

Aus dem Institut für Humangenetik der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. O. Rieß

Abteilung für Medizinische Genetik

Abteilungsleiter: Professor Dr. O. Rieß

**Mutationsanalyse und Haplotypenvergleich in CDCrel-1
und GPR37 bei Patienten mit Morbus Parkinson**

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

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

vorgelegt von

Andrea Bob-Schittenhelm, geb. Bob

aus

Lich

2009

Dekan:	Professor Dr. I. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. O. Rieß
2. Berichterstatter:	Professor Dr. T. Gasser

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Morbus Parkinson: Historisches, Klinik und Nosologie	6
1.2	Historisches	6
1.3	Nosologie	7
1.4	Pathogenese	7
1.5	Symptomatik	9
1.6	Diagnostik und Therapie	10
1.7	Genetische Aspekte der Parkinson'schen Erkrankung	11
1.8	<i>Parkin</i> : Ein wichtiger Genort der autosomal rezessiven Parkinson-Erkrankung (PARK2) ...	17
1.9	Partner für die Protein-Protein-Wechselwirkungen mit <i>Parkin</i>	18
1.9.1	CDCrel-1 und die Gruppe der Septine	19
1.9.2	PAEL-R (Parkin associated endothelin receptor – like receptor)	21
2	Zielsetzung	24
3	Material	25
3.1	Chemikalien	25
3.2	Puffer und Lösungen	25
3.3	Sonstiges	26
3.4	Kits	26
3.5	Verbrauchsmaterialien	27
3.6	Geräte	27
3.7	Oligonukleotide	28
4	Methoden	30
4.1	Patienten und Kontrollkollektiv	30
4.2	DNA Isolierung	30
4.3	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	31
4.4	Prinzip der „Nested PCR“	34
4.5	Gelelektrophorese zur Beurteilung des PCR Produktes	36
4.6	dHPLC-Mutationscreening	36
4.7	Sequenzierung	40
4.8	Pyrosequenzierung	44
4.9	Statistische Methoden	45
5	Ergebnisse	48
5.1	Ergebnisse für das <i>CDCrel</i> -Gen	48
5.1.1	Optimierung der PCR	48
5.1.2	Ermittlung der PCR Bedingungen für die einzelnen Primerpaare	49
5.1.3	Optimierung der dHPLC Bedingungen für das <i>CDCrel-1</i> Gen	53
5.1.4	Mutationsanalyse des <i>CDCrel-1</i> -Gens	53
5.1.5	Auswertung der Ergebnisse für <i>CDCrel-1</i>	57
5.2	Ergebnisse für das <i>Pael-R</i> -Gen	59
5.2.1	PCR- Optimierung für <i>Pael-R</i> -Gen	59
5.2.2	Nested PCR für <i>Pael-R</i>	61
5.2.3	DHPLC-Analyse für <i>Pael-R</i>	61
5.2.4	Mutationsanalyse des <i>PAEL-R</i> Gens	62
5.2.5	Mutationsanalyse durch Pyrosequenzierung	66
5.2.6	Ermittlung und Vergleich der kombinierten Allelhäufigkeiten für Patienten – und Kontrollproben des <i>PAEL-R</i> Gens	68
5.3	Genotypisierung in einem Kontrollkollektiv	69
5.3.1	Genotypisierung durch dHPLC Analyse für <i>CDCrel-1</i>	69
5.3.2	Genotypisierung durch dHPLC Analyse für <i>PAEL-R</i>	69
6	Diskussion	72
7	Zusammenfassung	76
8	Anhang	78
9	Literaturverzeichnis	82

1 Einleitung

1.1 Morbus Parkinson: Historisches, Klinik und Nosologie

Nach der Alzheimer-Krankheit ist der Morbus Parkinson (Parkinson's disease, PD) die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Weltweit sind über 6 Millionen Menschen betroffen (<http://www.epda.eu.com/>), mit den höchsten Prävalenzen in Nordamerika und Nordeuropa. In Deutschland gibt es etwa 250.000 PD-Patienten. Das Durchschnittsalter der Erkrankung beträgt 61 Jahre, allerdings entwickelt jeder 10. Patient bereits Symptome im Zeitraum zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr. Ein Erkrankungsalter vor dem 21. Lebensjahr wird als juveniler Parkinsonismus bezeichnet, während die Gruppe des Early-Onset-Parkinsonismus (EOPD) die Erkrankungen zwischen dem 21. und 40. Lebensjahr zusammenfasst [Lowe 2002]. Für die Erkrankung bestehen keine Geschlechtsunterschiede, die Prävalenz nimmt mit dem Alter zu. Sind in der Altersgruppe 70-74 Jahre noch 1,0 % der Bevölkerung betroffen, so sind es in der Gruppe der 80-84jährigen bereits 3,5 % [de Rijk 1997]. In verschiedenen Studien wird eine Inzidenz zwischen 7 und 19 auf 100.000 Einwohner angegeben [Lowe 2002]. Die Krankheitsdauer beträgt durchschnittlich 13,1 Jahre [Hughes 1993].

1.2 Historisches

James Parkinson (1755-1824) veröffentlichte 1817 seine Monographie "Essay on the Shaking Palsy", in der er erstmalig die Symptome einer "Schüttellähmung" mit folgenden Worten beschrieb: „*Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forwards, and to pass from a walking to a running pace: the senses and the intellect uninjured*“ [Parkinson 1817]. Er hatte bereits den langsam progredienten Charakter der Erkrankung erkannt. Eine wesentlich präzisere Beschreibung des Krankheitsbildes lieferte allerdings Wilhelm von Humboldt in seinen Briefen (1828 bis 1835) [Baker 2004]. Die charakteristischen konzentrischen hyalinen zytoplasmatischen Einschlusskörperchen (Lewy-Körperchen) im Gehirn der Erkrankten wurden 1913 von Friedrich Heinrich Lewy beschrieben und 1919 erstmals von Tretiakoff der Substantia nigra zugeordnet [Holdorff 2002].

1.3 Nosologie

Über 80-90 % der Parkinson-Patienten lassen sich dem idiopathischen Parkinson Syndrom zuordnen, dessen Ätiologie bislang unbekannt ist. Daneben sind bei einem Teil der Patienten genetische Ursachen bekannt, deren Pathomechanismen zu dem bekannten Bild der Parkinson-Symptomatik führen. Zu den Varianten des sekundären Parkinson zählen das postenzephalitische Parkinson-Syndrom, von dem seit 1960 keine neuen Fälle bekannt sind, sowie das medikamentös induzierte Parkinson Syndrom, durch Tranquilizer oder Neuroleptika ausgelöst und häufig reversibel nach Absetzen der Medikation. Weitere Auslöser können Umwelttoxine, Tumore und endokrinologische Störungen sein. Auch im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen wie der Multisystematrophie (MSA, Shy-Drager-Syndrom), der progressiven supranukleären Paralyse (PSP, Steele-Richardson-Olzewski-Syndrom) oder der Lewy-Körperchen-Erkrankung (Lewy-Body-Disease) werden Parkinson-Symptome beobachtet.

1.4 Pathogenese

Für die Manifestation der Symptome des Morbus Parkinson wird eine multifaktorielle Genese angenommen. Folglich werden in verschiedenen Stoffwechselwegen Pathogenesemechanismen beschrieben. Es werden z.B. ein toxisches Agens, ein mitochondriales Versagen, eine Erhöhung der freien Radikalen, unvollständige neurotrophe Einflußfaktoren oder eine „beschleunigte Zellalterung“ als relevante Auslöser beschrieben.

Für ein toxisches Agens sprechen die Beobachtungen, dass Exposition mit 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) zu einem selektiven Untergang der nigralen Neurone führt. Auf biochemischer Ebene führt die Oxidation der Derivate durch die Monoaminoxidase B (MAO B) zu einer Konzentrationsanreicherung an der inneren Zellmembran mit Blockade der NADH-Dehydrogenase-Bindungsstellen und damit nachfolgendem mitochondrialem Schaden [Singer 1990]. Weitere Pestizide

und Herbizide stehen ebenfalls im Verdacht, eine Parkinson-Symptomatik auslösen zu können.

Auch oxidativer Streß durch Freie Radikale, welche Zellmembranen peroxidieren, oder Tyrosinreste, die Proteine nitrieren oder durch Strangabbrüche direkte DNA Schäden hervorrufen, werden bei neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet [Sayre 2001]. Unter physiologischen Bedingungen sind diese für den Elektronentransport zuständig und an der Signaltransduktion der Zelle beteiligt. Sie werden durch Antioxidantien wie Glutathion oder Cystathion entgiftet. Eine Akkumulation von Metaboliten der Lipidperoxidation und dem Protein 4-hydroxynonenal (HNE) findet bevorzugt in den Neuronen der Substantia nigra statt [Yoritaka 1996] und beeinflusst den proteasomalen Ubiquitin-Abbaustoffwechsel der Proteine negativ [McNaught 2001]. Eisen, welches bei Parkinson-Patienten in höherer Konzentration in der Substantia nigra gefunden wird, führt zu einer Steigerung der toxischen Radikale [Berg 2002]. Aber auch bei der Oxidation von Dopamin selbst durch die Monoaminoxidase (MAO) entsteht Wasserstoffperoxid, aus welchem wiederum Hydroxylradikale entstehen, die bei den erkrankten Personen wohl nicht ausreichend abgefangen werden können [De Iuliis 2002]. Die kompensatorische Steigerung der Dopaminsynthese in den verbleibenden Neuronen verstärkt zusätzlich den Teufelskreis.

In anderen Arbeiten wiederum wird die mitochondriale Funktionsstörung mit einer Funktionsminderung der Nikotinamid-adenin-dinukleotid Coenzym Q-Reduktase erklärt [Mizuno 1998].

Gemeinsames morphologisches Korrelat beim Morbus Parkinson ist eine progressive Erkrankung der Basalganglien, bei der die Anzahl der in das Striatum projizierenden dopaminergen Neurone der Substantia nigra abnimmt. Diese ist gegenüber der altersbedingten Zellabnahme deutlich erhöht und führt zu einem Dopaminmangel in der extrapyramidal-motorischen Schleife, welche für die Modulation der Pyramidenbahn zuständig ist [Gibb 1987]. In überlebenden Neuronen beobachtet man in der Substantia nigra, Locus coeruleus und den dorsalen Motoneuronen 8-30µm große, sphärische Einschlusskörperchen, die sogenannten Lewy-Körperchen, die sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit hyalinem, eosinophilen Kern und

einem blassem Halo darstellen. Ultrastrukturell bestehen sie aus 7-20nm großen Intermediärfilamenten und dichten Granula aus alpha-Synuclein, alphaB-Crystallin, Ubiquitin und weiteren Neurofilamentproteinen, die vor ihrer Inkorporation phosphoryliert werden [Bancher 1989]. Der Nachweis von Proteinen des Ubiquitin-Systems legt den Verdacht nahe, dass die Lewy-Körperchen eine zytoprotektive Reaktion mit Einschluß der degenerativen Zellkomponente darstellen. [Zhao 2003].

1.5 Symptomatik

Die klinische Symptomatik des idiopathischen Parkinson mit Neuronenuntergang in der Substantia nigra und zytoplasmatischen Lewy-Körperchen resultiert vor allem aus dem Fehlen des striatalen Neurotransmitters Dopamin, wenn mehr als 50 % der Neurone in der Pars compacta untergegangen sind oder der Dopamingehalt um 70-80% vermindert ist [Bernheimer 1973]. Zur Diagnosestellung genügt es, wenn zwei der drei Kardinalsymptome Ruhetremor, Rigidität und Bradykinesie vorliegen. Von manchen Autoren wird die posturale Instabilität mit Fallneigung als viertes Kardinalsymptom angesehen.

Von den Symptomen manifestiert sich der Tremor in 40-70 % der Fälle zuerst [Gibb 1988], wobei berücksichtigt werden muss, dass Störungen der Feinmotorik oft als erstes wahrgenommen werden. Typischerweise tritt der Tremor zunächst an den Antagonisten der oberen Extremitäten und meist zunächst auch nur einseitig auf. Er manifestiert sich anfänglich nur intermittierend in Belastungssituationen. Später imponiert er als konstanter Ruhetremor mit gleichbleibender Intensität und Amplitude. Ausgeprägter Fingertremor wird als „Pillendreher-Phänomen“ bezeichnet. In manchen Fällen tritt zusätzlich ein Haltetremor auf, der Kopf und Unterkiefer mit einschließen kann. In späteren Stadien kann die Intensität des Tremors wieder abnehmen [Rajput 1991].

Insbesondere Rigor und Bradykinesie treten meist zusammen auf und werden von den Patienten zunächst als Muskelschwäche oder –steife interpretiert, insbesondere Muskelschmerzen der Nacken- und Schulterregion. Mit in den Begriff Bradykinesie wird in der Literatur in der Regel auch die beim Morbus Parkinson auftretenden Akinesie (Unfähigkeit eine Bewegung auszuführen) und Hypokinesie (reduzierte

Bewegungsamplitude) eingeschlossen [Rajput 1994]. Insbesondere Bewegungsmuster, die repetitive oder sequentielle Elemente beinhalten sind davon stark betroffen und äußern sich in einer zunehmend verlangsamten Ausführung. Plötzlich auftretende Bewegungsblockaden, insbesondere zu Beginn einer Bewegungsausführung behindern die Patienten. Der nach vorne geneigte Oberkörper führt zu einer zunehmenden Fallneigung. Typischerweise ist der Gang kleinschrittig und schlurfend bei fehlender Mitbewegung der oberen Extremitäten. Der Schweregrad korreliert in der Regel mit dem Verlust an striatalen Neuronen [Agid 1991]. Die Rigidität der oberen Extremitäten ist meist asymmetrisch und wird aufgrund ihres ruckartigen Charakters auch als „Zahnradphänomen“ beschrieben.

Weitere Befunde sind in 80 % der Fälle Sprechstörungen mit Dysarthrophonie und Mikrophonie. Schreibstörungen (Mikrographie) und Bewegungsarmut schränken die Patienten in ihrer Kommunikationsfähigkeit ein. Nicht selten werden depressive Verstimmungen bei Parkinson-Patienten beschrieben. Ob diese endogen verursacht werden oder eine Reaktion auf die Erkrankung darstellen, ist umstritten. Im Gegensatz zu den ersten Beobachtungen von James Parkinson treten durchaus kognitive Einschränkungen in bis zu 29% der Fälle auf [Marttila 1976]. Bei Parkinson-Patienten, die eine Demenz aufweisen, ist die Progression der Erkrankung rascher, es treten häufiger medikamentöse Nebenwirkungen auf und Wirkung der Medikamente ist häufig stark beeinträchtigt [Hietanen 1988]. Vegetative Begleitsymptome der Erkrankung sind Seborrhoe mit dem maskenartigen „Salbengesicht“, reduzierter Blinzelreflex, Hypersalivation, Orthostatische Hypotonie, Obstipation und Miktionsstörungen.

Eine akute Komplikation stellt die nach Infekten, Operationen oder Neuroleptika-Einnahme auftretende akinetische Krise dar. Bei dieser Stunden bis Tage anhaltenden Starre mit Hyperthermie handelt es sich um einen lebensbedrohlichen Zustand [Thomas 2003].

1.6 Diagnostik und Therapie

Grundsätzlich ist eine sichere Diagnose der Parkinson'schen Erkrankung nur post mortem zu stellen. Die neuropathologischen Kriterien sind hierbei ein Zelluntergang

von mehr als 60% der Neurone in der substantia nigra und der Nachweis von Lewy-Körperchen in diesen Zellen.

Mit einer hohen Wahrscheinlichkeit kann klinisch von einer Parkinsonschen Erkrankung ausgegangen werden, wenn die neurologische Untersuchung folgende Auffälligkeiten ergibt: Von den Leitsymptomen der klassischen Trias Rigor, Ruhetremor (4-6/sec) und Bradykinese und einer Störung der Halte- und Stellreflexe müssen mindestens zwei Symptome vorhanden sein. Außerdem ist ein asymmetrischer Beginn bei gutem Ansprechen auf eine Behandlung mit L-Dopa häufig. Meist sind keine weiteren neurologischen Defizite vorhanden.

Zur Therapie der Parkinsonschen Erkrankung sollte immer die physiotherapeutische und ergotherapeutische Betreuung der Patienten gehören. Hier werden Strategien zur Kompensation der neurologischen Defizite und zur Alltagsbewältigung erarbeitet.

Die medikamentöse Therapie des Morbus Parkinson ist immer symptomatisch. Es werden hier mit dem Ziel der Wiederherstellung des Transmittergleichgewichtes sehr unterschiedliche Substanzen eingesetzt, darunter L-Dopa + Decarboxylaseinhibitoren, Dopaminrezeptoragonisten, Anticholinergika, MAO-B / COMT-Hemmer und NMDA-Antagonisten. Über die Kombination und den Zeitpunkt der Gabe dieser Substanzen gibt es bisher keine gesicherten Erkenntnisse.

1.7 Genetische Aspekte der Parkinson'schen Erkrankung

In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass für Verwandte von Parkinson-Patienten das Erkrankungsrisiko bis zu 2,3fach erhöht ist [Marder 1996]. Mit der Anzahl der betroffenen Familienmitglieder nimmt das relative Risiko zu, die Krankheit ebenfalls zu entwickeln. In Studien an Zwillingen konnten Konkordanz-Raten von 75 % (eineiig) und 22% (zweieiig) ermittelt werden. [Piccini 1999, Vieregge 1999]. Dabei ist allerdings nicht berücksichtigt, dass Zwillinge denselben Umwelteinflüssen ausgesetzt sein können.

Während die Ätiologie des idiopathischen Morbus Parkinson unbekannt ist, konnten mittels klassischer parametrischer Kopplungsanalysen mit Positionsklonierungen

oder durch nichtparametrische Kopplungsanalysen mit Assoziationsstudien in den letzten Jahren elf Genorte in großen Parkinson-Familien mit autosomal-rezessivem oder autosomal-dominantem Erbgang identifiziert werden. Sie wurden der Reihenfolge ihrer Entdeckung nach mit PARK1 bis 11 ohne Rücksicht auf ihren Vererbungsmodus benannt [Riess 1999, Dawson 2003]. Eine entsprechende Übersicht findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über bekannte Gene oder Loci welche in sporadischen oder familiären Parkinson-Erkrankungen involviert sind.

Klassifikation	Gen	Modus	Locus	Referenz
PARK1	<i>a-Synuclein</i>	AD	4q21-23	Polymeropoulos 1997
PARK2	<i>Parkin</i>	AR	6q25.2-27	Kitada 1998
PARK3	Unbekannt	AD	2p13	Gasser 1998
PARK4	<i>a-Synuclein</i> Triplikation	AD	4p14-16.3	Farrer 1999
PARK5	<i>UCH-L1</i>	AD	4p14	Leroy 1998
PARK6	<i>PINK1</i>	AR	1p35-36	Valente 2004
PARK7	<i>DJ1</i>	AR	1p36	Bonifati 2003
PARK8	<i>LRRK2</i>	AD	12p11.2-q13.1	Zimprich 2004
PARK9	<i>ATP13A2</i>	AR	1p36	Ramirez 2006
PARK10	Unbekannt		1p32	Hicks 2002
PARK11	Unbekannt		2q36-37	Pankratz 2003
PARK12	Unbekannt		Xq21-25	Pankratz 2003
PARK13	<i>Omi/HTRA2</i>		2p12	Strauss 2005
	<i>NURR1</i>	AD	2q22-23	Le 2003
	<i>Synphilin-1</i>		5q23	Marx 2003
	<i>Peripherin</i>	AD	12q12	Glass 2008

Mutationen dieser Gene stellen die häufigste Ursache für autosomal-rezessive early-onset Fälle, einschliesslich des juvenilen Parkinson dar [Kitada 1998]. Diese unterscheiden sich gegenüber den idiopathischen Fällen durch das Fehlen der Lewy-Körperchen [Mori 1998]. Für PARK1, 2, 5, 7 und 8 wurden bereits Kandidatengene

identifiziert. Dabei sind neben Parkin insbesondere α -Synuclein [Polymeropoulos 1996, 1997, Krüger 1998, Zarranz 2004, Singleton 2003, Farrer 2004], DJ-1 [Nagakubo 1997, van Duijn 2001, Bonifati 2003, Abou-Sleiman 2004], PINK1 [Valente 2002, 2004, Hatano 2004; Healy 2004] und LRRK2 [Funayama 2002, Zimprich 2004, Paisan-Ruiz 2004] als Kandidaten sehr gut gesichert.

Für PARK1 wurde als erster Genort eine Punktmutation auf dem langen Arm von Chromosom 4 (4q21-23) innerhalb des α -Synuclein-Gen entdeckt. Es handelt sich um eine missense Mutation mit Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an der Position 53 (Ala53Thr), welcher eine Rolle bei der oxidativen Schädigung dopaminerger Neurone zukommt [Polymeropoulos 1996]. 1998 konnte eine zweite Punktmutation an Position 30 (Ala30Pro) nachgewiesen werden [Krüger 1998], die ebenfalls einen Aminosäureaustausch zur Folge hatte. Eine dritte Mutation mit Heterozygotie für E46K wurde 2004 bei Mitgliedern einer spanischen Familie nachgewiesen [Zarranz 2004]. Mutationen in den Genen für α -Synuclein sind jedoch selten [Berg 2005]. Eine Triplikation eines 1,6 – 2,04 Mb großen Abschnittes auf 4p15, in dem sich auch der Locus für das α -Synuclein Gen befindet, wurde zunächst als PARK4 klassifiziert (Singleton 2003, Farrer 2004). Sie geht mit einem sehr frühen Krankheitsbeginn, Gewichtsverlust und einer rasch voranschreitenden L-Dopa sensitiven Parkinsonsymptomatik einher. Einige Mitgliedern der untersuchten Familie wiesen denselben Haplotypen auf, ohne dass sich eine Parkinson-Symptomatik zeigte, stattdessen wurde ein isolierter Tremor beobachtet. Das α -Synuclein-Protein, ließ sich immunhistochemisch als wesentlicher Bestandteil der Lewy Körperchen nachweisen, außerdem fand es sich in Synaptophysin-immunoreaktiven präsynaptischen axonalen Endigungen, was darauf schließen lässt, dass es eine Rolle im synaptischen Vesikeltransport spielen könnte [Goedert 1997]. In der Wildtypform liegt α -Synuclein als ungefaltetes Protein vor. Seine Mutanten hingegen sind in der Lage mit sich selbst Aggregate zu bilden und amyloidähnliche Filamente auszubilden [Conway 1998].

Für PARK3 wurde der Locus 2p13 von Gasser et al. 1998 bei drei deutschen und einer dänischen Familie mit mehreren von der Parkinsonschen Erkrankung betroffenen Mitgliedern gefunden. Klinisch wiesen die Träger dieses Locus eine große Ähnlichkeit mit den an sporadischem M. Parkinson erkrankten Patienten auf.

So unterscheidet sich zum Beispiel das mittlere Erkrankungsalter mit 59 Jahren bei den Trägern des 2p13 Locus kaum von dem der an sporadischen Parkinson erkrankten mit 59,7 Jahren. Neben für den sporadischen Parkinson typischen Symptomen, fanden sich außerdem auch Zeichen einer Demenz mit Lewy Körperchen im Hirnstamm und Alzheimer Plaques. [Wszolek 1999]. Allerdings scheint die Penetranz dieser Mutation mit 40% eher gering zu sein, was auf eine Rolle dieses Locus nicht nur beim familiären, sondern auch beim sporadischen Parkinson Syndrom hinweisen könnte. Insgesamt ist die Mutation sehr selten [Gasser 1998, Wszolek 1993, 2002, De Stefano 2002].

Bei PARK5 (Ubiquitin Carboxy Hydrolase L-1, UCHL-1) handelt es sich um eine autosomal-dominante Form des Morbus Parkinson. Initial wurde eine Ile93Met Mutation des *UCHL-1* Gens (4p14) nachgewiesen werden, welche biochemisch zu einer 50%igen Reduktion der Enzymaktivität führt. [Leroy 1998]. UCHL-1 stellt ein zentrales Enzym im Ubiquitin-Stoffwechsel defekter Proteine über das 26 S Proteasom dar. UCHL1 hydrolysiert in diesem System Ubiquitin-Protein Komplexe und ermöglicht somit den Wiedereinsatz des Ubiquitin im System. Kürzlich wurde eine weitere dimerisationsabhängige Ligaseaktivität der UCHL1 festgestellt, welche, zumindest in vitro, die Aggregation von α -Synuclein fördert. Beide Geschwister in der Erstbeschreibung erkrankten dabei um das 50. Lebensjahr und wiesen zunächst einen Ruhetremor, später Rigidität, Bradykinesie und Standunsicherheit auf. Weitere Mutationen des *UCHL1* Gens wurden in Deutschland bisher nicht ausgemacht. Es fand sich jedoch ein S18Y Polymorphismus in Exon 3, welcher in Verdacht steht, das Risiko für das sporadische Parkinsonsyndrom zu verringern [Wintermeyer 2000]. In vitro erarbeitete Daten unterstützen jetzt diese These. Sie zeigten, dass S18Y eine deutlich geringere Ligase Aktivität besitzt, als die Wildtypform von UCHL1 [Healy 2004]. Bislang sind Mutationen des *UCHL-1* Gens auch innerhalb der genetisch vererbten Parkinson-Fälle ein seltenes Ereignis [Leroy 1998, Wintermeyer 2000].

Für PARK6 wurde in einer großen sizilianischen Familie mit einem Erkrankungsalter von 32-48 Jahren von Valente et al. 2001 durch ein genomweites Screening ein Locus auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 (1p35-36) für den autosomal-rezessiven Erbgang identifiziert. 2004 wurden von Valente et al. zwei missense Mutationen im *PINK1* (PTEN induzierte Kinase 1) Gen in 2 Familien mit PARK 6

ausgemacht. Hatano et al. (2004) und Healy et al. (2004) bestätigten diese Mutationen unabhängig von einander. Versuche mit Zellkulturen deuten auf eine Lokalisation der PTEN induzierten Kinase in den Mitochondrien hin, was einen protektiven Effekt der Kinase innerhalb der Zelle vermuten lässt [Valente 2004]. Phänotypisch zeigte sich ein früher Beginn mit langsamer Progredienz, langanhaltendem ansprechen auf die Therapie mit L-Dopa und häufigen, L-Dopa induzierten Fluktuationen und Dyskinesien. Dystonie und eine Besserung nach dem Schlafen traten nicht auf. In anderen Familien variiert das Erkrankungsalter der Betroffenen stark (Krankheitsbeginn bis zum 68. Lebensjahr). Dies und der langsame Verlauf der Erkrankung entspricht phänotypisch dem idiopathischen Parkinson Syndrom, sodaß eventuell diese Mutation unterrepräsentiert ist.

Das für PARK7 verantwortliche Gen *DJ-1* wurde zunächst als Onkogen, später auch als Antioxidans identifiziert, welches mit der Zunahme an reaktiven Sauerstoffverbindungen in seiner zellulären Konzentration ansteigt [Mitsumoto 2001]. Mutationen des DJ-1 Gens führen zu einer veränderten zellulären Antwort auf oxidativen Streß und damit auch der proteasomalen Inhibition [Martinat 2004]. Dabei spielt DJ-1 eine Rolle als redox-sensitives molekulares Chaperon, welches bei oxidativen zytoplasmatischen Vorgängen in der Zelle aktiviert wird und in der Lage ist, die Bildung von α -Synuclein-Aggregaten zu unterdrücken. 2001 untersuchten Duijn et al. eine niederländische Familie mit autosomal-rezessivem, juvenilem Parkinson Syndrom, die einer genetisch isolierten Population entstammte und fanden dabei nahezu zeitgleich mit der Entdeckung von PARK6 Hinweise auf einen Locus auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 (1p36) welcher dem *DJ-1* Gen entspricht. So wurde erstmals eine Verbindung des DJ-1 Gens zum AR-JP hergestellt. Mutationen im selben Gen bei einer italienischen Familie [Bonifati 2003] bestätigten diese Verbindung. Während bei der niederländischen Familie eine große homozygote Deletion über Exon 1 bis 5 gefunden wurde, die zu einem kompletten Ausfall des DJ-1 Proteins führte, wies die italienische Familie eine homozygote L166P missense Mutation auf, die einen Funktionsverlust des Proteins zur Folge hatte [Abou-Sleiman 2004]

2002 machten Funayama et al. in einer großen japanischen Familie mit autosomal-dominanter Parkinsonscher Erkrankung im Rahmen eines genomischen Screenings

einen Krankheitsspezifischen Locus auf Chromosom 12 aus. Es handelt sich hierbei um *LRRK2*, welches als PARK8 in die Nomenklatur einging. Als Charakteristika dieser Erkrankung präsentierten sich ein einseitiger Krankheitsbeginn im 51+/-6. Lebensjahr, gutes Ansprechen auf die Behandlung mit Levodopa und keine Hinweise auf Demenz oder neurologische Ausfälle. Auffällig schien, dass sich auch phänotypisch unauffällige Träger dieses Haplotyps fanden. Diese unvollständige Penetranz wurde als Hinweis auf den Einfluß weiterer genetischer oder umweltbedingter Faktoren gedeutet. Zimprich et al. untersuchten 2004 aus 21 Familien insgesamt 167 betroffene Mitglieder mit Hinweisen auf autosomal-dominantes Vererbungsmuster mit Hilfe von 21 Markern in der Kandidatenregion auf PARK8. Aus Neuropathologischer Sicht fanden sich in einer der Familien 4 verschiedene Muster: In einem Fall fanden sich Lewy Körperchen im Hirnstamm entsprechend dem Bild eines idiopathischen Parkinson Syndrom, ein Mitglied wies weitverbreitete Lewy-Körperchen auf, wie dies bei einer Lewy-Body Demenz der Fall ist. Ein dritter Fall zeigte eine Tau-Pathologie entsprechend einer PSP, während beim vierten Familienmitglied eine nigrale Degeneration ohne weitere pathologische Auffälligkeiten auftrat. Bei 2 Mitgliedern der anderen Familie zeigten sich eosinophile Einschlüsse ohne typische Lewy Körperchen. Diese sehr unterschiedlichen pathologischen Auswirkungen wurden als ein Hinweis darauf gedeutet, dass ein und derselbe genetische Defekt ein breites Spektrum an phänotypischen Ausprägungen zur Folge haben kann. Umgekehrt jedoch ist bei der Parkinsonschen Erkrankung sehr anschaulich zu verfolgen wie auch sehr verschiedene Ursachen zu der selben phänotypischen Ausprägung führen können. Mittlerweile machen Mutationen des *LRRK2*-Gens einen beträchtlichen Teil (3-7%) der familiären Parkinson-Erkrankungen in Europa aus. In geschlossenen Bevölkerungsgruppen, wie Ashkenazi-Juden werden sogar Frequenzen bis zu 41% beschrieben [Glass 2008]

Das mit PARK9 assoziierte, autosomal-rezessiv vererbte, auf 1p36 lokalisierte Kufor Rakeb Syndrom weist neben typischen Symptomen einer Parkinsonschen Erkrankung auch eine Beteiligung des Tractus cortico-spinalis, eine Demenz und supranukleärer Blickparese nach oben auf. Der Erkrankungsbeginn ist mit 11-16. Lebensjahr sehr früh und verläuft bei den arabischstämmigen Erkrankten sehr rasch progredient und führt in der Regel innerhalb von 2 Jahren ab Krankheitsbeginn bis hin zur Bettlägrigkeit. Die Betroffenen zeigten ein gutes Ansprechen auf die Therapie

mit Levodopa, wodurch die extrapyramidalen Funktionen über ungefähr 2 Jahre verbessert werden konnte [al Din 1992, Hampshire 2001].

Ebenfalls selten ist das dem Genort 1p32 zugeordnete PARK10 aus dem isländischen Raum [Hicks 2002] Es wird davon ausgegangen, dass es sich um ein Suszeptibilitätsgen für das spät beginnende idiopathische Parkinson Syndrom handelt.

Sowohl PARK11 auf Region 2q36–37 und PARK12 auf Region Xq21-25 [Pankratz 2003] wurden durch nichtparametrische Kopplungsanalysen ermittelt, wobei ein Teil dieser familiären Erkrankten Mutationen des Parkin-Gens aufwies. Diese genomweiten Studien konnten jedoch für europäische Populationen nicht nachvollzogen werden. Die Serinprotease Omi/HtrA2 wurde hingegen als Kandidatengens aufgrund seiner Interaktionseigenschaften mit Persenilin-1 einer Mutationsanalyse unterzogen, bei der zwei Punktmutationen identifiziert werden konnten [Strauss 2005]. Somit wurde dieses in den Mitochondrien aktive Protein als PARK13 klassifiziert. Daneben existieren noch einige weitere Familien mit maternalem Erbgang, passend zu einer mitochondrialen Störung, ohne dass bislang eine spezielle Mutation hierfür ausfindig gemacht werden konnte.

1.8 *Parkin*: Ein wichtiger Genort der autosomal rezessiven Parkinson-Erkrankung (PARK2)

1996 wurde zunächst in der japanischen [Ishikawa 1996], zwei Jahre später auch in der europäischen Bevölkerung [Leroy 1998] eine autosomal-rezessive, durch Mutation des Parkin Gens verursachte Form des Parkinsonismus beschrieben. Mittlerweile entfallen etwa 50% aller AR-JP Fälle auf eine der über 70 verschiedenen bekannten Mutationen auf dem Parkin-Gen, darunter zehn exonische Deletionen und fünf Punktmutationen [Abbas 1999, Bertoli-Avella 2005, Hattori 1998, Lucking 2000, Shyu 2005, Clarimon 2005, Chien 2006, Hertz 2006, Mata 2005].

Das aus 12 Exonen bestehende 1,4 Mb große Gen auf Chromosom 6q25 kodiert für ein Protein aus 465 Aminosäuren, dessen Amino-Ende eine gewisse Homologie zu Ubiquitin aufweist. Hot-spots für Mutationen sind insbesondere die Deletionen in den

Exons 2-5 und Punktmutationen in den Exons 6-12, wo zwei Ring-Finger Abschnitte lokalisiert sind.

Die durch Mutation des Parkin Gens verursachten Parkinson-Syndrome weisen in der Regel alle sehr ähnliche Charakteristika wie das langsame Fortschreiten früh beginnender und zunächst milder Symptome und eine Besserung der Syptomatik nach dem Schlafen auf.

Parkin agiert in Zusammenarbeit mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym UbcH7 als E3 Ubiquitin-Protein Ligase. Es ubiquitiniert Proteine und führt sie damit dem proteasomalen Abbau zu. Parkin ist auch in der Lage, sich selbst zu ubiquitinieren und damit seinen eigenen Abbau zu fördern [Zhang 2000]. Ein Ausfall von Parkin führt zu einem Neuronenuntergang in der Substantia nigra pars compacta und Locus coeruleus ohne Ausbildung der ansonsten typischen Lewy-Körperchen [Kitao 2007]. In den mutierten Parkin-Varianten kann das Substrat α -Synuclein nicht mehr gebunden werden [Shimura 2001].

1.9 Partner für die Protein-Protein-Wechselwirkungen mit *Parkin*

Um den Wirkmechanismus von Parkin bei Gesunden und Mutationsträgern genauer zu analysieren, wurde in-vitro wiederholt nach Interaktionspartnern von Parkin gesucht. Bisher sind 10 Substrate des Parkin bekannt, die bekanntesten darunter sind CDCrel-1, o-glykosiliertes α -Synuclein, Pael-Rezeptor und Synphilin-1. Beobachtungen aus Zellkulturen legen die Vermutung nahe, dass eine lactazystininduzierte Ansammlung von Parkin eine bedeutende Rolle bei der Ubiquitinierung missgefalteter Substrate spielt [Zhao 2003]. Scheinbar besitzt Parkin die Fähigkeit, Neurone vor Schäden durch Fehler im Zellstoffwechsel bewahren zu können. So schützt es die Zelle z.B. vor α -Synuclein-Toxizität, proteasomaler Dysfunktion und der Akkumulation des Pael-Rezeptors [Kitao 2007].

Kürzlich wurden das Hitze Schock Protein Hsp70 und sein Co-Chaperone CHIP als weitere Bindungspartner von Parkin identifiziert. Man fand heraus, dass CHIP dabei die Fähigkeit des Parkins, Pael-R zu ubiquitinieren, verstärkt [Takahashi 2003]. Hsp70 bildet mit Parkin, den Proteasomen und weiteren Proteinen einen Komplex,

der an dem Abbau fehlgefalteter Proteine als Substrate der E3-Ligase-Aktivität von Parkin beteiligt ist [Tsai 2003]. Es muss diesen Beobachtungen jedoch gegenübergestellt werden, dass bei Parkin-knock-out Mäusen keines der bisher bekannten Substrate von Parkin in den Zellen akkumulierten. Es fanden sich bei diesen Mäusen auch keinerlei Hinweise auf eine Degeneration dopaminergener Neurone [Takahashi, 2004].

Synphilin-1 wird vorwiegend in den präsynaptischen Neuronenendigungen exprimiert und zeigt somit eine ähnliche intrazelluläre Verteilung mit seinen Interaktionspartnern alpha-Synuklein und Parkin [Chung 2001]. Es ist ebenfalls im E3-Ubiquitin-Ligase-Stoffwechsel involviert. In zwei sporadischen Formen des Morbus Parkinson konnten Mutationen innerhalb des Synphilin-1 Gens nachgewiesen werden [Marx 2003].

Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der aktuellen Arbeit werden die Interaktionspartner CDCrel und PAEL-R in den nachfolgenden Abschnitten ausführlicher abgehandelt.

1.9.1 CDCrel-1 und die Gruppe der Septine

CDCrel-1 (cell division cycle related), alternativ auch als PNUTL1 (peanut-like) oder SEPT5 (Septin 5) bezeichnet, ist ein 42-kD Protein, dessen kodierendes Gen auf Chromosom 22q11.2 liegt. Es besteht aus 13 Exons welche sich über 8.8kb erstrecken [Yagi 1998]. Es wurde 1997 erstmals im Rahmen der Genexpressionsanalyse des Glykoprotein I β -beta-Vorläufers GP1BB entdeckt und beschrieben [Zieger 1997]. Die mRNA Expression ist vor allem im menschlichen Gehirn und im Herzen am höchsten, wenngleich sich CDCrel-1 in allen Organen mit Ausnahme der Leber nachweisen lässt [Zieger 2000]. Durch Spleißen sowie begleitende alternative Promotor-Verwendung entstehen zwei cDNA-Transkripte, die sich an ihrem 5'-Ende unterscheiden [Yagi 1998].

Bei der Untersuchung der Ausreifung von Synapsen im Tiermodell wurden erhöhte Expressionspiegel von CDCrel festgestellt, welche sich in Immunpräzipitaten als Komplexe mit den Septinen Nedd5 und Cdc10 darstellten [Peng 2002]. In Protein-Interaktion-Assays konnte zusätzlich eine Interaktion mit Sept8 nachgewiesen werden [Blaser 2002]. Damit gehört CDCrel-1 zur Gruppe der Septine. Diese

ubiquitär bei Pilzen und Tieren, nicht jedoch im Pflanzenreich vorkommende Proteinfamilie wurde zuerst in *Saccharomyces cerevisiae*, einer Hefeart, entdeckt. [De Virgilio 1996; Fares 1996]. CDC3, CDC10, CDC11 und CDC12 stellen temperatursensitive Varianten dar, deren Vorhandensein essentiell für die Zellteilung ist. Insbesondere das *Drosophila* Septin-Homologon namens Peanut akkumuliert bei defektem Protein in multikernigen Synzytien während der Mitose [Neufeld 1994]. Desweiteren spielen Septine eine große Rolle bei der Exozytose von Vesikeln [Martinez 2004]. Für CDCrel-1 wurde daher vom Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee die neue Bezeichnung SEPT5 vorgeschlagen [Macara 2002]

Es ist bekannt, dass der Locus 22q11.2 von *CDCrel-1* bei Patienten mit DiGeorge Syndrom und bei velo-kardiofaszialen Syndromen häufig Deletionen aufweist. [McKie 1997]. Phänotypisch ist das DiGeorge Syndrom eine komplexe kongenitale Fehlbildung mit Hypoplasie des Thymus und der Nebenschilddrüsen, das zum Teil durch fehlende Einwanderung von Nervenzellen in den pharyngealen Bogen gekennzeichnet ist. Das Ausmaß einer Beteiligung von CDCrel-1 an dieser Störung ist nicht bekannt. Jedoch wurde anhand von Messungen der Transkriptionsraten während der Embryonalentwicklung ein Expressionsmuster erstellt, auf dessen Basis im Zusammenhang mit klinischen Daten davon ausgegangen werden kann, dass CDCrel-1 in der Ätiologie des Velo-kardiofazialen Syndromes und des DiGeorge Syndromes involviert ist [Maldonado-Saldivia 2000]. Für diese Patienten ist jedoch bisher kein gehäuftes Auftreten des Parkinson-Syndroms beschrieben.

Sowohl beim Velo-kardiofazialen Syndrom, als auch beim DiGeorge Syndrom treten gehäuft Schizophrenien auf. Um eventuelle Zusammenhänge mit der Expression synaptischer Proteine zu klären wurden Ratten zwölf Wochen lang isoliert aufgezogen, eine Methode, welche im Modell zur Simulation der Vorgänge bei Schizophrenien verwendet wird, und die Immunoreaktivität von CDCrel-1, Synaptophysin und Syntaxin gemessen. Die isoliert aufgezogenen Ratten zeigten bezüglich CDCrel-1 signifikant erniedrigte Werte im Striatum, während eine grenzwertig erhöhte Konzentration im Hippocampus nachgewiesen werden konnte [Barr 2004].

CDCrel-1 wird hauptsächlich im Nervensystem exprimiert und ist dort an der Regulierung der Sekretion beteiligt. [Caltagarone 1998]. Die Expression in den präsynaptischen Enden inhibitorischer Neurone steigt während der Reifung der synaptischen Vesikel an [Kinoshita 2000]. Die Gensequenz enthält einen hochkonservierten GTPase-Abschnitt und man nimmt an, dass die Filamentbildung durch die GTPase-Funktion die Exozytose der synaptischen Vesikel im Sinne einer physikalischen Barriere reguliert [Kinoshita 2000]. Im Tiermodell zeigten homozygote CDCrel-1 Knockout-Mäuse keine Veränderungen zahlreicher synaptischer Proteine, während die Expression anderer Septine verändert war. CDCrel-1 scheint also für die neuronale Entwicklung nicht essentiell zu sein, seine funktionelle Reduktion wird durch andere Septine ausgeglichen [Peng 2002].

Das mit den synaptischen Bläschen assoziierte CDCrel-1 ist Bindungspartner der E3 Ubiquitin Ligase Aktivität von Parkin, welches, wie bereits oben erwähnt, für autosomal rezessive Formen des Morbus Parkinson verantwortlich gemacht wird [De Silva 2000]. Durch diese Mutationen des Parkin kann CDCrel-1 nicht ubiquitiniert und damit nicht dem proteasomalen Abbauweg zugeführt werden. Dies könnte für die bei der Parkinsonschen Erkrankung auftretende verminderte Exozytose dopaminergere synaptischer Bläschen in der Substantia nigra verantwortlich sein [Zhang 2000]. Im Tiermodell konnte durch viralen Gentransfer das humane CDCrel-1 in der Substantia nigra von Ratten exprimiert werden. Interessanterweise führte eine Überexpression hier zum Verlust dopaminergere Neurone [Dong 2003].

1.9.2 PAEL-R (Parkin associated endothelin receptor – like receptor)

Bei Pael-R (auch als GPR37 benannt) handelt es sich um ein Neurotransmitter-Rezeptorprotein, welches vor allem im Nervensystem, aber auch in der Leber und in der Plazenta exprimiert wird [Marazziti 1997]. Es weist in seiner Struktur große Ähnlichkeit mit dem Endothelinrezeptor Typ B auf. Diese Unterfamilie der putativen G-protein gekoppelten Rezeptoren („GPR's“) besteht aus sieben hydrophoben Transmembran-Domänen, welche durch hydrophile intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der Gen-Locus von GPR37 liegt auf 7q31 und enthält 2 Exone [Marazziti 1997].

Die 3,8kb große mRNA kodiert für das aus 613 Aminosäuren bestehende Protein. Es wird im Endoplasmatischen Retikulum gefaltet und von dort zur Zellmembran transportiert. Fehlgefaltetes Protein wird dabei normalerweise über die Membran des ER ins Zytosol transportiert und dort im Ubiquitin-Proteasomalen System abgebaut. In Zellkulturen zeigte sich, dass große Mengen ungefalteten Pael-R im Endoplasmatischen Retikulum zu nicht unerheblichem Zellstress führen, der die Vitalität der Zelle stark beeinträchtigt und schließlich den Zelltod auslöst [Imai 2001]. Parkin ist in der Lage, diesen Zellstress zu verhindern, indem es den Abbau des unlöslichen, fehlgefalteten Pael-R durch Ubiquitinierung unterstützt [Imai 2001].

Mit Hilfe von Yeast Two Hybrid screening wurde Pael-R als Substrat des Parkin identifiziert. [Takahashi 2003]. Parkin bindet an Ubc 6 und Ubc 7, beide sind mit dem ER assoziierte E2- Ubiquitin Ligasen, welche ebenso wie Parkin an der Ubiquitinierung des Pael-R beteiligt sind. In Versuchen mit Pael-R transfizierten humanen Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5H konnte nachgewiesen werden, dass die Halbwertszeit von Pael-R unter der Co-Expression von Parkin deutlich zurückging [Takahashi 2003]. Dies legte die Vermutung nahe, dass Parkin am ER assoziierten Abbau des Pael-R beteiligt ist und Pael-R somit ein Substrat des Parkin ist. Außerdem zeigte sich bei Überexpression von Pael-R, dass dieses Protein in bis zu 50% der Fälle in der unlöslichen Fraktion auftauchte, was auf die schwierige Faltbarkeit dieses Proteins hinweisen könnte [Takahashi 2006]. Unter Gabe des Proteasomen-Hemmstoffes Lactacystin stieg der Anteil unlöslichen Produktes noch weiter an, während der Anteil an korrekt gefaltetem Pael-R gleich blieb, was auf einen proteasomalen Abbauweg von Pael-R hinweist.

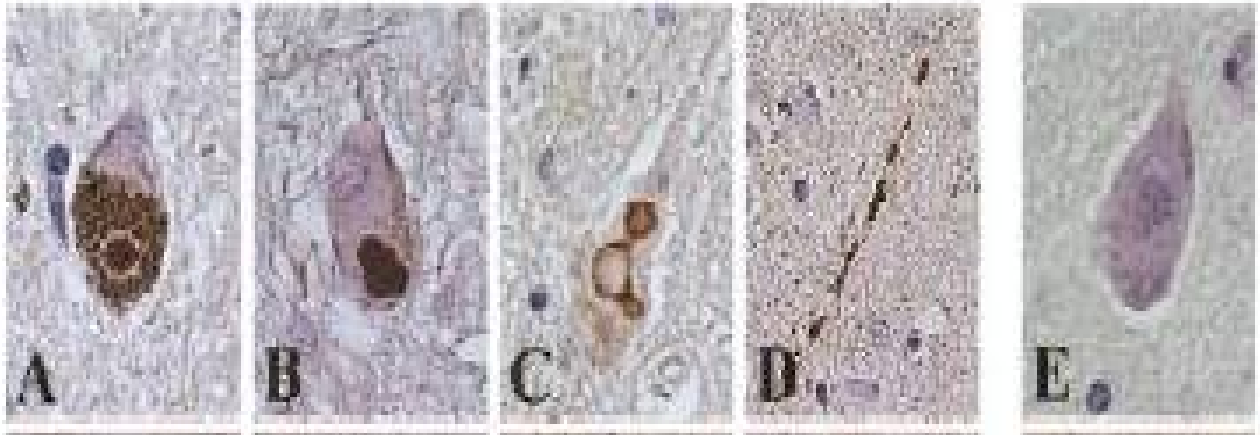


Abbildung 1: Immunhistochemischer Nachweis von Pael-R in paraffineingebetteten Gehirngewebe. A, B: Pael-R im Zellkern, C im Halo, D in Lewy-Neuriten, E: Normalkontrolle (Quelle: Murakami et al. 2004, Ann Neurol. 55:439-442).

2004 wurde Pael-R als ein Bestandteil der Lewy Körperchen identifiziert [Murakami 2004]. Mittels Immunhistochemie konnte Pael-R in bis zu 90% der Lewy Körperchen (LK) nachgewiesen werden, wobei Pael-R hauptsächlich im Kern lokalisiert ist. In ähnlicher Häufigkeit wurde mittels entsprechender Antikörper auch Parkin als Bestandteil der LK ausgemacht, welches sich jedoch hauptsächlich in den Randbereichen der LK befand. Obwohl bei der durch Mutationen im Parkin Gen verursachten autosomal rezessiven juvenilen Form der Parkinsonschen Erkrankung keine Lewy Körperchen vorkommen, legt das Ergebnis dieser Untersuchungen die Vermutung nahe, dass Parkin eine wichtige Rolle bei der Entstehung der LK spielt. [Schlossmacher 2002]. Als Ligand für Pael-R agiert das Neuropeptid HA (Head activator) [Rezagui 2006], in welchem Zusammenhang dieses seine Funktion ausübt, ist jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht bekannt.

2 Zielsetzung

Da die CDCrel-1-Überexpression eine dopamin-abhängige Neurotoxizität in nigralen Neuronen verursachen kann und CDCrel-1 als Substrat von Parkin agiert, war es für uns von großem Interesse, die Bedeutung von CDCrel-1 für den Morbus Parkinson festzustellen. Durch genetische Variabilität im CDCrel-1 Gen könnte es möglicherweise zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine in der Substantia nigra und der im Tierversuch nachgewiesenen toxischen Wirkung auf die Zellen kommen. Ähnliches gilt für das schwierig zu faltende Pael-R, welches als Bestandteil der Lewy Körperchen nachgewiesen werden konnte.

Insofern war es unser Ziel, das gesamte Gen sowohl von *Pael-R* als auch von *CDCrel-1* in einem großen Patientenkollektiv mit Morbus Parkinson auf Mutationen oder Sequenzvarianten hin zu untersuchen. Geklärt werden sollte insbesondere, ob diese Gene eine Rolle bei der erblichen Parkinson-Erkrankung spielen bzw. ob diese Gene modifizierenden Einfluss auf den Verlauf der Parkinson-Krankheit im Sinne eines Empfindlichkeitsgenortes („susceptibility gene“) haben.

Um für die Mutationsanalyse hinreichend statistische Aussagen machen zu können sollen insgesamt 364 (*CDCrel-1*) bzw. 333 (*PAEL-R*) Parkinsonpatienten mittels denaturierender Hochdruckflüssigchromatographie (dHPCL) untersucht werden. Auffällige Elutionsprofile sollen anschließend mittels zyklischer Sequenzierung überprüft werden. Als Kontrolle stehen 264 Proben von alterskorrelierten Patienten ohne neurodegenerative Auffälligkeiten zur Verfügung. Dem vorausgehend werden für alle zu untersuchenden Exone die Etablierung entsprechender Primerpaare mittels Gradienten-PCR notwendig. Für *PAEL-R* wird aufgrund der großen Länge der beiden Exons eine Einteilung in insgesamt 6 Abschnitte mit entsprechenden Primerpaaren notwendig. Für alle 12 Exons von *CDCrel-1* genügt hingegen jeweils ein Primerpaar um diese vollständig abzudecken.

Bei der Entdeckung möglicher Polymorphismen sollten diese entweder mittels passendem Restriktionsvderau oder Pyrosequencing für alle Proben einzeln bestimmt werden. In diesen Fällen ist zur Materialersparnis die Durchführung einer Nested-PCR vorgesehen. Die statistische Auswertung der Mutationen oder Polymorphismen soll im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv durchgeführt werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

Acetonitril	Merck, Darmstadt
Agarose	Biowhittaker, Taufkirchen
Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylediamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FICOLL Typ 400 20%	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	Carl Roth GmbH u. Co, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumacetat – Terahydrat	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2 - Mercaptoethanol	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat	Carl Roth GmbH u. Co, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH u. Co, Karlsruhe
Salzsäure (HCL (aq))	Merck, Darmsatdt
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomic, Crewe Großbritannien
Tween - 20	Merck, Darmstadt
Tris (Hydroxymethyl– Aminomethan)	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.2 Puffer und Lösungen

Puffer für Enzyme

10 x BioTherm Puffer

GeneCraft Münster

Allgemeine Puffer

Blaupuffer für Agarosegel

0,01% Bromphenolblau
Ficoll (Typ400)
1x TBE

10 x Ladepuffer für Agarosegel

0,1 % Bromphenolblau
0,1 % Xyencyanol
50 % Glycerin

10 x Tris–Borat–EDTA (TBE), pH 8,0

890mM Tris
890mM Borsäure
20mM EDTA (pH 8,0)

Sonstige Lösungen

Für das Abstoppen der zyklischen Sequenzierung:

Stop Lösung	1,5M NaOAc, pH 5,2 50mM Na ₂ EDTA, pH 8,0
-------------	---

dHPLC-Lösung:

Puffer A für dHPLC, pH 7,0	0,1M TEAA
Puffer B für dHPLC, pH 7,0	0,1M TEAA 25% Acetonitril
Puffer C für dHPLC	
Puffer D für dHPLC	

Pyrosequenzierung:

10 x Annealing Puffer, pH 7,6	200mM Tris – Acetat 50mM Mg(Oac) ₂ 10mM Tris HCL(aq) 2mM NaCl 1mM EDTA 0,1% Tween – 20
2 x Binding Puffer, pH 7,6	

3.3 Sonstiges

dNTPs	GeneCraft, Münster
Ethidiumbromidlösung 0,5ug/ml	Carl Roth GmbH u. Co, Karlsruhe
DNA Größenstandard 100bp DNA Ladder 250µl	InvitrogenGmbH, Karlsruhe
Fragmentlängen in Basenpaaren: 20072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100	
Enzyme	
BioTherm DNA-Polymerase (5U/µl)	GeneCraft, Münster

3.4 Kits

CEQ Dye Terminator Sequencing (DTCS) Quick Start Kit	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
--	--------------------------------

GenomiPhi Kit	Amersham Biosciences
PSQ SNP Reagenzien Kit	Pyrosequencing AB, Uppsala
QIAquick Gel – Extraktions – Kit	Qiagen GmbH, Hilden

3.5 Verbrauchsmaterialien

Beckmann 96 – well Platten	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Easy Peel Klebefolie	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Easy Pierce Strong Klebefolie	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf GmbH, Hamburg
Microwell 96 U – Platten	Nunc GmbH u. Co KG, Wiesbaden
Multi 96 Well PCR – Platten	PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR Softstrips	Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH, Hamburg
PSQ 96 Pyrosequenzierplatten	Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden

3.6 Geräte

CEQ 8000 Zyklussequenzierer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Elektrophoresekammer 40 – 0708	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer 40 – 1214	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophorese Spannungsgeber	
Consort E 835	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf GmbH, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5417C	Eppendorf GmbH, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5804	Eppendorf GmbH, Hamburg
Eppendorf Thermomixer	Eppendorf GmbH, Hamburg
Fotodokumentationsanlage	Eppendorf GmbH, Hamburg
Transilluminator	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Gene-Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Magnetrührer IKAMAG REO	Bachofen Laboratoriumsgeräte Reutlingen
Milli Q	Millipore GmbH, Eschborn
Thermocycler MJ Research PTC 200	Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf
PSQ Pyrosequenzierer	Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden
PSQ Sample Prep Tool	Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden
pH Meter MP 230	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
UV Tisch	Bachofen Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Vakuumentrifuge	
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf GmbH, Hamburg
Vortexer REAX control	Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach
Waage Precisa XT 6200C-	PESA Waagen GmbH, Bissingen- Steinhofen
Nukleinsäure-Fragmentanalyse-System	Transgenomic, Crewe Großbritannien

3.7 Oligonukleotide

Die Synthese sämtlicher Oligonukleotide wurde von der Firma Metabion GmbH in Martinsried übernommen. Die Konzentration der gelieferten Oligonukleotide betrug 100pM/µl.

Die Referenzsequenzen für das CDCrel und das Pael-R Gen wurden von NCBI bezogen (Internetadresse www.ncbi.nlm.nih.gov):

CDCrel: NP_002679

Pael-R: NM_005302

Tabelle 2: Primer für PAEL-R

Exon- abschnitt	Primer	Primersequenz 5` - 3`	Schmelz- Temperatur
Ex1a	1886_Ex1aF 1887_Ex1aR	TGCCTAACTCTCAGCAGCAA TTCCCTCTCCCCAAAGTTTC	57,3 57,3
Ex1b	1888_Ex1bF 1889_Ex1bR	GGACCCTCCTGGGACCTG AGTGCAATTGTCCACCCTTC	62,8 57,3
Ex1c	1890_Ex1cF 1891_Ex1cR	AAGGAGAGCCGGGAAACTC AGCCCCTGGAAGGCATTA	58,8 56,0
Ex2a	1892_Ex2aF 1893_Ex2aR	GGGACACCGGGAATAAATGT AGCAGGTGATGGTGAAAAGC	57,3 57,3
Ex2b	1894_Ex2bF 1895_Ex2bR	TTGGCTGTTACTTTTGTTC CTGGGGTGACACAGGACTTA	54,0 59,4
Ex2c	1935_Ex2c_NF 1936_Ex2c_NR	GGGGTTTCACAGCAGACAAT GAAAAATATGAATTA AAAACT TTC	57,3 54,3

Aufgrund der Größe der Exone des *Pael-R* Gens und der Sensitivität der dHPLC auf maximal 300 Basenpaare wurden Exon 1 und Exon 2 in jeweils 3 Teilabschnitten untersucht.

Tabelle 3: Primer zur Pyrosequenzierung von Polymorphismen (auf Ex2a des Pael-R Gens)

Exon- abschnitt	Primer	Primersequenz 5` - 3`	Schmelz- Temperatur
Ex2aSNP1 (Pyro)	2416_Ex2a1F 2401_Ex2a1R	BiotinGGACACCGGGAATAAATGTC TGGCAGTTGTTGAGGAACAG	56°C
Ex2aSNP2 (Pyro)	2402_Ex2a2F 2417_Ex2a2R	CGGCAGAAAGGTGCATTATT BiotinAGCAGGTGATGGTGAAAAGC	57°C

Tabelle 4: Primer zur Amplifikation der Exone des CDCrel Gens

Exon- abschnitt	Primer	Primersequenz 5` - 3`	Schmelz- Temperatur
Exon2	2294	CTCACCGTGTCTCTCCGTCT	61,4
	2295	TGTCACAATGGGTGACAGC	56,7
Exon3	2212	GACAGGGTATTGGGCTTCTG	59,4
	2213	AAGGAGCTGCGTTAGGTCTG	59,4
Exon4	2214	GTTGGAGCCCCAGACCTAAC	61,4
	2215	TGAAAGGGAGTCCTTGAGAGA	57,3
Exon5	2216	CCAAGATGGATGAGGACGAG	59,4
	2217	AGGCCTCGAGTGCTGTGG	60,5
Exon6	2218	CTAGGCGGCCACAGCACT	60,5
	2219	CCATATTGTAGGGGCTGCAC	59,4
Exon7	2220	GGAGTGCAGCCCCTACAATA	59,4
	2221	GTCCCCCTGGTACTCTCAGC	63,4
Exon8	2222	GGACTTGTCTGGCCTCAAATC	59,8
	2223	AGGAGACAAAGCCCTCTGGT	59,4
Exon9	2224	TAACCGTGCAATTACGCTCA	55,3
	2225	CCTTCCCCCACCAGACCT	60,5
Exon10	2226	CAGGTCTGGTGGGGGAAG	60,5
	2227	GGACCGGCCCTCAGTTAT	58,2
Exon11	2228	ACCAAGTCCAGGGCTGTGAG	61,4
	2229	GGAGGAGCATCCCTGACG	60,5
Exon12	2230	GCGTCAGGGATGCTCCTC	60,5
	2231	GATCCCCCAAGGTCAGAGAG	61,4

Aufgrund der kurzen Exonabschnitte genügte für *CDCrel-1* ein Primerpaar pro Exon. Eine Amplifikation von Exon 1 gelang trotz verschiedenster Ansätze (Q-Solution, Formamid, Touchdown-PCR, verschiedene Polymerasen) nicht. Neben dem hohen CG- Gehalt dieses Exons ergab die Sequenzierung erschwerend noch einen Längenpolymorphismus direkt im Anschluß an den kodierenden Bereich.

4 Methoden

4.1 Patienten und Kontrollkollektiv

Sowohl die Patienten, als auch die Kontrollgruppe wurden neurologisch untersucht. Bei den Probanden der Kontrollgruppe wurden neurologische Symptome, die auf eine Parkinson Erkrankung oder auf andere neurodegenerative Erkrankungen hinweisen könnten, durch standardisierte Tests ausgeschlossen. Bei der Auswahl von Patienten und Kontrollpersonen wurde auf Strukturgleichheit der beiden Gruppen geachtet. Das heißt, die beiden Gruppen sind bezüglich ihres Alters, ihrer ethnischen Herkunft und der Geschlechtsverteilung möglichst homogen. Von allen Studienteilnehmern lag nach Aufklärung ein schriftliches Einverständnis vor.

Im Parkinsonkollektiv waren von 364 Patienten 88 weiblichen und 100 männlichen Geschlechts, von 176 Patienten wurden keine Angaben zum Geschlecht gemacht. Das durchschnittliche Alter betrug bei den männlichen Patienten 59 Jahre (Spanne 35-79) und bei den weiblichen Patienten 60 Jahre (Spanne: 26-87). Als Kontrollgruppe dienten 275 Patientenproben mit ähnlicher Altersverteilung.

4.2 DNA Isolierung

Auf die im folgenden Text erwähnten Methoden der Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction, kurz PCR) und der Agarosegelelektrophorese wird im Anschluss genauer eingegangen, so dass diese Methoden hier nicht ausführlich beschrieben werden.

Nach erfolgter Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung wurden den Patienten bzw. Kontrollpersonen 20ml EDTA Blut entnommen. Die DNA wurde nach einem standardisierten Verfahren nach Miller et al [Miller 1988], welches auf dem „aussalzen“ der DNA beruht, extrahiert.

Die Bestimmung der DNA Konzentration erfolgte im Photometer. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die Absorption gemessen, wobei eine optische Dichte von 1 einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 µl/ml entspricht [Sambrook 1989]. Die gemessene DNA Konzentration betrug für alle Proben im Mittel 1,9ng/µl.

Sämtliche Proben wurden im Anschluß an die Extraktion in einer PCR [Mullis 1987] amplifiziert und auf einem Agarosegel zur anschließenden Beurteilung des PCR Produktes elektrophoretisch aufgetrennt. Beide Verfahren werden im Anschluß noch ausführlich besprochen.

Für DNA Proben, welche in der PCR kein oder nur wenig Produkt liefern, besteht die Möglichkeit, diese durch eine Fällung mit Isopropanol weiter aufzureinigen. Dieses Verfahren entfernt Salze, welche bei der Extraktion der DNA in den Proben verblieben sind und das Gelingen der PCR erheblich beeinträchtigen können. Dazu wird die DNA – Lösung mit 1/10 Volumen 3M NA –Acetat – Lösung versetzt und im Anschluss 0,6-0,8 Volumen Isopropanol zugegeben. Durch Natrium – Acetat werden monovalente Kationen gebildet. Sie bewirken zusammen mit Isopropanol, welches die Hydrathülle der DNA verdrängt ein Ausfallen der DNA zu unlöslichem Niederschlag. In der Zentrifuge wird bei maximaler Umdrehungszahl für 15 min die DNA zu einem Pellet abzentrifugiert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation abgenommen und die DNA mit 70%igem Ethanol nachgewaschen. Dabei werden Salze, die im Gegensatz zur DNA in Ethanol löslich sind herausgelöst. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei maximaler Umdrehungszahl für 5 Minuten. Nach einer Trockenzeit von weiteren 5 Minuten an der Raumluft wird das aufgereinigte Pellet dann im gewünschten Ausgangsvolumen Ampuwa – Wasser bzw. TE-Puffer resuspendiert.

4.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Prinzip der Polymerase Ketten Reaktion

Die PCR Methode wurde 1986 von K.B. Mullis eingeführt. Sie ermöglicht die gezielte Vervielfältigung ausgewählter DNA-Sequenzen aus dem Ausgangsmaterial, z.B.

genomischer DNA. Das Prinzip der PCR ist die in zyklischen Reaktionsschritten ablaufende enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebundenen Oligonukleotiden. Voraussetzung sind also die Kenntnis der Nukleotidsequenzen beiderseits des gewünschten Abschnittes und Verfügbarkeit der geeigneten Oligonukleotide.

Die Vermehrung der DNA läuft dann folgendermaßen ab: Die als Doppelhelix vorliegende DNA wird im ersten Schritt bei 95° C denaturiert, d.h. durch Lösung der Wasserstoffbrücken in ihre beiden Einzelstränge aufgeteilt. Die beiden synthetisch hergestellten Oligonukleotide, auch Primer genannt, können sich nun komplementär an die DNA Matrize anlagern (Annealing). Von diesen Primern ausgehend kann mit Hilfe zugegebener Desoxinukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) dann die Kettenverlängerung erfolgen (Elongation). Sie wird von der thermostabilen Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, der Taq-Polymerase, in 5`-3`-Richtung katalysiert. Das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase liegt bei 70 – 80 °C. Um zu verhindern, dass die Primermenge zum limitierenden Faktor wird, werden Primer im Überschuß in die Reaktion gegeben. Die neu entstandenen DNA-Doppelstränge werden im nächsten Zyklus erneut denaturiert, es folgt eine erneute Annealing- und Elongationsphase. In der Regel werden die Zyklen 20-50 mal wiederholt.

Optimierung der PCR Bedingungen

Je nach Primerpaar werden verschiedene Bedingungen benötigt, um eine optimale Reaktion zu ermöglichen. Eine wichtige Rolle spielt hier vor allen Dingen die Annealing-Temperatur. Weitere beeinflussende Faktoren können die MgCl-Konzentration oder die Zugabe weiterer Reagenzien (z.B. DMSO) sein.

Die Optimierung der Temperatur erwies sich in diesem Falle jedoch bei allen PCRs als ausreichend. Dazu wurde anhand der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur ein ansteigender Temperaturgradient gewählt. Es wurde ein PCR Ansatz hergestellt, der dann bei verschiedenen Temperaturen amplifiziert wurde. Die Schmelztemperatur eines Primers ist unter anderem von seinem Gehalt an Guanin und Cytosin abhängig (3 Wasserstoffbrücken zur komplementären Base).

Ziel der Optimierung ist es, eine möglichst hohe Ausbeute an möglichst reinem PCR Produkt zu erhalten.

Es wird zunächst ein sogenannter Mastermix angefertigt, der dann zusammen mit der jeweiligen DNA auf die einzelnen PCR-Tubes verteilt wird. Dazu werden für einen PCR-Ansatz auf Eis folgende Reagenzien zusammenpipetiert:

Reagenz	Stammlösung	Endkonzentration
10x PCR Puffer (Genecraft)	10x	1x
dNTPs der Firma Invitrogen	100mM	0,02mM
Primer Forward	100mM	0,4uM
Primer Reverse	100mM	0,4uM
Taq Polymerase (Genecraft)	5U /ul	1U
DNA	Durchschnittlich 121 ng/µl	9,5ng

Das restliche Volumen wurde mit Ampuwa auf 25µl aufgefüllt

Von dem Mastermix werden dann auf Eis je 25µl in einzelne Tubes gegeben, gemischt, kurz abzentrifugiert und direkt vom Eis in den auf 95°C vorgeheizten Thermocycler überführt. Die PCR-Cycler bieten die Möglichkeit einen Temperaturgradienten einzustellen, so dass in einer horizontalen Reihe für jeden Ansatz eine andere Annealingtemperatur festgelegt werden kann.

Arbeitsbeispiel für Exon 11 (*CDCrel-1*):

Der Mastermix wird immer mit einem Überschuß von einem Ansatz hergestellt d.h. für eine PCR mit 7 Temperaturen werden 8 Ansätze hergestellt:

Master Mix	8 x 25ul
HPLC Wasser	106,4µl
10 x PCR Puffer	20,0µl
DNTPs ,2mM	16,0µl
Taq Polymerase , 5U/µl	1,6µl
Primer 2228, 10pMol	8µl
Primer 2229, 10pMol	8µl
DNA	40µl

Die Schmelztemperatur T^m beträgt für die Primer 2228 und 2229 61,4°C bzw. 60,5°C. Es wurde der Gradient 50-70 gewählt und die Ansätze bei folgenden Annealingtemperaturen amplifiziert:

Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5	Ansatz 6	Ansatz 7
51,7°C	53,2°C	55,8°C	58,4°C	61,8°C	64,6°C	66,8°C

Ein üblicherweise durchgeführtes PCR Programm sah wie folgt aus:

Schritte	Zeit	Temperatur in°C
1 Denaturierung	3 min	95
2 Denaturierung	30 sec	95
3 Annealing	30 sec	50-70
4 Elongation	1 sec	72
	Wiederholung der Schritte 2-4 insgesamt 34 mal	
5 Elongation	5 min	72
6 Kühlen		4

Nach Optimierung der Bedingungen für alle Primerpaare wurde jede Patientenprobe mit jedem Primerpaar in einer PCR amplifiziert. Dazu wurden die Patientenproben in 96-well Mikrotiterplatten vorgelegt. Neben 95 Patientenproben enthält jede der Platte auch eine Negativkontrolle. Es wurde für jede PCR ein Mastermix für 96 Proben hergestellt. Von diesem wurden auf eine 96 Well PCR Platte je 20µl übertragen.

Zuletzt wurden mit einer 8-Kanalpipette aus jeder Patientenprobe 5µl DNA in den Mastermix gegeben. Auch diese Schritte fanden wie oben beschrieben alle auf Eis statt. Die Platten wurden dann mit Folie verschlossen und nach kurzem Mischen und Abzentrifugieren direkt vom Eis in den vorgeheizten PCR- Cycler (95°C) überführt. Die Konzentration der DNA Proben betrug im Durchschnitt 1,9ng /µl.

4.4 Prinzip der „Nested PCR“

Die Nested PCR wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um bei der Amplifikation der Proben für die Analyse von Single Nukleotid Polymorphismen (SNP) im Pyrosequenzierer DNA-Proben einzusparen. Es wird hierzu bereits vorhandenes PCR-Produkt verwendet, welches die für die Analyse gewünschten Abschnitte enthält. Nun werden die Primer so gewählt, dass sie innerhalb der vorhandenen Fragmente diejenigen Bereiche einschließen, die im Rahmen der Pyrosequenzierung untersucht werden sollen und aus dem vorhandenen Fragment die gewünschten Abschnitte in einer erneuten PCR amplifiziert.

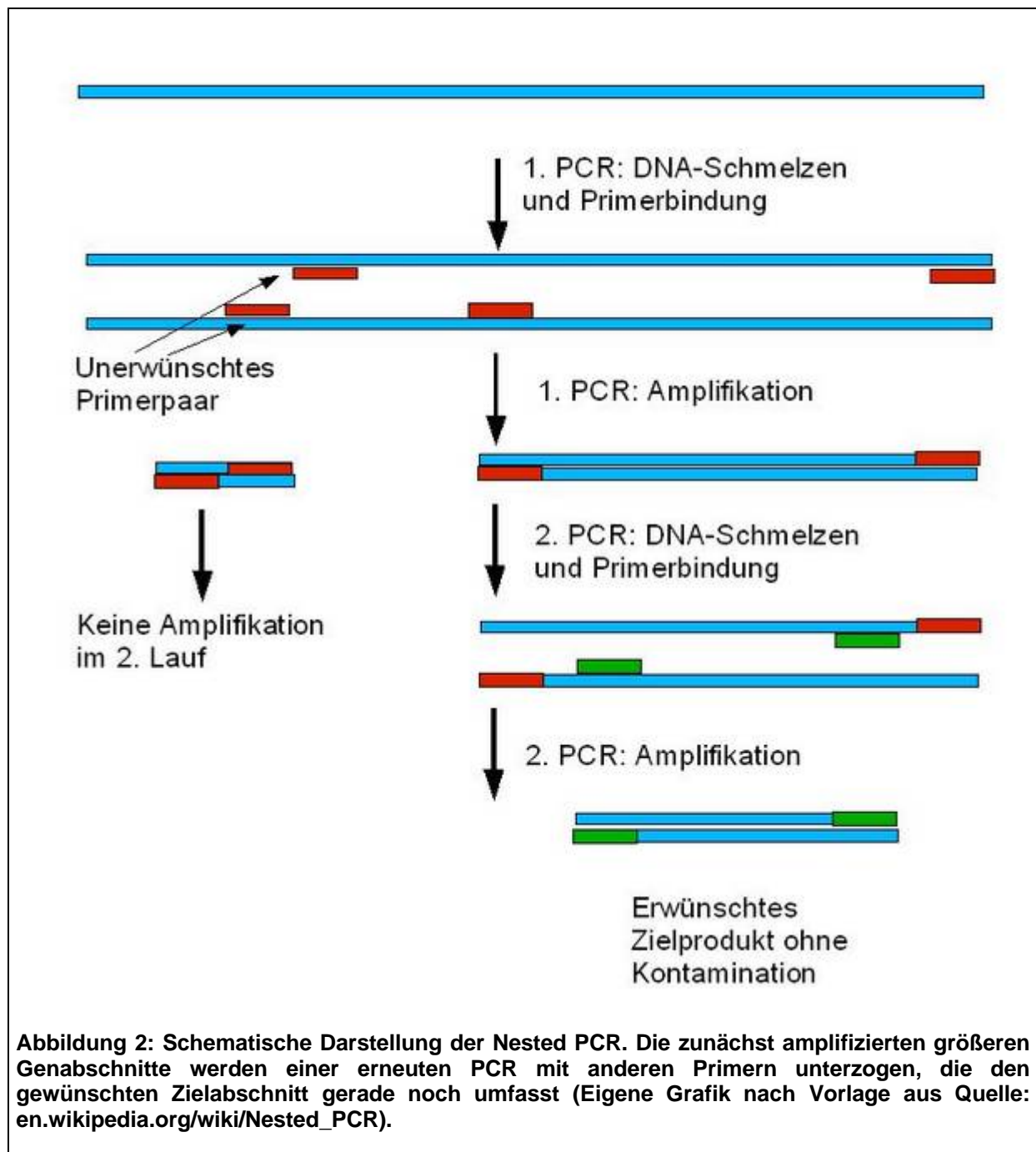


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Nested PCR. Die zunächst amplifizierten größeren Genabschnitte werden einer erneuten PCR mit anderen Primern unterzogen, die den gewünschten Zielabschnitt gerade noch umfasst (Eigene Grafik nach Vorlage aus Quelle: en.wikipedia.org/wiki/Nested_PCR).

4.5 Gelelektrophorese zur Beurteilung des PCR Produktes

Prinzip der Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt eine einfache Methode zur Auftrennung von DNA Abschnitten nach ihrer Größe dar.

Ein Agarosegel wird mit den PCR Amplifikaten beladen und in eine wässrige Lösung gegeben, die 1x TBE-Puffer enthält. Da DNA negativ geladen ist wandert sie in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Geschwindigkeit, mit der sich ein Fragment im Gel fortbewegt ist abhängig von seiner Größe: Ein langes Fragment legt in derselben Zeit eine kürzere Strecke zurück als ein kurzes. Um die Länge der Fragmente bestimmen zu können gibt man zusätzlich einen Längenstandard mit auf das Gel. Dem Gel wird außerdem ein interkalierender, fluoreszierender Farbstoff, das Ethidiumbromid zugegeben, so dass die DNA-Moleküle unter einer UV- Lampe sichtbar gemacht und mit einer Kamera fotografiert werden können.

Für die Herstellung eines 2% igen Agarosegels wird die Agarose in 1x TBE Puffer aufgekocht, nach kurzer Abkühlzeit werden 3µl Ethidiumbromid 1% zugegeben und das noch flüssige Gel in eine Gelkammer gegossen. Nach etwa 30 minütiger Abkühlzeit bildet sich eine feste Agarosematrix, an deren oberem Rand nach Entfernung der eingebrachten Plastikämme Probestaschen vorhanden sind. Diese Probestaschen können nun mit den PCR Produkten beladen werden. Hierzu werden üblicherweise 5µl PCR-Produkt mit 3µl 10x Agarose Blaupuffer vermischt, und dann in die Gel-Taschen gegeben.

4.6 dHPLC-Mutationsscreening

Prinzip der dHPLC

dHPLC steht für *Denaturing High Performance Liquid Chromatographie*. Sie eignet sich gut zur schnellen und sicheren Erkennung von Mutationen oder Polymorphismen in DNA Fragmenten mit einer Länge zwischen 100 und 500 Basenpaaren.

Sie funktioniert nach dem Prinzip der Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie.

Eine Säule aus Polystyren-Divinylbenzol stellt die unpolare, stationäre Phase, während die mobile Phase TEAA (Triethylammonium-Kation) enthält, welches an anionische Phosphatgruppen der DNA bindet. Es entsteht ein nach außen ungeladenes Ionenpaar. Über hydrophobe Wechselwirkungen der Alkylgruppen des TEAA mit der Säule kommt es zur Bindung der DNA an die Säule. Mit steigender Acetonitrilkonzentration in der mobilen Phase werden dann DNA - Fragmente aus der Säule ausgewaschen. Hierbei macht man es sich zu nutze, dass Homo- und Heteroduplex DNA-Fragmente verschiedene Schmelzeigenschaften haben. DNA – Heteroduplexes bestehen aus zwei Einzelsträngen, die in einer Base nicht miteinander übereinstimmen. Durch den Verlust der Wasserstoffbrücke in einer Heteroduplex-DNA liegt an dieser Stelle der hydrophile Kern der DNA – Doppelhelix frei. Hier kann der wässrige Anteil der mobilen Phase angreifen. Bei der entsprechenden Analysetemperatur vergrößert sich dieser Bereich und der teilweise denaturierte Heteroduplex wird von der Säule eluiert.

Die Homoduplex DNA hingegen eluiert erst bei einer höheren Acetonitrilkonzentration und damit später. Die im Eluat vorhandene DNA-Konzentration wird an einem Detektor bei 260nm photometrisch bestimmt und in einem Chromatogramm dargestellt.

Heteroduplexes entstehen bei DNA die homozygot eine Mutation aufweist indem zwei DNA Proben miteinander gepoolt werden. Die Proben werden denaturiert und dann erneut renaturiert, was dazu führt, dass sich einerseits die ursprünglichen homozygoten Doppelstränge mit oder ohne Mutation andererseits jedoch auch Heteroduplexes aus dem Wildtypstrang und dem Strang mit der Mutation ausbilden. So wird sichergestellt, dass auch eine homozygote Mutation nicht übersehen wird.

Heteroduplex Bildung

Um Heteroduplexes zu bilden wurden zu gleichen Teilen die PCR Produkte zweier Proben miteinander gemischt. Die gepoolten Proben wurden dann in einem Thermocycler (Gene-Amp PCR System 9700) zunächst bei 94° C für 2 min denaturiert. In den folgenden 30 Minuten wurde dann die Temperatur langsam auf 10°C abgesenkt. Dadurch kam es zur Anlagerung der Einzelstränge aneinander und zur Bildung der oben beschriebenen Heteroduplexes. Die Aufbewahrung der Proben nach diesem Schritt erfolgte bei 4°C oder bei –20°C.

dHPLC Methodenetablierung

Für die Analyse eines DNA- Fragmentes im dHPLC besteht der Gradient aus 4 verschiedenen Abschnitten, in denen jeweils verschiedene Mischungsverhältnisse der Puffer A und B bestehen. Im ersten Schritt, der Equilibrierungsphase, wird die Ausgangskonzentration der Puffer hergestellt. Im darauffolgenden Schritt, dessen Dauer 0,1 Minuten beträgt werden 5µl der DNA Probe injiziert. Der Anteil des Puffers B steigt in dieser Phase um 3% was einem Anstieg des Acetonitrilanteils um 0,75% entspricht. Während des 3. Schrittes, in dem auch die Elution von der Säule stattfindet, kommt es zum Aufbau eines linearen Gradienten: Puffer B steigt innerhalb von 2 min kontinuierlich um 5% pro Minute an. In Schritt 4 erfolgt die Reinigung der Säule mit der Ausgangskonzentration an Puffer B. Insgesamt beträgt die Dauer eines Messdurchlaufes 2,5 Minuten.

Nach Ablauf der obigen 4 Schritte wird die Säule erneut mit der Ausgangskonzentration an Puffer für die nächste Messung equilibriert. Durch Veränderung des Startgradienten, d.h. dem Verhältnis von Puffer A zu Puffer B, kann die Retentionszeit verändert werden. Erwünscht ist eine Retentionszeit die bei etwa 1,7 min liegt. Um den geeigneten Startgradienten und damit die gewünschte Retentionszeit für jedes DNA-Fragment zu ermitteln wurde PCR Produkt aus Kontroll-DNA verwendet und bei unterschiedlichen Startgradienten analysiert.

Zur Ermittlung der jeweils geeigneten Analysetemperatur für die verschiedenen Fragmente wurde die WAVEMAKER Software Version 4.1 verwendet. Sie ermittelt für jedes DNA-Fragment ein Schmelzprofil anhand dessen dann die Analysetemperatur bestimmt wird.

Die optimale Analysetemperatur wird so gewählt, dass die Homoduplex-DNA zu 99% in der nicht denaturierten, helikalen Form vorliegt, d.h. die Homoduplex-DNA gerade erst beginnt zu denaturieren. Für einige Fragmente ergeben sich aus der Schmelzkurve zwei oder mehr Analysetemperaturen. Dies ist der Fall, wenn die Steigung der Schmelzkurve mehr als 5°C Temperaturdifferenz aufweist zwischen dem Bereich, in dem die DNA zu 100% helikal und demjenigen, in dem die DNA zu 0% helikal vorliegt.

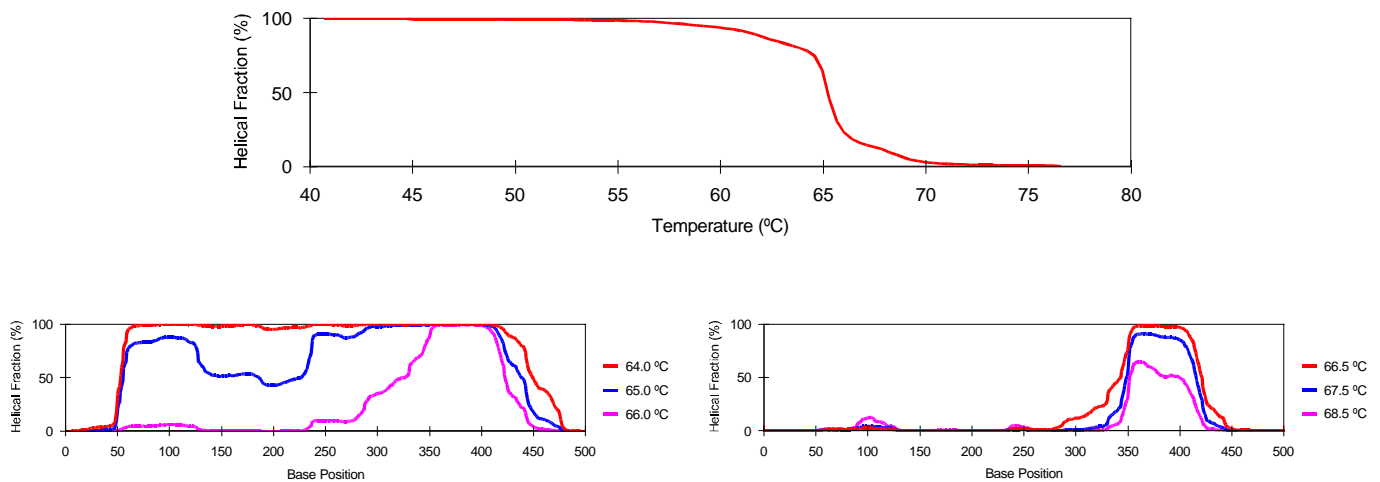


Abbildung 3: Die Analysetemperaturen werden anhand der Schmelzkurve und dem Verhalten des DNA Fragmentes so ermittelt, dass jeder Bereich des Fragmentes analysiert wird. Es handelt sich hier beispielhaft um die Schmelzkurve und die ermittelten Analysetemperaturen für den Exonabschnitt Ex1a des Pael-R Gens (2 Analysetemperaturen).

Analyse der gepoolten Patientenproben

Unter Berücksichtigung der im Vorfeld ermittelten, optimalen Bedingungen wurden die verschiedenen Exonabschnitte in einer PCR aus Patientenproben amplifiziert. Die Patientenproben wurden in 96-well Platten gefüllt, welche bis zu 95 Patientenproben und eine Negativkontrolle enthielten. Von der DNA wurden dazu in der jeweils vorliegenden Verdünnung 5µl pro PCR Ansatz eingesetzt.

Jede Platte mit Patientenproben wurde für jedes Exon amplifiziert. Für *GPR37* Exon1a-2c, für *CDCrel-1* Exon 2-12. Der Erfolg der PCR wurde für *GPR37* durch Auftragen sämtlicher PCR-Produkte auf Agarosegele, für *CDCrel-1* nur durch Auftragen von Stichproben und der Negativkontrolle überprüft. Von den PCR Produkten zweier Platten wurden dann immer 2 Proben zu gleichen Teilen (7,5 µl/Probe) in einer neuen 96-well Platte gemischt und durch Denaturieren und langsames Abkühlen mögliche Heteroduplices gebildet.

Da man beim Parkinson-Syndrom von einer multifaktoriell bedingten Erkrankung ausgehen kann (Foltynie et al.2002, Klein 2001) und es relativ unwahrscheinlich ist, dass alle verwendeten Patientenproben die gleichen Auffälligkeiten aufweisen, kann man so auch homozygote Veränderungen mit großer Wahrscheinlichkeit erkennen. Es ist also nicht nötig, jede einzelne Patientenprobe mit einer Wildtypprobe zu poolen.

Interpretation des dHPLC Chromatogramms

Grundsätzlich gilt für die Interpretation der Chromatogramme immer, dass alle Elutionsprofile eines DNA Fragmentes mit einander verglichen werden müssen. Es lässt sich das Chromatogramm einer Variante, welches im Idealfall 4 Peaks aufweist in der Regel leicht vom Chromatogramm einer Wildtypprobe mit einem Peak unterscheiden. Häufig finden sich für eine Variante jedoch nicht die oben beschriebenen 4 Peaks sondern nur 3 oder 2 Peaks.

Häufig tritt auch ein niedriger, in die Breite gezogener „Vorpeak“, eine Schulter, auf. Findet sich dieses Muster in allen Chromatogrammen dieser Messung, so kann man davon ausgehen, dass es sich um eine Verunreinigung z.B. durch Primer-Dimere oder PCR- Artefakte, und nicht um eine DNA-Variante handelt.

Treten Elutionsprofile mit 2, 3 oder 4 Peaks auf, so werden die ungepoolten Einzelproben in einem weiteren Durchlauf, nach Heteroduplexbildung noch einmal einzeln gemessen. Hiermit wird abgeklärt, ob sich in einer oder beiden Proben eine Variante findet. Hier gilt, dass für eine heterozygote Variante im Chromatogramm mehr als ein Peak auftreten wird, während für eine homozygote Probe die Retentionszeit im Vergleich mit einer Wildtyp-Einzelprobe verändert ist. Da verschiedene Elutionsprofile auf verschiedene Varianten hinweisen können, müssen unterschiedliche Chromatogramme unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden.

4.7 Sequenzierung

Die aus der dHPLC gewonnenen Ergebnisse wurden mit Hilfe der direkten, zyklischen Sequenzierung bestätigt: einige Einzelproben mit auffälligem Elutionsmuster werden sequenziert, bestätigt sich der Verdacht einer Variante, so werden alle auffälligen Proben analysiert.

Das Prinzip der zyklischen Sequenzierung ist eine Kombination aus PCR und DNA Sequenzierung nach Sanger [Sanger 1977]. Während des Sequenziervorganges wird das vorgegebene DNA-Segment amplifiziert. Da hier jedoch nur jeweils einer der beiden Primer zugegeben wird handelt es sich um eine lineare, nicht um eine exponentielle Amplifikation. Neben den 4 dNTPs, die üblicherweise für eine PCR eingesetzt werden, werden hier auch ddNTPs zugegeben. Diese sind an

unterschiedliche Flavochrome gekoppelt. Wird ein ddNTP anstelle eines dNTPs in das Amplifikat eingebaut, so kommt es zum Kettenabbruch, da die 3`Hydroxygruppe fehlt und damit keine neuen dNTPs angelagert werden können. Es entstehen auf diese Weise verschieden lange DNA Fragmente. Diese Fragmente werden nun mit Formamid denaturiert und auf ein Gel aufgetragen. Es handelt sich dabei um ein denaturierendes Sequenziergel, wodurch verhindert werden soll, dass die Einzelstränge intramolekulare Sekundärstrukturen ausbilden und damit ihre Laufeigenschaften im Spannungsfeld von anderen Faktoren abhängen, als ihrem Molekulargewicht. Abhängig von ihrer Länge wandern die DNA Fragmente mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel. Nach der Passage eines definierten Gelabschnittes werden die Fragmente durch einen Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt.

Eine Software ist in der Lage, die dabei entstehenden Lichtsignale farbstoffspezifisch und basenspezifisch zu erkennen und ein entsprechendes Intensitätsprofil zu erstellen. Die Sequenzreihenfolge kann dann aus der zeitlichen Reihenfolge errechnet werden.

Durchführung der Sequenzierung

Bevor die eigentliche Sequenzierung stattfinden kann, bedarf es einiger Schritte zur Vorbereitung der Proben. Zunächst muss von den entsprechenden Patientenproben eine weitere PCR angesetzt werden. Das gesamte PCR Produkt wird danach auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die entsprechenden Banden, welche nun ausschließlich PCR Produkt des gewünschten Abschnittes und keinerlei Verunreinigungen, wie z. B. nicht verbrauchte Primer enthalten, werden dann auf einer UV Platte mit Hilfe eines Skalpells herausgetrennt. Es folgt die Aufreinigung des PCR Produktes, mit dem Qiagen QIA-quick Gelextraktions-Kit. Hierzu werden die ausgeschnittenen Banden über Anionen-Austauschersäulen nach dem von der Firma vorgegebenen Protokoll aufgereinigt. Es wurde jedoch die DNA nicht, wie von der Firma geraten im letzten Schritt mit dem im Kit enthaltenen Elution Buffer, sondern mit HPLC-Wasser eluiert. Auf diese Weise besteht bei geringer DNA Ausbeute die Möglichkeit, die Probenmenge in der Vakuumzentrifuge durch Verdunstung von Wasser einzuengen und damit die DNA Konzentration zu erhöhen, ohne dabei den Gehalt an Salzen aus dem Puffer zu verändern. Anschließend wurde das Eluat erneut elektrophoretisch aufgetrennt und die Intensität der Banden

beurteilt. Anhand der Bandenintensität wird dann die Menge an Eluat bestimmt, welche in der Sequenzierreaktion zum Einsatz kommen soll. Um Fehler zu minimieren werden in der Regel beide komplementären DNA Stränge mit den jeweils bereits in der PCR verwendeten Primern sequenziert.

Alle weiteren benötigten Reagenzien sind bereits im DTCS Quick Start Mastermix der Firma Beckman Coulter enthalten: Er enthält die 4 dNTPS, ddNTPs mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff, eine DNA Polymerase sowie Reaktionspuffer.

Sequenzierreaktion

Der Ansatz, welcher in die Sequenzierreaktion gegeben wird setzt sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Menge
Aufgereinigtes PCR Produkt	Nach Konzentration 1,3 –2,5µl
HPLC Wasser	PCR Produkt und Wasser zusammen 5,6 µl
Primer (forward bzw. reverse)	1,4 µl
DTCS Quick Start Master Mix	3µl

Die Sequenzierreaktion läuft dann im Thermocycler nach folgendem Protokoll und 30 wiederholenden Zyklen ab:

Zeit	Temperatur	Wiederholung
1:30 min	94°C	1x
20 sec	96°C	
20 sec	57°C	30x
1min	60°C	
Unbegrenzt	4°C	

Alkoholfällung

Der Sequenzierreaktion folgt dann die Alkoholfällung. Dazu wird zunächst die Reaktion durch einen sogenannten Stop Mix abgestoppt:

Stopmix :

1 Volumenanteil 3M Na-Acetat pH 5,2

1 Volumenanteil 100mM Na²-EDTA pH8,0

Je Reaktionsansatz werden folgende Reagenzien in ein 1,5ml Eppendorfgefäß vorgelegt:

4µl Stop Mix

1µl Glycogen

10 µl Produkt aus der Sequenzierreaktion

Zusätzlich wird jedes Reaktions-Röhrchen mit je 10 µl HPLC-Wasser ausgespült, um so viel Produkt wie möglich in die Fällung zu geben. In einem ersten Fällungsschritt werden 6 Volumina 100% Ethanol zugegeben und die DNA in 30 Min bei 14000 Umdrehungen/min abzentrifugiert. Das Ethanol wird dann abgenommen, zurück bleibt ein DNA Pellet, welches dann mit 70%igem Ethanol in zwei weiteren Schritten jeweils für 15 min bei 14000 Umdrehungen/min erneut gewaschen wird. Nach jedem Schritt erfolgt das vorsichtige Abnehmen des Ethanol-Überstandes. Nun wird das Pellet in einer Vakuumzentrifuge bei 30°C und geöffnetem Eppendorf –Gefäß für 12 min getrocknet um sämtliche Ethanolreste zu entfernen, bevor es in 40µl Sample Loading Solution (SLS) der Firma Beckman Coulter (im DTCS Quick Start Kit enthalten) resuspendiert wird.

Kapillarelektrophorese

Die Sample Loading Solution enthält Formamid, welches mit DNA Wasserstoffbrücken ausbildet und die Bildung inter- oder intramolekularer Basenpaare verhindert. Die gelöste DNA wird dann nach Anleitung des Herstellers auf die Probenplatte pipettiert und mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt, um ein Verdunsten der Probe zu verhindern. Eine Pufferplatte wird mit fertigem Sequenzierpuffer bestückt und der Polyamidgelvorrat im Gerät überprüft. Bei jedem Messvorgang des Sequenziergerätes können über acht Kapillaren acht Proben gleichzeitig analysiert werden. Das Polyacrylamidgel in den Kapillaren wird nach jedem Messdurchgang erneuert. Es enthält Harnstoff als denaturierenden Faktor.

Der technische Ablauf erfolgt in 3 Schritten: Im ersten Schritt findet die Injektion der Proben bei einer Spannung von 2 kV statt, dieser Vorgang dauert etwa 15 Minuten. Nun erfolgt die Denaturierung der Proben für 120 Sekunden, wozu die Temperatur in den Kapillaren kurzfristig auf 90°C erhöht wird. Sie sinkt dann wieder auf 50°C ab. Im letzten Schritt werden die DNA Fragmente bei 4,2 kV in 85 Minuten aufgetrennt. Zur Auswertung der Ergebnisse mit der Analysesoftware (Version 5 der Firma Beckman Coulter) werden die Sequenzen der beiden Stränge, die sich aus der Sequenzierung mit den beiden entgegengesetzten Primern ergeben haben miteinander und mit einer vorgegebenen Referenzsequenz verglichen.

4.8 Pyrosequenzierung

Da es sich bei der Echtzeit Pyrophosphat–DNA–Sequenzierung um ein sehr schnelles und zuverlässiges Verfahren handelt, das bei bekannten Polymorphismen in kurzer Zeit eine große Probenmenge analysieren kann, eignet es sich besonders gut zur Erfassung von Kontrollkollektiven oder zur Bestimmung der Häufigkeit einer Veränderung in einem Patientenkollektiv.

Prinzip der Echtzeit Pyrophosphat–DNA–Sequenzierung

Das Prinzip dieses Verfahrens wurde aus Arbeiten von Nyren und Lundin (1985) und Ronaghi et al. (1996 und 1998) abgeleitet. Es dient der Sequenzierung kurzer DNA–Abschnitte noch während diese synthetisiert wird. Es beruht darauf, dass während der DNA Synthese Pyrophosphat freigesetzt wird welches dann indirekt luminometrisch gemessen werden kann.

Man macht sich hierzu eine Enzymkaskade zunutze: In die Reaktion werden ein Enzym–Puffer–Gemisch, welches unter anderem auch eine Klenow DNA–Polymerase enthält und, nach einem festgelegten Schema dNTPs schrittweise zugegeben. Wird ein Nukleotid durch die Polymerase eingebaut, so entsteht Pyrophosphat, welches dann seinerseits mit Adenosin-5`-Phosphosulfat unter Einfluß von Sulfurylase zu ATP reagiert. Das Lichtsignal entsteht dann in einem weiteren Schritt, in welchem ATP, katalysiert durch Luciferase, mit Luciferin zu Oxyluciferin (und damit sichtbarem Licht) reagiert.

Um einer Verfälschung der Reaktion durch das Nukleotid dATP vorzubeugen wird an seiner Stelle als Nukleotidanalogen dATPaS eingesetzt. Vor jeder neuen Nukleotidzugabe werden überschüssige Nukleotide aus der vorangegangenen Reaktion durch eine Apyrase degradiert. Für jedes eingebaute Nukleotid kann das entstandene Lichtsignal unter Berücksichtigung seiner Intensität durch eine Charge Couple Device (CCD) Kamera detektiert und mit der entsprechenden Software als Pyrogramm dargestellt werden.

Bevor die Proben jedoch in die eigentliche Pyroreaktion gegeben werden können bedarf es vorbereitender Schritte: Zunächst muß selektiv ein DNA–Einzelstrang für die folgende Analyse isoliert werden.

Dazu macht man sich die hohe Bindungsaffinität des Biotins zu Streptavidin zunutze. Es wird in eine herkömmliche Polymerase Ketten Reaktion einer der Primer mit einer 5` Biotin Markierung zugegeben, so dass einer der amplifizierten Stränge biotinyliert vorliegt. Diese werden in einem weiteren Schritt an mit Streptavidin gekoppelte Sepharose-Beads gebunden und unter Hitzeeinwirkung und Schütteln in einem Thermocycler immobilisiert. Es folgt eine Strangaufftrennung durch Denaturierung in Natronlauge. Die nicht biotinylierten Einzelstränge lösen sich von den Beads. Über eine Vakuumpumpe werden die Beads auf einem Filter aus Zellulose festgehalten, da sie zu groß sind um den Filter zu passieren, während die nicht gebundenen Einzelstränge und andere PCR Bestandteile wie z.B die Primer in den folgenden Waschschritten herausgewaschen werden können. Der Transfer der Streptavidin Sepharose Beads mit den daran gebundenen Einzelsträngen wird mit Hilfe von 96 zylindrischen Zellulosefiltern, welche an eine Vakuumpumpe angeschlossen sind bewerkstelligt.

Nach Immobilisierung, Denaturierung und Neutralisation des biotinylierten DNA Stranges folgt bei 80°C die Hybridisierung eines Sequenzierprimers, der so gewählt wurde, dass sein 3` Ende kurz vor der zu analysierenden, polymorphen Sequenz am Einzelstrang bindet. Im PSQ Pyrosequenzierer findet dann die eigentliche Pyrosequenzierreaktion wie oben beschrieben statt.

4.9 Statistische Methoden

Zu Beginn jeder wissenschaftlichen Arbeit wird eine Arbeitshypothese formuliert, über deren Gültigkeit bzw. Ablehnung dann nach Vorliegen sämtlicher Arbeitsergebnisse entschieden werden muss.

Um dies möglichst objektiv beurteilen zu können werden hier standardisierte statistische Tests eingesetzt. Sie vergleichen erwartete Ergebnisse mit den erhaltenen Arbeitsergebnissen und entscheiden so darüber, ob eine Arbeitshypothese angenommen oder verworfen wird.

Als Arbeitshypothese wird in der Regel die Nullhypothese gewählt, welche in unserem Fall besagt, dass Patienten und Kontrollpersonen sich hinsichtlich der getesteten Merkmale genotypisch nicht unterscheiden. Da prinzipiell die Möglichkeit besteht, dass die Arbeitshypothese für belegt angesehen wird, obwohl sie in der

Realität zu verwerfen gewesen wäre, oder umgekehrt, da die Stichprobe zufällig kein realitätsgetreues Bild liefert und damit keine Rückschlüsse auf die Gesamtpopulation zulässt, muss das Ergebnis zusätzlich auf diese Fehlermöglichkeiten überprüft werden. Man unterscheidet hier den Fehler 1. Art, welcher besagt, dass die Entscheidung für die Arbeitshypothese in der Realität richtig gewesen wäre, obwohl die Alternativhypothese gewählt wurde, vom Fehler 2. Art. Beim Fehler 2. Art handelt es sich um den Fehler, bei der Nullhypothese zu bleiben, obwohl hier die Alternativhypothese zugetroffen hätte. Nun können nicht beide Fehlerwahrscheinlichkeiten gleichzeitig überprüft werden. Man wählt deshalb eine obere Grenze α für die Wahrscheinlichkeit des Fehlers 1. Art. Dabei ist α beliebig zu wählen, wird jedoch in der Regel auf 0,05 festgelegt. Ein α – Wert von 0,05 bedeutet, dass es in 5% der Fälle zu einer Ablehnung der Nullhypothese kommt, obwohl diese in der Realität korrekt wäre. Es kann nach Durchführung eines Testes nur dann von einem signifikanten Ergebnis gesprochen werden, wenn zuvor ein α – Wert festgelegt wurde. Statistikprogramme berechnen häufig zusätzlich den p – Wert. Ist der p – Wert kleiner als der α – Wert, so handelt es sich um ein signifikantes Ergebnis. Die Nullhypothese wird in diesem Fall verworfen.

Genotypische Homogenität und Genotypenverteilung in den Kollektiven - Hardy Weinberg Test –

Mit Hilfe des Hardy Weinberg Testes nach Haldane (1954), Weir (1990) Guo und Thompson (1992) soll für alle gefundenen Varianten geprüft werden, ob die Genotypenverteilung bezüglich dieses Locus innerhalb der Kollektive einer Hardy Weinberg Verteilung genügt.

Dieser Test gibt Auskunft darüber, ob die Genotypenverteilung in einer Population zufällig ist, was der Nullhypothese entsprechen würde oder ob sie durch gerichtete Einflüsse auf die genetische Struktur des Locus zustande kommen. Er ermöglicht einen Vergleich von Patienten und Kontrollgruppen hinsichtlich ihrer Homogenität für alle Loci, an denen exonische Varianten gefunden wurden. Erhält man mit dem Hardy Weinberg Test ein signifikantes Ergebnis, so kann man von einem Zusammenhang zwischen der Variante und einer Phänotypischen Ausprägung, in unserem Fall der Parkinsonschen Krankheit ausgehen.

Zur Durchführung des Tests wurden die Daten in eine Kontingenztafel eingetragen. Ausgehend von den Randsummen dieser Tafel wurde dann die Wahrscheinlichkeit für diese Tafel berechnet. Die grafische Darstellung wurde mittels eines Mosaik-Plots durchgeführt. Zur Überprüfung der Gültigkeit des Hardy Weinberg Gleichgewichtes wurde hier der Chi Quadrat Test mit $\alpha=0,05$ gewählt. Aus entsprechenden Tabellen konnte nun derjenige Wert bestimmt werden, für den das Hardy Weinberg Gleichgewicht Gültigkeit besitzt.

Mit Hilfe des Chi Quadrat Testes wurden dann die Ergebnisse aus dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv hinsichtlich der gefundenen Haplotypen miteinander verglichen und die Signifikanz dieses Ergebnisses überprüft. Für die Durchführung der statistischen Tests wurde als Software JMP Version 6 von SAS Software eingesetzt.

Allelische Assoziation in den beiden Stichprobengruppen

In manchen Fällen hat nicht eine einzige Variante Auswirkungen auf den Phänotyp, in unserem Fall die Funktion eines Proteins, sondern erst die Summe genotypischer Veränderungen führt zu einer Ausprägung im Phänotyp und spielt damit eine Rolle bei der Entstehung einer Erkrankung.

Um dies zu überprüfen macht es Sinn, beide Kollektive im Bezug auf allelische Assoziationen hinsichtlich der gefundenen Veränderungen zu testen. Hierzu wurden die gefundenen Varianten, die auf einem Gen lokalisiert sind und für beide Kollektive untersucht wurden, herangezogen. Es wurde die genotypische Assoziation anhand folgenden Verfahrens untersucht: Für die Analyse des allelischen Koppelungsgleichgewichtes wurden die Haplotypen in beiden Kollektiven ausgezählt und ihre Häufigkeiten miteinander verglichen. Hierzu wird nach erfolgter Auszählung eine Kontingenztafel erstellt und ein Chi Quadrat Test durchgeführt. Unter Haplotyp versteht man die Allele miteinander gekoppelter Loci, welche sich auf einem Chromosom befinden. Da jeweils ein väterliches und ein mütterliches Chromosom vorliegen liegen auch zwei verschiedenen Allele (ein mütterliche, ein väterliches) vor. Bei mehreren Loci lassen sich jedoch nur für diejenigen Probanden die Haplotypen bestimmen, die für maximal einen Locus heterozygot sind. Ein Rückschluss auf die einzelnen Allele ist bei mehreren heterozygoten Loci nicht möglich.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse für das *CDCrel*-Gen

5.1.1 Optimierung der PCR

Damit eine Mutationsanalyse mittels dHPLC überhaupt möglich wurde, mussten zunächst die optimalen Bedingungen für die Durchführung der PCR für alle Exons beziehungsweise Exonabschnitte beider Gene ermittelt werden. Es wurde dazu für jedes Primerpaar die Annealingtemperatur in einer Gradienten-PCR ermittelt.

Es wurde diejenige Temperatur als Annealingtemperatur gewählt, bei der sich nach Auftragen auf ein Agarosegel die deutlichste Bande abzeichnete. Um den Ablauf dieses Verfahrens zu verdeutlichen, sei hier beispielhaft die Optimierung der PCR von Exon 11 des *CDCrel*-1 Genes aufgeführt. Es wurden hier mit Kontroll-DNA 7 Ansätze aus demselben Mastermix hergestellt, die dann im Gradientencycler mit dem Gradienten 50-70°C amplifiziert wurden.

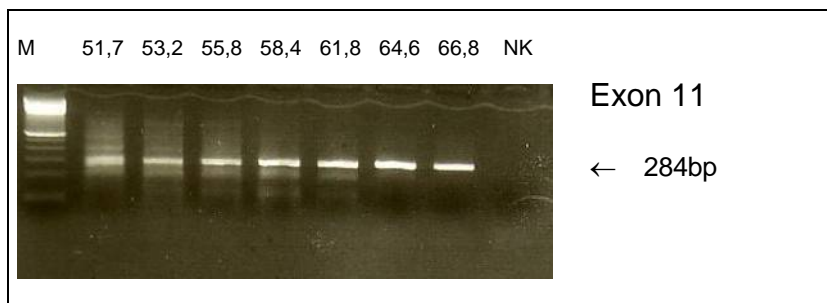
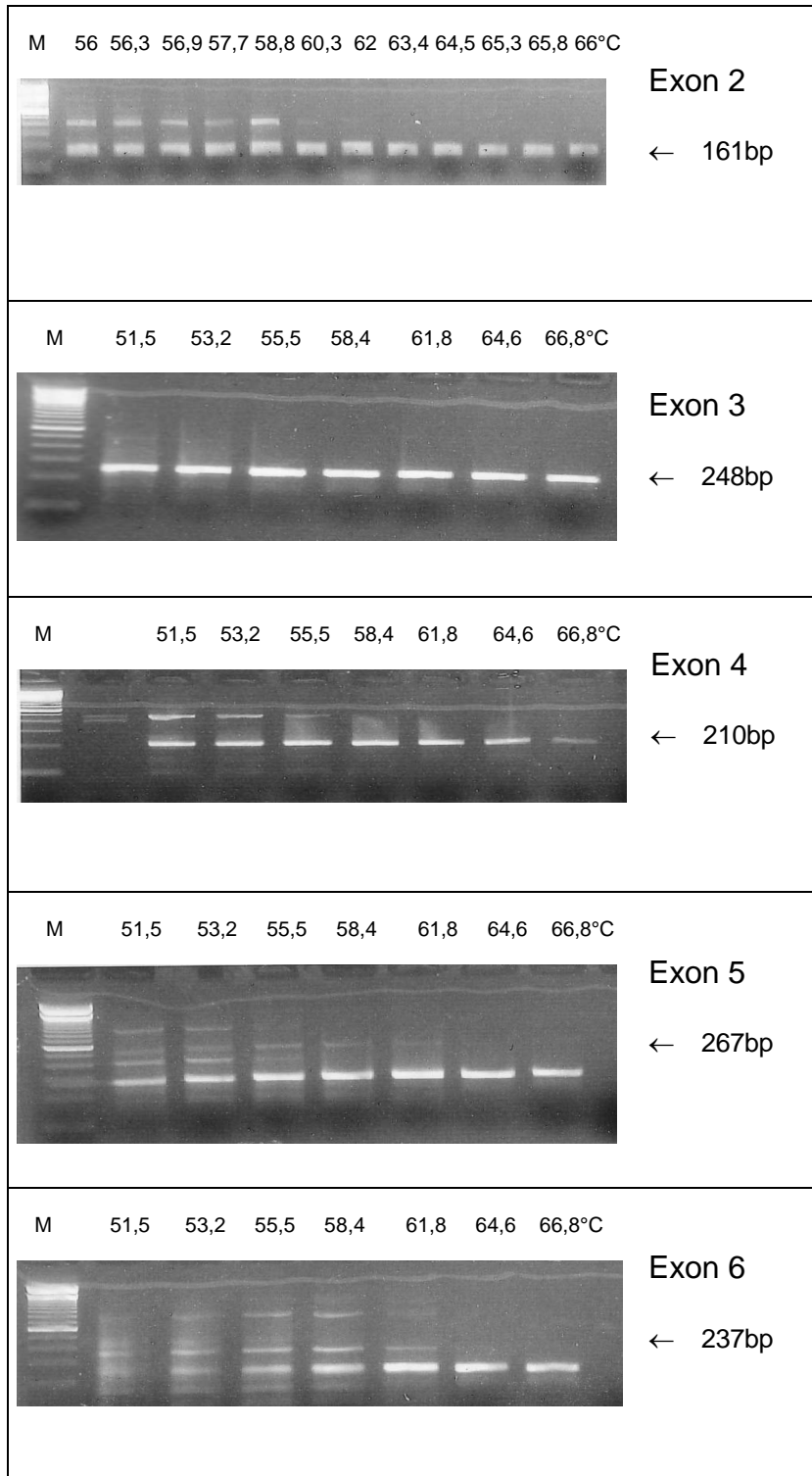


Abbildung 4: Gelbild der Gradienten PCR für Exon 11 nach elektrophoretischer Auftrennung. Über jeder Bande ist die Annealingtemperatur, die zur Amplifikation benutzt wurde angegeben. Die erwartete Länge des Produktes beträgt 284 bp; bei der mit NK bezeichneten Bande handelt es sich um die Negativkontrolle. Als Annealingtemperatur wurden für Exon 11 (*CDCrel*-1) schließlich 65°C gewählt.

Auf diese Weise wurde für sämtliche verwendeten Primerpaare die beste Annealingtemperatur ermittelt. Der Einsatz weiterer Veränderungen oder Reagenzien wie im Methodenteil kurz beschrieben, war für keines der Primerpaare nötig.

5.1.2 Ermittlung der PCR Bedingungen für die einzelnen Primerpaare



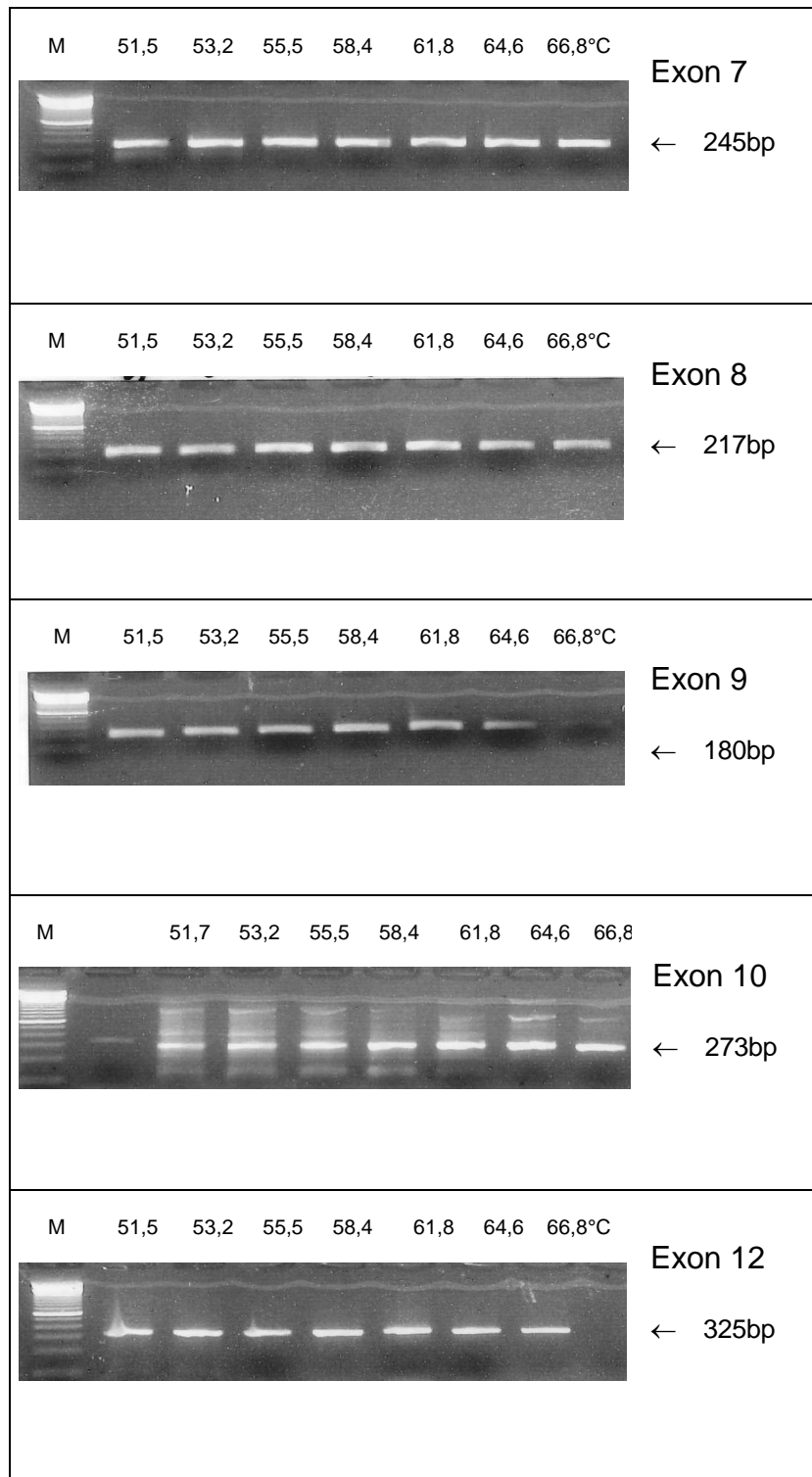


Abbildung 5: Gelbild der Gradienten PCR für Exon 2 bis 12 von CDCrel-1 nach elektrophoretischer Auftrennung. Über jeder Bande ist die Annealingtemperatur, die zur Amplifikation benutzt wurde angegeben. Exon 11 wurde oben bereits beispielhaft angegeben.

Die Amplifikation von Exon 10 wurde aufgrund der Doppelbanden bei 66°C mit und ohne Q-Solution wiederholt. Hier fanden sich auch ohne die Zugabe von Q-Solution eindeutige Banden bei 273bp, so dass von einer Verunreinigung der PCR im ersten Versuch ausgegangen werden konnte. In der Folge konnten sämtliche

Amplifikationen von Exon 10 bei 66°C ohne Zusatz weiterer Reagenzien problemlos durchgeführt werden.

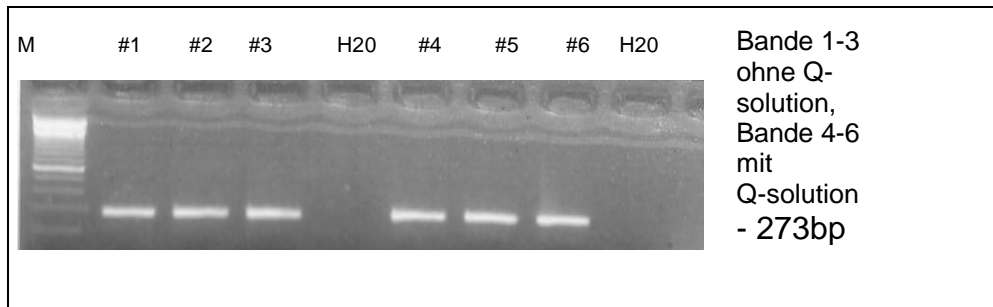


Abbildung 6: Gelbild der Amplifikation von Exon 10 des CDCrel-1 Gens mit und ohne Q-Solution

Für alle Primerpaare galten außerdem folgende PCR Bedingungen: einmalig zu Beginn für 3 min bei 95°C Denaturierung, dann über 30 Zyklen je 30 sec. Denaturieren bei 95°C, 30 sec. Annealingtemperatur und 30 sec. Extension bei 72°C. Am Ende der PCR eine einmalige Extension über 5 min bei 72 °C.

Tabelle 5: Primer zur Amplifikation der Exone von CDCrel-1 und die ermittelte optimale Annealingtemperatur.

Exonabschnitt	Produktlänge	Primer	Primersequenz 5`- 3`	Annealingtemperatur
Exon2	161	2294 2295	CTCACCGTGTCTCTCCGTCT TGTCACAATGGGTGACAGC	64°C
Exon3	248 bp	2212 2213	GACAGGGTATTGGGCTTCTG AAGGAGCTGCGTTAGGTCTG	58°C
Exon4	210 bp	2214 2215	GTTGGAGCCCCAGACCTAAC TGAAAGGGAGTCCTTGGAGA	58°C
Exon5	267 bp	2216 2217	CCAAGATGGATGAGGACGAG AGGCCTCGAGTGCTGTGG	64°C
Exon6	237 bp	2218 2219	CTAGGCGGCCACAGCACT CCATATTGTAGGGGCTGCAC	65 °C
Exon7	245 bp	2220 2221	GGAGTGCAGCCCCTACAATA GTCCCCCTGGTACTCTCAGC	64°C
Exon8	217 bp	2222 2223	GGACTTGTCTGGCCTCAAATC AGGAGACAAAGCCCTCTGGT	58°C
Exon9	190 bp	2224 2225	TAACCGTGCAATTACGCTCA CCTTCCCCCACCAGACCT	58°C
Exon10	273 bp	2226 2227	CAGGTCTGGTGGGGGAAG GGACCGGCCCTCAGTTAT	66°C
Exon11	284 bp	2228 2229	ACCAAGTCCAGGGCTGTGAG GGAGGAGCATCCCTGACG	65°C
Exon12	325 bp	2230 2231	GCGTCAGGGATGCTCCTC GATCCCCCAAGGTCAGAGAG	58°C

Eine Amplifikation von Exon 1 gelang trotz verschiedenster Ansätze (Q-Solution, Formamid, Touchdown-PCR, verschiedene Polymerasen) nicht. Neben einem sehr hohen CG- Gehalt dieses Exons ergab die Sequenzierung erschwerend noch einen Längenpolymorphismus im Intron 1.

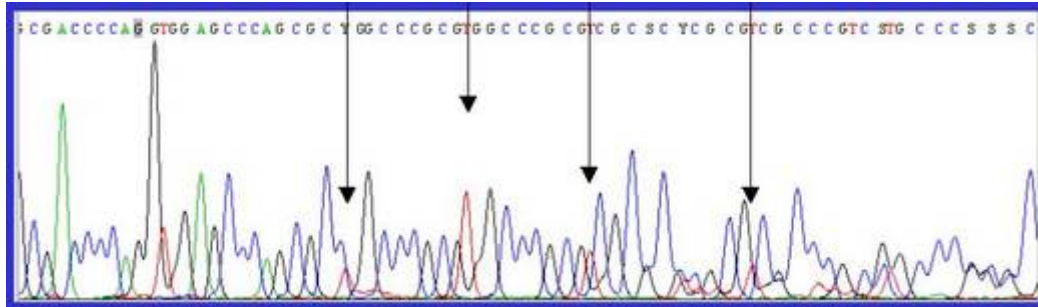


Abbildung 7: Längenpolymorphismus Intron 1 von CDCrel-1. Die Pfeile markieren den Beginn der Sequenzverschiebungen.

Dieser wurde mittels Polyacrylamidgelelektrophorese exemplarisch in 3 von 6 untersuchten Proben bestätigt.

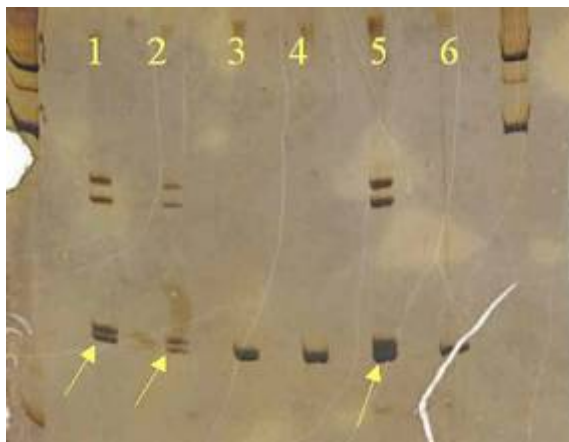


Abbildung 8: PAA-Gel mit Längenpolymorphismus in Banden 1,2 und 5.

Daher wurde Exon 1 für die nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen.

5.1.3 Optimierung der dHPLC Bedingungen für das *CDCrel-1* Gen

Die optimalen Bedingungen für die dHPLC Analyse der amplifizierten Fragmente bezüglich ihrer jeweiligen Analysetemperatur und der Pufferzusammensetzung während der verschiedenen Analyseschritte wurden mit Hilfe von PCR Amplifikaten aus CEPH-DNA ermittelt.

Tabelle 6: dHPLC Bedingungen für *CDCrel*

PCR Fragment	Zeit in min										Analysetemperatur
	Laden		Gradient				Waschen		Equilibrieren		
	0,0		0,1		2,1		2,2		2,4		
	%A	%B	%A	%B	%A	%B	%A	%B	%A	%B	
2	50	50	47	53	37	63	50	50	50	50	67,5°C
3	48	52	45	55	35	65	48	52	48	52	62,9°C
4	49	51	46	54	36	64	49	51	49	51	62,5°C
5	45	55	42	58	32	68	45	55	45	55	62,9°C
6	46	54	43	57	33	67	46	54	46	54	62,4°C
7	46	54	43	57	33	67	46	54	46	54	63,6°C
8	47	53	44	56	34	66	47	53	47	53	61,5°C
9	46	54	43	57	33	67	46	54	46	54	63,6°C
10	47	53	44	56	34	66	47	53	47	53	65,8°C
11	46	54	43	57	33	67	46	54	46	54	61,8°C
11	46	54	43	57	33	67	46	54	46	54	66,0°C
12	45	55	42	58	32	68	45	55	45	55	62,8°C

5.1.4 Mutationsanalyse des *CDCrel-1*-Gens

Bei der Analyse der PCR – Fragmente von *CDCrel-1* ergaben sich für Exon 2,3,4,7,8,9,10,11 und 12 für alle Proben unauffällige Elutionsprofile. Exemplarisch finden sich einige unauffällige Elutionsmuster in Tabelle 5. Obwohl für Exon 5 einige Proben in den Einzelläufen deutliche Auffälligkeiten zeigten und daraufhin sequenziert wurden, konnte für diese Proben keine Sequenzvariante nachgewiesen werden. In Exon 7 fand sich eine auffällige Probe, deren Sequenzierung das Vorliegen einer stummen Variante bestätigte. Es handelt sich hierbei um einen Basenaustausch von C nach T an Position c.6140, welcher keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge hat (p.I82I, Isoleucin).

Nachfolgend werden in Tabellen 7-9 nacheinander die unauffälligen Elutionsprofile, die auffälligen Elutionsprofile sowie die Einzelmessungen gezeigt

Tabelle 7: dHPLC-Elutionsprofile unauffälliger Patientenproben von CDCrel

PCR-Fragment	dHPLC-Analysetemperatur	Elutionsprofile
2	60,0°C	
3	62,9°C	
4	62,5°C	
5	62,9°C	

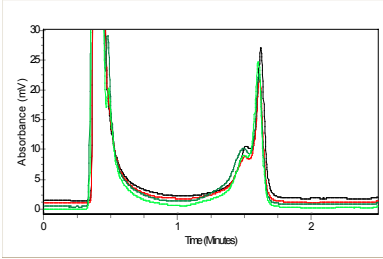
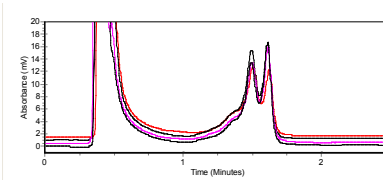
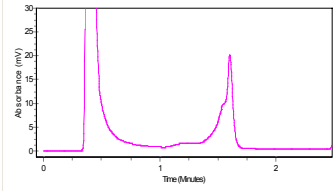
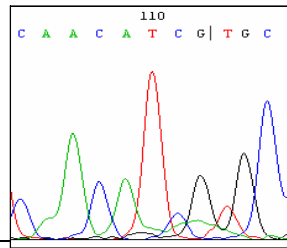
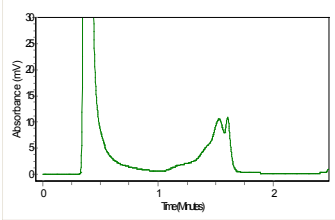
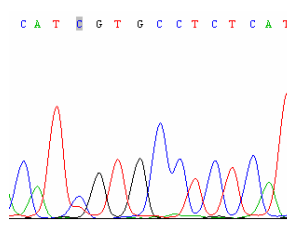
6	62,4°C	<p>Chromatogram showing Absorbance (mV) vs Time (Minutes) for 62,4°C. The y-axis ranges from 0 to 30 mV, and the x-axis ranges from 0 to 2 minutes. There are two main peaks: a large peak at approximately 0.4 minutes and a smaller peak at approximately 1.8 minutes. The legend includes: PA0234, PA0326 (green); PA0235, PA0336 (black); PA0270, PA0355 (magenta); PA0272, PA0356 (red).</p>
7	63,3°C	<p>Chromatogram showing Absorbance (mV) vs Time (Minutes) for 63,3°C. The y-axis ranges from 0 to 30 mV, and the x-axis ranges from 0 to 2 minutes. There are two main peaks: a large peak at approximately 0.4 minutes and a smaller peak at approximately 1.8 minutes. The legend includes: PA0234, PA0326 (green); PA0235, PA0336 (black); PA0270, PA0355 (magenta); PA0272, PA0356 (red).</p>
8	61,5°C	<p>Chromatogram showing Absorbance (mV) vs Time (Minutes) for 61,5°C. The y-axis ranges from 0 to 30 mV, and the x-axis ranges from 0 to 2 minutes. There are two main peaks: a large peak at approximately 0.4 minutes and a smaller peak at approximately 1.8 minutes. The legend includes: PA0001, PA0303 (black); PA0003, PA0304 (green); PA0138, PA0539 (magenta); PA0279, PA0359 (red).</p>
9	64,8°C	<p>Chromatogram showing Absorbance (mV) vs Time (Minutes) for 64,8°C. The y-axis ranges from 0 to 30 mV, and the x-axis ranges from 0 to 2 minutes. There are two main peaks: a large peak at approximately 0.4 minutes and a smaller peak at approximately 1.8 minutes. The legend includes: PA0242, PA0341 (black); PA0270, PA0355 (magenta); PA0279, PA0359 (red).</p>
10	65,8°C	<p>Chromatogram showing Absorbance (mV) vs Time (Minutes) for 65,8°C. The y-axis ranges from 0 to 30 mV, and the x-axis ranges from 0 to 2 minutes. There are two main peaks: a large peak at approximately 0.4 minutes and a smaller peak at approximately 1.8 minutes. The legend includes: PA1131, PA1195 (black); PA1128, PA1191 (green); PA1122, PA1186 (magenta).</p>
11	61,8°C	<p>Chromatogram showing Absorbance (mV) vs Time (Minutes) for 61,8°C. The y-axis ranges from 0 to 30 mV, and the x-axis ranges from 0 to 2 minutes. There are two main peaks: a large peak at approximately 0.4 minutes and a smaller peak at approximately 1.8 minutes. The legend includes: PA0057, PA0161 (black); PA0060, PA0167 (red); PA0075, PA0181 (magenta).</p>

11	66,0°C	
12	62,8°C	

Tabelle 8: Auffällige Elutionsmuster der PCR Fragmente Ex5 und Ex7 des CDCrel-Gens.

PCR – Fragme nt	dHPLC-Analyse- temperatur	Elutionsprofile
Ex 5	62,9°C	
Ex7	63,3°C	

Tabelle 9: Einzelläufe der im gepoolten Zustand auffälligen Proben.

PCR – Fragment Ex 5, Messung bei 62,9°C	Elutionsmuster	Sequenzierung
Unauffälliges Elutionsmuster		
Auffälliges Elutionsmuster		<p>Bei der Sequenzierung konnte kein Hinweis auf eine kodierende Sequenzvariante gefunden werden. Es wurden 2 von 3 auffälligen Proben sequenziert.</p>
PCR – Fragment Ex 7, Messung bei 63,3°C	Elutionsmuster	Sequenzierung
Unauffälliges Elutionsmuster		
Auffälliges Elutionsmuster		

5.1.5 Auswertung der Ergebnisse für *CDCrel-1*

Im *CDCrel-1* Gen fanden sich in 315 Proben bei der Untersuchung der Exone 2-12 bis auf eine stumme Variante (0,31%) in Exon 7 (c.6140C>T) für die Aminosäure Isoleucin keine weiteren Auffälligkeiten, weswegen hier keine weiteren statistischen Untersuchungen stattfanden. Auch auf einen Vergleich mit einer Kontrollgruppe wurde verzichtet. Exon 1 wurde bisher noch nicht analysiert. Es bestanden hier

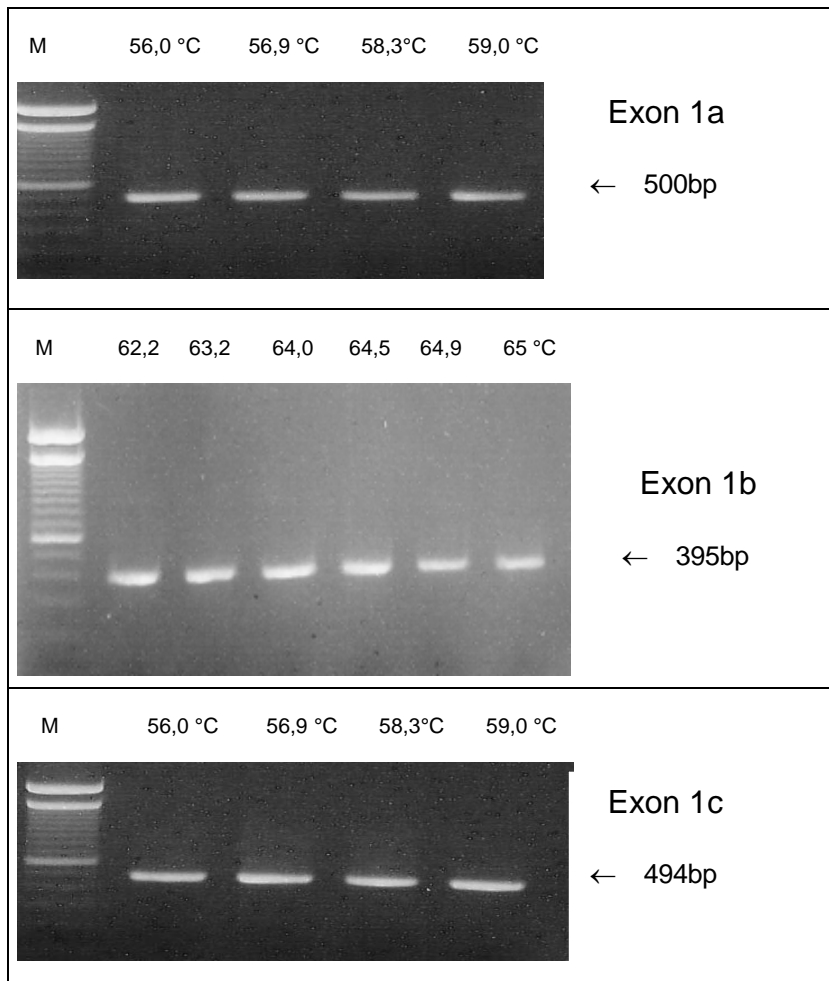
wegen des sehr hohen GC-Gehalts (62 Prozent) erhebliche Schwierigkeiten in der Wahl der Primer und der Optimierung der PCR, welche nicht überwunden werden konnten. Während des Versuchs die Methoden für Exon 1 zu etablieren fand sich im Intron 1-Bereich in einigen Proben ein Längenpolymorphismus direkt im Anschluß an den kodierenden Bereich, welcher die Methodenetablierung zusätzlich erschwerte. Dieser Bereich wird daher Gegenstand einer anderen Arbeit.

5.2 Ergebnisse für das *Pael-R*-Gen

5.2.1 PCR- Optimierung für *Pael-R*-Gen

Auch für das *Pael-R* Gen mussten zunächst die optimalen Bedingungen zur Durchführung der PCR für alle Exonabschnitte ermittelt werden. Wie bereits im Materialteil erwähnt, wurden die beiden Exone des *Pael-R* Gens aufgrund ihrer Größe und der Sensitivität der dHPLC auf maximal 300 Basenpaare in jeweils 3 Teilabschnitten (1a-c und 2a-c) amplifiziert und untersucht.

Auch hier wurde im Gradientencycler die optimale Annealingtemperatur für jedes Primerpaar ermittelt. Die Zugabe weiterer Reagenzien war zur Optimierung der PCR nicht nötig.



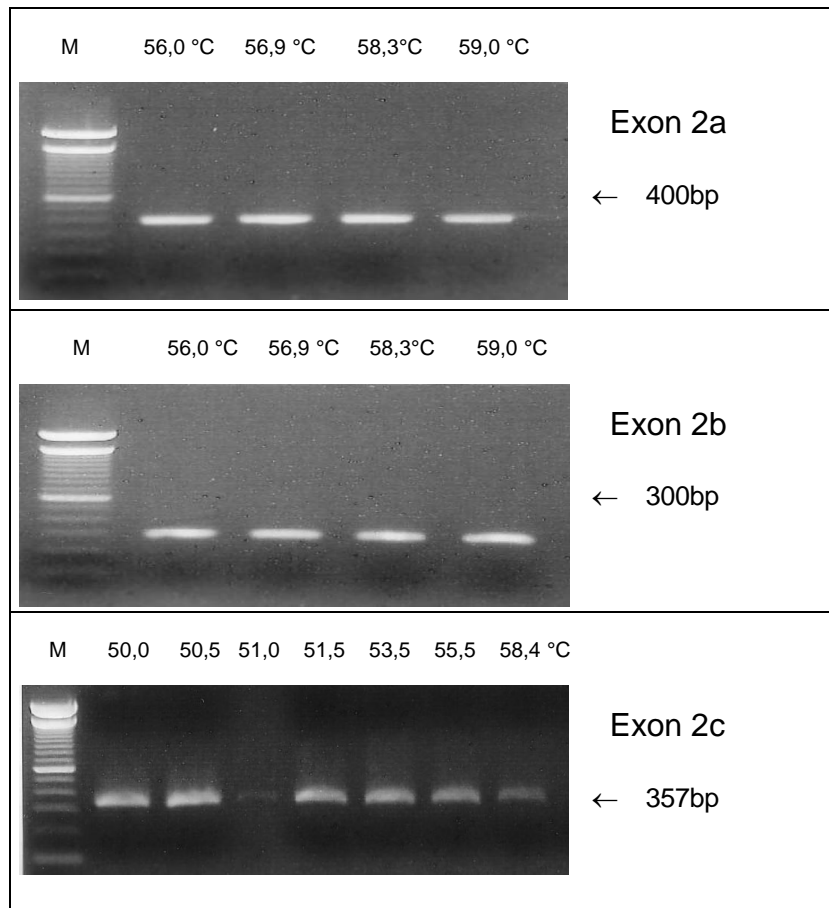


Abbildung 9: Gelbilder der Gradienten PCR für die beiden Exone von Pael-R nach elektrophoretischer Auftrennung. Über jeder Bande ist die jeweilige Annealingtemperatur, die zur Amplifikation benutzt wurde angegeben. Die gewählten Temperaturen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 10: Primer zur Amplifikation der Exone von Pael-R und die ermittelte optimale Annealingtemperatur

Exon- abschnitt	Produktlänge	Primer	Primersequenz	Annealing- temperatur
Exon1a	500 bp	1886_Ex1aF 1887_Ex1aR	TGCCTAACTCTCAGCAGCAA TTCCCTCTCCCCAAAGTTTC	57° C
Exon1b	395 bp	1888_Ex1bF 1889_Ex1bR	GGACCCTCCTGGGACCTG AGTGCAATTGTCCACCCTTC	63°C
Exon1c	494 bp	1890_Ex1cF 1891_Ex1cR	AAGGAGAGCCGGGAAACTC AGCCCCTGGAAGGCATTA	55°C
Exon2a	400 bp	1892_Ex2aF 1893_Ex2aR	GGGACACCGGGAATAAATGT AGCAGGTGATGGTGAAAAGC	57°C
Exon2b	300 bp	1894_Ex2bF 1895_Ex2bR	TTGGCTGTTACTTTTGTTC CTGGGGTGACACAGGACTTA	57°C
Exon2c	357 bp	1935_Ex2c_NF 1936_Ex2c_NR	GGGGTTTCACAGCAGACAAT GAAAAATATGAATTA AAAACTTTC	55°C

Für alle Primerpaare galten außerdem folgende PCR Bedingungen: einmalig zu Beginn für 3 min bei 95°C Denaturierung, dann über 30 Zyklen je 30 sec.

Denaturieren bei 95°C, 30 sec. Annealingtemperatur und 30 sec. Extension bei 72°C.
Am Ende der PCR eine einmalige Extension über 5 min bei 72 °C.

5.2.2 Nested PCR für *Pael-R*

Um genomische DNA zu sparen wurde aus dem PCR - Produkt sämtlicher Proben die mit Exon 2a amplifiziert worden waren später zur Analyse der Positionen c.1047 (SNP1) und c.1329 (SNP2) im Pyrosequenzierer eine sogenannte „Nested PCR“ hergestellt. Hierfür wurde 1µl PCR Produkt eingesetzt.

Es wurden Primer gewählt, welche auf dem bereits amplifizierten Exonabschnitt lagen und den jeweiligen Single Nukleotide Polymorphismus (SNP) mit einschlossen. Für diese Primer wurden folgende PCR Bedingungen ermittelt:

Tabelle 11: Ermittelte Annealingtemperaturen für die zur Pyrosequenzierung benötigten Primer

Exonabschnitt	Produktlänge	Primer	Primersequenz 5` - 3`	Annealingtemperatur
Ex2a (SNP1)	159 bp	2416_Ex2a1F 2401_Ex2a1R	BiotinGGACACCGGGAATAAATGTC TGGCAGTTGTTGAGGAACAG	56°C
Ex2a (SNP2)	141bp	2402_Ex2a2F 2417_Ex2a2R	CGGCAGAAAGGTGCATTATT BiotinAGCAGGTGATGGTGAAAAGC	57°C

5.2.3 DHPLC-Analyse für *Pael-R*

Analog zu der Vorgehensweise bei CDCrel wurden die optimalen Bedingungen für die dHPLC Analyse der amplifizierten Fragmente bezüglich ihrer jeweiligen Analysetemperatur und der Pufferzusammensetzung während der verschiedenen Analyseschritte mit Hilfe von PCR Amplifikaten aus CEPH-DNA ermittelt.

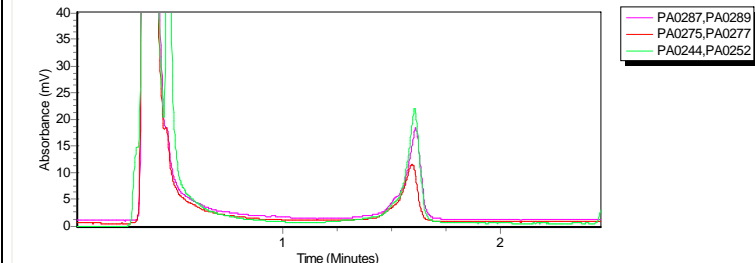
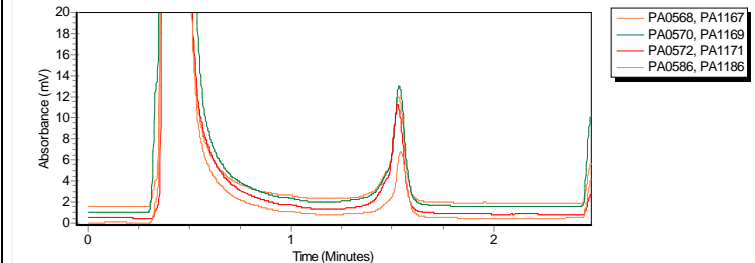
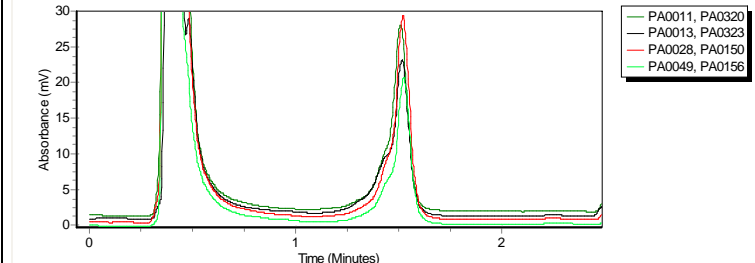
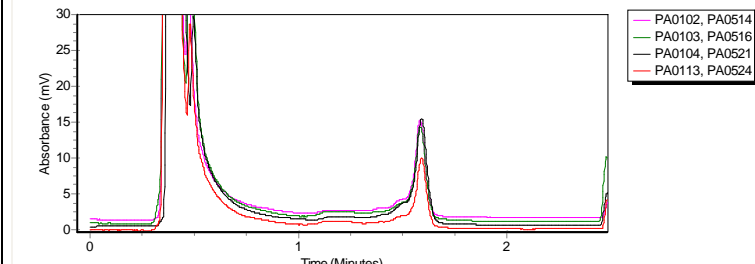
Tabelle 12: Optimierung der dHPLC Bedingungen für *Pael-R*

Exon – Abschnitt	Zeit in min										Analysetemperatur
	Laden		Gradient				Waschen		Equilibrieren		
	0,0		0,1	2,1	2,2	2,4	%A	%B	%A	%B	
1a	41	59	38	62	28	72	41	59	41	59	64,0°C
1a	42	58	39	61	29	71	42	58	42	58	66,5°C
1b	42	58	39	61	29	71	42	58	42	58	62,8°C
1c	40	60	37	63	27	73	40	60	40	60	61,5°C
2a	41	59	38	62	34	66	41	59	41	59	57,0°C
2b	46	54	43	57	39	61	46	54	46	54	59,3°C
2b	45	55	42	58	38	62	45	55	45	55	59,5°C
2c	50	50	47	53	37	63	50	50	50	50	62,8°C

5.2.4 Mutationsanalyse des *PAEL-R* Gens

In Exonabschnitt 1a bei der Messung mit 64°C, 1b, 1c, 2b und 2c fanden sich für alle 333 Proben einheitliche, einem DNA-Homoduplex entsprechende Elutionsprofile, welche in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 13: dHPLC-Elutionsprofile unauffälliger Patientenproben von *PAEL-R*

Exonabschnitt	dHPLC-Analyse-temperatur	Elutionsprofile
1a	64,0°C	
1b	62,8°C	
1c	61,5°C	
2b	57,0°C	

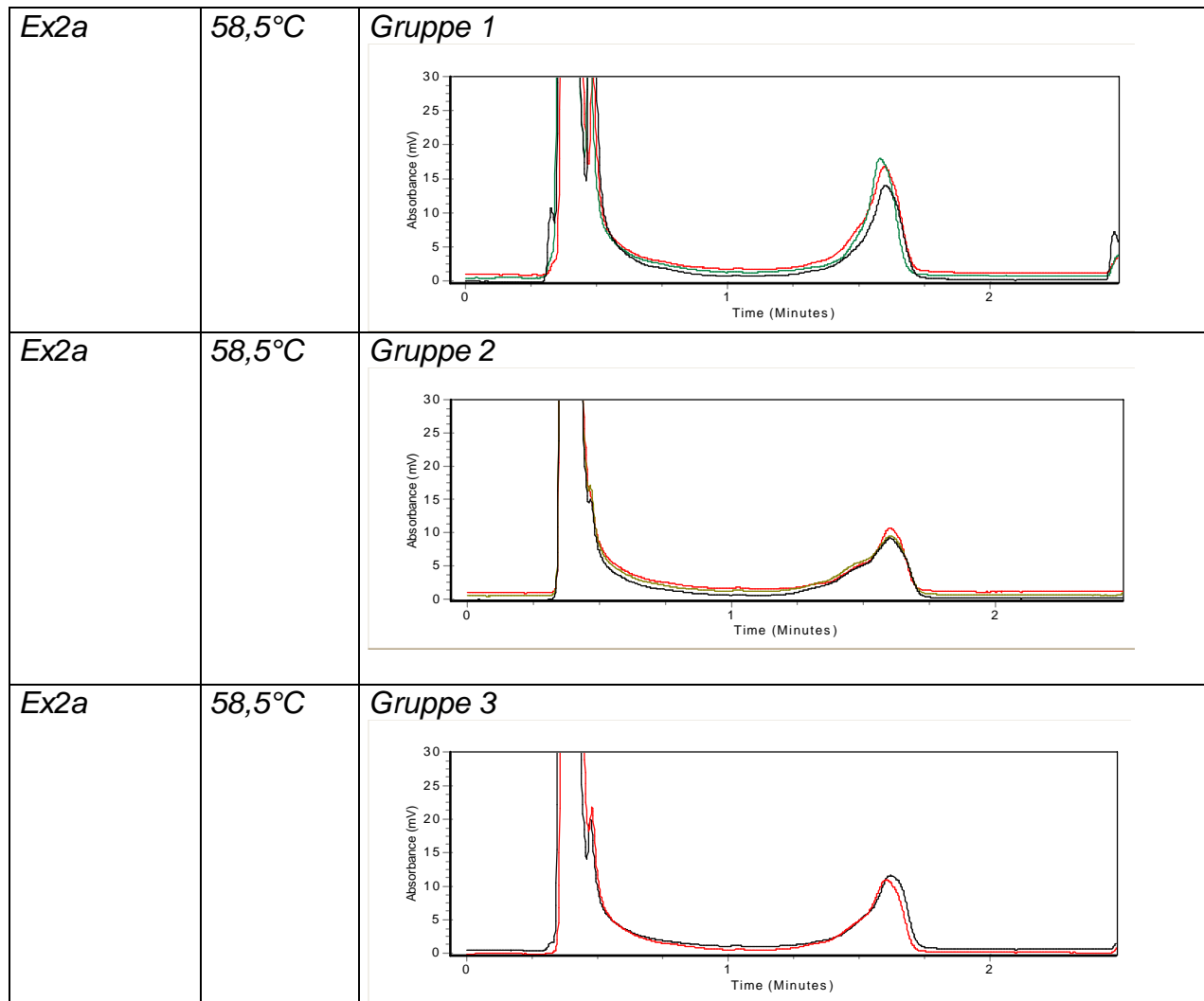
2b	59,3°C		
2c	59,5°C		

Auffällige Profile ergaben sich bei der Messung von Ex1a bei 66,5 °C und von Ex 2a. Der Exon 2a - Abschnitt enthält zwei bekannte Polymorphismen (rs724356 und rs3735270), welche kein einheitliches Elutionsprofil zulassen. Hier wurden für jedes Muster einzelne Proben sequenziert, um nicht weitere Varianten zu übersehen.

Die entsprechenden auffälligen Elutionsprofile sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

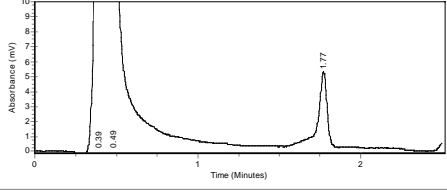
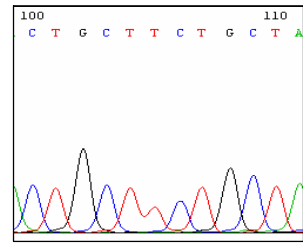
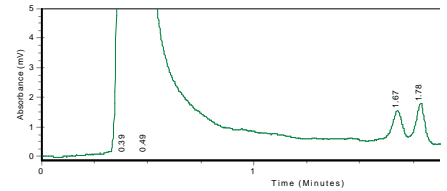
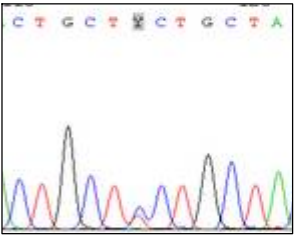
Tabelle 14: dHPLC Elutionsprofile auffälliger Proben des Pael-R Gens

<i>Exon- abschnitt</i>	<i>dHPLC- Analyse- temperatur</i>	<i>Elutionsprofile</i>
Ex1a	66,5°C	<p><i>Auffälliges Profil:</i></p>



Für Exon2a ließen die Einzelmessungen der Proben trotz unterschiedlich breiter Peaks keine Rückschlüsse auf die Genotypen der beiden SNPs zu, so dass hier später eine Pyrosequenzierung angeschlossen wurde. Im Falle einer zusätzlichen Variante hätte sich wahrscheinlich ein signifikant anderes, zusätzliches Elutionsprofil gezeigt.

Tabelle 15: Einzelmessungen und Sequenzierung auffälliger Proben aus Exon 1a des Pael-R Gens

<i>Exon 1a, Messung bei 66,5°C</i>	<i>Elutionsprofil</i>	<i>Sequenzierung</i>
<i>Unauffälliges Elutionsprofil</i>		
<i>Auffälliges Elutionsprofil</i>		

Das auffällige Elutionsprofil fand sich bei der Messung von Exon 1a bei 66,5°C in 25 von den insgesamt 333 gemessenen Patientenproben. Drei der im Einzellauf auffälligen Proben wurden sequenziert. Sie wiesen alle denselben Basenaustausch von T nach C an Position 709 des Exons auf, der jedoch stumm ist, d.h. nicht zu einem Aminosäureaustausch führt (c.48T>C, p.L16L). In beiden Fällen wird die Aminosäure Leucin kodiert.

Im ersten Abschnitt von Exon 2 (Exon2a) fanden sich zwei weitere, bereits beschriebene SNPs. Beim ersten SNP (rs724356) handelt es sich um einen Basenaustausch von T nach C an Position c.1047, welcher für die Aminosäure Threonin kodiert. Bei dem zweiten SNP (rs3735270) handelt es sich um einen Austausch von G nach C an Position c.1329, welcher für die Aminosäure Leucin kodiert. Beide Polymorphismen sind stumm, d.h. sie haben keinen Aminosäureaustausch zur Folge.

5.2.5 Mutationsanalyse durch Pyrosequenzierung

Da es nicht möglich war bestimmte dHPLC Muster für die einzelnen Kombinationmöglichkeiten dieser Polymorphismen zu bestimmen wurden hier sowohl die Patienten- als auch die Kontrollproben hinsichtlich dieser beiden SNP mit Hilfe der Pyrosequenzierung analysiert. Es zeigte sich, dass sich die Allelhäufigkeiten bei den Kontrollpersonen im Vergleich zu den Patienten deutlich unterscheiden.

Tabelle 16: Ergebnisse aus der Pyrosequenzierung hinsichtlich des 1. SNPs in Ex2a. Hier wurde ein Sequenzierprimer in 3'-5' Richtung des kodierenden Stranges gewählt, deshalb handelt es sich bei dem sequenzierten Bereich um die Reversesequenz. Der Basenaustausch von T nach C wird hier als Basenaustausch von A nach G angezeigt.

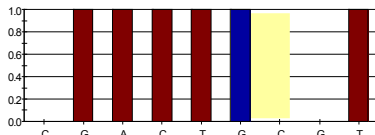
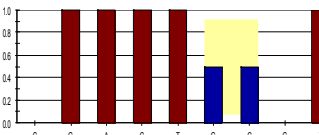
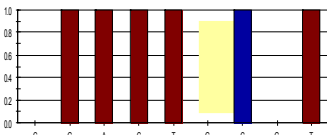
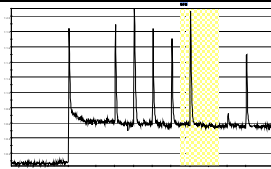
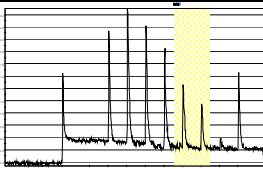
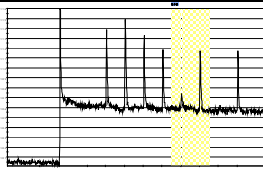
SNP1 (rs 724356) zu analysierende Sequenz: 5' - A/GGTGGTGA -3'			
	A/A	A/G	G/G
Histogramme			
Pyrogramme			
Anzahl in Patienten Proben	18/246 7,0 %	101/246 41,0 %	127/246 52,0 %
Anzahl in Kontroll Proben	21/275 8,0 %	94/275 34,0 %	160/275 58,0 %
Pearsons Chi-Quadrat	p=0,890	p=0,105	p=0,133

Nach Auswertung der gewonnenen Pyrosequenzierungs-Ergebnisse für den ersten SNP war die Allelkombination G/G mit 52% bzw. 58% am häufigsten anzutreffen, gefolgt von A/G mit 41% bzw. 34% und mit größerem Abstand A/A mit 7% bzw. 8%. In der Kontingenzanalyse wurden keine signifikanten Unterschiede der Allelzusammensetzungen zwischen 246 Parkinson-Patienten und 275 altersentsprechende Kontrollen gefunden. Die höchsten Übereinstimmungen hinsichtlich der prozentualen Verteilung entfiel dabei auf die am seltensten

vorkommende Basenkombination A/A. Somit unterscheiden sich Parkinson- und Kontrollpatienten hinsichtlich des der Verteilungen des Polymorphismus rs724356 des PAEL-R Gens nicht. Die beobachtete Genotypenverteilung entspricht dabei der Erwartung unter der Annahme einer Hardy–Weinberg-Verteilung.

Tabelle 17: Auswertung der Patienten- und der Kontrollproben für den 2. SNP (rs 3735270) des PAEL-R Gens.

SNP rs 3735270 zu analysierende Sequenz: 5'- GACTG/CT -3'

	G/G	G/C	C/C
Histogramme			
Pyrogramme			
Anzahl in Patienten Proben	133/ 262 51,0 %	104/262 40,0 %	25/262 9,0 %
Anzahl in Kontroll Proben	77/267 29,0 %	133/267 50,0 %	57/267 21,0 %
Pearsons Chi Quadrat	p<0,0001	p=0,0193	p=0,0002

Die meisten Pyrosequenzierungs-Messungen erbrachten dieses mal die Allelkombination G/C mit 40% bzw. 50% als häufigste Beobachtung, gefolgt von G/G mit 51% bzw. 29% und C/C mit 9% bzw. 21%. Bei der statistischen Auswertung mittels Kontingenzanalyse von 262 Parkinsonproben und 267 Kontrollproben bezüglich des Polymorphismus rs3735270 des PAEL-R Gens zeigte sich, dass das G/G-Allel mit 51% in Parkinsonpatienten hochsignifikant überrepräsentiert ist ($p < 0,0001$). Entsprechend zeigte sich eine signifikante Abnahme der verbleibenden G/C und C/C-Allelkombinationen im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollen.

5.2.6 Ermittlung und Vergleich der kombinierten Allelhäufigkeiten für Patienten – und Kontrollproben des *PAEL-R* Gens

Im Anschluß an die für jeden Polymorphismus allein bestimmten Allelhäufigkeiten wurde für die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der beiden SNPs die Allelhäufigkeiten für die gepaarten Gruppen ermittelt.

Abbildung 10: Vier von 16 Möglichkeiten der Kombination der einzelnen Haplotypen für die beiden Single Nukleotid Polymorphismen in Exon 2a. Es resultieren letztlich 4 mögliche Haplotypen-Kombinationen. Der Haplotyp wird ab hier so angegeben, wie er auf dem kodierenden Strang in 5´- 3´- Richtung gelesen werden würde.

SNP 1 (rs 724356)	SNP 2 (rs 3735270)	Haplotyp
$\frac{T}{T}$	$\frac{G}{C}$	$\frac{T}{T} \frac{G}{C}$
$\frac{T}{C}$	$\frac{C}{G}$	$\frac{T}{C} \frac{C}{G}$
$\frac{C}{T}$	$\frac{C}{C}$	$\frac{C}{T} \frac{C}{C}$
$\frac{C}{C}$	$\frac{G}{G}$	$\frac{C}{C} \frac{G}{G}$

Tabelle 18: Allelhäufigkeiten für die Patienten und Kontrollproben. Der Haplotyp wird hier so angegeben, wie er auf dem kodierenden Strang in 5´- 3´- Richtung gelesen werden würde.

Haplotyp	Patientenproben	Kontrollkollektiv	Pearsons Chi-Quadrat
T_C	1/382 (0,26%)	1/414 (0,24%)	p=0,9428
T_G	88/382 (23,04%)	78/414 (18,84%)	p=0,1454
C_C	94/382 (24,61%)	187/414 (45,17%)	p<0,0001
C_G	199/382 (52,10%)	148/414 (35,75%)	p<0,0001
Summe	382 (100%)	414 (100%)	

Bereits hier fällt auf, daß die C_G Allelkombination in der Patientengruppe mit 52,1% prozentual deutlich häufiger auftritt, als in der Kontrollgruppe mit 35,75%. Zur Überprüfung des Signifikanzniveaus wurden die ermittelten Werte in eine Kontingenztafel eingetragen und Parkinson- und Kontrollgruppen für jeden Haplotyp einzeln miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich eine hochsignifikante (p<0,0001)

Überrepräsentierung der C_G-Kombination bzw. Unterrepräsentierung der C_C-Kombination in den Patientenproben beim Vergleich mit den altersentsprechenden Kontrollen. Für den Haplotyp T_G erbatte der Chi Quadrat Test keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollgruppe ($p= 0,145$). Der Haplotyp T_C war in beiden Gruppen übereinstimmend jeweils nur ein einziges Mal anzutreffen.

Die Überrepräsentierung des G-Allels im Polymorphismus c.1329G>C resultiert somit zu hochsignifikant verschiedenen Haplotypen-Kombinationen an Positionen c.1047 und c.1329 in PAEL-R Patienten- und Kontrollkollektiven. Die Bedeutung dieser Unterschiede werden im Diskussionsteil erörtert.

5.3 Genotypisierung in einem Kontrollkollektiv

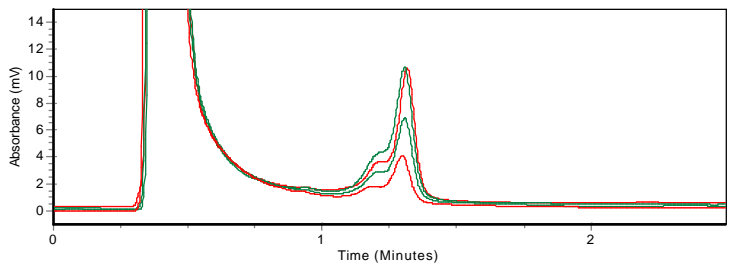
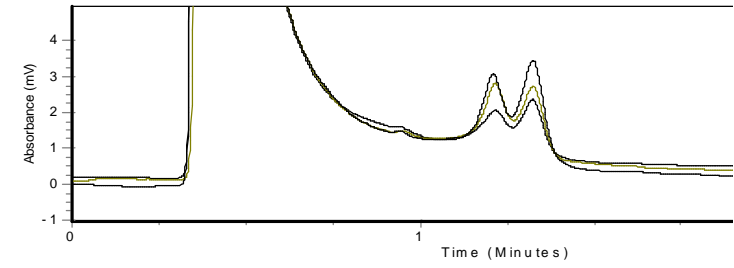
5.3.1 Genotypisierung durch dHPLC Analyse für *CDCrel-1*

Im Anschluss an die Genotypisierung der Patientenproben wurden Proben eines Kontrollkollektivs ebenfalls auf die in den Patientenproben gefundenen Veränderungen hin überprüft. Da für *CDCrel-1* außer einer stummen Variante in Exon 7 (c.6140C>T) keine weiteren Auffälligkeiten gefunden wurden, wurde hier auf einen Vergleich mit einer Kontrollgruppe verzichtet.

5.3.2 Genotypisierung durch dHPLC Analyse für *PAEL-R*

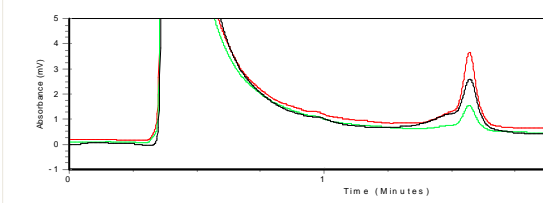
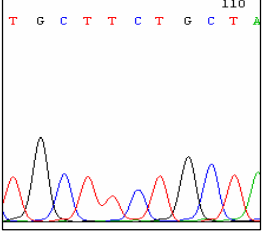
In Pael-R fand sich im ersten Abschnitt von Exon 1 ein Polymorphismus (c.48T>C), welcher durch Messung im dHPLC eindeutig zu identifizieren war, weswegen auch ein Kontrollkollektiv bestehend aus 264 Personen mittels dHPLC gescreent wurde. Da es durch Poolen der Proben relativ unwahrscheinlich war, eventuelle homozygote Proben zu übersehen wurde hier auf eine weitere Kontrollanalyse z.B. durch Pyrosequenzierung verzichtet. Auch hier wurden einige der auffälligen Proben zur Kontrolle im Anschluss an die dHPLC Messung sequenziert. Sie wiesen alle den erwarteten Polymorphismus entsprechend einem Basenaustausch von T nach C an Position 709 des Exons auf, der jedoch stumm ist, d.h. nicht zu einem Aminosäureaustausch führt (c.48T>C, p.L16L). Die entsprechenden Elutionsmuster des Kontrollkollektivs sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 19: Elutionsmuster bei der Messung des Kontrollkollektivs

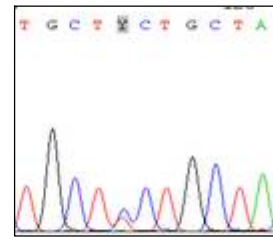
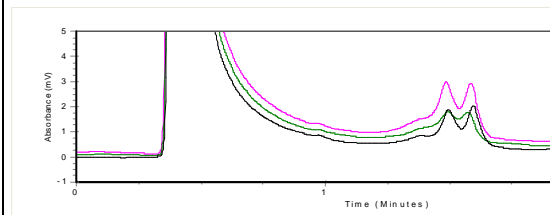
Exonabschnitt	Messtemperatur	Elutionsmuster
Ex1a	66,5°C	<p>Gruppe 1</p>  <p>Gruppe 2</p> 

Es wurde in den Einzelmessungen der insgesamt 264 gemessenen Kontrollproben das auffällige Elutionsmuster 12mal gefunden. Zur Sicherung des Ergebnisses wurden 2 der auffälligen Proben sequenziert. Es fand sich derselbe Polymorphismus wie bereits in den Patientenproben.

Tabelle 20: Elutionsmuster der Einzelmessungen im Kontrollkollektiv

Ex1a, Messung bei 66,5°C	Elutionsmuster	Sequenz
Unauffälliges Muster		

Auffälliges Muster



Der statistische Vergleich des Kontrollkollektives mit den Patientenproben wurde der Übersicht halber bereits im Anschluss an die Pyrosequenzierung dargestellt.

6 Diskussion

Genetische Aspekte in der Pathogenese des Morbus Parkinson werden in letzter Zeit zunehmend beachtet. Insbesondere die Entdeckung von *Parkin*-Mutationen beim juvenilen Parkinson-Syndrom hat sukzessive die Aufklärung von Protein-Protein-Interaktoren dieses pathogenetisch relevanten Ubiquitin-Ligase-Enzyms gestattet. Auch diese Interaktoren haben sich teilweise in die Konzepte eines gestörten proteasomalen Abbauweges eingliedern lassen. Der Anteil der genetischen Subtypen der Parkinson-Erkrankung weist eine starke Heterogenie auf, sodaß die Untersuchung weiterer Marker zur Aufdeckung der krankheitsrelevanter Proteine hilfreich sein kann.

Unter anderem akkumulieren die Interaktionspartner des Parkin, das Septin CDCrel-1 (PNUTL1, SEPT5) und der G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptor Pael-R (GPR37) im Gehirn von jugendlichen Parkinson-Patienten. International existieren derzeit keine Daten, in welcher Häufigkeit und im welchem Umfang Erkrankungen auf Mutationen in diesen Genen zurück zu führen sind. In dieser Arbeit wurden deshalb Proben von Parkinson-Patienten auf Mutationen innerhalb aller Exone in diesen beiden Genen untersucht.

Im *CDCrel-1*-Gen wurde in Exon 7 ein auffälliges Allel (0,31%) gefunden, dessen Sequenzierung das Vorliegen einer stummen Variante bestätigte. Es handelt sich hierbei um einen Basenaustausch von C nach T an Position c.6140. Von den insgesamt 364 untersuchten Patientenproben wurden 49 von der statistischen Auswertung ausgeschlossen, da bei ihnen keine vollständigen Untersuchungsergebnisse der Exons 2-12 vorlagen. Die Mutationsanalyse für Exon 1 wurde durch einen Längenpolymorphismus im Intron 1 verhindert. Somit kann das Vorhandensein von Varianten bzw. krankheitsverursachenden Mutationen für CDCrel bei Parkinson-Patienten derzeit noch nicht komplett ausgeschlossen werden. Hingegen verdichten sich in Tiermodellen neuerdings Hinweise darauf, dass der *CDCrel-1* einschließende Locus 22q11.2 bei neuropsychiatrischen Erkrankungen wie z.B. Schizophrenien eine gestörte Expression aufweist [Hiroi 2005]. Es kann somit spekuliert werden, dass Mutationen des *CDCrel-1*-Gens eventuell auch in einem Patientenkollektiv mit neuropsychiatrischen Verhaltensauffälligkeiten auftreten könnten.

Für das *PAEL-R* Gen wurden die beiden bekannten Polymorphismen in Exon 2 rs724356 und rs3735270 auch in den untersuchten Patientenproben beobachtet. Zusätzlich wurde in 25 von den insgesamt 333 gemessenen Patientenproben (7.5%) ein weiterer, bisher nicht bekannter Polymorphismus an Position c.48 in Exon 1 identifiziert. Die Sequenzierung dieser Position wies einen Basenaustausch von T nach C auf, der nicht zu einem Aminosäureaustausch von Leucin führt. Auch in 264 gemessenen Kontrollproben wurde diese stumme Variante 12 mal gefunden (4.5%) und in zwei Proben durch Sequenzierung bestätigt. In der aktuellen Studie konnten keine krankheitsverursachende Mutationen gefunden werden.

Auffällig ist allerdings die statistische Verteilung des bereits bekannten Polymorphismus rs373570 von *PAEL-R*. Bei den Parkinson-Patienten beobachtet man eine deutliche Überrepräsentierung des G-Allels. Bei Parkinson-Patienten wurde die Homozygotie für das GG-Allel an Position c.1329 fast doppelt so häufig beobachtet wie in der Kontrollgruppe (51% Parkinson-Patienten, 29% Kontrollgruppe, $p < 0,0001$). Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass das Vorhandensein der signifikant häufiger auftretenden c.1329G>C-Variante ein Risikoallel darstellen könnte. Dieses könnte beispielsweise mit einer durch alternatives Spleißen entstandenen divergierenden Isoform einhergehen, bei der die funktionelle Bedeutung des Proteins modifiziert ist. Funktionelle Polymorphismen, die mit einer veränderten Rezeptorstruktur einhergehen, sind insbesondere bei den Dopaminrezeptoren bekannt, welche ebenfalls zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren zählen [Gelfort 2000]. Es ist denkbar, dass es sich bei dem C_G-Haplotyp für *Pael-R* um einen Suszeptibilitätsfaktor handelt, der unter bestimmten Umweltbedingungen mit unvollständiger Penetranz zur Ausprägung der Parkinson'schen Erkrankung führt. Insbesondere könnte hypothetisch eine verminderte Resistenz gegenüber oxidativen Stressfaktoren vorliegen. Hierbei können allerdings auch andere Faktoren, wie eine veränderte Lokalisation oder Integration des Rezeptors in der Zellmembran ursächlich sein.

Vor diesem Hintergrund ist es bedeutsam, dass *Pael-R* bereits im Normalzustand als schwierig zu faltendes Protein in über 50% der Fälle dem proteasomalen Abbauweg mittels Ubiquitinierung zugeführt wird [Takahahshi 2006]. Schon kleinste

Veränderungen der Aminosäuresequenz könnten aufgrund der zu erwartenden Akkumulation von Pael-R dramatische Auswirkungen auf die dopaminergen Neurone zeigen. Insofern ist es auch denkbar, dass solche Mutationen bereits in der neuronalen Entwicklung in der Fetalperiode ihre Wirkung entfalten und aufgrund der anderen klinischen Symptomatik somit nicht in Parkinsonkollektiven gefunden werden.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass dieser Haplotyp mit anderen funktionellen Polymorphismen gekoppelt ist, welche zu einer Änderung der Proteinbiosynthese führen können. Der nächste Schritt wäre nun, die Promotor-Region auf funktionelle SNPs zu untersuchen und durch Expressionsklonierung der Haplotypen eventuell Unterschiede in Transkriptmenge, Transkriptstabilität oder posttranskriptionalen Modifizierungen nachzuweisen.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass das untersuchte Patientenkollektiv vorwiegend aus dem süddeutschen Raum stammt. Bei bekannter Heterogenität der Parkinsonerkrankung ist das Vorliegen einer zweiten unabhängigen Patientengruppe in anderen Regionen / Ländern durchaus denkbar und sollte daher in einer zweiten unabhängigen Studie zumindest ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit bieten sogenannte „genome-wide association studies“ bei denen die beobachteten Polymorphismen mit in Datenbanken hinterlegten Kontrollfällen verglichen werden. Ein Beispiel hierfür ist das international angelegte HapMap Projekt (<http://www.hapmap.org/>).

Schlussfolgerungen

- Das Vorliegen krankheitsverursachender Mutationen kann für CDCrel-1 nicht sicher ausgeschlossen werden. Innerhalb des CDCrel-1 Gen in Exon 7 existiert in einer Probe eine stumme Variante (c.6140C>T) ohne klinische Relevanz. Potentiell krankheitsverursachende Mutationen oder neue Polymorphismen konnten in einem Großteil des Gens weder für Patienten noch in den Kontrollen nachgewiesen werden.
- Das Pael-R Gen enthält innerhalb seiner Exons keine potentiell krankheitsverursachende Mutationen für den Morbus Parkinson. Ein bisher nicht beschriebener Polymorphismus in Exon 1 (c.48T>C) hat keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz des Proteins.
- Die signifikante ($p < 0,0001$) Überrepräsentation des G-Allels für den Polymorphismus c.1329G>C in PAEL-R (71% in Parkinson-Proben, 54% in der Kontrollgruppe), deutet darauf hin, dass dieses ein funktionellen Polymorphismus darstellt, der seine Wirkung möglicherweise außerhalb der untersuchten Genabschnittes entfaltet.
- Bei Parkinson-Patienten wurde die Homozygotie für das GG-Allel an Position c.1329 in PAEL-R fast doppelt so häufig beobachtet wie in der Kontrollgruppe (51% Parkinson-Patienten, 29% Kontrollgruppe, $p < 0,0001$). Sofern sich diese Daten in einem unabhängigen Kollektiv bestätigen lassen, ist für diesen Marker eine Assoziation mit der Parkinson-Krankheit anzunehmen. Die funktionelle Bedeutung ist jedoch wahrscheinlich bei einem weiteren, noch unbekanntem Polymorphismus zu suchen, der den Haplotyp mit dem G oder C-Allel an Position 1329 teilt.

7 Zusammenfassung

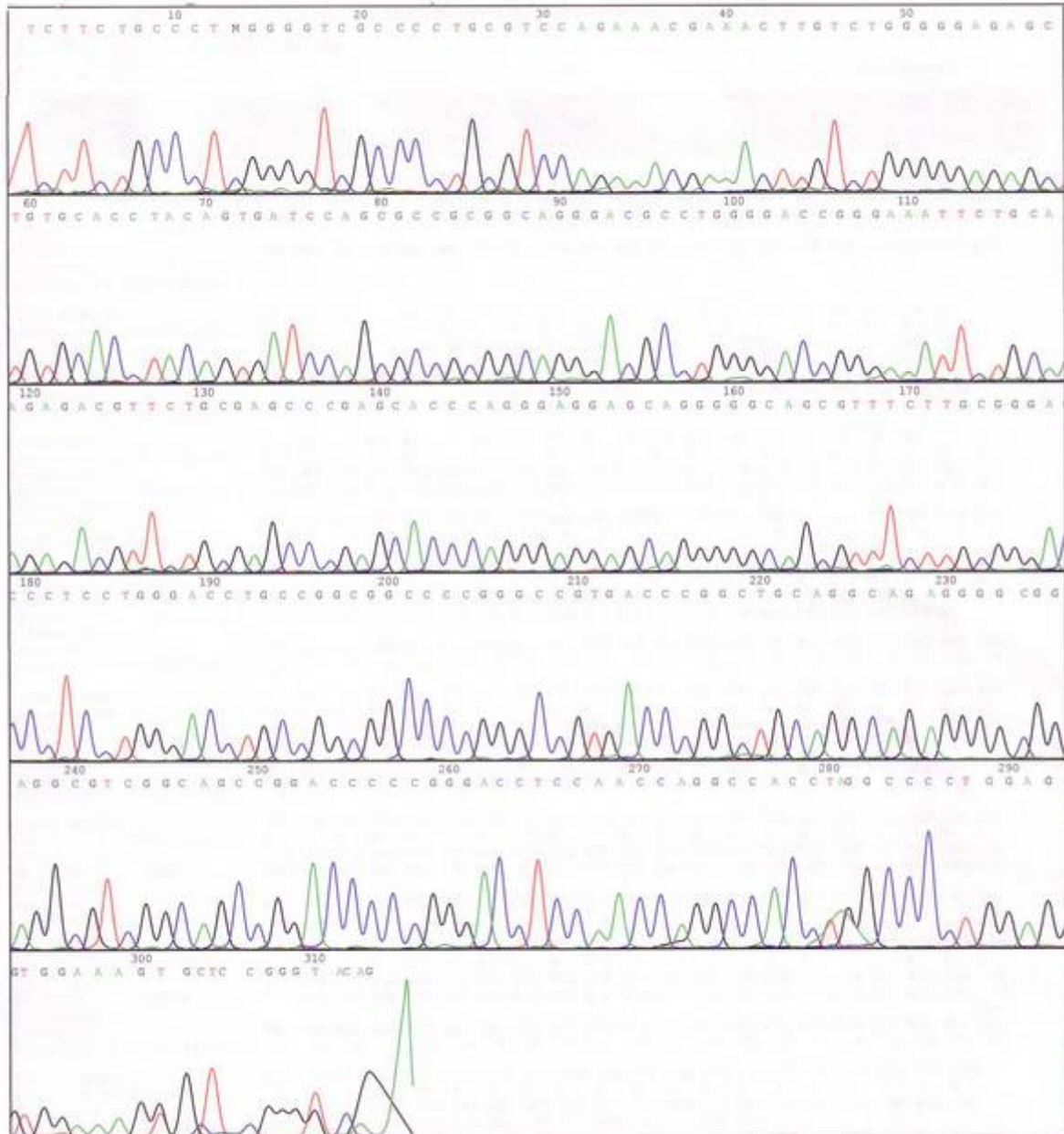
Für den autosomal-rezessiven juvenilen Parkinsonismus (AR-JP) sind verschiedene Krankheitsgene bekannt. Eines davon ist die E3 Ubiquitin-Ligase Parkin. Neben weiteren Interaktionspartnern sind insbesondere das Septin CDCrel-1 (PNUTL-1) und der G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptor Pael-R (GPR-37) von Interesse, da einige Arbeiten Hinweise auf die Akkumulation dieser Proteine im ZNS juveniler Parkinson-Patienten ergeben haben.

Ziel dieser Arbeit war eine Mutationsanalyse aller Exone beider Gene, um relevante Mutationen aufzudecken. Hierfür wurde mittels denaturierender Hochdruckflüssigchromatographie (dHPLC) für *CDCrel-1* insgesamt 364 Proben und für Pael-R insgesamt 333 Proben von Parkinson-Patienten sowie 264 Proben einer Kontrollgruppe untersucht. Proben mit auffälligem Elutionsprofil wurden anschliessend mittels zyklischer Sequenzierung überprüft. Für *CDCrel-1* konnte in Exon 7 in einer der 315 vollständig untersuchten Proben für Exon 2-12 (0,31%) eine stumme Variante nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um einen Austausch der Base C mit T an Position 6140, sodaß die Translation der Aminosäure Isoleucin unverändert erfolgt (c.6140C>T, p.I182I). Für *Pael-R* konnte neben zwei bekannten häufigen Polymorphismen (rs724356 und rs3735270) ein weiterer Polymorphismus c.48T>C, p.L16L mit stummer Kodierung von Leucin in 7,5% der Proben ausgemacht werden. Hierbei handelt es sich um einen Austausch der Base Thymin mit Cytosin an Position 48. In der Kontrollgruppe waren es 4,5%. Da in der dHPLC für unterschiedliche Polymorphismen sich ähnliche Elutionsprofile zeigten, wurde zur genauen Berechnung von Genotypen und Allelfrequenzen für 246 bzw. 262 Patienten mit Parkinson und 275 bzw. 267 „Old-People“-Kontrollen mittels Pyrosequenzierung die entsprechenden Allele für rs724356 und rs373570 bestimmt. Zuvor musste aufgrund des geringen DNA-Materials eine *nested*-PCR der relevanten Genabschnitte durchgeführt werden. Für rs373570 wurde bei den Parkinsonpatienten das G-Allel in 71% der Fälle nachgewiesen, während in der Kontrollgruppe nur 54% der Proben dieses Allel trugen. Entsprechend wurde eine Homozygotie für das GG-Allel in 51% der Parkinsonfälle bei nur 29% der Kontrollgruppen beobachtet. Die Allelfrequenz des Haplotypes C_G für *PAEL-R* ist in Parkinson-Fällen somit signifikant erhöht ($p > 0,0001$). Man kann also davon ausgehen, daß das G-Allel ein Marker für einen funktionellen Polymorphismus

darstellt, der außerhalb des untersuchten Genabschnittes liegt. Weitere Analysen, unter anderem Mutationsscreening der Promotor-Region auf funktionelle SNPs und durch Expressionsklonierung der Haplotypen auf Unterschiede in Transkriptmenge, Transkriptstabilität oder posttranskriptionalen Modifizierungen sind vielversprechende Ansätze.

8 Anhang

Exemplarische Darstellung einer vollständigen Sequenzierung des ersten Abschnittes von Exon 1 des PAEL-R mit Vorliegen des Polymorphismus.



```

Codon Number:          1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15 16 17 18
Reference AA Translation:
Exon1A.txt:           C  L  T  L  S  S  N  F  G  S  R  C  R  S  X  L  S  R
AB_OP125 GPR37,EX...: TGC C-TA ACT CTC AGC AGC AAC TTC GGC -AGC AGG TGT CGA TCC TAA CTA AGC AGG
AB_OP125 GPR37,...:   CCT GCT TGC CATC ACT CTC AGC AGC AAC TTC GGC -AGC AGG TGT CGA TCC TAA CTA AGC AGG
Difference:           111 111 111 1+1* 111 111 111 111 !!
Consensus:            CCT GCT TGC CATC ACT CTC AGC AGC AAC YKC GGC TAGC AGG TGT CGA TCC TAA CTA AGC AGG
Consensus AA Translation:
                       C  H  H  S  Q  Q  Q  L  P  R  L  A  G  V  D  P  N  X  A  G

Codon Number:          19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
Reference AA Translation:
Exon1A.txt:           S  C  G  C  R  V  C  P  H  Q  A  M  R  A  P  G  A  L  L  A  R
AB_OP125 GPR37,EX...: AGC TGC GGC TGC CGG GTG TGC CCT CAC CAA GCC ATG CGA GCC CCG GGC GCG CTT CTC GCC CGC
AB_OP125 GPR37,...:   AGC TGC GGC TGC CGG GTG TGC CCT CAC CAA GCC ATG CGA GCC CCG GGC GCG CTT CTC GCC CGC
Difference:           AGC TGC GGC TGC CGG GTG TGC CCT CAC CAA GCC ATG CGA GCC CCG GGC GCG CTT CTC GCC CGC
Consensus:            AGC TGC GGC TGC CGG GTG TGC CCT CAC CAA GCC ATG CGA GCC CCG GGC GCG CTT CTC GCC CGC
Consensus AA Translation:
                       A  A  A  A  G  C  A  L  T  K  P  C  E  P  R  A  R  F  S  P  A

Codon Number:          40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
Reference AA Translation:
Exon1A.txt:           M  S  R  L  L  L  L  L  L  L  K  V  S  A  S  S  A  L  G  V  A
AB_OP125 GPR37,EX...: ATG TCG CGG CTA CTG CTT CTG CTA CTG CTC AAG GTG TCT GCC TCT TCT GCC CTC GGG GTC GCC
AB_OP125 GPR37,...:   ATG TCG CGG CTA CTG CTV CTG CTA CTG CTC AAG GTG TCT GCC TCT TCT GCC CTC GGG GTC GCC
Difference:           ATG TCG CGG CTA CTG CTV CTG CTA CTG CTC AAG GTG TCT GCC TCT TCT GCC CTC GGG GTC GCC
Consensus:            ATG TCG CGG CTA CTG CTV CTG CTA CTG CTC AAG GTG TCT GCC TCT TCT GCC CTC GGG GTC GCC
Consensus AA Translation:
                       C  R  G  Y  C  FS  C  Y  C  S  R  C  L  P  L  L  P  S  G  S  P

Codon Number:          61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81
Reference AA Translation:
Exon1A.txt:           P  A  S  R  N  E  T  C  L  G  E  S  C  A  P  T  V  I  Q  R  R
AB_OP125 GPR37,EX...: CCT GCG TCC AGA AAC GAA ACT TGT CTG GGG GAG AGC TGT GCA CCT ACA GTG ATC CAG CGC CGC
AB_OP125 GPR37,...:   CCT GCG TCC AGA AAC GAA ACT TGT CTG GGG GAG AGC TGT GCA CCT ACA GTG ATC CAG CGC CGC
Difference:           CCT GCG TCC AGA AAC GAA ACT TGT CTG GGG GAG AGC TGT GCA CCT ACA GTG ATC CAG CGC CGC
Consensus:            CCT GCG TCC AGA AAC GAA ACT TGT CTG GGG GAG AGC TGT GCA CCT ACA GTG ATC CAG CGC CGC
Consensus AA Translation:
                       L  R  P  E  T  K  L  V  W  G  R  A  V  H  L  Q  X  S  S  A  A

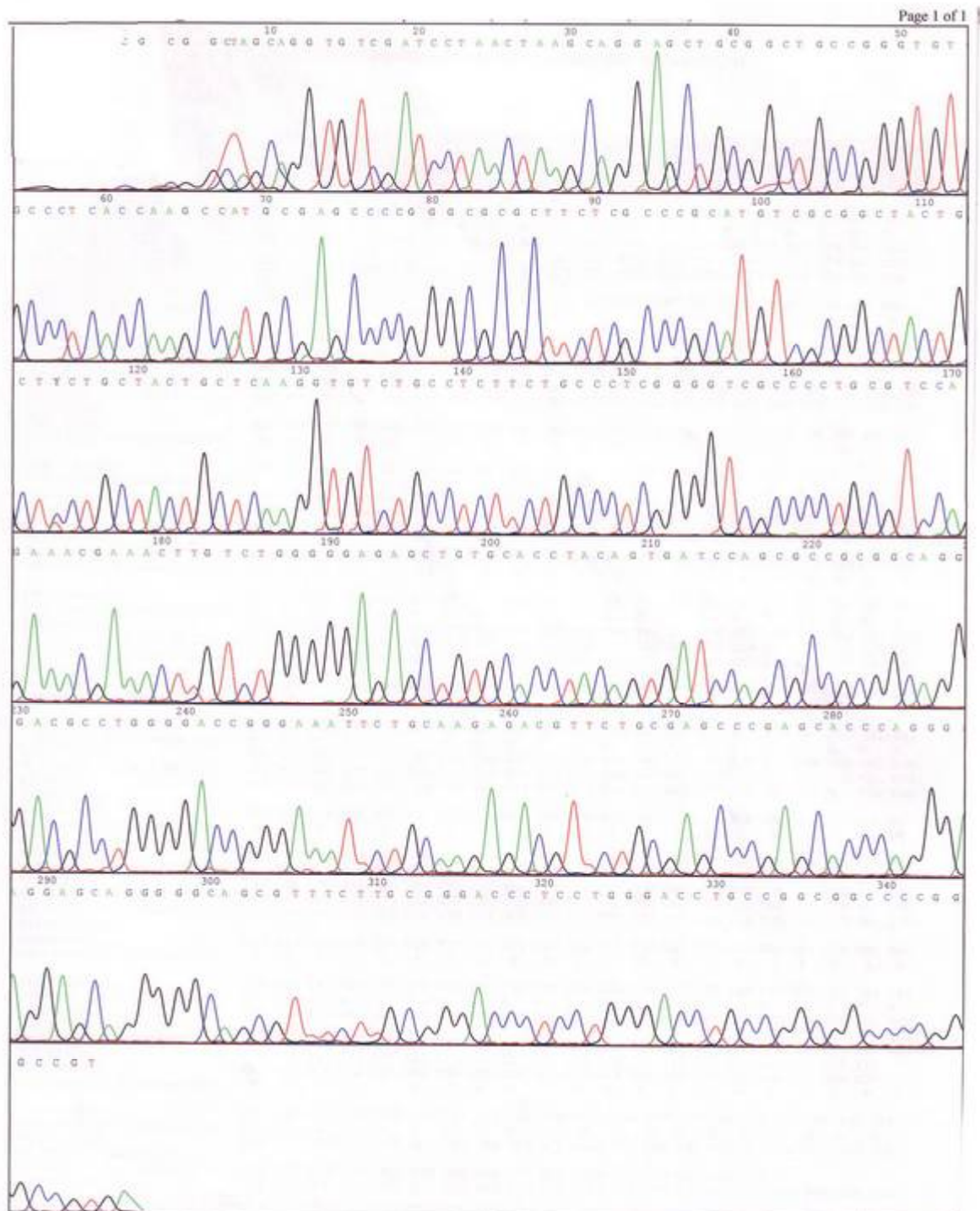
Codon Number:          82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102
Reference AA Translation:
Exon1A.txt:           G  R  D  A  W  G  P  G  N  S  A  R  D  V  L  R  A  R  A  P  R
AB_OP125 GPR37,EX...: GGC AGG GAC GCC TGG GGA CCG GGA AAT TCT GCA AGA GAC GTT CTG CGA GCC CGA GCA CCC AGG
AB_OP125 GPR37,...:   GGC AGG GAC GCC TGG GGA CCG GGA AAT TCT GCA AGA GAC GTT CTG CGA GCC CGA GCA CCC AGG
Difference:           GGC AGG GAC GCC TGG GGA CCG GGA AAT TCT GCA AGA GAC GTT CTG CGA GCC CGA GCA CCC AGG
Consensus:            GGC AGG GAC GCC TGG GGA CCG GGA AAT TCT GCA AGA GAC GTT CTG CGA GCC CGA GCA CCC AGG
Consensus AA Translation:
                       A  G  T  P  G  D  R  E  I  L  Q  E  T  F  C  E  P  E  H  P  A  G

Codon Number:          103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123
Reference AA Translation:
Exon1A.txt:           E  E  Q  G  A  A  F  L  A  G  P  S  W  D  L  P  A  A  P  G  R
AB_OP125 GPR37,EX...: GAG GAG CAG GGG GCA GCG TTT CTT GCG GGA CCC TCC TGG GAC CTG CCG GCG GCC CCG GGC CGT
AB_OP125 GPR37,...:   GAG GAG CAG GGG GCA GCG TTT CTT GCG GGA CCC TCC TGG GAC CTG CCG GCG GCC CCG GGC CGT
Difference:           GAG GAG CAG GGG GCA GCG TTT CTT GCG GGA CCC TCC TGG GAC CTG CCG GCG GCC CCG GGC CGT
Consensus:            GAG GAG CAG GGG GCA GCG TTT CTT GCG GGA CCC TCC TGG GAC CTG CCG GCG GCC CCG GGC CGT
Consensus AA Translation:
                       R  S  R  G  Q  R  F  L  R  D  P  P  G  T  C  R  R  P  R  A  V

Codon Number:          124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144
Reference AA Translation:
Exon1A.txt:           D  P  A  A  G  R  G  A  E  A  S  A  A  G  P  P  G  P  P  T  R
AB_OP125 GPR37,EX...: GAC CCG GCT GCA GGC AGA GGG GCG GAG GCG TCG GCA GCC GGA CCC CCG GGA CCT CCA ACC AGG
AB_OP125 GPR37,...:   GAC CCG GCT GCA GGC AGA GGG GCG GAG GCG TCG GCA GCC GGA CCC CCG GGA CCT CCA ACC AGG
Difference:           111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111
Consensus:            GAC CCG GCT GCA GGC AGA GGG GCG GAG GCG TCG GCA GCC GGA CCC CCG GGA CCT CCA ACC AGG
Consensus AA Translation:
                       T  R  L  Q  A  E  G  R  R  R  R  Q  P  D  P  R  D  L  Q  P  G

Codon Number:          145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164
Reference AA Translation:
Exon1A.txt:           P  P  G  P  W  R  W  K  G  A  R  G  Q  E  P  S  E  T  L  G
AB_OP125 GPR37,EX...: CCA CCT -GGC CCC TGG AGG TGG AAA GGT GCT -CGG GGT CAG GAG CCT TCT GAA ACT TTG GGG
AB_OP125 GPR37,...:   CCA CCT AGGC CCC TGG AGG TGG AAA GGT GCT ACGG GGT CGG GAG CCT TCT
Difference:           111 111 +111 111 111 111 111 111 111 +111 111 1*1 111 111 111 000 000 000 000
    
```


Exemplarische Darstellung einer vollständige Sequenzierung des ersten Abschnittes von Exon 1 des PAEL-R ohne Vorliegen eines Polymorphismus.




```

Codon Number:      1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
Reference AA Translation: C L T L S S N F G S R C R S X L S R S C G
Exon1A.txt:      TGC CTA ACT CTC AGC AGC AAC TTC GGC AGC AGG TGT CGA TCC TAA CTA AGC AGG AGC TGC GGC
AB_OP098      GPR37,...:
Difference:      000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000
Consensus:
Consensus AA Translation:

Codon Number:      22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41
Reference AA Translation: C R V C P H Q A M R A P G A L L A R M S
Exon1A.txt:      TGC CGG GTG TGC CCT CAC CAA GCC ATG CGA GCC CCG GGC GCG CTT CTC GCC CGC ATG TC-G
AB_OP098      GPR37,...:
Difference:      000 000 000 000 000 00 C CAA GCC ATG CGA GCC CCG GGC GCG CTT CTC GCC CGC ATR TCAG
Consensus:      C CAA GCC ATG CGA GCC CCG GGC GCG CTT CTC GCC CGC ATR TCAG
Consensus AA Translation: Q A M R A P G A L L A R I M S A

Codon Number:      42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62
Reference AA Translation: R L L L L L L L L K V S A S S A L G V A P A
Exon1A.txt:      CGG CTA CTG CTT CTG CTA CTG CTC AAG GTG TCT GCC TCT TCT GCC CTM GGG GTC GCC CCT GCG
AB_OP098      GPR37,...:
Difference:      < < ?
Consensus:      CGG CTA CTG CTY CTG CTA CTG CTC AAG GTG TCT GCC TCT TCT GCC CTM GGG GTC GCC CCT GCG
Consensus AA Translation: A T A P S A T A Q G V C L F C P R G R P C V

Codon Number:      63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83
Reference AA Translation: S R N E T C L G E S C A P T V I Q R R R G R
Exon1A.txt:      TCC AGA AAC GAA ACT TGT CTG GGG GAG AGC TGT GCA CCT ACA GTG ATC CAG CGC CGC GGC AGG
AB_OP098      GPR37,...:
Difference:      TCC AGA AAC GAA ACT TGT CTG GGG GAG AGC TGT GCA CCT ACA GTG ATC CAG CGC CGC GGC AGG
Consensus:      TCC AGA AAC GAA ACT TGT CTG GGG GAG AGC TGT GCA CCT ACA GTG ATC CAG CGC CGC GGC AGG
Consensus AA Translation: Q K R N L S G E L C T Y S D P A P R Q G

Codon Number:      84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104
Reference AA Translation: D A W G P G N S A R D V L R A R A P R E E
Exon1A.txt:      GAC GCC TGG GGA CCG GGA AAT TCT GCA AGA GAC GTT CTG CGA GCC CGA GCA CCC AGG GAG GAG
AB_OP098      GPR37,...:
Difference:      GAC GCC TGG GGA CCG GGA AAT TCT GCA AGA GAC GTT CTG CGA GCC CGA GCA CCC AGG GAG GAG
Consensus:      GAC GCC TGG GGA CCG GGA AAT TCT GCA AGA GAC GTT CTG CGA GCC CGA GCA CCC AGG GAG GAG
Consensus AA Translation: R L G T G K F C K R R S A S P S T Q G G A

Codon Number:      105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125
Reference AA Translation: Q G A A F L A G P S W D L P A A P G R D P
Exon1A.txt:      CAG GGG GCA GCG TTT CTT GCG GGA CCC TCC TGG GAC CTG CCG GCG GCC CCG GGC CGT GAC CCG
AB_OP098      GPR37,...:
Difference:      CAG GGG GCA GCG TTT CTT GCG GGA CCC TCC TGG GAC CTG CCG GCG GCC CCG GGC CGT GAC CCG
Consensus:      CAG GGG GCA GCG TTT CTT GCG GGA CCC TCC TGG GAC CTG CCG GCG GCC CCG GGC CGT GAC CCG
Consensus AA Translation: G G S V S C G T L L G P A G G P G P X P G

Codon Number:      126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146
Reference AA Translation: A A G R G A E A S A A G P P G P P T R P P
Exon1A.txt:      GCT GCA GGC AGA GGG GCG GAG GCG TCG GCA GCC GGA CCC CCG GGA CCT CCA ACC AGG CCA CCT
AB_OP098      GPR37,...:
Difference:      GCT GCA GGC AGA GGG GCG GAG GCG TCG GCA GCC GGA CCC CCG GGA CCT CCA ACC AGG CCA CCT
Consensus:      GCT GCA GGC AGA GGG GCG GAG GCG TCG GCA GCC GGA CCC CCG GGA CCT CCA ACC AGG CCA CCT
Consensus AA Translation: C R Q R G G V G S R T P P T S N Q A T X

Codon Number:      147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166
Reference AA Translation: G P W R W K G A R G Q E P S E T L G R G
Exon1A.txt:      -GGC CCC TGG AGG TGG AAA GGT GCT CGG GGT CAG GAG CCT TCT GAA ACT TTG GGG AGA GGG
AB_OP098      GPR37,...:
Difference:      AGGC CCC TGG AGG TGG AAA GGT GCT CGG GGT CAG GAG CCT TCT GAA ACT TTG GGG AGA GGG
Consensus:      AGGC CCC TGG AGG TGG AAA GGT GCT CGG GGT CAG GAG CCT TCT GAA ACT TTG GGG AGA GGG
Consensus AA Translation: A P G G G K V L G V G S L G

Codon Number:
Reference AA Translation:
Exon1A.txt:      AA
AB_OP098      GPR37,...:
Difference:      00
    
```

9 Literaturverzeichnis

- Abbas N, Lucking CB, Ricard S, Durr A, Bonifati V, De Michele G, Bouley S, Vaughan JR, Gasser T, Marconi R, Broussolle E, Brefel-Courbon C, Harhangi BS, Oostra BA, Fabrizio E, Bohme GA, Pradier L, Wood NW, Filla A, Meco G, Deneffe P, Agid Y, Brice A. (1999) A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet.* 8(4):567-574.
- Abou-Sleiman PM, Healy DG, Wood NW (2004). Causes of Parkinson's disease: genetics of DJ-1. *Cell Tissue Res.* 318(1):185-188.
- Agid Y (1991). Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet.* 337(8753):1321-1324.
- Al-Din NAS, Wriekat A, Mubaidin A, Dasouki M, Hiari M (1992). Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurol Scand* 49:347-352.
- Baker MG, Graham L. (2004). The journey: Parkinson's disease. *BMJ.* 329(7466):611-614.
- Bancher C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wiche G, Seitelberger F, Wisniewski HM (1989). An antigenic profile of Lewy bodies: immunocytochemical indication for protein phosphorylation and ubiquitination. *J Neuropathol Exp Neurol.* 48(1):81-93.
- Barr AM, Young CE, Sawada K, Trimble WS, Phillips AG, Honer WG (2004). Abnormalities of presynaptic protein CDCrel-1 in striatum of rats reared in social isolation: relevance to neural connectivity in schizophrenia. *Eur J Neurosci.* 20(1):303-307.
- Berg D, Becker G, Riederer P, Riess O (2002). Iron in neurodegenerative disorders. *Neurotox Res.* 4(7-8):637-653.
- Berg D, Niwar M, Maass S, Zimprich A, Moller JC, Wuellner U, Schmitz-Hubsch T, Klein C, Tan EK, Schols L, Marsh L, Dawson TM, Janetzky B, Muller T, Voitalla D, Kostic V, Pramstaller PP, Oertel WH, Bauer P, Krueger R, Gasser T, Riess O (2005). Alpha-synuclein and Parkinson's disease: implications from the screening of more than 1,900 patients. *Mov Disord.* 20(9):1191-1194.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci.* 20(4):415-455.
- Bertoli-Avella AM, Giroud-Benitez JL, Akyol A, Barbosa E, Schaap O, van der Linde HC, Martignoni E, Lopiano L, Lamberti P, Fincati E, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Squitieri F, Marini P, Abbruzzese G, Fabbrini G, Marconi R, Dalla Libera A, Trianni G, Guidi M, De Gaetano A, Boff Maegawa G, De Leo A, Gallai V, de Rosa G, Vanacore N, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P, Bonifati V;

- Italian Parkinson Genetics Network. (2005). Novel Parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 20(4):424-431.
- Blaser S, Jersch K, Hainmann I, Wunderle D, Zgaga-Griesz A, Busse A, Zieger B (2002). Human septin-septin interaction: CDCrel-1 partners with KIAA0202. *FEBS Lett*. 519(1-3):169-172.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 299(5604):256-259.
- Caltagarone J, Rhodes J, Honer WG, Bowser R (1998). Localization of a novel septin protein, hCDCrel-1, in neurons of human brain. *Neuroreport*. 9(12):2907-2912.
- Chien HF, Rohe CF, Costa MD, Breedveld GJ, Oostra BA, Barbosa ER, Bonifati V (2006). Early-onset Parkinson's disease caused by a novel parkin mutation in a genetic isolate from north-eastern Brazil. *Neurogenetics* 7(1):13-19.
- Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med*;7(10):1144-1150.
- Clarimon J, Johnson J, Djaldetti R, Hernandez D, Hattori N, Sroka H, Barhom Y, Singleton A (2005). Mutation of the Parkin gene in a Persian family: clinical progression over a 40-year period. *Mov Disord* 20(7):887-890.
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med*. 1998; 4(11):1318-20.
- Dawson TM, Dawson VL (2003). Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J Clin Invest*. 111(2):145-151.
- De Iuliis A, Burlina AP, Boschetto R, Zambenedetti P, Arslan P, Galzigna L (2002). Increased dopamine peroxidation in postmortem Parkinsonian brain. *Biochim Biophys Acta*. 1573(1):63-67.
- De Rijk MC, Rocca WA, Anderson DW, Melcon MO, Breteler MM, Maraganore DM (1997). Perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Neurology*. 48(5):1277-1281.
- De Silva HR, Khan NL, Wood NW (2000). The genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Genet Dev*. 10(3):292-298.
- De Virgilio C, DeMarini DJ, Pringle JR (1996). SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology*. 142(Pt 10):2897-2905.

- De Stefano AL, Lew MF, Golbe LI, Mark MH, Lazzarini AM, Guttman M, Montgomery E, Waters CH, Singer C, Watts RL, Currie LJ, Wooten GF, Maher NE, Wilk JB, Sullivan KM, Slater KM, Saint-Hilaire MH, Feldmann RG, Suchowersky O, Lafontaine AL, Labelle N, Growdon JH, Vieregge P, Pramstaller PP, Klein C, Hubble JP, Reider CR, Stacy M, MacDonald ME, Gusella JF, Myers RH (2002). PARK3 influences age at onset in Parkinson disease: a genome scan in the GenePD study. *Am J Hum Genet.* 70(5):1089-1095
- Dong Z, Fergert B, Paterna JC, Vogel D, Furler S, Osinde M, Feldon J, Bueler H (2003). Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(21):12438-12443
- Fares H, Goetsch L, Pringle JR (1996). Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 132(3):399-411.
- Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D, Langston JW (2004). Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol.* 55(2):174-179.
- Feany MB, Palllanck LJ (2003). Parkin a multipurpose neuroprotective agent? *Neuron.* 38(1):13-16
- Foltynie T, Sawcer S, Brayne C, Barker RA (2002). The genetic basis of Parkinson's disease *Neurol Neurosurg Psychiatry.* 73(4):363-370
- Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol.* 51(3):296-301.
- Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznoi B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet.* 18(3):262-265.
- Gelfort G (2000). Molekulargenetische Untersuchungen zur genetischen Prädisposition für Morbus Parkinson. *Dissertationsschrift Ruhr-Universität Bochum.*
- Gibb WR, Lees AJ (1987). The progression of idiopathic Parkinson's disease is not explained by age-related changes. Clinical and pathological comparisons with post-encephalitic parkinsonian syndrome. *Acta Neuropathol (Berl).* 73(2):195-201.
- Gibb WR, Lees AJ (1988). A comparison of clinical and pathological features of young- and old-onset Parkinson's disease. *Neurology.* 38(9):1402-1406.
- Glass A (2008). Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern von Synphilin-1 zur Erweiterung bekannter Proteinnetzwerke des Morbus Parkinson und Morbus Huntington.

- Goedert M (1997) Familial Parkinson's disease. The awakening of alpha-synuclein. *Nature*. 388(6639):232-3.
- Guo SW, Thompson EA (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48(2):361-372
- Haldane JBS (1954). An exact ctesting for randomness of mating *J Genet* 52:631-635
- Hampshire DJ, Roberts E, Crow Y, Bond J, Mubaidin A, Wriekat AL, Al-Din A, Woods CG (2001). Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36. *J Med Genet*. 38(10):680-682.
- Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Hassin-Baer S, Lu CS, Ng AR, Rosales RL, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N (2004). Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*. 56(3):424-427.
- Hattori, N (2004) Etiology and pathogenesis of Parkinson`s disease: from mitochondrial Dysfunctions to familial Parkinson`s disease. *Rinsho Shinkeigaku* 44(4-5):241-262
- Hattori N, Matsumine H, Asakawa S, Kitada T, Yoshino H, Elibol B, Brookes AJ, Yamamura Y, Kobayashi T, Wang M, Yoritaka A, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y. (1998) Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) [correction of Thr240Arg and Ala311Stop] in the Parkin gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 249(3):754-8.
- Healy DG, Abou-Sleiman PM, Gibson JM, Ross OA, Jain S, Gandhi S, Gosal D, Muqit MM, Wood NW, Lynch T (2004). PINK1 (PARK6) associated Parkinson disease in Ireland. *Neurology*. 63(8):1486-1488.
- Hertz JM, Ostergaard K, Juncker I, Pedersen S, Romstad A, Moller LB, Guttler F, Dupont E (2006). Low frequency of Parkin, Tyrosin Hydroxylase and GTP Cyclohadrase I gene mutations in a Danish population of early-onset Parkinson`s Disease. *Eur J Neurol* 13(4)385-390.
- Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K, Sveinbjornsdottir S (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 52(5):549-555.
- Hietanen M, Teravainen H (1988). Dementia and treatment with L-dopa in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 3(3):263-270.
- Hiroi N, Zhu H, Lee M, Funke B, Arai M, Itokawa M, Kucherlapati R, Morrow B, Sawamura T, Agatsuma S (2005). A 200-kb region on human chromosome 22q11.2 confers antipsychotic-responsive behavioral abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(52): 19132-19137.
- Holdorff B. (2002). Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work. *J Hist Neurosci*. 11(1):19-28.

- Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ (1993). A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol.* 50(2):140-148.
- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell.* 105(7):891-902.
- Ishikawa A, Tsuji S (1996). Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type of juvenile Parkinsonism. *Neurology* 47:160-166.
- Kinoshita A, Noda M, Kinoshita M (2000). Differential localization of septins in the mouse brain. *J Comp Neurol.* 428(2):223-239.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392(6676):605-608.
- Kitao Y, Imai Y, Ozawa K, Kataoka A, Ikeda T, Soda M, Nakimawa K, Kiyama H, Stern DM, Hori O, Wakamatsu K, Ito S, Itohara S, Takahashi R, Ogawa S. Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. *Hum Mol Genet.* 2007 Jan 1;16(1):50-60
- Klein C (2001) The genetics of Parkinson syndrome *Schweiz Rundschau Med Prax* 7;90(23):1015-1023
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genet* 18:106-108.
- Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK (2003). Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet.* 33(1):85-89.
- Leroy E, Anastasopoulos S, Konitsiotis C, Lavedan C, Polymeropoulos MH (1998). Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease *Hum Genet* 103: 424-427.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease *Nature* 395(6701):451-452.
- Lowe J, Leigh PN (2002). Disorders of movement and system degenerations. In: Graham D, Lantos PL (eds) *Greenfields neuropathology*, 7th edn. Arnold, London pp325-430
- Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meo G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A (2000): French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in

- Parkinson's Disease: Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med.* 25;342(21):1560-1567.
- Macara IG, Baldarelli R, Field CM, Glotzer M, Hayashi Y, Hsu SC, Kennedy MB, Kinoshita M, Longtine M, Low C, Maltais LJ, McKenzie L, Mitchison TJ, Nishikawa T, Noda M, Petty EM, Peifer M, Pringle JR, Robinson PJ, Roth D, Russell SE, Stuhlmann H, Tanaka M, Tanaka T, Trimble WS, Ware J, Zeleznik-Le NJ, Zieger B (2002). Mammalian septins nomenclature. *Mol Biol Cell.* 13(12):4111-4113.
- Maldonado-Saldivia J, Funke B, Pandita RK, Schuler T, Morrow BE, Schorle H (2000). Expression of Cdcrel-1 (Pnut11), a gene frequently deleted in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome. *Mech Dev.* 96(1):121-124.
- Marazziti D, Golini E, Gallo A, Lombardi MS, Matteoni R, Tocchini-Valentini GP (1997). Cloning of GPR37, a gene located on chromosome 7 encoding a putative G-protein-coupled peptide receptor, from a human frontal brain EST library. *Genomics.* 45(1):68-77.
- Marder K, Tang MX, Mejia H, Alfaro B, Cote L, Louis E, Groves J, Mayeux R (1996). Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study. *Neurology.* 47(1):155-160.
- Martinat C, Shendelman S, Jonason A, Leete T, Beal MF, Yang L, Floss T, Abeliovich A (2004). Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: an ES- derived cell model of primary Parkinsonism. *PLoS Biol.* 2(11):e327.
- Martinez C, Sanjuan MA, Dent JA, Karlsson L, Ware J (2004). Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. *Biochem J.* 382(Pt 3):783-791.
- Marttila RJ, Rinne UK (1976). Dementia in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 54(5):431-441.
- Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, Li L, Eberhardt O, Gerhardt E, Cookson MR, Hernandez D, Farrer MJ, Kachergus J, Engelender S, Ross CA, Berger K, Schöls L, Schulz JB, Riess O, Krüger R. Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2003;12(11):1223-31.
- Mata IF, Kachergus JM, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Lynch T, Hulihan MM, Cobb SA, Wu RM, Lu CS, Lahoz C, Wszolek ZK, Farrer MJ (2005). Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease. *Neurogenetics.* 6(4):171-177.
- McKie JM, Sutherland HF, Harvey E, Kim UJ, Scambler PJ (1997). A human gene similar to *Drosophila melanogaster* peanut maps to the DiGeorge syndrome region of 22q11. *Hum Genet.* 101(1):6-12.
- McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2(8):589-594.

- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 16:1215-1216.
- Mitsumoto A, Nakagawa Y (2001). DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res.* 35(6):885-893.
- Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.
- Murakami T, Shoji M, Imai Y, Inoue H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Harigaya Y, Sasaki A, Takahashi R, Abe K. (2004). Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 55(3):439-42.
- Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T, Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kondo T (1998). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 44(3 Suppl 1):S99-109.
- Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T, Suda K, Mizuno Y (1998). Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology.* 51(3):890-892.
- Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H (1997). DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun.* 231(2):509-513.
- Neufeld TP, Rubin GM (1994). The Drosophila peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell.* ;77(3):371-379.
- Nyren P, Lundin A. (1985), Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal Biochem.* 151(2):504-509.
- Paisan Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez Tur J, Wood NW, Singleton AB (2004) Cloning of the Gene containing mutations that cause PARK 8 linked Parkinson's disease. *Neuron* 18;44(4):595-600.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T; Parkinson Study Group. (2003) Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet.* 72(4):1053-1057.
- Parkinson J (1817). An essay on the shaking palsy. Abdruck in: *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 14(2):223-236.
- Peng XR, Jia Z, Zhang Y, Ware J, Trimble WS (2002). The septin CDCrel-1 is dispensable for normal development and neurotransmitter release. *Mol Cell Biol.* 22(1):378-387.

- Piccini P, Burn DJ, Ceravolo R, Maraganore D, Brooks DJ (1999). The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann Neurol.* 45(5):577-582.
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q 21-q23. *Science* 274(5290):1197-1199.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chanrasekharappa S, Athanassidou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997). Mutations in the α -synuclein-gene identified in families with Parkinson's disease *Science* 267: 2045-2047
- Rajput AH, Rozdilsky B, Ang L (1991). Occurrence of resting tremor in Parkinson's disease. *Neurology.* 41(8):1298-1299.
- Rajput AH, Uitti RJ (1994). Parkinson's disease risk factors. *Neurology.* 44(8):1557-1558.
- Rezagui M, Susens U, Ignatov A, Gelderblom M, Glassmeier M, Franke I, Urny J, Imai Y, Takahashi R, Schaller HC (2006) The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein coupled receptor GPR37. *J Cell Sci* 119:542-549
- Riess O, Krüger R, Schöls L, Kösel S, Graeber MB (1999) Zur Genetik und Pathogenese des Morbus Parkinson *Deutsches Ärzteblatt* 96(43): 2739-2748
- Riess O, Krüger R (1999). Parkinson's disease--a multifactorial neurodegenerative disorder. *J Neural Transm Suppl.* 56:113-125.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Petterson B, Uhlen M, Nyren P (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242(1):84-89.
- Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281(5375):363-365.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis F (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sayre LM, Smith MA, Perry G (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem.* 8(7):721-738.
- Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, Medina M, Sharma N, Forno L, Ochiishi T, Shimura H, Sharon R, Hattori N, Langston JW, Mizuno Y, Hyman BT, Selkoe DJ, Kosik KS (2002). Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol.* 160(5):1655-1667.

- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science*. 293(5528):263-269.
- Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Pang CY, Chen SY, Hsin YL, Thajeb P, Lee YJ, Li H. (2005). Early-onset Parkinson's disease in a Chinese population: 99mTc-TRODAT-1 SPECT, Parkin gene analysis and clinical study. *Parkinsonism Related Disord*. 11(3):173-180.
- Singer TP, Ramsay RR. Mechanism of the neurotoxicity of MPTP (1990). An update. *FEBS Lett*. 274(1-2):1-8.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003). Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 302(5646):841.
- Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Müller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Krüger R. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2005;14(15):2099-111.
- Takahashi R, Imai Y (2003). Pael receptor, endoplasmic reticulum stress, and Parkinson's disease. *Neurol*. 250 Suppl3:III25-9
- Takahashi R (2004). Neurodegeneration caused by ER stress? *Nippon Yakurigaku Zasshi* 124(6):375-382
- Takahashi R (2006). The pathological role of Pael-receptor/GPR37 in AR-JP. *Parkinsonism Relat Disord* 12(Suppl2):110-113
- Thomas A, Iacono D, Luciano AL, Armellino K, Onofri M. (2003). Acute akinesia or akinetic crisis in Parkinson's disease. *Neurol Sci*. 24(3):219-220
- Tsai YC, Fishman PS, Thakor NV, Oyler GAParkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function (2003) *Biol Chem*. 278(24):22044-22055
- Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Albanese A, Wood NW (2001). Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet*. 68(4):895-900.
- Valente EM, Brancati F, Ferraris A, Graham EA, Davis MB, Breteler MM, Gasser T, Bonifati V, Bentivoglio AR, De Michele G, Durr A, Cortelli P, Wassilowsky D, Harhangi BS, Rawal N, Caputo V, Filla A, Meo G, Oostra BA, Brice A, Albanese A, Dallapiccola B, Wood NW; European Consortium on Genetic Susceptibility in

- Parkinson's Disease (2002). PARK6-linked parkinsonism occurs in several European families. *Ann Neurol.* 51(1):14-18.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 304(5674):1158-1160.
- Van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ, Testers L, Breedveld GJ, Horstink M, Sandkuijl LA, van Swieten JC, Oostra BA, Heutink P (2001). Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet.* 69(3):629-634.
- Vierregge P, Hagenah J, Heberlein I, Klein C, Ludin HP (1999). Parkinson's disease in twins: a follow-up study. *Neurology.* 11;53(3):566-572.
- Weir BS, Reynolds J, Dodds KG (1990) The variances of sample heterozygosity. *Theor Popul Biol.* 37(1):235-253
- Wintermeyer P, Krüger R, Kuhn W, Müller T, Voitalla D, Berg D, Becker G, Leroy E, Polymeropoulos M, Berger K, Przuntek H, Schöls L, Epplen JT, Riess O (2000). Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients. *Neuroreport* 11(10): 2079-2082
- Wszolek ZK, Cordes M, Calne DB, Munter MD, Cordes I, Pfeifer RF (1993). [Hereditary Parkinson disease: report of 3 families with dominant autosomal inheritance] *Nervenarzt.* 64(5):331-335.
- Wszolek ZK, Markopoulou K. Molecular genetics of familial parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 1999;5(4):145-55.
- Wszolek ZK, Gwinn-Hardy K, Wszolek EK, Muenter MD, Pfeiffer RF, Rodnitzky RL, Uitti RJ, McComb RD, Gasser T, Dickson DW (2002). Neuropathology of two members of a German-American kindred (Family C) with late onset parkinsonism. *Acta Neuropathol (Berl).* 103(4):344-350.
- Yagi M, Zieger B, Roth GJ, Ware J (1998). Structure and expression of the human septin gene HCDCREL-1. *Gene.* 212(2):229-236.
- Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y (1996). Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(7):2696-2701.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yébenes JG (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 55(2):164-173.
- Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the

degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(24):13354-13359.

Zhao J, Ren Y, Jiang Q, Feng J (2003). Parkin is recruited to the centrosome in response to inhibition of proteasomes. *J Cell Sci.* 116(Pt 19):4011-4019.

Zieger B, Hashimoto Y, Ware J (1997). Alternative expression of platelet glycoprotein Ib(beta) mRNA from an adjacent 5' gene with an imperfect polyadenylation signal sequence. *J Clin Invest.* 99(3):520-525.

Zieger B, Tran H, Hainmann I, Wunderle D, Zgaga-Griesz A, Blaser S, Ware J (2000). Characterization and expression analysis of two human septin genes, PNUTL1 and PNUTL2. *Gene.* 261(2):197-203.

Zimprich A, Muller-Myhsok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M, Lockhart P, Strongosky A, Kachergus J, Calne DB, Stoessl J, Uitti RJ, Pfeiffer RF, Trenkwalder C, Homann N, Ott E, Wenzel K, Asmus F, Hardy J, Wszolek Z, Gasser T. (2004) The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am J Hum Genet.* 74(1):11-19.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die beispielhaften Arbeitsbedingungen danke ich Herrn Prof. Dr. O. Rieß und Dr. P. Bauer.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere Silke Metzger für die hervorragende Betreuung und die überaus angenehme Zusammenarbeit.

Und natürlich danke ich Jens Schittenhelm für die geduldige Hilfe bei technischen Problemen.

Lebenslauf

Andrea Bob-Schittenhelm

Geburtsdatum	25.11.1976
Geburtsort	Lich (Kreis Gießen)
Wohnort	Tübingen
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder
Schulbildung	
1983-1987	Friedrich Kammerer GHS in Ehningen
1987-1996	Carlo-Schmid-Gymnasium, Tübingen Allgemeine Hochschulreife 1996
Ausbildung	
1998-2000	Kinderkrankenpflege-Ausbildung Universitätsklinikum Tübingen
Studium	
1997-1998	Studium Biologie und Theologie (Hauptschullehramt) an der Pädagogische Hochschule Karlsruhe
2000-2009	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen 2002 Ärztliche Vorprüfung 2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung 2006 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 22.06.2009 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung