



Aus der Klinik für Neurologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. D. Kömpf  
und  
aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. E. Schwinger

---

**Molekulargenetische Untersuchung des  
*DJ1*- und *Parkin*-Gens bei Patienten  
mit Parkinson-Syndrom**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

**Nora Johanna Schäfer**  
aus Hamburg

Lübeck 2006

**1. Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. habil. Peter P. Pramstaller

**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. rer. nat. Stefan Anemüller

**Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2006**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.10.2006**

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Parkinson-Krankheit und Parkinson-Syndrom . . . . .	1
1.2	Populationsgenetik . . . . .	3
1.3	Genetik des Parkinson-Syndroms . . . . .	4
1.3.1	<i>DJ1</i> -assoziiertes Parkinson-Syndrom . . . . .	5
1.3.2	<i>Parkin</i> -assoziiertes Parkinson-Syndrom . . . . .	8
1.3.3	Pathogenese des Parkinson-Syndroms . . . . .	9
1.4	Die denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits- Chromatographie (dHPLC)-Analyse . . . . .	12
1.4.1	Das <i>Transgenomic-Wave</i> ®-System . . . . .	12
1.4.2	Das Prinzip der dHPLC . . . . .	12
1.5	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe . . . . .	14
1.6	Ziele . . . . .	14
<b>2</b>	<b>PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1	Patienten . . . . .	16
2.1.1	Zusammensetzung des Kollektivs . . . . .	16
2.2	Methoden . . . . .	17
2.2.1	Präparation genomischer DNS . . . . .	17
2.2.2	Konzentrationsbestimmung von DNS . . . . .	18

2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	19
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese und Gelelution . . . . .	24
2.2.5	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) . . . . .	26
2.2.6	Sequenzierung . . . . .	28
2.2.7	Denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits- Chromatographie (dHPLC)-Analyse . . . . .	30
2.2.8	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) . . . . .	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1	Patienten . . . . .	32
3.2	Etablierung der dHPLC-Analyse zur Detektion von Sequenzvariationen im <i>DJ1</i> -Gen . . . . .	33
3.2.1	Optimierung der Analyse-Temperaturen . . . . .	33
3.2.2	Optimierung der Zeitverschiebung . . . . .	36
3.2.3	dHPLC-Analysebedingungen des <i>DJ1</i> -Gens . . . . .	37
3.3	Mutationsanalyse des <i>DJ1</i> - und des <i>Parkin</i> -Gens . . . . .	38
3.3.1	Detektion von <i>DJ1</i> -Mutationen . . . . .	38
3.3.2	Detektion von <i>Parkin</i> -Mutationen . . . . .	44
3.3.3	Übersicht der Ergebnisse der Mutationsanalyse . . . . .	48
3.4	Restriktionsanalyse . . . . .	49
3.4.1	Beschreibung des Kontrollkollektivs . . . . .	49
3.4.2	Ergebnisse der Restriktionsanalyse . . . . .	49
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
4.1	Bewertung der Methoden . . . . .	51
4.2	Mutationen im <i>DJ1</i> -Gen . . . . .	52
4.2.1	Bekannte und neue <i>DJ1</i> -Mutationen . . . . .	52
4.2.2	Verteilung und Häufigkeit von <i>DJ1</i> -Mutationen . . . . .	54

4.2.3	Verteilung und Häufigkeit von <i>DJ1</i> -Mutationen - Eigene Ergebnisse	55
4.2.4	Auswirkung der identifizierten Mutationen auf das <i>DJ1</i> -Protein . . .	56
4.2.5	Die Arg98Gln (R98Q) -Variation im <i>DJ1</i> -Gen . . . . .	56
4.2.6	Zusätzliche klinische Zeichen bei <i>DJ1</i> -Mutationen . . . . .	57
4.3	Mutationen im <i>Parkin</i> -Gen . . . . .	58
4.3.1	Bekannte Mutationen im <i>Parkin</i> -Gen . . . . .	59
4.3.2	Verteilung und Häufigkeit von <i>Parkin</i> -Mutationen . . . . .	60
4.3.3	Häufigkeit von Mutationen im <i>Parkin</i> -Gen - Eigene Ergebnisse . . .	61
4.3.4	Auswirkung der identifizierten Mutationen auf das <i>Parkin</i> -Protein .	64
4.3.5	<i>Parkin</i> -Gen-Promoter . . . . .	65
4.4	Die Rolle von heterozygoten Mutationen im <i>DJ1</i> - und <i>Parkin</i> -Gen . . . . .	65
4.5	Fazit . . . . .	67
4.6	Ausblick . . . . .	68
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
	<b>A Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>87</b>
	<b>B Bekannte Mutationen im <i>Parkin</i>-Gen</b>	<b>90</b>
B.1	Bekannte Punkt- und andere kleine Mutationen im <i>Parkin</i> -Gen . . . . .	90
B.2	Bekannte Gendosisveränderungen im <i>Parkin</i> -Gen . . . . .	93
	<b>C Material</b>	<b>98</b>
C.1	Chemikalien . . . . .	98
C.2	Stammlösungen und Puffer . . . . .	99
C.3	Geräte . . . . .	100

<b>D</b>	<b><i>Primer</i> und Sonden</b>	<b>102</b>
D.1	Allgemeine <i>Primer</i> . . . . .	102
D.2	<i>Primer</i> für die konventionelle <i>DJ1</i> -Mutationsanalyse . . . . .	103
D.3	<i>Primer</i> für die Echtzeit-PCR zur Gendosisbestimmung im <i>DJ1</i> -Gen . . . . .	103
D.4	Sonden für die Echtzeit-PCR zur Gendosisbestimmung im <i>DJ1</i> -Gen . . . . .	104
D.5	<i>Primer</i> für die konventionelle <i>Parkin</i> -Mutationsanalyse . . . . .	105
D.6	<i>Primer</i> für die Echtzeit-PCR zur Gendosisbestimmung im <i>Parkin</i> -Gen . . . . .	106
D.7	Sonden für die Echtzeit-PCR zur Gendosisbestimmung im <i>Parkin</i> -Gen . . . . .	107
	<b>Danksagung</b>	<b>108</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>110</b>
	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>112</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Genetische Mutationen und die Pathogenese des Parkinson-Syndroms . . . . .	11
1.2	Formation eines Gemisches aus Homo- und Heteroduplices . . . . .	13
1.3	Auftrennung von Homo- und Heteroduplices . . . . .	13
1.4	Temperaturabhängige Auftrennung von Homo- und Heteroduplices . . . . .	14
3.1	dHPLC-Analyse: Programmanzeige . . . . .	35
3.2	dHPLC-Analyse: Optimierung der Analysetemperatur . . . . .	35
3.3	dHPLC-Analyse: Optimierung der Zeitverschiebung . . . . .	36
3.4	dHPLC-Analyse: 11-bp-Deletion im <i>DJ1</i> -Gen . . . . .	40
3.5	Gendosis-Untersuchung: Deletion von Exon 5 des <i>DJ1</i> -Gens . . . . .	41
3.6	Sequenzanalyse: Polymorphismus im <i>DJ1</i> -Gen . . . . .	41
3.7	Lokalisation der <i>DJ1</i> -Mutationen und -Polymorphismen . . . . .	42
3.8	SSCP und Sequenzierung der Probe B835 . . . . .	45
3.9	Ergebnisse der Gendosis-Untersuchung des <i>Parkin</i> -Gens . . . . .	46
3.10	Lokalisation der <i>Parkin</i> -Mutationen . . . . .	46
3.11	Detektion von Polymorphismen im Exon 10 des <i>Parkin</i> -Gens . . . . .	47
3.12	Restriktionsfragmentanalyse einer Sequenzveränderung im <i>DJ1</i> -Gen . . . . .	50

# Tabellenverzeichnis

1.1	Verschiedene monogenetische Formen des Parkinson-Syndroms . . . . .	5
2.1	Patientengruppen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden . . . .	17
3.1	Klinische Daten der untersuchten Patientengruppen . . . . .	33
3.2	Analysebedingungen des <i>DJ1</i> -Gens . . . . .	37
3.3	Übersicht der Ergebnisse der Mutationsanalyse . . . . .	48
3.4	Darstellung der Restriktionsfragmente . . . . .	50
4.1	Bekannte und neue kleine Mutationen und Polymorphismen im <i>DJ1</i> -Gen .	53
4.2	Bekannte Gendosisveränderungen im <i>DJ1</i> -Gen . . . . .	54
4.3	Häufigkeit von Mutationen im <i>DJ1</i> -Gen . . . . .	56
4.4	Bekannte Punktmutation 734A>T und 924C>T im <i>Parkin</i> -Gen . . . . .	60
4.5	Häufigkeit von <i>Parkin</i> -Mutationen in veröffentlichten Studien . . . . .	63
B.1	Bekannte Punkt- und andere kleine Mutationen im <i>Parkin</i> -Gen . . . . .	90
B.2	Bekannte Gendosisveränderungen im <i>Parkin</i> -Gen . . . . .	93

# Kapitel 1

## Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Mutationsanalyse zweier Gene, des *DJ1*- und des *Parkin*-Gens, die mit einem monogenetischen Parkinson-Syndrom assoziiert sind.

Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die Parkinson-Krankheit und das Parkinson-Syndrom sowie den aktuellen Stand der Forschung bezüglich der Ursachen der Erkrankung und der Rolle von genetischen Faktoren. Es wird über Mutationen im *DJ1*- und *Parkin*-Gen berichtet und ihre Bedeutung erklärt. Zur Detektion von Mutationen wurden die SSCP-Analyse, die Sequenzierung und die quantitative PCR angewandt. Zusätzlich wurde ein neueres Verfahren, die denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC), eingeführt, um Punktmutationen und kleine Deletionen oder Duplikationen im *DJ1*-Gen zu identifizieren. Das Prinzip dieser Methode wird im Kapitel 1.4 erläutert.

### 1.1 Parkinson-Krankheit und Parkinson-Syndrom

Die Parkinson-Krankheit ist eine langsam fortschreitende neurologische Erkrankung des Gehirns. Sie wird auch als Parkinsonsche Erkrankung, Morbus Parkinson, Paralysis agitans oder Schüttellähmung bezeichnet. Sie wurde nach dem englischen Arzt Dr. James Parkinson benannt, der 1887 seine Monographie „*An essay on the Shaking Palsy*“ (deutsche Übersetzung: „Eine Abhandlung über die Schüttellähmung“) veröffentlichte. Er beschrieb ein klinisches Syndrom, das bis heute der Markstein der klinisch diagnostischen Kriterien geblieben ist: Ruhetremor (rhythmisches Schütteln von Armen und Beinen), Rigor

(Muskelsteife), Akinese (allgemeine Bewegungsarmut, auch Bradykinese oder Hypokinese genannt) und eine Störung der Stellreflexe [20, 30, 98]. Diese vier Symptome sind die Kardinalsymptome der Parkinson-Krankheit.

In den meisten Fällen ist die Ursache der Erkrankung unbekannt, deshalb wird sie als idiopathische (griech. ohne bekannte Ursache) Parkinson-Krankheit bezeichnet.

Der Begriff Parkinson-Syndrom (PS) dagegen schließt alle klinischen Syndrome ein, deren klinische Symptome der Parkinson-Krankheit ähneln, ungeachtet der Pathologie und begleitender Symptome. Parkinson-Syndrome kommen bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen vor, z. B. bei der Multisystematrophie, der progressiven supranukleären Lähmung und bei vaskulären Erkrankungen, Depression und Demenz. Bei Vorliegen einer genetischen Ursache wird ebenfalls von einem Parkinson-Syndrom (PS) gesprochen oder aber von Parkinsonismus. Ein *early-onset parkinson's disease* (EOPD) liegt bei einem Erkrankungsalter von unter 45 Jahren vor, während der Begriff des juvenilen PS bei einem Erkrankungsalter von unter 21 Jahren gebraucht wird.

Die Diagnose der Parkinson-Krankheit wird durch die klinische Untersuchung gestellt, wobei mindestens zwei der oben genannten Kardinalsymptome vorliegen müssen. Die Diagnose kann abgesichert werden, wenn die Krankheit einseitig mit einem Ruhetremor begonnen hat und sich die Symptomatik auf die Gabe von Levodopa (L-Dopa) oder Apomorphin bessert. [66]

Die idiopathische Form der Parkinson-Krankheit ist eine häufige Erkrankung, die in den westlichen Ländern ca. 1,6 % aller über 65-jährigen betrifft. Die Häufigkeit nimmt von ca. 1 % bei den 65- bis 69-jährigen auf über 3,6 % bei den 85- bis 89-jährigen zu [20]. Die Erkrankung manifestiert sich meist nach dem 55. Lebensjahr [49]. Immerhin 10 % der Patienten erkranken jedoch schon vor Erreichen des 40. Lebensjahres und in einigen Fällen beginnt die Erkrankung im Kindes- und Jugendalter. Mit steigender Lebenserwartung und dem wachsenden Anteil älterer Menschen an der Bevölkerung in den industrialisierten Ländern gewinnt die Erkrankung zahlenmäßig wie auch sozioökonomisch an Bedeutung.

Innerhalb des letzten Jahrhunderts haben sich die vorherrschenden Theorien zur Ursache des Parkinson-Syndroms von Vererbung [34] zu einer infektiösen Ätiologie [103] zurück zur Vererbung [67], zu einer Umwelt-Ätiologie [23], zu einer reinen genetischen Ätiologie [24] und schließlich zu einer multifaktoriellen Theorie der Gen-Umwelt-Interaktion [111,

114, 119] gewandelt.

Ein konsistenter Risikofaktor der Parkinson-Krankheit ist das Alter [19]. Die Liste von möglichen exogenen (Umwelt-)Risikofaktoren ist lang, aber wenige konnten eine beständige Assoziation aufzeigen. In ca. 80 % der Parkinson-Fälle ist es nicht möglich, eine Ursache für die Erkrankung zu finden (idiopathische Parkinson-Krankheit). Es ist eine multifaktorielle Genese mit Umweltfaktoren denkbar, die auf genetisch prädisponierte Individuen einwirken. Es besteht weiterhin eine Debatte über die Bedeutung von Genen bei der idiopathischen Form der Parkinson-Krankheit.

## 1.2 Populationsgenetik

Zum besseren Verständnis dieser Arbeit wird im Folgenden ein kleiner Einblick in die Begriffe der Populationsgenetik gegeben.

Die molekulare Populationsgenetik untersucht die genetische Struktur derzeit existierender Populationen mit den Methoden der Molekularbiologie. Eine Population ist eine Gruppe von Individuen einer Art, zwischen denen die Möglichkeit der Fortpflanzung besteht. Zwei wichtige Eigenschaften einer Population sind ihre Größe und ihre räumliche Struktur. Die Größe einer Population bestimmt, welche Rolle der Zufall bei der Vererbung genetischer Variationen spielt (die sogenannte genetische Drift).

Eine wichtige Ursache dieser genetischen Drift ist der Gründer-Effekt. Der Gründer-Effekt tritt auf, wenn eine Population durch eine kleine Anzahl von Individuen, die einer größeren Ursprungspopulation entstammen, gegründet wird. Aufgrund der geringen Anzahl der Gründer, kann die Allelhäufigkeit innerhalb der neuen Population gegenüber der ursprünglichen Population stark verändert sein. Dieser Effekt erklärt die Anhäufung von rezessiven Erkrankungen als Folge einer genetischen Isolierung einer Bevölkerung. Häufig weisen dann alle Genträger dieselbe Mutation auf, da sie auf einen gemeinsamen Gründer zurückgeht.

Allele sind unterschiedliche Zustände desselben Gens oder Nukleotids aufgrund einer Mutation. Das ursprüngliche oder häufigere Allel wird als Wildtyp-Allel bezeichnet.

Unter einem genetischen Polymorphismus (von griech. *polýmorphos* = vielgestaltig) wird das Auftreten einer Genvariation (eines Allels) in einer Population verstanden. De-

definitionsgemäß muss die Häufigkeit der Genvariation (die Allelhäufigkeit) größer als 1 Prozent sein, andernfalls wird von einer Mutation gesprochen.

Zwei weitere wichtige Begriffe der Populationsgenetik sind homozygot und heterozygot. Ein diploides Individuum ist homozygot für eine genetische Variation, wenn in seinem Erbgut nur eines von zwei oder mehreren in der Population segregierenden Allelen vorkommt. Sind dagegen bei einem diploiden Individuum auf den beiden homologen Chromosomen unterschiedliche Polymorphismen oder Mutationen zu finden, ist dieses Individuum heterozygot für diesen Polymorphismus bzw. diese Mutation.

Der Genotyp umfasst die Gesamtheit des genetischen Materials, das im Phänotyp seine Ausprägung findet. Der Genotyp ist in Chromosomen organisiert. Die Position eines Gens auf dem Chromosom wird als *Locus* (lat. Ort) bezeichnet.

### 1.3 Genetik des Parkinson-Syndroms

Der geschätzte Anteil von Patienten in der Bevölkerung, der mindestens einen Verwandten mit einem PS hat, variiert zwischen 6,4 und 10,3 %, während Studien mit krankenhausbezogenen Patienten-Serien sogar über Häufigkeiten von bis zu 33 % berichten [5, 18, 26, 79]. Die Erkrankung von verwandten Personen spricht für eine direkte genetische Ursache [68]. Besonders bei einem frühen Beginn der Erkrankung (< 50 Jahre) spielt die genetische Komponente eine große Rolle [6, 35, 36, 64, 77, 123]. Seit 1997 konnten 11 Gene kartiert werden (*PARK1* bis *PARK11*). Ein dort lokalisiertes Gen und das entsprechende Genprodukt scheinen eine kausale Rolle bei der Entstehung des PS zu spielen. Sechs dieser Gene verursachen autosomal-dominante Formen des PS (*PARK1*, *3-5*, *8* und *10*) und drei autosomal-rezessiv vererbte (*PARK2*, *6* und *7*). *PARK10* und *PARK11* repräsentieren Suszeptibilitäts-Loci mit einer unbekanntem Art der Transmission [45, 97]. Bis auf *PARK8* (*LRRK2*) scheinen die dominanten Formen des PS sehr selten vorzukommen. Dagegen ist das rezessiv vererbte PS sehr viel häufiger. Vor kurzem wurde gezeigt, dass *PARK4* identisch mit *PARK1* ist [115]. Das *PARK9*-assoziierte *Kufor-Rakeb* Syndrom unterscheidet sich wesentlich vom klinisch typischen PS und wird deshalb als ein eigener Phänotyp betrachtet [89]. Zusätzlich gibt es Mutationen in einigen anderen Genen, die mit dem PS in Verbindung gebracht werden konnten, denen allerdings (noch) kein *PARK-Locus* zugeteilt wurde (u. a. *Synphilin-1* und *NR4A2*).

**Tabelle 1.1:** Verschiedene monogenetische Formen des Parkinson-Syndroms

	Art der Vererbung	Genort	Gen	OMIM‡
<b>Genetische Formen mit <i>PARK</i> Akronym</b>				
<i>PARK1</i> (= <i>PARK4</i> )	dominant	4q	<i>α-Synuclein</i>	168601
<i>PARK2</i>	rezessiv	6q	<i>Parkin</i>	600116
<i>PARK3</i>	dominant	2p	?	602404
<i>PARK5</i>	dominant	4p	<i>Ubiquitin cyclohydrolase-L1</i>	191342
<i>PARK6</i>	rezessiv	1p	<i>PINK1</i>	605909
<i>PARK7</i>	rezessiv	1p	<i>DJ1</i>	606324
<i>PARK8</i>	dominant	12p-q	<i>LRRK2 (Leucin-rich repeat kinase 2)</i>	607060 609007
<i>PARK10</i>	?	1p	?	606852
<i>PARK11</i>	?	2q	?	607688
<b>Genetische Formen ohne <i>PARK</i> Akronym</b>				
-	dominant	5q	<i>Synphilin-1</i>	603779
-	dominant	2q	<i>Nurr1 (NR4A2)</i>	601828

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung des *DJ1*-Gens im Zusammenhang mit dem PS. Zu Beginn der Analysen für diese Studie war nur sehr wenig über das *DJ1*-Gen und seine Rolle beim PS bekannt. Anhand der Untersuchung eines großen Patientenkollektivs sollten genauere Kenntnisse über das *DJ1*-Gen gewonnen werden. Einige der Patienten wurden ebenfalls auf Mutationen im *Parkin*-Gen untersucht. Mutationen im *Parkin*-Gen sind der bekannteste verantwortliche Einzelfaktor für die Entstehung eines PS. Die Untersuchung derselben Patienten sowohl auf *DJ1*- als auch auf *Parkin*-Mutationen ermöglichte einen Vergleich zwischen beiden. In den nun folgenden Kapiteln wird das *DJ1*- und der *Parkin*-assoziierte PS genauer beschrieben.

### 1.3.1 *DJ1*-assoziiertes Parkinson-Syndrom

Zu Beginn dieser Studie war sehr wenig über die Häufigkeit von *DJ1*-Mutationen bekannt. Ebenso wie *Parkin*-Mutationen wurden *DJ1*-Mutationen vor allem bei Patienten mit einem niedrigen Erkrankungsalter gefunden [6, 7].

Das *DJ1*-assoziierte PS zeigt typische Symptome der Parkinson-Krankheit, einen langsamen Krankheitsverlauf und gutes Ansprechen auf eine L-Dopa-Behandlung. Untersuchungen mittels funktioneller Bildgebung zeigten einen Verlust von Zellen im Bereich der *Substantia nigra*. Materialien zur pathologischen Untersuchung sind noch nicht vorhanden.

Insgesamt ist das Bild dieser Krankheit dem des *Parkin*-assoziierten PS ebenso wie dem des *PINK1*-assoziierten PS sehr ähnlich und überlappt sich signifikant mit der idiopathischen Parkinson-Krankheit.

### Mutationen im *DJ1*-Gen

Im Jahre 2002 beschrieben Bonifati und Mitarbeiter die Klonierung eines Gens für ein autosomal-rezessives PS – das *DJ1*-Gen (*PARK7*) auf Chromosom 7 [6]. Das *DJ1*-Gen hat 7 Exons und kodiert ein aus 189 Aminosäuren (20kD) bestehendes Protein. Das Exon 1 ist nicht-kodierend und wird alternativ gespleißt (Exon1a/b). Kurze Zeit später konnten zwei *DJ1*-Mutationen im homozygoten Zustand bei blutsverwandten Familien in den Niederlanden und Italien identifiziert werden, die ein autosomal-rezessives PS verursachten. In der niederländischen Familie wurde eine Exon1-5 – Deletion gefunden, die sich über die Promoter-Startposition erstreckte. Bei der italienischen Familie konnte eine Punktmutation (Leu166Pro) detektiert werden. Bald darauf wurden Mutationen im homozygoten, *compound*-heterozygoten und heterozygoten Zustand auch bei Patienten anderer Herkunft erkannt [2, 21, 35]. Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass diese *DJ1*-Mutationen die Krankheitsempfindlichkeit bei EOPD erhöhen [2, 35].

Es gab betroffene Patienten, bei denen nur eine Mutation im heterozygoten Zustand gefunden wurde. Das unterstützt die Vermutung, dass, wie bereits bei *Parkin*-Fällen beschrieben, eine heterozygote Mutation zum PS-Phänotyp führen kann. Die Rolle von heterozygoten *DJ1*-Mutationen wird ausführlich diskutiert werden.

Bisher sind keine Studien zur Häufigkeit von *DJ1*-Mutationen bei Patienten mit spätem Erkrankungsbeginn durchgeführt worden.

### Funktion des *DJ1*-Gens und des DJ1-Proteins

Bekannte Mutationen sind über das ganze *DJ1*-Gen verstreut. Die unterschiedlichen Mutationen betreffen unterschiedliche Domänen des Proteins mit jeweils anderer funktioneller

und struktureller Bedeutung. Dennoch verursachen sie einen ähnlichen Phänotyp.

Das DJ1-Protein wird ubiquitär exprimiert, besonders in der Leber, der Skelettmuskulatur, der Niere und im Gehirn mit höheren Konzentrationen in subkortikalen Regionen (Thalamus und *Substantia nigra pars compacta*). Das *DJ1*-Gen wurde zunächst als ein Onkogen beschrieben [88] und als ein Protein, das in Verbindung mit Infertilität bei Nagetieren steht [125]. Es wird angenommen, dass DJ1 die mRNA-Expression durch eine Interaktion mit einem Polypeptid-Komplex moduliert, der aus dem Androgen-Rezeptor und dem *Sumoylationenzym PIASx* besteht [91, 117]. *Sumoylation* bedeutet die Anknüpfung von SUMO, einem Ubiquitin-ähnlichen modifizierenden Protein. Im Gegensatz zu Ubiquitin scheint SUMO allerdings die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu beeinflussen und ihre Stabilität zu fördern. Einige Studien weisen eine Funktion als Sensor für oxidativen Stress und als Antioxidans nach, sowie eine Rolle als Schutz gegen mitochondriale Schädigung [8, 10]. Strukturelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass DJ1 Ähnlichkeiten mit der bakteriellen Hsp31 hat, einem Stress-induzierten Chaperon [106]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass DJ1 am in-vivo Signal-Transduktionsweg des Dopamin D2-Rezeptor-Subtyps bei Mäusen beteiligt ist [32].

Die Charakterisierung des Wildtyps sowie zweier krankheitsassoziiertes Punktmutationen deckte eine Dimer-Struktur auf. Bei der DJ1-Mutante (L166P) konnte eine beeinträchtigte Proteinfaltung nachgewiesen werden, die einen beschleunigten Abbau des DJ1-Proteins begünstigt. Die Mutante konnte keine Homodimer formen. Studien zur Kristallstruktur unterstützten die Vermutung, dass DJ1-Proteine nur als Dimer funktionieren [51, 84, 94, 120]. Daher wird angenommen, dass ein falsch gefaltetes und weniger stabiles DJ1-Protein DJ1<sup>L166P</sup> Zytotoxizität vermittelt, indem es das zelluläre Degradierungssystem überfordert und eine ungewöhnliche Zelllokalisierung bewirkt [84].

Weiterhin wurde gezeigt, dass DJ1 hauptsächlich in Gliazellen, den Astrozyten, lokalisiert ist. Es wird daher vermutet, dass dieses Protein eine große Bedeutung bei der glialen Funktion hat. Veränderungen der normalen physiologischen Funktion der Astrozyten könnten durch verminderte Sekretion von neurotrophen Faktoren und eine verminderte Kapazität gegenüber der Produktion freier Radikale zu einem dopaminergen Zelltod beisteuern.

### 1.3.2 *Parkin*-assoziiertes Parkinson-Syndrom

*Parkin*-Mutationen sind besonders häufig bei Patienten mit einem autosomal-rezessiven PS mit frühem Beginn (unter 50 Jahre) und bei einem isolierten PS mit juvenilem Beginn (unter 21 Jahre) [1, 56, 77]. Mutationen in diesem Gen sind für ca. 50 % der familiären und für ca. 20 % der sporadischen EOPD-Fälle verantwortlich. Die Prävalenz von *Parkin*-Mutationen verringert sich enorm mit einem späteren Erkrankungsalter [77].

Es gibt einige klinische Befunde, die das *Parkin*-assoziierte PS von der sporadischen Parkinson-Krankheit abgrenzen wie z. B. das niedrige Alter bei Krankheitsbeginn. Zusätzliche klinische Zeichen treten bei einigen Patienten auf, z. B. tageszeitliche Schwankungen der Symptomausprägung, Besserung nach Schlaf, Dystonie, Hyperreflexie, gute Ansprechbarkeit auf L-Dopa, frühzeitig induzierte Dyskinesien durch die L-Dopa-Behandlung und ein langsamer Krankheitsverlauf [56, 75].

#### Mutationen im *Parkin*-Gen

Mutationen im *Parkin*-Gen wurden in zahlreichen Familien unterschiedlicher ethnischer Herkunft festgestellt. Einen Überblick über die veröffentlichten Mutationen geben die Tabellen B.1 und B.2 im Anhang dieser Arbeit. Folgende unterschiedliche Arten von Mutationen wurden detektiert: (1) Punkt-Mutationen (*missense* oder *nonsense*), (2) Deletionen oder Insertionen einer oder mehrerer Basenpaare innerhalb eines Exons, die meistens eine Leserasterverschiebung (engl. *frameshift*) oder einen vorzeitigen Proteinabbruch bewirken, (3) Deletionen oder Multiplikationen eines oder mehrerer Exons, die durch eine Leserasterverschiebung zu einer Veränderung des Transkripts führen und zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und (4) Mutationen an der Intron-Exon-Grenze, die die Spleißregion beeinflussen.

*Compound*-heterozygote Mutationen mit Deletionen und *Missense*-Mutationen erklären die Mehrzahl der Fälle mit einem EOPD. Mehr als 50 % der Mutationsträger haben *Exon-Rearrangements*, die im heterozygoten Zustand nicht mittels konventioneller Methoden wie der Sequenzierung erkennbar sind. Zusätzlich zu konventionellen Methoden bedarf die Mutations-Analyse des *Parkin*-Gens daher der Gendosis-Untersuchung. Aufgrund der Komplexität der Untersuchung des *Parkin*-Gens gibt es nur wenige epide-

miologische Daten über die Häufigkeit von *Parkin*-Mutationen bei Kontrollpersonen und der idiopathischen Parkinson-Krankheit.

*Parkin*-Mutationen werden autosomal-rezessiv vererbt. Klinische, genetische und PET-Untersuchungen legen jedoch nahe, dass auch eine einzige heterozygote *Parkin*-Mutation zu einem PS prädisponieren kann [41, 63, 105].

### **Funktion des *Parkin*-Gens und des Parkin-Proteins**

In allen Exons des *Parkin*-Gens konnten Mutationen detektiert werden, die meisten betreffen allerdings Exon 2 und 7. *Parkin* wird in den Fortsätzen und Zellkörpern von Neuronen und in Myozyten exprimiert [62, 69].

Die Identifikation der normalen Funktion von *Parkin* konnte viele Hinweise auf pathologische Effekte von *Parkin*-Mutationen liefern.

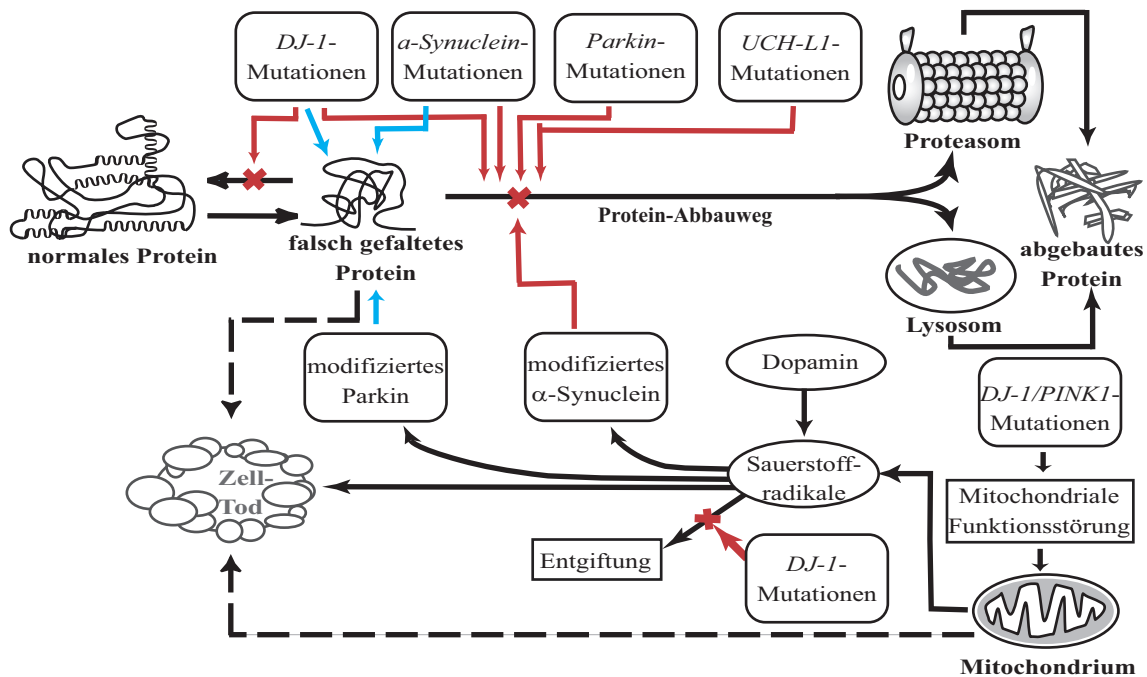
Das Parkin-Protein hat eine Ubiquitin-ähnliche Sequenz am N-Terminus und zwei *RING*-Finger (benannt nach *Really Interesting New Gene*), die durch ein *in-between-RING*-(*IBR*)-Motiv in Richtung des C-terminalen Endes des Proteins getrennt sind. Das Domänen-Motiv mit zwei *RING*-Fingern getrennt durch eine *IBR* Domäne ist vielen E3-Ligasen gemein. Die E2-abhängige E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Parkin konnte in *in vitro* und zellulären Studien gezeigt werden [112]. Diese Funktion wird durch Mutationen, die mit einem PS assoziiert sind, gestört. Parkin als E3-Ubiquitin-Ligase ubiquiniert sich selbst und vermittelt dadurch den eigenen Abbau [132]. Außerdem konnten bereits eine wachsende Anzahl von Parkin-Substraten identifiziert werden (zusammengefasst in [81]). Eine der führenden Hypothesen zur Erklärung des *Parkin*-assoziierten PS ist, dass eine Akkumulation dieser Substrate im nicht-ubiquinierten Zustand den selektiven Tod der Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* und im *Locus coeruleus* verursacht [17].

### **1.3.3 Pathogenese des Parkinson-Syndroms**

Während der Phänotyp des *DJ1*-assoziierten PS nahezu identisch mit dem des *Parkin*-assoziierten PS ist, ist die genaue Funktion des *DJ1*-Proteins bei der Pathogenese des PS weitgehend unbekannt. Die Funktion des Parkin-Proteins wird dagegen seit längerer Zeit untersucht und ist relativ gut beschrieben. Die Bedeutung weiterer Parkinson-Proteine wie

des PINK1-Proteins ist noch nicht vollständig bekannt. Es bleibt zu klären, ob die verschiedenen Proteine auf einen gemeinsamen Stoffwechselweg Einfluss nehmen. Eine Studie konnte das Parkin-Protein mit dem DJ1-Protein in Verbindung bringen[85]. Das Parkin-Protein scheint mit DJ1-Mutanten zu interagieren, indem es diese stabilisiert anstatt ihre Elimination durch Ubiquinierung zu fördern.

Die Abbildung 1.1 verdeutlicht die derzeitigen Hypothesen zur Interaktion der verschiedenen Proteine und der Pathogenese des PS.



**Abbildung 1.1:** Genetische Mutationen und die Pathogenese des Parkinson-Syndroms: Falsch gefaltete Proteine tragen eventuell zu einer Neurodegeneration bei einem PS bei. Durch eine Mutation könnte das  $\alpha$ -Synuclein- und DJ1-Protein falsch gefaltet sein (blaue Pfeile) und der Ubiquitin- (proteasomale) und lysosomale Abbauweg überlastet werden. Das Parkin- und UCH-L1-Protein, die beide zu dem Ubiquitin-Proteasom-System gehören, verlieren durch eine Mutation ihre Ubiquitin-Ligase/Hydrolase-Aktivität. Dieser Funktionsverlust würde die Fähigkeit der Zelle, beschädigte Proteine zu erkennen und falsch gefaltete Proteine abzubauen (rote Pfeile), beeinträchtigen. *DJ1*-Mutationen könnten ebenso die vermutete Chaperon-Aktivität des DJ1-Proteins modifizieren und so die Rückfaltung beschädigter Proteine und die Zuführung zum Protein-Abbau-System unterbrechen (rote Pfeile). Diese unterschiedlichen Veränderungen führen vermutlich zu der Akkumulation unerwünschter Proteine, welche durch unbekannte Mechanismen eine Neurodegeneration bewirken (gestrichelte Pfeile). Oxidativer Stress durch eine mitochondriale Funktionsstörung und den Dopamin-Metabolismus könnte durch eine post-translationale-Modifikation auch eine Falschfaltung von Proteinen (besonders von  $\alpha$ -Synuclein und Parkin) begünstigen. Oxidativer Stress kann seine Ursache auch in einem reduzierten Leistungsvermögen eines fehlerhaften DJ1-Proteins, Sauerstoffradikale zu entgiften, haben. Dagegen wird die mitochondriale Funktionsstörung wenigstens teilweise durch die fehlerhafte Aktivität und veränderte Lokalisation von DJ1 und PINK1 verursacht. Mitochondriale Funktionsstörungen, oxidativer Stress und die falsche Handhabung von Proteinen sind in dieser hypothetischen pathogenen Kaskade eng miteinander verknüpft. Zusätzliche mögliche Interaktionen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit ausgelassen.

## 1.4 Die denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC)-Analyse

Innerhalb der letzten Jahre hat sich die denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC) (engl. *denaturing-high-performance-liquid-chromatography*) zu einer der vielseitigsten Technologien für die Untersuchung von Sequenzvariationen entwickelt. Es ist ein schnelles, automatisierbares Verfahren, mit dem bekannte und unbekannte Mutationen sowie Einzel-Nukleotid-Polymorphismen unabhängig von ihrer Art und Lokalisation mit großer Zuverlässigkeit nachgewiesen werden können. Vergleichbare bisherige Methoden zur Mutationsanalyse, wie z. B. die SSCP-Analyse weisen im Vergleich eine geringere Sensitivität auf [27]. Im Rahmen dieser Studie wurde die dHPLC-Methode (*Transgenomic-Wave*®-System) zur Untersuchung des *DJ1*-Gens angewandt.

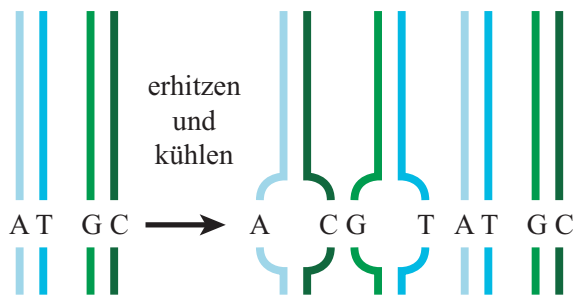
### 1.4.1 Das *Transgenomic-Wave*®-System

Das *Wave*-System setzt die dHPLC in Verbindung mit einer speziellen Trennsäule (*separation DNASep*®*cartridges*) ein. Die Säule besteht aus einem Polystyren/Divinylbenzen Copolymer, das als Festphase dient. Über das Reagenz TEAA (Triethylammoniumacetat) wird eine Interaktion zwischen injizierter DNS-Probe und der Säulenmatrix hergestellt. Acetonitril unterbricht diese Interaktion und verursacht die Elution der Probe von der Säule. Die Detektion des ausgespülten PCR-Produktes erfolgt mit Hilfe eines Hochleistungs-Deuterium-UV-Lichts mit einer Wellenlänge von 260 nm.

### 1.4.2 Das Prinzip der dHPLC

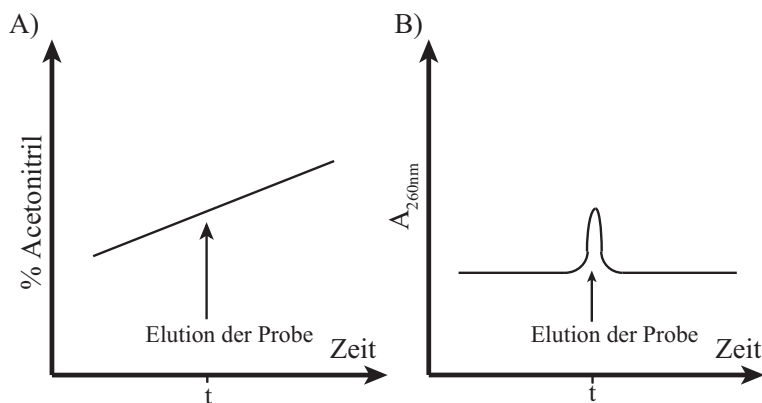
Die dHPLC basiert auf der Detektion von Heteroduplices. Eine Heteroduplex kann sich bilden, wenn neben dem Wildtyp-Allel eine Sequenzvariation auf dem zweiten Allel vorliegt. Wird das amplifizierte PCR-Produkt bei 95 °C in Einzelstrang-DNS denaturiert, kommt es durch anschließendes Renaturieren (engl. *Reannealing*) zur Formation von Homo- und Heteroduplices. Letztere bestehen aus einem Strang des Wildtyp-Allels und einem Strang des veränderten Allels. An der Position der Mutation kommt es zu einer Fehlpaarung der Nukleotide (*base-pair-mismatch*). Die Stränge sind in diesem Abschnitt nicht mehr

komplementär zueinander. Das bewirkt die Ausbildung von einzelsträngigen Regionen, besonders unter partiell denaturierenden Bedingungen.



**Abbildung 1.2:** Formation eines Gemisches aus Homo- und Heteroduplexen durch Denaturieren und Renaturieren. Eine Heteroduplex besteht aus zwei komplementären Einzelsträngen, die an einer Position wegen einer Mutation in einem der beiden Stränge eine einzelsträngige Region bilden.

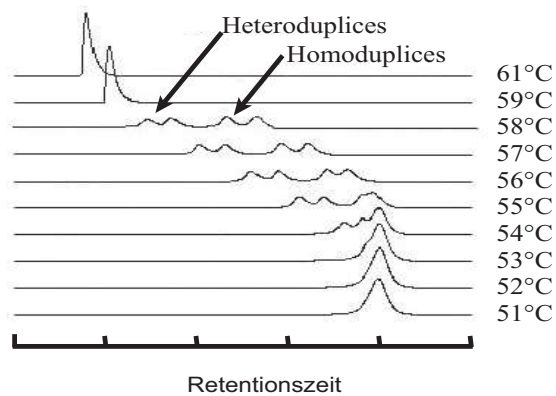
Die dHPLC nutzt das unterschiedliche Schmelzverhalten von homo- und heteroduplex-DNS unter partiell denaturierenden Bedingungen zur Mutationsdetektion. Die injizierte Probe interagiert über das Reagenz TEAA mit der Säulenmatrix. Bei jeder Analyse wird nun ein linearer Acetonitrilgradient durchgeführt. Die Anfangskonzentration ist gering genug, damit die DNS an die Säulenmatrix binden kann. Die Konzentration wird über die Zeit erhöht. Zu einem bestimmten Zeitpunkt verhindert die Konzentration von Acetonitril die Interaktion und es kommt zur Elution der DNS-Probe. Die Zeit, die zwischen der Injektion der Probe und der Elution vergeht, wird Retentionszeit genannt. Mit Hilfe der sogenannten Zeitverschiebung (engl. *time shift*) ist es möglich die Retentionszeit zu regulieren und den geeigneten Acetonitrilgradienten zu finden.



**Abbildung 1.3:** Graph A zeigt den linearen Acetonitrilgradienten. Zum Zeitpunkt  $t$  verhindert die Konzentration des Acetonitrils die Interaktion zwischen DNS-Probe und Säulenmatrix. In Graph B führt dies zur Elution der Probe zum Zeitpunkt  $t$ .

Am Anfang einer jeden Analyse muss die optimale partiell denaturierende Temperatur bestimmt werden, bei der das unterschiedliche Schmelzverhalten am größten ist. Optimale Analysebedingungen liegen bei einer Säulentemperatur vor, die eine partielle Denaturierung der Doppelstränge im Bereich der Nukleotid-Fehlpaarungen begünstigt. Die höchste Wahrscheinlichkeit, Mutationen zu detektieren, liegt bei einer Analysetemperatur vor, die

1 °C unter dem sogenannten T<sub>m</sub>-Wert liegt, der Schmelztemperatur, bei der 50 % der DNS als Doppelstrang- und 50 % als Einzelstrang-DNS vorliegen.



**Abbildung 1.4:** Temperaturabhängige Auftrennung der Heteroduplices von den Homoduplices. Die Heteroduplices werden vor den Homoduplices ausgewaschen. Die Retentionszeit verringert sich drastisch mit einer Erhöhung der Temperatur. Bei diesem Beispiel liegt eine A zu G Mutation auf einem Allel vor.

Die Sensitivität der Methode wird außer durch die Temperatur von weiteren Faktoren beeinflusst: PCR-Fragment-Länge (ideal 200 bis 500 bp), der Anzahl der Schmelzdomänen, der Qualität und Quantität des PCR-Produktes.

## 1.5 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Die Leiterin der Arbeitsgruppe, Frau Prof. Dr. med. Klein, erforscht seit vielen Jahren die genetischen Ursachen von Bewegungsstörungen, vor allem bei unterschiedlichen Parkinson-Syndromen und bei Dystonien. In den letzten Jahren gelang es der Arbeitsgruppe, eine Vielzahl von *Parkin*-Mutationen zu identifizieren, darunter viele heterozygote Exon-Deletionen/Duplikationen mittels einer neuen Methode, der Echtzeit-Amplifikation genomischer DNS [40, 41, 56].

Die Arbeitsgruppe verfügt über genetisches Material von über 350 sporadischen und familiären EOPD-Patienten, das die Grundlage dieser Arbeit bildete.

## 1.6 Ziele

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen ein besseres Verständnis zur Rolle von *DJ1*- und *Parkin*-Mutationen bei Patienten mit einem EOPD zu erhalten. Im Vordergrund der Studie stand die Untersuchung des *DJ1*-Gens.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Wie lassen sich *DJ1*-Mutationen ökonomisch und sicher detektieren?
2. Wie häufig sind Mutationen im *DJ1*-Gen?
3. Welche Mutationen findet man im *DJ1*-Gen?
4. Wie häufig sind *DJ1*-Mutationen im Vergleich zu *Parkin*-Mutationen?
5. Wie sieht die phänotypische Ausprägung bei Patienten mit *DJ1*-Mutationen aus?
6. Welche Bedeutung hat der Promoter des *Parkin*-Gens?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden folgende Arbeitsziele definiert:

1. Entwicklung einer neuen Methode zur Detektion von Punktmutationen und kleinen Deletionen oder Duplikationen im *DJ1*-Gen mittels der dHPLC-Analyse.
2. Untersuchung von 316 EOPD-Patienten auf Mutationen im *DJ1*-Gen mittels der dHPLC-Analyse, Sequenzierung und Gendosis-Untersuchung.
3. Analyse von 64 der 316 EOPD-Patienten auf Mutationen im *Parkin*-Gen mittels konventioneller und Gendosis-Untersuchungen.

# Kapitel 2

## PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Patienten

Für die molekulargenetische Untersuchung standen Patienten mit einem PS zur Verfügung. Die klinische Untersuchung haben Bewegungsstörungen-Spezialisten durchgeführt. Die Diagnose basierte auf publizierten Kriterien für ein PS [31]. Alle Patienten und Kontrollpersonen gaben ihr Einverständnis für diese Untersuchung und die Veröffentlichung, eine Genehmigung durch die lokalen Ethikkommissionen lag bei allen Studien vor. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Patientengruppen und Kontrollen charakterisiert.

#### 2.1.1 Zusammensetzung des Kollektivs

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 316 Patienten mit EOPD untersucht. Die Patienten wurden basierend auf unterschiedlichen Auswahlkriterien in fünf Gruppen aufgeteilt (s. Tabelle 2.1). Um die Häufigkeit von Aminosäuren-Substitutionen bei nicht betroffenen Personen zu ermitteln, wurden 94 Kontrollpersonen deutscher und südtiroler Herkunft getestet.

**Tabelle 2.1:** Patientengruppen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden

Gruppe	Anzahl der Patienten	Selektionskriterien der Patienten	Studienzentrum/ -zentren	Ethnische Herkunft
1	65	bevölkerungsbezogen	Universitäten von Genua und Bologna	italienisch
2	101	bevölkerungsbezogen	Universität Lübeck	deutsch
3	19	Isolatbevölkerung	Regionalkrankenhaus Bozen	südtirolisch
4	71	bevölkerungsbezogen	Universität Belgrad	serbisch
5	60	speziell überwiesen für die Untersuchung	verschiedene Zentren in Deutschland, Kanada und den USA	v. a. europäisch

## 2.2 Methoden

Im Folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden zur molekulargenetischen Untersuchung beschrieben. Die dHPLC-Analyse wurde während eines vierwöchigen Aufenthaltes im Labor von Prof. Olaf Rieß am Institut für Humangenetik der Universität Tübingen durchgeführt. Alle übrigen experimentellen Arbeiten fanden im Institut für Humangenetik der hiesigen Universität statt.

### 2.2.1 Präparation genomischer DNS

Die molekulargenetische Untersuchung, insbesondere die Polymerase-Kettenreaktion, benötigt genomische DNS als Vorlage. Die DNS-Extraktion erfolgte aus frischem oder tiefgefrorenem Blut der Patienten. Die genomische DNS wurde entsprechend der Aussalz-Methode [83] aus Leukozyten des Blutes isoliert. Die Zellen wurden lysiert, Proteine durch Proteinase K verdaut und die DNS durch Präzipitation (Ausfällung) gewonnen.

Protokoll:

1. 10 ml Vollblut (EDTA/Heparin/Citrat) mit Leidener-Lösung versetzen
2. Inkubation für 30 min auf Eis bei 200 rpm, um den Lysierungsprozess einzuleiten
3. Leukozyten abzentrifugieren (6000 rpm; 4 °C; 20 min), Überstand vorsichtig bis auf ca. 5 ml abgießen
4. Waschen des *Pellet* durch Resuspendieren in 10 ml Leidener-Lösung
5. Inkubation für 20 min auf Eis, zentrifugieren (6000 rpm, 4 °C, 15 min)
6. Abgießen des Überstandes (die Interphase bleibt erhalten) und waschen des *Pellet* mit 2-3 ml Leidener-Lösung
7. Resuspendieren des *Pellet* in 10 ml Leidener-Lösung
8. Inkubation für 20 min auf Eis und zentrifugieren (6000 rpm, 4 °C, 15 min)
9. Zur Erhöhung der Reinheit Schritte 6) bis 8) wiederholen
10. Ablösung der Interphase vom *Pellet* und Entfernen der Leidener-Lösung
11. Resuspendieren des *Pellet* in 3 ml Lysepuffer
12. Zugabe von 200  $\mu$ l Proteinase K (10 mg/ml) und 100  $\mu$ l SDS (20 % ig)
13. Inkubation über Nacht bei 55 °C
14. Zugabe von 1 ml 6M NaCl-Lösung pro ml Verdauungsansatz und kräftig schütteln
15. Zentrifugieren (6000 rpm, 20 °C, 25 min)
16. Verwerfen des Protein-*Pellet*, der Überstand wird weiterverwendet
17. Schritte 15) und 16) mehrmals wiederholen bis keine Proteine mehr vorhanden sind
18. Ausflocken der DNS durch Zugabe von 2 Vol. 96 % EtOH
19. Waschen der DNS-Flocke mit 1ml 70 % EtOH
20. Zentrifugieren (12000 rpm, 4 °C, 15 min), Überstand verwerfen
21. *Pellet* (DNS) im Thermoblock bei 37 °C trocknen
22. Zugabe von 500 bis 1000  $\mu$ l 1x TE-Puffer und DNS über Nacht im Kühlschrank lösen

Nach dieser Methode konnten ca. 100 bis 1000  $\mu$ g genomischer DNS guter Qualität extrahiert werden.

### 2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNS

Für einige Experimente, z. B. die dHPLC-Analyse, war es wichtig, die DNS-Konzentration der nukleinsäurehaltigen Lösung zu kennen.

### Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS

Die photometrische Bestimmung wurde an einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Nukleinsäuren absorbieren Licht bei einer Wellenlänge von 250 bis 270 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm aufgrund der Spektraleigenschaften ihrer Basen. Diese Absorption ist proportional zur Nukleinsäurekonzentration und kann gemäß der Gleichung nach Lambert-Beer berechnet werden:

$E_{260} = C_{NA} \times d \times \epsilon \times f$	$E_{260}$ : Extinktion bei 260 nm $C_{NA}$ : Konzentration der Nukleinsäure d: Schichtdicke der Küvette (= 1 cm) $\epsilon$ : Extinktionskoeffizient (= 50) f: Verdünnungsfaktor	Formel 1: <i>Lambert-Beer'sches Gesetz</i>
--	--	---

Die photometrische Konzentrationsbestimmung misst die gesamte Nukleinsäuremenge, unterscheidet also nicht zwischen DNS und RNA in einer Lösung. Vor der Konzentrationsmessung der DNS wurde am Photometer ein Nullwert mit Wasser bestimmt.

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Entsprechend der jeweiligen Fragestellung wurden zwei unterschiedliche Verfahren der PCR angewendet: die konventionelle PCR zur Mutationsdetektion mittels SSCP, direkter PCR-Produkt-Sequenzierung und dHPLC und die Echtzeit-PCR zur Gendosis-Untersuchung.

#### Konventionelle PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (kurz: PCR für engl. *Polymerase Chain Reaction*) ist eine enzymatische Methode, um DNS *in vitro* zu amplifizieren. Die PCR wurde 1983 von Kary B. Mullis entdeckt und seitdem weiterentwickelt [108]. Mit Hilfe der PCR kann ein kurzer, genau definierter Teil eines DNS-Abschnittes vervielfältigt werden. Eine PCR benötigt mehrere grundlegende Elemente. (1) Die **Original-DNS**, die den zu amplifizierenden Bereich enthält (2) **Zwei Primer**, um Anfang und Ende der zu vervielfältigenden Sequenz

festzulegen, (3) die **Thermostabile Polymerase**, um den flankierten Bereich zu duplizieren, (4) **Nukleotide**, die Bausteine für den von der DNS-Polymerase synthetisierten DNS-Strang und (5) die **Puffer**, die eine für die DNS-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellen. Der Prozess der PCR besteht aus 20 bis 40 Zyklen, die in jeweils drei Schritte unterteilt werden: Zunächst wird die doppelsträngige DNS erhitzt, um sie in die komplementären Einzelstränge zu trennen (Denaturierung). Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die *Primer* sich an die einzelnen DNS-Stränge anlagern können (*Annealing*). Im dritten Schritt synthetisiert die Polymerase entsprechend der Matrize eine komplementäre Kopie jedes Stranges. Dieser Schritt heißt Elongation.

## Quantitative PCR

### A) Die Echtzeit-PCR

Die Echtzeit-PCR (engl. *real-time* PCR) macht es möglich, genaue Aussagen über die eingesetzte DNS-Menge zu treffen. Die Echtzeit-PCR-Geräte (Firmen Roche, PerkinElmer, Stratagene u. a.) können die Anzahl gebildeter DNS-Moleküle *online* nach jedem Zyklus erfassen. Die Grundlage für die heute angewandte *real-time* quantitative PCR wurde 1992 durch Higuchi et al. geschaffen [46]. Es wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff verwendet, um die Reaktion verfolgen zu können. Die Fluoreszenz steigt proportional mit der Produktmenge an. Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten *Threshold Cycle* oder CT-Wert. Der CT-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt und die Amplifikation der DNS exponentiell ist. Der Zeitpunkt des Auftretens dieser so genannten log-linearen Phase ist abhängig von der initial eingesetzten Menge an DNS. Deshalb werden parallel in jedem PCR-Lauf bekannte *Template*-Mengen amplifiziert. Aus diesen lässt sich eine Standardkurve erstellen, anhand derer von einem bestimmten CT-Wert auf eine *Template*-Konzentration geschlossen werden kann.

### B) Der *LightCycler* – ein Echtzeit-PCR-Gerät

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der *LightCycler* (RocheDiagnostics) als Echtzeit-PCR-Gerät benutzt. Zur Detektion der PCR-Produkte wurden Hybridisierungsson-

den eingesetzt, die Signale konnten über zwei Fluoreszenzkanäle (Kanäle F2 und F3) gemessen werden.

#### C) Das Prinzip der Hybridisierungssonden

Hybridisierungssonden bestehen aus einem Paar sequenzspezifischer Oligonukleotide, die benachbart hybridisieren können. Sie tragen an den zugewandten Ende zwei Fluorophore, die über Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) interagieren können. Oligo 1 ist am 3'-Ende mit Fluorescein (FL), und Oligo 2 am 5'-Ende mit einem LC-spezifischen Farbstoff markiert. Es gibt zwei dieser LC-spezifischen Farbstoffe, von denen einer Licht der Wellenlänge 640 nm (LC640 wird in Kanal F2 gemessen) und der andere Licht der Wellenlänge 710 nm (LC705 wird in Kanal F3 gemessen) emittiert. Dabei überträgt der kurzwelligere Farbstoff Fluorescein, der mittels blauen Lichts angeregt wird, seine Energie strahlungslos an den langwelligeren Farbstoff LC. Dieser gibt ein rotes Licht ab, das detektiert wird. Das Signal kommt also nur zustande, wenn beide Sonden in räumlicher Nähe binden. Bei einem Überschuss an Sonden ist die Signalfluoreszenz proportional zur Menge der vorliegenden Zielsequenz.

#### D) Duplex-PCR

Um (heterozygote) Deletionen und Duplikationen größerer DNS-Abschnitte nachzuweisen, wurde das Prinzip der Duplex-PCR angewandt. Die Verwendung zweier unterschiedlich markierter Paare von Hybridisierungssonden ermöglichte die Koamplifikation der Ziel-DNS und eines Referenzgens in einem Reaktionsansatz für beide unter exakt gleichen Bedingungen. Der Quotient aus der Menge an Ziel-DNS und Referenzgen-DNS zeigt an, ob eine Duplikation, eine Deletion oder keine Veränderung der Ziel-DNS vorliegt.

### **Protokolle zur PCR bei verschiedenen Fragestellungen**

Für die konventionelle PCR (siehe A und B) wurde ein herkömmlicher Thermocycler verwendet, die Echtzeit-PCR (siehe C) erfolgte am *LightCycler* (RocheDiagnostics).

#### A) PCR-Ansatz und -Reaktion für konventionelle Mutationsdetektion

Zur Mutationsdetektion mittels SSCP und PCR-Produkt-Sequenzierung wurde ein PCR-Ansatz mit einer Standard-Taq-Polymerase (Q-Biogene oder Eppendorf) eingesetzt. Das

Temperaturoptimum dieses Enzyms liegt bei 70 - 80 °C. Es besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, das heißt, Nukleotide, die in Syntheserichtung vor der Polymerase liegen, werden abgebaut. Eine Lesekorrektur, also eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, fehlt. Die Taq-Polymerase fügt dem PCR-Produkt unabhängig von der Matrize am 3'-Ende ein Desoxyadenosin an.

PCR-Ansatz:

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
steriles dH <sub>2</sub> O		7,3 µl	
Puffer	10x	2,0 µl	1x
dNTP-Mix	1 mM	4,0 µl	4 nmol
<i>Primer+</i>	10 µM	0,8 µl	8 pmol
<i>Primer-</i>	10 µM	0,8 µl	8 pmol
<i>Template</i>	5 - 10 ng/µl	5,0 µl	25-50 ng
Taq	5 U/µl	0,1 µl	0,5 U
		Σ 20,0 µl	

Das Volumen des Probeansatzes konnte je nach Fragestellung variieren (10 - 20 µl). In der obigen Tabelle ist als Beispiel ein PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl dargestellt. Bei jeder PCR lief ein Kontrollansatz ohne *Template* mit (Negativkontrolle), d. h. das Volumen des *Templates* wurde durch H<sub>2</sub>O ersetzt. War eine geeignete Positivkontrolle (bekannte Mutation) vorhanden, so wurde diese ebenso mitgeführt. Beim Ansatz der PCR war es wichtig, die Taq-Polymerase zuletzt zu pipettieren, um vorzeitige unerwünschte Reaktionen zu verhindern. Der Block mit der Fassung für die Reaktionsgefäße und der beheizbare Deckel eines Thermocyclers wurden auf 95 °C vorgeheizt, bevor die Proben hineingestellt wurden.

PCR-Reaktion:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 35-39
<i>Annealing</i>	55 - 72 °C	30 s	
Extension	72 °C	30 s - 45 s	
Terminale Extension	72 °C	10 min	
Endtemperatur/Kühlung	4 °C	unendlich	

Das PCR-Programm steuert über die Zeit und die Temperatur die Thermozyklen. Die

*Annealing*-Temperatur variierte sehr stark. Sie wurde an die Schmelztemperatur des *Primers*, die durch die *Primer*-Sequenz bestimmt wird, angepasst. Die Extensionzeit richtete sich nach der Größe des Fragments und der Synthesegeschwindigkeit der Polymerase, die auf 1 kb/min geschätzt wurde.

#### B) PCR-Ansatz und -Reaktion für die dHPLC-Analyse

Es gibt einige Detergenzien, die nicht im PCR-Ansatz für die dHPLC enthalten sein sollen, da sie das Säulenmaterial schädigen. Aus diesem Grund wurden die Bio-Therm<sup>TM</sup>-DNS-Polymerase und der 10xPuffer Bio-Therm<sup>TM</sup> benutzt, die keine schädlichen Zusatzstoffe enthalten. Der PCR-Ansatz erfolgte nach dem Schema:

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
steriles dH <sub>2</sub> O		14,8 $\mu$ l	
Puffer	10x	2,5 $\mu$ l	1x
dNTP-Mix	10 mM	0,5 $\mu$ l	5 nmol
<i>Primer</i> +	10 $\mu$ M	1,0 $\mu$ l	10 pmol
<i>Primer</i> -	10 $\mu$ M	1,0 $\mu$ l	10 pmol
<i>Template</i>	5 - 10 ng/ $\mu$ l	5,0 $\mu$ l	25-50 ng
Taq	5 U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	1 U
		$\Sigma$ 25,0 $\mu$ l	

Die Zyklusbedingungen waren wie folgt:

94 °C für 4 min (initiale Denaturierung) // 39 Zyklen: 94 °C für 30 s; 55 - 61 °C für 30 s; 72 °C für 30 s // 72 °C für 4 min (endgültiger Elongationsschritt)

#### C) Quantitative Echtzeit-PCR mit Hybridisierungssonden

Zur Detektion von (heterozygoten) Deletionen oder Duplikationen im *Parkin*- und *DJ1*-Gen wurde eine quantitative Echtzeit-PCR angewandt. Beim *Parkin*-Gen wurden die Exons 1-12 und beim *DJ1*-Gen die Exons 2-7 untersucht. Jeweils ein Exon des untersuchten Gens wurde mit einem Teil des Referenz-Gens koamplifiziert. Als Referenz-Gen diente das  $\beta$ -Globin-Gen. Das spezifische Exon-Produkt hybridisierte mit den Sonden, die mit LC 640 markiert waren, und wurde auf Kanal 2 des *LightCyclers* detektiert. Das Referenz-Gen-Produkt wurde entsprechend auf Kanal 3 detektiert (markiert mit LC 705). Bei jedem Lauf wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Standard-DNS (Roche Diagnostics) bekannter Konzentration (0,6125 ng/ $\mu$ l, 2,5 ng/ $\mu$ l, 10 ng/ $\mu$ l) mitgeführt. Anhand

der Standardkurve konnte eine absolute Quantifizierung erreicht werden. Aus den vom *LightCycler* errechneten Anfangs-DNS-Mengen ließ sich ein Quotient aus der Menge des spezifischen Exons und der Menge an  $\beta$ -Globin errechnen. Dieser Wert entspricht der Gendosis, da er angibt, in wie vielen Kopien das Exon vorliegt. Im Normalfall sind alle Gene in zweifacher Kopie (zwei Allele) vorhanden. Ein Wert zwischen 0,8 und 1,2 wurde als normal betrachtet. Eine heterozygot auftretende Deletion des Exons wurde bei einem Wert zwischen 0,4 und 0,6 erwartet und eine heterozygote Duplikation bei Werten zwischen 1,3 und 1,7. Alle Werte wurden doppelt bestimmt und die Standardabweichung ermittelt. Es wurden nur die Doppelwerte akzeptiert, deren Standardabweichung kleiner oder gleich 10 % der ermittelten Konzentration war. Alle gefundenen Gendosisveränderungen wurden mindestens zweimal bestätigt.

Der folgende Reaktionsansatz wurde genutzt (das Exon 1 des *Parkin*-Gens wurde in 4 % Glycerin amplifiziert).

Substanz	Konzentration	Volumen	Endkonz. im Ansatz
dH <sub>2</sub> O		ad 10 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,8 bis 1,8 $\mu$ l	2 bis 4,5 mM <sup>a</sup>
<i>Primer</i> Ex (F+R)	5 - 20 $\mu$ M	1,0 $\mu$ l	0,5 - 2,0 $\mu$ M
Sonde FL Ex	4 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
Sonde LC Ex	4 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
<i>Primer</i> Glob (F+R)	5-20 $\mu$ M	1,0 $\mu$ l	0,5 - 2,0 $\mu$ M
Sonde FL Gl	4 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
Sonde LC Gl	4 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
Hybrid-Mix (Kit <sup>b</sup> )	10x	1,0 $\mu$ l	1 $\times$
DNS	5 ng	2,0 $\mu$ l	10 ng
		25,0 $\mu$ l	

<sup>a</sup>: 1 mM ist im Hybrid-Mix enthalten;

<sup>b</sup>: DNS *Master Fast Start Hybridization Probes* (RocheDiagnostics)

Am *LightCycler* wurde folgendes Programm zur Amplifikation angewandt: 95 °C 10 min // 39 Zyklen: 95 °C 10 s; 55 °C 10 s; 72 °C 10 s // Kühlen auf 40 °C 30 s

## 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese und Gelelution

Die horizontale Gelelektrophorese wurde als Standardmethode zum Nachweis und zur Auftrennung der PCR-Produkte nach der PCR verwendet. Die Agarose dient als Matrix,

in der DNS-Moleküle in einem elektrischen Feld wegen der negativ geladenen Phosphatgruppen im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNS zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch verschiedene Faktoren wie die Molekülgröße, die Konformation der DNS, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung beeinflusst. Sie nimmt logarithmisch mit steigender Basenzahl ab. Zur Größenabschätzung des PCR-Produkts wurde ein DNS-Längenstandard (100 bp-Leiter) aufgetragen.

### **DNS-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Abhängig von dem zu erwarteten Molekulargewichtsbereich lagen die Konzentrationen des Agarose-Gels zwischen 0,7 und 2,0 %.

*Vorbereiten des Gels:*

- Je nach gewünschter Agarosekonzentration Agarose in 1x TBE in der Mikrowelle aufkochen
- Zugabe von 1/50 Vol. Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml)
- Gellösung nach dem Abkühlen auf 50 - 60 °C in eine vorbereitete Gelkammer mit ein bis zwei Kämmen gießen
- Nach dem Erstarren des Gels Kämme vorsichtig herausziehen
- Gelträger in eine Pufferkammer einsetzen und mit 1x TBE als Laufpuffer überschichten
- DNS-Proben mit 1/3 Vol. Formamid-Farbstoff versetzen
- Proben und geeigneten Längenstandard in die Ladetaschen pipettieren

*Elektrophorese:* Elektrophorese bei 80 bis 120 V für 1 bis 2 h. Die Dauer ist abhängig von der verwendeten Kammer.

*Fotografieren des Gels:* Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNS. Da es unter UV-Licht (365 nm) fluoresziert, wird das in die DNS eingelagerte EtBr als rot-orange-farbige Bande sichtbar. Mit einer Digitalkamera und angeschlossenem Bildverarbeitungssystem (*BioDocAnalyse*, Biometra) konnte das Gel fotografiert werden.

### **Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen – die Gelelution**

Die Elution aus Agarose ist eine Methode zur Reinigung der PCR-Produkte von Nukleotiden, *Primer* und unspezifischen PCR-Amplifikaten. Dieses Verfahren wurde verwendet,

um PCR-Produkte für die Sequenzanalyse vorzubereiten, da die Sequenzier-Reaktionen extrem sensitiv auf minderwertige Qualität der DNS-Proben reagieren. Das vorgefertigte System *Perfectprep Cleanup* (Eppendorf) wurde zur Aufreinigung benutzt. Diese Methode nutzt die Eigenschaft der DNS, in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen reversibel an Glaspartikel (Silica-Partikel) zu binden und nach Absenken des Salzgehalts wieder in Lösung zu gehen [124]. Zunächst wurde die DNS-Bande knapp mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Agarose wurde in einem Hochsalzpuffer unter Wärmezufuhr gelöst. Die Adsorption der DNS an Silica-Partikel wurde dadurch ermöglicht. Es folgten einige Waschschriffe und schließlich die Elution der gereinigten DNS mit 10 mM Tris-Lösung. Die Geelution wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.2.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)**

Die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen dient der analytischen Trennung von DNS. Für Nukleinsäuren hat die Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Vergleich zur Elektrophorese in Agarosegelen eine höhere Belastungskapazität sowie eine höhere Trennkapazität.

#### ***Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse***

Die SSCP-Analyse wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Exons 1 bis 10 und des Exons 12 des *Parkin*-Gens angewandt. Es ist ein etabliertes elektrophoretisches Trennverfahren, das der Detektion von DNS-Mutationen auf Nukleotid-Ebene dient [95]. Es wird ein maximal 500 bp langes DNS-Fragment mittels PCR amplifiziert. Das Fragment wird anschließend denaturiert und auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Methode basiert auf der Tatsache, dass Einzelstrang-DNS im nicht-denaturierten Zustand eine Faltstruktur besitzt, die durch intramolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen bestimmt wird. Diese sequenzentsprechende Sekundärstruktur beeinflusst die Beweglichkeit der DNS während der Elektrophorese auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel. Ein DNS-Molekül, das eine Mutation aufweist, selbst eine Einzelbasensubstitution, hat eine andere Sekundärstruktur im Vergleich zum Wildtyp. Es bewegt sich deshalb mit einer anderen Geschwindigkeit durch das Gel.

Verglichen mit den übrigen Proben wird dies durch ein abweichendes Bandenmuster sichtbar. Außer der Sequenz bewirken weitere Faktoren (Temperatur, Luftdruck, pH und Fragmentlänge) eine Veränderung des Laufverhaltens der Einzelstrang-DNS. Da nicht alle Bedingungen konstant gehalten werden konnten, mussten immer mehrere Proben in einem Lauf analysiert werden. Im Vergleich waren einzelne abweichende Muster gut zu identifizieren.

Durchführung:

A) Analyse im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel

- Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  10 % APS zu 50 ml SSCP-Acrylamid-Gellösung
- Gießen eines Gels (25 cm x 40 cm und 4 mm dick), luftblasenfrei
- Einspannen der Gele nach der Polymerisation in Kammern, vertikal
- Pufferkammern mit 1x TBE als Laufpuffer auffüllen und Ladekamm einsetzen
- PCR-Produkte mit 40 % Formamid-Farbstoff versetzen und für 5 min bei 95 °C denaturieren, danach sofort auf Eis stellen
- Je 7  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt bzw. Längenstandard pro Ladetasche auftragen
- Elektrophorese bei konstanter Leistung (4 - 20 W) über 5 - 16 h

B) Silberfärbung

Zum Sichtbar-Machen der PCR-Moleküle im Gel erfolgte die Silberfärbung (v. Deimling et al. 1993). Dieses Verfahren ist äußerst sensitiv und beruht auf der Komplexierung von  $\text{Ag}^+$ -Ionen.

- Trennen der beiden Elektrophoreseplatten
- Inkubation der Gele für 5 min in 10 % Ethanol
- Entfernen des Ethanols und Inkubation für 3 min in 1 % Salpetersäure
- Zweimal mit Aqua dest. spülen
- Inkubation für 20 bis 60 min in 12 mM  $\text{AgNO}_3$ -Lösung
- Dreimal mit Aqua dest. spülen
- Entwickeln der Gele mit 280 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,2 % Formaldehyd-Lösung
- Stoppen der Färbung durch Zugabe von 10 % Essigsäure
- Waschen des Gels mit Aqua dest. und Blotten des Gels auf Whatman-Papier
- Trocknen des Gels auf heizbarem Geltrockner für 1-2 h bei 75 °C

## Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der denaturierenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde das Exon 11 des *Parkin*-Gens untersucht. Bei dieser Methode wird einzelsträngige Nukleinsäure nach ihrer Kettenlänge aufgetrennt. Dies wird durch den Zusatz von Harnstoff in das Polyacrylamidgel ermöglicht. Harnstoff, der sowohl Wasserstoffbrückendonator als auch -akzeptor ist, unterdrückt die Ausbildung von intra- und intermolekularen Wasserstoffbrücken.

### 2.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde zur Analyse der Exons 1-12 des *Parkin*-Gens und der Exons 2-7 des *DJ1*-Gens angewandt. Die DNS-Sequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung der DNS-Sequenz, also der Nukleotidabfolge, von genomischer DNS. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode nach Sanger [109] durchgeführt. Das enzymatische Verfahren beruht auf dem Einbau von Didesoxynukleotiden in die wachsende Polynukleotid-Kette. Die Didesoxynukleotide besitzen am C3-Atom keine freie OH-Gruppe für die Polymerisierung, so dass ein Kettenabbruch erzwungen wird. Die Sequenzier-Reaktion wurde mit einem vorgefertigten System (*Thermo Sequenase fluorescent labelled Primer cycle sequencing kit*) der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Der zu sequenzierende DNS-Abschnitt wurde an seinem 3'-Ende mit einem komplementären DNS-Oligonukleotid hybridisiert. Mit Hilfe der DNS-Polymerase kann an diese als *Primer* dienende Sequenz ein zur Matrize komplementärer Strang synthetisiert werden. In einem Ansatz wurden zwei unterschiedliche *Primer* eingesetzt: einer für den Vorwärts- und einer für den Rückwärtsstrang. Ein sequenzspezifischer Kettenabbruch wurde dadurch erreicht, dass der Sequenzierungsansatz in vier gleiche Teile geteilt und in jeden Ansatz eine geringe Menge eines entsprechenden 2'3'-Didesoxynukleotids gegeben wurde. Der Reaktionsansatz enthielt nun ein Gemisch aus Desoxynukleotiden (dNTPs) und Didesoxynukleotiden (ddNTPs). Aufgrund des jeweils spezifischen 2'3'-Didesoxynukleotids erfolgt der Kettenabbruch basenspezifisch, an jeder Position mit der entsprechenden Base gleich wahrscheinlich. Bei der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel nach der Fragment-Größe ergab sich deshalb ein Gemisch verschieden langer Bruchstücke, aus dem die Basensequenz abgelesen werden konnte. Die Detektion der DNS-Fragmente wurde durch die Markierung der *Primer* mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen

ermöglicht (der Vorwärts-*Primer* mit 700 nm, der Rückwärts-*Primer* mit 800 nm). Das verwendete Sequenziergerät (*LI-COR Long Read IR2-DNS-Sequenzierer*) ist ein Plattensequenziergerät, das mit Hilfe von zwei Infrarot-*Lasern* bei 700 und 800 nm simultan das Gel absucht (Duolaser).

#### A) Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktion diene das mittels Gelelektion aufgereinigte PCR-Produkt als Vorlage.

##### Ansatz: Mastermix

Substanz	Volumen
DNS	2-10 $\mu\text{l}$
M13F- <i>Primer</i> , IRD700-markiert, 2 $\mu\text{M}$	1,5 $\mu\text{l}$
M13R- <i>Primer</i> , IRD800-markiert, 2 $\mu\text{M}$	1,5 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	ad 17,0 $\mu\text{l}$

- Verteilen von je 3,9  $\mu\text{l}$  Mastermix auf 4 *Tubes*
- Zugabe von je 2  $\mu\text{l}$  A-, T-, G-, C-Reagenz (aus Kit)
- Amplifikation mit Kettenabbruch unter folgenden Bedingungen: 94 °C 2 min // 39 Zyklen: 94 °C 30 s; 58 °C 30 s; 72 °C 30 s // 72 °C 10 min // 4 °C als Endtemperatur
- Zugabe von je 4  $\mu\text{l}$  Ladepuffer (aus Kit)

#### B) Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese:

- Gießen eines Gels (25 cm  $\times$  41 cm  $\times$  0,2 mm)
- Nach Polymerisation in Sequenziergerät LI-COR einspannen, 1x TBE als Laufpuffer in Pufferkammern füllen
- Rechner für den Gellauf vorbereiten (Fokussierung des Lasers und Hell-Dunkel-Abgleich)
- Vorlauf (mind. 20 min)
- Denaturieren der Proben bei 95 °C für 3 min, danach sofort in Kühlblock stellen
- Laden von je 1,5  $\mu\text{l}$  Produkt in der Reihenfolge A-T-G-C
- Elektrophorese für ca. 6 h bei 50 °C und 31,5 W
- Auswertung durch direktes Lesen am Bildschirm

## 2.2.7 Denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC)-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden die kodierenden Exons 2 bis 7 des *DJ1*-Gens mittels der dHPLC-Analyse getestet. Das Verfahren der dHPLC bietet die Möglichkeit, Mutationen im hetero- und homozygoten Zustand auf Nukleotidebene zu detektieren. Bei optimalen Analysebedingungen können homozygote Mutationen nur zum Teil durch eine Verschiebung der Retentionszeit des Peaks vom Wildtyp unterschieden werden. Um homozygote Mutationen sicher zu detektieren, wurden deshalb jeweils zwei Proben im Verhältnis 1:1 gemischt und durch Denaturierung und Renaturierung die Ausbildung von Homo- und Heteroduplexstrukturen bewirkt.

### Bestimmung der Analysetemperatur

Die optimale Analysetemperatur wurde theoretisch mit Hilfe der WAVEMAKER<sup>TM</sup>-Software (Transgenomic) ermittelt. Dieses Programm analysiert das Schmelzverhalten einer eingegebenen DNS-Sequenz und bestimmt über den T<sub>m</sub>-Wert die Analysetemperatur. Führte dieses zu keinem befriedigenden Ergebnis, wurde eine Wildtyp-DNS bei ansteigender Temperatur in 0,5-°C-Schritten analysiert. Dabei wurde bei einer Temperatur von 3 °C unterhalb der ermittelten Analysetemperatur begonnen und bis zu einer Temperatur von 3 °C oberhalb fortgefahren. Bei DNS-Sequenzen, die langsam über einen Bereich von 10 °C aufschmelzen, wurden zwei Temperaturen für die Analyse festgelegt.

### Mutationsanalyse mittels dHPLC

#### A) Probenvorbereitung

- Durchführung einer konventionellen PCR und Nachweis der PCR-Produkte auf Agarosegel
- Mischen von je zwei PCR-Produkten im Verhältnis 1:1
- Denaturieren für 2 min bei 94 °C
- Graduelles *Reannealing* durch Temperaturniedrigung von 94 °C auf 10 °C in 25 min

#### B) dHPLC-Analyse

- Vorbereiten der dHPLC (Spülen der Säule und der Pumpen, Kalibrieren und Messung des Standards)

- Einsetzen der Reaktionsgefäße
- Messen der Proben bei der entsprechenden Analysetemperatur
- Auswertung der dHPLC-Profile am Bildschirm

Bei einem auffälligen Profil wurden die beiden Proben eines Gemisches einzeln untersucht. Positive dHPLC-Ergebnisse wurden mittels Direkt-Sequenzierung verifiziert.

### 2.2.8 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP)

Die RFLP-Methode ist ein gängiges Verfahren zur Detektion von Punktmutationen. Dabei wird die DNS mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II behandelt. Diese bakteriellen Enzyme erkennen spezifische Sequenzen auf der DNS und führen dort Doppelstrangbrüche durch. Sie zerlegen ein größeres DNS-Molekül in kleinere Stücke (Restriktionsfragmente) von reproduzierbarer Länge. Bei den Erkennungssequenzen handelt es sich meist um 4 bis 6 bp lange Palindrome (invers repetitive Basensequenzen). Bei dieser Methode muss die Mutation im Bereich der Schnittstelle des ausgewählten Restriktionsenzymys liegen. Im Mutationsfall wird die spezielle Sequenz vom Restriktionsenzym nicht mehr erkannt und nicht zerschnitten, anders als im nicht-mutierten Fall. Dabei entstehen verschieden lange DNS-Stücke (Fragmentlängenpolymorphismus), die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend detektiert werden können. Im Rahmen dieser Studie wurde dieses Verfahren eingesetzt, um 88 Kontrollen auf den heterozygoten Basenaustausch c.293G>A des *DJ1*-Gens zu untersuchen.

Durchführung:

- Umsetzung einer Standard-PCR
- Restriktionsansatz:

Substanz	Volumen
DNS	13,0 $\mu$ l
Enzym (MspI)	0,5 $\mu$ l
Puffer	1,5 $\mu$ l

- Inkubation für 3 h bei 37 °C
- Auftragen auf Agarosegel

# Kapitel 3

## Ergebnisse

Im Rahmen dieser Studie wurden zwei Gene, die mit EOPD assoziiert sind, molekular-genetisch analysiert. Für das *DJ1* Gen wurde eine Methode etabliert, kleine Sequenzvariationen mittels dHPLC zu detektieren. Die dHPLC-Analyse, Sequenzierung und eine Gendosis-Untersuchung wurden insgesamt an einem Kollektiv von 316 Patientenproben durchgeführt mit dem Ziel, die Häufigkeit und Arten von *DJ1*-Mutationen zu bestimmen. Zusätzlich wurde die Prävalenz von *Parkin*-Mutationen bei 65 Patienten aus dem Kollektiv untersucht, um einen direkten Vergleich zur Häufigkeit von Mutationen in beiden Genen zu ermöglichen.

### 3.1 Patienten

Diese Studie erfasste 316 Patienten (138 weiblich, 173 männlich, 5 unbekannt) mit einem durchschnittlichen Erkrankungsbeginn im Alter von  $39,0 \pm 7,6$  Jahren (Bereich 14 bis 64 Jahre). Bis auf wenige Ausnahmen wurden nur Patienten mit einem EOPD (Erkrankungsbeginn  $< 50$  Jahre) in die Untersuchung aufgenommen. Entsprechend unterschiedlichen Auswahlkriterien wurden die Patienten in 5 Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 umfasste 65 italienische Patienten. Keine Patienten waren miteinander verwandt, Familienangehörige wurden nicht untersucht. Atypische Parkinson-Symptome traten bei drei Patienten auf. Die einzelnen Patienten waren keinem gemeinsamen Umwelteinfluss ausgesetzt. Gruppe 2 setzte sich aus 104 deutschen Patienten zusammen. Patienten der Gruppe 3 ( $n=19$ ) stammten aus einer geographisch isolierten Region in Südtirol (Norditalien). Die Patien-

ten der Gruppe 4 (n=71) waren serbischer Abstammung. Gruppe 5 umfasste 60 Patienten, die zur genetischen Untersuchung an das Institut für Humangenetik in Lübeck überwiesen wurden. Sie waren hauptsächlich europäischer Herkunft, u. a. deutsch, südtirolisch, irisch und russisch. Das Erkrankungsalter, die Familienanamnese und die Einschlusskriterien sind teilweise unbekannt.

Die Tabelle 3.1 fasst die klinischen Daten der untersuchten Patientengruppen zusammen.

**Tabelle 3.1:** Klinische Daten der untersuchten Patientengruppen

Gruppe	Anzahl der Patienten	Positive Familiengeschichte, n (%)	Alter bei Krankheitsbeginn, J, mean±SD (range)	Geschlecht m/w
1	65	2 (3,2) 3 unbekannt	<51, 43,2±5,4 (25-50) 1 unbekannt	34/31
2	101	34 (33,7) 5 unbekannt	<50, 36,7±6,9 (16 - 48) 5 unbekannt	40/61
3	19	5 (29,4) 2 unbekannt	<50, 39,4±8,4 (18 - 49) 2 unbekannt	6/12 1 unbekannt
4	71	16 (22,9) 1 unbekannt	<46, 39,1±4,1 (26 - 45)	30/40 1 unbekannt
5	60	17 (56,7) 30 unbekannt	<65, 38,1±12,1 (14-64) 16 unbekannt	28/29 3 unbekannt

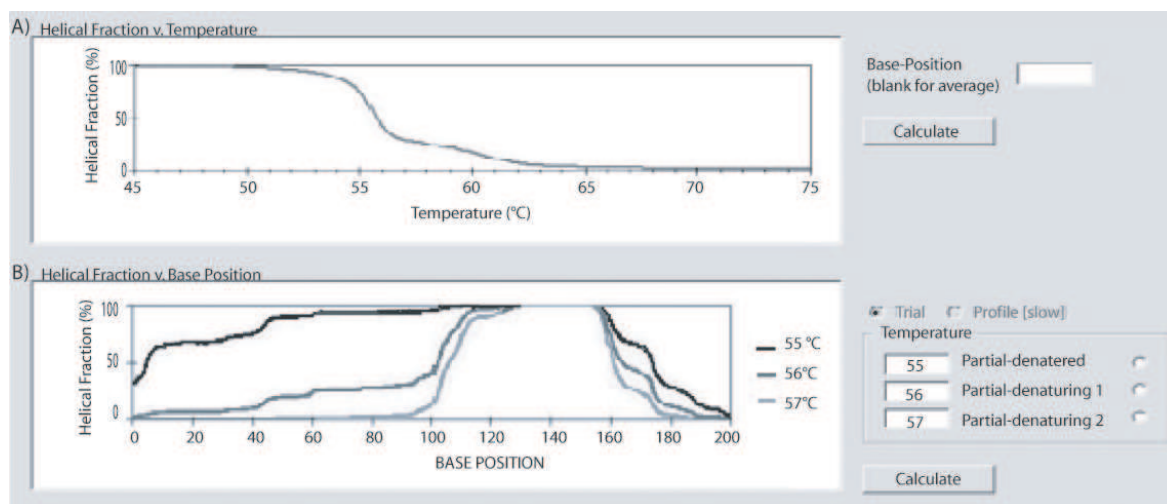
## 3.2 Etablierung der dHPLC-Analyse zur Detektion von Sequenzvariationen im *DJ1*-Gen

Die dHPLC-Analyse wurde als neue Methode zur Untersuchung von Mutationen und Polymorphismen auf Nukleotidebene etabliert.

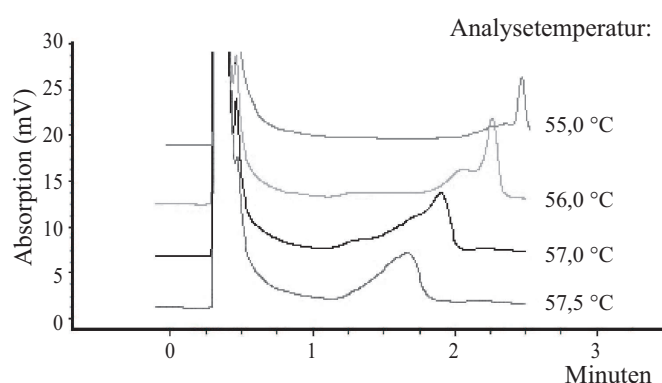
### 3.2.1 Optimierung der Analyse-Temperaturen

Das Prinzip der dHPLC-Methode wurde bereits im Detail erläutert. Die Sensitivität des Verfahrens ist stark temperaturabhängig. Um eine hohe Sensitivität zu gewährleisten,

wurden alle sechs kodierenden Exons des *DJI*-Gens einzeln hinsichtlich ihres Schmelzverhaltens untersucht. Zu diesem Zweck wurde die WAVEMAKER<sup>TM</sup>-Software (Transgenomic) eingesetzt. Die Software nutzt spezielle Algorithmen zur Berechnung des Schmelzverhaltens doppelsträngiger DNS, basierend auf der DNS-Fragment-Länge, der Nukleotid-Sequenz und -Beschaffenheit und den Chromatographie-Bedingungen. Es muss die komplette Sequenz des jeweiligen PCR-Produktes berücksichtigt werden. Das Programm stellt das Schmelzverhalten sowie den Anteil partiell denaturierter, nicht helikaler Segmente des PCR-Produkts bei unterschiedlichen Analyse-Temperaturen graphisch dar. Mit Hilfe dieser Diagramme ist es möglich, die optimale Temperatur zu ermitteln. Anschließend berechnet die Software die geeigneten Analyse-Bedingungen. Die Abbildung 3.1 zeigt die Bildschirmanzeige der WAVEMAKER<sup>TM</sup>-Software mit der Darstellung der Schmelzkurven und des prozentualen helikalen Anteils. Soweit möglich wurden die Analyse-Bedingungen mittels Positiv-Kontrollen oder bekannter Polymorphismen verifiziert. Dabei zeigte sich, dass die ermittelten Analyse-Temperaturen für die Exons 4, 5 und 7 nicht zu den gewünschten Ergebnissen führten. Aus diesem Grund wurde die Wildtyp-DNS bei variierenden Temperaturen untersucht (Abbildung 3.2). Für die Untersuchung der Exons 5 und 7 wurden 2 Analysetemperaturen ausgewählt, da beide Exons über einen großen Temperaturbereich aufschmelzen.



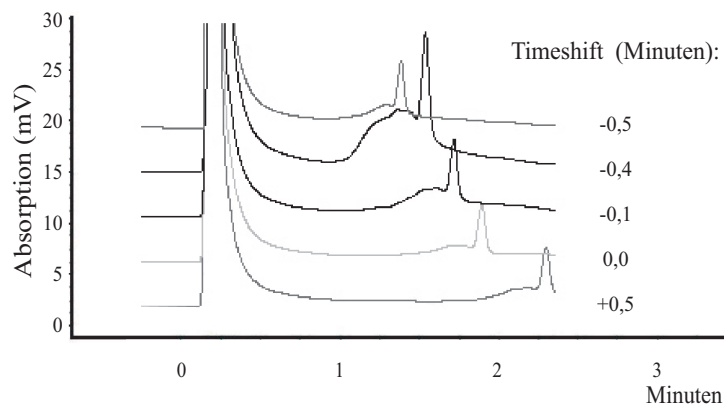
**Abbildung 3.1:** dHPLC-Analyse: Die Abbildung zeigt die Programmanzeige der WAVE-MAKER-Software. Die optimale Analyse-Temperatur wurde mit dem PC-Programm WAVE-MAKER theoretisch ermittelt. Dieses Programm analysiert das Schmelzverhalten einer eingegebenen Sequenz und bestimmt über den  $T_m$ -Wert die Temperatur. (A) zeigt die Schmelzkurve für Exon 4. Der helikale Anteil (in %) gibt den prozentualen Anteil an Doppelstrang-DNS entlang des Fragments an. Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass der  $T_m$ -Wert (die helikale Fraktion in % ist dann gleich 50) für Exon 4  $56,0\text{ }^\circ\text{C}$  beträgt. (B) Schmelzkurvenprofile von Exon 4, berechnet für unterschiedliche Temperaturen. Optimale Analyse-Bedingungen liegen bei einer Säulentemperatur von  $55\text{ }^\circ\text{C}$  (schwarze Schmelzkurve) vor, bei der ein Großteil des DNS-Fragments im teilweise denaturierten Zustand vorliegt. Bei höheren Analyse-Temperaturen sind mehr Anteile des Fragments bereits komplett denaturiert.



**Abbildung 3.2:** dHPLC-Analyse: Optimierung der Analysetemperatur von Exon 4 des *DJ1*-Gens. Die Wildtyp-DNS wurde bei ansteigender Analysetemperatur detektiert. Bei höheren Temperaturen erfolgte die Elution der Probe zu einem früheren Zeitpunkt und der Peak verbreiterte sich. Die beste Darstellung der Homoduplex-DNS wurde bei einer Analyse-Temperatur von  $55\text{ }^\circ\text{C}$  erreicht.

### 3.2.2 Optimierung der Zeitverschiebung

Anhand der Analyse-Temperatur wurde von der Software der Acetonitrilgradient berechnet. Wegen unterschiedlicher Bedingungen erfolgte bei einigen Exons die Elution der DNS nach Injektion sehr früh oder spät. Dadurch wurde die Detektion von Heteroduplices erschwert. Mit Einsatz der Zeitverschiebung konnte der Zeitpunkt der Elution verschoben werden. Er wurde so gewählt, dass die Retentionszeit zwischen 1.5 und 2 min lag.



**Abbildung 3.3:** dHPLC-Analyse: Optimierung der Zeitverschiebung. Das Diagramm zeigt die Retentionszeiten von Exon 4 des *DJ1*-Gens in Abhängigkeit von der eingestellten Zeitverschiebung. Anhand dieser Ergebnisse wurde für die Analyse des Exons 4 eine Zeitverschiebung von -0,1 min gewählt, die eine Elution der Probe nach ungefähr 1 min 45 s bedingt.

### 3.2.3 dHPLC-Analysebedingungen des *DJ1*-Gens

In der folgenden Tabelle sind die Analysebedingungen der sechs kodierenden Exons des *DJ1*-Gens dargestellt.

**Tabelle 3.2:** Analysebedingungen des *DJ1*-Gens

<i>Primer</i> Sequenzen, <i>Annealing</i> -Temperatur und Fragment-Länge				
Exon	Vorwärts- <i>Primer</i>	Rückwärts- <i>Primer</i>	<i>Annealing</i> -Temperatur (°C)	Fragment-Länge (bp)
2	GGGGTATCTCA GGGTTGCAATG	TGGCTAAAAAT CGATGTGGGACT	59.0	199
3	GGTGAGACCCC ATCTCTCTTT	AACAAAGAAGC CATATGAAGGAA	58.0	247
4	GCTATCTCCT GTACTTCCCACA	TTGAGGTATAATT GAGTAGAATTTTT	55.0	201
5	AGGTCAGAGA GCTTGTGGTTT	ACCAATGAC GCTGCAACAC	59.0	223
6	TGGGCTTTTCTAT ATCTGCACTTAG	GGGATTGCAGT AAGCCAAGA	61.0	240
7	GCCCATTAGG ATGTCACCTT	TTCCTAACGGC CTGTTTCTC	60.0	245
Bedingungen für die dHPLC-Analyse				
Exon	Ofentemperatur, °C	Zeitverschiebung (min)	Gradient %B	
2	59.0	0.5	51-61	
3	56.5	0	55-65	
4	55.0	-0.1	54-64	
5	58.0	0.3	53-63	
	61.5	0	51-60 <sup>a</sup>	
6	57.0	0	55-65	
7	58.5	-0.5	58-68	
	61.5	0	55-65	

<sup>a</sup>AT-Modus wurde genutzt

### 3.3 Mutationsanalyse des *DJ1*- und des *Parkin*-Gens

Im Rahmen dieser Studie wurden 316 Patienten mit EOPD mittels dHPLC, Sequenzierung und Gendosis-Untersuchung auf Mutationen im *DJ1*-Gen untersucht. Ebenfalls wurde die Gruppe 1 bestehend aus 65 Patienten auf Mutationen im *Parkin*-Gen analysiert. Die übrigen Gruppen wurden im Rahmen anderer Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Christine Klein auf Mutationen im *Parkin*-Gen untersucht [21, 42, 127]. Einen Überblick der Ergebnisse aller Untersuchungen wird im Kapitel 3.3.3 gegeben.

#### 3.3.1 Detektion von *DJ1*-Mutationen

Die dHPLC-Analyse und Gendosis-Untersuchung wurde an insgesamt 316 EOPD-Patienten durchgeführt. Lag bei einem Patienten eine Variation nur im heterozygoten Zustand vor, so erfolgte die vollständige Sequenzierung der Exons 2 bis 7 des *DJ1*-Gens. Dies geschah, um weitere Punktmutationen auszuschließen, da die dHPLC-Methode ebenfalls keine 100 % Sensitivität gewährleistet und möglicherweise Mutationen übersehen wurden.

#### Ergebnisse der *DJ1*-Mutationsanalyse

Im Rahmen dieser Untersuchung konnten unter den 316 Patienten drei Träger von *DJ1*-Mutationen im heterozygoten Zustand detektiert werden.

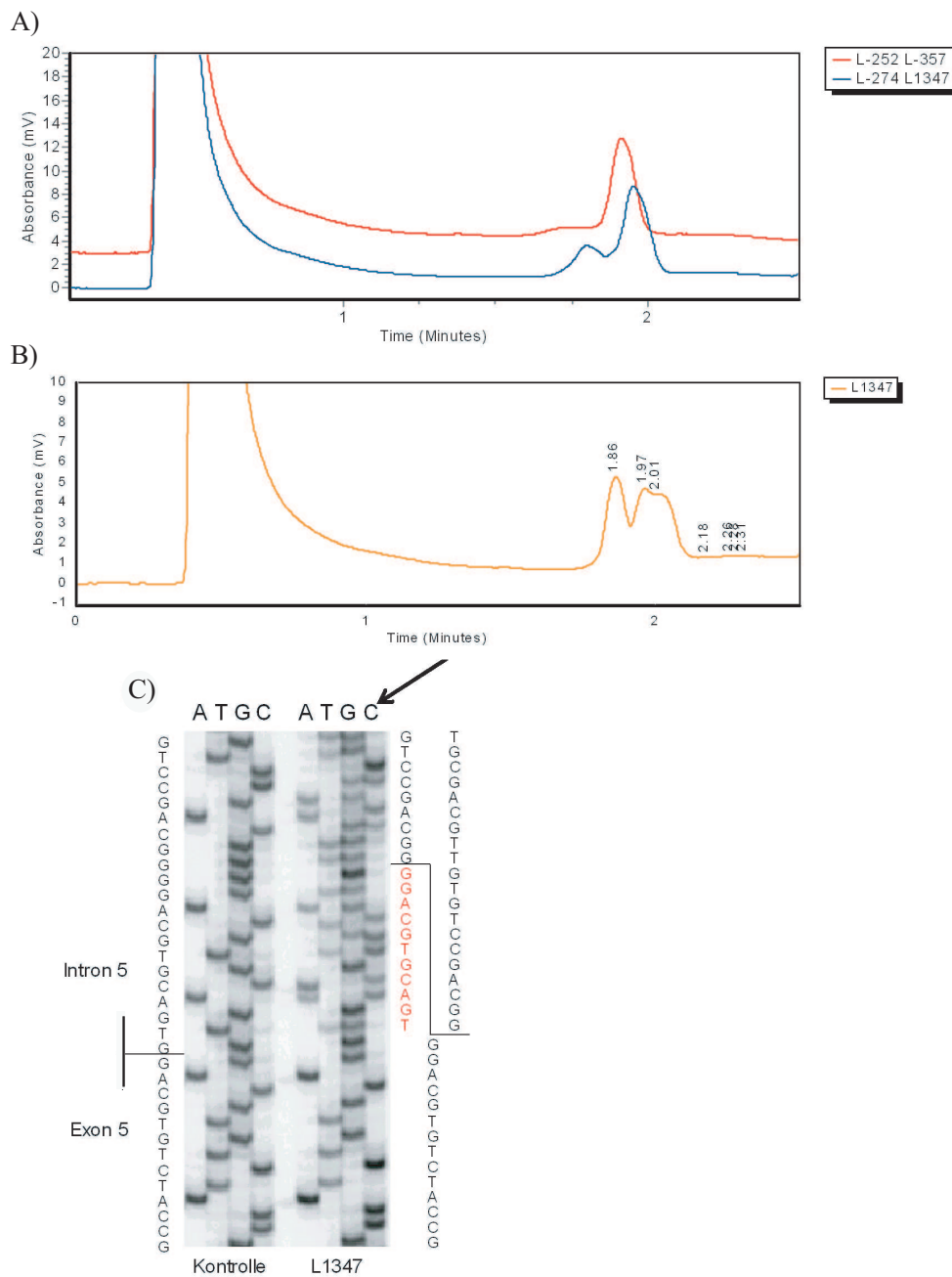
Fall 1: Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Deletion im heterozygoten Zustand am Anfang des Introns 5 (L1347: IVS5+2-12del).

Fall 2: Es konnte ein heterozygoter Mutationsträger mit einer Deletion von drei Exons (B66: Ex5-7del) detektiert werden.

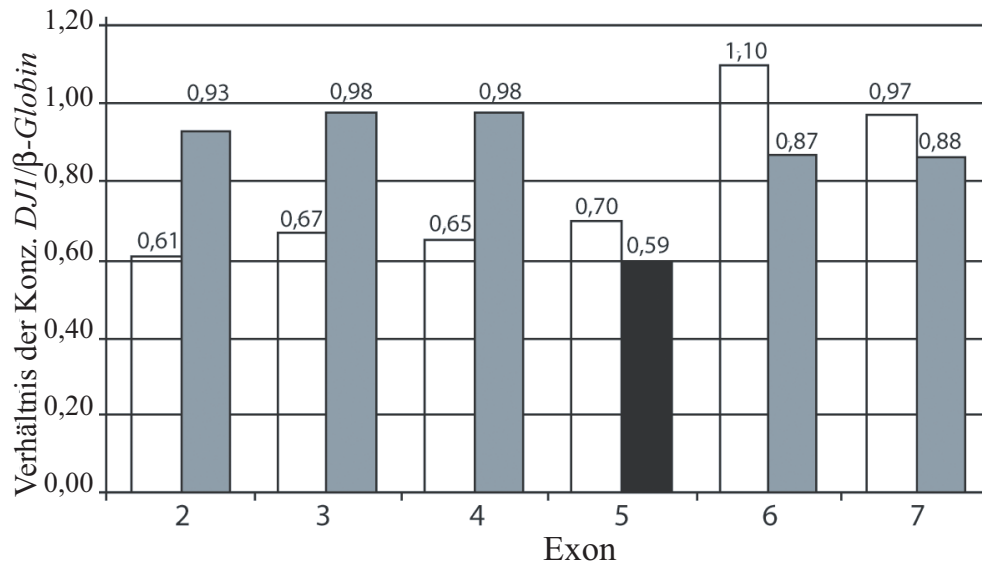
Fall 3: Eine Deletion von Exon 5 im heterozygoten Zustand (P56: Ex5del) wurde identifiziert.

Bei keinem dieser Patienten konnte eine korrespondierende Mutation durch Sequenzieren der kompletten kodierenden Region sowie der Exon-Intron-Grenze des *DJ1*-Gens festgestellt werden. Mutationen im *Parkin*-Gen wurden im Rahmen einer anderen Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe [42] ebenfalls nicht detektiert.

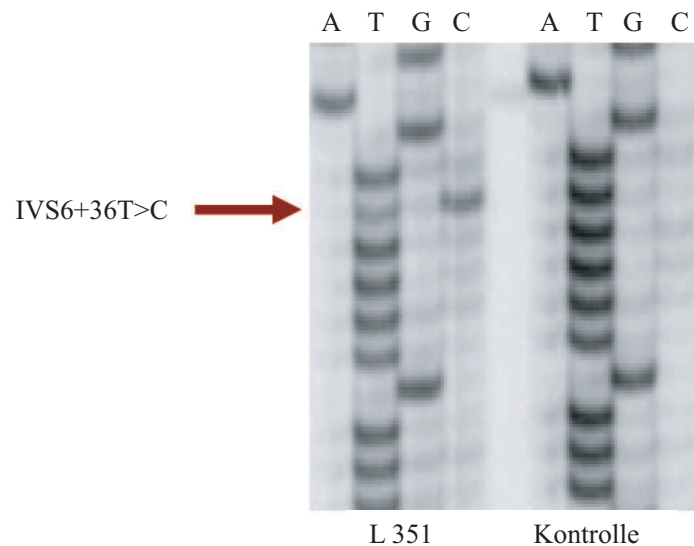
Neben den Mutationen wurden vier bekannte Polymorphismen im nicht-kodierenden Bereich des *DJ1*-Gens identifiziert: zwei Polymorphismen im Intron 4 (IVS4-98G>A; IVS4+30T>G), je einer im Intron 5 (IVS5+30G>A) und im Intron 6 (IVS6+38T>C). Zusätzlich wurde eine neue G>A-Substitution im Exon 5 (293G>A) bei 10 europäischen Patienten im heterozygoten Zustand (1,3 % der Chromosomen) und bei zwei nicht betroffenen Kontrollpersonen (eine im heterozygoten und eine im homozygoten Zustand) aus Deutschland und Südtirol identifiziert (1,5 % der Chromosomen). Ergebnisse zur Untersuchung der Substitution 293G>A sind in Kapitel 3.5 dargestellt. Die Lokalisation der Mutationen und Polymorphismen innerhalb des *DJ1*-Gens zeigt die Abbildung 3.7.



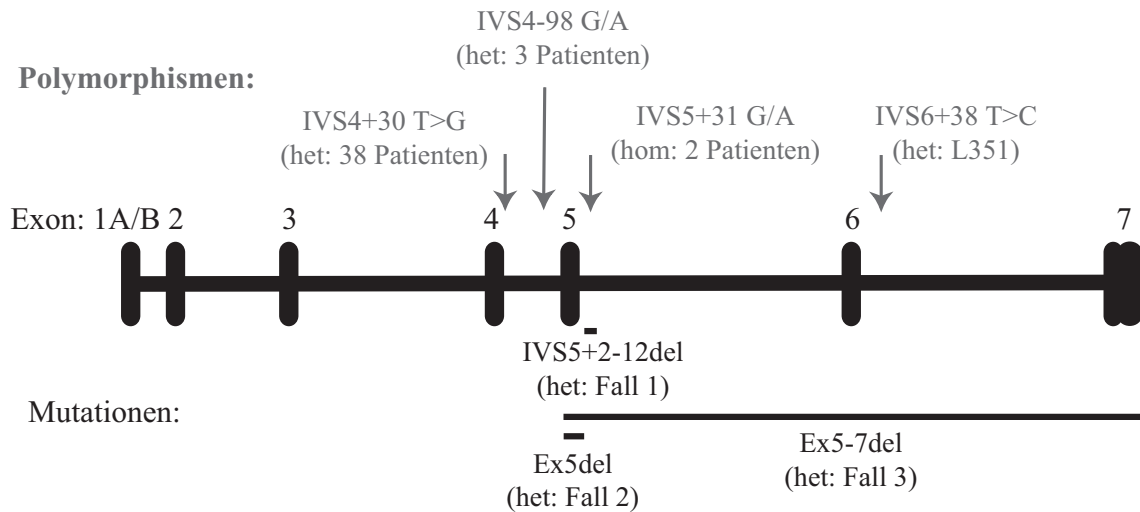
**Abbildung 3.4:** Mutationsanalyse mittels dHPLC von Fall 1. A) Das dHPLC-Profil des Probengemisches L-274 und L1347 (blau) zeigte im Vergleich zu einer normalen Kontrolle ein abweichendes Muster. B) Die anschließende Einzelmessung bestätigte bei der Probe L1347 die Bildung von Heteroduplices. C) Ergebnis der Sequenzierung der Probe L1347. Im Vergleich zu einer normalen Kontrolle ist das veränderte Bandenmuster deutlich erkennbar. L1347 zeigt eine heterozygote Deletion von 11 Nukleotiden im Bereich des Introns 5 des *DJ1*-Gens (IVS5+2-12del). Es handelt sich um eine Spleißmutation, da der hochkonservierte Spleiß-Donor (ein GT-Dinukleotid am 5'-Ende des Introns) betroffen ist. Das deletierte Thymidin, das zweite Nukleotid des Introns 5, wird aufgrund der Deletion durch ein Guanin ersetzt.



**Abbildung 3.5:** Ergebnisse der Gendosis-Untersuchung von Fall 3: Die grauen Balken entsprechen den Ergebnissen der Gendosis-Untersuchung von Fall 3. Bei Exon 5 zeigte sich ein Verhältnis von *DJ1*/ $\beta$ -Globin von 0,59 (schwarzer Balken). Dieses Verhältnis spricht für eine heterozygote Deletion von Exon 5 des *DJ1*-Gens. Die weißen Balken stellen die entsprechenden Verhältnisse einer positiven Kontrolle mit einer bekannten heterozygoten Deletion der Exons 1-5 (c.1\_322del) dar.



**Abbildung 3.6:** Die Sequenzierung der Probe L 351 zeigt den Polymorphismus IVS 6+38T>C im Intron 6. Der Polymorphismus führt zu keiner Veränderung auf Proteinebene, da er innerhalb des Introns lokalisiert ist.



**Abbildung 3.7:** Darstellung des *DJ1*-Gens mit der Lokalisation der gefundenen Mutationen und Polymorphismen. Die Polymorphismen sind oberhalb, die Mutation unterhalb der Sequenz angegeben. Die Proben-Nummern der Patienten mit der entsprechenden Mutation bzw. die Anzahl betroffener Patienten sowie der Zustand der Mutation/des Polymorphismus sind in Klammern angegeben.

### Auswirkung der Mutationen auf Proteinebene

Fall 1: Die identifizierte Mutation lag innerhalb des Introns 5 des *DJ1*-Gens. Introns kodieren nicht für einen Proteinabschnitt, da sie aus der Prä-mRNA herausgespleißt werden, bevor diese zur Translation aus dem Zellkern ausgeschleust wird. Die 11-bp-Deletion des Introns 5 des *DJ1*-Gens (IVS5+2-12del) beeinträchtigt die hoch-konservierte Spleißregion am Anfang des Introns, die normalerweise aus einem GT-Dinukleotid am 5'-Ende des Introns besteht. Durch die Deletion ist das Thymidin, das zweite Nukleotid des Dinukleotids, durch ein Guanin substituiert. Die Basenfolge in diesem Bereich, die sogenannte Exon-Intron-Grenze, dient dem Spleißapparat (Spleißosom) als Erkennungssequenz. Ist wie in diesem Fall eine essentielle Base ausgetauscht, so wird das Exon beim Spleißvorgang nicht berücksichtigt, wodurch es zur Synthese eines veränderten Proteins kommt. Es wird vermutet, dass die Mutation (IVS5+2-12del) durch die Veränderung der Spleißregion einen vorzeitigen Kettenabbruch des Proteins bewirkt.

Fall 2 und 3: Durch die Deletion der Exons 5-7 bzw. des Exons 5 kommt es wahrscheinlich ebenfalls zu einem vorzeitigen Kettenabbruch des Proteins.

Bei allen drei Patienten war keine weitere Untersuchung, z. B. cDNS-Sequenzierung

und *Southern-Blot*-Analyse, möglich, da keine RNA zur Verfügung stand.

### Klinische Symptome

Es folgen kurze klinische Fallberichte.

Fall 1: Die Patientin L1347 russischer Abstammung litt seit neun Jahren an einem langsam progredienten, tremor-dominanten PS. Die ersten Symptome traten in einem Alter von 17 Jahren mit einem intermittierenden Tremor beider Hände auf. Bis zum 21. Lebensjahr entwickelte die Patientin einen Ruhetremor in beiden Armen und eine Hypophonie. Ein Jahr später zeigten sich Probleme beim Gehen, das rechte Bein wurde nachgeschleppt. Mit 24 Jahren fanden sich im neurologischen Befund ein rechts- und armbetonter, feinschlägiger Ruhetremor, ein Zungentremor, eine Bradykinese mit Hypomimie, ein langsamer und steifer Gang jedoch kein Rigor. Der übrige neurologische Befund war bis auf eine leichte dystone Fehlstellung der Finger der rechten Hand unauffällig. Die Parkinson-Symptomatik sprach auf eine Therapie mit Dopaminagonisten an; die Laborergebnisse, neurophysiologische Tests und ein kraniales MRT waren unauffällig. Der 123-Jod-DAT-Scan zeigte eine deutliche Reduktion der Speicherung im *Nucleus caudatus* und *Putamen*, entsprechend der Diagnose der Parkinson-Krankheit. Ein IBZM-SPECT war ebenso mit der Diagnose vereinbar.

Fall 2: Der Patient B66 aus Südtirol litt seit dem 42. Lebensjahr an einem linksseitigen Tremor. Der Krankheitsverlauf war langsam und die Symptome sprachen gut auf eine Therapie mit L-Dopa und Pergolid an. Im Alter von 56 Jahren entwickelte er Fluktuationen (*wearing-off*-Phänomen und *on-off*-Phänomen) und die Behandlung mit L-Dopa verursachte Dyskinesien. Dennoch profitierte er von der L-Dopa-Therapie und konnte ein aktives Leben führen. Eine neurologische Untersuchung im Alter von 61 Jahren zeigte ein asymmetrisches, tremorbetontes PS mit nur schwach ausgeprägter Rigidität und Bradykinese. Der Patient hatte keine zusätzlichen klinischen Symptome wie z. B. psychiatrische Probleme, Dystonien oder Besserung nach Schlaf. Labortests, ein Kopf-CT und MRT waren unauffällig.

Fall 3: Im Alter von 45 Jahren verlor dieser serbische Patient seine Geschicklichkeit in der rechten Hand. Das Fortschreiten der Krankheit war schnell und 2,5 Jahre nach Krankheitsbeginn waren die Symptome symmetrisch ausgeprägt. Bereits nach drei Jahren ließ die

Wirkung der L-Dopa-Therapie stark nach. Es wurden keine L-Dopa-induzierten Dyskinesien beobachtet. Im Alter von 52 Jahren zeigte der Patient eine Hypomimie, verwaschene Sprache, beidseitige Akinese und Rigor, den typischen Parkinson-Gang und durch die posturale Instabilität eine Fallneigung. Mit 53 Jahren starb der Patient an einer myokardialen Infektion.

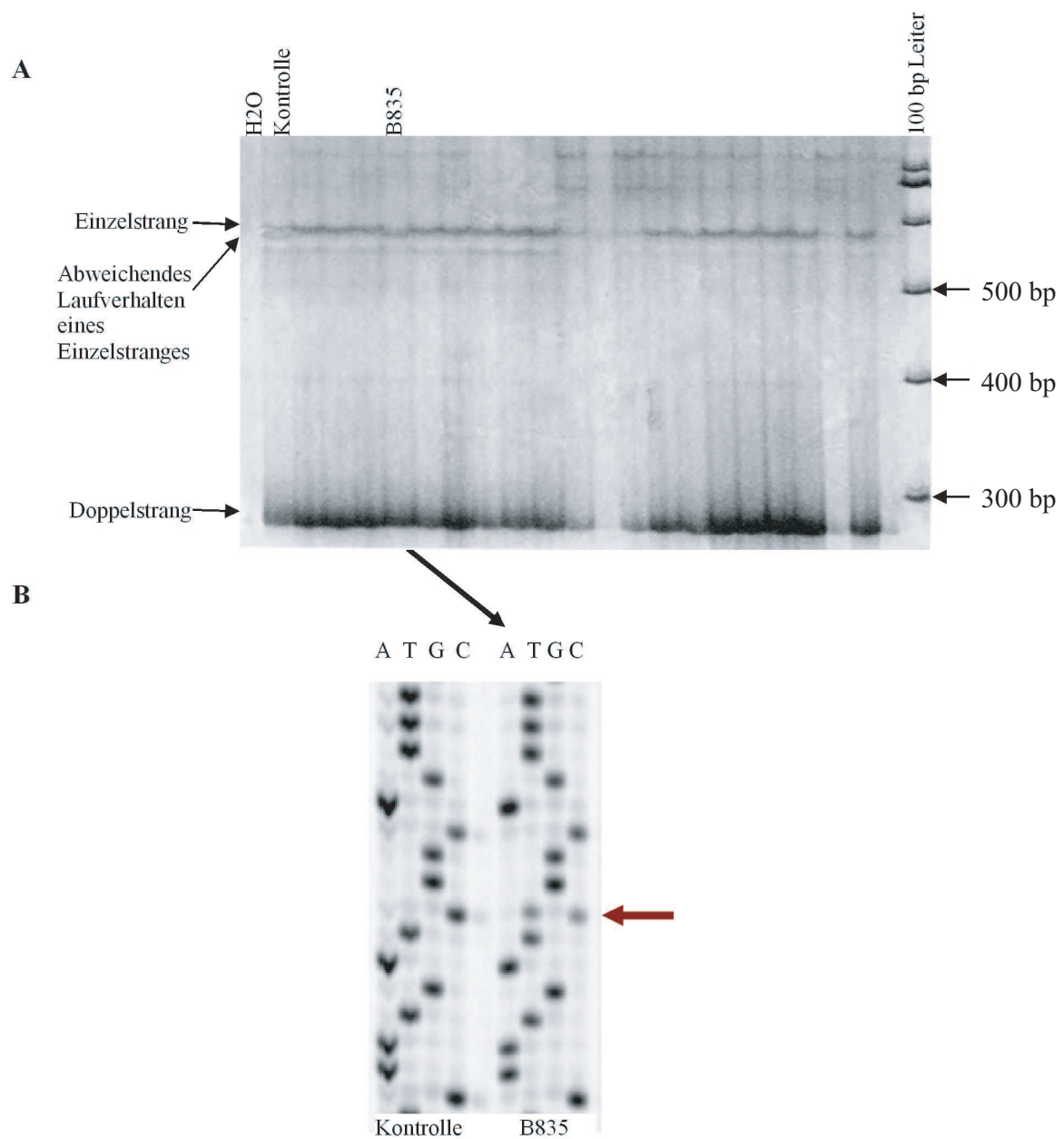
### 3.3.2 Detektion von *Parkin*-Mutationen

Zur Detektion von Sequenzvariationen auf Nukleotidebene wurden konventionelle Methoden (SSCP, Sequenzieren) angewandt. Zusätzlich wurde auf Deletionen oder Duplikationen in einem oder mehreren Exons mittels einer Gendosis-Untersuchung geprüft. Bei Patienten mit nur einer Mutation im heterozygoten Zustand wurden alle 12 Exons des *Parkin*-Gens vollständig sequenziert, um weitere Punktmutationen auszuschließen, die in der SSCP-Analyse möglicherweise übersehen wurden.

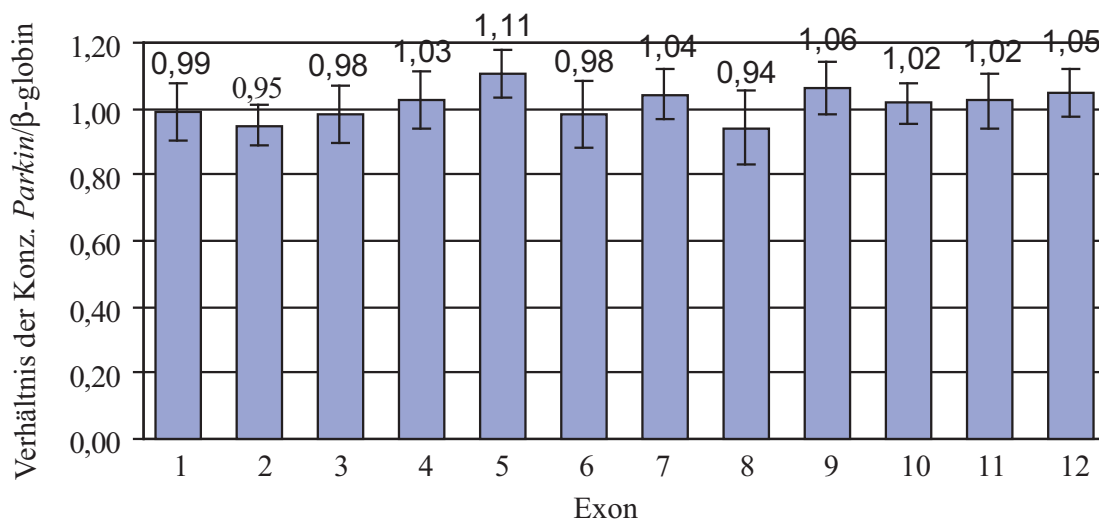
#### Ergebnisse der *Parkin*-Mutationsanalyse

Die molekulargenetische Untersuchung zeigte zwei Träger von Mutationen im *Parkin*-Gen (3 %). Bei einem Patienten wurden zwei unterschiedliche Mutationen im *compound*-heterozygoten Zustand (734 A>T und 924C>T) detektiert. Ein zweiter Patient konnte mit einer Mutation im heterozygoten Zustand identifiziert werden (924C>T). Die zwei unterschiedlichen Sequenzvariationen fielen anhand eines abweichenden Bandenmusters in der SSCP-Analyse auf. Beide Mutationen stellen eine *Missense*-Mutation dar. Gendosis-Veränderungen, die auf Deletionen oder Duplikationen ganzer Exons hinweisen, konnten nicht detektiert werden. Bekannte Polymorphismen im Exon 2 (IVS2+25T>C), 4 (601G>A und IVS3-20G>A), 8 (IVS7-35A>G), 10 (1239G>C) und 11 (1281G>A) wurden mittels SSCP-Analyse nachgewiesen.

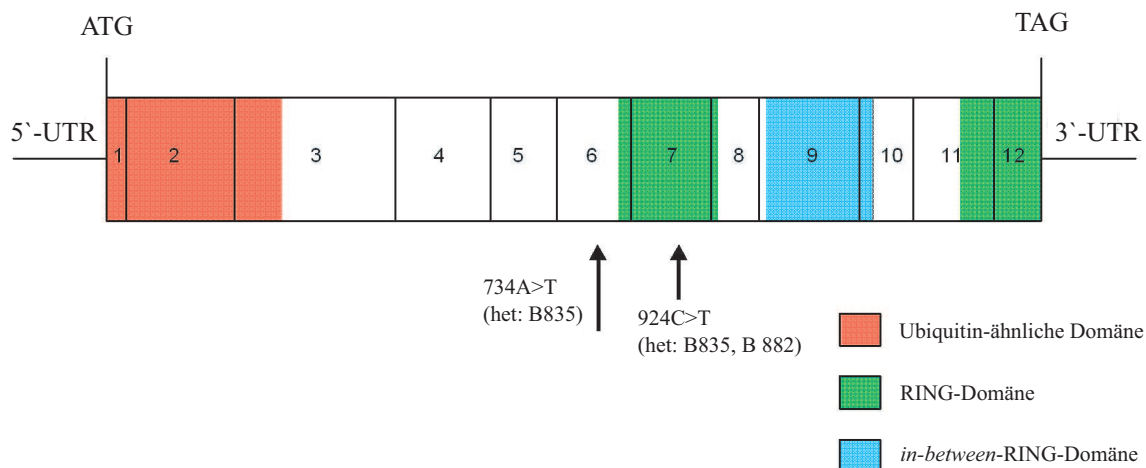
Unter den 65 Patienten wurden also zwei unterschiedliche Mutationen gefunden. Davon trat eine bei zwei Patienten auf. Die Lokalisation der beiden Mutationen innerhalb des *Parkin*-Gens wird in Abbildung 3.10 verdeutlicht.



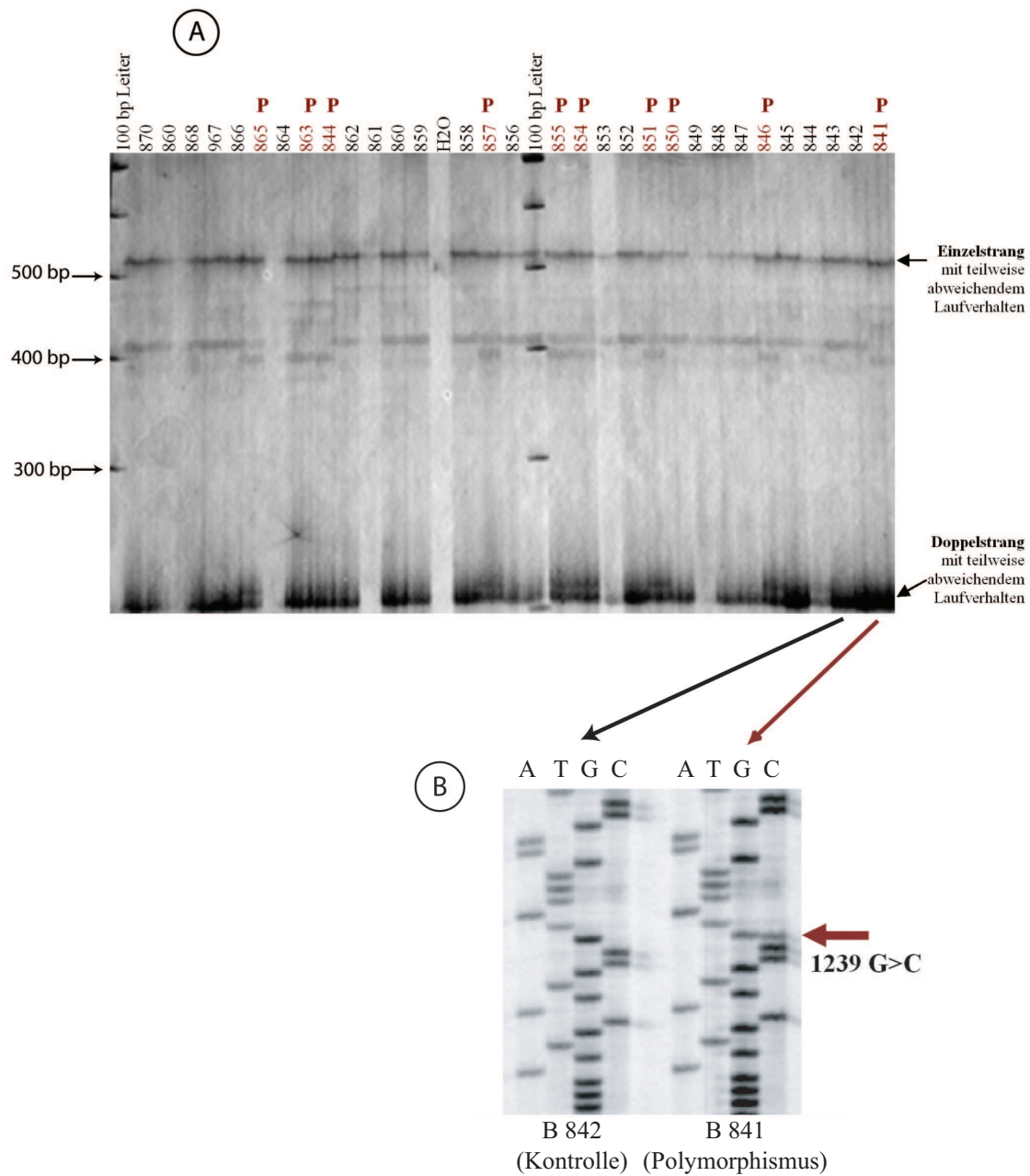
**Abbildung 3.8:** Ergebnisse der Mutationsanalyse mittels konventioneller Methoden. A) Die SSCP-Analyse des Exons 7 zeigte ein abweichendes Bandenmuster der Probe B 835. B) Die anschließende Sequenzierung bestätigte den heterozygoten Basenaustausch 924C>T. Durch den Basenaustausch in einem Allel sind in der Sequenz an der entsprechenden Stelle die Base C vom normalen Allel sowie die Base T vom mutierten Allel zu sehen (roter Pfeil). In der normalen Kontrolle ist im Vergleich nur eine Base vorhanden.



**Abbildung 3.9:** Ergebnisse der Gendosis-Untersuchung mit dem *LightCycler*. Für jedes *Parkin*-Exon stellt ein Balken den Mittelwert der Quotienten *Parkin* zu  $\beta$ -Globin aller 65 Patienten dar. Der Fehlerstrich veranschaulicht den Bereich in dem sich die Werte bewegen.



**Abbildung 3.10:** Lokalisation der gefundenen *Parkin*-Mutationen. Regionen, die für bestimmte Domänen im Protein kodieren, sind farbig gekennzeichnet. Die Probennummern der Patienten mit der entsprechenden Mutation sowie der Zustand der Mutation sind in Klammern angegeben. Die Nummer der Nukleotide richtet sich nach der Benennung der cDNS (nach Kitada et al., 1998).



**Abbildung 3.11:** Detektion von Polymorphismen im Exon 10 des *Parkin*-Gens.

(A) Die SSCP-Analyse zeigte eindeutige Abweichungen im Laufverhalten sowohl der Einzelstränge als auch der Doppelstränge als Hinweis auf das Vorliegen eines Polymorphismus. (B) In der Sequenzanalyse konnten die Polymorphismen (1239 G>C) bestätigt werden.

### Auswirkung der Mutationen auf Proteinebene

Beide identifizierte Mutationen sind *Missense*-Mutationen. Das bedeutet, dass der Basenaustausch in der DNS-Sequenz zum Einbau einer falschen Aminosäure in das Parkin-Protein führt. Die Mutation 734A>T im Exon 6 des *Parkin*-Gens stellt eine Transversion dar, da die Purinbase (A) durch eine Pyrimidinbase (T) substituiert ist. Diese Transversion führte zu einem Austausch der Aminosäure Arginin (mit negativ polarer Seitenkette) mit der Aminosäure Tryptophan (mit apolare Seitenkette). Die Transition 924C>T im Exon 7 des *Parkin*-Gens (Substitution eines Pyrimidins durch ein anderes Pyrimidin) bewirkte einen Einbau der Aminosäure Asparagin (ungeladene polare Seitenkette) anstelle von Lysin (mit apolarer Seitenkette).

### 3.3.3 Übersicht der Ergebnisse der Mutationsanalyse

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der Mutationsanalyse des *DJ1*- und des *Parkin*-Gens bei den 316 Patienten mit EOPD.

**Tabelle 3.3:** Übersicht der Ergebnisse der Mutationsanalyse

	<i>DJ1</i> -Gen		<i>Parkin</i> -Gen	
	konventionelle Untersuchung	Gendosis-Untersuchung	konventionelle Untersuchung	Gendosis-Untersuchung
Gruppe 1	<b>0/65 (0 %)</b>	<b>0/65 (0 %)</b>	<b>2/65 (3,0 %)</b>	<b>0/65 (0 %)</b>
Gruppe 2	<b>0/101 (0 %)</b>	<b>0/101 (0 %)</b>	5/101 (5,0 %)	7/101 (7,0 %)
Gruppe 3	<b>0/19 (0 %)</b>	<b>1/19 (5 %)</b>	3/19 (15,8 %)	1/19 (5,3 %)
Gruppe 4	<b>0/71 (0 %)</b>	<b>1/71 (1,4 %)</b>	1/71 (1,4 %)	1/71 (1,4 %)
Gruppe 5	<b>1/60 (1,7 %)</b>	<b>0/60 (0 %)</b>	5/60 (8,3 %)	0/60 (0 %)
Insgesamt	1/316 (0,3 %)	2/316 (0,6 %)	16/316 (5,1 %)	9/316 (2,8 %)

Eigene Ergebnisse sind fett gedruckt.

## 3.4 Restriktionsanalyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im *DJ1*-Gen bei 10 Patienten die Sequenzvariation c.293G>A (Arg98Gln) im heterozygoten Zustand identifiziert (1,3 % der Chromosomen). Um die Bedeutung der c.293G>A Variation abzuschätzen, wurden 94 ethnisch abgestimmte Kontrollen mittels RFLP-Analyse mit MspI untersucht.

### 3.4.1 Beschreibung des Kontrollkollektivs

Die DNS-Proben der 94 Kontrollindividuen wurden anhand ihrer Herkunft in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe 1 bestand aus einer Stichprobe von 39 Blutspendern aus Südtirol (Norditalien). Diese Proben wurden von Dr. Peter Pramstaller (Regionalkrankenhaus Bozen und EURAC Bozen, Italien) gesammelt. Die Blutspender wurden klinisch, aber nicht speziell neurologisch untersucht und wiesen keine offensichtlichen Störungen auf.

Die zweite Gruppe setzte sich aus 55 norddeutschen, neurologisch unauffälligen Individuen zusammen. Sie wurden in der Klinik für Neurologie der hiesigen Universität durch Prof. Peter Vieregge und Dr. Helfried Jacobs rekrutiert.

### 3.4.2 Ergebnisse der Restriktionsanalyse

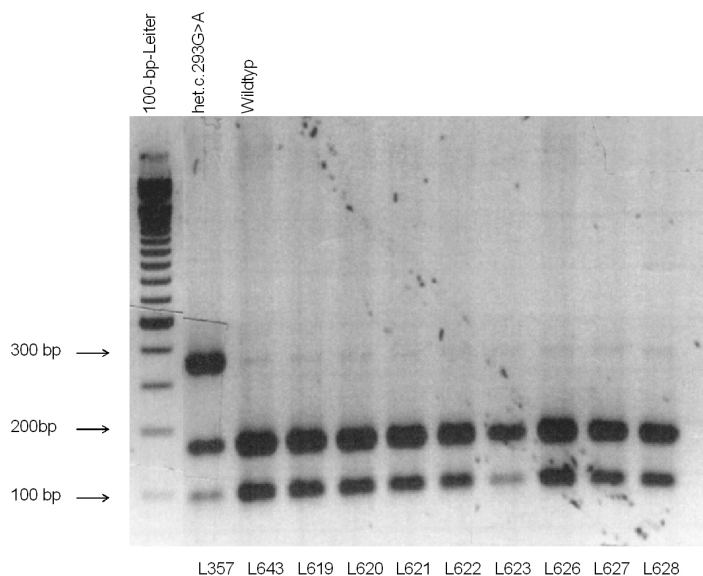
Die DNS der 94 Kontrollpersonen wurde mit dem Restriktionsenzym MspI verdaut. Die Schnittstelle dieses Enzyms liegt innerhalb der Region der untersuchten Sequenzvariation. Die Wildtyp-DNS wird durch das Enzym in zwei Fragmente geschnitten. Im Falle einer Variation erkennt das Enzym die Position der Schnittstelle nicht und schneidet daher nicht. Liegt die Variation im heterozygoten Zustand vor, so wird das Wildtyp-Allel in zwei kleine Fragmente geschnitten, während das veränderte Allel ungeschnitten bleibt, so dass insgesamt drei unterschiedliche Fragmente entstehen.

**Tabelle 3.4:** Darstellung der Restriktionsfragmente

DNS-Sequenz	Fragmente
Wildtyp	194 und 100 bp
heterozygot c.293G>A	194, 100 und 294 bp
homozygot c.293G>A	294 bp

Unter den 94 Kontrollindividuen wurden 2 Träger der Sequenzvariation c.293G>A identifiziert. Bei einer Kontrollperson trat die Sequenzvariation im heterozygoten Zustand und bei der zweiten im homozygoten Zustand auf. Das entspricht einer Häufigkeit von 1,58 % der Chromosomen (3/188 Chromosomen).

Die Veränderungen waren folgendermaßen auf die zwei Kontrollgruppen verteilt: In der Gruppe 1 mit 39 Personen befand sich eine Person mit der Variation im homozygoten Zustand (2,6 % der Chromosomen). Unter den 55 Kontrollpersonen der Gruppe 2 wurde ein Individuum mit der Variation im heterozygoten Zustand nachgewiesen (0,9 % der Chromosomen).



**Abbildung 3.12:** Agarose-Gelelektrophorese nach der Verdauung mit dem Restriktionsenzym MspI. Bei der Probe L357 sind drei Restriktionsfragmente aufgrund der Variation c.293G>A im heterozygoten Zustand zu erkennen. Die übrigen Proben zeigen die beiden typischen Fragmente der Wildtyp-DNS.

# Kapitel 4

## Diskussion

Die vorliegende Studie gibt einen tieferen Einblick in die Bedeutung von *DJ1*- und *Parkin*-Mutationen beim PS. Zum Nachweis von Mutationen im *DJ1*-Gen wurde ein neues Verfahren, die dHPLC-Analyse, etabliert. Es wurden 316 Patienten unterschiedlicher Herkunft mit einem klinisch-typischen EOPD molekulargenetisch auf Punktmutationen, kleine Deletionen/Duplikationen sowie *Exon-Rearrangements* im *DJ1*-Gen untersucht. Zusätzlich wurden 65 Patienten aus diesem Kollektiv (entspricht der Gruppe 1) mittels konventioneller Methoden und der Echtzeit-PCR auf Mutationen im *Parkin*-Gen getestet. Die Analyse auf *Parkin*-Mutationen in Gruppe 1 ermöglichte eine direkte Beurteilung der Häufigkeit von *DJ1*-Mutationen im Vergleich zu *Parkin*-Mutationen.

### 4.1 Bewertung der Methoden

Um eine möglichst umfassende Mutationsanalyse durchzuführen, wurden verschiedene Verfahren angewandt. Zur Untersuchung auf Mutationen im *Parkin*-Gen wurden die SSCP-Analyse, die Sequenzierung und die quantitative PCR eingesetzt. Die SSCP-Analyse eignet sich gut für eine Untersuchung großer Kollektive, da es ein einfaches, kostengünstiges und relativ zuverlässiges Verfahren ist. Bei Auffälligkeiten im Bandenmuster bei der SSCP-Analyse wurde die Probe anschließend sequenziert. Bei Vorliegen einer Mutation im heterozygoten Zustand wurden alle 12 Exons des *Parkin*-Gens sequenziert, um keine weitere Mutation zu übersehen. Die Sequenzierung ist im Vergleich zur SSCP-Analyse wesentlich aufwändiger, zeichnet sich allerdings durch eine hohe Sensitivität aus. Die quantitative

PCR wurde in der eigenen Arbeitsgruppe für das *Parkin*-Gen etabliert [40]. Es handelt sich um eine sehr zuverlässige und schnelle Methode, um große genomische Deletionen oder Duplikationen im heterozygoten Zustand aufzudecken. Herkömmliche Verfahren (Sequenzierung, SSCP) können solche Mutationen nicht detektieren. Die quantitative Analyse wurde in der eigenen Arbeitsgruppe auf das *DJ1*-Gen ausgeweitet und konnte für diese Studie übernommen werden.

Für die Untersuchung auf Punktmutationen und kleine Deletionen bzw. Duplikationen im *DJ1*-Gen wurde die dHPLC-Analyse als neue Methode etabliert. Sie wurde anstelle der SSCP-Analyse zur einfachen und schnellen Untersuchung einer großen Anzahl von Genabschnitten auf Mutationen angewandt. Mit der im Ergebnisteil dargestellten Etablierung und Optimierung der Analysebedingungen konnten sehr gute Ergebnisse erzielt werden.

## 4.2 Mutationen im *DJ1*-Gen

Von den 316 Patienten mit EOPD wurde in der vorliegenden Arbeit ein Träger einer heterozygoten Mutation mit einer kleinen Deletion von 11 bp am Anfang von Intron 5 detektiert (L1347:IVS5+2-12del). Die Gendosis-Untersuchung konnte zwei weitere heterozygote Mutationsträger mit einer Deletion von drei Exons (B66: Ex5-7del) und einer Deletion von Exon 5 (P56: Ex5del) identifizieren.

### 4.2.1 Bekannte und neue *DJ1*-Mutationen

Die Assoziation des *DJ1*-Gens mit dem autosomal-rezessiven EOPD konnte vor kurzem demonstriert werden [6]. Seitdem wurden durch verschiedenen Arbeitsgruppen einige Mutationen im *DJ1*-Gen nachgewiesen. Die Anzahl der bisher publizierten Mutationen ist im Vergleich zu *Parkin*-Mutationen gering. Die Tabellen 4.1 und 4.2 geben eine Übersicht über die bisher identifizierten Mutationen und Polymorphismen. Die Mutationen sind alle einheitlich benannt. Die Nummerierung beginnt bei dem Nukleotid 85 (Translations-Start) der *GenBank*-Sequenz NM\_007262.3.

**Tabelle 4.1:** Bekannte und neue kleine Mutationen und Polymorphismen im *DJ1*-Gen

Mutationen					
Nr.	Lokal.	Mutation	Protein	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
1	Ex2	c.56delC/ c.57G>A	Protein- abbruch	Hague et al., 2003 (1) [35]	
2	Ex2		Met26Ile	Abou-Sleiman et al., 2003 (1) [2]	Aschkenasisch
3		c.192G>C	p.Glu64Asp	Hering et al., 2004 (1) [44]	
4	Ex5	c.310G>A	Ala104Thr	Hague et al., 2003 (1) [35] Clark et al., 2004 (1) [15]	evtl. Poly- morphismus
5	In5	IVS5+2-12del	Protein- abbruch	<b>vorliegende Arbeit</b>	russisch
6	Ex7		Asp149Ala	Abou-Sleiman et al., 2003 (1) [2]	evtl. Poly- morphismus
7	Ex7	497T>C	Leu166Pro	Bonifati et al., 2003 (3) [7]	italienisch
8	In7	IVS7-1G>C	unbekannt	Hague et al., 2003 (1) [35]	
Polymorphismen					
1	Ex1a/b	g.18C>T	5'UTR	Hague et al., 2003 [35] Clark et al., 2004 [15]	
2	Ex1a/b	g.168_185del	5'UTR	Hague et al., 2003 [35] Clark et al., 2004 [15]	
3	Ex1a/b	g.213G>T	5'UTR	Hague et al., 2003 [35] Clark et al., 2004 [15]	
4	In1	IVS1-17C>T	IVS	Clark et al., 2004 [15]	
5	Ex4	c.234C>T		Hague et al., 2003 (1) [35]	
6	Ex4		Gly78Gly	Abou-Sleiman et al., 2003 (1) [2]	
7	In4	IVS4-98G>A	IVS	<b>vorliegende Arbeit (3)</b>	
8	In4	IVS4-31C>T	IVS	Hague et al., 2003 (1) [35]	
9	In4	IVS4+30T>G	IVS	Hague et al., 2003 [35] <b>vorliegende Arbeit (38)</b>	
10	Ex5	c.293G>A	Arg98Gln	Hague et al., 2003 (4) [35] Lockhart et al., 2004 (1) [74] Clark et al., 2004 [15] <b>vorliegende Arbeit (10)</b>	
11	Ex5		Arg98Arg	Abou-Sleiman et al., 2003 (1) [2]	
12	In5	IVS5+31G>A	IVS	Hague et al., 2003 (1) [35] Hedrich et al., 2003 (2) [42]	

Fortsetzung der Tabelle 4.1

Nr.	Lokal.	Mutation	Protein	Referenz (Häufigkeit)	Anmerkung
13	In6	IVS6+38T>A	IVS	<b>vorliegende Arbeit (1)</b>	
14	Ex7		Asp149Ala	Abou-Sleiman et al., 2003 (1) [2]	
15	Ex7		Ala167Ala	Abou-Sleiman et al., 2003 (1) [2]	
16	Ex4	c.510G>T	Ala171Ser	Clark et al., 2004 (1) [15]	

**Tabelle 4.2:** Bekannte Gendosisveränderungen im *DJ1*-Gen

Nr.	Lokalisation	Mutationstyp	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
1	Ex1a/b-5	Deletion	Bonifati et al., 2002 (1) [6]	niederländisch
2	Ex5-7	Deletion	Hedrich et al., 2003 (1) [42]	südtirolisch
3	Ex5	Deletion	<b>vorliegende Studie (1)</b>	serbisch

Insgesamt wurden in der bisher publizierten Literatur elf verschiedene Mutationen im *DJ1*-Gen beschrieben. Davon sind acht Punktmutationen oder kleine Deletionen (73 %) und drei Gendosisveränderungen (27 %). Die Detektion von drei unterschiedlichen Exon-Deletionen bekräftigt die Wichtigkeit der Gendosis-Untersuchung. Von den veröffentlichten Arbeiten, die auf *DJ1*-Mutationen bei EOPD-Patienten getestet haben, beinhalten nur vier die systematische Suche nach Punktmutationen und Gendosisveränderungen in einem großen Patientenkollektiv [21, 42, 64, 74]. Zwei der Untersuchungen fanden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Christine Klein unter eigener Mitarbeit statt.

#### 4.2.2 Verteilung und Häufigkeit von *DJ1*-Mutationen

Die Auswertung der Metaanalyse zeigt, dass Mutationen im *DJ1*-Gen in allen Exons (kodierende und nicht-kodierende) vorkommen. Zwei der Punktmutationen führen zu einem frühzeitigen Abbruch des Proteins. Durch die drei identifizierten Gendosisveränderungen wird ein Protein produziert, bei dem die Domänen, die durch die deletierten Exons kodiert werden, fehlen. In beiden Fällen kann vermutet werden, dass die Mutation ein funktionsunfähiges Protein verursacht.

Aufgrund der insgesamt geringen Anzahl an Mutationen, ist es nicht möglich, eine Aussage über die Verteilung und Häufigkeit von Mutationen in bestimmten Exons zu machen.

### 4.2.3 Verteilung und Häufigkeit von *DJ1*-Mutationen - Eigene Ergebnisse

Die EOPD-Patienten wurden in 5 Gruppen unterschieden hinsichtlich der Einschlusskriterien und der ethnischen Herkunft auf Mutationen im *DJ1*-Gen untersucht. In der hier vorliegenden Studie konnten mittels konventioneller Methoden und der Gendosis-Untersuchung drei Träger einer Mutation im *DJ1*-Gen identifiziert werden. Insgesamt ergibt sich eine Mutationshäufigkeit von  $<1\%$  ( $3/316$ ) bei EOPD-Patienten. Betrachtet man die einzelnen Gruppen, so wurde die höchste Mutationshäufigkeit in Gruppe 3 (EOPD-Patienten aus einer geographisch isolierten Region Südtirols) gefunden ( $1/19 = 5\%$ ). In dieser Gruppe wurden ebenfalls die meisten *Parkin*-Mutationen identifiziert ( $3/19 = 16\%$ ). In der Gruppe 5 gab es einen Mutationsträger ( $1/60 = 1,7\%$ ). Etwas niedriger war der Anteil an Mutationsträgern in Gruppe 4 ( $1/71 = 1,4\%$ ), die sich aus Patienten serbischer Herkunft zusammensetzte. In den Gruppen 1 und 2 konnten keine *DJ1*-Mutationen detektiert werden. Die Fallzahlen sind zu gering für eine statistische Analyse und es bedarf weiterer Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Patienten für genauere Aussagen zur Häufigkeit von *DJ1*-Mutationen bei EOPD-Patienten unterschiedlicher Herkunft.

Seit dem Abschluss dieser Arbeit gab es nur wenige weitere Berichte über die Untersuchung von EOPD-Fällen. Die Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die bisherigen Studien zur Häufigkeit von *DJ1*-Mutationen. Die Veröffentlichungen ergaben ebenfalls eine Häufigkeit von unter  $1\%$  bei Patienten mit EOPD.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass *DJ1*-Mutationen selten sind. Diese Vermutung wird durch alle bekannten veröffentlichten Studien bestärkt und stimmt mit neueren durchgeführten Genom-Scans überein [90, 96], die eine Kopplung zum *Parkin*-Gen aber nicht zum *DJ1*-Gen feststellten. Da die zuerst beschriebenen Mutationen in einer genetisch isolierten Gemeinschaft und in blutsverwandten Familien gefunden wurden, kann es sein, dass *DJ1*-Mutationen in der allgemeinen Bevölkerung selten sind.

**Tabelle 4.3:** Häufigkeit von Mutationen im *DJ1*-Gen

Referenz	Mutations- häufigkeit	Ethnische Herkunft	Bemerkung
Eerola et al., 2003 [25]	0/106 (0,0 %)	finnisch	sporadischer EOPD
Ibanez et al., 2003 [52]	0/20 (0,0 %)	verschieden	familiär und sporadisch
Abou-Sleiman et al., 2003 [2]	2/185 (1,1 %)	verschieden	sporadischer EOPD
Hague et al., 2003 [35]	1/107 (<1 %)	verschieden	EOPD
Djarmati et al., 2004 [21]	1/75 (1,3 %)	serbisch	familiär und sporadisch
Lockhart et al., 2004 [74]	0/41 (0,0 %)	verschieden	familiär und sporadisch
Hering et al. 2004 [44]	1/104 (<1 %)	verschieden	EOPD
Tan et al. 2004 [118]	(0,0 %)	verschieden	familiärer und sporadischer EOPD
Clark et al. 2004 [15]	1/89 (1,1 %)	verschieden	EOPD
Karamohamed et al. 2005 [57]	0/292 (0,0 %)	verschieden	familiär
<b>Eigene Studie</b>	<b>3/387 (&lt;1 %)</b>	<b>verschieden</b>	<b>familiär und sporadisch</b>

#### 4.2.4 Auswirkung der identifizierten Mutationen auf das *DJ1*-Protein

Es wird angenommen, dass die Mutation im Intron 5 (IVS5+2-12del) durch die Beeinträchtigung der Spleißregion einen vorzeitigen Abbruch des Proteins (engl. *truncation*) nach Exon 4 bewirkt. Die zwei identifizierten Deletionen (Ex5-7del und Ex5del) bewirken wahrscheinlich ebenfalls einen vorzeitigen Abbruch des Proteins nach Exon 4. Folglich fehlt dem Protein durch alle drei Mutationen die C-terminale Helix. Untersuchungen der Kristallstruktur lassen vermuten, dass das *DJ1*-Protein obligat als Dimer vorliegt. Die Dimerisierung wird durch Deletionen relativ kleiner Sequenzabschnitte am N- oder C-terminalen Ende stark abgeschwächt oder aufgehoben. Die Konsequenz dieser Strukturveränderung ist wahrscheinlich ein Funktionsverlust des *DJ1*-Proteins. Es bleibt zu klären, wie der toxische Effekt auf dopaminerge Neurone durch einen Funktionsverlust des *DJ1*-Proteins vermittelt wird.

#### 4.2.5 Die Arg98Gln (R98Q) -Variation im *DJ1*-Gen

Um die Bedeutung der c.293G>A (Arg98Gln) Variation im *DJ1*-Gen zu beurteilen, wurden 316 EOPD-Patienten hauptsächlich europäischer Herkunft sowie 94 ethnisch abge-

stimmte gesunde Kontrollpersonen auf das Vorkommen dieser Variation untersucht. Bei den Patienten wurde zur Mutationsdetektion die dHPLC-Analyse des Exons 5 durchgeführt. Die Kontrollgruppe wurde mittels der RFLP-Analyse mit MspI untersucht. Die c.293G>A-Substitution wurde bei 10 Patienten im heterozygoten Zustand detektiert (1,3 % der Chromosomen) sowie bei zwei Kontrollpersonen (eine im heterozygoten und eine im homozygoten Zustand; 1,6 % der Chromosomen). Es konnte damit kein signifikanter Unterschied zwischen der Häufigkeit dieser Substitution bei Patienten und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Zusätzlich besteht die c.293G>A-Variation in mehr als 1 % der Chromosomen der Kontrollgruppe. Beide Tatsachen unterstützen die Annahme, dass die Substitution c.293G>A einen Polymorphismus darstellt.

In der Studie von Hague *et al.*, 2003 [35] wurde die Variation c.293G>A bei drei nicht verwandten Patienten im einfach heterozygoten Zustand nachgewiesen. Als Antwort auf meine Ergebnisse bezüglich dieser Variation untersuchten Hague *et al.* die Häufigkeit in unterschiedlichen Regionen der Welt. In der europäischen Population fanden sie eine mit der vorliegenden Arbeit vergleichbare Häufigkeit (2,68 % der Chromosomen). Die Ansicht, dass es sich bei der 293G>A-Substitution um einen gutartigen Polymorphismus handelt, wird dadurch weiter gestärkt.

#### 4.2.6 Zusätzliche klinische Zeichen bei *DJ1*-Mutationen

Neben den Kardinalsymptomen (Ruhetremor, Bradykinese, Rigor und/oder Verlust der Haltungskontrolle) des PS wurden bei Patienten mit *DJ1*-Mutationen zusätzliche klinische Zeichen beobachtet. Dazu zählen ein langsamer Krankheitsverlauf und eine gute und anhaltende Wirkung einer L-Dopa-Therapie. Blepharospasmen (Krämpfe der Augenlider) und Fuß-Dystonien sowie frühzeitige psychiatrische Probleme wurden ebenfalls beschrieben. Die klinischen Symptome ähneln denen bei EOPD-Patienten mit *Parkin*- oder *PINK1*-Mutationen. Alle drei Gene stehen im Zusammenhang mit einem autosomal-rezessiven EOPD.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei Patienten mit einer Mutation im *DJ1*-Gen im heterozygoten Zustand detektiert werden. Es wird angenommen, dass alle drei Mutationen einen vorzeitigen Abbruch des Proteins nach Exon 4 bewirken. Dennoch ist der Phänotyp der drei Patienten sehr unterschiedlich. Die Patientin (Fall 1) mit einer Mutati-

on im Bereich von Intron 4 des *DJ1*-Gens zeigte ein langsam progredientes PS mit einigen dystonen aber keinen anderen ungewöhnlichen Eigenschaften. Sie erkrankte im Alter von 17 Jahren.

Bei dem Patienten mit der Deletion von Exon 5-7 (Fall 2) begann die Erkrankung im Alter von 42 Jahren. Das Fortschreiten des PS war langsam. Er sprach gut auf die L-Dopa-Therapie an, entwickelte allerdings motorische Fluktuationen. Es wurden keine zusätzlichen klinischen Symptome festgestellt.

Der dritte Patient mit der Deletion von Exon 5 (Fall 3) erkrankte im Alter von 45 Jahren. Die Wirkung der L-Dopa-Therapie nahm bei diesem Patienten bereits nach drei Jahren stark ab. Er zeigte ein PS ohne zusätzliche klinische Eigenschaften.

Es ist wahrscheinlich, dass komplexe Interaktionen den Phänotyp von *DJ1*-Mutationsträgern beeinflussen. Nicht alle heterozygoten Mutationsträger werden so betroffen sein wie in den vorliegenden Fällen mit einer *Truncation*-Mutation. Solche phänotypischen Variationen wurden bereits bei den besser untersuchten *Parkin*-Mutationen beobachtet. Der Erkrankungsbeginn von *compound*-heterozygoten *Parkin*-Mutations-Trägern variiert z. B. von 7 bis zu 64 Jahre [63, 77]. Eine ähnliche Spannbreite konnte bei heterozygoten Mutationsträgern beobachtet werden [90]. Die intra- und interfamiliäre phänotypische Variation unterstreicht die Vorstellung, dass zusätzliche Faktoren zu den identifizierten (*Parkin*- oder *DJ1*-) Mutationen zu der Penetranz und der Expressivität des PS beisteuern.

Es ist daher nicht möglich, aufgrund von einem mutierten Gen, der Mutationslokalisierung oder dem Mutationstyp den Phänotyp zu charakterisieren.

### 4.3 Mutationen im *Parkin*-Gen

In dieser Studie wurden 65 EOPD-Patienten komplett auf Mutationen im *Parkin*-Gen untersucht. Es konnten zwei unterschiedliche Mutationen bei zwei Mutationsträgern (3 %) detektiert werden. Ein Patient trug zwei Mutationen im *compound*-heterozygoten Zustand (1,5 %). Bei einem zweiten Patienten wurde eine Mutation im heterozygoten Zustand (1,5 %) nachgewiesen. Eine komplette Sequenzierung des *Parkin*-Gens bei diesem Patienten zeigte keine weitere Mutation, die den klinisch typischen EOPD-Phänotyp erklären

könnte. Die Untersuchung auf *DJ1*-Mutationen war ebenfalls unauffällig.

### 4.3.1 Bekannte Mutationen im *Parkin*-Gen

Mutationen im *Parkin*-Gen sind sehr variabel und schließen viele verschiedene Punktmutationen, kleine Deletionen und Duplikationen und Exon-*Rearrangements* ein, die alle 12 kodierenden Exons betreffen (zusammengefasst in [43]).

Die beiden in der vorliegenden Arbeit detektierten Mutationen wurden bereits in der Literatur beschrieben. Die 924C>T-Mutation ist die in Europa am häufigsten beobachtete kodierende Variante bei Patienten mit *Parkin*-Mutationen im *compound*-heterozygoten Zustand. Diese Tatsache ist wahrscheinlich auf einen gemeinsamen Gründer zurückzuführen [99]. Die Tabelle 4.4 zeigt das Vorkommen der zwei Mutationen in bereits publizierten Originalarbeiten. Eine Übersicht von allen bisher publizierten Mutationen liefern die Tabellen B.1 und B.2 im Anhang dieser Arbeit. Soweit bekannt sind die ethnische Herkunft der Patienten und die Häufigkeit der Mutation in der jeweiligen Untersuchung angegeben. Diese Daten wurden anhand einer Literaturrecherche in *Online*-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) zusammengetragen. Die Mutationen sind entsprechend der Erstbeschreibung durch Kitada und Mitarbeiter (1998) mit dem Transkriptionsstartpunkt als +1 einheitlich benannt. Als Referenz-Sequenz diente die *GenBank*-Sequenz AB009973.1. Diese Bezeichnung steht nicht im Einklang mit den Richtlinien der Mutations-Nomenklatur. Aufgrund ihres Vorherrschens in der aktuellen *Parkin*-Literatur wurde sie hier angewandt.

Die Analyse der Literatur zeigt, dass mittlerweile insgesamt 111 unterschiedliche Mutationen im *Parkin*-Gen identifiziert wurden. Davon sind 68 (61 %) Punktmutationen und kleine Deletionen oder Duplikationen, 43 (39 %) der Mutationen entfallen auf Gendosisveränderungen, also Deletionen oder Duplikationen ganzer Exons.

*Parkin*-Mutationen scheinen eine große Vielfalt aufzuweisen. Sie sind über das ganze *Parkin*-Gen verteilt und betreffen alle 12 Exons. Das unterstreicht die Wichtigkeit, bei einem systematischen Test auf *Parkin*-Mutationen alle 12 Exons zu überprüfen. Ebenfalls ist es notwendig, eine Gendosis-Untersuchung einzubeziehen, da Gendosis-Veränderungen einen großen Anteil der identifizierten Mutationen ausmachen. Aufgrund der Komplexität des *Parkin*-Gens, gibt es nur eine begrenzte Anzahl von systematischen Untersuchungen,

**Tabelle 4.4:** Bekannte Punktmutation 734A>T und 924C>T im *Parkin*-Gen

Lokalisation	Mutation	Protein	Referenz (Anzahl der Träger)	Ethnische Herkunft
Ex6	734A>T	Lys211Asn	Lücking et al., 2000 (2) [77] Kann et al., 2002 (1) [56] Nichols et al., 2002 (1) [90] Foroud et al., 2003 (1) [29]	niederländisch deutsch unbekannt unbekannt
Ex7	924C>T	Arg275Trp	Abbas et al., 1999 (1) [1] Lücking et al., 2000 (5) [77] Farrer et al., 2001 (1) [28] Pramstaller et al., 2002 (1) [104] Hedrich et al., 2002 (3) [41] Kann et al., 2002 (1) [56] Nichols et al., 2002 (3) [90] Oliveira et al., 2003 (3)[93] Periquet et al., 2003 (5) [100] Foroud et al., 2003 (4) [29] Rawal et al., 2003 (1) [107] Lincoln et al., 2003 (9) [73]	italienisch irisch französisch britisch europäisch deutsch unbekannt unbekannt unbekannt unbekannt niederländisch unbekannt

die große Patientenkollektive sowohl auf Punktmutationen und andere kleine Mutationen als auch auf Gendosis-Veränderungen getestet haben [21, 29, 40, 41, 56, 77, 90, 126, 128].

### 4.3.2 Verteilung und Häufigkeit von *Parkin*-Mutationen

Es konnten in allen 12 Exons des *Parkin*-Gens Mutationen nachgewiesen werden. Die Mutationen waren nicht gleichmäßig über die Exons verteilt.

Insgesamt wurden 189 Punktmutationen, kleine Deletionen oder Duplikationen identifiziert, die auf 68 unterschiedliche Mutationen zurückzuführen sind. Gendosis-Veränderungen waren mit einem Vorkommen bei 249 Patienten häufiger, allerdings entfielen sie auf nur 43 unterschiedliche Mutationen.

Punktmutationen kamen gehäuft im Exon 2 (44 mal) und Exon 7 (57 mal) vor. Die Mutation 924C>T im Exon 7 kam alleine 37 mal vor. Sehr selten waren Punktmutationen im Exon 8 (2 Mutationen) und 10 (keine Mutation). Gendosis-Veränderungen wurden besonders häufig im Exon 3 und 4 detektiert, im Exon 1 und 9 bis 12 waren sie dagegen selten.

Die Anhäufung der Mutationen in bestimmten Regionen des Gens weist darauf hin, dass diese Regionen für das *Parkin*-Gen funktionell von Bedeutung sind. Die meisten Punktmutationen (96 Mutationen) befanden sich in der RING-IBR-RING-Domäne (ca. Ex7-12), die für die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität des Parkin-Proteins verantwortlich ist. Mutationen in diesem Bereich könnten die Enzym-Funktion verändern oder beeinträchtigen.

Am N-terminalen Ende wurden besonders Mutationen detektiert, die zu einem frühzeitigen Abbruch des Proteins führen. Es wird ein Protein ohne die RING-IBR-RING-Domäne produziert. Durch diesen Verlust wird das Protein wahrscheinlich funktionslos.

### 4.3.3 Häufigkeit von Mutationen im *Parkin*-Gen - Eigene Ergebnisse

In dem Patientenkollektiv aus 65 EOPD-Patienten wurde eine Mutationsrate von 3 % im *Parkin*-Gen festgestellt. Vorherige Studien zeigten, dass ein großer Anteil von familiären und isolierten EOPD-Patienten verschiedener ethnischer Gruppen *Parkin*-Mutationen aufweisen [1, 38, 40, 43, 56, 77]. Insgesamt wird die Häufigkeit von *Parkin*-Mutationen bei EOPD-Patienten auf 10-25 % geschätzt. Die Häufigkeit von *Parkin*-Mutationen in der vorliegenden Studie ist im Vergleich niedrig. Die möglichen Ursachen für diese Differenz werden im Folgenden diskutiert.

Die bisherigen Studien zum *Parkin*-assoziierten PS legen nahe, dass die Häufigkeit von *Parkin*-Mutationen bei EOPD-Patienten von mehreren Faktoren beeinflusst werden:

(1) Das Alter bei Erkrankungsbeginn: Die Mutationshäufigkeit korreliert stark mit einem niedrigen Alter bei Erkrankungsbeginn. Bei den Patienten mit einem Erkrankungsbeginn von unter 20 Jahren wurden bei 77 % der Fälle *Parkin*-Mutationen nachgewiesen, aber bei nur 3 % der Patienten mit einem Erkrankungsbeginn von über 30 Jahren.

In der vorliegenden Studie haben die Patienten bei Erkrankungsbeginn ein relativ hohes Alter (nur zwei der Patienten erkrankten in einem Alter von unter 30 Jahren und 28 der Patienten waren bei Erkrankungsbeginn älter als 45 Jahre).

(2) Klinische Symptome und Familienanamnese: Vorherige Studien zeigten bei Patienten mit einem Krankheitsbeginn von unter 45 Jahren eine signifikant niedrigere Mutationshäufigkeit bei sporadischen Fällen (18 %) im Vergleich zu familiären Fällen (49 %) [77]. Bei einer weiteren Untersuchung von sporadischen, nicht familiären EOPD-Patienten mit einem Erkrankungsbeginn von unter 45 Jahren wurde eine Mutationsrate von 14 % gefunden [100].

Die Patienten der vorliegenden Arbeit wurden in einem Regionalkrankenhaus rekrutiert. Die Auswahl basierte auf einem Erkrankungsalter unter 51 Jahre ungeachtet einer positiven Familienanamnese und atypischer oder spezifischer Symptome. In vielen veröffentlichten Studien wurden die Patienten in spezialisierten Zentren für Bewegungsstörungen rekrutiert. Patienten mit einer positiven Familienanamnese tendieren eher dazu, spezielle Zentren aufzusuchen [79]. Diese Tendenz kann zu einem überproportionalen Anteil von *Parkin*-Fällen verglichen mit der allgemeinen Population von EOPD-Patienten führen.

Weder das hohe Alter bei Erkrankungsbeginn noch der relativ geringe Anteil familiärer Fälle kann die niedrige Mutationshäufigkeit vollständig erklären. Im Vergleich mit den von Lücking und Periquet beschriebenen sporadischen Fällen [77, 100] wurde eine höhere Mutationshäufigkeit erwartet, da Patienten mit positiver Familienanamnese nicht ausgeschlossen wurden.

(3) Ethnische Abstammung: Die ethnische Abstammung der Patienten scheint einen bedeutenden Einfluss auf die Mutationshäufigkeit zu haben. Bei der Durchsicht der *Parkin*-Literatur zeigen sich stark variierende Mutationshäufigkeiten zwischen Patientengruppen unterschiedlicher Populationen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen Genen gemacht. So variiert die Häufigkeit der hereditären Hämochromatose-Gen (HFE)-Mutation C282Y zwischen bestimmten Populationen. Für diese Mutation finden sich hohe Häufigkeitsraten bei mitteleuropäischen Patienten, während in mediterranen Gebieten die Häufigkeit sehr niedrig ist und im asiatischen Raum diese Mutation nicht vorkommt. [9, 71]. Die Tabelle 4.5 stellt die bisher in Originalarbeiten publizierten Mu-

tationshäufigkeiten im *Parkin*-Gen unter Angabe der ethnischen Herkunft und dem Einschlusskriterium sporadischer und/oder familiärer EOPD dar.

(4) Qualität der Analyse: Weitere Ursachen der niedrigen Mutationsrate können technische Gründe sein. Im Vergleich zu vielen anderen Studien wurde für diese Arbeit eine sehr umfangreiche Mutationsanalyse durchgeführt, da sowohl konventionelle Methoden als auch Gendosis-Untersuchungen eingesetzt wurden. Die Analyse schloss auch die Promoter-Region des *Parkin*-Gens ein, die in keiner der vorherig erwähnten Studien untersucht wurde. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass ein Polymorphismus im Promoter mit idiopatischem PS assoziiert ist [129]. Dennoch können Punktmutationen übersehen worden sein, da die Sensitivität der angewandten SSCP-Analyse bei nur etwa 80 % liegt [39]. Außerdem wurde der große Bereich der Intron-Sequenz nicht untersucht. Introns kodieren nicht für das Protein, spielen aber möglicherweise eine Rolle bei der Genregulation und beim alternativen Spleißen. Diese Funktion könnte durch Mutationen im Intron beeinflusst werden. Trotz der Einschränkungen durch die eingesetzten Methoden ist es unwahrscheinlich, dass viele Mutationen übersehen wurden. Mit derselben Kombination von konventionellen Methoden und der Echtzeit-PCR konnte in der eigenen Arbeitsgruppe 9 - 45 % *Parkin*-Mutationen in anderen Kollektiven nachgewiesen werden [40, 41, 56].

**Tabelle 4.5:** Häufigkeit von *Parkin*-Mutationen in veröffentlichten Studien

<b>Studien mit ethnisch homogenen Patientengruppen</b>			
Referenz	Mutationshäufigkeit	Ethnische Herkunft	Bemerkung
Hattori et al., 1998 [37]	19/34 (56 %)	japanisch	familiär
Hedrich et al., 2001 [40]	7/21 (33 %)	südtirolisch	familiär
Munoz et al., 2001 [87]	7/37 (19 %)	spanisch	sporadisch und familiär
Kann et al., 2002 [56]	11/111 (9 %)	deutsch	sporadisch und familiär <i>community-derived</i>
Chen et al., 2003 [11]	1/27 (<4 %)	US amerikanisch	sporadisch
Djarmati et al., 2004 [21]	1/75 (1,3 %)	serbisch	sporadisch und familiär

Fortsetzung der Tabelle 4.5

Referenz	Mutations- häufigkeit	Ethnische Herkunft	Bemerkung
Wu et al., 2005 [130]	4/41 (9,8%)	taiwanesisch	sporadisch
<b>Eigene Studie</b>	<b>2/65 (3 %)</b>	<b>italienisch</b>	<b>sporadisch und familiär</b>
Schlitter et al., 2006 [110]	3/95 (1,6 %)	deutsch	<i>late-onset PD</i>
Schlitter et al., 2006 [110]	1/96 (0,5 %)	norwegisch	<i>late-onset PD</i>
<b>Studien mit Patienten unterschiedlicher Herkunft</b>			
Abbas et al, 1999 [1]	12/38 (32 %)	v.a. europäisch	familiär
Lücking et al. 2000 [77]	36/73 (49 %)	verschieden	familiär
Lücking et al., 2000 [77]	18/100 (18 %)	verschieden	sporadisch
Hedrich et al., 2002 [41]	13/50 (24 %)	europäisch, amerikanisch, afrikanisch	sporadisch und familiär
Rawal et al., 2003 [107]	10/30 (33 %)	verschieden	familiär
Khan et al., 2003 [59]	24/115 (21 %)	verschieden	sporadisch und familiär
Periquet et al., 2003 [100]	20/246 (14 %)	verschieden	sporadisch
Oliveira et al., 2003 [93]	(18 %)	unbekannt	familiär

#### 4.3.4 Auswirkung der identifizierten Mutationen auf das *Parkin*-Protein

Eine der identifizierten Punktmutationen (924C>T; Asp275Lys) ist innerhalb der RING1-Domäne des *Parkin*-Proteins lokalisiert. Das Domänen-Motiv aus zwei RING-Fingern, getrennt durch eine IBR-Domäne, ist für die Ubiquinierungsaktivität des *Parkin*-Proteins verantwortlich [13, 112, 132]. Die Vermutung liegt nahe, dass Mutationen im *Parkin*-Gen die Funktion des *Parkin*-Proteins beeinflussen und zwar abschwächen. Allerdings wurde gezeigt, dass die Mutation Asp275Lys die Enzymaktivität von *Parkin* bewahrt [13]. Bei dieser speziellen Mutation scheint ein einfacher Funktionsverlust des Proteins als Ursache für die Erkrankung daher ausgeschlossen. Weitere Untersuchungen hatten

bei der Mutation Asp275Lys eine ungewöhnliche Lokalisation des Parkin-Proteins in der Zelle mit großen zytoplasmatischen und nukleären Einschlusskörperchen innerhalb von Aggreosomen festgestellt [16]. Diese veränderte Lokalisation und Aggregation könnte eine Erklärung für den toxischen Effekt der RING1-Mutation darstellen.

Die Bedeutung der zweiten Punktmutation (734A>T; Lys211Asn) bleibt zu klären. Sie betrifft keine der funktionell wichtigen Domänen. Allerdings wurde die Assoziation dieser Mutation mit EOPD in anderen Studien unabhängig voneinander dargestellt [56, 77, 90].

#### 4.3.5 *Parkin*-Gen-Promoter

Vor kurzem wurde über einen Einzelnukleotid-Polymorphismus innerhalb des *Parkin*-Promoters berichtet (-258T/G), der funktionell die Gen-Transkription beeinflusst. Eine populationsbasierte Studie von 296 Personen mit der Parkinson-Krankheit und 184 Kontrollpersonen zeigte eine Assoziation des -258G-Allels mit der idiopathischen Parkinson-Krankheit (*odds ratio* 1.52, *p* kleiner als 0.05) [129].

In der vorliegenden Studie konnten keine Polymorphismen innerhalb des *Parkin*-Promoters mittels SSCP-Analyse und Sequenzierung detektiert werden. Die Sequenzierung wurde allerdings nur bei Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse angewandt. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Mutationen im *Parkin*-Promoter selten sind. Es ist allerdings möglich, dass Veränderungen übersehen wurden. Die hier angewandte SSCP-Analyse zeigt im Vergleich zur Sequenzierung, die in der oben erwähnten Untersuchung eingesetzt wurde, eine etwas geringere Sensitivität.

### 4.4 Die Rolle von heterozygoten Mutationen im *DJ1*- und *Parkin*-Gen

Die identifizierten *DJ1*- und *Parkin*-Mutationen wurden alle im heterozygoten Zustand detektiert. Sowohl das *DJ1*-Gen als auch das *Parkin*-Gen werden autosomal-rezessiv vererbt. Zum Ausschluss weiterer Mutationen wurde eine Sequenzanalyse aller Exons des *DJ1*- bzw. des *Parkin*-Gens durchgeführt. Trotz der Kombination von Gendosis-Untersuchung und Sequenzierung ist es möglich, dass eine zweite Mutation in einem Teil

des jeweiligen Gens, der nicht untersucht wurde, d. h. in nicht-kodierenden Regionen oder im Intron, übersehen wurde. Dennoch liegt in diesem Fall die Vermutung nahe, dass eine heterozygote Mutation zwar nicht zwingendermaßen krankheitsauslösend ist, aber einen Risikofaktor für die Entwicklung eines PS darstellt. Eine funktionelle Relevanz ist besonders wahrscheinlich, wenn schwerwiegende Mutationen detektiert werden. Diese Annahme wird durch zahlreiche Berichte in der Literatur über betroffene Personen, bei denen ebenfalls nur eine heterozygote Mutation detektiert wurde, unterstützt [42, 56, 64, 75].

Positronen-Emissions-Studien (PET) bei asymptomatischen heterozygoten *Parkin*-Mutationsträgern zeigten eine milde aber signifikante Reduktion der 18-Fluorodopa-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollgruppen [47, 48, 58]. Dieser Befund lässt auf einen präklinischen Krankheitsprozess entsprechend einem PS schließen. Heterozygote Mutationen könnten zu einer verringerten Protein-Aktivität (Haploinsuffizienz) führen. Einige Studien konnten zeigen, dass heterozygote Mutationen zu einem älteren und homozygote oder *compound*-heterozygote Mutationen zu einem jungen Erkrankungsalter führen [41, 56]. Aus diesen Befunden lässt sich folgern, dass heterozygote Mutationen die Suszeptibilität, an einem PS zu erkranken, erhöhen und somit ein späteres Erkrankungsalter zur Folge haben.

Abschließend besteht die Möglichkeit, dass heterozygote Mutationen in Kombination mit (heterozygoten) Veränderungen auf anderen rezessiven PS-Genen (*PINK1* u. a.) krankheitsauslösend sind. Bei den vorliegenden Patienten konnte in der *DJ1*- bzw. *Parkin*-Diagnostik keine weitere Mutation nachgewiesen werden. Bislang ist sehr wenig über die Interaktion der unterschiedlichen rezessiven PS-Gene und ihrer Proteine bekannt. Interessanterweise konnte vor kurzem ein Genom-*Scan* bei EOPD-Patienten mit einfachen heterozygoten Mutationen im *Parkin*-Gen Hinweise auf die Kopplung zu Chromosom 10 demonstrieren. Zu derselben Region wurden auch in anderen Studien mit PS-Patienten Hinweise für eine Kopplung gefunden. Diese möglichen Interaktionen zwischen dem *Parkin*-Gen und einem *Locus* auf Chromosom 10 können vielleicht die hohen Zahlen an heterozygoten Mutationsträgern erklären.

## 4.5 Fazit

Die Fragenthemen der vorliegenden Arbeit lauteten:

1. Detektion von *DJ1*-Mutationen.
2. Häufigkeit von *DJ1*-Mutationen.
3. *DJ1*-Mutations-Typen.
4. Vergleich von *DJ1*- und *Parkin*-Mutationen.
5. *DJ1*-Mutationen und Phänotyp.
6. *Parkin*-Promoter.

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit werden wie folgt beantwortet:

1. Die dHPLC-Analyse konnte erfolgreich als Methode zur Detektion von Punktmutationen und kleinen Deletionen oder Duplikationen im *DJ1*-Gen etabliert werden. Sie erwies sich als ein effizientes Verfahren, um eine große Anzahl von Proben schnell und sicher zu untersuchen.
2. Durch die vorliegende Arbeit konnten drei Träger einer *DJ1*-Mutation unter den 316 EOPD-Patienten aufgedeckt werden. Insgesamt liegt die Häufigkeit von *DJ1*-Mutationen in dem untersuchten Kollektiv bei etwa 1 %.
3. Es wurden zwei Typen von Mutationen detektiert: (1) eine Deletion mehrerer Basenpaare an der Intron-Exon-Grenze, die durch die Beeinflussung der Spleißregion einen vorzeitigen Proteinabbruch bewirkt, (2) Deletionen eines oder mehrerer Exons, die zu einer Veränderung des Transskripts führen und zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Eine Mutation konnte mittels konventioneller Untersuchungen aufgedeckt werden (IVS5+2-12del), während die zwei weiteren Mutationen (Ex5-7del und Ex5del) durch eine Gendosis-Untersuchung identifiziert wurden.
4. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Vermutung, dass *DJ1*-Mutationen im Vergleich zu *Parkin*-Mutationen wesentlich seltener vorkommen. Bei 25 Patienten ( $25/316=7,9\%$ ) lagen *Parkin*-Mutationen vor, während bei nur drei Patienten ( $3/316=0,9\%$ ) *DJ1*-Mutationen detektiert wurden.

5. Die drei Patienten trugen eine ähnliche Mutation im *DJ1*-Gen, sie zeigten allerdings einen sehr unterschiedlichen Krankheitsverlauf. Der Krankheitsbeginn variierte von 17 bis 45 Jahre. Alle drei Patienten zeigten die typischen Symptome der Parkinson-Krankheit, teilweise einen langsamen Krankheitsverlauf und gutes Ansprechen auf eine L-Dopa-Therapie. Es ist anzunehmen, dass komplexe Interaktionen den Phänotyp von *DJ1*-Mutationsträgern beeinflussen.
6. Es wurden keine Mutationen im *Parkin*-Promoter innerhalb der Gruppe 1 detektiert. Mutationen in diesem Bereich des *Parkin*-Gens scheinen selten zu sein.

## 4.6 Ausblick

Seit der Entdeckung des *DJ1*-Gens wurden einige Mutationen nachgewiesen. Es wurden Erkenntnisse darüber gewonnen, welche Funktionen das DJ1-Protein im Zellstoffwechsel hat und wie diese Funktionen durch Mutationen beeinflusst werden. Diese Erkenntnisse tragen viel zum Verständnis der Mechanismen bei, die zu einer Parkinson-Krankheit führen. Die Frage nach der Rolle von heterozygoten Mutationen, die bereits bei dem *Parkin*-Gen diskutiert wurde, tritt nun auch bei dem *DJ1*-Gen auf.

Die genaue Funktion von *DJ1* und anderen Parkinson-Genen wie *PINK1* und *Parkin* bei der Pathogenese des PS ist nur teilweise bekannt und die zentrale Frage, ob alle Parkinson-Gene auf einen gemeinsamen Stoffwechselweg Einfluss nehmen, bleibt zu klären.

# Zusammenfassung

Die Parkinson-Krankheit zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Genetische Ursachen spielen insbesondere bei einem frühen Erkrankungsbeginn (EOPD) eine Rolle. Mutationen im *Parkin*-Gen (*PARK2*) sind die am häufigsten identifizierte Ursache eines rezessiv-vererbten PS mit frühem Beginn. *Parkin*-Mutationen erklären allerdings nur einen Teil der EOPD-Fälle. Vor kurzem wurde das *DJ1*-Gen als ein weiteres Gen, das mit einem rezessiv-vererbten PS assoziiert ist, beschrieben.

Das Ziel dieser Studie war es, mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen ein besseres Verständnis zur Rolle von *DJ1*- und *Parkin*-Mutationen zu erhalten. Im Vordergrund der Studie stand die Detektion von *DJ1*-Mutationen.

Zu dem Nachweis von Punktmutationen und kleinen Deletionen im *DJ1*-Gen wurde die dHPLC-Analyse eingeführt. Sie erwies sich als eine einfache und schnelle Methode für eine systematische Untersuchung großer Kollektive.

Es wurde ein großes Patientenkollektiv, das sich aus 316 EOPD-Patienten zusammensetzte, untersucht. Hinsichtlich unterschiedlicher Einschlusskriterien wurden die Patienten in 5 Gruppen aufgeteilt. Das gesamte Kollektiv wurde mittels dHPLC-Analyse, Sequenzierung und Gendosis-Untersuchung auf *DJ1*-Mutationen untersucht. Aus dem Kollektiv wurden 65 Patienten (Gruppe 1) auch mittels konventioneller Methoden (SSCP und Sequenzierung) und der Gendosis-Untersuchung nach Mutationen im *Parkin*-Gen überprüft.

Die dHPLC-Analyse von insgesamt 316 EOPD-Patienten konnte nur einen Träger einer *DJ1*-Mutation im heterozygoten Zustand aufdecken (IVS5+2-12del). Die Gendosis-Untersuchung identifizierte zwei weitere Mutationsträger (Ex5-7del und Ex5del). Insgesamt trugen also unter 1 % der Patienten *DJ1*-Mutationen. Es wurden zwei Typen von Mutationen detektiert: (1) eine Deletion mehrerer Basenpaare an der Intron-Exon-Grenze und (2) Deletionen eines oder mehrerer Exons. Die drei identifizierten Mutationen führen

wahrscheinlich zu einem vorzeitigen Abbruch des Proteins nach Exon 4. Interessanterweise lagen alle detektierten Mutationen nur im heterozygoten Zustand vor. Bei keinem der Patienten konnte eine Mutationen im *Parkin*-Gen detektiert werden.

Es wurde ein neuer Polymorphismus (Arg98Gln) bei 1,5 % der Chromosomen in der Patientengruppe und in Kontrollgruppen im *DJ1*-Gen detektiert.

Die vorliegende Studie bestätigt, dass Mutationen im *DJ1*-Gen seltener als *Parkin*-Mutationen sind. Die Häufigkeit von *Parkin*-Mutationen in dem untersuchten Kollektiv betrug etwa 8 % im Vergleich zu einer Häufigkeit von etwa 1 % der Mutationen im *DJ1*-Gen. Dennoch sollten *DJ1*-Mutationen als mögliche Ursache eines PS in Betracht gezogen werden.

Die drei Patienten, bei denen eine ähnliche *DJ1*-Mutation nachgewiesen wurde, zeigten die Kardinalsymptome des PS. Der Krankheitsverlauf, der Erkrankungsbeginn und die Wirkung der L-Dopa-Therapie variierte allerdings stark unter den Patienten. Es liegt nahe, dass andere Faktoren als die identifizierten Mutationen zu der Penetranz und der Expressivität des PS beisteuern.

Innerhalb der Gruppe 1 wurden zwei Träger von *Parkin*-Mutationen identifiziert (2/65 = 3 %). Bei einem Patienten konnte eine Mutation im heterozygoten Zustand detektiert werden. Mutationen im *Parkin*-Promoter konnten nicht nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie traten alle detektierten Mutationen im heterozygoten Zustand auf. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Studien, die Hinweise gefunden haben, dass eine heterozygote *DJ1*- oder *Parkin*-Mutation zu einem PS führen kann.

Die Rolle von heterozygoten Mutationen muss weiter untersucht werden. Auch die Frage nach der Funktion und dem Zusammenspiel der unterschiedlichen Parkinson-Gene bei der Pathogenese des PS bleibt zu klären.

# Literaturverzeichnis

- [1] Abbas N, Lücking CB, Ricard S, Dürr 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. 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* 1999;8:567-74.
- [2] Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. The role of pathogenic *DJ1* mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54:283-6.
- [3] Alvarez V, Guisasola LM, Moreira VG, Lahoz CH, Coto E. Early-onset Parkinson's disease associated with a new *parkin* mutation in a Spanish family. *Neurosci Lett* 2001;313:108-10.
- [4] 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. Novel *parkin* mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005;20:424-31.
- [5] Bonifati V, Fabrizio E, Vanacore N, De Mari M, Meco G. Familial Parkinson's disease: a clinical genetic analysis. *Can J Neurol Sci* 1995;22:272-9.
- [6] Bonifati V, Dekker MC, Vanacore N, Fabbrini G, Squitieri F, Marconi R, Antonini A, Brustenghi P, Dalla Libera A, De Mari M, Stocchi F, Montagna P, Gallai V,

- Rizzu P, van Swieten JC, Oostra B, van Duijn CM, Meco G, Heutink P. Autosomal recessive *early onset parkinsonism* is linked to three loci: *PARK2*, *PARK6*, and *PARK7*. *Neurol Sci* 2002;23 Suppl 2:S59-60.
- [7] Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the *DJ1* gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003;299:256-9.
- [8] Bonifati V, Oostra BA, Heutink P. Unraveling the pathogenesis of Parkinson's disease-the contribution of monogenetic forms. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1729-50.
- [9] Candore G, Mantovani V, Balistreri CR, Lio D, Colonna-Romano G, Cerreta V, Carru C, Deiana L, Pes G, Menardi G, Perotti L, Miotti V, Bevilacqua E, Amoroso A, Caruso C. Frequency of the HFE gene mutations in five Italian populations. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:267-73.
- [10] Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR. The Parkinson's disease protein DJ1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9103-8.
- [11] Chen R, Gosavi NS, Langston JW, Chan P. *Parkin* mutations are rare in patients with young-onset parkinsonism in a US population. *Parkinsonism Relat Disord* 2003;9:309-12.
- [12] Chien HF, Rohe CF, Costa MD, Breedveld GJ, Oostra BA, Barbosa ER, Bonifati V. Early-onset Parkinson's disease caused by a novel *parkin* mutation in a genetic isolate from north-eastern Brazil. *Neurogenetics* 2006;7:13-9.
- [13] Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM. *Parkin* ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 2001;7:1144-50.

- [14] Clarimon J, Johnson J, Djaldetti R, Hernandez D, Hattori N, Sroka H, Barhom Y, Singleton A. Mutation of the *Parkin* gene in a Persian family: clinical progression over a 40-year period. *Mov Disord* 2005;20:887-90.
- [15] Clark LN, Afridi S, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Singleton A, Wavrant De-Vrieze F, Hardy J, Mayeux R, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. Analysis of an early-onset Parkinson's disease cohort for *DJ1* mutations. *Mov Disord* 2004;19:796-800.
- [16] Cookson MR, Lockhart PJ, McLendon C, O'Farrell C, Schlossmacher M, Farrer MJ. RING finger 1 mutations in *Parkin* produce altered localization of the protein. *Hum Mol Genet* 2003;12:2957-65.
- [17] Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 2003;302:819-22.
- [18] De Michele G, Filla A, Volpe G, De Marco V, Gogliettino A, Ambrosio G, Marconi R, Castellano AE, Campanella G. Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in southern Italy. *Mov Disord* 1996;11:17-23.
- [19] de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meche FG, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology* 1995;45:2143-6.
- [20] de Rijk MC, Rocca WA, Anderson DW, Melcon MO, Breteler MM, Maraganore DM. A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Neurology* 1997a;48:1277-81.
- [21] Djarmati A, Hedrich K, Svetel M, Schäfer N, Juric V, Vukosavic S, Hering R, Rieß O, Romac S, Klein C, Kostic V. Detection of *Parkin* (*PARK2*) and *DJ1* (*PARK7*) mutations in early-onset Parkinson disease: *Parkin* mutation frequency depends on ethnic origin of patients. *Hum Mutat* 2004;23:525.
- [22] Dogu O, Johnson J, Hernandez D, Hanson M, Hardy J, Apaydin H, Ozekmekci S, Sevim S, Gwinn-Hardy K, Singleton A. A consanguineous Turkish family with early-onset Parkinson's disease and an exon 4 *parkin* deletion. *Mov Disord* 2004;19:812-6.

- [23] Duvoisin RC. The genetics of Parkinson's disease. A review. *Adv Neurol* 1993;60:306-15.
- [24] Duvoisin RC, Golbe LI. Kindreds of dominantly inherited Parkinson's disease: keys to the riddle. *Ann Neurol* 1995;38:355-6.
- [25] Eerola J, Hernandez D, Launes J, Hellstrom O, Hague S, Gulick C, Johnson J, Peuralinna T, Hardy J, Tienari PJ, Singleton AB. Assessment of a *DJ1* (*PARK7*) polymorphism in Finnish PD. *Neurology* 2003;61:1000-2.
- [26] Elbaz A, Grigoletto F, Baldereschi M, Breteler MM, Manubens-Bertran JM, Lopez-Pousa S, Dartigues JF, Alperovitch A, Tzourio C, Rocca WA. Familial aggregation of Parkinson's disease: a population-based case-control study in Europe. EURO-PARKINSON Study Group. *Neurology* 1999;52:1876-82.
- [27] Eng C, Brody LC, Wagner TM, Devilee P, Vijg J, Szabo C, Tavtigian SV, Nathanson KL, Ostrander E, Frank TS; Steering Committee of the Breast Cancer Information Core (BIC) Consortium. Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1. *J Med Genet* 2001;38:824-833.
- [28] Farrer M, Chan P, Chen R, Tan L, Lincoln S, Hernandez D, Forno L, Gwinn-Hardy K, Petrucelli L, Hussey J, Singleton A, Tanner C, Hardy J, Langston JW. Lewy bodies and parkinsonism in families with *Parkin* mutations. *Ann Neurol* 2001;50:293-300.
- [29] Foroud T, Uniacke SK, Liu L, Pankratz N, Rudolph A, Halter C, Shults C, Marder K, Conneally PM, Nichols WC. Heterozygosity for a mutation in the *Parkin* gene leads to later onset Parkinson disease. *Neurology* 2003;60:796-801.
- [30] Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 1999;56:33-9.
- [31] Gibb WR, Lees AJ. A comparison of clinical and pathological features of young- and old-onset Parkinson's disease. *Neurology* 1988;38:1402-6.

- [32] Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, Vortherms TA, Kitada T, Costa C, Tong Y, Martella G, Tschertter A, Martins A, Bernardi G, Roth BL, Pothos EN, Calabresi P, Shen J. Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron* 2005;45:489-96.
- [33] Gouider-Khouja N, Larnaout A, Amouri R, Sfar S, Belal S, Ben Hamida C, Ben Hamida M, Hattori N, Mizuno Y, Hentati F. Autosomal recessive parkinsonism linked to *parkin* gene in a Tunisian family. Clinical, genetic and pathological study. *Parkinsonism Relat Disord* 2003;9:247-51.
- [34] Gowers WR (ed.): A Manual of diseases of the nervous system. Philadelphia: P. Blakiston, 1888.
- [35] Hague S, Rogaeva E, Hernandez D, Gulick C, Singleton A, Hanson M, Johnson J, Weiser R, Gallardo M, Ravina B, Gwinn-Hardy K, Crawley A, St George-Hyslop PH, Lang AE, Heutink P, Bonifati V, Hardy J. Early-onset Parkinson's disease caused by a *compound* heterozygous *DJ1* mutation. *Ann Neurol* 2003;54:271-4.
- [36] 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. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004;56:424-427.
- [37] Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Yamamura Y, Yoshino H, Kobayashi T, Yokochi M, Wang M, Yoritaka A, Kondo T, Kuzuhara S, Nakamura S, Shimizu N, Mizuno Y. Molecular genetic analysis of a novel *Parkin* gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the *Parkin* gene in affected individuals. *Ann Neurol* 1998;44:935-41.
- [38] 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. Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) in the *parkin* gene. *Biochem Biophys Res Com* 1998b;249:754-758.
- [39] Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 1993;2:338-46.

- [40] Hedrich K, Kann M, Lanthaler AJ, Dalski A, Eskelson C, Landt O, Schwinger E, Vieregge P, Lang AE, Breakefield XO, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C. The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the *Parkin* gene in early-onset parkinsonism. *Hum Mol Genet* 2001;10:1649-56.
- [41] Hedrich K, Marder K, Harris J, Kann M, Lynch T, Meija-Santana H, Pramstaller PP, Schwinger E, Bressman SB, Fahn S, Klein C. Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for *Parkin* mutations. *Neurology* 2002;58:1239-46.
- [42] Hedrich K, Djarmati A, Schäfer N, Hering R, Wellenbrock C, Weiss PH, Hilker R, Vieregge P, Ozelius LJ, Heutink P, Bonifati V, Schwinger E, Lang AE, Noth J, Bressman SB, Pramstaller PP, Rieß O, Klein C. *DJ1* (*PARK7*) mutations are less frequent than *Parkin* (*PARK2*) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2004;62:389-94.
- [43] Hedrich K, Eskelson C, Wilmot B, Marder K, Harris J, Garrels J, Meija-Santana H, Vieregge P, Jacobs H, Bressman SB, Lang AE, Kann M, Abbruzzese G, Martinelli P, Schwinger E, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C, Kramer P. Distribution, type, and origin of *Parkin* mutations: review and case studies. *Mov Disord* 2004; 19:1146-57.
- [44] Hering R, Strauss KM, Tao X, Bauer A, Weitalla D, Mietz EM, Petrovic S, Bauer P, Schaible W, Müller T, Schols L, Klein C, Berg D, Meyer PT, Schulz JB, Wollnik B, Tong L, Krüger R, Rieß O. Novel homozygous p.E64D mutation in *DJ1* in early onset Parkinson disease (*PARK7*). *Hum Mutat* 2004;24:321-9.
- [45] Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K, Sveinbjornsdottir S. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2002;52:549-555.
- [46] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11:1026-30.
- [47] Hilker R, Klein C, Ghaemi M, Kis B, Strotmann T, Ozelius LJ, Lenz O, Vieregge P, Herholz K, Heiss WD, Pramstaller PP. Positron emission tomographic analysis

- of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the *Parkin* gene. *Ann Neurol* 2001;49:367-76.
- [48] Hilker R, Klein C, Hedrich K, Ozelius LJ, Vieregge P, Herholz K, Pramstaller PP, Heiss WD. The striatal dopaminergic deficit is dependent on the number of mutant alleles in a family with mutations in the *Parkin* gene: evidence for enzymatic *Parkin* function in humans. *Neurosci Lett* 2002; 323:50-4.
- [49] Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967;17:427-42.
- [50] Hoenicka J, Vidal L, Morales B, Ampuero I, Jimenez-Jimenez FJ, Berciano J, del Ser T, Jimenez A, Ruiz PG, de Yébenes JG. Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain. *Arch Neurol* 2002;59:966-70.
- [51] Honbou K, Suzuki NN, Horiuchi M, Niki T, Taira T, Ariga H, Inagaki F. The crystal structure of DJ1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease. *J Biol Chem* 2003;278:31380-4.
- [52] Ibanez P, De Michele G, Bonifati V, Lohmann E, Thobois S, Pollak P, Agid Y, Heutink P, Dürr A, Brice A. *Screening* for *DJ1* mutations in early onset autosomal recessive parkinsonism. *Neurology* 2003;61:1429-31.
- [53] Illarioshkin SN, Periquet M, Rawal N, Lücking CB, Zagorovskaya TB, Slominsky PA, Miloserdova OV, Markova ED, Limborska SA, Ivanova-Smolenskaya IA, Brice A. Mutation analysis of the *parkin* gene in Russian families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Mov Disord* 2003;18:914-9.
- [54] Jeon BS, Kim JM, Lee DS, Hattori N, Mizuno Y. An apparently sporadic case with *parkin* gene mutation in a Korean woman. *Arch Neurol* 2001;58:988-9.
- [55] Jin M, Jiao JS, Gu WH, Wang K, Zou HQ, Chen B, Wang GX. [A study on *PARKIN* gene in three pedigrees with autosomal recessive early-onset Parkinson's disease] *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2005;22:514-7. Chinese.
- [56] Kann M, Jacobs H, Mohrmann K, Schumacher K, Hedrich K, Garrels J, Wiegers K, Schwinger E, Pramstaller PP, Breakefield XO, Ozelius LJ, Vieregge P, Klein

- C. Role of *Parkin* mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2002;51:621-5.
- [57] Karamohamed S, Golbe LI, Mark MH, Lazzarini AM, Suchowersky O, Labelle N, Guttman M, Currie LJ, Wooten GF, Stacy M, Saint-Hilaire M, Feldman RG, Liu J, Shoemaker CM, Wilk JB, DeStefano AL, Latourelle JC, Xu G, Watts R, Growdon J, Lew M, Waters C, Vieregge P, Pramstaller PP, Klein C, Racette BA, Perlmutter JS, Parsian A, Singer C, Montgomery E, Baker K, Gusella JF, Herbert A, Myers RH. Absence of previously reported variants in the *SCNA* (G88C and G209A), *NR4A2* (T291D and T245G) and the *DJ1* (T497C) genes in familial Parkinson's disease from the GenePD study. *Mov Disord* 2005;20:1188-91.
- [58] Khan NL, Valente EM, Bentivoglio AR, Wood NW, Albanese A, Brooks DJ, Piccini P. Clinical and subclinical dopaminergic dysfunction in PARK6-linked parkinsonism: an 18F-dopa PET study. *Ann Neurol* 2002;52:849-53.
- [59] Khan NL, Graham E, Critchley P, Schrag AE, Wood NW, Lees AJ, Bhatia KP, Quinn N. *Parkin* disease: a phenotypic study of a large case series. *Brain* 2003;126:1279-92.
- [60] Khan NL, Horta W, Eunson L, Graham E, Johnson JO, Chang S, Davis M, Singleton A, Wood NW, Lees AJ. *Parkin* disease in a Brazilian kindred: Manifesting heterozygotes and clinical follow-up over 10 years. *Mov Disord* 2005;20:479-84.
- [61] Kim JS, Lee KS, Kim YI, Lee KH, Kim HT. Homozygous exon 4 deletion in *parkin* gene in a Korean family with autosomal recessive early onset parkinsonism. *Yonsei Med J* 2003;44:336-9.
- [62] Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the *Parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392:605-8.
- [63] Klein C, Pramstaller PP, Kis B, Page CC, Kann M, Leung J, Woodward H, Castellán CC, Scherer M, Vieregge P, Breakefield XO, Kramer PL, Ozelius LJ. *Parkin* deletions in a family with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype. *Ann Neurol* 2000;48:65-71.

- [64] Klein C, Djarmati A, Hedrich K, Schäfer N, Scaglione C, Marchese R, Kock N, Schule B, Hiller A, Lohnau T, Winkler S, Wiegers K, Hering R, Bauer P, Rieß O, Abbruzzese G, Martinelli P, Pramstaller PP. *PINK1*, *Parkin*, and *DJ1* mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur J Hum Genet* 2005;13:1086-93.
- [65] Kobayashi T, Matsumine H, Zhang J, Imamichi Y, Mizuno Y, Hattori N. Pseudoautosomal dominant inheritance of *PARK2*: two families with *parkin* gene mutations. *J Neurol Sci* 2003;207:11-7.
- [66] Kompetenznetz Parkinson (KNP), Deutsche Parkinson Gesellschaft (DPG), Bund Deutscher Neurologen (BDN). Leitlinie Parkinson-Syndrom. <http://www.dgn.org/168.0.html>.
- [67] Kondo K, Kurland LT, Schull WJ. Parkinson's disease. Genetic analysis and evidence of a multifactorial etiology. *Mayo Clin Proc* 1973;48:465-75.
- [68] Krüger R, Eberhardt O, Rieß O, Schulz JB. Parkinson's disease: one biochemical pathway to fit all genes? *Trends Mol Med* 2002;8:236-40.
- [69] Kubo SI, Kitami T, Noda S, Shimura H, Uchiyama Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y, Hattori N. *Parkin* is associated with cellular vesicles. *J Neurochem* 2001;78:42-54.
- [70] Kuroda Y, Mitsui T, Akaike M, Azuma H, Matsumoto T. Homozygous deletion mutation of the *parkin* gene in patients with atypical parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:231-4.
- [71] Lee JY, Yoo KH, Hahn SH. HFE gene mutation, C282Y causing hereditary hemochromatosis in Caucasian is extremely rare in Korean population. *J Korean Med Sci* 2000;15:179-82.
- [72] Leroy E, Anastasopoulos D, Konitsiotis S, Lavedan C, Polymeropoulos MH. Deletions in the *Parkin* gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Hum Genet* 1998;103:424-7.
- [73] Lincoln SJ, Maraganore DM, Lesnick TG, Bounds R, de Andrade M, Bower JH, Hardy JA and Farrer MJ. *Parkin* variants in North American Parkinson's disease: cases and controls. *Mov Disord* 2003;18:1306-11.

- [74] Lockhart PJ, Bounds R, Hulihan M, Kachergus J, Lincoln S, Lin CH, Wu RM, Farrer MJ. Lack of mutations in *DJ1* in a cohort of Taiwanese ethnic Chinese with early-onset parkinsonism. *Mov Disord* 2004;19:1065-9.
- [75] Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, Wood NW, De Michele G, Bonnet AM, Fraix V, Broussolle E, Horstink MW, Vidailhet M, Verpillat P, Gasser T, Nicholl D, Teive H, Raskin S, Rascol O, Destee A, Ruberg M, Gasparini F, Meco G, Agid Y, Dürr A, Brice A. How much phenotypic variation can be attributed to *Parkin* genotype? *Ann Neurol* 2003;54:176-85.
- [76] Lu CS, Wu JC, Tsai CH, Chen RS, Chou YH, Hattori N, Yoshino H, Mizuno Y. Clinical and genetic studies on familial parkinsonism: the first report on a *parkin* gene mutation in a Taiwanese family. *Mov Disord* 2001;16:164-6.
- [77] Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the *Parkin* gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:1560-7.
- [78] Madegowda RH, Kishore A, Anand A. Mutational screening of the *parkin* gene among South Indians with early onset Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:1588-90.
- [79] Marder K, Tang MX, Mejia H, Alfaro B, Cote L, Louis E, Groves J, Mayeux R. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study. *Neurology* 1996;47:155-60.
- [80] Maruyama M, Ikeuchi T, Saito M, Ishikawa A, Yuasa T, Tanaka H, Hayashi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Tsuji S. Novel mutations, pseudo-dominant inheritance, and possible familial affects in patients with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Ann Neurol* 2000;48:245-50.
- [81] Mata IF, Lockhart PJ, Farrer MJ. *Parkin* Genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2004;13 Spec No1:R127-133.

- [82] Mata IF, Alvarez V, Coto E, Blazquez M, Guisasola LM, Salvador C, Kachergus JM, Lincoln SJ, Farrer M. Homozygous partial genomic triplication of the *parkin* gene in early-onset parkinsonism. *Neurosci Lett* 2005;380:257-9.
- [83] Miller WC, DeLong MR. Parkinsonian symptomatology. An anatomical and physiological analysis. *Ann N Y Acad Sci* 1988;515:287-302.
- [84] Moore DJ, Zhang L, Dawson TM, Dawson VL. A missense mutation (L166P) in *DJ1*, linked to familial Parkinson's disease, confers reduced protein stability and impairs homo-oligomerization. *J Neurochem* 2003;87:1558-67.
- [85] Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM and Dawson VL. Association of *DJ1* and *Parkin* mediated by pathogenic *DJ1* mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 2005;14:71-84.
- [86] Munoz E, Pastor P, Marti MJ, Oliva R, Tolosa E. A new mutation in the *parkin* gene in a patient with atypical autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Neurosci Lett* 2000;289:66-8.
- [87] Munoz E, Tolosa E, Pastor P, Marti MJ, Valldeoriola F, Campdelacreu J, Oliva R. Relative high frequency of the c.255delA *parkin* gene mutation in Spanish patients with autosomal recessive parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:582-4.
- [88] Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. *DJ1*, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:509-513.
- [89] Najim al-Din AS, Wriekat A, Mubaidin A, Dasouki M, Hiari M. Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurol Scand* 1994;89:347-352.
- [90] Nichols WC, Pankratz N, Uniacke SK, Pauciulo MW, Halter C, Rudolph A, Conneally PM, Foroud T. Linkage stratification and mutation analysis at the *Parkin* locus identifies mutation positive Parkinson's disease families. *J Med Genet* 2002;39:489-92.

- [91] Niki T, Takahashi-Niki K, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. DJBP: a novel DJ1-binding protein, negatively regulates the androgen receptor by recruiting histone deacetylase complex, and DJ1 antagonizes this inhibition by abrogation of this complex. *Mol Cancer Res* 2003;1:247-61.
- [92] Nisipeanu P, Inzelberg R, Abo Mouch S, Carasso RL, Blumen SC, Zhang J, Matsumine H, Hattori N, Mizuno Y. *Parkin* gene causing benign autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Neurology* 2001;56:1573-5.
- [93] Oliveira SA, Scott WK, Martin ER, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Ondo WG, Allen FH, Jr., Scott BL, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, Zhang F, Booze MW, Winn MP, Middleton LT, Haines JL, Pericak-Vance MA, Vance JM. *Parkin* mutations and susceptibility alleles in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53:624-9.
- [94] Olzmann JA, Brown K, Wilkinson KD, Rees HD, Huai Q, Ke H, Levey AI, Li L, Chin LS. Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ1 protein folding and function. *J Biol Chem* 2004;279:8506-15.
- [95] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-9.
- [96] Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T. Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without *Parkin* mutations. *Am J Hum Genet* 2002;71:124-35.
- [97] Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T. Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene Interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet* 2003;12:2599-608.
- [98] Parkinson J. An essay on the shaking palsy, London 1817. (Reprint in: Critchley 1955, 145-218; deutsche Übersetzung Eine Abhandlung über die Schüttellähmung von Ute Schlie, als Anhang zu Pies 1988).

- [99] Periquet M, Lücking C, Vaughan J, Bonifati V, Dürr A, De Michele G, Horstink M, Farrer M, Illarioshkin SN, Pollak P, Borg M, Brefel-Courbon C, Deneffe P, Mecco G, Gasser T, Breteler MM, Wood N, Agid Y, Brice A. Origin of the mutations in the *Parkin* gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from Founder effects. *Am J Hum Genet* 2001;68:617-26.
- [100] Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S, Teive H, Fraix V, Vidailhet M, Nicholl D, Barone P, Wood NW, Raskin S, Deleuze JF, Agid Y, Dürr A, Brice A. *Parkin* mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 2003;126:1271-8.
- [101] Pineda-Trujillo N, Carvajal-Carmona LG, Buritica O, Moreno S, Uribe C, Pineda D, Toro M, Garcia F, Arias W, Bedoya G, Lopera F, Ruiz-Linares A. A novel Cys212Tyr founder mutation in *parkin* and allelic heterogeneity of juvenile Parkinsonism in a population from North West Colombia. *Neurosci Lett* 2001;298:87-90.
- [102] Poorkaj P, Nutt JG, James D, Gancher S, Bird TD, Steinbart E, Schellenberg GD, Payami H. *Parkin* mutation analysis in clinic patients with early-onset Parkinson [corrected] disease. *Am J Med Genet A* 2004;129:44-50.
- [103] Poskanzer DC, Schwab RS. Cohort Analysis of Parkinson's Syndrome: Evidence for a Single Etiology Related to Subclinical Infection About 1920. *J Chronic Dis* 1963;16:961-73.
- [104] Pramstaller PP, Kunig G, Leenders K, Kann M, Hedrich K, Vieregge P, Goetz CG, Klein C. *Parkin* mutations in a patient with hemiparkinsonism-hemiatrophy: a clinical-genetic and PET study. *Neurology* 2002;58:808-10.
- [105] Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, Scaravilli F, Eskelson C, Pepivani I, Hedrich K, Adel S, Gonzales-McNeal M, Hilker R, Kramer PL, Klein C. Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 *Parkin* mutation carriers. *Ann Neurol* 2005;58:411-22.

- [106] Quigley PM, Korotkov K, Baneyx F, Hol WG. The 1.6-Å crystal structure of the class of chaperones represented by *Escherichia coli* Hsp31 reveals a putative catalytic triad. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3137-42.
- [107] Rawal N, Periquet M, Lohmann E, Lücking CB, Teive HA, Ambrosio G, Raskin S, Lincoln S, Hattori N, Guimaraes J, Horstink MW, Dos Santos Bele W, Brousolle E, Destee A, Mizuno Y, Farrer M, Deleuze JF, De Michele G, Agid Y, Dürr A, Brice A. New *Parkin* mutations and atypical phenotypes in families with autosomal recessive parkinsonism. *Neurology* 2003;60:1378-81.
- [108] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
- [109] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-7.
- [110] Schlitter AM, Kurz M, Larsen JP, Voitalla D, Müller T, Epplen JT, Dekomien G. *Parkin* gene variations in late-onset Parkinson's disease: comparison between Norwegian and German cohorts. *Acta Neurol Scand* 2006;113:9-13.
- [111] Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology* 1993;43:1173-80.
- [112] Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, *Parkin*, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000;25:302-5.
- [113] Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Pang CY, Chen SY, Hsin YL, Thajeb P, Lee YJ, Li H. Early-onset Parkinson's disease in a Chinese population: 99mTc-TRODAT-1 SPECT, *Parkin* gene analysis and clinical study. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11:173-80.
- [114] Sim E, Stanley LA, Risch A, Thygesen P. Xenogenetics in multifactorial disease susceptibility. *Trends Genet* 1995;11:509-12.

- [115] 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, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003;12:2599-2608.
- [116] Slominskii PA, Miloserdova OV, Popova SN, Giliyazova IR, Khidiyatova IV, Magzhanov RV, Khusnutdinova EK, Limborskaia SA. [Analysis of deletion mutations in the *PARK2* gene in idiopathic Parkinson's disease] *Genetika* 2003;39:223-8. Russian.
- [117] Takahashi K, Taira T, Niki T, Seino C, Iguchi-Arigo SM, Ariga H. *DJ1* positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor. *J Biol Chem* 2001;276:37556-63.
- [118] Tan EK, Tan C, Zhao Y, Yew K, Shen H, Chandran VR, Teoh ML, Yih Y, Pavanni R, Wong MC. Genetic analysis of *DJ1* in a cohort Parkinson's disease patients of different ethnicity. *Neurosci Lett* 2004; 367:109-12.
- [119] Tanner CM, Goldman SM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* 1996;14:317-35.
- [120] Tao X, Tong L. Crystal structure of human DJ1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. *J Biol Chem* 2003;278:31372-9.
- [121] Terreni L, Calabrese E, Calella AM, Forloni G, Mariani C. New mutation (R42P) of the *parkin* gene in the ubiquitinlike domain associated with parkinsonism. *Neurology* 2001;56:463-6.
- [122] Ujike H, Yamamoto M, Kanzaki A, Okumura K, Takaki M, Kuroda S. Prevalence of homozygous deletions of the *parkin* gene in a cohort of patients with sporadic and familial Parkinson's disease. *Mov Disord* 2001;16:111-3.
- [123] Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B, Bentivoglio AR. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004;56:336-341.
- [124] Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:615-9.

- [125] Wagenfeld A, Gromoll J, Cooper TG. Molecular cloning and expression of rat contraception associated protein 1 (CAP1), a protein putatively involved in fertilization. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:545-9.
- [126] Wang T, Liang Z, Sun S, Cao X, Peng H, Cao F, Liu H, Tong ET. Point mutation in the *parkin* gene on patients with Parkinson's disease. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003;23:145-7.
- [127] Wellenbrock C. Doktorarbeit in Arbeit.
- [128] West A, Periquet M, Lincoln S, Lücking CB, Nicholl D, Bonifati V, Rawal N, Gasser T, Lohmann E, Deleuze JF, Maraganore D, Levey A, Wood N, Dürr A, Hardy J, Brice A, Farrer M. Complex relationship between *Parkin* mutations and Parkinson disease. *Am J Med Genet* 2002;114:584-91.
- [129] West AB, Maraganore D, Crook J, Lesnick T, Lockhart PJ, Wilkes KM, Kapatos G, Hardy JA, Farrer MJ. Functional association of the *Parkin* gene promoter with idiopathic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2002;11:2787-92.
- [130] Wu RM, Bounds R, Lincoln S, Hulihan M, Lin CH, Hwu WL, Chen J, Gwinn-Hardy K, Farrer M. *Parkin* mutations and early-onset parkinsonism in a Taiwanese cohort. *Arch Neurol* 2005;62:82-7.
- [131] Xu Y, Liu Z, Wang Y, Tao E, Chen G, Chen B. [A new point mutation on exon 2 of *parkin* gene in Parkinson's disease] *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2002;19:409-11. Chinese.
- [132] Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. 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* 2000;97:13354-9.

# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
cDNA	<i>Copy (complementary) DNA</i>
CT	<i>Threshold cycle</i>
D	Dalton
del	Deletion
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dHPLC	Denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribunucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
engl.	Englisch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOPD	<i>early-onset Parkinson's disease</i>
EtOH	Ethanol
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
g	Gramm

---

G	Guanin
griech.	Griechisch
h	Stunde
het	Heterozygot
hom	Homozygot
IBR	<i>In-between-RING</i>
IRD	<i>infrared dye</i>
IVS	<i>intervening sequence</i> ; Intron
J.	Jahre
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
lat.	Lateinisch
LC	<i>LightCycler</i>
L-Dopa	Levodopa
M	Molar (g/mol)
m	Milli- ( $10^{-3}$ )
min	Minute
mRNA	Messenger-RNA
$\mu$	Mikro- ( $10^{-6}$ )
n	Nano- ( $10^{-9}$ )
n	Anzahl
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Oligo	Oligonukleotid
p	Wahrscheinlichkeit
p	Pico- ( $10^{-12}$ )
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Positronenemissions-Tomographie
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PS	Parkinson-Syndrom

---

RING	<i>Really interesting new gene</i>
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SD	Standard Abweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
T	Thymin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Maß für Enzymaktivität)
u. a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
UTR	<i>untranslated regions</i> UTR sind die nicht in Protein translatierten Regionen
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
Vol.	Volumen
W	Watt
z. B.	zum Beispiel

# Anhang B

## Bekannte Mutationen im *Parkin*-Gen

### B.1 Bekannte Punkt- und andere kleine Mutationen im *Parkin*-Gen

Tabelle B.1: Bekannte Punkt- und andere kleine Mutationen im *Parkin*-Gen

Nr.	Lokal.	Mutation	Protein	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
1	Ex1	81G>T		Hedrich et al., 2002 (2)	evtl. Polym.
2	Ex1	102A>T		Rawal et al., 2003(1)	französisch
3	In1	IVS1+1G>A		Illarioshkin et al., 2003(1)	russisch
4	In1	IVS1+1G>T		Chien et al., 2005 (1)	brasilianisch
5	Ex2	144G>A	Val15Met	Munoz et al., 2002(1)	spanisch
6	Ex2	198C>T	Arg33Stop	Maruyama et al., 2000(1)	japanisch
7	Ex2	199G>A	Arg33Gln	Oliveira et al., 2003 (1)	
8	Ex2	202delA	Gln34/Stop43	Nisipeanu et al., 2001 (1)	arabisch-israelisch
9	Ex2	202-203delAG	Gln34/Stop37	Abbas et al., 1999 (2) Hedrich et al., 2002 (1) Illarioshkin et al., 2003(1) Lücking et al., 2000 (5) Gouider-Khouja et al., 2003 (3) Foroud et al., 2003 (1) Oliveira et al., 2003 (1) Lincoln et al., 2003 (1)	italienisch puertoricanisch russisch französisch, britisch tunesisch
10	Ex2	211C>T	Pro37Leu	Kann et al., 2002 (1)	deutsch
11	Ex2	226G>C	Arg42Pro	Terreni et al., 2001 (1) Hedrich et al., 2002 (1) Bertoli-Avella et al., 2005 (1)	italienisch italienisch

Fortsetzung der Tabelle B.1

Nr.	Lokal.	Mutation	Protein	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
12	Ex2	237G>C	Ala46Pro	Xu et al., 2002 (1)	chinesisch
13	Ex2	255delA	Asn52/Stop80	Abbas et al., 1999 (1) Lücking et al., 2000 (6) Hedrich et al., 2002 (1) Hoenicka et al., 2002 (2) Munoz et al., 2002 (4) Nichols et al., 2002 (1) Foroud et al., 2003 (1) Lincoln et al., 2003 (1) Rawal et al., 2003 (2)	französisch w.-europäisch puertoricanisch spanisch spanisch  portug. (1), brasil. (1)
14	Ex2	268T>A	Val56Glu	Hoenicka et al., 2002 (1)	spanisch
15	Ex3	321-322insGT	Trp74/Stop81	Abbas et al., 1999 (1) Lücking et al., 2000 (2) Pineda-Trujillo et al., 2001 (2) Nichols et al., 2002 (1)	französisch franz. (1), deutsch (1) antiochianisch (kolumbianisch)
16	Ex3	336G>T	Glu79Stop	Foroud et al., 2003 (1)	
17	Ex3	345C>A	Ala82Glu	West et al., 2002a (1)	
18	Ex3	346C>A	Ala82Glu	Hedrich et al., 2001 (1) Lincoln et al., 2003 (3)	südtirolisch, evtl. Polym.
19	Ex3	438-477del	Leu112/Stop163	Chen et al., 2003 (1) Farrer et al., 2001 (2) Hedrich et al., 2002 (1) Nichols et al., 2002 (1) Oliveira et al., 2003 (2)	US-amerikanisch europäisch
20	Ex4	584A>T	Lys161Asn	Abbas et al., 1999 (1)	italienisch
21	Ex5	635delG	Gln178/Stop187	Hattori et al., 1998a (2)	japanisch
22	Ex5	675A>C	Met192Leu	Hedrich et al., 2002 (1) Foroud et al., 2003 (1)	afro-amerikanisch
23	Ex5		Ser193Ile	Shyu et al., 2005 (1)	chinesisch
24	In5	IVS5+2T>A		West et al., 2002a (1)	englisch
25	Ex6	734A>T	Lys211Asn	Lücking et al., 2000 (2) Kann et al., 2002 (1) Nichols et al., 2002 (1) Foroud et al., 2003 (1)	niederländisch deutsch
26	Ex6	736G>A	Cys212Tyr	Pineda-Trujillo et al., 2001 (2) Hoenicka et al., 2002 (1)	antiochianisch (kolumbianisch) spanisch
27	Ex6		Cys212Gly	Shyu et al., 2005 (1)	chinesisch
28	Ex6	819C>T	Thr240Met	Foroud et al., 2003 (1)	
29	Ex6	820C>T	Thr240Met	Periquet et al., 2003 (1)	italienisch
			Thr240Met Thr240Met	Madegowda et al., 2005 (1) Schlitter et al., 2006 (1)	indisch deutsch
30	Ex6	820C>G	Thr240Arg	Hattori et al., 1998b (1)	türkisch
31	Ex7	859G>A	Cys253Trp	Oliveira et al., 2003 (1)	
32	Ex7	867C>T	Arg256Cys	Abbas et al., 1999 (1)	deutsch

Fortsetzung der Tabelle B.1

Nr.	Lokal.	Mutation	Protein	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
				Hedrich et al., 2002 (1) Periquet et al., 2003 (1) Oliveira et al., 2003 (1) Lincoln et al., 2003 (1) Schlitter et al., 2006 (2)	britisch französisch   deutsch, norwegisch
33	Ex7		Val258Met	Shyu et al., 2005 (1)	chinesisch
34	Ex7	871delG	Val290/Stop297	Munoz et al., 2000 (1)	marokkanisch
35	Ex7	884A>G	Leu261Leu	Hedrich et al., 2002 (1) Oliveira et al., 2003 (1)	evtl. Polym.
36	Ex7	905T>A	Cys268Stop	Lücking et al., 2000 (1)	
37	Ex7	924C>T	Arg275Trp	Abbas et al., 1999 (1) Lücking et al., 2000 (5) Farrer et al., 2001 (1) Pramstaller et al., 2002 (1) Hedrich et al., 2002 (3) Kann et al., 2002 (1) Nichols et al., 2002 (3) Oliveira et al., 2003 (3) Periquet et al., 2003 (5) Foroud et al., 2003 (4) Rawal et al., 2003 (1) Lincoln et al., 2003 (9)	italienisch irisch französisch britisch europäisch deutsch   niederländisch
38	Ex7	939G>A	Asp280Asn	Lücking et al., 2000 (1) Oliveira et al., 2003 (1)	
39	Ex7	951G>C	Gly284Arg	Wang et al., 2003 (1) Wu et al., 2005 (1) Jin et al., 2005 (1)	chinesisch chinesisch chinesisch
40	Ex7	966T>G	Cys289Gly	Lücking et al., 2000 (1)	
41	Ex7	972delG	Ala291Stop297	Munoz et al., 2002 (1)	
42	In7	IVS7-1G>C		West et al., 2002a (1) Rawal et al., 2003 (1)	
43	Ex8		Gln311His	Shyu et al., 2005 (1)	chinesisch
44	Ex8	1032C>T	Gln311Stop	Hattori et al., 1998b (1)	türkisch
45	Ex9	1072delT	323Cys/Stop434	Klein et al., 2000 (1) Hedrich et al., 2001 (1)	südtirolisch südtirolisch
46	Ex9	1084G>A	Gly328Glu	Lücking et al., 2000 (1)	
47	Ex9	1101C>T	Arg334Cys	Lücking et al., 2000 (1)	
48	Ex9	1142-1143delGA	Gln357/Stop368	Lücking et al., 2000 (1)	
49	Ex9	1147-8delAA	Arg358/Stop368	Hedrich et al., 2001 (1)	südtirolisch
50	Ex9	1152A>C	Thr351Pro	Kann et al., 2002 (2)	deutsch
51	In9	IVS9+4G>T		Oliveira et al., 2003 (1)	
52	Ex11	1276-77delGA	Tyr391/Stop394	Alvarez et al., 2001 (1)	spanisch
53	Ex11	1287G>T		West et al., 2002a (1)	
54	Ex11		Arg396Gly	Wu et al., 2005 (1)	chinesisch
55	Ex11	1293G>A	Ala398Thr	Periquet et al., 2003 (1)	

Fortsetzung der Tabelle B.1

Nr.	Lokal.	Mutation	Protein	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
56	Ex11		Arg402Trp	Poorkaj et al., 2004 (1)	evtl. Polym.
57	Ex11	1305C>T	Arg402Cys	Bertoli-Avella et al., 2005 (1) Schlitter et al., 2006 (1)	deutsch
58	Ex11	1345C>A	Thr415Asn	Abbas et al., 1999 (1) Bertoli-Avella et al., 2005 (1)	italienisch
59	Ex11	1353C>A	Cys418Arg	Bertoli-Avella et al., 2005 (1)	
60	In11	IVS11-3C>G		Bertoli-Avella et al., 2005 (1)	kubanisch
61	Ex12	1383T>C		West et al., 2002a (1)	italienisch
62	Ex12	1385insA	Asn428/Stop568	Rawal et al., 2003 (1)	französisch
63	Ex12	1390G>A	Gly430Asp	Lücking et al., 2000 (2) Hedrich et al., 2002 (1) Nichols et al., 2002(1) Oliveira et al., 2003 (1)	europäisch europäisch
64	Ex12	1393G>T	Cys431Phe	Maruyama et al., 2000 (1)	japanisch
65	Ex12	1411C>T	Pro437Leu	Hedrich et al., 2002 (1) Nichols et al., 2002 (1) Foroud et al., 2003 (1) Rawal et al., 2003 (1) Oliveira et al., 2003 (2) Poorkaj et al., 2004 (1)	niederländisch
66	Ex12	1422T>C	Cys441Arg	West et al., 2002a (1) Shyu et al., 2005 (1)	chinesisch
67	Ex12	1435G>A	Trp445Stop	Rawal et al., 2003 (1)	französisch
68	Ex12	1459G>A	Trp453Stop	Abbas et al., 1999 (1)	italienisch

## B.2 Bekannte Gendosisveränderungen im *Parkin*-Gen

Tabelle B.2: Bekannte Gendosisveränderungen im *Parkin*-Gen

Nr.	Lokal.	Mutation	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
1	Ex1	Deletion	Hedrich et al., 2002 (1) West et al., 2002a (1)	italienisch
2	Ex2	Deletion	Lücking et al., 2000 (4) Hedrich et al., 2001 (1) Hedrich et al., 2002 (1) Kann et al., 2002 (1) Periquet et al., 2003 (2) Poorkaj et al., 2004 (1) Wang et al., 2004 (1) Bertoli-Avella et al., 2005 (1) Wu et al., 2005 (1)	italienisch (3), französisch (1) albanisch afro-amerikanisch  chinesisch chinesisch

Fortsetzung der Tabelle B.2				
Nr.	Lokal.	Mutation	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
3	Ex2	Triplikation	Lücking et al., 2000 (1) Kann et al., 2002 (1)	
4	Ex2-3	Deletion	Abbas et al., 1999 (2) Lücking et al., 2000 (1) Foroud et al., 2003 (2) Bertoli-Avella et al., 2005 (1) Wu et al., 2005 (1)	chinesisch
5	Ex2-3	Duplikation	Periquet et al., 2003 (1)	
6	Ex2-4	Deletion	Maruyama et al., 2000 (2) Lücking et al., 2000 (1) Nichols et al., 2002(1) Periquet et al., 2003 (1)	japanisch
7	Ex2-4	Triplikation	Mata et al., 2005 (2)	
8	Ex2-4	Duplikation	Periquet et al., 2003 (1) Poorkaj et al., 2004 (1) Foroud et al., 2003 (1)	
9	Ex2-5	Deletion	Kann et al., 2002 (1)	
10	Ex3	Deletion	Hattori et al., 1998a (2) Lücking et al., 1998 (1) Nisipeanu et al., 1999 (1) Lücking et al., 2000 (10) Hedrich et al., 2001 (1) Lu et al., 2001 (1) Hedrich et al., 2002 (1) Hoenicka et al., 2002 (1) Nichols et al., 2002 (1) Illarioshkin et al., 2003(1) Lincoln et al., 2003 (1) Poorkaj et al., 2004 (1) Wang et al., 2004 (2) Bertoli-Avella et al., 2005 (4)	japanisch  israelisch europäisch europäisch taiwanesisch europäisch spanisch  russisch   chinesisch
11	Ex3	Duplikation	Lücking et al., 2000 (2) Kann et al., 2002 (1) Nichols et al., 2002 (1) West et al., 2002a (1) Foroud et al., 2003 (1) Periquet et al., 2003 (1)	deutsch   italienisch
12	Ex3-4	Deletion	Hattori et al., 1998a (3) Lücking et al., 2000 (4) Kuroda et al., 2001 (2) Ujike et al., 2001 (1) Hedrich et al., 2002 (2) Kann et al., 2002 (1) Nichols et al., 2002 (2) Foroud et al., 2003 (4) Rawal et al., 2003 (2)	japanisch ital. (2), franz. (1), deutsch (1)  japanisch puertoricanisch deutsch  brazil. (1), ital. (1)

Fortsetzung der Tabelle B.2				
Nr.	Lokal.	Mutation	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
			Periquet et al., 2003 (3) Bertoli-Avella et al., 2005 (3)	franz. (2), algerisch (1)
13	Ex3-4	Duplikation	Illarioshkin et al., 2003(1)	russisch
14	Ex3-5	Deletion	West et al., 2002a (1) Kobayashi et al., 2003 (4) Rawal et al., 2003 (1) Periquet et al., 2003 (1)	französisch US-amerikanisch
15	Ex3-6	Deletion	Lücking et al., 2000 (1) Rawal et al., 2003 (1)	portugiesisch
16	Ex3-7	Deletion	Kitada et al., 1998 (1)	
17	Ex3-9	Deletion	Lücking et al., 2000 (1)	
18	Ex4	Deletion	Abbas et al., 1999 (1) Hattori et al., 1998a (3) Hayashi et al., 2000 (1) Kitada et al., 2000 (4) Ujike et al., 1999 (2) Ujike et al., 2001 (1) Maruyama et al., 2000 (2) Lücking et al., 2000 (4) Jeon et al., 2001 (1) Hedrich et al., 2002 (1) Kann et al., 2002 (2) Lincoln et al., 2003 (1) Illarioshkin et al., 2003(1) Kim et al., 2003 (3) Foroud et al., 2003 (1) Rawal et al., 2003 (2) Wang et al., 2004 (1) Dogu et al., 2004 (1)	italienisch japanisch  japanisch japanisch  europäisch koreanisch italienisch deutsch  russisch koreanisch  brazil. (1), franz. (1) chinesisch türkisch
19	Ex4	Duplikation	Hedrich et al., 2001 (2) West et al., 2002a (1)	südtirolisch
20	Ex4-5	Deletion	Kann et al., 2002 (1)	deutsch
21	Ex4-6	Deletion	Nichols et al., 2002 (1) Foroud et al., 2003 (1) Clarimon et al., 2005 (4)	israelisch
22	Ex4-7	Deletion	West et al., 2002a (1) Rawal et al., 2003 (1)	französisch
23	Ex5	Deletion	Hattori et al., 1998a (2) Lücking et al., 2000 (3) Hedrich et al., 2001 (1) Hoenicka et al., 2002 (1) West et al., 2002a (1) Illarioshkin et al., 2003(1) Lincoln et al., 2003 (1) Bertoli-Avella et al., 2005 (1)	ital.(1), franz. (1), vietn. (1) albanisch spanisch  russisch
24	Ex5	Duplikation	Hedrich et al., 2002 (1)	europäisch

Fortsetzung der Tabelle B.2				
Nr.	Lokal.	Mutation	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
			Nichols et al., 2002 (1) Foroud et al., 2003 (4)	
25	Ex5-6	Deletion	Lücking et al., 2000 (2) Munoz et al., 2002 (1) Bertoli-Avella et al., 2005 (1)	
26	Ex5-7	Deletion	Leroy et al., 1998 (1)	griechisch
27	Ex6	Deletion	Nichols et al., 2002 (1) Foroud et al., 2003 (2) Rawal et al., 2003 (2) Periquet et al., 2003 (1) Bertoli-Avella et al., 2005 (2)	franz. (1), brasil. (1)
28	Ex6	Duplikation	Lücking et al., 2000 (1) Periquet et al., 2003 (1)	
29	Ex6-7	Deletion	Maruyama et al., 2000 (1) Lücking et al., 2000 (1) Bertoli-Avella et al., 2005 (1)	japanisch
30	Ex6-7	Duplikation	Nichols et al., 2002 (1)	
31	Ex7	Deletion	Hedrich et al., 2001 (3) Foroud et al., 2003 (1) Illarioshkin et al., 2003(1)	südtirolisch russisch
32	Ex7	Duplikation	Lücking et al., 2000 (1) Pramstaller et al., 2002 (1) Kann et al., 2002 (1) Nichols et al., 2002 (1) Foroud et al., 2003 (1) Lincoln et al., 2003 (1)	südtirolisch deutsch
33	Ex7-9	Deletion	Lücking et al., 2000 (1)	
34	Ex8	Deletion	Lücking et al., 2002 (1) West et al., 2002a (1) Nichols et al., 2002 (3) Foroud et al., 2003 (12) Poorkaj et al., 2004 (1) Bertoli-Avella et al., 2005 (1)	
35	Ex8	Duplikation	Nichols et al., 2002 (1) Foroud et al., 2003 (6)	
36	Ex8-9	Deletion	Lücking et al., 1998 (1) Lücking et al., 2000 (1) Nichols et al., 2002 (1) Foroud et al., 2003 (1) Madegowda et al., 2005 (1)	indisch
37	Ex8-10	Deletion	Bertoli-Avella et al., 2005(1)	
38	Ex9	Duplikation	Kann et al., 2002 (1) Poorkaj et al., 2004 (1)	
39	Ex10	Deletion	Foroud et al., 2003 (4) Illarioshkin et al., 2003(1)	russisch
40	Ex10	Duplikation	Foroud et al., 2003 (1)	

Fortsetzung der Tabelle B.2				
Nr.	Lokal.	Mutation	Referenz (Anzahl der Träger)	Anmerkung
41	Ex10-12	Deletion	Shyu et al., 2005 (1)	chinesisch
42	Ex11	Duplikation	Lücking et al., 2000 (4)	
43	Ex12	Deletion	Slominskii et al., 2003 (2)	bashkortostanisch

# Anhang C

## Material

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien aufgeführt. Für alle Chemikalien und Geräte sind die Hersteller angegeben.

### C.1 Chemikalien

Acrylamid (30 %); Rotiphorese Gel 30	Roth
Agarose	Biozym
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck
Aqua Spüllösung	Delta-Pharma
Betain	Sigma
Borsäure ( $\text{H}_2\text{BO}_3$ )	Merck
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Amersham Biosciences
EDTA = Titriplex III	Merck
Essigsäure 100 % ( $\text{H}_3\text{COOH}$ )	Merck
Ethanol (EtOH)	Merck
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Merck
Formaldehyd 37 %ig	Sigma
Formamid-Farbstoff	Fluka
Glycerin	Merck
Harnstoff	USB
Hybridisation FastStart-Mix	Roche

Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )	Merck
<i>LongRanger</i> -Gel-Lösung 50 %ig	Biozym
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}$ )	Merck
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) wasserfrei	Merck
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Merck
Molekulargewichtsstandard (100 bp)	Invitrogen
<i>Primer</i>	Biometra
Oligonukleotide	Biometra; MWG Biotech; TIB Molbiol
Oligonukleotide, markiert für LI-COR	MWG Biotech
Proteinase-Inhibitor	RocheDiagnostics
Restriktionsenzyme und Puffer/BSA	New England Biolabs; Invi- trogen
Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ )	Merck
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Amersham Biosciences
Silbernitrat (2,02g $\text{AgNO}_3$ /l)	Caelo
Sonden für <i>LightCycler</i>	TIB Molbiol
Taq-DNA-Polymerase + Puffer	Quantum/Appligene; Eppendorf; Gene Craft Germany
Tetramethylethyldiamin (TEMED) 50	Sigma
Tris	ICN Biomedicals
Xylencyanol	Merck

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden von den Firmen Roth, Fluka Biochemica und Merck geliefert.

## C.2 Stammlösungen und Puffer

Agarose 1 %ig:	1 g Agarose, 100 ml 1xTBE, 2 $\mu$ l Ethidumbromid
Formamid-Farbstoff	47,5 ml Formamid; 2,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); 0,01 g Bromphenolblau; 0,01 g Xylencyanol

Leidener-Lösung:	155 mM NH <sub>4</sub> Cl; 10 mM KHCO <sub>3</sub> ; 0,1 mM EDTA (pH 8,0); (steril filtriert)
Lyse-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 400 mM NaCl; 0,2 mM EDTA (pH 8,0); (steril filtriert)
PAA-Gel, denaturierend für Sequenzierung:	3,3 ml LongRanger Acrylamidlösung (Biozym); 3,0 ml 10x TBE; 12,6 g Harnstoff (entspricht 7 M); ad 30 ml mit dH <sub>2</sub> O; Polymerisieren mit 200 µl 10 % APS und 20 µl TEMED
Puffer A, für dHPLC:	50,0 ml 2M TEAA; 250 l Acetonitril; ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O
Puffer B, für dHPLC:	50,0 ml 2M TEAA; 250 ml Acetonitril; ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O
SSCP-Acrylamid-Gellösung, denaturierend:	400 g Harnstoff, 200ml Acrylamidgellösung (30 %ig), 200 ml 5x TBE, 800 µl TEMED, ad 1l mit dH <sub>2</sub> O; 60 ml Polymerisieren mit 500 µl 10 % APS
SSCP-Acrylamid-Gellösung, nicht-denaturierend:	6 / 8 % Acrylamidgellösung; 8 % Glycerin; in 1x TBE mit 1/1000 Vol. TEMED; 60 ml Polymerisieren mit 500 µl 10 % APS 1x
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0); (autoklaviert)
10xTBE-Puffer:	890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA

### C.3 Geräte

dHPLC

und *Software*

Transgenomic

Sequenziergerät

LI-COR IR2-DNA-Sequenzierer

und *Software*

MWG Biotech

Spektrophotometer

Eppendorf

## Thermocycler

Mastercycler

Eppendorf

TC-100 und PTC-200

Biozym

*LightCycler*und *Software*

RocheDiagnostics

## Videodokumentationssystem

Bio doc Analyse

Biometra

Alle hier nicht aufgeführten Standardgeräte wurden von den Firmen Eppendorf, Peqlab u. a. verwendet.

# Anhang D

## *Primer* und Sonden

Die *Primer*, die für die SSCP- und Sequenz-Analyse verwendet wurden, waren am 5'-Ende um die M13-*Primer*-Sequenz verlängert. Am Vorwärts-*Primer* befand sich die M13F-Sequenz und am Rückwärts-*Primer* die M13R-Sequenz.

### D.1 Allgemeine *Primer*

<i>Primer</i> -Name	Region	Sequenz	<i>Annealing</i> -Temp. (°C)
M13F-700	für alle Sequenzierungen	IRD700-CACGACGTTGTAAAACGAC	58
M13R-800		IRD800-GGATAACAATTTTCACACAGG	

## D.2 *Primer* für die konventionelle

### *DJ1*-Mutationsanalyse

Primer-Name	Region	Sequenz (nach Kitada et al., 1998)	Annealing-Temp. (°C)	Größe des PCR-Produktes (bp)
<i>DJ1</i> Ex 2F	<i>DJ1</i> Exon 2	GGGGTATCTCAGGGTTGCAATG	59.0	199
<i>DJ1</i> Ex 2R		TGGCTAAAAATCGATGTGGGACT		
<i>DJ1</i> Ex 3F	<i>DJ1</i> Exon 3	GGTGAGACCCCATCTCTCTTT	58.0	247
<i>DJ1</i> Ex 3R		AACAAAGAAGCCATATGAAGGAA		
<i>DJ1</i> Ex 4F	<i>DJ1</i> Exon 4	GCTATCTCCTGTACTTCCCACA	55.0	201
<i>DJ1</i> Ex 4R		TTGAGGTATAATTGAGTAGAATTTTT		
<i>DJ1</i> Ex 5F	<i>DJ1</i> Exon 5	AGGTCAGAGAGCTTGTGGTTT	59.0	223
<i>DJ1</i> Ex 5R		ACCAATGACGCTGCAACAC		
<i>DJ1</i> Ex 6F	<i>DJ1</i> Exon 6	TGGGCTTTTCTATATCTGCACTTAG	61.0	240
<i>DJ1</i> Ex 6R		GGGATTGCAGTAAGCCAAGA		
<i>DJ1</i> Ex 7F	<i>DJ1</i> Exon 7	GCCATTAGGATGTCACCTT	60.0	245
<i>DJ1</i> Ex 7R		TCCTAACGGCCTGTTTCTC		

## D.3 *Primer* für die Echtzeit-PCR zur

### Gendosisbestimmung im *DJ1*-Gen

Primer-Name	Region	Sequenz (nach Kitada et al., 1998)	Annealing-Temp. (°C)	Primer-Endkonzentration
β-Globin F	β-Globin-Gen	ACACAACGTGTTCCTACTAGC <sup>a</sup>	55	0,5 pmol/μl
β-Globin R		CAACTTCATCCACGTTCCACC <sup>a</sup>		
<i>DJ1</i> Ex 2F	<i>DJ1</i> Exon 2	TTTTTTTTTTTTTTTAAAGGCTTGTAAC	57	1,0 pmol/μl
<i>DJ1</i> Ex 2R		GGCTAAAAATCGATGTGGGACT		
<i>DJ1</i> Ex 3F	<i>DJ1</i> Exon 3	AGATTAAGGTCACCGTTGCAG	57	1,0 pmol/μl
<i>DJ1</i> Ex 3R		TGAAGGAATAACTCCATGTATGGAT		
<i>DJ1</i> Ex 4F	<i>DJ1</i> Exon 4	TTGTTTTCTTTATGTTTTAAACTGTTACA	53	1,5 pmol/μl
<i>DJ1</i> Ex 4R		CCAGCTTTATTGAGGTATAATTGAGTA		
<i>DJ1</i> Ex 5F	<i>DJ1</i> Exon 5	AGGTCAGAGAGCTTGTGGTTT	60	0,5 pmol/μl
<i>DJ1</i> Ex 5R		ACCAATGACGCTGCAACAC		
<i>DJ1</i> Ex 6F	<i>DJ1</i> Exon 6	CTGCACTTAGATCTTTTTTATTTTTATTC	52	1,5 pmol/μl
<i>DJ1</i> Ex 6R		CAAACAAACAAAAACAAGCATATAC		
<i>DJ1</i> Ex 7F	<i>DJ1</i> Exon 7	CATTACACCTACTCTGAGAATCGTG	57	0,5 pmol/μl
<i>DJ1</i> Ex 7R		TCCTAACGGCCTGTTTCTCTAA		

<sup>a</sup>Primer publiziert bei Wittwer et al., 1997

## D.4 Sonden für die Echtzeit-PCR zur Gendosisbestimmung im *DJ1*-Gen

Primer-Name	Region	Sequenz	Mg <sup>2+</sup> -Endkonzentration
$\beta$ -GlobinLC	$\beta$ -Globin-Gen	L-AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAA	2,0 - 4,5 mM
$\beta$ -GlobinFL		CAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGA-F	
<i>DJ1</i> Ex 2LC	<i>DJ1</i> Exon 2	L-GGAAATGGAGACGGTCATCCCTGT	3,0
<i>DJ1</i> Ex 2FL		CTGGTCATCCTGGCTAAAGGAGCA-F	
<i>DJ1</i> Ex 3 LC	<i>DJ1</i> Exon 3	L-GGTCATTTGTCTGATGCCAGCC	3,0
<i>DJ1</i> Ex 3 FL		AGACCCAGTACAGTGTAGCCGTGATG-F	
<i>DJ1</i> Ex 4 LC	<i>DJ1</i> Exon 4	L-CCTCCTGGTAGAACCACCACATCA	4,5
<i>DJ1</i> Ex 4 FL		CAGATAAATTCTGTGCGCCCAGATT-F	
<i>DJ1</i> Ex 5 LC	<i>DJ1</i> Exon 5	L-ATACTGAAGGAGCAGGAAAACCGGAAG	3,0
<i>DJ1</i> Ex 5 FL		TCTTTTCACTAGTCTGCTGCTGTGAAGG-F	
<i>DJ1</i> Ex 6 LC	<i>DJ1</i> Exon 6	L-GGTGTGTTGTAAC TTACTTCCAAAACC	3,8
<i>DJ1</i> Ex 6 FL		CCTCCATTCATCATTTTGTCTTTAGCAAG-F	
<i>DJ1</i> Ex 7 LC	<i>DJ1</i> Exon 7	L-CAAGCGCAAAC TCGAAGCTGGTC	3,0
<i>DJ1</i> Ex 7 FL		TTGCCATTCAGGGCTTCAACAATT-F	

## D.5 *Primer* für die konventionelle *Parkin*-Mutationsanalyse

<i>Primer</i> -Name	Region	Sequenz (nach Kitada et al., 1998)	<i>Annealing</i> -Temp. (°C)	Größe des PCR-Produktes (bp)
Ex 1 F	Exon 1	GCGCGGCTGGCGCCGCTGCGCGCA <sup>a</sup>	72	112
Ex 1 R		GCGGCGCAGAGAGGCTGTAC <sup>a</sup>		
Ex 2 F	Exon 2	ATGTTGCTATCACCATTTAAGGG	55	308
Ex 2 R		AGATTGGCAGCGCAGGCGGCATG		
Ex 3/1 F	Exon 3, 5'-Teil	ACATGTCACFTTTTGCTTCCCT	55	274
Ex 3/1 R		ACTGAGCTGCTGAGGTCCAC		
Ex 3/2 F	Exon 3, 3'-Teil	AGAAACGCGGCGGGAGGCTG	55	221
Ex 3/2 R		AGGCCATGCTCCATGCAGACTGC		
Ex 4 F	Exon 4	ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTTGT	55	261
Ex 4 R		AGGCAATGTGTTAGTACACA		
Ex 5 F	Exon 5	ACATGTCTTAAGGAGTACATTT	55	227
Ex 5 R		TCTCTAATTTCCCTGGCAAACAGTG		
Ex 6 F	Exon 6	AGAGATTGTTTACTGTGGAAACA	55	268
Ex 6 R		GAGTGATGCTATTTTTAGATCCT		
Ex 7 F	Exon 7	TGCCTTTCCACACTGACAGGTACT	55	239
Ex 7 R		TCTGTTCTTCATTAGCATTAGAGA		
Ex 8 F	Exon 8	TGATAGTCATAACTGTGTGTAAG	55	206
Ex 8 R		ACTGTCTCATTAGCGTCTATCTT		
Ex 9 F	Exon 9	GGGTGAAATTTGCAGTCAGT	55	278
Ex 9 R		AATATAATCCCAGCCCATGTGCA		
Ex 10 F	Exon10	ATTGCCAAATGCAACCTMTGTC	55	165
Ex 10 R		TTGGAGGAATGAGTAGGGCATT		
Ex 11 F	Exon 11	ACAGGGAACATAAACTCTGATCC	55	303
Ex 11 R		CAACACACCAGGCACCTTCAGA		
Ex 12 F	Exon 12	GTTTGGGAATGCGTGTTTT	55	255
Ex 12 R		AGAATTAGAAAATGAAGGTAGACA		

<sup>a</sup>Zusatz von 12 % Betain zur PCR

## D.6 *Primer* für die Echtzeit-PCR zur Gendosisbestimmung im *Parkin*-Gen

Primer-Name	Region	Sequenz	Annealing-Temp. (°C)	Primer-Endkonzentration
β-Globin F	β-Globin-Gen	ACACAACCTGTGTTCACTAGC <sup>a</sup>	55	0,5 pmol/μl
β-Globin R		CAACTTCATCCACGTTCAAC <sup>a</sup>		
Park Ex 1 F	<i>Parkin</i> Exon 1	GCGCGCTGGCGCCGCTGCGCGCA <sup>b,c</sup>	55	1,0 pmol/μl
Park Ex 1 R		GCGGCGCAGAGAGGCTGTAC <sup>b,c</sup>		
Park Ex 2 F	<i>Parkin</i> Exon 2	TTCAACTCCAGCCATGGTTTC	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 2 R		CCAGTCATTCTCAGCTCCTTC		
Park Ex 3 F	<i>Parkin</i> Exon 3	GCAACTGGAGGCGACGAC	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 3 R		GTCCTTCTGCTGTCTCAGTGTG		
Park Ex 4 F	<i>Parkin</i> Exon 4	GGTAGATCAATCTACAACAGCTTTTATG	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 4 R		GTCAAGGTGAGCGTTGCC		
Park Ex 5 F	<i>Parkin</i> Exon 5	CCATCTTGCTGGGATGATGTT <sup>d</sup>	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 5 R		TGCACTAGTCCCAGGGCA <sup>d</sup>		
Park Ex 6 F	<i>Parkin</i> Exon 6	GGAATTTTTCTTTAAATGTGGAGCA	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 6 R		GAGTGATGCTATTTTATGATCCT <sup>b</sup>		
Park Ex 7 F	<i>Parkin</i> Exon 7	GAGCCCCGTCCTGGTTTT	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 7 R		ACAAGGCAGGGAGTAGCCAA		
Park Ex 8 F	<i>Parkin</i> Exon 8	TGATAGTCATAACTGTGTGTAAG <sup>b</sup>	55	1,0 pmol/μl
Park Ex 8 R		ACTGTCTCATTAGCGTCTATCTT <sup>b</sup>		
Park Ex 9 F	<i>Parkin</i> Exon 9	AGCAGTATGGTGCAGAGGAGTG	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 9 R		CCCCTTCGCAGGTGACT		
Park Ex 10 F	<i>Parkin</i> Exon 10	GCCTTCTGCCGGGAATGTA	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 10 R		TTGGAGGAATGAGTAGGGCATT <sup>a</sup>		
Park Ex 11 F	<i>Parkin</i> Exon 11	CGCCTACAGAGTCGATGAAAGAG	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 11 R		TTTTTCCACTGGTACATGGCAG		
Park Ex 12 F	<i>Parkin</i> Exon 12	CGAGTGGTGCTGGAAGTGTG	55	0,5 pmol/μl
Park Ex 12 R		AATTGAAGGTAGACACTGGGTATG		

<sup>a</sup>Primer publiziert bei Wittwer et al., 1997

<sup>b</sup>Primer publiziert bei Kitada et al., 1998,

<sup>c</sup>Zusatz von 1 % Glycerin zur PCR

<sup>d</sup>Zusatz von 3 % Formamid zur PCR

## D.7 Sonden für die Echtzeit-PCR zur Gendosisbestimmung im *Parkin*-Gen

Primer-Name	Region	Sequenz	Mg <sup>2+</sup> -Endkonzentration
β-GlobinLC	β-Globin-Gen	L-AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAA	2,0 - 4,5 mM
β-GlobinFL		CAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGA-F	
Park Ex 1LC	<i>Parkin</i> Exon 1	L-CCCGCAGCCGCCACCTACC	4,5 mM
Park Ex 1FL		CGCGCATGGGCCTGTTCTCTG-F	
Park Ex 2LC	<i>Parkin</i> Exon 2	L-ATGCTGGTGTGAGAATCGACCTCCAC	3,0 mM
Park Ex 2FL		GCAACCACCTCCTTGAGCTGGAA-F	
Park Ex 3LC	<i>Parkin</i> Exon 3	L-TCAGCAGCTCAGTCTCCAGGAG	3,0 mM
Park Ex 3FL		CCCAGAGCTTGACTCGGGTGGAC-F	
Park Ex 4LC	<i>Parkin</i> Exon 4	L-CTCAGGGTACAGTGCAGCACCTGC	3,0 mM
Park Ex 4FL		CCTGTCAAAGAGTGCAGCCGGGA-F	
Park Ex 5LC	<i>Parkin</i> Exon 5	L-AATGCCAATCCCCACACTGC	3,0 mM
Park Ex 5FL		TTTTAATTCCAAACCGGATGAGTGGT-F	
Park Ex 6LC	<i>Parkin</i> Exon 6	L-CGCAACAAATAGTCGGAACATCACTTG	4,5 mM
Park Ex 6FL		GGAAACACCAGTAGCTTTGCACCTGA-F	
Park Ex 7LC	<i>Parkin</i> Exon 7	L-TACTGTGTGACAAGACTCAATGATCGGCA	3,0 mM
Park Ex 7FL		CCACGTGATTTGCTTAGACTGTTTCCAC-F	
Park Ex 8LC	<i>Parkin</i> Exon 8	L-CTTTAATCAAGGAGTTGGGACAGCCA	3,0 mM
Park Ex 8FL		CTCCAGAATCCTGAAGTGATGGAGC-F	
Park Ex 9LC	<i>Parkin</i> Exon 9	L-CTGCTGCCGGAGCCTGACCAGA	3,0 mM
Park Ex 9FL		CCCCGCCCTGGCTGTGGAGC-F	
Park Ex 10LC	<i>Parkin</i> Exon 10	L-GCACTCCCCTTCATGGTACGCTTC	2,0 mM
Park Ex 10FL		TGTTCCCTGAGGCTTCAAATACGGCAC-F	
Park Ex 11LC	<i>Parkin</i> Exon 11	L-AAGAAAACCAACCAAGCCCTGTCCCC	3,0 mM
Park Ex 11FL		TGGGAAGCAGCCTCCAAGAAACCAT-F	
Park Ex 12LC	<i>Parkin</i> Exon 12	L-TGGTCCCCCATGCAGACGCGGT	3,0 mM
Park Ex 12FL		CCGCCCTGGCTACACGTCAACCF	

# Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. med. Christine Klein ermöglichte es mir, ein interessantes Thema zu bearbeiten. Sie war immer diskussionsbereit und die Zusammenarbeit war stets fruchtbar.

Prof. Dr. med. Eberhardt Schwinger danke ich für die Forschungsmöglichkeit am Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck.

Frau Dr. rer. nat Katja Hedrich hat mich nicht nur in die Experimente eingearbeitet, sie war auch immer eine kompetente und geduldige Ansprechpartnerin.

Frau Karin Wieggers, Frau Jennifer Garrels und Herr Kemal Kabakci standen mit Rat und Tat zur Seite.

Auch all den anderen der AG Molekulare Neurogenetik danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Insbesondere Herrn Norman Kock, Frau Claudia Wellenbrock, Frau Eva-Maria Meyer und Frau Dr. med. Cordula Eskelson.

Herr Piskol half freundlicherweise bei der Fertigstellung des Posters für die Präsentation und bei einigen Computerproblemen.

Herr G. Abbruzzesse, Herr H. Jakobs, Herr V. Kostic, Herr P. Martinelli und Herr P. Pramsteller haben die Patienten untersucht und die Blutproben sowie die klinischen Daten weitergeleitet.

Herr Prof. Dr. med. Olaf Rieß hat mir die Möglichkeit gegeben, am Institut für Human-genetik der Eberhard Karls Universität Tübingen zu forschen.

Von Herrn Dr. med. Robert Hering habe ich vieles über das *Transgenomic-Wave*®-System gelernt. Er hatte immer gute Ideen und Ratschläge, wie die *Wave*® wieder funktionsfähig wird.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei den Patienten und Familienangehörigen für die Teilnahme an dieser Studie.

# Lebenslauf

Nora Johanna Schäfer

Wentorfer Straße 82

21029 Hamburg

geboren am 16.07.1980 in Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch



## **Ausbildung:**

- 1986-1996      Grundschule und Gymnasium in Bergedorf
- 1996-1998      *Kingdown School, Comprehensive School* in Warminster,  
England, englisches Abitur
- 1999            Externe Zusatzprüfungen zur Anerkennung der Hochschulreife  
in Deutschland
- 1999-2006      Medizinstudium an der Universität zu Lübeck, Deutschland

## **Ökologisches Jahr:**

- 1999            Freiwilliges ökologisches Halbjahr, Hamburg

## **Praktisches Jahr:**

- 2005            Chirurgie, Westküstenklinikum Heide
- 2005            Innere Medizin, Victoria Hospital, Kapstadt
- 2005-2006      Kinder-und Jugendpsychiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-  
Holstein Campus Lübeck

**Promotion:**

2002-2004 „Molekulargenetische Untersuchung des *DJ1*- und *Parkin*-Gens bei Patienten mit Parkinson-Syndrom“

**Förderung:**

2002-2003 Promotions-Stipendium 2002 aus dem Programm „Experimentelle Medizin“ der Universität zu Lübeck

# Veröffentlichungen

## Originalarbeiten/Kurzberichte/Mitteilungen:

1. Wellenbrock C, Hedrich K, **Schäfer N**, Kasten M, Jacobs H, Schwinger E, Hagenah J, Pramstaller PP, Vieregge P, Klein C. *NR4A2* mutations are rare among European patients with familial Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54:415.
2. Hedrich K, **Schäfer N**, Hering R, Hagenah J, Lanthaler AJ, Schwinger E, Kramer PL, Ozelius LJ, Bressman SB, Abbruzzese G, Martinelli P, Kostic V, Pramstaller PP, Vieregge P, Rieß O, Klein C. The R98Q variation in *DJ1* represents a rare polymorphism. *Ann Neurol* 2004;55:145; author reply 145-6.
3. Hedrich K, Djarmati A, **Schäfer N**, Hering R, Wellenbrock C, Weiss PH, Hilker R, Vieregge P, Ozelius LJ, Heutink P, Bonifati V, Schwinger E, Lang AE, Noth J, Bressman SB, Pramstaller PP, Rieß O, Klein C. *DJ1* (*PARK7*) mutations are less frequent than *Parkin* (*PARK2*) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2004;62:389-94.
4. Djarmati A, Hedrich K, Svetel M, **Schäfer N**, Juric V, Vukosavic S, Hering R, Riess O, Romac S, Klein C, Kostic V. Detection of *Parkin* (*PARK2*) and *DJ1* (*PARK7*) mutations in early-onset Parkinson disease: *Parkin* mutation frequency depends on ethnic origin of patients. *Hum Mutat* 2004;23:525.
5. Klein C, Djarmati A, Hedrich K, **Schäfer N**, Scaglione C, Marchese R, Kock N, Schüle B, Lohnau T, Winkler S, Wiegers K, Hering R, Bauer P, Rieß O, Abbruzzese G, Martinelli P, Pramstaller PP. *PINK1*, *Parkin*, and *DJ1* mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur J Hum Genet* 2005;13:1086-1093.

## Abstracts:

1. **Schäfer N**, Hering R, Weiss-Blankenhorn P, Hedrich K, Noth J, Rieß O, Klein C. Juveniler M. Parkinson assoziiert mit einer Mutation im *DJ1*-Gen (*PARK7*). Aktuelle Neurologie 2003;30(Suppl. 1):S92-93.