und verglich die Exomdaten mit denen der gesunden Eltern und Geschwister, um de novo Varianten zu identifizieren.

NUS1 wurde dadurch als Kandidatengen bestimmt und Varianten in diesem Gen kamen in zwei nachfolgenden, zusätzlichen großen Kohorten mit signifikanter

Häufung bei Parkinsonpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen vor. Dies führte zum Verdacht eines funktionellen Zusammenhangs, welcher sich in Tierexperimenten am Drosophila-Modell unter anderem durch die Beobachtung einer reduzierten Anzahl dopaminerger Neurone erhärtete (Guo et al., 2018).

In nachfolgenden Studien konnten die signifikanten Ergebnisse jedoch weder in einer chinesischen noch einer europäischen Kohorte repliziert werden (Chen et al., 2020) (Bustos et al., 2020), so dass die Bedeutung von *NUS1* Varianten bei der Entstehung von MP nicht eindeutig geklärt werden konnte und weiterer Untersuchung bedarf.

2.1.7 Pathogenese

Pathophysiologisch liegt Morbus Parkinson ein Verlust dopaminerger Neurone der Substantia nigra pars compacta als morphologisches Korrelat zu Grunde (Ferreira and Massano, 2017).

Besonders betroffen ist der ventrolaterale Bereich der Substantia nigra pars compacta mit Projektion in das posterolaterale Putamen (Dickson, 2018). Der Verlust dieser dopaminerger Neurone, die als Teil der Basalganglienschleife Bewegungsabläufe modifizieren, geht mit einer Reduktion des prokinetischen Anteils der Basalganglien und somit mit einer Inhibition von Bewegungen einher. Die Ursache dieses Verlusts ist bisher nicht eindeutig geklärt, vermutet wird beispielsweise ein Zusammenhang mit der Ubiquitinierung von Proteinen, Vesikelfusion oder der Dysfunktionalität von Mitochondrien (Sulzer, 2007).

2.1.7.1 Lewy-Körperchen

In den meisten Fällen findet sich in den Axonen und Perikarya der verbleibenden Neuronen der Substantia nigra pars compacta sowie beispielsweise in dem Hypothalamus, dem Locus caeruleus, dem Cortex und dem dorsalen Vagus Kern sogenannte Lewy-Körperchen die dort akkumulieren (Wakabayashi et al., 2013). Dies ist jedoch nicht zwangsläufig so, bei einigen Trägern von Varianten der Gene *PINK1*, *PRKN* und *LRRK2* scheinen die LK zu fehlen (Schneider and Alcalay, 2017, Zimprich et al., 2004).

LK sind auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie DLB, Alzheimerdemenz und MSA vorzufinden (Rocha et al., 2018).

LK bestehen hauptsächlich aus dem Protein alpha-Synuclein, dem Genprodukt von *SCNA*, welches physiologischerweise in alpha-helikaler Form vorliegt, in einigen Fällen aber in eine beta-Faltblattreiche Konformation transformiert wird. In dieser Konformation neigen die Proteine zur Ausbildung toxischer Oligomere und Amyloidplaques (Olanow and Brundin, 2013).

Zudem enthalten LK Produkte anderer mit MP assoziierter Gene, unter anderem von *PARK7*, *LRRK2*, *PRKN* und *PINK1* (Wakabayashi et al., 2013) und viele andere Zellbestandteile wie Lipide.

Der Mechanismus der Verbreitung (das sog. Spreading) der Lewy-Pathologie ist noch nicht abschließend geklärt, eine Vermutung ist beispielsweise, dass fehlgefaltetes beziehungsweise aggregiertes alpha-Synuclein die Fehlfaltung benachbarter alpha-Synuclein Proteine induziert und durch Exo- und Endozytose an empfängliche benachbarte Neurone übertragen wird und es somit zu einer prionenartigen Verbreitung kommt (Henderson et al., 2019). Andere Studien legen hingegen nahe, dass das Modell einer prionenartigen Verbreitung zu simpel ist und die selektive Vulnerabilität der einzelnen Neurone (erhöht etwa durch ein langes, verzweigtes Axon und erhöhten Calciumeinstrom) eine wichtige Rolle spielt (Surmeier et al., 2017).

Ein monokausaler Zusammenhang mit dem Verlust dopaminerger Neurone scheint nicht zu bestehen, denn das Vorhandensein von LK in einem Neuron ist kein sicheres Indiz für seinen Zelltod (Sulzer, 2007).

2.1.7.2 Mitochondriale Dysfunktion

Eine gestörte Funktion von Mitochondrien ist ebenfalls ein Erklärungsansatz für die Pathogenese von MP.

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle für die physiologische Zellfunktion und -erhaltung: die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP), die Beta-Oxidation von Fettsäuren, die Regulation des Zelltods und -wachstums und sowie der Calciumhomöostase gehören zu ihren Funktionen, außerdem sind sie an zahlreichen Biosynthesewegen beteiligt (Spinelli and Haigis, 2018).

Die zufällige Beobachtung, dass der Konsum der Substanz 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydropyridin, einem Inhibitor von Komplex I, III und IV der mitochondrialen Atmungskette, zu medikamenteninduziertem Parkinsonismus führt, legte den Grundstein für diese Theorie (Langston et al., 1983).

Es konnte beobachtet werden, dass beispielsweise die Funktion des Komplex I der Atmungskette bei Parkinsonpatienten unter anderem in der Substantia nigra, den Thrombozyten und der Skelettmuskulatur häufig beeinträchtigt ist (Chaturvedi and Beal, 2008).

Dass die selektive Beeinträchtigung von Komplex I parkinsonähnliche Symptome und neuronalen Zellverlust hervorrufen kann, konnte auch im Tierexperiment gezeigt werden (Burns et al., 1985).

Eine Beeinträchtigung der Atmungskette führt zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und reaktiver Stickstoffspezies, Energieverlust und schließlich zur Apoptose (Cerri and Valente, 2020).

Varianten der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (DNS) konnten in zahlreichen Patienten beobachtet werden (Luoma et al., 2007, Bender et al., 2006). Ebenso beeinträchtigen Varianten der zellulären DNS, beispielsweise der parkinsonassoziierten Gene *PINK1*, *PRKN* und *PARK7*, die mitochondriale Atmungskette (Grünewald et al., 2019).

Auch die Überexpression von alpha-Synuclein scheint die Funktion der Mitochondrien zu beeinträchtigen (Hsu et al., 2000, Lin et al., 2019), und eine beeinträchtigte mitochondriale Atmungskette scheint wiederum die Akkumulation von alpha-Synuclein zu fördern (Nisticò et al., 2011).

Der Zelltod speziell von dopaminergen Neuronen ließe sich dadurch erklären, dass eine pathogene Kaskade zu beobachten ist, bei der dysfunktionale Mitochondrien über dysfunktionale Lysosomen zur Fehlfunktion der Neuronen führen und sich diese Kaskade bei hohen intrazellulären Dopaminspiegeln verstärkt (Burbulla et al., 2017).

2.1.8 Therapie

Für die Behandlung von MP stehen heutzutage eine Vielzahl an symptomatischen, nicht jedoch kausalen Therapien zur Verfügung, die je nach Alter, Krankheitsverlauf und vordergründiger Symptomatik ausgewählt werden sollten. Verwendete Substanzklassen der medikamentösen Behandlung sind etwa Levodopa als Monotherapie oder in Kombination mit Decarboxylasehemmern, Dopaminagonisten, Monoaminoxidase-B-Hemmern, Catechol-O-Methyl-Transferase-Inhibitoren, N-Methyl-D-Aspartat-Antagonisten und Anticholinergika (Armstrong and Okun, 2020).

Bei geeigneten Patienten kann auch eine tiefe Hirnstimulation des Nucleus subthalamicus oder des Globus pallidus internus vorgenommen werden, die sowohl motorische als auch nicht motorische Beschwerden und die Lebensqualität relevant verbessern kann (Fasano et al., 2012, Deuschl et al., 2006).

Ergänzend kommen aktivierende Therapien in Form von Physiotherapie, Logopädie, sportlichem Training oder Ergotherapie sowie kognitivem Training zum Einsatz, die den Patienten auch die Erfahrung von Selbstwirksamkeit ermöglichen und so das Coping verbessern können (Witt et al., 2017).

2.2 Zielsetzung und Fragestellung

Morbus Parkinson ist eine weit verbreitete neurodegenerative Erkrankung, die für die Betroffenen und ihre Angehörigen eine große Belastung darstellt und mit einem hohen Verlust an qualitätsbezogenen Lebensjahren einhergeht.

Mit dem demographischen Wandel und der zunehmenden Alterung der Bevölkerung nimmt die Prävalenz dieser Krankheit weiter zu, und auch die finanzielle Belastung des Gesundheitssystems steigt.

Für eine optimale Behandlung dieser Patienten mangelt es aktuell jedoch noch an Wissen über die komplexen Ursachen und Mechanismen der Erkrankung.

Durch ein besseres Verständnis der Rolle genetischer Faktoren bei der Entstehung des Parkinson-Syndroms können neue Erkenntnisse über die noch unzureichend erforschten, pathophysiologischen Hintergründe der Krankheit

gewonnen werden, was gegebenenfalls auch zur Entwicklung neuer, verbesserter Therapieansätze beitragen kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Beurteilung der Rolle von Varianten der Gene *UQCRC1* und *NUS1* bei der Entstehung von Morbus Parkinson.

Hierzu sollen anhand genetischer Untersuchungen, statistischer Analysen und Auswertungen klinischer Daten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Gibt es in der untersuchten Kohorte von Parkinsonpatienten Varianten der Gene *UQCRC1* und *NUS1*, die signifikant häufiger auftreten als in einer neurologisch gesunden Referenzkohorte?
2. Können Varianten identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit als pathogen einzuschätzen sind?
3. Können die von Lin et al. 2020 beschriebenen Varianten des Gens *UQCRC1* auch in der untersuchten Kohorte detektiert werden, die sich ethnisch von der von Lin et al. untersuchten Kohorte unterscheidet?
4. Können die von Guo et al. 2018 beschriebenen Varianten des Gens *NUS1* auch in der untersuchten Kohorte detektiert werden, die sich ethnisch von der von Guo et al. untersuchten Kohorte unterscheidet?
5. Lässt sich im Falle von mehrfach detektierten Varianten ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp herstellen?

3 Material

Die folgenden Tabellen 1-6 geben eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Materialien.

Tabelle 1: verwendete Chemikalien

Name	Katalognr.	Lot-Nr.	Bezugsquelle	
Betaine	B0300-1VL	SLBW8334	Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Borsäure (61,83 g/mol)	P010,3	334213727	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland

DMSO Dimethyl Sulfoxide (78,13g/mol)	D4540-1L	BCBZ7129	Sigma-Aldrich Produktions GmbH	Steinheim am Albuch, Deutschland
dNTP Set (4x 25 µmol)	R0182	00061338	Thermo Fisher Scientific GmbH	Darmstadt, Deutschland
EDTA Ethylendiamintetra-essigsäure (372,24 g/mol)	8043,2	339286420	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100%	ETO-5000-99-1	20200715	SAV-Liquid Production GmbH	Flintsbach, Deutschland
Gene Ruler DNS Ladder Mix (0,5µg/µl)	SM0331	00621298	Thermo Fisher Scientific GmbH	Darmstadt, Deutschland
HIDI™ Formamide	4311320	2008715	Thermo Fisher Scientific GmbH	Darmstadt, Deutschland
Magnesium Chloride Solution (25mM)	A3511	0000272002	Promega GmbH	Mannheim, Deutschland
Midori Green Advance DNS Stain	MG04	762MG04020	Nippon Genetics Europe GmbH	Dueren, Deutschland
Natriumacetat 3M	27810.295	110294007	VWR International	Radnor, Pennsylvania, USA
Sea Kem LE Agarose	50004	0000866698	Lonza	Basel, Schweiz
Tris Ultrapure (121,14 g/mol)	A1086,5000	501178946	PanReac Applichem	Darmstadt, Deutschland

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 2: verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle		
96-Well PCR Platten	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland	
96 Septa Matten für 3500Dx/3500xL Genetic Analyzers	Thermo Fisher Scientific GmbH	Darmstadt, Deutschland	
96-well Matten	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland	
96-well Mikroplatten	U-Boden, Polypropylen Greiner Bio-One GmbH	Nürtingen, Deutschland	

96-well PCR Platten, ABI Sequenzer 3100/30		Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Combitips advanced®	0,1 ml, 0,2 ml, 1,0ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tubes®	1,5 ml und 2,0ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Gelkammer		Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Parafilm "M"®		Bemis	Neenah, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen	10 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH	Nürtingen, Deutschland
Pipettenspitzen	200 µl	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionstubes	1,5 ml, Polypropylen	Greiner Bio-One GmbH	Nürtingen, Deutschland
Standardkamm	1,5 mm, 20 well	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
SurPhob® Safe Seal 10 µl Filterspitzen		Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
SurPhob® Safe Seal 20 µl Filterspitzen		Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Thermopapier für Digitalprinter P-95DE		Mitsubishi Electric Europe B.V.	Ratingen, Deutschland
Tube Strips	0,2 ml	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 3: verwendete Enzyme und Kits

Name	Katalognr.	Lot-Nr.	Bezugsquelle
GoTaq® G2 DNS Polymerase (5U/µl, 500U)	M784B	0000343377	Promega GmbH Mannheim, Deutschland
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	04909631001	10382900	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	4336919	0067321	Thermo Fisher Scientific GmbH Darmstadt, Deutschland

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 4: gekaufte Puffer

Name	Katalognr.	Lot-Nr.	Bezugsquelle
5x Green GoTaq® Buffer	M791A	0000350567	Promega GmbH Mannheim, Deutschland
5x Sequencing Buffer BigDye Terminator	4339843	1908197	Thermo Fisher Scientific GmbH Darmstadt, Deutschland
Anode Buffer Container	4393927	2101137	Thermo Fisher Scientific GmbH Darmstadt, Deutschland
Buffer 10x für Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer	402824	1910511	Thermo Fisher Scientific GmbH Darmstadt, Deutschland
Cathode Buffer Container	4408256	2008682	Thermo Fisher Scientific GmbH Darmstadt, Deutschland

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 5: verwendete Geräte

Name	Bezugsquelle
Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific GmbH Darmstadt, Deutschland
Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific GmbH Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Computer	Fujitsu Technology Solutions GmbH Stuttgart, Deutschland
Digitalprinter P-95DE	Mitsubishi Electric Europe B.V. Ratingen, Deutschland
Elektrophorese Power Supply E835	Consort
Elektrophoresesystem	Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat Deutschland GmbH Eberhardzell, Deutschland
LightCycler® 96 System	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland
Magnetrührer MR300	Heidolph Instruments Labortechnik Schwabach, Deutschland
Mikrowelle	Panasonic Osaka, Japan
NanoDrop® Spectrophotometer ND- 2000	Thermo Fisher Scientific GmbH Darmstadt, Deutschland

Einfachpipetten 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette 100 µl Eppendorf Research 8 Kanal	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette 10 µl Eppendorf Research 8 Kanal	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Multipipette® M4 T100TM ThermalCycler	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie®2	Bio-Rad Laboratories GmbH Scientific Industries, Inc.	München, Deutschland Bohemia, New York, USA
Waage Explorer®	Ohaus Europe GmbH	Greifensee, Schweiz

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 6: verwendete Software und Programme

Anwendung	Software	Bezugsquelle	
Chromatogram viewer	FinchTV	Geospiza	Seattle, USA
Datenbearbeitung	Microsoft Excel 2021	Microsoft Corporation	Redmond, Washington, USA
Konservierungsanalyse	BLAST-P Zugriff 24.03.21	NCBI	Bethesda MD, USA
Schreibprogramm	Microsoft Office 2021	Microsoft Corporation	Redmond, Washington, USA
Sequenzier Programm	Sequencing Analysis Software 7	Thermo Fisher Scientific GmbH	Darmstadt, Deutschland
Stammbaumerstellung	Pedigree Chart Designer	CeGaT GmbH	Tübingen, Deutschland
Photometer Programm	NanoDrop 2000 V1.6.198	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Statistikprogramm	https://ihg.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl	Helmholtz Institut	München, Deutschland
Vorhersageprogramm	Combinded Annotation Dependent Depletion (CADD)	University of Washington, Hudson-Alpha Institute for Biotechnology and Berlin Institute of Health	Washington, USA
Vorhersageprogramm	MutationTaster	Charité Berlin	Berlin, Deutschland
Vorhersageprogramm	PolyPhen2	Harvard University	Boston, USA

Vorhersageprogramm	PROVEAN	J. Craig Venter Institute	Rockville, USA
Vorhersageprogramm	SIFT	Bioinformatics Institute	Singapore

Quelle: eigene Darstellung

3.1 Oligonucleotide

Die verwendeten Primer wurden mit dem Programm Primer-BLAST designt. Dieses Tool prüft die Primer auch auf Spezifität. Als Kriterien für die Primer wurde vorgegeben, dass diese mindestens 20 Basenpaare (bp) vor bzw. nach dem Exon binden müssen, um die Exon-Intron-Grenze beurteilen zu können. Als Schmelztemperatur T_M wurde ein Temperaturbereich zwischen 58 °C und 63 °C gewählt.

Bei mehreren vorgeschlagenen Primerpaaren wurden solche mit einer niedrigen Selbst-Komplementarität und einer ähnlichen Annealingtemperatur T_M bevorzugt.

Alle Primer wurden von der metabion international AG, Planegg, Deutschland bezogen und zur Verwendung auf eine Konzentration von 10 μ M verdünnt.

Der Primer „7 R269H“ wurde für das High Resolution Melting (HRM) zur Amplifikation eines kurzen Fragments, welches die Variante p.R269H beinhaltet, verwendet.

In Tab. 7 sind nachfolgend die Sequenzen der jeweiligen Oligonucleotide, die Produktlänge sowie die Annealingtemperatur dargestellt.

Tabelle 7: verwendete Primer

Exon	Sequenz 5'-3' (Forward/Reverse)	Produktlänge in bp	T _M
UQCRC1			
1+2	GCCGAGCACCAACTGTACG	664	62°C
	AACCCAAACCACAAACGGGA		58°C
3	GCAATGATGTGGTGTGACGA	427	58°C
	TTAGGAAAGCCAGCCAGACAT		59°C
4	ATCTCTGTTCTGTTGGCGCA	455	58°C
	AGCTGCAAAGCCATACGCTA		58°C
5	CTACATCAAGGCGCTGTCCA	503	60°C
	CCAGGCCAGAATGGAGCAAG		63°C
6	CATGCCTCTCCTAGTCTGCC	279	63°C
	CTGGGGTCAAAGGTCCCCTA		63°C
7 R269H	ACTGTTAGACCTCGCCCAGAA	129	61°C
	GCACTACTCCTGCCAAAAGG		63°C
7+8	GGACCTTCTTTCCTCACCTG	748	63°C
	CCCTCTTGTCTTCAACGCAC		60°C
9	GTGCGTTGAAGACAAGAGGG	461	60°C
	GCTGTCGCTGGCAAGATGTA		60°C
10+11	GCACACTTTGTCTGTGACCG	828	60°C
	TCCACTATGCTACCCCTGC		63°C
12	GTGTGTGAGGACATCGGACG	564	63°C
	GAGGCCAAGAGAACGGCCT		62°C
13	TCATCAATACCCTGCACCCG	514	62°C
	CAGGAGCCACAGAAGTAGAGG		60°C
NUS1			
1	GCCACGTTCTCGGACCCA	796	61°C
	AGCGCTGTGATTTGCAGAGAG		61°C
2	TGAGTGAGGAACATAACAGGCT	622	60°C
	AGTAACAGAGCAACGTGAATGA		58°C
3	AACACTTTGAAAAGAAGGCAGTGT	512	60°C
	TCAGGCTTTATGGTGTGAAAGAA		59°C
4	TGGGGCATGGAGACATACAG	397	60°C
	CCAGTGGTACTGTGAAATAACTGA		62°C
5	TGCTTTTCTTGTGGAAAAGAGGC	609	62°C
	CAGGGTTTCATAGGTGCTTTGT		60°C

Quelle: eigene Darstellung

4 Methoden und Patientenkollektiv

Insgesamt wurden alle den unten genannten Selektionskriterien entsprechenden, in der Biobank verfügbaren Patienten in die Studie einbezogen.

Daraus ergab sich die Untersuchung von 259 Parkinson-Patienten auf Varianten des Gens *UQCRC1* und 84 Patienten auf Varianten des Gens *NUS1*.

Bei beiden Genen wurden jeweils alle Exons sowie die Exon-Intron-Grenzen sequenziert und die Sequenz mit einer Referenzsequenz abgeglichen, um Varianten zu identifizieren.

Diese Varianten wurden mit Hilfe von in-silico-Analysen mit verschiedenen Programmen in Hinblick auf ihre potenzielle Pathogenität beurteilt.

Für die Sequenzierung kam die DNS-Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) zur Anwendung. Das HRM diente zur Überprüfung der Frequenz der Variante R269H des Gens *UQCRC1* in Exon 7 in einer Kontrollkohorte.

Die DNS-Proben waren Bestandteil der Neuro-Biobank Tübingen und die zuständige Ethikkommission Tübingen, die Biobank Tübingen sowie das TREND-Komitee haben der Verwendung zugestimmt (Projektnummer des Ethikantrags: 958/2020BO2).

4.1 Auswahl des Studienkollektivs

Es wurden aus der Gesamtzahl aller bis zum Zeitpunkt 11/2020 bereits in die Neuro-Biobank Tübingen aufgenommenen Patienten zwei Kohorten selektiert, jeweils eine für die Gene *UQCRC1* und *NUS1*.

Beiden Kohorten gemeinsam waren die Einschlusskriterien einer über die Jahre hinweg konstanten Diagnose eines Parkinson-Syndroms, einer negativen genetischen Untersuchung auf pathogene Varianten von *LRRK2* oder *GBA* sowie eine vorliegende Einverständniserklärung des Patienten. Es wurden nur zum Zeitpunkt der Studie nicht verstorbene Patienten eingeschlossen, um den Indexpatienten gegebenenfalls für weitere Untersuchungen kontaktieren zu können.

Die klinische Diagnose des Parkinson-Syndroms erfolgte gemäß der MDS Clinical Diagnostic Criteria (Postuma et al., 2015).

Ausschlusskriterien waren:

1. Exitus letalis des Patienten
2. bekannte pathogene Varianten der Gene *LRRK2*, *GBA*, *PRKN*, *PINK1* oder *PARK7*

3. Hinweise auf das Vorliegen eines atypischen Parkinson-Syndroms
4. Diagnose einer DLB

Die weiteren Kriterien wurden anhand der bis dato publizierten Studien zu dem jeweiligen Gen gewählt.

Es wurden alle Patienten in die Studie eingeschlossen, auf die die entsprechenden Kriterien zutrafen.

4.1.1 UQCRC1

Für Varianten des Gens *UQCRC1* beschreiben Lin et al. heterozygote *UQCRC1*-Varianten als potenziell krankheitsverursachend bei Patienten mit familiärem MP mit vermutetem autosomal-dominantem Erbgang.

Das Erkrankungsalter der Patienten aus den drei hier initial untersuchten Familien variiert zwischen 42 und 77 Jahren (Lin et al., 2020a).

Weitere Einschlusskriterien für dieses Studienkollektiv waren daher:

1. Erkrankungsalter von höchstens 75 Jahren
2. Mindestens ein betroffener Verwandter ersten Grades

Die Kohorte umfasste 259 Patienten.

Die Frequenz der detektierten Variante p.R269H wurde anschließend in einer Kontrollkohorte aus Probanden des Uniklinikums Tübingen überprüft, um regionale Unterschiede in Allelfrequenzen gegenüber großen Datenbanken wie gnomAD zu berücksichtigen.

Für die Kontrollkohorte wurden Patienten der TREND-Studie (Tuebinger evaluation of **R**isk factors for **E**arly detection of **N**euro**D**egeneration) ausgewählt, da für diese ausführliche klinische Daten vorliegen (Harris et al., 2009).

Ausschlusskriterien waren:

1. ein Alter von unter 65 Jahren bei der letzten Visite
2. Neurologische Erkrankungen
3. Positive Familienanamnese für Parkinson-Syndrom oder Tremor

Alle Probanden wurden vor 1955 geboren, um die höhere Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von MP im Alter zu berücksichtigen.

Die Kontrollkohorte wurde bezüglich des Geschlechterverhältnisses an die Patientengruppe angeglichen und beinhaltete ebenfalls 259 Probanden.

4.1.2 NUS1

De novo Varianten im Gen *NUS1* sind von Guo et al., als potenziell krankheitsverursachend für sporadisches MP bei einem frühen Erkrankungsbeginn von unter 40 Jahren beschrieben (Guo et al., 2018).

Es wurden daher nur Patienten mit negativer Familienanamnese und einem Erkrankungsalter von unter 40 Jahren eingeschlossen.

Die Kohorte umfasste 84 Patienten.

4.2 DNS-Analyse

4.2.1 Verdünnung der DNS-Proben

Die verwendeten DNS-Proben der Tübinger Neuro-Biobank lagen bereits fertig aufbereitet vor, so dass keine DNS-Isolation mehr vorgenommen werden musste.

Die Proben waren mit der Aussalzmethode aus Ethylendiamintetraacetat-Blut gewonnen worden.

Auch die Konzentration der jeweiligen Proben war bereits durch die Messung der optischen Dichte mittels Absorptionsspektrometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm durch den NanoDrop® ND-1000 bestimmt worden. Sie wurde daher lediglich stichprobenartig in den verdünnten Proben überprüft.

Alle vorliegenden DNS-Proben wurden für diese Studie auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt.

Für die Berechnung des benötigten Verdünnungsvolumens wurde folgende Formel zu Grunde gelegt:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Hierbei stellt C_1 die ursprüngliche Konzentration der Probe und V_1 das benötigte Volumen zur Verdünnung dar.

C_2 ist die angestrebte Konzentration von 10 ng/ μ l nach erfolgter Verdünnung, das Zielvolumen V_2 wurde für jede Probe individuell so festgelegt, dass V_1 mindestens 1 μ l betrug und das Zielvolumen insgesamt mindestens 50 μ l.

Durch Umformen der Formel errechnet sich das benötigte Volumen DNS wie folgt:

$$V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$$

Das Volumen H_2O für die Verdünnung wurde dann durch $V_{H_2O} = V_2 - V_1$ ermittelt.

4.2.2 Primeretablierung

Da verschiedene Primer unterschiedliche Bedingungen für eine optimale Funktionsweise benötigen, musste zunächst für jeden der Primer der optimale Reaktionsansatz (Set-up) für die Polymerasekettenreaktion (PCR) etabliert werden.

Für einige Reaktionsansätze wurden Zusätze wie Magnesiumchlorid, Betaine oder DMSO oder eine angepasste Annealingtemperatur verwendet, um die Spezifität der Anlagerung an den jeweiligen DNS-Abschnitt zu verbessern oder die Ausbeute zu erhöhen.

Für alle Etablierungen wurde eine Kontroll-DNS-Probe verwendet. Die zu untersuchenden DNS-Abschnitte wurden dabei mit dem jeweiligen Forward- und Reverse-Primer im Rahmen einer Touchdown-PCR (siehe Tab. 10) amplifiziert. Dabei wurden für jedes Primerpaar acht verschiedene Reaktionsansätze (siehe Tab. 8) parallel getestet.

Tabelle 8: PCR-Reaktionsansätze

	1	2	3	4	5	6	7	8
H₂O	2,95	3,45	5,35	4,15	4,65	4,15	3,45	2,25
Puffer (5x)	2	2	2	2	2	2	2	2
MgCl₂ (25 mM)	1,2	1,2	-	-	-	1,2	-	1,2
Betaine (5 M)	1,2	-	-	1,2	-	-	1,2	1,2
DMSO (≥99,5% (GC))	-	0,7	-	-	0,7	-	0,7	0,7
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Primer F (10 µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Primer R (10 µM)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
taq- Polymerase (5 U / µl)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
	+2µl	DNS						
	(10ng/µl)							

alle Angaben in µl. DMSO: Dimethylsulfoxid, dNTP: Desoxyribunucleotidtriphosphate, F: Forward, MgCl₂: Magnesiumchlorid, R: Reverse

Quelle: eigene Darstellung

Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend mit einer Gelelektrophorese in 2 % Agarosegel bei 150 mV für 15 min aufgetrennt und die Banden im Vergleich zu einem Standard (GeneRuler) durch Zugabe von Midori Green unter UV-Licht beurteilt.

Nachfolgend ist in Tab. 9 dargestellt, welches Set-up letztlich für die jeweiligen Exons verwendet wurde.

Tabelle 9: PCR Set-ups

Gen	Exon	PCR Setup	Protokoll
<i>UQCRC1</i>	E1 + E2	7	TCHDOWN64
<i>UQCRC1</i>	E3	3	TCHDOWN64
<i>UQCRC1</i>	E4	4	TCHDOWN64
<i>UQCRC1</i>	E5	7	TCHDOWN64
<i>UQCRC1</i>	E6	3	TCHDOWN64
<i>UQCRC1</i>	E7 + E8	4	TCHDOWN68
<i>UQCRC1</i>	E9	7	TCHDOWN64
<i>UQCRC1</i>	E10 - E11	7	TCHDOWN64
<i>UQCRC1</i>	E12	5	TCHDOWN68
<i>UQCRC1</i>	E13	2	TCHDOWN64
<i>NUS1</i>	E1	7	TCHDOWN64
<i>NUS1</i>	E2	3	TCHDOWN64
<i>NUS1</i>	E3	3	TCHDOWN68
<i>NUS1</i>	E4	3	TCHDOWN64
<i>NUS1</i>	E5	7	TCHDOWN64

Quelle: eigene Darstellung

4.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist ein 1985 entdecktes Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung von DNS in vitro (Saiki et al., 1985).

Sie ist dem Prinzip der natürlichen DNS-Replikation, wie sie etwa bei jeder Mitose stattfindet, nachempfunden und verläuft zyklisch in drei Teilschritten.

Der Reaktionsansatz enthielt die zu amplifizierende DNS, Puffer, destilliertes Wasser, die jeweils benötigten Forward- und Reverse-Primer, Desoxynucleotidtriphosphate (dNTP) im Überschuss sowie hitzestabile Taq-Polymerase und in Abhängigkeit der verwendeten Primer und der DNS-Struktur des Amplifikats Zusätze wie Magnesiumchlorid, DMSO oder Betaine.

Die DNS-Proben durchliefen in einem Thermocycler insgesamt 50 Zyklen in jeweils drei Schritten.

Die einzelnen Schritte wurden vorher als Protokoll auf dem Thermocycler gespeichert, um einen stets identischen Ablauf zu gewährleisten.

Der Thermocycler ermöglichte die raschen Temperaturänderungen und eine exakte Einhaltung der Zeit- und Temperaturintervalle.

Tabelle 10: Protokoll der Touchdown-PCR TCHDOWN64 bzw. 68

	TCHDOWN64	TCHDOWN68
Zeit	Temperatur in °C	Temperatur in °C
(1) 3 min	95	95
(2) 30 Sek.	95	95
(3) 30 Sek.	64; -0,5 pro Zyklus	68; -0,5 pro Zyklus
(4) 30 Sek.	72	72
	19x Wiederholung (2) bis (4)	23x Wiederholung (2) bis (4)
(5) 30 Sek.	95	95
(6) 30 Sek.	55	55
(7) 30 Sek.	72	72
29x	Wiederholung (5) bis (7)	Wiederholung (5) bis (7)
(8) 5 min	72	72
(9) ∞	12	12

Quelle: eigene Darstellung

Der Ablauf einer PCR ist wie folgt:

- I. Als erster Schritt erfolgt die Denaturierung bei hohen Temperaturen, um die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNS durch Hitzedenaturierung zu lösen. Die DNS liegt nun einzelsträngig vor.

- II. Anschließend erfolgt bei niedrigeren Temperaturen das Annealing, die Anlagerung der Primer an die komplementäre Bindungsstelle des

Templates. Die optimale Annealingtemperatur ist abhängig von den verwendeten Primern, im Rahmen der hier zur Anwendung gebrachten Touchdown-PCR wurde daher die Annealingtemperatur ausgehend von 65 °C schrittweise reduziert. Einige PCR-Ansätze erforderten eine noch höhere Annealingtemperatur von initial 68 °C, diese wurden im Vorfeld bei der Etablierung identifiziert und sind Tab. 9 zu entnehmen. In diesem Schritt hybridisieren die Forward- und Reverse-Primer an jeweils einen der beiden Stränge auf den entgegengesetzten Seiten des zu amplifizierenden DNS-Abschnitts.

- III. Die nun folgende Elongation durch die hitzestabile Taq-Polymerase ermöglicht, ausgehend von den angelagerten Primern, die Synthese komplementärer Stränge zur einzelsträngig vorliegenden DNS mit Hilfe der freien Nucleotide. Die Elongation erfolgt beim Aktivitätsoptimum von 72 °C der Taq-Polymerase, welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Da die Primer sich an das 3' Ende des jeweiligen Genabschnitts anlagern, erfolgt die Synthese der komplementären DNS-Stränge von 5' nach 3'. Die im Puffer enthaltenen Magnesiumionen dienen hierbei der Komplexbildung mit den dNTPs, wodurch diese von der Taq-Polymerase als Substrate verwendet werden können.

In jedem Zyklus wird somit die Anzahl vorliegender Ziel-DNS Kopien bis zum Erreichen des Plateaus der exponentiellen Vervielfältigung verdoppelt, die Anzahl an Kopien nach Ablauf der PCR lässt sich unter optimalen Bedingungen mit der Formel $X = Y(2^n)$ berechnen.

Hierbei ist X ist Anzahl Ziel-Kopien nach der Amplifikation, Y die Anzahl anfangs vorliegender Kopien und n die Anzahl durchlaufener PCR-Zyklen (Waters and Shapter, 2014).

Als Touchdown-PCR bezeichnet man, wie von Green et al. beschrieben, eine Form der Polymerasekettenreaktion bei der initial eine um 5-10 °C höhere Annealingtemperatur als für die Primer zu erwarten wäre gewählt wird. Diese

Annealingtemperatur wird schrittweise mit jedem Zyklus gesenkt bis auf etwa 2-5°C unter der erwarteten Annealingtemperatur (Green and Sambrook, 2018).

Dies gewährleistet eine besonders spezifische Bindung der Primer bei ihrem Temperaturoptimum T_M und damit spezifische PCR-Produkte (Korbie and Mattick, 2008). Durch ein Absenken der Temperatur auf 55 °C, wenn bereits ausreichend spezifische Produkte vorhanden sind, wird die Ausbeute erhöht.

4.2.4 Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNS-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, indem sie auf ein Agarosegel aufgetragen werden und durch das Anlegen von Strom auf Grund ihrer negativen Gesamtladung zur Anode wandern (Yilmaz et al., 2012).

Die Geschwindigkeit, mit der die Fragmente wandern, hängt dabei von ihrem Molekulargewicht beziehungsweise ihrer Fragmentlänge und der Porengröße des Gels ab. Fragmente mit geringerem Molekulargewicht wandern dabei schneller und damit weiter (Lee et al., 2012).

Die verwendeten Agarosegele mit einem Agarosegehalt von 2 % sind geeignet für eine Fragmentlänge von circa 0,5-25 kb (Voytas, 2001).

Durch die Zugabe eines entsprechenden Farbstoffs, der sich in die DNS einlagert, können die entstehenden Banden unter Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden.

Anhand eines Komigrationsstandards kann so die Länge der Fragmente in bp bestimmt werden.

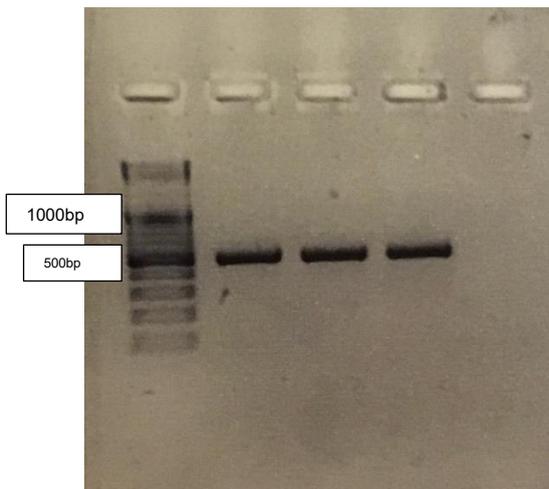
Die Herstellung des Gels fand wie folgt statt:

- (1) Zugabe von 10 g Agarose zu 500 ml 1x TBE-Puffer
- (2) Erhitzen in der Mikrowelle unter gelegentlichem Schwenken bis zum Aufklaren der Lösung
- (3) Abkühlung unter ständigem Rühren mit dem Magnetrührer
- (4) Dabei Zugabe von 25 µl Midorigreen
- (5) Gießen in entsprechende Kammern mit 20-Well-Kämmen

Die erfolgreiche Amplifikation der DNS durch die PCR und eine eventuelle Verunreinigung wurden durch Gelelektrophorese von Stichproben jeder 96-Well-Platte und des Leerwerts überprüft. Dies erfolgte in 2 % Agarosegel mit Midorigreen bei 150 V für 15 Minuten im Vergleich zu dem Komigrationsstandard GeneRuler. In Abb. 1 ist eine solche Gelelektrophorese zu sehen.

Abbildung 1: Gelelektrophorese UQCRC1 Exon 5

Standard Patientenproben UQCRC1 E5 Leerwert



Quelle: eigene Abbildung

4.2.5 Aufreinigung

Die entstandenen PCR-Produkte wurden nun aufgereinigt, um die PCR-Reagenzien und eventuelle Nebenprodukte zu entfernen:

- (1) Zugabe von 1,2 μ l 3 M Natriumacetat mit einem pH-Wert von 5,2 und 28,8 μ l 100% Ethanol zu den 10 μ l PCR-Produkt
- (2) Zentrifugation für 45 min bei 3220 g und Raumtemperatur
- (3) Entfernung des Überstands
- (4) Zugabe von 100 μ l 70%igem Ethanol
- (5) Erneute Zentrifugation bei 3220 rpm für 20 min
- (6) Wiederholung der Schritte (3) - (5)
- (7) Entfernung des Ethanols durch eine Zentrifugation über Kopf für 1 min bei 600 rpm
- (8) Resuspension in 15 μ l H₂O

Das Natrium lagert sich hierbei in das DNS-Rückgrat ein und gleicht somit die negative Ladung der Phosphatgruppen aus, um die Löslichkeit der DNS in Wasser herabzusetzen. Auch Ethanol verringert die Löslichkeit der DNS, da es eine niedrigere Dielektrizitätskonstante als Wasser besitzt (Green and Sambrook, 2016).

Die DNS wurde somit ausgefällt, wohingegen die verwendeten Primer und dNTPs in Lösung blieben und ausgewaschen wurden. Dies war für die folgende Sanger-Sequenzierung von Bedeutung, da unter anderem das Verhältnis von dNTPs zu Didesoxynucleotidtriphosphaten (ddNTPs) durch überschüssige dNTPs gestört worden wäre.

4.2.6 Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs durch den Einbau von Didesoxynucleotiden anstelle von Desoxynucleotiden. Diese werden dem Reaktionsansatz zusätzlich zu den Desoxynucleotiden beigefügt und führen an zufälligen, verschiedenen Stellen zum Abbruch des DNS-Stranges.

Dies ist dadurch begründet, dass die Didesoxynucleotide an ihrem 3'-Kohlenstoffatom keine Hydroxygruppe besitzen und somit keine Veresterung mit dem Phosphatrest des darauffolgenden Desoxynucleotids stattfinden kann (Sanger et al., 1977).

Da die Didesoxynucleotide mit einem Fluoreszenzfarbstoff farbcodiert sind, lässt sich aus den unterschiedlich langen Strängen mit Hilfe des Sequenziergeräts durch Kapillarelektrophorese die genaue Basenabfolge bestimmen.

Der Ablauf der Sequenzier-PCR nach Sanger unterscheidet sich prinzipiell nicht von dem einer gewöhnlichen PCR.

Es wurden hier im Gegensatz zur initialen Touchdown-PCR jedoch zwei separate Ansätze für den Forward- und den Reverse-Primer verwendet, um jeweils nur einen der beiden Stränge zu vervielfältigen.

Außerdem wurde kein Touchdown-Protokoll verwendet, sondern eine immer gleichbleibende Annealingtemperatur von 60 °C, da bereits zahlreiche

spezifische Produkte aus der Touchdown-PCR vorhanden waren. Für Primer deren Reaktionsprodukt nur ein Exon umfasst wurde das Protokoll SEQ60_2 verwendet, war das Reaktionsprodukt länger kam das Protokoll SEQ60_4 zur Anwendung da die Bildung längerer Produkte mehr Zeit in Anspruch nimmt. Die entsprechenden Protokolle sind Tab. 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Protokolle der Sequenzier-PCR

SEQ60_2 SEQ60_4

Dauer	Zeit	Temperatur in °C
(1) 1 min	(1) 1 min	94
(2) 10 Sek.	(2) 10 Sek.	94
(3) 2 min	(3) 4 min	60
29x	29x	Wiederholung (2) und (3)
(4) ∞	(4) ∞	4

Quelle: eigene Darstellung

Es wurde für jede Probe Reaktionsgefäße beladen, je eins für den Forward- und Reverse-Primer, wobei jeweils 6 µl Mastermix und 4 µl PCR-Produkt enthalten waren. Die genaue Zusammensetzung ist in Tab. 12 dargestellt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz Sequenzier-PCR

Bestandteil	Volumen in µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	4
H ₂ O	2,65
SEQ-Buffer (10x)	1,65
Primer (10 µM)	1
BigDye	0,7

Quelle: eigene Darstellung

Der BigDye enthielt dabei bereits u.a. die Polymerase und die dNTPs sowie die fluoreszenzmarkierten ddNTPs.

Die Proben durchliefen nun erneut Zyklen im Thermocycler, im Wechsel bei 95 °C (Denaturierung) und 60 °C (Annealing und Elongation).

Die Aufreinigung der entstandenen Kettenabbruchprodukte erfolgte identisch wie bei der initialen PCR.

4.2.7 Bestimmung der DNS-Sequenz

Von den aufgereinigten Produkten der Sequenzier-PCR wurden je 7 µl gemeinsam mit 10 µl Formamide zur Denaturierung der doppelsträngigen DNS auf ABI 96-Well-Platten pipettiert und 10 Sekunden bei 600 g zentrifugiert. Nun konnte die Sequenz mit Hilfe des Sequenziergeräts (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer) bestimmt werden.

Das Sequenziergerät arbeitet mit Kapillarelektrophorese, hierbei werden die einzelnen, unterschiedlich langen Fragmente die bei der Sanger-Sequenzierung entstanden sind gemäß ihrer Länge aufgetrennt.

Dies geschieht, indem die Kapillaren zusammen mit Elektroden in die Probe eingetaucht werden und elektrischer Strom angelegt wird, wodurch die DNS-Fragmente in die Kapillaren wandern (Dovich and Zhang, 2000).

Die Fragmente wandern entlang des elektrischen Felds durch die gelgefüllten Kapillaren zur Anode. Kürzere Fragmente wandern dabei schneller als längere. Am Ende der Kapillaren befinden sich ein Argon-Laser, welcher die Fluoreszenzfarbstoffe zur Fluoreszenz anregt, und ein Detektor, der diese Signale erkennt.

Da jede Base durch einen anderen Farbstoff markiert war, konnten die Basen so unterschieden werden.

Nun konnte anhand der Reihenfolge, in der die vier verschiedenen Farbstoffe detektiert wurden, die Sequenz durch das Gerät bestimmt werden.

Die Sequenzen wurden mit dem Programm FinchTV ausgewertet und mit der Referenzsequenz abgeglichen.

Als Referenzsequenz diente das Transkript NM_003365 für *UQCRC1* und das Transkript NM_138459 für *NUS1*, beide Transkripte wurden dem Genome Browser der University of California (UCSC) im Dezember 2020 entnommen.

Detektierte Varianten wurden - wenn vorhanden - in der B-Probe des Patienten validiert. Die B-Probe war eine unabhängige DNS-Probe des Patienten zum gleichen Visitendatum. Lag keine B-Probe vor, so wurde die A-Probe erneut sequenziert

4.2.8 High Resolution Melting

Das Verfahren des HRMs kann genutzt werden, um Wildtyp-Sequenzen von homo- oder heterozygoten Varianten zu unterscheiden.

Es handelt sich hierbei um eine Real-Time-PCR, der Reaktionsansatz (siehe Tab. 13) durchläuft im LightCycler (LightCycler® 96 System) die Zyklen einer Touchdown-PCR, wobei der zu untersuchende DNS-Abschnitt exponentiell vervielfältigt wird. Das Protokoll ist Tab. 14 zu entnehmen.

Tabelle 13: Reaktionsansatz LightCycler Assay

Bestandteil	Volumen in µl
Mastermix	5
Primer F (10 µM)	0,2
Primer R (10 µM)	0,2
MgCl ₂ (25 mM)	1
H ₂ O	2,1
DNS (10 ng/µl)	1,5

F: Forward, Mastermix: enthält die u.a. die dNTPs, die Polymerase und das SYBR Green, R: Reverse

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 14: Protokoll für das High Resolution Melting

Dauer in Sekunden	Temperatur in °C	Temperaturanstieg in °C/s
(1) 600	95	4,4
(2) 10	95	4,4
(3) 15	65; -0,5 pro Zyklus bis zur Zieltemperatur von 55	4,4
(4) 15	72	4,4
45x	Wiederholung (2) bis (4)	
(5) 60	95	4,4
(6) 60	40	4,4
(7) 1	65	2,2
(8) 600	Anstieg von 65 auf 97	

Quelle: eigene Darstellung

Dem Reaktionsansatz wurde der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green zugegeben, welcher an die doppelsträngigen DNS-Fragmente bindet und in gebundener Form Fluoreszenzsignale aussendet.

Nach Ablauf der PCR wurde die Temperatur der Proben kontinuierlich erhöht, wobei die Doppelstränge bei Erreichen der Schmelztemperatur T_M denaturieren. Hierbei wird der Fluoreszenz-Farbstoff frei und die Intensität der Fluoreszenz nimmt ab (Erali et al., 2008).

Auch geringe Unterschiede in der DNS-Sequenz wie beispielsweise eine heterozygote Basensubstitution führen bereits zu einer Veränderung der Stabilität. Diese wird hauptsächlich durch die Länge des Fragments und seinen Gehalt an Guanin und Cytosin bestimmt. Daher unterscheidet sich die T_M von Wildtyp und Variante.

Eine Analyse mittels Software erlaubte eine graphische Darstellung, bei der die T_M gegen die Fluoreszenz aufgetragen wurde. Dies ermöglichte eine Zuordnung der einzelnen Proben in die Gruppen „Wildtyp“ und „Variante“.

War ein Proband laut dieser Methode Träger einer Variante oder war keine eindeutige Zuordnung möglich, so wurden diese Proben nachfolgend mittels Sanger-Sequenzierung untersucht um die Ergebnisse zu überprüfen (Tindall et al., 2009).

Generell ist die Spezifität dieser Methode für kürzere Fragmente mit einer Länge von weniger als 150 bp höher als für längere Fragmente, da hier ein Einzelnukleotid-Polymorphismus die Stabilität verhältnismäßig mehr beeinflusst (Reed and Wittwer, 2004).

4.3 Auswertung

4.3.1 Terminologie

Da die Definition einzelner Begrifflichkeiten in der Genetik heterogen ist, sollen im Folgenden die Bedeutungen einiger wichtiger Begriffe für diese Arbeit festgelegt werden, um Missverständnisse zu vermeiden.

- Variante: unter einer Variante wird eine permanente Abweichung der DNS-Sequenz von einer Referenzsequenz verstanden. Als selten werden in dieser Arbeit Varianten mit einer MAF $\leq 0,001$ bezeichnet. Varianten können als pathogen, wahrscheinlich pathogen, wahrscheinlich benigne, benigne oder als Varianten unklarer Signifikanz klassifiziert werden.
- Polymorphismus: ein Polymorphismus bezeichnet eine Variante mit einer MAF von $>0,01$ (Karki et al., 2015).
- Mutation: der weit verbreitete Terminus Mutation soll keine Pathogenität implizieren sondern hier als Synonym zu dem Begriff Variante betrachtet werden (Richards et al., 2015)

4.3.2 Allelfrequenzen

Als Minor Allele bezeichnet man das seltenere Allel (Frequenz $<50\%$ bei bi-allelelischen Varianten) (Kido et al., 2018). Bei den hier identifizierten Abweichungen von der Referenzsequenz handelt es sich jeweils um das Minor Allele dessen Frequenz, die MAF, mit folgender Formel berechnet werden kann:

$$MAF = \frac{2aa + Aa}{2n}$$

wobei A das Major Allele, a das Minor Allele und n die Anzahl an Individuen in der jeweiligen Kohorte darstellt. aa bezeichnet die Anzahl homozygoter Variantenträger, Aa die heterozygoter.

4.3.3 Datenbanken

Um die detektierten Varianten hinsichtlich ihrer Allelfrequenz in der untersuchten Kohorte im Vergleich zur Gesamtbevölkerung beurteilen zu können, wurde die öffentlich zugängliche Genomdatenbank gnomAD herangezogen, ebenso wie die Datenbank des Accelerating Medicines Partnership Parkinson's Disease (AMP-PD).

Die Datenbank gnomAD v2.1.1 umfasste zum Zeitpunkt dieser Arbeit 141.456 neurologisch gesunde Individuen, die exom- oder genomsequenziert wurden und erlaubt eine Unterscheidung der Frequenzen nach Populationen.

Die für diese Arbeit relevante Referenzgruppe ist die europäische nicht-finnische der Untergruppe non-neuro, die 51.535 Personen umfasste. Die finnische Bevölkerung wird auf Grund der genetischen Diskrepanz zur übrigen Bevölkerung Europas außen vor gelassen (Lao et al., 2008).

Die Datenbank des AMP-PD umfasst 1.050 Kontrollpersonen und 1.647 Parkinsonpatienten.

4.3.4 Vorhersageprogramme

Um die Pathogenität der detektierten Varianten beurteilen zu können, wurden in-silico-Vorhersageprogramme genutzt. Diese Programme beurteilen Varianten in Hinblick auf ihre Pathogenität mittels unterschiedlicher Algorithmen. Berücksichtigt werden hier unter anderem die Allelfrequenz, die Art der Mutation (z.B. missense, nonsense oder silent) und ihre Auswirkung auf die Aminosäuresequenz sowie die Konservierung der betroffenen Aminosäure.

Die in dieser Arbeit verwendeten Programme sind MutationTaster2 (Schwarz et al., 2014), PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2013), SIFT (Kumar et al., 2009) und PROVEAN v.1.1.3 Genome variants (Choi and Chan, 2015).

Außerdem wurde die ensemble-Methode CADD1.6 (Rentzsch et al., 2019) genutzt, welche mehrere individuelle Tools zusammenfasst und so die Performance verbessern soll (Ioannidis et al., 2016).

Da der PHRED-skalierte CADD-Score logarithmisch ist, bedeutet ein Score von 10, dass die Variante vermutlich zu den 10 % pathogensten gehört, ein Score von 20, dass sie zu den 1 % pathogensten gehört und ein Score von 30, dass es sich voraussichtlich um eine der 0,1 % pathogensten Varianten handelt.

Zur Beurteilung von Varianten außerhalb der codierenden Exons wurde das Programm Human Splicing Finder HSFpro genutzt (Desmet et al., 2009).

Die Bestimmung der Position einzelner Aminosäuren erfolgte mit uniprot.

Für die Analyse der Konservierung über mehrere Spezies hinweg wurde das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) verwendet. In Tab. 15 ist die jeweils verwendete Referenzsequenz aufgeführt.

Tabelle 15: Referenzsequenzen für die verschiedenen Spezies für die Gene UQCRC1 und NUS1

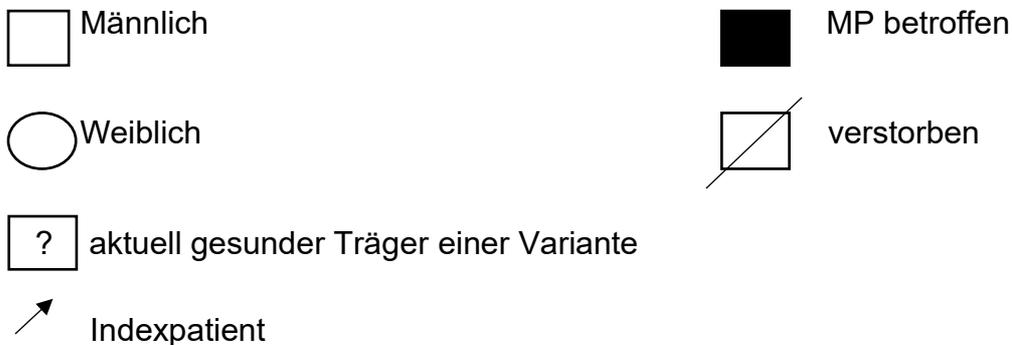
Spezies		NCBI-Referenzsequenz	
		UQCRC1 BLAST-P	NUS1 BLAST-P
Mensch	<i>Homo sapiens</i>	NP_003356.2	NP_612468.1
Gemeiner Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>	NP_001267054.1	XP_009439474.3
Rhesusaffe	<i>Macaca mulatta</i>	NP_001035208.1	NP_001181421.1
Hauskatze	<i>Felis catus</i>	XP_003982215.1	XP_003986546.1
Pferd	<i>Equus caballus</i>	XP_001498993.3	XP_001504211.3
Erdmännchen	<i>Suricata suricatta</i>	XP_029773521.1	XP_029800649.1

Quelle: eigene Darstellung

4.3.5 Stammbäume

Die Erstellung von Stammbäumen erfolgt mit dem Pedigree Chart Designer der Firma CeGaT aus Tübingen.

Hierbei wurden folgende Symbole verwendet:



Als vereinfachte Darstellung sind hier die männlichen Symbole aufgeführt, für weibliche Personen wurde analog verfahren.

4.3.6 Statistik

Die Odds Ratio (OR) ist ein Maß für die Stärke eines Zusammenhangs zweier Merkmale. Eine $OR > 1$ bedeutet dabei, dass die Chancen einer Gruppe beispielsweise an MP zu erkranken höher sind als die einer zweiten Gruppe, ein Wert von 1 bedeutet, dass es keinen Unterschied gibt und ein Wert < 1 , dass die Wahrscheinlichkeit für die erste Gruppe geringer ist. Die OR kann Werte zwischen 0 und ∞ annehmen.

Die Odds Ratio berechnet sich wie folgt:

$$OR = \frac{\left(\frac{v}{w}\right)}{\left(\frac{x}{y}\right)}$$

Die Zuordnung der Variablen findet sich in untenstehender Tabelle 16.

Tabelle 16: Definition der Variablen für die Berechnung der Odds Ratio

	n Personen mit Variante	n Personen ohne Variante
n an MP erkrankt	v	x
n nicht an MP erkrankt	w	y

Quelle: eigene Darstellung

Als Variantenträger wurden homo- und heterozygote Träger zusammengefasst, verglichen wurde die Frequenz in der eigenen, von MP betroffenen Kohorte mit der neurologisch gesunden nicht-finnischen Kohorte von gnomAD.

Das Signifikanzniveau α gibt hierbei die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird. Ein Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ wurde in dieser Arbeit als signifikant betrachtet. Verwendet wurde der zweiseitige exakte p-Wert nach Fisher.

5 Ergebnisse

5.1 Demographie der Patientenkollektive

5.1.1 UQCRC1

Die Selektion einer Kohorte für die Untersuchung auf Varianten des Gens *UQCRC1* nach den unter 4.1.1 dargestellten Kriterien ergab ein Patientenkollektiv von insgesamt 259 Patienten.

Hiervon waren 143 (55,21 %) männlich, 116 (44,79 %) weiblich, das Verhältnis von männlich zu weiblich lag somit bei 1,23:1.

Das mediane Erkrankungsalter lag bei 57 Jahren, das 25 % Quartil bei 50 Jahren und das 75 % Quartil bei 64 Jahren. Die Spanne reichte von 7 bis 75 Jahre als Erkrankungsalter.

Die Erkrankungsalters- und Geschlechtsverteilung des Kollektivs ist in Abbildung 2 dargestellt.

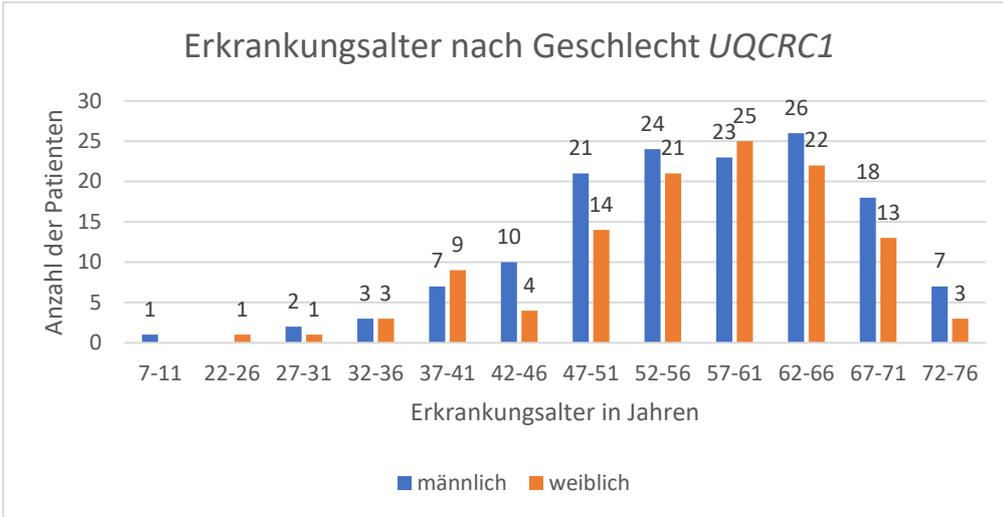


Abbildung 2: Erkrankungsalter nach Geschlecht der Kohorte für UQCRC1 dargestellt ist die Anzahl an Patienten eines Geschlechts die in einer Altersgruppe erkrankt ist. Bei einem männlichen Patienten war das Erkrankungsalter nicht bekannt. Quelle: eigene Darstellung

5.1.2 NUS1

Die selektierte Kohorte für das Gen *NUS1* umfasste insgesamt 84 Patienten. Hiervon waren 60 männlich (71,4 %) und 24 weiblich (28,6 %).

Das Verhältnis von männlich zu weiblich war 2,5:1, das mediane Erkrankungsalter lag bei 36 Jahren mit einer Spanne von 22 bis 40 Jahren.

Das 25 % Quartil lag bei 31,75 Jahren, das 75 % Quartil bei 39 Jahren.

Die Erkrankungsalters- und Geschlechtsverteilung des Kollektivs ist in Abbildung 3 dargestellt.

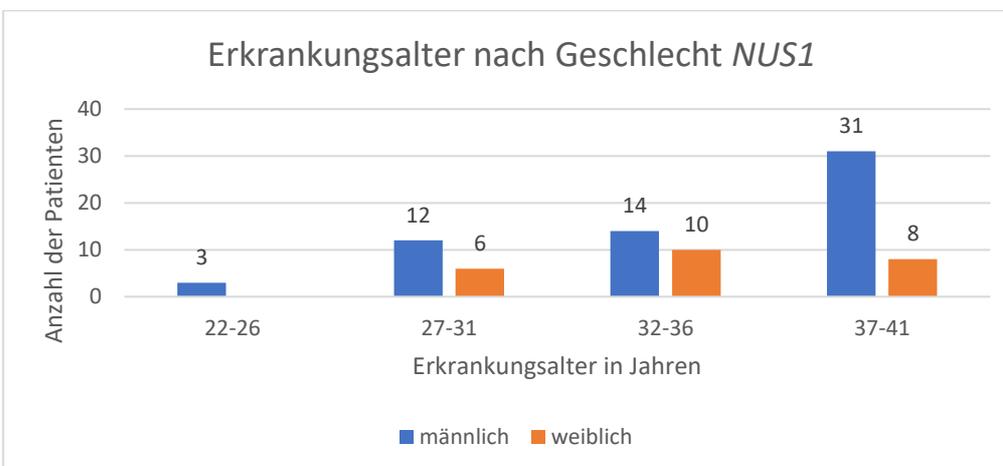


Abbildung 3: Erkrankungsalter nach Geschlecht der Kohorte für NUS1 dargestellt ist die Anzahl an Patienten eines Geschlechts die in einer Altersgruppe erkrankt ist. Quelle: eigene Darstellung

5.2 UQCRC1 Varianten

5.2.1 Gesuchte Varianten

Die gesuchten Varianten c.941A>C (p.Y314S), c.931A>C (p.I311L), c.70-1G>A und c.73_74insG, p.A25Gfs*27, die von Lin et al. 2020 in einer chinesischen Population beschrieben wurden, konnten in dieser Studie nicht gefunden werden.

5.2.2 Übersicht detektierte Varianten

Im Folgenden steht in Tab. 17 eine Übersicht aller in dieser Arbeit detektierter Varianten des Gens *UQCRC1*:

Tabelle 17: Übersicht über die detektierten Varianten.

Gen	Variante	MAF eigene Kohorte	MAF gnomAD	OR	95 % KI	p-Wert
<i>UQCRC1</i>	p.R269H	0,029	0,026	1,12	0,67-1,89	0,67
<i>UQCRC1</i>	p.N301S	0,002	0,004	0,45	0,063-3,21	0,73
<i>UQCRC1</i>	p.G312S	0,002	0,001	2,21	0,31-15,93	0,37
<i>UQCRC1</i>	p.E435K	0,004	0,002	1,99	0,49-8,05	0,27

KI= Konfidenzintervall, MAF= Minor Allele Frequency, OR= Odds Ratio, p-Wert mit dem zweiseitigen Fisher exact test berechnet

Quelle: eigene Darstellung

5.2.3 p.R269H

Der Polymorphismus p.R269H ist in Exon 7 lokalisiert und trat in der untersuchten Kohorte insgesamt 15-mal auf. Eine Übersicht über die Variantenträger ist in Tab. 18 dargestellt.

Tabelle 18: Übersicht über die Träger der Variante p.R269H aufsteigend sortiert nach Erkrankungsalter in Jahren; m: männlich, MP: Morbus Parkinson, REM: Rapid Eye Movement, w: weiblich.

Geschlecht	Erkrankungsalter in Jahren	Diagnose	nicht motorische Symptome	Anzahl betroffener Verwandter
m	38	MP	unbekannt	2
w	40	MP	unbekannt	2
m	44	MP	Depression, REM-Schlafstörung, Harndrang, Alpträume	1
w	46	MP	Halluzinationen	3
m	46	MP	unbekannt	1
w	50	MP	unbekannt	2
m	57	MP	Halluzinationen, REM-Schlafstörung, Harndrang, Alpträume, Obstipation	2
m	59	MP	unbekannt	2
m	60	MP	unbekannt	2
w	60	MP	unbekannt	3
m	61	MP, Demenz	Demenz, Halluzinationen, REM-Schlafstörung, Harndrang, orthostatische Dysregulationen, Alpträume, Obstipation	1
m	62	MP	REM-Schlafstörung, Obstipation, Harndrang	1
w	64	MP	unbekannt	2
m	67	MP	unbekannt	2
m	unbekannt	MP	Harndrang	4

Quelle: eigene Darstellung

Der Austausch der Base Guanin durch Adenin an Position 806 der codierenden DNS (c.806G>A) führt auf Aminosäurelevel zu einer Substitution von Arginin durch Histidin; es handelt sich also um eine nichtsynonyme Variante. Die Sequenz ist in Abb. 4 abgebildet, in Tab. 19 sind die Beurteilung der Pathogenität und die MAF dargestellt, in Tab. 20 die Konservierungsanalyse.

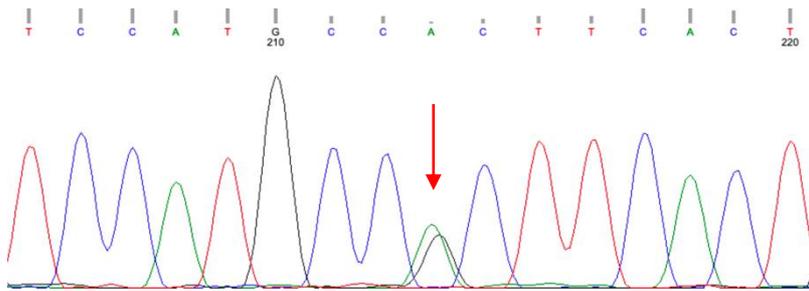


Abbildung 4: Sequenzausschnitt von UQCRC1 Exon 7 um die Variante p.R269H (het.)

Die Variante ist mit einem Pfeil markiert. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Tyrosin
Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 19: Beurteilung der Pathogenität von Variante p.R269H und Darstellung ihrer Minor Allele Frequency (MAF)

Prädiktion der Pathogenität		Frequenz	
Programm	Beurteilung	Kohorte	MAF
Mutationtaster	Disease causing	untersuchte Kohorte	0.029
PROVEAN	Deleterious (Score - 4.48)	gnomAD	0.026
SIFT	tolerated	AMP-PD case	0.029
Polyphen2	Probably damaging	AMP-PD control	0.029
CADD	18.89		

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 20: Konservierungsanalyse der Aminosäure R an Pos. 269

Spezies	Aminosäure
<i>Homo sapiens</i>	R
Variante	H
<i>Pan troglodytes</i>	R
<i>Macaca mulatta</i>	R
<i>Felis catus</i>	R
<i>Equus caballus</i>	R
<i>Suricata suricatta</i>	R

H: Histidin, R: Arginin

Quelle: eigene Darstellung

5.2.3.1 Frequenz der Variante p.R269H in der Kontrollkohorte

Da die Frequenz der Variante p.R269H in der Datenbank gnomAD in Abhängigkeit von der Ethnie von 0,000 in Ostasien bis 0,029 in Europa (nicht - finnisch) schwankt, wurde zum besseren Vergleich der MAF der Variante in der Region Tübingen eine regionale neurologisch gesunde Kontrollgruppe untersucht. Die 259 Probanden der Kontrollgruppe wurden bezüglich des Geschlechterverhältnisses der Parkinsonkohorte angeglichen.

Das HRM zeigte, dass diese Variante mit einer Frequenz von 0,035 in der Kontrollgruppe prävalenter war als in der Gruppe der Parkinsonkranken, wo die MAF 0,029 betrug. Die OR betrug somit 0,82 bei einem Konfidenzintervall von 95 %, der p-Wert lag bei 0,29.

5.2.4 p.N301S

Bei einem der Patienten fand sich in Exon 8 die Variante p.N301S. Das Parkinson-Syndrom manifestierte sich bei diesem Patienten griechischer Abstammung im Alter von 38 Jahren (early onset), es handelte sich um einen MP vom Äquivalenztyp mit rechtsbetonter Symptomatik.

Der Patient war insgesamt stark betroffen, bei seinem letzten Ambulanzbesuch mit 62 Jahren befand er sich im Hoehn und Yahr Stadium IV.

Zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung lagen ein starker Ruhe-, Aktions- und Haltetremor beider Hände in den medikamentösen Off-Phasen vor, die Feinmotorik war deutlich eingeschränkt.

Axial und an allen Extremitäten bestand ein ausgeprägter, rechtsbetonter Rigor. Das Gangbild war sehr unsicher, es bestanden eine Starthemmung sowie Freezing und Festination beim Gehen und eine hohe Sturzfrequenz ebenso wie posturale Instabilität.

Das Ansprechen auf Levodopa war gut, die therapeutische Breite jedoch sehr gering durch die Induktion von starken Hyperkinesien.

Besonders litt der Patient unter ausgeprägten Wirkungsfluktuationen und Dyskinesien der Extremitäten und des Rumpfes.

Zusätzlich litt er an den nicht-motorischen Symptomen orthostatische Dysregulation, Obstipation und Harndrang.

Es bestand der Verdacht auf eine dementielle Entwicklung bei eingeschränktem Kurzzeitgedächtnis, der MoCA-Score (Montreal Cognitive Assessment) betrug 19/30

Die Familienanamnese war positiv; in Abb. 5 ist der Stammbaum dargestellt.

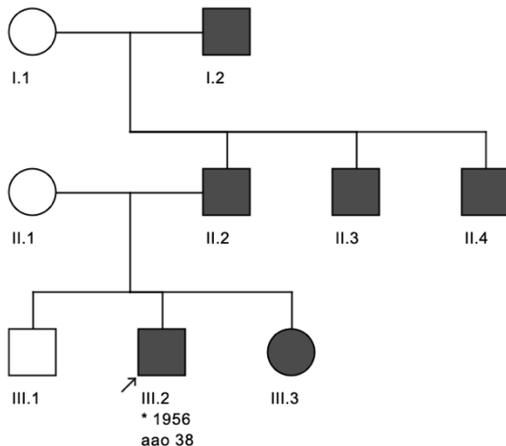


Abbildung 5: Stammbaum des 1956 geborenen Patienten mit der Variante p.N301S.

aa: age at onset. Männliche Personen sind durch ein Rechteck symbolisiert, weibliche durch einen Kreis. Erkrankte Individuen sind durch ausgefüllte Symbole dargestellt, die Indexperson ist mit einem Pfeil markiert.

Quelle: eigene Darstellung

Die Substitution der Base Adenin durch Guanin an Position 902 der codierenden DNS (c.902A>G) führt zu einem Austausch der Aminosäure Asparagin durch Serin, es handelt sich also um eine Missense-Mutation.

Die Sequenz ist in Abb. 6 abgebildet, in Tab. 21 sind die Beurteilung der Pathogenität und die MAF dargestellt, in Tab. 22 die Konservierungsanalyse.

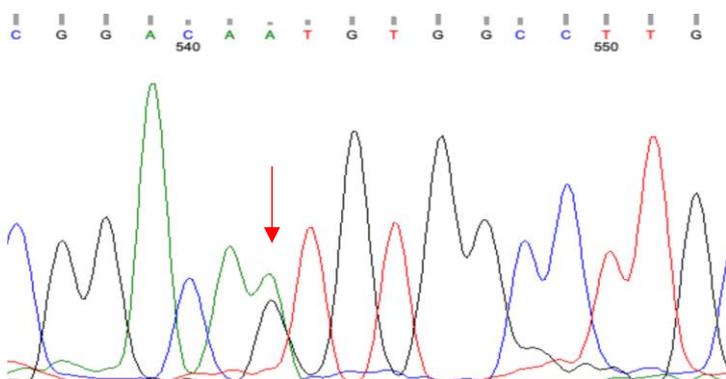


Abbildung 6: Sequenzausschnitt von UQCRC1 Exon 8 um die Variante p.N301S (het)

Die Variante ist mit einem Pfeil markiert. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Tyrosin

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 21: Beurteilung der Pathogenität von Variante p.N301S und Darstellung ihrer Minor Allele Frequency (MAF)

Prädiktion der Pathogenität		Frequenz	
Programm	Beurteilung	Kohorte	MAF
Mutationtaster	Disease causing	untersuchte Kohorte	0.002
PROVEAN	Neutral (-2.02)	gnomAD	0.004
SIFT	tolerated	AMP-PD case	0.004
Polyphen2	Possibly damaging	AMP-PD control	0.002
CADD	12.26		

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 22: Konservierungsanalyse der Aminosäure N an Pos. 301

Spezies	Aminosäure
<i>Homo sapiens</i>	N
Variante	S
<i>Pan troglodytes</i>	N
<i>Macaca mulatta</i>	N
<i>Felis catus</i>	N
<i>Equus caballus</i>	N
<i>Suricata suricatta</i>	N

N: Asparagin, S: Serin

Quelle: eigene Darstellung

5.2.5 p.G312S

Die detektierte Variante p.G312S befindet sich in Exon 8 des Gens *UQCRC1*. In der untersuchten Kohorte konnte diese Variante einmal gefunden werden.

Der Träger dieser Variante erkrankte im Alter von 56 Jahren am Parkinson-Syndrom. Die Symptomatik war einseitig beginnend mit Schwäche und leichtem Zittern im linken Arm sowie einer subjektiven Gangunsicherheit, es handelte sich um ein linksbetontes Parkinson-Syndrom vom Äquivalenztyp.

Bei der letzten Untersuchung im Alter von 60 Jahren konnten kein Ruhe- oder Haltetremor und keine posturale Instabilität festgestellt werden.

Der mäßig ausgeprägte Rigor war links stärker als rechts, insbesondere nachts litt der Patient an gelegentlichen Myoklonien.

Autonome Symptome wie Harndrang lagen vor, standen aber nicht im Vordergrund.

Nuklearmedizinisch konnte eine verminderte Dichte an D2-Rezeptoren festgestellt werden, der Verdacht auf eine MSA erhärtete sich bei der Glucose-PET-CT-Untersuchung nicht.

Das Ansprechen auf Levodopa war sehr gut, Verlaufsdaten liegen nicht vor.

Die Mutter des Patienten war ebenfalls von dieser Erkrankung betroffen, seine beiden erwachsenen Söhne waren zum Zeitpunkt der Studie nicht am Parkinson-Syndrom erkrankt. Zu dieser Zeit waren sie 39 und 42 Jahre alt.

Bei beiden Söhnen wurde im Verlauf ebenfalls die Sequenz von Exon 8 des Gens *UQCRC1* bestimmt.

Der 1978 geborene, asymptotische Sohn des Patienten konnte ebenfalls als Träger der Variante p.G312S identifiziert werden, nicht aber sein jüngerer Bruder.

Der Stammbaum der Familie ist in Abb. 7 zu sehen.

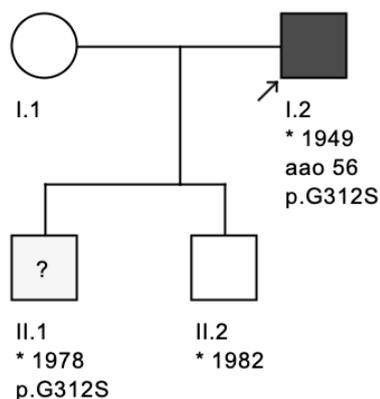


Abbildung 7: Stammbaum des Patienten mit der Variante p.G312S.

aao: age at onset. Männliche Personen sind durch ein Rechteck symbolisiert, weibliche durch einen Kreis. Erkrankte Individuen sind durch ausgefüllte Symbole dargestellt, die Indexperson ist mit einem Pfeil markiert. Das Fragezeichen bei Person II.1 symbolisiert, dass auf Grund des Genotyps und des aktuellen Alters der Erkrankungsstatus abzuwarten bleibt.

Quelle: eigene Darstellung

Durch die Basensubstitution Guanin zu Adenin an Position 934 der codierenden DNS (c.934G>A) kommt es auf Aminosäureebene zu einem Austausch der Aminosäure Glycin durch Serin, es handelt sich folglich um eine Missense-Mutation.

Die Sequenz ist in Abb. 8 abgebildet, in Tab. 23 sind die Beurteilung der Pathogenität und die MAF dargestellt, in Tab. 24 die Konservierungsanalyse.

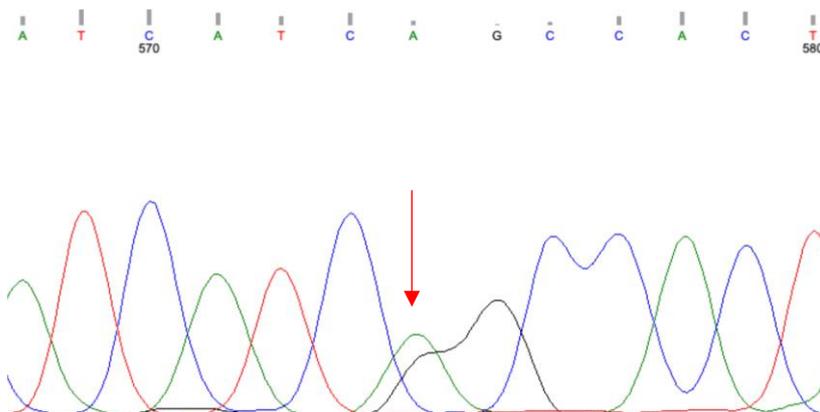


Abbildung 8: Sequenzausschnitt von UQCRC1 Exon 8 um die Variante p.G312S (het.)

Die Variante ist mit einem Pfeil markiert. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thyrosin

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 23: Beurteilung der Pathogenität von Variante p.G312S und Darstellung ihrer Minor Allele Frequency (MAF)

Prädiktion der Pathogenität		Frequenz	
Programm	Beurteilung	Kohorte	MAF
Mutationtaster	Disease causing	untersuchte Kohorte	0.002
PROVEAN	Deleterious (-5.97)	gnomAD	0.001
SIFT	Damaging	AMP-PD case	0.001
Polyphen2	Probably damaging	AMP-PD control	0.0005
CADD	36		

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 24: Konservierungsanalyse der Aminosäure G an Pos. 312

Spezies	Aminosäure
<i>Homo sapiens</i>	G
Variante	S
<i>Pan troglodytes</i>	G
<i>Macaca mulatta</i>	G
<i>Felis catus</i>	G
<i>Equus caballus</i>	G
<i>Suricata suricatta</i>	G

G: Glycin, S: Serin

Quelle: eigene Darstellung

5.2.6 p.E435K

Bei insgesamt zwei Patienten der untersuchten Kohorte fand sich die heterozygote Mutation p.E435K in Exon 12.

Träger der Variante waren je ein Mann und eine Frau, der männliche Patient ist im Alter von 58 Jahren am Parkinson-Syndrom erkrankt.

Über den männlichen Patienten lagen keine weiteren Informationen vor außer der Aussage, es gäbe ca. 12 Betroffene in der Familie.

Die weibliche Patientin war zum Zeitpunkt der Erstmanifestation 52 Jahre alt, bei ihrer Erkrankung handelt es sich um ein rechtbetontes Parkinson-Syndrom vom Äquivalenztyp. Bei der letzten Untersuchung im Alter von 58 Jahren lag das Hoehn und Yahr Stadium II vor, im Vordergrund der Symptomatik stand die Störung der Feinmotorik des rechten Armes. Bei emotionaler Anspannung bestand ein Tremor rechtsseitig. Es lag eine subjektive Gangunsicherheit vor, jedoch keine Ganginitiationsstörung, kein Freezing, keine Festination und keine posturale Instabilität.

Axial und am rechten Arm fand sich ein leichter Rigor.

Hinweise auf kognitive Defizite oder depressive Verstimmungen lagen nicht vor und es wurden abgesehen von einer ausgeprägten Hyposmie keine nicht-motorischen Beschwerden angegeben.

Die Mutter der Patientin litt seit ihrem sechsten Lebensjahrzehnt ebenfalls am Parkinson-Syndrom. Weitere Betroffene in der Familie gab es zum Zeitpunkt der Studie nicht.

Durch den Austausch der Base Guanin durch Adenin an Position 1303 der codierenden DNS (c.1303G>A) kommt es zu einer Änderung der resultierenden Aminosäure von Glutamin zu Lysin. Die Sequenz ist in Abb. 9 abgebildet, in Tab. 25 sind die Beurteilung der Pathogenität und die MAF dargestellt, in Tab. 26 die Konservierungsanalyse.

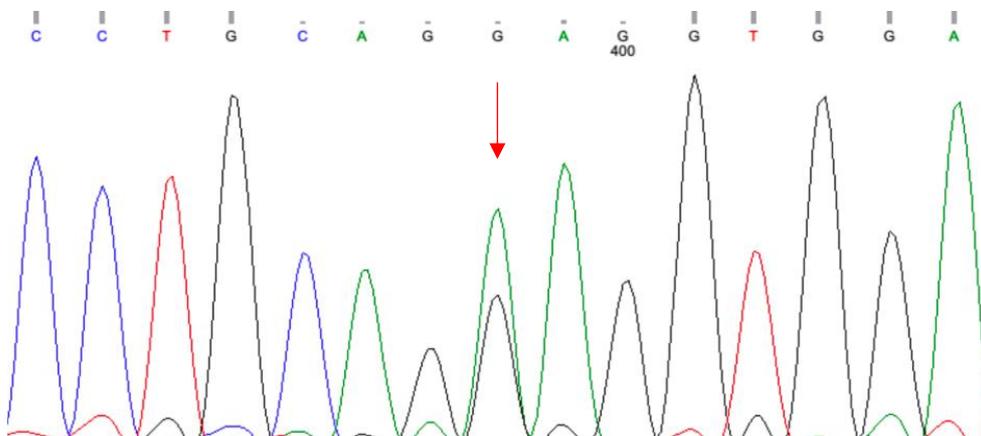


Abbildung 9: Sequenzausschnitt von UQCRC1 Exon 12 um die Variante p.E435K (het.)
Die Variante ist mit einem Pfeil markiert. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thyrosin
Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 25: Beurteilung der Pathogenität von Variante p.E435K und Darstellung ihrer Minor Allele Frequency (MAF)

Prädiktion der Pathogenität		Frequenz	
Programm	Beurteilung	Kohorte	MAF
Mutationtaster	Disease causing	untersuchte Kohorte	0,004
PROVEAN	Neutral (-0.35)	gnomAD	0,002
SIFT	tolerated	AMP-PD case	0,003
Polyphen2	benign	AMP-PD control	0,001
CADD	17,13		

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 26: Konservierungsanalyse der Aminosäure E an Pos. 435

Spezies	Aminosäure
<i>Homo sapiens</i>	E
Variante	K
<i>Pan troglodytes</i>	E
<i>Macaca mulatta</i>	E
<i>Felis catus</i>	E
<i>Equus caballus</i>	E
<i>Suricata suricatta</i>	E

E: Glutamin, K: Lysin

Quelle: eigene Darstellung

5.2.7 Varianten in der untranslatierten Region

In der Untranslated Region (UTR) fanden sich zwei heterozygote Varianten: die Variante c.-11g>t, bei der es in der UTR vor Exon 1 zu einer Basensubstitution Guanin zu Thymin kommt, und die Variante c.*4a>g nach Exon 13, die in einer Basensubstitution Adenin zu Guanin resultiert.

Beide Varianten traten einmal auf.

Da die UTR nicht auf Proteinebene translatiert wird, kommt es zu keiner direkten Änderung der Aminosäuresequenz.

5.2.8 Intronische Varianten

Insgesamt fand sich in den beurteilten jeweils 20 bp vor und nach jedem Exon eine intronische Variante: c.69+17a>g. Diese Variante trat bei einem Patienten auf und besteht in einer Basensubstitution Adenin zu Guanin 17 Basenpaare downstream des ersten Exons. Da Introns nicht auf Proteinebene translatiert werden, kommt es zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz.

5.3 NUS1 Varianten

Keine der zahlreichen von Guo et al. beschriebenen de novo Varianten p.I22F, p.I36M, p.I36T, p.K58N, p.R67G, p.R86L, p.A89S, p.G91C, p.I117M, p.N144K, p.L159I, p.D163H, p.Q209H, p.N233D, p.L240I, p.V264I sowie c.691+3dupA in

der Splice-Site und c.882+15 A>T in der 3' UTR des Gens *NUS1* wurde in dieser Kohorte gefunden (Guo et al., 2018).

Im Folgenden steht in Tab. 27 eine Übersicht über die einzige in dieser Arbeit detektierte Variante des Gens *NUS1*:

Tabelle 27: detektierte Variante *NUS1*

Gen	Variante	MAF eigene Kohorte	MAF gnomAD	OR	95% KI	p-Wert
<i>NUS1</i>	p.P169H	0.006	0.002	2.67	0.37- 19.02	0.32

KI= Konfidenzintervall, MAF= Minor Allele Frequency, OR= Odds Ratio, p-Wert mit dem zweiseitigen Fisher exact test berechnet

Quelle: eigene Darstellung

5.3.1 p.P169R

Eine der untersuchten Patientinnen trug die heterozygote Variante p.P169R in Exon 2 des Gens *NUS1*.

Diese Patientin erkrankte im Alter von 30 Jahren an einem rechtsbetonten Parkinson-Syndrom. Zu Beginn litt sie vor allem an einem Ruhetremor der rechten Hand und einem deutlichen Rigor der unteren Extremität beidseits. Das Gangbild war kleinschrittig und es bestand eine posturale Instabilität.

Nachdem unter medikamentöser Therapie starke Wirkungsfluktuationen und Hyperkinesien auftraten, wurde sie seit einem Alter von 49 Jahren mit tiefer Hirnstimulation des Nucleus subthalamicus beidseits behandelt. Unter dieser Therapie kam es zunächst zu einer deutlichen Besserung der Symptomatik, im Verlauf waren jedoch mehrfache Korrekturen der Einstellung nötig und die Symptomatik war stark progredient.

Im Alter von 63 Jahren war die Patientin pflegebedürftig bei einer starken Gangstörung mit Freezing und Stürzen sowie einer ausgeprägten Demenz mit einem MoCA-Score von 5/30. Außerdem litt sie zum Untersuchungszeitpunkt an den nicht-motorischen Symptomen orthostatische Dysregulation, REM-Schlafstörung und Obstipation.

Die Familienanamnese war negativ.

Die Basensubstitution Cytosin zu Guanin an Position 506 der codierenden DNS (c.506C>G) führt zum Austausch der Aminosäure Prolin zu Arginin, es handelt sich also um eine Missense-Mutation. Die Sequenz ist in Abb. 10 abgebildet, in Tab. 28 sind die Beurteilung der Pathogenität und die MAF dargestellt, in Tab. 29 die Konservierungsanalyse.

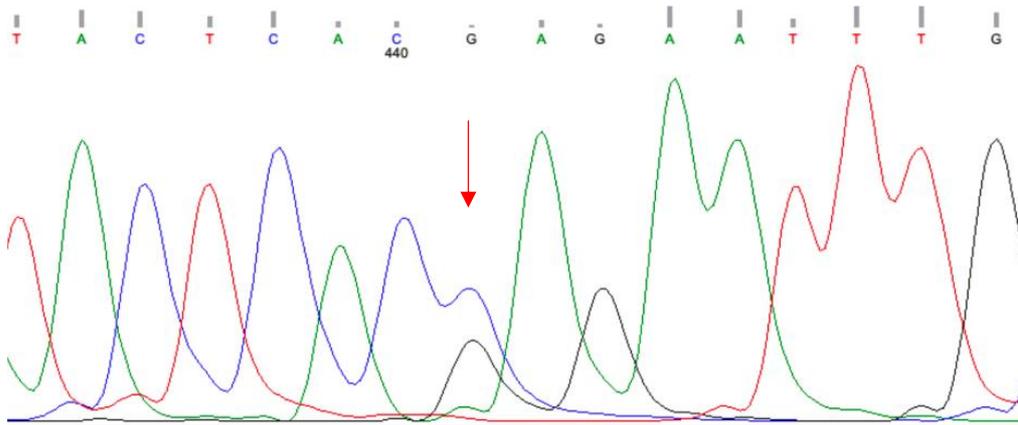


Abbildung 10: Sequenzausschnitt von NUS1 Exon 2 um die Variante p.P169R (het.)
Die Variante ist mit einem Pfeil markiert. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thyrosin
Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 28: Beurteilung der Pathogenität von Variante p.P169R und Darstellung ihrer Minor Allele Frequency (MAF)

Prädiktion der Pathogenität		Frequenz	
Programm	Beurteilung	Kohorte	MAF
Mutationtaster	Polymorphism	untersuchte Kohorte	0.006
PROVEAN	Neutral (-2.31)	gnomAD	0.002
SIFT	tolerated	AMP-PD case	0.0004
Polyphen2	benign	AMP-PD control	0.0003
CADD	19,26		

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 29: Konservierungsanalyse der Aminosäure P an Pos. 169

Spezies	Aminosäure
<i>Homo sapiens</i>	P
Variante	R
<i>Pan troglodytes</i>	P
<i>Macaca mulatta</i>	P
<i>Felis catus</i>	P
<i>Equus caballus</i>	P
<i>Suricata suricatta</i>	P

P: Prolin, R: Arginin

Quelle: eigene Darstellung

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Von den 259 untersuchten Patienten, deren Erkrankung über autosomal-dominante Vererbung zu erklären sein könnte, wiesen insgesamt 19 (7,3 %) Exonvarianten des Gens *UQCRC1* auf. Bei 15 davon handelte es sich um den Polymorphismus p.R269H, der in einer Kontrollkohorte noch prävalenter war. Die Signifikanz der anderen detektierten Varianten p.N301S, p.E435K und p.G312S bleibt zu diskutieren.

Des Weiteren fanden sich zwei Varianten in der UTR und eine in einem Intron. Die von Lin et al. beschriebenen Varianten c.941A>C (p.Y314S), c.931A>C (p.I311L), c.70-1G>A und c.73_74insG, p.A25Gfs*27 konnten in dieser Kohorte nicht gefunden werden.

Unter den 84 untersuchten Patienten mit negativer Familienanamnese und jungem Erkrankungsalter trug einer (1,2 %) eine exonische Variante des Gens *NUS1*, p.P169R, welche in der bioinformatischen Bewertung der Pathogenität als benigne eingestuft wurde.

Keine der zahlreichen von Guo et al. beschriebenen de novo Varianten war in diesem Patientenkollektiv vertreten.

Alle detektierten Varianten waren heterozygot.

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methodik

6.1.1 Diagnosesicherheit

Die Diagnose des Parkinson-Syndroms bei den Patienten der ausgewählten Kohorten wurde klinisch gestellt und bei keinem der Patienten histopathologisch gesichert, da zum Zeitpunkt der Studie niemand verstorben war.

Die Diagnosestellung erfolgte durch eine ärztliche Untersuchung nach den Kriterien der Movement Disorder Society, jedoch variiert die Diagnosesicherheit je nach Erfahrung und Expertise des Untersuchers sowie Krankheitsdauer und Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 75 % und 95 % (Postuma et al., 2015).

6.1.2 Kriterien für die Kohorte von *UQCRC1*

Bei der Auswahl der Patienten für die Kohorte der Untersuchung von *UQCRC1* wurde keine untere Altersgrenze für das Erkrankungsalter festgelegt, es sind also auch early-onset-Patienten in dem Kollektiv enthalten, obwohl ein möglicher Zusammenhang zwischen *UQCRC1*-Varianten und MP initial bei late-onset-Patienten beschrieben wurde (Lin et al., 2020b). Da die Studienlage zu diesem Thema zum aktuellen Zeitpunkt aber noch unzureichend ist, wurde entschieden Patienten jeglichen Erkrankungsalters bis zu einer Grenze von 75 Jahren zu untersuchen.

Diese obere Grenze wurde gewählt, da die Prävalenz von MP mit dem Alter steigt und in der Bevölkerung zwischen 75 und 84 Jahren bereits bei ca. 3,1 % liegt (de Rijk et al., 1995). Ein hohes Erkrankungsalter schließt eine genetische Komponente bei der Ätiologie zwar nicht aus, ihre Effektstärke wird dann aber als gering eingestuft (die Odds Ratio ist für Common Variants $<1,5$) und moduliert das Erkrankungsrisiko wahrscheinlicher als tatsächlich kausal zu sein (Cherian and Divya, 2020).

Da Patienten mit einem vermutlich autosomal-dominanten Vererbungsmuster untersucht werden sollten, wurden nur solche mit mindestens einem betroffenen Verwandten ersten Grades eingeschlossen (Klein and Westenberger, 2012).

Dies berücksichtigt nicht die möglicherweise unvollständige Penetranz (Shieh, 2019), die zum Überspringen der Erkrankung von Generationen führen kann, es wurden also vermutlich nicht alle in der Biobank verfügbaren Patienten mit potentiell autosomal-dominant vererbtem MP untersucht.

Da das Überspringen von Generationen allerdings besonders für autosomal-rezessive Vererbungsmuster typisch ist (Klein and Westenberger, 2012), weniger für autosomal-dominante, wurde auf den Einschluss solcher Patienten in die Studie verzichtet.

Hinzu kommt, dass nicht bei allen in die Biobank aufgenommenen Patienten eine Familienanamnese erhoben worden war, wodurch in diesen Fällen keine Rückschlüsse auf das Vererbungsmuster und somit kein Einbezug in die Studie möglich waren.

Des Weiteren wurde bei den Patienten das Vorliegen bekannter pathogener Varianten der Gene *LRRK2*, *GBA*, *PRKN*, *PINK1* oder *PARK7* untersucht, auf Grund der Vielzahl an bekannten und bis dato unbekannt Genen mit einem Einfluss auf die Ätiologie von Morbus Parkinson ist diese Untersuchung allerdings unvollständig und bedeutet nicht, dass keine andere genetische Ursache für die Erkrankung vorliegen könnte. Aus Gründen der technischen Umsetzbarkeit und des finanziellen Aufwands wurde daher entschieden, die Untersuchung zum Ausschluss bekannter genetischer Ursachen auf die genannten, häufig ursächlichen Gene zu beschränken.

Was die Größe der Kohorte betrifft, so ist eine möglichst große Kohorte bei seltenen Varianten wünschenswert, da mit der Anzahl der Patienten die Wahrscheinlichkeit steigt, solche seltenen Varianten zu detektieren. Auf Grund der oben beschriebenen Kriterien war die einbezogene Anzahl Patienten die mit den zur Verfügung stehenden Daten und Proben maximal mögliche Anzahl für die vorliegende Arbeit. Mit den Datenbanken gnomAD und AMP-PD bestand zudem Zugriff auf das Genom von über 140.000 gesunden Kontrollen sowie mehr als 1600 weiteren Parkinsonpatienten, so dass die eigenen Resultate in einen größeren Kontext gesetzt werden können.

Unterschiede zu der Kohorte von Lin et al. sind etwa die Größe der Kohorte, die bei Lin et al. 699 nicht verwandte Parkinsonpatienten mit autosomal-dominantem Parkinson-Syndrom und 1.934 Patienten mit sporadischem MP sowie insgesamt 2.594 gesunde Kontrollen umfasst. Das hier untersuchte Kollektiv umfasst 259 Probanden mit mutmaßlich autosomal-dominant vererbtem MP, in der AMP-PD Kohorte sind 1.050 Kontrollpersonen und 1.647 Parkinsonpatienten enthalten, bei denen hinsichtlich einer möglichen Vererbung nicht weiter differenziert wurde. Außerdem unterscheidet sich die Ethnie der untersuchten Kollektive: während Lin et al. ausschließlich taiwanesischen, koreanischen und japanischen Probanden betrachteten, sind die Probanden der vorliegenden Arbeit alle europäischer (nicht finnischer) Abstammung. Was das Erkrankungsalter der Patienten betrifft, so liegt dieses in den drei primär untersuchten Indexfamilien von Lin et al. zwischen 40 und 60 Jahren, bei den 259 hier untersuchten Probanden bei unter 75 Jahren. Zudem schlossen Lin et al. bekanntermaßen pathogene Varianten von insgesamt 40 Genen aus, in der vorliegenden Studie wurden solche Varianten bei insgesamt fünf Genen ausgeschlossen.

6.1.3 Kriterien für die Kohorte von *NUS1*

Für die Untersuchung des Gens *NUS1* sollten Patienten mit einem jungen Erkrankungsalter (early onset) berücksichtigt werden, die keine betroffenen Verwandten haben und deren krankheitsverursachende genetische Variante daher de novo sein könnte.

Hierbei ergab sich das Problem, dass der Begriff „early onset“ nicht einheitlich definiert ist, so sind beispielsweise bei Cherian und Divya Patienten mit einem Erkrankungsalter von unter 50 Jahren gemeint (Cherian and Divya, 2020), bei Quinn et al. Patienten mit einem Erkrankungsalter von unter 40 Jahren (Quinn et al., 1987).

Für die vorliegende Studie wurde ein Erkrankungsalter von unter 40 Jahren gewählt.

Bei de novo Varianten gibt es die Schwierigkeit, dass für ein definitives Feststellen des Neuauftretens der Variante Trios, das heißt der Patient und beide

Elternteile, genetisch untersucht werden müssen und auch eine genetische Bestätigung der tatsächlichen Elternschaft erforderlich ist (Richards et al., 2015). In Ermangelung der Verfügbarkeit wurde darauf verzichtet, nur Patienten bei denen genetisches Material beider Eltern vorlag einzuschließen.

Da alle Patienten zum Zeitpunkt der Studie noch am Leben waren und ihr Einverständnis gegeben haben gegebenenfalls kontaktiert zu werden, hätte eine genetische Untersuchung der Eltern im Falle interessanter Untersuchungsergebnisse eventuell noch im Nachgang erfolgen können.

Unterschiede zu der Kohorte von Guo et al. gibt es beispielsweise in der Hinsicht, dass von den dort untersuchten 39 jung erkrankten Indexpatienten auch beide Eltern sowie insgesamt 20 nicht betroffene Geschwister genetisch untersucht wurden. Die vorliegende Studie beschränkt sich aus oben genannten Gründen auf die Indexpatienten. Guo et al. untersuchten die bei den 39 de novo Patienten identifizierten Kandidatengene in zwei weiteren Kohorten, die insgesamt 5.089 Patienten (durchschnittliches Erkrankungsalter $48,75 \pm 12,50$ Jahre in Kohorte 1 beziehungsweise $58,05 \pm 10,10$ Jahre in Kohorte 2) und 4.423 Kontrollen umfassten, von den hier detektierten 26 Trägern von seltenen Varianten des Gens *NUS1* wurden jedoch bei den meisten die Eltern nicht mit untersucht, so dass kein Rückschluss auf das Neuauftreten der Varianten möglich ist. Das Erkrankungsalter liegt bei den Indexpatienten von Guo et al. bei unter 35 Jahren, in der vorliegenden Studie bei unter 40 Jahren.

Während Guo et al. das Vorliegen bekanntermaßen pathogener Varianten von 20 verschiedenen Genen ausschlossen, sind es in der vorliegenden Studie fünf Gene.

6.1.4 Labormethoden

Alle Arbeiten im Labor wurden unter Einhaltung strenger Hygiene- und Sauberkeitsregeln durchgeführt, zudem wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen zu detektieren.

Alle Arbeitsschritte erfolgten nach einem festgelegten Protokoll, um die Bedingungen zu standardisieren und Zufallsvariablen zu reduzieren.

Bei der Durchführung der PCR wurden die Reaktionsbedingungen für jeden Primer separat etabliert und optimiert, um möglichst spezifische Produkte zu erhalten.

Zur Bestimmung der Sequenzen wurde die Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) angewendet, die den Goldstandard darstellt (McCourt et al., 2013). Stets wurden der Forward- und der Reverse-Strang separat sequenziert, so dass alle detektierten Varianten zunächst im komplementären Strang validiert wurden. Zudem wurden, um eine möglichst hohe Genauigkeit zu erzielen, alle detektierten Varianten falls vorhanden in einer zweiten DNS-Probe validiert, lag keine zweite Probe vor so wurde die erste Probe nochmals untersucht.

6.1.5 Auswertung

Die Auswertung der Sequenzen und der Abgleich mit der Referenzsequenz erfolgte für alle Proben manuell, so dass auch heterozygote Varianten zielsicher erkannt wurden.

Um die Wahrscheinlichkeit zu reduzieren, dass Varianten übersehen oder falsch gedeutet werden, wurden alle Sequenzen durch eine erfahrene medizinisch-technische Assistentin ein zweites Mal ausgewertet.

Es ist also davon auszugehen, dass die bestimmten Sequenzen den tatsächlichen Genotyp des jeweiligen Patienten widerspiegeln.

In dieser Studie wurden alle codierenden Exons sowie jeweils 20 bp des Introns vor und nach jedem Exon beurteilt.

Varianten, die sich an einer anderen Stelle des Introns befinden, wurden somit nicht detektiert. Sogenannte Deep Intronic Variations, die sich 100 bp oder mehr vom Exon entfernt finden, wurden beispielsweise als mögliche Ursache für die Niemann-Pick-Krankheit Typ C1 (Rodríguez-Pascau et al., 2009) oder die Muskeldystrophie Typ Duchenne (Takeshima et al., 2010) beschrieben. Es ist daher denkbar, dass intronische Varianten der Gene *UQCRC1* und *NUS1*, die hier nicht erfasst wurden, eine Rolle bei der Entstehung von MP spielen.

Dennoch wurde im Rahmen dieser Studie auf Grund von Kosten-Nutzen-Abwägungen entschieden, die Introns nicht zu untersuchen, da dies auf Grund

der Länge von Introns, die circa ein Zwanzigfaches der Exonlänge beträgt (Vaz-Drago et al., 2017), sehr aufwändig gewesen wäre und in Anbetracht der wenigen Hinweise in der Literatur auf einen Zusammenhang mit MP wenig zusätzliche Informationen versprach.

Hinzu kommt, dass viele Datenbanken wie das hier verwendete gnomAd v2.1.1 überwiegendst Exomdaten enthalten und daher ein sinnvoller Vergleich der MAF erschwert gewesen wäre.

6.1.6 Vorhersageprogramme

Die verwendeten Vorhersageprogramme MutationTaster, SIFT, PROVEAN und PolyPhen-2 legen in Ihrer Bewertung der Varianten unterschiedliche Schwerpunkte: der Fokus von MutationTaster sind die Proteinstruktur und -funktion sowie die evolutionäre Konservierung, bei SIFT ist es die evolutionäre Konservierung, bei PROVEAN eine Bewertung der Ähnlichkeit der Variantensequenz und der homologen Proteinsequenz und bei PolyPhen-2 sind die Schwerpunkte ebenfalls die Proteinstruktur und -funktion sowie die evolutionäre Konservierung (Richards et al., 2015).

CADD1.6 vergleicht die Annotation von (nahezu) fixierten Allelen beim Menschen mit denen simulierter Varianten (Rentzsch et al., 2019).

Solche in-silico-Tools sind bei der Bewertung bekanntermaßen pathogener beziehungsweise neutraler Varianten zu 65-80% akkurat (Thusberg et al., 2011) und tendieren eher dazu, die Pathogenität leicht zu überschätzen (Choi et al., 2012).

Insgesamt liegt bei in-silico-Analysen das Problem vor, dass die Sensitivität und Spezifität begrenzt ist (Thusberg et al., 2011). Dies ist unter anderem der Tatsache geschuldet, dass der Allelfrequenz bei diesen Analysen teils eine große Bedeutung beigemessen wird, die Allelfrequenzen jedoch bei ca. 85 % aller nichtsynonymen Varianten bei unter 0,005 liegt und pro Individuum mit 100-400 solcher Varianten zu rechnen ist (Tennesen et al., 2012).

Die Unterschiedlichkeit der zugrunde liegenden Algorithmen zeigt sich auch hier in den verschiedenen Vorhersagen der Programme für ein und dieselbe Variante.

Es ist daher nicht möglich, absolute Aussagen zur Pathogenität zu treffen, sondern lediglich durch die Kombination verschiedener Tools eine möglichst genaue Vorhersage zu generieren.

Hinweise auf Pathogenität sind laut Richards et al. hierbei Varianten, die die Größe, Struktur und Funktion des Proteins beeinflussen, vor allem also Nonsense-, Frameshift- oder Splicing-Mutationen oder Deletionen. Bei Missense-Mutationen sind die biochemischen Eigenschaften der ursprünglichen und der neuen Aminosäure von Bedeutung, da sie die Tertiärstruktur des Proteins beeinflussen. Auch die Position der betroffenen Aminosäure im fertigen Protein spielt eine Rolle, ist die funktionelle Domäne betroffen so ist die Wahrscheinlichkeit für Pathogenität erhöht.

Evolutionär hohe Konservierung einer Aminosäure spricht für einen aus ihr resultierenden Selektionsvorteil; betrifft eine Variante eine solche Aminosäure ist dies ein Hinweis auf mögliche Pathogenität.

Auch die Allelfrequenz in einer Referenzpopulation dient als Anhaltspunkt für die Klassifikation von Varianten, ist die MAF eines Allels größer als 5 % so ist dies ein starker Indikator für Benignität (Richards et al., 2015).

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 UQCRC1

6.2.1.1 Varianten der Lin et al. Studie

Die von Lin et al. beschriebenen, hier gesuchten exonischen Missense-Varianten c.941A>C (p.Y314S) und c.931A>C (p.I311L) sowie die intronische Variante c.70-1G>A und die sie in der Studie von Lin et al. begleitende (konkomittierende) Insertion c.73_74insG (p.A25Gfs*27) konnten in der untersuchten Kohorte nicht gefunden werden.

Die Missense-Mutation p.Y314S wurde ursprünglich in einer taiwanesischen Familie detektiert, in der fünf Mitglieder von einem spät beginnenden Parkinson-Syndrom mit Polyneuropathie und gutem Ansprechen auf Levodopa betroffen waren. Fünf gesunde Familienmitglieder wurden ebenfalls genetisch untersucht; die Variante p.Y314S cosegregierte mit der Erkrankung (Lin et al., 2020a).

Diese Variante, p.Y314S, ist in der gesamten gnomAD Datenbank, die insgesamt 141.456 Individuen umfasst, weder hetero- noch homozygot in einer der betrachteten Populationen vertreten. In der AMP-PD-Kohorte ist sie ebenfalls nicht beschrieben. Auch bei insgesamt 2.595 taiwanesischen und japanischen gesunden Kontrollen war die Variante nicht präsent (Lin et al., 2020b).

In der Studie von Senkevich et al. (Senkevich et al., 2020) wurde die Variante p.Y314S weder in der AMP-PD Kohorte noch in der Kohorte des IPDGC detektiert, wobei diese beiden europäischen Kohorten insgesamt über 16.000 Fälle und über 18.000 Kontrollen europäischen Ursprungs inkludierten.

Die Frequenz dieser Variante ist daher als sehr selten anzunehmen, womit es wenig überraschend ist, dass sie bei keinem der untersuchten Probanden der vorliegenden Studie zu finden war.

Der CADD-Score für diese Variante liegt bei 27,1.

Eine denkbare Erklärung dafür, dass p.Y314S in der taiwanesischen Familie bei fünf Parkinsonpatienten heterozygot auftrat, nicht aber bei ihren fünf gesunden Verwandten, wäre auch dass diese Variante nicht ursächlich für den Morbus Parkinson, wohl aber für die Polyneuropathie ist. Zudem könnte es sich um eine sehr seltene, atypische Form des Morbus Parkinson handeln, dessen genetische Grundlage sich von typischen Formen des MP unterscheidet.

Die fünf Indexpatienten erkrankten im Alter zwischen 42 und 62 Jahren an MP; vier von ihnen erkrankten in ihrem dritten Lebensjahrzehnt an einer an der distalen unteren Extremität beginnenden Polyneuropathie (Lin et al., 2020b). Des Weiteren ist zu beachten, dass bei einem Teil der betroffenen Familienmitglieder auch die Variante p.D555N des Gens *CLCN6* detektiert wurde. Varianten dieses Gens, welches für den späten endosomalen Cl⁻/H⁺-Austauscher CIC-6 codiert, sind unter anderem assoziiert mit dem Vorhandensein von früh beginnender Neurodegeneration (Polovitskaya et al., 2020). Denkbar wäre also auch, dass diese *CLCN6*-Variante allein oder in Zusammenspiel mit der *UQCRC1*-Variante eine Rolle in der Ätiologie des Krankheitsbildes der Betroffenen spielt.

Die Variante p.I311L, die bei zwei betroffenen taiwanesischen Brüdern mit Tremor-dominantem MP gefunden wurde, ist ebenfalls bei keinem der 141.456

Individuen der gnomAD Datenbank beschrieben, ebenso wenig in der AMP-PD Datenbank oder der taiwanesisch-koreanischen Kontrollgruppe. Der CADD-Score dieser Variante beträgt 16,87.

Auch die Insertion c.73_74insG (p.A25Gfs*27), die im Indexfall konkomittierend mit der Intronvariante c.70-1G>A auftrat und laut Vorhersage zu alternativem Splicing führt, ist in keiner der Datenbanken gelistet und damit in der Referenzkohorte sehr selten.

Die Tatsache, dass keine der von Lin et al. beschriebenen Varianten in der gnomAD- oder AMP-PD-Kohorte gefunden wurde, könnte auf ethnisch bedingte Unterschiede im Genom zurückzuführen sein.

Während Lin et al. ostasiatische Patienten aus Taiwan und Japan untersuchten, sind von den 141.456 Individuen der non-neuro-Kohorte von gnomAD lediglich 7.486 ostasiatischer Abstammung, das Kollektiv AMP-PD und das hier untersuchte Kollektiv betrachten ausschließlich europäische Patienten.

Zwar sind die Varianten auch in der taiwanesischen Kontrollgruppe nicht zu finden, dies wäre bei Varianten mit beispielsweise einer MAF <0,0001 % aber bei einer Kohortengröße von 2.595 bzw. 7.486 Individuen auch nicht unbedingt zu erwarten gewesen.

In einer europäischen beziehungsweise deutschen Kohorte scheinen die Varianten c.941A>C (p.Y314S), c.931A>C (p.I311L), c.70-1G>A und c.73_74insG (p.A25Gfs*27) daher gemäß der Frequenz in der AMP-PD-Parkinson-Kohorte und der eigenen Ergebnisse keine bedeutende Rolle bei der Entstehung von typischem MP zu spielen.

6.2.1.2 p.R269H

Durch die Substitution G>A an Pos. 806 der codierenden DNS (rs62618742) kommt es zum Austausch der Aminosäure Arginin durch Histidin.

Beide Aminosäuren gehören zu den basischen Aminosäuren und liegen unter physiologischen Bedingungen protoniert vor. Da Histidin jedoch einen niedrigen

pKs Wert von 6,5 besitzt, liegt es nur zum Teil protoniert vor. Arginin hingegen hat einen pKs Wert von 12,5 und ist vollständig protoniert (Horn, 2015).

Aminosäuren mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften haben, wenn sie gegeneinander ausgetauscht werden, meist größeren Einfluss auf das fertige Protein da sie dessen Tertiärstruktur und Funktion stärker beeinflussen können (Ng and Henikoff, 2006).

Es gibt allerdings auch Fälle, in denen die Substitution der biochemisch recht ähnlichen Aminosäuren Arginin durch Histidin die Funktion des Proteins beeinflusst (Barbetti et al., 1990).

Die Aminosäure an Position 269 ist innerhalb des Proteins zwischen einem Beta-Faltblatt und einer Helix lokalisiert.

Bei Betrachtung der 15 Variantenträger des Kollektivs ergibt sich ein heterogenes Bild: das Erkrankungsalter liegt zwischen 38 und 67 Jahren, es sind zehn männliche und fünf weibliche Personen darunter und während einige an zusätzlichen nicht motorischen Symptomen leiden, sind bei anderen keine derartigen Beschwerden dokumentiert. Eine auffällige Ähnlichkeit was das Erkrankungsalter, Geschlecht oder den Phänotyp betrifft kann daher nicht festgestellt werden.

Diese Variante ist mit einer MAF von 0,026 in der gnomAD-Kohorte eine häufige Variante in der europäischen nicht-finnischen Bevölkerung.

Während sie in dem hier untersuchten Kollektiv eine MAF von 0,029 hat, liegt diese in der regional ähnlichen, geschlechtsangepassten neurologisch gesunden Kontrollgruppe sogar bei 0,035. Damit beträgt die OR 0,82 bei einem 95 % Konfidenzintervall von 0,41 – 1,67 bei einem p-Wert von 0,29.

Betrachtet man die untersuchte Kohorte und die gnomAD-Referenz, so liegt die Odds Ratio bei 1,12, das 95 % KI reicht von 0,67-1,89 mit einem p-Wert von 0,67, der Unterschied ist somit nicht statistisch signifikant.

In der Fall- und Kontrollgruppe des AMP-PD gibt es keinen Unterschied in der MAF dieser Variante.

Die Bewertung durch die Vorhersageprogramme fällt uneinheitlich aus; so beurteilen MutationTaster und PROVEAN (Score -4,48; bei einem Cut-off von -4,1 beträgt die Sensitivität 57,6 % und die Spezifität 90,3 % (Choi and Chan, 2015)) die Variante als pathogen, PolyPhen2 als eventuell pathogen und SIFT (Score 0,162; Cut-off bei 0,05) als benigne.

Der CADD-Score beträgt 18,89.

Zum aktuellen Zeitpunkt (04/21) gibt es keine Publikationen und keinen Eintrag in ClinVar über diese Variante.

Auch wenn einige der verwendeten in-silico-Methoden die Variante als pathogen einstufen und die hohe Konservierung der Aminosäure Arginin an dieser Position bei den ausgewählten Spezies einen krankheitsverursachenden Effekt vermuten lassen, so scheint es in Zusammenschau mit der Allelfrequenz doch sehr unwahrscheinlich, dass diese Variante ursächlich für das Parkinson-Syndrom ist. Auch ein modulierender Effekt, der die Erkrankungswahrscheinlichkeit gemeinsam mit anderen Faktoren erhöht, scheint nicht vorzuliegen da die Variante in der hier untersuchten gesunden Kontrollgruppen sogar noch etwas prävalenter ist und auch im Vergleich mit den öffentlichen Datenbanken kein signifikanter Unterschied in der Frequenz besteht.

6.2.1.3 p.N301S

Bei der Variante p.N301S führt ein Austausch der Base Adenin durch Guanin an Position 902 der codierenden DNS zum Austausch der Aminosäure Asparagin durch Serin (rs144710790).

Während es sich bei Asparagin um ein ungeladenes Amid handelt, ist Serin eine polare aber unter physiologischen Bedingungen neutrale Aminosäure (Horn, 2015), bezüglich ihrer Polarität unterscheiden sich die beiden Aminosäuren also in vivo nicht.

Innerhalb des Proteins befindet sich die Aminosäure in einer Helix.

In der untersuchten Kohorte tritt die Variante bei einem Patienten auf, welcher von einem early-onset Parkinson-Syndrom betroffen ist und besonders starke

Wirkungsfluktuationen unter der Therapie aufweist. Ca. 20 Jahre nach Erstmanifestation befindet er sich im Hoehn und Yahr Stadium IV, die Familienanamnese ist mit 6 Betroffenen innerhalb dreier Generationen hoch positiv und spricht klar für ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster.

Da die Familie in Griechenland lebt, war es nicht möglich, diese klinisch oder molekulargenetisch zu untersuchen.

Der Patient ist zudem Träger der Variante p.V380L im *PRKN* Gen, diese wurde jedoch als nicht pathogen eingestuft.

Die Sequenzierung aller Exons des Gens *GBA* und der Exons 24, 27, 30, 31, 35, 40 und 41 des Gens *LRRK2* zeigte den Wildtyp. Die Sequenzierung aller Exons des Gens *PINK1* zeigte die Varianten c.388-7A>G hom, c.960-5G>A hom, c.*37A>T hom sowie p.N521T hom, von denen keine als pathogen eingestuft wurde. Auch wurden alle Exons des Gens *PRKN* sowie dessen Gendosis untersucht, es zeigte sich die Variante p.V380L die ebenfalls als nicht pathogen eingestuft wurde.

Die MAF dieser Variante ist mit 0,002 in der untersuchten Kohorte halb so groß wie in der Referenzkohorte gnomAD mit 0,004. In der gnomAD-Kohorte sind hierbei 440 heterozygote und ein homozygoter Träger der Variante unter den rund 141.000 untersuchten Individuen.

Die OR beträgt hier 0,45, das 95 % KI liegt bei 0,063-3,21 mit einem p-Wert von 0,73. Der Unterschied ist somit statistisch nicht signifikant.

In der AMP-PD-Kohorte liegt die Frequenz bei den Parkinsonpatienten ebenfalls bei 0,004, bei Kontrollen hingegen bei 0,002.

Diese abweichenden Ergebnisse lassen sich zum einen durch fehlende Relevanz der Variante in der Ätiologie des Parkinson-Syndroms erklären, zum anderen ist die Allelfrequenz so niedrig, dass sie bei der vorliegenden Kohortengröße der Parkinsonpatienten wenig aussagekräftig ist, da einzelne Fälle stark ins Gewicht fallen und das Ergebnis leicht verzerren können.

Die Vorhersage der Programme ist überwiegend, dass diese Variante keine pathogenen Auswirkungen hat. So liegt etwa der PROVEAN-Score bei -2,02

(Cut-off -2.5 für 78,6 % Spezifität und 80,4 % Sensitivität) und der CADD-Score ist mit 12,26 der niedrigste der hier detektierten *UQCRC1* Varianten.

In den untersuchten Spezies ist die Aminosäure Asparagin an dieser Position konserviert.

Zum aktuellen Zeitpunkt (04/21) gibt es keine Publikationen und keinen Eintrag in ClinVar über diese Variante.

Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass die Variante p.N301S bei dem beschriebenen Patienten nicht ursächlich für dessen Parkinsonerkrankung ist. Das häufige Auftreten der Erkrankung in der Indexfamilie und die Tatsache, dass alle drei Generationen betroffen sind, lässt eine hohe Penetranz der ursächlichen Mutation vermuten.

Das ist nicht zu vereinbaren mit der Tatsache, dass sich die MAF in großen Kohorten bei Fällen und Kontrollen nicht oder nur minimal unterscheidet, zudem sprechen die Vorhersagen der Programme gegen eine Pathogenität.

Das Krankheitsbild und die Familienanamnese des Patienten lassen sich von den bereits bekannten parkinsonverursachenden Genen am ehesten mit einer Variante des Gens *SNCA* in Einklang bringen.

6.2.1.4 p.G312S

Bei der Variante p.G312S kommt es durch Basensubstitution posttranslational zu einem Austausch der Aminosäure Glycin durch Serin.

Glycin ist die einfachste proteinogene Aminosäure und besitzt eine apolare, lipophile Struktur.

Serin dagegen zählt auf Grund der Hydroxygruppe in der Seitenkette zu den polaren Aminosäuren, ist jedoch ebenfalls neutral da sie nicht ionisiert vorliegt (Horn, 2015).

Auf Ebene der Tertiärstruktur ist die Aminosäure an Position 312 zwischen zwei Helices lokalisiert.

Hervorzuheben ist, dass es sich hier um die Aminosäure handelt, die der von Lin et al. beschriebenen Variante p.I311L direkt benachbart ist und sich nur eine

Aminosäure entfernt von der ebenfalls beschriebenen Variante p.Y314S befindet.

Die neue Aminosäure Serin, die sich dann jeweils an Position p.312 beziehungsweise p.314 befindet, ist bei beiden Varianten identisch.

Sollte es sich bei der betroffenen Region des Proteins also um eine funktionelle Domäne handeln, so könnte die räumliche und biochemische Ähnlichkeit der Varianten auf eine ähnliche Auswirkung hindeuten.

In der untersuchten Kohorte fand sich ein Patient mit dieser Variante, er leidet an einem linksbetonten Parkinson-Syndrom vom Äquivalenztyp mit begleitenden autonomen Symptomen und gutem Ansprechen auf Levodopa. Seine Mutter war ebenfalls an Morbus Parkinson erkrankt.

Das Erkrankungsalter ist mit 56 Jahren ähnlich wie bei den Patienten von Lin et al. (40-60 Jahre), anders als bei den Trägern der Variante p.Y314S ist bei diesem Indexpatienten jedoch keine Polyneuropathie bekannt.

Die beiden bis dato gesunden Söhne konnten ebenfalls molekulargenetisch untersucht werden, einer der beiden Söhne ist ebenfalls Träger der Variante p.G312S.

Die Söhne waren zum Zeitpunkt der Studie 39 und 42 Jahre alt und damit etwa 15 Jahre jünger als ihr Vater zum Zeitpunkt seines Erkrankungsbeginns gewesen ist. Es lässt sich daher keine absolute Aussage zur Cosegregation der Variante mit der Erkrankung in der Familie machen, da nicht beurteilt werden kann, ob die beiden Söhne später in ihrem Leben noch am Parkinson-Syndrom erkranken werden. Eine Verlaufsbeobachtung der beiden Söhne wäre daher von Interesse. Sollte der Träger der Variante ebenso wie sein Vater an MP erkranken, so wäre dies ein Indiz für einen Zusammenhang zwischen Genotyp und dem Auftreten der Erkrankung. Eine Erkrankung des Bruders, der nicht Träger der Variante ist, würde die Hypothese hingegen schwächen.

Diese Variante ist von den detektierten die Einzige, die von allen Vorhersageprogrammen als pathogen eingestuft wird. Der PROVEAN-Score liegt bei -5,97, womit die Variante mit einer Sensitivität von 57,6 und einer

Spezifität von 90,3 als pathogen bewertet wird. Der hohe CADD-Score ist mit 36 sehr hoch und der höchste der hier detektierten Varianten.

Die MAF ist in der untersuchten Kohorte mit 0,002 doppelt so hoch wie in der gnomAD-Referenzkohorte.

Die OR beträgt daher 2,21 mit einem 95 % KI von 0,31-15,93 bei einem p-Wert von 0,37. Der Unterschied ist somit statistisch nicht signifikant.

Gleiches zeigt sich in den beiden Gruppen des AMP-PD, in der die Variante mit einer MAF von 0,001 bei den Parkinsonpatienten und mit einer MAF von 0,0005 bei den gesunden Kontrollen vertreten ist.

In den untersuchten Spezies ist die Aminosäure Glycin an dieser Position konserviert.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass diese Variante potenziell krankheitsverursachend sein könnte. Eine Verlaufsbeobachtung der Verwandtschaft, insbesondere der beiden Söhne des Patienten, könnte weiteren Aufschluss über die Bedeutung dieser Variante geben, ebenso wie eine Untersuchung in größeren Kohorten.

6.2.1.5 p.E435K

In der Kohorte sind je ein Mann und eine Frau Träger der Variante p.E435K, bei der es zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin zu Lysin kommt.

Beide Aminosäuren liegen bei physiologischem pH-Wert dissoziiert, d.h. geladen vor. Glutamin ist jedoch sauer, Lysin basisch (Horn, 2015).

Die gegensätzliche Ladung der beiden Aminosäuren könnte die Struktur und Funktion des Proteins beeinträchtigen. So ist beispielsweise die Variante p.E46K des *SNCA*-Gens, bei der der gleiche Aminosäureaustausch erfolgt, als Ursache für das Parkinson-Syndrom und die DLB bekannt (Zarranz et al., 2004).

Die Indexpatientin dieser Variante leidet seit ihrem 52. Lebensjahr an einem rechtsbetonten Parkinson-Syndrom vom Äquivalenztyp und befand sich acht

Jahre nach Erstmanifestation im Hoehn und Yahr Stadium II, Hinweise auf kognitive Defizite lagen damals nicht vor.

Zu dem männlichen Patienten gibt es außer dem Erkrankungsalter von 58 Jahren keine näheren Informationen.

Die MAF in dem untersuchten Kollektiv liegt bei 0,004, in der Referenzkohorte in gnomAD beträgt sie 0,002. Die Odds Ratio liegt daher bei 1,99 bei einem 95 % KI von 0,49-8,05 mit einem p-Wert von 0,27 und ist daher statistisch nicht signifikant.

Auch in den beiden Gruppen des AMP-PD zeigt sich ein höhere MAF bei Fällen mit 0,003 als bei Kontrollen mit 0,001.

Außer dem MutationTaster stufen alle Programme die Variante als benigne ein, der PROVEAN-Score liegt bei -0,35 und der CADD-Score bei 17,13.

Gemeinsam betrachtet legen die Resultate nahe, dass kein monokausaler Zusammenhang zwischen der Variante p.E435K und der Entstehung von Morbus Parkinson besteht. Dennoch könnte es sich bei p.E435K um einen Risikofaktor handeln, der das Erkrankungsrisiko erhöht.

6.2.1.6 Varianten außerhalb codierender Exons

Es wurden zwei Varianten der Untranslated Region und eine intronische Variante gefunden: c.-11g>t, c.*4a>g und c.69+17a>g.

Die intronischen Sequenzen und die UTR spielen eine Rolle bei der Bindung des Spleißosoms an die prä-mRNA und beeinflussen die Erkennung der entsprechenden Sequenz durch das Spleißosom. Eine veränderte intronische Sequenz kann somit zu alternativem Splicing führen und die Länge, Peptidsequenz und Funktion des fertigen Proteins beeinflussen. Sogenannte Splicing Regulatory Sequences, die als Enhancer oder Silencer fungieren, können auch mehrere hundert Nucleotide vor dem Exon liegen (Black, 2003).

Varianten der intronischen Bindungsstelle für Splicing regulierende Proteine sind als Ursache für aberrantes Splicing und einige monogenetische Erkrankungen bekannt (Caminsky et al., 2014).

Alle diese Varianten haben laut HSFpro keinen signifikanten Einfluss auf die Splicing Signale. Daher ist eine entscheidende Rolle dieser Varianten in der Krankheitsentstehung als eher unwahrscheinlich zu interpretieren.

6.2.2 Pathophysiologische Hinweise auf eine Assoziation von *UQCRC1*-Varianten mit Morbus Parkinson

Wie in der Einleitung in Kapitel 2.1.7.2 beschrieben, ist der generelle Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und der Entstehung von Morbus Parkinson schon lange Gegenstand der Forschung und scheint nach aktuellem Stand eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen (Grünewald et al., 2019). Eine der zentralen Aufgaben von Mitochondrien ist die Versorgung der Zelle mit ATP, welches über eine Reihe von Redoxreaktionen und den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten in der sogenannten Atmungskette produziert wird.

Das von *UQCRC1* codierte Protein Ubiquinol-Cytochrom-C-Reductase-Core-Protein I ist eine von insgesamt elf Untereinheiten des homodimeren Komplex III der mitochondrialen Atmungskette und in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Lin et al., 2020c). Komplex III interagiert direkt mit Komplex I, dessen Dysfunktion schon lange mit dem Auftreten von Parkinsonismus assoziiert wird (Langston et al., 1983) (Lopez-Fabuel et al., 2017).

Komplex III ist neben Komplex I der hauptsächliche Entstehungsort von reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien, seine physiologische Funktionen sind das Pumpen von Protonen in den Intermembranraum und die Übertragung von Elektronen von Ubiquinol auf Cytochrom c (Subramaniam and Chesselet, 2013) (Horn, 2015).

Die in der Studie von Lin et al. von Varianten betroffene Aminosäuren I311 und Y314 spielen eine Rolle bei der Homodimerisation des Komplex III.

In ihren Experimenten konnten Lin et al. zeigen, dass SH-SY5Y Neurone, die eine der beobachteten Varianten trugen, eine verkürzte Morphologie aufwiesen und eine wesentlich geringere Aktivität der Atmungskette sowie eine niedrigere Produktion von ATP zeigten. Im Gegenzug war die Produktion von ROS erhöht, insbesondere bei der Variante p.Y314S.

Knock-in-Drosophila zeigten altersabhängige lokomotorische Defekte, eine verkürzte Lebensspanne und einen Verlust dopaminerger Neurone. Knock-in-Mäuse wiesen einen Phänotyp ähnlich dem der Indexpatienten auf mit einem schlurfenden Gangbild und Freezing-Phänomen, was sich unter der Gabe von Levodopa signifikant besserte. Auch in vivo zeigte sich ein Verlust dopaminerger Neurone sowie ein Rückgang des Durchmessers myelinisierter peripherer Neurone, was der Polyneuropathie der Indexpatienten entsprechen könnte (Lin et al., 2020a).

Eine Akkumulation von alpha-Synuclein konnte in den Versuchen nicht beobachtet werden, diese ist jedoch auch nicht bei allen Formen des Parkinson-Syndroms präsent.

Die in vitro sowie in vivo Experimente von Lin et al. sind somit für sich genommen ein Indikator für einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen Varianten des Gens *UQCRC1* und einem parkinsonähnlichen Phänotyp. Auch ist der generelle Zusammenhang zwischen dysfunktionalen Mitochondrien und der Entstehung von MP schon länger bekannt.

Zum aktuellen Zeitpunkt sind allerdings nur mit Morbus Parkinson assoziierte Gene bekannt, deren Genprodukte die Funktion und Homöostase von Mitochondrien beeinträchtigen, nicht jedoch selbst Teil der Atmungskette sind (Cerri and Valente, 2020).

Die extreme Rarität der von Lin et al. detektierten und experimentell untersuchten Varianten macht es jedoch schwer, weitere Parkinsonpatienten mit derselben Variante zu finden und bei diesen die Cosegregation mit der Erkrankung zu untersuchen und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen herzustellen. Weder in der vorliegenden Arbeit noch in größeren Studien an europäischen und asiatischen Populationen konnte dieser Genotyp bisher identifiziert werden. In keiner anderen Studie ergab sich eine signifikante Korrelation von Varianten des Gens *UQCRC1* mit der Entstehung von MP.

6.2.3 NUS1

6.2.3.1 Varianten der Guo et al. Studie

Von den insgesamt 12 Kandidatengenen, die Guo et al. untersuchten, war *NUS1* das einzige mit signifikant mehr seltenen SNVs bei Patienten (insgesamt 5.089 Personen) als bei Kontrollen (insgesamt 4.423 Personen) (Patienten : Kontrollen 6:0, $p=0,03$ in Kohorte 1, Patienten : Kontrollen 20:2, $p=3,2E-4$ in Kohorte 2) mit einer OR von 11,3. Keiner der insgesamt 26 von MP betroffenen Träger von Varianten des Gens *NUS1* hatte eine bekanntermaßen pathogene Variante der Gene *LRRK2*, *PARK2* (*Parkin*), *PLA2G6*, *DNSJC13*, *GIGYF2*, *FBXO7*, *SYNJ1*, *HTRA2*, *EIF4G1*, *SNCA*, *DNSJC6*, *VPS35*, *ATP13A2*, *PINK1*, *PARK7* (*DJ-1*), *UCHL1*, *RAB39B*, *CHCHD2*, *VPS13C* oder *TMEM2301*.

Detektiert wurden die folgenden Varianten: p.I22F, p.I36M, p.I36T, p.K58N, p.R67G, p.R86L, p.A89S, p.G91C, p.I117M, p.N144K, p.L159I, p.D163H, p.Q209H, p.N233D, p.L240I, p.V264I sowie c.691+3dupA in der Splice Site und c.882+15 A>T in der 3' UTR.

Die Variante c.691+3dupA wurde von Guo et al. weiter untersucht und führt zu irregulärem Splicing, bei dem 91 bp von Exon 3 übersprungen werden, und das eine signifikante Reduktion der *NUS1* Expression in den Patienten im Vergleich zu Kontrollen zu bedingen scheint.

Zu betonen ist an dieser Stelle, dass die Eltern der meisten der 26 Träger von potentiellen de novo Varianten zum Zeitpunkt der Studie bereits verstorben waren und nicht mehr untersucht werden konnten.

Es kann also nicht abschließend beurteilt werden, ob es sich bei diesen Varianten überhaupt um neu aufgetretene Varianten handelt oder ob diese nicht auch bei gesunden Verwandten vorliegen. Des Weiteren waren die Patienten zu Beginn ihrer Erkrankung bereits im Durchschnitt $48,75 \pm 12,50$ Jahre alt in Kohorte 1 beziehungsweise $58,05 \pm 10,10$ Jahre alt in Kohorte 2, womit es sich bei den meisten nicht mehr um einen frühen Erkrankungsbeginn handelt. Ein späterer Erkrankungsbeginn macht bei sporadischem MP einen Einfluss von beispielsweise Umweltfaktoren, bei denen auch die Expositionsdauer eine Rolle spielt, wahrscheinlicher.

Keine der von Guo et al. detektierten seltenen Varianten des Gens *NUS1* konnte in der vorliegenden Studie gefunden werden. Da diese Kohorte mit 84 Patienten allerdings vergleichsweise sehr klein ist, war dies nicht unbedingt zu erwarten.

6.2.3.2 p.P169R

Die einzige Variante, die bei den 84 Patienten des Kollektivs für die Untersuchung von *NUS1* in dieser Arbeit detektiert wurde, ist p.P169R.

Hierbei kommt es zur Substitution der apolaren Aminosäure Prolin durch das basische Arginin.

Die Indexpatientin leidet seit ihrem 31. Lebensjahr an einem rechtsbetonten Parkinson-Syndrom, das gemeinsam mit einer starken dementiellen Entwicklung zu einer Pflegebedürftigkeit im Alter von 63 Jahren führte. Die Familienanamnese ist negativ.

Diese Variante ist auch in der Datenbank ClinVar aufgeführt, wo sie bei einem Patienten mit einem angeborenen Defekt der Glykosylierung vom Typ Ia sowie einem Patienten mit geistiger Behinderung und Krampfanfällen beschrieben ist.

Die MAF liegt in der untersuchten Kohorte bei 0,006, in gnomAD bei 0,002.

Die OR ist demnach 2,64 mit einem 95 % KI von 0,37-19,018 bei einem p-Wert von 0,32 und ist statistisch nicht signifikant.

Am ehesten zu erklären ist diese Differenz dadurch, dass die untersuchte Kohorte mit 84 Patienten sehr viel kleiner ist als die Referenzkohorte, so dass sich dieser Unterschied bei Untersuchung einer größeren Gruppe vermutlich relativieren würde.

Die geringe Größe der Kohorte und die damit einhergehende niedrige statistische Power könnten umgekehrt allerdings auch bedingen, dass es tatsächlich einen Effekt gibt, der ohne eine größere Fallzahl statistisch nicht zu belegen ist.

Auch in der Studie von Bustos et al., in der die europäischen Kohorten des AMP-PD und IPDGC untersucht wurden, fand sich die Variante p.P169R in insgesamt

6 von 2.687 Fällen und in 5 von 1502 Kontrollen, woraus sich kein signifikanter Zusammenhang ergab (Bustos et al., 2020).

Alle verwendeten Vorhersageprogramme stufen die Variante als benigne ein, der PROVEAN-Score liegt bei -2,31 und der CADD-Score bei 19,26.

Die Aminosäure Prolin ist an dieser Position bei den betrachteten Spezies konserviert.

Insgesamt besteht also kein Anlass zu der Annahme, diese Variante könnte einen Einfluss auf die Entstehung von Morbus Parkinson in der hier untersuchten Kohorte haben.

Besonders der schwer betroffene Phänotyp der Indexpatientin mit begleitender Demenz und ihr junges Erkrankungsalter machen es sehr unwahrscheinlich, dass diese durchweg als benigne eingestufte Variante ursächlich für ihre Erkrankung ist.

Bei der Patientin wurden bisher pathogene Varianten der Gene *GBA*, *LRRK2*, *PINK1*, *PARK7* und *PRKN* ausgeschlossen. Ein junges Erkrankungsalter und eine dementielle Entwicklung sind jedoch auch etwa bei *SNCA*-Varianten wie p.A53T oder Multiplikationen bekannt, die bei Kaukasiern in weniger als 1 % der Fälle ursächlich für MP sind (Berg et al., 2005). Diese folgen einem autosomal-dominanten Vererbungsmuster (Lill, 2016). Zwar sind bei der Indexpatientin keine weiteren Fälle in der Familie bekannt, jedoch könnte unvollständige Penetranz eine Erklärung hierfür sein. Die Penetranz von beispielsweise *SNCA*-Duplikationen liegt etwa bei nur ca. 40 %, so dass diese auch ursächlich für scheinbar sporadische Fälle sein können (Schulte and Gasser, 2011).

Eine Sequenzierung von *SNCA* könnte bei dieser Patientin also möglicherweise Aufschluss über die Ursache ihrer Erkrankung geben.

6.3 Schlussfolgerung

Die eingangs gestellten Leitfragen können unter Berücksichtigung der vorliegenden Resultate wie folgt beantwortet werden:

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben keinen eindeutigen Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang von Varianten des Gens *UQCRC1* mit der Entstehung des Parkinson-Syndroms. Es wurden keine Varianten identifiziert, die in den untersuchten Patientenkohorten signifikant häufiger auftraten als in der neurologisch gesunden Vergleichsgruppe.

Auch konnte keine der von Lin et al. beschriebenen Varianten in dieser ethnisch unterschiedlichen Kohorte detektiert werden.

Im Falle der beiden mehrfach detektierten Varianten p.R269H und p.E435K, die beide als eher benigne eingestuft wurden, besteht keine auffällige Ähnlichkeit im Phänotyp der Patienten.

Dieses Resultat ist kohärent mit den Ergebnissen von Senkevich et al., die in einer großen europäischen Kohorte keinen signifikanten Zusammenhang feststellen konnten (Senkevich et al., 2020).

Denkbar ist jedoch, dass bestimmte Varianten des Gens *UQCRC1* zwar keine monokausale Ursache für typischen Morbus Parkinson darstellen, wohl aber einen Risikofaktor, der in Kombination mit anderen Faktoren das Erkrankungsrisiko erhöht.

Insbesondere die Variante p.G312S sollte diesbezüglich weiter untersucht werden, da eine funktionelle Relevanz der betroffenen Region des Proteins durch die Untersuchung von knock-in-Mäusen nahe gelegt wird (Lin et al., 2020a) und sie durch die in-silico-Analysen als pathogen eingestuft wird.

Auch bei der Untersuchung des Gens *NUS1* konnte keine Variante gefunden werden, die in dieser - ethnisch von der von Guo et al. untersuchten Kohorte verschiedenen - Kohorte signifikant häufiger war als in der neurologisch gesunden Vergleichsgruppe.

Die einzige in dieser Arbeit detektierte *NUS1*-Variante wird von in-silico-Analysen als benigne eingeschätzt und stimmt nicht mit den von Guo et al. identifizierten Varianten überein.

Dass die vorliegenden Daten nicht auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen de novo Varianten des Gens *NUS1* und der Entstehung von früh beginnendem Parkinson-Syndrom hinweisen, stimmt mit den Resultaten von

Bustos et al. überein, die in einer Fall-Kontroll-Studie mit Individuen europäischen Ursprungs keine Evidenz für einen Zusammenhang gefunden haben (Bustos et al., 2020).

6.4 Ausblick

Zur weiterführenden Klärung der Frage nach einem kausalen Zusammenhang zwischen Mutationen der Gene *UQCRC1* und *NUS1* mit der Entstehung von Morbus Parkinson bedarf es weiterer Studien mit größeren Fallzahlen um die Wahrscheinlichkeit, sehr seltene Varianten zu identifizieren, zu erhöhen.

Insbesondere weitere ethnische Gruppen neben den bereits untersuchten europäischen und asiatischen Kohorten zu betrachten wäre interessant, da sich bei einigen parkinsonassoziierten Genen eine große Differenz bezüglich der Häufigkeit der Varianten und deren Penetranz zwischen den verschiedenen Populationen zeigt.

Bezüglich der Variante p.G312S wäre eine langjährige Beobachtung der Familie des Indexpatienten von Interesse, ebenso wie eine Rekrutierung entfernterer Verwandter, um zu sehen ob die Variante mit der Erkrankung cosegregiert. Wenn dem so sein sollte, könnten in vitro und in vivo Experimente zu dieser Variante Aufschluss über ihre Signifikanz geben.

7 Zusammenfassung

Bei Morbus Parkinson handelt es sich um die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Krankheit, deren Prävalenz mit der zunehmenden Alterung der Gesellschaft zunimmt und die die Lebensqualität der Betroffenen stark einschränkt.

Die Ätiologie ist ein Zusammenspiel aus Umwelt, Genetik und Epigenetik, schätzungsweise 5-10 % der Parkinsonpatienten leiden an einer monogen verursachten Form des Parkinson-Syndroms.

Da Varianten bereits als ursächlich für die Erkrankung bekannter Gene nur einen Teil der genetisch bedingten Fälle hinreichend erklären können, wird nach weiteren möglicherweise pathogenen Varianten anderer Gene gesucht.

Dies ist auch von klinischer Relevanz, da ein besseres Verständnis der Genetik Erkenntnisse über die Pathophysiologie liefern kann und so möglicherweise neue Ansätze für Therapien entwickelt werden können.

In dieser Studie wurden daher insgesamt 259 Patienten mit autosomal-dominantem Parkinson-Syndrom auf Varianten aller codierender Exons des Gens *UQCRC1* und 84 Patienten mit einem frühen Erkrankungsalter ohne familiäre Vorgeschichte auf Varianten der codierenden Exons des Gens *NUS1* mittels Sanger-Sequenzierung untersucht.

Die ermittelten Varianten wurden hinsichtlich ihrer Allelfrequenzen mit der Parkinsonkohorte und der gesunden Kontrollkohorte des AMP-PD sowie dem non-neuro-Kollektiv von gnomAD verglichen und mit Hilfe verschiedener in-silico-Analysen bezüglich ihrer Pathogenität beurteilt.

Die gesuchten *UQCRC1*-Varianten c.941A>C (p.Y314S), c.931A>C (p.I311L), c.70-1G>A und c.73_74insG (p.A25Gfs*27) konnten in der untersuchten Kohorte nicht gefunden werden.

Insgesamt fanden sich vier verschiedene exonische Varianten des Gens *UQCRC1*, p.R269H, p.N301S, p.G312S und p.E435K sowie zwei Varianten in der UTR und eine intronische Variante. Von diesen Varianten kann lediglich bei p.G312S ein relevanter Zusammenhang mit der Entstehung von Morbus Parkinson in Betracht gezogen werden, der in größeren Kohorten näher untersucht werden sollte, etwa durch Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.

Die einzige in dieser Kohorte vorkommende *NUS1*-Variante ist p.P169R, der hinsichtlich des Parkinson-Syndroms nach den vorliegenden Daten keine Bedeutung zugemessen werden kann. Auch hier wurden keine neuen Varianten identifiziert.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass die Bedeutung von Varianten der Gene *UQCRC1* und *NUS1* bei der Ätiologie des Parkinson-Syndroms in diesem europäischen Kollektiv keine bedeutende Rolle zu spielen scheint, was mit den Ergebnissen anderer Studien gut vereinbar ist.

Der Einfluss der Variante p.G312S auf die Entstehung von Morbus Parkinson bedarf weiterer Untersuchungen.

8 Literaturverzeichnis

- ADZHUBEI, I., JORDAN, D. M. & SUNYAEV, S. R. 2013. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 7, Unit7.20.
- ALLAN, W. 1937. Inheritance of the shaking palsy. *Archives of Internal Medicine*, 60, 424-436.
- ALVAREZ, M. V., EVIDENTE, V. G. & DRIVER-DUNCKLEY, E. D. 2007. Differentiating Parkinson's disease from other parkinsonian disorders. *Semin Neurol*, 27, 356-62.
- ARMSTRONG, M. J. & OKUN, M. S. 2020. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *Jama*, 323, 548-560.
- BARBETTI, F., RABEN, N., KADOWAKI, T., CAMA, A., ACCILI, D., GABBAY, K. H., MERENICH, J. A., TAYLOR, S. I. & ROTH, J. 1990. Two unrelated patients with familial hyperproinsulinemia due to a mutation substituting histidine for arginine at position 65 in the proinsulin molecule: identification of the mutation by direct sequencing of genomic deoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab*, 71, 164-9.
- BELLOU, V., BELBASIS, L., TZOULAKI, I., EVANGELOU, E. & IOANNIDIS, J. P. 2016. Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism Relat Disord*, 23, 1-9.
- BENDER, A., KRISHNAN, K. J., MORRIS, C. M., TAYLOR, G. A., REEVE, A. K., PERRY, R. H., JAROS, E., HERSHESON, J. S., BETTS, J., KLOPSTOCK, T., TAYLOR, R. W. & TURNBULL, D. M. 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet*, 38, 515-7.
- BERG, D., NIWAR, M., MAASS, S., ZIMPRICH, A., MÖLLER, J. C., WUELLNER, U., SCHMITZ-HÜBSCH, T., KLEIN, C., TAN, E. K., SCHÖLS, L., MARSH, L., DAWSON, T. M., JANETZKY, B., MÜLLER, T., WOITALLA, D., KOSTIC, V., PRAMSTALLER, P. P., OERTEL, W. H., BAUER, P., KRUEGER, R., GASSER, T. & RIESS, O. 2005. Alpha-synuclein and Parkinson's disease: implications from the screening of more than 1,900 patients. *Mov Disord*, 20, 1191-4.
- BERG, D., POSTUMA, R. B., ADLER, C. H., BLOEM, B. R., CHAN, P., DUBOIS, B., GASSER, T., GOETZ, C. G., HALLIDAY, G., JOSEPH, L., LANG, A. E., LIEPELT-SCARFONE, I., LITVAN, I., MAREK, K., OBESO, J., OERTEL, W., OLANOW, C. W., POEWE, W., STERN, M. & DEUSCHL, G. 2015. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord*, 30, 1600-11.
- BLACK, D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 72, 291-336.
- BONIFATI, V. 2012. Autosomal recessive parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S4-6.
- BURBULLA, L. F., SONG, P., MAZZULLI, J. R., ZAMPESE, E., WONG, Y. C., JEON, S., SANTOS, D. P., BLANZ, J., OBERMAIER, C. D. & STROJNY, C. 2017. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science*, 357, 1255-1261.

- BURNS, R. S., LEWITT, P. A., EBERT, M. H., PAKKENBERG, H. & KOPIN, I. J. 1985. The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency. Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med*, 312, 1418-21.
- BUSTOS, B. I., BANDRES-CIGA, S., GIBBS, J. R., KRAINIC, D., MENCACCI, N. E., GAN-OR, Z. & LUBBE, S. J. 2020. Replication assessment of NUS1 variants in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*.
- CAMINSKY, N., MUCAKI, E. J. & ROGAN, P. K. 2014. Interpretation of mRNA splicing mutations in genetic disease: review of the literature and guidelines for information-theoretical analysis. *F1000Res*, 3, 282.
- CERRI, S. & VALENTE, E. M. 2020. Mitochondria and Parkinson's disease: a complex (III) liaison. *Brain*, 143, 3175-3178.
- CHATURVEDI, R. K. & BEAL, M. F. 2008. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 395-412.
- CHEN, X., XIAO, Y., ZHOU, M., LIN, Y., GUO, W., HUANG, S., QIU, J., PENG, G., MO, M., LI, Z., ZHU, X. & XU, P. 2020. Genetic analysis of NUS1 in Chinese patients with Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 86, 202.e5-202.e6.
- CHERIAN, A. & DIVYA, K. P. 2020. Genetics of Parkinson's disease. *Acta Neurol Belg*, 120, 1297-1305.
- CHOI, Y. & CHAN, A. P. 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, 31, 2745-2747.
- CHOI, Y., SIMS, G. E., MURPHY, S., MILLER, J. R. & CHAN, A. P. 2012. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS one*, 7, e46688.
- CREMADES, N., COHEN, S. I., DEAS, E., ABRAMOV, A. Y., CHEN, A. Y., ORTE, A., SANDAL, M., CLARKE, R. W., DUNNE, P. & APRILE, F. A. 2012. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell*, 149, 1048-1059.
- CUERVO, A. M., STEFANIS, L., FREDENBURG, R., LANSBURY, P. T. & SULZER, D. 2004. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, 305, 1292-1295.
- DE OLIVEIRA, R. V. & PEREIRA, J. S. 2017. The role of diffusion magnetic resonance imaging in Parkinson's disease and in the differential diagnosis with atypical parkinsonism. *Radiol Bras*, 50, 250-257.
- DE RIJK, M. C., BRETHER, M. M. B., GRAVELAND, G. A., OTT, A., GROBBEE, D. E., VAN DER MECHE, F. G. A. & HOFMAN, A. 1995. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly. *Neurology*, 45, 2143.
- DELAMARRE, A. & MEISSNER, W. G. 2017. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse Med*, 46, 175-181.
- DESMET, F. O., HAMROUN, D., LALANDE, M., COLLOD-BÉROUD, G., CLAUSTRES, M. & BÉROUD, C. 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*, 37, e67.
- DEUSCHL, G., SCHADE-BRITTINGER, C., KRACK, P., VOLKMANN, J., SCHÄFER, H., BÖTZEL, K., DANIELS, C., DEUTSCHLÄNDER, A., DILLMANN, U., EISNER, W., GRUBER, D., HAMEL, W., HERZOG, J., HILKER, R., KLEBE, S., KLOSS, M., KOY, J., KRAUSE, M., KUPSCH, A.,

- LORENZ, D., LORENZL, S., MEHDORN, H. M., MORINGLANE, J. R., OERTEL, W., PINSKER, M. O., REICHMANN, H., REUSS, A., SCHNEIDER, G. H., SCHNITZLER, A., STEUDE, U., STURM, V., TIMMERMANN, L., TRONNIER, V., TROTTEBERG, T., WOJTECKI, L., WOLF, E., POEWE, W. & VOGES, J. 2006. A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 355, 896-908.
- DICKSON, D. W. 2018. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 46 Suppl 1, S30-s33.
- DOVICH, N. J. & ZHANG, J. 2000. How Capillary Electrophoresis Sequenced the Human Genome. *Angewandte Chemie International Edition*, 39, 4463-4468.
- DU, X. Y., XIE, X. X. & LIU, R. T. 2020. The Role of α -Synuclein Oligomers in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*, 21.
- ERALI, M., VOELKERDING, K. V. & WITTEWER, C. T. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and molecular pathology*, 85, 50-58.
- FASANO, A., DANIELE, A. & ALBANESE, A. 2012. Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation. *Lancet Neurol*, 11, 429-42.
- FERREIRA, M. & MASSANO, J. 2017. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. *Acta Neurol Scand*, 135, 273-284.
- FREDERICKS, D., NORTON, J. C., ATCHISON, C., SCHOENHAUS, R. & PILL, M. W. 2017. Parkinson's disease and Parkinson's disease psychosis: a perspective on the challenges, treatments, and economic burden. *Am J Manag Care*, 23, S83-s92.
- GAN-OR, Z., LEBLOND, C. S., MALLET, V., ORR-URTREGER, A., DION, P. A. & ROULEAU, G. A. 2015. LRRK2 mutations in Parkinson disease; a sex effect or lack thereof? A meta-analysis. *Parkinsonism & related disorders*, 21, 778-782.
- GREEN, M. R. & SAMBROOK, J. 2016. Precipitation of DNA with Ethanol. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016.
- GREEN, M. R. & SAMBROOK, J. 2018. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*, 2018.
- GRÜNEWALD, A., KUMAR, K. R. & SUE, C. M. 2019. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 177, 73-93.
- GUO, J. F., ZHANG, L., LI, K., MEI, J. P., XUE, J., CHEN, J., TANG, X., SHEN, L., JIANG, H., CHEN, C., GUO, H., WU, X. L., SUN, S. L., XU, Q., SUN, Q. Y., CHAN, P., SHANG, H. F., WANG, T., ZHAO, G. H., LIU, J. Y., XIE, X. F., JIANG, Y. Q., LIU, Z. H., ZHAO, Y. W., ZHU, Z. B., LI, J. D., HU, Z. M., YAN, X. X., FANG, X. D., WANG, G. H., ZHANG, F. Y., XIA, K., LIU, C. Y., ZHU, X. W., YUE, Z. Y., LI, S. C., CAI, H. B., ZHANG, Z. H., DUAN, R. H. & TANG, B. S. 2018. Coding mutations in NUS1 contribute to Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 11567-11572.
- HARRIS, P. A., TAYLOR, R., THIELKE, R., PAYNE, J., GONZALEZ, N. & CONDE, J. G. 2009. Research electronic data capture (REDCap)--a

- metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*, 42, 377-81.
- HARRISON, K. D., MIAO, R. Q., FERNANDEZ-HERNÁNDO, C., SUÁREZ, Y., DÁVALOS, A. & SESSA, W. C. 2009. Nogo-B receptor stabilizes Niemann-Pick type C2 protein and regulates intracellular cholesterol trafficking. *Cell Metab*, 10, 208-18.
- HEALY, D. G., FALCHI, M., O'SULLIVAN, S. S., BONIFATI, V., DURR, A., BRESSMAN, S., BRICE, A., AASLY, J., ZABETIAN, C. P., GOLDWURM, S., FERREIRA, J. J., TOLOSA, E., KAY, D. M., KLEIN, C., WILLIAMS, D. R., MARRAS, C., LANG, A. E., WSZOLEK, Z. K., BERCIANO, J., SCHAPIRA, A. H., LYNCH, T., BHATIA, K. P., GASSER, T., LEES, A. J. & WOOD, N. W. 2008. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*, 7, 583-90.
- HENDERSON, M. X., TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, V. M. 2019. α -Synuclein pathology in Parkinson's disease and related α -synucleinopathies. *Neurosci Lett*, 709, 134316.
- HENTATI, F., TRINH, J., THOMPSON, C., NOSOVA, E., FARRER, M. J. & AASLY, J. O. 2014. LRRK2 parkinsonism in Tunisia and Norway: a comparative analysis of disease penetrance. *Neurology*, 83, 568-9.
- HOEHN, M. M. & YAHR, M. D. 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 17, 427-42.
- HÖGLINGER, G. U., RESPONDEK, G., STAMELOU, M., KURZ, C., JOSEPHS, K. A., LANG, A. E., MOLLENHAUER, B., MÜLLER, U., NILSSON, C. & WHITWELL, J. L. 2017. Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: the movement disorder society criteria. *Movement Disorders*, 32, 853-864.
- HORN, F. 2015. *Biochemie des Menschen*, Stuttgart u.a., Thieme.
- HSU, L. J., SAGARA, Y., ARROYO, A., ROCKENSTEIN, E., SISK, A., MALLORY, M., WONG, J., TAKENOUCI, T., HASHIMOTO, M. & MASLIAH, E. 2000. alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am J Pathol*, 157, 401-10.
- HUGHES, A. J., DANIEL, S. E. & LEES, A. J. 2001. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology*, 57, 1497-9.
- IOANNIDIS, N. M., ROTHSTEIN, J. H., PEJAVER, V., MIDDHA, S., MCDONNELL, S. K., BAHETI, S., MUSOLF, A., LI, Q., HOLZINGER, E., KARYADI, D., CANNON-ALBRIGHT, L. A., TEERLINK, C. C., STANFORD, J. L., ISAACS, W. B., XU, J., COONEY, K. A., LANGE, E. M., SCHLEUTKER, J., CARPTEN, J. D., POWELL, I. J., CUSSENOT, O., CANCEL-TASSIN, G., GILES, G. G., MACINNIS, R. J., MAIER, C., HSIEH, C. L., WIKLUND, F., CATALONA, W. J., FOULKES, W. D., MANDAL, D., EELES, R. A., KOTE-JARAI, Z., BUSTAMANTE, C. D., SCHAID, D. J., HASTIE, T., OSTRANDER, E. A., BAILEY-WILSON, J. E., RADIVOJAC, P., THIBODEAU, S. N., WHITTEMORE, A. S. & SIEH, W. 2016. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet*, 99, 877-885.
- JANKOVIC, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79, 368-76.

- JANKOVIC, M. Z., DOBRICIC, V., KRESOJEVIC, N., MARKOVIC, V., PETROVIC, I., SVETEL, M., PEKMEZOVIC, T., NOVAKOVIC, I. & KOSTIC, V. 2018. Identification of mutations in the PARK2 gene in Serbian patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 393, 27-30.
- KARKI, R., PANDYA, D., ELSTON, R. C. & FERLINI, C. 2015. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC medical genomics*, 8, 1-7.
- KASTEN, M., HARTMANN, C., HAMPF, J., SCHAAKE, S., WESTENBERGER, A., VOLLSTEDT, E. J., BALCK, A., DOMINGO, A., VULINOVIC, F., DULOVIC, M., ZORN, I., MADDOEV, H., ZEHNLE, H., LEMBECK, C. M., SCHAWA, L., REGINOLD, J., HUANG, J., KÖNIG, I. R., BERTRAM, L., MARRAS, C., LOHMANN, K., LILL, C. M. & KLEIN, C. 2018. Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes Parkin, PINK1, DJ1: MDSGene Systematic Review. *Mov Disord*, 33, 730-741.
- KASTEN, M. & KLEIN, C. 2013. The many faces of alpha-synuclein mutations. *Mov Disord*, 28, 697-701.
- KIDO, T., SIKORA-WOHLFELD, W., KAWASHIMA, M., KIKUCHI, S., KAMATANI, N., PATWARDHAN, A., CHEN, R., SIROTA, M., KODAMA, K., HADLEY, D. & BUTTE, A. J. 2018. Are minor alleles more likely to be risk alleles? *BMC Med Genomics*, 11, 3.
- KILARSKI, L. L., PEARSON, J. P., NEWSWAY, V., MAJOUNIE, E., KNIPE, M. D., MISBAHUDDIN, A., CHINNERY, P. F., BURN, D. J., CLARKE, C. E., MARION, M. H., LEWTHWAITE, A. J., NICHOLL, D. J., WOOD, N. W., MORRISON, K. E., WILLIAMS-GRAY, C. H., EVANS, J. R., SAWCER, S. J., BARKER, R. A., WICKREMARATCHI, M. M., BEN-SHLOMO, Y., WILLIAMS, N. M. & MORRIS, H. R. 2012. Systematic review and UK-based study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, 27, 1522-9.
- KIM, C. Y. & ALCALAY, R. N. 2017. Genetic Forms of Parkinson's Disease. *Semin Neurol*, 37, 135-146.
- KLEIN, C. & WESTENBERGER, A. 2012. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2, a008888.
- KLUENEMANN, H. H., NUTT, J. G., DAVIS, M. Y. & BIRD, T. D. 2013. Parkinsonism syndrome in heterozygotes for Niemann-Pick C1. *J Neurol Sci*, 335, 219-20.
- KÖLLENSPERGER, M., GESER, F., SEPPI, K., STAMPFER-KOUNTCHEV, M., SAWIRES, M., SCHERFLER, C., BOESCH, S., MUELLER, J., KOUKOUNI, V., QUINN, N., PELLECCIA, M. T., BARONE, P., SCHIMKE, N., DODEL, R., OERTEL, W., DUPONT, E., ØSTERGAARD, K., DANIELS, C., DEUSCHL, G., GUREVICH, T., GILADI, N., COELHO, M., SAMPAIO, C., NILSSON, C., WIDNER, H., SORBO, F. D., ALBANESE, A., CARDOZO, A., TOLOSA, E., ABELE, M., KLOCKGETHER, T., KAMM, C., GASSER, T., DJALDETTI, R., COLOSIMO, C., MECO, G., SCHRAG, A., POEWE, W. & WENNING, G. K. 2008. Red flags for multiple system atrophy. *Mov Disord*, 23, 1093-9.
- KORBIE, D. J. & MATTICK, J. S. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc*, 3, 1452-6.

- KUMAR, P., HENIKOFF, S. & NG, P. C. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*, 4, 1073-81.
- LANGSTON, J. W., BALLARD, P., TETRUD, J. W. & IRWIN, I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219, 979-80.
- LAO, O., LU, T. T., NOTHNAGEL, M., JUNGE, O., FREITAG-WOLF, S., CALIEBE, A., BALASCAKOVA, M., BERTRANPETIT, J., BINDOFF, L. A., COMAS, D., HOLMLUND, G., KOUVATSI, A., MACEK, M., MOLLET, I., PARSON, W., PALO, J., PLOSKI, R., SAJANTILA, A., TAGLIABRACCI, A., GETHER, U., WERGE, T., RIVADENEIRA, F., HOFMAN, A., UITTERLINDEN, A. G., GIEGER, C., WICHMANN, H. E., RÜTHER, A., SCHREIBER, S., BECKER, C., NÜRNBERG, P., NELSON, M. R., KRAWCZAK, M. & KAYSER, M. 2008. Correlation between genetic and geographic structure in Europe. *Curr Biol*, 18, 1241-8.
- LEE, P. Y., COSTUMBRADO, J., HSU, C. Y. & KIM, Y. H. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*.
- LEVIN, J., KURZ, A., ARZBERGER, T., GIESE, A. & HÖGLINGER, G. U. 2016. The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Dtsch Arztebl Int*, 113, 61-9.
- LILL, C. 2016. Genetics of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Probes*, 30.
- LIN, C.-H., TSAI, P.-I., LIN, H.-Y., HATTORI, N., FUNAYAMA, M., JEON, B., SATO, K., ABE, K., MUKAI, Y., TAKAHASHI, Y., LI, Y., NISHIOKA, K., YOSHINO, H., DAIDA, K., CHEN, M.-L., CHENG, J., HUANG, C.-Y., TZENG, S.-R., WU, Y.-S., LAI, H.-J., TSAI, H.-H., YEN, R.-F., LEE, N.-C., LO, W.-C., HUNG, Y.-C., CHAN, C.-C., KE, Y.-C., CHAO, C.-C., HSIEH, S.-T., FARRER, M. & WU, R.-M. 2020a. Mitochondrial UQCRC1 mutations cause autosomal dominant parkinsonism with polyneuropathy. *Brain*.
- LIN, C. H., TSAI, P. I., LIN, H. Y., HATTORI, N., FUNAYAMA, M., JEON, B., SATO, K., ABE, K., MUKAI, Y., TAKAHASHI, Y., LI, Y., NISHIOKA, K., YOSHINO, H., DAIDA, K., CHEN, M. L., CHENG, J., HUANG, C. Y., TZENG, S. R., WU, Y. S., LAI, H. J., TSAI, H. H., YEN, R. F., LEE, N. C., LO, W. C., HUNG, Y. C., CHAN, C. C., KE, Y. C., CHAO, C. C., HSIEH, S. T., FARRER, M. & WU, R. M. 2020b. Mitochondrial UQCRC1 mutations cause autosomal dominant parkinsonism with polyneuropathy. *Brain*.
- LIN, K. J., LIN, K. L., CHEN, S. D., LIOU, C. W., CHUANG, Y. C., LIN, H. Y. & LIN, T. K. 2019. The Overcrowded Crossroads: Mitochondria, Alpha-Synuclein, and the Endo-Lysosomal System Interaction in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*, 20.
- LIN, Z. H., ZHENG, R., RUAN, Y., GAO, T., JIN, C. Y., XUE, N. J., DONG, J. X., YAN, Y. P., TIAN, J., PU, J. L. & ZHANG, B. R. 2020c. The lack of association between ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I (UQCRC1) variants and Parkinson's disease in an eastern Chinese population. *CNS Neurosci Ther*, 26, 990-992.
- LOPEZ-FABUEL, I., RESCH-BEUSHER, M., CARABIAS-CARRASCO, M., ALMEIDA, A. & BOLAÑOS, J. P. 2017. Mitochondrial Complex I Activity is

- Conditioned by Supercomplex I-III(2)-IV Assembly in Brain Cells: Relevance for Parkinson's Disease. *Neurochem Res*, 42, 1676-1682.
- LUOMA, P. T., EEROLA, J., AHOLA, S., HAKONEN, A. H., HELLSTRÖM, O., KIVISTÖ, K. T., TIENARI, P. J. & SUOMALAINEN, A. 2007. Mitochondrial DNA polymerase gamma variants in idiopathic sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 69, 1152-9.
- MCCOURT, C. M., MCART, D. G., MILLS, K., CATHERWOOD, M. A., MAXWELL, P., WAUGH, D. J., HAMILTON, P., O'SULLIVAN, J. M. & SALTO-TELLEZ, M. 2013. Validation of next generation sequencing technologies in comparison to current diagnostic gold standards for BRAF, EGFR and KRAS mutational analysis. *PLoS One*, 8, e69604.
- MIYAKE, Y., TANAKA, K., FUKUSHIMA, W., KIYOHARA, C., SASAKI, S., TSUBOI, Y., YAMADA, T., OEDA, T., SHIMADA, H., KAWAMURA, N., SAKAE, N., FUKUYAMA, H., HIROTA, Y. & NAGAI, M. 2012. SNCA polymorphisms, smoking, and sporadic Parkinson's disease in Japanese. *Parkinsonism Relat Disord*, 18, 557-61.
- MIZUNO, Y., HATTORI, N., MORI, H., SUZUKI, T. & TANAKA, K. 2001. Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 14, 477-82.
- MUELLER, J. C., FUCHS, J., HOFER, A., ZIMPRICH, A., LICHTNER, P., ILLIG, T., BERG, D., WÜLLNER, U., MEITINGER, T. & GASSER, T. 2005. Multiple regions of α -synuclein are associated with Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 57, 535-541.
- NALLS, M. A., BLAUWENDRAAT, C., VALLERGA, C. L., HEILBRON, K., BANDRES-CIGA, S., CHANG, D., TAN, M., KIA, D. A., NOYCE, A. J., XUE, A., BRAS, J., YOUNG, E., VON COELLN, R., SIMÓN-SÁNCHEZ, J., SCHULTE, C., SHARMA, M., KROHN, L., PIHLSTRØM, L., SIITONEN, A., IWAKI, H., LEONARD, H., FAGHRI, F., GIBBS, J. R., HERNANDEZ, D. G., SCHOLZ, S. W., BOTIA, J. A., MARTINEZ, M., CORVOL, J. C., LESAGE, S., JANKOVIC, J., SHULMAN, L. M., SUTHERLAND, M., TIENARI, P., MAJAMAA, K., TOFT, M., ANDREASSEN, O. A., BANGALE, T., BRICE, A., YANG, J., GAN-OR, Z., GASSER, T., HEUTINK, P., SHULMAN, J. M., WOOD, N. W., HINDS, D. A., HARDY, J. A., MORRIS, H. R., GRATTON, J., VISSCHER, P. M., GRAHAM, R. R. & SINGLETON, A. B. 2019. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol*, 18, 1091-1102.
- NG, P. C. & HENIKOFF, S. 2006. Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, 61-80.
- NISTICÒ, R., MEHDAWY, B., PICCIRILLI, S. & MERCURI, N. 2011. Paraquat- and rotenone-induced models of Parkinson's disease. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 24, 313-322.
- NOYCE, A. J., BESTWICK, J. P., SILVEIRA-MORIYAMA, L., HAWKES, C. H., GIOVANNONI, G., LEES, A. J. & SCHRAG, A. 2012. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol*, 72, 893-901.
- OBESO, J. A., STAMELOU, M., GOETZ, C. G., POEWE, W., LANG, A. E., WEINTRAUB, D., BURN, D., HALLIDAY, G. M., BEZARD, E.,

- PRZEDBORSKI, S., LEHERICY, S., BROOKS, D. J., ROTHWELL, J. C., HALLETT, M., DELONG, M. R., MARRAS, C., TANNER, C. M., ROSS, G. W., LANGSTON, J. W., KLEIN, C., BONIFATI, V., JANKOVIC, J., LOZANO, A. M., DEUSCHL, G., BERGMAN, H., TOLOSA, E., RODRIGUEZ-VIOLANTE, M., FAHN, S., POSTUMA, R. B., BERG, D., MAREK, K., STANDAERT, D. G., SURMEIER, D. J., OLANOW, C. W., KORDOWER, J. H., CALABRESI, P., SCHAPIRA, A. H. V. & STOESSL, A. J. 2017. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord*, 32, 1264-1310.
- OLANOW, C. W. & BRUNDIN, P. 2013. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Mov Disord*, 28, 31-40.
- PAPADIMITRIOU, D., ANTONELOU, R., MILIGKOS, M., MANIATI, M., PAPAGIANNAKIS, N., BOSTANTJOPOULOU, S., LEONARDOS, A., KOROS, C., SIMITSI, A., PAPAGEORGIOU, S. G., KAPAKI, E., ALCALAY, R. N., PAPADIMITRIOU, A., ATHANASSIADOU, A., STAMELOU, M. & STEFANIS, L. 2016. Motor and Nonmotor Features of Carriers of the p.A53T Alpha-Synuclein Mutation: A Longitudinal Study. *Mov Disord*, 31, 1226-30.
- PARK, E. J., GRABIŃSKA, K. A., GUAN, Z., STRÁNECKÝ, V., HARTMANNOVÁ, H., HODAŇOVÁ, K., BAREŠOVÁ, V., SOVOVÁ, J., JOZSEF, L., ONDRUŠKOVÁ, N., HANSÍKOVÁ, H., HONZÍK, T., ZEMAN, J., HŮLKOVÁ, H., WEN, R., KMOCH, S. & SESSA, W. C. 2014. Mutation of Nogo-B receptor, a subunit of cis-prenyltransferase, causes a congenital disorder of glycosylation. *Cell Metab*, 20, 448-57.
- PARKINSON, J. 1969. An essay on the Shaking Palsy. *Archives of Neurology*, 20, 441-445.
- PICKRELL, A. M. & YOULE, R. J. 2015. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, 85, 257-73.
- POLOVITSKAYA, M. M., BARBINI, C., MARTINELLI, D., HARMS, F. L., COLE, F. S., CALLIGARI, P., BOCCHINFUSO, G., STELLA, L., CIOLFI, A., NICETA, M., RIZZA, T., SHINAWI, M., SISCO, K., JOHANNSEN, J., DENECKE, J., CARROZZO, R., WEGNER, D. J., KUTSCHE, K., TARTAGLIA, M. & JENTSCH, T. J. 2020. A Recurrent Gain-of-Function Mutation in CLCN6, Encoding the Cl(-)/H(+)-Exchanger, Causes Early-Onset Neurodegeneration. *Am J Hum Genet*, 107, 1062-1077.
- POSTUMA, R. B., BERG, D., STERN, M., POEWE, W., OLANOW, C. W., OERTEL, W., OBESO, J., MAREK, K., LITVAN, I., LANG, A. E., HALLIDAY, G., GOETZ, C. G., GASSER, T., DUBOIS, B., CHAN, P., BLOEM, B. R., ADLER, C. H. & DEUSCHL, G. 2015. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 30, 1591-601.
- QUINN, N., CRITCHLEY, P. & MARSDEN, C. D. 1987. Young onset Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 2, 73-91.
- RÄMÖ, O., KUMAR, D., GUCCIARDO, E., JOENSUU, M., SAAREKAS, M., VIHINEN, H., BELEVICH, I., SMOLANDER, O. P., QIAN, K., AUVINEN, P. & JOKITALO, E. 2016. NOGO-A/RTN4A and NOGO-B/RTN4B are

- simultaneously expressed in epithelial, fibroblast and neuronal cells and maintain ER morphology. *Sci Rep*, 6, 35969.
- REED, G. H. & WITWER, C. T. 2004. Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. *Clinical Chemistry*, 50, 1748-1754.
- RENTZSCH, P., WITTEN, D., COOPER, G. M., SHENDURE, J. & KIRCHER, M. 2019. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*, 47, D886-d894.
- RICHARDS, S., AZIZ, N., BALE, S., BICK, D., DAS, S., GASTIER-FOSTER, J., GRODY, W. W., HEGDE, M., LYON, E., SPECTOR, E., VOELKERDING, K. & REHM, H. L. 2015. 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. *Genet Med*, 17, 405-24.
- RIZEK, P., KUMAR, N. & JOG, M. S. 2016. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *Cmaj*, 188, 1157-1165.
- ROCHA, E. M., DE MIRANDA, B. & SANDERS, L. H. 2018. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 109, 249-257.
- RODRÍGUEZ-PASCAU, L., COLL, M. J., VILAGELIU, L. & GRINBERG, D. 2009. Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease. *Hum Mutat*, 30, E993-e1001.
- SAARNI, S. I., HÄRKÄNEN, T., SINTONEN, H., SUVISAARI, J., KOSKINEN, S., AROMAA, A. & LÖNNQVIST, J. 2006. The impact of 29 chronic conditions on health-related quality of life: a general population survey in Finland using 15D and EQ-5D. *Qual Life Res*, 15, 1403-14.
- SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K., HORN, G., ERLICH, H. & ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354.
- SAKAKIBARA, S., HASHIMOTO, R., KATAYAMA, T., KENJYO, M., YOKOKAWA, Y., SAITO, Y., HIRAKAWA, A., ITO, M., NAKAMURA, T., HARA, K., HASHIZUME, A., AIBA, I., INUKAI, A. & KATSUNO, M. 2020. Longitudinal Change of DAT SPECT in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *J Parkinsons Dis*, 10, 123-130.
- SAMII, A., NUTT, J. G. & RANSOM, B. R. 2004. Parkinson's disease. *Lancet*, 363, 1783-93.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SCHAPIRA, A. H. V., CHAUDHURI, K. R. & JENNER, P. 2017. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*, 18, 435-450.
- SCHNEIDER, S. A. & ALCALAY, R. N. 2017. Neuropathology of genetic synucleinopathies with parkinsonism: Review of the literature. *Mov Disord*, 32, 1504-1523.
- SCHULTE, C. & GASSER, T. 2011. Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet*, 4, 67-80.

- SCHWARZ, J. M., COOPER, D. N., SCHUELKE, M. & SEELOW, D. 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*, 11, 361-362.
- SENKEVICH, K., BANDRES CIGA, S., GAN-OR, Z. & KROHN, L. 2020. Lack of evidence for association of UQCRC1 with Parkinson's disease in Europeans. *medRxiv*, 2020.09.04.20188243.
- SHAN, W., LI, J., XU, W., LI, H. & ZUO, Z. 2019. Critical role of UQCRC1 in embryo survival, brain ischemic tolerance and normal cognition in mice. *Cell Mol Life Sci*, 76, 1381-1396.
- SHIEH, J. T. C. 2019. Genomic Sequencing Expansion and Incomplete Penetrance. *Pediatrics*, 143, S22-s26.
- SPINELLI, J. B. & HAIGIS, M. C. 2018. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol*, 20, 745-754.
- SUBRAMANIAM, S. R. & CHESSELET, M. F. 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 106-107, 17-32.
- SULZER, D. 2007. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends in neurosciences*, 30, 244-250.
- SURMEIER, D. J., OBESO, J. A. & HALLIDAY, G. M. 2017. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*, 18, 101-113.
- SVEINBJORNSDOTTIR, S. 2016. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 139, 318-324.
- TAKESHIMA, Y., YAGI, M., OKIZUKA, Y., AWANO, H., ZHANG, Z., YAMAUCHI, Y., NISHIO, H. & MATSUO, M. 2010. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center. *J Hum Genet*, 55, 379-88.
- TENNESSEN, J. A., BIGHAM, A. W., O'CONNOR, T. D., FU, W., KENNY, E. E., GRAVEL, S., MCGEE, S., DO, R., LIU, X., JUN, G., KANG, H. M., JORDAN, D., LEAL, S. M., GABRIEL, S., RIEDER, M. J., ABECASIS, G., ALTSHULER, D., NICKERSON, D. A., BOERWINKLE, E., SUNYAEV, S., BUSTAMANTE, C. D., BAMSHAD, M. J. & AKEY, J. M. 2012. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science*, 337, 64-9.
- THUSBERG, J., OLATUBOSUN, A. & VIHINEN, M. 2011. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Human mutation*, 32, 358-368.
- TINDALL, E. A., PETERSEN, D. C., WOODBRIDGE, P., SCHIPANY, K. & HAYES, V. M. 2009. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Hum Mutat*, 30, 876-83.
- TOLOSA, E., VILA, M., KLEIN, C. & RASCOL, O. 2020. LRRK2 in Parkinson disease: challenges of clinical trials. *Nat Rev Neurol*, 16, 97-107.
- TRINH, J., ZELDENRUST, F. M. J., HUANG, J., KASTEN, M., SCHAAKE, S., PETKOVIC, S., MADDOEV, H., GRÜNEWALD, A., ALMUAMMAR, S., KÖNIG, I. R., LILL, C. M., LOHMANN, K., KLEIN, C. & MARRAS, C. 2018. Genotype-phenotype relations for the Parkinson's disease genes SNCA, LRRK2, VPS35: MDSGene systematic review. *Mov Disord*, 33, 1857-1870.

- TYSNES, O. B. & STORSTEIN, A. 2017. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 124, 901-905.
- VAZ-DRAGO, R., CUSTÓDIO, N. & CARMO-FONSECA, M. 2017. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet*, 136, 1093-1111.
- VON BOHLEN UND HALBACH, O. 2004. Synucleins and their relationship to Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*, 318, 163-74.
- VOYTAS, D. 2001. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 2, Unit 2.5A.
- WAKABAYASHI, K., TANJI, K., ODAGIRI, S., MIKI, Y., MORI, F. & TAKAHASHI, H. 2013. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*, 47, 495-508.
- WANG, S., MAO, S., XIANG, D. & FANG, C. 2018. Association between depression and the subsequent risk of Parkinson's disease: A meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 86, 186-192.
- WATERS, D. L. & SHAPTER, F. M. 2014. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol*, 1099, 65-75.
- WITT, K., KALBE, E., ERASMI, R. & EBERSBACH, G. 2017. Nichtmedikamentöse therapieverfahren beim morbus Parkinson. *Der Nervenarzt*, 88, 383-390.
- YILMAZ, M., OZIC, C. & GOK, İ. 2012. Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. *Gel Electrophoresis—Principles and Basics*, 33.
- YU, E., RUDAKOU, U., KROHN, L., MUFTI, K., RUSKEY, J. A., ASAYESH, F., ESTIAR, M. A., SPIEGELMAN, D., SURFACE, M., FAHN, S., WATERS, C. H., GREENBAUM, L., ESPAY, A. J., DAUVILLIERS, Y., DUPRÉ, N., ROULEAU, G. A., HASSIN-BAER, S., FON, E. A., ALCALAY, R. N. & GAN-OR, Z. 2021. Analysis of Heterozygous PRKN Variants and Copy-Number Variations in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 36, 178-187.
- ZARRANZ, J. J., ALEGRE, J., GÓMEZ-ESTEBAN, J. C., LEZCANO, E., ROS, R., AMPUERO, I., VIDAL, L., HOENICKA, J., RODRIGUEZ, O. & ATARÉS, B. 2004. The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 55, 164-173.
- ZIMPRICH, A., BISKUP, S., LEITNER, P., LICHTNER, P., FARRER, M., LINCOLN, S., KACHERGUS, J., HULIHAN, M., UTTI, R. J., CALNE, D. B., STOESSL, A. J., PFEIFFER, R. F., PATENGE, N., CARBAJAL, I. C., VIREGGE, P., ASMUS, F., MÜLLER-MYHSOK, B., DICKSON, D. W., MEITINGER, T., STROM, T. M., WSZOLEK, Z. K. & GASSER, T. 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44, 601-7.

9 Eigenanteilserklärung

Die Arbeit wurde am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Thomas Gasser durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgt durch Professor Dr. med. T. Gasser und mich.

Die aufgeführten Arbeiten im Labor, die Auswahl der Kohorten und die Auswertung der Sequenzen wurden von mir nach Einarbeitung durch Ann-Kathrin Hauser selbstständig durchgeführt. Sämtliche Sequenzen wurden durch Frau Hauser ein zweites Mal ausgewertet, um Interratervariabilität zu reduzieren. Auch die Bewertung der Varianten mittels in-silico-Analysen habe ich selbst durchgeführt, wobei Claudia Schulte mir bei Fragen stets zur Seite stand.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Claudia Schulte durch mich.

Die Ermittlung der Allelfrequenzen in der Datenbank des AMP-PD wurde von Hui Liu durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 22.04.2022

Maas, Jordana Noemi

Ort, Datum

Name, Vorname

Unterschrift

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation tatkräftig unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gasser. Danke für die Möglichkeit, meine Promotion in dieser Arbeitsgruppe absolvieren zu können sowie für die sehr gute fachliche und stets motivierende Betreuung und Durchsicht dieser Arbeit.

Ein herzliches Danke auch an PhD Claudia Schulte, die mich in die Programme eingearbeitet hat, mir bei Fragen jederzeit zur Seite stand und diese Arbeit durchgesehen hat.

Für die ausgezeichnete Einarbeitung und Betreuung im Labor, die stete Beantwortung meiner Fragen und die motivierenden Gespräche möchte ich mich vielmals bei Ann-Kathrin Hauser bedanken.

PhD Hui Liu, PhD Mohammad Dehestani, PhD Felix Knab, Christian Deuschle und Benjamin Riebenbauer sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich herzlich für den konstruktiven Austausch und die Anregungen sowie die stets angenehme und hilfsbereite Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

PD Dr. med. Kathrin Brockmann und Dr. med. Isabel Wurster danke ich für das Zurverfügungstellen von Patientendaten und die Beantwortung von Fragen zu den Patientenfällen und Datenbanken.

Meiner Familie und meinen Freunden bin ich für ihre stetige, vielseitige Unterstützung und Motivation während dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums sehr dankbar.

Ich bedanke mich herzlich für die Förderung meiner Arbeit durch das Johannes-Dichgans-Promotionsstipendium für Studierende der Humanmedizin am Hertie-

Institut für klinische Hirnforschung Tübingen und die Unterstützung durch das IZKF Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät Tübingen.

Die verwendeten Patientenproben stammen aus der Neuro-Biobank der Universität Tübingen, Deutschland (<https://www.hih-tuebingen.de/en/about-us/core-facilities/biobank/>). Diese Biobank wird durch die örtliche Universität, das Hertie-Institut und das Deutsche Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. unterstützt. Für das freundliche Zurverfügungstellen der Patientenproben bedanke ich mich.