

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt Neurodegenerative
Erkrankungen

**Die Bedeutung von *Miro1/RHOT1* als Kandidatengen für
eine gestörte mitochondriale Funktion und Dynamik bei
der Parkinson-Krankheit**

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

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

vorgelegt von

Scheibner, David

2019

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Krüger

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Grundmann-Hauser

Tag der Disputation: 17.10.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung:	6
1.1. Idiopathisches Parkinson Syndrom (IPS) / Parkinson-Krankheit (PK)...	7
1.1.1. Epidemiologie	7
1.1.2. Klinik	8
1.1.3. Diagnostik.....	9
1.1.4. Therapie	10
1.2. Pathophysiologie des Parkinson-Syndroms	10
1.3. Ursachen des Parkinson-Syndroms	11
1.4. Die Rolle der Mitochondrien beim Parkinson-Syndrom	13
1.5. Miro1/RHOT1	15
1.6. Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Geräte	21
2.2. Verbrauchsmaterial	21
2.3. Oligonukleotide / Primer	21
2.4. DNA-Proben	25
2.4.1. DNA-Proben von Parkinson-Patienten	25
2.4.2. Kontroll-Proben von gesunden Probanden	25
2.5. Methoden	26
2.5.1. <i>Polymerase Chain Reaktion (PCR)</i>	26
2.5.2. Gelelektrophorese	29
2.5.3. <i>High Resolution Melting Analysis (HRMA)</i>	30
2.5.4. DNA-Sequenzierung nach Sanger.....	37
2.5.5. Restriktionsenzymverdau	38

2.5.6.	SNaPshot® (Applied Biosystems)	40
2.5.7.	MutationTaster.....	43
3.	Ergebnisse.....	44
3.1	Varianten/SNPs im intronischen Bereich.....	45
3.1.1	17: 32208329A>G (rs377468429) 20bp <i>upstream</i> von Exon 18... 45	
3.1.2	17:32175936G>A (rs8076276) 26bp <i>downstream</i> von Exon 5..... 46	
3.1.3	17:32175938T>C (rs763188874) 24bp <i>downstream</i> von Exon 5 . 47	
3.2	Varianten/SNPs im Exon ohne Einfluss auf die Aminosäuresequenz (Synonymous Coding).....	48
3.2.1	c.1125G>A (rs114899192) im Exon 14.....	48
3.2.2	c.1104C>T (rs767800498) im Exon 14	49
3.2.3	c.1458A>G (rs16967164) in Exon 17	51
3.2.4	c.2031A>G (rs58010811) in Exon 21	53
3.3	Varianten im Exon mit Veränderung der Aminosäuresequenz (<i>Missense</i> Varianten)	55
3.3.1	Mutation R272Q im Exon 11	55
3.3.2	Mutation R450C im Exon 16	59
3.3.3	Mutation F676V im Exon 21	65
4.	Diskussion	69
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturverzeichnis.....	81
7.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	92
8.	Veröffentlichungen.....	93
9.	Danksagung.....	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems™
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBD	kortikobasale Degeneration
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DLK	Demenz vom Lewy-Körper-Typ
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Exo I	Exonuklease I
ggf.	gegeben falls
GWAS	Genomewide association study
HPLC	High performance liquid chromatography
HRM	High Resolution Melting
HRMA	High Resolution Melting Analysis
IPS	Idiopathisches Parkinson Syndrom
LC 480	LightCycler® 480
MAF	Minor allele frequency
MAO	Monoaminoxidase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mind.	Mindestens
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MSA	Multisystematrophie
Mt	Mutante
NEB	New England Biolabs
NGS	Next-generation sequencing
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PS	Parkinson-Syndrom
PK	Parkinson Krankheit
PSP	Progressive supranukleäre Blickparese
REM	Rapid Eye Movement
REN	Restriktionsendonukleasen
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SNP	Single Nukleotid Polymorphism
SPECT	Single photon emission computed tomography
T _m	Annealing temperature
T _m	Melting temperature
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
v.a.	vor allem
Wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

1. Einleitung:

Die Parkinson-Krankheit (PK) ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen des Menschen. Nach der aktuellen S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016) werden Parkinson-Syndrome (PS) definiert durch das obligate Vorliegen einer Akinese und mindestens eines der folgenden Kardinalsymptome: Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität. Zudem gibt es eine Reihe fakultativer Begleitsymptome wie sensorische Symptome, vegetative Symptome, psychische Symptome, Schlafstörungen und kognitive Symptome ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016; Schwarz und Storch, 2007, p. 28).

Parkinson-Syndrome werden in der aktuellen S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie in vier Gruppen unterteilt:

Tabelle 1: Einteilung der Parkinson-Syndrome nach der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016)

<p>1. Idiopathisches Parkinson-Syndrom/Parkinson-Krankheit (IPS/PK)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Akinetisch-rigider Typ - Äquivalenz-Typ - Tremordominanz-Typ
<p>2. Monogenetische Formen des Parkinson-Syndroms</p>
<p>3. atypische Parkinson Syndrome</p> <ul style="list-style-type: none"> - Multisystematrophie (MSA), Demenz vom Lewy-Körper-Typ (DLK), Progressive supranukleäre Blickparese (PSP), Kortikobasale Degeneration (CBD)
<p>4. sekundäre Parkinson-Syndrome</p> <ul style="list-style-type: none"> - z.B. medikamenteninduziert, entzündlich, metabolisch, tumorbedingt, toxininduziert, traumatisch

Zudem können die Parkinson-Syndrome auch nach histopathologischen Kriterien in Synukleinopathien (IPS, MSA, DLK) und Tauopathien (PSP, CBD) eingeteilt werden ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016).

Die PK-Patienten werden klinisch zudem nach dem Alter bei Beginn der Erkrankung (*onset*) eingeteilt (Krüger et al., 2017). Hierbei werden juvenile, frühe und spät beginnende, typische Formen unterschieden. Bei der juvenilen Form (*juvenile-onset PK*) kommt es vor dem 20. Lebensjahr zum Beginn der Erkrankung. Bei der frühen Form (*early-onset PK*) liegt der Erkrankungsbeginn vor dem 40. bzw. 45. Lebensjahr und bei einem Erkrankungsbeginn nach dem

40. bzw. 45. Lebensjahr spricht man von einer typischen Form (*normal-onset PK*) (Krüger et al., 2017).

1.1. Idiopathisches Parkinson Syndrom (IPS) / Parkinson-Krankheit (PK)

Das IPS ist mit ca. 75% die häufigste Form des PS ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016). Die klassische Symptomatik besteht aus den drei Leitsymptomen Ruhetremor, Rigor und Bradykinese (Jankovic, 2008; Schwarz und Storch, 2007). Zum Beginn der Erkrankung sind nicht immer alle drei Leitsymptome ausgeprägt. Zur Diagnosestellung ist daher mindestens eine Akinese/Bradykinese und ein weiteres Kardinalsymptom (Rigor, Ruhetremor oder posturale Instabilität) notwendig (Schwarz und Storch, 2007). Typisch für ein IPS ist die initiale Einseitigkeit (Halbseitenbetonung) und im späteren Verlauf weiter bestehende Asymmetrie der motorischen Symptomatik (Schwarz und Storch, 2007, p. 52). Im Verlauf nehmen die motorischen Symptome in der Regel kontinuierlich zu. Zudem werden teilweise vor der Diagnosestellung oder erst im weiteren Verlauf nicht-motorische Begleitsymptome beobachtet. Hierbei handelt es sich u.a. um Depression, Schlafstörungen, Obstipation oder Hyposmie (Krüger et al., 2017; O'Sullivan et al., 2008; Schwarz und Storch, 2007). Je nach Ausprägung der klinischen Leitsymptome kann das IPS in drei Subtypen unterteilt werden: Tremordominanz-Typ, akinetisch-rigider Typ und Äquivalenztyp (Schwarz und Storch, 2007, p. 52).

1.1.1. Epidemiologie

Die *Prävalenz* (Häufigkeit einer Erkrankung zu einem bestimmten Zeitpunkt) des IPS liegt bei etwa 0,1-0,3% und die *Inzidenz* (Zahl der Neuerkrankungen in einem bestimmten Zeitraum) bei 11 bis 19 /100 000 Einwohner pro Jahr ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016; Lindgren et al., 2005). Inzidenz sowie Prävalenz nehmen mit steigendem Alter zu (Lindgren et al., 2005). In westlichen Populationen sind Männer deutlich häufiger als Frauen von der Erkrankung betroffen (Faktor ~1,46) ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016). Schätzungen zufolge wird sich im Vergleich zu 2015 bis 2040 die Anzahl der Erkrankten, u.a. durch die steigende Lebenserwartung, auf etwa 14 Millionen Menschen weltweit verdoppeln (Dorsey et al., 2007; Dorsey und Bloem, 2018).

1.1.2. Klinik

Motorische Symptome

Bradykinese ist eine Verlangsamung der Bewegungsgeschwindigkeit und Erschwerung bzw. Verzögerung der Initiierung von Willkürbewegungen („DGN S3-Leitlinie IPS,“ 2016). In der klinischen Untersuchung zeigen sich hierdurch u.a. ein kleinschrittiges Gangbild, eine Dysarthrophonie und eine reduzierte Mimik.

Der klassische Parkinsontremor ist ein Ruhetremor mit einer Frequenz von ca. 4–6 Hz (Schwarz und Storch, 2007, p. 50). Bei Beginn von Willkürbewegungen nimmt die Amplitude des Ruhetremors sichtbar ab. Weitere mögliche Tremorformen beim IPS sind ein Ruhe- und Haltetremor mit unterschiedlicher Frequenz und ein reiner Halte- und Aktionstremor (Deuschl et al., 1998).

Unter Rigor versteht man eine pathologische Erhöhung des Muskeltonus. Klinisch zeigt sich häufig das sogenannte „Zahnradphänomen“ bei der passiven Bewegung einer Extremität (Schwarz und Storch, 2007, p. 51).

Posturale Instabilität bezeichnet die Störung der Haltungs- und Stellreflexe. Hierdurch kommt es u.a. zu einer Unsicherheit oder Schwanken beim Stehen und Gehen (Schwarz und Storch, 2007, p. 51).

Psychiatrische Symptome

Eine Depression ist das häufigste psychiatrische Symptom beim IPS (Allain et al., 2000). So entwickeln etwa 40-50% der IPS-Patienten eine depressive Symptomatik (Allain et al., 2000). Zudem zeigt sich im späteren Verlauf der Erkrankung bei ca. 17,5-43,6% der Patienten ein dementielles Syndrom (Riedel et al., 2008). Weiterhin kommt es bei etwa 20-40% der IPS-Patienten im Krankheitsverlauf zum Auftreten von psychotischen Symptomen wie Halluzinationen oder Denkstörungen (Schwarz und Storch, 2007). Häufig sind solche psychotischen Störungen bei IPS-Patienten jedoch auch medikamenteninduziert (Schwarz und Storch, 2007, p. 57).

Weitere nicht-motorische Symptome

Zu den weiteren Symptomen des IPS zählen sensorische Symptome wie Dysästhesien, Schmerzen und Hyposmie sowie vegetative Symptome wie Störungen von Blutdruck und/oder Temperaturregulation, Blasen- und Darmfunktion sowie sexuellen Funktionen (“DGN S3-Leitlinie IPS,” 2016; O’Sullivan et al., 2008). Auch eine Schlafstörung mit Störung des Rapid Eye Movement (REM)-Schlafverhaltens gehört zu den weiteren möglichen Symptomen eines PS (“DGN S3-Leitlinie IPS,” 2016; O’Sullivan et al., 2008).

1.1.3. Diagnostik

Die Diagnose eines IPS wird primär durch die klinische Untersuchung und Anamnese gestellt. Initial kann zum Ausschluss anderer Ursachen der Symptomatik eine Schnittbildgebung (Computertomographie oder Magnetresonanztomographie) erfolgen. Zudem kann ggf. eine *Single photon emission computed tomography* durchgeführt werden. Hierbei handelt es sich um ein nuklearmedizinisches Verfahren, welches u.a. zur Darstellung der dopaminergen Neurone im Gehirn genutzt werden kann (“DGN S3-Leitlinie IPS,” 2016).

Die aktuelle S3-Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Neurologie empfiehlt folgenden dreistufigen Algorithmus zur klinischen Sicherung einer IPS-Verdachtsdiagnose:

Tabelle 2 Algorithmus zur Diagnose der Parkinson-Krankheit nach der aktuellen Leitlinie (“DGN S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom”, 2016).

1. Feststellung einer Akinese beziehungsweise Bradykinese
Zudem muss mindestens eines der folgenden Symptome bestehen: - Rigor - Ruhetremor - Posturale Instabilität
2. Überprüfung unterstützender Kriterien
- Asymmetrie der motorischen Symptomatik - Typischer Ruhetremor mit einer Frequenz von ca. 4–6 Hz - Ansprechen auf Levodopa - Langsame Progression der Erkrankung
3. Ausschluss eines sekundären oder atypischen Parkinson-Syndroms

1.1.4. Therapie

Die Therapie des IPS erfolgt in Abhängigkeit der Symptomatik interdisziplinär durch Neurologen, Physiotherapeuten, Ergotherapeuten und Logopäden ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016). Für die medikamentöse Therapie sind vielzählige Medikamente mit unterschiedlichen Wirkprinzipien in Deutschland zugelassen. Hierbei handelt es sich u.a. um Levodopa in Kombination mit einem DOPA-Decarboxylaseinhibitor, Dopaminagonisten, MAO-B-Hemmer, COMT-Inhibitoren, NMDA-Antagonisten und Anticholinergika ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016). Bei schwereren Verlaufsformen gibt es die Möglichkeit einer kontinuierlichen subkutanen Therapie mit Apomorphin (einem potenten Dopaminagonisten) oder eine kontinuierliche intrajeunale Gabe von Levodopa/Carbidopa ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016). Weiterhin gibt es die Möglichkeit einer tiefen Hirnstimulation, welche typischerweise als bilaterale elektrische Stimulation des *Nucleus subthalamicus* erfolgt ("DGN S3-Leitlinie IPS," 2016).

1.2. Pathophysiologie des Parkinson-Syndroms

Die motorische Symptomatik des PS wird im Wesentlichen durch eine Degeneration von dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra pars compacta* erklärt (Bernheimer et al., 1973). Durch den Verlust dieser Neurone kommt es zu einem Dopaminmangel v.a. im Bereich des *Corpus striatum* und zu einer gesteigerten Aktivität der Neurone u.a. im *Globus pallidus internus* und *Nucleus subthalamicus* (Bergman und Deuschl, 2002; Schwarz und Storch, 2007). Als pathologisches Korrelat der Erkrankung wurden zytoplasmatische Einschlusskörperchen aus ubiquitinierten Proteinen, v.a. α -Synuklein, die sogenannten Lewy-Körper, in den Neuronen der *Substantia nigra* nachgewiesen (Spillantini et al., 1997). Zudem wurden bei Parkinson-Patienten α -Synuklein-Ablagerungen in den Neuriten und Axonen, die sogenannten Lewy-Neuriten, nachgewiesen (Braak et al., 1999). Die Menge und die Lokalisation der Lewy-Körper und Lewy-Neuriten verändert sich im Krankheitsverlauf (Braak et al., 2004). So finden sich im Frühstadium der Erkrankung α -Synuklein-Einschlüsse v.a. in den motorischen Kernen des *Nervus vagus*, der *Medulla oblongata* und den Kernen des *Nervus olfactorius* (Braak et al., 2004). Zudem

wurde gezeigt, dass bei Parkinson-Patienten α -Synuklein-Ablagerungen u.a. auch in Neuronen des enterischen Nervensystems sowie der Haut nachgewiesen werden können (Doppler et al., 2017). Motorische Symptome treten in diesem frühen Stadium noch nicht auf. Im weiteren Verlauf zeigen sich zunehmend Lewy-Körper erst im Hirnstamm, dem Mittelhirn, der *Substantia nigra* und im Spätstadium im *Neocortex*. Braak et al etablierten daher eine Einteilung des IPS nach pathologischen Kriterien in 6 Stadien (Braak et al., 2004).

1.3. Ursachen des Parkinson-Syndroms

In den letzten Jahren wurde ausgiebig nach Ursachen, die zu der Entstehung eines PS führen können, geforscht. Neben Umwelteinflüssen wurde nach genetischen Prädispositionen gesucht. Der größte Risikofaktor für ein PS ist das Alter (Bowling und Beal, 1995). Zu den umweltbedingten Risikofaktoren zählen u.a. Pestizide (Narayan et al., 2017). Bei den genetischen Formen unterscheidet man Gene, in denen eine entsprechende Mutation zu einem PS führt (monogenetische Formen / familiäre Formen), welche etwa 5-10% der Erkrankungen ausmachen (Lill, 2016), und genetische Risikofaktoren, die das Risiko, ein PS zu entwickeln, erhöhen (Gasser et al., 2011; Lill, 2016). Die bisher bekannten monogenetischen Formen des PS und die bekannten genetischen Risikofaktoren erklären ca. 20-30% des Risikos in der Normalbevölkerung, ein PS zu entwickeln (Gasser et al., 2011). Es wird zudem angenommen, dass auch die sporadische Form des PS durch eine Kombination aus genetischen und umweltbedingten Faktoren ausgelöst wird (Gasser et al., 2011).

In letzter Zeit wurden eine Vielzahl an Genen identifiziert, bei denen eine Mutation das Risiko, ein IPS zu entwickeln, erhöht oder monogenetisch zum Auftreten eines, zum Teil atypischen, Parkinson-Syndroms führt (Gasser et al., 2011; Lill und Klein, 2017). Die monogenetischen/familiären Formen werden entsprechend den Mendelschen Regeln autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbt (Karimi-Moghadam et al., 2018). Aktuell sind 6 Gene (Parkin, Pink, DJ1, SNCA, LRRK2, VPS53) bekannt, deren Mutationen monogenetisch

ein PS mit typischen Parkinson-Symptomen verursachen (Lill und Klein, 2017). Außerdem gibt es weitere Gene, bei denen Mutationen monogenetisch zum Teil atypische Parkinson-Symptome verursachen (Gasser et al., 2011; Lill und Klein, 2017; Martin et al., 2011). Die nachfolgende Tabelle zeigt die bisher bekannten Gene, die mit der monogenetischen Entstehung eines (zum Teil atypischen) PS assoziiert sind:

Tabelle 3: Mit der monogenetischen Entstehung eines Parkinson-Syndroms oder parkinsonähnlicher Symptome assoziierte Gene. Modifiziert nach Martin et al 2011 inklusive PARK17 (Vilariño-Güell et al., 2011; Wider et al., 2008), PARK18 (Chartier-Harlin et al., 2011) PARK19 (Edvardson et al., 2012; Olgiati et al., 2016), PARK20 (Krebs et al., 2013; Quadri et al., 2013), PARK21 (Vilariño-Güell et al., 2014), PARK22 (Funayama et al., 2015) und PARK23 (Lesage et al., 2016).

PARK Lokus	Gen	Genpositio n	Klinischer Phänotyp	Pathologie
PARK1/4	SNCA, α -Synuklein	4q21	parkinson-typische Symptome, zusätzlich Demenz	Lewy-Körper
PARK2	Parkin	6q25-q27	<i>early-onset</i> , langsam fortschreitend	Lewy-Körper
PARK3	unbekannt	2p13	<i>late-onset</i> , parkinson-typische Symptome	Lewy-Körper
PARK5	UCH-L1	4p14	late-onset, parkinson-typische Symptome	unbekannt
PARK6	PINK1	1p35-p36	<i>early-onset</i> , langsamer Progress, parkinson-typische Symptome	ein Fall mit Lewy-Körper
PARK7	DJ-1	1p36	<i>early-onset</i> , langsamer Progress, parkinson-typische Symptome	unbekannt
PARK8	LRRK2	12q12	<i>late-onset</i> , parkinson-typische Symptome	Lewy-Körper
PARK9	ATP13A2	1p36	<i>early-onset</i> mit Kufor-Rakeb Syndrom	unbekannt
PARK10	unbekannt	1p32	unklar	unbekannt
PARK11	GIGYF2	2q36-q37	<i>late-onset</i> , parkinson-typische Symptome	unbekannt
PARK12	unbekannt	Xq	unklar	unbekannt
PARK13	Omi/ HTRA2	2p13	unklar	unbekannt
PARK14	PLA2G6	22q13.1	parkinson-typische Symptome mit zusätzl. Symptomen	Lewy-Körper
PARK15	FBX07	22q12-q13	<i>early-onset</i> , parkinson-typische Symptome	unbekannt
PARK16	unbekannt	1q32	<i>late-onset</i>	unbekannt
PARK17	VPS35	16q2	<i>late-onset</i> , parkinson-typische Symptome	Lewy-Körper

PARK18	EIF4G1	3q27	<i>late-onset</i> , parkinson-typische Symptome	Lewy-Körper
PARK19	DNAJC6	1p31	<i>early-onset</i>	unbekannt
PARK20	SYNJ1	21q22	<i>early-onset</i>	unbekannt
PARK21	DNAJC13	3q22	<i>late-onset</i>	Lewy-Körper
PARK22	CHCHD2	7p11.2	<i>late-onset</i>	unbekannt
PARK23	VPS13C	15q22	<i>early-onset</i>	Lewy-Körper
FTDP-17	MAPT	17q21.1	Demenz, teils parkinson-typische Symptome	Neurofibrillen-bündel
SCA2	Ataxin 2	12q24.1	Ataxie, teils parkinson-typische Symptome	unbekannt
SCA3	Ataxin 3	14q21	Ataxie, teils parkinson-typische Symptome	unbekannt
Gaucher's locus	GBA	1q21	<i>late-onset</i> , parkinson-typische Symptome	Lewy-Körper

Zur Entstehung eines IPS sind zudem mind. 28 genetische Risikofaktoren bekannt (Lill und Klein, 2017; Nalls et al., 2014). Mutationen in diesen Genen erhöhen im Vergleich zum Wildtyp das Risiko, ein IPS zu entwickeln, ohne dieses monogenetisch zu verursachen (Nalls et al., 2014). Durch Mutationen der entsprechenden Gene kann die Funktion der enkodierten Proteine reduziert sein oder auch komplett verloren gehen (*loss of function Mutationen*).

Zu den für die Entstehung eines PS bisher bekannten relevanten Proteinen gehören u.a. Parkin, PINK1, DJ-1, LRRK2, α -synuklein und Omi/HtrA2 (Burbulla et al., 2010a; Cresto et al., 2018). Einige dieser Proteine spielen u.a. eine Rolle in der mitochondrialen Homöostase, und Funktionseinschränkungen dieser Proteine können zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen (Burbulla et al., 2010a; Cresto et al., 2018).

1.4. Die Rolle der Mitochondrien beim Parkinson-Syndrom

Mitochondrien sind Organellen in den Zellen, welche u.a. für die Bereitstellung der Energie (in Form von Adenosintriphosphat (ATP) über die Atmungskette) (Fernie et al., 2004), die Calcium-Pufferung, die Regulation des oxydativen Stresses und die Regulation des Zellzyklus wie Induktion des Zelltodes (*Apoptose*) verantwortlich sind (Chan, 2006; Karbowski und Youle, 2003; Mandemakers et al., 2007; Mattson et al., 2008; McBride et al., 2006; Rizzuto et al., 2012). Da die Neurone auf eine kontinuierliche ATP-Produktion angewiesen und empfindlich für erhöhten oxidativen Stress sind, sowie u.a. der

Calciumhaushalt der Neuronen eine entscheidende Rolle in der Regulation von Neurotransmittern spielt (Larsen et al., 2018), wird angenommen, dass mitochondriale Dysfunktionen für die Entstehung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen verantwortlich sind (Chan, 2006; Chang et al., 2006; Mandemakers et al., 2007; Saxton und Hollenbeck, 2012).

Dass die Funktion der Mitochondrien auch eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines PS spielt, wird seit langem vermutet. Es wurden bei Patienten nach einer Vergiftung mit dem Neurotoxin *1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin* (MPTP) parkinsontypische Symptome nachgewiesen (Davis et al., 1979; Langston et al., 1983). Diese parkinsontypischen Symptome wie Akinese, Rigor und Tremor ließen sich auch in Tierversuchen nach Gabe von MPTP reproduzieren (Burns et al., 1983). MPTP bzw. MPP⁺ (ein Metabolit von MPTP) ist ein Neurotoxin, das den mitochondrialen Komplex-I und somit die mitochondriale Atmungskette inhibiert (Boada et al., 2000; Chonpathompikunlert et al., 2018) und so zu einer Schädigung u.a. der dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* führt (Burns et al., 1983). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass auch bei PS-Patienten die mitochondriale Komplex-I-Aktivität in den Gehirnen signifikant reduziert ist (Parker et al., 2008, 1989; Schapira et al., 1990). Durch den Nachweis von monogenetischen Formen des PS mit Störungen der Funktion von u.a. PINK1, Parkin und DJ-1, bei denen es zu einer Funktionseinschränkung der Mitochondrien kommt, konnte der Einfluss der Mitochondrien auf die Entstehung eines PS weiter unterstrichen werden (Larsen et al., 2018). Diese Proteine sind durch unterschiedliche Mechanismen zur Aufrechterhaltung und Regulation der Mitochondrien notwendig. So sind PINK1 und Parkin im Rahmen der Mitophagie also dem Abbau von geschädigten Mitochondrien essentiell (Geisler et al., 2010). PINK1 wird vermehrt an geschädigte Mitochondrien gebunden und sorgt für eine erhöhte Aktivität von Parkin (Narendra et al., 2010). Parkin wiederum verursacht eine ubiquitinierung von Proteinen wodurch diese proteasomal abgebaut werden. Hierdurch wird u.a. eine Mitophagie eingeleitet (Narendra et al., 2008; Wang et al., 2011). Es ist bereits bekannt,

dass Mutationen in einem der beiden Gene mit der Entstehung einer PS assoziiert sind (Geisler et al., 2010).

Die Biogenese von Mitochondrien erfolgt in den Neuronen v.a. im Zellkörper (Chang et al., 2006; van Spronsen et al., 2013). Aufgrund der Größe der Neuronen ist jedoch ein Transport der Mitochondrien v.a. entlang der bis zu einem Meter langen Axone notwendig, um auch an den distalen Enden der Axone eine ausreichende Energieversorgung und Calcium-Puffer bereitstellen zu können (Chada und Hollenbeck, 2003; Saxton und Hollenbeck, 2012; Schwarz, 2013; van Spronsen et al., 2013). Der Transport der Mitochondrien erfolgt hierbei entlang von speziellen röhrenförmigen Strukturproteinen, den *Mikrotubuli* (Schwarz, 2013). Hierfür werden die Mitochondrien durch Motorproteine, wie Kinesin für den Transport in die Peripherie (anterograde Transport) und Dynein für den Transport zum Zellkörper (retrograde Transport), entlang der *Mikrotubuli* transportiert (Hollenbeck und Saxton, 2005). Ein gestörter axonaler Transport von Mitochondrien wird mit der Entstehung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson assoziiert (Saxton und Hollenbeck, 2012). Für die Adhäsion der Mitochondrien an die Transportproteine sind eine Reihe weiterer Proteine erforderlich. Hier spielt u.a. das Protein Miro1 eine entscheidende Rolle (Glater et al., 2006; Mattson et al., 2008; Wang und Schwarz, 2009).

1.5. Miro1/RHOT1

Miro1 ist ein Protein aus 691 Aminosäuren (<http://www.ensembl.org/id/ENST00000358365>, 18.10.2018). Die für Miro1 codierende DNA-Sequenz, das *RHOT1*-Gen, liegt auf Chromosom 17 (17q11.2), es hat eine Transkriptionslänge von 3297 Basenpaaren und besteht aus 21 Protein-codierenden DNA-Abschnitten (*Exons*) (<http://www.ensembl.org/id/ENST00000358365>, 18.10.2018).

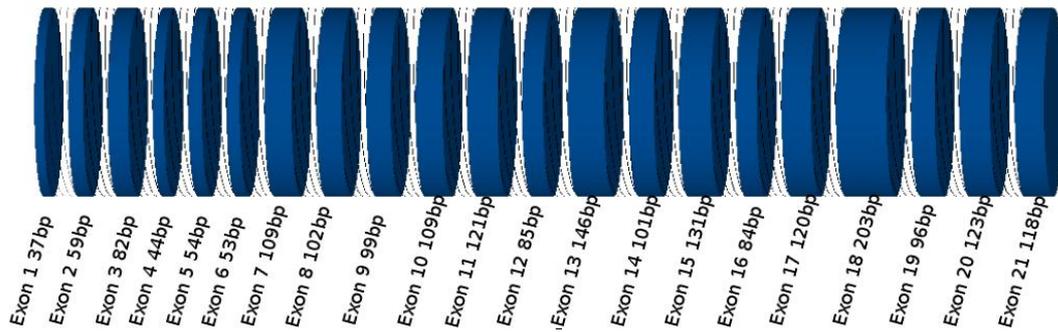


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *RHOT1*-Gen mit 21 Exons (in blau) und deren Größe in Basenpaaren (bp).

Miro gehört zu der Gruppe der mitochondrialen Rho-GTPasen und ist an der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Frederick et al., 2004). Miro hat zwei GTPase-Domänen, zwei calciumbindende EF-hand Domänen und eine C-terminale Transmembrandomäne (Fransson et al., 2003; Klosowiak et al., 2013). Direkt hinter jeder EF-Hand-Domäne liegt eine Helix, die strukturell einen EF-Hand-Liganden nachahmt. Diese Domänen werden als *ligand mimic domains* bezeichnet (Klosowiak et al., 2013).



Legende:

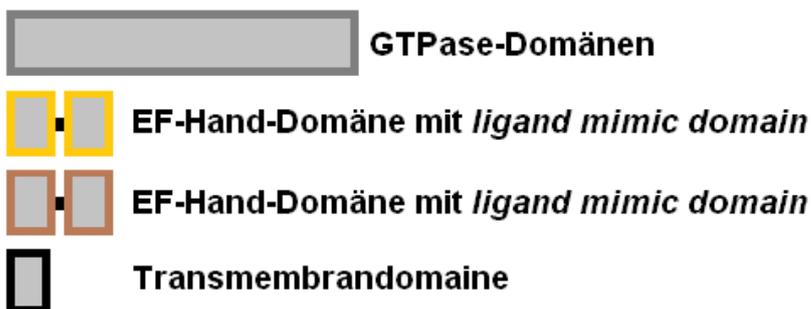


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *RHOT1*-Gen mit seinen funktionellen Domänen. Modifiziert nach Klosowiak et al. 2013.

Miro kann beim Menschen und in einer Vielzahl von weiteren eukaryoten Organismen nachgewiesen werden (Fransson et al., 2003). Es wird daher

angenommen, dass Miro evolutionär betrachtet bereits sehr früh entstanden ist und dadurch, dass es evolutionär hoch konserviert ist, wird ein entscheidender Einfluss auf die Zellfunktion angenommen (Fransson et al., 2003; Vlahou et al., 2011; Yamaoka und Hara-Nishimura, 2014).

Miro1 ist u.a. an der Bindung von Mitochondrien an die Transportproteine entlang der Mikrotubuli zuständig (Fransson et al., 2006; Glater et al., 2006; Guo et al., 2005). Hierfür wurde in *Drosophila* ein Komplex aus den Proteinen Miro, Milton und dem Motorprotein Kinesin beschrieben, welcher für den anterograden Transport der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli notwendig ist (Glater et al., 2006; Wang und Schwarz, 2009). Milton bindet dabei an die schwere Kette von Kinesin, während Miro mit seiner C-terminalen Transmembrandomäne an die äußere Mitochondrienmembran und zudem an Milton bindet. Somit werden die Mitochondrien anterograd entlang der Mikrotubuli und somit an den Ort, an dem sie gebraucht werden, transportiert (Glater et al., 2006).

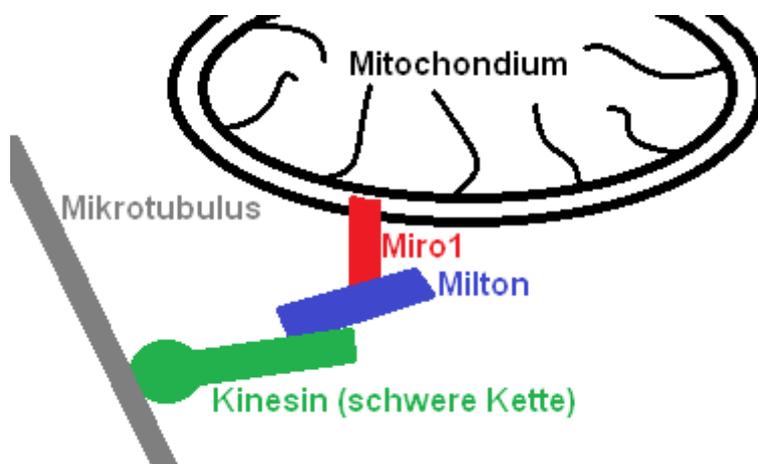


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Proteinkomplexes aus Miro1, Milton und Kinesin. Modifiziert nach Wang und Schwarz, 2009

In Zellen von Säugetieren scheint Miro1 möglicherweise jedoch nicht mit Milton zu interagieren, sondern direkt an Kinesin zu binden (MacAskill et al., 2009b).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Miro1 auch am retrograden Transport von Mitochondrien über eine Komplexbildung mit Dynein/Dynactin beteiligt ist (Morlino et al., 2014).

Die Bereitstellung von Mitochondrien an Orten mit hohem Energiebedarf ist für die Zellen und v.a. die großen Neurone von großer Bedeutung (Birsa et al., 2013; Morris und Hollenbeck, 1993). Die genauen Methoden, mit denen diese Bereitstellung gesteuert werden, sind noch nicht gänzlich bekannt (Mattson et al., 2008). Es ist hierbei u.a. eine Regulation des Transportes der Mitochondrien durch die zytoplasmatische Calciumkonzentration beschrieben worden (MacAskill et al., 2009b; Wang und Schwarz, 2009; Yi et al., 2004). Bei hohen Calciumkonzentrationen kommt es hierbei zu einem Stopp des Transportes der Mitochondrien (Yi et al., 2004). An Orten mit hohem Energiebedarf beziehungsweise zu geringer Energie-/ATP-Produktion steigt die Calciumkonzentration u.a. durch einen verminderten transmembralen Calciumtransport und verminderte Pufferkapazität der Mitochondrien an (Wang und Schwarz, 2009). Zudem steigt in den Neuronen durch die Aktivierung der präsynaptischen Endigung die zytoplasmatische Calciumkonzentration an, da sich zur Freisetzung von Neurotransmittern spannungsabhängige Calcium-Kanäle öffnen (David und Barrett, 2000). Somit zeigt ein erhöhter intrazytoplasmatischer Calciumspiegel auch eine erhöhte Aktivität der Synapse und somit einen erhöhten Bedarf an Energie an. Die Calciumkonzentration im Zytoplasma der Neuronen dient somit als ein Regulationsmechanismus der bedarfsgerechten Bereitstellung von Mitochondrien (MacAskill et al., 2009b; Wang und Schwarz, 2009).

Durch Bindung von Calcium an die EF-Hand-Domänen (Klosowiak et al., 2013) wird Miro1 von Kinesin wieder gelöst und der Transport der Mitochondrien wird gestoppt. Somit stehen die Mitochondrien am Ort des Bedarfs zur Verfügung (MacAskill et al., 2009b, 2009a). MacAskill et al. konnten zeigen, dass durch eine Überexpression von Miro1 durch Transfektion mit Wildtyp-Miro1 in Neuronen des *Hippocampus* von Ratten der Anteil an Mitochondrien, die sich in Dendriten bewegen, signifikant erhöht werden konnte (MacAskill et al., 2009b). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein *Knockdown* von Miro1 durch shRNAi zu einer Reduktion der transportierten Mitochondrien führte (MacAskill et al., 2009b).

Es konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass Miro einen Einfluss auf die Qualitätskontrolle und den Abbau (*Mitophagie*) der Mitochondrien hat (Liu et al., 2012). Dass eine Störung der *Mitophagie* mit der Entstehung eines PS assoziiert ist, wurde bereits wie oben beschrieben im Zusammenhang mit PINK1/Parkin beschrieben (Geisler et al., 2010). Es wird angenommen, dass eine Unterbrechung des Transportes der Mitochondrien für die *Mitophagie* erforderlich ist (Wang et al., 2011). Hier wurde gezeigt, dass u.a. bei geschädigten Mitochondrien Miro vermehrt durch das Protein PINK1 phosphoryliert und durch Parkin ubiquitiniert wird. Hierdurch wird Miro von den Mitochondrien getrennt und proteasomal abgebaut (Wang et al., 2011; Weihofen et al., 2009). Somit stoppt der Transport der Mitochondrien. Die Mitochondrien, die z.B. durch oxidativen Stress geschädigt sind, werden so isoliert und eine Fusion mit anderen Mitochondrien wird verhindert, bevor sie abgebaut werden (Wang et al., 2011; Weihofen et al., 2009). Zudem wurde 2012 von Liu et al. beschrieben, dass ein *Knockdown* von Miro zu einer Akkumulation der Mitochondrien im Zellkörper und einer vermehrten *Mitophagie* führt (Liu et al., 2012).

Die Trennung von Miro1 von geschädigten Mitochondrien wird zudem durch die Bildung eines Komplexes von Miro1 mit dem Protein LRRK2 begünstigt (Hsieh et al., 2016). Hsieh et al. zeigten, dass eine genetische Funktionsstörung von LRRK2 diesen Komplex mit Miro1 stört und Miro1 daher länger an geschädigten Mitochondrien gebunden bleibt. Somit wird letztlich die *Mitophagie* von geschädigten Mitochondrien verzögert (Hsieh et al., 2016).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Aus den Untersuchungen anderer Proteine wie PINK1 und Parkin, die mit der Entstehung eines PS assoziiert sind, ist bekannt, dass eine Störung der mitochondrialen organellaren Qualitätskontrolle, der *Mitophagie* oder der Teilung bzw. Fusion der Mitochondrien zum Untergang von dopaminergen Neuronen und somit zur Entstehung eines PS beitragen kann (Imai und Lu, 2011; Valente et al., 2004).

Somit wird davon ausgegangen, dass auch Mutationen im *RHOT1*-Gen zur Entstehung eines PS führen können (Anvret et al., 2012; Hsieh et al., 2016).

Unter dieser Annahme haben wir eine Kandidatengen-Studie zur Suche nach neuen Mutationen im *RHOT1*-Gen in einer Gruppe von PK-Patienten durchgeführt. Hierfür erfolgte ein Mutationsscreening bei 752 deutschen Parkinson-Patienten zur Suche nach neuen Mutationen im *RHOT1*-Gen.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Tabelle 4: Geräte

Name	Hersteller
LightCycler® 480	Roche
3500 XL Genetic Analyser	Applied Biosystems™ HITACHI
PRISM® 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems™ HITACHI
Heraeus™ Multifuge™ 3 S-R	Thermo Scientific™
Biofuge pico Heraeus	Kendro
T100® Thermal Cycler	Bio-Rad
DNA Engine DYAD	MJ Research
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
E861 600v-1000mA	Consort
ThermoEC Classic™ CSSU911	

2.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller	Bestellnummer
250µl Fine Point LTS Tips	RAININ	RC-L250/10
20µl LTS® TIPS	RAININ	RC-L10/10
Safe-Lock Tubes 1,5µl	Eppendorf	0030 120.086
Pipettenspitze 200µl gelb	Sarstedt	70760002
epT.I.P.S.® Standard 50-1000µl	Eppendorf	0030 000.919
epT.I.P.S.® Standard 0,1-10µl	Eppendorf	0030 000 811
0,2ml Non-Skirted 96-well PCR Plate	Thermo Scientific™	AB-0600
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	Roche	04 729 092 001
LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche	04 729 757 001
Tubes für die PCR	Verschiedene	

2.3. Oligonukleotide / Primer

Oligonukleotide oder auch *Primer* sind kleinere Basensequenzen (ca. 20 Basenpaare), die so gewählt werden, dass sie komplementär zu einer bestimmten DNA-Sequenz sind. Sie werden z.B. für die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: *polymerase chain reaction*, PCR, siehe auch Kapitel 2.5.1) oder SNaPshot® (siehe Kapitel 2.5.6) verwendet. Für die PCR benötigt man ein Primerpaar, das die zu vervielfältigende Sequenz von beiden Seiten auf je einem DNA-Strang umschließt. Dabei müssen beide *Primer* eines Paares in etwa die gleiche Schmelz-Temperatur (*annealing* Temperatur, T_m) haben, damit die *Primer* während der PCR spezifisch an die DNA-Matrix anlagern

können. Für die Schmelzkurvenanalyse im LightCycler® 480 sollte die zwischen ihnen liegende Sequenz, also das spätere PCR-Produkt, um eine ausreichende Sensitivität für die Mutationsdetektion zu erhalten, laut Handbuch des Herstellers, weniger als 500 Basenpaare betragen. Jedoch ist bei kleineren Amplifikaten mit einer höheren Sensitivität der Schmelzkurvenanalyse zu rechnen (Gundry, 2003; Krypuy et al., 2006; Liew et al., 2004). Um unerwünschte Nebenprodukte zu vermeiden, ist es wichtig, dass die *Primer* möglichst spezifisch nur an der gewünschten Stelle der DNA binden. Dies haben wir u.a. mit der Software Primer-BLAST [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>] getestet.

Da wir bei dieser Arbeit nach Mutationen gesucht haben, die die Funktion des Genprodukts, sprich von Miro1, beeinflussen, haben wir uns v.a. für die kodierende DNA (*Exons*) und weniger für die nicht-kodierende DNA (*Introns*) interessiert. Deshalb haben wir die *Primer* so gewählt, dass sie nur einen kleinen Teil der intronischen DNA auf beiden Seiten eines *Exons* mit umschließen. Da wir bei allen *Exons* aber die, das *Exon* direkt umschließende, intronische Sequenz mit erfasst haben, können wir auch Mutationen entdecken, die durch ein verändertes Schneiden der Aminosäuresequenz (*Splicing*) Änderungen der Funktion des enkodierten Proteins verursachen würden (Sterne-Weiler und Sanford, 2014).

Als Grundlage für die Primererstellung und Mutationsanalyse haben wir die Nukleotid-Sequenz und Translation von RHOT1, die durch Ensembl.org (RHOT1-002 ENST00000358365) bereitgestellt wird, verwendet [<http://www.ensembl.org/id/ENST00000358365>, 23.10.2018]. Für die Erstellung der *Primer* haben wir u.a. die Online-Software Primer-BLAST [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>] verwendet und haben die *Primer* bei der Firma Metabion GmbH bestellt. Die *Primer* wurden HPLC (*high performance liquid chromatography*) gereinigt und lyophilisiert bestellt und nach den Herstellerangaben zur Anwendung gelöst und verdünnt.

Der Translationsstart von Miro1 liegt noch im Bereich des Exon 1. Es ließ sich für Exon 1 jedoch trotz vielfacher Versuche mit verschiedenen *Primern* und

PCR-Ansätzen kein PCR-Protokoll etablieren, das ein ausreichend spezifisches Produkt für Exon 1 liefert. Wir haben daher Exon 1 bei der Untersuchung ausgelassen. Für Exon 2 bis Exon 21 ließ sich mit den in Tabelle 6 genannten *Primern* die PCR durchführen.

Tabelle 6: Verwendete Primer für die *Polymerase Chain Reaction* (PCR). T_m = annealing Temperatur, bp = Basenpaare (Grossmann et al., 2019).

Exon	Exon- länge (bp)	PCR- Produkt (bp)	Sequenz forward (5'→ 3')	Sequenz reverse (5'→ 3')	T _m
2	59	212	TTG CCA AAT TTG AGC TTA TG	ACA CAT GCC AAA AGA GAC AG	56°C
3	82	230	TTG AGT GAT AAT ATT CAA AGG TGT TT	CCT CTC TGA ACA TTT GTA AAA GC	54°C
4	44	117	CAA TAT GAA ACA TTG ACT TCC TGT C	TTC TAC ACA AAA CCC CAC ACC	61°C
5	54	163	TTG CTA ATT AAG TGC TGT CTA TG	CCA CTG AAA CCA ACT ATA GGG	59°C
6	53	187	GGC TAA GCG CTT GTT AAT TTT C	AAA TTT AAG TGA AGG ATT TAG GGA AG	57°C
7	109	168	CCT TAT TAC AAT GTG CCC TG	AAA TTT TCA AAT CAA ATT ACA AGG	59°C
8	102	378	CAT GTT GTG ATG TCC ACA AAG	ACC AAA ATG TAA CCA TTT AAT AAG C	60°C
9	99	185	CAT TGC TTA TGA AAA TCA CAG	ACG CAA ATG TCT GAA ATA AAG	54°C
10	109	235	GTG GTT TTA ACG CTG GTT TG	CAA TAA AGA CCT TCA CCT TCT GC	57°C
11	121	289	TGC TTT TCT CCT ATG TGA CTC TG	GGT GGG AGG ATC ACT TGA CT	62°C
12	85	209	TGG TGT TAC CTC ACA AAA GAC	TGG AAA ATT ACA GCT AAA GGC	56°C
13	146	216	TCT AAA CAT TCT GTA TCC TTG TG	TTG TAA CTC TAG AGG AAA GAG GTG	61°C

14	101	198	CCC CAT AAA TAT TCG TTT AGG	AAA TAT CTC TAA TCA TGA GCT GAA C	57°C
15	131	280	GGT GGA ATG GAG GCT TAG TG	CAA TGG CTA TGA AAA CAT TAT GTA AAC	61°C
16	84	195	GCA GAT ATT GAG ATT TTC GGT TC	GAA GCC AAT TTG TTT TCA AAG AG	59°C
17	120	253	TTT TAA ACT TAG GAA GTC CAG GG	CAT TCA GTC ATA GTC TGT AGG AGC	60°C
18	203	393	CTG GAG GAA ATG CTT GGT TC	GTT GCT GAA CAA TTC CTA TGT G	59°C
19	96	178	TTT TAC CTT TGC TTT AAA ACT CTC	CAA CAA AAT CCC ACA GAA G	56°C
20	123	184	TCA ACT CCT GTC CTT CTG TG	GCC TGG TAC CCA GTA AAT AAA G	52°C
21	118	257	CTG GTA TAG GGT TTT CAT ACT AAT C	ATA ATT CTA GCA GAA CTT AAA GCA TTC	56°C

Tabelle 7: Verwendete Primer für SNaPshot®. Mt = Mutante, Wt = Wildtyp, For = *forward* Rev = *reverse*, bp = Basenpaare

Mutation	Exon	Base	Wt For	Mt For	Primer- Sequenz (5'→ 3')	Länge (bp)	For / Rev Primer
R272Q	11	815	G	A	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA TCA TCA TAA CCA AAT CGT C	40	Rev
R450C	16	1348	C	T	GTT CTG TTT TCA GAG GCA GAA GAA AAT T	28	For
F676V	21	2026	T	G	AGC AAA GCC CAA AAC TGC AA	20	Rev

2.4. DNA-Proben

2.4.1. DNA-Proben von Parkinson-Patienten

Wir haben im Sinne einer Kandidatengen-Studie die DNA von 752 deutschen Parkinson-Patienten auf Mutationen im Miro1/RHOT1-Gen untersucht (Grossmann et al., 2019). Die Probanden waren vor Probenentnahme von erfahrenen Neurologen untersucht worden und es lag bereits eine Genehmigung der Ethikkommission der Universität Tübingen vor (287/2004V). Dabei sind 63,16% der Patienten männlich und 36,84% sind weiblich. Das Durchschnittsalter bei Erkrankungsbeginn lag bei 59,4 ($\pm 13,2$) Jahren. Das Durchschnittsalter bei Untersuchung und Probenentnahme lag bei 65,7 ($\pm 10,2$) Jahren (Grossmann et al., 2019). Die DNA hatte eine Konzentration von ca. 10ng/ μ l. Die 752 Proben wurden auf 8 Platten mit 96 *wells* aufgeteilt, wobei auf jeder Platte jeweils ein Leerwert mit Wasser war.

2.4.2. Kontroll-Proben von gesunden Probanden

Als gesunde Kontrollgruppe haben wir 282 DNA-Proben von gesunden Personen ohne einem PS aus der MEMO-Studie (Baune et al., 2008; Burbulla et al., 2010b; Rothdach et al., 2000) untersucht, die zum Zeitpunkt der Untersuchung mindestens 65 Jahre alt waren. Dabei waren 52,84% männlich und 47,16% weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 72 ($\pm 4,4$) Jahre (Grossmann et al., 2019). In der MEMO-Studie wurden alle Teilnehmer neurologisch untersucht und bei fehlenden diagnostischen Kriterien für ein PS nach dem Vorhandensein von geringen extrapyramidalen Symptomen (EPS) klassifiziert. PDSYN1 steht hierbei für geringe und PDSYN2 für leichte EPS. 99 der Patienten der Kontrollgruppe zeigten PDSYN1 und 25 PDSYN2, wobei beides nicht für die Diagnose eine IPS ausreicht.

Als zweite Kontrollgruppe dienten 92 Proben aus der TREND-Studie (Hobert et al., 2011) von gesunden Personen ohne ein PS und ohne bekannte Risikofaktoren für die Entstehung eines PS. Dabei waren 51,09% männlich und 48,91% weiblich (Grossmann et al., 2019).

2.5. Methoden

2.5.1. ***Polymerase Chain Reaktion (PCR)***

Die *Polymerase Chain Reaktion* (PCR) ist eine 1983 von Mullis beschriebene Methode, mit der man einen beliebigen DNA-Abschnitt gezielt vervielfältigen kann (Mullis et al., 1986). Dazu nutzt man ein bei allen Lebewesen vorkommendes Enzym: eine DNA-Polymerase. Dieses Enzym ist in der Lage aus einzelnen Nukleotiden, den Grundbausteinen der DNA, einen zusammenhängenden DNA-Strang zu polymerisieren. Da die DNA-Polymerase immer einen kurzen DNA-Abschnitt zum Starten benötigt, der schon an der zu kopierenden DNA (*Template-DNA*) anliegen muss, kann man mit Hilfe dieser kurzen DNA-Abschnitte (*Primer*) bestimmen, welcher Abschnitt der DNA vervielfältigt werden soll. Man wählt also jeweils einen *Primer* für den Plus- und den Minus-Strang der DNA (Saiki et al., 1988).

Man benötigt für eine PCR also jeweils die *Template-DNA*, zwei *Primer*, eine Polymerase, die vier verschiedenen Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) sowie eine Pufferlösung. Da die Reaktionen auch von der Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)-Konzentration in der Lösung abhängen, ist es beim Etablieren der PCR nötig verschiedene $MgCl_2$ -Konzentrationen zu testen (Riedel et al., 1992; Slack et al., 2011).

Eine PCR verläuft in ca. 25-45 sich wiederholenden Zyklen. Je mehr Zyklen verwendet werden, umso mehr PCR-Produkt kann entstehen. Bei zu vielen Zyklen entstehen jedoch vermehrt unspezifische Nebenprodukte (Bell und DeMarini, 1991). In jedem Zyklus wird zunächst die DNA bei 95°C denaturiert. Dabei werden die Doppelstränge der DNA in die beiden Einzelstränge gespalten. Anschließend lagern sich die *Primer* auf beiden Seiten an die DNA-Einzelstränge an (Primerhybridisierung). Die dafür benötigte Temperatur wird *annealing* Temperatur (T_m) genannt und hängt von der Nukleotid-Zusammensetzung des *Primers* ab. Sie muss also für jedes Primerpaar zunächst einzeln bestimmt werden (Bercovich et al., 1999; Ishii und Fukui, 2001). Dazu testet man das jeweilige Primerpaar mit T_m , trägt das PCR-Produkt auf ein Agarose-Gel auf und wählt die Temperatur aus, bei der nur eine

möglichst deutliche Bande zu sehen ist. Wählt man die T_m zu hoch, können die *Primer* nicht binden und es entsteht kein Produkt. Wählt man sie zu niedrig, ist die Bindung der *Primer* nicht spezifisch und es entstehen ungewünschte Nebenprodukte (Sachadyn et al., 1998). Im nächsten Schritt lagert sich die DNA-Polymerase an die *Primer* an und beginnt weitere Nukleotide vom 5' zum 3'-Ende an die *Primer* anzusetzen (*Elongation*). So entsteht eine Kopie des DNA-Abschnittes, der hinter dem *Primer* liegt. Um alle Schritte direkt nacheinander ausführen zu können, benötigt man ein sehr hitzestabiles Enzym. Daher verwendet man eine Polymerase, die bei einem in heißen Geysiren lebenden Bakterium (*Thermus aquaticus*, *Taq*) entdeckt wurde (Saiki et al., 1988). Diese *Taq*-Polymerase übersteht die Denaturierungstemperatur von 95°C und hat selber eine optimale Arbeitstemperatur von 72°C. Diese drei Schritte werden 25-45mal hintereinander ausgeführt (siehe Tabelle 10).

Nach dem ersten Zyklus erhält man also zwei DNA-Doppelstränge. Die Kopien sind in 3'-Richtung aber noch zu lang. In den weiteren Zyklen wird der Anteil der Kopien mit der richtigen Größe immer höher, bis der Anteil der zu großen Kopien im gesamten Produkt nicht mehr auffällt (siehe Abbildung 4).

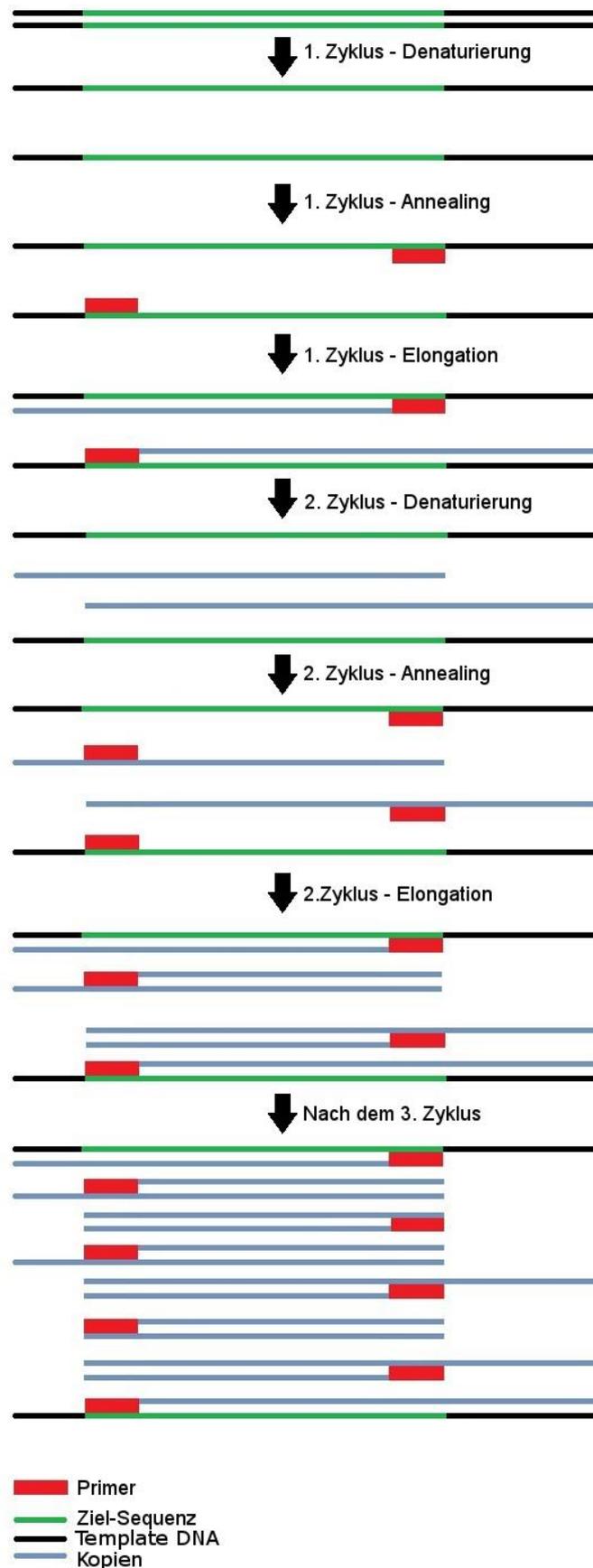


Abbildung 4: Schematischer Ablauf einer *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Tabelle 8: Material für die *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Name	Hersteller	Bestellnummer
LiChrosolv® Wasser	MERCK	1.15333.2500
100mM dNTP Set PCR Grade	Invitrogen	10297-018
Magnesiumchlorid Stock Solution	Roche	11699113001
Betain Enhancer Solution	Ampliqon	351104
GoTaq® DNA Polymerase	Promega	M830B
5x colorless GoTaq® Reaction Buffer	Promega	M792A

Tabelle 9: Protokoll der *Polymerase Chain Reaction*

Reagenz	Volumen
Puffer	3µl
Betain	3µ
Aqua destillata	5,2µl
Magnesiumchlorid	0,3µl
dNTPs	0,75µl
Forward Primer	0,75µl
Reverse Primer	0,75µl
GoTaq®	0,25µl
DNA	1µl
Gesamtvolumen	15µl

Tabelle 10: Ablauf einer *Polymerase Chain Reaction*. T_m = annealing Temperatur

Schritt	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1.	95°C	5 Minuten	Start-Denaturierung
2.	95°C	1 Minute	Denaturierung
3.	60°C	45 Sekunden	Primerhybridisierung (Temperatur je nach T _m der verwendeten Primer)
4.	72°C	45 Sekunden	Elongation
25-45mal Wiederholung der Schritte 2-4			
5.	72°C	7 Minuten	Abschluss-Elongation
6.	4°C	Dauerhaft	Lagerung

2.5.2. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird genutzt, um verschieden große DNA-Abschnitte voneinander zu trennen und sichtbar zu machen. Sie wurde zuerst von Arne Tiselius beschrieben (Tiselius, 1937). Dazu wird ein Gel aus Agarose, TAE-Puffer (TRIS, Acetat und EDTA) und Ethidiumbromid gegossen. Dieses Gel hat kleine Poren, durch die die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung beim Anlegen einer Spannung zur Anode wandern kann. Je kleiner die DNA-Abschnitte sind, desto schneller können diese durch die Gelmatrix wandern. So werden die DNA-Abschnitte ihrer Länge nach voneinander in verschiedene Banden

getrennt (Fredrick, 1964; Loening, 1967; Seibert et al., 1938). Je höher die Agarosekonzentration im Gel ist, umso kleiner werden die Poren und umso geringere Längenunterschiede können dargestellt werden. Das Ethidiumbromid lagert sich dabei an die Doppelstrang-DNA an. Dabei wird die durch ultraviolettes (UV) Licht anregbare Fluoreszenz von Ethidiumbromid deutlich verstärkt. Die DNA hat also eine deutlich stärkere Fluoreszenz als das restliche Gel. So kann man die einzelnen Banden unter einer UV-Lampe sichtbar machen (Le Pecq und Paoletti, 1966; Waring, 1965). Durch die Verwendung eines DNA-Markers (englisch: *DNA ladder*), welcher fest definierte verschieden große DNA-Abschnitte enthält, kann man auch die ungefähre Länge einer Bande abmessen (Abbasian et al., 2015; Cooney et al., 1989).

Tabelle 11: Material für die Gelelektrophorese

Name	Hersteller	Bestellnummer
LE Agarose	Biozym	840004
TAE-Puffer (TRIS, Acetat und EDTA)	Verschiedene	
Ethidiumbromid 1%	ROTH	2218.3
GeneRuler™ I Ultra Low Range DNA-Ladder	Thermo Scientific™	#SM1211
GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder Plus	Thermo Scientific™	#SM1311

Tabelle 12: Protokoll zum Gießen eines Agarosegels

Reagenz	Menge
Agarose	2g
TAE-Puffer	50ml
Ethidiumbromid 1%	6µl

Tabelle 13: Ladepuffer und Laufzeiten eines Agarosegels

Ladepuffer	1,5µl
PCR-Produkt	15µl
Spannung	110 V
Laufzeit	40-60 min

2.5.3. High Resolution Melting Analysis (HRMA)

Zur Suche nach Mutationen in den DNA-Proben haben wir das *High Resolution Melting Analysing* (HRMA) mit dem LightCycler® 480 von Roche genutzt. Beim HRMA lässt man die doppelsträngige DNA (dsDNA) durch ansteigende

Temperaturen schmelzen (*denaturieren*) und kann anschließend die Schmelzkurven der DNA-Proben miteinander vergleichen. Da für die HRMA eine hohe Zahl von DNA-Kopien nötig ist, muss man die DNA zunächst mittels PCR amplifizieren. Für die HRMA am LightCycler® 480 haben wir den *LightCycler® 480 High Resolution Melting Master* von Roche nach den Angaben im Handbuch verwendet. Dieser enthält eine *FastStart Taq DNA Polymerase*, einen HRMA-Farbstoff und einen Puffer. Die Sensitivität des HRMA zur Detektion von Mutationen beträgt etwa 97,5% während die Spezifität etwa 95,8% beträgt (Bing-Sheng Li et al., 2011). Die Sensitivität hängt jedoch von der Größe des PCR-Produktes ab und nimmt bei PCR-Produkten über 400bp deutlich ab (Bing-Sheng Li et al., 2011). Wir haben daher alle Exons von Miro1 einzeln untersucht.

2.5.3.1. Realtime PCR am LightCycler® 480

Zur Amplifikation der DNA kann man am LightCycler® 480 beim HRMA direkt eine *Realtime*-PCR durchführen. Bei einer *Realtime*-PCR gibt man zu einem normalen PCR-Ansatz einen Farbstoff, der, an die DNA gebunden, fluoresziert. So kann man bereits, während die PCR noch läuft, nach jedem Zyklus ablesen, wie viel PCR-Produkt entstanden ist (Navarro et al., 2015). Dazu haben wir den Farbstoff *SYBR® Green I* verwendet. Dieser ist ein *Cyanin*-Farbstoff, der bei Bindung an doppelsträngige DNA ca. 11mal stärker fluoresziert als bei Bindung an Einzelstrang-DNA (Schneeberger et al., 1995; Zipper et al., 2004). Dadurch eignet sich *SYBR® Green I* besser für HRMA als z.B. Ethidiumbromid. Die Fluoreszenz wird dann von einem Detektor gemessen und graphisch auf dem Monitor dargestellt. Um die Spezifität möglichst hoch zu halten und gleichzeitig möglichst viel PCR-Produkt zu erhalten, haben wir für die PCR ein *Touchdown*-Protokoll gewählt. Bei einer *Touchdown*-PCR fängt man mit einer etwas höheren als der berechneten *annealing* Temperatur an und senkt die Temperatur dann in jedem Zyklus in kleinen Schritten, bis man die gewünschte Temperatur erreicht hat (Green und Sambrook, 2018).

2.5.3.2. High Resolution Melting (HRM)

Nach der *Realtime* PCR wurde das HRM durchgeführt. Dazu werden die Proben zunächst auf 40°C abgekühlt, so dass die DNA möglichst komplett in Doppelsträngen vorliegt. Die Fluoreszenz von *SYBR® Green I* ist jetzt, da die DNA in Doppelsträngen vorliegt und somit möglichst viel Farbstoff binden kann, am stärksten (Zipper et al., 2004). Anschließend wird die Temperatur mit 1°C/s von 60°C auf 95°C erhöht. Dabei denaturiert die DNA und liegt dann wieder in Einzelsträngen vor. Da *SYBR® Green I* v.a. an Doppelstrang-DNA gebunden fluoresziert (Zipper et al., 2004), fällt die Stärke der Fluoreszenz beim Erreichen der für die Denaturierung des jeweiligen PCR-Produktes notwendigen Temperatur (Schmelztemperatur (T_m), englisch *melting temperature*) schlagartig ab, da die DNA in Einzelstränge zerfällt. Es entsteht so für jede Probe eine Schmelzkurve.

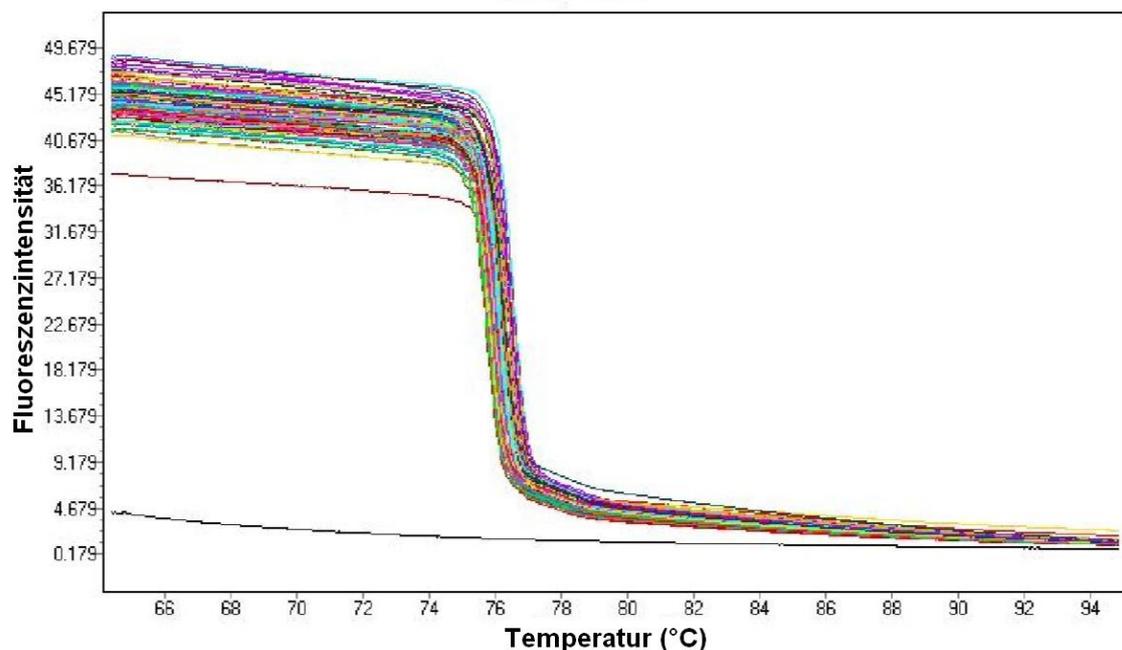


Abbildung 5: Darstellung der Schmelzkurven von 95 gepollten Proben (verschiedenfarbig) und einem Leerwert (schwarz) beim *High Resolution Melting*.

Die Schmelztemperatur hängt dabei vom Anteil an Guanin/Cytosin im PCR-Produkt, der Länge des Produktes, der DNA-Sequenz und einer möglichen Heterozygotie des PCR-Produktes ab (Reed et al., 2007).

Die Schmelzkurven der PCR-Produkte des gleichen DNA-Abschnittes verschiedener Individuen können jetzt miteinander verglichen werden. Wenn sie

die gleiche Basenzusammensetzung haben, sind ihre Schmelzkurven nahezu identisch. Liegt eine Mutation, Variante oder ein *Single Nukleotid Polymorphism* (SNP) mit einem heterozygoten Austausch von Guanin (G) oder Cytosin (C) zu Adenin (A) oder Thymin (T) vor, ist die T_m der Probe verändert und es kommt zudem zu einem *Missmatch* der dsDNA an der Stelle des SNP und damit zur Bildung eines *Heteroduplex* (Gundry, 2003; Liew et al., 2004; Zhou et al., 2004). Dies führt zu einer deutlich veränderten Schmelzkurve (Gundry, 2003; Liew et al., 2004). Bei einem heterozygoten Austausch von G zu C oder A zu T kann die T_m relativ unverändert bleiben, es kommt jedoch weiterhin zur Bildung von *Heteroduplices*, wodurch die Schmelzkurve der Probe verändert wird (Gundry, 2003; Zhou et al., 2004). Bei einem homozygoten SNP kommt es hingegen nicht zur Bildung von *Heteroduplices*, es kann jedoch durch die veränderte Basenzusammensetzung zu einer Abweichung der T_m im Vergleich zum Wildtyp kommen (Gundry, 2003; Liew et al., 2004; Zhou et al., 2004). Um diese SNPs besser detektieren zu können, haben wir immer die PCR-Produkte von zwei verschiedenen Individuen gemischt (*gepoolt*) oder den Wildtyp hinzugegeben. So lagern sich in einer Reaktion auch DNA-Stränge der Mutante und des Wildtyps zusammen und es kommt zur Bildung von *Heteroduplices* (Liew et al., 2004). Durch die dann fehlende Bindung der DNA-Stränge im Bereich des SNP wird der Schmelzpunkt der Probe gesenkt, was zu einer stärker veränderten Schmelzkurve führt (Capper et al., 2015; Liew et al., 2004; Palais et al., 2005; Zhou et al., 2004). Wir haben dazu Platten mit 95 Proben, also 190 PCR-Produkten von einzelnen Individuen und einem Leerwert mit Wasser verwendet.

Tabelle 14: Material für das *High Resolution Melting*

Name	Hersteller	Bestellnummer
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	Roche	04909631001
MgCl ₂ Stock Solution	Roche	11699113001
LiChrosolv® Wasser	MERCK	1.15333.2500

Tabelle 15: Pipettierprotokoll für das *High Resolution Melting*, PCR=Polymerase Chain Reaction

Reagenz	Volumen (µl)
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	7,5
Magnesiumchlorid	1,8
Wasser	0,7
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
PCR-Produkt (gepoolte DNA)	2 mal 2µl

Tabelle 16: *High Resolution Melting* (HRM) Protokoll. ¹Die Temperatur variiert je nach Primerpaar. PCR = Polymerase Chain Reaction

Temperatur (°C)	Haltezeit (mm:ss)	Ramp-Rate (°C/s)	2. Zieltemperatur bei Touchdown PCR (°C)	Schrittgröße (°C/Zyklus)
Pre-Inkubation 1 Zyklus				
95	05:00	4,4		
Amplifikation 45-55 Zyklen				
95	20	2,0		
65 ¹	20	2,0	53 ¹	0,5
72	20	2,0		
HRM 1 Zyklus				
95	01:00	4,4		
40	01:00	2,2		
65	00:01	1		
95		0,02		
Kühlen 1 Zyklus				
40	00:30	2,2		

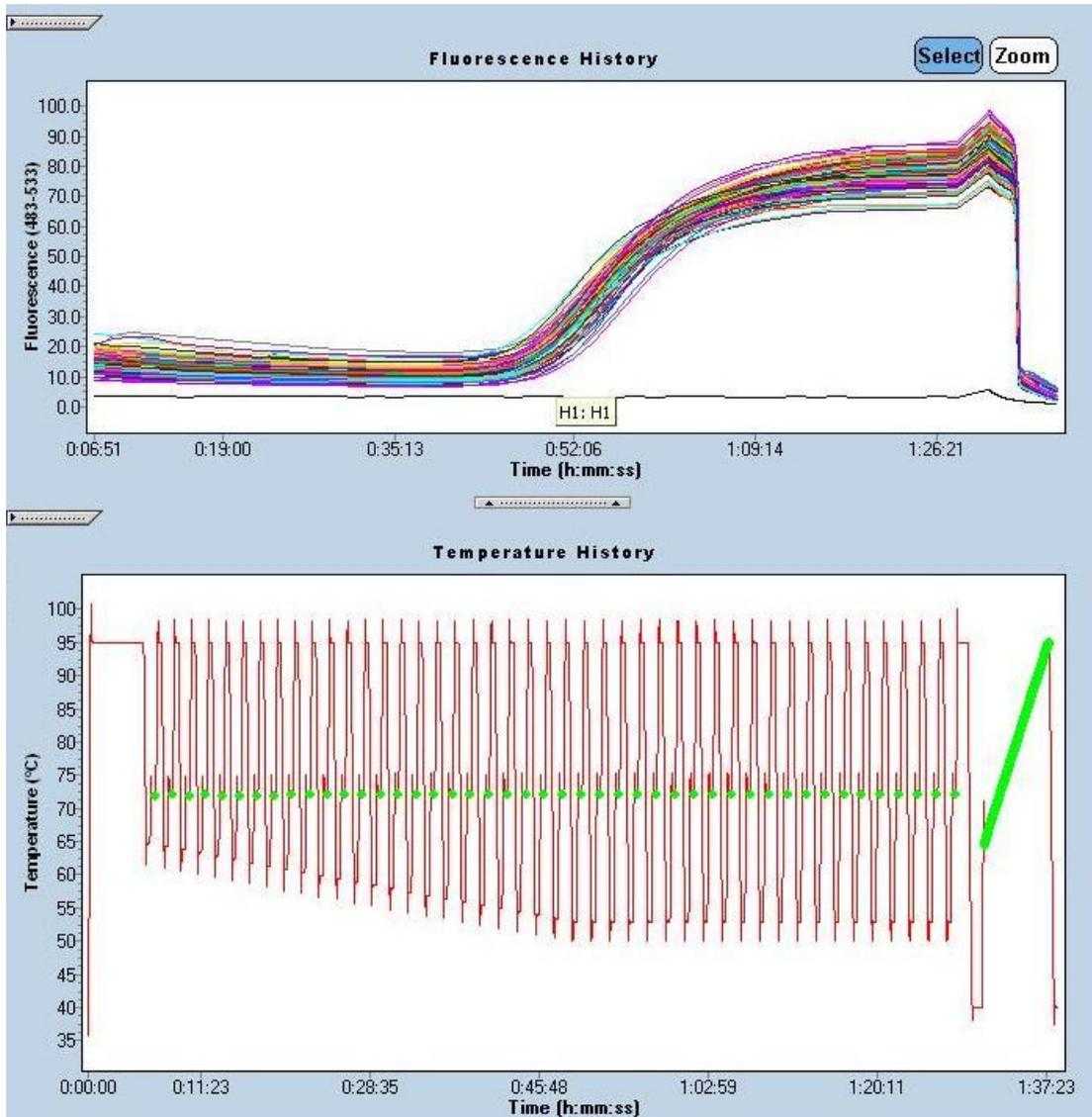


Abbildung 6

Screenshot aus der LightCycler® 480 - Software: Ablauf einer *Realtime Polymerase Chain Reaction* (PCR) mit einem *High Resolution Melting* (HRM) am Light-Cycler 480®. Oben ist die Stärke der Fluoreszenz über die Zeit und unten der Temperaturverlauf über die Zeit dargestellt. Am Anfang verläuft die Fluoreszenzkurve sehr flach, da erst nach einigen PCR-Zyklen die DNA-Konzentration hoch genug ist, damit die Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen hinaus ansteigt. In den nächsten Zyklen steigt die DNA-Konzentration dann kontinuierlich an, bis die PCR-Reagenzien aufgebraucht sind und es zu einer Plateau-Phase kommt. Zum Schluss wird das HRM durchgeführt. Dabei fällt die Fluoreszenz beim Erreichen der Schmelztemperatur schlagartig ab.

2.5.3.3. Auswertung mit der LightCycler® 480 Gene Scanning Software

Zum Vergleich der einzelnen Schmelzkurven haben wir die LightCycler® 480 Gene Scanning Software verwendet. Mit dieser Software können in mehreren Schritten die Schmelzkurven automatisch normalisiert und im direkten Vergleich zu einander ausgewertet werden. Im ersten Schritt werden nach Angaben des Handbuchs negative Proben identifiziert und von der Analyse ausgenommen. Im zweiten Schritt werden die Kurven normalisiert. Dafür werden für jede Kurve die Fluoreszenzwerte vor dem Schmelzpunkt als relativer Wert von 100% und die Fluoreszenzwerte nach dem Schmelzpunkt als 0% gesetzt. Die Kurven können so besser übereinandergelegt und verglichen werden. Im dritten Schritt wird die Achse der Temperatur angepasst. Dabei wird für jede Kurve der Wert bestimmt, ab dem die gesamte dsDNA denaturiert ist. Diese werden dann ebenfalls normalisiert. Im letzten Schritt werden die Kurven von einer als Standard definierten Kurve subtrahiert. Es werden also nur noch die Differenzen der einzelnen Kurven dargestellt. Jetzt sind eventuelle Mutationen direkt sichtbar und werden farblich markiert (siehe Abbildung 7).

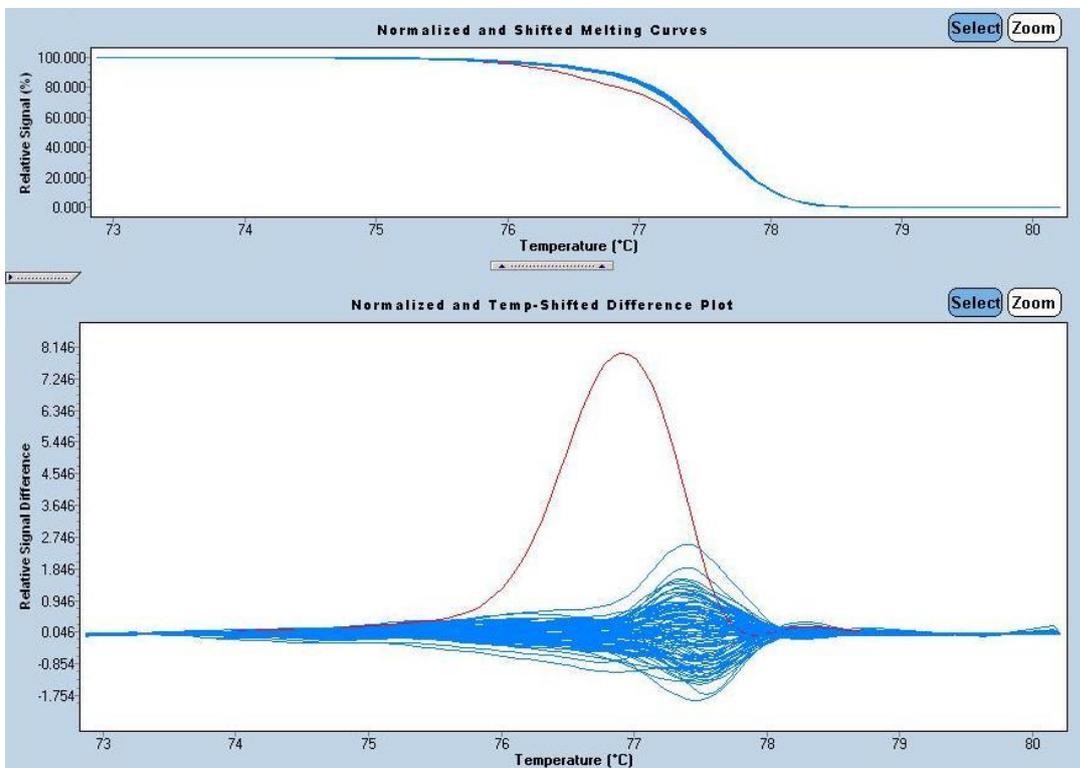


Abbildung 7: Screenshot aus der LightCycler® 480 Gene Scanning Software: Auswertung von Exon 16 mit 95 Proben auf einer Platte. Oben sind die normalisierten Schmelzkurven und unten die Differenzen der einzelnen Kurven dargestellt. In rot ist die heterozygote Mutation R450C hervorgehoben.

2.5.4. DNA-Sequenzierung nach Sanger

Zur Sequenzierung auffälliger Proben haben wir die DNA-Sequenz mit der Kettenabbruch-Synthese nach Sanger dargestellt (Sanger und Coulson, 1975). Dazu gibt man zum PCR-Produkt einen *Primer*, dNTPs, *Didesoxyribonukleosid-Triphosphate* (ddNTP), eine DNA-Polymerase und Puffer. Der *Primer* bindet an die DNA und die DNA-Polymerase beginnt vom *Primer* aus einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Den ddNTPs fehlt sowohl an Position 2' und 3' eine Hydroxygruppe. Durch die fehlende Hydroxygruppe an Position 3' kann an den ddNTP kein weiteres (d)dNTP angehängt werden und es kommt zum Kettenabbruch. Dabei wird, an immer einer zufälligen Stelle, statt eines dNTP ein ddNTP eingebaut und die Synthese des Stranges damit unterbrochen. In der darauffolgenden Kapillarelektrophorese kann dann die jeweilige Base anhand des Farbstoffes und ihre Position anhand der Länge des DNA-Stranges identifiziert werden. Da jeder der vier ddNTPs mit einem anderen Fluoreszenz-Farbstoff markiert ist, können alle vier Basen gemeinsam untersucht werden. Man erhält somit eine komplette Darstellung der Basenreihenfolge hinter dem *Primer* (Sanger et al., 1977).

Wir haben hierfür das *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* von Applied Biosystems™ verwendet. Hierfür wird, um eine ausreichend große Menge der zu sequenzierenden DNA zu erhalten, zunächst eine PCR des entsprechenden DNA-Abschnittes durchgeführt (siehe Kap. 2.5.1). Das PCR Produkt wird danach zuerst mittels Alkoholfällung aufgereinigt. Dabei werden zu 15µl PCR-Produkt 1,5µl 3M NaAcetat und 37,5µl 99%iger Ethanol gegeben. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend bei 4600 Umdrehungen pro Minute bei 8°C für 45 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend vorsichtig abgesaugt und das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und jeweils nochmal für 15 Minuten zentrifugiert. Danach wird das Pellet bei Zimmertemperatur getrocknet und in 10µl *Aqua destillata* gelöst.

Im Anschluss erfolgt die Sequenzierung mittels *Cycle Sequencing* mit dem *BigDye® Terminator v3.1* nach Angaben des Herstellers.

Tabelle 17: Material für die Sequenzierung

Name	Hersteller	Bestellnummer
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied biosystems™	4336919
3M NaAcetat pH 4,8	Verschiedene	
Ethanol absolut zur Analyse EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	MERCK Millipore	1009832511

Tabelle 18: Reaktionsansatz zur Sequenzierung

Reagenz	Volumen
Gereinigte DNA	5,5µl
BigDye® Puffer	2µ
BigDye® Terminator v3.1	2µl
Primer	0,5µl
Gesamtvolumen	10µl

Tabelle 19: Protokoll zur Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1.	96°C	1 Minute	Start-Denaturierung
2.	96°C	10 Sekunden	Denaturierung
3.	50°C	5 Sekunden	Primerhybridisierung
4.	60°C	4 Minuten	Elongation
	25mal Wiederholung der Schritte 2-4		
6.	4°C	Dauerhaft	Lagerung

Das Produkt des *Cycle Sequencing* wird, wie oben beschrieben, erneut aufgereinigt und im Anschluss mittels Elektrophorese mit dem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer sequenziert. Hierdurch werden die unterschiedlich farblich markierten ddNTPs mit ihrer genauen Position/Abstand hinter dem *Primer* dargestellt.

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden für jede Probe als Datei gespeichert und dann mit der Software gap4 des Staden Package 1.7.0 [<http://staden.sourceforge.net/>] ausgewertet. Mithilfe dieser Software kann entweder jede Base einer einzelnen DNA-Probe untersucht werden oder es können verschiedene DNA-Proben miteinander verglichen und so durch Unterschiede Rückschlüsse auf eine Mutation gezogen werden.

2.5.5. Restriktionsenzymverdau

Als Restriktionsenzyme bzw. Restriktionsendonukleasen (REN) werden Enzyme bezeichnet, die an die DNA an einer spezifischen Basenabfolge binden

und diese dort schneiden können (Arber und Linn, 1969; Danna und Nathans, 1971). Die REN wurden 1969 von Arber et al. (Arber und Linn, 1969) beschrieben und es sind eine Vielzahl von verschiedenen REN bekannt, die jeweils an andere DNA-Sequenzen binden und diese schneiden dort können (Roberts, 1980; Smith und Nathans, 1973).

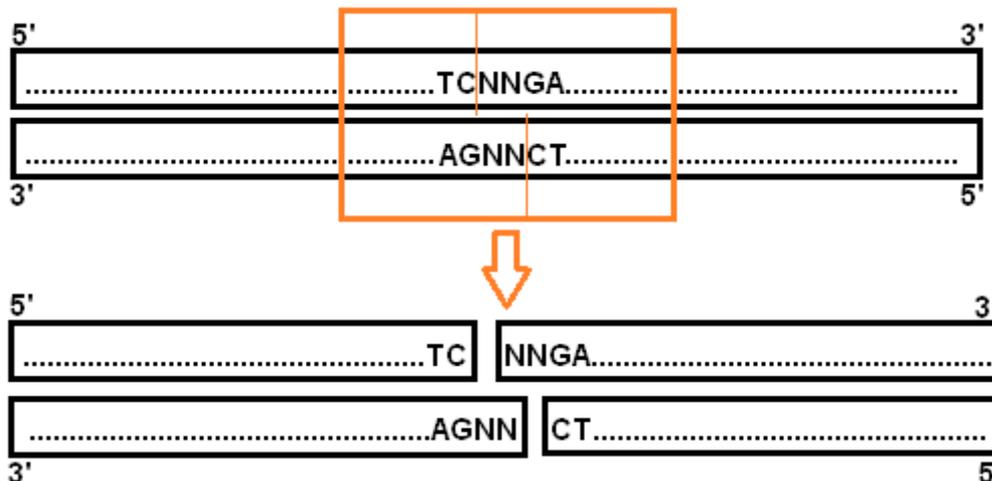


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Restriktionsenzymverdau mit Hpy188III (New England Biolabs). T=Thymin, A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, N=beliebige Base(A/T/C/G). Hpy188III schneidet die DNA zwischen TC und NNGA und somit an der markierten Stelle.

Den Restriktionsenzymverdau verwenden wir als eine Möglichkeit, um einen SNP bzw. eine Variante sicher nachzuweisen (Fu et al., 2016). Dazu wird ein Restriktionsenzym verwendet, das entweder nur den Wildtyp (Wt) oder nur die Mutante (Mt) im PCR-Produkt schneiden kann. So erhält man für die Mutante und den Wildtyp unterschiedlich viele und unterschiedlich lange DNA-Abschnitte. Diese können mittels Gelelektrophorese dargestellt werden. Welches Restriktionsenzym zur Testung einer Mutation in Frage kommt, wurde über die *Online-Software* NEBcutter V2.0 [<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>] getestet.

Tabelle 20: Verwendete Restriktionsenzyme (bp=Basenpaare, NEB=New England Biolabs, Wt=Wildtyp, Mt=Mutante)

Mutation	Enzym	Produkt Wt	Produkt Mt	Hersteller	BestellNr
R272Q	Taq ^o I	120 + 169bp	289bp	NEB	R0149
R450C	Hpy188III	47 + 148bp	195bp	NEB	R0622

Tabelle 21: Restriktionsenzymverdau-Protokoll

Reagenz	Volumen
Restriktionsenzym	2µl
Puffer nach Herstellerangaben	2µ
Rinderserumalbumin (BSA)	0,2µl
Aqua destillata	0,8µl
PCR-Produkt	15µl
Gesamtvolumen	20µl

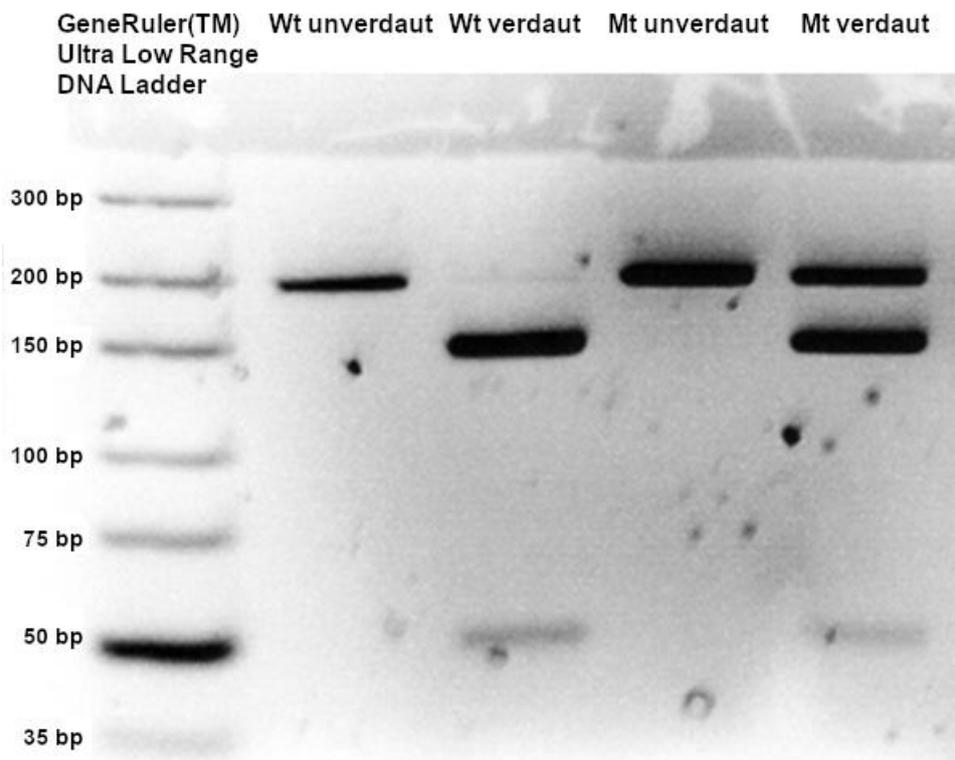


Abbildung 9: Beispiel eines Restriktionsenzymverdau zur Untersuchung der Mutation R450C in Exon 16 des *RHOT1*-Gens. Das Restriktionsenzym Hpy188III schneidet nur das 195 Basenpaare (bp) lange PCR-Produkt des Wildtyp (Wt) in ein 148 bp und ein 47 bp großes Fragment. Die Mutante (Mt) ist in diesem Beispiel heterozygot. Da das Enzym die Mt nicht schneiden kann, sind bei der Mt sowohl das 195 bp lange Ursprungs-PCR-Produkt als auch die durch das Restriktionsenzym geschnittenen 148 bp und 47 bp langen Produkte sichtbar.

2.5.6. SNaPshot® (Applied Biosystems)

SNaPshot® (Applied Biosystems) ist eine Methode, mit der man mittels *Single Base Extension* eine bekannte oder vermutete Mutation bzw. SNP nachweisen

kann (Di Cristofaro et al., 2010; Magnin et al., 2011). Dabei wird an einen *Primer*, der so an die *Template*-DNA anlagert, dass an seinem 3'-Ende die untersuchte Base liegt, genau ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid angehängt. Dieses lässt sich in der Elektrophorese dann darstellen.

Wir haben hierfür das SNaPshot® Multiplex Kit von ABI nach den Angaben im Handbuch verwendet. Zuerst wird für jede Variante/SNP ein *Primer* generiert. Dieser muss so an die *Template*-DNA anlagern, dass der SNP an seinem 3'-Ende liegt. Um verschiedene SNPs im gleichen Durchlauf testen zu können, generiert man die *Primer* mit verschiedenen Längen. Der Längenunterschied sollte dabei mind. 8 Basen betragen. Dazu wurde, wie im Handbuch empfohlen, ein Poly-T-Schwanz (verschieden viele Desoxythymidintriphosphate) an den *Primer* angehängt. Die im Kit enthaltene DNA-Polymerase bindet dann ein ddNTP an den *Primer* in 3'-Richtung. Durch die Verwendung von ddNTPs wird nur ein ddNTP angehängt (siehe auch Kap. 2.5.4), das genau die untersuchte Base darstellt. Jedes der 4 ddNTPs ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert (A=Grün (Farbstoff: dR6G) C=Schwarz (dTAMRA™), G=Blau (dR110), T=Rot (dROX™)). So lässt sich in der anschließenden Elektrophorese die Base an der untersuchten Position genau bestimmen.



Abbildung 10: Schematische Darstellung der SNaPshot®-Untersuchung der Mutation R450C. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin, ddNTP=Didesoxyribonukleosid-Triphosphat. DNA=Deoxyribonucleic acid). Der Primer wird so ausgewählt dass an seinem 3'-Ende die zu untersuchte Base liegt (in rot markiert). Die DNA-Polymerase bindet genau ein ddNTP an den Primer in 3'-Richtung an. Dieses ddNTP entspricht somit der Base an der untersuchten DNA-Position und lässt sich durch den verwendeten Farbstoff identifizieren.

Wenn verschiedene SNPs im gleichen Durchlauf untersucht werden sollen, kann man die PCR-Produkte vorher mischen (*poolen*). Das gleiche gilt für die

Primer. Dabei muss man die einzelnen *Primer*-Konzentrationen je nach Ergebnis ggf. anpassen.

Zur Vermeidung von Messfehlern durch Verunreinigungen muss sowohl das Ausgangs-PCR-Produkt als auch das Produkt nach dem *Thermal-Cycling* zunächst gereinigt werden. Dabei werden die verwendeten *Primer* und die unverbrauchten dNTPs entfernt. Dazu wurde, wie im Handbuch empfohlen, der enzymatische Verdau mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) und *Exonuclease I* (Exo I) verwendet. SAP dephosphoryliert dNTPs während Exo I Einzelstrang-DNA von 3' nach 5' hydrolysiert. Hierdurch werden überflüssige *Primer* und *Nukleotide* entfernt. (Bell, 2008; Han et al., 2011; Werle et al., 1994).

Nach der Aufreinigung erfolgt die SNaPshot®-Multiplex-PCR. Hierbei bindet die Polymerase an den *Primer* und hängt genau ein ddNTP an den *Primer* in 3'-Richtung an. Zur Entfernung der nicht verbrauchten ddNTPs im PCR-Ansatz erfolgt im Anschluss eine erneute Aufreinigung mittels SAP-Verdau. Im Anschluss wird das SNaPshot®-PCR-Produkt zur Elektrophorese im *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser* nach den Angaben im Handbuch mit Formamide und *GeneScan™-120 LIZ® Size Standard* vorbereitet und die Proben mit der GeneMapper® 4.1 Software von ABI ausgewertet.

Tabelle 22: Material für SNaPshot®

Name	Hersteller	Bestellnummer
SNaPshot® Multiplex Kit	Applied biosystems™	4323159
GeneScan™-120 LIZ® Size Standard	Applied biosystems™	4324287
Formamide	Verschiedene	
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Affymetrix / USB	78390
Exonuclease I (Exo I)	Affymetrix / USB	70073Z 2500

Tabelle 23: Aufreinigung mittels Enzymverdau

Item	Volumen
PCR Produkt	7,5 µl
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	2,5 Units
Exonuclease I (Exo I)	1,0 Units
Total	11 µl

Tabelle 24: Enzymverdau-Protokoll

Schritt	Temperatur	Dauer
Inkubation	37°C	Ca. 1 Stunde
Inaktivierung	75°C	15 Minuten
Lagerung	4°C	Dauerhaft

Tabelle 25: SNaPshot®-Protokoll

	Volumen (µl)
SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix	2
Gepoolte PCR-Produkte	3
Gepoolte Primer	0,5
Deionisiertes Wasser	4,5
Total	10

Tabelle 26: SNaPshot®-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1	96°C	10 Sekunden
2	50°C	5 Sekunden
3	60°C	30 Sekunden
4	24 mal Wiederholung von Schritt 1-3	
5	4°C	Dauerhaft

Tabelle 27: Post-Extension Treatment

	Volumen (µl)
PCR-Produkt	10
SAP	1,0 Units

Tabelle 28: Post-Extension Treatment Protokoll

Schritt	Temperatur	Dauer
Inkubation	37°C	1 Stunde
Inaktivierung	75°C	15 Minuten
Lagerung	4°C	Dauerhaft

2.5.7. MutationTaster

Zur Überprüfung der Relevanz einer Mutation/SNP im Hinblick auf eine mögliche pathogenetische Relevanz haben wir die Mutationen mit der Software MutationTaster2 [<http://mutationtaster.org/>] überprüft. Diese Software gibt eine Einschätzung, ob eine Mutation krankheitsrelevant sein kann (Schwarz et al., 2014).

3. Ergebnisse

Zur Untersuchung des Miro1/RHOT1-Gens auf Mutationen haben wir die DNA-Proben von 752 Patienten mit klinisch gesichertem Parkinson-Syndrom analysiert. Wir haben die Miro1-Sequenz in einzelnen Exons untersucht. Von den 21 Exons ließen sich für die Exons 2-21 ein PCR-Protokoll etablieren, das ein qualitativ ausreichendes PCR-Produkt lieferte, einzig für das Exon1 ließ sich trotz der Verwendung von verschiedenen *reverse* und *forward* Primern und PCR-Protokollen inkl. einer *Touchdown*-PCR kein entsprechendes Protokoll etablieren. Bei Exon1 gab es bei den Versuchen zu viele Nebenprodukte bei der PCR, und sowohl beim HRMA am LightCycler® 480 als auch bei der Sequenzierung waren die Ergebnisse unzureichend. Exon1 wurde daher in dieser Studie nicht untersucht.

Als Screeningmethode wurden zuerst alle Proben mittels HRMA im LightCycler® 480 auf Mutationen untersucht. Proben, die eine auffällige Schmelzkurve zeigten, wurden im nächsten Schritt zur weiteren Abklärung nach Sanger sequenziert. Bestätigten sich hierbei Mutationen/SNPs, haben wir die jeweilige Probe mittels Restriktionsenzymverdau oder SNaPshot® überprüft und so die eventuelle Mutation bestätigen oder verwerfen können. Da SNaPshot® aufwendiger zu etablieren ist als ein Restriktionsenzymverdau, wurde, wenn möglich, der Restriktionsenzymverdau vorgezogen. Nur bei Mutationen, bei denen es kein Restriktionsenzym zu erwerben gab, welches die DNA so schneidet, dass man die Mutationen hätte bestätigen können, wurde primär SNaPshot® eingesetzt.

Die von uns gefundenen Mutationen wurden im Anschluss in einer gesunden Kontrollgruppe mittels SNaPshot® gesucht. Hierbei auffällige Proben haben wir ebenfalls mittels Restriktionsenzymverdau oder Sequenzierung kontrolliert.

3.1 Varianten/SNPs im intronischen Bereich

3.1.1 17: 32208329A>G (rs377468429) 20bp *upstream* von Exon 18

Beim HRM der PCR-Amplifikate von Exon 18 zeigte sich eine auffällige und von den anderen Kurven abweichende Schmelzkurve.

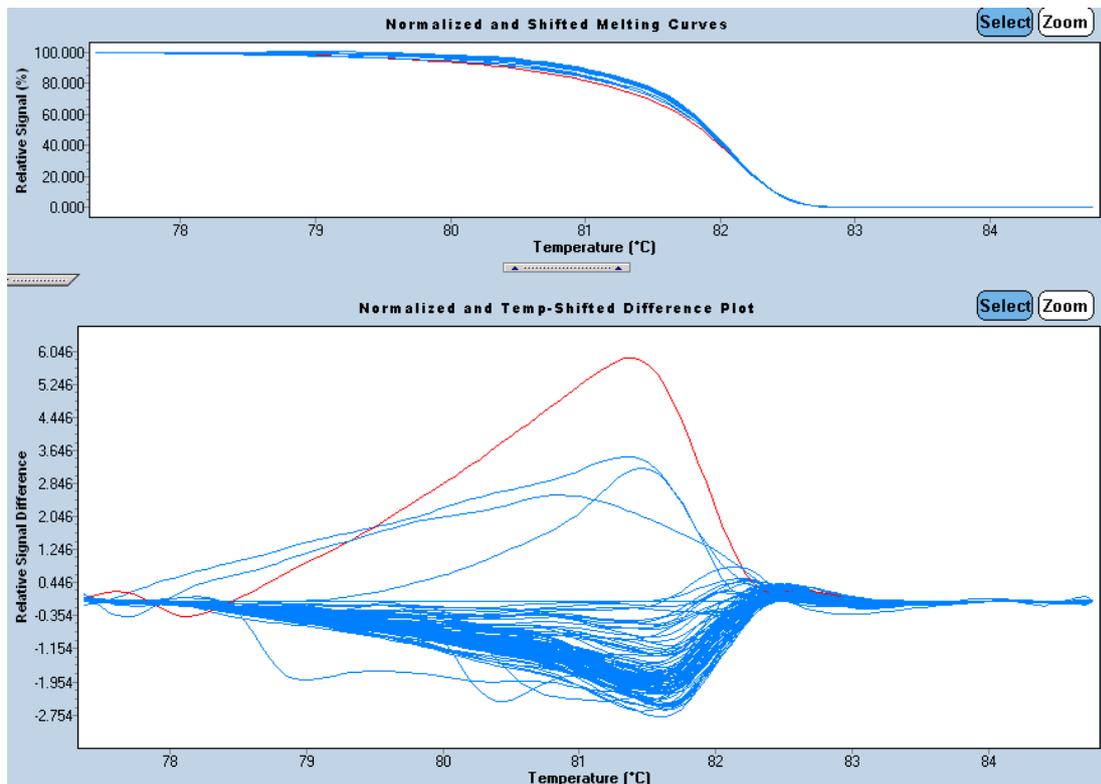


Abbildung 11 *Screenshot* aus der LightCycler® 480 GeneScanning-Software

Es sind Schmelzkurven von 95 gepoolten Proben des Exon 18 dargestellt. Oben sind die Schmelzkurven zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert worden. Unten sind die Differenzen der einzelnen Schmelzkurven von einer Referenzkurve dargestellt. Auffällige Proben werden dabei automatisch farbig hervorgehoben. Die rote Kurve stellt die Schmelzkurve der Probe mit der intronischen Variante 17:32208329A>G (rs377468429) dar

Zur weiteren Abklärung erfolgte eine Sequenzierung der entsprechenden Probe und es konnte ein heterozygoter Basenaustausch von Adenosin nach Guanodin 20bp in 5'-Richtung (*upstream*) von Exon 18 gezeigt werden.

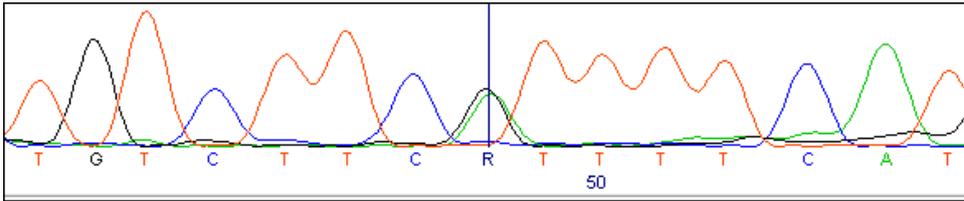


Abbildung 12 Variante 17:32208329A>G (rs377468429) in der Sequenzierung. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin, R=heterozygote Variante)

Diese Variante ist unter der Bezeichnung rs377468429 bereits bekannt. (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;v=rs377468429, 23.10.2018)

3.1.2 17:32175936G>A (rs8076276) 26bp downstream von Exon 5

Beim HRM der PCR-Amplifikate von Exon 5 zeigte sich auch eine auffällige und von den anderen Kurven abweichende Schmelzkurve.

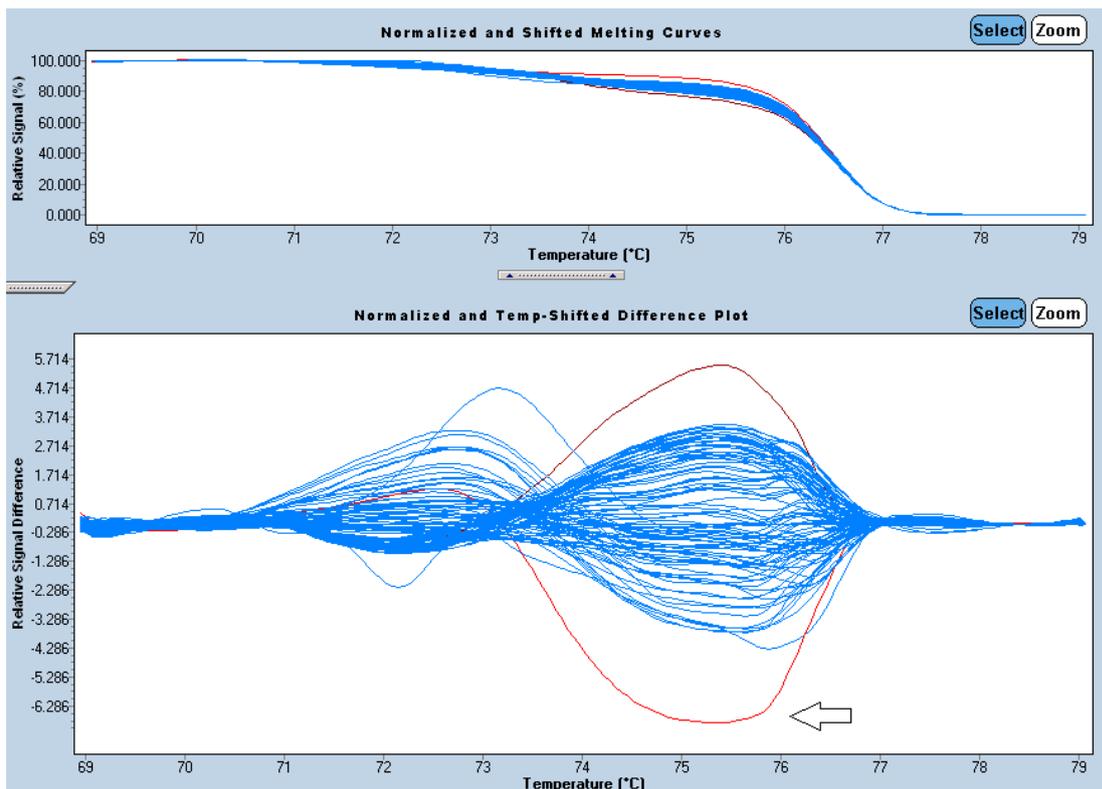


Abbildung 13 Screenshot aus der LightCycler® 480 GeneScanning-Software

Es sind die Schmelzkurven von Exon 5 bei 95 gepoolten Proben dargestellt. Oben sind die Schmelzkurven zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert worden. Unten sind die Differenzen der einzelnen Schmelzkurven von einer Referenzkurve dargestellt. Auffällige Proben werden dabei automatisch farbig hervorgehoben. Die hellrote Kurve (mit einem Pfeil markiert) stellt die Schmelzkurve der Probe mit der Variante 17:32175936G>A (rs8076276) dar.

Es erfolgte daraufhin eine Sequenzierung der entsprechenden Probe (mit dem Pfeil markiert) und es zeigte sich eine Variante mit einem Basenaustausch von Adenosin nach Guanin 26bp in 3'-Richtung (*downstream*) von Exon 5 im intronischen Bereich.

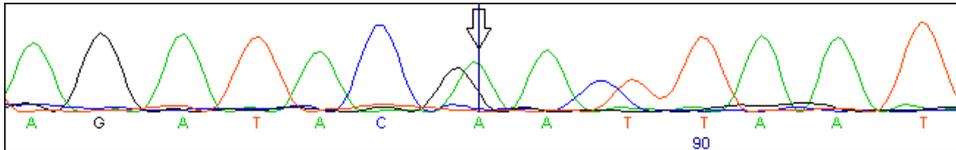


Abbildung 14 Sequenzierung der Variante 17:32175936G>A (rs8076276) mit einem Pfeil markiert. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin)

Diese Variante ist unter der Bezeichnung rs8076276 bereits bekannt (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Context?db=core;v=rs8076276, 23.10.2018).

3.1.3 17:32175938T>C (rs763188874) 24bp *downstream* von Exon 5

In der Sequenzierung der unter 3.1.2 gezeigten DNA-Probe konnte eine zweite Variante (17:32175938T>C) 24bp *downstream* von Exon 5 gezeigt werden.

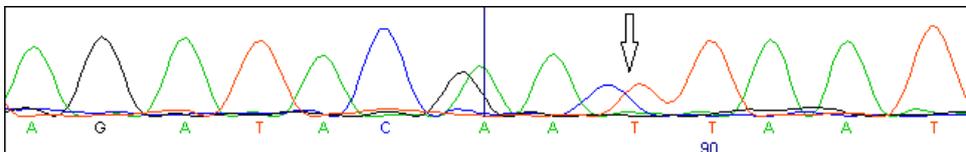


Abbildung 15 Sequenzierung der Variante 17:32175938T>C (rs763188874) mit einem Pfeil markiert. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin)

Auch diese Variante ist bereits unter der Bezeichnung rs763188874 bekannt (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;v=rs763188874, 23.10.2018).

3.2 Varianten/SNPs im Exon ohne Einfluss auf die Aminosäuresequenz (Synonymous Coding)

3.2.1 c.1125G>A (rs114899192) im Exon 14

Beim HRM der PCR-Amplifikate von Exon 14 fielen bei 4 Proben signifikant von den anderen Proben abweichende Schmelzkurven auf.

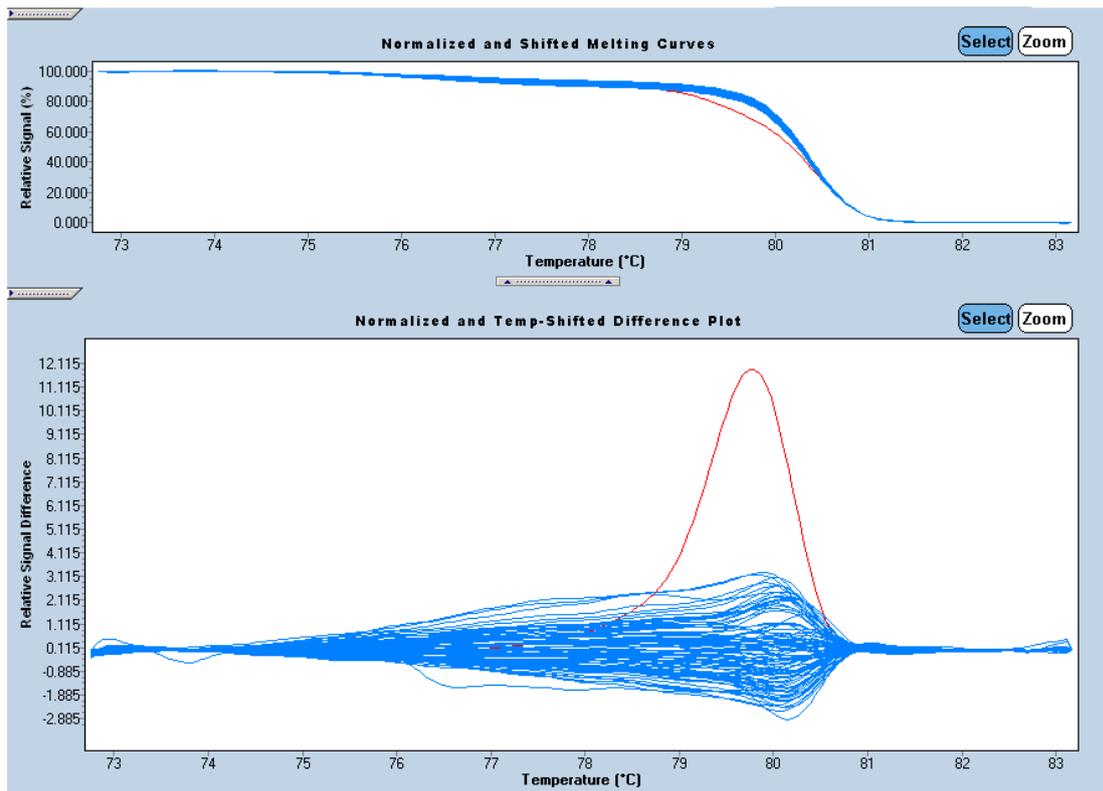


Abbildung 16: Screenshot aus der LightCycler® 480 GeneScanning-Software

Es sind die Schmelzkurven von Exon 14 bei 95 gepoolten Proben dargestellt. Oben sind die Schmelzkurven zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert worden. Unten sind die Differenzen der einzelnen Schmelzkurven zu einer Referenzkurve dargestellt. Auffällige Proben werden dabei automatisch farbig hervorgehoben. Die rote Kurve stellt die Schmelzkurve einer Probe mit der Variante c.1125G>A dar.

Wir haben diese auffälligen Proben anschließend sequenziert. Dabei zeigte sich bei den 4 Proben eine Variante an cDNA-Position 1125 mit einem Nukleotid-Austausch von Guanosin nach Adenosin.

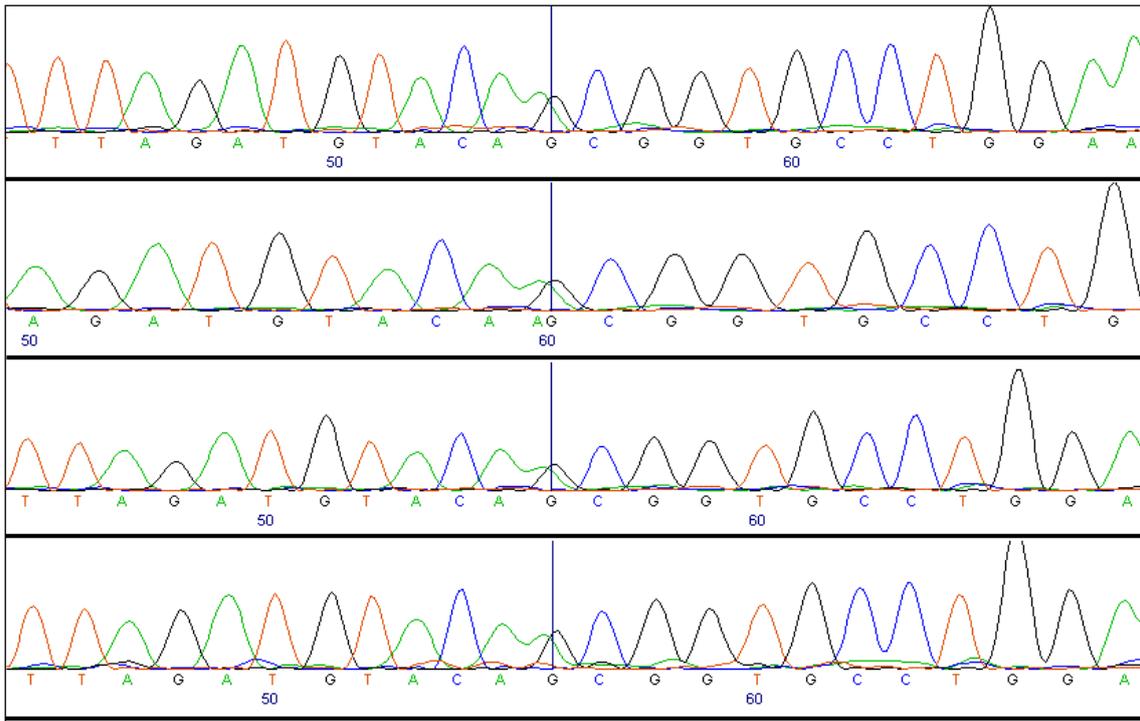


Abbildung 17: 4 Proben mit der Variante c.1125G>A (rs114899192) in der Sequenzierung. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin)

Diese Variante ist unter der Bezeichnung rs114899192 bekannt (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;v=rs114899192, 07.10.2018).

Laut Ensembl.org kommt diese Variante in der Gesamtbevölkerung mit einer Häufigkeit von ca. 0,1% vor (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?v=rs114899192, 23.10.2018). In unseren Proben wurde bei 4 von 752 Patienten diese Variante nachgewiesen, was einer Häufigkeit von ca. 0.5% entspricht. Sowohl die Basensequenz des Wt (CAG) als auch die der Mt (CAA) codieren für Glutamin. Somit handelt es sich um eine *synonymous coding* Variante. Wir haben diese Variante, da sie nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führt und auch in der breiten Bevölkerung vorkommt, nicht weiter untersucht.

3.2.2 c.1104C>T (rs767800498) im Exon 14

In Exon 14 fiel eine weitere Probe auf, deren Schmelzkurve sowohl von den negativen wie auch von den Schmelzkurven der Proben mit der Variante c.1125G>A abwich (In Abb. 18 grün dargestellt).

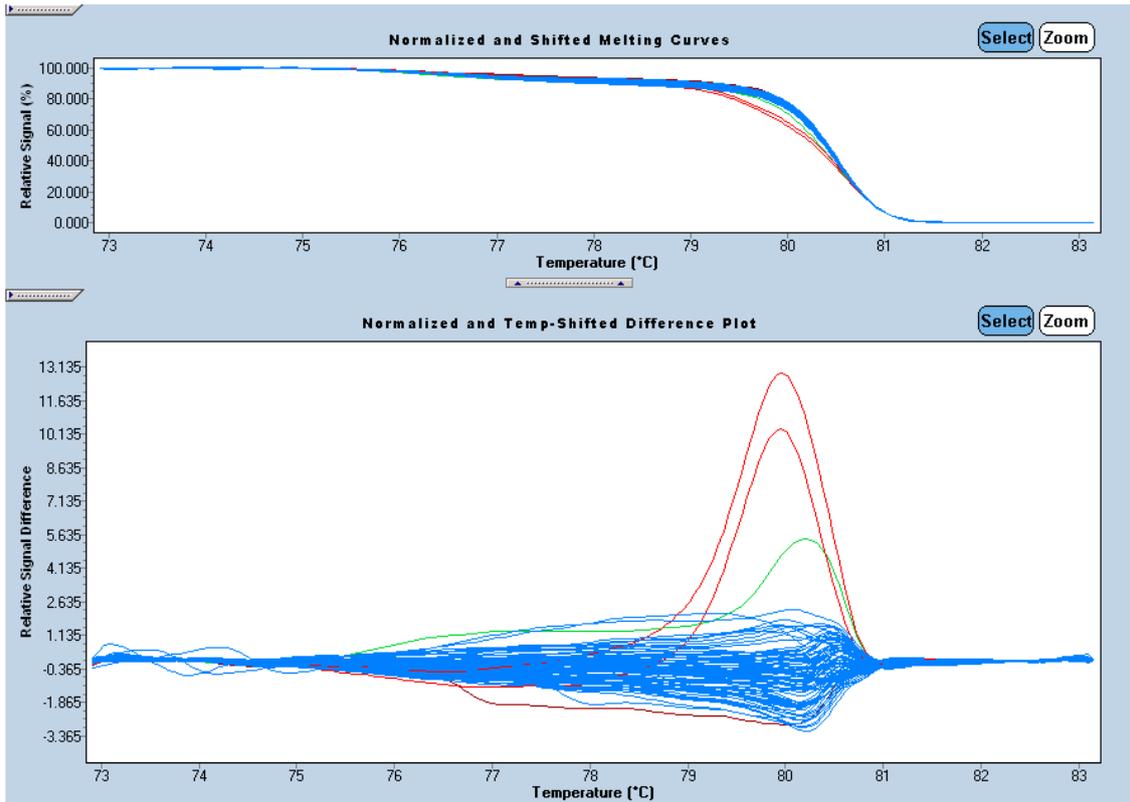


Abbildung 18: Screenshot aus der LightCycler® 480 GeneScanning-Software
 Es sind die Schmelzkurven von Exon 14 bei 95 gepoolten Proben dargestellt. Oben sind die Schmelzkurven zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert worden. Unten sind die Differenzen der einzelnen Schmelzkurven zu einer Referenzkurve dargestellt. Auffällige Proben werden dabei automatisch farbig hervorgehoben. Die grüne Kurve stellt die Schmelzkurve der Probe mit der Variante c.1104C>T dar. Bei den beiden rot dargestellten Kurven handelt es sich um Proben mit der oben beschriebenen Variante c.1125G>A (rs114899192).

Wir haben auch diese Probe sequenziert und es zeigte sich eine heterozygote Variante an cDNA-Position 1104 mit einem Austausch von C nach T.

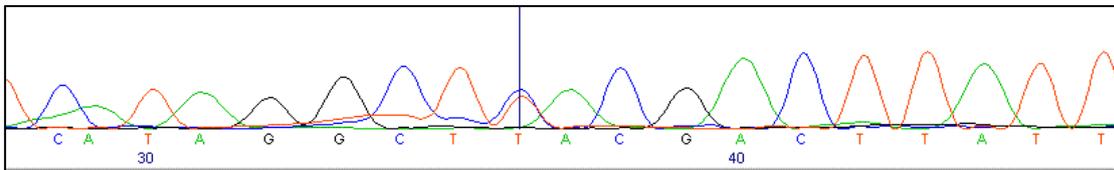


Abbildung 19: Variante c.1104C>T in der Sequenzierung. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin)

Wir haben die Sequenzierung anschließend jeweils mit einem *forward* und einem *reverse Primer* wiederholt. Hierbei bestätigte sich die Variante.

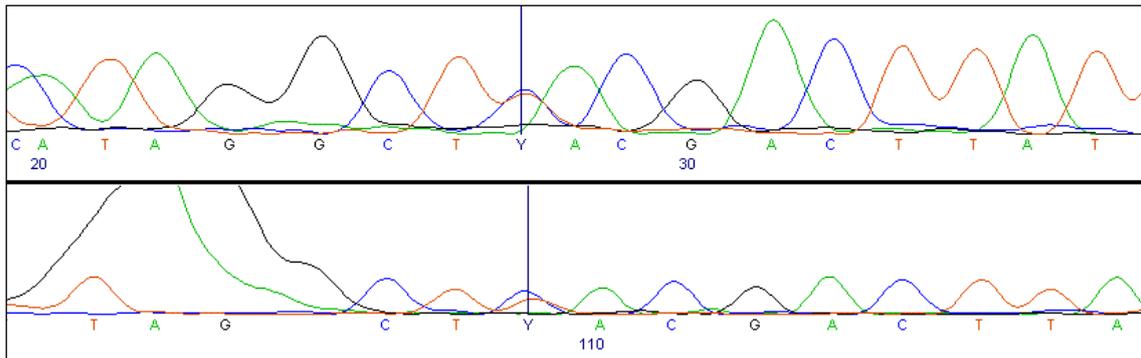


Abbildung 20: Variante c.1104C>T in der Sequenzierung. Oben: *Forward* Primer, Unten: *Reverse* primer. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin, Y=heterozygote Variante)

Diese Variante ist unter der Bezeichnung rs767800498 bereits bekannt (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;v=rs767800498, 23.10.2018).

Da diese Variante zu keinem Aminosäureaustausch führt und damit höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die Proteinfunktion hat, sind wir nicht von einer pathogenetischen Relevanz ausgegangen und es erfolgte keine weitere Untersuchung.

3.2.3 c.1458A>G (rs16967164) in Exon 17

Beim HRM der Proben von Exon 17 zeigten sich sehr viele Proben mit auffälligen, häufig ähnlichen Schmelzkurven, welche von den Schmelzkurven der anderen Proben deutlich abwichen. Es konnten hier drei voneinander abgrenzbare Schmelzkurventypen dargestellt werden.

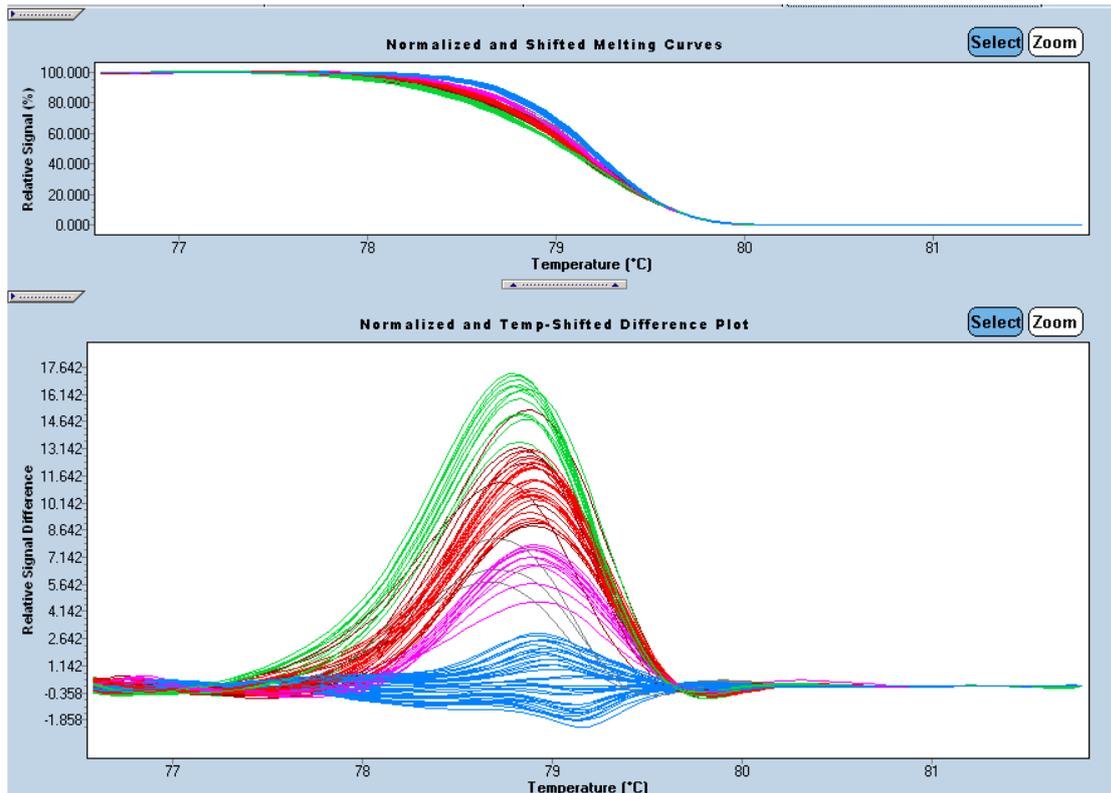


Abbildung 21: Screenshot aus der LightCycler® 480 GeneScanning-Software

Es sind beispielhaft die Schmelzkurven von Exon 17 bei 95 gepoolten Proben der Platten 7 und 8 (von 8) dargestellt. Oben sind die Schmelzkurven zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert worden. Unten sind die Differenzen der einzelnen Schmelzkurven zu einer Referenzkurve dargestellt. Auffällige Proben werden dabei automatisch farbig hervorgehoben. Die blauen Kurven stellen den Wildtyp dar. Unter den Proben mit den grünen Linien fanden sich homozygote Träger des SNP c.1458A>G (rs16967164). Unter den Proben mit den roten und lila Kurven fanden sich heterozygote Träger des SNP c.1458A>G (rs16967164).

Aufgrund der großen Anzahl auffälliger Proben haben wir nur eine Stichprobe von 58 auffälligen Proben sequenziert. In der Sequenzierung der Proben zeigte sich ein Nukleotid-Austausch (A>G) an cDNA-Position 1458. Es fanden sich unter den stichprobenartig getesteten Proben 26 heterozygote Träger des SNP c.1458A>G und 5 homozygote Träger des SNP c.1458A>G. Bei den anderen 27 der 58 getesteten Proben war keine Variante nachweisbar.

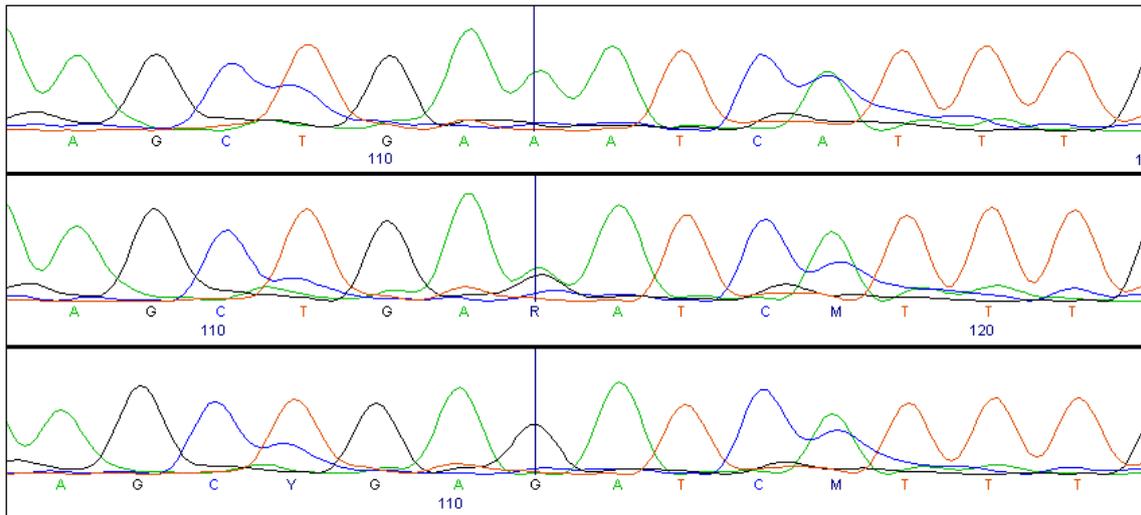


Abbildung 22: SNP c.1458A>G (rs16967164) in der Sequenzierung. Oben ist der Wildtyp, in der Mitte die heterozygote Mutante und unten die homozygote Mutante dargestellt. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin, R=heterozygote Variante)

Dieser SNP ist bereits unter der Bezeichnung rs16967164 (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;v=rs16967164, 23.10.2018) bekannt und führt zu keinem Aminosäureaustausch (*synonymous coding SNP*). Auch hier sind wir nicht von einer pathogenetischen Relevanz ausgegangen und haben daher die anderen Proben nicht weiter untersucht.

3.2.4 c.2031A>G (rs58010811) in Exon 21

Auch beim HRM der Proben mit Exon 21 konnte ebenfalls eine auffällige, von den Schmelzkurven der anderen Proben abweichende, Schmelzkurve dargestellt werden.

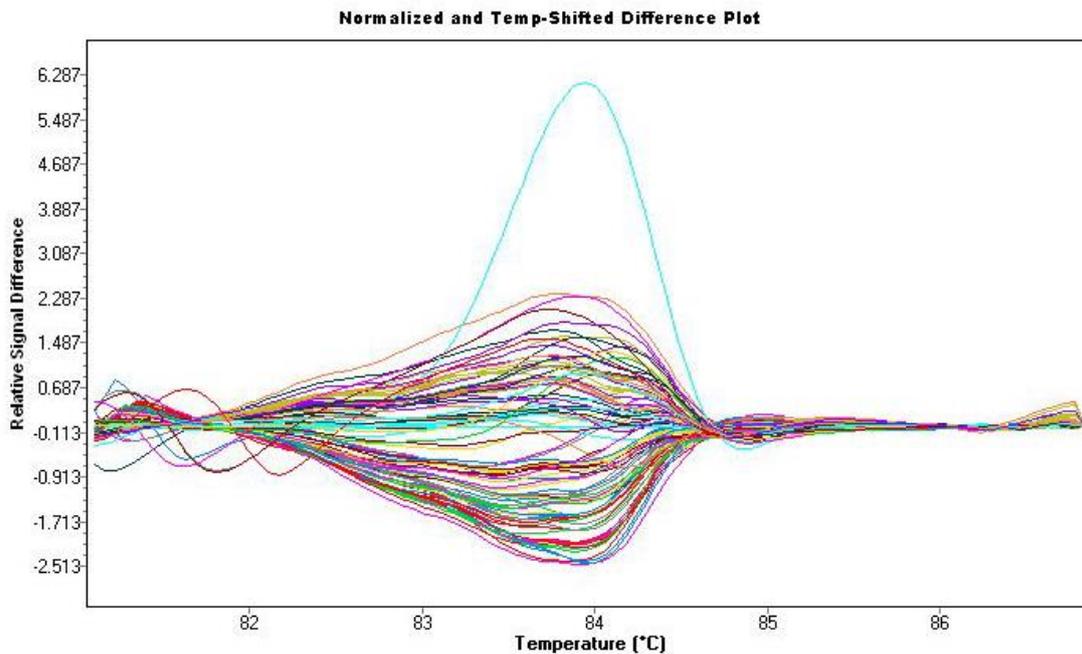


Abbildung 23 Darstellung der *High Resolution Melting Analysis* mit der LightCycler® 480 GeneScanning-Software. Es sind die Schmelzkurven von 95 gepoolten Proben von Exon 21 dargestellt. Die Schmelzkurven sind zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert worden und es sind die Differenzen der einzelnen Schmelzkurven zu einer Referenzkurve dargestellt. Die hellblaue Kurve zeigt den heterozygoten Träger der Variante c.2031A>G (rs58010811).

In der Sequenzierung der auffälligen Probe zeigte sich ein Nukleotid-Austausch (A>G) an cDNA-Position 2031, welcher zu keinem Aminosäureaustausch (*synonymous coding* Variante) führt und unter rs58010811 bekannt ist (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;v=rs58010811, 23.10.2018).

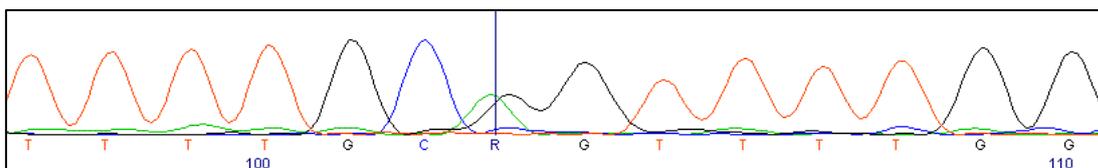


Abbildung 24: Variante c.2031A>G (rs58010811) in der Sequenzierung. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin, R=heterozygote Variante)

3.3 Varianten im Exon mit Veränderung der Aminosäuresequenz (Missense Varianten)

3.3.1 Mutation R272Q im Exon 11

Beim HRM der Proben von Exon 11 zeigte sich bei einer Probe eine deutlich von denen der anderen Proben abweichende Schmelzkurve.

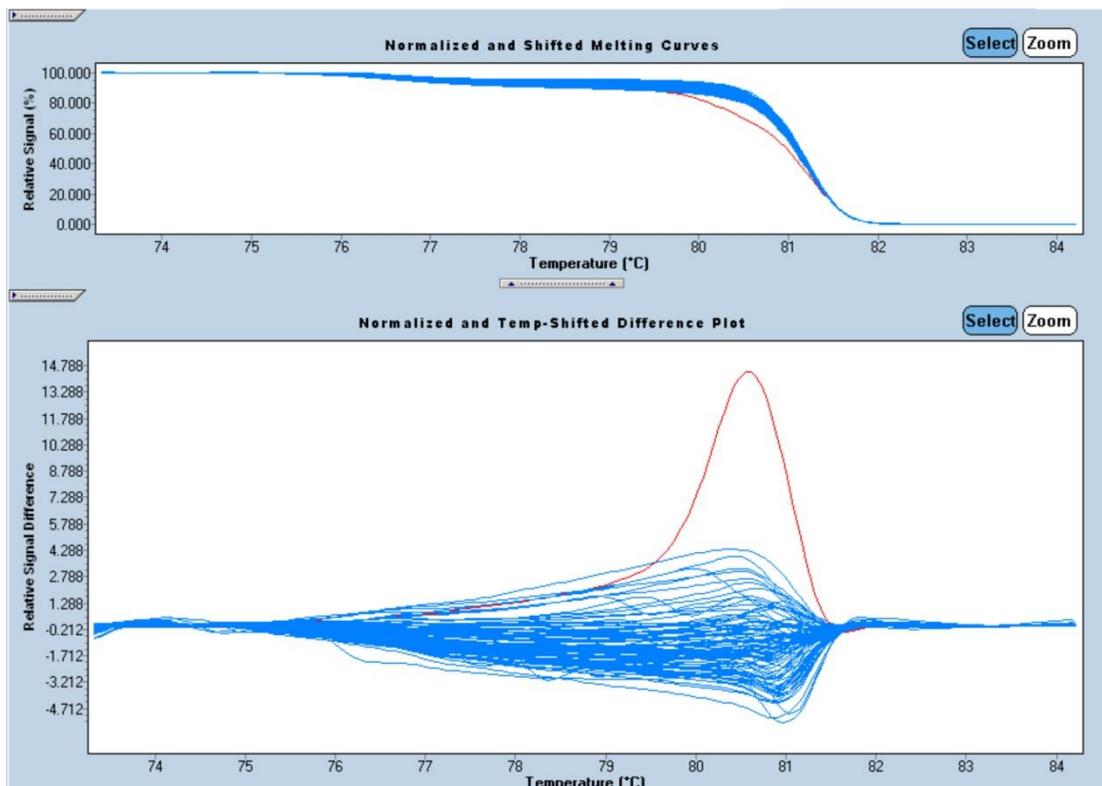


Abbildung 25: Screenshot aus der LightCycler® 480 GeneScanning-Software

Es sind die Schmelzkurven von Exon 11 bei 95 gepoolten Proben dargestellt. Oben sind die Schmelzkurven zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert worden. Unten sind die Differenzen der einzelnen Schmelzkurven zu einer Referenzkurve dargestellt. Auffällige Proben werden dabei automatisch farbig hervorgehoben. Hier ist die Probe mit der heterozygoten Mutation R272Q in rot dargestellt.

Die Probe mit der auffälligen Schmelzkurve wurde sequenziert, um die Position und die Art der DNA-Variation bestimmen zu können. Dabei fiel die heterozygote Mutation c.815G>A auf. Es handelt sich hierbei um eine *missense* Mutation mit einem Aminosäureaustausch von Arginin(R) zu Glutamin(G) an Position 272 des Miro1-Proteins (R272Q) (Grossmann, 2017¹; Grossmann et al., 2019)

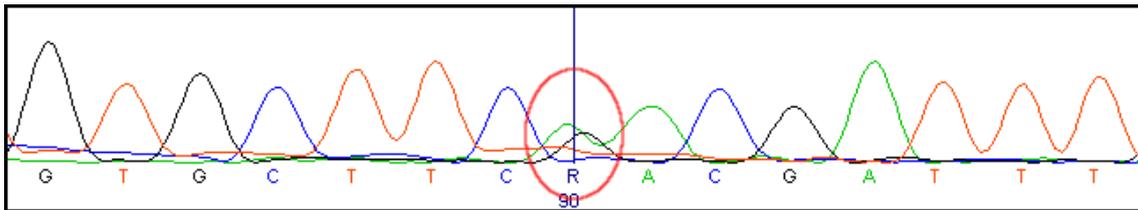


Abbildung 26: Mutation c.815G>A / R272Q in der Sequenzierung. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin, R=heterozygote Variante)

Zur Bestätigung der Mutation wurde ein Restriktionsenzymverdau mit dem Enzym Taq^α1 von New England Biolabs durchgeführt. Dieses verdaut nur den Wt. Dabei schneidet es das ursprüngliche PCR-Produkt mit 289bp in zwei Fragmente mit 120bp und 169bp. Bei einer heterozygoten Mutation müssen also drei Banden sichtbar sein: Das Ausgangs-PCR-Produkt der Mt sowie die beiden verdauten Fragmente vom Wt. Wir haben die Mutation R272Q so bestätigen können.

¹ Die in dieser Arbeit von mir nachgewiesene Mutation R272Q wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Dajana Grossman bereits funktionell charakterisiert und die Ergebnisse im Rahmen ihrer Dissertation bereits veröffentlicht.

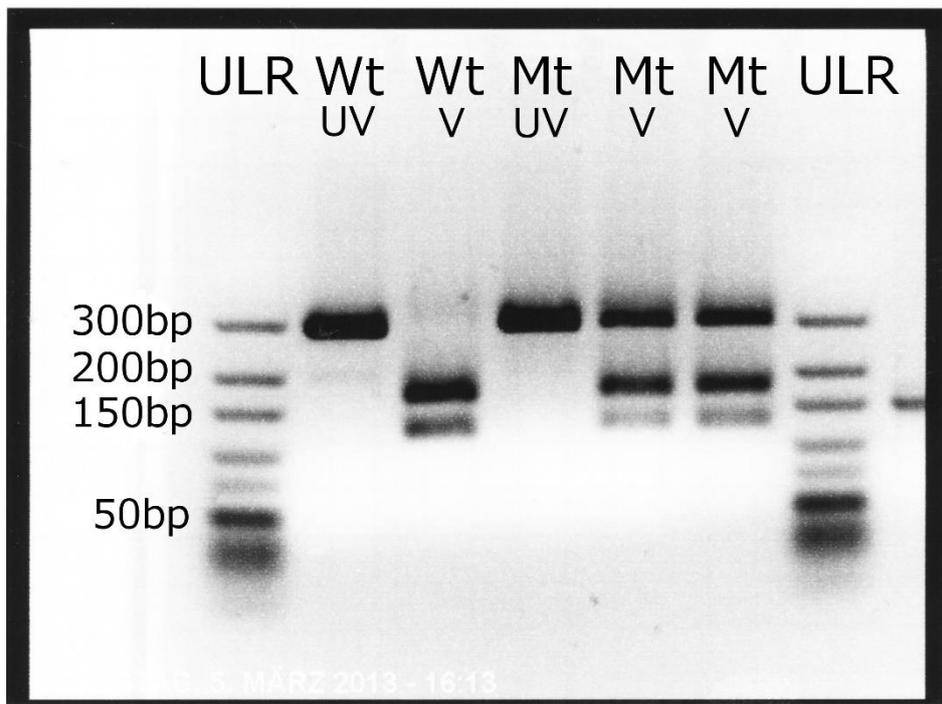


Abbildung 27: Restriktionsenzymverdau der Mutation R272Q mit dem Enzym Taq^α1. Von links nach rechts: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (ULR); Wildtyp(Wt) unverdaut(UV) Wt verdaut(V); Mutante(Mt) UV; Mt V; Wiederholung Mt V; ULR. Beim Wt wird das PCR-Produkt mit 289bp Länge in zwei Fragmente mit 120bp und 169bp verdaut. Die Mt kann nicht verdaut werden. Bei der vorliegenden heterozygoten Mutation sind also alle drei Banden sichtbar.

Zur Untersuchung der gesunden Kontrollen haben wir die entsprechenden Proben mittels SNaPshot® auf die Mutation R272Q im Exon 11 untersucht. Die gesunden Kontroll-Proben, welche auffällige SNaPshot®-Ergebnisse zeigten, haben wir mittels Restriktionsenzymverdau sowie Sequenzierung untersucht. Dabei fanden sich keine weiteren Träger der Mutation R272Q.

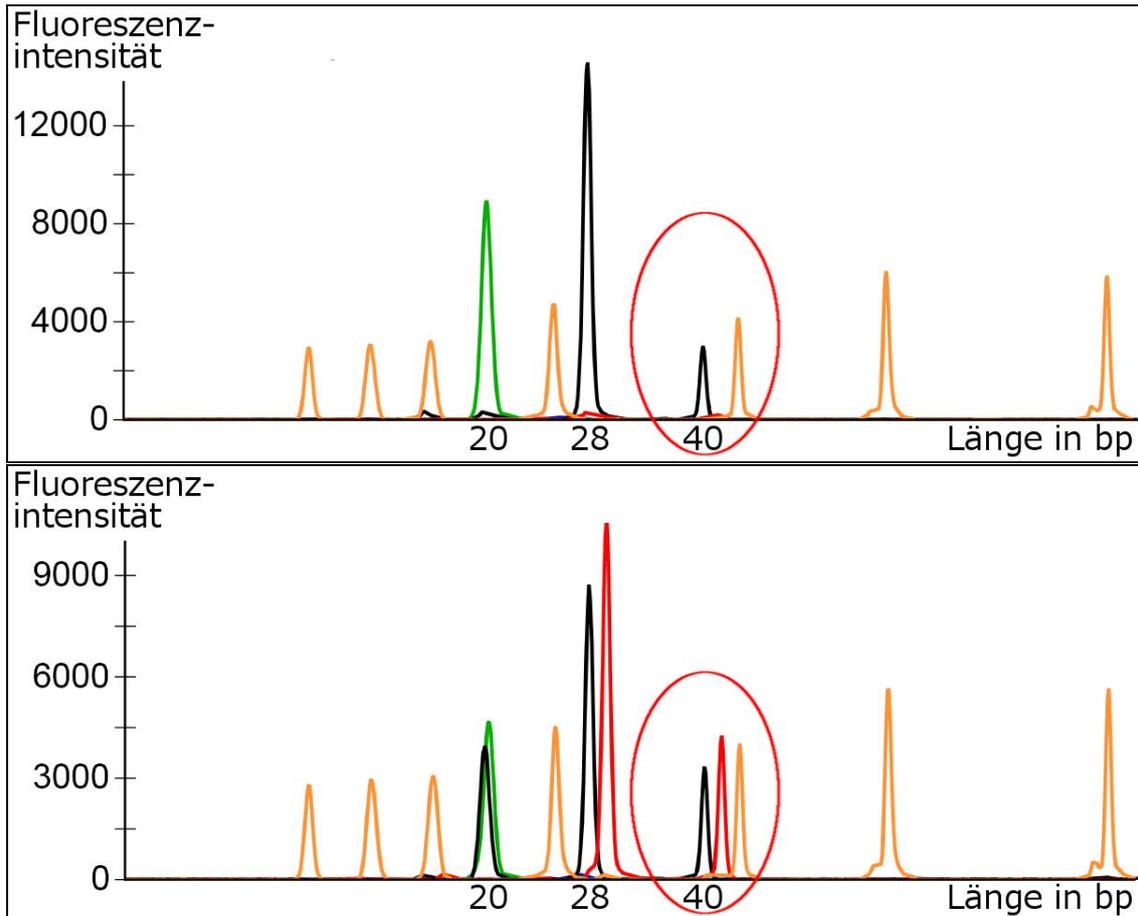


Abbildung 28: SNaPshot®-Ergebnisse in der GeneMapper® Software der Mutation R272Q. Oben: Wildtyp (Wt); Unten Mutante (Mt) R272Q. Die Farben entsprechen jeweils einer Base: Schwarz = Cytosin, Rot = Thymin, Grün = Adenin, Blau = Guanin. Bei der Wt-Kontrolle findet sich nur ein Peak bei der Länge des verwendeten Primers von 40 Basenpaaren (bp). Diese entspricht der erwarteten Base Cytosin. Bei der Mt R272Q finden sich, da es sich um eine heterozygote Mutation handelt, zwei Banden bei der Länge von 40bp für die Basen Cytosin und Thymin. Die Peaks bei 20bp und 28bp zeigen gleichzeitig untersuchte andere Mt an.

Die Mutation R272Q befindet sich innerhalb der *ligand mimic domain* an der ersten EF-Hand-Domäne von Miro1 (Grossmann et al., 2019; Grossmann, 2017; Klosowiak et al., 2013). Der Einfluss der Mutation auf die Funktion des Proteins wurde mittels der Software MutationTaster2 überprüft. Hierbei wurde die Mutation als krankheitsauslösend (engl. „*disease causing*“) eingestuft. Der Patient mit der R272Q-Mutation leidet an einem IPS vom Tremordominanz-Typ und hat ein *normal onset* PS. Der Vater des Patienten hat einen bekannten Tremor. Siehe auch Grossmann, 2017 und Grossmann et al., 2019.

3.3.2 Mutation R450C im Exon 16

In Exon 16 zeigte sich beim HRM im LightCycler® 480 ebenfalls bei einer Probe eine deutliche Abweichung der Schmelzkurven von den Kurven der anderen Proben.

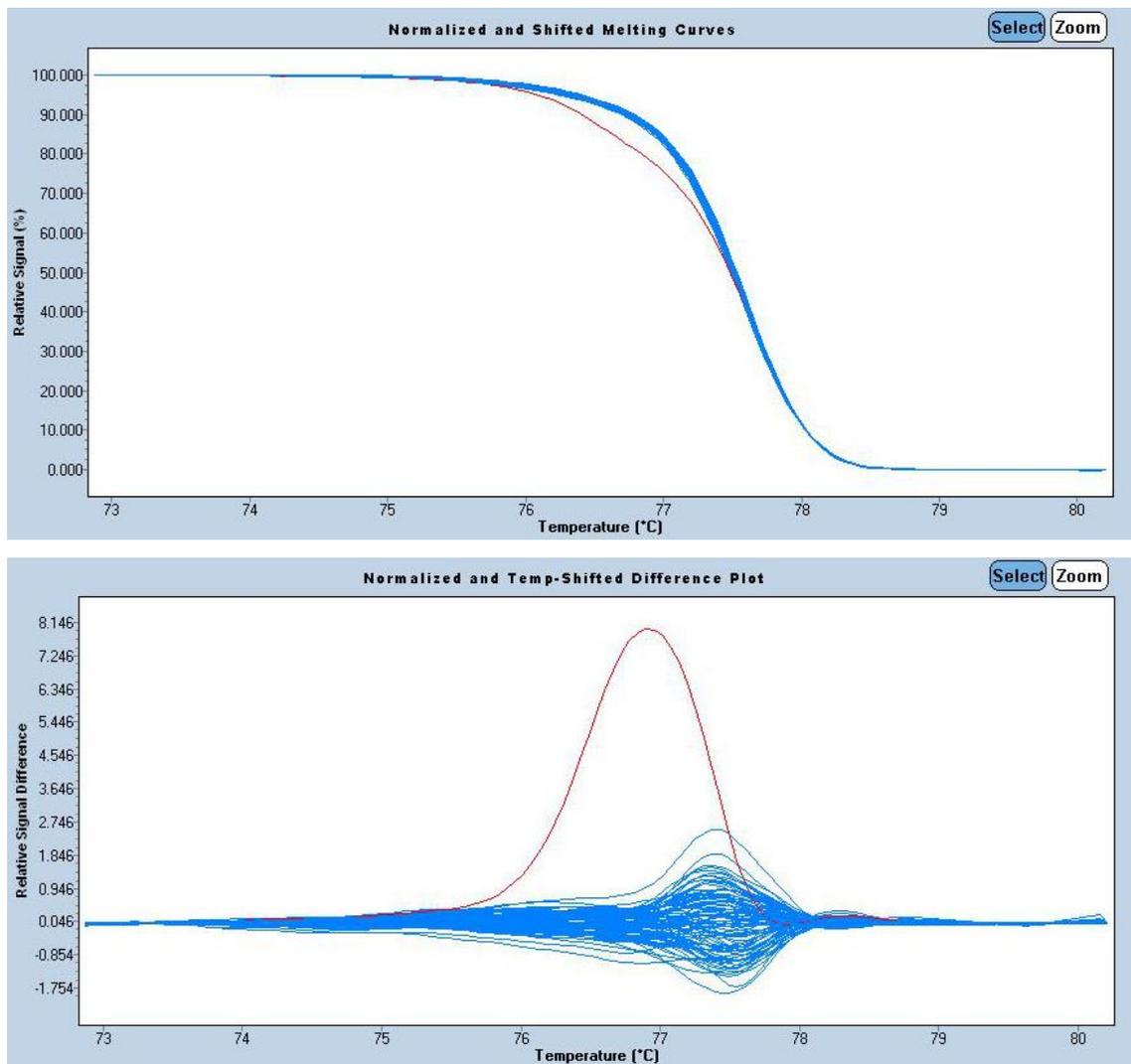


Abbildung 29: Screenshot aus der LightCycler® 480 GeneScanning-Software

Es sind die Schmelzkurven von Exon 16 bei 95 gepoolten Proben dargestellt. Oben sind die Schmelzkurven zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert worden. Unten sind die Differenzen der einzelnen Schmelzkurven zu einer Referenzkurve dargestellt. Auffällige Proben werden dabei automatisch farbig hervorgehoben. Hier ist die Probe mit der Mutation R450C in rot dargestellt.

In der anschließend durchgeführten Sequenzierung der DNA-Proben mit der oben dargestellten auffälligen Schmelzkurve zeigte sich bei einer Probe ein heterozygoter Basenaustausch c.1348C>T. Dieser führt zu einer Veränderung

der Aminosäuresequenz von Arginin (R) zu Cystein (C) des Miro1-Proteins an Position 450 (R450C) (Grossmann, 2017²; Grossmann et al., 2019).

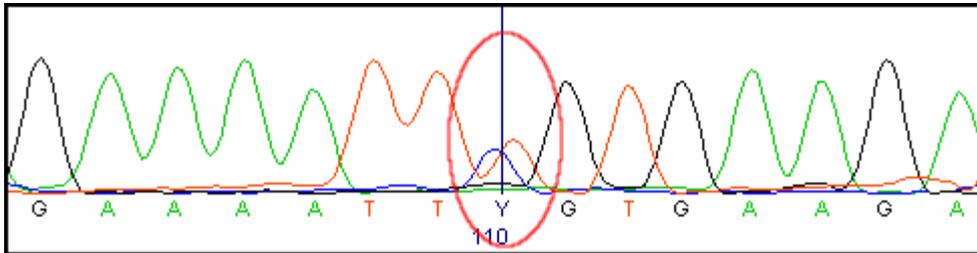


Abbildung 30: Heterozygote Mutation c.1348C>T / R450C in der Sequenzierung. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin, Y=heterozygote Variante)

Zur Bestätigung der Mutation führten wir einen Restriktionsenzymverdau durch. Dazu haben wir das Enzym Hpy188III von New England Biolabs verwendet. Dieses schneidet nur den 195bp großen Wt in ein 47bp und ein 148bp großes Fragment. Beim Wt finden sich nach einem vollständigen Verdau also nur die zwei geschnittenen Fragmente. Die Mt kann von dem Restriktionsenzym nicht verdaut werden. Es bleibt also die ursprüngliche Basenlänge erhalten. Da es sich bei der gefundenen Mutation um eine heterozygote Mutation handelt, kann bei Mt-Trägern also kein vollständiger Verdau stattfinden. Das Mt-Allel bleibt in seiner Länge unverändert, während das Wt-Allel verdaut wird. Es finden sich bei der Mt also drei Fragmente: Die beiden Schnittprodukte des Restriktionsenzym (47bp und 148bp) sowie der nicht verdaute Anteil der Mt mit 195bp.

² Die in dieser Arbeit von mir nachgewiesene Mutation R450C wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Dajana Grossman bereits funktionell charakterisiert und die Ergebnisse im Rahmen ihrer Dissertation bereits veröffentlicht.

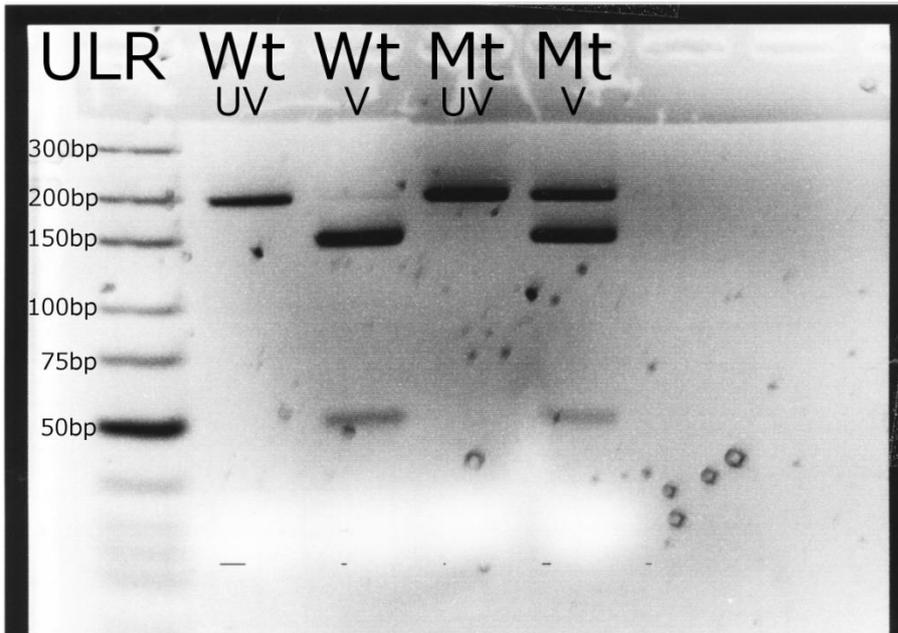


Abbildung 31: Restriktionsenzymverdau der Mutation R450C mit dem Restriktionsenzym Hpy188III. Von links nach rechts: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder; Wildtyp(Wt) unverdaut; Wt verdaut; Mutante(Mt) unverdaut; Mt verdaut.

Der Wt wird vollständig in zwei Fragmente (47 Basenpaare(bp) und 148bp) verdaut. Die heterozygote Mt kann nur teilweise (nur das Wt-Allel) verdaut werden, da das Enzym die Mt nicht verdauen kann. Es sind bei der Mt also sowohl Banden bei der Größe der beiden Fragmente nach dem Verdau wie auch eine Bande bei der Ausgangsgröße (195bp) sichtbar.

Die Mutation R450C befindet sich innerhalb der zweiten GTPase-Domäne von Miro1 (Grossmann, 2017; Grossmann et al., 2019). Der Einfluss der Mutation auf die Funktion des Proteins wurde auch mittels der Software MutationTaster2 getestet. Hierbei wurde die Mutation als krankheitsauslösend (engl. „*disease causing*“) eingestuft. Der Patient mit der R450C-Mutation hat ein *normal onset PS* und sein Vater hat einen bekannten Tremor. Siehe auch Grossmann, 2017 und Grossmann et al., 2019.

Zur Untersuchung der gesunden Kontrollen haben wir die entsprechenden Proben mittels SNaPshot® auf die Mutation R450C im Exon 16 untersucht.

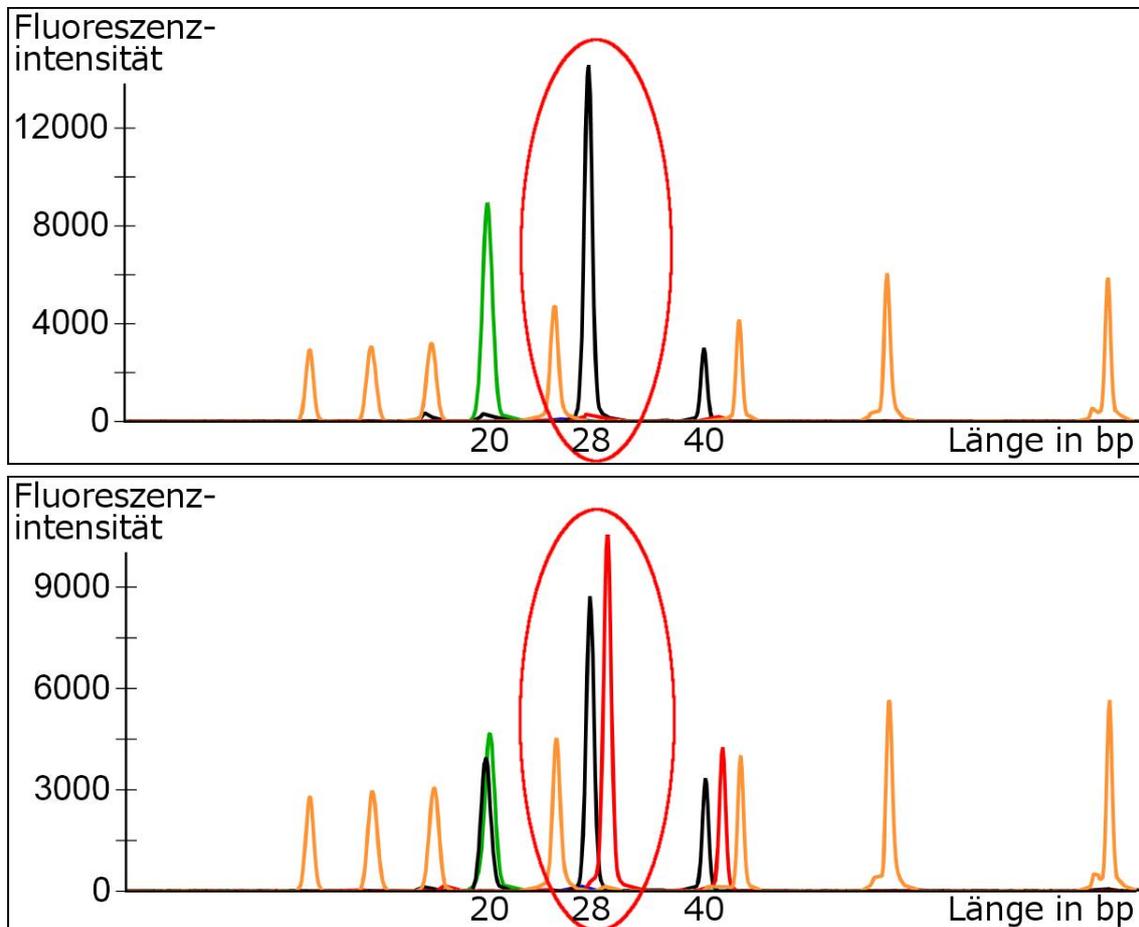


Abbildung 32: SNaPshot®-Ergebnisse der Mutation R450C in der GeneMapper® Software. Oben: Wildtyp (Wt); Unten Mutante (Mt) R450C. Die Farben entsprechen jeweils einer Base: Schwarz = Cytosin, Rot = Thymin, Grün = Adenin, Blau = Guanin. Beim Wt findet sich nur ein Peak bei der Länge des verwendeten Primers von 28 Basenpaaren (bp). Diese entspricht der erwarteten Base Cytosin. Bei der Mt finden sich, da es sich um eine heterozygote Mutation handelt, zwei Banden bei der Länge von 28bp für die Basen Cytosin und Thymin. Die anderen Peaks bei 20bp und 40bp stehen für Untersuchungen anderer Mt.

Hierbei fanden sich auch unter den gesunden Kontrollen einige auffällige Proben. Zum Teil war es alleine aufgrund der SNaPshot®-Ergebnisse jedoch nicht möglich zu entscheiden, ob es sich um Mt oder Wt handelt. Daher haben wir diese Proben mittels Restriktionsenzymverdau erneut getestet und die Proben zusätzlich sequenziert.

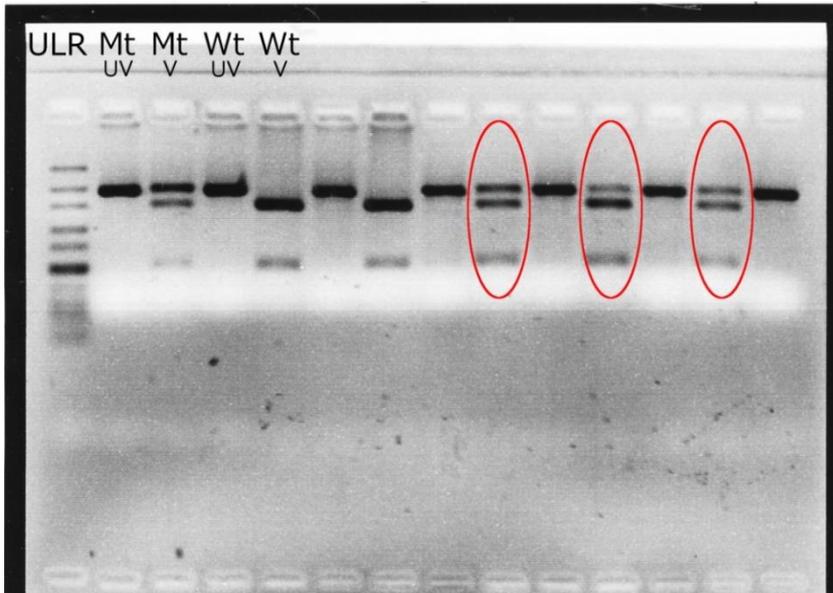


Abbildung 33: Kontrolle der auffälligen SNaPshot®-Proben der gesunden Kontrollen zur Kontrolle der Mutation R450C mittels Restriktionsenzymverdau mit Hpy188III. Beispielhaft Gel 1 von 4. Von rechts nach links: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder; Positiv-Kontrolle/Mutante(Mt) unverdaut(UV); Mt verdaut(V); Negativ-Kontrolle/Wildtyp(Wt) UV; Wt V; danach folgen die auffälligen SNaPshot®-Proben jeweils immer zuerst UV dann V. Bei den heterozygoten Mutationen sind 3 Banden sichtbar (in der Abbildung markiert). Beim Wildtyp sind nur 2 Banden sichtbar.

Die Analyse zeigte bei 16 Proben ein Muster, welches mit dem Vorliegen der R450C Mutation vereinbar wäre. Zum Beispiel Probe 2/G1:

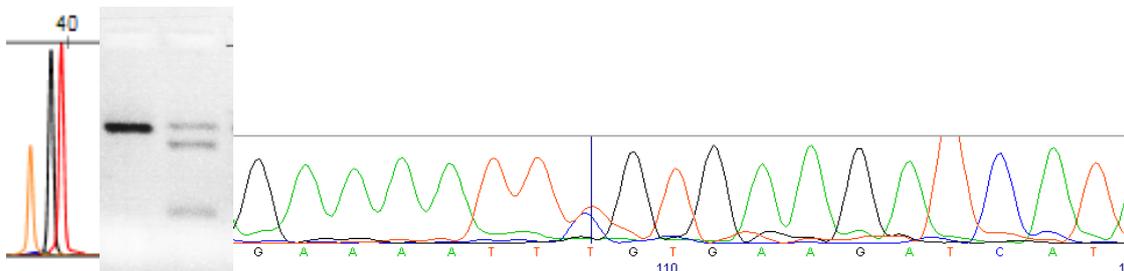


Abbildung 34: SNaPshot® (links), Restriktionsenzymverdau (mitte) und Sequenzierung (rechts) der Probe 2/G1 der gesunden Kontroll-Proben. Alle drei Methoden zeigen ein Muster wie bei der Mutation R450C. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin)

Zusammen mit den Beobachtungen bei weiteren Proben für die es mit den verschiedenen Methoden unterschiedliche (und somit widersprüchliche) Ergebnisse bzw. nicht eindeutige Ergebnisse gab, vermuten wir hier ein technisches Problem, welches trotz mehrfacher Wiederholung und Optimierung der Parameter nicht eindeutig zu bestimmen war. Hier kann die Probe 2/E3 als Beispiel dienen:

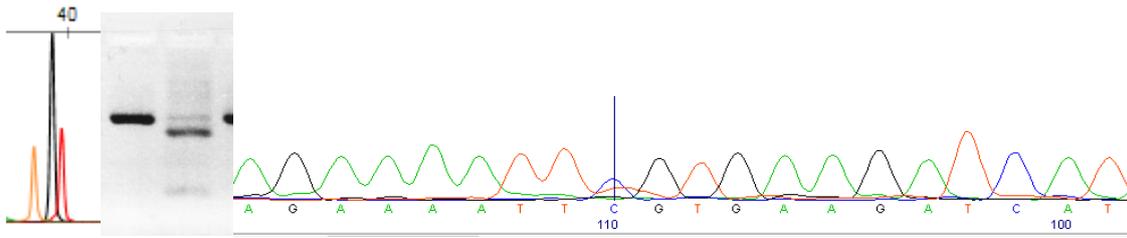


Abbildung 35: Von links nach rechts: SNaPshot®, Restriktionsenzymverdau und Sequenzierung der Probe 2/E3 der gesunden Kontroll-Proben. SNaPshot® und Sequenzierung sehen eher positiv aus während der Restriktionsenzymverdau eher negativ ist. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin)

Zur weiteren Abklärung haben wir als zusätzliche Screening-Methode alle Kontrollproben mittels HRM im LightCycler® 450 getestet. Hierbei zeigten sich ebenfalls Muster, die teilweise der auffälligen Schmelzkurve der Mt R450C entsprechen. Es blieb dabei wieder ein Teil der Proben, die nicht eindeutig zuzuordnen war.

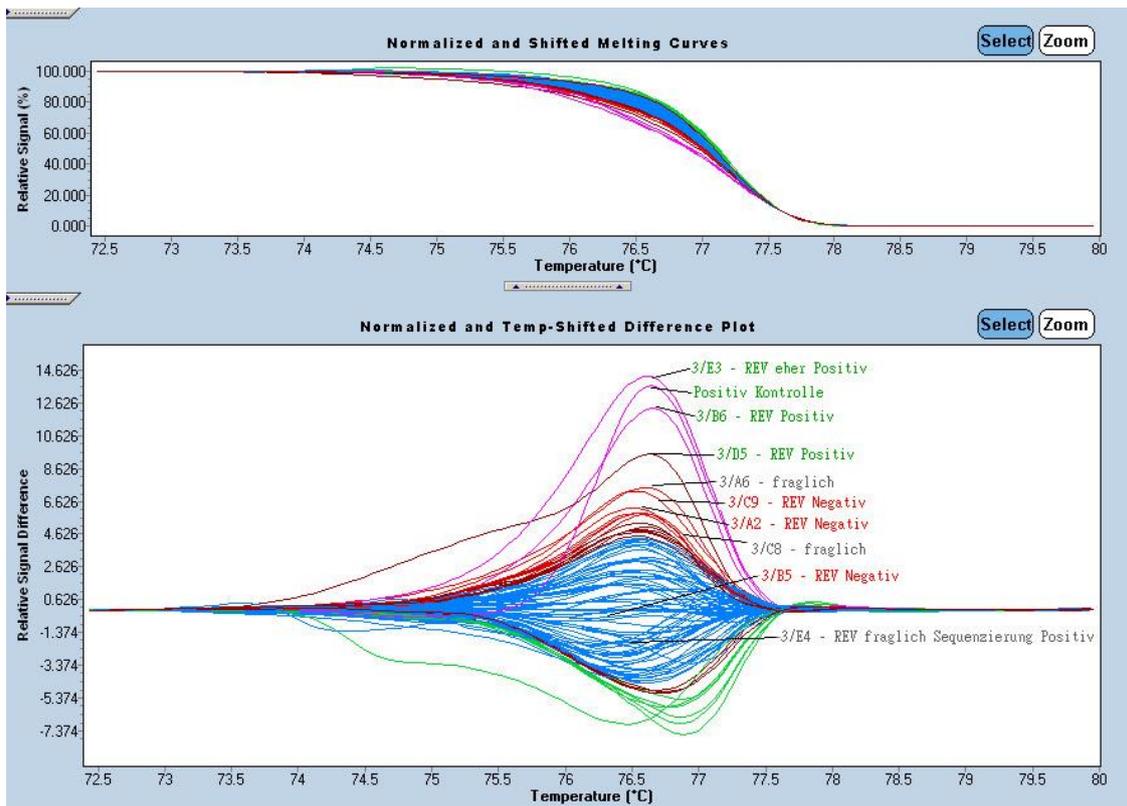


Abbildung 36: Screenshot aus der LightCycler® 480 GeneScanning-Software vom *High Resolution Melting* von 95 gepoolten Proben der gesunden Kontrollen. Die Kurven sind mit der Nummer der dazugehörigen Proben sowie der Information, ob der Restriktionsenzymverdau (REV) für die Mutation R450C positiv oder negativ war, beschriftet. Es ist zu erkennen, dass die Proben mit einem positiven REV auch auffällige (von der Standardkurve abweichende) Schmelzkurven haben, während Proben mit einem negativen REV eher unauffällige Schmelzkurven haben.

Zur weiteren Abklärung dieser Befunde haben wir eine unabhängige Kontrollgruppe mit 92 Proben von Probanden ohne IPS mittels HRM untersucht. Hierbei zeigten sich keine auffälligen Proben unter den Kontrollen.

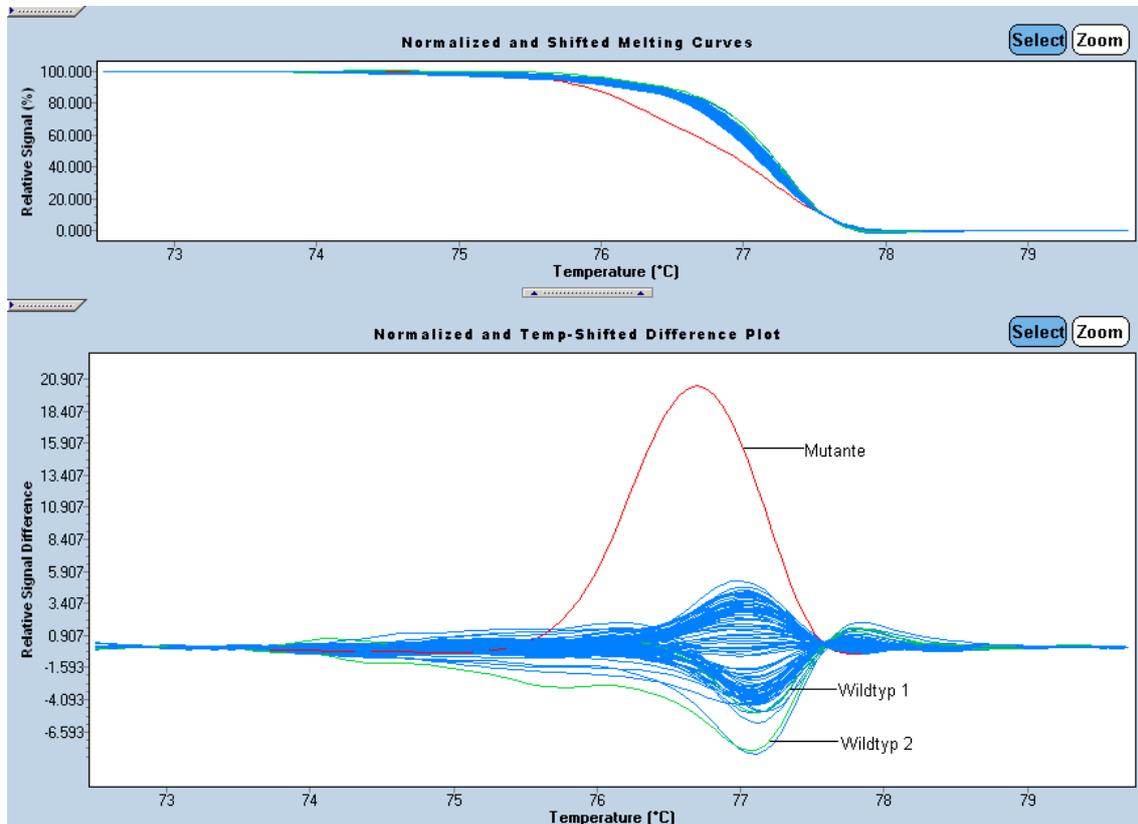


Abbildung 37: Screenshot aus der LightCycler® 480 GeneScanning-Software. Es sind die Schmelzkurven von 92 gesunden Kontrollen, der Mutante(Mt) sowie zwei Wildtyp(Wt)-proben dargestellt. Oben sind die Schmelzkurven zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert worden. Unten sind die Differenzen der einzelnen Schmelzkurven zu einer Referenzkurve dargestellt. Auffällige Proben werden dabei automatisch farbig hervorgehoben: Mt(Positiv-Kontrolle) in rot, Wt(Negativ-Kontrolle) in grün.

3.3.3 Mutation F676V im Exon 21

Beim HRM der DNA-Proben zeigte sich im Exon 21 eine weitere Probe, die eine deutlich auffällige und von den Kurven der anderen Proben abweichende Schmelzkurve hatte.

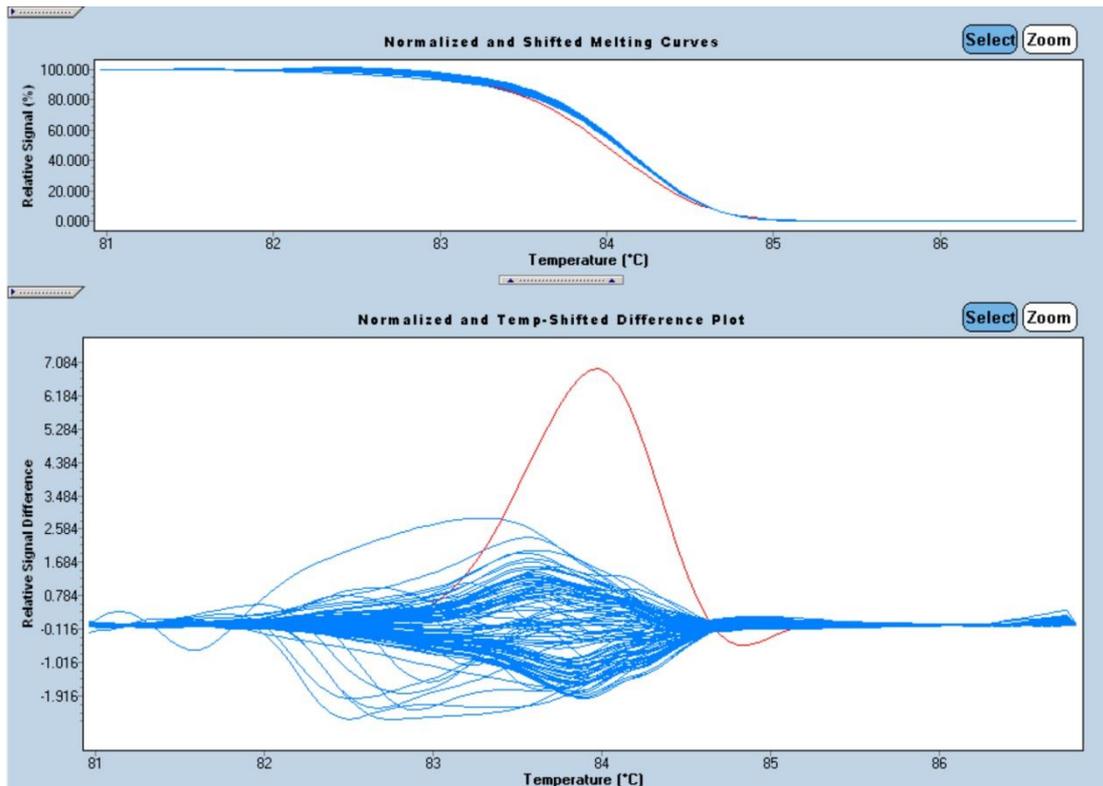


Abbildung 38: Screenshot aus der LightCycler® 480 GeneScanning-Software
 Es sind die Schmelzkurven von Exon 21 bei 95 gepoolten Proben dargestellt. Oben sind die Schmelzkurven zur besseren Vergleichbarkeit normalisiert worden. Unten sind die Differenzen der einzelnen Schmelzkurven zu einer Referenzkurve dargestellt. Auffällige Proben werden dabei automatisch farbig hervorgehoben. Hier ist die Probe mit der Mutation F676V in rot dargestellt.

Die auffälligen Proben haben wir mittels Sequenzierung untersucht. Hierbei fiel die heterozygote Mutation c.2026T>G auf, welche einen Aminosäureaustausch von Phenylalanin(F) zu Valin(V) an Position 676 des Miro1-Proteins verursacht (Grossmann, 2017)³.

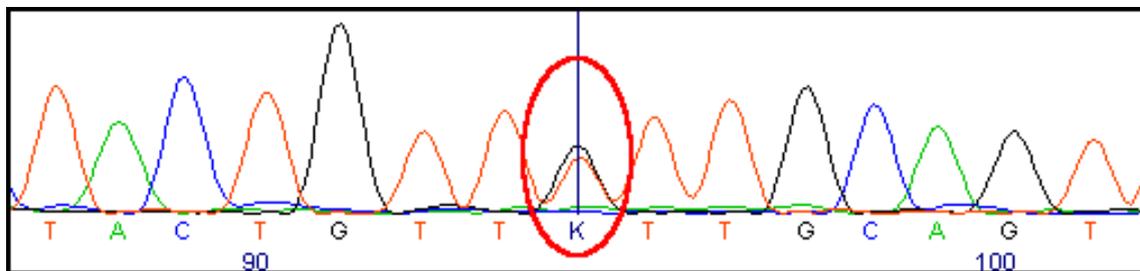


Abbildung 39: Mutation c.2026T>G in der Sequenzierung. (G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, A=Adenin, K=heterozygote Variante)

³ Die in dieser Arbeit von mir nachgewiesene Mutation F676V wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Dajana Grossman bereits funktionell charakterisiert und die Ergebnisse im Rahmen ihrer Dissertation bereits veröffentlicht.

Da es für diese Mutation kein Restriktionsenzym zu erwerben gab, welches die Mutation hätte bestätigen können, haben wir die Mutation mittels SNaPshot® bestätigt.

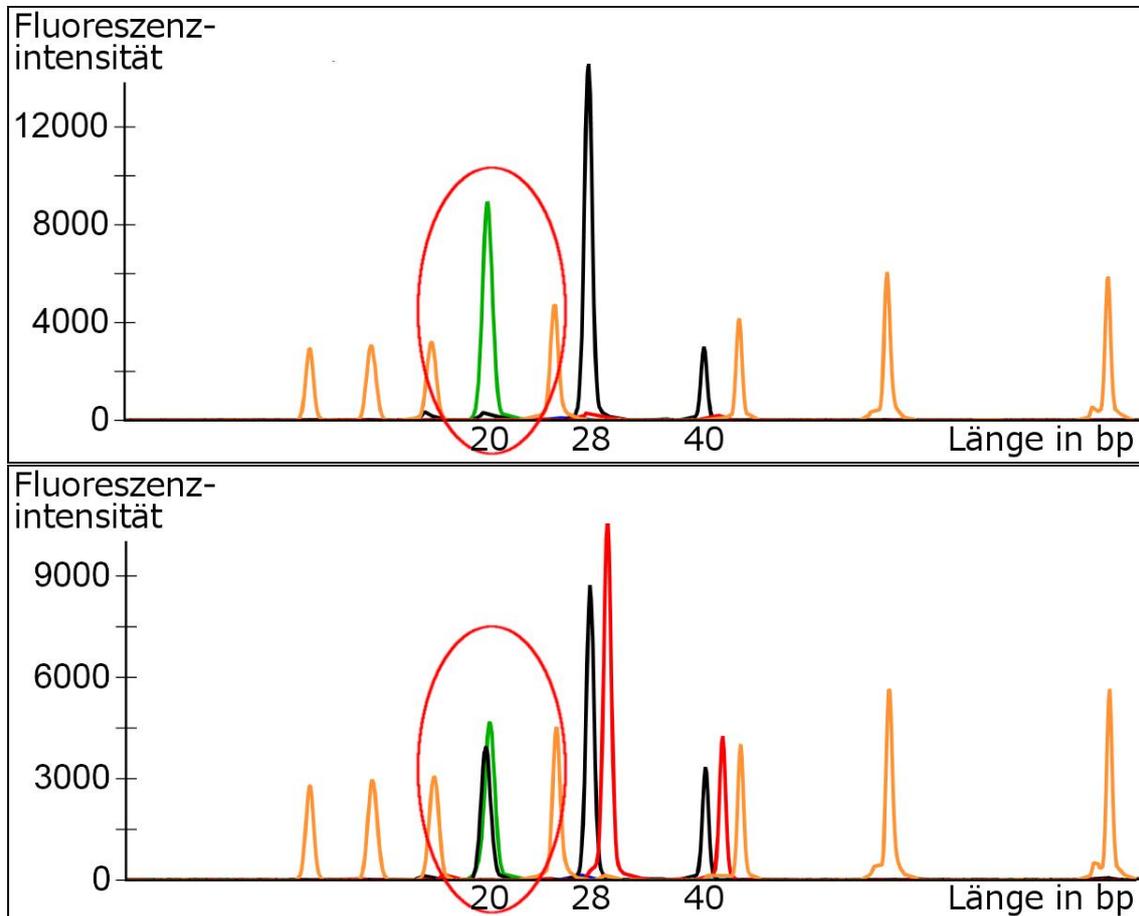


Abbildung 40: SNaPshot®-Ergebnisse der Mutation F676V in der GeneMapper® Software. Oben: Wildtyp(Wt); Unten Mutante(Mt) F676V. Die Farben entsprechen jeweils einer Base: Schwarz = Cytosin, Rot = Thymin, Grün = Adenin, Blau = Guanin. Beim Wt findet sich nur ein Peak bei der Länge des verwendeten Primers von 20 Basenpaaren (bp). Diese entspricht der bei dem verwendeten *reverse Primer* zu erwartenden Base Adenin. Bei der Mt finden sich, da es sich um eine heterozygote Mutation handelt, zwei Banden bei der Länge von 20bp für die Basen Adenin und Cytosin. Die anderen Peaks bei 28bp und 40bp stehen für Untersuchungen anderer Mt.

Die Mutation F676V befindet sich innerhalb der Transmembran-Domäne von Miro1 (Grossmann, 2017). Der Einfluss der Mutation auf die Funktion des Proteins wurde mittels der Software MutationTaster2 getestet. Hierbei wurde die Mutation ebenfalls als krankheitsauslösend eingestuft. Der Patient mit der F676V-Mutation leidet an einem IPS mit einem *normal onset* und er hat einen Bruder der ebenfalls an einem PS leidet. Siehe auch Grossmann, 2017.

Auch hier haben wir die gesunden Kontrollen mittels SNaPshot® untersucht. Hierbei gab es erneut einige Proben mit leicht auffälligen *Peaks*. Wir haben diese Proben dann mittels erneutem SNaPshot® sowie Sequenzierung mit zwei verschiedenen *Primer*-Paaren jeweils *forward* und *reverse* untersucht. Hierbei waren dann alle Proben negativ.

4. Diskussion

PS ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen beim Menschen. Es wird daher in vielen Arbeitsgruppen an diesem Thema aktiv geforscht und in den letzten Jahren konnten die Erkenntnisse zur Pathogenese bzw. Entstehung eines PS deutlich erweitert werden. Dabei wurden anhand monogenetischer Formen der PK Mechanismen entdeckt, die auch für die Entstehung der häufigen sporadischen PK mitverantwortlich sein können. So kodieren Gene für verschiedene Proteine, wie alpha-Synuklein, PINK1, Parkin, DJ-1 und LRRK2, die mit einem PD assoziiert sind (Burbulla et al., 2010a; Kitada et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997; Schiesling et al., 2008; Thomas und Beal, 2007; Valente et al., 2004). Da einige dieser Proteine im Zusammenhang mit der mitochondrialen Funktion stehen, stehen aktuell vor allem die Mitochondrien und deren Funktion, Homöostase, der Transport der Mitochondrien in den Neuronen sowie oxidativer Stress in den Neuronen im Fokus der Forschung (Beal, 2005; Burbulla et al., 2010a; Keeney et al., 2006; Larsen et al., 2018). Es wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt, dass eine Einschränkung der Funktion der Mitochondrien mit der Entstehung eines PS assoziiert ist (Burbulla et al., 2010a; Larsen et al., 2018; Weihofen et al., 2009). Es wurde daher bereits bei Parkinson-Patienten nach Mutationen in den entsprechenden Genen (siehe auch Kapitel 1.3) gesucht und in verschiedenen Studien wurde eine Vielzahl von monogenetischen Einflüssen und genetische Risikofaktoren für die Entstehung eines PS beschrieben (Lill, 2016; Nalls et al., 2014).

Mittels moderner Methoden der Mutationsanalyse, wie *Next-generation sequencing (NGS)* und *genomewide association study (GWAS)*, konnten in den letzten Jahren großangelegte Mutationsscreenings des ganzen Genoms bei Parkinson-Patienten erfolgen und somit neue Mutationen nachgewiesen werden (Emelyanov et al., 2018; Pankratz et al., 2009; Simón-Sánchez et al., 2009). Bei den GWAS ist jedoch die Sensitivität zur Detektion von selteneren Mutationen deutlich reduziert (Manolio et al., 2009). Letztere können nur durch eine Sequenzierung der entsprechenden Gene, oder auch des gesamten Genoms, identifiziert werden (Manolio et al., 2009).

Ein anderer Ansatz zur gezielten Suche nach pathogenetisch relevanten Mutationen ist die Untersuchung von Kandidatengen. Hierbei werden Mutationen gezielt in Genen gesucht, von denen man, aufgrund der Funktion der von ihnen kodierten Proteine, annimmt, dass sie einen Einfluss auf die Erkrankung haben (Kwon und Goate, 2000; Zhu und Zhao, 2007).

Aufgrund der bekannten Funktionen von Miro1/RHOT1 und deren Einfluss auf mit einem PS bereits assoziierte Faktoren wie Mitophagie, Regulation des Calciumhaushalts und Transport der Mitochondrien (MacAskill et al., 2009b; Wang et al., 2011; Wang und Schwarz, 2009; Weihofen et al., 2009) wird angenommen, dass Mutationen in Miro1 ebenfalls einen Einfluss auf die Entstehung eines PK haben (Anvret et al., 2012; Hsieh et al., 2016; Lahiri und Klionsky, 2017).

Wir haben in dieser Arbeit zur weiteren Abklärung dieser Hypothese nach PK-assoziierten Mutationen im RHOT1-Gen als Kandidatengen gesucht. Hierfür wurde die DNA von 752 Parkinson-Patienten auf Mutationen im RHOT1-Gen untersucht. Wir haben uns hierbei vor allem für Mutationen in den Exons interessiert, da wir hier eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen Einfluss von Mutationen auf die Funktion des Miro1-Proteins sehen. In dieser Arbeit wurde daher immer nur ein kleiner Teil des intronischen Bereichs um das Exon mit untersucht. Dadurch können jedoch Mutationen im intronischen Bereich vor und nach dem Exon übersehen werden. Da diese durch ein verändertes *Splicing* aber ebenfalls einen Einfluss auf die Funktion des kodierten Proteins haben können (Sterne-Weiler und Sanford, 2014), könnten diese Abschnitte in einer weiteren Arbeit noch genauer untersucht werden.

Wir haben in dieser Arbeit bereits etablierte Verfahren wie die PCR (Mullis et al., 1986) Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977; Sanger und Coulson, 1975), Restriktionsenzymverdau (Arber und Linn, 1969; Fu et al., 2016; Roberts, 1980), SNaPshot® (Di Cristofaro et al., 2010; Magnin et al., 2011) und das HRMA mittels LightCycler® 480 (Bing-Sheng Li et al., 2011; Capper et al., 2015) verwendet. Diese Methoden gelten als geeignete und sensitive Verfahren zum Mutationsscreening und zur Validierung einer

vermuteten Mutation (Bing-Sheng Li et al., 2011; Erali et al., 2008; Magnin et al., 2011; Reed et al., 2007). Zudem gibt es bereits viele Studien, die HRMA zur Detektion von Mutationen genutzt haben (Islam et al., 2018; Krypuy et al., 2006; Pichler et al., 2009; Rapado et al., 2009; Yan et al., 2010).

Bei kleineren DNA-Abschnitten/PCR-Produkten zeigen sich beim HRM die Unterschiede der Schmelzkurven vom Wt und der Mt deutlicher. Die Sensitivität des HRM ist daher für kleine DNA-Abschnitte deutlich besser als für längere Abschnitte (Gundry, 2003; Krypuy et al., 2006; Liew et al., 2004; Yan et al., 2010). Wir haben daher, um kleinere PCR-Produkte zu erhalten, alle Exons des RHOT1-Gens einzeln untersucht.

Für jedes Exon wurden dafür zunächst *Primer* konstruiert und deren Spezifität mittels PCR und Gelelektrophorese getestet. Hierzu wurde für jeden *Primer* die beste *annealing* Temperatur (Ishii und Fukui, 2001), eine geeignete Magnesiumkonzentration im PCR-Ansatz (Riedel et al., 1992; Slack et al., 2011) sowie ein geeignetes PCR-Protokoll etabliert. Für die Exons 2-21 ließen sich so PCR-Protokolle erstellen, mit denen eine ausreichend spezifische Amplifikation des gesuchten DNA-Abschnittes möglich war. Die Spezifität wurde mittels Gelelektrophorese und Sequenzierung des PCR-Produktes überprüft. Ein gut etabliertes PCR-Protokoll mit einer hohen Spezifität ist für die Durchführung eines HRM entscheidend, da Verunreinigungen der Probe wie Primer-Dimere, Variationen der Salzkonzentrationen oder unspezifische zusätzliche PCR-Produkte die Schmelzkurven beim HRM beeinflussen können (Pichler et al., 2009).

Bei der PCR von Exon1 entstand bei allen Ansätzen jedoch zu viel unspezifisches Nebenprodukt, und auch in der Sequenzierung sowie beim HRM waren die Ergebnisse von Exon1 nicht ausreichend auswertbar. Es erfolgten daher Testversuche mit verschiedenen *forward* und *reverse Primern*, anderen PCR-Protokollen, verschiedenen Temperatur-Einstellungen sowie einer *Touchdown-PCR* (siehe auch Kap. 2.5.3.1). Jedoch ließ sich auch bei diesen Versuchen keine ausreichende Spezifität erreichen. Wir haben uns daher entschieden, Exon1 in dieser Arbeit nicht weiter zu untersuchen. Somit kann

durch die aktuelle Arbeit keine Aussage über mögliche Mutationen in Exon1 des RHOT1-Gens getroffen werden. Da der Translationsstart von Miro1 jedoch im Bereich des Exon 1 liegt, könnten auch Mutationen im Exon 1 für die Funktion des Proteins relevant sein. Diese müssten in weiteren Arbeiten noch untersucht werden. Zur weiteren Analyse von Mutationen im Exon1 könnte in zukünftigen Arbeiten z.B. eine *Nested-PCR* versucht werden. Hierbei wird zunächst in einer ersten PCR ein größerer DNA-Abschnitt, welcher das Exon1 umschließt, amplifiziert. In einer zweiten PCR wird dann das Exon1 aus dem ersten PCR-Produkt gezielt erneut amplifiziert. Somit kann evtl. die Menge an unspezifischem Nebenprodukt reduziert werden (Marinho et al., 2018).

Wir haben beim Mutationsscreening des Kandidatengens RHOT1 insg. 10 verschiedene Varianten/Mutationen in den DNA-Proben der 752 Parkinson-Patienten gefunden.

Tabelle 29: In dieser Arbeit gefundene Varianten/Mutationen im *RHOT1*-Gen. Siehe auch Grossmann 2017⁴ und Grossmann et al., 2019

Art	Variante/Mutation	Lage	Name
Intronische Variante	17: 32208329A>G	20bp <i>upstream</i> von Exon 18	rs377468429
Intronische Variante	17:32175936G>A	26bp <i>downstream</i> von Exon 5	rs8076276
Intronische Variante	17:32175938T>C	24bp <i>downstream</i> von Exon 5	rs763188874
Synonymous Coding	c.1125G>A	Exon 14	rs114899192
Synonymous Coding	c.1104C>T	Exon 14	rs767800498
Synonymous Coding	c.1458A>G	Exon 17	rs16967164
Synonymous Coding	c.2031A>G	Exon 21	rs58010811
Missense Mutation	R272Q	Exon 11	
Missense Mutation	R450C	Exon 16	
Missense Mutation	F676V	Exon 21	

Drei der gefundenen Varianten liegen im intronischen Bereich vor einem Exon (rs377468429) oder nach einem Exon (rs8076276 und rs763188874). Diese drei Varianten waren laut www.ensembl.org bereits aus anderen Studien bekannt. Da diese Varianten als intronische Varianten nicht zu einem

⁴ Die in dieser Arbeit von mir nachgewiesenen *missense* Mutationen wurden in unserer Arbeitsgruppe durch Dajana Grossman bereits funktionell charakterisiert und die Ergebnisse im Rahmen ihrer Dissertation bereits veröffentlicht.

Aminosäureaustausch im Miro1-Protein führen, haben wir diese Varianten in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Es bleibt jedoch die Möglichkeit bestehen, dass diese Variationen zu einem veränderten *Splicing* und hierdurch zu einem Einfluss auf die Funktion von Miro1 führen können (Sterne-Weiler und Sanford, 2014). Das *Splicing*-Alternativen mit der Entstehung eines PS assoziiert sein können, ist bereits bei anderen Genen wie Parkin (La Cognata et al., 2015; Tan et al., 2005) oder PINK1 (Marongiu et al., 2007; Samaranch et al., 2010) bekannt. Diese Möglichkeit könnte in weiteren Untersuchungen auch bei Miro1 abgeklärt werden.

Wir haben zudem vier Varianten gefunden, die zwar innerhalb eines Exons liegen, die aber zu keinem Aminosäureaustausch im Protein führen (*synonymous coding* Varianten). Ein Einfluss auf die Funktion des Proteins ist somit unwahrscheinlicher. Es könnte jedoch auch durch eine *synonymous coding* Variante zu einem relevanten Einfluss auf die Funktion des Proteins, z.B. durch ein verändertes *Splicing*, kommen (Karambataki et al., 2014; Manousaki et al., 2017; Meyer et al., 2014). So hat z.B. die seltene *synonymous coding* Variante CYP2R1 einen großen Einfluss auf den Vitamin-D-Haushalt (Manousaki et al., 2017).

Wir haben die *synonymous coding* Variante c.1125G>A (rs114899192) bei 4 von 752 Proben von PS-Patienten nachweisen können. Dies entspricht einer Häufigkeit von ca. 0,5%. Laut www.ensembl.org kommt diese Variante in den Untersuchungen des *1000 Genomes Project* (Phase 3) mit einer Häufigkeit von ca. 0,1% vor. Somit kommt diese Variante in unserer Untersuchung etwas häufiger vor, als im Durchschnitt des *1000 Genomes Project*. Die Datenbank von *genomAD* [genoms](http://genomAD.genoms) zeigt laut www.ensembl.org ebenfalls eine durchschnittliche Häufigkeit dieser Variante von 0,1%. Die Häufigkeiten in den einzelnen Ländern variieren im *1000 Genomes Project* jedoch nach den vorliegenden Daten (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?v=rs114899192, 23.10.2018) zwischen 0,1% im Gesamtdurchschnitt und 1% in Puerto Rico. Da diese Variante in unseren Kontrollen etwas häufiger gefunden wurde als nach

den vorliegenden Daten zu erwarten war, besteht die Möglichkeit, dass diese Variante mit einem PS assoziiert sein könnte. Da diese Variante jedoch bereits bekannt ist, in der breiten Bevölkerung vorkommt und keinen direkten Einfluss auf die Aminosäuresequenz von Miro1 hat, haben wir diese Variante aktuell nicht priorisiert und daher nicht weiter untersucht. Ein Einfluss auf die Entstehung eines PS könnte in weiteren zukünftigen Untersuchungen, z.B. durch größere Fallzahlen aus verschiedenen Populationen, abgeklärt werden.

Die *synonymous coding* Variante c.1104C>T (rs767800498) konnten wir bei 1 von 752 Proben nachweisen. Da diese Variante ebenfalls bereits aus anderen Studien bekannt ist und keinen direkten Einfluss auf die Aminosäuresequenz des Proteins hat (siehe oben), haben wir diese Variante nicht weiter untersucht.

Im Exon 17 zeigte sich eine Vielzahl von auffälligen Schmelzkurven. Wir haben hier zunächst 58 der auffälligen Proben als Stichprobe untersucht. Hierbei konnte bei 31 Proben der *synonymous coding* SNP c.1458A>G (rs16967164) nachgewiesen werden. Es fanden sich in der Stichprobe 26 heterozygote Träger des SNP und 5 homozygote Träger des SNP. Dieser SNP ist bereits bekannt und kommt nach den Daten des *1000 Genomes Project* (Phase 3) (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?v=rs16967164, 23.10.2018) als heterozygoter SNP mit einer Häufigkeit von ca. 39,8% und als homozygoter SNP mit einer Häufigkeit von ca. 12,5% vor. Aufgrund dieser hohen Frequenz des SNP in der unselektierten Bevölkerung sahen wir keinen Anhalt für eine pathogenetische Relevanz für die PK und haben den SNP daher nicht weiter untersucht. Auch Anvret und Kollegen konnten keine Assoziation dieses SNP mit einem PS nachweisen (Anvret et al., 2012). Da wir in dieser Arbeit nicht alle auffälligen Proben von Exon 17 untersucht haben, besteht die Möglichkeit, dass wir einen anderen SNP mit einer ähnlichen Schmelzkurve, wie die der Proben mit dem rs16967164, übersehen konnten.

Die bei einer Probe gefundene heterozygote *synonymous coding* SNP c.2031A>G (rs58010811) war ebenfalls bereits bekannt und kommt nach den Daten des *1000 Genomes Project* (Phase 3) als heterozygoter SNP mit einer Häufigkeit von ca. 6,1% und als homozygoter SNP mit einer Häufigkeit von ca.

0,5%

vor

(www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?v=rs58010811, 23.10.2018). Es ist daher auch bei diesem SNP nicht mit einer Assoziation mit einem PS zu rechnen und wir haben diesen SNP nicht weiter untersucht.

Im Exon11 im RHOT1-Gen konnte bei einer Probe die heterozygote Mutation R272Q nachgewiesen werden (Grossmann, 2017⁵; Grossmann et al., 2019). Bei den Untersuchungen der gesunden Kontrollen zeigte sich diese Mutation nicht erneut. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war diese Mutation nach unseren Recherchen bisher unbekannt. Mittlerweile ist sie auf ensembl.org unter rs866543534 eingetragen (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;v=rs866543534, 23.10.2018). Diese Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin nach Glutamin und liegt in der *ligand mimic domain* an der ersten EF-Hand-Domäne von Miro1 (Klosowiak et al., 2013; Grossmann et al., 2019). Da es durch diese Mutationen zu einer Beeinträchtigung der Funktion der EF-Hand-Domäne und somit zu einer veränderten Calciumbindung an Miro1 kommen könnte (Klosowiak et al., 2013), ist ein Einfluss auf die Funktion von Miro1 anzunehmen. Hierdurch könnte es, wie zuvor erläutert, zu einer Störung des Transportes der Mitochondrien in den Neuronen kommen (MacAskill et al., 2009b). Es ist daher möglich, dass diese Mutation für die Entstehung eines PS verantwortlich sein könnte (Saxton und Hollenbeck, 2012). Dies haben wir zunächst mittels der Software MutationTaster2 überprüft und auch hier wurde die Mutation als krankheitsrelevant eingestuft. Diese Mutation wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Dajana Großmann in Ihrer Dissertation zwischenzeitlich weiter untersucht (Grossmann, 2017). Auch hier wurde die Mutation durch 8 von 9 Analysetools als krankheitsrelevant eingestuft (Grossmann, 2017). Es erfolgten zudem zwischenzeitlich noch weitere Screenings nach dieser Mutation und in allen Untersuchungen, inklusive der genetischen Daten von 67486 Proben, wurde die Mutation R272Q nicht erneut nachgewiesen (Grossmann,

⁵ Die in dieser Arbeit von mir nachgewiesenen missense Mutationen wurden in unserer Arbeitsgruppe durch Dajana Grossman bereits funktionell charakterisiert und die Ergebnisse im Rahmen ihrer Dissertation bereits veröffentlicht.

2017). Diese Mutation scheint daher eine sehr seltene Variante (*minor allele frequency* (MAF) < 0,5%) zu sein. Der Einfluss dieser Mutation auf die Funktion von Miro1 wurde durch Dajana Grossmann in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls bereits weiter untersucht und es erfolgten funktionelle Analysen. Hierbei scheint R272Q u.a. die Calciumbindung an Miro1 und somit auch die mitochondriale Calciumpuffer-Kapazität zu stören (Grossmann, 2017; Grossmann et al., 2019).

Die zweite heterozygote *missense* Mutation R450C konnte im Exon 16 des RHOT1-Gens nachgewiesen werden (Grossmann, 2017⁶; Grossmann et al., 2019). Diese Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin nach Cystein und liegt innerhalb der zweiten GTPase-Domäne von Miro1 (Grossmann et al., 2019). Zum Zeitpunkt der Untersuchung war diese Mutation nach unseren Recherchen bisher unbekannt. Mittlerweile ist auch sie auf ensembl.org unter [rs762102262](https://ensembl.org/variation/Explore?db=core;v=rs762102262) eingetragen (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;v=rs762102262, 23.10.2018). Laut MutationTaster2 handelt es sich ebenfalls um eine wahrscheinlich krankheitsauslösende Mutation.

Bei den Untersuchungen der 282 gesunden Kontrollen zeigte sich bei 16 Proben jedoch ebenfalls die Mutation R450C. Zudem waren mehrere Ergebnisse weiterer Proben der gesunden Kontrollen nicht eindeutig einzuordnen. Da diese Mutation bisher unbekannt war, ist jedoch von einer seltenen Variante auszugehen. Somit ist eine so hohe Frequenz (mind. 5,6%), mit der wir die Mutation in den gesunden Kontrollen nachweisen konnten, unwahrscheinlich. Wir haben daher zunächst eine zweite Gruppe mit 92 Proben von gesunden Kontrollen getestet. Hierbei konnte die Mutation nicht erneut nachgewiesen werden. Wir gehen daher am ehesten von einer Kontamination oder einer vorangegangenen Schädigung/Zerfall der DNA-Proben der ersten Kontroll-Gruppe aus. Möglicherweise kann eine Schimmelpilzkontamination diese Befunde erklären. Es wären diesbezüglich aber weitere Untersuchungen notwendig. Auch diese Mutation wurde von Dajana Grossmann bereits weiter

⁶ Die in dieser Arbeit von mir nachgewiesenen *missense* Mutationen wurden in unserer Arbeitsgruppe durch Dajana Grossman bereits funktionell charakterisiert und die Ergebnisse im Rahmen ihrer Dissertation bereits veröffentlicht.

untersucht (Grossmann, 2017). Die Mutation R450C wurde hier durch 4 von 9 Analysetools als krankheitsauslösend und von 2 Analysetools als möglicherweise krankheitsauslösend eingestuft (Grossmann, 2017). Auch diese Mutation wurde zudem in weiteren Datenbanken und Mutationsscreenings gesucht (Grossmann, 2017). Hierbei konnte die Mutation R450C nur in einer Datenbank für somatische Tumormutationen (cosmic70) nachgewiesen werden (Grossmann, 2017). Es ist daher von einer seltenen Variante (MAF < 0,5%) auszugehen, und die hier dargestellten Ergebnisse der gesunden Kontrollen mit einer Frequenz von >5% erscheinen noch unwahrscheinlicher.

Die dritte gefundene heterozygote *missense* Mutation F676V wurde bei einem der Parkinson-Patienten im Exon 21 des RHOT1-Gens nachgewiesen (Grossmann, 2017)⁷. Diese Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Phenylalanin zu Valin und liegt in der Transmembran-Domäne von Miro1. In den Untersuchungen der gesunden Kontrollen konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war diese Mutation, nach unseren Recherchen, bisher unbekannt. Mittlerweile ist sie auf ensembl.org unter [rs1240491796](https://ensembl.org/variation/Explore?db=core;v=rs1240491796) eingetragen (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;v=rs1240491796, 23.10.2018). Der Einfluss der Mutation auf die Funktion des Proteins wurde mittels der Software MutationTaster2 getestet. Hierbei wurde die Mutation ebenfalls als krankheitsauslösend eingestuft. Auch diese dritte Mutation wurde von Dajana Grossmann bereits weiter untersucht. Die Mutation F676V wurde hierbei nur durch 2 von 9 Analysetools als krankheitsauslösend eingestuft (Grossmann, 2017). In den weiteren Screening-Untersuchungen konnte diese Mutation jedoch bei einer gesunden Kontroll-Probe nachgewiesen werden (Grossmann, 2017). Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass die Mutation F676V mit der Entstehung eines PS assoziiert ist (Grossmann, 2017).

Insgesamt wurden bei dieser Arbeit drei neue *missense* Mutationen im RHOT1-Gen nachgewiesen. Bei diesen Mutationen scheint es sich um seltene

⁷ Die in dieser Arbeit von mir nachgewiesenen *missense* Mutationen wurden in unserer Arbeitsgruppe durch Dajana Grossman bereits funktionell charakterisiert und die Ergebnisse im Rahmen ihrer Dissertation bereits veröffentlicht.

Mutationen mit einem MAF < 0,5% zu handeln. Nach Manolio et al. ist bei seltenen Mutationen mit einem größeren Einfluss auf die Entstehung einer Erkrankung zu rechnen (Manolio et al., 2009). Zwei der gefundenen Mutationen (R272Q und R450C) scheinen nach den bisher vorliegenden und oben beschriebenen Daten insgesamt einen möglichen Einfluss auf die Entstehung eines PS zu haben. Diese Annahme wird durch die bereits in unserer Arbeitsgruppe erfolgten funktionellen Analysen unterstützt (Grossmann, 2017). Um dies nachweisen zu können, sind diesbezüglich jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig. Durch den Nachweis dieser neuen *missense* Mutationen bei PS-Patienten wird jedoch die Hypothese, dass Miro1 als Kandidatengen für eine gestörte mitochondriale Funktion und Dynamik bei der Parkinson-Krankheit eine Rolle spielt, weiter unterstützt.

5. Zusammenfassung

Die Parkinson Krankheit (PK) ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen des Menschen. Bei der Entstehung der Erkrankung spielen verschiedene Faktoren eine Rolle, wobei neben Umweltfaktoren auch verschiedene genetische Faktoren, für die Entstehung der PK verantwortlich sind. So können aktuell ca. 5-10% der Erkrankungen durch monogenetische Formen erklärt werden. Zudem gibt es mind. 28 weitere genetische Risikofaktoren, durch die die Wahrscheinlichkeit, die PK zu entwickeln, erhöht wird. Insgesamt lassen sich durch alle genetischen Faktoren zurzeit etwa 20-30% des Risikos, eine PK zu entwickeln, erklären. Es wird daher intensiv nach weiteren genetischen Ursachen gesucht. Hier gilt das Protein Miro1 als Kandidat, eine Rolle in der Pathogenese der PK zu spielen. *Miro1* ist ein Protein der Gruppe der mitochondrialen Rho-GTPasen, das eine entscheidende Rolle im Transport von Mitochondrien in den Neuronen, sowie im Rahmen der Qualitätskontrolle der Mitochondrien spielt.

Da bereits aus anderen Studien bekannt war, dass Störungen dieser Funktionen mit der Entstehung der PK assoziiert sind, haben wir im Rahmen einer Kandidatengen-Studie nach Mutationen im *Miro1/RHOT1*-Gen bei 752 Parkinson-Patienten gesucht. Hierfür wurden die DNA-Proben mittels High Resolution Melting Analysis, Sequenzierung, SNaPshot® und/oder Restriktionsenzymverdau untersucht.

Hierbei haben wir insgesamt 10 *Single Nukleotid Polymorphism* (SNP) beziehungsweise Mutationen nachweisen können. Bei drei dieser SNPs handelt es sich um intronische, nicht-kodierende Basenaustausche und bei 4 weiteren SNPs um *synonymous coding* SNPs, also Basenaustausche, die die Peptid-Sequenz nicht ändern.

Wir haben bei dieser Arbeit jedoch auch drei bisher unbekannt *missense* Mutationen im *Miro1*-Gen bei PK-Patienten nachweisen können. Diese drei Mutationen liegen in relevanten strukturellen Bereichen von *Miro1* (einer *ligand mimic domain* an der ersten EF-Hand-Domäne, einer GTPase-Domäne und der

Transmembran-Domäne). Diese Mutationen wurden zudem auch durch die Software MutationTaster als krankheitsauslösend eingestuft.

Durch den Nachweis von drei bisher unbekanntem Mutationen im *Miro1/RHOT1*-Gen bei PK-Patienten sehen wir die Bedeutung von *Miro1/RHOT1* als Kandidatengen für eine gestörte mitochondriale Funktion und Dynamik bei der Parkinson-Krankheit gestärkt. Nachfolgende funktionelle Studien an Patienten-basierten Zellmodellen haben diesen Verdacht zwischenzeitlich bestätigt und weisen auf eine Störung der Calcium-Pufferkapazität der Mitochondrien durch die o.g. Mutationen hin.

6. Literaturverzeichnis

- Abbasian, M., Seyedi, H.A.E., Boroujeni, Z.K., Mofid, M.R., 2015. **Easy method for production of a home-made DNA ladder in every laboratory.** Adv. Biomed. Res. 4, 70.
- Allain, H., Schuck, S., Mauduit, N., 2000. **Depression In Parkinson's Disease: Must Be Properly Diagnosed And Treated To Avoid Serious Morbidity.** BMJ 320 7245 , 1287–1288.
- Anvret, A., Ran, C., Westerlund, M., Sydow, O., Willows, T., Olson, L., Galter, D., Belin, A.C., 2012. **Genetic Screening of the Mitochondrial Rho GTPases MIRO1 and MIRO2 in Parkinson's Disease.** Open Neurol. J. 6, 1–5.
- Arber, W., Linn, S., 1969. **DNA modification and restriction.** Annu. Rev. Biochem. 38, 467–500.
- Baune, B.T., Ponath, G., Golledge, J., Varga, G., Arolt, V., Rothermundt, M., Berger, K., 2008. **Association between IL-8 cytokine and cognitive performance in an elderly general population--the MEMO-Study.** Neurobiol. Aging 29 6 , 937–944.
- Beal, M.F., 2005. **Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration.** Ann. Neurol. 58 4 , 495–505.
- Bell, D.A., DeMarini, D.M., 1991. **Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments.** Nucleic Acids Res. 19 18 , 5079.
- Bell, J.R., 2008. **A Simple Way to Treat PCR Products Prior to Sequencing Using ExoSAP-IT®.** BioTechniques 44 6 , 834.
- Bercovich, D., Regev, Z., Ratz, T., Luder, A., Plotsky, Y., Gruenbaum, Y., 1999. **Quantitative ratio of primer pairs and annealing temperature affecting PCR products in duplex amplification.** BioTechniques 27 4 , 762–764, 766–768, 770.
- Bergman, H., Deuschl, G., 2002. **Pathophysiology of Parkinson's disease: from clinical neurology to basic neuroscience and back.** Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc. 17 Suppl 3, S28-40.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., Seitelberger, F., 1973. **Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations.** J. Neurol. Sci. 20 4 , 415–455.
- Bing-Sheng Li, Xin-Ying Wang, Feng-Li Ma, Bo Jiang, Xiao-Xiao Song, An-Gao Xu, 2011. **Is High Resolution Melting Analysis (HRMA) Accurate for Detection of Human Disease-Associated Mutations? A Meta Analysis.** PLoS ONE 6 12 , 1–9.
- Birsa, N., Norkett, R., Higgs, N., Lopez-Domenech, G., Kittler, J.T., 2013. **Mitochondrial trafficking in neurons and the role of the Miro family of GTPase proteins.** Biochem. Soc. Trans. 41 6 , 1525–1531.
- Boada, J., Cutillas, B., Roig, T., Bermúdez, J., Ambrosio, S., 2000. **MPP(+)-induced mitochondrial dysfunction is potentiated by dopamine.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 268 3 , 916–920.
- Bowling, A.C., Beal, M.F., 1995. **Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases.** Life Sci. 56 14 , 1151–1171.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., Del Tredici, K., 2004. **Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology.** Cell Tissue Res. 318 1 , 121–134.
- Braak, H., Sandmann-Keil, D., Gai, W., Braak, E., 1999. **Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry.** Neurosci. Lett. 265 1 , 67–69.

- Burbulla, L.F., Kriebiehl, G., Krüger, R., 2010a. **Balance is the challenge - The impact of mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: BALANCE IS THE CHALLENGE.** Eur. J. Clin. Invest. 40 11 , 1048–1060.
- Burbulla, L.F., Schelling, C., Kato, H., Rapaport, D., Voitalla, D., Schiesling, C., Schulte, C., Sharma, M., Illig, T., Bauer, P., Jung, S., Nordheim, A., Schöls, L., Riess, O., Krüger, R., 2010b. **Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis.** Hum. Mol. Genet. 19 22 , 4437–4452.
- Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobowitz, D.M., Kopin, I.J., 1983. **A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80 14 , 4546–4550.
- Capper, R.L., Jin, Y.K., Lundgren, P.B., Peplow, L.M., Matz, M.V., van Oppen, M.J.H., 2015. **Quantitative high resolution melting: two methods to determine SNP allele frequencies from pooled samples.** BMC Genet. 16, 62.
- Chada, S.R., Hollenbeck, P.J., 2003. **Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling.** J. Exp. Biol. 206 Pt 12 , 1985–1992.
- Chan, D.C., 2006. **Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development.** Cell 125 7 , 1241–1252.
- Chang, D.T.W., Honick, A.S., Reynolds, I.J., 2006. **Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons.** J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 26 26 , 7035–7045.
- Chartier-Harlin, M.-C., Dachsel, J.C., Vilariño-Güell, C., Lincoln, S.J., Leprêtre, F., Hulihan, M.M., Kachergus, J., Milnerwood, A.J., Tapia, L., Song, M.-S., Le Rhun, E., Mutez, E., Larvor, L., Dufлот, A., Vanbesien-Mailliot, C., Kreisler, A., Ross, O.A., Nishioka, K., Soto-Ortolaza, A.I., Cobb, S.A., Melrose, H.L., Behrouz, B., Keeling, B.H., Bacon, J.A., Hentati, E., Williams, L., Yanagiya, A., Sonenberg, N., Lockhart, P.J., Zubair, A.C., Uitti, R.J., Aasly, J.O., Krygowska-Wajs, A., Opala, G., Wszolek, Z.K., Frigerio, R., Maraganore, D.M., Gosal, D., Lynch, T., Hutchinson, M., Bentivoglio, A.R., Valente, E.M., Nichols, W.C., Pankratz, N., Foroud, T., Gibson, R.A., Hentati, F., Dickson, D.W., Destée, A., Farrer, M.J., 2011. **Translation Initiator EIF4G1 Mutations in Familial Parkinson Disease.** Am. J. Hum. Genet. 89 3 , 398–406.
- Chonpathompikunlert, P., Boonruamkaew, P., Sukketsiri, W., Hutamekalin, P., Sroyraya, M., 2018. **The antioxidant and neurochemical activity of Apium graveolens L. and its ameliorative effect on MPTP-induced Parkinson-like symptoms in mice.** BMC Complement. Altern. Med. 18 1 , 103.
- Cooney, C.A., Galbraith, J.L., Bradbury, E.M., 1989. **A regularly spaced DNA size standard with 10 kbp resolution for pulsed field gel electrophoresis.** Nucleic Acids Res. 17 13 , 5412.
- Cresto, N., Gardier, C., Gubinelli, F., Gaillard, M.-C., Liot, G., West, A.B., Brouillet, E., 2018. **The Unlikely Partnership Between LRRK2 and α -Synuclein in Parkinson's Disease.** Eur. J. Neurosci. doi:10.1111/ejn.14182
- Danna, K., Nathans, D., 1971. **Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 68 12 , 2913–2917.
- David, G., Barrett, E.F., 2000. **Stimulation-Evoked Increases in Cytosolic $[Ca^{2+}]$ in Mouse Motor Nerve Terminals Are Limited by Mitochondrial Uptake and Are Temperature-Dependent.** J. Neurosci. 20 19 , 7290–7296.

- Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M., Kopin, I.J., 1979. **Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues.** *Psychiatry Res.* 1 3 , 249–254.
- Deuschl, G., Bain, P., Brin, M., 1998. **Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee.** *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 13 Suppl 3, 2–23.
- DGN S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom [Website], 2016. URL <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/030-010.html> (Aufruf am 15.10.18).
- Di Cristofaro, J., Silvy, M., Chiaroni, J., Bailly, P., 2010. **Single PCR multiplex SNaPshot reaction for detection of eleven blood group nucleotide polymorphisms: optimization, validation, and one year of routine clinical use.** *J. Mol. Diagn. JMD* 12 4 , 453–460.
- Doppler, K., Jentschke, H.-M., Schulmeyer, L., Vadasz, D., Janzen, A., Luster, M., Höffken, H., Mayer, G., Brumberg, J., Booij, J., Musacchio, T., Klebe, S., Sittig-Wiegand, E., Volkmann, J., Sommer, C., Oertel, W.H., 2017. **Dermal phospho-alpha-synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease.** *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133 4 , 535–545.
- Dorsey, E.R., Bloem, B.R., 2018. **The Parkinson Pandemic-A Call to Action.** *JAMA Neurol.* 75 1 , 9–10.
- Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., Tanner, C.M., 2007. **Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030.** *Neurology* 68 5 , 384–386.
- Edvardson, S., Cinnamon, Y., Ta-Shma, A., Shaag, A., Yim, Y.-I., Zenvirt, S., Jalas, C., Lesage, S., Brice, A., Taraboulos, A., Kaestner, K.H., Greene, L.E., Elpeleg, O., 2012. **A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism.** *PloS One* 7 5 , e36458. doi:10.1371/journal.pone.0036458
- Emelyanov, A.K., Usenko, T.S., Tesson, C., Senkevich, K.A., Nikolaev, M.A., Miliukhina, I.V., Kopytova, A.E., Timofeeva, A.A., Yakimovsky, A.F., Lesage, S., Brice, A., Pchelina, S.N., 2018. **Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set.** *Neurobiol. Aging* 71, 267.e7-267.e10.
- Erali, M., Voelkerding, K.V., Wittwer, C.T., 2008. **High resolution melting applications for clinical laboratory medicine.** *Exp. Mol. Pathol.* 85 1 , 50–58.
- Fernie, A.R., Carrari, F., Sweetlove, L.J., 2004. **Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 3 , 254–261.
- Fransson, Å., Ruusala, A., Aspenström, P., 2003. **Atypical Rho GTPases Have Roles in Mitochondrial Homeostasis and Apoptosis.** *J. Biol. Chem.* 278 8 , 6495–6502.
- Fransson, S., Ruusala, A., Aspenström, P., 2006. **The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344 2 , 500–510.
- Frederick, R.L., McCaffery, J.M., Cunningham, K.W., Okamoto, K., Shaw, J.M., 2004. **Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway.** *J. Cell Biol.* 167 1 , 87–98.
- Fredrick, J.F., 1964. **GEL ELECTROPHORESIS: PREFACE.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 307–308.
- Fu, Y.-B., Peterson, G.W., Dong, Y., 2016. **Increasing Genome Sampling and Improving SNP Genotyping for Genotyping-by-Sequencing with New Combinations of Restriction Enzymes.** *G3 Bethesda Md* 6 4 , 845–856.
- Funayama, M., Ohe, K., Amo, T., Furuya, N., Yamaguchi, J., Saiki, S., Li, Y., Ogaki, K., Ando, M., Yoshino, H., Tomiyama, H., Nishioka, K., Hasegawa, K., Saiki, H.,

- Satake, W., Mogushi, K., Sasaki, R., Kokubo, Y., Kuzuhara, S., Toda, T., Mizuno, Y., Uchiyama, Y., Ohno, K., Hattori, N., 2015. **CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study.** *Lancet Neurol.* 14 3 , 274–282.
- Gasser, T., Hardy, J., Mizuno, Y., 2011. **Milestones in PD genetics.** *Mov. Disord.* 26 6 , 1042–1048.
- Geisler, S., Holmström, K.M., Treis, A., Skujat, D., Weber, S.S., Fiesel, F.C., Kahle, P.J., Springer, W., 2010. **The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations.** *Autophagy* 6 7 , 871–878.
- Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S., Schwarz, T.L., 2006. **Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent.** *J. Cell Biol.* 173 4 , 545–557.
- Green, M.R., Sambrook, J., 2018. **Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR).** *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018 5 , pdb.prot095133. doi:10.1101/pdb.prot095133
- Grossmann, D., 2017. **Functional characterization of novel RhoT1 variants, which are associated with Parkinson's disease** (Dissertationsschrift). Universität Tübingen.
- Grossmann, D., Berenguer-Escuder, C., Bellet, M.E., Scheibner, D., Bohler, J., Massart, F., Rapaport, D., Skupin, A., Fouquier d'Hérouël, A., Sharma, M., Ghelfi, J., Raković, A., Lichtner, P., Antony, P., Glaab, E., May, P., Dimmer, K.S., Fitzgerald, J.C., Grünwald, A., Krüger, R., 2019. **Mutations in RHOT1 Disrupt Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contact Sites Interfering with Calcium Homeostasis and Mitochondrial Dynamics in Parkinson's Disease.** *Antioxid. Redox Signal.* 31 16 , 1213–1234.
- Gundry, C.N., 2003. **Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes.** *Clin. Chem.* 49 3 , 396–406.
- Guo, X., Macleod, G.T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M.P., Atwood, H.L., Zinsmaier, K.E., 2005. **The GTPase dMiro Is Required for Axonal Transport of Mitochondria to Drosophila Synapses.** *Neuron* 47 3 , 379–393.
- Han, K., Lee, T.Y., Nikitopoulos, D.E., Soper, S.A., Murphy, M.C., 2011. **A vertically stacked, polymer, microfluidic point mutation analyzer: Rapid high accuracy detection of low-abundance K-ras mutations.** *Anal. Biochem.* 417 2 , 211–219.
- Hobert, M.A., Niebler, R., Meyer, S.I., Brockmann, K., Becker, C., Huber, H., Gaenslen, A., Godau, J., Eschweiler, G.W., Berg, D., Maetzler, W., 2011. **Poor trail making test performance is directly associated with altered dual task prioritization in the elderly--baseline results from the TREND study.** *PLoS One* 6 11 , e27831. doi:10.1371/journal.pone.0027831
- Hollenbeck, P.J., Saxton, W.M., 2005. **The axonal transport of mitochondria.** *J. Cell Sci.* 118 Pt 23 , 5411–5419.
- Hsieh, C.-H., Shaltouki, A., Gonzalez, A. e., Bettencourt da cruz, A., Burbulla, L. f., St. Lawrence, E., Schüle, B., Krainc, D., Palmer, T. d., Wang, X., 2016. **Functional Impairment in Miro Degradation and Mitophagy Is a Shared Feature in Familial and Sporadic Parkinson's Disease.** *Cell Stem Cell* 19 6 , 709 - 724. doi:10.1016/j.stem.2016.08.002
- Imai, Y., Lu, B., 2011. **Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: disordered cellular power plant becomes a big deal in a major movement disorder.** *Curr. Opin. Neurobiol.* 21 6 , 935–941.

- Ishii, K., Fukui, M., 2001. **Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR.** Appl. Environ. Microbiol. 67 8 , 3753–3755.
- Islam, M.T., Sarker, S.K., Talukder, S., Bhuyan, G.S., Rahat, A., Islam, N.N., Mahmud, H., Hossain, M.A., Muraduzzaman, A.K.M., Rahman, J., Qadri, S.K., Shahidullah, M., Mannan, M.A., Tahura, S., Hussain, M., Saha, N., Akhter, S., Nahar, N., Begum, F., Shirin, T., Akhteruzzaman, S., Qadri, S.S., Qadri, F., Mannoor, K., 2018. **High resolution melting curve analysis enables rapid and reliable detection of G6PD variants in heterozygous females.** BMC Genet. 19 1 , 58.
- Jankovic, J., 2008. **Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.** J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 79 4 , 368–376.
- Karambataki, M., Malousi, A., Kouidou, S., 2014. **Risk-associated coding synonymous SNPs in type 2 diabetes and neurodegenerative diseases: genetic silence and the underrated association with splicing regulation and epigenetics.** Mutat. Res. 770, 85–93.
- Karbowski, M., Youle, R.J., 2003. **Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis.** Cell Death Differ. 10 8 , 870–880.
- Karimi-Moghadam, A., Charsouei, S., Bell, B., Jabalameli, M.R., 2018. **Parkinson Disease from Mendelian Forms to Genetic Susceptibility: New Molecular Insights into the Neurodegeneration Process.** Cell. Mol. Neurobiol. 38 6 , 1153–1178.
- Keeney, P.M., Xie, J., Capaldi, R.A., Bennett, J.P., 2006. **Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled.** J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 26 19 , 5256–5264.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N., 1998. **Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.** Nature 392 6676 , 605–608.
- Klosowiak, J.L., Focia, P.J., Chakravarthy, S., Landahl, E.C., Freymann, D.M., Rice, S.E., 2013. **Structural coupling of the EF hand and C-terminal GTPase domains in the mitochondrial protein Miro.** EMBO Rep. 14 11 , 968–974.
- Krebs, C.E., Karkheiran, S., Powell, J.C., Cao, M., Makarov, V., Darvish, H., Di Paolo, G., Walker, R.H., Shahidi, G.A., Buxbaum, J.D., De Camilli, P., Yue, Z., Paisán-Ruiz, C., 2013. **The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures.** Hum. Mutat. 34 9 , 1200–1207.
- Krüger, R., Klucken, J., Weiss, D., Tönges, L., Kolber, P., Unterecker, S., Lorrain, M., Baas, H., Müller, T., Riederer, P., 2017. **Classification of advanced stages of Parkinson's disease: translation into stratified treatments.** J. Neural Transm. Vienna Austria 1996 124 8 , 1015–1027.
- Krypuy, M., Newnham, G.M., Thomas, D.M., Conron, M., Dobrovic, A., 2006. **High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer.** BMC Cancer 6, 295.
- Kwon, J.M., Goate, A.M., 2000. **The candidate gene approach.** Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol. 24 3 , 164–168.
- La Cognata, V., D'Agata, V., Cavalcanti, F., Cavallaro, S., 2015. **Splicing: is there an alternative contribution to Parkinson's disease?** Neurogenetics 16 4 , 245–263.

- Lahiri, V., Klionsky, D.J., 2017. **Functional impairment in RHOT1/Miro1 degradation and mitophagy is a shared feature in familial and sporadic Parkinson disease.** *Autophagy* 13 8 , 1259–1261.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., Irwin, I., 1983. **Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis.** *Science* 219 4587 , 979–980.
- Larsen, S.B., Hanss, Z., Krüger, R., 2018. **The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease.** *Cell Tissue Res.* 373 1 , 21–37.
- Le Pecq, J.-B., Paoletti, C., 1966. **A new fluorometric method for RNA and DNA determination.** *Anal. Biochem.* 17 1 , 100–107.
- Lesage, S., Drouet, V., Majounie, E., Deramecourt, V., Jacoupy, M., Nicolas, A., Cormier-Dequaire, F., Hassoun, S.M., Pujol, C., Ciura, S., Erpapazoglou, Z., Usenko, T., Maurage, C.-A., Sahbatou, M., Liebau, S., Ding, J., Bilgic, B., Emre, M., Erginel-Unaltuna, N., Guven, G., Tison, F., Tranchant, C., Vidailhet, M., Corvol, J.-C., Krack, P., Leutenegger, A.-L., Nalls, M.A., Hernandez, D.G., Heutink, P., Gibbs, J.R., Hardy, J., Wood, N.W., Gasser, T., Durr, A., Deleuze, J.-F., Tazir, M., Destée, A., Lohmann, E., Kabashi, E., Singleton, A., Corti, O., Brice, A., French Parkinson's Disease Genetics Study (PDG), International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC), 2016. **Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy.** *Am. J. Hum. Genet.* 98 3 , 500–513.
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., Wittwer, C., 2004. **Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons.** *Clin. Chem.* 50 7 , 1156–1164.
- Lill, C.M., 2016. **Genetics of Parkinson's disease.** *Mol. Cell. Probes, Genetics of multifactorial diseases* 30 6 , 386–396.
- Lill, C.M., Klein, C., 2017. **Epidemiologie und Ursachen der Parkinson-Erkrankung.** *Nervenarzt* 88 4 , 345–355.
- Lindgren, P., von Campenhausen, S., Spottke, E., Siebert, U., Dodel, R., 2005. **Cost of Parkinson's disease in Europe.** *Eur. J. Neurol.* 12 s1 , 68–73.
- Liu, S., Sawada, T., Lee, S., Yu, W., Silverio, G., Alapatt, P., Millan, I., Shen, A., Saxton, W., Kanao, T., Takahashi, R., Hattori, N., Imai, Y., Lu, B., 2012. **Parkinson's Disease-Associated Kinase PINK1 Regulates Miro Protein Level and Axonal Transport of Mitochondria.** *PLoS Genet.* 8 3 , e1002537, doi:10.1371/journal.pgen.1002537.
- Loening, U.E., 1967. **The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis.** *Biochem. J.* 102 1 , 251–257.
- MacAskill, A.F., Brickley, K., Stephenson, F.A., Kittler, J.T., 2009a. **GTPase dependent recruitment of Grif-1 by Miro1 regulates mitochondrial trafficking in hippocampal neurons.** *Mol. Cell. Neurosci.* 40 3 , 301–312.
- MacAskill, A.F., Rinholm, J.E., Twelvetrees, A.E., Arancibia-Carcamo, I.L., Muir, J., Fransson, A., Aspenstrom, P., Attwell, D., Kittler, J.T., 2009b. **Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses.** *Neuron* 61 4 , 541–555.
- Magnin, S., Viel, E., Baraquin, A., Valmary-Degano, S., Kantelip, B., Pretet, J.-L., Mouglin, C., Bigand, M., Girardo, B., Borg, C., Ferrand, C., 2011. **A Multiplex SNaPshot Assay as a Rapid Method for Detecting KRAS and BRAF Mutations in Advanced Colorectal Cancers.** *J. Mol. Diagn.* 13 5 , 485–492.
- Mandemakers, W., Morais, V.A., De Strooper, B., 2007. **A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases.** *J. Cell Sci.* 120 10 , 1707–1716.

- Manolio, T.A., Collins, F.S., Cox, N.J., Goldstein, D.B., Hindorff, L.A., Hunter, D.J., McCarthy, M.I., Ramos, E.M., Cardon, L.R., Chakravarti, A., Cho, J.H., Guttmacher, A.E., Kong, A., Kruglyak, L., Mardis, E., Rotimi, C.N., Slatkin, M., Valle, D., Whittemore, A.S., Boehnke, M., 2009. **Finding the missing heritability of complex diseases.** *Nature* 461 7265 , 747–753.
- Manousaki, D., Dudding, T., Haworth, S., Hsu, Y.-H., Liu, C.-T., Medina-Gómez, C., Voortman, T., van der Velde, N., Melhus, H., Robinson-Cohen, C., Cousminer, D.L., Nethander, M., Vandenput, L., Noordam, R., Forgetta, V., Greenwood, C.M.T., Biggs, M.L., Psaty, B.M., Rotter, J.I., Zemel, B.S., Mitchell, J.A., Taylor, B., Lorentzon, M., Karlsson, M., Jaddoe, V.V.W., Tiemeier, H., Campos-Obando, N., Franco, O.H., Utterlinden, A.G., Broer, L., van Schoor, N.M., Ham, A.C., Ikram, M.A., Karasik, D., de Mutsert, R., Rosendaal, F.R., den Heijer, M., Wang, T.J., Lind, L., Orwoll, E.S., Mook-Kanamori, D.O., Michaëlsson, K., Kestenbaum, B., Ohlsson, C., Mellström, D., de Groot, L.C.P.G.M., Grant, S.F.A., Kiel, D.P., Zillikens, M.C., Rivadeneira, F., Sawcer, S., Timpson, N.J., Richards, J.B., 2017. **Low-Frequency Synonymous Coding Variation in CYP2R1 Has Large Effects on Vitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis.** *Am. J. Hum. Genet.* 101 2 , 227–238.
- Marinho, R.C., Martins, G.R., Souza, K.C., Sousa, A.L.M., Silva, S.T.C., Nobre, J.A., Teixeira, M.F.S., 2018. **Duplex nested-PCR for detection of small ruminant lentiviruses.** *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 49 Suppl 1; 83–92; doi:10.1016/j.bjm.2018.04.013
- Marongiu, R., Brancati, F., Antonini, A., Ialongo, T., Ceccarini, C., Scarciolla, O., Capalbo, A., Benti, R., Pezzoli, G., Dallapiccola, B., Goldwurm, S., Valente, E.M., 2007. **Whole gene deletion and splicing mutations expand the PINK1 genotypic spectrum.** *Hum. Mutat.* 28 1 , 98.
- Martin, I., Valina L. Dawson, Ted M. Dawson, 2011. **Recent Advances in the Genetics of Parkinson's Disease.** *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 12, 301–325.
- Mattson, M.P., Gleichmann, M., Cheng, A., 2008. **Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders.** *Neuron* 60 5 , 748–766.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., Wasiak, S., 2006. **Mitochondria: More Than Just a Powerhouse.** *Curr. Biol.* 16 14 , R551–R560.
- Meyer, N.J., Ferguson, J.F., Feng, R., Wang, F., Patel, P.N., Li, M., Xue, C., Qu, L., Liu, Y., Boyd, J.H., Russell, J.A., Christie, J.D., Walley, K.R., Reilly, M.P., 2014. **A functional synonymous coding variant in the IL1RN gene is associated with survival in septic shock.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 6 , 656–664.
- Morlino, G., Barreiro, O., Baixauli, F., Robles-Valero, J., Gonzalez-Granado, J.M., Villa-Bellosta, R., Cuenca, J., Sanchez-Sorzano, C.O., Veiga, E., Martin-Cofreces, N.B., Sanchez-Madrid, F., 2014. **Miro-1 Links Mitochondria and Microtubule Dynein Motors To Control Lymphocyte Migration and Polarity.** *Mol. Cell. Biol.* 34 8 , 1412–1426.
- Morris, R.L., Hollenbeck, P.J., 1993. **The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth.** *J. Cell Sci.* 104 (Pt 3), 917–927.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263–273.
- Nalls, M.A., Pankratz, N., Lill, C.M., Do, C.B., Hernandez, D.G., Saad, M., DeStefano, A.L., Kara, E., Bras, J., Sharma, M., Schulte, C., Keller, M.F., Arepalli, S., Letson, C., Edsall, C., Stefansson, H., Liu, X., Pliner, H., Lee, J.H., Cheng, R., 2014. **Large-scale meta-analysis of genome-wide association data**

- identifies six new risk loci for Parkinson's disease.** *Nat. Genet.* 46 9 , 989–993.
- Narayan, S., Liew, Z., Bronstein, J.M., Ritz, B., 2017. **Occupational pesticide use and Parkinson's disease in the Parkinson Environment Gene (PEG) study.** *Environ. Int.* 107, 266–273.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., Youle, R.J., 2008. **Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy.** *J. Cell Biol.* 183 5 , 795–803.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., Youle, R.J., 2010. **PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin.** *PLoS Biol.* 8 1 , e1000298, doi: 10.1371/journal.pbio.1000298.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M.J., Solera, J., 2015. **Real-time PCR detection chemistry.** *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 439, 231–250.
- Olgati, S., Quadri, M., Fang, M., Rood, J.P.M.A., Saute, J.A., Chien, H.F., Bouwkamp, C.G., Graafland, J., Minneboo, M., Breedveld, G.J., Zhang, J., International Parkinsonism Genetics Network, Verheijen, F.W., Boon, A.J.W., Kievit, A.J.A., Jardim, L.B., Mandemakers, W., Barbosa, E.R., Rieder, C.R.M., Leenders, K.L., Wang, J., Bonifati, V., 2016. **DNAJC6 Mutations Associated With Early-Onset Parkinson's Disease.** *Ann. Neurol.* 79 2 , 244–256.
- O'Sullivan, S.S., Williams, D.R., Gallagher, D.A., Massey, L.A., Silveira-Moriyama, L., Lees, A.J., 2008. **Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study.** *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 23 1 , 101–106.
- Palais, R.A., Liew, M.A., Wittwer, C.T., 2005. **Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping.** *Anal. Biochem.* 346 1 , 167–175.
- Pankratz, N., Wilk, J.B., Latourelle, J.C., DeStefano, A.L., Halter, C., Pugh, E.W., Doheny, K.F., Gusella, J.F., Nichols, W.C., Foroud, T., Myers, R.H., PSG-PROGENI and GenePD Investigators, Coordinators and Molecular Genetic Laboratories, 2009. **Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease.** *Hum. Genet.* 124 6 , 593–605.
- Parker, W.D., Boyson, S.J., Parks, J.K., 1989. **Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease.** *Ann. Neurol.* 26 6 , 719–723.
- Parker, W.D., Parks, J.K., Swerdlow, R.H., 2008. **Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex.** *Brain Res.* 1189, 215–218.
- Pichler, M., Balic, M., Stadelmeyer, E., Ausch, C., Wild, M., Guelly, C., Bauernhofer, T., Samonigg, H., Hoefler, G., Dandachi, N., 2009. **Evaluation of high-resolution melting analysis as a diagnostic tool to detect the BRAF V600E mutation in colorectal tumors.** *J. Mol. Diagn. JMD* 11 2 , 140–147.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, Elisabeth, etc..., 1997. **Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.** *Science* 276 5321 , 2045–2047.
- Quadri, M., Fang, M., Picillo, M., Olgati, S., Breedveld, G.J., Graafland, J., Wu, B., Xu, F., Erro, R., Amboni, M., Pappatà, S., Quarantelli, M., Annesi, G., Quattrone, A., Chien, H.F., Barbosa, E.R., International Parkinsonism Genetics Network, Oostra, B.A., Barone, P., Wang, J., Bonifati, V., 2013. **Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism.** *Hum. Mutat.* 34 9 , 1208–1215.
- Rapado, I., Grande, S., Albizua, E., Ayala, R., Hernández, J.-A., Gallardo, M., Gilsanz, F., Martínez-Lopez, J., 2009. **High resolution melting analysis for JAK2**

- Exon 14 and Exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms.** *J. Mol. Diagn. JMD* 11 2 , 155–161.
- Reed, G.H., Kent, J.O., Wittwer, C.T., 2007. **High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics.** *Pharmacogenomics* 8 6 , 597–608.
- Riedel, K.H., Wingfield, B.D., Britz, T.J., 1992. **Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers.** *FEMS Microbiol. Lett.* 71 1 , 69–72.
- Riedel, O., Klotsche, J., Spottke, A., Deuschl, G., Förstl, H., Henn, F., Heuser, I., Oertel, W., Reichmann, H., Riederer, P., Trenkwalder, C., Dodel, R., Wittchen, H.-U., 2008. **Cognitive impairment in 873 patients with idiopathic Parkinson's disease.** *J. Neurol.* 255 2 , 255–264.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., Mammucari, C., 2012. **Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 9 , 566–578.
- Roberts, R.J., 1980. **Restriction and modification enzymes and their recognition sequences.** *Nucleic Acids Res.* 8 1 , r63–r80.
- Rothdach, A.J., Trenkwalder, C., Haberstock, J., Keil, U., Berger, K., 2000. **Prevalence and risk factors of RLS in an elderly population: the MEMO study. Memory and Morbidity in Augsburg Elderly.** *Neurology* 54 5 , 1064–1068.
- Sachadyn, P., Sobiewska, G., Kur, J., 1998. **Thermal profile with alternately raised and lowered annealing temperature improves the PCR amplification using highly degenerate primers.** *Acta Biochim. Pol.* 45 3 , 691–694.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. **Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase.** *Science* 239 4839 , 487–491.
- Samaranch, L., Lorenzo-Betancor, O., Arbelo, J.M., Ferrer, I., Lorenzo, E., Irigoyen, J., Pastor, M.A., Marrero, C., Isla, C., Herrera-Henriquez, J., Pastor, P., 2010. **PINK1-linked parkinsonism is associated with Lewy body pathology.** *Brain J. Neurol.* 133 Pt 4 , 1128–1142.
- Sanger, F., Coulson, A.R., 1975. **A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.** *J. Mol. Biol.* 94 3 , 441–448.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 12 , 5463–5467.
- Saxton, W.M., Hollenbeck, P.J., 2012. **The axonal transport of mitochondria.** *J. Cell Sci.* 125 9 , 2095–2104.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., Marsden, C.D., 1990. **Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.** *J. Neurochem.* 54 3 , 823–827.
- Schiesling, C., Kieper, N., Seidel, K., Krüger, R., 2008. **Review: Familial Parkinson's disease--genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease.** *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34 3 , 255–271.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., Zeillinger, R., 1995. **Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain.** *Genome Res.* 4 4 , 234–238.
- Schwarz, J., Storch, A., 2007. **Parkinson-Syndrome: Grundlagen, Diagnostik und Therapie**, 1. Aufl. ed, Klinische Neurologie. Kohlhammer, Stuttgart.
- Schwarz, J.M., Cooper, D.N., Schuelke, M., Seelow, D., 2014. **MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age.** *Nat. Methods* 11 4 , 361–362.

- Schwarz, T.L., 2013. **Mitochondrial trafficking in neurons**. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5 6 .
- Seibert, F.B., Pedersen, K.O., Tiselius, A., 1938. **MOLECULAR WEIGHT, ELECTROCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF TUBERCULIN PROTEIN AND POLYSACCHARIDE MOLECULES**. J. Exp. Med. 68 3 , 413–438.
- Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J.M., Sharma, M., Gibbs, J.R., Berg, D., Paisan-Ruiz, C., Lichtner, P., Scholz, S.W., Hernandez, D.G., Krüger, R., Federoff, M., Klein, C., Goate, A., Perlmutter, J., Bonin, M., Nalls, M.A., Illig, T., Gieger, C., Houlden, H., Steffens, M., Okun, M.S., Racette, B.A., Cookson, M.R., Foote, K.D., Fernandez, H.H., Traynor, B.J., Schreiber, S., Arepalli, S., Zonozi, R., Gwinn, K., van der Brug, M., Lopez, G., Chanock, S.J., Schatzkin, A., Park, Y., Hollenbeck, A., Gao, J., Huang, X., Wood, N.W., Lorenz, D., Deuschl, G., Chen, H., Riess, O., Hardy, J.A., Singleton, A.B., Gasser, T., 2009. **Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease**. Nat. Genet. 41 12 , 1308–1312.
- Slack, G.S., Low, J., Kaminski, G., Yirrell, D., 2011. **Optimising PCR reactions; remember magnesium?** J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. 52 1 , 63–64.
- Smith, H.O., Nathans, D., 1973. **Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes**. J. Mol. Biol. 81 3 , 419–423.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997. **Alpha-synuclein in Lewy bodies**. Nature 388 6645 , 839–840.
- Sterne-Weiler, T., Sanford, J.R., 2014. **Exon identity crisis: disease-causing mutations that disrupt the splicing code**. Genome Biol. 15 1 , 201.
- Tan, E.K., Shen, H., Tan, J.M.M., Lim, K.L., Fook-Chong, S., Hu, W.P., Paterson, M.C., Chandran, V.R., Yew, K., Tan, C., Yuen, Y., Pavanni, R., Wong, M.C., Puvan, K., Zhao, Y., 2005. **Differential expression of splice variant and wild-type parkin in sporadic Parkinson's disease**. Neurogenetics 6 4 , 179–184.
- Thomas, B., Beal, M.F., 2007. **Parkinson's disease**. Hum. Mol. Genet. 16 Spec No. 2, R183-194.
- Tiselius, A., 1937. **Electrophoresis of serum globulin. I**. Biochem. J. 31 2 , 313–317.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M.K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G., Wood, N.W., 2004. **Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1**. Science 304 5674 , 1158–1160.
- van Spronsen, M., Mikhaylova, M., Lipka, J., Schlager, M.A., van den Heuvel, D.J., Kuijpers, M., Wulf, P.S., Keijzer, N., Demmers, J., Kapitein, L.C., Jaarsma, D., Gerritsen, H.C., Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., 2013. **TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites**. Neuron 77 3 , 485–502.
- Vilariño-Güell, C., Rajput, A., Milnerwood, A.J., Shah, B., Szu-Tu, C., Trinh, J., Yu, I., Encarnacion, M., Munsie, L.N., Tapia, L., Gustavsson, E.K., Chou, P., Tatarnikov, I., Evans, D.M., Pishotta, F.T., Volta, M., Beccano-Kelly, D., Thompson, C., Lin, M.K., Sherman, H.E., Han, H.J., Guenther, B.L., Wasserman, W.W., Bernard, V., Ross, C.J., Appel-Cresswell, S., Stoessl, A.J., Robinson, C.A., Dickson, D.W., Ross, O.A., Wszolek, Z.K., Aasly, J.O., Wu, R.-M., Hentati, F., Gibson, R.A., McPherson, P.S., Girard, M., Rajput, M., Rajput, A.H., Farrer, M.J., 2014. **DNAJC13 mutations in Parkinson disease**. Hum. Mol. Genet. 23 7 , 1794–1801.

- Vilariño-Güell, C., Wider, C., Ross, O.A., Dachsel, J.C., Kachergus, J.M., Lincoln, S.J., Soto-Ortolaza, A.I., Cobb, S.A., Wilhoite, G.J., Bacon, J.A., Behrouz, B., Melrose, H.L., Hentati, E., Puschmann, A., Evans, D.M., Conibear, E., Wasserman, W.W., Aasly, J.O., Burkhard, P.R., Djaldetti, R., Ghika, J., Hentati, F., Krygowska-Wajs, A., Lynch, T., Melamed, E., Rajput, A., Rajput, A.H., Solida, A., Wu, R.-M., Uitti, R.J., Wszolek, Z.K., Vingerhoets, F., Farrer, M.J., 2011. **VPS35 Mutations in Parkinson Disease**. *Am. J. Hum. Genet.* 89 1 , 162–167.
- Vlahou, G., Eliáš, M., von Kleist-Retzow, J.-C., Wiesner, R.J., Rivero, F., 2011. **The Ras related GTPase Miro is not required for mitochondrial transport in Dictyostelium discoideum**. *Eur. J. Cell Biol.* 90 4 , 342–355.
- Wang, X., Schwarz, T.L., 2009. **The Mechanism of Ca²⁺-Dependent Regulation of Kinesin-Mediated Mitochondrial Motility**. *Cell* 136 1 , 163–174.
- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M.J., Schwarz, T.L., 2011. **PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility**. *Cell* 147 4 , 893–906.
- Waring, M.J., 1965. **Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids**. *J. Mol. Biol.* 13 1 , 269–282.
- Weihofen, A., Thomas, K.J., Ostaszewski, B.L., Cookson, M.R., Selkoe, D.J., 2009. **Pink1 Forms a Multiprotein Complex with Miro and Milton, Linking Pink1 Function to Mitochondrial Trafficking**. *Biochemistry* 48 9 , 2045–2052.
- Werle, E., Schneider, C., Renner, M., Völker, M., Fiehn, W., 1994. **Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing**. *Nucleic Acids Res.* 22 20 , 4354–4355.
- Wider, C., Skipper, L., Solida, A., Brown, L., Farrer, M., Dickson, D., Wszolek, Z.K., Vingerhoets, F.J.G., 2008. **Autosomal dominant dopa-responsive parkinsonism in a multigenerational Swiss family**. *Parkinsonism Relat. Disord.* 14 6 , 465–470.
- Yamaoka, S., Hara-Nishimura, I., 2014. **The mitochondrial Ras-related GTPase Miro: views from inside and outside the metazoan kingdom**. *Front. Plant Sci.* 5, 350.
- Yan, J., Xu, H., Xiong, C., Ren, Z., Tian, G., Zeng, F., Huang, S., 2010. **Rapid and reliable detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations in Han Chinese using high-resolution melting analysis**. *J. Mol. Diagn. JMD* 12 3 , 305–311.
- Yi, M., Weaver, D., Hajnóczky, G., 2004. **Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit**. *J. Cell Biol.* 167 4 , 661–672.
- Zhou, L., Myers, A.N., Vandersteen, J.G., Wang, L., Wittwer, C.T., 2004. **Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye**. *Clin. Chem.* 50 8 , 1328–1335.
- Zhu, M., Zhao, S., 2007. **Candidate gene identification approach: progress and challenges**. *Int. J. Biol. Sci.* 3 7 , 420–427.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F., 2004. **Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications**. *Nucleic Acids Res.* 32 12 , e103–e103.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Neurologie in Tübingen unter Betreuung von Professor Dr. med. Rejko Krüger durchgeführt.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Brigitte Maurer und Dr. Lena Burbulla von mir eigenständig durchgeführt. Die Elektrophorese am ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer im Rahmen der Sequenzierung nach Sanger sowie im Rahmen der SNaPshot®-Untersuchungen erfolgten durch andere Labormitarbeiter wie Katrin Hauser und Claudia Schulte.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 21.12.2018

David Scheibner

8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Grossmann, Dajana – ***Functional characterization of novel RhoT1 variants, which are associated with Parkinson's disease*** – Dissertationsschrift
Universität Tübingen – 2017

Grossmann, D., Berenguer-Escuder, C., Bellet, M.E., Scheibner, D., Bohler, J., Massart, F., Rapaport, D., Skupin, A., Fouquier d'Hérouël, A., Sharma, M., Ghelfi, J., Raković, A., Lichtner, P., Antony, P., Glaab, E., May, P., Dimmer, K.S., Fitzgerald, J.C., Grünewald, A., Krüger, R., 2019. ***Mutations in RHOT1 Disrupt Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contact Sites Interfering with Calcium Homeostasis and Mitochondrial Dynamics in Parkinson's Disease***. Antioxid. Redox Signal. 31 16, 1213–1234.

9. Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Rejko Krüger für die Überlassung des spannenden Themas sowie für die viele Unterstützung im Rahmen der experimentellen Arbeit und der Ausarbeitung der Dissertationsschrift.

Zudem möchte ich mich bei den Kollegen/Kolleginnen im Labor für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Insbesondere danke ich Brigitte Maurer und Lena Burbulla für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor.

Bei Dajana Grossmann möchte ich mich für den fachlichen Austausch im Rahmen der Arbeit bedanken.

Katrin Hauser und Claudia Schulte danke ich für die Unterstützung im Rahmen der Sequenzierungen.

Meiner Schwester Alisa danke ich für die vielen Stunden Korrekturlesen und Diskussionen. Bei meiner Ehefrau Leonie möchte ich mich für die Unterstützung im Rahmen der gesamten Arbeit bedanken.