

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Neurogenetik

**Genetische Varianten in *PLXNA4*
bei Morbus Parkinson**

Immanuel Georg Stahl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Juliane Winkelmann
2. apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Die Dissertation wurde am 01.02.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.01.2017 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iii
Tabellenverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einleitung	1
1.1. Genetische Variation	1
1.2. Identifizierung von Auslösern monogener Erkrankungen	6
1.2.1. Linkage-Analysen	6
1.2.2. Sequenzierungen	7
1.2.3. Next-Generation-Sequencing	8
1.3. Morbus Parkinson (PD)	9
1.3.1. Klinische Präsentation und Diagnose	9
1.3.2. Epidemiologie	11
1.3.3. Pathologie	11
1.3.4. Therapeutische Möglichkeiten	13
1.4. Genetische Formen der Parkinsonerkrankung	14
2. Fragestellung	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Untersuchte Familie, Kontrollgruppe und Parkinson-Patientenkollektiv . .	17
3.1.1. Beschreibung der untersuchten Familie	17
3.1.2. KORA Allgemeinbevölkerungskohorte	18
3.1.3. Parkinson-Patientenkollektiv	18
3.2. DNA-Analysetechniken	19
3.2.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase chain reaction, PCR) . .	19
3.2.2. Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (Idaho LightScanner)	22
3.2.3. Sanger-Sequenzierung	26
3.2.4. Segregationsanalyse	27
3.2.5. Geräte und Reagenzien für die PCR	28
3.3. Statistische Analysen	28
3.3.1. Chi-Quadrat-Test	28
3.3.2. Exakter Test nach Fisher	30
3.4. In silico Prädiktionsalgorithmen	31
3.4.1. SIFT	31
3.4.2. MutationTaster	31
3.4.3. PolyPhen2	32

4. Ergebnisse	34
4.1. Untersuchung der betroffenen Familie	34
4.1.1. Ergebnisse der Exomsequenzierung	34
4.1.2. Linkage-Analyse	36
4.1.3. Segregation der Kandidatenvarianten aus der Exomsequenzierung	37
4.1.4. Segregation der weiteren <i>PLXNA4</i> -Varianten	39
4.2. DNA-Analysen der Fall- und Kontrollpopulation und statistische Auswertung der identifizierten Varianten	40
4.2.1. Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse	41
4.2.2. Identifizierte Varianten	41
4.3. Familienanamnesen der Variantenträger	48
4.4. In silico Prädiktion	48
5. Diskussion	51
5.1. Chancen und Risiken bei der Ergebnisbeurteilung	51
5.1.1. Definition einer seltenen Variante	51
5.1.2. Statistische Beurteilung seltener Varianten	52
5.1.3. Kontrollprobanden bei PD	53
5.1.4. Unvollständige Penetranz	54
5.1.5. Schwächen eines Screeningverfahrens	55
5.1.6. Einschränkungen der Exomsequenzierung	56
5.1.7. Korrektheit der Prädiktionsprogramme	58
5.2. Beurteilung des Zusammenhangs seltener Varianten in <i>PLXNA4</i> und einer Erkrankung an PD	59
5.2.1. Seltene genetische Varianten bei komplexen genetischen Erkrankungen	60
5.2.2. Plexine	63
5.2.3. Axon-Guidance-Moleküle als Auslöser neurodegenerativer Erkrankungen	66
5.3. Weiteres Vorgehen	68
5.4. Abschließende Betrachtung	71
6. Zusammenfassung	73
Literatur	75
Anhang	89
A. Danksagung	90
B. Kongressbeitrag und Publikation	91
C. Lebenslauf	92

Abbildungsverzeichnis

1.1. Effektstärke und Allelhäufigkeit von genetischen Varianten	6
3.1. Stammbaum der untersuchten Familie	17
3.2. Schmelzkurven von <i>PLXNA4</i> Exon 5	25
3.3. Schmelzkurven von <i>PLXNA4</i> Exon 31	25
3.4. Schmelzkurven von <i>PLXNA4</i> Exon 17	26
4.1. Darstellung der menschlichen Chromosome mit der Position der identifizierten Varianten und Regionen mit einem LOD $\geq 0,5$	37
4.2. Segregation der Variante p.Ser178Thr in <i>CPNE1</i>	38
4.3. Segregation der Variante p.Gly425Arg in <i>GOLGA4</i>	38
4.4. Segregation der Variante c.373_374delAA in <i>OGN</i>	38
4.5. Segregation der Variante p.Ser657Asp in <i>PLXNA4</i>	39
4.6. Segregation der Variante p.Arg302His in <i>PLXNA4</i>	40
4.7. Segregation der Variante p.Phe40Leu in <i>PLXNA4</i>	40
4.8. Identifizierte Varianten in <i>PLXNA4</i>	47
4.9. Häufigkeitsverteilungen der sehr seltenen Varianten in <i>PLXNA4</i>	50
5.1. Schematische Darstellung der PLXN-Signalwege	65
5.2. Subzelluläre Lokalisation von PLXNA4 mit und ohne p.Ser657Asn	70
5.3. Zellüberleben von Fibroblasten mit und ohne p.Ser657Asn	70

Tabellenverzeichnis

1.1. Monogene Formen der Parkinson-Krankheit	14
3.1. PCR-Basisansatz	20
3.2. Touchdown-PCR-Programm	20
3.3. Primer Exons <i>PLXNA4</i>	21
3.4. Protokoll PCR (für LightScanner)	23
3.5. Protokoll PCR ohne LCGreen (für LightScanner)	24
3.6. Farbeinlagerungsprogramm	24
3.7. Ansatz Sequenzier-PCR	27
3.8. Sequenzier PCR-Programm	27
3.9. Verwendete Reagenzien und Geräte für die PCR	28
3.10. Vierfeldertafel für den χ^2 -Homogenitätstest	28
3.11. Datenquellen von MutationTaster	32
3.12. Von PolyPhen2 genutzte Informationen	33
4.1. Durch Exomsequenzierung identifizierte Varianten	35
4.2. Nach Filterung verbleibende Varianten mit erhöhter Frequenz	35
4.3. Nach Filterung und Frequenzanalyse verbleibende Varianten	36
4.4. Häufigkeiten der identifizierten Varianten	41
4.5. Verteilung der nicht-synonymen Varianten in <i>PLXNA4</i> bezogen auf die MAF	42
4.6. Verteilung der sehr seltenen Varianten in <i>PLXNA4</i> bezogen auf die Art der Variante	42
4.7. Identifizierte intronische Varianten in <i>PLXNA4</i>	44
4.8. Identifizierte synonyme Varianten in <i>PLXNA4</i>	45
4.9. Identifizierte nicht-synonyme Varianten in <i>PLXNA4</i>	46
4.10. Ergebnisse der Prädiktionsprogramme für Varianten in <i>PLXNA4</i>	49
4.11. Statistische Testung der sehr seltenen ($MAF \leq 0,5\%$) „schädlichen“ Vari- anten in <i>PLXNA4</i>	50

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytison
ca.	circa
CAST	Cohort-Allelic-Sums-Test
CNV	Copy-Number-Variation
<i>CPNE1</i>	Gen für Copine-I
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
G	Guanosin
GAP	Ras-GTPase-aktivierendes-Protein
GIT	Gastrointestinaltrakt
<i>GOLGA4</i>	Gen für Golgin-A4
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
Ig	Immunglobulin
<i>IMPDH1</i>	Gen für Inosine-5'-Monophosphate-Dehydrogenase-1
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
LOD	Logarithm of the Odds
<i>LRRK2</i>	Gen für Leucine-rich-Repeat-Kinase-2
MAF	Minor-Allele-Frequency
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
<i>MAPT</i>	Gen für Microtubule-associated-Protein-Tau
N	Nervus
NGS	Next-Generation-DNA-Sequencing
<i>OGN</i>	Gen für Osteoglycin
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD	Morbus Parkinson
<i>PINK1</i>	Gen für PTEN-induced-putative-kinase-1
<i>PLXNA4</i>	Gen für Plexin-A4
PNS	Peripheres Nervensystem
RBD	Rho-GTPase-bindenden-Domäne
<i>RBM28</i>	Gen für RNA-Binding-Motif-Protein-28
<i>SNCA</i>	Gen für α -Synuclein
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
SNV	Single-Nucleotide-Variant
STR	Short-Tandem-Repeat

Abkürzungsverzeichnis

T	Thymin
UK	United Kingdom
<i>VPS35</i>	Gen für Vacuolar-Protein-Sorting-35
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Spätestens mit Darwins 1858 beschriebener Evolutionstheorie war gezeigt, dass Eigenschaften von Generation zu Generation weitergegeben werden (Darwin, 1859). Darüberhinaus konnte Gregor Mendel 1866 erstmals zeigen, dass verschiedene Merkmale eines Organismus einzeln vererbt werden können und begründete die nach ihm benannten Vererbungsregeln (Mendel, 1866). Nachdem Anfang des 20. Jahrhunderts der Begriff des Gens (Wilhelm Johanssen) geprägt wurde, waren mit der Entdeckung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Erbmolekül durch Avery, MacLeod und McCarty 1944 (Avery et al., 1944) und der Entschlüsselung der Struktur der DNA durch Watson und Crick 1953 (Watson et al., 1953) die nächsten Schritte zur Erklärung der menschlichen Vererbung von Eigenschaften und auch Krankheiten getan.

1.1. Genetische Variation

Das menschliche Genom, also das gesamte Erbgut, umfasst ca. 3 Milliarden Basenpaare (Bp), ein relativ kleiner Teil davon (ca. 3%) besteht aus Genen, die für Proteine kodieren (Schaaf et al., 2008). Der gesamte, potentiell für Proteine kodierende Anteil des Genoms wird auch als Exom bezeichnet. Die gesamte Erbinformation muss beispielsweise bei der Meiose, also der Entstehung von Samen- und Eizelle, repliziert werden. Bei diesen Replikationen kommt es trotz verschiedener Korrekturmechanismen zu Fehlern (Strachan et al., 1999). Dadurch entstehen genetische Varianten, die einerseits strukturell sein können, also die Anzahl an Kopien oder die Position eines Genabschnitts betreffen, wie zum Beispiel die Duplikation eines ganzen Chromosoms bei der Trisomie 21. Andererseits können sie nicht strukturell sein und nur die Sequenz der Basenpaare betreffen (Seyffert, 2003).

Die häufigste genetische Veränderung ist der Austausch einer einzelnen Base, ein sogenannter Einzelnukleotidaustausch oder Single-Nucleotide-Variante (SNV) (Schaaf et al., 2008). Die meisten dieser SNVs befinden sich in den großen intergenischen und intronischen Bereichen der DNA; aber auch in den Exons, also den für Proteine kodierenden Ab-

schnitten der DNA, gibt es solche Varianten (Strachan et al., 1999). Hier können die SNVs sowohl synonym sein, das heißt sie verändern die Aminosäuresequenz des Proteins nicht, als auch nicht-synonym. Nicht-synonyme Varianten können nochmals unterteilt werden in Varianten, die in einem einfachen Austausch einer Aminosäure resultieren (Missense-Varianten) oder solche, die einen vorzeitigen Stopp der Translation nach sich ziehen und so zu einem verkürzten Protein führen (Nonsense-Varianten) (Seyffert, 2003).

Die Mutationsrate über das gesamte Genom verteilt, wird pro Basenposition auf ungefähr $1,1 * 10^{-8}$ pro Generation geschätzt (Roach et al., 2010; Nachman et al., 2000; Kondrashov, 2003), bzw. auf $1,47 * 10^{-8}$ pro Person pro Generation bei nicht-synonymen Veränderungen (Rauch et al., 2012). Genetische Untersuchungen zeigten eine SNV bei annähernd jedem 52-ten Bp (Fu et al., 2013).

Wenn diese genetischen Varianten nicht nur in einem Individuum zu identifizieren sind, sondern mit einer Allelfrequenz von mindestens 0,01 in einer Population, so spricht man auch von Einzelnukleotid-Polymorphismen oder Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs) (Strachan et al., 1999). Prinzipiell können diese Varianten in allen Häufigkeiten vorkommen. Die Häufigkeit wird als sogenannte Minor-Allele-Frequency (MAF) angegeben und beziffert die prozentuale Häufigkeit des selteneren Allels („minor allele“). Die MAFs können sich auch populations-spezifisch unterscheiden (Choudhury et al., 2014).

Bei Varianten, die einen negativen Effekt auf die Funktion des Proteins haben, geht man von einem negativen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit einer Variante und der Stärke dieses Effektes aus (Manolio et al., 2009). Der Grund hierfür ist die negative Selektion. Negative Selektion tritt dadurch auf, dass der Träger einer Variante, die einen starken Effekt auf die Funktionsfähigkeit eines Proteins hat, in den meisten Fällen weniger leistungsfähig im Sinne der Reproduktion ist. Das bedeutet, er wird weniger Nachkommen zeugen, die dieselbe Variante tragen. Varianten mit einem starken Effekt werden also aus den Allelen einer Population aussortiert und seltener (Loewe, 2008).

Die nächsten Absätze behandeln genetische Variation im Hinblick auf Erkrankungen. Ein Teil der bekannten Krankheiten ist multifaktoriell bedingt, das heißt, die Krankheit entsteht im komplexen Zusammenspiel von verschiedenen genetischen Veranlagungen und Umwelteinflüssen (Craig, 2008). Bei einigen Erkrankungen überwiegt der Einfluss der Umweltfaktoren, bei anderen wiederum der der genetischen Veranlagung. Eine besondere Stellung im Bereich der genetischen Erkrankungen nehmen die monogenen Erkrankungen ein: Hier löst eine Mutation in einem einzelnen Gen eine Erkrankung aus (Chial, 2008).

Monogen bedingte Krankheiten können dominant oder rezessiv weitervererbt werden (Chial, 2008). Für die oben genannte Sonderform der monogenen Erkrankung gilt, dass beim dominanten Erbgang eine Mutation auf einem der zwei Allele eines Menschen zum Auftreten der Krankheit reicht; beim rezessiven Erbgang müssen beide Allele, das väterliche und das mütterliche, betroffen sein. Entweder mit der gleichen Veränderung (homozygot) oder mit verschiedenen Veränderungen (compound heterozygot) (Schaaf et al., 2008). Daraus ergibt sich, dass beim dominanten Erbgang jede Generation einer Familie betroffen ist, solange das mutierte Allel weitergegeben wird. Beim rezessiven Erbgang hingegen können auch Generationen „ausgelassen“ werden: diese tragen dann nur ein mutiertes Allel, sind phänotypisch gesund, können dieses Allel aber dennoch als sogenannte „Carrier“ weitervererben (Strachan et al., 1999).

Jedoch ist es auch bei vielen monogenen Erkrankungen falsch zu postulieren, dass eine bestimmte Veränderung zwangsläufig zum Ausbruch der Erkrankung führen muss. Man spricht dann von „unvollständiger Penetranz.“ Dies bedeutet, dass in manchen Individuen der aufgrund des Genotyps zu erwartende Phänotyp nicht ausgeprägt ist (Miko, 2008). Gründe dafür können im unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Individuen (Nadeau, 2001), in unterschiedlicher Expression der Gene aufgrund z.B. epigenetischer Faktoren (Miko, 2008) oder auch in Umwelteinflüssen liegen.

Manche genetische Varianten sind in einer Gruppe von an einer bestimmten Erkrankung betroffenen Personen häufiger zu beobachten als in einer gesunden Kontrollpopulation (Manolio et al., 2008). Trotzdem ist die gleiche Variante, jedoch in einer anderen Häufigkeit, auch in dieser gesunden Kontrollpopulation zu finden. In diesem Falle spricht man von einem „Risikoallel“, das das Risiko für eine bestimmte Erkrankung erhöht oder erniedrigt (Park et al., 2011). Diese Risikoveränderung wird als „Odds Ratio“ (OR) quantifiziert. ORs größer als eins bedeuten eine Risikoerhöhung. Aber auch der protektive Effekt, den manche Varianten gegenüber einer Erkrankung bewirken, kann damit ausgedrückt werden. Der Wert des ORs ist in diesem Fall kleiner eins.

Einige Erkrankungen haben multiple Formen, sie können komplex, oligogen oder auch monogen auftreten. Das heißt, die Ursache für das Auftreten der gleichen Erkrankung kann bei verschiedenen Personen unterschiedlich sein. Beispielsweise wurde in dem Gen für α -Synuclein (*SNCA*), in dem eine Missense-Variante als Auslöser einer monogenen familiären Parkinsonerkrankung identifiziert wurde (Polymeropoulos et al., 1997), später auch ein SNP (rs2736990) nachgewiesen, der eine Assoziation (OR = 1,23) zu sporadischen

Fällen der Parkinsonerkrankung zeigt (Simón-Sánchez et al., 2009). Eine weitere Ursache für eine familiäre Parkinsonerkrankung konnte in der Triplikation dieses Genes gefunden werden (Singleton et al., 2003).

Auch die pathologischen Korrelate können bei monogen und sporadisch auftretenden Formen von Erkrankungen dieselben sein. So wurden nach der Identifizierung von genetischen Varianten in *SNCA* als Auslöser für familiäre Parkinsonerkrankung (Polymeropoulos et al., 1997) Ablagerungen von α -Synuclein in den sogenannten „Lewy-Bodies“ in den Gehirnen erkrankter Personen nachgewiesen. Dieser Nachweis gelang sowohl bei Varianten-tragenden, an einer familiären Parkinsonerkrankung leidenden, als auch bei nicht-Varianten-tragenden, an einer sporadischen Parkinsonerkrankung leidenden Personen (Spillantini et al., 1997).

Von monogenen Erkrankungen sind eher wenige Menschen betroffen. So sind zum Beispiel (z.B.) Varianten im Gen für Leucine-rich-Repeat-Kinase-2 (*LRRK2*) für nur etwa 1% der sporadischen Parkinson-Fälle verantwortlich, wenn man alle Populationen gemeinsam betrachtet (Cookson et al., 2005). Warum sollte man also diese seltenen Erkrankungen erforschen, wenn doch die meisten Erkrankungen durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren bedingt sind? Als Gründe können aufgeführt werden (Kuhlenbäumer et al., 2011):

- Spezifischen Mutationen, die monogene Erkrankungen auslösen sind in manchen Populationen nicht so gering, z.B. Mutationen in *LRRK2* bei an Parkinson erkrankten Ashkenazi-Juden (Ozelius et al., 2006) und arabischstämmigen Nordafrikanern (Lesage et al., 2006).
- Monogene Formen einer Erkrankung können helfen, die häufigeren komplexen oder auch sporadischen Formen der gleichen Erkrankung besser zu verstehen. So wurde die Amyloid-Hypothese der Alzheimer-Krankheit hauptsächlich nach Entdeckungen von Varianten in Genen, die für monogene Formen der Erkrankung verantwortlich sind, begründet (Ertekin-Taner, 2007).
- Da sie einen starken phänotypischen Effekt haben, können monogene Erkrankungen besser in Zell- und Tiermodellen untersucht werden (Kuhlenbäumer et al., 2011).
- Zusammengenommen sind seltene monogene Erkrankungen mit einer Gesamthäufigkeit von bis zu 20/1000 nicht so selten (Schaaf et al., 2008).

- Im Hinblick auf eventuelle therapeutische Ansätze in der Zukunft ist ein besseres Verständnis der Krankheit wichtig. Dies kann durch die Identifizierung von seltenen genetischen Auslösern gelingen.

Die meisten Bemühungen neue genetische Varianten zu identifizieren, die an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind, zielen auf solche ab wie sie innerhalb des gepunkteten Balkens auf Abb. 1.1 dargestellt sind. Also seltene Varianten mit großem Effekt oder häufige Varianten mit kleinem Effekt (Manolio et al., 2009). Seltene Varianten mit kleinem Effekt sind schwer zu identifizieren (Tennessen et al., 2012) und für häufige Varianten mit starkem Effekt gibt es nur wenige Beispiele (McCarthy et al., 2008).

Bei der Identifizierung von relativ häufigen Varianten sind sogenannte genomweite Assoziationsstudien (GWAS) mit Erfolg angewendet worden. Bei diesen wird, z.B. in einer großen Gruppe von Fällen und Kontrollen, eine große Anzahl von über das gesamte Genom verteilten SNPs genotypisiert, um eine eventuelle Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp aufzudecken (Hirschhorn et al., 2005). So wurden für viele komplexe Erkrankungen, z.B. das Restless-Legs-Syndrom (Winkelmann et al., 2007), SNPs identifiziert, die das Risiko zu erkranken, beeinflussen.

Zur Identifizierung von seltenen Varianten mit großem Effekt kommen die im folgenden Kapitel beschriebenen Methoden zum Einsatz.

In der vorliegenden Ausarbeitung insgesamt geht es um die Analyse genetischer Ursachen der Parkinsonerkrankung.

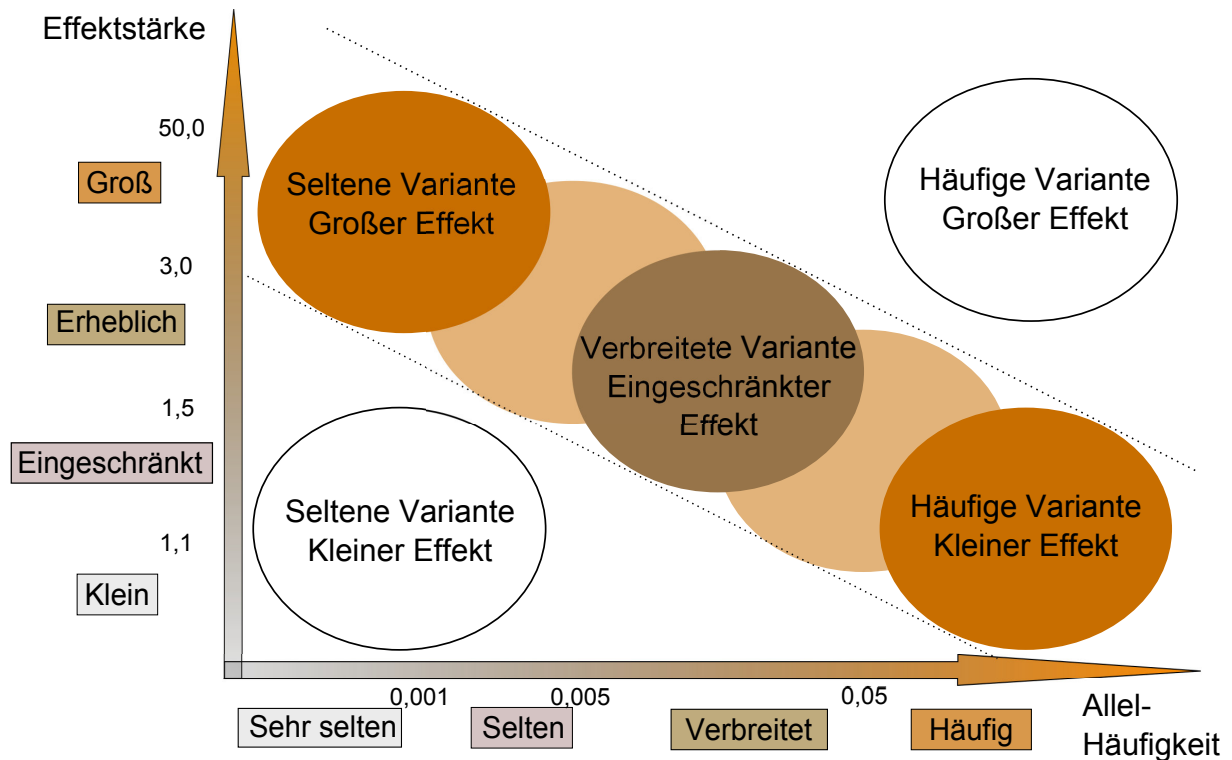


Abbildung 1.1. – Effektstärke und Allelhäufigkeit von genetischen Varianten. Nach (Manolio et al., 2009)

1.2. Identifizierung von Auslösern monogener Erkrankungen

Aus den oben diskutierten Gründen ist es sinnvoll die auslösenden genetischen Varianten von monogenen Erkrankungen zu identifizieren. Lange Zeit beschränkte sich die Möglichkeit hierzu auf die Linkage-Analyse und Kandidatengensequenzierungen. Mit der Einführung des Next-Generation-DNA-Sequencing (NGS) etablierte sich eine neue Methode (Kuhlenbäumer et al., 2011). Diese Methoden - mit den sich daraus ergebenden Vor- und Nachteilen - werden in den nachfolgenden 3 Kapiteln kurz beschrieben.

1.2.1. Linkage-Analysen

Bei der Linkage-Analyse wurden früher DNA-Marker, zum Beispiel sogenannte Short-Tandem-Repeats (STRs), genutzt. Diese STRs bestehen aus sich wiederholenden Di-, Tri-, oder Tetranukleotiden und weisen je nach Allel verschiedenste Längen auf. Aufgrund dieser großen Heterogenität kann in den meisten Fällen zwischen väterlichem und mütterlichem Allel unterschieden werden (Pulst, 1999).

Durch die große Anzahl an inzwischen bekannten SNPs, die ebenfalls eine sehr große Heterogenität zwischen Allelen zeigen, werden heute allerdings SNP-Arrays zur Unterscheidung der verschiedenen Allele genutzt (Matise et al., 2003). Betrachtet man zwei betroffene Familienmitglieder aus aufeinanderfolgenden Generationen, lässt sich also feststellen, auf welchem Allel sich die krankheitsauslösende Variante befinden muss. In der folgenden Generation wird nun die Rekombinationsfrequenz zwischen verschiedenen Loci betrachtet. Dabei gilt vereinfacht, dass Genabschnitte, die nah zusammen liegen – die also gekoppelt sind – während der Meiose weniger wahrscheinlich getrennt werden als Abschnitte, die weiter voneinander entfernt liegen. Wenn sich feststellen lässt, dass eine Erkrankung gemeinsam mit einem Marker „segregiert,“ zu den anderen Markern aber weniger Kopplung zeigt, so kann man daraus folgern, dass die auslösende Variante in der Nähe dieses Markers liegen muss (Pulst, 1999). Dieser Genabschnitt kann dann sequenziert und eine eventuell vorhandene Variante identifiziert werden.

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Eigenschaft tatsächlich mit einem Marker assoziiert ist, wird durch den sogenannten „Logarithm of the Odds“ (LOD)-Score angegeben. Dieser Wert ist der Logarithmus der Wahrscheinlichkeit, dass tatsächlich eine Kopplung besteht, geteilt durch die Wahrscheinlichkeit, dass keine Kopplung besteht (Morton, 1955). Bei einem LOD-Score von mindestens 3 kann von einer Kopplung ausgegangen werden, bei einem Score von höchstens -2 kann eine Kopplung relativ sicher verneint werden (Pulst, 1999).

Der Nachteil dieser Analyse ist, dass hierzu große Familien mit mehreren betroffenen Generationen nötig sind. Wegen des späten Beginns der Erkrankungen wirkt sich das besonders erschwerend auf die Analyse von neurodegenerativen Erkrankungen aus, da einerseits bei Ausbruch der Krankheit die Elterngeneration häufig schon verstorben ist und es andererseits noch lange Zeit dauern kann, bis die Generation der Kinder eventuell ebenfalls erkrankt.

1.2.2. Sequenzierungen

Eine weitere Methode zur Identifizierung von genetischen Varianten ist die direkte Sequenzierung des Genoms beziehungsweise (bzw.) des Exoms (alle für Proteine kodierenden Bereiche des Genoms). Durch den hohen Personal- und Zeitaufwand und damit auch den hohen Kosten, die damit verbunden sind große Mengen an DNA mit Hilfe der in Kapitel 3.2.3 genauer beschriebenen, schon länger verfügbaren Sanger-Sequenzierung zu

analysieren, war die Sequenzierung ganzer Genome bzw. Exome zur Variantenidentifizierung aber lange Zeit nicht praktikabel.

Diese Möglichkeit erschloss sich erst durch die in Kapitel 1.2.3 beschriebene neue Methode des NGS. Sie ermöglichte die Entdeckung von Genen, die monogenen Erkrankungen zugrunde liegen, in Fällen, in denen die alten Methoden zum Beispiel aufgrund von zu wenigen betroffenen Familienmitgliedern gescheitert waren (Bamshad et al., 2011). Hier kann es ausreichend sein nur eine betroffene Generation einer Familie zu untersuchen. Dazu werden die Genome bzw. Exome z.B. von nur zwei betroffenen Personen sequenziert und auf gemeinsame Varianten abgeglichen. Mithilfe von inzwischen umfangreichen, öffentlichen genetischen Datenbanken wie dbSNP (Sherry et al., 2001) können die infrage kommenden Varianten aufgrund ihrer Allelfrequenz weiter eingegrenzt werden. Bei weiteren Verwandten kann dann festgestellt werden, ob sie die Kandidatenvarianten ebenfalls tragen oder nicht. Diese Methode kann also auch in kleineren Familien angewendet werden (Kuhlenbäumer et al., 2011) und erleichtert so die Erforschung monogener Erkrankungen.

Die Beschränkung auf das sogenannte „Exom“ ist durch folgende Überlegungen gerechtfertigt (Bamshad et al., 2011): Erstens stören die meisten bekannten Varianten, die für monogene Erkrankungen verantwortlich sind, die Proteinkodierung (Stenson et al., 2003). Zweitens haben viele seltene Varianten in den Exons wie Missense-Varianten, Nonsense-Varianten, kurze Insertionen und Deletionen einen funktionellen Effekt auf das Protein oder schädigen seine Funktion (Kryukov et al., 2007). Und drittens ist auch noch heute die Sequenzierung des ganzen Genoms ungleich teurer und die Interpretation der Ergebnisse schwieriger. Das Exom ist also ein an funktionell beeinträchtigenden Varianten angereicherter Ausschnitt der DNA, der zur Analyse von möglicherweise monogenen Erkrankungen geeignet ist (Bamshad et al., 2011). So waren z.B. zwei verschiedene Arbeitsgruppen in der Lage durch den Einsatz von Exomsequenzierung bei zweien von der Parkinsonerkrankung betroffenen Familien eine für die Erkrankung ursächliche seltene Variante in dem Gen für Vacuolar-Protein-Sorting-35 (*VPS35*) zu identifizieren (Zimprich et al., 2011; Vilariño-Güell et al., 2011).

1.2.3. Next-Generation-Sequencing

Mit der Entwicklung des NGS, bei der im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung viele Sequenzierungsschritte parallel ablaufen und die Amplifizierung und Sequenzierung in einem Gerät geschehen, wurde die Genom- bzw. Exomsequenzierung für alltägliche wissenschaft-

liche Fragestellungen anwendbar. Ein ganzes Exom kann mit Hilfe dieser Methode in einem einzigen, mehrstündigen Durchlauf der Sequenziermaschine analysiert werden. Die Kosten sind im Vergleich zur Sangersequenzierung dadurch um vier Größenordnungen gefallen (Bamshad et al., 2011).

Beim Illumina Genome Analyzer werden dabei zunächst die zu sequenzierenden Abschnitte der DNA amplifiziert. Zur anschließenden Sequenzierung wird die DNA fragmentiert und mit Adaptoren ligiert. Diese Fragmente werden nun auf die sogenannten „Flow-Cell-Chambers“, auf denen zu den Adaptoren komplementäre Oligonukleotide angebracht sind, aufgebracht. Die einzelnen Moleküle werden nun durch „Bridge amplification“ vervielfältigt, so dass in mehreren Schritten einzelne sogenannte „Cluster“ von gleichen Molekülen entstehen, welche jeweils ca. eine Millionen Kopien enthalten. Viele tausende Reaktionen laufen dabei parallel ab. Als nächstes folgt der sogenannte „Sequencing-by-synthesis“-Schritt. Bei diesem werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide, deren 3'-OH Gruppe chemisch blockiert ist und DNA-Polymerase hinzugefügt. Nach diesem Schritt wird die Flow-Cell optisch abgetastet und das eingefügte, fluoreszierende Nukleotid in jedem „Cluster“ bestimmt. Dann wird die 3'-OH Blockade aufgehoben und ein neuer Zyklus beginnt. So entstehen viele sogenannte „Reads“ (in jedem „Cluster“ einer) welche sich in ihrer Sequenz überschneiden und jetzt anhand einer Referenzsequenz bioinformatisch in eine Reihe gebracht werden können. (Tucker et al., 2009; Mardis, 2008)

1.3. Morbus Parkinson (PD)

Erstmals beschrieben von James Parkinson im Jahre 1817 (Parkinson, 2002) bestand die klassische Symptomtrias lange aus Tremor, Rigor und Akinese (Lang et al., 1998a). Heute kommt als viertes Kardinalsymptom noch die posturale Instabilität hinzu (Hughes et al., 1992). Aber auch nicht-motorische Symptome wie Demenz spielen eine große Rolle bezüglich der Lebensqualität (Global Parkinson's Disease Survey Steering Committee, 2002) von Parkinson-Patienten. Zudem kann es zu vegetativen Symptomen wie Blasenentleerungsstörungen, Obstipation oder Blutdruckstörungen kommen (Lim et al., 2009).

1.3.1. Klinische Präsentation und Diagnose

Um die Diagnosekriterien zu vereinheitlichen, wurden die im Folgenden dargestellten UK Brain Bank Kriterien (Hughes et al., 1992) erstellt. Auch die Probanden mit PD in dieser

Arbeit wurden nach diesen Kriterien beurteilt.

- **Schritt 1: Diagnose eines Parkinson-Syndroms:**

- Bradykinesie
- plus mindestens eines der folgenden:
 - * Steifigkeit
 - * Ruhetremor (4-6Hz)
 - * Posturale Instabilität, die nicht primär aus visueller, vestibulärer, cerebellärer oder propriozeptiver Dysfunktion entsteht.

- **Schritt 2: Ausschlusskriterien für PD**

- Zustand nach wiederholten Schlaganfällen mit stufenweisem Fortschritt der Parkinson-Symptome
- Zustand nach wiederholten Kopfverletzungen
- Zustand nach gesicherter Encephalitis
- Blickkrampf
- Behandlung mit Neuroleptika bei Beginn der Symptome
- Mehr als ein ebenfalls betroffener Verwandter
- Anhaltende Remission
- Ausschließlich einseitige Präsentation nach 3 Jahren
- Supranukleäre Blickparese
- Kleinhirn Zeichen
- Frühe, starke autonome Beteiligung
- Frühe, stark ausgeprägte Demenz mit Störungen des Gedächtnisses, der Sprache und der Praxis
- Positives Babinski-Zeichen
- Darstellung eines Tumors oder Hydrocephalus (nicht okklusiv) in der Computertomographie
- Kein Ansprechen auf große Dosen Levodopa (bei Ausschluss von Malabsorption)
- Exposition gegenüber MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin)

- **Schritt 3: Unterstützende positive Kriterien zur Vorhersage der Diagnose PD (drei oder mehr zutreffend für Diagnose PD)**

- Einseitiger Beginn
- Ruhetremor vorhanden
- Fortschreiten der Krankheit
- Bleibende Asymmetrie mit stärkerer Beteiligung der Körperseite des Beginns
- Sehr gutes Ansprechen (70-100%) auf Levodopa
- Starke, Levodopa-induzierte Chorea
- Ansprechen auf Levodopa für 5 Jahre oder mehr
- Klinischer Verlauf über 10 Jahre oder mehr

Allerdings geht der diagnostizierten Erkrankung oft schon ein jahrelanges Prodromalstadium mit nicht-motorischen und motorischen Symptomen voraus. Nicht-motorische Symptome sind z.B. Geruchsstörungen, Obstipation, Depressionen und REM-Schlaf-Verhaltensstörungen (Lang, 2011). Motorische Frühsymptome sind oft mit den späteren Symptomen verwandt, wie Gangbildstörungen, Feinmotorikstörungen und einseitiges vermindertes Armschwingen (Maetzler et al., 2012).

1.3.2. Epidemiologie

Mit einer Prävalenz von ein bis zwei Prozent bei den über 60-Jährigen ist PD die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Nussbaum et al., 2003). In einigen Studien ist die Inzidenz bei Männern leicht erhöht mit einem Frau-zu-Mann-Verhältnis von 1 zu 1,1 bis 2,6 (de Lau et al., 2006).

Die Lebenserwartung für Patienten mit PD ist verkürzt (Morens et al., 1996) und das relative Risiko zu sterben ist, abhängig von der Dauer der Erkrankung, erhöht. In den ersten 5 Jahren nach der Diagnose betrug es in einer Studie 1,1 nach 5 bis 10 Jahren 2,3 und nach über 10 Jahren 3,5 (Chen et al., 2006).

1.3.3. Pathologie

Pathologisch geht PD mit einem Verlust von mehreren spezifischen Neuronenpopulationen einher. Aminerge Hirnstammkerne, der Nucleus basalis Meynert (cholinerg), kleine kortikale Neurone, Neurone im Bulbus olfactorius und sympathische und parasympathische Neurone im Magen-Darm-Trakt sind betroffen (Lang et al., 1998a). Besondere Bedeutung kommt dem Verlust der neuromelanin-haltigen dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta zu. Die hieraus resultierende Minderversorgung des Striatums mit Dopamin führt zu den klassischen, motorischen Symptomen Akinese und Rigor (Lang et al., 1998a). Pathophysiologisch kommt es durch den Mangel an Dopamin zu einer verstärkten Aktivität des GABAergen, inhibitorisch auf den Thalamus wirkenden Kerns der Basalganglien, dem Globus pallidus internus. Dies geschieht durch mindestens zwei Mechanismen:

- Verminderte Aktivität der direkten, inhibierenden neuronalen Verbindung des Striatums zum Globus pallidus internus (über D1-Rezeptoren werden diese Neurone beim Gesunden aktiviert) (direkter Pathway).

- Verstärkte Aktivität der indirekten, exzitatorischen Verbindung über den Globus pallidus externus und Nucleus subthalamicus zum Globus pallidus internus (über D2-Rezeptoren werden diese Neurone beim Gesunden gehemmt) (indirekter Pathway).

Die daraus resultierende verstärkte Aktivität des Globus pallidus internus führt zu einer Inhibierung des Thalamus und dadurch zu einer Hemmung des motorischen Kortex (Lang et al., 1998b).

Neuropathologische Korrelate sind die sogenannten Lewy-Neurite, ubiquitinylierte neurale Fortsätze, die sich in allen betroffenen Hirnstammregionen finden und die etwa bei Vorkommen im Cornu ammonis 2 des Hippocampus und vorhandener Demenz mit dem Ausmaß der kognitiven Beeinträchtigung in Zusammenhang stehen (Churchyard et al., 1997). Desweiteren gibt es intrazelluläre Einschlüsse, die sogenannten Lewy-Körper, die hauptsächlich aus Alpha-Synuclein-Neurofilamenten und Ubiquitin bestehen (Spillantini et al., 1997; Kuzuhara et al., 1988). Die Ursache des Zelluntergangs ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Mitochondriale Dysfunktion (Ottolini et al., 2013; Okatsu et al., 2012) und oxidativer Stress (Andres-Mateos et al., 2007) scheinen beteiligt zu sein, aber auch über Toxine (Castello et al., 2007; Langston et al., 1983), neuroinflammatorische Faktoren (Lastres-Becker et al., 2012; L'Episcopo et al., 2012) und Effekte von α -Synuclein (Spillantini et al., 1997; Olanow et al., 2013) wird diskutiert.

Die Schwere der Krankheit bzw. deren Fortschritt korreliert mit dem Vorhandensein von pathologischen Läsionen in verschiedenen Hirnregionen (Braak et al., 2003). Diese Läsionen dehnen sich von kaudal nach rostral aus. Die Braak-Stadien beschreiben dieses Fortschreiten und haben 6 Stufen. Im Stadium 1 ist die Medulla oblongata betroffen, im Stadium 2 zusätzlich das Tegmentum pontis. In diesen Stadien sind noch keine Motorsymptome, möglicherweise aber andere Frühsymptome wie Anosmie oder gastrointestinale Störungen vorhanden. Im Stadium 3 ist zusätzlich das Mesencephalon betroffen, insbesondere die Substantia nigra pars compacta und im Stadium 4 zusätzlich untere Teile des Prosencephalons. In den Stadien 5 und 6 finden sich Läsionen auch im Telencephalon, zum Beispiel im präfrontalen Kortex oder teilweise im primär-motorischen Cortex (Braak et al., 2003). Weitere Untersuchungen zeigten auch eine sehr frühe Beteiligung des enterischen Nervensystems im Gastrointestinaltrakt (GIT) sowie des sympathischen Nervensystems und des Myelons (Braak et al., 2008), sodass sogar über einen Beginn der Erkrankung

im GIT und einem folgenden Aufstieg über den Nervus vagus und schließlich in immer höhere Hirnregionen diskutiert wird (Hawkes et al., 2009).

Der Untergang der einzelnen Neurone geht vermutlich von den Axonen aus (Burke et al., 2012). Dies ergibt sich beispielsweise daraus, dass einige Studien zeigen, dass bei Beginn der Symptome der Verlust von Dopamin im Putamen größer ist (Scherman et al., 1989; Riederer et al., 1976; Lee et al., 2000; Tissingh et al., 1998) als der Neuronenverlust in der Substantia nigra pars compacta (Greffard et al., 2006; Ma et al., 1997; Fearnley et al., 1991).

1.3.4. Therapeutische Möglichkeiten

Mit Dopamin bzw. dessen Blut-Hirn-Schranke-gängiger Vorstufe Levodopa und mit Dopaminagonisten sind, vor allem zu Beginn der Erkrankung, gut wirksame Medikamente vorhanden (Goetz et al., 2014). Auch operative Verfahren wie die Tiefen-Hirn-Stimulation erzielen in manchen Fällen gute Ergebnisse (Lang et al., 1998b).

Bei älteren oder kognitiv auffälligen Patienten kann die Therapie direkt mit Levodopa begonnen werden (Fuhr et al., 2013), da hier weniger Nebenwirkungen beobachtet werden (Jann, 2011). Bei jüngeren, kognitiv unauffälligen Patienten kann auch mit einem Dopaminagonisten oder mit MAO-B-Hemmern begonnen werden. Davon erhofft man sich eine Verzögerung des Eintritts von Dyskinesien (Jann, 2011).

Für eine Tiefen-Hirn-Stimulation kommen Patienten mit PD in Frage, die mit medikamentöser Therapie nicht zufriedenstellend behandelt werden können. Sie sollten aber nicht zu alt sein (<75 Jahre), keine Demenz oder andere, unkontrollierte psychiatrische Erkrankung haben und sollten prinzipiell ein gutes Ansprechen auf Levodopa zeigen (Fuhr et al., 2013). Die beiden häufigsten Stimulationsorte sind der Nucleus subthalamicus und der Globus pallidus internus und sie bringen vergleichbare Resultate (Follett et al., 2010).

Diese Therapien sind aber rein symptomatisch. Neuroprotektive Therapien, die den Ausbruch der Krankheit verhindern oder deren Fortschreiten aufhalten könnten, existieren derzeit noch nicht. Allerdings gibt es verschiedene Ansätze einen protektiven Effekt zu finden. Substanzen, die in laufenden Studien untersucht werden sind unter anderem Glutathion, Nikotin, Pioglitazon und der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF) (Goetz et al., 2014). Auch Versuche zu Zellersatztherapien konnten teilweise vielversprechende Ergebnisse zeigen (Piccini et al., 1999), allerdings waren in anderen Untersuchungen die Effekte nur gering und es kam zu Nebenwirkungen wie Dyskinesien (Freed et

al., 2001; Olanow et al., 2013). Um neue protektive oder regenerative Therapieformen entwickeln zu können, ist die Erforschung der molekularen Mechanismen wichtig, die der Krankheit zugrunde liegen. Durch die im nächsten Kapitel dargestellten Entdeckungen genetischer Formen von Parkinson war die Genetik in den letzten Jahren hierbei besonders erfolgreich (Gasser, 2009).

1.4. Genetische Formen der Parkinsonerkrankung

Eine positive Familienanamnese ist außer dem Lebensalter der stärkste Indikator eines erhöhten Risikos (OR = 5,49) für PD (Semchuk et al., 1993). Bis zu 20% der PD Patienten berichten über weitere an PD erkrankte Familienmitglieder (Payami et al., 1994; Bonifati et al., 1995). Wie in Tabelle 1.1 dargestellt, gibt es mehrere Gene mit Varianten, die mendelisch vererbtes Parkinson auslösen können. Sie werden teilweise dominant und teilweise rezessiv vererbt. Die meisten von ihnen wurden in großen Familien mittels Linkage-Analysen identifiziert. Erst in jüngerer Zeit konnten durch den Einsatz von Exomsequenzierung auch Varianten in kleineren Familien identifiziert werden (siehe Kapitel 1.2.2 Sequenzierungen).

Teilweise in den gleichen Genen, und teilweise in bis dahin nicht mit Parkinson assoziierten Genen, konnten in GWAS viele Varianten nachgewiesen werden, die zwar alleine nicht zwangsläufig ein Parkinson-Syndrom auslösen, aber das Risiko, daran zu erkranken, verändern (Gasser et al., 2011). So beträgt das OR für eine Variante in *SNCA* (rs2736990) 1,23 und das OR für eine Variante im Gen für Microtubule-associated-Protein-Tau (*MAPT*) 0,77 (Simón-Sánchez et al., 2009). Ein neu identifizierter Locus mit Assoziation ist z.B. *PARK16* mit dem SNP rs823128 und einem OR = 0,66 (Simón-Sánchez et al., 2009).

Tabelle 1.1. – Monogene Formen der Parkinson-Krankheit

Gen	Vererbung	Funktion/Pathologie	Methode	Publikation
<i>SNCA</i>	dominant	Teil der Lewy-Körper	Linkage Analyse	(Polymeropoulos et al., 1997)
<i>LRRK2</i>	dominant	Proteinkinase	Linkage Analyse	(Zimprich et al., 2004)
<i>PARK2</i>	rezessiv	Mitophagie	Linkage Analyse	(Kitada et al., 1998)
<i>PINK1</i>	rezessiv	Mitophagie	Linkage Analyse	(Valente et al., 2004)
<i>DJ-1</i>	rezessiv	Antioxidans	Linkage Analyse	(Bonifati et al., 2003)
<i>VPS35</i>	dominant	Retromer-Komplex	Exomsequenzierung	(Zimprich et al., 2011) und (Vilariño-Güell et al., 2011)

Durch die Identifizierung von Varianten in diesen Genen, die eine familiäre Parkinsonerkrankung auslösen können, wurden auch große Fortschritte in der Erklärung der Pathoge-

nese von PD erzielt (Gasser et al., 2011). So wurde kurz nach der Entdeckung der ersten *SNCA* Varianten festgestellt, dass das von diesem Gen kodierte Protein, α -Synuclein, der Hauptbestandteil der Lewy-Körper ist (Spillantini et al., 1997). Eine weitere Bestätigung, dass dieses Protein auch an der Entstehung von PD beteiligt ist, lieferte die in einer GWAS gefundene, oben erwähnte Assoziation zwischen dem *SNCA*-Locus (rs2736990) und der Erkrankung an PD (Simón-Sánchez et al., 2009).

Varianten in *Parkin* und *PINK1* lösen rezessive Formen der familiären Parkinsonerkrankung aus. Die Proteine dieser Gene sorgen für die regelrechte Entsorgung geschädigter Mitochondrien (Narendra et al., 2008; Clark et al., 2006) und schützen vor oxidativem Stress (*PINK1*) (Narendra et al., 2008). Durch die Identifizierung dieser Varianten als Auslöser der Erkrankung rückten die oben genannten Proteine, Zellorganellen und Stoffwechselwege in den Fokus der Erforschung der Pathogenese der Erkrankung und der Suche nach möglichen Therapien.

Der durch die bisher beschriebenen Varianten erklärte Anteil an familiären Parkinsonerkrankungen wird auf höchstens 20% bis 30% geschätzt (Gasser et al., 2011) und reicht noch nicht aus, um die beschriebenen familiären Häufungen zu erklären. So wird die Heritabilität, also der Anteil an der Erkrankungsveranlagung, der durch Genetik zu erklären ist, auch nach Ausschluss aller bekannten Mutationen und Risikovarianten auf 0,4 geschätzt (Hamza et al., 2010). Es ist also davon auszugehen, dass noch weitere häufige und seltene, bisher unentdeckte genetische Varianten existieren, die die familiäre Parkinsonerkrankung auslösen oder die Erkrankung an PD begünstigen.

Es bleibt zu bemerken, dass sich gezeigt hat, dass einige bisher entdeckte Varianten, die zwar zu einer monogenen Form des Parkinson-Syndroms führen, dadurch auffallen, dass deren Penetranz relativ gering ist (zum Beispiel 51% im Alter von 69 Jahren für die Variante p.Gly2019Ser in *LRRK2*) (Healy et al., 2008).

2. Fragestellung

Eine positive Familienanamnese ist außer dem Lebensalter der stärkste Indikator eines erhöhten Risikos für PD, doch die bis heute beschriebenen genetischen Varianten reichen nicht aus, um den potentiell durch Genetik verursachten Teil der Parkinsonerkrankungen zu erklären.

Um in diesem Bereich weitere genetische Veränderungen zu identifizieren, wird eine Patientin untersucht, die an PD mit spätem Erkrankungsbeginn leidet und deren Mutter und Tante ebenfalls an PD erkrankt waren, sowie ein, auch an PD erkrankter, Cousin 2. Grades dieser Indexpatientin. Die Erkrankung scheint in der Familie in einem dominanten Vererbungsmodus weitergegeben zu werden.

Durch eine Analyse mittels Exomsequenzierung soll eine möglicherweise für die Erkrankung verantwortliche genetische Variante identifiziert werden.

Desweiteren soll das eventuell verantwortliche Gen in einer Gruppe von PD-Patienten und in einer Kontrollgruppe mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalyse auf weitere Varianten hin untersucht werden. Die dabei identifizierten Varianten werden mittels in-silico Prädiktionsalgorithmen auf ihre mögliche Pathogenität untersucht und mittels statistischer Analysen auf eine Assoziation zu PD überprüft, um so eine mögliche Beteiligung dieses Gens auch in weiteren sporadischen PD-Fällen zu klären.

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel wird zunächst die betroffene Familie und die Auswahl und Zusammensetzung von Kontrollgruppe und Parkinson-Patientenkollektiv beschrieben (Kapitel 3.1). Es folgen die Darstellungen der Untersuchungsmethoden und verwendeten Geräte und Reagenzien zur Analyse des gewonnenen DNA-Materials (Kapitel 3.2) sowie der statistischen Techniken zur Auswertung der Ergebnisse (Kapitel 3.3). Zuletzt wird noch auf die computergestützte Analyse von genetischen Varianten eingegangen (Kapitel 3.4).

3.1. Untersuchte Familie, Kontrollgruppe und Parkinson-Patientenkollektiv

In der untersuchten Familie wurde zunächst nach einem Kandidatengen gefahndet, welches möglicherweise ursächlich für die Parkinsonerkrankung ist. Anschließend wurde es in den weiter unten beschriebenen Fall- und Kontrollpopulationen weiter untersucht.

3.1.1. Beschreibung der untersuchten Familie

Abbildung 3.1. – Stammbaum der Familie

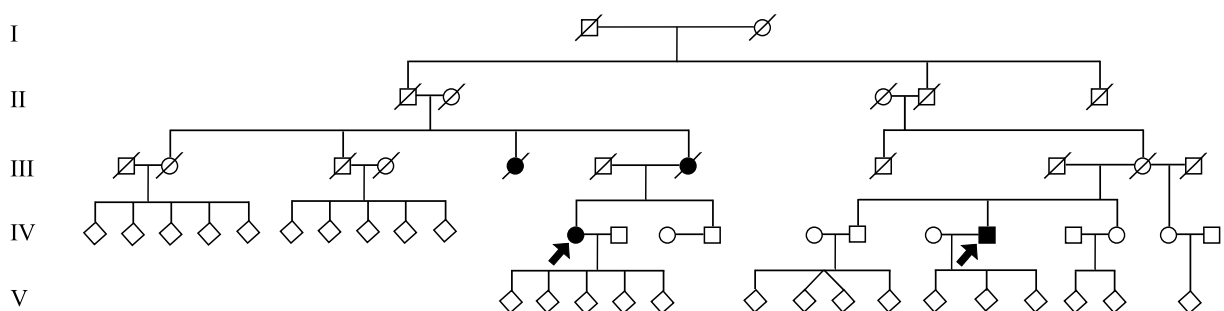


Abb. 3.1 zeigt den Stammbaum der von uns untersuchten Familie. Die Index-Patientin IV:11 leidet an PD mit spätem Erkrankungsbeginn (Erkrankungsbeginn: 60 Jahre, Dauer der Erkrankung: 15 Jahre). Ebenso ihr Cousin 2ten Grades IV:18 (Erkrankungsbeginn: 67

Jahre, Dauer der Erkrankung: 5 Jahre). Bei der genauen Untersuchung fiel eine tremor-dominante und Levodopa-responsive Parkinsonerkrankung auf, beide Patienten klagten über subjektive kognitive Einschränkungen. Bei IV:11 und einem ihrer Kinder besteht zusätzlich ein Restless-Legs-Syndrom. Transkranieller Ultraschall zeigte eine Hyperechogenität in der Substantia nigra von IV:18, wurde aber bei IV:11 nicht durchgeführt. Aus medizinischen und familiären Aufzeichnungen lässt sich auch bei der bereits verstorbenen Mutter von IV:11 und einer ebenfalls verstorbenen Tante die Erkrankung feststellen. Da sie bereits verstorben waren, konnte von ihnen keine DNA gewonnen werden. Eine weitere Tante von IV:11 litt an einer nicht weiter klassifizierten Demenz (Schulte et al., 2013).

Die Patienten wurden in der auf Bewegungsstörungen spezialisierten Paracelsus-Elena-Klinik in Kassel rekrutiert und mehrfach von Neurologen untersucht.

3.1.2. KORA Allgemeinbevölkerungskohorte

Die „Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg“ (KORA)-Kohorte besteht aus Bewohnern der Region Augsburg (Wichmann et al., 2005). Es handelt sich um eine Allgemeinbevölkerungskohorte, das heißt, in ihr befinden sich auch Personen, die an den verschiedensten Erkrankungen leiden, die in der Allgemeinbevölkerung vorkommen. Die in dieser Arbeit untersuchte KORA-Age-Kohorte ist eine Subgruppe daraus und besteht aus Personen, die vor 1944 geboren wurden. Alle Personen, die angegeben hatten dopaminerge Medikamente zu nehmen, wurden zusätzlich ausgeschlossen. Demographisch ist diese Gruppe $76,0 \pm 6,6$ Jahre und zu 50,1% weiblich (Wichmann et al., 2005).

3.1.3. Parkinson-Patientenkollektiv

Die Parkinsonpatienten kommen aus Deutschland, rekrutiert und untersucht von Oberärzten der Paracelsus-Elena Klinik Kassel und aus Österreich, untersucht und rekrutiert von neurologischen Fachärzten des Wilhelminenspitals und des Allgemeinen Krankenhauses in Wien. Demographisch handelt es sich um 376 deutsche ($71,1 \pm 9,4$ Jahre; 31,6% weiblich) und 486 österreichische ($58,7 \pm 11,3$ Jahre; 35,4% weiblich) Patienten, zusammen also 862 ($64,1 \pm 10,5$ Jahre; 33,7% weiblich) (Zimprich et al., 2011; Schulte et al., 2012). Die Parkinson-Diagnosen wurden in Übereinstimmung mit den UK Brain Bank Kriterien (Hughes et al., 1992) (siehe Kapitel 1.3.1) gestellt.

3.2. DNA-Analysetechniken

In den folgenden Kapiteln werden die von mir angewandten DNA-Analysetechniken beschrieben.

3.2.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase chain reaction, PCR)

Die Erfindung der PCR durch Mullis hat die Molekularbiologie revolutioniert. Seitdem ist es möglich, bestimmte, interessierende DNA zu vervielfältigen und so zu untersuchen. Bei der PCR dienen zwei Oligonukleotide als sogenannte Primer, sie flankieren den Abschnitt der DNA, der vervielfältigt werden soll. Sie werden speziell für den jeweiligen Abschnitt synthetisiert und (in großer Anzahl) zu der DNA hinzugegeben. Des Weiteren enthält der Ansatz eine thermostabile DNA-Polymerase und die Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) der Moleküle Adenosin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanosin (G). Damit die Polymerase schnell und fehlerarm arbeiten kann, werden noch ideale pH-Werte und Elektrolytkonzentrationen eingestellt.

Nun wird der gesamte Ansatz erhitzt (Denaturierung). Die DNA wird dadurch geschmolzen und liegt jetzt einzelsträngig vor. Dann wird die Mischung wieder abgekühlt. Aufgrund der kürzeren Länge der Primer und deren zahlenmäßiger Überlegenheit lagern sich diese als erste den einzelnen DNA-Strängen an (Annealing). Als letztes folgt der Synthese-Schritt: die Polymerase synthetisiert nun einen zu den einzelnen Strängen komplementären Partnerstrang (Elongation). Die DNA-Moleküle liegen jetzt in doppelter Ausführung vor. Durch Wiederholung der Schritte wächst die Menge an DNA-Kopien exponentiell an (Mullis et al., 1987; Saiki et al., 1988).

Zur Beurteilung der Güte der bei der PCR entstandenen DNA-Moleküle werden diese elektrophoretisch aufgetrennt. So lässt sich beurteilen, ob die durch die PCR entstandenen DNA-Produkte gleichartig sind. Hierzu wird 1,5% Agarose in TBE-Puffer (Tris/Borate/EDTA) gelöst und der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid hinzugefügt. Durch das dabei entstehende Gel wird 30 min lang eine elektrische Spannung von 120 Volt gelegt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle „wandern“ so durch das Gel in Richtung Anode und trennen sich der Größe nach auf. Das Ergebnis kann anschließend unter UV-Licht betrachtet werden.

Tabelle 3.1 zeigt den von uns verwendeten Basisansatz zur PCR-Analyse. Die dabei verwendeten Materialien und Geräte sind in Tabelle 3.9 aufgeführt und Tabelle 3.2 zeigt das Standard PCR-Programm.

Tabelle 3.1. – PCR-Basisansatz

Inhalt	Menge
H ₂ O	12,5 μ l
10xPuffer	2 μ l
dNTP-Mix (2mM)	2 μ l
MgCl ₂ (25mM)	2 μ l
Taq-Polymerase	0,2 μ l
Primer F (10pmol/ μ l)	0,4 μ l
Primer R (10pmol/ μ l)	0,4 μ l
DNA (50ng/ μ l)	0,5 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Tabelle 3.2. – Touchdown-PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	10min	
95°C	30sek	25 Zyklen
70°C (-0,5°C pro Zyklus)	30sek	
72°C	30sek	
95°C	30sek	25 Zyklen
54°C	30sek	
72°C	30sek	
72°C	10min	
94°C	30sek	
25°C	30sek	

Die zur PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 3.3 beschrieben. Bis auf das nicht kodierende erste Exon von *PLXNA4* wurden sämtliche Exons und, um etwaige splice-site Varianten zu erfassen, auch die direkt an die Exons angrenzenden intronischen Bereiche, analysiert.

Um eine möglichst gute Analyse durch den LightScanner (siehe Kapitel 3.2.2) zu gewährleisten, musste das verhältnismäßig lange zweite Exon auf drei Produkte aufgeteilt werden. Die Primer wurden mit Hilfe von ExonPrimer designed und durch die Metabion international AG, Martinsried hergestellt.

Tabelle 3.3. – Primer Exons *PLXNA4*

Exon	Richtung	Sequenz	Produktlänge
2.1	F	5'-CTG AGG GGA CGA CTG TGC-3'	504 Bp
	R	5'-CCC CAG CTT GAA GAG GTC-3'	
2.2	F	5'-CAA TGT CAA CAA GAT GCT CCT C-3'	515 Bp
	R	5'-AAA GCC TCA CGA GCT TGG-3'	
2.3	F	5'-TGT CTA TGG TTT TAG CAG TGG C-3'	521 Bp
	R	5'-TAC AGG CTG GGG TTC TCA TC-3'	
3	F	5'-CTC TGC CAA TTT CCT TGA CG-3'	306 Bp
	R	5'-GAT AAC ATC CAG CCC AGG AG-3'	
4	F	5'-CTT TGG CTG AAG TTT GGC TG-3'	272 Bp
	R	5'-GTT TGT ACT GAG CCA CAG GC-3'	
5	F	5'-CTC TTC TGG TAC ACT GCT GGG-3'	224 Bp
	R	5'-GGA AGG GAA TTA CCA GGA GG-3'	
6	F	5'-CCC TCC CTG GAC CAA GC-3'	236 Bp
	R	5'-GAG GGG AGA GTT TTC CTT GC-3'	
7	F	5'-TGT CCT TTT CCC ATT TCA CC-3'	286 Bp
	R	5'-CCC CAC ATC TGT CCT GAG-3'	
8	F	5'-GCA GGT GTC ACT GGT CAG G-3'	231 Bp
	R	5'-TTT GGA TGA AAC TTG ACC CC-3'	
9	F	5'-GAC TCA AGC CCT CTG CTT TG-3'	238 Bp
	R	5'-CTG TGT CCC ATG CTC ACA AC-3'	
10	F	5'-AAC ATC CGG GTT ATG TCT GC-3'	339 Bp
	R	5'-AGT GAT GTG GGT GGG ACT G-3'	
11	F	5'-GCC GTA GGC TGA TCA TTT G-3'	234 Bp
	R	5'-CTC TCT ACC CCA TCC CTT CC-3'	
12	F	5'-CTG TCC CCA CTG CCA TTC-3'	329 Bp
	R	5'-GCA GAG TTT CCA CAG GGT G-3'	
13	F	5'-GCC TCA TCA GCA AGT GAG TG-3'	270 Bp
	R	5'-CTA ACC CGT CTT CCC TCC-3'	
14	F	5'-AGG GTC TTG GCT GGA AGT C-3'	258 Bp
	R	5'-TCA CAG AGC TCT AGA GGG GC-3'	
15	F	5'-CAG AAG CCT CCT CCA CCC-3'	265 Bp
	R	5'-GCT ACC CTG AAG TCA TTT ACC-3' TG	
16	F	5'-GTG GGA GGG CCT TGA CTC-3'	300 Bp
	R	5'-GAG TCA GGG AAG GGA AAC AG-3'	
17	F	5'-CAC TGT CCT TAT TGT CAT AGC TCA G-3'	271 Bp
	R	5'-TAC TTG GGA AGA CCC ACA CC-3'	
18	F	5'-GGG CTG TGG GTA TGT GGA G-3'	373 Bp
	R	5'-GTC TGT GAC TTG AAC ACC CC-3'	
19	F	5'-AGC TGG TAG CTG TGG TCC TC-3'	287 Bp
	R	5'-TCT TGG AAA GCC TTG GTG G-3'	
20	F	5'-TGA TTG GTC TCC TTT CCG TC-3'	464 Bp
	R	5'-CCA GCC TGC TTG TTT GTA TAT G-3'	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Primer <i>PLXNA4</i> Fortsetzung			
Exon	Richtung	Sequenz	Produktlänge
21	F	5'-GAG ATG GAG GTG ACT CCT GG-3'	281 Bp
	R	5'-GAA AGA AGG GGC TGG ACT TG-3'	
22	F	5'-CGT GGG GAG GTC ACT GAG-3'	399 Bp
	R	5'-CTG CAA GGC ACG GTG AG-3'	
23	F	5'-CAC GGG CTC TGA CCA GC-3'	199 Bp
	R	5'-ATC CCC AGT CAG GCT GC-3'	
24	F	5'-CTT TGG AGA AGC AGG GAC TG-3'	286 Bp
	R	5'-AGG GCT ACC CAG GAT GGA AG-3'	
25	F	5'-AGG AGC TTT TCC TGC TAC CC-3'	284 Bp
	R	5'-GAC AGG AGA AGG TGA GGT GTG-3'	
26	F	5'-CTT CCC CAC AAG AGG GGT C-3'	239 Bp
	R	5'-CCT GTT ATT CCA GGG CAA TG-3'	
27	F	5'-ATT TCC TGG AGT GGC AGA GC-3'	213 Bp
	R	5'-TGA CAA CAG CTG CTC AGG AC-3'	
28	F	5'-AGC AAG GGA TGC ATG GTA AG-3'	325 Bp
	R	5'-TGA AGT CCC TCT CCA TAG CC-3'	
29	F	5'-CAG GTT TTA AAA GCC ATC CTC-3'	310 Bp
	R	5'-TCC CAC CAC CAT TAA CTT GAG-3'	
30	F	5'-CCT ACC CAC ACC ACA GCC-3'	352 Bp
	R	5'-GGA GGG GAC CTT TTG TTG AG-3'	
31	F	5'-CAT CCA TCT CTC CTC TAC TCC G-3'	282 Bp
	R	5'-CAT GCA GGG TTG TCT TCA TTC-3'	
32	F	5'-CAT CCA CAC CAT CTT TGT GC-3'	236 Bp
	R	5'-TAG ACT GAG GCA CGG CTT G-3'	

F=Forward, R=Reverse, Bp=Basenpaare

3.2.2. Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (Idaho LightScanner)

Die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse macht sich die komplexen Schmelzeigenschaften der DNA zunutze. Da Guanin und Cytosin in gegenüberliegenden DNA-Strängen über drei Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind und Adenosin und Thymin nur über zwei, schmelzen die beiden erstgenannten Basen erst bei höheren Temperaturen auseinander (Mandel et al., 1968). Ein weiterer Aspekt ist die Verwendung von speziellen mit der DNA interkalierenden Farbstoffen (Wittwer et al., 2003). Diese binden besonders an doppelsträngiger DNA und fluoreszieren in diesem gebundenen Zustand stark. Sobald die DNA einzelsträngig vorliegt, wird die Bindung schwach und die Fluoreszenz nimmt deutlich ab (Higuchi et al., 1992; Gudnason et al., 2007). Aus diesen beiden Tatsachen ergibt

sich die Konsequenz, dass verschiedene Basensequenzen eine unterschiedliche Abnahme der Fluoreszenz bei langsamen Erhitzen zeigen (Wittwer et al., 2003).

Ausgangspunkt für die Analyse waren durch PCR vervielfältigte und mit dem Farbstoff LCGreen versetzte DNA-Moleküle. In dem von uns verwendeten Idaho-Technology-LightScanner HR384 wurde bei allen untersuchten DNAs konstant während der Erhitzung die Fluoreszenz gemessen. Anschliessend wurde die Abnahme der Fluoreszenz über dem Temperaturanstieg mit Hilfe der LightScanner-Software with call-IT grafisch dargestellt. Jetzt wurden die Schmelzkurven optisch, manuell ausgewertet. Bei diesem Schritt auffällige DNAs wurden für die weitere Analyse ausgewählt und anschließend zur Bestimmung der zugrundeliegenden DNA-Veränderung Sanger-sequenziert.

Die Analyse im LightScanner wurde in 384-Well-Platten durchgeführt. Da zur sichereren und besseren Auswertung die DNA jedes Probanden zweimal nebeneinander bearbeitet wurde und jeweils 4 Negativ-Kontrollen auf einer Platte vorhanden waren, konnten 188 verschiedene DNAs pro Platte untersucht werden. Von jeder auffälligen Schmelzkurvenform wurde die DNA eines Pärchens sequenziert, sowie zusätzlich zur Kontrolle die DNA eines Pärchens, das eine unauffällige Schmelzkurve zeigte.

In Tabelle 3.4 ist der PCR-Ansatz zur Vervielfältigung der DNA dargestellt. Hierfür wurden ebenfalls die in Tab 3.3 beschriebenen Primer verwendet. Falls das sofortige Zufügen des LCGreen-Farbstoffes in fehlerhafter PCR resultierte, wurde erst der in Tabelle 3.5 dargestellte Ansatz verwendet. Anschliessend wurde in einem extra Farbeinlagerungsschritt der Farbstoff (1:3 verdünnt und $2\mu\text{l}$ pro Ansatz) hinzugefügt und durch das Durchlaufen des in Tabelle 3.6 dargestellten Zyklus in den PCR-Maschinen in die DNA integriert.

Tabelle 3.4. – Protokoll PCR (für LightScanner)

Inhalt	Menge
H ₂ O	$3\mu\text{l}$
10xPuffer	$0,5\mu\text{l}$
dNTP-Mix (2mM)	$0,5\mu\text{l}$
MgCl ₂ (25mM)	$0,5\mu\text{l}$
LCGreen Dye	$0,25\mu\text{l}$
Taq-Polymerase	$0,05\mu\text{l}$
Primer F (10pmol/ μl)	$0,1\mu\text{l}$
Primer R (10pmol/ μl)	$0,1\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	$5\mu\text{l}$

Tabelle 3.5. – Protokoll PCR ohne LCGreen (für LightScanner)

Inhalt	Menge
H ₂ O	3,25µl
10xPuffer	0,5µl
dNTP-Mix (2mM)	0,5µl
MgCl ₂ (25mM)	0,5µl
Taq-Polymerase	0,05µl
Primer F (10pmol/µl)	0,1µl
Primer R (10pmol/µl)	0,1µl
Gesamtvolumen	5µl

Tabelle 3.6. – Farbeinlagerungsprogramm

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	20sek	7 Zyklen
55°C	30sek	
94°C	30sek	
10°C	1min	

In Abb. 3.2 ist eine analysierte Platte des 5. Exons von *PLXNA4* zu sehen, darauf zeigt sich eine einzelne auffällige Schmelzkurve eines DNA-Pärchens, sie entsprach der Variante p.Thr535Ile. In Abb. 3.3 (31. Exon von *PLXNA4*) sind mehrere auffällige Schmelzkurven zu sehen, sie zeigen einen SNP (rs75848889), der mehrfach, sowohl heterozygot als auch homozygot, vorkam sowie eine zusätzliche synonyme Variante (c.5574C>A). In Abb. 3.4 (17 Exon von *PLXNA4*) sind viele verschiedene Schmelzkurven zu sehen; dies entspricht drei SNPs (rs3734983, rs3734984 und rs3734985) in verschiedenen homo- und heterozygoten Kombinationen, sowie einer zusätzlichen Variante (p.Val1060Ile).

3. Material und Methoden

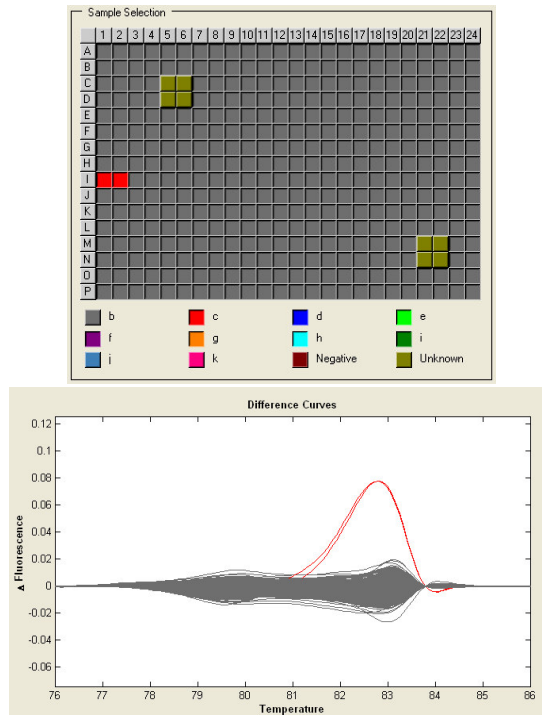


Abbildung 3.2. – Schmelzkurven von *PLXNA4* Exon 5; Rot p.Thr535Ile; Oben ist die Position des auffälligen Schmelzkurvenpaares auf der 384er-Platte zu sehen; Unten die grafische Darstellung der auffälligen Schmelzkurve

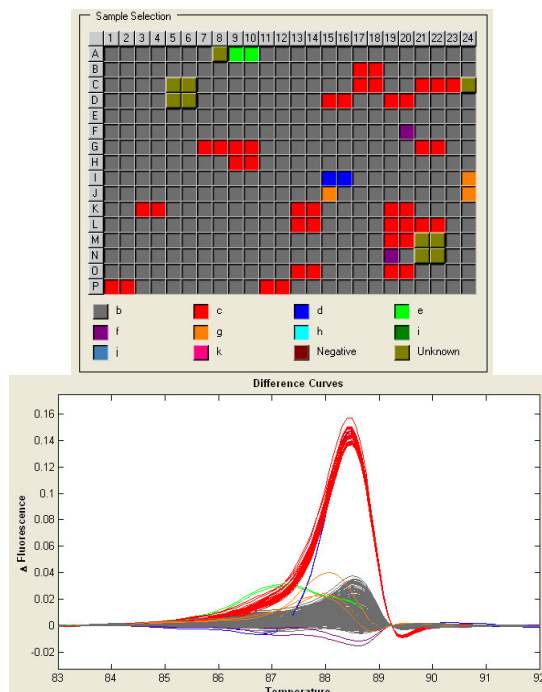


Abbildung 3.3. – Schmelzkurven von *PLXNA4* Exon 31; Rot: rs75848889 heterozygot, grün: rs75848889 homozygot, blau: c.5574C>A; Oben sind die Positionen der auffälligen Schmelzkurvenpaare auf der 384er-Platte zu sehen; Unten die grafische Darstellung der auffälligen Schmelzkurven

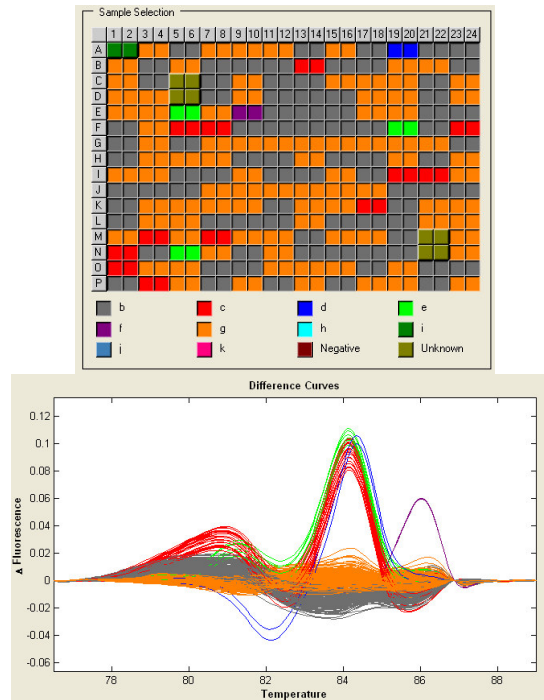


Abbildung 3.4. – Schmelzkurven von *PLXNA4* Exon 17; Orange, rot, grün, blau und grau: rs3734983, rs3734984 und rs3734985 in hetero- und homozygoten Kombinationen, lila: p.Val1060Ile; Oben sind die Positionen der auffälligen Schmelzkurvenpaare auf der 384er-Platte zu sehen; Unten die grafische Darstellung der auffälligen Schmelzkurven

3.2.3. Sanger-Sequenzierung

Vor der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte mit Hilfe von NucleoFast-Reinigungsplatten von Macherey-Nagel von überflüssigen dNTPs, Primern, ausgefallenen Salzen oder übriggebliebenem Öl gereinigt.

Die von Sanger im Jahre 1977 entwickelte Sequenzierungsmethode (Sanger et al., 1977) wird folgendermaßen durchgeführt: Eine ausreichende Anzahl gleichartiger DNA-Moleküle wird zusammen mit thermostabiler DNA-Polymerase, Primern und Nukleotiden gemischt, wobei zusätzlich zu den gewöhnlichen Nukleotiden fluoreszenzmarkierte (jedes der 4 DNA-Nukleotide in einer eigene Farbe) 2',3'-Didesoxynukleotide hinzugefügt werden. Es folgt nun eine PCR-Reaktion (siehe Kapitel 3.2.1: Polymerase-Ketten-Reaktion). Da an den 2',3'-Didesoxynukleotiden aber keine Elongation stattfinden kann, bricht die DNA-Synthese an diesem Strang ab, sobald eines dieser Moleküle eingebaut wird. So entstehen viele DNA-Moleküle in verschiedenen Längen, die je nach letzter Base nach Anregung mit einem Laser in einer anderen Farbe fluoreszieren. Von uns wurden hierzu Big-Dye-Terminator v3.1-Reagenzien von Applied Biosystems verwendet.

Zum maschinellen Lesen des entstandenen Produkts wurde dieses mittels Säulen-Filtration (Sephadex, Sigma-Aldrich) nochmals von störenden Molekülen (Polymerase, Primer, Puffer) gereinigt. Die Produkte wurden anschließend in einem AB|Hitachi 3730-DNA-Analyzer ausgelesen und mithilfe der Staden-Package-Software grafisch dargestellt und ausgewertet.

Für die PCR-Reaktion wurden dieselben Primer verwendet, wie in Tab 3.3 beschrieben. Es wird pro Ansatz (siehe Tabelle 3.7) aber nur der Primer für eine Richtung hinzugefügt. Das durchlaufene PCR-Programm ist in Tabelle 3.8 dargestellt.

Tabelle 3.7. – Ansatz Sequenzier-PCR

Zusatz	Menge
H ₂ O	1μl
5xBig Dye Sequenzier-Puffer	1,5μl
Big Dye Terminator	0,5μl
Primer (10pmol/μl l)	1μl l
PCR-Produkt	1μl l
Gesamtvolumen	5μl

Tabelle 3.8. – Sequenzier PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	1min	
96°C	10sek	35 Zyklen
50°C	5sek	
60°C	4min	
4°C	5min	

3.2.4. Segregationsanalyse

Bei der von uns durchgeführten Sanger-basierten Segregationsanalyse wird die DNA der Familienmitglieder an der interessierenden Stelle mittels der oben beschriebenen Sanger-Sequenzierung sequenziert (siehe Kapitel 3.2.3) und untersucht, welche Familienmitglieder welches Allel tragen. Es wird also untersucht welche Familienmitglieder Träger einer bestimmten identifizierten Variante sind und welche nicht. Man spricht auch von Genotypisierung mittels Sanger-Sequenzierung.

3.2.5. Geräte und Reagenzien für die PCR

Soweit nicht anders beschrieben wurde die PCR bei den oben beschriebenen Analysetechniken mit den in Tabelle 3.9 aufgeführten Reagenzien und Geräten durchgeführt.

Tabelle 3.9. – Verwendete Reagenzien und Geräte für die PCR

Funktion	Produkt
Polymerase	Thermo-Start™ <i>Taq</i> DNA Polymerase von ABgene® Ltd. Waltham, USA
Puffer	Thermo-Start High Performance PCR Buffer von ABgene® Ltd. Waltham, USA
Nukleotide	dNTP Set von Fermentas, Waltham, USA
Farbstoff	LCGreen Dye von Idaho Technology Inc. Salt Lake City, USA
PCR-Cycler	Biorad-S1000-Thermal-Cycler von Bio-Rad, Hercules, USA

3.3. Statistische Analysen

Um Aussagen darüber treffen zu können, ob beobachtete Häufigkeitsunterschiede bei der Anzahl der Variantenträger in unseren Fall- und Kontrollpopulationen nur durch Zufall entstanden sind, werden statistische Analysen durchgeführt. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf 5% festgelegt, das heißt ein p-Wert bzw. eine Wahrscheinlichkeit $<0,05$ wird als statistisch signifikant gewertet.

3.3.1. Chi-Quadrat-Test

Um zu testen, ob in zwei unterschiedlichen Stichproben (in unserem Fall Kontroll- und Fallpopulation) die relativen Häufigkeiten eines Merkmals - hier eine Variante in *PLXNA4* - aus identisch verteilten Populationen stammen, bietet sich als erstes der χ^2 -Homogenitätstest an (Weiß et al., 2005).

Die Ausgangssituation kann einfach in einer Vierfeldertafel (Tabelle 3.10) dargestellt werden:

Tabelle 3.10. – Vierfeldertafel für den χ^2 -Homogenitätstest

		Merkmal: „Parkinson“		Randsummen
		P_k =erkrankt	$\overline{P_k}$ =nicht erkrankt	
Merkmal: „Variante in <i>PLXNA4</i> “	V_n = Variantenträger	a	b	a+b
	$\overline{V_n}$ =kein Variantenträger	c	d	c+d
Randsummen		a+c	b+d	n=a+b+c+d

In unserem Fall bedeutet „Pk“ an Parkinson erkrankt zu sein und „ \overline{Pk} “ bedeutet gesund zu sein. „Vn“ bedeutet eine Variante zu tragen und „ \overline{Vn} “ bedeutet keine Varianten zu tragen. Die Häufigkeiten in den 4 Merkmalsklassen sind mit a,b,c und d gekennzeichnet.

- Unter der Nullhypothese sind die Ereignisse Pk und Vn unabhängig voneinander, es gilt also (Weiß et al., 2005):

$$H_0 : P(Pk | Vn) = P(Pk)$$

Das heißt, es ist genauso wahrscheinlich das Merkmal Pk zu tragen, wenn man Träger des Merkmals Vn ist, wie es generell wahrscheinlich ist, das Merkmal Pk zu tragen - unabhängig davon, ob man das Merkmal Vn trägt.

Übertragen auf die oben genannten Häufigkeiten in Tabelle 3.10 lautet die Nullhypothese H_0 (Weiß et al., 2005):

$$H_0 : \frac{a}{a+b} = \frac{a+c}{n}$$

Beim χ^2 -Test werden nun die beobachteten Häufigkeiten a, b, c und d mit den unter der Nullhypothese zu erwartenden Häufigkeiten nach folgender Formel verglichen (Weiß et al., 2005):

$$\frac{(\text{beobachtete Häufigkeit} - \text{erwartete Häufigkeit})^2}{\text{erwartete Häufigkeit}} = \frac{(B - E)^2}{E}$$

Die Summe dieser Quotienten ergibt die Prüfgröße χ^2 . In einem Ausdruck zusammengefasst:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^4 \frac{(B_i - E_i)^2}{E_i}$$

Unter der Verwendung der Definition „ E_i = Produkt der jeweiligen Randsummen, geteilt durch die Gesamtzahl“ (z.B. $E_1 = \frac{(a+b)(a+c)}{n}$) und übersetzt in die Bezeichnungen a, b, c, d, erhält man nach Umformung (Weiß et al., 2005):

$$\chi^2 = \frac{n \cdot (ad - bc)^2}{(a+b)(a+c)(c+d)(b+d)}$$

In dem Extremfall, dass alle beobachteten Häufigkeiten mit den erwarteten übereinstimmen wäre $\chi^2 = 0$. Allerdings sind auch kleinere Abweichungen noch mit der Null-

hypothese vereinbar. Je größer jedoch die Abweichung, desto unwahrscheinlicher wird die Nullhypothese (Weiß et al., 2005). Falls der Wert der Prüfgröße innerhalb des Intervalls $[0, \chi^2_{df;1-\alpha}]$ liegt, wird die Nullhypothese auf dem Niveau α beibehalten. Der Freiheitsgrad df ist in unserem Fall von je 2 Merkmalsausprägungen gleich 1 und das Signifikanzniveau α wurde auf 5% gesetzt. Aus der zugehörigen χ^2 -Verteilung kann der Wert $\chi^2_{1;0,95} = 3,841$ abgelesen werden.

Das bedeutet, wenn die Prüfgröße χ^2 größer als 3,841 ist, kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% davon ausgegangen werden, dass die Nullhypothese (also die Unabhängigkeit der Ereignisse) falsch ist (Weiß et al., 2005).

Voraussetzung für die Benutzung des χ^2 -Tests ist, dass jede der erwarteten Häufigkeiten ≥ 5 ist.

Ist eine dieser Bedingungen nicht erfüllt, so bietet sich als Alternative der „exakte Test nach Fisher“ an.

3.3.2. Exakter Test nach Fisher

Bei diesem Test wird die Wahrscheinlichkeit – der p-Wert – der konkreten Kontingenztafel direkt berechnet. Im Falle einer Vierfeldertafel, wie sie bei uns vorliegt, geht man wie folgt vor:

Die Merkmale der 2x2-Tabelle werden so angeordnet, dass die kleinste Häufigkeit oben links steht (also a entspricht, siehe Tabelle 3.10).

Die Wahrscheinlichkeit, dass genau diese Situation eintritt, lässt sich mit folgender Formel berechnen (Weiß et al., 2005):

$$P = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n! \cdot a! \cdot b! \cdot c! \cdot d!}$$

Ist diese Wahrscheinlichkeit alleine schon größer als α wird die Nullhypothese beibehalten (d.h., es besteht keine Abhängigkeit zwischen dem Tragen von Merkmal A und dem von Merkmal B).

Falls dies nicht zutrifft, werden weitere Vierfeldertafeln für noch extremere Situationen gebildet. Das heißt, unter Beibehaltung der Randsummen wird a immer weiter um 1 reduziert, bis $a = 0$ entspricht. Alle so errechneten Einzelwahrscheinlichkeiten werden addiert und ergeben bei einer einseitigen Fragestellung den Gesamt-p-Wert. In unserem Fall ist allerdings eine zweiseitige Fragestellung anzuwenden, da eine Variante in *PLXNA4*

nicht nur eine Risikoerhöhung, sondern auch eine Risikoerniedrigung für die Erkrankung an Parkinson bedeuten könnte. Deswegen ist hier der p-Wert noch zu verdoppeln. Ist dieser anschließend kleiner als α , wird die Nullhypothese abgelehnt (Weiß et al., 2005).

3.4. In silico Prädiktionsalgorithmen

Es gibt verschiedene bioinformatische Algorithmen, die aufgrund von strukturellen Eigenschaften der Proteine und/oder aufgrund von sequenzbasierten Vergleichen zwischen homologen Proteinen Aussagen darüber treffen, wie schädlich ein durch eine genetische Variante verursachter Aminosäurewechsel für die Funktion des Proteins ist. Die gängigen darunter sind PolyPhen2 (Adzhubei et al., 2010), MutationTaster (Schwarz et al., 2010) und SIFT (Ng et al., 2006). Alle von uns identifizierten Varianten wurden mit diesen online verfügbaren Diensten auf ihre mögliche Pathogenität getestet.

3.4.1. SIFT

SIFT (Sorting Intolerated from Tolerated) benutzt für seine Vorhersage ausschließlich Sequenz-basierte Informationen. Dabei sucht der Algorithmus erst nach homologen Proteinsequenzen und bringt diese in vergleichbare Positionen (Alignment). Nun wird für das Auftreten jeder möglichen Aminosäuresubstitution die Wahrscheinlichkeit berechnet und gegenüber der Wahrscheinlichkeit der am häufigsten beobachteten Aminosäure normalisiert. So wird ein Score (0-1) gebildet und falls eine Variante einen gewissen Schwellenwert (0,05) unterschreitet, wird sie als schädigend eingestuft (Kumar et al., 2009).

3.4.2. MutationTaster

Der Algorithmus von MutationTaster benutzt zusätzlich zu den sequenzbasierten Analysen auch solche zu strukturellen Eigenschaften der Proteine, sowie Annotationen zu bestimmten Veränderungen aus Datenbanken. Außerdem bietet er den Vorteil, dass auch synonyme und splice-site-Veränderungen analysiert werden können. Es werden die in Tabelle 3.11 dargestellten Datenquellen genutzt. Zusätzlich werden splice-site-Veränderungen über die NNsplice-Software evaluiert und eine Polyadenylations-Signal-Analyse über die polyadq-Software. Desweiteren wird eine Kozak-Konsens-Sequenz-Analyse durchgeführt und mögliche Beeinflussungen von Proteineigenschaften und die Länge des Proteins gewertet (Schwarz et al., 2010). Mithilfe dieser Daten wird eine Vorhersage über das Schädig-

gungspotential getroffen. Der zusätzlich angegebene Score (1-0) kennzeichnet die Sicherheit dieser Aussage (je näher 1, desto sicherer).

Tabelle 3.11. – Datenquellen von MutationTaster

Daten	Datenquelle
Ensembl Transcript und Gen ID (Gen Position, Transkripte, Exons, Translation)	Ensembl
Homologe Gene von Menschen und 10 anderen Spezies	Ensembl
DNA- und Aminosäuresequenzen des Menschen und anderer Spezies	Ensembl
NCBI und Gen ID, HGNC Symbol	NCBI Entrez Gene
SNPs und deren chromosomale Position	dbSNP/Ensembl
SNPs und deren zugehöriger Phenotyp	HapMap
SwissProt ID, Proteineigenschaften	SwissProt/UniProt

(Schwarz et al., 2010)

3.4.3. PolyPhen2

PolyPhen2 benutzt ebenfalls sequenzbasierte und strukturbasierte Verfahren für die Vorhersage des Schädigungspotentials. Die in Tabelle 3.12 dargestellten Charakteristika der Variante werden, wenn verfügbar, genutzt, um eine Vorhersage über deren Schädigungspotential zu treffen. Dabei wird ein Score zwischen 0 und 1 gebildet. Ist dieser $>0,85$ wird die Variante als „wahrscheinlich schädigend“ klassifiziert. Bei einem Score zwischen 0,85 und 0,15 als „möglicherweise schädigend“ und bei einem Score $<0,15$ als „nicht schädigend.“(Adzhubei et al., 2010)

Tabelle 3.12. – Von PolyPhen2 genutzte Informationen

-PSIC-Score des mutierten Allels und Unterschiede des PSIC-Score zwischen Wildtyp und Variante. (Erklärung: Der PSIC-Score berücksichtigt homologe Proteine und deren Varianz an der betrachteten Stelle.)
-Anzahl der an dieser Position beobachteten Aminosäuren beim multiplen Alignment und Kongruenz der Variante zu den beobachteten Aminosäuren. (Erklärung: Beim multiplen Alignment werden die Sequenzen von gleichen Proteinen bei verschiedenen Spezies verglichen.)
-Ähnlichkeiten zum nächsten Homolog das vom Wildtyp-Allel abweicht.
-Lage der Variante innerhalb oder außerhalb einer speziellen Proteindomäne. (Erklärung: Proteindomänen sind solche, die in der Pfam-Datenbank definiert sind.)
-Entstehung der Variante im Zusammenhang mit CpG-Transition.
-Veränderung des Volumens der Seitenkette der Aminosäure.
-B-Faktor oder Temperaturfaktor. (Erklärung: Der B-Faktor wird in kristallografischen Studien verwendet und steht mit der Toleranz gegenüber Aminosäure-Austauschen in Zusammenhang.)
-Normalisierte Oberfläche der Aminosäure. (Erklärung: Oberflächengrößen werden aus der Protein Structure Database (PDB) und dem Dictionary of Secondary Structure in Proteins (DSSP) errechnet.)
-Änderung der Ladung der Oberflächen von verborgenen Aminosäuren durch die Variante. (Adzhubei et al., 2010)

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung der betroffenen Familie

Die genauere Beschreibung der Parkinsonerkrankung der Indexpatientin und ihres Cousins sowie deren Familienanamnese und Stammbaum finden sich in Kapitel 3.1.1. Von 17 Familienmitgliedern der Generation der Indexpatientin, sowie deren Kindern und Enkeln, konnte DNA gewonnen werden. Darunter ein etwa gleichaltriger Bruder von IV:11, zwei weitere Geschwister (einer ca. 10 Jahre älter und einer ca. 10 Jahre jünger) von IV:18, sowie dessen Halbschwester.

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der durchgeführten DNA-Analysen in dieser Familie dargestellt.

4.1.1. Ergebnisse der Exomsequenzierung

Die DNA der betroffenen Familienmitglieder IV:11 und IV:18 wurde aus Lymphozyten isoliert und die Exom-Sequenzen angereichert (SureSelect Human All Exon 38 Mb bzw. 50 Mb target enrichment, Agilent) und mittels NGS sequenziert. Hierbei wurden 153.734.568 bzw. 197.684.804 Reads generiert und bei einer durchschnittlichen Abdeckung von 108,46-fach bzw. 154,13-fach eine 8-fache Abdeckung von 93,67% bzw. 94,74% erreicht (Schulte et al., 2013). Das Alignment der Sequenzen wurde mit Burrows-Wheeler-Aligner (Version 0.5.8) durchgeführt und SNVs und kleine Insertionen und Deletionen mittels SAMtools (Version 0.1.7) identifiziert. Wie in Tabelle 4.1 dargestellt wurden dabei 28.803 gemeinsame Varianten gefunden (Schulte et al., 2013). Nach dem Abgleich mit der Exomdatenbank des Helmholtz-Zentrums München (n=1.739) blieben noch 14 Varianten, die in dieser Kontrollpopulation seltener als 1% vorkamen. Eine weitere Variante hatte in der dbSNP131 Datenbank (Sherry et al., 2001) eine MAF von >5% und war somit als Kandidat einer kausalen Variante ungeeignet. Unter den übrigen 13 Varianten befanden sich 10, die die Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins veränderten (splice-site, frameshift, nonsense- und missense-Mutationen) und so als Kandidaten in Betracht gezogen wurden. In keiner

der beiden DNAs fielen Varianten auf, die sich in einem Gen befanden, das bereits in Zusammenhang mit der Entstehung des Parkinson-Syndroms gebracht wurde (Schulte et al., 2013).

Tabelle 4.1. – Durch Exomsequenzierung identifizierte Varianten

	Gemeinsame Varianten
Insgesamt	28.803
<1% in In-House Exomen (n=1.739)	14
MAF<5% in dbSNP131 (Sherry et al., 2001)	13
Nicht synonym	10

Die 10 übriggebliebenen Varianten wurden über eine Frequenzanalyse in einer Fall- und Kontrollpopulation weiter untersucht. Dies geschah bei 975 Parkinson-Patienten und 1014 Kontroll-Probanden der KORA-Age Kohorte (zum Großteil dieselben Kohorten wie in Kapitel 3.1.2: KORA und Kapitel 3.1.3: Parkinson-Patienten beschrieben) mittels Genotypisierung durch Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie (Sequenom[®] Plattform). Aufgrund ihrer Häufigkeit sowohl in den Fällen als auch in den Kontrollen erschien es bei den in Tabelle 4.2 aufgeführten sechs Varianten als unwahrscheinlich, dass sie die kausale Ursache der Parkinsonerkrankung sind:

Tabelle 4.2. – Nach Filterung verbleibende Varianten mit erhöhter Frequenz

Gensymbol	Chromosom	Variante (Transcript-ID)	Funktion	Frequenz	
				PD:KORA	dbSNP ^t
<i>ARPP21</i>	Chr3	p.Ala576Thr (uc003cga.2)	missense	9:11	
<i>PHF2</i>	Chr9	p.Ser840Asn (uc004aub.2)	missense	15:26	rs41276200
<i>SLC22A13</i>	Chr3	p.Arg16His (uc011ayn.1)	missense,3utr	20:23	rs72542450
<i>SPANXE</i>	ChrX	p.Leu42Ile (uc004fbq.2)	missense	14/7:9/15	
<i>RBM28</i>	Chr7	p.Asp300Gly (uc003vmo.2)	missense	6:5	
<i>IMPDH</i>	Chr7	p.His296Arg (uc011kol.1)	missense	6:5	rs61751223

Die Frequenzangaben zu der Variante in *SPANXE* auf dem X-Chromosom unterscheidet hetero- und homozygoten Vorkommen; ^t(Sherry et al., 2001)

In Anbetracht aller Untersuchungen blieben also folgende in Tabelle 4.3 gezeigten 4 Varianten, die als Auslöser der Parkinsonerkrankung in der betrachteten Familie in Frage kamen:

Tabelle 4.3. – Nach Filterung und Frequenzanalyse verbleibende Varianten

Gensymbol	Chromosom	Variante (Transcript-ID)	Funktion	Frequenz PD:KORA
<i>PLXNA4</i>	Chr7	p.Ser657Asn (uc003vra.3)	missense	1:0
<i>OGN</i>	Chr9	c.373_374delAA (uc004asb.3)	frameshift	1:0
<i>CPNE1</i>	Chr20	p.Ser178Thr (uc002xdg.2)	missense,5utr	1:1
<i>GOLGA4</i>	Chr3	p.Gln425Arg (uc010hgr.1)	missense	2:0

Interessant ist noch zu bemerken, dass bei beiden Probanden eine weitere nicht synonyme Variante in *PLXNA4* identifiziert werden konnte: p.Phe40Leu bei IV:11 und die sehr seltene Variante p.Arg302His bei IV:18; die Varianten sind in den ESP-Exomen (Exome Sequencing Project, 2015) mit einer Frequenz von 111/8489 (p.Phe40Leu) und 3/8597 (p.Arg302His) vorhanden, bzw. haben eine MAF von 1,3% (p.Phe40Leu) und 0,03% (p.Arg302His). Auch diese Varianten wurden auf Segregation in der Familie untersucht. Die Ergebnisse dieses Kapitels entstanden in Zusammenarbeit mit Eva Schulte.

4.1.2. Linkage-Analyse

Um den Kreis der möglichen Kandidaten weiter einzuengen, führten wir eine Linkage-Analyse durch. Hierzu wurden sechs Familienmitglieder (IV:11, IV:14, IV:16, IV:18, IV:20, IV:21, siehe Abb. 3.1) mit einem Oligonukleotid SNP Array (500K, Illumina) genotypisiert und eine parametrische Linkage-Analyse mit einem Anteil von 12.875 SNPs durchgeführt. Für Simulationen in MERLIN wurde ein Modell mit autosomal-dominanter Vererbung und einer Penetranz von 70% angenommen (Schulte et al., 2013).

Hierbei wurden 25 Regionen im Genom identifiziert, die einen LOD-Score $\geq 0,5$ zeigten (Abb. 4.1). Von den übriggebliebenen Varianten lag nur *PLXNA4* in einer dieser Regionen. Dieser gering positive LOD-Score reicht nicht aus, um von einer signifikanten Kopplung zu sprechen (siehe Kapitel 1.2.1: Linkage-Analyse), er kann aber als weiterer Hinweis für die *PLXNA4*-Variante als geeignete Kandidaten-Variante gewertet werden. So wurden auch in anderen Exom- bzw. Genomsequenzierungsstudien erfolgreich niedrig-schwellige LOD-Scores zum weiteren Filtern von Varianten eingesetzt (Johnson et al., 2010; Sobreira et al., 2010). Die Ergebnisse dieses Kapitels entstanden in Zusammenarbeit mit Darina Czamara.

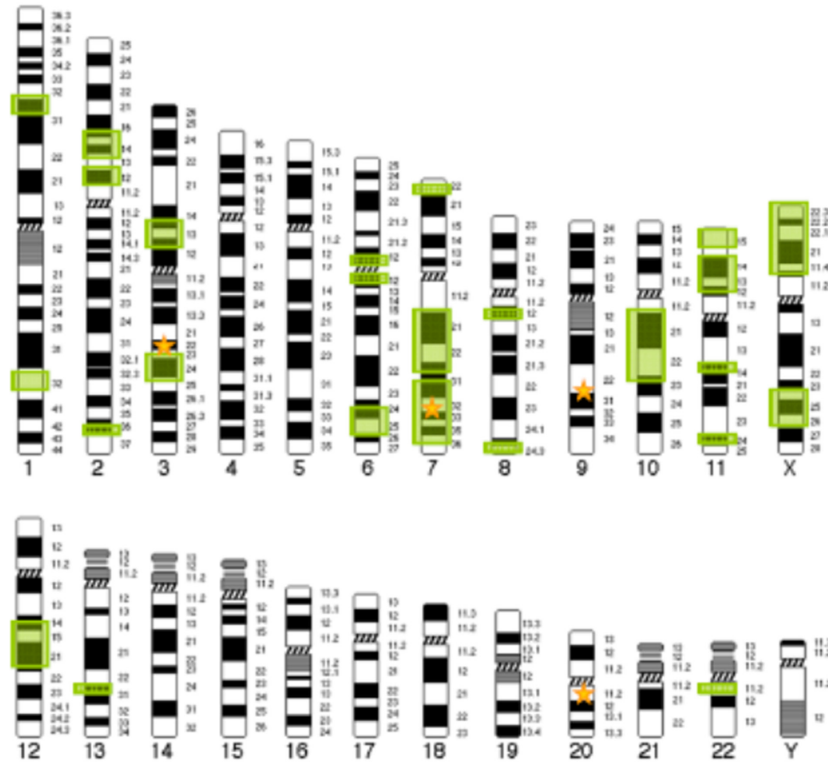


Abbildung 4.1. – Dargestellt sind die menschlichen Chromosome; Grüne Kästen zeigen Regionen mit $\text{LOD} \geq 0,5$; Sterne markieren Position der Varianten: p.Gln425Arg in *GOLGA4* auf Chromosom 3, p.Ser657Asn in *PLXNA4* auf Chromosom 7, c.373_374delAA in *OGN* auf Chromosom 9, p.Ser178Thr in *CPNE1* auf Chromosom 20; (Schulte et al., 2013)

4.1.3. Segregation der Kandidatenvarianten aus der Exomsequenzierung

Um zu evaluieren, ob das Tragen der durch die Exomsequenzierung identifizierten und in den Frequenzanalysen sehr seltenen Varianten p.Ser178Thr in *CPNE1*, p.Gly425Arg in *GOLGA4*, c.373_374delAA in *OGN* und p.Ser657Ap in *PLXNA4* und die Erkrankung an PD in der Familie segregieren, wurde DNA von 17 Personen aus der 4., 5., und 6. Generation der von uns untersuchten Familie gewonnen und durch Genotypisierung mittels Sanger-Sequenzierung analysiert.

4. Ergebnisse

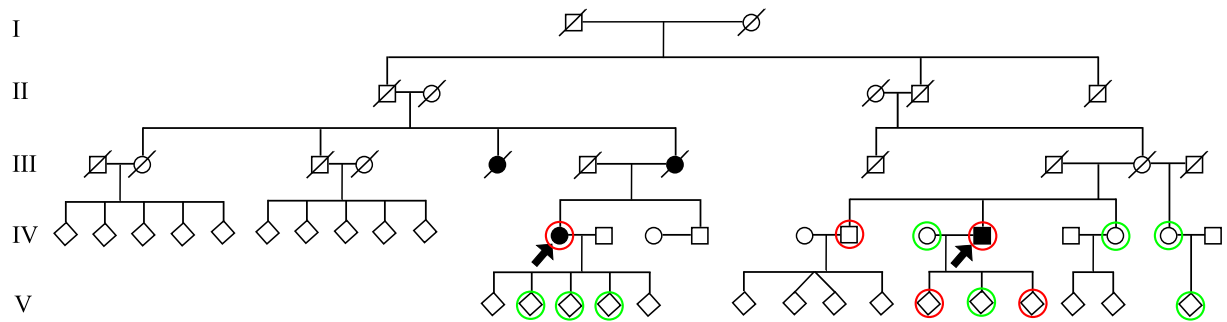


Abbildung 4.2. – Segregation der Variante p.Ser178Thr in *CPNE1*: Grün umrandet A/A (Wildtyp), rot umrandet: A/T.

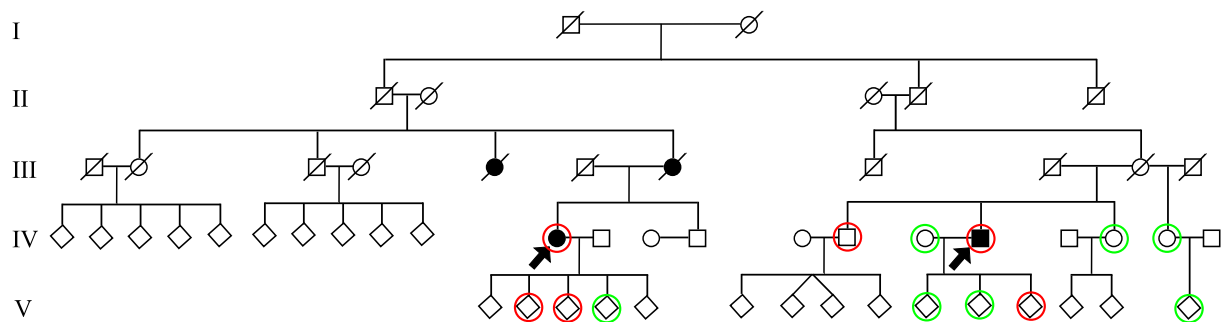


Abbildung 4.3. – Segregation der Variante p.Gly425Arg in *GOLGA4*: Grün umrandet A/A (Wildtyp), rot umrandet: A/G.

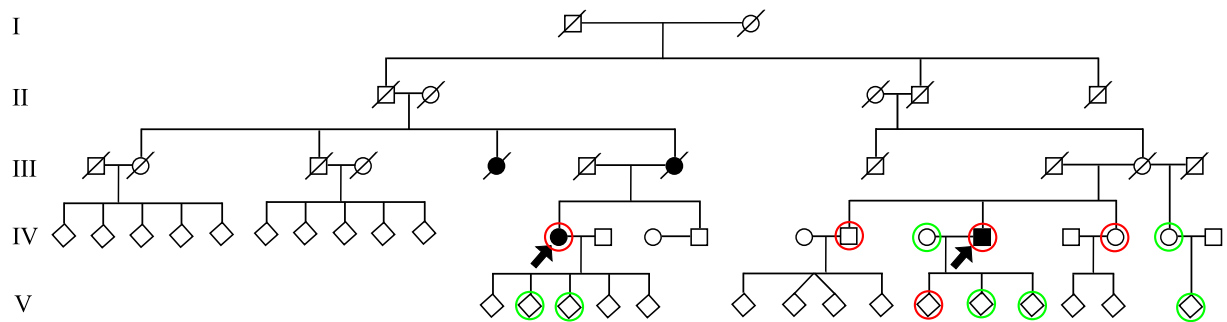


Abbildung 4.4. – Segregation der Variante c.373_374delAA in *OGN*: Grün umrandet keine Deletion (Wildtyp), rot umrandet: Deletion.

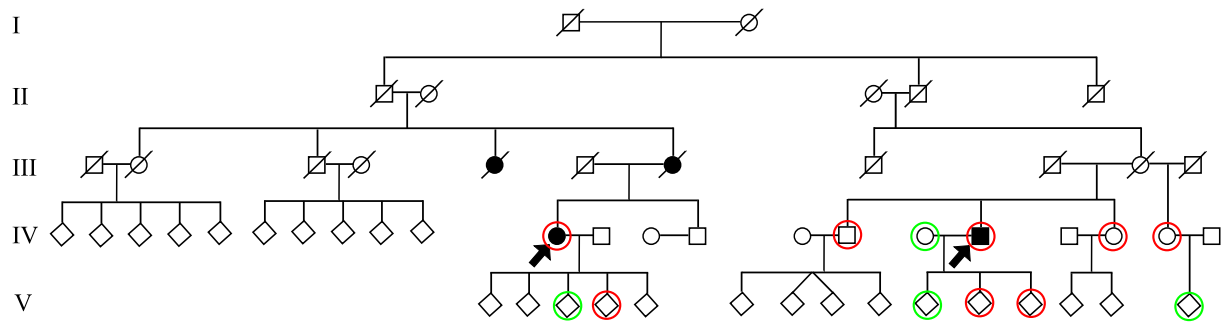


Abbildung 4.5. – Segregation der Variante p.Ser657Asp in *PLXNA4*: Grün umrandet C/C (Wildtyp), rot umrandet: C/T.

Für unsere Fragestellung ist vor allem die Betrachtung der Generation der beiden Betroffenen wichtig, da in deren Kindergeneration noch keine Erkrankung an Parkinson aufgetreten ist.

Wie in Abb. 4.2 dargestellt, sind beide Betroffene (IV:11 und IV:18) sowie der Bruder (IV:16) von IV:18 Träger der Variante p.Ser178Thr in *CPNE1*. Daraus ergibt sich eine Penetranz von 66,67%.

Die Variante p.Gly425Arg in *GOLGA4* zeigt in der Generation der Betroffenen das gleiche Segregationsmuster (siehe Abb. 4.3).

Die Variante c.373_374delAA in *OGN* war bei beiden Betroffenen (IV:11 und IV:18) sowie bei dem Bruder (IV:16) und der Schwester (IV:20) von IV:18 nachzuweisen. (Abb. 4.4) Daraus ergibt sich eine Penetranz von 50%.

In Abb. 4.5 ist das Segregationsmuster der Variante p.Ser657Asp in *PLXNA4* zu sehen. Träger der Variante sind beide Betroffenen (IV:11 und IV:18) sowie der Bruder (IV:16), die Schwester (IV:20) und die Halbschwester (IV:21) von IV:18. Daraus ergibt sich eine Penetranz von 40%.

Bei den verschiedenen Kandidatenvarianten ließen sich also Penetranzen zwischen 40% und 66% errechnen. Dies ist wie in Kapitel 5.1.4: Unvollständige Penetranz, diskutiert noch vergleichbar mit der Penetranz anderer, etablierter Parkinsongene.

4.1.4. Segregation der weiteren *PLXNA4*-Varianten

Die Analyse der zusätzlichen Varianten p.Arg302His und p.Phe40Leu durch Sanger-Sequenzierung zeigte, dass die ursprünglich bei IV:18 identifizierte und in den ESP-Exomen (Exome Sequencing Project, 2015) mit einer Frequenz von 3/8597 (MAF=0,03%) vorkommende Variante p.Arg302His bei 7 weiteren Familienmitgliedern vorhanden ist

(siehe Abb. 4.6). Anders als bei den Ergebnissen der Exomsequenzierung war auch die Indexpatientin IV:11 Trägerin dieser Variante. Die Variante p.Phe40Leu (Frequenz in ESP Exomen 111/8489, MAF=1,3%) wurde noch bei drei weiteren Familienmitgliedern identifiziert (siehe Abb. 4.7). Die Kombination aus p.Ser657Asn und p.Phe40Leu war nur bei der Indexpatientin vorhanden. Die Kombination aus p.Ser657Asn und p.Arg302His war bei 7 Individuen zu finden.

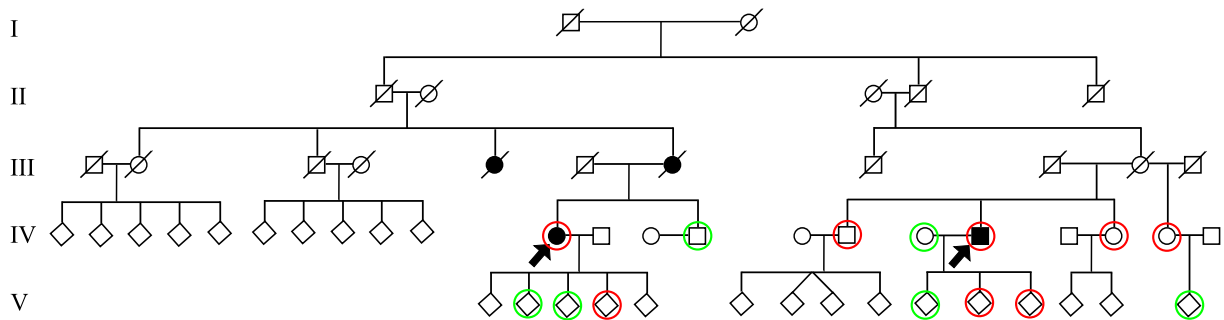


Abbildung 4.6. – Segregation der Variante p.Arg302His in *PLXNA4*: Grün umrandet G/A (Wildtyp), rot umrandet: G/G.

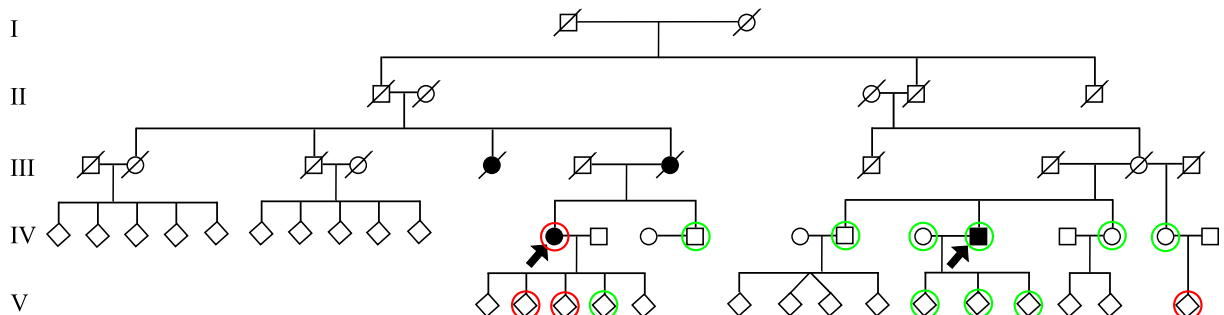


Abbildung 4.7. – Segregation der Variante p.Phe40Leu in *PLXNA4*: Grün umrandet G/A (Wildtyp), rot umrandet: G/G.

4.2. DNA-Analysen der Fall- und Kontrollpopulation und statistische Auswertung der identifizierten Varianten

Das Kandidatengen *PLXNA4* wurde aufgrund von Frequenzanalyse, Linkage-Analyse und funktioneller Überlegungen (siehe Kapitel 5.2.2: Plexine) zur genaueren Betrachtung ausgewählt. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der weiteren DNA-Analysen dieses Gens in den in Kapitel 3.1.2 und Kapitel 3.1.3 beschriebenen Fall- und Kontrollpopulationen sowie die statistische Analyse der dabei identifizierten Varianten dargestellt.

4.2.1. Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse

Zur Identifikation weiterer eventuell vorhandener Varianten wurden alle 31 kodierenden Exons von *PLXNA4* in den DNAs der Parkinson-Patienten (n=862) und der Kontroll-Probanden (n=940) zunächst mittels der in Kapitel 3.2.2: Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse beschriebenen Methode untersucht. Anschließend wurden die dabei auffälligen Schmelzkurven mittels Sanger-Sequenzierung (siehe Kapitel 3.2.3) sequenziert.

Aus den 330 Platten für *PLXNA4* wurden mittels Schmelzkurvenanalyse insgesamt 1.704 Produkte zur Sequenzierung ausgewählt, dabei fand sich in 873 tatsächlich eine Variante. 342 Produkte wurden als Kontrollen sequenziert und zeigten erwartungsgemäß keine Variante. Die restlichen 489 (28,7%) Produkte trugen trotz initial auffälliger Schmelzkurven keine Variante.

4.2.2. Identifizierte Varianten

Die Häufigkeiten der, durch Sanger-Sequenzierung der DNAs mit auffälligen Schmelzkurven, identifizierten Varianten in den jeweiligen Variantenklassen sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Insgesamt wurden 118 verschiedene Varianten in *PLXNA4* identifiziert. Diese fanden sich in und um jedes Exon, außer bei Exon 30, in dem keine Variante gefunden wurde. Davon waren 82 (=69,5%) bis dahin unbeschrieben und 86 (72,9%) waren sehr selten mit einer $MAF \leq 0,5\%$ ((Manolio et al., 2009; Tennessen et al., 2012) und Diskussion in Kapitel 5.1.1).

81 davon lagen in den Exons. Hiervon wiederum waren 65 (=80,2%) unbeschrieben und 69 (=85,3%) waren sehr selten ($MAF \leq 0,5\%$).

Es wurden 44 Varianten identifiziert, die die Aminosäuresequenz des Proteins ändern. Davon waren 38 (=86,4%) unbeschrieben und 38 (=86,4%) sehr selten ($MAF \leq 0,5\%$).

Tabelle 4.4. – Häufigkeiten der identifizierten Varianten

Variantenklasse	Anzahl	neu	$MAF \leq 0,1\%$	$MAF \leq 0,2\%$	$MAF \leq 0,5\%$	$MAF \leq 1\%$
Alle Varianten	118	82 (69,5%)	69 (58,5%)	77 (65,3%)	86 (72,9%)	90 (76,2%)
kodierende Varianten	81	65 (80,2%)	53 (65,4%)	60 (74,1%)	69 (85,3%)	71 (87,7%)
Nicht-synonyme	44	38 (86,4%)	31 (70,5%)	35 (79,5%)	38 (86,4%)	40 (90,9%)

Die Verteilung nach der Kollabierung (hierbei werden jeweils alle Varianten in den Fällen und alle Varianten in den Kontrollen addiert, siehe auch Kapitel 5.1.2) der einzelnen Varianten zwischen den untersuchten Populationen (Parkinson-Patienten (n=862) und

KORA-Kontrollen (N=940)) und die dazugehörigen p-Werte aus der statistischen Testung sind in Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.5 zeigt die Verteilung von nicht-synonymen Varianten in Abhängigkeit von deren MAF. Hierbei offenbart sich ein zunehmender Unterschied im Vorkommen zwischen Fällen und Kontrollen je niedriger der MAF-Cut-Off gewählt wird.

Tabelle 4.6 stellt die Verteilung von sehr seltenen Varianten ($MAF \leq 0,5\%$) in Abhängigkeit von deren Klasse dar: 111 Parkinson-Patienten und 103 Kontrollprobanden trugen eine sehr seltene Variante. Bei 29 (PD) bzw. 18 (KORA) davon war es eine intronische Variante und bei 35(PD) bzw. 55 (KORA) war es eine synonyme Variante. 47 Parkinson-Patienten und 30 Kontroll-Probanden trugen eine nicht-synonyme Variante.

Tabelle 4.5. – Verteilung der nicht-synonymen Varianten in *PLXNA4* bezogen auf die MAF

MAF	Anzahl in		p-Wert	Test
	Fällen n=862	Kontrollen n=940		
$MAF \leq 0,1\%$	26	9	0,002	χ^2
$MAF \leq 0,2\%$	34	17	0,006	χ^2
$MAF \leq 0,5\%$	47	30	0,018	χ^2
$MAF \leq 1\%$	60	59	>0,05	χ^2
alle MAFs	146	147	>0,05	χ^2

Tabelle 4.6. – Verteilung der sehr seltenen Varianten in *PLXNA4* bezogen auf die Art der Variante

Variantenklasse	Anzahl in		p-Wert	Test
	Fällen n=862	Kontrollen n=940		
Alle Varianten ($MAF \leq 0,5\%$)	111	103	>0,05	χ^2
Intronische Varianten ($MAF \leq 0,5\%$)	29	18	>0,05	χ^2
Synonyme Varianten ($MAF \leq 0,5\%$)	35	55	>0,05	χ^2
Nicht-synonyme Varianten ($MAF \leq 0,5\%$)	47	30	0,018	χ^2
≥ 2 Varianten	36	25	>0,05	χ^2
≥ 2 nicht-synonyme Varianten	10	8	>0,05	χ^2
≥ 2 nicht-synonyme Varianten ($MAF \leq 0,5\%$)	3		>0,05	F

F: Exakter Test nach Fisher

Ebenfalls in Tabelle 4.6 zu sehen ist die Verteilung von Probanden bei denen mehr als eine Variante identifiziert wurde. 36 der Parkinson-Patienten und 25 der Kontrollprobanden trugen mehr als eine Variante. 10 der Parkinson-Patienten und 8 der Kontrollprobanden trugen zwei nicht-synonyme Varianten. 3 der Parkinson-Patienten und kein Kontrollproband trugen außerdem zwei sehr seltene ($MAF \leq 0,5\%$) nicht-synonyme Varianten.

Es wurde eine Deletion identifiziert (c.4872_4874delGAT bzw. p.Met1624del), die aber zu keiner Leserasterverschiebung führt; sie konnte bei drei Parkinson-Patienten festgestellt werden und bei keinem Kontroll-Probanden. Kodierende Insertionen oder eine Nonsense-Mutation wurde nicht gefunden.

In Tabelle 4.7 sind alle Varianten aufgelistet, die in den, direkt den Exons angrenzenden, intronischen Bereichen identifiziert wurden. Diese reichten je nach Exon bis zu 70 Bp über das Exon hinaus. Von möglicher funktioneller Relevanz sind dabei hauptsächlich Varianten im Bereich von ± 10 Bp, also an den Spleiß-Stellen (Berg JM, 2002).

4. Ergebnisse

Tabelle 4.7. – Identifizierte intronische Varianten in *PLXNA4*

Genomische Lage	dbSNP141 ^t	Veränderung	Allel-Häufigkeit in		MAF in 1000Genomes ^{tt}
			Fällen n=1724	Kontrollen n=1880	
chr7:132192231	rs156960	c.1185+34T>C	675	662	37%
chr7:131910891	rs11761569	c.1982+29C>T	18	8	2,9%
chr7:131888230	neu	c.2294-53_2294-52ins*	79	121	
chr7:131888230	neu	c.2294-52G>T		1	
chr7:131887391	rs12154424	c.2586+14C>G	17	15	0,4%
chr7:131878787	neu	c.2856+34C>T	1		
chr7:131878791	neu	c.2856+30G>A		1	
chr7:131872220	neu	c.2993+9A>G	1	1	
chr7:131866972	rs3734983	c.3159-23T>C	450	519	28,1%
chr7:131866833	rs3734984	c.3252+23T>C	162	179	16,1%
chr7:131866817	rs3734985	c.3252+39T>C	450	519	19,2%
chr7:131866112	rs199629511	c.3492+28G>T		1	0,1%
chr7:131865336	neu	c.3639+9G>A		1	
chr7:131864407	rs3734990	c.3874+39C>T	n/a	n/a	10,7%
chr7:131864379	rs57665981	c.3874+67A>G	n/a	n/a	18,2%
chr7:131859496	rs7808586	c.4017+41A>G	n/a	n/a	26,8%
chr7:131849986	rs118159408	c.4287-27C>T	n/a	n/a	0,1%
chr7:131849981	rs17166207	c.4287-22A>G	n/a	n/a	13,9%
chr7:131849975	rs189094062	c.4287-15C>T	4		0,2%
chr7:131848893	rs113388134	c.4501+8C>T	17	17	1%
chr7:131844217	neu	c.4660+16C>A		1	
chr7:131844187	rs56254512	c.4660+45G>A	23	19	1,4%
chr7:131833427	rs2671108	c.4661-22A>G	113	107	24,8%
chr7:131833425	rs10256987	c.4661-20C>T	84	88	11,7%
chr7:131832627	rs1450882	c.4864+32C>T	16	21	0,6%
chr7:131832626	neu	c.4864+35delG	1		
chr7:131832787	rs369869195	c.4765-29C>T		1	n/a
chr7:131830086	rs2598198	c.5056-39G>A	117	115	24,9%
chr7:131830080	rs2671100	c.5056-33C>T	117	115	24,9%
chr7:131829836	rs377298220	c.5225+42C>T		1	n/a
chr7:131825606	rs199928075	c.5226-36G>A	1		0,04%
chr7:131817993	neu	c.5440-36G>A		1	
chr7:131815391	neu	c.5590-58G>A		1	
chr7:131815372	neu	c.5590-39delC	1		
chr7:131815343	rs10954361	c.5590-10T>C	388	428	28,3%
chr7:131815220	rs10954360	c.5685+18T>C	490	486	40,2%
chr7:131815218	rs377264937	c.5685+20G>A	2		n/a

*TGCCGTAGGCTGATCATTTGGGCCCTCTCTA; n/a: Nicht verfügbar; ^t(Sherry et al., 2001);
^{tt}(Abecasis et al., 2010)

Tabelle 4.8 stellt alle in *PLXNA4* identifizierten synonymen Varianten dar.

Tabelle 4.8. – Identifizierte synonyme Varianten in *PLXNA4*

Genomische Lage	dbSNP141 ^t	Veränderung		Allel-Häufigkeit in		Domäne	MAF in 1000Genomes ^{tt}
		Nukleotid	Triplet	Fällen n=1724	Kontrollen n=1880		
chr7:132193312	neu	c.143C>T	CCC>CCT		1	sema	
chr7:132193224	rs78248128	c.230C>T	AGC>AGT	2	7	sema	3,1%
chr7:132193186	rs139250180	c.269C>T	GAC>GAT	1		sema	0,1%
chr7:132193006	neu	c.449G>T	CTG>CTT	1		sema	
chr7:132192982	rs151121557	c.473G>A	GAG>GAA	8	4	sema	0,2%
chr7:132192949	rs156962	c.506G>A	TCA>TCG	680	705	sema	37,1%
chr7:132192499	rs142028036	c.956G>A	GCG>GCA	8	9	sema	0,2%
chr7:132192322	rs142219743	c.1133C>T	GGC>GGT		3	sema	n/a
chr7:132192295	rs156961	c.1160C>T	CTC>CTT	675	662	sema	37,2 %
chr7:131982919	neu	c.1436C>T	CCC>CCT		1	sema	
chr7:131913126	neu	c.1709C>T	TCC>TCT		1	PSI	
chr7:131912227	rs76286420	c.1817C>G	GTC>GTG		1	PSI	6,3%
chr7:131908289	rs376773119	c.2096C>T	CCC>CCT		1	PSI	n/a
chr7:131895867	neu	c.2135G>T	CTG>CTT		1	PSI	
chr7:131895861	neu	c.2141C>T	CCC>CCT		1	PSI	
chr7:131887495	rs117847895	c.2498C>T	TGC>TGT	1	2	PSI	0,1%
chr7:131887471	neu	c.2522C>T	GCC>GCT		1	PSI	
chr7:131878878	rs200014828	c.2801C>T	TGC>TGT		1	IPT	0,1%
chr7:131872271	rs377114297	c.2954C>T	AAC>AAT		2	IPT	n/a
chr7:131870108	rs3734980	c.3110T>C	TAT<TAC	2	1	IPT	11%
chr7:131866934	rs357929449	c.3176C>T	ATC>ATT		1	IPT	n/a
chr7:131866320	neu	c.3314T>C	GGT>GGC		1	IPT	
chr7:131866206	rs17166227	c.3428G>A	CCG>CCA	79	62	IPT	7,5%
chr7:131865474	rs201637265	c.3512G>A	CCG>CCA	1		IPT	0,05%
chr7:131865456	rs201842720	c.3530C>T	AAC>AAT	1	1	IPT	0,05%
chr7:131865417	rs144287352	c.3569G>A	CCG>CCA		6	IPT	0,1%
chr7:131864603	neu	c.3719C>T	ATC>ATT	1		TM	
chr7:131864591	rs3734989	c.3731A>G	GCA>GCG	710	885	TM	28%
chr7:131859678	rs13232207	c.3878C>A	GCC>GCA	2		cyto	9,3%
chr7:131848964	neu	c.4439C>T	GGC>GGT	1		cyto	
chr7:131832705	rs199524845	c.4820C>T	AAC>AAT	1		cyto	0,1%
chr7:131831350	rs370460371	c.4976C>T	CAC>CAT	1	1	cyto	n/a
chr7:131829917	neu	c.5160C>T	CTG>TTG		2	cyto	
chr7:131829892	rs201002816	c.5213C>T	ACC>ACT	1		cyto	0,05%
chr7:131817850	rs75848889	c.5549A>G	GCA>GCG	140	188	cyto	10,9%
chr7:131817823	rs190064869	c.5576C>A	GGC>GGA	3	6	cyto	0,2%
chr7:131815310	rs2671103	c.5615T>C	GAT>GAC	249	262	cyto	10,3%

sema: Semaphorinbindungsdomäne; PSI: Domäne von Plexinen, Semaphorinen und Integrinen; IPT: Immunglobulin(Ig)-ähnliche Domäne von Plexinen und Transkriptionsfaktoren; TM: Transmembrandomäne; cyto: Zytoplasmatische Domäne; n/a: Nicht verfügbar; ^t(Sherry et al., 2001); ^{tt}(Abecasis et al., 2010)

In Tabelle 4.9 sind alle identifizierten nicht-synonymen Varianten in *PLXNA4* dargestellt. Abb. 4.8 zeigt die Verteilung der Varianten in Bezug zu den verschiedenen Domänen in *PLXNA4*.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.9. – Identifizierte nicht-synonyme Varianten in *PLXNA4*

Genomische Lage	dbSNP141 ^t	Nukleotid	Veränderung Aminosäure	Allel-Häufigkeit in		Domäne	MAF in 1000Genomes ^{tt}
				Fällen	Kontrollen		
				n=1724	n=1880		
chr7:132193371	rs113830939	c.82C>T	p.Arg28Trp	1		sema	1,6%
chr7:132193335	rs145024048	c.118T>C	p.Phe40Leu	36	29	sema	0,9%
chr7:132193311	rs139738239	c.142G>A	p.Ala48Thr	1	1	sema	n/a
chr7:132192971	neu	c.482C>T	p.Ser161Leu	1		sema	
chr7:132192810	rs142904267	c.643G>A	p.Ala215Thr	8	2	sema	0,2%
chr7:132192664	neu	c.789C>T	p.Met263Ile	1		sema	
chr7:132192636	neu	c.817G>C	p.Glu273Gln		1	sema	
chr7:132192549	neu	c.904C>T	p.Arg302Cys	1		sema	
chr7:132192548	rs143813209	c.905G>A	p.Arg302His	1		sema	0,02%
chr7:132192530	rs149257060	c.923G>A	p.Arg309His	1		sema	n/a
chr7:132192327	rs151233036	c.1126C>T	p.Arg376Trp	2		sema	n/a
chr7:132192307	neu	c.1146C>A	p.Asp382Glu	1		sema	
chr7:132174173	rs142386862	c.1249G>A	p.Asp417Asn	26	35	sema	0,8%
chr7:132174152	rs142997259	c.1270G>A	p.Val424Ile	6	4	sema	0,2%
chr7:132174125	rs139356539	c.1297A>G	p.Thr433Ala		1	sema	n/a
chr7:131982880	neu	c.1473C>A	p.His491Gln		1	sema	
chr7:131925916	rs112682233	c.1513G>A	p.Val505Ile	3	5	sema	0,1%
chr7:131925880	neu	c.1549G>A	p.Gly517Ser		2	PSI1	
chr7:131925825	neu	c.1604C>T	p.Thr535Ile		1	PSI1	
chr7:131912264	neu	c.1828A>G	p.Ile610Val		1	n/a	
chr7:131912221	neu	c.1871T>A	p.Ile624Asn	1		n/a	
chr7:131910932*	neu	c.1970G>A*	p.Ser657Asn*	1		PSI2	
chr7:131908387	rs186378769	c.1996G>A	p.Val666Met	1		PSI2	0,07%
chr7:131908372	neu	c.2011C>T	p.Arg671Cys	1		PSI2	
chr7:131908372	rs199651527	c.2011C>A	p.Arg671Ser		1	PSI2	0,09%
chr7:131895706	rs201526825	c.2294C>T	p.Thr765Ile		2	n/a	0,1%
chr7:131888127	rs374819408	c.2350G>A	p.Val784Met	1		n/a	n/a
chr7:131887568	neu	c.2423G>A	p.Arg808His	1		PSI3	
chr7:131887415	rs201337636	c.2576G>A	p.Arg859His	1		IPT1	0,09%
chr7:131883311	rs62622406	c.2671G>A	p.Ala891Thr	26	23	IPT1	0,9%
chr7:131878934	neu	c.2743G>A	p.Val915Met	1		IPT1	
chr7:131870089	rs117458710	c.3127G>A	p.Val1043Met	7	14	IPT3	0,4%
chr7:131866930	rs200738128	c.3178G>A	p.Val1060Ile	1		IPT3	n/a
chr7:131865473	rs192855926	c.3511C>T	p.Pro1171Ser	4	4	IPT4	0,2%
chr7:131864652	neu	c.3668C>T	p.Pro1223Leu	1		IPT4	
chr7:131853148	rs73155258	c.4201G>A	p.Ala1401Thr	n/a	n/a	cyto	0,05%
chr7:131833340	neu	c.4726A>T	p.Asn1576Tyr	1		RBD	
chr7:131832686	rs201134213	c.4837G>A	p.Val1613Ile	1		cyto	0,1%
chr7:131832662	neu	c.4861T>C	p.Tyr1621His		2	cyto	
chr7:131831449-451	neu	c.4872_4874delGAT	p.Met1624del	3		cyto	
chr7:131829903	neu	c.5200G>A	p.Val1734Ile	1		cyto	
chr7:131817926	neu	c.5471T>C	p.Ile1824Thr		1	cyto	
chr7:131815315	rs150228337	c.5608C>T	p.His1870Tyr	6	15	cyto	0,4%
chr7:131815312	rs201799383	c.5611G>A	p.Asp1871Asn		1	cyto	0,1%

sema: Semaphorinbindungsdomäne; PSI: Plexin, Semaphorin und Integrin Domäne; IPT: Ig-ähnlich, in Plexinen und Transkriptionsfaktoren; TM: Transmembrandomäne; cyto: Zytoplasmatische Domäne; RBD: Rho-GTPase bindende Domäne; n/a: Nicht verfügbar; * markiert die Variante der Indexpatientin; ^t(Sherry et al., 2001); ^{tt}(Abecasis et al., 2010)

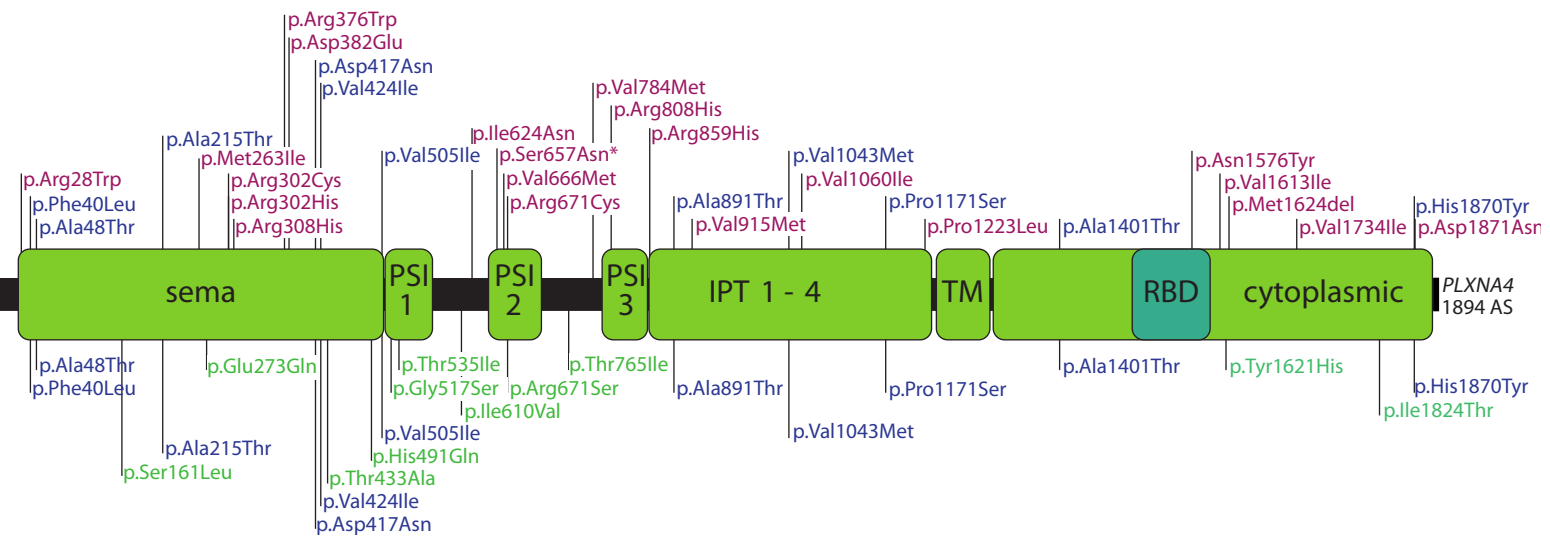


Abbildung 4.8. – Nicht-synonyme Varianten in *PLXNA4*: Der schwarze Balken stellt die kodierenden Regionen des Gens dar; die grünen Kästen die funktionellen Domänen; AS: Aminosäuren; PSI: Plexin, Semaphorin, Integrin Domäne; IPT: Ig-ähnliche Domäne von Plexinen und Transkriptionsfaktoren; TM: Transmembrandomäne; RBD: Rho-GTPase bindende Domäne; Rote Varianten kommen nur in Fällen vor; Grüne Varianten nur in Kontrollen; Blaue Varianten in beiden; Das Sternchen markiert die Index-Variante

4.3. Familienanamnesen der Variantenträger

Bei 17 PD-Patienten mit Varianten in *PLXNA4* waren auch Informationen zur Familienanamnese vorhanden: 3 berichteten über einen erst- oder zweitgradigen Verwandten mit PD und in einem Fall über essentiellen Tremor der Mutter und eines Onkels (Schulte et al., 2013). Besonders interessant ist dabei der Fall des Patienten mit der Variante Arg302Cys, da dessen Bruder ebenfalls an Parkinson erkrankt ist und seine DNA verfügbar war. Die Sequenzierung bestätigte, dass dieser ebenfalls die gleiche Variante trägt.

4.4. In silico Prädiktion

Die Analyse aller nicht-synonymen Varianten in *PLXNA4* mittels der drei in Kapitel 3.4 beschriebenen Prädiktionsalgorithmen brachte die in Tabelle 4.10 dargestellten Ergebnisse. Nur drei Varianten in *PLXNA4* (zwei in Kontrollen und eine in PD-Patienten) werden von allen Algorithmen als schädigend eingestuft. Die bei drei PD-Patienten vorhandene Deletion konnte mit PolyPhen2 nicht analysiert werden, wird aber von den beiden anderen Algorithmen als schädigend eingestuft.

Die in den einzelnen Algorithmen als schädigend vorhergesagten und sehr seltenen ($MAF \leq 0,05\%$) Varianten wurden jeweils kollabiert und ergaben bei der statistischen Testung auf Abhängigkeit zwischen dem Tragen einer Variante und PD mit Hilfe des χ^2 -Tests bzw. dem Exakten Test nach Fisher die in Tabelle 4.11 gezeigten p-Werte. In Abb. 4.9 sind die Unterschiede im Vorkommen der sehr seltenen Varianten in *PLXNA4* zwischen Fällen und Kontrollen graphisch dargestellt. Die Deletion konnte in PolyPhen2 nicht bewertet werden und wurde deshalb in diesem Algorithmus nicht beachtet.

Tabelle 4.10. – Ergebnisse der Prädiktionsprogramme für Varianten in *PLXNA4*

Variante	Allel-Häufigkeit in		SIFT ^t		PolyPhen2 ^{tt}		MutationTaster ^{ttt}	
	PD n=1724	KORA n=1880	Präd.	score	Präd.	score	Präd.	score
p.Arg28Trp	1	0	DAM	0.02	Prob. Dam.	0.990	Poly	0.934
p.Phe40Leu	35	29	TOL	0.33	Pos Dam	0.611	Poly	0.968
p.Ala48Thr	1	1	TOL	0.6	Ben	0.000	Poly	0.988
p.Ser161Leu	0	1	DAM	0.01	Prob Dam	1.000	DisCaus	0.999
p.Ala215Thr	8	2	TOL	0.44	Prob Dam	0.966	DisCaus	0.984
p.Met263Ile	1	0	TOL	0.2	Pos Dam	0.478	DisCaus	0.963
p.Glu273Gln	0	1	TOL	0.17	Prob Dam	0.966	DisCaus	0.964
p.Arg302Cys	1	0	DAM	0.05	Prob Dam	0.962	Poly	0.789
p.Arg302His	1	0	TOL	0.14	Ben	0.001	Poly	0.903
p.Arg308His	1	0	TOL	0.08	Prob Dam	1.000	DisCaus	0.992
p.Arg376Trp	2	0	DAM	0.01	Prob Dam	0.986	Poly	0.685
p.Asp382Glu	1	0	TOL	1	Ben	0.022	DisCaus	0.961
p.Asp417Asn	26	35	TOL	0.47	Ben	0.001	Poly	0.999
p.Val424Ile	6	4	TOL	0.31	Ben	0.000	Poly	0.995
p.Thr433Ala	0	1	TOL	0.11	Prob Dam	0.995	DisCaus	0.989
p.His491Gln	0	1	TOL	0.69	Ben	0.000	Poly	0.966
p.Gly517Ser	0	2	TOL	0.91	Ben	0.000	Poly	0.897
p.Thr535Ile	0	1	n/a	n/a	Ben	0.023	DisCaus	0.987
p.Ile610Val	0	1	TOL	1	Ben	0.004	DisCaus	0.947
p.Ile624Asn	1	0	TOL	0.58	Pos Dam	0.942	DisCaus	0.998
p.Ser657Asn*	1	0	TOL	0.19	Prob Dam	0.997	DisCaus	0.986
p.Val666Met	1	0	TOL	0.06	Prob Dam	1.000	DisCaus	0.991
p.Arg671Cys	1	0	DAM	0.02	Prob Dam	0.997	DisCaus	0.503
p.Arg671Ser	0	1	TOL	0.3	Pos Dam	0.772	Poly	0.693
p.Thr765Ile	0	2	TOL	0.27	Pos Dam	0.938	DisCaus	0.994
p.Val784Met	1	0	TOL	0.17	Ben	0.154	Poly	0.595
p.Arg808His	1	0	TOL	0.54	Prob Dam	1.000	DisCaus	0.998
p.Arg859His	1	0	TOL	0.11	Pos Dam	0.853	DisCaus	0.998
p.Val915Met	1	0	DAM	0.05	Prob Dam	1.000	DisCaus	0.999
p.Val1060Ile	1	0	TOL	0.17	Ben	0.117	DisCaus	0.994
p.Pro1171Ser	4	4	TOL	0.08	Ben	0.060	DisCaus	0.997
p.Pro1223Leu	1	0	TOL	0.88	Prob Dam	1.000	DisCaus	0.998
p.Asn1576Tyr	1	0	DAM	0	Pos Dam	0.808	DisCaus	0.861
p.Val1613Ile	1	0	TOL	0.42	Ben	0.011	DisCaus	0.979
p.Tyr1621His	0	2	TOL	0.19	Prob Dam	1.000	DisCaus	0.999
p.Met1624del	3	0	DEL	-6.97	n/a	n/a	DisCaus	1
p.Val1734Ile	1	0	TOL	0.17	Ben	0.039	DisCaus	0.997
p.Ile1824Thr	0	1	DAM	0	Prob Dam	0.999	DisCaus	0.999
p.His1870Tyr	6	15	DAM	0.01	Ben	0.158	Poly	0.521
p.Asp1871Asn	0	1	TOL	0.22	Prob Dam	0.959	DisCaus	0.998
p.Val505Ile	3	5	TOL	0.27	Pos Dam	0.613	DisCaus	0.970
p.Val1043Met	7	14	TOL	0.23	Ben	0.005	Poly	0.964
p.Ala1401Thr	n/a	n/a	TOL	0.36	Prob Dam	1.000	DisCaus	0.990
p.Ala891Thr	26	23	TOL	0.6	Pos Dam	0.709	Poly	0.96

Grau unterlegt sind Felder in denen ein Algorithmus eine Variante als schädigend einstuft.

Präd: Prädiktion; DAM: Damaging; TOL: Tolerated; Prob Dam: Probably damaging; Pos Dam: Possibly damaging; Ben: Benign; DisCaus: Disease causing; Poly: Polymorphism, n/a: Nicht verfügbar;

^t(Ng et al., 2006); ^{tt}(Adzhubei et al., 2010); ^{ttt}(Schwarz et al., 2010)

Tabelle 4.11. – Statistische Testung der sehr seltenen ($MAF \leq 0,5\%$) „schädlichen“ Varianten in *PLXNA4*

Gen	„schädigend“ in	Häufigkeit in		p-Wert	Test
		PD n=862	KORA n=940		
<i>PLXNA4</i>	SIFT	10	2	0,0178	Exakter Test nach Fisher
<i>PLXNA4</i>	PolyPhen2	19	9	0,033	χ^2 -Test
<i>PLXNA4</i>	MutationTaster	33	23	>0,05	χ^2 -Test

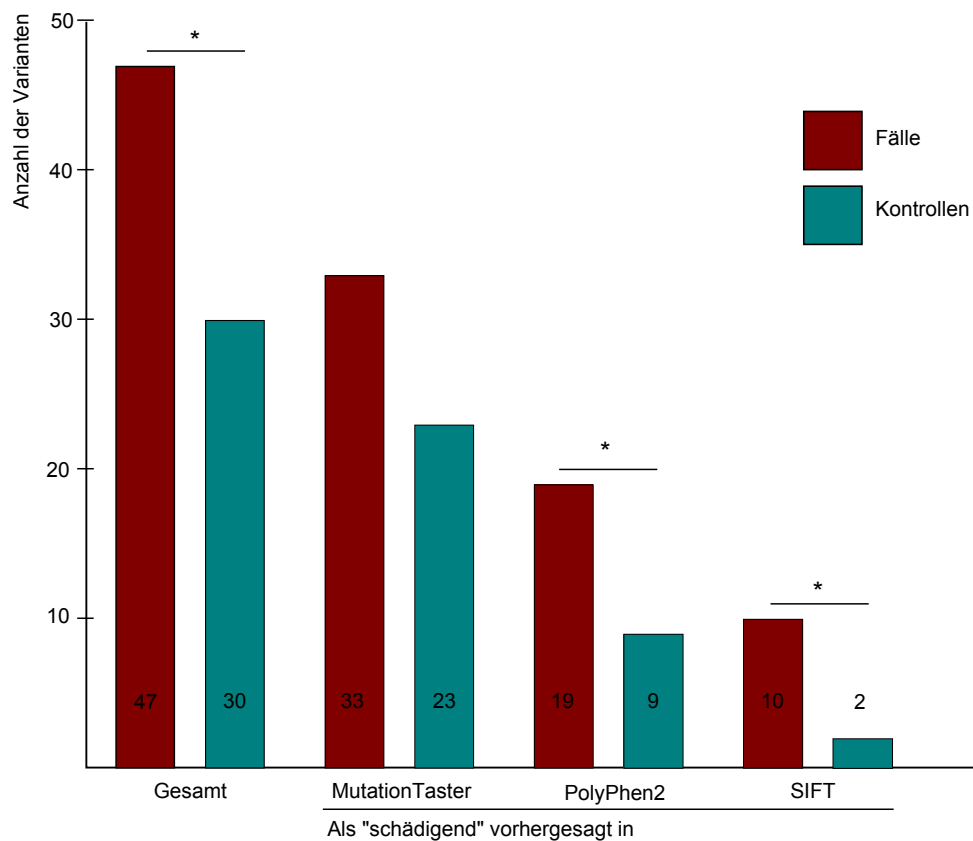


Abbildung 4.9. – Häufigkeitsverteilungen der sehr seltenen Varianten in *PLXNA4*: Stern markiert einen statistisch signifikanten Unterschied

5. Diskussion

5.1. Chancen und Risiken bei der Ergebnisbeurteilung

Die statistische Auswertung zeigt einen Zusammenhang zwischen sehr seltenen Varianten in *PLXNA4* und einer Erkrankung an PD. Schließt man die Ergebnisse der Prädiktionsprogramme mit ein so bestätigt sich der Zusammenhang bei zwei (SIFT und Poylphen2) von drei Algorithmen, jedoch im Fall von PolyPhen2 weniger signifikant. Es gilt allerdings einige Punkte zu berücksichtigen, die die Aussagekraft dieses beobachteten Zusammenhangs für *PLXNA4* einschränken.

5.1.1. Definition einer seltenen Variante

Ein essentieller Punkt des oben beschriebenen Zusammenhangs ist dabei die Definition einer sehr seltenen Variante. Obwohl es hierzu keine verbindlichen Definitionen gibt, werden die Varianten häufig in 3 Gruppen unterteilt: Varianten mit MAFs von mehr als 5% werden als häufig beschrieben, Varianten mit MAFs zwischen 5% und 1% oder 0,5% als Varianten mit geringer Frequenz und Varianten mit MAFs von weniger als 1% oder 0,5% als selten oder sehr selten (Manolio et al., 2009; Tennessen et al., 2012). Allgemein wird von einem negativen Zusammenhang zwischen Effektstärke und MAF ausgegangen (siehe auch Kapitel 5.2.1: Seltene genetische Varianten bei komplexen Erkrankungen).

Wenn man nun den MAF-Cut-Off für seltene Varianten schrittweise erniedrigt, so zeigt sich in unseren Ergebnissen ein immer stärker ausgeprägter relativer Anstieg des Anteils der Varianten in der Patientengruppe. Bei $MAF \leq 5\%$ und $\leq 1\%$ sind die Varianten in beiden Populationen mit 146 zu 147 beziehungsweise 60 zu 59 noch gleich verteilt. Bei $MAFs \leq 0,5\%$ (47 zu 30, $p=0,018$) zeigen sich bereits statistisch signifikant mehr Varianten in der Patientengruppe und bei $MAFs \leq 0,2\%$ (34 zu 17, $p=0,006$) und $MAF \leq 0,1\%$ (26 zu 9, $p=0,002$) wird der Unterschied noch deutlicher.

Wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben ist die Wahrscheinlichkeit der Pathogenität bei sehr seltenen Varianten erhöht. Prinzipiell zeigt sich hier also ein Verhalten der Variantenver-

teilung wie es bei einer möglichen Bedeutung von *PLXNA4*-Varianten bei der Pathogenese von PD zu erwarten wäre.

Dass dieser Unterschied nicht einfach durch eine Häufung von seltenen Varianten in der Patientengruppe, sondern mit einer Häufung möglicherweise funktionell relevanter seltener Varianten zu erklären ist, ergibt sich aus der Betrachtung synonyme und intronischer Varianten, also solcher Varianten, die weniger wahrscheinlich eine Funktionsbeeinträchtigung des Proteins nach sich ziehen (Nelson et al., 2012). So zeigt sich, dass der Unterschied an der Anzahl sehr seltener Varianten zwischen den Gruppen bei diesen Varianten nicht mehr signifikant ist. Mit einer $MAF \leq 0,5\%$ finden sich 29 zu 18 ($p > 0,5$) synonyme Varianten und 35 zu 55 ($p > 0,5$) intronische Varianten bei den Gruppen. Mit einer $MAF \leq 0,2\%$ finden sich 14 zu 23 ($p > 0,5$) synonyme und 11 zu 10 ($p > 0,5$) intronische Varianten.

5.1.2. Statistische Beurteilung seltener Varianten

Die meisten identifizierten Varianten in *PLXNA4* waren wie die Indexvariante in der untersuchten Familie sehr selten. So hatten 86,4% der nicht-synonymen Varianten in der von uns untersuchten Population eine $MAF \leq 0,05\%$; 63,6% davon waren sogar sogenannte Singletons, das heißt, diese Varianten sind nur bei einer untersuchten Person zu finden.

Einerseits zeigt sich in neuen Untersuchungen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Pathogenität einer seltenen Variante (siehe Kapitel 5.2.1: Seltene genetische Varianten bei komplexen Erkrankungen). Andererseits ist die statistische Analyse seltener Varianten komplex, da die Teststärke, Zusammenhänge zu finden, niedrig ist und die benötigte Anzahl an Fällen und Kontrollen dadurch sehr groß wird (Bansal et al., 2010).

Bei einer univariaten Analyse, die einen Zusammenhang bei jeder Variante einzeln mittels Verfahren wie dem χ^2 -Test oder dem exakten Test nach Fisher nachzuweisen versucht, wird die Teststärke besonders durch die nötige Korrektur für multiples Testen erniedrigt (Li et al., 2008a). Wenn man die Alternative einer multivariaten Analyse mittels Verfahren wie Hotellings T^2 -Test oder logistischer Regression wählt, wird die Power durch die dann vorhandenen vielen Freiheitsgrade erniedrigt (Li et al., 2008a).

Diesen Problemen kann man mit dem sogenannten Cohort-Allelic-Sums-Test (CAST) begegnen (Morgenthaler et al., 2007). Dabei werden alle Varianten in einem Gen (oder auch in mehreren Genen einer Familie) in der gesamten untersuchten Population zusammengefasst, die Allelfrequenzen werden also, getrennt über alle Fälle bzw. Kontrollen, kollabiert. So wären bei einer Variante mit der Frequenz von 2,5% bei den Kontrollen

(unter der zusätzlichen Bedingung, dass sie in Fällen doppelt so häufig vorkommt wie in Kontrollen) ca. 10.000 Fälle und Kontrollen nötig, um 80% Teststärke bei der Feststellung eines Unterschiedes zu erreichen. Wenn aber zwei solche Varianten zusammengefasst werden, kann mit einer Frequenz von 5% bei den Kontrollen gerechnet werden. Die Zahl der benötigten Fälle und Kontrollen verringert sich auf ca. 3.000 (Bansal et al., 2010).

Welche Varianten kollabiert werden sollen kann aufgrund verschiedener Merkmale wie Variantenklassen, MAF, funktioneller Relevanz (Bonfond et al., 2012) oder Vorkommen im gleichen Signalweg (Pinto, 2010) entschieden werden. Das Problem des CAST ist seine Anfälligkeit bei Fehlklassifikationen. Wenn funktionell wirksame Varianten von der Analyse aus- oder funktionell nicht wirksame Varianten in die Analyse eingeschlossen werden, sinkt auch hier die Teststärke zur Aufdeckung von Assoziationen deutlich (Li et al., 2008a). Die Güte des Testverfahrens hängt also auch von der Auswahl der Varianten zur Analyse ab.

Eine Möglichkeit die Robustheit der Analyse gegen Fehlklassifikationen zu erhöhen, bietet die Combined-Multivariate-and-Collapsing Methodik (Li et al., 2008a). Hierbei werden beispielsweise alle sehr seltenen Varianten kollabiert und dann zusammen mit den häufigeren in einer multivariaten Analyse getestet. Der Variable-Weight-Test (Price et al., 2010) berücksichtigt die vorhergesagte Schädlichkeit der Varianten und der Adaptive-Sums-Test (Han et al., 2010) ist geeignet, wenn zusätzlich protektive Varianten mit eingeschlossen werden. Da das Verfahren des NGS relativ neu ist, gibt es noch wenig Erfahrung und noch kein einheitliches Vorgehen, wie mit den vielen zusammengetragenen Daten am besten umgegangen werden sollte.

5.1.3. Kontrollprobanden bei PD

Parkinson ist eine Erkrankung des alten Menschen, deren Prävalenz mit Zunahme des Alters immer weiter ansteigt (de Lau et al., 2006). Dies stellt ein Problem für die Auswahl der Kontrollprobanden dar, besonders bei Untersuchungen und Studien zur Pathogenese der Erkrankung. Die Schwierigkeit besteht in der Möglichkeit, dass eine als gesund betrachtete Person im weiteren Verlauf noch an Parkinson erkranken oder sich bereits in einem, noch asymptomatischen oder undiagnostizierten Zustand der Krankheit befinden kann. Auf der anderen Seite benötigt man zur Analyse seltener Varianten eine möglichst große Zahl an Probanden. Um dieses Problem zu minimieren, wurden die Kontrollen aus der KORA-Age-Kohorte (siehe Kapitel 3.1.2 KORA Allgemeinbevölkerungskontrolle) re-

krutiert. Dass sich trotz dieser Maßnahme Probanden in der Kontrollgruppe befinden, die noch an PD erkranken werden oder sich bereits in einem undiagnostizierten Anfangsstadium der Erkrankung befinden, kann nicht ausgeschlossen werden.

In Bezug auf unsere Untersuchung sind durch solche Fehlklassifikationen zwei Richtungen der Beeinflussung denkbar. Eine fälschlicherweise in unserer Kontrollpopulation identifizierte seltene Variante hätte in Wahrheit zu den Varianten der Fallpopulation gezählt werden müssen. Der beobachtete Zusammenhang würde in diesem Fall unterschätzt. Andererseits würde ein falsch klassifizierter, an PD erkrankter Proband, der keine Variante trägt, fälschlicherweise die Kontrollpopulation vergrößern. Der beobachtete Zusammenhang würde in diesem Fall überschätzt. Durch die relativ große Anzahl an Fällen und Kontrollen und der relativ geringen Anzahl an seltenen Varianten, wäre der zuerst beschriebene Effekt jedoch wesentlich stärker ausgeprägt.

5.1.4. Unvollständige Penetranz

Ein damit in Zusammenhang stehendes Problem ist das der unvollständigen Penetranz, also der Tatsache, dass nicht alle Variantenträger erkranken. So sind auch in der von uns untersuchten Familie gesunde Familienmitglieder Träger der Variante. Dies muss aber nicht unbedingt gegen die Beteiligung der *PLXNA4*-Variante an der Entstehung der Erkrankung sprechen. Auch andere Varianten in etablierten Parkinson-Genen wie z.B. *LRRK2*, weisen eine Penetranz auf, die weit unter 100% liegt. Das Risiko an einem Parkinsonsyndrom zu erkranken, liegt bei Trägern der häufigsten *LRRK2*-Variante (p.Gly2019Ser) bei 28% im Alter von 59 Jahren und steigt auf 74% im Alter von 79 Jahren (Healy et al., 2008). In Anbetracht dessen liegt die von uns beobachtete Penetranz in der Familie noch im erwartbaren Rahmen anderer familiärer Parkinsonerkrankungen mit autosomal dominanten Vererbungsmodus.

Da in beiden betroffenen Familienmitgliedern auch noch andere *PLXNA4*-Varianten gefunden wurden, muss auch eine oligogene Genese in Betracht gezogen werden. Das heißt, dass eine Variante nicht ausreicht, um PD auszulösen, sondern dass weitere Varianten im selben oder auch anderen Genen nötig sind, um die Erkrankung auszulösen. Man spricht auch von „mutational Load,“ also der Summe aller schädigenden Varianten im gesamten Genom eines Individuums, die zu einer Verringerung seiner reproduktiven Fitness (Agrawal et al., 2012) bzw. zum Entstehen eines Phänotyps (Zaghloul et al., 2010) beitragen. So wurden bei Patienten mit Kortison-Reduktase-Mangel Varianten in zwei verschiedenen

Genen (HSD11B1 und H6PD) identifiziert. Alle von der Erkrankung Betroffenen trugen nicht nur eine von diesen Varianten, sondern mindestens drei veränderte Allele in diesen beiden Genen (Draper et al., 2003). Die von uns identifizierte Variante würde in einem solchen Fall also im Zusammenspiel mit anderen genetischen Faktoren die Krankheit begünstigen.

Es kann durch eine Variante auch nur zu einer Phänotypmodifikation im Zusammenspiel mit anderen Varianten kommen. So gibt es Varianten, die beispielsweise den Erkrankungsbeginn von PD (Varianten im *PARK10*-Locus (Li et al., 2002; Oliveira et al., 2005)) und Alzheimer (*APOE*-Allele (Li et al., 2002; Corder et al., 1993)) beeinflussen.

5.1.5. Schwächen eines Screeningverfahrens

Die Güte eines Screeningverfahrens (in unserem Fall die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) wird durch die zwei Parameter Sensitivität und Spezifität bestimmt. Die Sensitivität eines Tests gibt an, wie viele der tatsächlich positiven Befunde auch als positiv erkannt werden (in unserem Fall, wie viele der DNAs mit genetischer Variante auch erkannt werden). Die Spezifität gibt an, wie viele der tatsächlich negativen Befunde auch als negativ erkannt werden (in unserem Fall wie viele DNAs ohne Variante als solche eingestuft wurden). In der Realität ist es schwierig Tests zu finden, die in beiden Fällen einen Wert von 100% erreichen; das heißt, es kommt immer wieder zu Fehlklassifikationen.

Die Sensitivität der hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse als Suchverfahren für Varianten liegt für Amplicons <400Bp Länge nahe 100%, die Spezifität bei 80%. Für längere Amplicons sinkt die Sensitivität auf 81%, während die Spezifität mit 84% relativ gleich bleibt (Garritano et al., 2009).

Probleme bei der Detektion bereiten beispielsweise homozygote Varianten (Audrezet et al., 2008), GC-reiche und variantenreiche Regionen (Laurie et al., 2009), sowie Insertionen oder Deletionen nahe längeren Mononukleid-Sequenzen (Garritano et al., 2009). Bei einer falsch positiven Einteilung (Spezifität) fällt der Fehler auf, in unserem Fall, bei der anschließenden Sequenzierung. Eine falsch negative Einteilung (Sensitivität) führt dagegen zum Übersehen einer Variante. Dies sollte die Fall- und Kontrollpopulation in gleichem Maße betreffen.

Insgesamt ist die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse aber ein relativ schnelles, einfaches und kosteneffektives Verfahren um relativ große Populationen auf neue genetische Varianten hin zu untersuchen (Garritano et al., 2009). Weitere Vorteile sind, dass es sich

in den meisten Fällen um ein sogenanntes, für Verunreinigungen unanfälliges, „closed tube“ System handelt, also nach dem Start der PCR keine weiteren Bearbeitungsschritte nötig sind (Gundry et al., 2003; Wittwer et al., 2003). Außerdem wird die DNA während der Bearbeitung nicht geschädigt und kann so zur weiteren Analyse (z.B. zur Sequenzierung) verwendet werden (Garritano et al., 2009).

5.1.6. Einschränkungen der Exomsequenzierung

Durch die Entwicklung des NGS wurde die Sequenzierung von großen Teilen von DNA um ein vielfaches schneller und günstiger und die Sequenzierung beispielsweise ganzer Exome wurde in großem Maßstab möglich (Metzker, 2010). Aber auch die Exomsequenzierung durch NGS ist kein fehlerfreies Verfahren (Mamanova et al., 2010). Ein Problem stellt die Definition der Zielstrukturen, die als Exom gelten, dar: da das Wissen über alle tatsächlich für Proteine kodierenden Bereiche der DNA nicht vollständig ist, hängen die Zielstrukturen vom aktuellen Kenntnisstand ab und sind möglicherweise nicht vollständig (Bamshad et al., 2011). Außerdem schwankt die Effektivität der Sonden für verschiedene Zielstrukturen teilweise stark und manche Sequenzen entziehen sich der Erfassung durch Sonden komplett (Bamshad et al., 2011). So kann ein hoher Gehalt an A und T zu Problemen beim Annealing und ein hoher Gehalt an G und C zu Problemen durch Sekundärstrukturen führen (Mamanova et al., 2010).

Bei der Anreicherung der gewählten Zielstrukturen aus der zu untersuchenden DNA geben folgende Kenngrößen Aufschluss über die Güte des Verfahrens:

1. Sensitivität, also der Anteil an Basen aus der Zielstruktur, die von einem oder mehreren „Reads“ gedeckt sind.
2. Spezifität, also der Anteil an Sequenzierprodukten, der zu den Zielstrukturen gehört.
3. Uniformität oder die Variabilität in der Abdeckung unter den Zielstrukturen.
4. Reproduzierbarkeit oder wie stark die Ergebnisse von wiederholenden Experimenten korrelieren.

Die in unserem Fall genutzte „In-solution hybrid capture“-Methode erreicht eine Sensitivität von >99,5%, eine Spezifität von 80%, eine Uniformität von 61% und eine Reproduzierbarkeit von >96% (Mamanova et al., 2010). Auch wenn diese Werte im Vergleich zu anderen Verfahren als robust zu sehen sind (Mamanova et al., 2010), so besteht doch auch hier die Möglichkeit, eine eventuell entscheidende Variante zu übersehen.

Ein Problem speziell dieser Arbeit stellt die Verwendung verschiedener Anreicherungskits mit einer anderen Größe und verschiedenen Zielstrukturen und Sonden zur Sequenzierung der DNA der beiden Index-Patienten dar (sh. Kapitel 4.1.1: Ergebnisse der Exomsequenzierung). So wurden eventuell vorhandene weitere gemeinsame Varianten möglicherweise übersehen. Der Grund für die Verwendung der unterschiedlichen Kits liegt in der zeitlich versetzten Analyse. Bei der Sequenzierung der Indexpatientin zum Ausschluss einer bekannten PD Variante war das 38 Mb Kit noch das aktuellste. Nach Rekrutierung und Gewinnung der DNA für das zweite Exom stand bereits das größere 50 Mb Kit zur Verfügung und wurde genutzt.

Es besteht auch die Möglichkeit, dass die in unserer Familie für die Erkrankung verantwortliche Variante im intronischen Bereich der DNA liegt. Dieser wurde bei unserer Untersuchung jedoch komplett ausgeklammert. Dies erscheint allerdings weniger wahrscheinlich, da die meisten der bekannten, für monogene Erkrankungen verantwortlichen, Varianten die Proteinfunktion beeinträchtigen (Stenson et al., 2003) und in den Exons oder an Spleißstellen zu finden sind (Kuhlenbäumer et al., 2011).

Weitere Schwachstellen des NGS sind die Identifizierung von kleinen Insertionen oder Deletionen (Shigemizu et al., 2013) und von Copy-Number-Variations (CNVs) (Bamshad et al., 2011). CNVs sind Abschnitte von DNA von mindestens 1000 Bp Länge, die, im Vergleich zu einem Referenzgenom, in unterschiedlicher Anzahl an Kopien vorhanden sind (Feuk et al., 2006). Aufgrund der relativ kurzen „Reads“ können diese, teilweise sehr langen, CNVs mit dem oben beschriebenen Verfahren des NGS nicht problemlos identifiziert werden und hätten in unserer Untersuchung übersehen werden können (Bamshad et al., 2011). Es gibt aber Beispiele dafür, dass Veränderungen in der Anzahl von Kopien eines Gens an der Entstehung von Parkinson beteiligt sind. So konnte in einer Untersuchung eine Verdreifachung von *SNCA* als Ursache für familiäre Parkinsonerkrankung verantwortlich gemacht werden (Singleton et al., 2003).

Das weitere Filtern der gemeinsamen Varianten aufgrund von Häufigkeiten in Kontrollpopulationen ist ebenfalls problematisch. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Personen, die an der untersuchten Erkrankung leiden in dieser Population vorhanden sind und das Ergebnis verzerren (Bamshad et al., 2011).

Auch gilt es, die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass der Proband IV:18 nur eine Phänokopie darstellt und die Erkrankung in seinem Fall eine andere Ursache hat als bei den anderen Familienmitgliedern. In diesem Fall wäre die Filterung nach gemeinsamen

Varianten nicht zielführend und die Anzahl der zu untersuchenden Kandidatenvarianten würde sich vervielfachen (Schulte et al., 2013).

5.1.7. Korrektheit der Prädiktionsprogramme

Die statistische Testung der in den drei Prädiktionsalgorithmen als schädigend vorhergesagten Varianten brachte bei den Programmen SIFT und PolyPhen2 ebenfalls signifikante Ergebnisse. Bei dem Programm SIFT mit der Einschränkung, dass wieder nur die seltenen Varianten berücksichtigt wurden. In dem Programm MutationTaster zeigten sich zwar mehr Varianten (33 zu 23) in den Fällen, dieser Unterschied war aber nicht signifikant ($p=0,091$, χ^2 -Test).

Doch auch die Aussagen der verschiedenen Prädiktionsprogramme an sich sind unter Vorbehalt zu sehen. Zur Beurteilung werden, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, strukturelle Eigenschaften der Proteine und sequenzbasierte Verfahren zur Bewertung von Aminosäuresubstitutionen herangezogen. Dem zugrunde liegen die Beobachtungen, dass Veränderungen an konservierten Positionen (sequenzbasiert) und Veränderungen an im Inneren des Proteins gelegenen Aminosäuren (strukturbasiert) besonders häufig eine funktionelle Konsequenz haben (Ng et al., 2006).

Bei der Analyse mit Hilfe von strukturellen Eigenschaften ist zu beachten, dass es für viele Proteine gar keine hierzu relevanten Informationen gibt. Auch wird häufig die reine Kristallstruktur betrachtet und supramolekulare Interaktionen dabei nicht berücksichtigt (Ng et al., 2006). Aber selbst die Hinzunahme von funktionellen Annotationen aus Datenbanken wie Swiss-Prot (Bairoch et al., 2005) über Domänen des Proteins, die für die Bindung von Liganden, Protein-Protein Interaktionen oder die Bildung von Disulfidbrücken wichtig sind, kann das Resultat nicht immer verbessern (Ng et al., 2006).

Bei den sequenzbasierten Methoden ist vor allem die Auswahl der homologen Proteine und deren Alignment wichtig. So können zu ähnliche Proteine oder auch Proteine, deren Funktion sich geändert hat oder die unter positiver Selektion standen, zu Fehlklassifikationen führen (Ng et al., 2006).

Zum Trainieren und zum Testen der Algorithmen werden SNP-Sets genutzt, die schädliche und neutrale Varianten beinhalten. Zur Auswahl der schädlichen Varianten werden z.B. Datenbanken genutzt, die genetische Varianten auflisten, die zu einer Erkrankung führen (Schwarz et al., 2010; Ng et al., 2006). Dazu gehören beispielsweise Online-Mendelian-Inheritance-in-Man (OMIM) (Hamosh et al., 2005), und Human-Gene-Mutation-Database

(HGMD) (Stenson et al., 2003). Zur Auswahl neutraler Varianten werden entweder SNPs verwendet, die in Datenbanken und Literatur als Polymorphismen gewertet werden (Ng et al., 2006; Schwarz et al., 2010) oder solche, die Unterschiede zwischen nah verwandten Spezies in homologen Proteinen zeigen und als nicht schädigend eingeschätzt werden (Adzhubei et al., 2010). Hierbei kann es zu Fehlklassifikationen kommen, die die Genauigkeit der Vorhersagen beeinträchtigen und die im folgenden genannten Testergebnisse verfälschen.

PolyPhen2 erreicht dabei bei einer Falsch-Positiv-Rate von 20% eine wahre Positiv-Rate von 92% (Adzhubei et al., 2010), MutationTaster eine Gesamtgenauigkeit von $91,1 \pm 0,1\%$ (Falsch-Positiv-Rate 17% und wahre Positiv-Rate von 85%) (Schwarz et al., 2010) und SIFT eine Falsch-Negativ-Rate von 31% bei einer Falsch-Positiv-Rate von 20% (Ng et al., 2006).

Während die Prädiktionsprogramme bei Varianten, die monogene Erkrankungen auslösen, relativ gute Ergebnisse liefern, sind sie zum Testen von häufigen Varianten mit kleinem Effekt bei komplexen Erkrankungen weniger geeignet (Thomas et al., 2004; Ng et al., 2006). Zum Untersuchen von seltenen Varianten mit stärkerem Effekt, die zu komplexen Erkrankungen beitragen, scheinen sie hingegen wieder besser geeignet zu sein (Ng et al., 2006).

Es handelt sich insgesamt betrachtet bei einer Vorhersage als „schädigend“ also nur um ein weiteres Indiz, das auf eine wahrscheinliche Schädlichkeit der Varianten hinweist. Um einen tatsächlich vorhandenen Effekt nachzuweisen, muss die Variante einer funktionellen Analyse unterzogen werden. Die ständig fortschreitende Entdeckung, Charakterisierung und Sammlung von Varianten und SNPs in Datenbanken wie dbSNP (Sherry et al., 2001), dem 1000 Genomes Project (Abecasis et al., 2010) und das Vorantreiben von Projekten wie der „Encyclopedia of DNA Elements“ (ENCODE), (E. N. C. O. D. E Project Consortium, 2012) die es sich zum Ziel gemacht haben alle funktionell relevanten Teile der DNA zu charakterisieren, werden die Beurteilung von Varianten in Zukunft erleichtern.

5.2. Beurteilung des Zusammenhangs seltener Varianten in *PLXNA4* und einer Erkrankung an PD

Bei der durchgeführten Exomsequenzierung stellte sich eine Variante in *PLXNA4* als geeigneter Kandidat heraus, um in der untersuchten Familie der Auslöser der Parkinson-

Erkrankung zu sein. Während bei Berücksichtigung aller identifizierten Varianten in *PLXNA4* die Verteilung zwischen den Gruppen (PD und KORA) noch relativ gleich ist – wie bei zufälliger Aufteilung zu erwarten – ist jedoch die Zahl der seltenen Missense-Varianten im Kollektiv der Parkinson-Patienten erhöht. Das gilt genauso für die als schädigend vorhergesagten Varianten mit einer $MAF \leq 0,5\%$ in zwei von drei Prädiktionsalgorithmen. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist, dass eine genetische Variante, die zu einer verminderten Funktionsfähigkeit von *PLXNA4* führt, ein Risikofaktor für das Auftreten von PD ist. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützen diese Hypothese.

Zur Bestätigung der möglichen Pathogenität wären weitere betroffene Familien, bei denen die gleiche Variante mit der Erkrankung segregiert, wünschenswert. Auch könnte in einer weiteren, unabhängigen Fall- und Kontrollgruppe eine Häufung von seltenen *PLXNA4*-Varianten repliziert werden und eine Häufung von solchen seltenen Varianten in den anderen Kandidaten-Genen ausgeschlossen werden. Hierbei gilt es aber zu beachten, dass auch bei der Rekrutierung so großer Fallzahlen ein möglichst homogener genetischer Hintergrund vorhanden ist. Die Anzahl an Varianten, die von verschiedenen Populationen geteilt werden, nimmt mit der geographischen Distanz ab, dies gilt im Besonderen für seltene Varianten (Nelson et al., 2012). Obwohl dieser Effekt im innereuropäischen Nord-Süd-Gefälle und zwischen verschiedenen Kontinenten besonders stark ist, wirken sich bei der Analyse seltener Varianten auch schon geringe Effekte auf die Ergebnisse aus (Nelson et al., 2012). Eine weitere Möglichkeit zur Bestätigung wären funktionelle Untersuchungen an Tier- oder phänotyprelevanten Zellmodellen, um zu zeigen, dass die Variante in *PLXNA4* tatsächlich mit einem Parkinson-spezifischen Funktionsverlust einhergeht.

Doch auch die folgenden Überlegungen zur Rolle von seltenen genetischen Varianten bei komplexen Erkrankungen und der Funktion von Plexinen bzw. Axon-Guidance-Molekülen liefern interessante Aspekte zu möglichen Zusammenhängen.

5.2.1. Seltene genetische Varianten bei komplexen genetischen Erkrankungen

In den letzten Jahren konnten durch GWAS viele genetische Varianten identifiziert werden, die zur Entstehung von komplex-genetischen und häufigen Erkrankungen beitragen. Dies betrifft SNPs, die mit einer relativ hohen MAF ($\geq 5\%$) in der Bevölkerung vorkommen (Hardy et al., 2009). Den klassischen GWAS zugrunde liegt die „common disease, common variant“-Hypothese (Cargill et al., 1999), also die Annahme, dass zumindest ein Teil der beobachteten Heritabilität von häufigen Erkrankungen aufgrund von allelischen

Variante Zustände kommt, die mit relativ hoher Frequenz in einer Population zu finden sind (Manolio et al., 2009). Die Heritabilität ist der Anteil an phänotypischer Varianz, der auf genetische Varianz zurückzuführen ist und nimmt einen Wert zwischen 0 und 1 an (Seyffert, 2003). Die Effektstärken der bei den GWAS identifizierten Varianten sind allerdings meist sehr niedrig (die meisten ORs liegen bei 1,1) und erklären bei kaum einer Krankheit oder einem körperlichen Merkmal mehr als 10% der prinzipiell mit Genetik erklärbaren Varianz (Frazer et al., 2009). Trotz der vielen neu identifizierten genetischen Risikofaktoren, die auch neue Einsichten in die molekularen Mechanismen vieler Erkrankungen brachten (International Parkinson's Disease Genomics Consortium et al., 2011; Winkelmann et al., 2007; McAllister et al., 2015; Raj et al., 2012), zeigte sich auch, dass die bei GWAS identifizierten Varianten nur einen Teil der beobachteten Heritabilität von komplexen Erkrankungen erklären. In einer Studie von Hamza et al. betrug die Heritabilität für Parkinson 0,6 (Hamza et al., 2010). Nach Ausschluss aller Träger einer bekannten, Parkinson auslösenden Variante oder eines bekannten Risikoallels betrug sie immer noch 0,41 (Hamza et al., 2010).

Wie kann man also den Rest, die sogenannte „missing heritability“ (Manolio et al., 2009) erklären? Neben der Möglichkeit, dass größere Abberationen der DNA wie beispielsweise CNVs daran beteiligt sind (Eichler et al., 2010), gibt es die Hypothese, dass zumindest ein Teil davon durch seltene Varianten zu erklären sein könnte (Manolio et al., 2009). Eine Reihe von Überlegungen legen nahe, dass genetische Varianten, die einen Funktionsverlust nach sich ziehen, durch Selektion aussortiert werden und deshalb selten sind (Tennessen et al., 2012). So konnte in einer Auswertung von Daten im Rahmen des 1000-Genome-Projects beispielsweise gezeigt werden, dass synonyme Varianten häufiger vorkommen als nicht-synonyme (synonyme sind in etwa so häufig wie Varianten im gesamten Genom) (Marth et al., 2011). Ausserdem sind nicht-synonyme Varianten gehäuft unter den SNPs mit niedriger Frequenz zu beobachten: 63% aller nicht-synonymen Varianten sind mit einer Frequenz von $\leq 1\%$ vorhanden, bei den synonymen Varianten sind es nur 53%. Dies alles reflektiert eine negative Selektion schädigender Varianten (Marth et al., 2011).

Auch unsere Untersuchungen unterstützen diese Hypothese; so stieg der Anteil an Varianten mit $MAF \leq 1\%$ in *PLXNA4* von 83,8% bei den synonymen auf 90,9% bei den nicht-synonymen. Berücksichtigt man auch die intronischen Varianten, so liegt der Anteil an seltenen Varianten, die die Aminosäuresequenz nicht beeinflussen, bei 67,6%.

Aus diesen Überlegungen lässt sich ein negativer Zusammenhang zwischen Allelhäufigkeit und Effektstärke ableiten (siehe Abb. 1.1) (Manolio et al., 2009). Zum anderen bekräftigt dies die „common disease, rare variant“-Hypothese, also die Annahme, dass zumindest ein Teil der oben genannten „missing heritability“ von häufigen Erkrankungen wie PD durch seltene Varianten mit stärkerem Effekt zu erklären ist (Nelson et al., 2012; Kryukov et al., 2007).

In einer großen Studie (Tennesen et al., 2012) konnte vor kurzem gezeigt werden, dass der Großteil aller Varianten -nämlich 86%- eines Menschen selten ($MAF \leq 1\%$) sind. Ausserdem lag der Anteil an seltenen Varianten, die einen vorhergesagten funktionellen Effekt hatten, bei ca. 95,7%. Darüber hinaus wurde eine negative Korrelation zwischen vorhergesagter Schädlichkeit und MAF festgestellt. Insgesamt erklären die Autoren diesen hohen Anteil der seltenen Varianten mit dem geringen Selektionsdruck während des exponentiellen Bevölkerungswachstums der letzten ca. 4500 Jahre und gehen davon aus, dass diese seltenen Varianten stark zu phänotypischen Unterschieden und zur Krankheitsvererbung beitragen (Tennesen et al., 2012).

Gleichzeitig zeigte sich aber auch, dass die Teststärke, kausale Varianten zu entdecken, niedrig ist (Tennesen et al., 2012). So erreichten bei einer Fall- und Kontrollpopulation von je 400 weniger als 5% der getesteten Gene über 80% Teststärke, obwohl mit relativ hohen ORs von 5 gerechnet wurde.

Auch eine weitere Untersuchung zeigte einen großen Überschuss an seltenen Varianten in Genen für Proteine, die als pharmakologische Angriffspunkte dienen, von denen viele funktionelle Beeinträchtigungen verursachten (Nelson et al., 2012). Bei 14.002 Teilnehmern wurde insgesamt alle 17 Basenpaare eine Variante identifiziert, 95% davon waren selten ($MAF \leq 0,5\%$) und mehr als 74% waren nur in ein oder zwei Individuen zu beobachten. Im Verhältnis von synonymen zu nicht-synonymen Varianten zeigte sich hier eine ständige Zunahme des Anteils der synonymen Varianten, je höher die Frequenz der betrachteten Varianten ist. Dies wird als weiteres Indiz für die negative Selektion schädigender Varianten gesehen und spricht für eine höhere Wahrscheinlichkeit an Pathogenität, je seltener die Variante ist. Die Analyse der Varianten mittels Prädiktionsprogrammen brachte das erwartete Resultat: je seltener die Variante, desto eher gilt sie als schädigend (Nelson et al., 2012).

Im Sinne dieser Überlegungen ist eine funktionelle Relevanz der vielen seltenen von uns entdeckten Varianten also durchaus plausibel, auch wenn man vorsichtigerweise nicht

von einer monogenen, durch Varianten in *PLXNA4* ausgelösten Form von Parkinson ausgeht. Ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit einer intakten *PLXNA4*-Funktion im menschlichen Organismus ist die Tatsache, dass in allen untersuchten DNAs keine einzige Nonsense-Mutation gefunden wurde.

Insgesamt zeigte *PLXNA4* in unserer Kontrollpopulation eine Häufigkeit an nicht-synonymen Varianten von $8,4 * 10^{-5}$ Varianten pro Person pro Aminosäure. Dies kann man als Indikator für den Selektionsdruck sehen, der auf dem Gen liegt, es zeigt also wie gut eine veränderte oder verlorene Funktion eines Proteins noch vom Organismus ausgeglichen werden kann. Um die Toleranz gegenüber Varianten auch mit anderen Genen zu vergleichen, kann man die Anzahl der durch das 1000Genome Projekt (Abecasis et al., 2010) identifizierten nicht synonymen SNPs betrachten. Hier zeigt sich *PLXNA4* mit einer Rate von 0,049 SNPs pro Aminosäure zwischen sehr konservierten Genen, wie von Histonen (0,007 für *H3F3A*) und sehr variablen Genen des Immunsystems, wie beispielsweise von Interferonen (0,086 für *IFNB1*). Bei *PLXNA4* scheint es sich um ein Gen zu handeln, das relativ tolerant gegenüber Fehlern ist. Dies würde eher gegen eine Beteiligung an einer Erkrankung, die einen direkten, starken Einfluss auf die Reproduktionsfähigkeit hat, sprechen. PD ist jedoch eine Erkrankung des alten Menschen, das bedeutet, dass dies nicht automatisch bedeuten muss, dass Varianten in *PLXNA4* nicht als Auslöser oder Risikofaktor für diese Erkrankung in Frage kommen.

5.2.2. Plexine

Die richtige Vernetzung der Nervenzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) während der Entwicklung ist ein hochkomplexer Vorgang. Um die korrekte Verschaltung und damit auch die Funktionsfähigkeit gewährleisten zu können, muss dieser Vorgang bis ins kleinste Detail reguliert werden. Hierfür sind verschiedenste Signalmoleküle und Signalwege verantwortlich.

Eine Klasse dieser Signalmoleküle bilden die Semaphorine, die unter anderem Axon- und Dendritenwachstum und Verzweigung regulieren (Winberg et al., 1998) und die Verteilung und Morphologie dendritischer Dornfortsätze kontrollieren (Tran et al., 2009). Um ihre meist Axon-abstoßende Wirkung entfalten zu können, benötigen sie Rezeptoren auf den wachsenden Neuronen (Kitsukawa et al., 1997; Chen et al., 2000). Eine Gruppe dieser Rezeptoren bilden die Plexine (Takahashi et al., 1999; Tamagnone et al., 1999).

Plexine sind große Transmembranproteine mit einer N-terminalen extrazellulären Sema-Domäne. Ihr folgen eine Kombination von drei cysteinreichen PSI- (Plexin, Semaphorin, Integrin) und sechs IPT-Domänen (Ig domain shared by plexins and transcription factors). Auf der zytoplasmatischen Seite befindet sich eine Ras-GTPase-aktivierende-Protein(GAP)-Domäne mit einer darin enthaltenen Rho-GTPase-bindenden-Domäne (RBD) (Abb. 4.8) (Janssen et al., 2010).

Die unterschiedlichen Plexine, die auch verschiedene Semaphorine als Liganden haben, werden auf unterschiedlichen Neuronen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Funktionen exprimiert (Negishi et al., 2005). PLXNA4 ist der Rezeptor des sezernierten Klasse-3-Semaphorins SEMA3A (Suto et al., 2003) und der transmembranären Klasse-6-Semaphorine SEMA6A und SEMA6B (Suto et al., 2005). Für die Transduktion der Signale der sezernierten gelösten SEMA3A-Moleküle benötigt PLXNA4 nach aktuellem Kenntnisstand den Co-Rezeptor Neuropilin1 (Suto et al., 2003), während dies für die Transduktion der Signale der membranär gebundenen SEMA6A- und SEMA6B-Moleküle wohl nicht der Fall ist (Suto et al., 2005).

Durch die Bindung von Semaphorinen kann die GAP-Domäne der Plexine ihre Arbeit aufnehmen und sorgt so für eine Inaktivierung von GTPasen der Rho-Familie (besonders Rnd1) und für eine Aktivierung/Inaktivierung weiterer Signalmoleküle wie CRMP2/CRAM, GSK3 β , Cdk5 und Fyn (Reviewed in (Negishi et al., 2005)) (Abb. 5.1). Dadurch kommt es unter anderem durch Veränderungen in der Zytoskelettstabilität zu dessen Umbau und damit in den meisten Fällen zum Zusammenbruch der Wachstumsaussprossungen der Nervenzellen (Negishi et al., 2005).

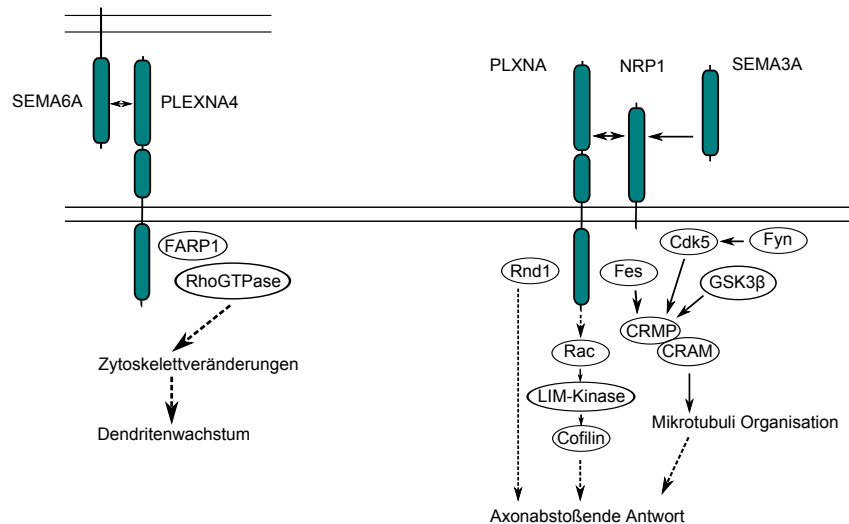


Abbildung 5.1. – Schematische Darstellung von an der Signaltransduktion von Semaphorinen und Plexinen beteiligten Signalmoleküle: Linker Teil nach (Zhuang et al., 2009); rechter Teil nach (Negishi et al., 2005)

PlxnA4^{-/-} Mäuse zeigen folgende Fehlbildungen des ZNS und des peripheren Nervensystems (PNS):

- Fehlerhafter Verlauf und Ausbreitung von peripheren sensiblen Nerven des Myelons, des Nervus (N) ophthalmicus, des N. trigeminus, des N. facialis, des N. glossopharyngeus und des N. vagus. (die gleichen Effekte, in abgeschwächter Form, waren auch bei heterozygoten Mäusen zu beobachten) (Suto et al., 2005)
- Fehlerhafte Austritte und Verläufe der Axone aus sympathischen, paravertebralen Ganglien und des Ganglion stellatum. Es zeigten sich Einwüchse in die anteriore vertebrale Muskulatur und in paravertebrales Bindegewebe sowie atypische Aussprossungen nach medial. (Suto et al., 2005; Waimey et al., 2008)
- Fehlerhafte Kreuzung der Fasern in der vorderen Kommissur (Suto et al., 2005)
- Fehlerhafte Bildung des Barrel-Cortex (Suto et al., 2005)
- Verminderte Bildung basaler Dendriten der kortikalen Pyramiden-Neurone in Layer 5 des Kortex (Tran et al., 2009)
- Fehlerhafte Migration sympathischer Neurone zu ihren Ganglien (bei gleichzeitigem Fehlen von *PlxnA3*) (Waimey et al., 2008)
- Fehlerhafte Projektion der Moosfasern im Hippocampus (Suto et al., 2007)

Bei Versuchen an Hühnerembryos konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass PLXNA4 am Dendritenwachstum spinaler Motoneurone beteiligt ist (Zhuang et al., 2009) und an Zebrafischen wurde die Bedeutung von *Plxna4* in der Aussprossung sensibler Axone gezeigt (Miyashita et al., 2004).

Desweiteren ist *PLXNA4* möglicherweise an der Entstehung von Alzheimer beteiligt. So wurde in einer GWAS ein SNP in der Sema-Domäne identifiziert, der eine Assoziation zu der Erkrankung an Alzheimer zeigte (Jun et al., 2014). Außerdem wurde nachgewiesen, dass PLXNA4 an der Phosphorylierung von Tau beteiligt ist, ein Protein, dass in der Pathogenese von Alzheimer eine Rolle spielt (Grundke-Iqbal et al., 1986). Auch die Expression von *PLXNA4* in post-mortem Hirngewebe war bei Alzheimer Patienten um das 1,9-fache ($p=6 * 10^{-4}$) erhöht (Jun et al., 2014).

5.2.3. Axon-Guidance-Moleküle als Auslöser neurodegenerativer Erkrankungen

Auch unter biologischem, beziehungsweise funktionellem Blickwinkel erscheint eine Rolle von *PLXNA4* in der Pathogenese von PD plausibel. Die Idee, dass Defekte in Molekülen, die für das Axonwachstum zuständig sind, ein Auslöser für neurodegenerative Erkrankungen sein könnten, ist nicht neu.

In einer GWAS von Maraganore et al. wurde ein SNP (rs7702187) in *SEMA5A*, einem Liganden eines Plexin-Rezeptors, als ein möglicher Suzeptibilitätsfaktor für Parkinson identifiziert (Maraganore et al., 2005). Es handelt sich hierbei um eine sehr frühe GWAS, die lediglich 775 Fälle und 775 Kontrollen einschloss. Eine andere Studie, die den gleichen SNP in *SEMA5A* auf Assoziation zu Parkinson untersuchte, konnte diese in einer taiwanesischen Population (n=303+171) feststellen, aber in einer, sehr kleinen, finnischen Population (146+135) nicht replizieren (Clarimon et al., 2006). Auch eine weitere Studie mit 427 Fällen und 412 Kontrollen aus Europa und Asien konnte keine Risikoerhöhung durch den SNP rs7702187 in *SEMA5A* nachweisen (Bialecka et al., 2006).

In einer weiteren GWAS von Fung et al. mit 537 Fällen und Kontrollen konnte eine Assoziation ebenfalls nicht repliziert werden (Fung et al., 2006). Auch in späteren größeren GWAS (Simón-Sánchez et al., 2009; Edwards et al., 2010; Satake et al., 2009) und Meta-Analysen (International Parkinson's Disease Genomics Consortium et al., 2011; Lill et al., 2012) konnte diese Assoziation nicht repliziert werden.

Allerdings konnte im Rahmen anderer Pathway-basierter Ansätze ein Zusammenhang zwischen SNPs in Genen, die eine Rolle im Axonwachstum spielen, und der Erkrankung

selbst und dem Erkrankungsbeginn von Parkinson gezeigt werden (Lesnick et al., 2007; Srinivasan et al., 2009). So ließ sich in einer Untersuchung von Lesnick et al., aufgrund einer Auswahl aus 1.460 untersuchten SNPs in 117 Genen, die eine Rolle im Axonwachstum spielen, recht sicher zwischen Fällen und Kontrollen unterscheiden (Konkordanz von 0,7 in der ersten (n=886) und 0,9 in der zweiten (n=537) Versuchsgruppe) (Lesnick et al., 2007). Außerdem konnten 68% der in der ersten und 71% der in der zweiten Versuchsgruppe beobachteten Unterschiede im Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns durch das Auftreten einer Auswahl aus diesen SNPs erklärt werden (Lesnick et al., 2007).

Weiterhin wurde die Expression der in dieser Studie untersuchten Gene in post-mortem Gewebe von Parkinson-Patienten (n=22) und Kontrollen (n=23) untersucht. In den untersuchten Regionen des Gehirns (Substantia nigra, Putamen und Nucleus caudatus) fiel dabei in mehr Genen eine vermehrte oder verminderte Genexpression in der Patientengruppe auf, als durch Zufall zu erwarten wäre (Lesnick et al., 2007). Während sich der Zusammenhang zwischen diesen SNPs in Genen des Axonwachstums und Parkinson in einer zweiten Assoziationsstudie von Srinivasan et al. (Srinivasan et al., 2009) sowohl mit dem Datensatz von (Lesnick et al., 2007), als auch in einer eigenen Versuchsgruppe (n=187+187) replizieren ließ, scheiterte diese Replikation in dem Datensatz von Fung et al. (Fung et al., 2006).

Auch in einer weiteren Studie mit 525 Fällen und 518 Kontrollen, bei der dieselben SNPs wie bei (Lesnick et al., 2007) analysiert wurden, konnten die Ergebnisse nicht repliziert werden (Li et al., 2008b).

Die Ergebnisse zu einem möglichen Zusammenhang zwischen Parkinson und Varianten in Axonleitmolekülen allgemein oder SEMA5A im speziellen, sind also höchst widersprüchlich und lassen keine Schlüsse zu. Ein Problem der hier besprochenen frühen GWAS ist die relativ kleine Anzahl an Fällen und Kontrollen. Dies wirkt sich besonders erschwerend auf die Detektion von Effekten mit kleinen ORs aus.

Zusammen betrachtet ist es möglich, dass es sich bei den in GWAS identifizierten Assoziationen um falsch-positive Ergebnisse handelt. Besonders die nicht mögliche Replikation der Assoziationen aus den frühen GWAS in zwei großen Studien mit über 3.400 Fällen und 3.700 Kontrollen (Evangelou et al., 2010) bzw. über 5.500 Fällen und über 6.600 Kontrollen (Elbaz et al., 2006) lässt dies wahrscheinlich erscheinen. Allerdings konnte eine kürzlich erschienene Studie (Jun et al., 2014) eine Assoziation zwischen *PLXNA4* und Alzheimer herstellen (näher beschrieben in: Kapitel 5.2.2).

Zu einem möglichen Zusammenhang zwischen seltenen genetischen Varianten in *PLXNA4* und einer Erkrankung an PD gibt es derzeit noch keine weiteren Untersuchungen.

Funktionell sind mehrere Mechanismen denkbar, die einen Zusammenhang zwischen fehlerhaftem Axonwachstum und Neurodegeneration erklären könnten. Zum einen eine fehlerhafte Vernetzung der entsprechenden Neurone während der Embryogenese. So hat das betroffene Individuum von Anfang an eine verminderte Anzahl an voll funktionsfähigen, beispielweise dopaminergen, Neuronen. Dieses Individuum hat nun weniger Reserven, um altersbedingte oder durch Umwelteinflüsse entstandene Verluste von spezifischen Neuronen zu kompensieren und erkrankt leichter an einer neurodegenerativen Erkrankung.

Zum anderen gibt es Hinweise, dass Axon-Leitmoleküle im erwachsenen Gehirn über gegenseitige Stimulation des prä- und postsynaptischen Neurons auch für die Aufrechterhaltung von synaptischen Verbindungen verantwortlich sind (Lin et al., 2009). Es wurde auch eine Beteiligung von SEMA3A an der Zerstörung der Axone und sogar an der Apoptose neuronaler Zellen gezeigt (Shirvan et al., 2000). In diesem Rahmen sind zum Beispiel eine Verkümmernung synaptischer Verbindungen und dadurch fehlende retrograde Wachstumsreize aus der Peripherie vorstellbar (Lin et al., 2009). Dies passt auch zu der Beobachtung, dass der Untergang der Neurone bei neurodegenerativen Erkrankungen von den Axonen ausgeht. (Vgl. Kapitel 1.3 Morbus Parkinson).

Aus diesen funktionellen Überlegungen könnte es also durchaus zutreffen, dass Varianten in *PLXNA4* eine neurodegenerative Erkrankung wie Parkinson begünstigen können.

5.3. Weiteres Vorgehen

Zusammengefasst kann man aufgrund der hier dargestellten Untersuchung weder ausschließen, dass die *PLXNA4*-Variante in unserer Familie an der Entstehung von PD beteiligt war, noch kann man diesen Zusammenhang aus den Ergebnissen schlussfolgern. Es ergaben sich aber Hinweise auf eine mögliche Beteiligung, die die Variante als interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen herausstellen. Auch bietet sich mit dieser Variante die Möglichkeit, den oben beschriebenen eventuellen Zusammenhang zwischen Axon-Leitmolekülen und Neurodegeneration weiter zu erforschen und eventuell zu bestätigen.

Eine Möglichkeit hierzu bieten funktionelle Untersuchungen, z.B. an Zellen der untersuchten Patienten, die den Gendefekt tragen. Allerdings tragen die Zellen der betroffenen

Patientin alle Kandidatenvarianten. Um eine einzelne Variante zu untersuchen müsste man also mehrere Zelllinien parallel züchten und die jeweils anderen Varianten korrigieren.

Die besten Zellen für eine aussagekräftige Untersuchung wären in diesem Fall dopaminerge Neurone. Allerdings ist es nicht möglich, bzw. nicht verhältnismäßig, solche direkt durch eine Biopsie zu gewinnen. Einen möglichen Ausweg bietet die Entnahme von Fibroblasten der betroffenen Patienten, um daraus erst sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) und daraus schließlich dopaminerge Zellen zu generieren. Für dieses Verfahren gibt es bereits beschriebene Protokolle (Sánchez-Danés et al., 2012). Eine Alternative bietet die direkte Induzierung von dopaminergen Neuronen aus Fibroblasten (Caiazzo et al., 2011). Dies bietet den Vorteil, dass der Umweg über die iPSCs vermieden wird, außerdem besitzen diese Zellen ein geringeres Entartungspotential. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass postmitotische Zellen entstehen, die kein Selbsterneuerungspotential mehr haben. Abhilfe könnte hier die Generierung von induzierten neuronalen Stammzellen (iNSCs) schaffen. Solche Zellen haben wenig Entartungspotential und besitzen noch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung in der Kultur (Ring et al., 2012).

Ein erster Schritt in diese Richtung wurde bereits unternommen. Sowohl von der Index-Patientin (IV:11), als auch von einem nicht variantentragenden Kind wurden Fibroblasten kultiviert. In ersten Versuchen wurde damit die subzelluläre Lokalisation von PLXNA4 mittels Immunzytochemie bestimmt. Desweiteren wurden die Zellen auf ihre Überlebensfähigkeit getestet. Dies ist insofern interessant, als bei einer degenerativen Erkrankung die Lebensspanne der Zellen verkürzt sein kann. So wurden bei Patienten mit einer Variante in *ATP13A2*, welche eine rezessive Form eines early-onset Parkinson-Syndroms auslösen kann (Ramirez et al., 2006) und sich auf die Lysosomfunktion auswirkt, bereits in Fibroblastenkulturen Unterschiede in der Überlebensfähigkeit der Zellen sichtbar (Dehay et al., 2012).

In Fibroblasten, mit der p.Ser657Asn-Variante und ohne zeigten sich keine Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von PLXNA4 (Abb. 5.2) oder im Überleben der Fibroblasten (Abb. 5.3) (Schulte et al., 2013).

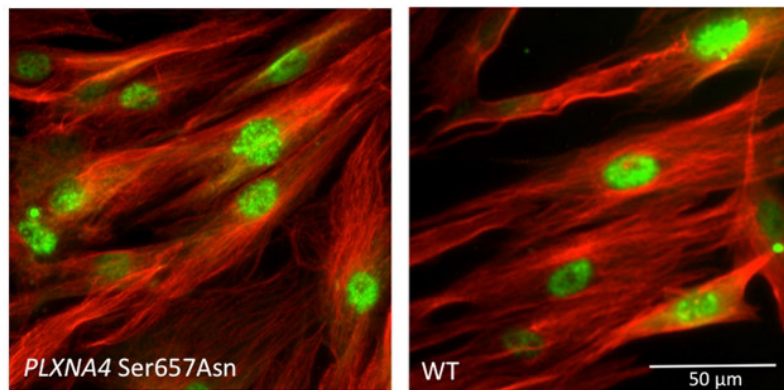


Abbildung 5.2. – Subzelluläre Lokalisation: Immunzytochemie an Fibroblasten mit und ohne Variante p.Ser657Asn: Rot: Aktin. Grün: PLXNA4; (Schulte et al., 2013)

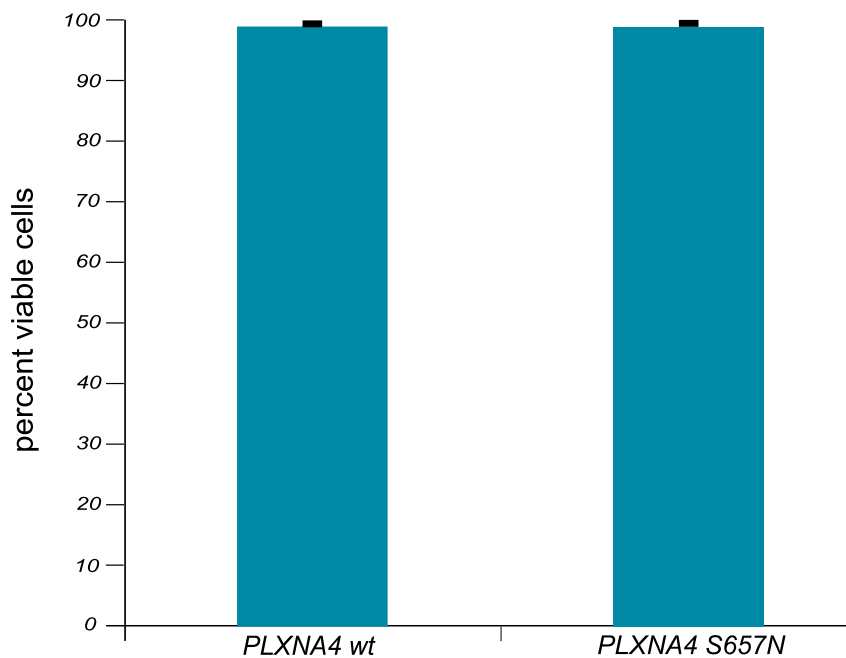


Abbildung 5.3. – Zellüberleben von Fibroblasten mit und ohne Variante p.Ser657Asn: Linker Balken: Wildtyp. Rechter Balken: *PLXNA4* p.Ser657Asn; Assay mit live/dead staining und FACS (Schulte et al., 2013)

Um als nächstes abweichendes Axon- und Dendritenwachstum zu zeigen, könnte jetzt für weitere Untersuchungen also die Generierung von Neuronen folgen. Dies wurde beispielsweise bei einer Studie zu autosomal dominanter hereditärer spastischer Paraplegie getan (Zhu et al., 2014). Nachdem bei einer betroffenen Patientin eine Variante in *ATL1* als Auslöser identifiziert wurde, wurden Fibroblasten gewonnen und aus diesen anhand bekannter Protokolle erst iPSCs und später glutamerge Vorderhirn-Neurone generiert. Diese Neurone wurden in ihren sogenannten Neurospheres (frei schwimmende Ansammlungen

dieser Zellen) auf Deckgläser gebracht und nach 48 Stunden wurde das stattgefunden Axonwachstum der Neurone untersucht. Hierbei fiel ein Unterschied in der Länge der gewachsenen Axone auf (Zhu et al., 2014).

In einer weiteren Studie wurde abweichendes Neuritenwachstum von murinen sympathischen Nervenzellen in Abhängigkeit vom *Plexin-A4*-Status der Zellen gezeigt. Auf je zwei Schichten L-Zellen, eine davon exprimierte Sema6B, wurden sympathische Nervenzellen von *PlxnA4*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen aufgebracht. Nach 24-stündiger Kultivierung wurde die Länge der Neurite gemessen. Nur die Zellen der Wildtyp-Mäuse reagierten auf das Vorhandensein von Sema6B mit einer massiven Verkürzung der Neurite (Suto et al., 2005).

5.4. Abschließende Betrachtung

Die Variante p.Ser657Asn in *PLXNA4* stellte sich in dieser Arbeit als bester Kandidat heraus, um in der untersuchten Familie für die Erkrankungen an PD verantwortlich zu sein. Allerdings ist dieses Ergebnis unter Vorbehalt zu sehen.

Kritikpunkte sind die Beschränkung der Analyse auf das Exom, das Verwenden unterschiedlicher Anreicherungskits sowie die Benutzung des gering positiven LOD-Scores als Hinweis aus der Linkage-Analyse. Auch ist auf die geringe Penetranz der Variante in der Familie hinzuweisen und auf die Möglichkeit, dass es sich bei dem betroffenen Verwandten der Indexpatientin nur um eine Phänokopie handelt und somit keine gemeinsame Variante der Auslöser ist. Da die identifizierte Variante sehr selten ist und keine weitere betroffene Familie mit der gleichen Variante gefunden wurde, bleiben als Möglichkeit zum Nachweis einer eventuellen Pathogenität z.B. zusätzliche funktionelle Analysen an Zell- oder Tiermodellen.

Außerdem zeigte sich in dieser Arbeit eine statistisch signifikante Häufung seltener, nicht-synonymer Varianten in *PLXNA4* bei PD-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

Ein Problem bei der Analyse dieser seltenen Varianten sind die großen Fall- und Kontrollpopulationen, die nötig sind, um Assoziationen aufzudecken (Bansal et al., 2010). Statistische Verfahren wie der von uns verwendete CAST können helfen die nötigen Zahlen zu verkleinern (Morgenthaler et al., 2007). Problematisch ist hierbei die unsichere Klassifizierung zwischen schädlichen, neutralen und möglicherweise sogar protektiven Va-

rianten. Eine Möglichkeit, die Schädlichkeit identifizierter Varianten zu verifizieren, bietet auch hier die funktionelle Analyse. Eine solche Analyse bei mehreren Varianten durchzuführen, besonders wenn diese möglicherweise nur in sehr spezifischen Situationen ihre Wirkung zeigen, erfordert allerdings einen sehr großen zeitlichen und technischen Aufwand. Um eine mögliche Beteiligung seltener Varianten in *PLXNA4* an der Entstehung von PD zu bestätigen, sollten die Ergebnisse in einer unabhängigen und größeren Fall- und Kontrollpopulation repliziert werden. Hierbei muss man jedoch beachten, dass trotz der Rekrutierung möglichst großer Fallzahlen auch ein homogener genetischer Hintergrund gewährleistet sein muss.

Zusammenfassend stützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass seltene genetische Varianten bei der Entstehung komplex-genetischer Erkrankungen eine Rolle spielen. Sie zeigen, dass *PLXNA4* im speziellen oder Axon-Guidance-Moleküle im allgemeinen interessante Kandidaten zur weiteren Erforschung dieser Gene bzw. Signalwege für neurodegenerative Erkrankungen wie PD sind.

6. Zusammenfassung

Die genetische Forschung konnte durch die Identifizierung von seltenen genetischen Varianten als kausale Krankheitsauslöser viel zum Verständnis der Pathogenese monogener Krankheiten beitragen. In GWAS wurden bei komplex-genetischen Erkrankungen häufige genetische Varianten identifiziert, die per se keine Erkrankung verursachen, aber mit einer niedrigen OR das Risiko für eine Krankheit erhöhen. Zusammengenommen erklären diese Erkenntnisse über seltene und häufige genetische Varianten noch nicht die Heritabilität vieler Erkrankungen. Ein Teil dieser sogenannten „missing heritability“ lässt sich möglicherweise durch bisher noch unentdeckte monogene sowie auch weitere häufige genetische Varianten erklären. Möglicherweise spielen auch seltene Varianten mit mittelgroßen ORs eine Rolle.

Auch bei PD ist durch die bisher identifizierten genetischen Varianten die beobachtete Heritabilität nicht erklärt.

In dieser Arbeit wurde eine Parkinson-Familie, in der die Erkrankung laut Stammbauanalyse dominant vererbt wird, mittels Exomsequenzierung analysiert. Das Ziel war es, eine seltene genetische Variante zu identifizieren, die in dieser Familie für eine monogen ausgelöste Form der Parkinson-Erkrankung verantwortlich ist.

Die durch NGS, Linkage-Analyse und Allelhäufigkeit bestimmte Kandidatenvariante p.Ser657Asn in *PLXNA4* ist sehr selten ($MAF < 0,001$) und wurde beim Abgleich mit verschiedenen Datenbanken (In-House Exom-Datenbank des Helmholtz Zentrums München, dbSNP, 1000 Genomes Project) bei keiner Person außerhalb der betrachteten Familie identifiziert. Bei der Segregationsanalyse innerhalb der Familie zeigte die Variante zum Untersuchungszeitpunkt eine Penetranz von 40%.

Um festzustellen, ob auch bei anderen PD-Patienten seltene Varianten in *PLXNA4* zu identifizieren sind, wurden alle kodierenden Regionen (31 Exons) von *PLXNA4* in einer Gruppe von Parkinson-Patienten ($N=862$) und in einer gesunden Kontrollgruppe ($N=940$) auf weitere genetische Varianten hin untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Häufung seltener, nicht-synonymer Varianten in der Patientengruppe (47 zu 30,

$p=0,018$ χ^2 -Test). Dies spricht für eine Beteiligung seltener Varianten in *PLXNA4* als Risikofaktor einer Erkrankung an PD.

PLXNA4 kodiert für ein Transmembranprotein aus der Gruppe der Plexine. Dies sind Rezeptoren auf Nervenzellen, die während der Embryogenese als Axon-Guidance-Moleküle für ein korrektes Axonwachstum spezifischer Neurone nötig sind.

Zum Nachweis der tatsächlichen Pathogenität der Variante p.Ser657Asn in *PLXNA4* sind weitere funktionelle Analysen, die eine veränderte Funktion oder einen Verlust der Funktion des Proteins zeigen, nötig. Darüber hinaus sollten zur Bestätigung weitere Parkinson-Familien mit genetischen Varianten in *PLXNA4* identifiziert werden. Eine Möglichkeit um zusätzliche Hinweise zur Beteiligung seltener Varianten in *PLXNA4* an der Entstehung von PD zu erhalten, wäre die Replikation der Ergebnisse in unabhängigen, größeren Fall- und Kontrollpopulationen.

Zusammenfassend stützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass seltene genetische Varianten bei der Entstehung komplex-genetischer Erkrankungen eine Rolle spielen. Sie zeigen, dass *PLXNA4* im speziellen oder Axon-Guidance-Moleküle im allgemeinen interessante Kandidaten zur weiteren Erforschung dieser Gene bzw. Signalwege für neurodegenerative Erkrankungen wie PD sind.

Literatur

- Abecasis, G. R., D. Altshuler, A. Auton, L. D. Brooks, R. M. Durbin, R. A. Gibbs, M. E. Hurles, G. A. McVean und 1000 Genomes Project Consortium (2010). „A map of human genome variation from population-scale sequencing.“ eng. In: *Nature* 467, S. 1061–1073.
- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A. S. Kondrashov und S. R. Sunyaev (2010). „A method and server for predicting damaging missense mutations.“ eng. In: *Nat Methods* 7, S. 248–249.
- Agrawal, A. F. und M. C. Whitlock (2012). „Mutation Load: The Fitness of Individuals in Populations Where Deleterious Alleles Are Abundant“. In: *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43, S. 115–135.
- Andres-Mateos, E., C. Perier, L. Zhang, B. Blanchard-Fillion, T. M. Greco, B. Thomas, H. S. Ko, M. Sasaki, H. Ischiropoulos, S. Przedborski, T. M. Dawson und V. L. Dawson (2007). „DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, S. 14807–14812.
- Audrezet, M.-P., A. Dabricot, C. Le Marechal und C. Ferec (2008). „Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene.“ eng. In: *J Mol Diagn* 10, S. 424–434.
- Avery, O. T., C. M. Macleod und M. McCarty (1944). „Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III.“ eng. In: *J Exp Med* 79, S. 137–158.
- Bairoch, A., R. Apweiler, C. H. Wu, W. C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M. J. Martin, D. A. Natale, C. O'Donovan, N. Redaschi und L. L. Yeh (2005). „The Universal Protein Resource (UniProt).“ eng. In: *Nucleic Acids Res* 33, S. D154–D159.
- Bamshad, M. J., S. B. Ng, A. W. Bigham, H. K. Tabor, M. J. Emond, D. A. Nickerson und J. Shendure (2011). „Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery.“ eng. In: *Nat Rev Genet* 12, S. 745–755.
- Bansal, V., O. Libiger, A. Torkamani und N. J. Schork (2010). „Statistical analysis strategies for association studies involving rare variants.“ eng. In: *Nat Rev Genet* 11, S. 773–785.
- Berg JM Tymoczko JL, S. L. (2002). *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman.
- Bialecka, M., M. Kurzawski, G. Klodowska-Duda, G. Opala, E. Tan und M. Drozdziak (2006). „Polymorphism in semaphorin 5A (Sema5A) gene is not a marker of Parkinson's disease risk.“ eng. In: *Neurosci Lett* 399, S. 121–123.
- Bonifati, V., E. Fabrizio, N. Vanacore, M. De Mari und G. Meco (1995). „Familial Parkinson's disease: a clinical genetic analysis.“ eng. In: *Can J Neurol Sci* 22, S. 272–279.
- Bonifati, V., P. Rizzu, M. J. van Baren, O. Schaap, G. J. Breedveld, E. Krieger, M. C. J. Dekker, F. Squitieri, P. Ibanez, M. Joosse, J. W. van Dongen, N. Vanacore, J. C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C. M. van Duijn, B. A. Oostra und P. Heutink (2003). „Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism.“ eng. In: *Science* 299, S. 256–259.

- Bonnefond, A., N. Clément, K. Fawcett, L. Yengo, E. Vaillant, J. Guillaume, A. Dechaume, F. Payne, R. Roussel, S. Czernichow, S. Hercberg, S. Hadjadj, B. Balkau, M. Marre, O. Lantieri, C. Langenberg, N. Bouatia-Naji, G. Charpentier, M. Vaxillaire, G. Rocheleau, N. J. Wareham, R. Sladek, M. I. McCarthy, C. Dina, I. Barroso, R. Jockers und P. Froguel (2012). „Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes.“ eng. In: *Nat Genet* 44, S. 297–301.
- Braak, H., K. Del Tredici, U. Rüb, R. A. I. de Vos, E. N. H. Jansen Steur und E. Braak (2003). „Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson’s disease.“ eng. In: *Neurobiol Aging* 24, S. 197–211.
- Braak, H. und K. Del Tredici (2008). „Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease.“ eng. In: *Neurology* 70, S. 1916–1925.
- Burke, R. E. und K. O’Malley (2012). „Axon degeneration in Parkinson’s disease.“ In: *Experimental Neurology*.
- Caiazzo, M., M. T. Dell’Anno, E. Dvoretzkova, D. Lazarevic, S. Taverna, D. Leo, T. D. Sotnikova, A. Menegon, P. Roncaglia, G. Colciago, G. Russo, P. Carninci, G. Pezzoli, R. R. Gainetdinov, S. Gustincich, A. Dityatev und V. Broccoli (2011). „Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts.“ eng. In: *Nature* 476, S. 224–227.
- Cargill, M., D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, K. Ardlie, N. Patil, N. Shaw, C. R. Lane, E. P. Lim, N. Kalyanaraman, J. Nemesh, L. Ziaugra, L. Friedland, A. Rolfe, J. Warrington, R. Lipshutz, G. Q. Daley und E. S. Lander (1999). „Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes.“ eng. In: *Nat Genet* 22, S. 231–238.
- Castello, P. R., D. A. Drechsel und M. Patel (2007). „Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain.“ eng. In: *J Biol Chem* 282, S. 14186–14193.
- Chen, H., A. Bagri, J. A. Zupicich, Y. Zou, E. Stoeckli, S. J. Pleasure, D. H. Lowenstein, W. C. Skarnes, A. Chédotal und M. Tessier-Lavigne (2000). „Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections.“ eng. In: *Neuron* 25, S. 43–56.
- Chen, H., S. M. Zhang, M. A. Schwarzschild, M. A. Hernán und A. Ascherio (2006). „Survival of Parkinson’s disease patients in a large prospective cohort of male health professionals.“ eng. In: *Mov Disord* 21, S. 1002–1007.
- Chial, H. (2008). „Mendelian genetics: Patterns of inheritance and single-gene disorders.“ In: *Nature Education* 1(1):63.
- Choudhury, A., S. Hazelhurst, A. Meintjes, O. Achinike-Oduaran, S. Aron, J. Gamiieldien, M. Jalali Sefid Dashti, N. Mulder, N. Tiffin und M. Ramsay (2014). „Population-specific common SNPs reflect demographic histories and highlight regions of genomic plasticity with functional relevance.“ eng. In: *BMC Genomics* 15, S. 437.
- Churchyard, A. und A. J. Lees (1997). „The relationship between dementia and direct involvement of the hippocampus and amygdala in Parkinson’s disease.“ eng. In: *Neurology* 49, S. 1570–1576.
- Clarimon, J., S. Scholz, H.-C. Fung, J. Hardy, J. Eerola, O. Hellstrom, C.-M. Chen, Y.-R. Wu, P. J. Tienari und A. Singleton (2006). „Conflicting results regarding the semaphorin gene (SEMA5A) and the risk for Parkinson disease.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 78, 1082–4; author reply 1092–4.

- Clark, I. E., M. W. Dodson, C. Jiang, J. H. Cao, J. R. Huh, J. H. Seol, S. J. Yoo, B. A. Hay und M. Guo (2006). „Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin.“ eng. In: *Nature* 441, S. 1162–1166.
- Cookson, M. R., G. Xiromerisiou und A. Singleton (2005). „How genetics research in Parkinson’s disease is enhancing understanding of the common idiopathic forms of the disease.“ eng. In: *Curr Opin Neurol* 18, S. 706–711.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines und M. A. Pericak-Vance (1993). „Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families.“ eng. In: *Science* 261, S. 921–923.
- Craig, J. (2008). „Complex diseases: Research and applications“. In: *Nature Education* 1(1):184.
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. London: Murray.
- Dehay, B., M. Martinez-Vicente, A. Ramirez, C. Perier, C. Klein, M. Vila und E. Bezdard (2012). „Lysosomal dysfunction in Parkinson disease: ATP13A2 gets into the groove.“ eng. In: *Autophagy* 8, S. 1389–1391.
- Draper, N., E. A. Walker, I. J. Bujalska, J. W. Tomlinson, S. M. Chalder, W. Arlt, G. G. Lavery, O. Bedendo, D. W. Ray, I. Laing, E. Malunowicz, P. C. White, M. Hewison, P. J. Mason, J. M. Connell, C. H. L. Shackleton und P. M. Stewart (2003). „Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency.“ eng. In: *Nat Genet* 34, S. 434–439.
- E. N. C. O. D. E Project Consortium (2012). „An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome.“ eng. In: *Nature* 489, S. 57–74.
- Edwards, T. L., W. K. Scott, C. Almonte, A. Burt, E. H. Powell, G. W. Beecham, L. Wang, S. Züchner, I. Konidari, G. Wang, C. Singer, F. Nahab, B. Scott, J. M. Stajich, M. Pericak-Vance, J. Haines, J. M. Vance und E. R. Martin (2010). „Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease.“ eng. In: *Ann Hum Genet* 74, S. 97–109.
- Eichler, E. E., J. Flint, G. Gibson, A. Kong, S. M. Leal, J. H. Moore und J. H. Nadeau (2010). „Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease.“ eng. In: *Nat Rev Genet* 11, S. 446–450.
- Elbaz, A., L. M. Nelson, H. Payami, J. P. A. Ioannidis, B. K. Fiske, G. Annesi, A. Carmine Belin, S. A. Factor, C. Ferrarese, G. M. Hadjigeorgiou, D. S. Higgins, H. Kawakami, R. Krüger, K. S. Marder, R. P. Mayeux, G. D. Mellick, J. G. Nutt, B. Ritz, A. Samii, C. M. Tanner, C. Van Broeckhoven, S. K. Van Den Eeden, K. Wirdefeldt, C. P. Zabetian, M. Dehem, J. S. Montimurro, A. Southwick, R. M. Myers und T. A. Trikalinos (2006). „Lack of replication of thirteen single-nucleotide polymorphisms implicated in Parkinson’s disease: a large-scale international study.“ eng. In: *Lancet Neurol* 5, S. 917–923.
- Ertekin-Taner, N. (2007). „Genetics of Alzheimer’s disease: a centennial review.“ eng. In: *Neurol Clin* 25, S. 611–67, v.
- Evangelou, E., D. M. Maraganore, G. Annesi, L. Brighina, A. Brice, A. Elbaz, C. Ferrarese, G. M. Hadjigeorgiou, R. Krueger, J.-C. Lambert, S. Lesage, K. Markopoulou, G. D. Mellick, B. Meeus, N. L. Pedersen, A. Quattrone, C. Van Broeckhoven, M. Sharma, P. A. Silburn, E.-K. Tan, K. Wirdefeldt, J. P. A. Ioannidis und G. (2010). „Non-replication

- of association for six polymorphisms from meta-analysis of genome-wide association studies of Parkinson's disease: large-scale collaborative study.“ eng. In: *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B, S. 220–228.
- Exome Sequencing Project (2015). „The NHLBI GO ESP Exome Variant Server“. In: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
- Fearnley, J. M. und A. J. Lees (1991). „Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity.“ eng. In: *Brain* 114 (Pt 5), S. 2283–2301.
- Feuk, L., A. R. Carson und S. W. Scherer (2006). „Structural variation in the human genome.“ eng. In: *Nat Rev Genet* 7, S. 85–97.
- Follett, K. A., F. M. Weaver, M. Stern, K. Hur, C. L. Harris, P. Luo, W. J. Marks Jr, J. Rothlind, O. Sagher, C. Moy, R. Pahwa, K. Burchiel, P. Hogarth, E. C. Lai, J. E. Duda, K. Holloway, A. Samii, S. Horn, J. M. Bronstein, G. Stoner, P. A. Starr, R. Simpson, G. Baltuch, A. De Salles, G. D. Huang, D. J. Reda und C. (2010). „Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease.“ eng. In: *N Engl J Med* 362, S. 2077–2091.
- Frazer, K. A., S. S. Murray, N. J. Schork und E. J. Topol (2009). „Human genetic variation and its contribution to complex traits.“ eng. In: *Nat Rev Genet* 10, S. 241–251.
- Freed, C. R., P. E. Greene, R. E. Breeze, W. Y. Tsai, W. DuMouchel, R. Kao, S. Dillon, H. Winfield, S. Culver, J. Q. Trojanowski, D. Eidelberg und S. Fahn (2001). „Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease.“ eng. In: *N Engl J Med* 344, S. 710–719.
- Fu, W., T. D. O'Connor, G. Jun, H. M. Kang, G. Abecasis, S. M. Leal, S. Gabriel, M. Rieder, D. Altshuler, J. Shendure, D. A. Nickerson, M. J. Bamshad, N. H. L. B. I Exome Sequencing Project und J. M. Akey (2013). „Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants.“ eng. In: *Nature* 493, S. 216–220.
- Fuhr, P., U. Gschwandtner, H. Brunnschweiler und E. Taub (2013). „[Practical aspects of the treatment of Parkinson's disease].“ ger. In: *Praxis (Bern 1994)* 102, S. 981–985.
- Fung, H.-C., S. Scholz, M. Matarin, J. Simón-Sánchez, D. Hernandez, A. Britton, J. R. Gibbs, C. Langefeld, M. L. Stiebert, J. Schymick, M. S. Okun, R. J. Mandel, H. H. Fernandez, K. D. Foote, R. L. Rodríguez, E. Peckham, F. W. De Vrieze, K. Gwinn-Hardy, J. A. Hardy und A. Singleton (2006). „Genome-wide genotyping in Parkinson's disease and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data.“ eng. In: *Lancet Neurol* 5, S. 911–916.
- Garritano, S., F. Gemignani, C. Voegelé, T. Nguyen-Dumont, F. Le Calvez-Kelm, D. De Silva, F. Lesueur, S. Landi und S. V. Tavtigian (2009). „Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus.“ eng. In: *BMC Genet* 10, S. 5.
- Gasser, T. (2009). „Mendelian forms of Parkinson's disease.“ eng. In: *Biochim Biophys Acta* 1792, S. 587–596.
- Gasser, T., J. Hardy und Y. Mizuno (2011). „Milestones in PD genetics.“ eng. In: *Mov Disord* 26, S. 1042–1048.
- Global Parkinson's Disease Survey Steering Committee (2002). „Factors impacting on quality of life in Parkinson's disease: results from an international survey.“ eng. In: *Mov Disord* 17, S. 60–67.
- Goetz, C. G. und G. Pal (2014). „Initial management of Parkinson's disease.“ eng. In: *BMJ* 349, g6258.

- Greffard, S., M. Verny, A.-M. Bonnet, J.-Y. Beinis, C. Gallinari, S. Meaume, F. Piette, J.-J. Hauw und C. Duyckaerts (2006). „Motor score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a good predictor of Lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra.“ eng. In: *Arch Neurol* 63, S. 584–588.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski und L. I. Binder (1986). „Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, S. 4913–4917.
- Gudnason, H., M. Dufva, D. D. Bang und A. Wolff (2007). „Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature.“ eng. In: *Nucleic Acids Res* 35, e127.
- Gundry, C. N., J. G. Vandersteen, G. H. Reed, R. J. Pryor, J. Chen und C. T. Wittwer (2003). „Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes.“ eng. In: *Clin Chem* 49, S. 396–406.
- Hamosh, A., A. F. Scott, J. S. Amberger, C. A. Bocchini und V. A. McKusick (2005). „Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders.“ eng. In: *Nucleic Acids Res* 33, S. D514–D517.
- Hamza, T. H. und H. Payami (2010). „The heritability of risk and age at onset of Parkinson’s disease after accounting for known genetic risk factors.“ eng. In: *J Hum Genet* 55, S. 241–243.
- Han, F und W. Pan (2010). „A data-adaptive sum test for disease association with multiple common or rare variants.“ eng. In: *Hum Hered* 70, S. 42–54.
- Hardy, J. und A. Singleton (2009). „Genomewide association studies and human disease.“ eng. In: *N Engl J Med* 360, S. 1759–1768.
- Hawkes, C. H., K. Del Tredici und H. Braak (2009). „Parkinson’s disease: the dual hit theory revisited.“ eng. In: *Ann N Y Acad Sci* 1170, S. 615–622.
- Healy, D. G., M. Falchi, S. S. O’Sullivan, V. Bonifati, A. Durr, S. Bressman, A. Brice, J. Aasly, C. P. Zabetian, S. Goldwurm, J. J. Ferreira, E. Tolosa, D. M. Kay, C. Klein, D. R. Williams, C. Marras, A. E. Lang, Z. K. Wszolek, J. Berciano, A. H. V. Schapira, T. Lynch, K. P. Bhatia, T. Gasser, A. J. Lees, N. W. Wood und I. (2008). „Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson’s disease: a case-control study.“ eng. In: *Lancet Neurol* 7, S. 583–590.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh und R. Griffith (1992). „Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.“ eng. In: *Biotechnology (N Y)* 10, S. 413–417.
- Hirschhorn, J. N. und M. J. Daly (2005). „Genome-wide association studies for common diseases and complex traits.“ eng. In: *Nat Rev Genet* 6, S. 95–108.
- Hughes, A. J., S. E. Daniel, L. Kilford und A. J. Lees (1992). „Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson’s disease: a clinico-pathological study of 100 cases.“ eng. In: *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55, S. 181–184.
- International Parkinson’s Disease Genomics Consortium und Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (W. T. C. C. C2) (2011). „A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson’s disease.“ eng. In: *PLoS Genet* 7, e1002142.
- Jann, M. W. (2011). „Advanced strategies for treatment of Parkinson’s disease: the role of early treatment.“ eng. In: *Am J Manag Care* 17 Suppl 12, S315–S321.
- Janssen, B. J. C., R. A. Robinson, F. Pérez-Brangulí, C. H. Bell, K. J. Mitchell, C. Siebold und E. Y. Jones (2010). „Structural basis of semaphorin-plexin signalling.“ eng. In: *Nature* 467, S. 1118–1122.

- Johnson, J. O., J. Mandrioli, M. Benatar, Y. Abramzon, V. M. Van Deerlin, J. Q. Trojanowski, J. R. Gibbs, M. Brunetti, S. Gronka, J. Wu, J. Ding, L. McCluskey, M. Martinez-Lage, D. Falcone, D. G. Hernandez, S. Arepalli, S. Chong, J. C. Schymick, J. Rothstein, F. Landi, Y.-D. Wang, A. Calvo, G. Mora, M. Sabatelli, M. R. Monsurro, S. Battistini, F. Salvi, R. Spataro, P. Sola, G. Borghero, I., G. Galassi, S. W. Scholz, J. P. Taylor, G. Restagno, A. Chiò und B. J. Traynor (2010). „Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS.“ eng. In: *Neuron* 68, S. 857–864.
- Jun, G., H. Asai, E. Zeldich, E. Drapeau, C. Chen, J. Chung, J.-H. Park, S. Kim, V. Haroutunian, T. Foroud, R. Kuwano, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, G. D. Schellenberg, K. L. Lunetta, J.-W. Kim, J. D. Buxbaum, R. Mayeux, T. Ikezu, C. R. Abraham und L. A. Farrer (2014). „PLXNA4 is associated with Alzheimer disease and modulates tau phosphorylation.“ eng. In: *Ann Neurol* 76, S. 379–392.
- Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno und N. Shimizu (1998). „Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.“ eng. In: *Nature* 392, S. 605–608.
- Kitsukawa, T., M. Shimizu, M. Sanbo, T. Hirata, M. Taniguchi, Y. Bekku, T. Yagi und H. Fujisawa (1997). „Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice.“ eng. In: *Neuron* 19, S. 995–1005.
- Kondrashov, A. S. (2003). „Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases.“ eng. In: *Hum Mutat* 21, S. 12–27.
- Kryukov, G. V., L. A. Pennacchio und S. R. Sunyaev (2007). „Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 80, S. 727–739.
- Kuhlenbäumer, G., J. Hullmann und S. Appenzeller (2011). „Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders.“ eng. In: *Hum Mutat* 32, S. 144–151.
- Kumar, P., S. Henikoff und P. C. Ng (2009). „Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm.“ eng. In: *Nat Protoc* 4, S. 1073–1081.
- Kuzuhara, S., H. Mori, N. Izumiyama, M. Yoshimura und Y. Ihara (1988). „Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study.“ eng. In: *Acta Neuropathol* 75, S. 345–353.
- L’Episcopo, F., C. Tirolo, N. Testa, S. Caniglia, M. C. Morale, M. Deleidi, M. F. Serapide, S. Pluchino und B. Marchetti (2012). „Plasticity of subventricular zone neuroprogenitors in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse model of Parkinson’s disease involves cross talk between inflammatory and Wnt/ β -catenin signaling pathways: functional consequences for neuroprotection and repair.“ eng. In: *J Neurosci* 32, S. 2062–2085.
- Lang, A. E. (2011). „A critical appraisal of the premotor symptoms of Parkinson’s disease: potential usefulness in early diagnosis and design of neuroprotective trials.“ eng. In: *Mov Disord* 26, S. 775–783.
- Lang, A. E. und A. M. Lozano (1998a). „Parkinson’s disease. First of two parts.“ eng. In: *N Engl J Med* 339, S. 1044–1053.
- (1998b). „Parkinson’s disease. Second of two parts.“ eng. In: *N Engl J Med* 339, S. 1130–1143.

- Langston, J. W., P. Ballard, J. W. Tetrud und I. Irwin (1983). „Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis.“ eng. In: *Science* 219, S. 979–980.
- Lastres-Becker, I., A. Ulusoy, N. G. Innamorato, G. Sahin, A. Rábano, D. Kirik und A. Cuadrado (2012). „Synuclein expression and Nrf2 deficiency cooperate to aggravate protein aggregation, neuronal death and inflammation in early-stage Parkinson’s disease.“ eng. In: *Hum Mol Genet* 21, S. 3173–3192.
- Laurie, A. D. und P. M. George (2009). „Evaluation of high-resolution melting analysis for screening the LDL receptor gene.“ eng. In: *Clin Biochem* 42, S. 528–535.
- Lee, C. S., A. Samii, V. Sossi, T. J. Ruth, M. Schulzer, J. E. Holden, J. Wudel, P. K. Pal, R. de la Fuente-Fernandez, D. B. Calne und A. J. Stoessl (2000). „In vivo positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic dopaminergic nerve terminals in Parkinson’s disease.“ eng. In: *Ann Neurol* 47, S. 493–503.
- Lesage, S., A. Dürr, M. Tazir, E. Lohmann, A.-L. Leutenegger, S. Janin, P. Pollak, A. Brice und F. (2006). „LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson’s disease in North African Arabs.“ eng. In: *N Engl J Med* 354, S. 422–423.
- Lesnick, T. G., S. Papapetropoulos, D. C. Mash, J. Ffrench-Mullen, L. Shehadeh, M. de Andrade, J. R. Henley, W. A. Rocca, J. E. Ahlskog und D. M. Maraganore (2007). „A genomic pathway approach to a complex disease: axon guidance and Parkinson disease.“ eng. In: *PLoS Genet* 3, e98.
- Li, B. und S. M. Leal (2008a). „Methods for detecting associations with rare variants for common diseases: application to analysis of sequence data.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 83, S. 311–321.
- Li, Y.-J., W. K. Scott, D. J. Hedges, F. Zhang, P. C. Gaskell, M. A. Nance, R. L. Watts, J. P. Hubble, W. C. Koller, R. Pahwa, M. B. Stern, B. C. Hiner, J. Jankovic, F. A. Allen Jr, C. G. Goetz, F. Mastaglia, J. M. Stajich, R. A. Gibson, L. T. Middleton, A. M. Saunders, B. L. Scott, G. W. Small, K. K. Nicodemus, A. D. Reed, D. E. Schmechel, K. A. Welsh-Bohmer, P. M. Conneally, A. D. Roses, J. R. Gilbert, J. M. Vance, J. L. Haines und M. A. Pericak-Vance (2002). „Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 70, S. 985–993.
- Li, Y., C. Rowland, G. Xiromerisiou, R. J. Lagier, S. J. Schrodi, E. Dradiotis, D. Ross, N. Bui, J. Catanese, K. Aggelakis, A. Grupe und G. Hadjigeorgiou (2008b). „Neither replication nor simulation supports a role for the axon guidance pathway in the genetics of Parkinson’s disease.“ eng. In: *PLoS One* 3, e2707.
- Lill, C. M. et al. (2012). „Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson’s disease genetics: The PDGene database.“ eng. In: *PLoS Genet* 8, e1002548.
- Lim, S.-Y., S. H. Fox und A. E. Lang (2009). „Overview of the extranigral aspects of Parkinson disease.“ eng. In: *Arch Neurol* 66, S. 167–172.
- Lin, L., T. G. Lesnick, D. M. Maraganore und O. Isacson (2009). „Axon guidance and synaptic maintenance: preclinical markers for neurodegenerative disease and therapeutics.“ eng. In: *Trends Neurosci* 32, S. 142–149.
- Loewe, L. (2008). „Negative Selection“. In: *Nature Education* 1(1):59.
- Ma, S. Y., M. Røyttä, J. O. Rinne, Y. Collan und U. K. Rinne (1997). „Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson’s disease using disector counts.“ eng. In: *J Neurol Sci* 151, S. 83–87.
- Maetzler, W. und J. M. Hausdorff (2012). „Motor signs in the prodromal phase of Parkinson’s disease.“ eng. In: *Mov Disord* 27, S. 627–633.

- Mamanova, L., A. J. Coffey, C. E. Scott, I. Kozarewa, E. H. Turner, A. Kumar, E. Howard, J. Shendure und D. J. Turner (2010). „Target-enrichment strategies for next-generation sequencing.“ eng. In: *Nat Methods* 7, S. 111–118.
- Mandel, M und J Marmur (1968). „Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA“. In: *Methods in Enzymology* 12, S. 198–206.
- Manolio, T. A., L. D. Brooks und F. S. Collins (2008). „A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease.“ eng. In: *J Clin Invest* 118, S. 1590–1605.
- Manolio, T. A., F. S. Collins, N. J. Cox, D. B. Goldstein, L. A. Hindorf, D. J. Hunter, M. I. McCarthy, E. M. Ramos, L. R. Cardon, A. Chakravarti, J. H. Cho, A. E. Guttmacher, A. Kong, L. Kruglyak, E. Mardis, C. N. Rotimi, M. Slatkin, D. Valle, A. S. Whittemore, M. Boehnke, A. G. Clark, E. E. Eichler, G. Gibson, J. L. Haines, T. F. C. Mackay, S. A. McCarroll und P. M. Visscher (2009). „Finding the missing heritability of complex diseases.“ eng. In: *Nature* 461, S. 747–753.
- Maraganore, D. M., M. de Andrade, T. G. Lesnick, K. J. Strain, M. J. Farrer, W. A. Rocca, P. V. K. Pant, K. A. Frazer, D. R. Cox und D. G. Ballinger (2005). „High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 77, S. 685–693.
- Mardis, E. R. (2008). „Next-generation DNA sequencing methods.“ eng. In: *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9, S. 387–402.
- Marth, G. T., F Yu, A. R. Indap, K. Garimella, S. Gravel, W. F. Leong, C. Tyler-Smith, M. Bainbridge, T. Blackwell, X. Zheng-Bradley, Y. Chen, D. Challis, L. Clarke, E. V. Ball, K. Cibulskis, D. N. Cooper, B. Fulton, C. Hartl, D. Koboldt, D. Muzny, R. Smith, C. Sougnez, C. Stewart, A. Ward, J. Yu, Y. Xue, D. Altshuler, C. D. Bustamante, A. G. Clark, M. Daly, M. DePristo, P. Flicek, S. Gabriel, E. Mardis, A. Palotie, R. Gibbs und G. (2011). „The functional spectrum of low-frequency coding variation.“ eng. In: *Genome Biol* 12, R84.
- Matise, T. C., R. Sachidanandam, A. G. Clark, L. Kruglyak, E. Wijsman, J. Kakol, S. Buyske, B. Chui, P. Cohen, C. de Toma, M. Ehm, S. Glanowski, C. He, J. Heil, K. Markianos, I. McMullen, M. A. Pericak-Vance, A. Silbergleit, L. Stein, M. Wagner, A. F. Wilson, J. D. Winick, E. S. Winn-Deen, C. T. Yamashiro, H. M. Cann, E. Lai und A. L. Holden (2003). „A 3.9-centimorgan-resolution human single-nucleotide polymorphism linkage map and screening set.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 73, S. 271–284.
- McAllister, J. M., R. S. Legro, B. P. Modi und J. F. Strauss 3rd (2015). „Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms.“ eng. In: *Trends Endocrinol Metab*.
- McCarthy, M. I., G. R. Abecasis, L. R. Cardon, D. B. Goldstein, J. Little, P. A. Ioannidis J und J. N. Hirschhorn (2008). „Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges.“ eng. In: *Nat Rev Genet* 9, S. 356–369.
- Mendel, G. (1866). „Versuche über Pflanzen-Hybriden“. In: *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins zu Brünn* 4, S. 3–47.
- Metzker, M. L. (2010). „Sequencing technologies - the next generation.“ eng. In: *Nat Rev Genet* 11, S. 31–46.
- Miko, I. (2008). „Phenotype variability: penetrance and expressivity“. In: *Nature Education* 1(1):137.
- Miyashita, T., S.-Y. Yeo, Y. Hirate, H. Segawa, H. Wada, M. H. Little, T. Yamada, N. Takahashi und H. Okamoto (2004). „PlexinA4 is necessary as a downstream target

- of Islet2 to mediate Slit signaling for promotion of sensory axon branching.“ eng. In: *Development* 131, S. 3705–3715.
- Morens, D. M., J. W. Davis, A. Grandinetti, G. W. Ross, J. S. Popper und L. R. White (1996). „Epidemiologic observations on Parkinson’s disease: incidence and mortality in a prospective study of middle-aged men.“ eng. In: *Neurology* 46, S. 1044–1050.
- Morgenthaler, S. und W. G. Thilly (2007). „A strategy to discover genes that carry multi-allelic or mono-allelic risk for common diseases: a cohort allelic sums test (CAST).“ eng. In: *Mutat Res* 615, S. 28–56.
- Morton, N. E. (1955). „Sequential tests for the detection of linkage.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 7, S. 277–318.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloona (1987). „Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.“ eng. In: *Methods Enzymol* 155, S. 335–350.
- Nachman, M. W. und S. L. Crowell (2000). „Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans.“ eng. In: *Genetics* 156, S. 297–304.
- Nadeau, J. H. (2001). „Modifier genes in mice and humans.“ eng. In: *Nat Rev Genet* 2, S. 165–174.
- Narendra, D., A. Tanaka, D.-F. Suen und R. J. Youle (2008). „Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy.“ eng. In: *J Cell Biol* 183, S. 795–803.
- Negishi, M., I. Oinuma und H. Katoh (2005). „Plexins: axon guidance and signal transduction.“ eng. In: *Cell Mol Life Sci* 62, S. 1363–1371.
- Nelson, M. R., D. Wegmann, M. G. Ehm, D. Kessner, P. St Jean, C. Verzilli, J. Shen, Z. Tang, S.-A. Bacanu, D. Fraser, L. Warren, J. Aponte, M. Zawistowski, X. Liu, H. Zhang, Y. Zhang, J. Li, Y. Li, L. Li, P. Woollard, S. Topp, M. D. Hall, K. Nangle, J. Wang, G. Abecasis, L. R. Cardon, S. Zöllner, J. C. Whittaker, S. L. Chisoe, J. Novembre und V. Mooser (2012). „An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people.“ eng. In: *Science* 337, S. 100–104.
- Ng, P. C. und S Henikoff (2006). „Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function.“ eng. In: *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, S. 61–80.
- Nussbaum, R. L. und C. E. Ellis (2003). „Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease.“ eng. In: *N Engl J Med* 348, S. 1356–1364.
- Okatsu, K., T. Oka, M. Iguchi, K. Imamura, H. Kosako, N. Tani, M. Kimura, E. Go, F. Koyano, M. Funayama, K. Shiba-Fukushima, S. Sato, H. Shimizu, Y. Fukunaga, H. Taniguchi, M. Komatsu, N. Hattori, K. Mihara, K. Tanaka und N. Matsuda (2012). „PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria.“ eng. In: *Nat Commun* 3, S. 1016.
- Olanow, C. W. und P. Brundin (2013). „Parkinson’s disease and alpha synuclein: is Parkinson’s disease a prion-like disorder?“ eng. In: *Mov Disord* 28, S. 31–40.
- Oliveira, S. A., Y.-J. Li, M. A. Noureddine, S. Zuchner, X. Qin, M. A. Pericak-Vance und J. M. Vance (2005). „Identification of risk and age-at-onset genes on chromosome 1p in Parkinson disease.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 77, S. 252–264.
- Ottolini, D., T. Calì, A. Negro und M. Brini (2013). „The Parkinson disease-related protein DJ-1 counteracts mitochondrial impairment induced by the tumour suppressor protein p53 by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria tethering.“ eng. In: *Hum Mol Genet* 22, S. 2152–2168.
- Ozelius, L. J., G. Senthil, R. Saunders-Pullman, E. Ohmann, A. Deligtisch, M. Tagliati, A. L. Hunt, C. Klein, B. Henick, S. M. Hailpern, R. B. Lipton, J. Soto-Valencia, N.

- Risch und S. B. Bressman (2006). „LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson’s disease in Ashkenazi Jews.“ eng. In: *N Engl J Med* 354, S. 424–425.
- Park, J.-H., M. H. Gail, C. R. Weinberg, R. J. Carroll, C. C. Chung, Z. Wang, S. J. Chanock, J. F. Fraumeni Jr und N. Chatterjee (2011). „Distribution of allele frequencies and effect sizes and their interrelationships for common genetic susceptibility variants.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, S. 18026–18031.
- Parkinson, J. (2002). „An essay on the shaking palsy. 1817.“ eng. In: *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14, 223–36; discussion 222.
- Payami, H., K. Larsen, S. Bernard und J. Nutt (1994). „Increased risk of Parkinson’s disease in parents and siblings of patients.“ eng. In: *Ann Neurol* 36, S. 659–661.
- Piccini, P., D. J. Brooks, A. Björklund, R. N. Gunn, P. M. Grasby, O. Rimoldi, P. Brundin, P. Hagell, S. Rehncrona, H. Widner und O. Lindvall (1999). „Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson’s patient.“ eng. In: *Nat Neurosci* 2, S. 1137–1140.
- Pinto, D. e. a. (2010). „Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders.“ eng. In: *Nature* 466, S. 368–372.
- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanasiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe und R. L. Nussbaum (1997). „Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson’s disease.“ eng. In: *Science* 276, S. 2045–2047.
- Price, A. L., G. V. Kryukov, P. I. W. de Bakker, S. M. Purcell, J. Staples, L.-J. Wei und S. R. Sunyaev (2010). „Pooled association tests for rare variants in exon-resequencing studies.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 86, S. 832–838.
- Pulst, S. M. (1999). „Genetic linkage analysis.“ eng. In: *Arch Neurol* 56, S. 667–672.
- Raj, T., J. M. Shulman, B. T. Keenan, L. B. Chibnik, D. A. Evans, D. A. Bennett, B. E. Stranger und P. L. De Jager (2012). „Alzheimer disease susceptibility loci: evidence for a protein network under natural selection.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 90, S. 720–726.
- Ramirez, A., A. Heimbach, J. Gründemann, B. Stiller, D. Hampshire, L. P. Cid, I. Goebel, A. F. Mubaidin, A.-L. Wriekat, J. Roeper, A. Al-Din, A. M. Hillmer, M. Karsak, B. Liss, C. G. Woods, M. I. Behrens und C. Kubisch (2006). „Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase.“ eng. In: *Nat Genet* 38, S. 1184–1191.
- Rauch, A., D. Wieczorek, E. Graf, T. Wieland, S. Endeke, T. Schwarzmayr, B. Albrecht, D. Bartholdi, J. Beygo, N. Di Donato, A. Dufke, K. Cremer, M. Hempel, D. Horn, J. Hoyer, P. Joset, A. Röpke, U. Moog, A. Riess, C. T. Thiel, A. Tzschach, A. Wiesener, E. Wohlleber, C. Zweier, A. B. Ekici, A. M. Zink, A. Rump, C. Meisinger, H. Grallert, H. Sticht, A. Schenck, H. Engels, G. Rappold, E. Schröck, P. Wieacker, O. Riess, T. Meitinger, A. Reis und T. M. Strom (2012). „Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study.“ eng. In: *Lancet* 380, S. 1674–1682.
- Riederer, P. und S. Wuketich (1976). „Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson’s disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis.“ eng. In: *J Neural Transm* 38, S. 277–301.
- Ring, K. L., L. M. Tong, M. E. Balestra, R. Javier, Y. Andrews-Zwilling, G. Li, D. Walker, W. R. Zhang, A. C. Kreitzer und Y. Huang (2012). „Direct reprogramming of mouse

- and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor.“ eng. In: *Cell Stem Cell* 11, S. 100–109.
- Roach, J. C., G. Glusman, A. F. A. Smit, C. D. Huff, R. Hubley, P. T. Shannon, L. Rowen, K. P. Pant, N. Goodman, M. Bamshad, J. Shendure, R. Drmanac, L. B. Jorde, L. Hood und D. J. Galas (2010). „Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing.“ eng. In: *Science* 328, S. 636–639.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich (1988). „Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.“ eng. In: *Science* 239, S. 487–491.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, S. 5463–5467.
- Satake, W., Y. Nakabayashi, I. Mizuta, Y. Hirota, C. Ito, M. Kubo, T. Kawaguchi, T. Tsunoda, M. Watanabe, A. Takeda, H. Tomiyama, K. Nakashima, K. Hasegawa, F. Obata, T. Yoshikawa, H. Kawakami, S. Sakoda, M. Yamamoto, N. Hattori, M. Murata, Y. Nakamura und T. Toda (2009). „Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson’s disease.“ eng. In: *Nat Genet* 41, S. 1303–1307.
- Schaaf, C. und J. Zschocke (2008). *Basiswissen Humangenetik*. Berlin: Springer Verlag.
- Scherman, D., C. Desnos, F. Darchen, P. Pollak, F. Javoy-Agid und Y. Agid (1989). „Striatal dopamine deficiency in Parkinson’s disease: role of aging.“ eng. In: *Ann Neurol* 26, S. 551–557.
- Schulte, E. C., B. Mollenhauer, A. Zimprich, B. Bereznai, P. Lichtner, D. Haubenberger, W. Pirker, T. Brücke, M. J. Molnar, A. Peters, C. Gieger, C. Trenkwalder und J. Winkelmann (2012). „Variants in eukaryotic translation initiation factor 4G1 in sporadic Parkinson’s disease.“ eng. In: *Neurogenetics* 13, S. 281–285.
- Schulte, E. C., I. Stahl, D. Czamara, D. C. Ellwanger, S. Eck, E. Graf, B. Mollenhauer, A. Zimprich, P. Lichtner, D. Haubenberger, W. Pirker, T. Brücke, B. Bereznai, M. J. Molnar, A. Peters, C. Gieger, B. Müller-Myhsok, C. Trenkwalder und J. Winkelmann (2013). „Rare variants in PLXNA4 and Parkinson’s disease.“ eng. In: *PLoS One* 8, e79145.
- Schwarz, J. M., C. Rödelberger, M. Schuelke und D. Seelow (2010). „MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations.“ eng. In: *Nat Methods* 7, S. 575–576.
- Semchuk, K. M., E. J. Love und R. G. Lee (1993). „Parkinson’s disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis.“ eng. In: *Neurology* 43, S. 1173–1180.
- Seyffert, W. (2003). *Lehrbuch der Genetik*, 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.,
- Sherry, S. T., M. H. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E. M. Smigielski und K. Sirotkin (2001). „dbSNP: the NCBI database of genetic variation.“ eng. In: *Nucleic Acids Res* 29, S. 308–311.
- Shigemizu, D., A. Fujimoto, S. Akiyama, T. Abe, K. Nakano, K. A. Boroevich, Y. Yamamoto, M. Furuta, M. Kubo, H. Nakagawa und T. Tsunoda (2013). „A practical method to detect SNVs and indels from whole genome and exome sequencing data.“ eng. In: *Sci Rep* 3, S. 2161.
- Shirvan, A., R. Shina, I. Ziv, E. Melamed und A. Barzilai (2000). „Induction of neuronal apoptosis by Semaphorin3A-derived peptide.“ eng. In: *Brain Res Mol Brain Res* 83, S. 81–93.

- Simón-Sánchez, J., C. Schulte, J. M. Bras, M. Sharma, J. R. Gibbs, D. Berg, C. Paisan-Ruiz, P. Lichtner, S. W. Scholz, D. G. Hernandez, R. Krüger, M. Federoff, C. Klein, A. Goate, J. Perlmutter, M. Bonin, M. A. Nalls, T. Illig, C. Gieger, H. Houlden, M. Steffens, M. S. Okun, B. A. Racette, M. R. Cookson, K. D. Foote, H. H. Fernandez, B. J. Traynor, S. Schreiber, S. Arepalli, R. Zonozi, K. Gwinn, M. van der Brug, G. Lopez, S. J. Chanock, A. Schatzkin, Y. Park, A. Hollenbeck, J. Gao, X. Huang, N. W. Wood, D. Lorenz, G. Deuschl, H. Chen, O. Riess, J. A. Hardy, A. B. Singleton und T. Gasser (2009). „Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson’s disease.“ eng. In: *Nat Genet* 41, S. 1308–1312.
- Singleton, A. B., M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hu- lihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M. R. Cookson, M. Muentner, M. Baptista, D. Miller, J. Blan- cato, J. Hardy und K. Gwinn-Hardy (2003). „alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson’s disease.“ eng. In: *Science* 302, S. 841.
- Sánchez-Danés, A., A. Consiglio, Y. Richaud, I. Rodríguez-Pizà, B. Dehay, M. Edel, J. Bové, M. Memo, M. Vila, A. Raya und J. C. Izpisua Belmonte (2012). „Efficient generation of A9 midbrain dopaminergic neurons by lentiviral delivery of LMX1A in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells.“ eng. In: *Hum Gene Ther* 23, S. 56–69.
- Sobreira, N. L. M., E. T. Cirulli, D. Avramopoulos, E. Wohler, G. L. Oswald, E. L. Stevens, D. Ge, K. V. Shianna, J. P. Smith, J. M. Maia, C. E. Gumbs, J. Pevsner, G. Thomas, D. Valle, J. E. Hoover-Fong und D. B. Goldstein (2010). „Whole-genome sequencing of a single proband together with linkage analysis identifies a Mendelian disease gene.“ eng. In: *PLoS Genet* 6, e1000991.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes und M. Goedert (1997). „Alpha-synuclein in Lewy bodies.“ eng. In: *Nature* 388, S. 839–840.
- Srinivasan, B. S., J. Doostzadeh, F. Absalan, S. Mohandessi, R. Jalili, S. Bigdeli, J. Wang, J. Mahadevan, C. L. G. Lee, R. W. Davis, J. William Langston und M. Ronaghi (2009). „Whole genome survey of coding SNPs reveals a reproducible pathway determinant of Parkinson disease.“ eng. In: *Hum Mutat* 30, S. 228–238.
- Stenson, P. D., E. V. Ball, M. Mort, A. D. Phillips, J. A. Shiel, N. S. T. Thomas, S. Abeyasinghe, M. Krawczak und D. N. Cooper (2003). „Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update.“ eng. In: *Hum Mutat* 21, S. 577–581.
- Strachan, T und A. Read (1999). *Human Molecular Genetics*. 2nd edition. New York: Wiley-Liss.
- Suto, F, Y Murakami, F Nakamura, Y Goshima und H Fujisawa (2003). „Identification and characterization of a novel mouse plexin, plexin-A4.“ eng. In: *Mech Dev* 120, S. 385–396.
- Suto, F., K. Ito, M. Uemura, M. Shimizu, Y. Shinkawa, M. Sanbo, T. Shinoda, M. Tsuboi, S. Takashima, T. Yagi und H. Fujisawa (2005). „Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance.“ eng. In: *J Neurosci* 25, S. 3628–3637.
- Suto, F., M. Tsuboi, H. Kamiya, H. Mizuno, Y. Kiyama, S. Komai, M. Shimizu, M. Sanbo, T. Yagi, Y. Hiromi, A. Chédotal, K. J. Mitchell, T. Manabe und H. Fujisawa (2007). „Interactions between plexin-A2, plexin-A4, and semaphorin 6A control lamina- restricted projection of hippocampal mossy fibers.“ eng. In: *Neuron* 53, S. 535–547.

- Takahashi, T., A. Fournier, F. Nakamura, L. H. Wang, Y. Murakami, R. G. Kalb, H. Fujisawa und S. M. Strittmatter (1999). „Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors.“ eng. In: *Cell* 99, S. 59–69.
- Tamagnone, L., S. Artigiani, H. Chen, Z. He, G. I. Ming, H. Song, A. Chedotal, M. L. Winberg, C. S. Goodman, M. Poo, M. Tessier-Lavigne und P. M. Comoglio (1999). „Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates.“ eng. In: *Cell* 99, S. 71–80.
- Tennessen, J. A., A. W. Bigham, T. D. O’Connor, W. Fu, E. E. Kenny, S. Gravel, S. McGee, R. Do, X. Liu, G. Jun, H. M. Kang, D. Jordan, S. M. Leal, S. Gabriel, M. J. Rieder, G. Abecasis, D. Altshuler, D. A. Nickerson, E. Boerwinkle, S. Sunyaev, C. D. Bustamante, M. J. Bamshad, J. M. Akey, B., S. und N. (2012). „Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes.“ eng. In: *Science* 337, S. 64–69.
- Thomas, P. D. und A. Kejariwal (2004). „Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: evolutionary evidence for differences in molecular effects.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, S. 15398–15403.
- Tissingh, G., P. Bergmans, J. Booij, A. Winogrodzka, E. A. van Royen, J. C. Stoof und E. C. Wolters (1998). „Drug-naïve patients with Parkinson’s disease in Hoehn and Yahr stages I and II show a bilateral decrease in striatal dopamine transporters as revealed by [123I]beta-CIT SPECT.“ eng. In: *J Neurol* 245, S. 14–20.
- Tran, T. S., M. E. Rubio, R. L. Clem, D. Johnson, L. Case, M. Tessier-Lavigne, R. L. Haganir, D. D. Ginty und A. L. Kolodkin (2009). „Secreted semaphorins control spine distribution and morphogenesis in the postnatal CNS.“ eng. In: *Nature* 462, S. 1065–1069.
- Tucker, T., M. Marra und J. M. Friedman (2009). „Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 85, S. 142–154.
- Valente, E. M., P. M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M. M. K. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A. R. Bentivoglio, D. G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. González-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W. P. Gilks, D. S. Latchman, R. J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger und N. W. Wood (2004). „Hereditary early-onset Parkinson’s disease caused by mutations in PINK1.“ eng. In: *Science* 304, S. 1158–1160.
- Vilariño-Güell, C., C. Wider, O. A. Ross, J. C. Daxsel, J. M. Kachergus, S. J. Lincoln, A. I. Soto-Ortolaza, S. A. Cobb, G. J. Wilhoite, J. A. Bacon, B. Behrouz, H. L. Melrose, E. Hentati, A. Puschmann, D. M. Evans, E. Conibear, W. W. Wasserman, J. O. Aasly, P. R. Burkhard, R. Djaldetti, J. Ghika, F. Hentati, A. Krygowska-Wajs, T. Lynch, E. Melamed, A. Rajput, A. H. Rajput, A. Solida, R.-M. Wu, R. J. Uitti, Z. K. Wszolek, F. Vingerhoets und M. J. Farrer (2011). „VPS35 mutations in Parkinson disease.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 89, S. 162–167.
- Waimey, K. E., P.-H. Huang, M. Chen und H.-J. Cheng (2008). „Plexin-A3 and plexin-A4 restrict the migration of sympathetic neurons but not their neural crest precursors.“ eng. In: *Dev Biol* 315, S. 448–458.
- Watson, J. D. und F. H. Crick (1953). „Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid.“ eng. In: *Nature* 171, S. 737–738.
- Weiß, C. und P. Bucszy (2005). *Basiswissen Medizinische Statistik*: Berlin: Springer.
- Wichmann, H.-E., C. Gieger, T. Illig und M. (2005). „KORA-gen—resource for population genetics, controls and a broad spectrum of disease phenotypes.“ eng. In: *Gesundheitswesen* 67 Suppl 1, S26–S30.

- Winberg, M. L., J. N. Noordermeer, L. Tamagnone, P. M. Comoglio, M. K. Spriggs, M. Tessier-Lavigne und C. S. Goodman (1998). „Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance.“ eng. In: *Cell* 95, S. 903–916.
- Winkelman, J., B. Schormair, P. Lichtner, S. Ripke, L. Xiong, S. Jalilzadeh, S. Fulda, B. Pütz, G. Eckstein, S. Hauk, C. Trenkwalder, A. Zimprich, K. Stiasny-Kolster, W. Oertel, C. G. Bachmann, W. Paulus, I. Peglau, I. Eisensehr, J. Montplaisir, G. Turecki, G. Rouleau, C. Gieger, T. Illig, H.-E. Wichmann, F. Holsboer, B. Müller-Myhsok und T. Meitinger (2007). „Genome-wide association study of restless legs syndrome identifies common variants in three genomic regions.“ eng. In: *Nat Genet* 39, S. 1000–1006.
- Wittwer, C. T., G. H. Reed, C. N. Gundry, J. G. Vandersteen und R. J. Pryor (2003). „High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen.“ eng. In: *Clin Chem* 49, S. 853–860.
- Zaghloul, N. A. und N. Katsanis (2010). „Functional modules, mutational load and human genetic disease.“ eng. In: *Trends Genet* 26, S. 168–176.
- Zhu, P.-P., K. R. Denton, T. M. Pierson, X.-J. Li und C. Blackstone (2014). „Pharmacologic rescue of axon growth defects in a human iPSC model of hereditary spastic paraplegia SPG3A.“ eng. In: *Hum Mol Genet* 23, S. 5638–5648.
- Zhuang, B., Y. S. Su und S. Sockanathan (2009). „FARP1 promotes the dendritic growth of spinal motor neuron subtypes through transmembrane Semaphorin6A and PlexinA4 signaling.“ eng. In: *Neuron* 61, S. 359–372.
- Zimprich, A., S. Biskup, P. Leitner, P. Lichtner, M. Farrer, S. Lincoln, J. Kachergus, M. Hulihan, R. J. Uitti, D. B. Calne, A. J. Stoessl, R. F. Pfeiffer, N. Patenge, I. C. Carbajal, P. Vieregge, F. Asmus, B. Müller-Myhsok, D. W. Dickson, T. Meitinger, T. M. Strom, Z. K. Wszolek und T. Gasser (2004). „Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology.“ eng. In: *Neuron* 44, S. 601–607.
- Zimprich, A., A. Benet-Pagès, W. Struhal, E. Graf, S. H. Eck, M. N. Offman, D. Haubenberger, S. Spielberger, E. C. Schulte, P. Lichtner, S. C. Rossle, N. Klopp, E. Wolf, K. Seppi, W. Pirker, S. Presslauer, B. Mollenhauer, R. Katzenschlager, T. Foki, C. Hotzy, E. Reinthaler, A. Harutyunyan, R. Kralovics, A. Peters, F. Zimprich, T. Brücke, W. Poewe, E. Auff, C. Trenkwalder, B. Rost, G. Ransmayr, J. Winkelman, T. Meitinger und T. M. Strom (2011). „A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease.“ eng. In: *Am J Hum Genet* 89, S. 168–175.
- de Lau, L. M. L. und M. M. B. Breteler (2006). „Epidemiology of Parkinson’s disease.“ eng. In: *Lancet Neurol* 5, S. 525–535.

A. Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Meitinger, Direktor des Instituts für Humangenetik des Helmholtz Zentrums München, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen.

Bei Frau Prof. Dr. Juliane Winkelmann möchte ich mich herzlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Dr. Eva Christina Schulte für die herausragende praktische Betreuung meiner Arbeit. Bei allen Fragen und Problemen konnte ich stets auf ihre freundliche, schnelle und kompetente Hilfe und Unterstützung bauen.

Für die bereitwillige und professionelle Hilfe im Labor danke ich Frau Jelena Golic, Frau Regina Feldmann, Frau Katja Junghans und Frau Susanne Lindhof.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Neurogenetik am Helmholtz Zentrum München für die freundliche Aufnahme, die Hilfe bei Problemen und die gute Atmosphäre, sei es im Labor oder in den Pausen, bedanken.

Zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie für ihre Unterstützung, besonders Dr. Oliver Scheickl für die Einführung in die Arbeit mit LaTeX. Der größte Dank gilt dabei allen voran meinen Eltern, die mich unermüdlich und großzügig in allen Lebensphasen und -bereichen unterstützten und ohne die all dies nicht möglich gewesen wäre.

B. Kongressbeitrag und Publikation

85. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Hamburg, 26.-29. September 2012)

Freier Vortrag: „Identifizierung von PLXNA4-Varianten bei Patienten mit Morbus Parkinson durch Exom-Sequenzierung“

Schulte EC, Stahl I, Czamara D, Ellwanger DC, Eck S, Graf E, Mollenhauer B, Zimprich A, Lichtner P, Haubenberger D, Pirker W, Brücke T, Bereznai B, Molnar MJ, Peters A, Gieger C, Müller-Myhsok B, Trenkwalder C, Winkelmann J: Rare variants in *PLXNA4* and Parkinson's disease. *PLoS One* 8:e79145 (2013).

C. Lebenslauf

Name Immanuel Georg Stahl

Geburtsdatum 08. August 1984

Geburtsort Nürnberg

Schulbildung

1991-2004 Freie Waldorfschule Chiemgau

2004 Abitur am staatlichen Landschulheim Marquardtstein

Zivildienst

2004-2005 Betreuung geistig und körperlich behinderter Menschen in den Wendelstein Werkstätten Raubling

Studium

2005-2006 Physik an der TU München

2006-2008 Germanistik an der LMU München

2008-2010 Medizin an der Universität Heidelberg

2010-2014 Medizin an der TU München

Weiterbildung

seit 2015 Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik am RoMed Klinikum Rosenheim