



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE
BIOMETRIE UND STATISTIK

Aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. rer. biol. hum. Inke R. König

**Analyse von genetischen und funktionalen Modifikatoren des
Erkrankungsalters bei X-chromosomalem Dystonie-
Parkinsonismus**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Björn-Hergen Laabs
aus Essen

Lübeck Oktober 2021

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. biol. hum. Inke R. König

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

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.08.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
2 Einfluss einer Hexanukleotid-Wiederholungssequenz auf die Expressivität von X-chromosomalem Dystonie-Parkinsonismus	6
3 Genetische Modifikatoren der altersabhängigen Penetranz bei X-chromosomalem Dystonie-Parkinsonismus	12
4 Unterschiede der Hexanucleotid-Sequenzlänge in verschiedenen Gehirnregionen bei X-chromosomalem Dystonie-Parkinsonismus mittels Nanopore-Sequenzierung	19
5 Diskussion und Ausblick.....	23
Danksagungen	25
Lebenslauf.....	26
Publikationsverzeichnis	27

1 Einleitung

In der genetischen Epidemiologie bezeichnet reduzierte Penetranz das Phänomen, dass eine Krankheit bei einer Person nicht oder erst zeitlich verzögert auftritt, obwohl die Person einen nachweislich krankheitsverursachenden Genotyp trägt. So ist zum Beispiel bekannt, dass die Krankheit Chorea Huntington durch eine autosomal-dominant vererbte Elongation einer CAG-Wiederholungssequenz im *Huntingtin*-Gen ausgelöst wird. Dabei ist das Erkrankungsalter (engl.: age at onset, AAO) invers mit der Anzahl der Wiederholungen korreliert.

Eine weitere neurodegenerative Bewegungsstörung ist der X-chromosomale Dystonie-Parkinsonismus (XDP), welcher durch die Insertion eines ~2,6-kb SINE-VENTR-Alu (SVA) Retrotransposons in Intron 32 des *TAF1*-Gens auf dem X-Chromosom ausgelöst wird, jedoch eine sehr hohe Variabilität des Erkrankungsalters aufweist. Dabei ist bereits bekannt, dass das Erkrankungsalter bei XDP durch eine Wiederholungssequenz innerhalb des SVA Retrotransposons beeinflusst wird. Ähnlich wie bei Chorea Huntington zeigt sich auch bei XDP eine inverse Korrelation zwischen dem Erkrankungsalter und der Wiederholungszahl (engl.: repeat number, RN). Durch die Beschränkung der Krankheit auf einen geografisch relativ kleinen Bereich auf den Philippinen ergibt sich eine genetisch sehr homogene Studienpopulation, was XDP zu einer idealen Modellerkrankung zur Erforschung genetischer Mechanismen der altersabhängigen Penetranz macht.

Im Rahmen der Forschungsgruppe ProtectMove (DFG FOR 2488) wurde eine umfangreiche Erhebung der XDP Patient*innen auf den Philippinen durchgeführt, welche anschließend auf klinische und genetische Zusammenhänge mit dem Erkrankungsalter untersucht wurde.

Dabei wurde in der vorliegenden Studienpopulation zunächst in einer ersten Arbeit erneut der Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsalter und der Wiederholungszahl im *TAF1*-Gen untersucht. Ein besonderer Fokus lag dabei auf dem Einfluss der Wiederholungszahl auf die Expressivität, den Schweregrad und die *TAF1*-Expression. Anschließend wurde in einer weiteren Arbeit eine genomweite Assoziationsanalyse (GWAS) durchgeführt, um weitere genetische Faktoren zu ermitteln, die das Erkrankungsalter über die Wiederholungszahl hinaus beeinflussen. Zuletzt wurde in einer dritten Arbeit untersucht, ob sich die RN in Höhe und Variabilität zwischen dem Blut und verschiedenen

Gehirnregionen von zwei Patienten unterscheiden, um dadurch Anhaltspunkte für die pathologische Neurodegeneration in bestimmten Gehirnregionen von XDP Patient*innen zu finden.

2 Einfluss einer Hexanukleotid-Wiederholungssequenz auf die Expressivität von X-chromosomalem Dystonie-Parkinsonismus

Westenberger, A., Reyes, C. J., Saranza, G., Dobricic, V., Hanssen, H., Domingo, A., **Laabs, B.-H.**, Schaake, S., Pozojevic, J., Rakovic, A., Grütz, K., Begemann, K., Walter, U., Dressler, D., Bauer, P., Rolfs, A., Münchau, A., Kaiser, F. J., Ozelius, L. J., Jamora, R. D. G., Rosales, R. L., Diesta, C. C. E., Lohmann, K., König, I. R., Brüggemann N. & Klein, C. (2019) A Hexanucleotide Repeat Modifies Expressivity of X-Linked Dystonia Parkinsonism. *Annals of Neurology* 85:812-822

Einleitung

X-chromosomaler Dystonie-Parkinsonismus (XDP) ist eine schwere neurodegenerative Erkrankung, die sich als eine Kombination aus Dystonie und Parkinson präsentiert. Sie wird X-chromosomal rezessiv vererbt, wodurch hauptsächlich Männer betroffen sind. Dabei stammen alle Patient*innen von demselben genetischen Vorfahr ab, der vermutlich auf Panay Island (Philippinen) gelebt hat. Obwohl die krankheitsverursachende Mutation im *TAF1*-Gen nahezu volle Penetranz aufweist, liegt für das Erkrankungsalter (engl.: age at onset, AAO) eine sehr hohe Variabilität vor. Darüber hinaus treten normalerweise zunächst dystonieartige Symptome gefolgt von parkinsonartigen Symptomen auf. Es kann jedoch auch schon in frühen Stadien der Erkrankung zu parkinsonartigen Symptomen kommen. Abschließend ist auch die Zeit bis zur Generalisierung der Dystonie und damit die Schwere der Erkrankung sehr variabel.

Zuvor hatten zwei unabhängige Studien gezeigt, dass ein ~2,6-kb SINE-VENTR-Alu (SVA) Retrotransposons in Intron 32 des *TAF1*-Gens auf dem X-Chromosom einen funktionalen Effekt auf die Expression von *TAF1* hat. Dabei war die Wiederholungszahl (engl.: repeat number, RN) der Hexanukleotid-Sequenz innerhalb der SVA Insertion in einer Kohorte von 140 XDP-Patienten invers mit dem AAO korreliert.

In diesem Artikel wird nun neben dem Einfluss der RN auf das AAO auch die Art der Anfangssymptome (dystonieartig vs. parkinsonartig), Schweregrad von Dystonie oder Parkinsonismus und andere klinische Merkmale in der größten bis dahin erfassten Kohorte von XDP-Patient*innen untersucht.

Methoden

Studienpopulation und Klinische Untersuchung

Tabelle 1: Aufteilung der Studienpopulation nach verschiedenen Genotypen bezüglich der SVA Insertion.

Patient*innensubgruppe	Anzahl
Klinisch diagnostizierte XDP-Patienten	355
Heterozygote Mutationsträgerinnen	58
Klinisch unauffällige hemizygoter Mutationsträger	5
Homozygote Trägerinnen	1
Mosaik Turner-Syndrom	1

Insgesamt wurden in der vorliegenden Studie 420 Mutationsträger*innen eingeschlossen (Tabelle 1), deren RN über DNA aus Blutproben bestimmt wurde und die eine standardisierte neurologische Untersuchung durchliefen. Für 314 der 355 klinisch diagnostizierten XDP-Patienten war das AAO bekannt. Insgesamt waren 295 Patienten in keiner der vorangegangenen Studien eingeschlossen worden. Für 294 Patienten war bekannt, welche Art von Anfangssymptomen aufgetreten war und von den 249 Patienten, bei denen sich zuerst eine Dystonie manifestierte, war für 238 Patienten bekannt, in welchem Körperteil diese begann.

Bei einer Subgruppe von 28 Patienten wurden detaillierte Maße zum Schweregrad der Erkrankung erhoben. Dazu wurde die Schwere der Dystonie mit Hilfe des bewegungsbezogenen Teils der Burke-Fahn-Marsden Dystonia Rating Scale (BFMDRS) und der Schweregrad des Parkinson mit Hilfe der Unified Parkinson Disease Rating Scale Teil 3 (UPDRS-III) gemessen. Außerdem wurde für einige Patienten die Mini-Mental State Examination (MMSE) und die Frontal Assessment Battery (FAB) durchgeführt. Abschließend wurde für 31 Patienten das relative *TAF1* Expressionslevel gemessen.

Statistische Analysen

Für die 295 neu eingeschlossenen XDP-Patienten wurde der Zusammenhang zwischen RN und AAO mit Hilfe eines linearen Regressionsmodells untersucht. Um mögliche nichtlineare Effekte auszuschließen wurden darüber hinaus fraktionelle Polynome verwendet. Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen der Art der Anfangssymptome und der RN mittels logistischer Regression untersucht. Dabei wurde eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt, die die Stabilität des Effektes bei Adjustierung für das AAO untersucht. Für

die weitere Untersuchung der 28 Patienten, für die detaillierte klinische Daten vorlagen, wurden RN und AAO mittels eines U-Tests mit der Gesamtkohorte (n = 295) verglichen. Da in der genetisch homogenen Patient*innenkohorte von Verwandtschaft ausgegangen werden muss, wurden die ermittelten Effekte mit Hilfe generalisierter Schätzgleichungen (engl.: generalized estimation equations, GEE) validiert, welche Individuen der gleichen Familie als Datencluster betrachten. Darüber hinaus wurden die Pearson-Korrelationen zwischen RN und BFMDRS, UPDRS-III, MMSE und FAB geschätzt. Schließlich wurde der Zusammenhang zwischen RN und dem relativen *TAF1* Expressionslevel mit einer linearen Regression modelliert und erneut mit fraktionellen Polynomen auf nichtlineare Effekte untersucht. Um insgesamt das Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ einzuhalten, wurde für multiples Testen mittels der Bonferroni-Korrektur adjustiert. Dabei wurde von vier zentralen Hypothesen (Zusammenhang zwischen RN und (1) AAO, (2) Art der Anfangssymptome, (3) BFMDRS, sowie (4) *TAF1* Expressionslevel) ausgegangen, was zu einem adjustierten Signifikanzniveau von 0.0125 pro Hypothese führt. Alle darüber hinaus durchgeführten Analysen wurden deskriptiv interpretiert.

Ergebnisse

Die RN der 420 untersuchten Patient*innen lag zwischen 30 und 55 und folgte approximativ einer Normalverteilung (Abb. 1A). Das durchschnittliche Alter der 355 diagnostizierten XDP-Patienten betrug 46.9 Jahre (Standardabweichung = 9.7 Jahre), wohingegen das AAO zwischen 20 und 67 Jahren (Mittelwert = 41.8 Jahre, Standardabweichung = 8.7 Jahre) lag. Dabei waren AAO und RN in der Gruppe der 28 Patienten, für die detaillierte klinische Daten vorlagen, vergleichbar zur Gesamtkohorte.

Korrelation zwischen RN, AAO und Anfangssymptomen

Für den Zusammenhang zwischen RN und AAO ergab sich in 295 Patienten eine signifikante inverse Pearsonkorrelation ($r = -0.70$, $R^2 = 0.491$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$, Abb. 1B), wobei es keine Hinweise auf einen nichtlinearen Effekt gab. Aus der linearen Regression resultiert damit das lineare Modell:

$$\text{AAO} = 100.39 - 1.41 \times \text{RN},$$

welches bedeutet, dass das AAO mit jeder RN mehr im Durchschnitt um 1.41 Jahre sinkt. Darüber hinaus gibt $R^2 = 0.491$ an, dass mit diesem Modell 49.1% der Varianz im AAO erklärt werden können. Hierbei konnte der selbe Zusammenhang auch in den beiden Subgruppen (Abb. 1C und D) aufgeteilt nach Anfangssymptomatik beobachtet werden, wobei die Korrelation bei den Patienten mit dystonieartigen Anfangssymptomen im Vergleich etwas stärker war ($r = -0.73$). Darüber hinaus ergab sich aus der logistischen Regression zum Zusammenhang zwischen RN und anfänglicher Symptomatik ein OR von 0.89 (95% Konfidenzintervall [0.81; 0.97]), was in diesem Fall bedeutet, dass die Chance, parkinsonartige Anfangssymptome zu haben, mit jeder RN um 12% sinkt ($p = 0.00562$).

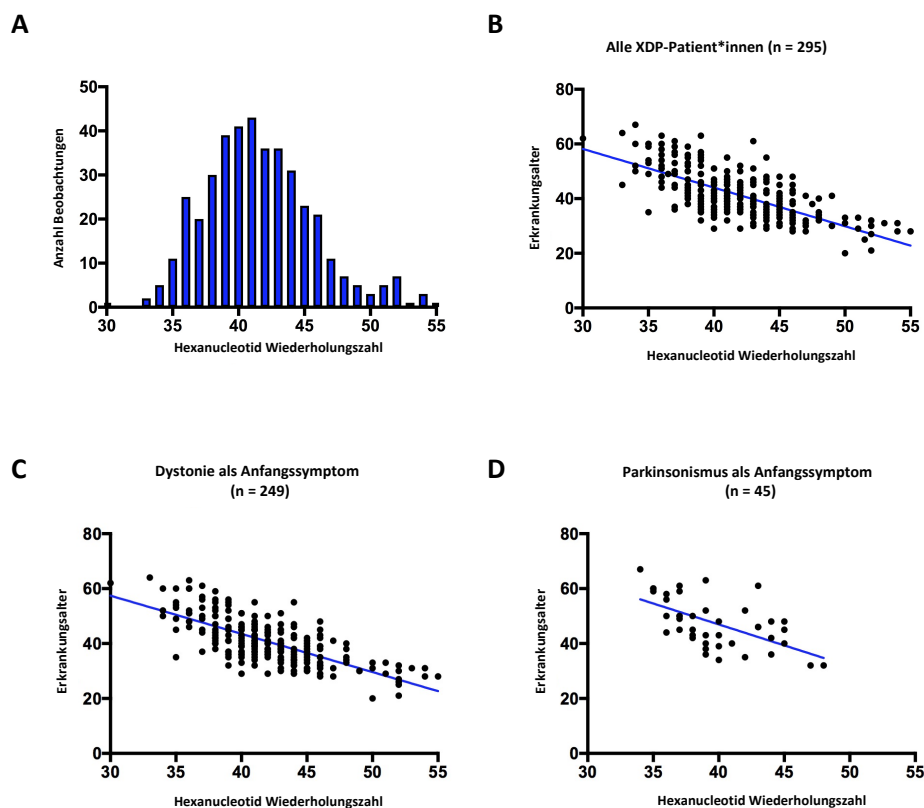


Abbildung 1: (A) Verteilung der RN unter 420 Mutationsträger*innen, Zusammenhang zwischen RN und AAO für (B) alle ($n = 295$) klinisch diagnostizierten XDP-Patienten, (C) XDP-Patienten mit dystonieartigen Anfangssymptomen ($n = 249$), (D) XDP-Patienten mit parkinsonartigen Anfangssymptomen ($n = 45$)

Da nach einer zusätzlichen Adjustierung für das AAO der Effekt der RN nicht länger signifikant ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt der RN auf die Anfangssymptome indirekt ist. Dabei beeinflusst die RN das AAO und das AAO wiederum

die Anfangssymptome. Alle gefundenen Effekte blieben auch bei Berücksichtigung der Verwandtschaftsverhältnisse stabil.

Korrelation zwischen RN, Schweregrad der Dystonie und anderen klinischen Parametern

In der Gruppe der 28 Patienten, für die detailliertere klinische Daten vorlagen, ergab sich eine positive Korrelation ($r = 0.51$, $p = 0.007$) von RN mit BFMDRS. Darüber hinaus konnten Hinweise auf Korrelationen mit den anderen klinischen Kennzahlen gefunden werden (UPDRS-III: $r = 0.40$, FAB: $r = -0.64$, MMSE: $r = -0.52$).

Korrelation zwischen RN und *TAF1* Expressionslevel

In einer Subgruppe aus 31 Patienten, für die das *TAF1* Expressionslevel (relativ zu *GAPDH* gemessen wurde, ergab sich eine negative Korrelation ($r = -0.54$, $p = 6.3 \times 10^{-4}$) zwischen dem Expressionslevel und der RN, was darauf hindeutet, dass eine höhere RN mit einer verringerten Expression von *TAF1* korreliert.

Diskussion

Lange Zeit wurden XDP Patient*innen als relativ homogene Gruppe angenommen, da sie vermutlich alle von einem gemeinsamen genetischen Vorfahr abstammen und unter sehr ähnlichen Umwelteinflüssen leben. Dies steht im deutlichen Widerspruch zu der hohen Variabilität in AAO und Expressivität der Erkrankung. In der größten bisher erfassten Kohorte von XDP Patient*innen konnte nun die RN innerhalb der SVA Insertion als genetischer Modifikator der altersabhängigen Penetranz von XDP bestätigt werden. Darüber hinaus konnten die Erkenntnisse darauf erweitert werden, dass die RN ebenso mit dem Schweregrad der Dystonie bzw. des Parkinson korreliert. Dabei konnte eine indirekte Assoziation der RN mit dem Schweregrad der Erkrankung über die Dauer der Erkrankung ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu konnte nachgewiesen werden, dass die Art der Anfangssymptome über das AAO indirekt von der RN abhängt. Interessanterweise konnte die inverse Korrelation zwischen einer RN und dem AAO bereits bei anderen neurodegenerativen Bewegungsstörungen wie Chorea Huntington und bestimmten Formen der spinocerebellären Ataxie beobachtet werden.

Bereits zuvor war bekannt, dass die *TAF1* Expression bei XDP-Patient*innen vermindert ist, was zu den pathogenen Veränderungen in bestimmten Hirnregionen führt. In dieser Studie

konnte nun jedoch nachgewiesen werden, dass die *TAF1* Expression ebenfalls invers mit der RN korreliert ist, was darauf hin deutet, dass diese RN den tatsächlichen Auslöser der verringerten Expression darstellt.

3 Genetische Modifikatoren der altersabhängigen Penetranz bei X-chromosomalem Dystonie-Parkinsonismus

Laabs, B.-H., Klein, C., Pozojevic, J., Domingo, A., Brüggemann, N., Grütz, K., Rosales, R. L., Jamora, R. D. G., Saranza, G., Diesta, C. C. E., Wittig, M., Schaake, S., Dulovic-Mahlow, M., Quismundo, J., Otto, P., Acuna, P., Go, C., Sharma, N., Multhaupt-Buell, T., Müller, U., Hanssen, H., Kilpert, F., Franke, A., Rolfs, A., Bauer, P., Dobricic, V., Lohmann, K., Ozelius, L. J., Kaiser, F. J., König, I. R. & Westenberger, A. (2021) Identifying genetic modifiers of age-associated penetrance in X-linked dystonia-parkinsonism. *Nature Communications* 12:3216.

Einleitung

X-chromosomaler Dystonie-Parkinsonismus (XDP) ist eine neurodegenerative Bewegungsstörung, die typischerweise im Erwachsenenalter beginnt und X-chromosomal rezessiv vererbt wird. Alle Patient*innen tragen dabei die selbe krankheitsverursachende ~2,6-kb SINE-VENTR-Alu (SVA) Retrotransposons Insertion in Intron 32 des *TAF1*-Gens auf dem X-Chromosom. Trotz der genetisch sehr eindeutigen Ursache der Erkrankung zeigen XDP Patient*innen eine sehr große Variabilität in Erkrankungsalter (engl.: age at onset, AAO), Verlauf und Schweregrad. Dabei können etwa 50% des AAO bereits durch die Wiederholungszahl (engl.: repeat number, RN) einer Hexanukleotidsequenz in der SVA Insertion erklärt werden. In dieser Studie wird eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) durchgeführt, um weitere genetische Faktoren zu ermitteln, die die altersabhängige Penetranz beeinflussen.

Methoden

Studienpopulation

Alle Individuen in der Studienpopulation stammen von den Philippinen. Von 458 männlichen XDP-Patienten, für die genomweit Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl: single nucleotide polymorphisms, SNPs) genotypisiert wurden, wurden acht wegen schlechter Datenqualität und 97 weitere aufgrund von enger Verwandtschaft zu den eingeschlossenen Patient*innen ausgeschlossen. Für die Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse wurde jeweils der paarweise Kinship-Koeffizient berechnet, welcher den genetischen Grad der Verwandtschaft schätzt. Anschließend wurden Paare mit einem Kinship-Koeffizienten größer gleich 0.125 (Cousin oder enger) als verwandt angenommen. Von jedem daraus resultierenden Familiencluster wurde die Person für die

Analysen ausgewählt, die die höchste Genotypisierungsrate aufwies. Durch dieses Vorgehen wurden 353 Patienten (von denen 332 bereits in früheren Studien enthalten waren) in der GWAS untersucht. Darüber hinaus wurden 37 später eingeschlossene XDP-Patienten und 162 gesunde philippinische Kontrollen für Post-GWAS Analysen herangezogen.

Genetische und statistische Analysen

RN und genomische DNA wurden aus dem Blut der Patient*innen bestimmt. Dabei wurde zur Genotypisierung das Infinium Global Screening Array von Illumina verwendet, welches insgesamt 645,896 SNPs enthält. Die 443,059 SNPs, welche nicht im Rahmen der Qualitätskontrolle (Genotypisierungsrate pro SNP > 98%, Häufigkeit des Alternativallels (engl.: minor allele frequency, MAF) > 1%, Genotypisierungsrate pro Individuum > 98%, Abweichung der Heterozygotie ≤ 5 SD) ausgeschlossen wurden, wurden mit SHAPEIT2 und IMPUTE2 mit Hilfe des öffentlichen Teils des HRC Referenz Panels imputiert, sodass der Datensatz insgesamt 39,083,699 Varianten enthielt. Darunter wiesen 4,990,999 SNPs eine MAF > 5% und einen Imputations-Informationen-Score > 0.3 auf. Diese wurden dann final für die GWAS herangezogen.

Um nun den Einfluss verschiedener genetischer Varianten auf das AAO zu bestimmen, wurde ein Ansatz verfolgt, der aus mehreren Schritten bestand. Zunächst wurde eine GWAS für das normalisierte AAO durchgeführt, um mögliche Kandidaten-SNPs zu identifizieren. Dabei wurde ein lineares Modell angewendet, welches die Genotypunsicherheit einbezieht, welche durch die Imputation entsteht. Dabei werden die SNP Effekte als additiv angenommen. Zusätzlich wurde die RN als Kovariable in das Modell eingeschlossen, damit nur genetische Varianten gesucht werden, die die Varianz im AAO erklären, die nicht auch schon durch die RN erklärt wird. Um Effekte durch Populationsstratifikation auszuschließen, wurden außerdem die ersten 10 Hauptkomponenten einer Hauptkomponentenanalyse auf unkorrelierten genetischen Daten hinzugefügt. Schließlich wurden alle Varianten mit einem p-Wert unter 5.0×10^{-8} als signifikant angenommen.

Da die so detektierten genetischen Varianten stark korreliert sein können, wurden die signifikanten Varianten anschließend mit einer bedingten Regression erneut analysiert, um so unabhängige Regionen unterscheiden zu können. Dabei wurden für jede Region die

Regressionskoeffizienten iterativ neu geschätzt, wobei das Modell jeweils für den SNP mit dem kleinsten p-Wert adjustiert wurde. Sind nach solch einer Adjustierung alle anderen p-Werte nicht mehr signifikant, kann davon ausgegangen werden, dass alle anderen Varianten in der Region mit dem selben Signal assoziiert sind. Andernfalls liegen in einer Region mehrere unabhängige Signale vor.

Ergebnisse

GWAS

Das durchschnittliche AAO der 353 eingeschlossenen klinisch bestätigten XDP-Patienten lag bei 41.8 (Standardabweichung = 8.4) mit einer Spanne von 21 bis 67 Jahren. Die durchschnittliche RN lag zwischen 30 und 55 (Mittelwert = 41.6, Standardabweichung = 4.1). Die RN zeigte eine inverse Pearson-Korrelation mit dem AAO ($r=-0.703$), welche etwa 50% der Variabilität des AAO erklärt. In der GWAS wiesen insgesamt 93 SNPs einen signifikanten p-Wert auf (Abb. 2A). Von diesen 93 SNPs lagen 60 in einer 0.33Mb Region auf Chromosom 5 (Abb. 2B) und die restlichen 33 in einer 0.04Mb Region auf Chromosom 7 (Abb. 2C). Von den 60 SNPs auf Chromosom 5 lagen 34 innerhalb des *MSH3*-Gens, während die übrigen in der Region zwischen *MSH3* und *DHFR*, sowie im *DHFR*-Gen selbst ($n = 4$) lagen. Dabei war die einzige kodierende Variante rs1650697 in Exon 1 von *MSH3*. Insgesamt wies der SNP rs245013 in Intron 12 von *MSH3* den kleinsten p-Wert auf und ist mit einer geschätzten Verringerung des AAO um 3.30 Jahre pro Alternativallel assoziiert (Abb. 3A). Die iterative bedingte Analyse der signifikanten SNPs auf Chromosom 5 ergab, dass einige weiterhin signifikant blieben, wenn das lineare Modell für rs245013 adjustiert wurde, wodurch von einem zweiten unabhängigen Signal auf Chromosom 5 ausgegangen werden muss. Von den 6 SNPs, die nach der Adjustierung signifikant blieben, wies rs33003 den kleinsten p-Wert auf und liegt in Intron 23 von *MSH3*. Diese Variante war mit einer geschätzten Verringerung des AAO um 3.19 Jahren pro Alternativallel assoziiert (Abb. 3B). Die 33 SNPs auf Chromosom 7 lagen in und zwischen den Genen *EIF2AK1* und *ANKRD61*, wobei der SNP mit dem kleinsten p-Wert (rs62456190) in Intron 11 von *EIF2AK1* liegt und mit einer Verzögerung des AAO um 3.82 Jahre pro Alternativallel assoziiert ist (Abb. 3C). Außerdem liegen die beiden Gene *AIMP2* und *PMS2* ebenfalls sehr nah an diesem Signal (Abb. 2C). Zusammengefasst lassen die Ergebnisse der GWAS und der anschließenden bedingten Analyse auf drei unabhängige genetische Modifikatoren für das AAO in XDP

schließen. Dabei erklären die drei SNPs mit den kleinsten p-Werten 13 % der Variabilität im AAO.

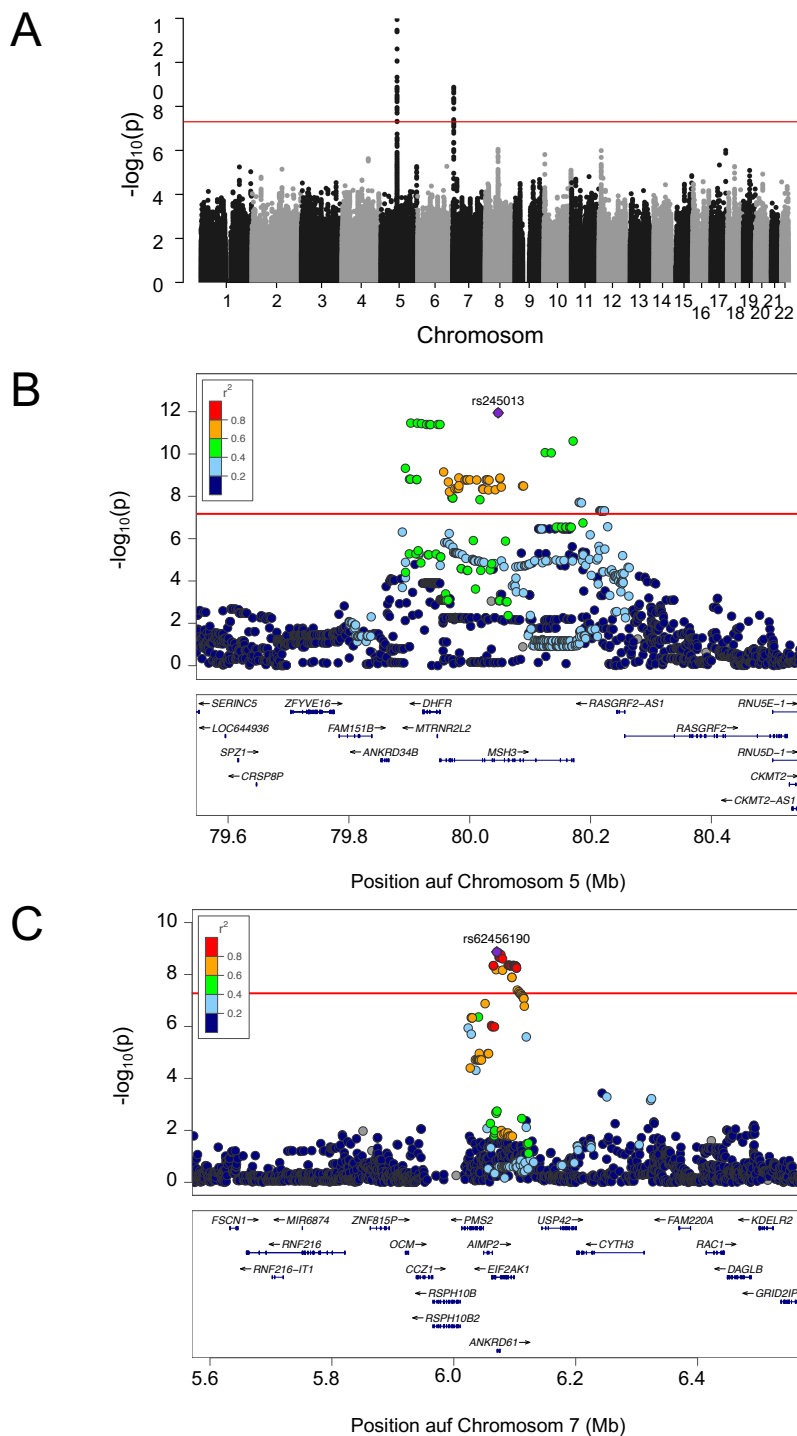


Abbildung 2: (A) Manhattan-Plot zur GWAS. Jeder Punkt entspricht dem $-\log_{10}(p)$ -Wert einer genetischen Variante in einem linearen Modell, welches das AAO schätzt und für RN und Populationsstratifikation adjustiert ist. Punkte über der roten Linie entsprechen einem p-Wert unter 5.0×10^{-8} und können somit als signifikant angenommen werden. (B) und (C) Locus-Zoom-Plots für die Regionen auf Chromosom 5 und 7.

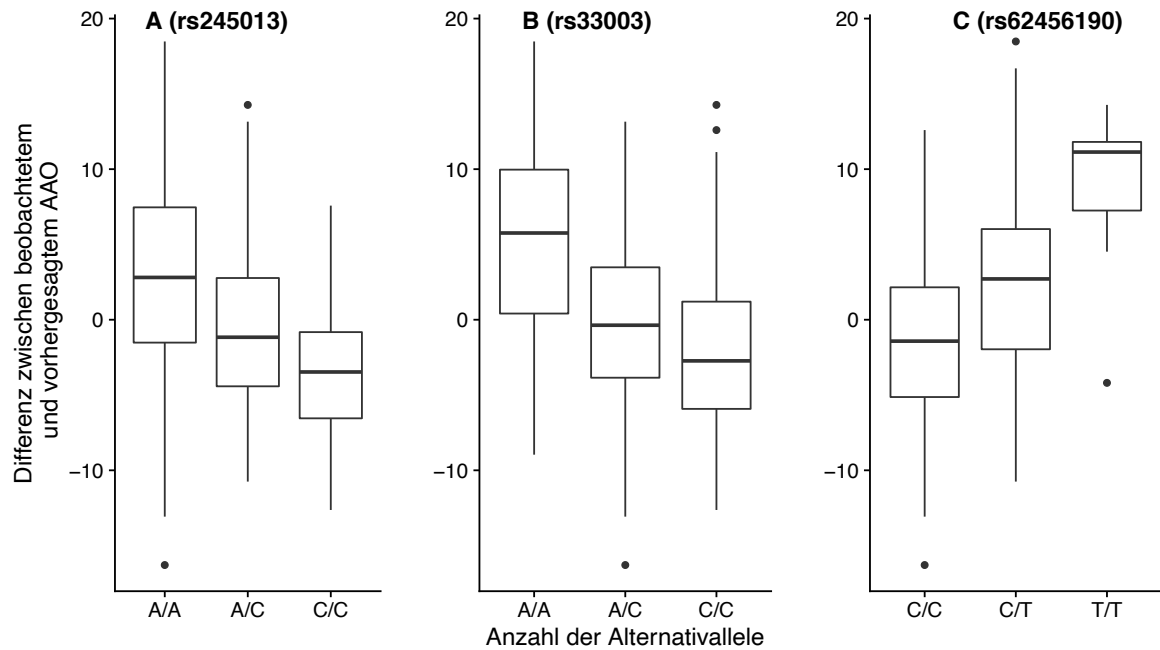


Abbildung 3: Effekte der drei Hauptvarianten. Die Boxen wurden anhand der drei möglichen Genotypen pro SNP aufgeteilt, während auf der y-Achse die Differenz zwischen geschätztem und beobachtetem AAO dargestellt ist, wenn man zur Schätzung des AAO nur die RN verwendet.

Analyse von weiteren Varianten in Exon 1 von *MSH3*

Da das stärkste Signal in der GWAS mit dem vorderen Abschnitt von *MSH3* assoziiert war, wobei hier die einzige kodierende Variante in Exon 1 lag, wurde dort nach weiteren Varianten gesucht. Dabei ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem AAO und einem Polymorphismus in der Länge einer spezifischen Sequenz in Exon 1 (Abb. 4A). Dieser Polymorphismus zeichnet sich im Vergleich zum Wildtyp (6a) entweder durch die Deletion (3a) zweier Teilsequenzen von 18 und neun Basenpaaren Länge oder durch die Duplikation (7a) einer neun Basenpaar langen Teilsequenz aus. Daraus ergibt sich in der Primärstruktur lediglich eine Deletion von neun beziehungsweise eine Duplikation von sechs Aminosäuren und keine Verschiebung des Leserasters. Interessanterweise konnte eine inverse Korrelation der Länge dieses Polymorphismus mit dem AAO beobachtet werden. So wiesen Patient*innen, die homozygot für die Duplikation (7a/7a) waren und somit das längste Allel aufwiesen, im Mittel ein etwa drei Jahre früheres AAO auf als Patient*innen, die homozygot für den Wildtyp (6a/6a) waren (Abb. 4C). Demgegenüber erkrankten Patient*innen, die den Genotyp 3a/6a haben, im Mittel etwa ein Jahr später als

erwartet. Da es insgesamt nur zwei Patient*innen gab, die homozygot für die Deletion (3a/3a) waren, musste diese Kategorie von der Analyse ausgeschlossen werden.

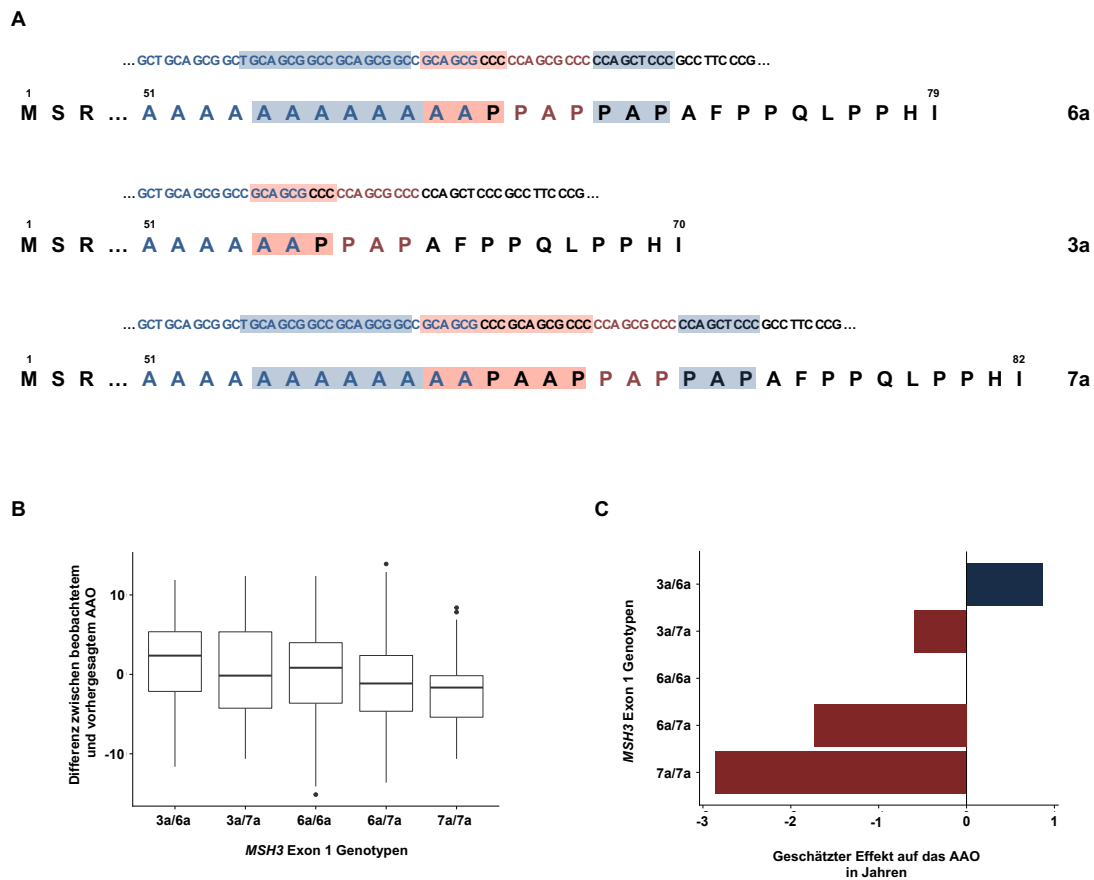


Abbildung 4: Effekt des Sequenzlängen-Polymorphismus in Exon 1 von *MSH3* auf das AAO. (A) Darstellung der drei möglichen Allele des Polymorphismus auf DNA- und Aminosäuren-Ebene. (B) Differenz zwischen beobachtetem AAO und geschätztem AAO auf Basis der RN für fünf beobachtete Genotypen. (C) Geschätzter Effekt der einzelnen Genotypen auf das AAO resultierend aus einem linearen Modell mit RN als weiterer Kovariable.

Diskussion

Obwohl die Penetranz der krankheitsverursachenden Mutation bei XDP als nahezu vollständig angenommen wird, sind in einem Alter von 30, 40, 50 und 60 Jahren erst 5%, 43%, 81%, 96% der Mutationsträger erkrankt. Etwa 50% der Variabilität im AAO können dabei durch ein SVA RN in *TAF1* auf dem X-Chromosom erklärt werden. Mit Hilfe einer GWAS konnten nun drei weitere unabhängige Loci entdeckt werden, die weitere 13% der Variabilität erklären, womit etwa zwei Drittel der gesamten Variabilität im AAO erklärt werden können. Dabei fällt auf, dass sowohl das Gen *MSH3*, in dem die ersten beiden

Signale lagen, als auch das Gen *PMS2*, welches sehr dicht an dem dritten Signal lag, Proteine kodieren, die in einem gemeinsamen Pfad zur Reparatur von Nichtübereinstimmungen bei der DNA Replikation miteinander interagieren. Dabei wurde bereits zuvor vermutet, dass dieser Reparaturmechanismus zu einer Instabilität in der RN bei Wiederholungssequenzen führen kann. In einer anderen Studie zeigten diese beiden Gene ebenfalls eine Assoziation mit dem AAO bei Chorea Huntington, bei der es sich ebenfalls um eine neurodegenerative Bewegungsstörung handelt, bei der das AAO durch eine Wiederholungssequenz beeinflusst wird. Insgesamt können weitere Parallelen zwischen Chorea Huntington und XDP gezogen werden. So betreffen beide im Gehirn hauptsächlich das Striatum, was auch bei Chorea Huntington zu dystonie- und parkinsonartigen Symptomen führen kann. Außerdem erkranken die meisten Patient*innen ebenfalls zwischen dem 40sten und 50sten Lebensjahr. Damit ergibt sich aus den hier gezeigten Ergebnissen nicht nur eine Relevanz für XDP, sondern durch die Parallelen zu Chorea Huntington auch für andere neurodegenerative Erkrankungen, die durch die Länge einer Wiederholungssequenz beeinflusst werden.

4 Unterschiede der Hexanucleotid-Sequenzlänge in verschiedenen Gehirnregionen bei X-chromosomalem Dystonie-Parkinsonismus mittels Nanopore-Sequenzierung

Reyes, C. J.* , Laabs, B.-H.* , Schaake, S., Lüth, T., Ardicoglu, R., Rakivic, A., Grütz, K., Alvarez-Fischer, D., Jamora, R. D. G., Rosales, R. L., Weyers, I., König, I. R., Brüggemann, N., Klein, C., Dobricic, V., Westenberger, A. & Trinh, J. (2021) Brain regional differences in hexanucleotide repeat length in X-linked dystonia-parkinsonism using nanopore sequencing. *Neurology Genetics* 7:1

Einleitung

X-chromosomaler Dystonie Parkinsonismus (XDP) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die durch schnell voranschreitende Dystonie und Parkinsonismus geprägt ist. Einzigartig für Individuen, die philippinischer Abstammung sind, wird XDP durch eine einzelne SINE-VENTR-Alu (SVA) Retrotransposons Insertion im *TAF1*-Gen ausgelöst. Diese Mutation verringert die *TAF1* Expression, was wahrscheinlich zu einer Degeneration der Basalganglien führt. Daher wird XDP schon lange als Modellkrankheit dafür betrachtet, wie die Pathologie der Basalganglien zu Dystonie und Parkinsonismus führt. Neben der Verkümmernung des Striatums weisen bildgebende Verfahren darauf hin, dass auch andere Hirnregionen wie der Kortex und das Kleinhirn betroffen sein könnten.

Darüber hinaus legen neuere Studien nahe, dass XDP genetische Gemeinsamkeiten mit anderen Krankheiten aufweist, die durch Wiederholungshäufigkeit spezifischer Mikrosatelliten bestimmt werden, wie zum Beispiel Chorea Huntington, bestimmte Formen der spinocerebellären Ataxie und mehr als 20 weitere Erkrankungen. Genauer wurde berichtet, dass die Länge der Hexanukleotidsequenz innerhalb des SVA Retrotransposons im *TAF1*-Gen ein genetischer Modifikator für die Expressivität von XDP ist. Je länger dabei die Wiederholungssequenz ist, desto schwerer ist der zu erwartende Krankheitsverlauf und desto früher ist das Erkrankungsalter. Weiter zeigt die Wiederholungszahl (engl.: repeat number, RN) eine somatische Variabilität, was die Möglichkeit eröffnet, dass die RN in bestimmten Hirnregionen höher liegt, was zur selektiven Neurodegeneration beitragen könnte. Daher wurde diese Studie durchgeführt, um die regionalen Unterschiede der RN mit dem neuronalen Verlust zu vergleichen, der bei XDP beobachtet werden kann.

Methoden

Genetische Analysen

Um den Zusammenhang zwischen RN Unterschieden und der Neurodegeneration bei XDP weiter zu untersuchen, wurde genomische DNA aus Blut- und Hirnproben von zwei verstorbenen XDP-Patienten genommen. Darin wurde die Hexanukleotid RN mit vier verschiedenen Methoden gemessen: (1) Fragmentanalyse, (2) stark verdünnter PCR (engl.: small-pool PCR, SP-PCR) verbunden mit einem Southern-Blot-Hybridisierungsverfahren, (3) Cas9 basierter Nanopore Sequenzierung und (4) PCR basierter Nanopore Sequenzierung.

Statistische Analysen

Die RNs von verschiedenen Geweben wurden innerhalb einer einzelnen Person mit statistischen Tests verglichen. Pro Gewebeart zeigte die RN eine Abweichung von einer Normalverteilung und wies unterschiedliche Varianzen auf, sodass die mediane RN zwischen den Geweben mit Hilfe der Median-Tests nach Mood verglichen wurde. Um dem multiplen Testproblem gerecht zu werden, wurde ein Signifikanzniveau von 5% pro Patient und Genotypisierungsart festgelegt, woraus sich vier unabhängige Analysen ergeben (SP-PCR für L-10322, SP-PCR für L-7995, Cas9 Nanopore für L-7995 und PCR Nanopore Sequenzierung für L-7995). Aus den verschiedenen Gewebearten pro Analyse ergibt sich ein adjustiertes Signifikanzniveau von $0.05/5 = 0.01$ für den Patient L-7995 bei der Southern-Blot Hybridisierung (Blut vs. Hypophyse, Kleinhirn, Mittelhirn, Kortex und Basalganglien) und $0.05/2 = 0.025$ bei Patient L-10322 (Blut vs. Kortex und Basalganglien) und L-7995 bei der Nanopore-Sequenzierung (Blut vs. Kleinhirn und Basalganglien). Darüber hinaus wurden Boxplots verwendet, um die Verteilung der RN in den verschiedenen Gewebearten zu visualisieren, wohingegen Quartilsstreuungskoeffizienten (engl.: quartile coefficient of dispersion, QCD) und die korrespondierenden 95%-Konfidenzintervalle berechnet wurden, um die Interquartilsspannen relativ zu den Verteilungsmedianen vergleichen zu können.

Ergebnisse

Die Standard-Fragmentanalyse identifizierte eine RN von 41 Wiederholungen für den Patient L-10322 und 45 für Patient L-7995. Allerdings zeigte die SP-PCR bereits die Heterogenität der RN über alle Gewebearten in beiden Patienten hinweg. Im speziellen war die mediane RN für L-10322 in den Basalganglien ($p = 4 \times 10^{-7}$) und Cortex ($p = 1.83 \times 10^{-4}$) signifikant höher als im Blut (Abb. 5A). Diese Beobachtung war konsistent bei den RNs für L-7995, sowohl für die SP-PCR (Abb. 5B) als auch für die Cas9 basierte Nanopore-Sequenzierung (Abb. 5C) und die PCR basierte Nanopore-Sequenzierung (Abb. 5D).

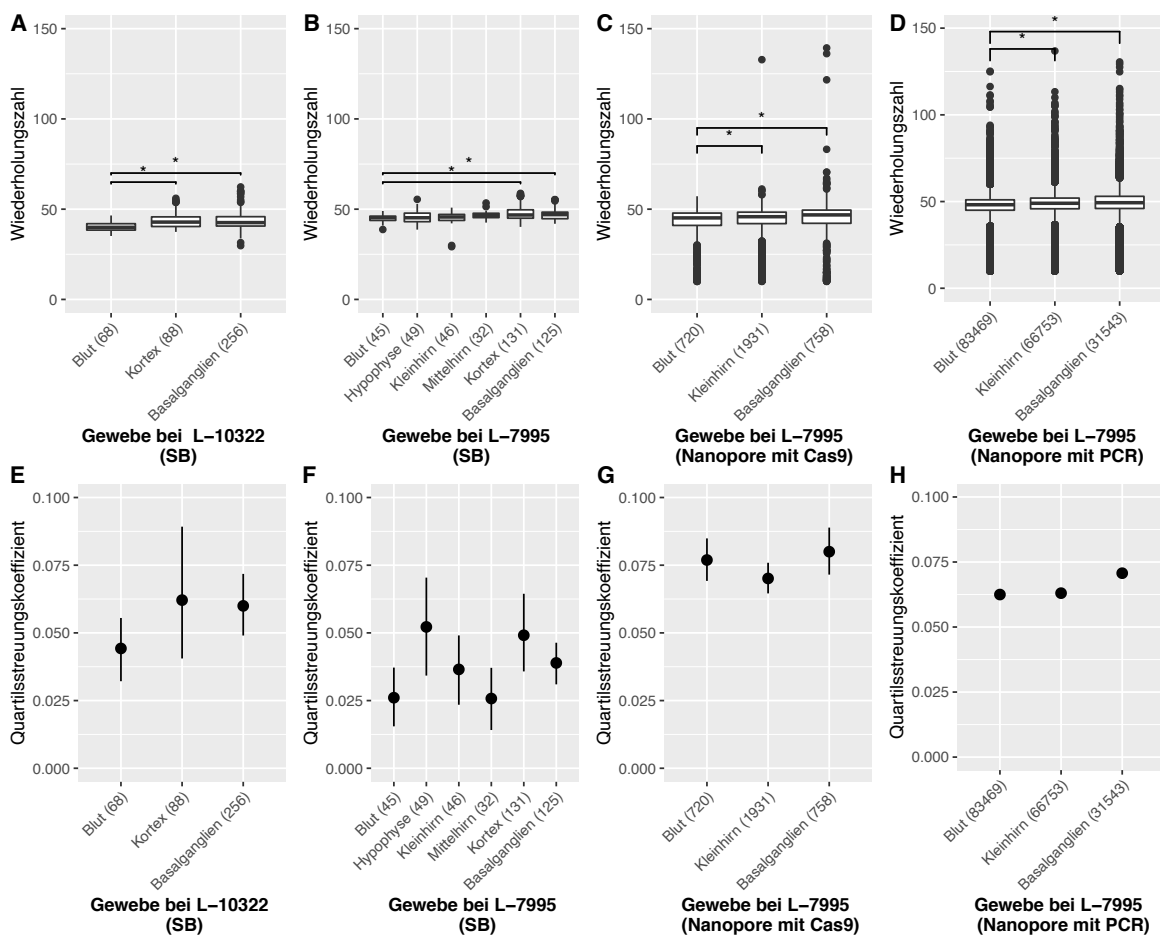


Abbildung 5: Die RNs für L-10322 (A) und L-7995 (B) gemessen mit der Southern-Blot Hybridisierung, sowie für L-7995 mittels Cas9 basierter Nanopore-Sequenzierung (C) und PCR basierter Nanopore-Sequenzierung (D) werden als Boxplots dargestellt. Anschließend wurden die korrespondierenden QCDs als Punktschätzer mit Konfidenzintervall (E) - (H) dargestellt.

Verglichen mit dem Blut ergaben sich für die Basalganglien und den Cortex für L-10322 aus der Southern-Blot Hybridisierung höhere QCDs (Abb. 5E). Demgegenüber ergaben sich bei L-7995 für alle Gehirnregionen außer das Mittelhirn höhere QCDs als im Blut (Abb. 5F). Bei

der Cas9 basierten Nanopore-Sequenzierung ergab sich in den Basalganglien ein höherer QCD als im Blut, obwohl das Kleinhirn sogar einen geringeren QCD aufwies (Abb. 5G). Demgegenüber ergaben sich bei der PCR basierten Nanopore-Sequenzierung sowohl für das Kleinhirn als auch für die Basalganglien höhere QCDs als im Blut (Abb. 5H)

Diskussion

Neben dem striatalen Volumenverlust in den Basalganglien weisen XDP Patient*innen einen Volumenverlust der grauen Materie im Kleinhirn und eine leichte Reduktion der kortikalen Dicke auf, was mit kognitiven Dysfunktionen in Verbindung gebracht wird. Daher ist es bemerkenswert, dass in dieser Studie mit zwei Patienten sowohl in den Basalganglien als auch im Cortex höhere mediane RNs und eine stärkere Instabilität der RN nachgewiesen werden konnten als im Blut. Weiter konnten die Ergebnisse sowohl mittels Southern-Blot Hybridisierung als auch mit zwei verschiedenen Varianten der Nanopore-Sequenzierung beobachtet werden. Bei Chorea Huntington konnte ebenfalls eine Variabilität der RN beobachtet werden, wobei auch hier RN und Instabilität der RN in den Gehirnregionen am höchsten war, die neuropathologisch am stärksten betroffen waren.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit die Anwendungsmöglichkeiten der Nanopore-Sequenzierung auf die Detektion von Wiederholungsinstabilitäten erweitern, wodurch weitere Hinweise darauf erbracht werden konnten, dass die Instabilität der RN bei XDP abhängig von der betrachteten Gehirnregion ist. Dabei war es durch die Betrachtung von nur zwei Patienten nicht möglich, den genauen Beitrag der Instabilität zum charakteristischen Muster des neuronalen Zelltodes bei XDP zu bestimmen. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass die Instabilität in den hauptsächlich betroffenen Gehirnregionen deutlicher auftritt, was auf eine zentrale Rolle bei den bisher nicht vollständig aufgeklärten pathogenen Prozessen hindeuten könnte, die zur Neurodegeneration bei XDP führt. Damit ergibt sich für die Instabilität ein mögliches therapeutisches Potenzial bei der Behandlung von XDP.

5 Diskussion und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss der RN auf die Expressivität von XDP-Patient*innen in der größten bis dahin gesammelten Studienpopulation untersucht. Dabei konnte der bereits bekannte Zusammenhang zwischen RN und AAO repliziert werden, welcher etwa 50% des AAO erklärt. Weiter konnte dieser Effekt auch in zwei Subgruppen nachgewiesen werden, die durch die Anfangssymptomatik (Parkinson oder Dystonie) bestimmt wurden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die RN zwar das AAO, das AAO wiederum aber einen Einfluss auf die Anfangssymptomatik hat, sodass die Chance, parkinsonartige Anfangssymptome zu haben, in jüngeren Jahren größer ist. Außerdem konnte in einer kleinen Subgruppe von Patienten mit ausführlichen klinischen Daten beobachtet werden, dass Patienten mit einer höheren RN auch zu einem schwereren Verlauf der Krankheit neigen. Schließlich ergab sich eine negative Korrelation zwischen der RN und der Expression von *TAF1*, was eine Ursache für die pathogenen Veränderungen in bestimmten Gehirnregionen sein könnte.

Im zweiten Teil wurde in dieser Studienpopulation eine GWAS durchgeführt, um weitere genetische Modifikatoren des AAO zu entdecken. Dabei ergaben sich trotz der sehr geringen Fallzahl signifikante Ergebnisse, was zum einen auf relativ große Effekte schließen lässt, zum anderen aber auch durch die außergewöhnlich homogene Studienpopulation begünstigt wird. Hierbei konnten drei unabhängige Signale beobachtet werden, welche zusammen weitere 15% der Variabilität im AAO von XDP-Patient*innen erklären. Dabei ist besonders bemerkenswert, dass diese Signale mit den Genen *MSH3* und *PMS2* in Verbindung gebracht werden können, die in einem gemeinsamen genetischen Pfad liegen, welcher an der DNA-Replikation beteiligt ist. Dieser Pfad steht in dem Verdacht, zu Instabilitäten bei der Vervielfältigung von Wiederholungsequenzen zu führen, welche die pathogenen Mechanismen bei XDP zusätzlich verstärken könnte. Weitere Hinweise darauf ergeben sich auch aus der Huntington-Forschung, in der kürzlich der selbe Polymorphismus in Exon 1 von *MSH3* mit dem AAO in Verbindung gebracht werden konnte, wie nun bei XDP.

Damit ergeben sich nun neben *TAF1* auch *MSH3* und *PMS2* als mögliche Ansätze zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung von XDP.

Im dritten Teil wurde schließlich die Instabilität der RN in verschiedenen Gehirnregionen untersucht. Dabei ergaben sich erneut Parallelen zu Chorea Huntington, wo ebenfalls sowohl die RN selbst als auch die Instabilität der RN in den hauptsächlich betroffenen Gehirnregionen höher liegt als im Blut oder anderen Gehirnregionen. Aufgrund der limitierten Anzahl von Patient*innen konnten hier die funktionalen Zusammenhänge noch nicht abschließend geklärt werden.

Aus allen Teilen dieser Arbeit ergeben sich verschiedene Anknüpfungspunkte für zukünftige Forschungsprojekte. Die Analyse des Einflusses der RN hat gezeigt, dass die RN nicht nur einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der Patient*innen hat, sondern auch die Expressivität der Erkrankung beeinflusst. Eine ausführlichere klinische Untersuchung der Patient*innen könnte genutzt werden, um detailliertere Erkenntnisse über den Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von der RN zu erhalten. Die Ergebnisse der GWAS könnten genutzt werden, um einen genetischen Risikoscore (engl.: polygenic risk score, PRS) zu entwickeln, mit dem das Erkrankungsalter der Patient*innen genauer vorhergesagt werden könnte. Mit Hilfe eines solchen PRS könnte außerdem die genetische Überlappung mit anderen neurodegenerativen Bewegungserkrankungen, für die bereits PRS entwickelt wurden, weiter untersucht werden. Darüber hinaus könnte Nanopore Sequenzierung dazu eingesetzt werden, die Instabilität der RN im Blut einer deutlich größeren Studiengruppe zu bestimmen, um sowohl den Zusammenhang zwischen *MSH3* und der Instabilität als auch den Effekt der Instabilität auf das AAO genauer zu untersuchen. Schließlich wurden in den bisherigen Analysen lediglich unabhängige Effekte untersucht. Es ist aber davon auszugehen, dass diese Effekte ebenfalls miteinander interagieren. So könnte der Effekt der *MSH3/PMS2* Varianten von der RN abhängen. Hier könnten interpretierbare Methoden des maschinellen Lernens dazu eingesetzt werden, deutlich komplexere Modelle mit einer höheren Vorhersagegenauigkeit zu entwickeln.

Danksagungen

Diese Arbeit hätte ohne die Unterstützung von verschiedenen Personen und Institutionen nicht zustande kommen können. Die zugrundeliegende Fragestellung ergab sich dabei aus der DFG-geförderten Forschungsgruppe ProtectMove. Allen Beteiligten der Forschungsgruppe gilt dabei mein Dank für die konstruktive und zielführende Zusammenarbeit. Weiter möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. rer. biol. hum. Inke R. König danken, die mich in den letzten vier Jahren als Doktorand betreut hat. Dabei stand sie mir stets mit fachlichem Rat zur Seite und gab mir als Doktorand dennoch die nötigen Freiheiten, die ersten Schritte einer wissenschaftlichen Karriere zu beschreiten. Zum Abschluss gilt mein Dank natürlich meiner Familie und meiner Partnerin, die mich stets in dem Bestreben des Promovierens unterstützt und angetrieben haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Björn-Hergen Laabs
Geburtsdatum 04.10.1992
Geburtsort Essen



Berufliche Tätigkeiten:

seit 2017 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Institut für Medizinische Biometrie und Statistik
Universität zu Lübeck
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

2013 – 2017 **Hilfswissenschaftler**
Institut für Medizinische Biometrie und Statistik
Universität zu Lübeck
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Studium:

seit 2017 **Promotionsstudium**
Genetische Epidemiologie
Universität zu Lübeck

2015 – 2017 **Master of Science**
Mathematik in Medizin und Lebenswissenschaften
Vertiefung Genetische Statistik
Universität zu Lübeck

2012 – 2015 **Bachelor of Science**
Mathematik in Medizin und Lebenswissenschaften
Universität zu Lübeck

Tätigkeiten in wissenschaftlichen Fachgesellschaften

seit 2021 **Stellvertretender AG-Leiter**
AG Nachwuchs
Deutsche Region der Internationalen Biometrischen Gesellschaft

Publikationsverzeichnis

Zeitschriftenartikel

- [1] Balck, A., Schaake, S., Kuhnke, N. S., Domingo, A., Madoev, H., Margolesky, J., Dobricic, V., Alvarez-Fischer, D., **Laabs, B.-H.**, Kasten, M., Lou, W., Nicolas, G., Marras, C., Lohmann, K., Klein, C. & Westenberger, A. (2021) Genotype-phenotype relations in primary familial brain calcification: Systematic MDSGene review. *Movement Disorders* 2021.
- [2] Peters, T., Antel, J., Naresh, R., **Laabs, B.-H.**, Föcker, M., Albers, N., Bühlheimer, J., Hinney, A., Libuda, L. & Hebebrand, J. (2021) Suggestive evidence for causal effect of leptin levels on risk for anorexia nervosa: Results of a Mendelian randomization study. *Frontiers in Genetics* 12:733606.
- [3] Libuda, L., Naresh, R., Ludwig, C., **Laabs, B.-H.**, Antel, J., Föcker, M., Hebebrand, J., Hinney, A. & Peters, T. (2021) A Mendelian randomization study on causal effects of 25(OH)vitamin D levels on attention deficit/hyperactivity disorder. *European Journal of Nutrition* 60(6): 1-11
- [4] Reyes, C. J., **Laabs, B.-H.**, Schaake, S., Lüth, T., Ardicoglu, R., Rakovic, A., Grütz, K., Alvarez-Fischer, D., Jamora, R. D. G., Rosales, R. L., Weyers, I., König, I. R., Brüggemann, N., Klein, C., Dobricic, V., Westenberger, A. & Trinh, J. (2021) Brain regional differences in hexanucleotide repeat length in X-linked dystonia-parkinsonism using nanopore sequencing. *Neurology Genetics* 7(4):1
- [5] **Laabs, B.-H.**, Klein, C., Pozojevic, J., Domingo, A., Brüggemann, N., Grütz, K., Rosales, R. L., Jamora, R. D., Saranza, G., Diesta, C. C. E., Wittig, M., Schaake, S., Dulovic-Mahlow, M., Quismundo, J., Otto, P., Acuna, P., Go, C., Sharma, N., Multhaupt-Buell, T., Müller, U., Hanssen, H., Kilpert, F., Franke, A., Rolfs, A., Bauer, P., Dobricic, V., Lohmann, K., Ozelius, L. J., Kaiser, F. J., König, I. R. & Westenberger, A. (2021) Identifying genetic modifiers of age-associated penetrance in X-linked dystonia-parkinsonism. *Nature Communications* 12:3216.
- [6] Krause C., Schaake, S., Grütz, K., Sievert, H., Reyes, C. J., König, I. R., **Laabs, B.-H.**, Jamora, R. D. G., Rosales, R. L., Diesta, C. C. E., Pozojevic, J., Gemoll, T., Westenberger, A., Kaiser, F. J., Klein, C. & Kirchner, H. (2020) DNA methylation as a potential molecular mechanism in X-linked dystonia-parkinsonism. *Movement Disorders* 35(12): 2220--2229
- [7] Peters, T., Nüllig, L., Antel, J., Naresh, R., **Laabs, B.-H.**, Tegeler, L., Amhaouach C., Libuda, L., Hinney, A. & Hebebrand, J. (2020) The role of genetic variation of BMI, body composition, and fat distribution for mental traits and disorders: A look-up and Mendelian randomization study. *Frontiers in Genetics* 11:373

- [8] Libuda, L., **Laabs, B.-H.**, Ludwig, C., Bühlmeier, J., Antel, J., Hinney, A., Naresh, R., Föcker, M., Hebebrand, J., König, I. R. & Peters, T. (2019) Vitamin D and the risk of depression: A causal relationship? Findings from a Mendelian randomization study. *Nutrients* 11(5):1085
- [9] Westenberger, A., Reyes, C. J., Saranza, G., Dobricic, V., Hanssen, H., Domingo, A., **Laabs, B.-H.**, Schaake, S., Pozojevic, J., Rakovic, A., Grütz, K., Begemann, K., Walter, U., Dressler, D., Bauer, P., Rolfs, A., Münchau, A., Kaiser, F. J., Ozelius, L. J., Jamora, R. D., Rosales, R. L., Diesta, C. C. E., Lohmann, K., König, I. R., Brüggemann N. & Klein, C. (2019) A hexanucleotide repeat modifies expressivity of X-linked dystonia parkinsonism. *Annals of Neurology* 85:812--822

Konferenzvorträge

- [10] **Laabs, B.-H.** & König I. R. (2021) Identification of representative trees in random forests based on a new tree-based distance measure. *67. Biometrisches Kolloquium* Münster, Deutschland (Online).
- [11] **Laabs, B.-H.**, Westenberger A. & König I. R. (2021) Identification of representative trees in random forests based on a new tree-based distance measure. *66. GMDS-Jahrestagung und 12. TMF-Jahreskongress*, Deutschland (Online).
- [12] **Laabs, B.-H.**, Westenberger A. & König I. R. (2021) Identification of representative trees in random forests based on a new tree-based distance measure. *Workshop "Biometrical Aspects in Genome Analysis XIV"*, Deutschland (Online).

Konferenzposter

- [13] **Laabs, B.-H.**, Westenberger A. & König I. R. (2021) Identification of representative trees in random forests based on a new tree-based distance measure. *International Genetic Epidemiology Society 2021 Annual Virtual Meeting*, USA (Online).
- [14] **Laabs, B.-H.**, Wright, M. N., Thiele, D. & König, I. R. (2019) Maxchisq - A new R package for maximally selected χ^2 -statistics. *DAGStat 2019* München, Deutschland
- [15] **Laabs, B.-H.** & König, I. R. (2018) Genome-wide haplotype association studies: Comparison of novel methods. *IGES 2018* San Diego, CA, USA
- [16] **Laabs, B.-H.**, Wright, M. N. & König, I. R. (2018) Maximally selected χ^2 -statistics in random forests for classification. *64. Biometrisches Kolloquium* Frankfurt, Deutschland