Aus dem Institut für Neurogenetik

Der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. med. C. Klein

Molekulare Mechanismen der Neurodegeneration bei Morbus Parkinson

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Martha Pierstorff

aus Neuss

Lübeck 2016

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. C. Klein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med W. Heide

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2017

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.02.2017

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Morbus Parkinson 1

1.1.1. Pathogenese 2

1.1.1.1. Korrelationen zwischen Klinik und Genetik 4

1.1.1.2. *ATP13A2* 6

1.1.1.3. *α-Synuclein* 7

1.1.1.4. *Parkin* 9

1.2. Zelltod 11

1.2.1. Apoptose 11

1.2.1.1. Signalwege der Apoptose 12

1.2.1.2. Regulation der Apoptose 14

1.2.1.3. Bcl_2-Familie 15

1.2.2. Autophagie und Mitophagie 15

1.2.3. Zelltod bei Morbus Parkinson 16

1.3. Vorarbeiten 16

1.3.1. Vorarbeiten der genetischen Analyse 16

1.3.2. Vorarbeiten der Proteinanalyse 17

1.4. Fragestellung und Zielsetzung 17

2. Patienten, Material und Methoden 18

2.1. Patienten 18

2.1.1. Population aus Lübeck 18

2.1.2. Lübecker Patientenkollektiv zur kompletten Sequenzanalyse 18

2.1.3. Population aus Spanien 19

2.1.4. Familie LA mit Kontrollen 19

2.1.5. Probe aus Chile 19

2.1.6. Weitere Proben 20

2.2. Material 20

2.2.1. Chemikalien 20

2.2.2. Lösungen 22

2.2.3. *Kits* 22

2.2.4. Antikörper 22

2.2.5. Oligonukleotide 23

2.2.6. Geräte ... 23
2.2.7. *Software* ... 24
2.2.8. Datenbanken ... 24
2.3. Methoden ... 24
2.3.1. DNA-Extraktion ... 24
2.3.2. Bestimmung der DNA-Konzentration ... 25
2.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR) ... 25
2.3.4. Gradienten-PCR ... 26
2.3.5. Agarosegel-Eletrophorese ... 26
2.3.6. DNA-Sequenzierung ... 27
2.3.7. PCR am *Light-Cycler®* und Schmelzkurvenanalyse ... 27
2.3.8. Zellkultur ... 29
2.3.8.1. Behandlung der Zellen mit Toxinen ... 29
2.3.9. *Tripan-blue-exclusion-Assay* ... 29
2.3.10. Lactat-Dehydrogenase-Messung ... 30
2.3.11. Proteinanalyse durch *Westernblot* ... 30
2.3.11.1. Herstellung von Zellhomogenisaten ... 30
2.3.11.2. Mitochondriale Präparation ... 30
2.3.11.3. Gel-Elektrophorese und Transfer ... 31
2.3.11.4. Inkubation mit Antikörpern ... 32
2.3.11.5. Chemilumineszenz ... 32
2.3.11.6. Quantitative Analyse der Banden ... 33
2.3.12. Auswertung/Statistik ... 33
3. Ergebnisse ... 34
3.1. Ergebnisse der genetischen Analyse ... 34
3.1.1. Schmelzkurvenanalyse am *Light-Cycler®* ... 34
3.1.1.1. Etablierung der *Primer* ... 35
3.1.1.2. Testung auf Sensitivität ... 37
3.1.1.3. Auswertung der Schmelzkurve ... 38
3.1.1.4. Vollständige Sequenzanalyse der *Light-Cycler®*-Proben ... 39
3.1.1.5. Probleme der Schmelzkurvenanalyse ... 41
3.1.2. Sequenzanalyse der Lübecker Proben zur kompletten Sequenzierung ... 41
3.1.2.1. Ermittelte Variantenträger ... 45
3.2. Ergebnisse zur Proteinanalyse ... 46

3.2.1. Morphologie der humanen Fibroblasten 46
3.2.2. Analyse des Sterbeverhaltens der Fibroblasten 47
3.2.2.1. *Tripan-blue-exclusion-Assay* 47
3.2.2.2. Laktat-Dehydrogenase-Messung 48
3.2.3. Expression von α-Synuclein in humanen Fibroblasten mit Mutationen im *Parkin*-Gen 49
3.2.3.1. Nachweis von α-Synuclein in *Parkin*-Mutationsträgern im Vergleich zu Kontrollen 50
3.2.3.2. Zelluläre Lokalisierung von α-Synuclein 51
3.2.4. Expression von α-Synuclein in Fibroblasten mit Mutationen im *ATP13A2*-Gen 52
3.2.5. Expression von Bax in Fibroblasten mit Mutationen im *Parkin*-Gen 53
3.2.6. Expression von Bax in Fibroblasten mit Mutationen im *ATP13A2*-Gen 53
3.2.7. Proteinanalyse in Fibroblasten mit Mutationen im *Parkin*-Gen unter oxidativem Stress mit H_2O_2 54
3.2.7.1. Expression von α-Synuclein unter oxidativem Stress mit H_2O_2 54
3.2.7.2. Expression von Bcl_2 und Bax unter oxidativem Stress mit H_2O_2 54

4. Diskussion 56
4.1. Bewertung der verwendeten Methoden 56
4.1.1. Schmelzkurvenanalyse 56
4.1.2. Sequenzanalyse der Proben zur kompletten Sequenzierung 57
4.1.3. Proteinanalyse mittels *Westernblot* 58
4.2. Mutationsanalyse bei Patienten mit Parkinson-Syndrom 59
4.3. Analyse des Zelltods bei Mutationsträgern auf Proteinebene 60
4.4. Fazit 66

5. Ausblick 68
6. Zusammenfassung 69
7. Literaturverzeichnis 73
8. Anhang IV
8.1. Abkürzungsverzeichnis IV
8.2. *Primer*-Tabellen VII
8.3. Ergebnistabellen VII
8.4. MOCA-*Score* XVII
8.5. Danksagung XVIII
8.6. Eidesstattliche Erklärung XIX

9. Lebenslauf XX

1. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Genetik und den pathologischen Abläufen auf molekularer Ebene des Morbus Parkinson (MP). Sie steht im Zusammenhang mit der Forschungsarbeit am Institut für Neurogenetik am Universitätsklinikum Schleswig Holstein (UKSH) Campus Lübeck unter der Leitung von Prof. Dr. Christine Klein.

Zu Beginn wird der MP allgemein beschrieben (*Kap. 1.1*). Im Anschluss folgt die Darstellung der Pathogenese und der hier verwendeten mit Morbus Parkinson assoziierten Gene sowie deren Klinik (*Kap. 1.1.1*). Die Verbindung zwischen der Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankung mit dem Zelltod wird in Kap. 1.2 erläutert. Das einleitende Kapitel schließt mit der Ausformulierung der Fragestellung und Zielsetzung dieser Forschungsarbeit ab (*Kap. 1.4*).

1.1. Morbus Parkinson

Der MP wurde erstmals im Jahre 1817 von James Parkinson beschrieben (Parkinson, 1817). Er bezeichnete die Krankheit damals als *shaking palsy*, wörtlich übersetzt als „zitternde Lähmung". 1960 bemerkten Ehringer und Hornykiewicz die Abwesenheit von Dopamin im Striatum erkrankter Menschen. Damit war eine richtungsweisende Grundlage zur Therapie und Forschung des MP bis zum heutigen Tage geschaffen (Ehringer und Hornykiewicz, 1960).

Neurologisch wird der MP in die Gruppe der akinetisch-rigiden Syndrome eingeteilt, die sich durch verminderte Spontan- und Mitbewegungen, Tonuserhöhung und eventuelle unwillkürliche Bewegungen auszeichnen (Lang und Lozano, 1998).

MP ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung mit einer Prävalenz von 56 – 234 / 100.000 Einwohner und einer daraus resultierenden Häufigkeit von 1 – 2 % in der Gesamtbevölkerung und ca 3 % in der Bevölkerung der über 65 Jährigen. 5 – 10 % aller MP-Erkrankungen sind durch familiäre Vererbung bedingt (Dorsey *et al.*, 2007).

Die Ursachen für die Entstehung des MP sind vielschichtig und in großen Teilen noch unbekannt. Man weiß, dass der MP zu 90 – 95 % idiopathisch auftritt. Allerdings konnten in der Vergangenheit mehrere Gene der Krankheit zugeordnet werden. Darüber hinaus kann das Parkinsonsyndrom (PS) durch eine Enzephalitis, durch toxische Stoffe, Medikamente oder Nahrungsfette induziert sein. Es gibt also viele Faktoren, die ihren Teil zur Entwicklung eines MP beitragen (Klein und Schlossmacher, 2007; Vance *et al.*, 2010; Kamel *et al*., 2014) (***Abb. 1***).

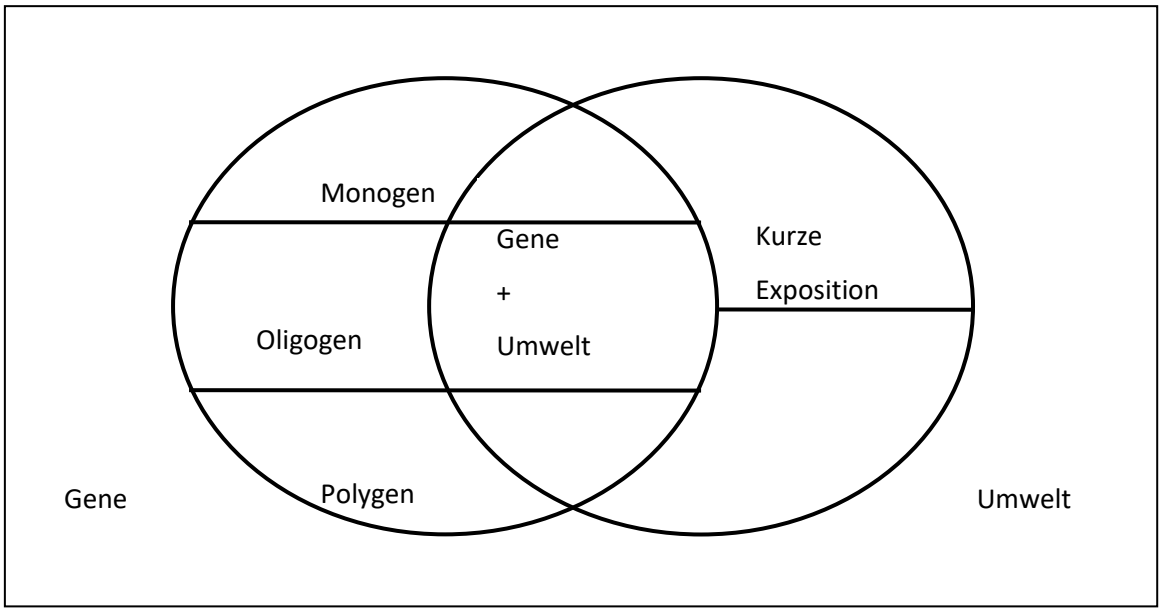


Abb. 1: Modell zur multifaktoriellen Entstehung von Krankheiten, wie z.B. der Morbus Parkinson (Klein und Lohmann-Hedrich, 2007).

Den MP zeichnen vier Kardinalsymptome aus, die Akinesie, der Tremor, der Rigor und die posturale Instabilität. Zusätzlich können kognitive, vegetative oder weitere neurologische Krankheitszeichen auftreten. Deren Ausprägung ist bei jedem Patienten individuell und kann Hinweise auf eine mögliche genetische Komponente geben, da einzelne Symptomkomplexe bestimmten Genotypen zugeordnet werden können.
Die Pathogenese, Klinik und die in dieser Arbeit verwendeten Gene werden im Folgenden genauer erläutert.

1.1.1. Pathogenese

Die Pathogenese des MP auf molekularer Ebene ist noch nicht vollständig erforscht. Makroskopisch findet man eine Degeneration der dopaminhaltigen Nervenzellen in der Substantia nigra. Aber auch in anderen melaninhaltigen Kernen, wie dem Globus pallidus, dem Corpus striatum, der Formatio reticularis, dem Nucleus dentatus oder dem Thalamus kann man einen Zelluntergang in einigen Fällen finden. In den zugrunde gegangenen Zellen finden sich teilweise die für den MP typischen *Lewy bodies* (LB). Die LB sind eosinophile zytoplasmatische Einschmelzungen, die größtenteils aus α-Synuclein bestehen. Man findet sie hauptsächlich in der Substanzia nigra, seltener im Locus coeroleus und in manchen Gebieten des Kortex. Fast immer treten sie bei Mutationsträgern für die Gene *α-Synuclein, Glucocerebrosidase* oder *LRRK2* auf, nur selten bei *Parkin*-Mutationsträgern (Pramstaller et al., 2005; Kalia *et al.*, 2015). Sie können auch bei verschiedenen Formen der Demenz auftreten (Houlden und Singleton, 2012).
Bisher wurden 20 verschiedene *Loci* beschrieben, die mit einem MP assoziiert sind (***Tab. 1***).

Akronym	Erbgang	Region	Protein	Referenzen
PARK1*	**AD**	**4q21-q23**	**α-Synuclein**	**Polymeropoulos *et al.*, 1997+**
PARK2*	**AR**	**6q25.2-q27**	**Parkin**	**Kitada *et al.*, 1998+**
PARK3	AD	2p13	n. b.	Gasser *et al.*, 1998#
PARK4	AD	4q21-q23	α-Synuclein°	Singleton *et al.*, 2003+
PARK5	AD	4p14	UCHL1	Leroy *et al.*, 1998+
PARK6	AR	1p35-p36	PINK1	Valente *et al.*, 2004a+
PARK7	AR	1p36	DJ-1	Bonifati *et al.*, 2003+
PARK8	AD	12q12-q13.1	LRRK2	Paisan-Ruiz *et al.*, 2004+; Zimprich *et al.*, 2004+
PARK9*	**AR**	**1p36**	**ATP13A2**	**Ramirez *et al.*, 2006+**
PARK10	n. b.	1p32	n. b.	Hicks *et al.*, 2002#
PARK11	AD	2q36-q37	GIGYF2	Pankratz *et al.*, 2003#
PARK12	X	Xq21-q25	n. b.	Pankratz *et al.*, 2003#
PARK13	AD	2p13.1	HTRA2/Omi	Strauss *et al.*, 2005+
PARK14	AR	22q13.1	PLA2G6	Morgan *et al.*, 2006+
PARK15	AR	22q11.2-q13	FBXO7	Shojaee *et al.*, 2008#
PARK16	n. b.	1q32	n. b.	Simon-Sanchez *et al.*, 2009#
PARK17	n. b.	4p16	GAK	Pankratz *et al.*, 2009#
PARK18	n.b.	6p21.3	HLA-DRA	Hamza *et al.*, 2010#
PARK19	AR	1p31.3	DNAJC6	Edvardson *et al.*, 2012+
PARK20	AR	21q22.11	Synaptojanin 1	Drouet *et al.*, 2014+

Tab. 1: 20 Genorte des familiären Parkinsonsyndroms; [+]erste beschriebene Genmutation; [#]Kartierung des Locus; ° Identifikation einer α-Synuclein-Triplikation; AD, autosomal-dominant; AR, autosomal-rezessiv; n. b., nicht bekannt; X, X-chromosomal; *in dieser Arbeit analysierte Gene.

Allerdings konnten davon lediglich 10 *Loci* repliziert werden (*PARK1, PARK2, PARK6, PARK7, PARK8, PARK9, PARK14, PARK15, PARK19, PARK20*). Weitere Gen-*Loci* stellten sich als Risikofaktoren heraus, die nicht für eine monogenetische Vererbung verantwortlich sind (*PARK10, PARK11, PARK12, PARK16, PARK17, PARK18, PARK19, PARK20*). *PARK5* und *PARK13* konnten nicht repliziert werden, während für *PARK3* niemals ein Gen identifiziert werden konnte. *PARK4* stellte sich als bereits bekannt heraus, da es identisch zu *PARK1* ist (Marras *et al.*, 2012).

Aufgrund der nun eher unübersichtlichen Situation wurde im Jahr 2012 eine neue Nomenklatur eingeführt und die verifizierten, monogenetischen mit MP-assoziierten Gene zusammengefasst (***Tab. 2***).

Neue Nomenklatur	Phenotyp	Locus Symbol
Autosomal-dominant		
PARK-SNCA*	***Early-onset* PS, Demenz**	**PARK1**
PARK-LRRK2	Klassisches PS	PARK8
PARK-VPS35	Klassisches PS	n. b.
Autosomal rezessiv		
PARK-PARKIN*	***Early-onset* PS**	**PARK2**
PARK-PINK1	*Early-onset* PS	PARK6
PARK-DJ1	*Early-onset* PS	PARK7
PARK-ATP13A2*	**Kufor-Rakeb-Syndrom**	**PARK9**
PARK-FBX07	*Early-onset* PS, Pyramidenbahnzeichen	PARK15
PARK-DNAJC6	Atypisches PS	PARK19
PARK-SYNJ1	Atypisches PS	PARK20

Tab. 2: Neue Nomenklatur der verifizierten, monogenetischen, mit MP-assoziierten Gene. Einteilung erfolgt nach der Mendel'schen Vererbung (in Anlehnung an Marras *et al.*, 2012). *In dieser Arbeit analysierte Gene.

Im Folgenden werden die mit MP-assoziierten Gene im Detail beschrieben, die für diese Arbeit von Bedeutung sind. Zu Beginn steht eine Beschreibung der klinischen Unterschiede der drei Genotypen. Im Anschluss daran werden die molekularen Eigenschaften beschrieben. Die Erläuterungen beginnen für das erste Projekt mit *ATP13A2*, danach folgen *α-Synuclein* und *Parkin* in chronologischer Reihenfolge.

1.1.1.1. Korrelationen zwischen Klinik und Genetik

Mit dem Auffinden von immer mehr Genen, die mit dem MP assoziiert werden, ergeben sich neue Fragen, inwieweit sich verschiedene Mutationen in verschiedenen Genen auf das Krankheitsbild auswirken. Zuweilen lassen sich charakteristische Merkmale einem Genotyp zuordnen und von dem idiopathischen Phänotyp abgrenzen. Eine klinische Einstufung kann bereits einen Hinweis darauf geben, welche Mutationen zunächst abgeklärt werden sollten (***Tab. 3***).

Klassisches PS			***Early-onset* PS**			**Atypisches PS**		
PARK-SNCA*	**AD**	**PARK1**	**PARK-PARKIN***	**AR**	**PARK2**	**PARK-ATP13A2***	**AR**	**PARK9**
PARK-LRRK2	AD	PARK8	PARK-PINK	AR	PARK6	PARK-FBX07	AR	PARK15
PARK-VPS35	AD	PARK17	PARK-DJ1	AR	PARK7	PARK-DNAJC6	AR	PARK19
						PARK-SYNJ1	AR	PARK20

Tab. 3: Klinische Einteilung der PS, die Hinweise auf eine potentielle genetische Ursache geben (in Anlehnung an Marras *et al.*, 2012). *In dieser Arbeit analysierte Gene.

Tab. 3 gibt einen Überblick über klinische und genetische Zusammenhänge des PS. Aus jeder Gruppe des PS wurde jeweils ein Gen für diese Arbeit ausgewählt. Über die Phänotypen der hier verwendeten Gene wird im Folgenden im Detail eingegangen.

Das klinische Krankheitsbild des *ATP13A2*-Genotyps gehört zu den atypischen PS und wird Kufor-Rakeb-Syndrom genannt. Erstmals beschrieben wurde es 1994 anhand einer blutverwandten arabischen Familie in den nördlichen jordanischen Hochgebirgen (Najim al-Din *et al.*, 1994). Es zeichnet sich neben den Kardinalsymptomen durch zusätzliche Symptome wie Pyramidenbahnzeichen, einer supranukleären Blickparese, einem okulogyren dystonen Spasmus und einem Mini-Myoklonus aus. Begleitend tritt in den meisten Fällen eine Demenz auf. Das Erkrankungsalter liegt bei homozygoten oder gemischt-heterozygoten Mutationsträgern zwischen 10 - 37 Lebensjahren (Najim al-Din *et al.*, 1994; Eiberg *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2012).
In dieser Arbeit wurde mit Zellen gearbeitet, die für *ATP13A2* gemischt heterozygot sind. Sie tragen eine M*issense*-Mutation in der *Splice*-Region von Exon 13 (c.1542G>A) und eine Deletion (c.3443delC) in Exon 26.
Neuropathologisch findet sich eine nigrostriatale, pallidale und pyramidale Neurodegeneration ohne Nachweis von LB oder Metall-Akkumulationen (Brüggemann *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2012; Podhajska *et al.*, 2012).

Der klinische Phänotyp des *α-Synuclein*-Genotyps wird im Allgemeinen dem klassischen PS zugeordnet, kann sich aber in mancher Hinsicht von dem typisch ideopathischen PS differenzieren. Wie stark die Patienten betroffen sind, hängt von der Mutation ab. So ist ein Patient, der eine Triplikation oder Punktmutation trägt, stärker und früher betroffen, als ein Patient, der eine Duplikation trägt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt meist zwischen 30 und 50 Jahren. Die Krankheit verläuft progredient mit den vier Kardinalsymptomen, zusätzlich Halluzinationen, kognitiven Einschränkungen, selten mit Tremor und atypischen klinischen Zeichen (Ikeuchi *et al.*, 2008; Brueggemann *et al.*, 2008; Nishioka *et al.*, 2009; Poulopoulos *et al.*, 2012; Cheon *et al.*, 2012; Jellinger, 2015).
Neuropathologisch kommt es zu einem Verlust von nigralen und kortikalen Neuronen, zur Degeneration des Temporallappens und Verbreitung von LB im Zentralhirn und Kortex (Poulopoulos *et al.*, 2012; Houlden und Singleton, 2012; Jellinger, 2015).

Der klinische Phänotyp des *Parkin*-Genotyps unterscheidet sich in erster Linie von dem ideopathischen Patienten durch den frühen Krankheitsbeginn und dem dafür langsamen

Fortschreiten der Krankheit. Die meisten Patienten erkranken vor Erreichen des 40. Lebensjahres, selten später. Daher wird der *Parkin*-Genotyp klinisch der Gruppe der *early-onset parkinsons diseases* (EOPD) zugeordnet. Die Symptome treten eher symmetrisch auf und lassen sich sehr gut mit L-Dopa behandeln. Eine Hyperreflexie und Frequenzdystonie der Beine findet man hier häufig. Außerdem kommt es zu täglichen Fluktuationen und einer Verbesserung der Symptomatik durch Schlaf. Autonome Dysregulationen sind selten. Über diese Symptome hinaus sind, abgesehen von den vier Kardialsymptomen, keine weiteren bekannt (Lohmann *et al.*, 2003; Lohmann *et al.*, 2009; Puschmann, 2013).

Diese typische Symptomatik tritt nur bei den in dieser Arbeit verwendeten homozygoten Mutationsträgern auf, nicht bei den gemischt-heterozygoten oder heterozygoten.

Im Detail wurden in dieser Arbeit Zellen verwendet, die folgende Mutationen tragen: Homozygote und heterozygote Punktmutationen als Deletionen (c.1072delT), eine homozygote Deletion eines gesamten Exons (delEx7), sowie eine gemischt-heterozygote Mutation (c.1072delT+delEx7). Die Spender der verwendeten Proben und Kontrollen sind miteinander verwandt, weswegen von einem ähnlichen Genom ausgegangen werden kann (*Kap. 2.1.4*).

Neuropathologisch zeigt sich ein selektiver Verlust von dopaminergen Neuronen und ein Verlust von adrenergen Neuronen des Locus ceruleus. LB sind, wie oben beschrieben, selten (Poulopoulos *et al.*, 2012; Cheon *et al.*, 2012).

Nun erfolgt die Darstellung der molekularen Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Gene. Die Reihenfolge ist dem Ablauf der Projekte angepasst, weswegen die Beschreibung von *ATP13A2,* gefolgt von *α-Synuclein* und *Parkin,* abgehandelt wird.

1.1.1.2. *ATP13A2*

ATP13A2 (PARK9, PARK-ATP13A2) wurde als ursächlich für die Kufor-Rakeb-Syndrom im *PARK9-Locus* ausgemacht und ist selten für eine Erkrankung an MP verantwortlich (Ramirez *et al.*, 2006). Die Vererbung erfolgt autosomal-rezessiv.

Das Gen liegt auf Chromosom 1p36, umfasst 29 Exons mit über 26 kb und kodiert für 1180 Aminosäuren. Es sind mehrere *Missense*- und trunkierende Mutationen bekannt.

Das Protein ist eine lysosomale *p-type* ATPase und wird vorwiegend in neuronalen Zellen exprimiert. Der physiologische Wirkungsort wird in den Corpora mamillaria vermutet. Neuropathologisch kann ATP13A2 zentral in den LB umgeben von α-Synuclein gefunden werden (Dehay *et al.*, 2012b; van Veen *et al.*, 2014).

ATP13A2 besitzt 10 Transmembrandomänen und ist in der lysosomalen Membran lokalisiert. Bei einigen Mutationen verliert die ATPase ihre Stabilität und verbleibt deshalb im endoplasmatischen Retikulum, wo sie dann durch Proteasome abgebaut wird. Dadurch erreicht die ATPase nicht ihren eigentlichen Wirkungsort und ist funktionsuntüchtig (Ramirez *et al.*, 2006). Auch ein stress-induzierter Zelltod aufgrund des massiven proteasomalen Abbaus durch Retention von ATP13A2 im endoplasmatischen Retikulum ist beschrieben (Dehay *et al.*, 2012a).

Die physiologische Funktion des Proteins ist bisher noch nicht geklärt, in der Literatur wird eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Kationenhaushalts in den Lysosomen diskutiert (Usenovic *et al.*, 2012).

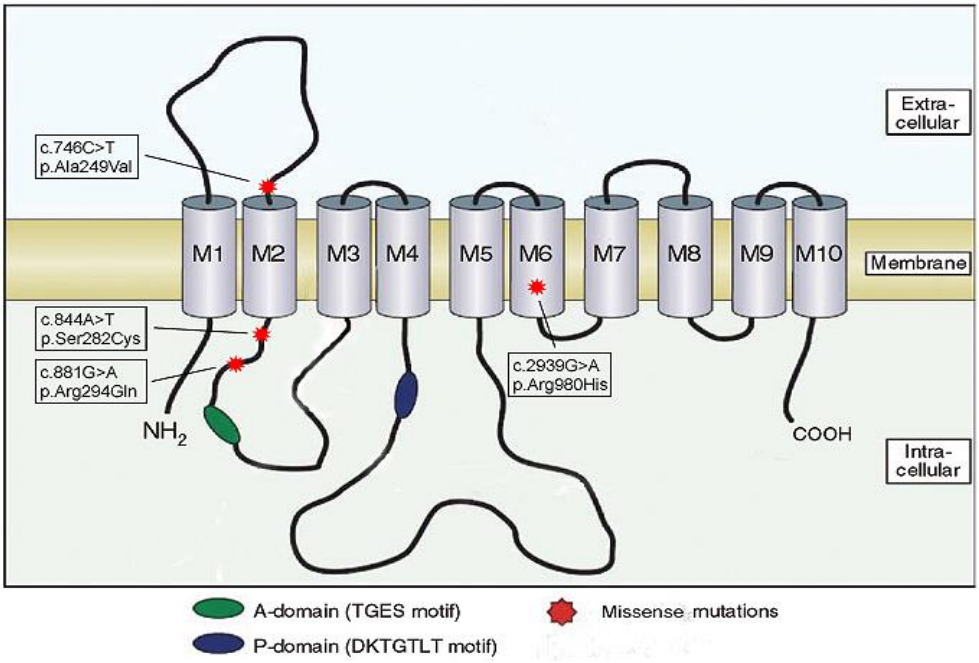


Abb. 2: ATP13A2: Darstellung der 10 Transmembrandomänen mit vier bekannten M*issense*-Mutationen (Lohmann, 2008)

1.1.1.3. *α-Synuclein*

Mutationen von *α-Synuclein* (*SNCA*, *PARK1/4, PARK-SNCA*) (Polymeropoulos *et al.*, 1997) bedingen autosomal-dominant vererbte Formen des familiären PS. α-Synuclein ist das erste Gen, das dem MP zugeordnet wurde, gehört allerdings innerhalb der vererbten Formen mit einer Häufigkeit von < 1 % eher zu den selteneren Formen.

Das Gen liegt auf Chromosom 4q21.3-22, umfasst 6 Exons mit mehr als 113 kb und kodiert für 140 Aminosäuren. Neben verschiedenen Punktmutationen (*PARK1*) wurden auch Duplikationen bzw. Triplikationen (*PARK4*) des gesamten *α-Synuclein*-Gens beobachtet, die ebenfalls zu dem charakteristischen Phänotyp führen, wobei die numerischen Aberrationen wesentlich häufiger vorkommen als die Punktmutationen (Polymeropoulos *et al*., 1997; Klein *et al.*, 2000; Singleton *et*

al., 2003; Zarranz *et al.*, 2004; Ibanez *et al.*, 2004; Ibanez *et al.*, 2009; Kasten und Klein, 2013; Oczkowska *et al.*, 2013).

Das α-Synuclein-Protein gehört zu einer Proteinfamilie, zu der auch β-Synuclein und γ-Synuclein gehören. N-terminal befindet sich eine amphipathische Region mit sechs konservierten Aminosäuren-*repeats*, mittig liegt eine hydrophobe Region mit einer nicht amyloiden betakomponenten Domäne, C-terminal ist eine säurehaltige Region. Unter physiologischen Bedingungen nimmt das Protein hauptsächlich die Form eines Tetramers an, seltener die einer Helix ohne Verbindung zur Lipidmembran (Dikiy und Eliezer, 2014).

α-Synuclein ist in Neuronen exprimiert und sowohl an der Membran des Zellkerns als auch in synaptischen Vesikeln lokalisiert. Selten findet man es auch frei im Zytosol (Oczkowska *et al.*, 2013; Dikiy und Eliezer, 2014).

Die Funktion des α-Synuclein-Proteins ist bis heute nicht vollständig geklärt. Man vermutet eine Rolle in der Dopaminfreisetzung und im Dopamintransport, es nimmt durch Interaktionen mit zytoskeletalen Proteinen an der Regulation des axonalen Transports der synaptischen Vesikel teil und moduliert den Fettstoffwechsel und deren Hydrolyse. Zudem soll α-Synuclein auch an dem Phospholipid-Stoffwechsel durch Hemmung der Phospholipase D2 beteiligt sein. Weitere Studien berichten über eine Beteiligung in der Differenzierung und des Überlebens von dopaminergen Vorläuferneuronen. Eine antiapoptotische Wirkung wird α-Synuclein ebenfalls nachgesagt. Zudem hat man eine erhöhte Expression unter oxidativem Stress festgestellt (Jao *et al.*, 2004; Cookson, 2009; Cheon *et al.*, 2012; Oczkowska *et al.*, 2013; Dikiy und Eliezer, 2014).

Der Abbau des Proteins erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System oder durch lysosomale Autophagie. Auch ist eine Elimination über zytoplasmatische Proteasen beschrieben (Oczkowska *et al.*, 2013).

Gerät das zelluläre Gleichgewicht ins Wanken kann sich die Proteinstruktur in die Form einer β-Helix verwandeln und durch die Bildung von löslichen Oligomeren aggregieren. Daraus entwickeln sich unlösliche Filamente, die sich als Teil der LB in der Zelle ablagern (*Kap. 1.1.1*) (Spillantini *et al.*, 1997; Oczkowska *et al.*, 2013; Dikiy und Eliezer, 2014).

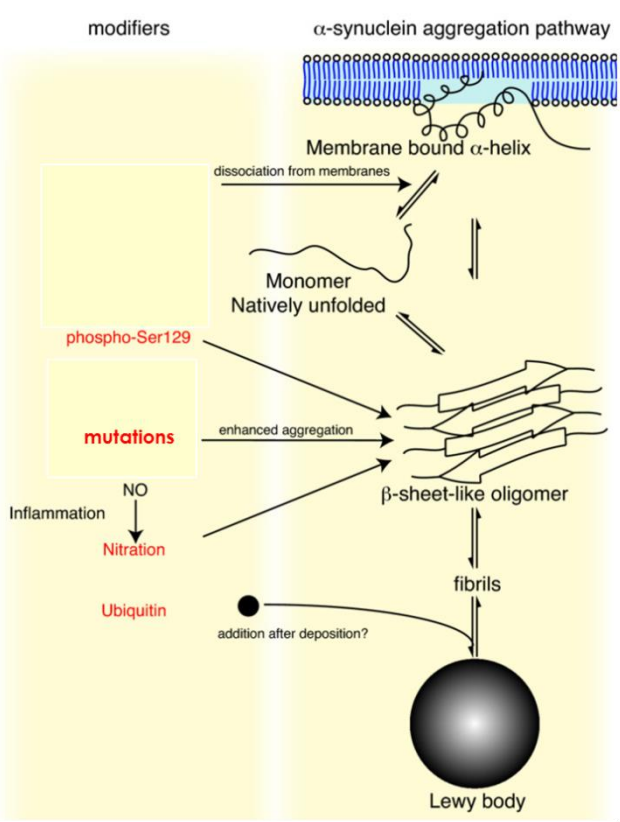


Abb. 3: α-Synuclein: Darstellung der Bildung von LB; Durch mutationsbedingt veränderte Proteinstrukturen kommt es zur Konfirmation von β-Helix-Oligomeren. Diese akkumulieren zu unlöslichen Fibrillen und bilden LB (Lohmann, 2008).

1.1.1.4. *Parkin*

Das Gen *Parkin* (*PARK2, PARK-PARKIN*) (Kitada *et al.*, 1998) wird dem autosomal-rezessiv vererbten PS zugeordnet. Typisch ist ein frühes Erkrankungsalter (< 50 Jahre). Dadurch nimmt die Wahrscheinlichkeit, aufgrund einer Mutation im *Parkin*-Gen am MP zu erkranken, mit dem Alter ab.

Das Gen liegt auf Chromosom 6q25 - 27, umfasst 12 Exons mit über 1500 kb und kodiert für 465 Aminosäuren (Kitada *et al.*, 1998).

Mutationen im *Parkin*-Gen wurden am Häufigsten beobachtet (Klein C, 2005; Puschmann, 2013).

Es sind über 100 verschiedene Mutationen bekannt (Puschmann, 2013). Unter den EOPD betragen Mutationen im *Parkin*-Gen 10 – 50 % (Kann *et al.*, 2002; Mellick *et al.*, 2009). Die Penetranz bei homozygoten und gemischt-heterozygoten Mutationsträgern ist sehr hoch, während die monogenetische Ursache bei heterozygoten Mutationen in der Literatur umstritten ist (Pankratz *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2014).

Das Parkin-Protein umfasst 52kDa und wird hauptsächlich in Neuronen, v.a. in der Subtantia nigra, exprimiert. Es besteht aus einer N-terminalen ubiquitin-ähnlichen-Domäne und einer

C-terminalen RING-Box mit 4 Zinkfinger-Domänen und ist an der Protein-Degradation als Ubiquitin-Protein-Ligase (E3-Protein) beteiligt (Safadi *et al.*, 2011; Byrd und Weissmann, 2013).

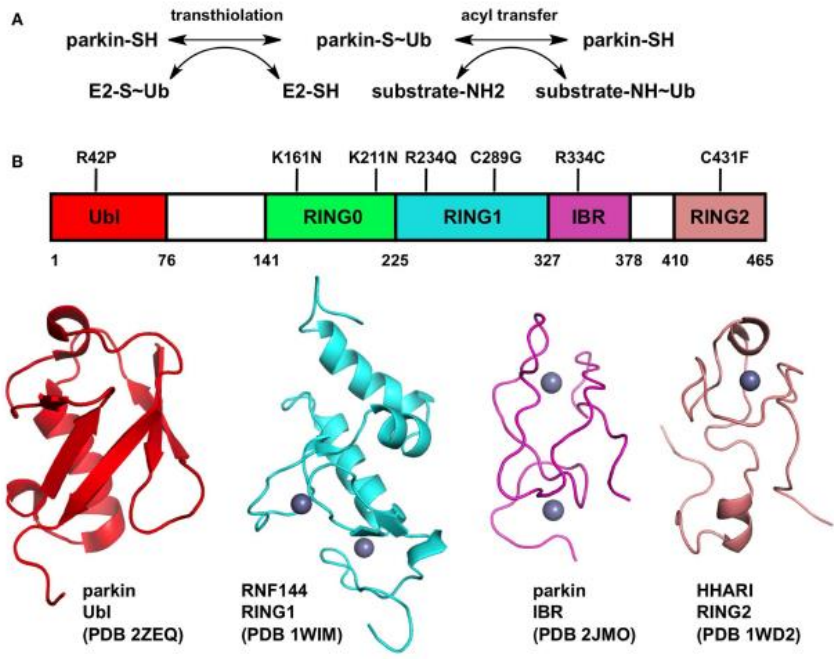


Abb. 4: Stoffwechsel und Struktur von Parkin: Ubiquitinierung von Substraten (A); zunächst findet eine Transthiolation statt. Folgend kommt es zum Acyl-Transfer. Struktur von Parkin (B); Im oberen Bereich sind die Bindungsdomänen mit einigen bekannten Mutationen dargestellt. 4 der Domänen von Parkin bzw. die RBR Homologe zeigen sich in der unteren Reihe. Zink-Atome sind als graue Kugeln skizziert (Trempe und Fon, 2013).

Lokalisiert ist Parkin im Zytosol und mit der Zellmembran assoziiert.

Bisher sind über 30 Substrate, unter anderem auch α-Synuclein und mitochondriale Proteine, für das Enzym bekannt. Parkin ist in der Lage sich selbst zu ubiquitieren und so den eigenen Abbau zu induzieren (Hedrich *et al.*, 2002; Safadi *et al.*, 2011; Shimura *et al.*, 2012; Cheon *et al.*, 2012; Rakovic *et al.*, 2013; Trempe und Fon, 2013). Dieser Mechanismus soll einen apoptotischen Zelluntergang verhindern (Oczkowska *et al.*, 2013). Der genaue Zusammenhang zwischen Parkin und der Degeneration der dopaminergen Neuronen auf molekularer Ebene ist noch nicht bekannt. Allerdings weiß man, dass die verschiedenen Mutationen die Enzymaktivität, die Protein-Protein-Interaktionen, die Löslichkeit und die Lokalisation verändern können. In Studien wird angegeben, dass Parkin an der Reparatur der mitochondrialen DNA beteiligt sei, nicht-funktionsfähige Mitochondrien der Autophagie zuführe und in einer direkten Interaktion mit PINK1 und dem Fettstoffwechsel stände. (Shimura *et al.*, 2000; Cheon *et al.*, 2012; Rakovic *et al.*, 2013; Trempe und Fon, 2013; Byrd und Weissmann, 2013). Außerdem wird vermutet, dass Parkin eine wichtige Funktion zum Schutz der Zellen vor oxidativem Stress besitzt (Greene *et al.*, 2005; Cheon *et al.*, 2012). Johnson *et al.* zeigten 2012, dass Parkin vor der Translokation von basalem oder durch oxidativen Stress induzierten Bax zu den Mitochondrien schützt (Johnson *et al.*, 2012).

Parkin konnte auch in den für neurodegenerative typischen LB nachgewiesen werden (Shimura *et al.*, 2012). Allerdings konnten auf der anderen Seite neuropathologisch bei *Parkin*-Mutationsträgern nur selten LB nachgewiesen werden (Pramstaller *et. al.*, 2005; Poulopoulos *et al.*, 2012; Houlden und Singleton, 2012; Lonskaya *et al.*, 2013).

Wie in den vorangegangen Kapiteln beschrieben, tritt durch Mutationen in den o. g. Genen ein PS auf. Jeder Form des MP liegt die Neurodegeneration in der Substantia nigra zugrunde, wobei der genaue Ablauf des Zelltods noch nicht geklärt ist. Daher werden im folgenden Kapitel zunächst die verschiedenen Formen des Zelltods, v.a. die Apoptose, erläutert. Ein Teil des Forschungsprojekts beschäftigt sich mit diesen Prozessen und ist daher von Relevanz für Fragestellung, Zielsetzung, Versuchsdurchführung sowie späterer Auswertung der Ergebnisse.

1.2. Zelltod

Das Absterben von Zellen kann über Apoptose, Autophagie, Mitophagie oder Nekrose erfolgen. Die Apoptose ist die aktive Selbstzerstörung der Zelle und wird durch körpereigene Stoffe ausgelöst, während die Nekrose den passiven Zelltod nach einem traumatischen Ereignis darstellt. Die Nekrose wird durch Sauerstoff- oder Nährstoffmangel ausgelöst. Die betroffenen Zellen können nicht mehr genug ATP bilden, weswegen sich die Zellmembran unkontrolliert auflöst und die intrazellulären Enzyme im extrazellulären Gewebe eine Entzündung verursachen. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Formen des Zelluntergangs ist, dass bei der Apoptose immer nur eine einzige Zelle untergeht, während bei der Nekrose eine ganze Zellgruppe betroffen ist (Elmore, 2007). Die Autophagie ist ebenfalls ein energieabhängiger Zell(-teil-)abbau, der lysosomal abläuft und auch zellprotektiv wirken kann. Die Mitophagie ist eine auf die Mitochondrien beschränkte Unterform der Autophagie (Elmore, 2007; Dagda *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2013).
Der genaue Zusammenhang zwischen der Pathogenese des MP und dem Zelltod wird in Kap. 1.2.3 beschrieben. Zunächst erfolgt die Erläuterung der Apoptose, deren Signalwege und Regulation. Kap. 1.2.2 beinhaltet die Auto- und Mitophagie als weitere mögliche Wege des bei der Neurodegeneration stattfindenden programmierten Zelltods.

1.2.1. Apoptose

Erstmals wurde die Apoptose von Kerr *et al.* 1972 beschrieben (Kerr *et al.*, 1972). Physiologisch ist die Apoptose wichtig für eine korrekte Embryogenese und die Aufrechterhaltung des zellulären

Gleichgewichts in den Organen (Lodish *et al.*, 2001; Danial und Korsmeyer, 2004; Elmore, 2007; Jain *et al*., 2013).

Die Apoptose führt, wie zuvor beschrieben, zum programmierten energieabhängigen Zelltod (Elmore, 2007; Jain *et al.*, 2013). Sie wird in drei verschiedene Phasen, die Initiations-, die Effektor- und die Degradationsphase eingeteilt. Vereinfacht ist der Ablauf in **Abb. 5** dargestellt.

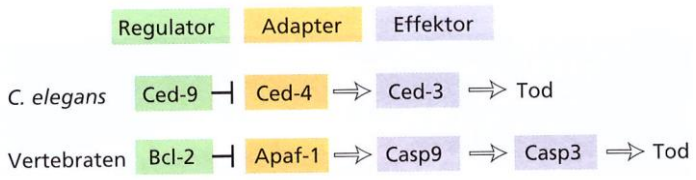


Abb. 5: Übersicht über den Apoptoseweg bei C. elegans und Vertebraten. An diesem konservierten Mechanismus sind drei große Gruppen von Proteinen beteiligt. Die Regulatorproteine fördern oder hemmen die Apoptose. Die Adapterproteine treten sowohl mit den Regulatoren als auch mit den Effektoren in Wechselwirkung. Die Effektorproteine gehören zu der Familie der Cystein-Proteasen, deren Aktivierung durch die Effektoren zum Zelltod führt (Lodish *et al.*, 2001).

Es sind zwei verschiedene Signalwege bekannt, die zur Apoptose führen. Zum Einen kann der Zelltod über Rezeptoren mit Todesdomänen, wie zum Beispiel die Tumor-Nekrose-Faktoren-(TNF)-α-Rezeptoren, ausgelöst werden. Zum Anderen können auch intrazelluläre Stressfaktoren oder die aktivierte Caspase 8 eine Freisetzung von proapoptotischen Proteinen auslösen.

Die Regulation der Apoptose erfolgt über die Proteinfamilie der Bcl_2-Familie. Diese wirken sowohl pro- als auch antiapoptotisch (Jain *et al.*, 2013).

1.2.1.1. Signalwege der Apoptose

Allgemein werden die intrazelluläre Signaltransduktion und die Auslösung der zur Apoptose führenden zellulären Veränderungen durch proteolytische Enzyme katalysiert. Diese werden als Caspasen bezeichnet. Caspasen sind Cysteinproteasen, die hinter Aspartyl-Resten von Proteinen schneiden. Man unterscheidet Initiator- und Effektorcaspasen. Die Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) aktivieren durch limitierte Proteolyse die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7), welche dann in aktiver Form die intrazellulären Proteine spalten (Wang *et al.*, 2004; Elmore, 2007; Jain *et al.*, 2013).

Man unterscheidet den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg der Apoptose.

Der extrinsische Signalweg wird über sogenannte Todesrezeptoren durch extrazelluläre Stimuli aus der TNF-Familie ausgelöst. Dadurch wird die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 initiiert (Reed und Roth, 2002; Wang *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2013). Ist Caspase-8 einmal aktiviert, kommt es unwiderruflich zum programmierten Zelltod (Elmore, 2007; Jain *et al.*, 2013).

Der intrinsische Signalweg wird durch zelluläre Stimuli ausgelöst (Reed und Roth, 2002). Dazu gehören ein dysfunktionaler Proteinstoffwechsel mit Proteinakkumulationen, mitochondriale Dysfunktionen und oxidativer Stress (Elmore, 2007; Levy *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2013). Über proapoptotische Regulatorproteine aus der Bcl_2-Familie wird die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom-c aus dem intramembranösen Spalt der mitochondrialen Membran initiiert, wodurch im Zytosol über das Apoptosom die Effektorcaspasen aktiviert werden (Reed und Roth, 2002; Jain *et al.*, 2013). Das Apoptosom besteht aus der inaktiven Initiatorcaspase-9, die an den *apoptotic-protease-activating-factor-1* (Apaf-1) und Cytochrom-c nach mitochondrialer Intialisierung der Apoptose gebunden ist. Durch diesen Komplex verändert Caspase-9 ihre Proteinstruktur und ist damit aktiviert (Danial und Korsmeyer, 2004; Elmore, 2007; Jain *et al.*, 2013). Auch kann der intrinsische Signalweg über das endoplasmatische Retikulum induziert werden, wodurch Caspase-12 als Initiatorcaspase aktiviert wird (Wang *et al.*, 2004; Elmore, 2007; Jain *et al.*, 2013).

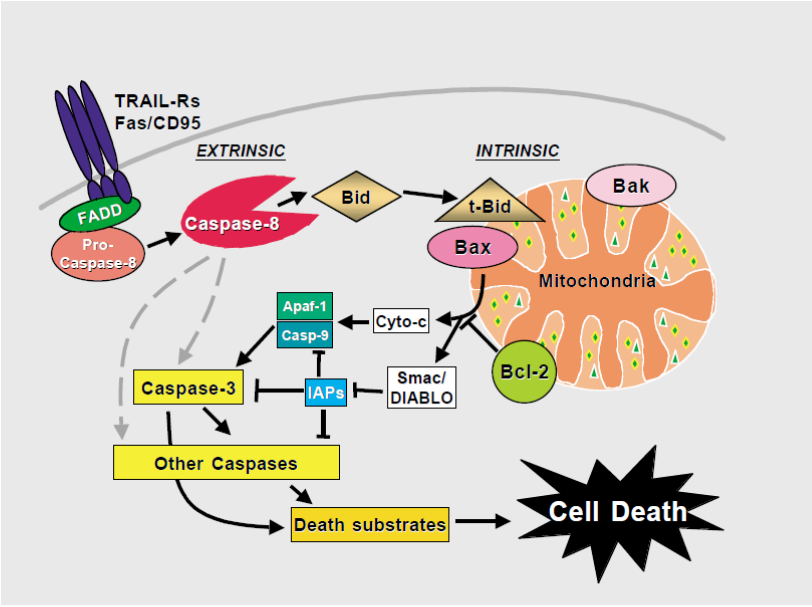


Abb 6: Signalwege der Apoptose: Der extrinsische Weg ist bedingt durch die Aktivierung von Todesrezeptoren (z.B. Fas, TNF-α-Rezeptoren). Über FADD wird Caspase-8 aktiviert. Entweder wird nun Caspase-3 direkt oder über weitere Proteasen aktiviert. Der intrinsische Weg ist durch die Freisetzung von Cytochrom-c aus dem intermembranösen Spalt der Mitochondrien bedingt. Die Freisetzung von Cytochrom-c wird durch die Bcl_2-Familie reguliert. Cytochrom-c induziert im Zytosol die Bildung des Apoptosoms, welches aus Caspase-9 und Apaf-1 besteht. Nun wird Caspase-3 aktiviert und weitere Caspasen führen die Zelldegradation durch (Reed und Roth, 2002).

In der Initiationsphase werden die Initiatorcaspase-8 (extrinsischer Singnalweg) oder die Initiatorcaspase-9 (intrinsischer Signalweg) aktiviert, welche nun an den Effektorcaspasen (Caspase-3, Caspase-7) eine C-terminale Spaltung von Asparaginsäureresten vornehmen und somit auch diese aktivieren.

In der Effektorphase kommt es zunächst zur Aktivierung aller Effektorcaspasen, welche die nukleäre und mitochondriale DNA abbauen.

In der Degradationsphase sind nun morphologische Veränderungen an der Zelle zu erkennen. Zunächst kommt es zur Schrumpfung des Zytosols und das Chromatin kondensiert. Danach erfolgt die Fragmentierung des Zellkerns und der Zelle. Die durch Abschnürung der Zellmembran gebildeten Blasen werden als apoptotische Körperchen bezeichnet, die durch Phagozyten abgebaut werden (***Abb. 7***) (Lodish *et al.*, 2001; Danial und Korsmeyer, 2004; Elmore, 2007; Jain *et al.*, 2013).

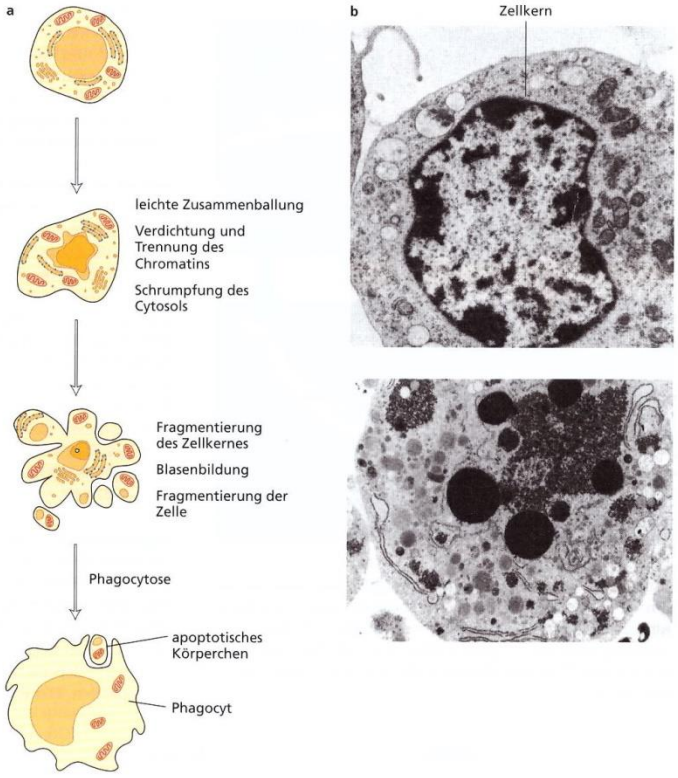


Abb. 7: Zelluläre Vorgänge beim Zelltod durch Apoptose: a: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen in apoptotischen Zellen. b: Mikroskopische Aufnahmen einer normalen (oben) und einer apoptotischen Zelle (unten). Man erkennt deutlich die beginnende Fragmentierung des Zellkerns in der apoptotischen Zelle (Lodish *et al.*, 2001).

1.2.1.2. Regulation der Apoptose

Die Regulation der Apoptose erfolgt über zwei Mechanismen. Hauptsächlich sind Proteine der Bcl_2-Familie an der Regulation beteiligt, die im folgenden Kapitel genauer beschrieben werden (*Kap. 1.2.1.3*), aber auch über *inhibitor-of-apoptotic-proteins* (IAPs) werden das Apoptosom und die Effektorcaspasen gehemmt. Damit werden sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Signalweg gehemmt. IAPs werden wiederum über einen durch Bax ausgelösten Signalweg gehemmt (***Abb. 6***) (Reed und Roth, 2002; Elmore, 2007; Jain *et al.*, 2013).

1.2.1.3. Bcl_2-Familie

Nachdem der programmierte Zelltod im Sinne der Apoptose erstmals 1972 von Kerr *et al.* beschrieben wurde, konnte 1985 Bcl_2 als erstes antiapoptotisches Protein detektiert werden (Kerr *et al.*, 1972; Tsujimoto *et al.*, 1985). Darauf folgend wurde Bax 1993 als erstes proapoptotisches Protein erkannt (Oltvai *et al.*, 1993). Alle weiteren identifizierten Regulatorproteine, die bestimmte Domänen tragen, wurden unter dem Sammelbegriff der Bcl_2-Familie zusammengefasst. Es sind über 20 Mitglieder bekannt (Danial und Korsmeyer, 2004; Elmore, 2007; Jain *et al.*, 2013).

Bax ist das bekannteste proapoptotische Protein und an jedem mitochondrialen Apoptosevorgang beteiligt. Es kommt in lebensfähigen Zellen als Monomer im Zytosol vor. Wird nun die Apoptose durch Stimuli aktiviert, transloziert Bax zu den Mitochondrien und wird dort als homooligomerisierte Multimere in die äußere mitochondriale Membran eingebaut (Danial und Korsmeyer, 2004; Gomez-Lazaro *et al.*, 2008; Guillemin *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2013). Die Permeabilität der mitochondrialen Membran wird dadurch erhöht. Somit kann Cytochrom-c aus dem intermembranösen Spalt in das Zytosol gelangen und die Bildung des Apoptosoms initiieren (Elmore, 2007; Gomez-Lazaro *et al.*, 2008; Guillemin *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2013).

Bcl_2 ist das bekannteste antiapoptotische Protein und trägt eine membrandurchspannende Domäne. Damit ist Bcl_2 hauptsächlich mit der Membran der Mitochondrien, aber auch des Zellkerns und des endoplasmatischen Retikulums verankert (Lodish *et al.*, 2001; Danial und Korsmeyer, 2004). Seine Hauptfunktion ist die Hemmung der Apoptose und dadurch die Sicherung des Überlebens der Zelle. Bcl_2 agiert als direkter Antagonist von Bax. So wird die Freisetzung von Cytochrom-c in das Zytosol und die Aktivierung der Effektorcaspasen über das Apoptosom verhindert (Lodish *et al.*, 2001; Guillemin *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2013). Über die Regulation von Bcl_2 gibt es bisher nur Studien bezüglich der genetischen Regulation an der Promotorregion in der Forschung der Protoonkogene (Danial und Korsmeyer, 2004; Jain *et al.*, 2013).

1.2.2. Autophagie und Mitophagie

Die Autophagie ist eine weitere Form des induzierten, energieabhängigen Zelltods. Charakteristisch ist die Sequestrierung des Zytoplasmas und der Zellorganellen, die in Vesikeln mit einer Doppel- oder Multimermembran eingeschlossen wurden, über einen lysosomalen Abbau (Elmore, 2007; Jain *et al.*, 2013).

Als Funktion der Autophagie sieht man die Elimination von zellschädigenden Organellen oder Molekülen. Befinden sich zu viele toxische Stoffe in der Zelle, wird der Zelltod eingeleitet. Bei geringer Menge von zellschädigenden Molekülen werden diese lysosomal eliminiert und die Zelle überlebt. Daher sagt man der Autophagie eine sowohl protektive als auch letale Funktion nach (Levy *et al.*, 2009).

1.2.3. Zelltod bei Morbus Parkinson

In vielen Studien wurden diverse Ursachen der Neurodegeneration bei MP beschrieben. Dazu gehören die Proteinakkumulation, von z. B. α-Synuclein, ein veränderter Proteinabbau, mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, Neuroinflammation oder eine dysregulierte Signalisierung von Kinasen. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass die Neurodegeneration über den Weg der Apoptose abläuft. Der genaue molekulare Zusammenhang ist bisher nicht geklärt. Die Frage, ob der Neurodegeneration die Apoptose oder die Auto- oder Mitophagie vorangeht, ist noch offen. Auf diese Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit experimentell genauer eingegangen (*Kap. 3.2*).
Die molekulare Erforschung der Neurodegeneration ist klinisch von besonderer Bedeutung, weil man hofft, eine in diesen Mechanismus eingreifende kurative Therapie entwickeln zu können (Levy *et al.*, 2009).

Im weiteren Verlauf werden die Vorarbeiten, Fragestellungen und Zielsetzungen erläutert.

1.3. Vorarbeiten

Dieses Kapitel beschreibt die vor Beginn der Experimente entwickelten Standards und Ergebnisse als Grundlage für die Versuchsdurchführungen dieser Forschungsarbeit.

1.3.1. Vorarbeiten der genetischen Analyse

Die Proben der Population aus Lübeck wurden vor Beginn dieser Arbeit bezüglich ihres Mutationsstatus im *Parkin*- und *DJ-1*-Gen untersucht. Dies wurde in der Sektion für Neurogenetik der Klinik für Neurologie des UKSH Campus Lübeck unter der Leitung von Prof. C. Klein erarbeitet.
Der Mutationsstatus der spanischen Proben wurde für *ATP13A2* bestimmt und dieser Arbeit zur Verfügung gestellt (***Tab. 17***).
Die Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) war ebenfalls bereits etabliert.

1.3.2. Vorarbeiten der Proteinanalyse

Die Biopsien der Fibroblasten wurden in der Klinik für Neurologie des UKSH Campus Lübeck entnommen und die Zellkultivierung, mitochondriale Präparation und *Westernblot*-Analyse im Institut für Neurogenetik etabliert. Der Mutationsstatus der Proben wurde bestimmt.
Der Antrag an die Ethikkommission wurde vor Beginn der Arbeit genehmigt.

1.4. Fragestellung und Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit zwei Projekten und ist strukturell diesbezüglich zu untergliedern.

Das erste Projekt behandelt die Frage, ob in einem Lübecker Patientenkollektiv (*Kap. 2.1.1*) Mutationen im *ATP13A2*-Gen vorliegen. Dazu soll ein *Screening*-Verfahren mittels *Real-time*-PCR zur schnellen Detektion von Mutationen im *ATP13A2*-Gen etabliert werden. Durch dieses Verfahren sollen (unbekannte) Mutationen im Lübecker Patientenkollektiv schnell und ökonomisch diagnostiziert werden.

Das zweite Projekt beschäftigt sich mit der Frage, welche molekularen Mechanismen für die Neurodegeneration verantwortlich sind. Dafür wurden Fibroblasten untersucht, die eine Mutation im *Parkin*- oder *ATP13A2*-Gen tragen (*Kap. 2.1.4, 2.1.5*).
Zunächst soll ein Beweis für eine erhöhte Sterblichkeit von Fibroblasten, die eine Mutation im *Parkin*-Gen tragen, im Vergleich zu Fibroblasten, die keine Mutation tragen, erbracht werden. Dafür werden die Zellen unbehandelt oder unter oxidativem Stress untersucht.
Falls dieser Zusammenhang bestätigt werden kann, soll nach molekulargenetischen Ursachen gesucht werden.
Dafür wurde der Hypothese nachgegangen, dass *Parkin*- und *ATP13A2*-Mutationsträger einen erhöhten intrazellulären Spiegel von α-Synuclein im Gegensatz zu Nicht-Mutationsträgern enthalten. Auch soll die zelluläre Lokalisation von α-Synuclein ermittelt werden.
Der letzte Schritt soll die Frage beantworten, ob der Zelltod über den Mechanismus der Apoptose (*Kap. 1.2.1*), abläuft. Dafür werden pro- und antiapoptotische Proteine in Fibroblasten untersucht, welche Mutationen für das *Parkin*-Gen tragen.

Die Grundlagen der Experimente werden im folgenden Kapitel beschrieben (*Kap. 2*).

2. Patienten, Material und Methoden

Dieses Kapitel beinhaltet zunächst eine genaue Beschreibung der verschiedenen Patientenkollektive. Im Anschluss daran stehen die verwendeten Materialien und die Abläufe der Methoden. Vor Beginn der Experimente wurden diese von der Ethikkommission genehmigt.

2.1. Patienten

Der Großteil der Patienten, die an der Studie zu dieser Arbeit teilgenommen haben, wurden ärztlich am UKSH Campus Lübeck untersucht und als an MP erkrankt diagnostiziert. Zusätzlich wurden Proben verwendet, die am Institut für Neurologie der europäischen Akademie Bozen untersucht wurden. Ein am Kufor-Rakeb-Syndrom erkrankter Chilene stellte ein Biopsat zur Verfügung.
Die Vorarbeiten zu dieser Arbeit, bezogen auf die neurogenetischen Erkenntnisse über die Fibroblastenproben, wurden zum größten Teil in der Sektion für molekulare Neurogenetik unter der Leitung von Prof. Dr. Christine Klein erarbeitet.
Proben aus einer an MP erkranken Population aus Spanien wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese sind schon vor Beginn dieser Arbeit analysiert worden und dienten als Kontrollen für die Etablierung der *Real-time*-PCR am *Light-Cycler*® (LC).

2.1.1. Population aus Lübeck

Der eine Teil der Proben (n = 622), die für die genetische Analyse auf *ATP13A2* verwendet wurden, wurde aus Patienten zusammengestellt, bei denen am Uniklinikum Lübeck der MP diagnostiziert wurde. Zur Analyse am LC (*Kap. 2.3.7*) wurden 622 Proben verwendet, die - soweit bekannt - kaukasischen Ursprungs sind. Hinsichtlich des Erkrankungsalters, der Art der Symptome als auch anderer Merkmale wurden bei der Analyse am LC keine Einschränkungen vorgenommen.

2.1.2. Lübecker Patientenkollektiv zur kompletten Sequenzanalyse

Zur vollständigen Sequenzierung nach Sanger wurde ein Kollektiv (n = 94) aus der Population aus Lübeck (*Kap. 2.1.1*) erstellt, welches aufgrund medizinischer Daten eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweist eine Mutation in *ATP13A2* zu tragen. Die Einschlusskriterien waren das Erkrankungsalter vor dem 40. Lebensjahr, als Begleitsymptom eine Demenz (quantifiziert als MOCA-*Score* < 26, ***Abb. 35***) und kein Mutationsträger für ein anderes mit MP assoziiertes Gen.

2.1.3. Population aus Spanien

Ein weiteres Patientenkollektiv (n = 65) aus Spanien wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Alle darin enthaltenen Patienten sind an MP erkrankt. Weitere Ein- oder Ausschlusskriterien wurden nicht vorgenommen. Die Sequenzen dieser Proben für *ATP13A2* wurden schon vor Beginn dieser Arbeit angefertigt und dienten in erster Linie zur Etablierung am LC (***Tab. 17***).

2.1.4. Familie LA mit Kontrollen

Ein großer Teil der Fibroblasten wurde einem Patientenkollektiv bestehend aus einer Familie in Südtirol entnommen. Aus der Familie mit 196 Familienmitgliedern über 7 Generationen sind 25 Individuen bekannt, die an einem Dopa-responsiven MP erkrankt sind (Pramstaller *et al.*, 2005). 77 Familienmitglieder wurden auf eine Mutation im *Parkin*-Gen untersucht, die 25 mit Dopa-responsiven MP eingeschlossen. Bei der genetischen Analyse der 25 Erkrankten stellte sich heraus, dass bei der Familie zwei verschiedene Mutationen im *Parkin*-Gen vorliegen, eine Deletion von Exon 7 und eine Punktdeletion c.1072delT. Diese beiden Mutationen liegen sowohl homozygot als auch heterozygot vor, sogar einen gemischt-heterozygoten Mutationsträger konnte man identifizieren, der auf dem einen Allel die Deletion von Exon 7 und auf dem anderen Allel die Punktmutation c.1072delT trägt. Bei fünf Patienten ist der Status unbekannt und sieben der Erkrankten tragen keine Mutation im *Parkin*-Gen. Von den 77 Familienmitgliedern wurden der Sektion für klinische und molekulare Neurogenetik 16 Hautbiopsate zur Verfügung gestellt. Von diesen 16 Hautbiopsaten wurden sieben Proben für diese Arbeit verwendet (***Tab. 4***).

Probe	Gen	Mutation	Allel	Klinischer Status	Erkrankungsalter
B1	*Parkin*	delEx7	heterozygot	nicht-erkrankt	
B2	*Parkin*	delEx7+ c.1072delT	gemischt-heterozygot	erkrankt	64
B3	*Parkin*	c.1072delT	homozygot	erkrankt	43
B4	*Parkin*	delEx7	homozygot	erkrankt	34
B5	*Parkin*	-	Wildtyp	nicht-erkrankt	
B6	*Parkin*	-	Wildtyp	nicht-erkrankt	
B7	*Parkin*	-	Wildtyp	nicht-erkrankt	

Tab. 4: Verwendete Proben der Population aus Südtirol (Referenzsequenz: NM_004562.2)

2.1.5. Probe aus Chile

Zur Analyse der Expression von α-Synuclein bei Mutationen im *ATP13A2*-Gen wurden Fibroblasten eines chilenischen Mutationsträgers verwendet (***Tab. 5***).

Probe	Gen	Mutation	Allel	Klinischer Status
C1	*ATP13A2*	c.1542G>A+c.3443delC	gemischt-heterozygot	erkrankt

Tab. 5: Verwendete Probe aus der Population aus Chile (Referenzsequenz: NM_022089.2)

2.1.6. Weitere Proben

Als Kontrollen wurden weitere Fibroblasten verwendet, die keiner der genannten Populationen angehören, nicht an MP erkrankt sind und auch keine Mutation in einem mit MP assoziierten Gen tragen (W1, W2).

Nach Auflistung der Proben, die in dieser Arbeit verwendet wurden, folgen nun die verwendeten Materialien und Methoden.

2.2. Material

Dieses Kapitel zählt die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösungen, *Kits*, Antikörper, Oligonukleotide und Geräte auf. Auch die verwendete *Software* und Datenbanken werden erwähnt. Im darauf folgenden Kapitel (*Kap. 2.3*) werden die Methoden erläutert.

2.2.1. Chemikalien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	SIGMA
3130 POP7 *Performance Optimized Polymer*	Applied Biosystems
Accutase	PAA Laboratories GmbH
Acrylamid (30 %)	BioRad
Agarose	SIGMA
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	SIGMA
Ascorbinsäure	SIGMA
Betain	SIGMA
Big-Dye-Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing-Buffer	Applied Biosystems
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Riedel-de-Haën
Chloroquin	SIGMA
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck
Complete Mini protease inhibitors	Invitrogen
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Amersham Biosciences

Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA
Dulbeccos-Modified-Eagle-Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	ICN Biomedicals Inc.
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SIGMA
ExoSAP-IT	Usb
Filterpapier 3MM	Watmann
Foetal Bovine Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH
Formamid	SIGMA
Glucose	SIGMA
Glycerol	SIGMA
HiDi Formamid	Applied Biosystems
LE-Agarose	Biozym
Leupeptin	SIGMA
Methanol	J.T.Baker
Molekulargewichtsstandard (*Prestained Protein*)	BIO RAD
Natriumacetatlösung	Fluka-Biochemika
Natriumdesoxycholsäure	SIGMA
Nitrocellulosemembran	Bio Rad
Non Fat Dry Milk	SIGMA
Normal goat serum	VECTOR
Paraquat	SIGMA
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
Phosphate-buffered-saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH
Ponceau S	SIGMA
Potassium Bikarbonat ($KHCO_3$)	SIGMA
Proteinase K	SIGMA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Sucrose	BDH
Taq DNA Polymerase und PCR-Puffer	Qbiogene
Tris-Borate-EDTA Puffer (TBE) 10x	SIGMA
Tris-Buffered-Saline (TBS) 10x	BioRad
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	MP Biomedicals
Triton X100	SIGMA

Tween-20	SIGMA
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	SIGMA

2.2.2. Lösungen

Protein Running Buffer	NuPage
Protein Sample Loading Buffer	NuPage
Protein Transfer Buffer	NuPage, 10 % Methanol

Formamid-Farbstoff	47,5ml Formamid, 2,0ml 0,5M EDTA, 0,01g Bromphenolblau, pH 8,0
Homogenisationspuffer	10mM Tris, 1mM EDTA, 250mM Sucrose, 1mM PMSF, 1µg/ml Leupeptin, pH 7,4
Leidener Lösung	155mM NH4Cl, 10mM KHCO3, 0,1mM EDTA, pH 8,0
Lysepuffer	10mM Tris, 400ml NaCl, 0,2mM EDTA, pH 8,0
RIPA-Puffer	50mM Tris - HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 % Triton X - 100, 1 % Natriumdesoxycholsäure, 0,1 % SDS
10x TBE Puffer	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20mM EDTA
TBS/Tween Puffer	900ml H2O, 100ml TBS, 1 % Tween

Tab. 6: Für die Arbeit hergestellte Lösungen

2.2.3. *Kits*

BCA *Protein-Assay-Kit*	Pierce
Big-Dye-Terminator v1.1, v3.1-Cycle-Sequencing-Kit	Applied Biosystems
GC-rich-Kit	Roche
*High-Resolution-Melting-Maste*r (Light-Cycler® 480)	Roche
Lactat-Dehydrogenase-Messung (LDH-Messung)	Millipore
Pfx-Kit	Invitrogen
SuperSignal West Pico Chemiluminescent-*Kit*	Pierce
Tripan-blue-exclusion-Assay-Kit	Invitrogen

2.2.4. Antikörper

Primäre Antikörper:	
Maus anti-β-Actin 1:100000	Sigma

Hase anti-Bax 1:2000	Cell Signalling
Hase anti-Bcl-2 1:1000	Cell Signaling
Maus anti-α-Synuclein 1:1000	BD Pharmaceuticals

Sekundäre Antikörper gebunden an HRP (*Horse Raddish Peroxidase*):

Ziege anti Hase IgG-HRP gekoppelt 1:10000	Santa Cruz
Ziege anti Maus IgG-HRP gekoppelt 1:10000	Santa Cruz

2.2.5. Oligonukleotide

Desoxyribonukleotide (*Primer*)	Qbiogene
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen

2.2.6. Geräte

3130 *Genetic Analyser*	Applied Biosystems
3130xl *Genetic Analyser*	Applied Biosystems
Biofuge pico	Heraeus
Electrophoresis Power Supply	Amersham pharmacia biotech
Feinwaage	Kern 572
Flex Cycler	Analytik Jena
Heizblock	VWR
Homogeniser	Eurostar IKA Werke
Light-cycler® 480	Roche diagnostics
Mastercycler	Eppendorf
Mikroskop Axioplan	Zeiss-Optik
Mikrowelle MICROWAVE 800	SEVERIN
Mini-Gel System	BIO RAD
Mini-transblot Einheit	BIO RAD
MJ Mini	Bio RAD
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Peq Lab
Spektrophotometer	Eppendorf
Synergy HT *plate reader*	BIOTEK
Thermocycler PTC 100 und PTC 200	MJ Research
Zentrifuge	Eppendorf, Neolab, Sorvall

2.2.7. *Software*

DNA Analyse Programm	*Mutation-Surveyor, ChromasLite*
Schmelzkurvenauswertung	*Light-Cycler®-Software*
Image-processing-program	*Total Lab*

2.2.8. Datenbanken

Zur Auswertung wurden folgende Datenbanken verwendet: *UCSC Human Blat Search, Genebank ncbi, dbSNP Short Genetic Variations, Variant-Effect-Predictor, 100 Genom Project, Proteine Domaine, Uniprot, Human Genome Variation Society, ExAC-Browser, PROVEAN v1.1.*
Genomische Positionen für *ATP13A2* wurden anhand folgender Referenzsequenzen ermittelt: NG_009054.1, NM_022089.2, NP_071372.1.

Im folgenden Kapitel werden nun die Anwendungsgebiete der Patienten und Materialen in den durchgeführten Methoden erläutert.

2.3. Methoden

Nun werden die genauen Durchführungen der in dieser Arbeit verwendeten Methoden beschrieben. Zu Beginn stehen die verschiedenen Methoden der genetischen Analyse, beginnend mit der DNA-Extraktion, über die *Primer*-Etablierung und schließlich die Durchführung der Schmelzkurvenanalyse am LC und die Sequenzanalyse nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977).
Im Anschluss daran erfolgt die Erläuterung der Methoden der Proteinanalyse. Nach Darstellung des Vorgangs der Zellkultivierung werden die Behandlung der Zellen mit Toxinen und die anschließenden Tests beschrieben. Folgend finden sich die Methoden zur Herstellung von Zellhomogenisaten, sowie der mitochondrialen Präparation. Letztlich wird der Vorgang der *Westernblot*-Analysen erläutert.

2.3.1. DNA-Extraktion

Die Präparation genomischer DNA erfolgte aus Leukozyten des peripheren Blutes nach der Aussalzmethode (Miller *et al*., 1988). Dabei wurden die Zellen durch Zugabe einer hypertonen Lösung zunächst lysiert, Proteine durch das Enzym Proteinase K verdaut, und die DNA anschließend mittels Präzipitation isoliert. Die Durchführung geschah im Einzelnen wie folgt:

- Versetzen von 10 ml Vollblut (EDTA/ Heparin/ Citrat) mit 35 ml Leidener-Lösung
- Inkubation für 30 min auf Eis bei 200 rpm
- Abzentrifugieren der Leukozyten (6000 rpm, 4 ° C, 20 min)
- Waschen des Zell*pellets* durch Resuspendieren in 10 ml Leidener-Lösung
- Inkubation für 20 min auf Eis und Zentrifugation (6000 rpm, 4 ° C, 20 min)
- Resuspension des *Pellets* in 3 ml Lysepuffer
- Zugabe von 200 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 100 µl SDS (20 %)
- Inkubation über Nacht bei 55 ° C
- Zugabe von 1ml 6M NaCl-Lösung und kräftig schütteln
- Zentrifugation (6000 rpm, 20 ° C, 25 min)
- Überstand mit 6M NaCl-Lösung waschen bis dieser keine sichtbaren Schwebteilchen mehr enthält
- Ausflocken der DNA durch Zugabe von 2 Vol. 96 % EtOH
- DNA-Flocke mit 1 ml 70 % EtOH waschen
- Zentrifugation (12000 rpm, 4 ° C, 15 min), Überstand verwerfen
- *Pellet* (DNA) im Thermoblock bei 37 ° C trocknen
- Zugabe von 500 bis 1000 µl 1x TE-Puffer; DNA über Nacht im Kühlschrank lösen

Auf diese Weise konnten ca. 100 - 1000µg genomischer DNA gewonnen werden.

2.3.2. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde mittels photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 260nm durchgeführt (*Nano drop Peq Lab*®).

2.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction* (engl.)) ist eine Methode zur Amplifizierung spezifischer Sequenzabschnitte eines DNA-Doppelstranges von 100 – 1000 bp Länge *in vitro*. Hierbei werden folgende Reaktionsschritte unterschieden: Die Denaturierung der DNA, das Binden der *Primer* (*Annealing*) und die Extensionsreaktion.
Zuerst wird der DNA-Doppelstrang durch Erhöhung der Temperatur auf 95 ° C in zwei Einzelstränge aufgetrennt. An die Einzelstränge können nun die *Primer* binden, die aus 18 – 27 bp langen Oligonukleotiden bestehen. In diesem zweiten Schritt kann die Temperatur zwischen 50 – 70 ° C (*Annealing*-Temperatur) abhängig von dem *Primer*-Paar variieren. Im dritten Schritt verlängert eine hitzestabile *Taq*-Polymerase die *Primer* ausgehend von der *Primer*-Bindungsstelle

in 5 ´ - 3 ´ - Richtung bei 72 ° C. Alle drei Reaktionsschritte werden 35 mal wiederholt, um eine ausreichende Amplifikation zu erreichen.

Im Allgemeinen enthält ein PCR-Ansatz DNA als Matrize, *aqua dest*., Nukleotide, 10 x – TBE - Puffer, Vorwärts- sowie Rückwärts-*Primer* und *Taq*-Polymerase. Als Zusatzstoffe kann man sowohl Betain, DMSO als auch Formamid verwenden.

2.3.4. Gradienten-PCR

Für jedes *Primer*-Paar wurde zu Beginn die optimale *Annealing*-Temperatur bestimmt. Dazu wurde eine Gradienten-PCR verwendet, wobei die Reaktionsgefäße mit verschiedenen *Annealing*-Temperaturen erhitzt wurden. Abgesehen von der Temperatur unterlagen die Reaktionsgefäße denselben Bedingungen. Die Temperaturunterschiede betrugen zwischen 1 – 2 ° C. Nach der PCR wurde anhand der Intensität der Bande auf einem Agarose-Gel die optimale *Annealing*-Temperatur für das *Primer*-Paar abgelesen (***Abb. 8***).

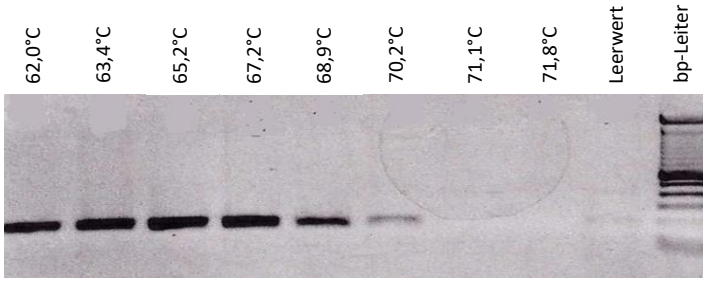


Abb. 8: Gradienten-PCR zur Ermittlung der optimalen *Annealing*-Temperatur (hier 67 ° C).

2.3.5. Agarosegel-Eletrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist ein Trennverfahren, das DNA-Moleküle aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld auftrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist in erster Linie abhängig von der Molekülgröße und der angelegten Spannung, aber auch von der Konformation und Ladung des Moleküls. Um die DNA unter ultravioletter Bestrahlung sichtbar zu machen, wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid (1,88‰) versetzt (***Abb. 9***).

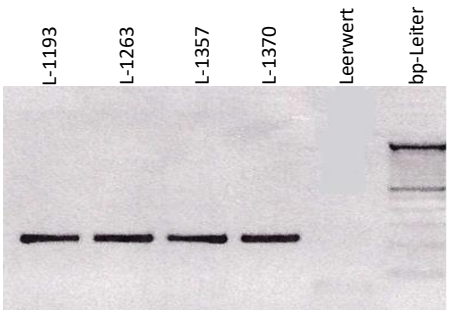


Abb. 9: Agarosegel-Elektrophorese nach einer PCR von vier Proben mit Leerwert und Basenpaarleiter.

2.3.6. DNA-Sequenzierung

Die Proben, die durch die Schmelzkurvenanalyse als abweichend von dem Wildtyp detektiert wurden (*Kap. 3.1.1.3*), und das Kollektiv zur kompletten Sequenzierung (*Kap. 2.1.2*) wurden nach der Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Zunächst wurde das erste PCR-Produkt durch eine Exonuclease aufgereinigt. Danach folgte eine weitere PCR mit einem *Kit* (*Terminatormix*), der normale dNTPs und ddNTPs enthielt. Diese ddNTPs terminieren die Extensionsreaktion. Außerdem sind sie für jede Base spezifisch mit Fluoreszenz markiert. Dadurch entstehen n - viele PCR-Produkte, die sich nach Wahrscheinlichkeitsberechnungen genau um eine Basenlänge unterscheiden. Da die letzte Base mit Fluoreszenz markiert ist, kann das Sequenziergerät (*Applied Biosystems®*) nach einer Auftrennung der DNA-Fragmente die Basenfolge des Produkts erkennen. Die Sequenz wurde danach mit Analyseprogrammen (*Mutation-Surveyor®, ChromasLite®*) ausgewertet.

2.3.7. PCR am *Light-Cycler®* und Schmelzkurvenanalyse

Am Echtzeit-PCR-Gerät *Light-Cycler®* 480 wurden die Proben mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse nach Variationen im Gen untersucht. Zunächst führt der LC eine PCR mit 45 Zyklen durch. Im Anschluss an die PCR werden die Doppelstränge bei 95 ° C aufgeschmolzen und daraufhin schnell auf 40 ° C abgekühlt, damit sich alle Einzelstränge zu Doppelsträngen verbinden. Nun beginnt die eigentliche Aufschmelzung, während die Temperatur langsam von 60 ° C auf 95 ° C ansteigt. Dabei werden die Doppelstränge, die an allen Basen komplementär gebunden sind, in einer anderen Geschwindigkeit getrennt, als die Doppelstränge, die durch eine Mutation nicht an allen Basen komplementär sind. Um das Schmelzverhalten detektieren zu können, wurde das Reaktionsgemisch mit einem fluoreszierenden Farbstoff (*HRM-Dye*) versetzt. Dieser Farbstoff

interkaliert in doppelsträngige DNA, bindet aber nicht an DNA-Einzelstränge. Dadurch entsteht während des Schmelzvorgangs eine exponentiell abfallende Kurve (***Abb. 10***).

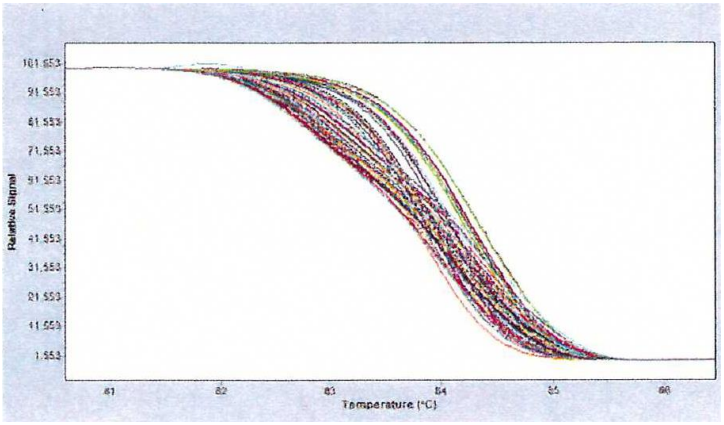


Abb. 10: Schmelzkurve am LC. Die Fluoreszenzintensität nimmt bei steigender Temperatur ab. X-Achse Temperatur, y-Achse relatives Signal.

Die Besonderheit dieser Methode ist, dass anhand dieser Schmelzkurve jede Punktmutation erkannt werden soll, weil minimale Schmelzunterschiede, die z.B. aufgrund eines Basenaustausches auftreten, von dem normalen Kurvenverlauf abweichen. Die Schmelzunterschiede entstehen dadurch, dass ein Doppelstrang mit einer heterozygoten Mutation, aufgrund des Basenaustausches und der daraus resultierenden veränderten Bindungsstärke, bei einer niedrigeren Temperatur auseinander schmilzt, als ein Wildtyp.

Hatte das PCR-Produkt eines Exons eine Länge von mehr als 400 bp, wurde das Exon in zwei Hälften geteilt (Exon 5).

Damit die Analyse keine fehlerhaften Ergebnisse liefert, müssen bestimmte Voraussetzungen gegeben sein: Nach der Etablierung der *Primer* folgte eine $MgCl_2$-Titration von 1,0mM bis 3,5mM in 0,5mM Schritten. Durch die optimale $MgCl_2$-Konzentration wird die höchste Spezifität und Stabilität der PCR erreicht. Außerdem wurde jede Probe mit DNA (0,75µg) versetzt, die keine genetische Variation trägt. Damit wird die Sensitivität für homozygote Mutationsträger erhöht, da sich durch die Zugabe der Wildtyp-DNA auch heterozygote Doppelstränge bilden, die dann bei einer anderen Temperatur aufschmelzen.

Zur Etablierung wurden bei jeder PCR am LC schon sequenzierte Proben (Wildtyp und Genvariationträger aus der spanischen Population) neben unbekannten Proben analysiert. Die Proben mit bekanntem genetischen Status dienten der Kontrolle der Schmelzkurvenanalyse, ob Unterschiede detektiert werden. Somit konnte die Sensitivität ermittelt werden.

Die Auswertung der Schmelzkurven erfolgte mit Hilfe der *Light-Cycler®-Software.*

Nach Erläuterung der Methoden des genetischen Projekts erfolgt nun die Beschreibung der Methoden der Proteinanalyse. Zu Beginn finden sich die Zellkultivierung, die Behandlung der Zellen mit Toxinen und die Analysen hinsichtlich des Sterbeverhaltens der Fibroblasten. Im Anschluss werden die Vorbereitungen und die Durchführung des *Westernblottings* beschrieben.

2.3.8. Zellkultur

Humane Hautfibroblasten von Mutationsträgern im *Parkin*-Gen wurden für diese Arbeit verwendet. Hautfibroblasten von nicht Betroffenen dienten als Negativ-Kontrollen (*Kap. 2.1*). Ein Teil steht in enger Verwandtschaft mit den Betroffenen, andere weisen kein verwandtschaftliches Verhältnis auf.

Die Zellen wurden in *Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium* (DMEM) versetzt mit 10 % fetalem Kalbsserum (FBS) und 1 % Penicillin / Streptomycin bei 37 ° C und 5 % CO_2 in 95 % Luft kultiviert. Konfluente Zellpassagen wurden durch die Behandlung mit Accutase für etwa 3 min bei 37 ° C von der Kulturplatte gelöst. Die gelösten Zellen wurden wieder mit einer Dichte von ⅓ in neue Kulturplatten gepflanzt. Auch wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min pelletiert, danach einmal mit 1 x PBS gewaschen und bei – 80 ° C eingefroren. Diese Zellpellets wurden für weitere Experimente, wie mitochondriale Präparation und *Westernblotting* verwendet.

2.3.8.1. Behandlung der Zellen mit Toxinen

Zur Untersuchung der Zellen unter oxidativem Stress wurden die Zellen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Paraquat und Chloroquin behandelt. Die Toxine wurden für 24 h dem Medium in folgenden Konzentrationen beigefügt: H_2O_2 hatte eine Konzentration von 50µM, Paraquat von 50µM und Chloroquin von 100µM. Diese Behandlung wurde für den *Tripan-blue-exclusion-Assay*, die Lactat-Dehydrogenase-Messung und die Proteinanalyse durch *Westernblot* benutzt.

2.3.9. *Tripan-blue-exclusion-Assay*

Der Farbstoff *Tripan-Blue* kann durch eine vorgeschädigte sterbende Zellmembran in abgestorbene Zellen eindringen und diese anfärben. Dazu wurde der Farbstoff in einer Konzentration von 0,4 % *Tripan-Blue* mit einer Zellsuspension vermischt und 5 min inkubiert. Am Mikroskop wurden dann die lebenden und die toten Zellen mit Hilfe einer Burkitt-Kammer gezählt und das Verhältnis berechnet.

2.3.10. Lactat-Dehydrogenase-Messung

Das Enzym Lactat-Dehydrogenase (LDH) ist in der Zelle ubiquitär in gleicher Menge vorhanden und wird bei jeglicher Art von Zelltod freigesetzt. Eine quantitative Analyse wurde mit Hilfe eines *Kits* durchgeführt (SIGMA: *In-vitro-Toxicology-Assay-Kit, Lactic-Dehydrogenase-based*), der Laktat als Substrat und $NADH+H^+$ als Cofactor nutzt und einen Tatrazolim-Farbstoff enthält. Während der Reaktion wurde durch die LDH $NADH+H^+$ zu $NAD^+ + H_2$ reduziert. Der Tatrazolim-Farbstoff wird in Anwesenheit von NAD+ zu einem farbigen Formazan-Derivat, welches photometrisch messbar ist (Spektrophotometer). Nach einer quantitativen Analyse konnten Aussagen über das Sterbeverhalten der Zellen unter verschiedenen Bedingungen getroffen werden.

2.3.11. Proteinanalyse durch *Westernblot*

Nun wird die Herstellung von Zellhomogenisaten und die mitochondriale Präparation erläutert. Die Durchführung dieser Methoden ist unerlässlich zur Anfertigung einer *Westernblot*-Analyse. Die Schritte der *Westernblot*-Analyse werden im Anschluss beschrieben.

2.3.11.1. Herstellung von Zellhomogenisaten

Wenn die Zellkulturflasche zu ca 80 % bewachsen war, konnten die Zellen pelletiert (*Kap. 2.3.8*) und in 200µl RIPA-Puffer (50mM Tris - HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 % Triton X - 100, 1 % Sodium deoxycholat, 0,1 % SDS) mit *1 X Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail* (*Roche®*) gelöst werden. Darin sollten die Zellen mindestens 30 min bleiben, damit alle Membranen, Organellen und andere größere Zellanteile ihre Stabilität und Struktur verlieren. Danach muss eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min folgen, um alle unlöslichen Strukturen zu entfernen. Der Überstand kann nun für Analysen verwendet werden.

2.3.11.2. Mitochondriale Präparation

Um auf ein *Westernblot* verschiedene Zellfraktionen auftragen zu können, mussten die gewünschten Fraktionen (zytosolische und mitochondriale Fraktion) durch folgenden Prozess aufgetrennt werden. Zunächst wurden die Zellen aus einer 175 cm^2 großen Flasche pelletiert (*Kap. 2.3.8*) und für 12 h bei – 80 ° C eingefroren. Die weiteren Schritte erfolgen alle bei 4 ° C. Nun wurde das Zellpellet mit 1 ml Homogenisierungspuffer (10mM Tris pH 7,4, 1mM EDTA, 250mM Sucrose) mit 1 X *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail* (*Roche®*) zur Aufreinigung resuspendiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation bei 4000 x g für 5 min verworfen und

das Pellet wiederum mit 2 ml Homogenisierungspuffer gelöst. Die eigentliche Homogenisierung erfolgte über mechanische Einwirkung mittels eines 800 rpm schnellen rotierenden Stabes. Durch mindestens 15 auf- und ab-Bewegungen am Stab entlang, während dieser rotierte, wurden die Zellmembranen zerstört ohne die Organellen zu beschädigen. Der Erfolg wurde am Mikroskop überprüft. Es durften keine intakten Zellmembranen mehr sichtbar sein. Lagen nur noch einzelne Zellbestandteile ohne Zellverband vor, wurde das Homogenisat bei 1500 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen gegeben. Dieser Überstand wurde nun bei 10000 rpm für 10 min lang zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet stellte die mitochondriale Fraktion dar, während der Überstand die zytosolische Fraktion war.

Zur Aufreinigung der zytosolischen Fraktion wurde diese erneut bei 10000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen gegeben.

Zur Aufreinigung der mitochondrialen Fraktion wurde das Pellet in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und wiederum bei 10000 rpm 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Um nun die mitochondrialen Proteine zu isolieren, wurden 50µl RIPA-Puffer zu dem Pellet gegeben. Nach 30 min wurden die mitochondriale Membran und andere komplexe Bestandteile der Mitochondrien bei 13000 rpm für 30 min pelletiert und der Überstand als mitochondriales Proteingemisch in ein neues Röhrchen transferiert.

2.3.11.3. Gel-Elektrophorese und Transfer

Gele, die einen Konzentrationsgradient von 4 – 12 % (*NuPage)* haben, wurden für diese Experimente verwendet. Die Gele wurden in der passenden Kammer befestigt, die mit *Running-Buffer* aufgefüllt wurde. In den Raum zwischen den Gelen wurde zusätzlich noch ein Antioxidant (*NuPage*) zugegeben. Die Proben enthielten eine Menge an Proteinen von 5 µg und wurden mit 1,0 µl DTT und 2,5 µl *2 x sample-loading-buffer* (*NuPage*) versetzt. Insgesamt war ein Volumen zwischen 10 – 20 µl erwünscht. Die Proben wurden bei 95 ° C für 5 min denaturiert und schließlich auf das Gel geladen. Die erste Tasche war reserviert für den *molecular-weight-protein-standard* (*BioRad*). Die Elektrophorese war auf 150 V für 90 min eingestellt. Danach wurden die Platten, die das Gel umschlossen, voneinander getrennt. Der obere Teil des Gels, der die Taschen darstellte, wurde abgetrennt. In die Transferkassette wurden zunächst ein Schwamm und ein Filterpapier (*Whatman*) gelegt, worauf die Nitrocellulosemembran (*Whatman*) und das Gel folgten, wobei das Gel auf der Seite der Anode liegen muss. Zum Abschluss werden ein weiteres Filterpapier (*Whatman*) und ein weiterer Schwamm platziert, die Kassette verschlossen und mit Transfer-Puffer und 10 % Methanol (*NuPage*) aufgefüllt. In die Kammer außerhalb der Kassette wurde zur

Kühlung Wasser gefüllt. Bei 32 V lief der Transfer über 70 min. Der Effekt des Transfers wurde nachher mit *Ponceau S Lösung* (*Sigma*) überprüft.

2.3.11.4. Inkubation mit Antikörpern

Für jeden Antikörper wurde die ideale Konzentration bestimmt (***Tab. 7***) und alle weiteren Experimente damit durchgeführt.

Antikörper	Konzentration
Anti-β-Actin (Maus)	1:400000
Anti-α-Synuclein (Maus)	1:1000
Anti-Bax (Kalia LV)	1:2000
Anti-Bcl_2 (Kalia LV)	1:1000
Anti-Maus (Ziege)	1:10000
Anti-Hase (Ziege)	1:10000

Tab. 7: Antikörper und deren Konzentrationen

Nach Übertragung der Proteine auf das Filterpapier folgte nun die Inkubation mit den Antikörpern. Zunächst wurden die Membranen dreimal für 5 min in TBST gereinigt. Folgend wurde eine 1 %ige Milchlösung in TBST hergestellt und das Filterpapier eine Stunde bei Raumtemperatur darin geschwenkt. Dies diente der Blockierung der Bindung unspezifischer Proteine.

Nun wurde die primäre Antikörperlösung erstellt. Diese bestand aus 1 %iger Milch gelöst in TBST und den primären Antikörpern in der o. g. Konzentration. Die Membranen wurden nun über mindestens 12 h bei 4 ° C darin geschwenkt. Im Anschluss wurde das Filterpapier erneut dreimal 5 min in TBST gereinigt. Jetzt konnte die Lösung für die sekundären Antikörper erstellt werden. Die sekundären Antikörper wurden danach ausgewählt, durch welches Tier die primären Antikörper gebildet wurden. Wieder wurde eine 1 %ige Milchlösung hergestellt und die sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 hinzugegeben. Es erfolgte die Inkubation über eine Stunde bei Raumtemperatur.

2.3.11.5. Chemilumineszenz

Zur Darstellung der Proteine erfolgte nun die Markierung der sekundären Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase. Diese ist in einer Lösung des *Kits* für die Durchführung der Chemilumineszenz enthalten. Die zweite Lösung enthält Luminol, welches durch die Peroxidase aktiviert wird und so Licht emittiert.

In der Durchführung wurden beide Lösungen zu gleichen Teilen miteinander vermischt und die Membranen für 1,5 min bei Raumtemperatur darin inkubiert. Zuvor wurden sie erneut dreimal für je 5 min in TBST gereinigt.

Auch nach der Inkubation wurden die Membranen wieder gewaschen.

Nun konnte die Entwicklung der Filme mit unterschiedlichen Expositionszeiten in der Dunkelkammer beginnen. Dort entstanden Fotographien der Membranen.

2.3.11.6. Quantitative Analyse der Banden

Zur quantitativen Analyse der Banden wurde eine *Software* namens *total-lab-software* verwendet.

2.3.12. Auswertung/Statistik

Zur Ermittlung des Signifikanzniveaus wurde der t-Test verwendet.

Die Berechnungen der Sensitivität und Spezifität am LC erfolgten mithilfe der Vierfeldertafel (***Tab. 8***).

	Mutation	**Keine Mutation**	
Positiv getestet	A	B	A+B
Negativ getestet	C	D	C+D
	A+C	B+D	∑

Tab. 8: **Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität**

Sensitivität = A / (A + C)

Spezifität = D / (B + D)

3. Ergebnisse

Zunächst werden die Ergebnisse der genetischen Analyse beschrieben (*Kap. 3.1*), im Anschluss die der Proteinanalyse (*Kap 3.2*). Die angegeben Sequenzlokalisationen wurden nach folgenden Referenzsequenzen ermittelt: genomisch NG_009054.1, kodierend NM_022089.2, Proteinsequenz NP_071372.1. Alle Ergebnisse wurden zum Beweis der Reproduzierbarkeit mindestens dreimal wiederholt.

3.1. Ergebnisse der genetischen Analyse

Im folgenden Abschnitt werden die Auswahl der Patienten, Probleme der Methoden und die Ergebnisse der Sequenzanalyse vom *ATP13A2*-Gen zusammen mit der statistischen Auswertung beschrieben. Das Ziel der genetischen Analyse war vor Allem die Etablierung einer *Screening*-Methode, das Auffinden von unbekannten Mutationen, von *Missense*-Mutationen in der Lübecker Population, aber auch die statistische Auswertung hinsichtlich der Häufigkeit von *single-nucleotide-polymorphisms* (SNPs).
Die zu untersuchenden Proben (n = 622) wurden anhand dessen ausgewählt, dass bei den zugehörigen Patienten die Diagnose MP am UKSH Campus Lübeck gestellt wurde. Weitere Kriterien, wie Geschlecht, Alter, Erkrankungsalter, Familienanamnese, ethnische Zugehörigkeit oder Art und Schwere der Symptome wurden bei der Erhebung nicht berücksichtigt.

3.1.1. Schmelzkurvenanalyse am *Light-Cycler®*

Zu Beginn sollte die Schmelzkurvenanalyse am LC etabliert werden. Hierbei handelt es sich um eine Methode, die zunächst eine gewöhnliche PCR durchführt, bei der die dNTPs mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind, der ausschließlich an doppelsträngige DNA bindet. Im Anschluss an die PCR werden die Proben zunächst erhitzt, um die Doppelstränge zu lösen, und sehr schnell wieder abgekühlt, damit sich sowohl homozygote als auch heterozygote Doppelstränge bilden. Diese Doppelstränge werden dann langsam wieder aufgeschmolzen und mithilfe von Fluoreszenz detektiert. Dabei sollen bei den Proben, die keine Mutation tragen, die Doppelstränge bei anderen Temperaturen schmelzen, als bei den Proben, die eine Mutation tragen (*Kap. 2.3.7*).
Als Voraussetzung für diesen Test wurde eine Sensitivität von 95 % festgelegt.
Bevor die Arbeit am LC beginnen konnte, mussten zunächst die *Primer* ausgewählt und etabliert werden (*Kap. 3.1.1.1*). Laut Hersteller sollen die amplifizierten Sequenzen nicht größer als 400 bp,

idealerweise kleiner als 250 bp sein. Überschritt das PCR-Produkt die Länge, wurde es zur Analyse in zwei Hälften geteilt. Die *Primer* wurden von der Firma *Qbiogene*® hergestellt.

3.1.1.1. Etablierung der *Primer*

Zunächst wurde eine PCR unter Standardbedingungen bei einer *Annealing*-Temperatur von 52 ° C durchgeführt, um allgemein festzustellen, ob eine PCR-Amplifizierung stattgefunden hat oder nicht. Dafür wurden die Proben im Anschluss an die PCR-Reaktion auf Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Auf diese Weise konnte man die Anzahl der Banden, die Größe der Fragmente und die Reinheit der Proben erkennen.

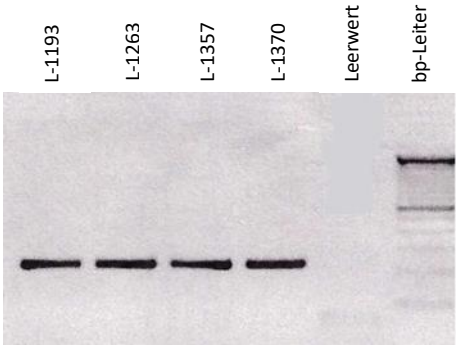


Abb. 11: Nachweis eines einzelnen PCR-Produkts für ein exemplarisches *Primer*-Paar.

Falls nach einer PCR mit einer *Annealing*-Temperatur von 52 ° C auf dem Agarosegel keine Banden zu sehen sind, muss die PCR wiederholt werden, wobei dann Zusatzstoffe, wie DMSO, Betain oder Formamid, die die PCR unterstützen sollen, dem Reaktionsgemisch beigefügt werden. Die verschiedenen Zusatzstoffe werden in unterschiedlichen Konzentrationen beigemischt, bis eine Bande auf dem Agarosegel zu sehen ist. Des Weiteren kann man auch die Konzentrationen der DNA oder der *Primer* verändern.

Nachdem auf dem Agarosegel Banden zu sehen waren, wird eine Gradienten-PCR durchgeführt um die optimale *Annealing*-Temperatur zu ermitteln. Dabei wird für jede Probe eine andere *Annealing*-Temperatur festgelegt. Die Temperaturspanne wird manuell eingestellt. Auch diese PCR-Produkte werden auf Agarosegel aufgetragen. Die optimale Temperatur ergibt sich aus der höchsten Temperatur, bei der eine ausreichend dicke Bande mit der richtigen Fragmentgröße zu erkennen ist (***Abb. 12***).

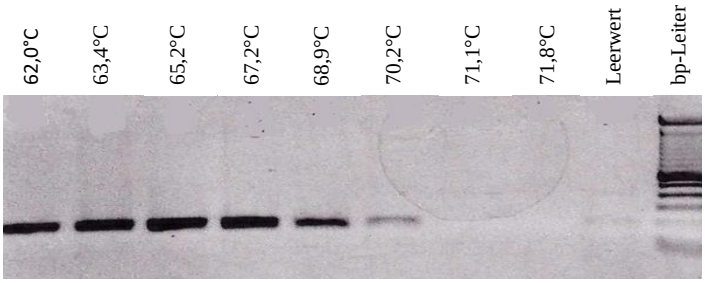


Abb. 12: Gradienten-PCR zur Ermittlung der optimalen *Annealing*-Temperatur (hier 67 ° C).

Damit ist die Etablierung für die allgemeine PCR abgeschlossen.

Um nun die PCR auf den LC zu übertragen, muss zunächst eine $MgCl_2$-Titration durchgeführt werden. Dabei werden die Proben mit verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen von 1,0 - 3,5 µmol versetzt. Im Anschluss an die PCR am LC werden sowohl die Amplifikationskurven betrachtet, als auch die Proben wieder auf Agarosegel aufgetragen. In der Amplifikationskurve musste ein deutlicher exponentieller Anstieg dargestellt werden. Die Entscheidung, welche $MgCl_2$-Konzentration die Optimale ist, ist abhängig von dem Anstieg der Amplifikationskurve und der Stärke der Bande auf dem Agarosegel.

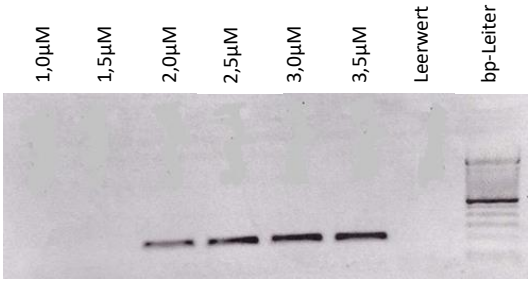


Abb. 13: $MgCl_2$-Titration zur Bestimmung der optimalen $MgCl_2$-Konzentration (hier 2,5 µM).

Allerdings wirft die Etablierung der PCR am LC einige Probleme auf (*Kap. 3.1.4*). Daher konnte die Schmelzkurvenanalyse am LC nicht für alle *Primer-P*aare etabliert werden. Die Protokolle der etablierten Paare sind in **Tab. 9** zusammengefasst.

Exon	*Annealing*-Temperatur (° C)	$MgCl_2$-Konzentration (µM)
4	61	2,5
5.2	68	2,5
10	64	3,5
11	69	2,5
12	65	2,5
13	63	3,0
16	54	2,5
17	63	3,0
18	56	5,5
20	63	3,0
21-22	65	2,5
23	63	3,5
24	61	3,0
27	61	2,5
28	66	2,0

Tab. 9: PCR-Protokolle am LC für das Gen *ATP13A2*

Nur für 15 *Primer*-Paare konnte am LC eine gute Amplifikationskurve erreicht werden. Auch nach Veränderung verschiedener Parameter, wie die Dauer der Temperaturunterschiede, Herabsetzung der *Annealing*-Temperatur oder Zugabe von Zusatzstoffen (Betain, Formamid, DMSO) erbrachte keine Verbesserung. Dadurch konnte keine auswertbare Schmelzkurve erstellt werden. Für die 15 *Primer*-Paare, die eine gute Amplifikationskurve aufweisen konnten, wurde nun die Testung der Sensitivität durchgeführt. Dies wird im folgenden Kapitel beschrieben.

3.1.1.2. Testung auf Sensitivität

Nach Etablierung der Versuchsbedingungen für die PCR am LC wurden Analysen mit den zu analysierenden Proben durchgeführt. In den ersten Ansätzen wurden vier Proben mit unbekannten genetischen Status, sowie mindestens eine, die keine Mutation im *ATP13A2*-Gen trägt und - wenn vorhanden - auch Proben, die bekannte SNPs tragen, analysiert. Die Kontroll-Proben wurden den schon vor dieser Arbeit analysierten Proben der spanischen Population (***Tab. 17***) entnommen.

Das Ziel war, eine gut auszuwertende Schmelzkurvenanalyse zu erhalten. Darin sollten sich die Wildtyp-Probe und die SNP-tragende Probe hinsichtlich ihres Schmelzverhaltens unterscheiden. Die Proben, deren genetischer Status noch unbekannt war, sollten sich den anderen Schmelzkurven zuordnen oder andere Schmelzkurven bilden. Leider konnte eine Schmelzkurvenanalyse nach den o. g. Vorgaben ausschließlich für Exon 5.2, 11, 17 und 20 reproduzierbar etabliert werden. Die weitere Auswertung wird im folgenden Kapitel beschrieben.

3.1.1.3. Auswertung der Schmelzkurve

Nachdem für die Exons die zugehörigen *Primer* hinsichtlich der *Annealing*-Temperatur und der $MgCl_2$-Konzentration etabliert wurden, sowie eine Sensitivität von 95 % erreicht wurde, beginnen nun die Analysen aller Proben. Dafür werden die Schmelzkurvenanalysen am Ende des Laufs betrachtet. Als Referenz wird in jeder Versuchsreihe auch eine Probe analysiert, die schon nach Sanger sequenziert wurde und keine genetischen Veränderungen trägt. Außerdem werden allen Proben auch Wildtyp-DNA in einer Konzentration von 3,75 % zugemischt, damit Proben mit homozygoten Mutationen besser in der Schmelzkurvenanalyse auffallen, weil sich durch diese Beimischung auch heterozygote Doppelstränge vor der Aufschmelzung bilden. Dadurch soll der Unterschied im Schmelzverhalten zwischen Wildtypen und homozygoten Mutationsträgern verstärkt werden.

Anhand der Schmelzkurve können nun verschiedene Gruppen von Proben abgelesen werden, die sich hinsichtlich der Schmelztemperaturen unterscheiden. Dabei handelt es sich um eine Gruppe, die die Wildtypen darstellt und eine oder mehrere weitere Gruppen, die sich von den Wildtypen unterscheiden.

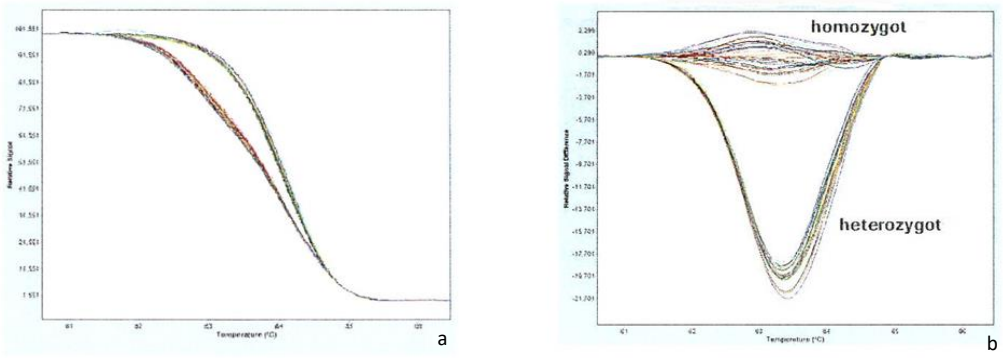


Abb. 14: (a) Darstellung der Schmelzkurve (exemplarisch für Exon 20). Erkennbar sind zwei verschiedene Schmelzpunkte; (b) Auswertung der Schmelzkurve. Die heterozygoten Mutationsträger werden deutlich von den homozygoten Wildtypen abgehoben. Die homozygote Gruppe beinhaltet einen bekannten Wildtyp, die heterozygote einen bekannten SNP.

Das Ergebnis dieser Methode ist die Differenzierung zwischen Proben, die den Wildtypen entsprechen und damit nicht weiter analysiert werden müssen und den Proben, die anders aufschmelzen als die Wildtypen und deshalb genauer untersucht werden sollten.

Die Analyse von Exon 17 wurde abgebrochen, da auf diesem Exon ein SNP (rs2076603, g.24413C>G, g.24413C>T, g.24413C>A, c.2005C>G, c.2005C>T, c.2005C>A, p.Pro605Pro) mit einer Häufigkeit von 68,622 % in der Allgemeinbevölkerung (UCSC) liegt.

Auf diese Weise konnten für jedes der drei *Primer*-Paare Proben ermittelt werden, deren Schmelzverhalten sich von Wildtypen unterschied (***Tab. 10***).

Exon	Absolute Anzahl	Relative Anzahl (%)
5.2	39	6,27
11	38	6,11
20	318	51,13

Tab. 10: Absolute und relative Anzahl (bezogen auf die Gesamtanzahl von n = 622) der Proben, die sich im Schmelzverhalten von einem bekannten Wildtyp am LC unterschieden.

Wiesen Proben Unterschiede im Schmelzverhalten im Gegensatz zum Wildtyp auf, schloss sich eine Sequenzanalyse nach Sanger an (*Kap. 2.3.6*) (Sanger *et al.*, 1977). Damit ist eine genaue Darstellung der Basenfolge des untersuchten Genabschnitts möglich. Dieses wird im Folgenden erläutert.

3.1.1.4. Vollständige Sequenzanalyse der *Light-Cycler®*-Proben

Um die Proben, die in der Schmelzkurvenanalyse anders als die Wildtypen gruppiert wurden, genauer zu untersuchen, wurde eine Sequenzanalyse nach Sanger durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Dafür wurden diese Proben erneut amplifiziert und nach Kopplung an fluoreszierende ddNTPs mittels eines *Sequenzer* (*Applied Biosystems®*) bestimmt.

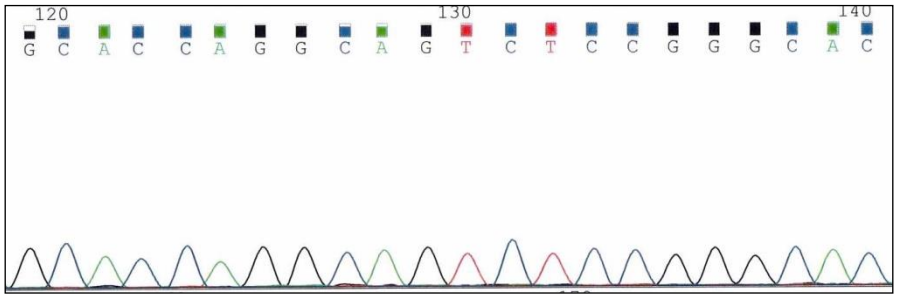


Abb. 15: Teil der Sequenz von Exon 11 in *ATP13A2* nach Sequenzanalyse

Die ermittelten Sequenzen wurden mit einer Sequenzanalyse-*Software* (*Mutation-Surveyor®* und *ChromasLite®*) auf Abweichungen vom Wildtyp analysiert.

Die Ergebnisse der analysierten Exons sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

	Proben durch LC detektiert	Proben, die SNP tragen	rs55979991 g.12213C>T
Funktion der SNPs			Synonyme Variante c.643C>T p.Ser151Ser
Absolute Anzahl	39	0	0
Relative Anzahl (%) bezogen auf 622 Proben	6,27	0	0
Relativer Anteil (%) bezogen auf die Proben durch LC detektiert	100	0	0
Anteil in der Allgemeinbevölkerung (UCSC) (%)	n. a.	< 1	< 1
Signifikanzniveau zw. Allgemeinbevölkerung und Lübecker Patientenkollektiv	n. a.	0,157	0,157

Tab. 11: Sequenzanalyse Exon 5.2 im Gen *ATP13A2* (Signifikanzniveau 5 %)

Die Analyse von Exon 5.2 ergab 39 auffällige Proben hinsichtlich ihres Schmelzverhaltens. Eine Veränderung der Gensequenz konnte allerdings in keiner dieser Proben ermittelt werden. Die Sensitivität konnte leider nicht sicher getestet werden, da keine mutationstragende Probe dieser Arbeit zur Verfügung stand. Die errechnete Spezifität beträgt 93,73 %.

	Proben durch LC detektiert	**Proben, die SNP tragen**	**rs17855550 g.16844A>G**	**rs56290406 g.16884C>T**
Funktion der SNPs			*Missense*-Variante c.1155A>G p.Gln322Arg	Synonyme Variante c.1195C>T p.Ala335Ala
Absolute Anzahl	38	38	0	38 (davon ho 8; het 30)
Relative Anzahl (%) bezogen auf 622 Proben	6,11	6,11	0	6,11 (davon ho 1,29; het 4,82)
Relativer Anteil (%)bezogen auf die Proben durch LC detektiert	100	100	0	100 (davon ho 21,05; het 78,95)
Anteil in der Allgemeinbevölkerung (UCSC) (%)	n. a.	ca 4	< 1	3,946
Signifikanzniveau zw. Allgemeinbevölkerung und Lübecker Patientenkollektiv	n. a.	0,523	0,157	0,523

Tab. 12: Sequenzanalyse Exon 11 im Gen *ATP13A2* (Signifikanzniveau 5 %)

Für Exon 11 konnten 38 Proben hinsichtlich ihres Schmelzverhaltens detektiert werden und alle diese Proben tragen die synonyme Variante rs56290406 (g.16884C>T, c.1195C>T, p.Ala335Ala). Daher konnte zusätzlich zu der vorausgesetzten Sensitivität von 95 % eine Spezifität von 100 % errechnet werden.

	Proben durch LC detektiert	**Proben, die SNP tragen**	**rs17852747 g.25099C>T**	**rs138294777 g.25257G>A**	**rs56010635 g.25331C>T**	**rs56359655 g.25353C>G**	**rs55633553 g.25355C>T**	**rs2076604 g.25359A>G**
Funktion der SNPs			Synonyme Variante, c.2345C>T p.Leu719Leu	*Intron*-Variante	*Intron*-Variante	*Intron*-Variante	*Intron*-Variante	*Intron*-Variante
Absolute Anzahl	318	200	0	0	0	0	0	200 (davon ho 20; het 180)
Relative Anzahl (%) bezogen auf 622 Proben	51,13	32,15	0	0	0	0	0	32,21 (davon ho 3,05; het 28,94)
Relativer Anteil (%) bezogen auf die Proben durch LC detektiert	100	62,89	0	0	0	0	0	62,89 (davon ho 6,29; het 56,60)
Anteil in der Allgemeinbevölkerung (UCSC) (%)	n. a.	ca 30	< 1	< 1	< 1	1,240	< 1	29,607
Signifikanzniveau zw. Allgemeinbevölkerung und Lübecker Patientenkollektiv	n. a.	0,520	0,157	0,157	0,157	0,104	0,157	0,381

Tab. 13: Sequenzanalyse Exon 20 im Gen *ATP13A2* (Signifikanzniveau 5 %)

Innerhalb von Exon 20 konnten 318 Proben hinsichtlich ihres Schmelzverhaltens erkannt werden. Davon tragen 200 Proben eine *Intron*-Variante (rs2076604, g.25359A>G), die übrigen beinhalten die Wildtyp-Sequenz. Daraus ergibt sich für diesen Test eine Spezifität von 72,04 %.

Hinsichtlich der Häufigkeit der SNPs konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Lübecker Patientenkollektiv und der Allgemeinbevölkerung mithilfe des t-Tests berechnet werden.

Im nächsten Kapitel werden nochmals alle Probleme der Schmelzkurvenanalyse zusammengefasst.

3.1.1.5. Probleme der Schmelzkurvenanalyse

Wie in Kap. 3.1.1.1 und 3.1.1.2 erwähnt, stellen sich mehrere Probleme hinsichtlich der Schmelzkurvenanalyse dar, wodurch die Untersuchung mancher Exons auf diesem Wege erschwert wird. Ein Problem stellt die Umstellung von einem gewöhnlichen *Cycler* auf den LC dar, weil der LC schneller die Temperaturen wechselt. Deswegen kann es passieren, dass am LC, trotz guter Amplifikation am gewöhnlichen *Cycler,* kein PCR-Produkt auf dem Agarosegel zu sehen ist. In manchen Fällen kann eine Verlängerung der Heiz- und Kühlzeiten oder der Amplifikationsdauer helfen.

Auch bei guter Amplifikation konnten manche der Exons nicht ausgewertet werden, da sich in der Schmelzkurve keine Unterschiede im Schmelzverhalten zwischen schon bekannten Variationsträgern und nicht-Variationsträgern zeigten. Damit ist die Vorgabe der Sensitivität von 95 % nicht erfüllt. Daraufhin wurde das Projekt „Die Etablierung eines *Screening-V*erfahrens zur Detektion von *ATP13A2*-Mutationen“ für die restlichen 25 *Primer-P*aare abgebrochen und die folgende Untersuchung begonnen.

3.1.2. Sequenzanalyse der Lübecker Proben zur kompletten Sequenzierung

Aufgrund der aufgetretenen Problematik in der Analyse am LC, wie im vorangegangen Kapitel (*Kap. 3.1.1.5*) beschrieben, wurde ein Patientenkollektiv erstellt, welches die Parameter Erkrankungsalter ≤ 39 und/oder Demenz (MOCA-*Score* < 26, ***Abb. 35***) erfüllt (*Kap. 2.1.2*). Nach der Etablierung der *Primer-P*aare unter Standardbedingungen und Gradienten-PCR (***Tab. 15***), wurde die Sequenzanalyse nach Sanger durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels *Mutation-Surveyor®* und *ChromasLite®*. *In-silico*-Proteinanalysen wurden mithilfe der Datenbanken *PROVEANv1.1* (*Protein-Variation-Effect-Analyzer v1.1*) und *Uniprot* durchgeführt. Für die in den Proben ermittelten SNPs wurden die Häufigkeiten berechnet. Im Anschluss erfolgte der Vergleich der Häufigkeiten zwischen dem Lübecker Patientenkollektiv und der Allgemeinbevölkerung durch Berechnung des Signifikanzniveaus unter Verwendung des t-Tests.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Analyse ist in der folgenden Tabelle (***Tab. 14***) aufgeführt.

Exon	SNP	Funktion	Abs. Anzahl	Davon homozygot	Rel. Anzahl (%)	Anteil in der Allgemeinbevölkerung (UCSC) (%)	Signifikanzniveau zw. Allgemeinbevölkerung und Lübecker Patientenkollektiv
1	rs56047197 g.4964C>T	*Upstream*-Gen-Variante	37	0	39,36	38,958	p = 0,959
3	g.11399A>G c.322A>G p.Pro44Pro	Synonyme Variante	1	0	1,06	0,400	p = 0,158
4	rs41273155 g.11988C>G	*Intron*-Variante	3	0	3,19	3,922	p = 0,302
7	rs56327781 g.14693A>G	*Intron*-Variante	4	1	4,26	1,910	p = 0,267
10	rs140087527 g.16712G>T	*Intron*-Variante	1	0	1,06	1,140	p = 0,965
11	rs56290406 g.16884C>T c.1195C>T p.Ala335Ala	Synonyme Variante	8	0	8,51	3,946	p = 0,194
12	rs9435736 g.19975A>G	*Intron*-Variante	47	28	51,08	19,100	**$p = 2{,}136 \times 10^{-18}$**
12	rs55682704 g.20056_20056insC	*Intron*-Variante	16	16	17,02	< 1	**$p = 1{,}348 \times 10^{-8}$**
14	**Unbekannt g.20631C>G c.1487C>G p.Ser433Val**	***Missense*-Variante Neutral**	**1**	**0**	**1,06**	**n. a.**	**n. a.**
16	rs56351817 g.23165C>T c.1804C>T p.Pro538Pro	Synonyme Variante	1	0	1,06	< 1	p = 0,965
17	rs2076603 g.24413C>G g.24413C>T g.24413C>A c.2005C>G c.2005C>T c.2005C>A p.Pro605Pro	Synonyme Variante	65	26	69,15	68,622	p = 0,955
19	**Unbekannt g.24939C>T**	***Intron*-Variante**	**2**	**0**	**2,13**	**n. a.**	**n. a.**
20	rs2076604 g.25359A>G	*Intron*-Variante	33	2	35,11	29,607	p = 0,450
24	rs9435662 g.28482C>T c.2827C>T p.Gly879Gly	Synonyme Variante	55	12	69,15	60,551	p = 0,186
25	rs3738815 g.28722G>A c.2980G>A p.Ser930Ser	Synonyme Variante	27	2	28,30	22,997	**p = 0,004**

Tab. 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzanalyse des Lübecker Patientenkollektivs für das Gen *ATP13A2*. Alle darin detektierten Genvarianten werden hier aufgeführt. Bisher unbekannte Genvarianten und signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau 5 %) zwischen dem Lübecker Patientenkollektiv und der Allgemeinbevölkerung (nach UCSC) wurden hervorgehoben (Fortsetzung nächste Seite).

Fortsetzung Tab. 14

Exon	SNP	Funktion	Abs. Anzahl	Davon homozygot	Rel. Anzahl (%)	Anteil in der Allgemeinbevölkerung (UCSC) (%)	Signifikanzniveau zw. Allgemeinbevölkerung und Lübecker Patientenkollektiv
26	rs761421 g.29770G>A c.3160G>A p.Val990Val	Synonyme Variante	57	18	60,64	60,016	p = 0,928
26	rs55885047 g.29907C>T	*Intron*-Variante	6	2	6,38	1,822	p = 0,126
26	**Unbekannt g.29784T>C c.3174T>C p.Ala995Val**	***Missense*-Variante Pathogen**	**1**	**0**	**1,06**	**n. a.**	**n. a.**
27	rs7531163 g.29970C>T	*Intron*-Variante	33	4	35,11	29,400	p = 0,365
27	rs9435659 g.30081C>T c.3382C>T p.Ala1064Ala	Synonyme Variante	43	18	45,74	39,373	p = 0,067
28	rs2076605 g.30267C>T	*Intron*-Variante	56	20	59,57	36,066	**p = 0,0009**
28	**Unbekannt g.30403C>T c.3532C>T p.Thr1114Ile**	***Missense*-Variante Neutral**	**1**	**0**	**1,06**	**n. a.**	**n. a.**
29	rs3170740 g.30681G>A c.3706G>A p.Ala1172Thr	*Missense*-Variante Neutral	64	21	68,09	35,498	**p = 0,00015**

Insgesamt wurden vier bisher unbekannte Genvariationen detektiert. Es handelt sich um drei *Missense*-Varianten und eine *Intron*-Variante. Diese werden im Folgenden im Detail chronologisch beschrieben.

Eine der unbekannten *Missense*-Varianten befindet sich in Exon 14 auf Position g.20631C>G, c.1487C>G, p.Ser433Val. Es kommt zu einer Veränderung der Proteinsequenz, da für Valin anstatt für Serin codiert wird. Diese Variante wird in den *in-silico*-Proteinanalysen als neutral und nicht pathogen gewertet.

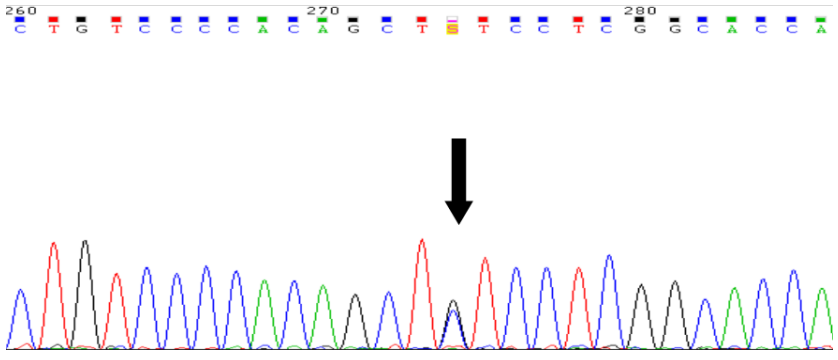


Abb. 17: Darstellung der unbekannten *Missense*-Variante g.20631C>G, c.1487C>G, p.Ser433Val in heterozygoter Form in Exon 14 in *ATP13A2* (Probe L-1193) (↓).

Für Exon 19 wurde eine bisher unbekannte *Intron*-Variante in zwei der hier analysierten Proben entdeckt (L-339, L-3037). Diese befindet sich auf Position g.24939C>T und liegt zwischen Exon 19 und Exon 20, nahe an Exon 19. Auf Genomebene wird Cytosin gegen Thymin ausgetauscht.

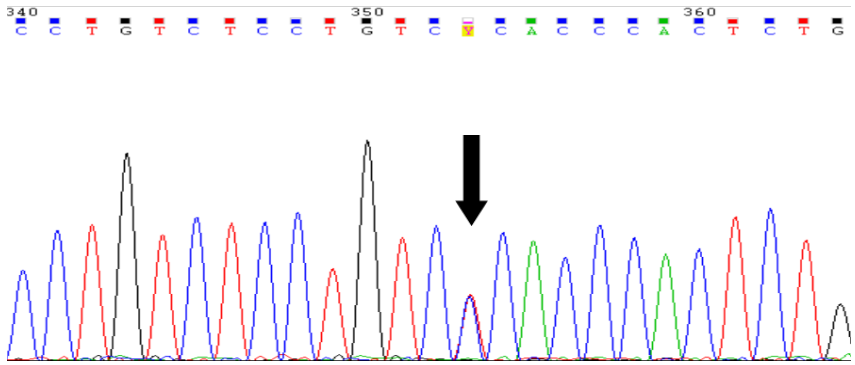


Abb. 18: Darstellung der unbekannten *Intron*-Variante g.24939C>T in heterozygoter Form hinter Exon 19 in *ATP13A2* (Probe L-339) (↓).

In Exon 26 wurde eine weitere bisher unbekannte Genvariation mit einer *Missense*-Funktion auf Position g.29784T>C, c.3174T>C, p.Ala995Val detektiert. Die genetische Sequenz wird durch Austausch von Thymin gegen Cytosin und die Proteinsequenz durch Austausch von Valin gegen Alanin verändert. Nach *in-silico*-Proteinanalysen ist diese Mutation pathogen.

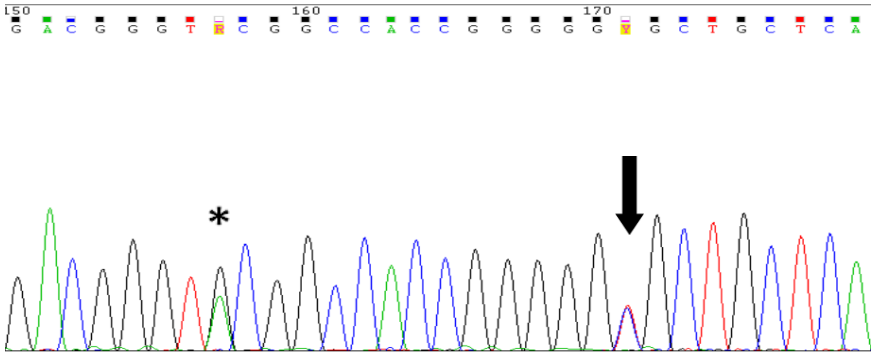


Abb. 19: Darstellung der unbekannten *Missense*-Variante (g.29784T>C, c.3174T>C, p.Ala995Val) in heterozygoter Form in Exon 26 in *ATP13A2* (Probe L-3029) (↓). Zusätzlich ist in dieser Sequenz die synonyme Variante rs761421 (g.29770G>A, c.3160G>A, p.Val990Val) enthalten (*).

Die vierte bisher unbekannte Mutation konnte in einer der hier analysierten Proben in Exon 28 auf Position g.30403C>T, c.3532C>T, p.Thr1114Ile entdeckt werden. Diese tauscht Thymin gegen Cytosin auf der Ebene der Gensequenz aus. Daraus resultierend kommt es zu einer Veränderung der Proteinsequenz, anstatt Threonin wird die Aminosäure Isoleucin codiert. Diese ist nach *in-silico*-Proteinanalysen neutral und hat daher keinen Krankheitswert.

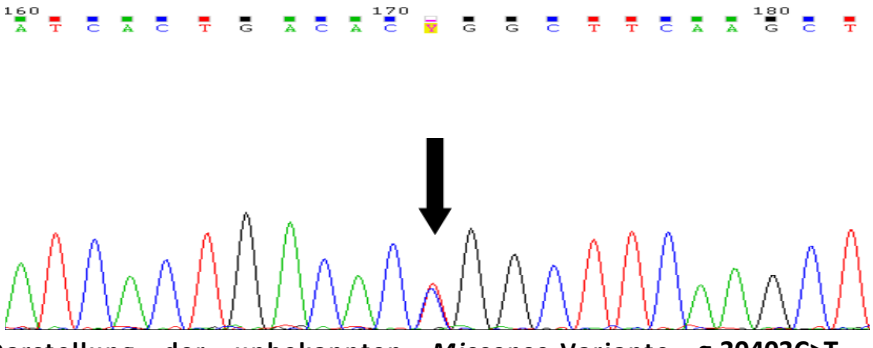


Abb. 20: Darstellung der unbekannten *Missense*-Variante g.30403C>T, c.3532C>T, p.1114Thr>Ile in heterozygoter Form in Exon 28 in *ATP13A2* (Probe L-368) (↓).

Nur eine bekannte *Missense*-Mutation rs3170740 (g.30681G>A, c.3706G>A, p.Ala1172Thr) in Exon 29 konnte im Lübecker Patientenkollektiv detektiert werden. Diese Genveränderung tragen 21 Proben in homozygoter Form (L-1551, L-1826, L-1899, L-1988, L-3030, L-3041, L-3047, L-305, L-306, L-3301, L-3305, L-3366, L-3378, L-3391, L-396, L-4023, L-503, L-561, L-563, L-616, L-874). Der Anteil der betroffenen Proben innerhalb des Kollektivs, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, ist signifikant höher als der Anteil der Mutationsträger in der Allgemeinbevölkerung (p = 0,00015). Allerdings ist diese *Missense*-Mutation nach *in-silico*-Proteinanalysen benigne und hat keinen Krankheitswert.

In dem Lübecker Patientenkollektiv wurden fünf SNPs ermittelt, die signifikant häufiger im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung vorkommen. Im Detail handelt es sich um die *Intron*-Variante rs9435736 (Exon 12, g.19975A>G), die *Intron*-Variante rs55682704 (Exon 12, g.20056_20056insC), die synonyme Variante rs3738815 (Exon 25, g.28722G>A, c.2980G>A, p.Ser930Ser, p = 0,011), die *Intron*-Variante rs20776605 (Exon 28, g.30267C>T, p = 0,0009) und die *Missense*-Variante rs3170740 (Exon 29, g.30681G>A, c.3706G>A, p.Ala1172Thr, p = 0,00015).

Alle in diesem Kapitel ermittelten Auffälligkeiten werden im nächsten Kapitel nochmal zusammengefasst.

3.1.2.1. Ermittelte Variantenträger

In der Schmelzkurvenanalyse wurden keine Träger von homozygoten oder gemischt-heterozygoten pathogenen *Missense*-Varianten detektiert.

Unter dem Patientenkollektiv zur kompletten Sequenzanalyse (*Kap. 2.1.2*) konnten 23 Träger von *Missense*-Varianten ermittelt werden. Davon sind zwei Proben gemischt-heterozygot (L-1193, L-3029), 20 Proben homozygot (L-1551, L-1826, L-1899, L-1988, L-3030, L-3041, L-3047, L-305, L-306, L-3301, L-3305, L-3366, L-3378, L-3391, L-396, L-4023, L-503, L-561, L-563, L-616, L-874) und eine Probe homozygot und gemischt-heterozygot (L-3030).

L-1193 trägt die bisher unbekannte *Missense*-Mutation in Exon 14 (g.20631C>G, c.1487C>G, p.Leu433Val) und die bekannte *Missense*-Mutation in Exon 29 (rs3170740, g.30681G>A, c.3706G>A, p.Ala1172Thr), jeweils in heterozygoter Form.

Die unbekannte *Missense*-Mutation in Exon 26 (g.29784T>C, c.3174T>C, p.Ala995Val) und die bekannte *Missense*-Mutation in Exon 29 (rs3170740, g.30681G>A, c.3706G>A, p.Ala1172Thr) konnten zusammen in Probe L-3029 nachgewiesen werden. Auch hier liegen beide Genveränderungen in heterozygoter Form vor.

Für die bekannte *Missense*-Mutation in Exon 29 (rs3170740, g.30681G>A, c.3706G>A, p.Ala1172Thr) konnten 21 Proben mit homozygoter Genveränderung ermittelt werden (*Kap.*

3.1.2). Eine dieser Proben (L-3030) trägt zusätzlich eine heterozygote *Missense*-Mutation in Exon 28 (g.30403C>T, c.3532C>T, p.Thr1114Ile).
Zusammengefasst muss gesagt werden, dass keine dieser Proben eine pathogene Mutation trägt. Die einzige Genvariante, die einen pathogenen Wert hat, befindet sich in Exon 26 (g.29784T>C, c.3174T>C, p.Ala995Val) und liegt heterozygot vor. Die Probe L-3029 trägt keine weitere pathogene Mutation ist somit genotypisch nicht am Kufor-Rakeb-Syndrom erkrankt.

Damit ist Ergebnisteil des genomischen Projekts abgeschlossen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analysen hinsichtlich des Zelltods bei MP geschildert.

3.2. Ergebnisse zur Proteinanalyse

In dieser Arbeit sollten Unterschiede zwischen humanen Fibroblasten erarbeitet werden, die Mutationen in einem mit MP assoziierten Gen tragen, und humanen Fibroblasten, die keine Mutation in einem der bekannten mit MP assoziierten Gene tragen. Dazu wurden humane Fibroblasten in Bezug auf ihre Morphologie, ihr Sterbeverhalten und ihre Proteinexpression analysiert.

3.2.1. Morphologie der humanen Fibroblasten

Zur experimentellen Nutzung wurden humane Fibroblasten aus einem Hautbiopsat kultiviert (***Abb. 21***). Anhand der Morphologie ließen sich keine Unterschiede erkennen. Hinsichtlich ihres Zytoplasmas, der Kerngröße und ihrer Form waren die Fibroblasten in der Kultur ähnlich.

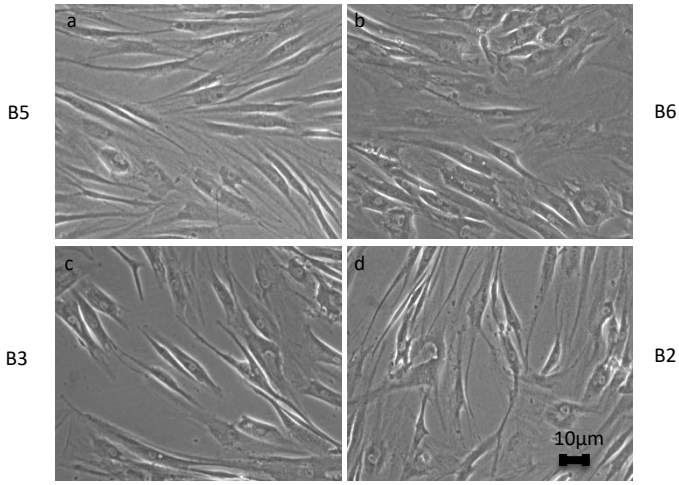


Abb. 21a/b/c/d: Zellkultur: Kultivierte menschliche Fibroblasten von verschiedenen Mutationsträgern (B2, B3) und Kontrollen (B5, B6). Morphologisch sind keine Unterschiede ersichtlich (Vergrößerung: 10µm).

3.2.2. Analyse des Sterbeverhaltens der Fibroblasten

Aufgrund der Tatsache, dass die Pathologie des MP auf der Degeneration der dopaminergen Neuronen beruht (*Kap. 1.2*), wurde das Sterbeverhalten der Fibroblasten untersucht. Zur Analyse wurden der *Tripan-blue-exclusion-Assay* und die Laktat-Dehydrogenase-Messung angewandt.

3.2.2.1. *Tripan-blue-exclusion-Assay*

Zu Beginn der experimentellen Reihe stand die Überprüfung der Lebensfähigkeit der humanen Fibroblasten mittels *Tripan-blue-exclusion-Assay* (***Abb. 22***). Im Rahmen dieser Analyse wurde zunächst die Anzahl der toten Zellen im Verhältnis zu der Anzahl der lebenden Zellen gesetzt und die Mutationsträger mit den Nicht-Mutationsträgern verglichen. In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Fibroblasten vor der Durchführung des *Tripan-blue-exclusion-Assays* mit oxidativem Stress behandelt. Dazu wurde Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verwendet, welches durch Radikalbildung das zelluläre Gleichgewicht stört.
Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen werden im Folgenden beschrieben und ausgewertet.

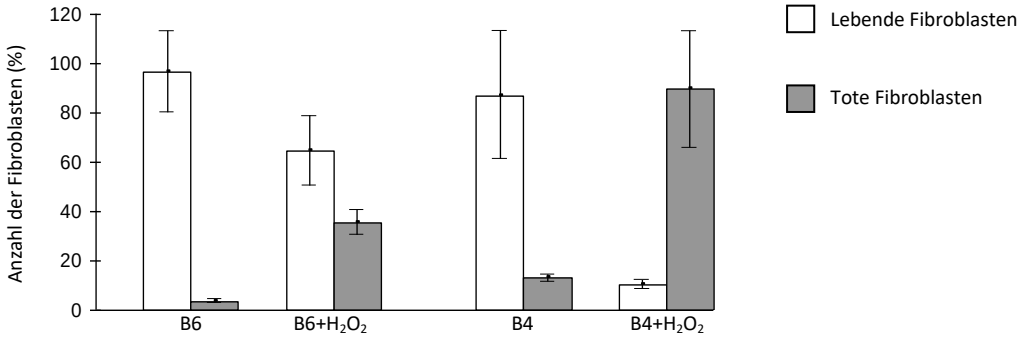


Abb. 22: *Tripan-blue-exclusion-Assay*. In der Lebensfähigkeit der Zellen unter Standardbedingungen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutationsträgern im *Parkin*-Gen (B4) und Nicht-Mutationsträgern (B6). Nach Behandlung mit H_2O_2 war der Anteil der toten Fibroblasten bei den Mutationsträgern im *Parkin*-Gen wesentlich höher als bei den Nicht-Mutationsträgern ($p < 0{,}001$).

Aus den in diesem Diagramm dargestellten Versuchsergebnissen geht hervor, dass es unter Standardbedingungen keine signifikanten Unterschiede im Überleben der Fibroblasten von Mutationsträgern und Nicht-Mutationsträgern gibt. Allerdings konnte nach einer Exposition mit zytotoxischen Stoffen, wie in diesem Falle H_2O_2, ein vermehrtes Überleben der Fibroblasten in den Nicht-Mutationsträgern im Vergleich zu den Mutationsträgern erkannt werden.

3.2.2.2. Laktat-Dehydrogenase-Messung

Um das vorausgegangene Experiment zu vertiefen, wurde eine Analyse zum Sterbeverhalten der Fibroblasten mittels einer LDH-Messung durchgeführt. Die LDH ist auch in der Klinik einer der wichtigsten Parameter für den Zelltod. Sobald Zellen, gleich welcher Art, zugrunde gehen, wird die LDH in das umliegende Medium freigesetzt und kann mithilfe von photospektrometrischen Untersuchungen detektiert werden.

Das folgende Diagramm zeigt eine LDH-Messung, die an unbehandelten Fibroblasten durchgeführt wurde.

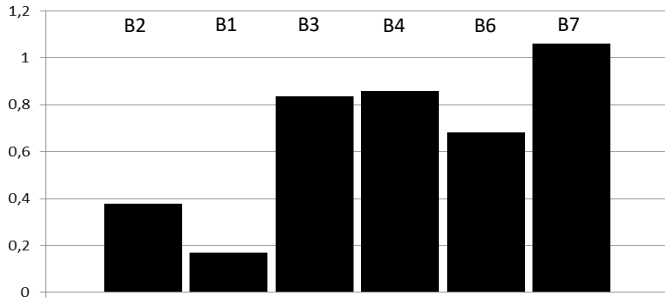


Abb. 23: LDH-Messung unter Normalbedingungen. Hier lag kein signifikanter Unterschied (p = 0,80) zwischen Mutationsträgern und Nicht-Mutationsträgern im Sterbeverhalten der Fibroblasten hinsichtlich der LDH-Konzentration im extrazellulären Medium vor.

Mit Hilfe der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Mutationsträgern und Nicht-Mutationsträgern festgestellt werden.

Aufgrund der Ergebnisse des *Tripan-blue-exclusion-Assays* wurde die LDH-Messung nach Behandlung mit oxidativem Stress mittels H_2O_2, Paraquat und Chloroquin durchgeführt.

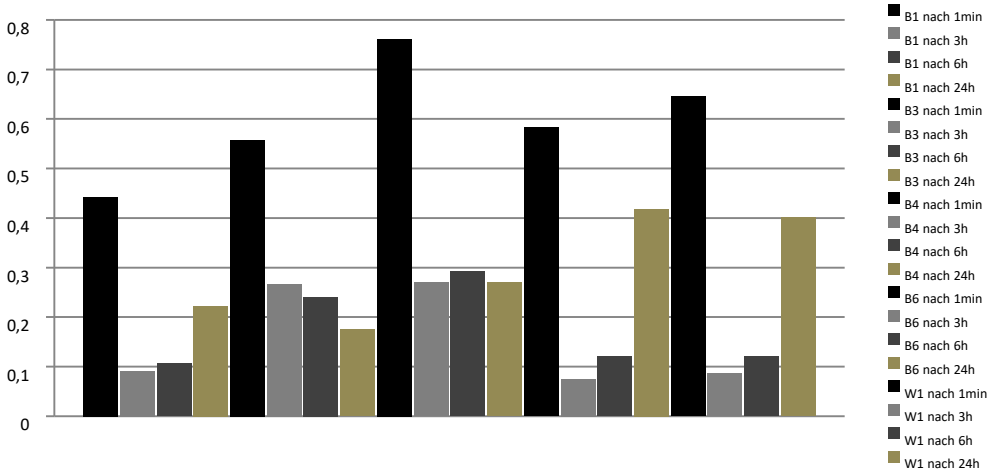


Abb. 24: LDH-Messung nach Behandlung mit H_2O_2. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der erhöhten LDH-Konzentration, nach 3 h (p = 0,0008) und nach 6 h (p = 0,037) H_2O_2-Exposition, bei homozygoten Mutationsträgern im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgern. In den Zeitintervallen 1 min (p = 0,105) und 24 h (p = 0,999) wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt. Zwischen den LDH-Konzentrationen des heterozygoten Mutationsträgers und der Nicht-Mutationsträger konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Der oxidative Stress durch Paraquat und Chloroquin erbrachte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der LDH-Konzentration im extrazellulären Medium. Nach Inkubation mit H_2O_2 starben signifikant mehr Fibroblasten, die eine homozygote *Parkin*-Mutation tragen (***Abb. 24***).

3.2.3. Expression von α-Synuclein in humanen Fibroblasten mit Mutationen im *Parkin*-Gen

Aufgrund der vorausgegangenen Ergebnisse wurde nach Unterschieden auf molekularer Ebene, zwischen Mutationsträgern im *Parkin*-Gen und Nicht-Mutationsträgern, gesucht.
Als ein bekanntes Protein, welches mit MP assoziiert ist, wurden die Analysen zunächst auf α-Synuclein konzentriert. Mittels *Westernblot*-Analysen sollten die verschiedenen humanen Fibroblasten auf α-Synuclein untersucht werden.
Zu Beginn wurde die Methode hinsichtlich des Antikörpers gegen α-Synuclein optimiert, indem die Spezifität und die optimale Proteinkonzentration des zu untersuchenden Homogenisats getestet wurden (***Abb. 25***). Zur Inkubation mit dem primären Antikörper (α-Synuclein) wurde eine Antikörperkonzentration von 1:1000 verwendet. Die Lösung wurde aus TBST mit 1 % Milchpulver hergestellt.

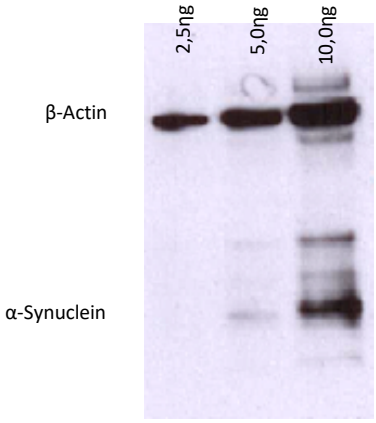


Abb. 25: *Westernblot*-Analyse zur Testung der Antikörperspezifität von α-Synuclein in heterozygoten Mutationsträgern im *Parkin*-Gen (B1). Es wurden drei verschiedene Proteinkonzentrationen verwendet (2,5 ηg, 5,0 ηg, 10,0 ηg). Es ist zu erkennen, dass bei steigender Proteinkonzentration das Signal von β-Actin und von α-Synuclein stärker wird. Bei 2,5 ηg Proteingemisch konnte kein α-Synuclein nachgewiesen werden. Bei 5,0 ηg ist eine schwache Bande von α-Synuclein zu erkennen. Bei 10,0 ηg sind eine starke Bande von α-Synuclein aber auch mehrere unspezifische Banden erkennbar.

Das Ergebnis dieses Experiments war, dass gute Resultate für α-Synuclein erzielt werden können, wenn 5,0 ηg Proteingemisch bei einer Antikörperverdünnung von 1:1000 in 1 % Milch in TBST verwendet werden. Auf dieser Erkenntnis basierend wurden in den folgenden Versuchsreihen 5,0 ηg Proteingemisch verwendet.

Allerdings zeigten sich im weiteren Verlauf - auch unter diesen optimierten Versuchsbedingungen - immer wieder unspezifische Banden von α-Synuclein (***Abb. 26***), weswegen in den späteren Experimenten stets die Membran nach dem Transfer unterhalb der Bande von β-Actin (42kD) durchtrennt wurde. Dadurch konnten Resultate mit einer höheren Spezifität für α-Synuclein erzielt werden.

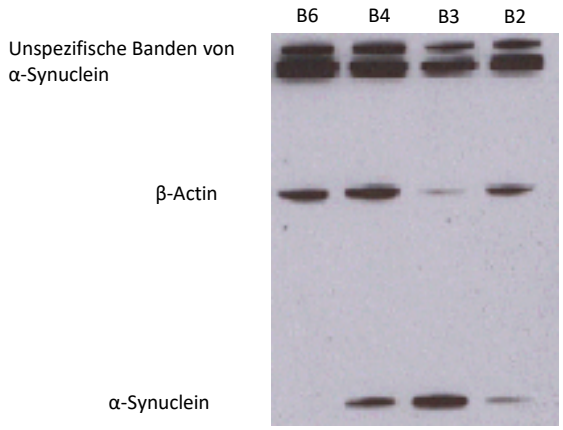


Abb. 26: *Westernblot*-Analyse: Unspezifische Banden von α-Synuclein, die sowohl bei Fibroblasten mit einer Mutation im *Parkin*-Gen (B2, B3, B4) auftraten, als auch bei Fibroblasten ohne eine Mutation im *Parkin*-Gen (B6). Um zu verhindern, dass durch die unspezifische Bindung der Antikörper ein verfälschtes Ergebnis entsteht, wurden die Membranen nach dem Transfer unterhalb der β-Actin-Bande durchtrennt und somit ein besseres Resultat erreicht.

3.2.3.1. Nachweis von α-Synuclein in *Parkin*-Mutationsträgern im Vergleich zu Kontrollen

Nachdem es möglich war α-Synuclein in humanen Fibroblasten nachzuweisen, wurden Fibrobasten, die eine Mutation im *Parkin*-Gen tragen, mit Fibroblasten, die keine Mutation im *Parkin*-Gen tragen, verglichen. α-Synuclein war nur in den Fibroblasten nachweisbar, welche eine Mutation im *Parkin*-Gen tragen (***Abb. 27***).

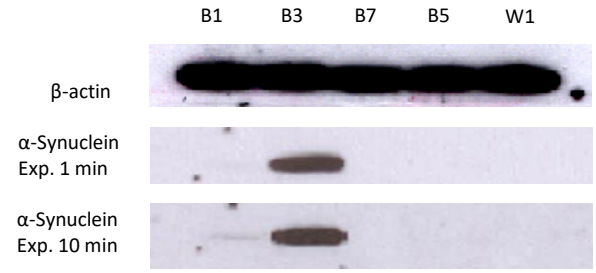


Abb. 27: *Westernblot*-Analyse: Expression von α-Synuclein in humanen Fibroblasten. In den Fibroblasten, die keine Mutation im *Parkin*-Gen (B5, B7, W1) tragen, war kein α-Synuclein nachweisbar, während im homozygoten Mutationsträger (B3) eine ganz klare Bande zu erkennen ist. Nach einer Expositionszeit von 10 min ist eine schwache Bande auch bei dem heterozygoten Mutationsträger (B1) zu erkennen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass α-Synuclein in Mutationsträgern (B1, B3) nachzuweisen ist, während hingegen Wildtypen (B5, B6, B7) kein α-Synuclein zeigen, stellte sich die Frage, ob die Stärke der Expression bei verschiedenen Mutationen variiert (***Abb. 28***).

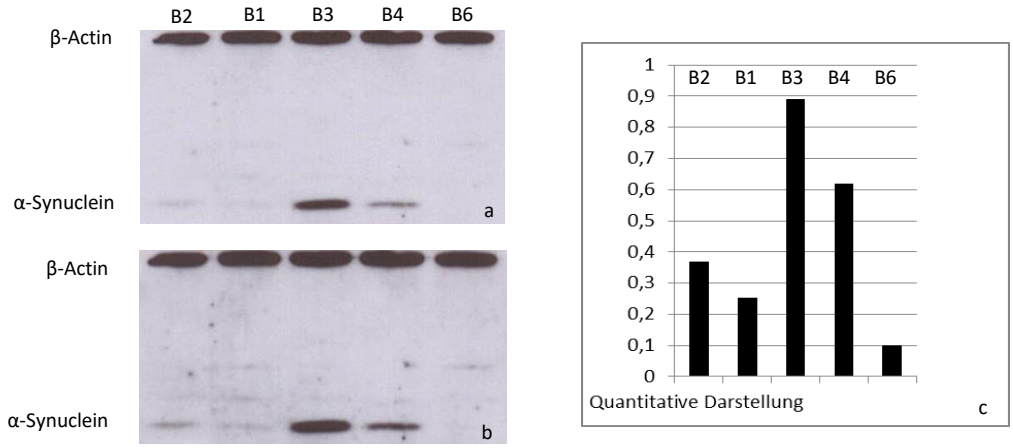


Abb. 28a/b/c: *Westernbot*-Analyse: Expression von α-Synuclein in verschiedenen Mutationen im *Parkin*-Gen. Die stärkste Expression von α-Synuclein bei der homozygoten Punktdeletion (B3) war nach einer Expositionszeit von 30 sec (a) zu finden. Ebenfalls zeigte sich eine deutliche Bande bei der homozygoten Deletion von Exon 7 (B4). Bei den anderen beiden Mutationsträgern ließ sich die Expression von α-Synuclein nach 30 sec Exposition nicht eindeutig beurteilen. Nach einer Expositionszeit von 60 sec (b) war in dem gemischt heterozygoten Mutationsträger (B2) eine klare Bande erkennbar. Eine schwächere Bande zeigte die Probe mit der heterozygoten Deletion von Exon 7 (B1). In dem Wildtyp (B6) war weiterhin kein α-Synuclein nachweisbar. Die quantitative Analyse (c) verdeutlicht oben Genanntes.

Aus dieser Abbildung (***Abb. 28***) ist ersichtlich, dass die homozygoten Mutationen eine stärkere Expression von α-Synuclein induzieren als heterozygote Mutationen, wobei die homozygoten Punktdeletionen eine wesentlich kräftigere Bande zeigen als die homozygoten Deletionen von Exon 7. Die gemischt heterozygote Probe, die auf einem Allel die Punktmutation und auf dem anderen Allel die Deletion von Exon 7 trägt, hält sich mit der Stärke der Expression von α-Synuclein zwischen den homozygoten und den heterozygoten Mutationsträgern.
Zusammenfassend gibt es tatsächlich Unterschiede in der Stärke der Expression von α-Synuclein abhängig von der Art der Mutation im *Parkin*-Gen.

3.2.3.2. Zelluläre Lokalisierung von α-Synuclein

Aufgrund des vermehrten Vorliegen von α-Synuclein in Fibroblasten, die eine Mutation im *Parkin*-Gen tragen, und der Tatsache, dass auch die Art der Mutation wichtig ist für die Menge, die von α-Synuclein in der Zelle produziert wird, wurde nach der zellulären Lokalisierung von α-Synuclein in den Fibroblasten gesucht (***Abb. 29***). Dazu wurden die zytosolische und die mitochondriale Fraktion mittels mitochondrialer Präparation (*Kap. 2.3.11.2*) voneinander getrennt.

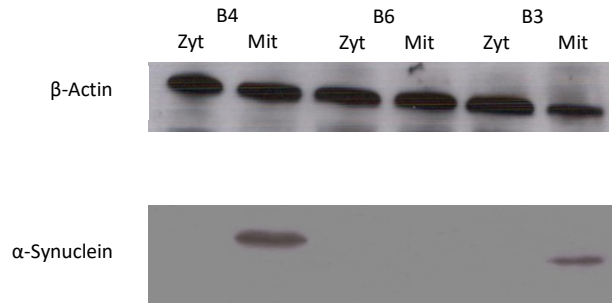


Abb. 29: *Westernblot*-Analyse zur Ermittlung der Lokalisation von α-Synuclein. Es ist zu erkennen, dass in den homozygoten Mutationsträgern (B3, B4) α-Synuclein in der mitochindrialen (Mit) Fraktion nachgewiesen werden konnte, während in der zytosolischen (Zyt) Fraktion kein α-Synuclein zu finden war. Wiederum war kein α-Synuclein bei dem Nicht-Mutationsträger (B6) vorhanden.

Die *Westernblot*-Analyse nach mitochondrialer Präparation zeigt α-Synuclein in der mitochondrialen Fraktion bei homozygoten Mutationsträgern (B3, B4).

3.2.4. Expression von α-Synuclein in Fibroblasten mit Mutationen im *ATP13A2*-Gen

Das vorangegangene Kapitel (*Kap. 3.2.3*) beschreibt die vermehrte Expression von α-Synuclein in *Parkin*-Mutationsträgern. Im Ergebnis ist die Höhe der Proteinkonzentration abhängig von der Art der Mutation.

Ob diese Ergebnisse auch für α-Synuclein bei Fibroblasten mit Mutationen im *ATP13A2*-Gen (C1) vorliegen, wird im Folgenden analysiert. Das methodische Vorgehen wurde nicht verändert.

Wie in **Abb. 30** exemplarisch dargestellt, wurden verschiedene *Westernblots* angefertigt.

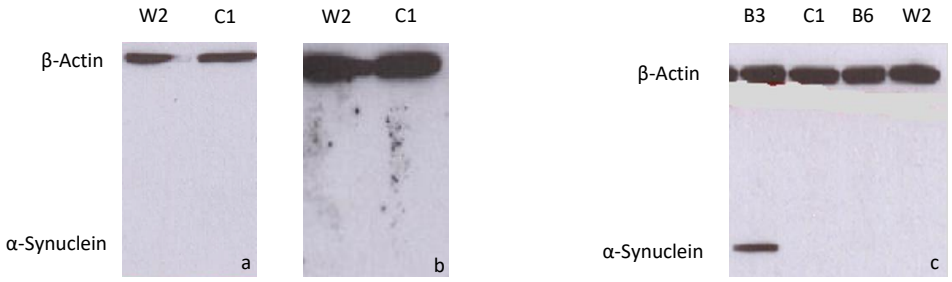


Abb. 30a/b/c: *Westernblot*-Analyse: Fehlender Nachweis von α-Synuclein in *ATP13A2*-Mutationsträgern (C1). a: Nach einer Expositionszeit von 30 sec ist keine Bande auf der Höhe von α-Synuclein sichtbar. b: Auch nach einer Expositionszeit von 5 min ist kein α-Synuclein erkennbar. c: Expression von α-Synuclein in einem *ATP13A2*-Mutationsträger (C1) im Vergleich mit einem Mutationsträger im *Parkin*-Gen (B3) als Kontrolle. Auch hier konnte α-Synuclein im *ATP13A2*-Mutationsträger nicht detektiert werden.

In **Abb. 30** ist kein Unterschied in der Expression von α-Synuclein zwischen *ATP13A2*-Mutationsträgern (C1) und Fibroblasten, die keine Mutation tragen (W2, B6), erkennbar. Auch im Vergleich zu einem Mutationsträger im *Parkin*-Gen (B3) konnte kein α-Synuclein nachgewiesen

werden (***Abb. 30c***). Damit verhalten sich Fibroblasten mit einer *ATP13A2*-Mutation, bezogen auf die Expression von α-Synuclein, wie Nicht-Mutationsträger im *Parkin*-Gen.

3.2.5. Expression von Bax in Fibroblasten mit Mutationen im *Parkin*-Gen

Aufgrund des vermuteten Zusammenhangs von der Nervenzelldegeneration und der Apoptose wurden die Fibroblasten, die eine Mutation im *Parkin*-Gen tragen, auf das proapoptotische Protein Bax untersucht (***Abb. 31***).

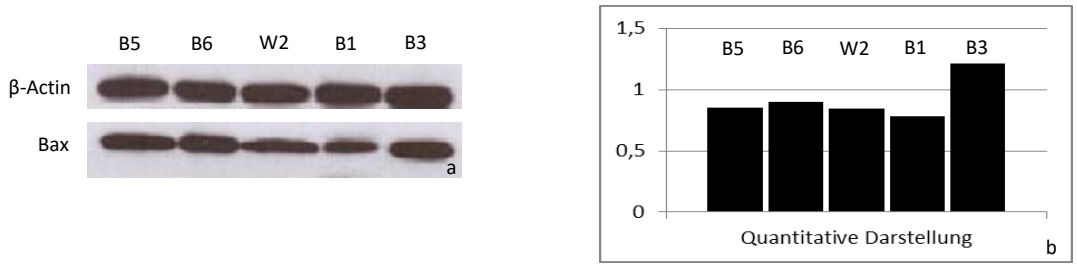


Abb. 31: *Westernblot*-Analyse: Die Expression von Bax in verschiedenen *Parkin*-Mutationsträgern (B1, B3) und Nicht-Mutationsträgern (B5, B6, W2) (a). Es ist kein signifikanter Unterschied (p = 0,476) zu erkennen (b).

Aus diesem exemplarisch dargestellten *Westernblot* geht hervor, dass Bax keine signifikanten Unterschiede (p = 0,476) im Vergleich zwischen Mutationsträgern im *Parkin*-Gen und Nicht-Mutationsträgern aufweist.

3.2.6. Expression von Bax in Fibroblasten mit Mutationen im *ATP13A2*-Gen

Auch bei einem *ATP13A2*-Mutationsträger wurde die Expression von Bax in Vergleich zu Nicht-Mutationsträgern untersucht (***Abb. 32***).

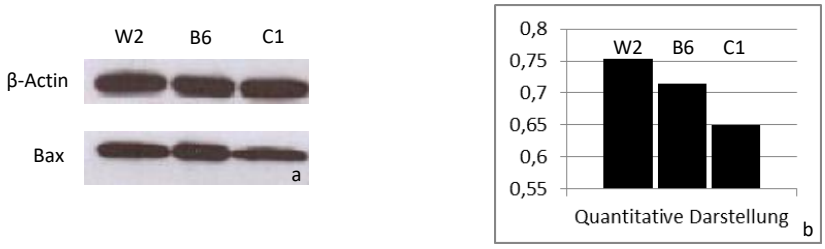


Abb. 32a/b: *Westernblot*-Analyse: Die Expression von Bax in einem *ATP13A2*-Mutationsträger (C1) und Nicht-Mutationsträgern (W2, B6) (a). Es ist wiederum kein signifikanter Unterschied (p = 0,328) zu erkennen (b).

Auch die Fibroblasten, die eine Mutation im *ATP13A2*-Gen tragen, weisen keinerlei Unterschiede in ihrer Expression von Bax zu Nicht-Mutationsträgern auf.

3.2.7. Proteinanalyse in Fibroblasten mit Mutationen im *Parkin*-Gen unter oxidativem Stress mit H_2O_2

Aufgrund der Ergebnisse aus den Analysen des Sterbeverhaltens der Fibroblasten (*Kap. 3.2.2*) wurde nun die Expression von α-Synuclein, Bax und Bcl_2 nach Behandlung der Fibroblasten mit H_2O_2 über drei Stunden untersucht.

3.2.7.1. Expression von α-Synuclein unter oxidativem Stress mit H_2O_2

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die Expression von α-Synuclein durch die Behandlung der Fibroblasten mit H_2O_2 verändert (***Abb. 33***).

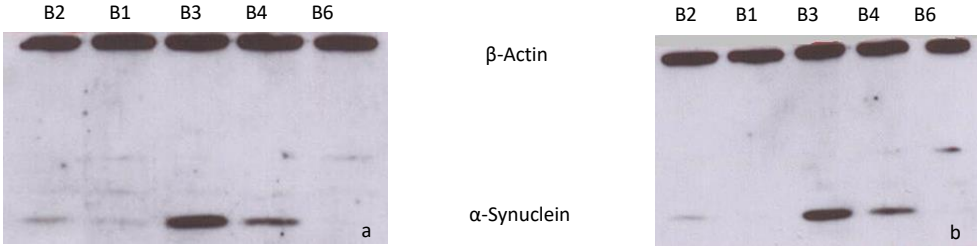


Abb. 33a/b: *Westernblot*-Analyse zur Expression von α-Synuclein in unbehandelten Fibroblasten (a) und in Fibroblasten, die mit H_2O_2 behandelt wurden (b). Hier liegen keine signifikanten Unterschiede vor (p = 0,849).

Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Expression von α-Synuclein unter Normalbedingungen und oxidativem Stress.

3.2.7.2. Expression von Bcl_2 und Bax unter oxidativem Stress mit H_2O_2

Das antiapoptotische Protein Bcl_2 und das proapoptotische Protein Bax wurden ebenfalls unter oxidativem Stress untersucht (***Abb. 34***).

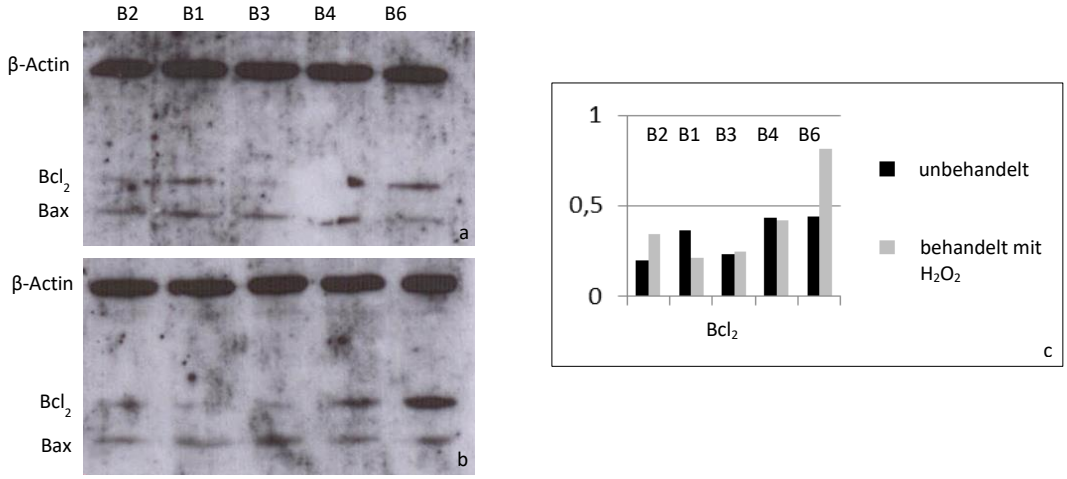


Abb. 34a/b/c: *Westernblot*-Analyse: Expression von Bcl_2 und Bax in unbehandelten Fibroblasten (a) und in Fibroblasten, die mit H_2O_2 behandelt wurden (b). Während die Expression von Bax keinen signifikanten Unterschied zeigt (p = 0,258), ist bei der Expression von Bcl_2 ein signifikanter Anstieg (p = 0,026) zwischen den unbehandelten und den behandelten Fibroblasten des Nicht-Mutationsträgers (B6) zu erkennen. Die Expression von Bcl_2 bei Mutationsträgern (B1, B2, B3, B4) lässt keinen signifikanten Unterschied errechnen (p = 0,966). Die quantitative Darstellung der Expression von Bcl_2 (c) verdeutlicht graphisch die vermehrte Expression von Bcl_2 im Nicht-Mutationsträger (B6) unter Behandlung mit H_2O_2.

Die Analyse zeigt einen signifikanten Unterschied (p = 0,026) in der Expression von Bcl_2 bei dem Nicht-Mutationsträger zwischen den behandelten und den unbehandelten Fibroblasten.

Es bleibt festzuhalten, dass sich bei Fibroblasten, die eine Mutation im *Parkin*-Gen tragen, eine erhöhte Neigung zum Absterben unter oxidativem Stress zeigt.

In den selben Fibroblasten konnte vermehrt α-Synuclein intrazellulär nachgewiesen werden. Die Menge des α-Synucleins ist abhängig von der Art der Mutation. Der homozygote Mutationsträger B3 (c.1072delT) weist das höchste Level an α-Synuclein auf, gefolgt von dem zweiten homozygoten Mutationsträger B4 (delEx7) und dem gemischt-heterozygoten Mutationsträger B2 (delEx7+c.1072delT). Bei dem heterozygoten Mutationsträger B1 (delEx7) lässt sich nur sehr wenig α-Synuclein nachweisen. Klinisch korrelieren diese Ergebnisse sehr gut mit dem Erkrankungsstatus. B3 und B4 sind sehr früh mit 43 und 34 Jahren erkrankt, während bei B2 erst mit 64 die Erkrankung ausbrach. B1 weist keine Symptome auf. In der Probe, die eine Mutation für *ATP13A2* trägt, wurde kein α-Synuclein nachgewiesen.

In den *Parkin*-Mutationsträgern konnte α-Synuclein in der mitochondrialen Zellfraktion lokalisiert werden.

In den Analysen, ob der Zelltod über die Apoptose abläuft, konnte ein vermehrtes Auftreten von Bcl_2 in den Kontrollen nach Behandlung mit oxidativem Stress nachgewiesen werden. Bax erbrachte keine Veränderungen.

4. Diskussion

Zu Beginn der Diskussion steht die Bewertung der verwendeten Methoden. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Sequenzanalyse und der Proteinanalyse erläutert und mit dem aktuellen wissenschaftlichen Stand abgeglichen.

4.1. Bewertung der verwendeten Methoden

Anfangs werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden bezüglich ihrer Verwertbarkeit und Qualität beurteilt. Zu Beginn werden die Schmelzkurvenanalyse am LC und die Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit bewertet, im Anschluss erfolgt dies bezüglich der *Westernblot*-Analyse.

4.1.1. Schmelzkurvenanalyse

Ziel dieser Versuchsreihe war eine neue Methode der *Real-time*-PCR am LC zu etablieren, die eine schnelle *Screening-M*ethode zur Identifizierung von genetischen Abweichungen im Gen *ATP13A2* ermöglicht. Bei den Proben, die eine Auffälligkeit in der Schmelzkurvenanalyse zeigten, sollte eine komplette Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt werden, damit die genaue genetische Variation erkannt werden konnte.

Während der Etablierungsphase wurden zu vier Proben mit unbekannten Mutationsstatus auch immer eine Probe eines bekannten Wildtyps und – wenn möglich – eine Probe eines Mutationsträgers als Referenz analysiert. Zusätzlich wurde den Proben, zur Erhöhung der Sensitivität für homozygote Mutationsträger, Wildtyp-DNA in einer Konzentration von 3,75 % hinzugegeben.

Überschritten die PCR-Produkte die Größe von 400 bp, wurden die Exons in zwei Teile geteilt (Exon 5).

Die Versuchsansätze wurden hinsichtlich der optimalen *Annealing*-Temperatur und der $MgCl_2$-Konzentration für 15 *Primer*-Paare optimiert (***Tab. 7***).

Während der Etablierungsphase traten verschiedene Probleme auf. Einige *Primer-P*aare zeigten eine unzureichende Amplifikation, andere waren hinsichtlich ihrer Sensitivität nicht aussagekräftig (*Kap. 3.1.1.4*).

Für vier *Primer-P*aare konnte die Methode etabliert werden (Exon 5.2, 11, 17, 20). Analysen für Exon 11 und Exon 20 zeigen eine hohe Sensitivität und konnten mittels dieser Methode analysiert werden.

Die Analyse von Exon 5 zeigte einige Probleme auf. Die Sensitivität konnte nicht sicher getestet werden, da es unter den schon vor Beginn dieser Arbeit analysierten Proben keinen Träger einer Genveränderung in der untersuchten Sequenz gab. Darüber hinaus wurde nur die zweite Hälfte von Exon 5 mit dieser Methode erfasst, während das *Primer-P*aar der ersten Hälfte von Exon 5 nicht etabliert werden konnte. Aufgrund der Tatsache, dass die Sequenzierung nach Sanger bereits für die gesamte Gensequenz von Exon 4 bis Exon 5 etabliert wurde, sind keine Einsparungen hinsichtlich des Arbeitsaufwands und der finanziellen Ausgaben gegeben.

Exon 17 zeigte eine hohe Sensitivität, trägt allerdings einen SNP (rs2076603, g.24413C>G, g.24413C>T, g.24413C>A, c2005C>G, c.2005C>T, c.2005C>A p.Pro605Pro), welcher mit einer Häufigkeit von 68,62 % in der Allgemeinbevölkerung vorliegt. Daher müssen ca ¾ aller Proben nachträglich nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert werden, da man den SNP mit dieser Methode anhand der Schmelzkurve nicht von anderen Veränderungen auf dem Gen unterscheiden kann. Diese Tatsache macht das Verfahren durch die hohe Anzahl an doppelten Durchführungen sehr teuer und aufwändig.

Für die übrigen Exons konnte die Methode aufgrund geringer Sensitivität und Spezifität nicht etabliert werden. Während der Etablierung wurden unter diversen Versuchsbedingungen immer wieder Mutationsträger nicht erkannt (falsch-negativ) oder Nicht-Mutationsträger als Mutation (falsch-positiv) gewertet. Auch traten häufig Probleme bezüglich der Menge des Amplifikationsprodukts auf, weswegen keine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden konnte. Zusammengefasst konnten nur vier von 29 Exons etabliert werden, wovon nur zwei eine deutliche Verbesserung hinsichtlich eines vereinfachten Analyseverfahrens erbrachten. Deswegen wird die Methode für das vorgegebene Ziel als nicht geeignet angesehen.

4.1.2. Sequenzanalyse der Proben zur kompletten Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) ist eine schon lang etablierte sichere Methode zur Analyse der Basenpaarabfolge innerhalb eines PCR-Produkts. Allerdings ist die Methode sehr zeitaufwändig und teuer, weswegen die o. g. Schmelzkurvenanalyse etabliert werden sollte. Durch die Sequenzierung nach Sanger erhält man nach mehreren Amplifikations- und Reinigungsvorgängen des Produkts eine graphische Darstellung der Basenpaare. Diese Grafik wird mit anderen Grafiken mittels einer dafür entwickelten *Software* verglichen und die Ergebnisse eigenständig kontrolliert.

Daraus resultiert eine genaue Methode mit hoher Spezifität und Sensitivität zur Analyse der genetischen Sequenz.

Für diese Arbeit wurden, von den zunächst 622 Proben für die Schmelzkurvenanalyse, 94 Proben zur Sequenzierung nach Sanger ausgewählt. Die Auswahl wurde bezogen auf Kriterien für das Kufor-Rakeb-Syndrom getroffen, weswegen die betroffenen Patienten neben einem klinisch diagnostizierten MP ein sehr frühes Erkrankungsalter ≤ 39 Jahren und/oder eine begleitende Demenz (MOCA-*Score* < 26, ***Abb. 35***) aufweisen. Unter diesem Probenkollektiv konnten mehrere Veränderungen im *ATP13A2*-Gen im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung gezeigt werden.
Die auffälligen Proben der Schmelzkurvenanalyse wurden mit dieser Methode ebenfalls genauer untersucht (*Kap. 3.1*).

4.1.3. Proteinanalyse mittels *Westernblot*

Die Proteinanalyse mittels *Westernblot* ist eine altbewährte Methode zur qualitativen und quantitativen Proteinanalyse. Die humanen Fibroblasten wurden, wie in Kap. 2.3.8 beschrieben, kultiviert. Nach Extraktion der Proteinfraktion wurden die Versuchsbedingungen optimiert. Dafür wurden die geeigneten Protein- und Antikörperkonzentrationen bestimmt und für weitere Analysen verwendet.
Daraus resultierten *Westernblots*, die Banden für die zu untersuchenden Proteine zeigten. Die Richtigkeit der Proteindetektion wurde anhand der Größe der Proteine in kDa anhand einer Referenzskala bestimmt. Zur quantitativen Analyse wurde ebenfalls bei jeder Testreihe β-Actin bestimmt. β-Actin ist ein ubiquitäres Protein des Zytoskeletts, welches in jeder Zelle in gleicher Menge vorkommt. Daher konnten bei gleicher Größe der β-Actin-Banden unterschiedliche Proteinmengen der zu analysierenden Proteine bestimmt werden. Die Proteinmengen wurden mithilfe der Software *TotalLab*® quantifiziert.
Jede Analyse wurde zur Testung der Reproduzierbarkeit mindestens dreimal wiederholt.
Aufgrund der Optimierung der Versuchsbedingungen und der Reproduzierbarkeit sind die analysierten Ergebnisse von höchster Aussagekraft.
Ergänzend könnten die Ergebnisse mittels Immunofluoreszenz reproduziert werden. So können auch die zellulären Lokalisationen direkt ermittelt werden.

Nach der Bewertung der durchgeführten Versuche folgt die Diskussion der Ergebnisse (*Kap. 3*). Diese werden mit der aktuellen Literatur verglichen und kritisch bewertet. Zu Beginn steht die Diskussion der Mutationsanalyse, gefolgt von der Diskussion der Proteinanalyse.

4.2. Mutationsanalyse bei Patienten mit Parkinson-Syndrom

Die Mutationsanalyse für *ATP13A2* bei Patienten mit MP wurde teilweise mithilfe von zwei Methoden durchgeführt. Eine *Screening*-Methode am LC konnte für vier *Primer-P*aare etabliert werden. Die Proben stammen von an MP erkrankten Patienten, deren klinische Expertise an UKSH Campus Lübeck erhoben wurde. Das Kollektiv bestand aus insgesamt 622 Proben. Diese wurden für Exon 5.2, 11 und 20 mittels einer *Real-time*-PCR auf genomische Auffälligkeiten getestet und bei Abweichungen in der Schmelzkurvenanalyse zusätzlich nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert. Die Untersuchung für Exon 17 wurde aufgrund eines hohen Auftretens eines SNPs (rs2076603, g.24413C>G, g.24413C>T, g.24413C>A, c.2005C>G, c2005C>T, c.2005C>A, p.Pro605Pro) aus ökonomischen Gründen abgebrochen.

Da die Methode lediglich für zwei *Primer-P*aare ein vereinfachtes Verfahren erbrachte, wurde die Schmelzkurvenanalyse durch die im Folgenden beschriebene Versuchsreihe ersetzt. Es wurde eine Hochrisikogruppe aus dem Lübecker Patientenkollektiv erstellt (n = 94), deren Symptome auch einem Kufor-Rakeb-Syndrom entsprechen können (*Kap. 2.1.2*). Diese wurden mittels der Sequenzanalyse nach Sanger untersucht (Sanger *et. al.*, 1977).

Bislang unbekannte Genveränderungen konnten in dem 94 Proben umfassenden Patientenkollektiv in Exon 14, 19, 26 und 28 detektiert werden. Diese werden im Folgenden genauer beschrieben.

Eine *Intron*-Variante (g.24939C>T) konnte zwischen Exon 19 und Exon 20 nahe an Exon 19 detektiert werden.

Auch drei *Missense*-Varianten wurden ermittelt (*Kap. 3.3.1*). Diese verändern die Proteinsequenz in Exon 14 (g.20631C>G, c.1487C>G, p.Ser433Val), in Exon 26 (g.29784T>C, c.3174T>C, p.Ala995Val) und in Exon 28 (g.30403C>T, c.3552C>T, p.Ile1114Thr). Diese Veränderungen liegen in den betroffenen Proben heterozygot vor. *In-silico*-Proteinanalysen zeigten lediglich eine pathogene Variante in Exon 26 (g.29784T>C, c.3174T>C, p.Ala995Val). Ansonsten werden die Varianten als benigne beschrieben und haben daher keinen Krankheitswert.

Zusätzlich wurden die gefundenen SNPs hinsichtlich ihrer Häufigkeit im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung untersucht. Zur statistischen Analyse wurde der t-Test verwendet und ein Signifikanzniveau von 5 % festgelegt. Dabei wurden fünf SNPs in unterschiedlichen Exons mit einem signifikanten Unterschied zur Allgemeinbevölkerung ermittelt. Sie weisen eine signifikante Erhöhung auf (Exon 12, *Intron*-Variante, rs9435736, g.19975A>G, $p = 2{,}136 \times 10^{-18}$; Exon 12, *Intron*-Variante, rs55682704, g.20056_20056insC, $p = 1{,}348 \times 10^{-8}$; Exon 25, synonyme Variante, rs3738815, g.28722G>A, c.2980G>A, p.Ser930Ser, p = 0,011; Exon 28, *Intron*-Variante, rs20776605, g.30267C>T, p = 0,0009; Exon 29, *Missense*-Variante, rs3170740, g.30681G>A,

c.3706G>A, p.Ala1172Thr, p = 0,00015). Bei allen weiteren bekannten SNPs wurden in der Mutationsanalyse keine Unterschiede zur Allgemeinbevölkerung festgestellt. Zukünftig wäre eine Analyse hinsichtlich möglicher Risikofaktoren innerhalb dieser SNPs interessant.

Folgend findet sich die Diskussion der Ergebnisse und der aktuellen Literatur in Bezug auf die Analysen hinsichtlich des Zelltods bei MP.

4.3. Analyse des Zelltods bei Mutationsträgern auf Proteinebene

Rückblickend zusammengefasst, wurden für diese Analyse humane Fibroblasten verwendet, die Mutationen für *Parkin* und *ATP13A2* tragen. Als Kontrollen wurden Fibroblasten verwendet, die zwar aus der gleichen Familie LA stammen, aber keine Mutation tragen. Zwei Kontrollproben hatten keinen verwandtschaftlichen Bezug (*Kap. 2.1.4, 2.1.5*).

Vor dem Hintergrund der bei MP vorliegenden Neurodegeneration von dopaminergen Neuronen wird von einem kontrollierten Zelltod im Sinne von Apoptose, Autophagie oder Mitophagie ausgegangen (Levy *et al.*, 2009; Rakovic *et al.*, 2012; Bourdenx *et al*., 2014). Die Nekrose wird als Ursache aufgrund des Absterbens von einzelnen Zellen, anstelle des Gewebeuntergangs von großen Zellverbänden, ausgeschlossen.

Diverse Studien beschreiben verschiedene Zusammenhänge zwischen MP und der Apoptose oder Autophagie (*Kap. 1.2*).

Parkin wirkt im Allgemeinen protektiv für die Zelle, indem es durch Abbau von dysfunktionalen Proteinen die Zelle reinigt. Kommt es zu einer Proteinakkumulation, durch z.B. eine Überexpression von α-Synuclein, kann auch ein toxischer Stress durch das endoplasmatische Retikulum vermittelt werden, wenn die Kapazitäten desselben überstiegen sind. Auch über diesen Prozess kann der Zelltod eingeleitet werden (Levy *et al.*, 2009; Bourdenx *et al.*, 2014).

Auf einem anderen Signalweg kommt es nach Induktion der Translokation von Parkin zu den Mitochondrien durch PINK1 zur Ubiquitierung von mitochondrialen Proteinen, welche nun über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden. Daraus resultiert eine Veränderung des Membranpotentials, die Mitochondrien verlieren ihre Funktion und gehen zugrunde. Kommt es zu einer Überexpression oder erhöhter Induktion von Parkin durch PINK1, sind zu viele Mitochondrien betroffen und die ATP-Synthese ist nicht mehr ausreichend (Levy *et al.*, 2009; Rakovic *et al.*, 2012).

Andererseits führen Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems zur Akkumulation von α-Synuclein, welches dann toxisch wirkt (Gallegos *et al.*, 2015). Ob diese direkte Störung der

mitochondrialen Funktion durch Parkin oder direkte Toxine über den Weg der Apoptose oder Mitophagie zum Zelltod führt, ist noch umstritten.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob ein apoptotischer Zelluntergang in humanen Fibroblasten von genetisch bedingtem MP induziert wird. Die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von oxidativem Stress, mitochondrialer Dysfunktion und Proteinakkumulation in der Induktion der apoptotischen Kaskade besteht, basiert auf mehreren Studien. Diese besagen, dass Parkin in seiner Funktion einer E3-Ubiquitin-Protein-Ligase durch einen ausreichenden Proteinabbau eine Apoptose verhindert und bei Vorliegen einer Dysfunktion durch Proteinakkumulation bedingt. Wenn bei einer vorliegenden Mutation im *Parkin*-Gen der Proteinabbau dysfunktional wird, kann auch α-Synuclein nicht mehr suffizient abgebaut werden (Danial und Korsmeyer, 2004; Greene *et al.*, 2009; Hauser und Hastings, 2013; Oczkowska *et al.*, 2013). Auch das Gleichgewicht der mitochondrialen Proteine wird durch Parkin reguliert (Rakovic *et al.*, 2008; Trempe und Fon, 2013). Hauser und Hastings vertieften diesen Gedanken 2013, indem sie aufgrund einer PINK-1/Parkin-Dysfunktion eine erhöhte intrazelluläre Anzahl von geschädigten Mitochondrien beschreiben (Hauser und Hastings, 2013). Diese erhöhen durch den Funktionsverlust den oxidativen Stress. ATP13A2 ist ebenfalls am mitochondrialen Gleichgewicht beteiligt. Kommt es zu einer geringeren Menge an funktionierendem ATP13A2, wird weniger ATP synthetisiert, es kommt zu mitochondrialer DNA mit mehr Läsionen, zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und einem vermehrten Aufbrechen des mitochondrialen Netzwerks (Grünewald *et al.*, 2012). Ist das mitochondriale Gleichgewicht gestört, können die o. g. Formen des Zelluntergangs auftreten.

Durch die o. g. zellulären Vorgänge entsteht vermehrt oxidativer Stress, welcher als möglicher Auslöser der Apoptose angesehen wird. Dies wurde im Folgenden analysiert.

Zunächst wurde mittels *Tripan-blue-exclusion-Assay* ein vermehrtes Zellsterben von Fibroblasten mit *Parkin*-Mutationen unter oxidativem Stress bewiesen (*Kap. 3.2.2.1*). Der oxidative Stress wurde durch ein mit H_2O_2-versetztem Nährmedium initiiert. Dieser Versuch wurde mit der Durchführung einer LDH-Messung verifiziert (*Kap. 3.2.2.2*).

Da in der Literatur darüber diskutiert wird, dass α-Synuclein der zu Grunde liegende Auslöser für die Pathogenese des MP ist und dass auch die wildtyp-Form des α-Synuclein-Proteins bei anderen mit MP-assoziierten Mutationen an der Pathogenese beteiligt ist, wurde die These aufgestellt, dass α-Synuclein für das Vorliegen von oxidativem Stress verantwortlich ist. Weitere Versuche wurden mittels *Westernblot*-Analyse durchgeführt.

Zunächst wurden die Versuchsbedingungen optimiert. Sowohl die optimalen Protein- als auch Antikörperkonzentrationen wurden ermittelt (*Kap. 3.2.3*).

α-Synuclein wurde in Fibroblasten, die verschiedene Mutationen für *Parkin* tragen, in unterschiedlicher Konzentration nachgewiesen. Die größte α-Synuclein-Fraktion fand sich bei einem homozygoten Träger der Punktdeletion (c.1072delT, B3 (***Tab. 4***)), gefolgt von dem Träger der Deletion von Exon 7 (B4). Auch bei dem gemischt-heterozygoten Träger (delEx7+c.1072delT, B2) kann eine Bande detektiert werden. Ein sehr schwacher Nachweis findet sich bei dem heterozygoten Genotyp der Deletion von Exon 7 (B1), bei der Kontrolle ist kein α-Synuclein nachzuweisen. Die Ergebnisse korrelieren mit den Erkrankungsalter. Bei B3 und B4 traten bereits sehr früh mit 43 und 34 Jahren Symptome auf. B2 erkrankte mit 64 Jahren, während B1 nicht betroffen ist. Imaizumi *et al*. wiesen 2012 ebenfalls ein erhöhtes Level von α-Synuclein in *Parkin*-Mutationsträgern (*PARK2* - iPSC *derived neurons*) nach. Es sind allerdings keine klinischen Zusammenhänge in dieser Studie beschrieben worden (Imaizumi *et al.*, 2012). Ob sich allgemein eine klinische Korrelation zwischen der Menge des intrazellulären α-Synucleins und der PS-Form ergibt, wäre eine interessante Frage, der in Zukunft nachgegangen werden könnte. Erste Hinweise zeigen sich in dieser Arbeit insofern, dass die *Parkin*-Mutationsträger klinisch der EOPD zugeordnet werden (***Tab. 3***). Die EOPD wird als klassisches PS mit sehr frühem Erkrankungsbeginn beschrieben. Dabei tragen sie vermehrt α-Synuclein intrazellulär. *α-Synuclein*-Mutationsträger finden sich in der Gruppe des klassischen PS. Im Gegensatz dazu konnte in *ATP13A2*-Mutationsträgern kein α-Synuclein nachgewiesen werden; dieser Genotyp wird dem atypischen PS zugeschrieben.

Nachdem α-Synuclein bei *Parkin*-Mutationsträgern nachgewiesen wurde, wurde α-Synuclein in der Zelle lokalisiert. Es konnte nur mitochondrial nachgewiesen werden. Bisher ist das mitochondriale Vorliegen von α-Synuclein in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Es wurde an der Membran des Zellkerns als auch in synaptischen Vesikeln lokalisiert. Seltener fand man es auch frei im Zytosol (Oczkowska *et al*., 2013). In postletalen Autopsien konnte auch α-Synuclein gebunden an Dopamin detektiert werden. Die zelluläre Lokalisation wurde hier allerdings auch nicht bestimmt. Diese Bindung hemmt die CMA (*chaperone-mediated-autophagy*), welche auch zu einem erhöhten oxidativen Stress durch Proteinakkumulation führt (Levy *et al.*, 2009).

Nun wurden Analysen bezüglich des Vorliegens von vermehrtem α-Synuclein in Fibroblasten, die eine Mutation im *ATP13A2*-Gen tragen, durchgeführt. Hier konnte α-Synuclein nicht nachgewiesen werden. Bae *et al.* konnten 2014 ebenfalls keinen Unterschied der α-Synuclein-Level zwischen *ATP13A2*-/- Trägern und Kontrollen feststellen (Bae *et al.*, 2014). In der Literatur wird allerdings ein Zusammenhang zwischen α-Synuclein und ATP13A2 vermutet. ATP13A2 soll eine Fehlfaltung von α-Synuclein verhindern und wurde im Zentrum der LB, umgeben von

α-Synuclein, entdeckt (Dehay *et al.*, 2012a). Daher könnte man auch bei dieser Mutation ebenfalls einen Anstieg durch Akkumulation von α-Synuclein erwarten, weil es möglicherweise nicht durch Proteasen wie Parkin oder lysosomale Proteine wie ATP13A2 abgebaut werden kann (Levy *et al.*, 2009). Dies konnte in dieser Arbeit nicht belegt werden.

Da wir annehmen, dass α-Synuclein für den oxidativen Stress verantwortlich ist, wurde der Umkehrschluss wiederlegt. Dafür wurden die Fibroblasten mit *Parkin*-Mutationen und die Kontrolle oxidativem Stress mittels H_2O_2 ausgesetzt und eine *Westernblot*-Analyse für α-Synuclein durchgeführt und mit unbehandelten Proben verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der quantitativen Analyse von α-Synuclein im Vergleich zwischen mit H_2O_2 behandelten und unbehandelten Zellen ermittelt werden. Daher wird das vermehrte Vorliegen von α-Synuclein nicht durch den oxidativen Stress ausgelöst. Eine Veränderung der Lokalisation von α-Synuclein innerhalb der Zellorganellen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Nach der Erkenntnis, dass α-Synuclein vor allem in homozygoten Mutationsträgern von *Parkin* in erhöhtem Umfang vorliegt, wurde nun das proapoptotische Protein Bax analysiert. Es ist das bekannteste proapoptotische Protein und an jedem mitochondrialen Apoptosevorgang beteiligt (*Kap. 1.2.1.3*). Johnson et al. zeigten 2012, dass Bax direkt durch Parkin ubiquitiniert wird. Dadurch schützt Parkin vor der Translokation von Bax zu den Mitochondrien, wodurch die Apoptose eingeleitet würde (Johnson *et al.*, 2012). Bax konnte in allen Mutationsträgern und der Kontrolle ohne signifikanten Unterschied nachgewiesen werden. Auch die Fibroblasten des *ATP13A2*-Mutationsträgers erwiesen ein ähnliches Level von Bax. Damit wurde ein bereits vorliegendes proapoptotisches Geschehen ausgeschlossen. Deshalb wurde der Versuch nach Behandlung der Fibroblasten der *Parkin*-Mutationsträger und der Kontrolle mit H_2O_2 wiederholt. Auch hier konnte keine vermehrte Expression von Bax festgestellt werden. Diese Versuche wurden nun für das antiapoptotische Protein Bcl_2 durchgeführt. Bcl_2 agiert als direkter Antagonist von Bax und verhindert so die Freisetzung von Cytochrom-c in das Zytosol und die Aktivierung der Effektorcaspasen über das Apoptosom (*Kap. 1.2.1.3*). Dort zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Bcl_2 nur in der Kontrollprobe nach Behandlung der Zellen mit H_2O_2. Bei allen Proben der Mutationsträger blieb ein vermehrtes Auftreten des antiapoptotischen Proteins aus. Bisher wurde in der Literatur ein ausbleibender Anstieg von Bcl_2 noch nicht direkt beschrieben. Allerdings beschrieben Ghavami *et al.* 2014 eine Aktivierung des Zelltods durch mangelnden Proteinabbau und dem daraus resultierenden oxidativen Stress, wodurch Bcl_2 abgebaut wird (Ghavami *et al.*, 2014). Die Fibroblasten, die die *ATP13A2*-Mutation tragen, wurden in dieser Versuchsreihe nicht mit eingeschlossen. Im weiteren Verlauf wäre es sicher sinnvoll, das Verhalten von Bcl_2 in

Fibroblasten mit einer *ATP13A2*-Mutation zu untersuchen und Zusammenhängen zwischen α-Synuclein und dem antiapoptotischen System sollte weiter nachgegangen werden.

Ghavami *et al.* berichteten 2014 auch über mögliche Zusammenhänge zwischen der Apoptose und der Autophagie. Caspasen sollen durch die Autophagie ebenfalls aktiviert werden (Ghavami *et al.*, 2014). Das proautophagische Protein Beclin-1 wird wahrscheinlich über die Mitochondrien durch eine Freisetzung von Cytochrom-c aktiviert und von Bcl_2 direkt gehemmt. Trotz der neuen Erkenntnisse über die Autophagie ist der genaue Mechanismus nicht bekannt. Verschiedene Studien versuchen die Frage zu klären, welche Rollen die Autophagie und die Apoptose in der Neurodegeneration spielen. Shen *et al.* konnten 2011 nach Induktion der Autophagie keinen Zelltod nachweisen (Shen *et al.*, 2011). Daraus könnte der Schluss gezogen werden, dass die Autophagie zellprotektiv wirkt. Nixon und Yang sprachen sich 2012 ebenfalls dafür aus, dass auf die Autophagie die Apoptose oder Nekrose folgen muss, damit die Zelle abstirbt (Nixon und Yang, 2012). Eine der zytoprotektiven Funktionen der Autophagie ist eine reduzierte Anzahl der Mitochondrien durch Mitophagie. Gleichermaßen sinkt die Anzahl der proapoptotischen Proteine, die mit den Mitochondrien assoziiert sind. Ist die Autophagie gestört, kommt es zum Zelltod. Ein möglicher Induktionsweg wird über defekte Mitochondrien diskutiert, die ihr Membranpotential verlieren und so Cytochrom-c freisetzen (Hauser und Hastings, 2013).

Wie in der Einleitung beschrieben (*Kap. 1.1.1.2*), soll α-Synuclein über das Proteasom-Ubiquitin-System oder durch die lysosomale Autophagie abgebaut werden (Oczkowska *et al.*, 2013).

Neuere Studien belegen eine Elimination von α-Synuclein durch Exozytose (Grey *et al.*, 2015). Im Extrazellulärraum kommt es zu einer Inflammation und einer Aktivierung des TNF-α-Rezeptors, welcher den extrinsischen Signalweg der Apoptose einleitet (Prajapati *et al.*, 2014).

Es wird auch diskutiert, ob der Beginn der Akkumulation durch die Exozytose getriggert wird, andere Theorien besagen eine Triggerung der Akkumulation von α-Synuclein in den Lysosomen durch Cathepsin B (Tsujimura *et al.*, 2015).

Eine verminderte Aktivität des ALP (*Autophagy-lysosomal-pathway*) führt zu einer reduzierten intrazellulären α-Synuclein-Aggregation bei vermehrter Sekretion von α-Synuclein-Oligomeren in den Extrazellulärraum (Poehler *et al.*, 2014; Danmeil *et al.*, 2015). Dehay *et al.* beschrieben 2013 ebenfalls eine Aggregation von α-Synuclein durch lysosomalen Funktionsverlust (Dehay *et al.*, 2013).

Ein ATP13A2-Funktionsverlust führt zu einer verminderten Exozytose von α-Synuclein, während eine Überexpression von ATP13A2 die Toxizität des α-Synuclein verringert (Tsunemi *et al.*, 2014) und neuroprotektiv wirken kann (Lopes da Fonseca und Outeiro, 2014).

In Patienten mit sporadischem MP wurde eine vermehrte Exozytose von α-Synuclein nachgewiesen, während ein erhöhtes Level an ATP13A2 vorlag (Kong *et al.*, 2014). Dazu passend wiesen Hauser et Hastings 2013 auf eine gestörte Exozytose von α-Synuclein bei *ATP13A2*-Mutationsträgern hin (Hauser und Hastings, 2013). Dies steht im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit nicht nachgewiesenen erhöhten intrazellulären α-Synuclein-Levels.

Tsujimura *et al.* beschreiben 2015 andererseits die Endozytose von α-Synuclein-Fibrillen, welche darauf folgend intrazellulär akkumulieren (Tsujimura *et al.*, 2015).

Bir *et al.* beobachteten eine intrazelluläre Akkumulation von α-Synuclein in SHSY5Y-Zellen nach Hemmung der Proteasomen durch Lactacystin. Dadurch kommt es zu einer mitochondrialen Dysfunktion und zum Absterben der Zelle. Der Zelltod kann bei gleichzeitigem *knockout* von *α-Synuclein* verhindert werden (Bir *et al.*, 2014).

Eine Inaktivierung des JNK1-Bcl_2-Wegs wird durch eine Überexpression von humaner *α-Synuclein*-(E46K)-Mutation induziert, wodurch die Makroautophagie geschwächt wird (Yan *et al.*, 2014).

Luth *et al.* beschrieben 2014 einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+}-Spiegel, der durch das Vorliegen von präfibrillären α-Synuclein-Oligomeren ausgelöst wird. Durch die erhöhte Ca^{2+}-Konzentration kommt es zur Schwellung und Depolarisierung der mitochondrialen Membran und zu einer Freisetzung von Cytochrom-c (Luth *et al.*, 2014).

Bae *et al.* konnten 2014 keinen Unterschied der α-Synuclein-Level zwischen *ATP13A2*-/- Trägern und Kontrollen feststellen, auch nicht in der lysosomalen Aktivität (Bae *et al.*, 2014).

Neue Erkenntnisse über die Lokalsation von ATP13A2 in der Zelle erbrachten Yang und Xu 2014. Wildtyp-ATP13A2 findet sich in Lysosomen, während mutierte Formen im endoplastamatischen Retikulum lokalisiert sind. Es kommt zu einer reduzierten Autophagie, wodurch vermehrt reaktive Sauerstoffradikale entstehen und oxidativer Stress intrazellulär vorliegt (Yang und Xu, 2014).

Wie man aus der Diskussion der aktuellen Literatur ersehen kann, gibt es kontroverse Ergebnisse, die sich noch nicht zusammenbringen lassen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit einigen Studien überein. Andererseits werfen sie aber auch neue Fragen auf, da sie nicht mit anderen Forschungsergebnissen vereinbar sind. Es ist erkennbar, dass sich der aktuelle Wissensstand noch auf der Ebene der Grundlagenforschung bewegt.

Im Hinblick auf potentielle kurative Therapeutika befasst sich die Forschung mit vielen möglichen neuroprotektiven Stoffen. Ein Ansatzpunkt sind antiapoptotische oder antiautophagische Substanzen (u.a. Saxagliptin, CDNF). Bei diesen Therapieansätzen besteht allerdings das Problem, dass eine systemische Wirkung auf diese Vorgänge mit erheblichen Nebenwirkungen, v.a. die Entwicklung von Malignomen, nach sich ziehen (Ghavami *et al.*, 2014; Mei und Niu, 2014; Nassar *et al.*, 2015). Weitere Stoffe wie Nikotin, ALDH-2 (mitochondriale Aldehyddehydrogenase),

Transhinon IIA, Puerarin, Acetylcorynolin, Tetraspanin oder Spermidin reduzieren den oxidativen Stress und wurden teilweise auch *in vivo* getestet (Fu *et al.,* 2014; Büttner *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Masoudi *et al.,* 2014; Chiu *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015).

Auch wurde die ATP13A2-Überexpression bereits *in vivo* getestet. In der Studie von Daniel *et al.* konnte 2014 in Rattenmodellen dadurch kein neuroprotektiver Effekt erzielt werden (Daniel *et al*., 2014).

Lonskaya *et al.* und Mahul-Mellier *et al.* beschrieben c-Abl (Tyrosinkinase Abelson) als Regulatorprotein im α-Synuclein- und Parkin-Abbau durch Phosphorilierung. c-Abl ist eine Tyrosinkinase, die an vielen Zellmechanismen, u.a. als Induktor der Apoptose, beteiligt ist. Eine Überexpression von α-Synuclein induziert die Expression von c-Abl (Lonskaya *et al.*, 2013; Mahul-Mellier *et al.*, 2014).

4.4. Fazit

In Bezug auf die Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit (*Kap. 1.4*) ist das *Screening*-Verfahren zur schnellen und ökonomischen Diagnostik von Mutationen im *ATP13A2*-Gen mittels *Real-time*-PCR aufgrund ungenügender Sensitivität und Spezifität nicht sinnvoll in der Zukunft zu verwenden. Zur genauen Sequenzanalyse nach Sanger wurden 94 Proben aus der Lübecker Population ausgewählt, die aufgrund medizinischer Daten ein erhöhtes Risiko tragen, am Kufor-Rakeb-Syndrom zu leiden (*Kap. 2.1.2*). In dieser Analyse konnten keine homozygoten oder gemischt-heterozygoten Träger von pathogenen Mutationen ermittelt werden (*Kap. 3.1.2.1*). Es wurden drei bisher unbekannte *Missense*-Varianten (Exon 14, g.20631C>G, c.1487C>G, p.Leu433Val; Exon 26, g.29784T>C, c.3174T>C, p.Ala995Val; Exon 28, g.30403C>T, c.3532C>T, p.Ile1114Thr) und eine *Intron*-Variante (Exon 19, g.24939C>T) detektiert (*Kap. 3.1.2*).

Im Zuge des zweiten Projekts konnte der genaue molekulare Mechanismus der Neurodegeneration in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Allerdings wurde eine erhöhte Sterblichkeit von Fibroblasten, die eine Mutation im *Parkin*-Gen tragen, im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgern nachgewiesen (*Kap. 3.2.2*). Die Hypothese, dass *Parkin*-Mutationsträger einen erhöhten intrazellulären Spiegel von α-Synuclein aufweisen (*Kap. 3.2.3.1*), wurde bestätigt. Mutationsträger im *ATP13A2*-Gen weisen keinen erhöhten Spiegel von α-Synuclein auf (*Kap. 3.2.4*). α-Synuclein konnte bei den *Parkin*-Mutationsträgern in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden (*Kap. 3.2.3.2*). Zur Ermittlung der Art des Zelltods wurden pro- und antiapoptoische Proteine in den in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten untersucht. Hier zeigte sich ein Anstieg des antiapoptotischen Proteins Bcl_2 unter oxidativem Stress bei Nicht-

Mutationsträgern, während es bei den Mutationsträgern für *Parkin* nicht angestiegen ist. Analysen zu Bax erbrachten keine Unterschiede (*Kap. 3.2.7.2*).

Zusammengefasst kann davon ausgegangen werden, dass ein erhöhtes intrazelluläres Vorliegen von α-Synuclein oxidativen Stress begünstigt und das antiapoptotische oder antiautophagische System nicht adäquat reguliert wird. Wie der oxidative Stress genau induziert wird, ist noch nicht geklärt. Studien beschreiben toxische Ursachen sowohl durch mitochondriale Dysfunktion als auch durch Proteinakkumulation bei Dysfunktion von Proteasen. Das Sterbeverhalten ist allerdings aufgrund des sehr langsamen Fortschreitens der Neurodegeneration schwer zu erfassen. Zudem spielen noch weitere Faktoren wie Umwelteinflüsse eine Rolle in der Entwicklung des MP, die im Studiendesign schwer zu fassen sind und daher noch nicht evident erforscht sind.

5. Ausblick

Das Ziel der Aufklärung der molekularen Mechanismen des MP liegt in der Entwicklung einer kurativen Therapie. Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit eine Mutationsanalyse (I) und Analysen hinsichtlich des Sterbeverhaltens, des α-Synuclein-Levels und der apoptotischen Stoffwechsellage (II) bei an genetisch bedingtem MP erkrankten Patienten durchgeführt. Die Fortsetzung der hier durchgeführten Untersuchungen unter kritischer Einbeziehung neuer Forschungsergebnisse kann möglicherweise einige Wissenslücken schließen. In der Diskussion wurden bereits einige Vorschläge eingebracht, wie die Fortsetzung der Forschungsarbeit mit den vorliegenden Ergebnissen durchgeführt werden könnte. Diese Vorschläge werden im Folgenden nochmals zusammenfassend erläutert.

(I) In der Mutationsanalyse konnten keine homozygoten Mutationsträger nachgewiesen werden. Allerdings könnte die Ermittlung der Risikoveränderung durch das Vorliegen von SNPs Aussagen über genetische Risikofaktoren erzielen.

(II) Der Frage, ob wirklich ein Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Level von α-Synuclein und der Schwere und Form des PS vorliegt, sollte in einer Studie mit vielen Teilnehmern nachgegangen werden. Zusätzlich sollte bei den in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten die Menge an extrazellulär gelegenem α-Synuclein untersucht werden und erneut ein Vergleich zwischen *Parkin*- und *ATP13A2*-Mutationsträgern, sowie Kontrollen erfolgen. Die Analyse von c-Abl bei den hier verwendeten *Parkin*-Mutationsträgern wäre ebenfalls interessant, da bei einem erhöhten α-Synuclein-Level nach den Arbeiten von Lonskaya *et al.* und Mahul-Mellier *et al.* auch ein erhöhter c-Abl-Spiegel vorliegen sollte (Lonskaya *et al*., 2013; Mahul-Mellier *et al*., 2014).

Hinsichtlich der Rolle von Bcl_2 in der Neurodegeneration gibt es ebenfalls noch viele Fragen zu klären. Zum Einen ist das genaue Zusammenspiel von Bcl_2 und Beclin-1 bei *Parkin*- und *ATP13A2*-Mutationsträgern zu untersuchen, zum Anderen ist die Ursache des Ausbleibens des Bcl_2-Anstiegs in den *Parkin*-Mutationsträgern ungeklärt. Die Aufdeckung dieser Mechanismen könnte den genauen Ablauf der Neurodegeneration beschreiben. Daraus könnten weitere Therapiestrategien entwickelt werden. Als weiteren Therapieansatz könnte auch eine direkte Hemmung der α-Synuclein-Akkumulation in Betracht gezogen werden.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen der Neurodegeneration bei Morbus Parkinson (MP). Unter den Parkinsonsyndromen (PS) sind 5 – 10 % genetisch bedingt. Klinisch lassen sich die PS in drei Formen einteilen; Das klasische PS, das *early-onset*-PS und das atypische PS. Für diese Arbeit wurde aus jeder Form ein zugehöriges Gen ausgewählt; *ATP13A2*, *α-Synuclein* und *Parkin*.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet zwei Projekte:

(I) Zur schnellen und ökonomischen Mutationsanalyse für das Gen *ATP13A2* soll eine *Real-time*-PCR als *Screening-M*ethode etabliert werden. Die genaue Sequenzanalyse soll darauf folgend mit Hilfe der Sequenzierung nach Sanger erfolgen.

(II) Das zweite Projekt beschäftigt sich mit den Hintergründen der molekularen Mechanismen der Neurodegeneration. Dazu soll zunächst eine vermehrte Sterblichkeit von Fibroblasten, die eine Mutation im *Parkin*-Gen tragen, anhand eines *Tripan-blue-exclusion-Assays* und einer Laktat-Dehydrogenase-Messung bewiesen werden. Es werden Analysen hinsichtlich des intrazellulären Vorkommens von α-Synuclein bei *Parkin*- und *ATP13A2*-Mutationsträgern mittels *Westernblot* vorgenommen. Dazu werden Vergleiche zu dem klinischen Status der Patienten gezogen. Zusätzlich werden Bax und Bcl_2 als pro- und antiapoptotische Proteine in den Fibroblasten der *Parkin*-Mutationsträger untersucht. Damit soll der Frage nachgegangen werden, über welche Art von Zelltod die Neurodegeneration abläuft.

(I) Während der Etablierung der *Screening-M*ethode mittels *Real-time*-PCR konnte keine ausreichende Sensitivität und Spezifität erreicht werden, weswegen diese Methode für ein *Screening-V*erfahren für das Gen *ATP13A2* als nicht geeignet angesehen wird. Es wurden 94 Proben anhand klinischer Daten ausgewählt und nach Sanger für das gesamte Gen *ATP13A2* sequenziert. Dabei konnten keine homozygoten Träger einer pathogenen Variation detektiert werden. Allerdings wurden vier bisher unbekannte Genveränderungen nachgewiesen. Es handelt sind um drei *Missense*- und eine *Intron*-Variante. Eine der neu ermittelten Genvarianten wirkt sich nach *in-silico*-Prädikation pathogen aus. Diese liegt in der vorliegenden Probe heterozygot vor und hat damit für den betroffenen Patienten keinen Krankheitswert.

(II) Im Zuge des zweiten Projekts wurde eine erhöhte Sterblichkeit von Fibroblasten, die eine Mutation im *Parkin*-Gen tragen, nach Behandlung mit oxidativem Stress nachgewiesen. Diese Fibroblasten von Mutationsträgern wiesen, abhängig von der Art ihrer Mutation, eine erhöhte intrazelluläre Menge an α-Synuclein auf. Bei *ATP13A2*-Mutationsträgern konnte α-Synuclein nicht nachgewiesen werden. Schlussfolgerungen aus diesen Ergebnissen könnten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Menge des intrazellulären α-Synucleins und der Form des PS geben.

Das antiapoptotische Protein Bcl_2 wurde unter oxidativem Stress vermehrt bei Nicht-Mutationsträgern in Vergleich zu *Parkin*-Mutationsträgern ermittelt. Bax als proapoptotisches Protein zeigte keine Unterschiede. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Überlebenswege der Zellen bei *Parkin*-Mutationsträgern gestört sind. Hinsichtlich dieser Erkenntnis und in Zusammenschau mit der aktuellen Literatur gibt es in Zukunft noch viele Fragen zu klären. An diese Arbeit sollten sich Analysen hinsichtlich des Zusammenspiels zwischen α-Synuclein und den apoptotischen Proteinen anschließen.

Summary

This thesis investigated molecular mechanisms of neurodegeneration in Parkinson's disease (PD). Among all PD, 5 – 10 % are caused by pathogenic mutations in PD genes (monogenetic PD). We distinguish three clinical subtypes; the classical, early-onset and atypical PD. We have chosen one representative gene for each form of PD - *ATP13A2*, *α-Synuclein* and *Parkin* - for the experiments within the thesis.

The following two projects were addressed in this thesis:

(I) Establishment of a fast and economic real time PCR to screen for mutations in *ATP13A2*. To identify the exact gene sequence, this was followed by Sanger sequencing.

(II) The second project deals with pathways underlying the molecular neurodegeneration of PD. First we demonstrated increased cell death in fibroblasts harboring *Parkin* mutations. For this, we conducted a tripan blue exclusion assay and a lactate dehydrogenase assay under conditions of oxidative stress. To investigate an increased intracellular level of α-Synuclein in *Parkin* and *ATP13A2* mutation carriers we performed by Western blotting. We compared the results to the clinical status of the patients. Finally we analyzed levels of pro- and antiapoptotic proteins, respectively, i. e. Bax and Bcl_2 - to investigate pathways of cell death.

(I) Due to several technical problems during the establishment of the screening for *ATP13A2* mutations, this part of the project was no longer pursued. As an alternative we selected 94 samples from patients who displayed clinical symptoms possible consistent with *ATP13A2* mutations. We analyzed these samples by Sanger sequencing and did not detect any clearly pathogenic mutations. We identified four previously unknown heterozygous variants: Three missense variants and one intron variant. One of the missense variants was predicted to be pathogen by in-silico methods.

(II) Significantly more fibroblasts with a mutation in *Parkin* died under oxidative stress. The same cells showed an increased level of intracellular α-Synuclein depending on the type of mutation. We did not detect any α-Synuclein in fibroblasts from *ATP13A2* mutation carriers. These results may indicate a correlation between the level of intracellular α-Synuclein and the clinical expression. In wildtype fibroblasts we detected increased levels of the antiapoptotic Protein Bcl_2 under oxidative stress. Fibroblasts from *Parkin* mutations carriers did not show any differences of Bcl_2 levels under normal conditions or upon oxidative stress. Likewise, for the proapoptotic protein Bax, no differences between fibroblasts from *Parkin* mutation carriers and fibroblasts from wildtypes were identified.

In conclusion, we detected signs of an impaired antiapoptotic pathway in *Parkin* mutation carriers, raising new questions and hypotheses. In the future, the interaction between α-Synuclein and (anti-) apoptotic proteins should be further investigated.

7. Literaturverzeichnis

Bae E, Lee C., Lee HJ, Kim S, Lee SJ. (2014). ATP13A2/PARK9 Deficiency Neither Cause Lysosomal Impairment Nor Alter α-Synuclein Metabolism in SH-SY5Y Cells. *Exp Neurobiol., 23*, 365-371.

Bir A, Sen O, Anand S, Khemka VK, Banerjee P, Cappai R, Sahoo A, Chakrabarti S. (2014). α-Synuclein-induced mitochondrial dysfunction in isolated preparation and intact cells: implications in the pathogenesis of Parkinsons disease. *J Neurochem, 131*, 868-877.

Bourdenx M, Bezard E, Dehay B. (2014). Lysosomes and α-synuclein form a dangerous duet leading to neuronal cell death. *Frontiers in Neuroanatomy, 8*, 1-7.

Brueggemann N, Odin P, Gruenewald A, Tadic V, Hagenah J, Seidel G, Lohmann K, Klein C, Djarmati A. (2008). Alpha-synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. *Neurology,* 71, 1294.

Brüggemann N, Hagenah J, Reetz K, Schmidt A, Kasten M, Buchmann I, Eckerle S, Bähre M, Münchau A, Djarmati A, van der Vegt J, Siebner H, Binkofski F, Ramirez A, Behrens MI, Klein C. (2010). Recessively Inherited Parkinsonism. *Arch Neurol., 67*, 1357-1363.

Büttner S, Broeskamp F, Sommer C, Markaki M, Habernig L, Alavian-Ghavanini A, Carmona-Gutierrez D, Eisenberg T, Michael E, Kroemer G, Tavernarakis N, Sigrist SJ, Madeo F. (2014). Spermidine protects against α-synuclein neurotoxicity. *Cell Cycle, 13*, 3903-3908.

Byrd RA, Weissmann A. (2013). Compact Parkin only: insights into the structure of an autoinhibited ubiquitin ligase. *The EMBO Journal, 32*, 2087–2089.

Cheon SM, Chan L, Chan DKY, Kim JW. (2012). Genetics of Parkinsons Disease - A Clinical Perspective. *Journal of Movement Disorders, 5*, 33-41.

Chiu CC, Yeh T, Lai SC, Wu-Chou YH, Chen CH, Mochly-Rosen D, Huang YC, Chen YJ, Chen CL, Chang YM, Wang HL, Lu CS. (2015). Neuroprotective effects of aldehyde dehydrogenase 2 activation in rotenone-induced cellular and animal models of parkinsonism. *Exp Neurol., 263*, 244-253.

Chu MK, Kang S, Kim WC, Ma HI, Choi JM, Kima YJ. (2014). Analysis of Dosage Mutation in PARK2 among Korean Patients with Early-Onset or Familial Parkinsons Disease. *Clin Neurol, 10*, 244-248.

Dagda RK, Cherra SJ, Kulich SM, Tandon A, Park D, Chu CT. (2009). Loss of PINK1 Function Promotes Mitophagy through Effects on Oxidative Stress and Mitochondrial Fission. *J Biol Chem., 284*, 13843–13855.

Danial NN, Korsmeyer SJ. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell, 116*, 205–219.

Daniel G, Musso A, Tsika E, Fiser A, Glauser L, Pletnikova O, Schneider BL, Moore DJ. (2014). α-Synuclein-induced dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinsons disease occurs independent of ATP13A2 (PARK9). *Neurobiol Dis., 73*, 229-243.

Danmeil L, Wenzhao W, Jianhua Z, Zhongxin Z. (2015). Proteasome inhibitor-induced autophagy in PC12 cells overexpressing A53T mutant α-synuclein. *Molecular Medicine Reports*, 11, 1655-1660.

Dehay B, Martinez-Vicente M, Ramirez A, Perier C, Klein C, Vila M, Bezard E. (2012). Lysosomal dysfunction in Parkinson disease: ATP13A2 gets into the groove. *Autophagy, 8*, 1389-1391.

Dehay B, Martinez-Vincente M, Caldwell GA, Caldwell KA, Yue Z, Cookson MR, Klein C, Vila M, Bezard E. (2013). Lysosomal impairment in Parkinsons disease. *Movement Disorders, 28*, 725-732.

Dehay B, Ramirez A, Martinez-Vicente M, Perier C, Canron MH, Doudnikof E, Vital A, Vila M, Klein C, Bezard E. (2012). Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A, 109*, 9611-9616.

Dikiy I, Eliezer D. (2014). N-terminal Acetylation Stabilizes N-terminal Helicity in Lipid- and Micelle-bound α-Synuclein and Increases Its Affinity for Physiological Membranes. *J Biol Chem, 289*, 3652–3665.

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology, 68*, 384-386.

Ehringer H, Hornykiewicz O. (1960). Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr, 38*, 1236-1239.

Eiberg H, Hansen L, Korbo L, Nielsen IM, Svenstrup K, Bech S, Pinborg LH, Friberg L, Hjermind LE, Olsen OR, Nielsen JE. (2012). Novel mutation in ATP13A2 widens the spectrum of Kufor-Rakeb syndrome (PARK9). *Clin Genet, 82*, :256-263.

Fu RH, Wang Y, Chen CS, Tsai RT, Liu SP, Chang WL, Lin HL, Lu CH, Wei JR, Wang ZW, Shyu WC, Lin SZ. (2014). Acetylcorynoline attenuates dopaminergic neuron degeneration and α-synuclein aggregation in animal models of Parkinsons disease. *Neuropharmacology, 82*, 108-120.

Gallegos S, Pacheco C, Peters C, Opazo CM, Aguayo LG. (2015). Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinsons disease. *Frontiers in Neuroscience, 9*, 1-11.

Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christoffersson J, Chaabanef W, Moghadami AR, Kashani HH, Hashemi M, Owjid AA, Łos MJ. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology, 112*, 24–49.

Gomez-Lazaro M, Galindo M, Cancannon CG, Segura MF, Fernandez-Gomez FJ, Nuria Llecha N, Comella JX, Prehn JHM, Jordan J. (2008). 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. *Journal of Neurochemistry, 104*, 1599–1612.

Greene JC, Whitworth A, Andrews LA, Parker TJ, Pallanck LJ. (2005). Genetic and genomic studies of Drosophila parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Hum Mol Genet, Vol. 14*, 799–811.

Grey M, Dunning CJ, Gaspar R, Grey C, Brundin P, Sparr E, Linse S. (2015). Acceleration of α-Synuclein Aggregation by Exosomes. *J Biol Chem, 290*, 2969-2982.

Grünewald A, Arns B, Seibler P, Rakovic A, Münchau A, Ramirez A, Sue CM, Klein C. (2012). ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with Kufor-Rakeb syndrome. *Neurobiol Aging, 33*, 1843.

Guillemin Y, Lopez J, Gimenez D, Fuertes G, Valero JG, Blum L, Gonzalo P, Salgado J, Girard-Egro A, Aouacheria A. (2010). Active Fragments from Pro- and Antiapoptotic BCL-2 Proteins Have Distinct Membrane Behavior Reflecting Their Functional Divergence, *PLoS One, 5,* e9066.

Hauser D, Hastings TG. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinsons disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis., 51*, 35-42.

Hedrich K, Marder K, Harris J, Kann M, Lynch T, Meija–Santana H, Pramstaller PP, Schwinger E, Bressman SB, Fahn S, Klein C. (2002). Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinsons disease for Parkin mutations. *Neurology, 58*, 1239-1246.

Houlden H, Singleton A. (2012). The genetics and neuropathology of Parkinsons disease. *Acta Neuropathol, 124*, 325-338.

Ibanez P, Bonnet A, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Dürr A, Brice A. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinsons disease. *Lancet., 364*, 1169-1171.

Ibanez P, Lesage S, Janin S, Lohmann E, Durif F, Destée A, Bonnet AM, Brefel-Courbon C, Heath S, Zelenika D, Agid Y, Dürr A, Brice A. (2009). Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. *Arch Neurol., 66*, 102-108.

Ikeuchi T, Iwatsubo T, Nishizawa M, Takahashi H, Ishikawa A, Kakita A, Shiga A, Kasuga K, Kaneko H, Tan CF, Idezuka J, Wakabayashi K, Onodera O. (2008). Patients homozygous and heterozygous for SNCA duplication in a family with parkinsonism and dementia. *Arch. Neurology, 65*, 514-519.

Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Hagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H. (2012). Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and α-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Molecular Brain, 5,* 1-13.

Jain MV, Paczulla A, Klonisch T, Dimgba TF, Rao SB, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla VR, Maddika S, Łos M. (2013). Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J. Cell. Mol. Med., 17*, 12-29.

Jao CC, Der-Sarkissian A, Chen J, Langen R. (2004). Structure of membrane-bound alpha-synuclein studied by site-directed spin labeling. *PNAS, 101*, 8331–8336.

Jellinger KA. (2015). Neuropathobiology of non-motor symptoms in Parkinson disease. from J. Neuronal Transmission, Epub ahead of print

Johnson BN, Berger A, Cortese GP, Lavoie MJ. (2012). The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109*, 6283-6288.

Kalia LV, Lang AE, Hazrati LN, Fujioka S, Wszolek ZK, Dickson DW, Ross OA, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Hurtig HI, Alcalay RN, Marder KS, Clark LN, Gaig C, Tolosa E, Ruiz-Martínez J, Marti-Masso JF, Ferrer I, López de Munain A, Goldman SM, Schüle B, J. William Langston JW, Aasly JO, Giordana MT, Bonifati V, Puschmann A, Canesi M, Pezzoli G, Maues De Paula A, Hasegawa K, Duyckaerts C, Brice A, Stoessl AJ, Marras C. (2015). Clinical Correlations With Lewy Body Pathology in LRRK2-Related Parkinson Disease. *JAMA Neurol., 72*, 100–105.

Kamel F, Goldman SM, Umbach DM, Chen H, Richardson G, Barber MR, Meng C, Marras C, Korell M, Kasten M, Hoppin JA, Comyns K, Chade A, Blair A, Bhudhikanok GS, Ross GW, Langston JW, Sandler DP, Tanner CM. (2014). Dietary Fat Intake, Pesticide Use, and Psrkinsons disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 20, 82-87.

Kann M, Jacobs H, Mohrmann K, Schumacher K, Hedrich K, Garrels J, Wiegers K, Schwinger E, Pramstaller PP, Breakefield XO, Ozelius LJ, Vieregge P, Klein C. (2002). Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism. *Ann Neurol., 51*, 621–625.

Kasten M, Klein C. (2013). The many faces of alpha-synuclein mutations. *Mov. Disord.*, 28, 697-701.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implictions in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer, 26*, 239.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature, 392*, 605-608.

Klein C, Djamarti A, Hedrich K, Schäfer N, Scaglione C, Marchese R, Kock N, Schüle B, Hiller A, Lohnau T, Winkler S, Wiegers K, Hering R, Bauer P, Riess O, Abbruzzese G, Martinelli P, Pramstaller PP. (2005). PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *European Journal of Human Genetics, 13*, 1086–1093.

Klein C, Lohmann-Hedrich K. (2007). Impact of recent genetic findings in Parkinson`s disease. *Current opinion Neurology, 20*, 453-464.

Klein C, Pramstaller PP, Kis B, Page CC, Kann M, Leung J, Woodward H, Castellan CC, Scherer M, Vieregge P, Breakefield XO, Kramer PL, Ozelius LJ. (2000). Parkin Deletions in an Familiy with Adult-onset, Tremor-Dominant Parkinsonism: Expanding the Phenotype. *Ann Neurol, 48*, 65-71.

Klein C, Schlossmacher MG (2007). Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder. *Neurology, 69*, 2093-2104.

Kong SM, Chan BK, Park JS, Hill KJ, Aitken JB, Cottle L, Farghaian H, Cole AR, Lay PA, Sue CM, Cooper AA. (2014). Parkinsons disease-linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes α-Synuclein externalization via exosomes. *Hum Mol Genet., 23*, 2816-2833.

Lai HJ, Lin CH, Wu RM. (2012). Early-Onset Autosomal-Recessive Parkinsonian-Pyramidal Syndrome. *Acta Neurol Taiwan, 21*, 99-107.

Lang AE, Lozano A. (1998). Parkinsons Disease. *N. Engl. J. Med., 339*, 1044-1053.

Levy OA, Malagelada C, Greene LA. (2009). Cell death pathways in Parkinsons disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Springer Science+Business Media, 10*, 10495-10008.

Liu Y, Zeng X, Hui Y, Zhu C, Wu J, Taylor DH, Ji J, Fan W, Huang Z, Hu J. (2015). Activation of α7 nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: implications for Parkinsons disease. *Neuropharmacology, 91*, 87-96.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (Ed.). (2001). *Molekulare Zellbiologie* (Vol. 4): Gustav Fischer.

Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, Wood NW, De Michele G, Bonnet AM, Fraix V, Broussolle E, Horstink MW, Vidailhet M, Verpillat P, Gasser T, Nicholl D, Teive H, Raskin S, Rascol O, Destée A, Ruberg M, Gasparini F, Meco G, Agid Y, Durr A, Brice A. (2003). How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol.*, 54, 176-85.

Lohmann E, Thobois S, Lesage S, Broussolle E, Tezenas du Montcel S, Ribeiro MJ, Remy P, Pelissolo A, Dubois B, Mallet L, Pollak P, Agid Y, Brice A, (2009). A multidisciplinary study of patients with early-onset PD with and without parkin mutations. *Neurology*, 72, 110–116.

Lohmann K. (2008). Erbliche Parkinson-Syndrome: Überblick und neue Entwicklungen. Unpublished work.

Lonskaya I, Desforges NM, Hebron ML, Moussa CE. (2013). Ubiquitination increases parkin activity to promote autophagic alpha-synuclein clearance. *PLoS One, 8*, e83914.

Lopes da Fonseca T, Outeiro TF. (2014). ATP13A2 and Alpha-synuclein: A Metal Taste in Autophagy. *Exp Neurobiol., 4*, 314-323.

Luth ES, Stavrovskaya I, Bartels T, Kristal BS, Selkoe DJ. (2014). Soluble, prefibrillar α-synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca2+-induced mitochondrial dysfunction. *Biol Chem., 289*, 21490-21507.

Mahul-Mellier AL, Fauvet B, Gysbers A, Dikiy I, Oueslati A, Georgeon S, Lamontanara AJ, Bisquertt A, Eliezer D, Masliah E, Halliday G, Hantschel O, Lashuel HA. (2014). c-Abl phosphorylates α-synuclein and regulates its degradation: implication for α-synuclein clearance and contribution to the pathogenesis of Parkinsons disease. *Hum. Mol. Genet., 23*, 2858-2879.

Marras C, Lohmann K., Lang A, Klein C. (2012). Fixing the broken system of genetic locus symbols. *Neurology, 78*, 1017-1024.

Masoudi N, Ibanez-Cruceyra P, Offenburger SL, Holmes A, Gartner A. (2014). Tetraspanin (TSP-17) Protects Dopaminergic Neurons against 6-OHDA-Induced Neurodegeneration in C.elegans. *PLOS Genetics, 10*, e1004767.

Mei JM, Niu CS. (2014). Effects of CDNF on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation. *Neurol Sci., 8*, 1275-1280.
Mellick GD, Siebert GA, Funayama M, Buchanan DD, Li Y, Imamichi Y, Yoshino H, Silburn PA, Hattori N. (2009). Screening PARK genes for mutations in early-onset Parkinsons disease patients from Queensland, Australia. *Parkinsonism Relat. Disord., 15*, 105–109.
Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.
Cookson MR. (2009). α-Synuclein and neuronal cell death. *Molecular Neurodegeneration, 4*, 1750-1326.
Najim al-Din AS, Wriekat A, Mubaidin A, Dasouki M, Hiari M. (1994). Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurol Scand, 89*, 347-352.
Nassar NN, Al-Shorbagy MY, Arab HH, Abdallah DM. (2015). Saxagliptin: A novel antiparkinsonian approach. *Neuropharmacology, 89*, 308-317.
Nishioka K, Ross OA, Ishii K, Kachergus JM, Ishiwata K, Kitagawa Inoue Y, Imai H, Takanashi M, Mizuno Y, Farrer MJ, Hattori N. (2009). Expanding the clinical phenotype of SNCA duplication carriers. *Movement Disorders, 24*, 1811-1819
Nixon RA, Yang DS (2012). Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol., 4*, 1-23.
Oczkowska A, Kozubski W, Lianeri M, Dorszewska J. (2013). Mutations in PRKN and SNCA Genes Important for the Progress of Parkinsons Disease. *Current Genomics, 14*, 502-517.
Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell, 74*, 609-619.
Pankratz N, Kissell DK, Pauciulo MW, Halter CA, Rudolph A, Pfeiffer RF, Marder KS, Foroud T, Nichols WC. (2009). Parkin dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations. *Neurology, 73*, 279-286.
Parkinson J, (1817). An essay in the shaking palsy. *Wittingham and Rowland, London*.
Podhajska A, Musso A, Trancikova A, Stafa K, Moser R, Sonnay S, Glauser L, Moore D. (2012). Common pathogenic effects of missense mutations in the P-type ATPase ATP13A2 (PARK9) associated with early-onset parkinsonism. *PLoS One*, 7, e39942.
Poehler AM, Xiang W, Spitzer P, May V, Meixner H, Rockenstein E, Chutna O, Outeiro T, Winkler J, Masliah E, Klucken J. (2014). Autophagy modulates SNCA/alpha-synuclein release, thereby generating a hostile microenvironment. *Autophagy, 10*, 2171-2192.
Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997). Mutation in the α-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinsons Disease. *Science, 276*, 2045-2047.
Poulopoulos M, Levy OA, Alcalay RN. (2012). The neuropathology of genetic Parkinsons disease. *Mov Disord, 27*, 831-842.
Prajapati P, Lakshmi S, Singh K, Bhatelia K, Singh R, Singh R. (2014). TNF-α regulates miRNA targeting mitochondrial complex-I and induces cell death in dopaminergic cells. *Biochim. Biophys. Acta., 1852*, S0925-4439.
Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, Scaravilli F, Eskelson C, Pepivani I, Hedrich K, Adel S, Gonzales-McNeal M, Hilker R, Kramer PL, Klein C. (2005). Lewy body Parkinsons disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann Neurol., 58*, 411-422.
Puschmann A, (2013). Monogenic Parkinsons disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord.*, 19, 407-15.
Rakovic A, Shurkewitsch K, Seibler P, Grünewald A, Zanon A, Hagenah J, Krainc D, Klein C. (2013). Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)-induced Putative Kinase 1 (PINK1)-dependent Ubiquitination of Endogenous Parkin Attenuates Mitophagy. *J Biol Chem, 288*, 2223–2237.
Rakovic A, Stiller B, Djarmati A, Flaquer A, Freudenberg J, Toliat MR, Linnebank M, Kostic V, Lohmann K, Paus S, Nurnberg P, Kubisch C, Klein C, Wullner U, Ramirez A. (2008). Genetic association study of the P-type ATPase ATP13A2 in late-onset Parkinsons disease. Mov. Disord., 24, 429-433.
Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2 , encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature Genetics*, 38, 1184-91.
Reed JC, Roth W. (2002). Apoptosis and cancer: When BAX is trailing away. *Nature Medicine, 8* 216-218.

Ren B, Zhang YX, Zhou HX, Sun FW, Zhang ZF, Wei ZF, Zhang CY, Si DW. (2015). Tanshinone IIA prevents the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons by inhibiting NADPH oxidase and iNOS in the MPTP model of Parkinsons disease. *J. Neurol. Sci., 348*, 0022-0510.

Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol., 35*, 495–516.

Safadi SS, Barber KR, Shaw GS. (2011). Impact of autosomal recessive juvenile Parkinsons disease mutations on the structure and interactions of the parkin ubiquitin-like domain. *Biochemistry, 50*, 2603-2610.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry, 74,* 5463-5467.

Shen S, Kepp O, Michaud M, Martins I, Minoux H, Metivier D, Maiuri MC, Kroemer RT, Kroemer G. (2011). Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene, 30*, 4544–4556.

Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genetics, 3*, 302-305.

Shimura H, Mizuno Y, Hattori N. (2012). Parkin and Parkinson disease. *Clin Chem, 58*, 1260-1261.

Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. (2003). α-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinsons Disease. *Science, 302*, 841.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature, 388*, 839-840.

Trempe JF, Fon EA. (2013). Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection. *Front. Neurol., 4*, 38.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science., 228*, 1440-1443.

Tsujimura A, Taguchi K, Watanabe Y, Tatebe H, Tokuda T, Mizuno T, Tanaka M. (2015). Lysosomal enzyme cathepsin B enhances the aggregate forming activity of exogenous α-synuclein fibril. *Neurobiol. Dis., 73*, 244–253.

Tsunemi T, Hamada K, Krainc D. (2014). ATP13A2/PARK9 regulates secretion of exosomes and α-synuclein. *J. Neurosci., 34*, 15281-15287.

Usenovic M, Knight AL, Ray A, Wong V, Brown KR, Caldwell GA, Caldwell KA, Stagljar I, Krainc D. (2012). Identification of novel ATP13A2 interactors and their role in alpha-synuclein misfolding and toxicity. *Human molecular genetics*, *21*, 3785-94.

Vance JM, Ali S, Bradley WG, Singer C, Di Monte DA. (2010). Gene-environment interactions in Parkinsons disease and other forms of parkinsonism. *Neurotoxicology, 5*, 598-602.

Veen van S, Vangheluwe P, Sørensen DM, Holemans T, Holen HW, Palmgren MG. (2014). Cellular function and pathological role of ATP13A2 and related P-type transport ATPases in Parkinsons disease and other neurological disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience, 7*, 1-22.

Wang Z, Cuddy M, Samuel T, Welsh K, Schimmer A, Hanaii F, Houghten R, Pinilla C, Reed JC. (2004). Cellular, Biochemical, and Genetic Analysis of Mechanism of Small Molecule IAP Inhibitors. *The Journal of Biological Chemestry, 279*, 48168–48176.

Yan JQ, Yuan YH, Gao YN, Huang JY, Ma KL, Gao Y, Zhang WQ, Guo XF, Chen NH. (2014). Overexpression of human E46K mutant α-synuclein impairs macroautophagy via inactivation of JNK1-Bcl-2 pathway. *Mol Neurobiol., 50*, 685-701.

Yang X, Xu Y. (2014). Mutations in the ATP13A2 gene and Parkinsonism: a preliminary review. *Biomed. Res. Int*., 371256.

Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yebenes JG. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol., 55*, 164-173.

Zhang X, Xiong J, Liu S, Wang L, Huang J, Liu L, Yang J, Zhang G, Guo K, Zhang Z, Wu P, Wang D, Lin Z, Xiong N, Wang T. (2014). Puerarin protects dopaminergic neurons in Parkinsons disease models. *Neuroscience, 280*, 88-98.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AD	autosomal dominant
Ala	Alanin
ALDH	Alkoholdehydrogenase
ALP	*Autophagy-lysosomal-pathway*
Apaf	*apoptotic protease activating factor 1* (Apoptose-auslösender Faktor-1)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AR	autosomal rezessiv
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
° C	Grad Celsius
C	Cytosin
Casp	Caspase
C. elegans	Caenorhabditis elegans
Chr.	Chromosom
CMA	*chaperone-mediated-autophagy*
Cys	Cystein
Cyto-c	Cytochrom-c
D	Dalton
ddNTP	2 ´ , 3 ´ - Didesoxynukleosid - 5 ´ - triphosphat
del	Deletion
DMEM	*Dulbeccos Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2 ´ - Desoxynukleosid – 5 ´ - triphosphat
Dopa	Dopamin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOPD	*early-onset parkinsons diseases*

et al.	und andere
Ex	Exon
FADD	*Fas-Associated protein with Death Domain*
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gramm
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
Gln	Glutamin
h	Stunde(n)
het	heterozygot
HiDi Formamid	*highly deionized Formamide*
His	Histidin
ho	homozygot
HRM-Dye	*High-resolution-melting-Dye*
HRP	*Horse-raddish-peroxidase*
IAPs	*Inhibitors of apoptosis proteins*
k	kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
LC	LightCycler®480
LDH	Lactatdehydrogenase
µ	mikro- (10^{-6})
m	Meter
M	molar
min	Minute(n)
MOCA-*Score*	*Montreal Cognitive Assessment*
MP	Morbus Parkinson
ŋ	nano- (10^{-9})
n. a.	nicht angegeben
n. b.	nicht bekannt
o. g.	oben genannt
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Parkinsonsyndrom
q	langer Arm eines Chromosoms
rel.	relativ
RIPA	*Radioimmunoprecipitation assay*
rpm	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunde(n)
SDS	Natrium-Dodekylsulfat
Ser	Serin
Smac	*second mitochondria-derived activator of caspases*
SNP	*single nucleotide polymorphism* (Einzel-Nukleotid-Polymorphismus)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	*Tris-Borate*-EDTA Puffer
TBS	*Tris-Buffered-Saline*
TBST	*Tris-Buffered-Saline* + Tween-20
Temp.	Temperatur
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
UTR	*Untranslated Region* (untranslatierter Bereich)
V	Volt
Val	Valin
z. B.	Zum Beispiel
zw.	Zwischen

8.2. *Primer*-Tabellen

Tab. 15: *Primer* für das Gen *ATP13A2* zur kompletten Sequenzierung

Gen	Exon	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)	Größe [bp]	*Annealing*-Temp. [° C]	Zusätze
ATP13A2	1	F: CCA GCA CGC ACA GTC CCT AAC R: GCT GCG AGC GGC GGC GCC	624	64	0,75µl Betain
ATP13A2	2-3	F: AGC AAG AGG AGA AGG TGC CTC C R: GGT TGG CAC CCA AGC ATC CTC C	534	65	-
ATP13A2	4-5	F: CCT TGA TTT ATG CCT TCT CCA GC R: GCA CAG ATC ATG AAA CCG AGG	538	65	-
ATP13A2	6	F: CAG CAT AAG CAC ACT GCT TCT GG R: CAT GCC ATG CCA CCG TCT GTG C	206	65	-
ATP13A2	7-8	F: ATA GTC TCC AGC CTG CAC AGG G R: CTG GTT GCC ACC GTA AAG TGG	520	68	-
ATP13A2	9-11	F: GGG ATT GAC CAG GAG AAA G R: GAG GAA GGA AGC TGC AGG	702	60	0,75µl Betain
ATP13A2	12	F: CCT CTC TGA GCC TCA GTG TTC C R: GGC CCA ACT TCT GCT AAG ATG GG	518	67	-
ATP13A2	13-15	F: CTC CTC GGC ACC ATC TAC AGC ATC R: TAG ACA GGA CCT GGC ATC CTG TGG	539	68	-
ATP13A2	16	F: AGA GGG AAT CAC ATG TGC CAA GG R: ACA GGG TGG GAT TCG TTA G	437	60	0,75µl Betain
ATP13A2	17-19	F: :ACG TAT TCC AGG TCA CCC AAC AGC R: AAC CAG GGG GAC TCA GGG GC	705	68	-
ATP13A2	20	F: CCA AGG AAG ATG CCC TGC CTG G R: ATG GGT TCC TTG GAA GTC ACT CC	448	63	-
ATP13A2	21-23	F: GGC AGA CGG ATT TCA TCC AGC C R: GAG CTT GTC CGT TCG TCT GTT	764	65	-
ATP13A2	24-25	F: CCC AGC TGT CAT CAT ATT CTG CC R: CCC ACG TCA TCT ATT CTG GGA CC	524	65	-
ATP13A2	26-27	F: GGG CCT CTG CTA TCA GAC TAG G R: GTG CAC GCC AGT CTT CCA CTC G	651	57	-
ATP13A2	28-29	F: CGA GTG GAA GAC TGG CGT GCA C R: CTG TCT TGT ACC TGG CAC CAT	789	65	-

Tab. 16: *Primer* für das Gen *ATP13A2* am LC480®

Gen	Exon	Vorwärts-Primer (F)/ Rückwärts-Primer (R)	Größe [bp]	*Annealing*-Temp. [° C]	$MgCl_2$[µM]	Zusätze
ATP13A2	5.2	F: TGA CAG TCC CAG GCA GAG GA R: TGTGCAATGGGAGAGTCAGACTT	128	68	2,5	-
ATP13A2	11	F: TGA GCT CCT CTC CTG CCT G R: CAT CCA ACC CTT TGC CCT	219	69	2,5	-
ATP13A2	20	F: CCA AGG AAG ATG CCC TGC CTG G R: GGA GTG ACT TCC AAG GAA CCC AT	206	63	3,0	-

8.3. Ergebnistabellen

Tab. 17: Ergebnisse der spanischen Population für das Gen *ATP13A2*

Probe	Enthaltene SNPs
A1	rs56327781, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662
A2	rs2076604, rs2076603, rs9435659, rs3170740, rs3738815, rs7531163
A3	rs2076603, rs761421, rs9435662
A4	rs56327781, rs761421, rs9435659, rs3170740, rs3738815
A5	rs2076604, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662

Fortsetzung Tab. 17

Probe	Enthaltene SNPs
A6	rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662
A7	rs2076603, rs9435659, rs9435662, rs3170740, rs3738815
A8	rs2076603, rs761421, rs9435659
A9	rs2076603, rs9435662, rs3170740
B1	rs2076604, rs2076603, rs9435659, rs3170740, rs7531163
B2	rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662
B3	rs2076603, rs761421, rs9435662, rs7531163
B4	rs41273155, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs3170740
B5	rs2076604, rs7531164, rs2076603, rs761421, rs9435662
B6	rs56327781, rs2076603, rs9435662, rs3170740, rs3738815, rs7531163
B7	rs761421, rs9435659, rs9435662, rs3170740
B8	rs2076603, rs761421, rs9435662, rs3738815
C1	rs2076603, rs761421, rs9435659, rs3170740, rs3738815, rs7531163
C2	rs56327781, rs55885047, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662, rs7531163
C3	rs2076604, rs2076603, rs761421, rs9435659
C4	rs56327781, rs2076604, rs55885047, rs2076603, rs761421, rs3170740, rs3738815, rs7531163
C5	rs2076603, rs9435659, rs9435662, rs3738815
C6	rs2076604, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662, rs3170740
C7	rs761421, rs9435659, rs3170740
C8	rs761421, rs9435659, rs3738815, rs7531163
D1	rs2076604, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662
D2	rs41273155, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs3170740
D3	rs2076603, rs761421, rs9435662
D4	rs56367069, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662
D5	rs761421, rs9435662, rs3170740, rs3738815
D6	rs2076604, rs2076603, rs9435659, rs3170740, rs7531163
D7	rs2076603, rs761421, rs9435659
D8	rs2076603, rs761421, rs3170740, rs7531163
E1	rs2076603, rs9435659, rs9435662, rs3738815
E2	rs2076604, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662
E3	rs55885047, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs3170740
E4	rs2076604, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662, rs3170740
E5	rs56327781, rs41273155, rs2076603, rs761421, rs7531163
E6	rs56327781, rs2076603, rs761421, rs3170740, rs3738815
E7	rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662, rs3170740, rs3738815
E8	rs2076603, rs761421, rs9435659
F1	rs2076604, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662
F2	rs2076603, rs9435659, rs3170740
F3	rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662, rs7531163
F4	rs2076603, rs761421, rs9435662, rs3170740, rs3738815, rs7531163
F5	rs2076604, rs2076603 , rs761421, rs9435659, rs9435662, rs3170740
F6	rs2076603, rs9435659, rs3738815
F7	rs2076603, rs761421, rs3170740, rs7531163
F8	rs2076603, rs761421, rs9435659, rs3170740

Fortsetzung Tab. 17

Probe	Enthaltene SNPs
G1	rs2076604, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs3170740
G2	rs2076604, rs56367069, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662, rs3170740
G3	rs2076603, rs9435659, rs9435662, rs3170740, rs3738815, rs7531163
G4	rs56327781, rs2076604, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs3170740, rs3738815
G5	rs2076603, rs761421, rs3170740, rs7531163
G6	rs2076603, rs761421, rs9435659
G7	rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662
G8	rs2076603, rs761421, rs9435662, rs3170740, rs3738815
H1	rs41273157, rs2076603, rs9435659, rs3170740
H2	rs56327781, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs7531163
H3	rs2076604, rs7531164, rs761421, rs9435662, rs3170740
H4	rs55885047, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs3738815
H5	rs56327781, rs55885047, rs2076603, rs9435659, rs9435662, rs3170740, rs3738815
H6	rs2076603, rs761421, rs9435659
H7	rs2076603, rs761421, rs9435659, rs9435662, rs3170740
H8	rs2076603, rs761421, rs3170740, rs3738815, rs7531163

Tab. 18: Ergebnisse der Analyse für das Gen *ATP13A2* am LC. het = heterozygot, ho = homozygot. Darstellung der am LC ermittelten positiven Proben für die Exons und des tatsächlichen SNP nach Sequenzierung nach Sanger.

Probe	Durch LC detektiert in	SNP	Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-1032	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / ho rs2076604 / het	L-2465		
L-1059	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het	L-2466	Exon 20	rs2076604 / het
L-1060	Exon 20	rs2076604 / het	L-2467	Exon 20	rs2076604 / het
L-1061			L-2475	Exon 20	rs2076604 / het
L-1066	Exon 20		L-2481		
L-1067	Exon 20		L-2492	Exon 20	rs2076604 / het
L-1068			L-2493		
L-1069	Exon 20	rs2076604 / het	L-2496	Exon 20	rs2076604 / het
L-1070	Exon 20	rs2076604 / het	L-2497		
L-1079	Exon 20		L-2499		
L-1088	Exon 5.2 Exon 20		L-2500	Exon 20	rs2076604 / het
L-1090	Exon 20	rs2076604 / het	L-2512	Exon 20	rs2076604 / het
L-1091	Exon 20	rs2076604 / het	L-2513	Exon 20	rs2076604 / ho
L-1092	Exon 20		L-2514		
L-1093	Exon 20	rs2076604 / het	L-2517	Exon 20	rs2076604 / het
L-1094			L-2520		
L-1098	Exon 20	rs2076604 / het	L-2521		
L-1099	Exon 20		L-2528	Exon 20	rs2076604 / het
L-1100			L-2532	Exon 20	rs2076604 / ho
L-1101			L-2539		
L-1106	Exon 11	rs56290406 / ho	L-2540	Exon 20	
L-1107	Exon 20	rs2076604 / het	L-2541	Exon 20	rs2076604 / het
L-1108	Exon 5.2 Exon 20	rs2076604 / het	L-2542	Exon 20	rs2076604 / het
L-1109	Exon 20		L-2559	Exon 20	rs2076604 / ho
L-1121	Exon 20		L-2561		
L-1122	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / ho	L-2562	Exon 11	rs56290406 / het
L-1123			L-2568		
L-1127	Exon 20	rs2076604 / het	L-2571	Exon 20	rs2076604 / het
L-1128	Exon 5.2 Exon 20		L-2572		
L-1129			L-2576	Exon 20	
L-1130			L-2579	Exon 20	rs2076604 / het

Fortsetzung Tab. 18

Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-1131	Exon 20	rs2076604 / het
L-1132	Exon 20	rs2076604 / het
L-1133		
L-1134		
L-1135	Exon 20	rs2076604 / het
L-1136	Exon 20	
L-1137	Exon 20	
L-1140		
L-1141	Exon 20	
L-1145	Exon 20	rs2076604 / het
L-1149	Exon 20	rs2076604 / het
L-1150	Exon 20	
L-1151		
L-1152	Exon 11	rs56290406 / het
L-1153	Exon 20	rs2076604 / het
L-1154	Exon 20	rs2076604 / het
L-1155	Exon 5.2	
L-1156	Exon 20	
L-1157		
L-1158	Exon 20	rs2076604 / het
L-1162	Exon 5.2	
L-1164		
L-1165	Exon 20	
L-1166	Exon 20	rs2076604 / ho
L-1167		
L-1168	Exon 20	
L-1169		
L-1170	Exon 20	
L-1171	Exon 20	rs2076604 / het
L-1172	Exon 20	
L-1173	Exon 20	rs2076604 / het
L-1174	Exon 5.2 Exon 20	rs2076604 / het
L-1175		
L-1176	Exon 20	
L-1177	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het
L-1178	Exon 20	
L-1179		
L-1180		
L-1181		
L-1192	Exon 5.2	
L-1193	Exon 20	
L-1194	Exon 20	rs2076604 / het
L-1198		
L-1200		
L-1203	Exon 20	rs2076604 / het
L-1204		
L-1208		
L-1209	Exon 20	rs2076604 / het
L-1210	Exon 20	rs2076604 / het
L-1211	Exon 20	rs2076604 / het
L-1212	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / ho rs2076604 / het
L-1213	Exon 20	rs2076604 / ho
L-1214	Exon 20	rs2076604 / het
L-1215	Exon 20	rs2076604 / het
L-1216		
L-1217	Exon 20	rs2076604 / ho
L-1218	Exon 20	rs2076604 / het
L-1219	Exon 20	
L-1220		
L-1221		
L-1222		
L-1223		
L-1224	Exon 20	

Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-2580		
L-2581	Exon 20	rs2076604 / het
L-2583	Exon 20	
L-2586	Exon 20	rs2076604 / ho
L-2606	Exon 5.2	
L-2616	Exon 20	
L-2617		
L-2622	Exon 20	rs2076604 / het
L-2623	Exon 20	
L-2635	Exon 5.2 Exon 20	
L-2637	Exon 20	rs2076604 / het
L-2638		
L-2639	Exon 20	
L-2640		
L-2641	Exon 20	rs2076604 / het
L-2645		
L-2648	Exon 20	rs2076604 / het
L-265	Exon 20	rs2076604 / het
L-2652	Exon 20	rs2076604 / het
L-2653		
L-2662	Exon 20	rs2076604 / het
L-2663	Exon 20	
L-2664	Exon 20	
L-2666	Exon 20	
L-2672	Exon 20	rs2076604 / het
L-2677		
L-2681	Exon 20	rs2076604 / het
L-2696	Exon 11	rs56290406 / het
L-2703	Exon 20	rs2076604 / het
L-2704		
L-2716	Exon 20	rs2076604 / het
L-2761		
L-272	Exon 20	
L-2726	Exon 20	
L-273	Exon 20	rs2076604 / het
L-2779	Exon 20	rs2076604 / het
L-2780	Exon 20	rs2076604 / het
L-2796		
L-2797		
L-280	Exon 20	
L-2804	Exon 20	
L-2805		
L-2806		
L-2807		
L-2833	Exon 20	
L-2835	Exon 5.2 Exon 20	
L-2836		
L-2837	Exon 20	rs2076604 / het
L-2841	Exon 20	rs2076604 / het
L-2842	Exon 20	rs2076604 / het
L-2848		
L-2849	Exon 20	rs2076604 / het
L-2864	Exon 5.2	
L-2866	Exon 20	
L-2867		
L-2868	Exon 11	rs56290406 / het
L-2869	Exon 20	
L-2875	Exon 20	
L-2877	Exon 20	
L-2882	Exon 11	rs56290406 / het
L-2885	Exon 20	rs2076604 / het
L-2890	Exon 20	rs2076604 / het
L-2892		

Fortsetzung Tab. 18

Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-1225	Exon 20	
L-1226	Exon 20	
L-1227	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het rs2076604 / het
L-1228	Exon 20	
L-1229		
L-1230	Exon 20	rs2076604 / het
L-1231	Exon 20	rs2076604 / het
L-1235	Exon 11	rs56290406 / ho
L-1236	Exon 20	
L-1237		
L-1238	Exon 20	rs2076604 / het
L-1239		
L-1242		
L-1244	Exon 20	rs2076604 / ho
L-1245		
L-1246	Exon 20	rs2076604 / het
L-1251	Exon 20	
L-1252	Exon 20	rs2076604 / het
L-1253		
L-1254		
L-1255	Exon 20	
L-1256		
L-1257		
L-1258	Exon 20	rs2076604 / het
L-1263		
L-1264	Exon 20	rs2076604 / het
L-1266	Exon 20	
L-1267	Exon 5.2 Exon 20	rs2076604 / het
L-1268	Exon 20	rs2076604 / het
L-1269		
L-127	Exon 20	
L-1270	Exon 20	rs2076604 / het
L-1271	Exon 11	rs56290406 / het
L-1273		
L-128	Exon 20	rs2076604 / het
L-1289	Exon 20	rs2076604 / het
L-1290	Exon 20	rs2076604 / het
L-1291		
L-1292	Exon 20	rs2076604 / ho
L-1293		
L-1301	Exon 20	rs2076604 / het
L-1316		
L-1318		
L-1321	Exon 5.2	
L-1324		
L-1325	Exon 20	rs2076604 / het
L-1340	Exon 20	rs2076604 / het
L-1341	Exon 20	
L-1343	Exon 20	rs2076604 / het
L-1345		
L-1349		
L-1354		
L-1355	Exon 20	rs2076604 / ho
L-1356	Exon 11	rs56290406 / ho
L-1357	Exon 5.2 Exon 20	rs2076604 / het
L-1358	Exon 20	rs2076604 / het
L-1367	Exon 20	rs2076604 / het
L-1368		
L-1369		
L-1370	Exon 20	rs2076604 / het

Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-2893		
L-2895	Exon 20	
L-2898	Exon 20	rs2076604 / het
L-2899	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het
L-2904		
L-295	Exon 20	
L-3009	Exon 20	rs2076604 / het
L-3010		
L-3020	Exon 5.2	
L-3028		
L-3029		
L-303	Exon 20	
L-3030		
L-3032		
L-3037		
L-3038		
L-3039		
L-3040		
L-3041		
L-3046		
L-3047		
L-3049		
L-305	Exon 5.2	
L-306		
L-3072	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het rs2076604 / het
L-3073	Exon 20	rs2076604 / ho
L-3074	Exon 20	rs2076604 / het
L-3075	Exon 20	rs2076604 / ho
L-3076		
L-3078		
L-3083	Exon 20	rs2076604 / het
L-3099		
L-3108		
L-3112		
L-3196	Exon 20	rs2076604 / het
L-3199	Exon 20	rs2076604 / het
L-3201	Exon 20	rs2076604 / het
L-3207		
L-3222		
L-323	Exon 11	rs56290406 / het
L-3239	Exon 20	
L-324	Exon 11	rs56290406 / het
L-3240	Exon 20	
L-3242		
L-3245	Exon 20	rs2076604 / het
L-3250	Exon 20	rs2076604 / het
L-3258		
L-3259		
L-3260		
L-3261		
L-3262		
L-3265	Exon 20	rs2076604 / het
L-3271	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het rs2076604 / het
L-3272	Exon 5.2 Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het rs2076604 / het
L-3273	Exon 5.2	
L-3277	Exon 20	rs2076604 / het
L-3280	Exon 20	rs2076604 / het
L-3296		
L-3301	Exon 20	rs2076604 / het
L-3302	Exon 20	rs2076604 / het

Fortsetzung Tab. 18

Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-1371	Exon 20	
L-138	Exon 20	
L-1382	Exon 20	rs2076604 / het
L-1385	Exon 20	
L-1404	Exon 20	rs2076604 / het
L-1407	Exon 5.2 Exon 20	
L-1408	Exon 20	
L-1419	Exon 20	rs2076604 / het
L-1435		
L-144		
L-1444		
L-1447		
L-1451	Exon 20	rs2076604 / het
L-1454	Exon 20	
L-1456		
L-146		
L-148	Exon 20	rs2076604 / het
L-1517	Exon 20	rs2076604 / het
L-1520	Exon 20	
L-1521		
L-1522		
L-1523	Exon 20	rs2076604 / het
L-1524	Exon 20	rs2076604 / het
L-1525		
L-1537		
L-1541	Exon 20	rs2076604 / het
L-1543	Exon 20	
L-1545	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het
L-1546	Exon 20	rs2076604 / het
L-1549	Exon 20	
L-1550		
L-1551		
L-1562	Exon 20	rs2076604 / het
L-1613		
L-1661		
L-1700	Exon 20	
L-1701		
L-1702	Exon 20	
L-1703	Exon 20	rs2076604 / ho
L-1704		
L-1706	Exon 20	rs2076604 / het
L-1707	Exon 20	rs2076604 / het
L-1711	Exon 20	rs2076604 / het
L-1712		
L-1765	Exon 20	rs2076604 / het
L-1787	Exon 5.2 Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het rs2076604 / het
L-1788	Exon 20	
L-1813		
L-1814	Exon 20	
L-1826	Exon 20	
L-1848	Exon 20	
L-1854	Exon 20	
L-1874	Exon 20	rs2076604 / het
L-1887	Exon 20	rs2076604 / het
L-1888	Exon 20	rs2076604 / het
L-1894	Exon 20	rs2076604 / het
L-1899		
L-1900		
L-1901	Exon 20	rs2076604 / het

Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-3304	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het rs2076604 / het
L-3305	Exon 20	
L-3306	Exon 20	rs2076604 / het
L-3307	Exon 5.2 Exon 11 Exon 20	 rs56290406 / ho rs2076604 / het
L-3308	Exon 5.2	
L-3309		
L-3310	Exon 20	rs2076604 / het
L-3311	Exon 5.2 Exon 20	 rs2076604 / het
L-3312		
L-3313		
L-3320		
L-3323	Exon 20	rs2076604 / het
L-3324		
L-3325		
L-3331		
L-3332	Exon 20	
L-3366		
L-3371		
L-3378		
L-3381		
L-3386		
L-3391		
L-3392		
L-3393		
L-339		
L-340	Exon 20	
L-3447		
L-345	Exon 20	rs2076604 / het
L-3454		
L-3455		
L-3456		
L-349	Exon 20	rs2076604 / het
L-3499		
L-3452		
L-3453		
L-3464		
L-351	Exon 20	rs2076604 / ho
L-353	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het
L-355	Exon 20	rs2076604 / het
L-356	Exon 20	rs2076604 / het
L-359		
L-361	Exon 20	rs2076604 / het
L-362		
L-3655		
L-3658		
L-3664		
L-3666		
L-3672		
L-3675		
L-3676		
L-3681		
L-3682		
L-3683		
L-3684		
L-3698		
L-3712		
L-3713		
L-3714		
L-3715		

Fortsetzung Tab. 18

Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-1902		
L-1903	Exon 20	rs2076604 / het
L-1904		
L-1905		
L-1914	Exon 20	
L-1915	Exon 5.2	
L-1921	Exon 20	rs2076604 / het
L-1929	Exon 5.2 Exon 11 Exon 20	 rs56290406 / het rs2076604 / het
L-1936	Exon 20	
L-1937	Exon 20	
L-1943	Exon 20	
L-1944	Exon 20	
L-1945	Exon 20	
L-1955	Exon 5.2	
L-1957	Exon 20	rs2076604 / het
L-1958	Exon 20	rs2076604 / het
L-1959	Exon 20	rs2076604 / het
L-1966		
L-1980		
L-1988	Exon 20	rs2076604 / het
L-1997	Exon 20	
L-2001	Exon 20	
L-2002		
L-2008	Exon 5.2 Exon 20	
L-2035	Exon 5.2 Exon 20	 rs2076604 / het
L-2036		
L-2061		
L-2099	Exon 20	rs2076604 / het
L-210	Exon 5.2 Exon 20	
L-2105		
L-2108	Exon 20	rs2076604 / het
L-2109		
L-2145	Exon 20	rs2076604 / het
L-2146	Exon 20	rs2076604 / het
L-2147		
L-2156		
L-2157	Exon 20	rs2076604 / het
L-2158	Exon 20	
L-2159		
L-2160	Exon 20	rs2076604 / het
L-2165	Exon 20	rs2076604 / het
L-2166		
L-2167		
L-2195	Exon 20	
L-2197	Exon 20	rs2076604 / het
L-2198		
L-2199	Exon 20	rs2076604 / het
L-220	Exon 20	rs2076604 / het
L-2200		
L-2203	Exon 20	rs2076604 / het
L-2204		
L-2205	Exon 11	rs56290406 / het
L-2208		
L-2210	Exon 20	rs2076604 / het
L-2212	Exon 20	
L-2224		
L-2226	Exon 20	
L-2228		
L-2233	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het
L-2234		
L-2237		

Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-3716		
L-373	Exon 20	
L-377		
L-3796	Exon 20	rs2076604 / het
L-382		
L-383		
L-384	Exon 20	
L-385		
L-3852		
L-3856		
L-3857		
L-389	Exon 20	
L-392		
L-393		
L-395		
L-396	Exon 11	rs56290406 / ho
L-397	Exon 20	rs2076604 / ho
L-398	Exon 20	
L-402		
L-4023		
L-4028		
L-4029		
L-4031		
L-4035		
L-4037		
L-4039		
L-4040		
L-4043		
L-409		
L-417	Exon 20	rs2076604 / het
L-4182		
L-419		
L-423	Exon 20	
L-424	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het rs2076604 / het
L-425	Exon 20	rs2076604 / het
L-4301		
L-4302		
L-490	Exon 20	rs2076604 / het
L-503		
L-504		
L-510	Exon 20	rs2076604 / het
L-512	Exon 20	rs2076604 / het
L-513	Exon 20	rs2076604 / het
L-514		
L-515	Exon 20	
L-517		
L-530	Exon 20	rs2076604 / het
L-544	Exon 5.2	
L-558	Exon 20	
L-560	Exon 20	
L-561		
L-563		
L-564		
L-581		
L-583		
L-584	Exon 20	rs2076604 / het
L-585		
L-587		
L-589	Exon 5.2 Exon 20	 rs2076604 / het
L-600	Exon 20	
L-601	Exon 20	rs2076604 / het

Fortsetzung Tab. 18

Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-2238	Exon 20	rs2076604 / het
L-2239		
L-2247	Exon 20	rs2076604 / het
L-2251		
L-2254		
L-2258	Exon 20	rs2076604 / het
L-2259		
L-2260	Exon 20	rs2076604 / ho
L-228		
L-231	Exon 5.2 Exon 20	
L-2389	Exon 11	rs56290406 / het
L-2390	Exon 20	
L-2391		
L-2392		
L-2393	Exon 20	rs2076604 / het
L-2396	Exon 20	rs2076604 / het
L-2398	Exon 11	rs56290406 / het
L-2405	Exon 11	rs56290406/ het
L-2431	Exon 20	
L-2438		
L-2439		
L-2440		
L-2441	Exon 20	rs2076604 / het
L-2442		
L-2443	Exon 5.2 Exon 20	
L-2444		
L-2445		
L-2455		
L-2456		
L-2457		
L-2458	Exon 5.2 Exon 20	rs2076604 / het
L-2459		
L-246		
L-2460	Exon 11	rs56290406 / het
L-2461	Exon 20	rs2076604 / ho
L-2462		
L-2463	Exon 20	

Probe	Durch LC detektiert in	SNP
L-608		
L-611	Exon 20	rs2076604 / het
L-616		
L-642		
L-644		
L-649	Exon 20	rs2076604 / het
L-650		
L-653		
L-662		
L-736	Exon 5.2 Exon 20	
L-747	Exon 11 Exon 20	rs56290406 / het
L-804	Exon 20	
L-811		
L-852	Exon 20	rs2076604 / het
L-853	Exon 11	rs56290406 / het
L-855		
L-856		
L-860	Exon 11	rs56290406 / het
L-861	Exon 20	
L-864	Exon 20	
L-865	Exon 20	
L-866	Exon 5.2 Exon 20	
L-868	Exon 20	rs2076604 / het
L-869		
L-870	Exon 20	rs2076604 / ho
L-871		
L-872	Exon 5.2 Exon 20	rs2076604 / het
L-873		
L-874	Exon 5.2	
L-908		
L-913		
L-927	Exon 20	rs2076604 / het
L-944	Exon 5.2	
L-945	Exon 20	
L-957		
L-961	Exon 20	
L-962		

Tab. 19: Ergebnisse der Sequenzierung nach Sanger für das Gen *ATP13A2*, unbekannte Mutationen sind hervorgehoben.

Probe	Enthaltene SNPs
L-1193	**c.1487C>G**, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs3170740
L-1231	rs2076604, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs3170740
L-1263	rs56047197, rs56327781, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs55885047, rs7531163, rs9435659, rs3170740
L-1357	rs56047197, rs9435736, rs55682704, rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-1370	rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-1385	rs56047197, rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659
L-1404	rs9435736, rs2076604, rs3738815, rs7531163
L-1435	
L-1451	rs9435736, rs55682704, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs3170740
L-1522	
L-1551	rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-1613	rs56047197, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-1661	rs56047197, rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-1700	rs2076603
L-1706	rs9435736, rs55682704, rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740

Fortsetzung Tab. 19

Probe	Enthaltene SNPs
L-1787	rs56047197, rs41273155, rs56290406, rs9435736, rs55682704, rs2076604, rs3738815, rs7531163
L-1826	rs2076603, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-1899	rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-1900	rs2076603, rs114407349, rs761421, rs2076605, rs3170740
L-1901	rs56327781, rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs2076605, rs3170740
L-1929	rs56047197, rs41273155, rs56290406, rs9435736, rs55682704, rs2076603, rs2076604, rs3738815, rs7531163
L-1988	rs9435736, rs114407349, rs761421, rs2076605, rs3170740
L-2002	rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs2076605, rs3170740
L-2008	rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-2035	rs56047197, rs9435736, rs55682704, rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-2147	rs56047197, rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-2696	rs56047197, rs41273155, rs56290406, rs9435736, rs2076603
L-2836	rs56047197
L-2885	rs2076603, rs2076604, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3010	rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs2076605, rs3170740
L-3028	rs56047197, rs9435736, rs2076603, rs7531163
L-3029	rs9435736, rs2076603, rs761421, **c.3174T>C**, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-303	rs2076603
L-3030	rs9435736, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs2076605, **c.3532C>T**, rs3170740
L-3032	rs9435736, rs2076604, rs7531163
L-3037	rs9435736, **g.24939C>T**, rs761421, rs3170740
L-3038	rs2076603, rs2076604
L-3039	rs9435736, rs55682704, rs2076604, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3040	rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3041	rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3046	rs9435736, rs55682704, rs2076604, rs7531163
L-3047	rs56047197, rs56290406, rs9435736, rs761421, rs9435659, rs3170740
L-3049	rs9435736, rs55682704, rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs3170740
L-305	rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-306	rs9435736, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3075	rs56047197, rs9435736, rs55682704, rs2076603, rs2076604
L-3076	rs56047197, rs9435736, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3078	rs56047197, rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3222	rs56047197, rs9435736, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3262	rs9435736, rs55682704, rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3272	rs56290406, rs2076603, rs2076604, rs3738815
L-3296	rs56047197, rs2076603, rs2076604, rs3738815, rs2076605, rs3170740
L-3301	rs56327781, rs9435736, rs55682704, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs3170740
L-3305	rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs2076605, rs3170740
L-3310	rs2076603, rs2076604, rs7531163
L-3312	rs56047197, rs9435736, rs55682704, rs2076603, rs2076604, rs3738815
L-3331	rs56047197, rs9435736, rs56351817, rs2076603, rs55885047, rs56146840
L-3366	rs9435736, rs2076603, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3378	rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-339	rs9435736, rs2076603, **g.24939C>T**, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3391	rs9435736, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-340	rs56047197, rs9435736, rs2076603, rs7531163
L-356	rs56047197, rs9435736, rs55682704, rs2076604, rs7531163
L-359	rs56047197, rs9435736, rs3738815, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3655	rs56047197, rs2076604, rs3738815
L-3658	rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3664	rs2076603, rs3738815, rs7531163
L-3666	rs2076603, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3672	rs56047197, rs114407349, rs761421, rs55885047, rs9435659, rs56146840, rs2076605, rs3170740
L-3675	rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-3683	rs9435736, rs2076603, rs2076604, rs3738815 , rs7531163
L-3698	rs9435736, rs55682704, rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-377	rs56047197, rs56290406, rs114407349, rs761421, rs7531163, rs9435659
L-382	rs56047197, rs2076603, rs3738815
L-393	rs2076603, rs2076605, rs3170740
L-396	rs56290406, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-4023	rs140087527, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-4029	rs56047197, rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-4035	rs9435736, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs3170740

Fortsetzung Tab. 19

Probe	Enthaltene SNPs
L-503	rs56290406, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-513	rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs3170740
L-517	rs2076603, rs114407349, rs761421, rs55885047, rs9435659, , rs56146840, rs2076605, rs3170740
L-561	rs56047197, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-563	rs56047197, rs2076603, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-564	rs56047197, rs114407349, rs3170740
L-587	rs56047197, rs2076603, rs114407349, rs2076605, rs3170740
L-589	rs56047197, rs9435736, rs55682704, rs2076603, rs2076604, rs114407349, rs3738815, rs761421, rs7531163, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-616	rs56047197, c.322A>G, rs56327781, rs9435736, rs114407349, rs761421, rs9435659, rs2076605, rs3170740
L-644	rs114407349, rs761421, rs55885047, rs9435659, rs56146840
L-865	rs56047197, rs2076603, rs55885047, rs3170740
L-866	rs2076603, rs114407349, rs2076605
L-869	rs2076603, rs7531163
L-872	rs56047197, rs2076603, rs2076604, rs3738815, rs7531163, rs3170740
L-874	rs56047197, rs114407349, rs3170740

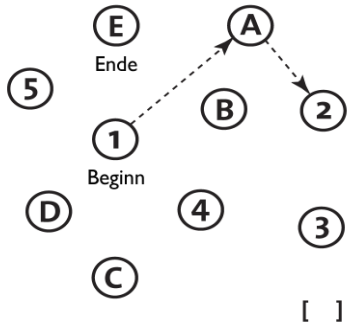
8.4. MOCA-*Score*

Abb. 35: MOCA-*Score* zur klinischen Diagnostik einer Demenz

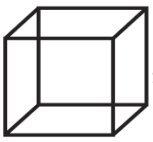
MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)

NAME :
Ausbildung : Geburtsdatum :
Geschlecht : DATUM :

VISUOSPATIAL / EXEKUTIV — PUNKTE



[ ] [ ]



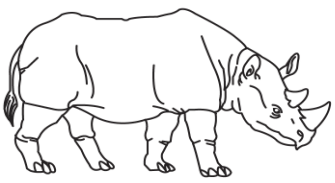
Würfel nachzeichnen

Eine Uhr zeichnen (Zehn nach elf) (3 Punkte)

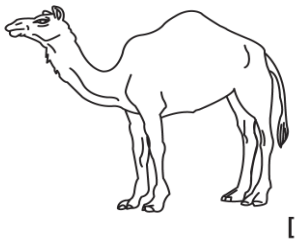
[ ] Kontur [ ] Zahlen [ ] Zeiger ___/5

BENENNEN

[ ]



[ ]



[ ] ___/3

GEDÄCHTNIS

Wortliste vorlesen, wiederholen lassen.
2 Durchgänge. Nach 5 Minuten überprüfen (s.u.)

	GESICHT	SAMT	KIRCHE	TULPE	ROT
1.Versuch					
2.Versuch					

Keine Punkte

AUFMERKSAMKEIT Zahlenliste vorlesen (1 Zahl/ Sek.)

In der vorgegebenen Reihenfolge wiederholen [ ] 2 1 8 5 4
Rückwärts wiederholen [ ] 7 4 2 ___/2

Buchstabenliste vorlesen (1 Buchst./Sek.). Patient soll bei jedem Buchstaben „A" mit der Hand klopfen. Keine Punkte bei 2 oder mehr Fehlern
[ ] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B ___/1

Fortlaufendes Abziehen von 7 , mit 100 anfangen [ ] 93 [ ] 86 [ ] 79 [ ] 72 [ ] 65
4 oder 5 korrekte Ergebnisse: **3 P.**, 2 oder 3 korrekt: **2 P.**, 1 korrekt: **1 P.**, 0 korrekt: **0 P.** ___/3

SPRACHE **Wiederholen:** „Ich weiß lediglich, dass Hans heute an der Reihe ist zu helfen." [ ]
„Die Katze versteckte sich immer unter der Couch, wenn die Hunde im Zimmer waren." [ ] ___/2

Möglichst viele Wörter in einer Minute benennen, die mit dem Buchstaben F beginnen [ ] _____ (N ≥ 11 Wörter) ___/1

ABSTRAKTION Gemeinsamkeit von z.B. Banane und Apfelsine = Frucht [ ] Eisenbahn - Fahrrad [ ] Uhr - Lineal ___/2

ERINNERUNG

	Worte erinnern OHNE HINWEIS	GESICHT [ ]	SAMT [ ]	KIRCHE [ ]	TULPE [ ]	ROT [ ]
Optional	Hinweis zu Kategorie					
	Mehrfachauswahl					

Punkte nur bei richtigem Nennen OHNE Hinweis ___/5

ORIENTIERUNG [ ] Datum [ ] Monat [ ] Jahr [ ] Wochentag [ ] Ort [ ] Stadt ___/6

© **Z Nasreddine MD** Version 7. Nov. 2004 deutsche Übersetzung: **SM Bartusch, SG Zipper**

www.mocatest.org Untersucher: _____

Normal ≥ 26 / 30

TOTAL ___/30
+ 1 Punkt wenn ≤ 12 Jahre Ausbildung

8.5. Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
An erster Stelle danke ich Frau Prof. Christine Klein für die interessanten Themen und die Arbeitsmittel. Mit ausdauerndem Engagement, Verständnis und guten Ratschlägen hat sie mich während der Zeit der Laborarbeit und der Schreibphase begleitet.
Ebenso gilt mein Dank Dr. Slobodanka Orolicki, die mir während der Experimente mit Rat und Tat zur Seite stand und den Erfolg dieser Arbeit nie in Frage gestellt hat.
Ebenfalls danke ich der Arbeitsgruppe des Instituts für Neurogenetik. Dr. Katja Lohmann, Dr. Aleksandar Raković, Dr. Anne Grünewald, Dr. Alfredo Ramirez, Dr. Maike Kasten und Dr. Ana Westernberger haben mich immer wieder motiviert und wussten für jedes Problem eine Lösung. Auch bin ich Sylwia Dankert, Thora Lohnau, Karin Wiegers, Heike Pawlak, Bianca Räsenhöft und Susen Winkler für ihre technische Unterstützung und eine großartige Arbeitsatmosphäre im Labor dankbar.
Ein ganz großes Dankeschön geht an die Patienten, die sich zur Teilnahme an Forschungsarbeiten bereit erklärt haben.
Die Unterstützung meiner Familie hinsichtlich der Motivation und Ausdauer ihrerseits hat einen großen Teil zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Vor allem danke ich meinen Eltern, dass sie mich bis hier hin unterstützt haben und mir eine solche Ausbildung ermöglicht haben.
Ein weiteres Dankeschön geht an all meine Freunde, insbesondere Fabian Kleina, die viel Verständnis gezeigt haben und mich auch durch Ablenkungen auf neue Ideen gebracht haben.

8.6. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere, dass ich nicht vorher oder gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder die Dissertation vorgelegt habe und dass ich mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen habe.

Ich bestätige, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt wurden.

Lübeck, den

_____

Martha Pierstorff

Rudolf-Groth-Str. 23
23566 Lübeck
Email: martha.pierstorff@uksh.de
Tel: 0173-5463327
Matrikel-Nummer: 578480

9. Lebenslauf

Name:	Martha Pierstorff
Geburt:	17.02.1986 in Neuss
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

08/1992 - 07/1996	Gebrüder-Grimm-Grundschule Wevelinghoven
08/1996 - 06/2005	Erzbischöfliches Gymnasium Marienberg Neuss

Abschluss: Abitur, Note: 2,1

Studium

09/2005-07/2007	Humanmedizin an der Universität Pécs (Ungarn)
04/2008-12/2012	Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

Berufserfahrung

Praktisches Jahr:

08/2011-12/2011	Neurochirurgie/ Universitätsklinikum Lübeck
12/2011-03/2012	Innere Medizin/ Sana Kliniken Lübeck
03/2012-07/2012	Allgemeinchirurgie/ DRK Krankenhaus Ratzeburg

Seit 04/2013	Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Neurochirurgie/ Universitätsklinikum Lübeck

Promotion

Seit 02/2009	Institut für Neurogenetik, Universität zu Lübeck