



# **Genetik und Ätiologie des Essentiellen Tremors**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Dipl.-Biol. Sandra Thier**

Kiel, August 2010

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Manuela Dittmar .....

Korreferent: PD Dr. med. Stephan Klebe .....

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2010 .....

Zum Druck genehmigt: .....

Der Dekan: .....

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Phänotyp des essentiellen Tremors (ET).....	1
1.1.1 Ätiologie .....	2
1.1.2 Diagnose .....	4
1.1.3 Epidemiologie und Genetik .....	5
1.1.3.1 <i>Monogener, wahrscheinlich autosomal dominanter ET: ETM-Kopplungsregionen.....</i>	<i>7</i>
1.1.3.2 <i>Genetisch komplexer ET: LINGO1 .....</i>	<i>9</i>
1.1.3.3 <i>Pathophysiologische Kandidatengene .....</i>	<i>10</i>
1.2 Morbus Parkinson .....	13
1.3 Identifizierung der Ursachen genetisch bedingter Krankheiten.....	15
1.3.1 Kopplungsstudien .....	16
1.3.2 Assoziationsstudien.....	18
1.4 Ziele der Arbeit .....	20
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1 Reagenzien und Verbrauchsmittel.....	22
2.2 Geräte .....	23
2.3 Internetdatenbanken und Programme.....	24
2.4 Studienpopulation.....	25
2.4.1 Essentieller Tremor .....	26
2.4.1.1 <i>Fallstichprobe .....</i>	<i>26</i>
2.4.1.2 <i>Kontrollstichprobe .....</i>	<i>27</i>
2.4.1.3 <i>Familien.....</i>	<i>28</i>
2.4.2 Morbus Parkinson .....	28
2.4.2.1 <i>Fallstichprobe .....</i>	<i>28</i>

---

2.4.2.2	<i>Kontrollstichprobe</i> .....	29
2.5	Probenpräparation zur Genotypisierung .....	29
2.5.1	DNA Isolierung aus EDTA-Vollblut .....	29
2.5.2	Gesamt-Genom-Amplifikation .....	30
2.5.3	Gelelektrophorese .....	31
2.5.4	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	31
2.5.5	Herstellung von Platten für die SNPlex™- und TaqMan®-Genotypisierung.....	32
2.6	Genotypisierung .....	33
2.6.1	Auswahl der STR-Marker .....	33
2.6.2	Amplifikation .....	33
2.6.3	SNP-Auswahl und Pooldesign .....	35
2.6.4	SNPlex™-Technologie .....	35
2.6.5	TaqMan®-Genotypisierung .....	38
2.7	Expressionsstudie des Transkripts <i>BC038758</i> .....	39
2.8	Exon-DNA-Sequenzierung des Transkripts <i>BC038758</i> .....	41
2.9	Statistik.....	42
2.9.1	Kopplungsanalysen .....	42
2.9.1.1	<i>Die statistische Teststärke und Signifikanzschwellen</i> .....	42
2.9.1.2	<i>Parametrische Analysen</i> .....	43
2.9.1.3	<i>Nicht-parametrische Analysen</i> .....	44
2.9.2	Assoziationsanalysen .....	45
2.9.2.1	<i>Die statistische Teststärke</i> .....	45
2.9.2.2	$\chi^2$ -Test.....	46
2.9.2.3	<i>Logistische Regression</i> .....	47
2.9.2.4	<i>Hardy-Weinberg-Gleichgewicht</i> .....	47
2.9.2.5	<i>Odds Ratio</i> .....	48
2.10	Datenmanagement .....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
3.1	Kopplungsanalyse der ET-Familien.....	49
3.1.1	Replikation der ETM-Regionen.....	49
3.1.1.1	<i>Feinkartierung der ETM2-Region</i> .....	51
3.1.1.2	<i>Dopamin-Rezeptor D3 Gen</i> .....	52
3.1.2	GABA <sub>A</sub> -R-Untereinheiten als Kandidatengene .....	53
3.1.3	Genomweite Kopplungsstudie (GWKS).....	54
3.1.3.1	<i>Analyse der einzelnen Familien</i> .....	57
3.1.3.2	<i>Feinkartierung des putativen Locus auf Chromosom 3q26.31 bis 3q29</i> .....	58

3.1.3.3	<i>Feinkartierung des putativen Locus auf Chromosom 19p13.2-19p13.12</i> .....	59
3.1.3.4	<i>Ergebnisse der ETM-Regionen in der GWKS</i> .....	61
3.1.3.5	<i>GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Loci in der GWKS</i> .....	61
3.2	Assoziationsanalyse von Kandidatengenen .....	62
3.2.1	<i>DRD3</i> .....	62
3.2.2	GABA <sub>A</sub> -R-Untereinheiten .....	63
3.2.3	<i>LINGO1</i> .....	65
3.2.3.1	<i>Replikation in unabhängiger Stichprobe</i> .....	66
3.2.3.2	<i>Assoziationsanalyse des LINGO1 Gens in einer Morbus Parkinson-Studienpopulation</i> .....	69
3.3	Expressionsstudien des Transkripts <i>BC038758</i> .....	71
3.4	Exon-Sequenzierung des Transkripts <i>BC038758</i> .....	72
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>74</b>
4.1	Ergebnisse der Kopplungsanalyse.....	74
4.1.1	Ergebnisse mit Markern in den ETM-Regionen .....	74
4.1.1.1	<i>ETM1</i> .....	75
4.1.1.2	<i>DRD3</i> .....	76
4.1.1.3	<i>ETM2</i> .....	79
4.1.1.4	<i>Feinkartierung der ETM2-Region</i> .....	80
4.1.1.5	<i>ETM3</i> .....	83
4.1.2	Untereinheiten der GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren .....	84
4.1.3	Genomweite Kopplungsstudie .....	85
4.1.3.1	<i>Gemeinsame Analyse aller Familien</i> .....	85
4.1.3.2	<i>Separate Analyse der einzelnen Familien</i> .....	88
4.1.3.3	<i>Feinkartierung des putativen Locus auf Chromosom 3q26.31-3q29</i> .....	90
4.1.3.4	<i>Feinkartierung des putativen Locus 19p13.2 bis 19p13.12</i> .....	91
4.2	Ergebnisse der Assoziationsanalysen.....	92
4.2.1	<i>Dopamin-Rezeptor D3 Gen</i> .....	92
4.2.2	GABA <sub>A</sub> -R-Untereinheiten .....	94
4.2.3	<i>LINGO1</i> als Suszeptibilitätsfaktor für den ET .....	96
4.2.3.1	<i>LINGO1 und Morbus Parkinson</i> .....	100
4.2.3.2	<i>Expressionsstudien des Transkriptes BC038758</i> .....	104
4.2.3.3	<i>Sequenzierung des Transkriptes BC038758</i> .....	105
4.3	Limitierungen dieser Arbeit .....	108
4.3.1	ET-Diagnose als Fehlerquelle.....	109
4.3.2	Statistische Teststärke .....	111
4.3.3	Populationsstratifizierung .....	113
4.3.4	Multiples Testen, falsch-positive Ergebnisse und Signifikanzschwellen .....	115

---

4.3.5	Replizierbarkeit der Suszeptibilitätsfaktoren heterogener Erkrankungen.....	115
4.4	Schlussfolgerungen .....	116
4.4.1	Kopplungsanalysen zum ET .....	116
4.4.2	Assoziationsanalysen zum ET .....	118
4.4.3	Ausblicke .....	118
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>134</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>152</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>154</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>156</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Histologischer Nachweis von Lewy-Körperchen und Torpedos im Gehirn. ....	3
Abbildung 1-2:	Dopaminerge Erregungsleitung an der Synapse.....	8
Abbildung 1-3:	Regulierung des Wachstums von Axonen im zentralen Nervensystem. ....	10
Abbildung 1-4:	GABAerge synaptische Übertragung. ....	11
Abbildung 1-5:	Aufbau des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors. ....	11
Abbildung 1-6:	Anordnung und Lokalisation der GABA <sub>A</sub> -Rezeptor und GABA-Transporter Gene.....	12
Abbildung 1-7:	Überlappung der Syndrome des Essentiellen Tremor und des Morbus Parkinson. ....	14
Abbildung 1-8:	Prinzip der direkten (A) und indirekten (B) Assoziationsanalyse.....	19
Abbildung 1-9:	Aufgabenstellung dieser Arbeit. ....	21
Abbildung 2-1:	Archimedes Spirale.....	27
Abbildung 2-2:	Prinzip der gesamt-Genom-Amplifikation. ....	31
Abbildung 2-3:	Anordnung der Proben im 96er-Format. ....	32
Abbildung 2-4:	Ligationsprodukt der Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA) -Reaktion. ....	36
Abbildung 2-5:	PCR des allelspezifischen Produkts bei der SNPLex™ Genotypisierung.....	36
Abbildung 2-6:	Visualisierung der Genotypen durch die GeneMapper Software v4.0.....	37
Abbildung 2-7:	Prinzip der TaqMan®-Genotypisierung. ....	38
Abbildung 2-8:	Graphische Darstellung zur Berechnung der statistischen Teststärke.....	46
Abbildung 3-1:	Stammbaum der ET-Familie TEX mit Haplotypen von <i>ETM2</i> .....	52
Abbildung 3-2:	Darstellung der sechs ET-Familien für die GWKS.....	55
Abbildung 3-3:	Graphische Darstellung der Ergebnisse der GWKS.....	56
Abbildung 3-4:	Ergebnisse der GWKS für einzelne ET-Familien. ....	58
Abbildung 3-5:	Übersicht der untersuchten SNPs in der <i>LINGO1</i> Region (100 kb).....	68



---

Abbildung 3-6:	Expressionsnachweis von <i>BC038758</i> im Gehirn. ....	71
Abbildung 3-7:	Expressionsnachweis in verschiedenen Gewebepanels.....	72
Abbildung 4-1:	Familien von Lucotte <i>et al.</i> und Jeanneteau <i>et al.</i> für Kopplungsnachweis zum <i>DRD3</i> Gen. ....	77
Abbildung 4-2:	Zusammenhang vom homozygotem Vorkommen des Risikoallels der Ser9Gly-Variante mit dem Alter bei Krankheitsbeginn und mit der Tremorstärke in der Studie von Jeanneteau <i>et al.</i> . ....	93
Abbildung 4-3:	Genomische Region des <i>LINGO1</i> Gens. ....	107
Abbildung 7-1:	Stammbäume der 20 ET-Familien für die Kopplungsstudien.....	127
Abbildung 7-2:	Haplotypanalyse von NG48 Chromosom 3.....	129
Abbildung 7-3:	Feinkartierung des putativen Chromosom 19 Locus in der ET-Familie NG48 .....	130

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Diagnosekriterien des ET der <i>Tremor Investigation Group</i> (TRIG).....	5
Tabelle 2-1:	Zusammensetzung der Studienstichproben in den einzelnen Projekten der Kopplungs- und Assoziationsanalysen. ....	25
Tabelle 2-2:	PCR-Ansatz für STR-Marker.....	34
Tabelle 2-3:	Programm der Touch down PCR. ....	34
Tabelle 2-4:	Primer für die Expressionsstudie des Transkripts <i>BC038758</i> .....	41
Tabelle 2-5:	Primer der Sequenzierreaktion der Tanskriptvariante <i>BC038758</i> .....	42
Tabelle 2-6:	Signifikanzschwellen genomweiter Kopplungsanalysen. ....	43
Tabelle 2-7:	Verwendetes Modell für die parametrische Kopplungsanalyse.....	44
Tabelle 2-8:	Kontingenztafel des allelischen $\chi^2$ -Test .....	46
Tabelle 2-9:	Kontingenztafel des genotypischen $\chi^2$ -Test .....	47
Tabelle 3-1:	Ergebnisse der Kopplungsanalyse für die ETM-Regionen.....	50
Tabelle 3-2:	Ergebnisse der Kopplungsanalyse für die <i>ETM2</i> -Region der ET-Familie TEX. ....	51
Tabelle 3-3:	Ergebnisse der Kopplungsanalyse für die GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Untereinheiten ....	53
Tabelle 3-4:	Ergebnisse der Feinkartierung von Chromosom 3 in allen sechs Familien der GWKS.....	59
Tabelle 3-5:	Ergebnisse der Feinkartierung von Chromosom 19.....	60
Tabelle 3-6:	Kombination der <i>ETM2</i> -Marker mit den Markern der GWKS auf Chromosom 2. ....	61
Tabelle 3-7:	Vergleich der Allelfrequenzen von SNP rs6280 des <i>DRD3</i> Gens zwischen ET-Patienten und Kontrollen unter Beachtung der Herkunft und der Familienanamnese.....	63
Tabelle 3-8:	Ergebnisse der neun nominal signifikanten SNPs der 1. Stufe der Assoziationsanalyse der GABA <sub>A</sub> -R-Untereinheiten.....	64
Tabelle 3-9:	Assoziationsergebnisse der fünf nachverfolgten SNPs in der 2. Stufe. ....	64
Tabelle 3-10:	Assoziationsergebnisse der 10 <i>LINGO1</i> htSNPs. ....	65

---

Tabelle 3-11:	Subgruppenanalyse von rs8030859, rs9652490 und rs11856808.....	66
Tabelle 3-12:	Ergebnisse der Replikation der drei <i>LINGO1</i> SNPs. ....	66
Tabelle 3-13:	Ergebnisse der Assoziationsanalyse in einer deutschen Morbus Parkinson-Stichprobe. ....	70
Tabelle 3-14:	Ergebnisse der Subgruppenanalyse in der Morbus Parkinson-Stichprobe.....	70
Tabelle 3-15:	Ergebnis der Mutationsdetektion im Transkript <i>BC038758</i> . ....	73
Tabelle 7-1:	Auflistung der verwendeten Mikrosatelliten für die Segregationsanalyse der GABA <sub>A</sub> -Rezeptor Gene. ....	128
Tabelle 7-2:	Ergebnisse der Feinkartierung von Chromosom 3 in Familie NG48.....	129
Tabelle 7-3:	Klinische Daten der ET-Probanden mit positiver Familienanamnese der <i>DRD3</i> Assoziationsstudie.....	131
Tabelle 7-4:	Klinische Daten der ET-Probanden ohne positive Familienanamnese der <i>DRD3</i> Assoziationsstudie.....	132
Tabelle 7-5:	Klinische Daten der Stichproben der GABA <sub>A</sub> R-Assoziationsanalyse.....	132
Tabelle 7-6:	Regionen für die Assoziationsstudie der Gene der GABA <sub>A</sub> R-Untereinheiten und der GABA-Transporter. ....	133
Tabelle 7-7:	Klinische Daten der deutschen und französischen ET-Patienten für die <i>LINGO1</i> Studie. ....	133
Tabelle 7-8:	Klinische Daten der Parkinson Patienten für die <i>LINGO1</i> Assoziationsstudie.	133

# Abkürzungsverzeichnis

A2M	engl.: <i>alpha-2-macroglobulin</i>
ACO	eng.: <i>aging controls</i>
ASO	allelspezifisches Oligonukleotid
BDZ	Benzodiazepine
bp	Basenpaare
C.I.	Konfidenzintervall
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CC	engl.: <i>case control</i>
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i>
CEPH	franz.: <i>Centre d'Etude du Polymorphisme Humain</i>
cM	Centimorgan
CNV	engl.: <i>copy number variation</i>
CR	engl.: <i>call rate</i>
cSNP	engl.: <i>coding SNP</i>
DA	Dopamin
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
df	Freiheitsgrad
DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DRD3	Dopamin Rezeptor D3
DYT	Dystonie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ET	Essentieller Tremor
ETM1, 2, 3	<i>Essential Tremor 1, 2, 3</i>
FMR1	engl.: <i>fragile X mental retardation 1</i>
Franz.	französisch
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GABA <sub>A</sub> -R	GABA-Rezeptoren der Klasse A
GABRA1, 2, 4, 5, 6	engl.: <i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1, 2, 4, 5, 6</i>
GABRB1, 2, 3	engl.: <i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1, 2, 3</i>
GABRD	engl.: <i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta</i>
GABRG1, 2, 3	engl.: <i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 1, 2, 3</i>
GABRP	engl.: <i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi</i>
GABRR1, 2	engl.: <i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, rho 1, 2</i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</i>
GAT1	engl.: <i>sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1</i>

<i>GBA</i>	<i>Glucocerebrosidase</i>
gDNA	genomische DNA
Gly	Glycin
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
GWKS	genomweite Kopplungsstudie
H <sub>2</sub> O	Wasser
HapMap	engl.: <i>haplotype map of the human genome</i>
<i>HNMT</i>	<i>Histamin N-Methyltransferase</i>
<i>HS1-BP3</i>	engl.: <i>HS1 binding protein 3</i>
ht	engl.: <i>haplotype tagging</i>
HWE	engl.: <i>Hardy-Weinberg-Equilibrium</i>
IBD	engl.: <i>identical by descent</i>
IBS	engl.: <i>identical by state</i>
kb	Kilobasenpaar
LD	engl.: <i>linkage disequilibrium</i>
LIMS	engl.: <i>Laboratory Information Management System</i>
<i>LINGO1</i>	engl.: <i>leucine rich repeat and immunoglobulin domain-containing, Nogo receptor-interacting protein gene 1</i>
LOD	engl.: <i>logarithm of odds</i>
LOD <sub>max</sub>	theoretisch maximal möglicher LOD-Wert
LRR	engl.: <i>leucine rich repeat</i>
<i>LRRK2</i>	engl.: <i>leucine rich repeat kinase 2</i>
LSO	locusspezifisches Oligonukleotid
m	Anzahl der Kontrollen
mA	Milliampere
MAF	engl.: <i>minor allele frequency</i>
MAP-Kinase	Mitogen-assoziierten Protein-Kinase
<i>MAPT</i>	<i>Microtubule-assoziierten Protein Tau</i>
Mb	Megabasen
MDA	engl.: <i>multiple displacement amplification</i>
MDS	engl.: <i>Movement Disorder Society</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min	Minute
MP	Morbus Parkinson
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i>
n	Anzahl
n11	Anzahl der Fälle homozygot für Allel 1
n12	Anzahl der Fälle heterozygot
n22	Anzahl der Fälle homozygot für Allel 2
NCBI	engl.: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
NIH	engl.: <i>National Institute of Health</i>

---

NPL	engl.: <i>non-parametric linkage analysis</i>
nt	Nukleotide
OLA	Oligonukleotid-Ligations-Assay
OR	engl.: <i>odds ratio</i>
pCCA	p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll $\chi^2$ -Tests
pCCG	p-Wert des genotypbasierten Fall-Kontroll $\chi^2$ -Tests
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PL	engl.: <i>parametric linkage analysis</i>
PS	Populationsstratifizierung
$r^2$	konservativer Kopplungskoeffizient
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i>
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	engl.: <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SD	engl.: <i>standard deviation</i>
Ser	Serin
<i>SLC6A1, 11, 12, 13</i>	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1, 11, 12, 13</i>
<i>SNCA</i>	engl.: <i>alpha-synuclein</i>
SNP	engl.: <i>single nucleotide polymorphism</i>
SPC	engl.: <i>special phenotyped controls</i>
STR	engl.: <i>small tandem repeat</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TRIG	engl.: <i>Tremor Investigation Group</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	engl.: <i>units</i>
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UV	ultraviolettes Licht
WGA	engl.: <i>whole genome amplification</i>
WTCCC	engl.: <i>Wellcome Trust Case-Control Consortium</i>
ZNS	zentrale Nervensystem

# 1 Einleitung

Der erstmals 1836 von Most als eigenständiges Krankheitsbild beschriebene essentielle Tremor (ET) zählt zu den häufigsten neurologischen Bewegungsstörungen (Louis *et al.*, 1998b, Most, 1836). Dennoch sind viele Aspekte, wie z.B. die Pathophysiologie und die Genetik der Erkrankung, noch nicht geklärt. Die große klinische Heterogenität sowie die teilweise vorhandene Überlappung zu anderen neurologischen Erkrankungen erschweren die Diagnose. Die Pathogenese des ET ist ebenfalls noch weitgehend unbekannt. Die Erforschung der genetischen Ursachen dieser Erkrankung bietet eine vielversprechende Möglichkeit, Erkenntnisse über die Ursachen der Krankheitsentstehung zu erlangen und wirksame Therapien zu entwickeln.

## 1.1 Phänotyp des essentiellen Tremors (ET)

Der Begriff Tremor leitet sich aus dem lateinischen Wort „*tremere*“ (zittern) ab. Tremor ist definiert als eine unwillkürliche, rhythmische, oszillierende Bewegung, von der verschiedene Muskelgruppen mit variabler Amplitude betroffen sein können (Deuschl *et al.*, 1998). Der physiologische Tremor, auch normaler Tremor genannt, stellt keine Erkrankung dar und kann bei jedem gesunden Menschen auftreten. Er wird zum Beispiel durch Angst, Anstrengung, Stress oder Koffein hervorgerufen. Dieser Tremor ist meist reversibel, wenn der auslösende Reiz nicht mehr vorhanden ist. Mit seiner niedrigen Amplitude und hohen Frequenz (ca. 6-12 Hz) wird der physiologische Tremor nicht als pathologisch angesehen. Die pathologischen Tremorformen können in Ruhe- und Aktionstremor unterteilt werden (Elble, 2000). Der Ruhetremor tritt in Ruhestellung auf, d.h. bei entspannter Muskulatur. Im Gegensatz dazu steht der Aktionstremor, bei dem der Tremor durch Muskelkontraktion hervorgerufen wird. Der Aktionstremor kann in den Haltetremor (bei reiner Schwerkraftbelastung), den isometrischen Tremor (beim Halten von schweren Gegenständen) und den Intentionstremor (bei zielgerichteten Bewegungen) untergliedert werden.

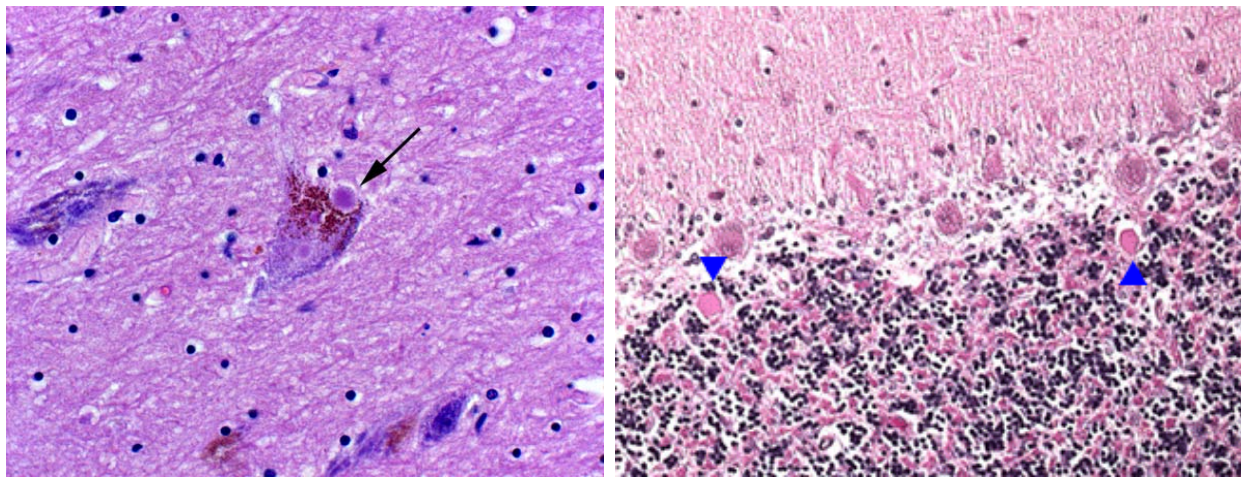
Der klassische ET zeichnet sich überwiegend durch einen Aktions-/Haltetremor mit einer Frequenz von 4-10 Hz und einer hohen Amplitude aus. Ein Ruhetremor hingegen tritt nur selten auf (Findley & Cleeves, 1984). Am häufigsten vom ET betroffene Körperregionen sind die Hände (94 %) und die oberen Extremitäten. Es können aber auch der Kopf (33 %), die unteren Extremitäten (13 %), die Stimme (16 %), das Gesicht (3 %) und der Rumpf (3 %) betroffen sein (Elble, 2000). Bei 50-70 % der Patienten ist nach Ingestion von geringen Mengen Alkohol eine Besserung des Aktionstremors festzustellen (Boecker *et al.*, 1996, Deuschl, 1999), wobei sich neurophysiologisch eine Reduktion der Amplitude bei unveränderter Frequenz nach Alkoholkonsum zeigt (Koller & Biary, 1984). Die Frequenz des essentiellen Tremors nimmt typischerweise im Alter ab, während die Amplitude zunimmt (Putzke *et al.*, 2006). Die große Amplitude des ET bedingt eine starke funktionelle Behinderung, die mit zunehmendem Lebensalter noch ansteigen kann. Die Erkrankung kann demzufolge zu erheblichen Einschränkungen im alltäglichen Leben führen (Lorenz *et al.*, 2006). Viele Patienten haben große Schwierigkeiten bei gewöhnlichen Aktivitäten wie z.B. beim Essen und Trinken, da sie häufig aufgrund des Aktionstremors Flüssigkeit verschütten oder ihnen das Essen vom Besteck fällt. Auch sind feinmotorische Bewegungen wie z.B. Schreiben oder Hemdenzuknöpfen stark beeinträchtigt oder nicht mehr durchführbar. Die Erkrankung hat Auswirkungen auf die Arbeit und das Sozialleben der Patienten. Teilweise können Betroffene im Zuge des progressiven Krankheitsverlaufs ihren Beruf nicht mehr ausüben. Des Weiteren kann aufgrund von sozialer Stigmatisierung ein Rückzug der Betroffenen aus dem öffentlichen Leben beobachtet werden.

### **1.1.1 Ätiologie**

Die Pathophysiologie des ET ist noch nicht hinreichend geklärt. Es werden u.a. Störungen im Guillain-Mollaret Dreieck (untere Olive, Nucleus ruber und Nucleus dentatis) als ursächlich für den ET diskutiert, wie Harmalin-Tiermodelle zeigten. Durch Harmalin, einem natürlichen Alkaloid, werden bei Nagern Läsionen der inferioren Olive induziert, wodurch ein Tremor hervorgerufen wird, der klinisch dem des menschlichen ET ähnelt (Elble, 1998, Paterson *et al.*, 2009). Viele klinische Aspekte sowie einige Bildgebungsstudien sprechen dafür, dass der ET durch Störungen im Kleinhirn hervorgerufen wird (Nicoletti *et al.*, 2010). Der bei ET-Patienten häufig vorkommende Intentionstremor spricht zusätzlich für eine Störung des Kleinhirns, welches für die Blick- Ziel- und Stützbewegungen verantwortlich ist (Deuschl & Elble, 2009).



Das Gangbild (z.B. breitbasig-, ataktischer Gang), die Dezeleration sowie die Verlängerung der Bewegungsdauer bei Greif- und Zeigebewegungen und abnorme Augenfolgebewegungen der ET-Patienten deuten ebenfalls auf zerebellare Funktionsstörungen hin (Deuschl *et al.*, 2000). In Positronen-Emissions-Tomographie Studien konnte eine bilaterale zerebellare Aktivierung, nicht aber eine Aktivierung der unteren Olive bei ET-Patienten gefunden werden (Colebatch *et al.*, 1990, Jenkins *et al.*, 1993). Bei der Protonen-Magnet-Resonanz-Spektroskopie, welche für die Messung von Metaboliten eingesetzt wird, konnte eine Verminderung von *N*-Acetyl-L-Aspartat (NAA) im Kleinhirn von ET-Patienten detektiert werden, was auf eine Degeneration des neuronalen Gewebes schließen lässt (Tedeschi *et al.*, 1996). Dieses führte zu der aktuellen Debatte, dass der ET wohlmöglich als neurodegenerative Erkrankung einzustufen ist (Louis *et al.*, 2002, Louis & Vonsattel, 2008). Unterstützt wird diese Hypothese durch pathologische Präparate von ET-Gehirnen, bei denen sogenannte Torpedos (axonale Schwellungen der Purkinje-Zellen) und Lewy-Körperchen (Abbildung 1-1) gefunden worden. Läsionen des Kleinhirns sowie Torpedos und Lewy-Körperchen sind pathologische Befunde bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. bei Morbus Parkinson und Demenz.



**Abbildung 1-1: Histologischer Nachweis von Lewy-Körperchen und Torpedos im Gehirn.**

Das linke Bild zeigt Lewy-Körperchen (schwarzer Pfeil), welches runde zytoplasmatische Einschlusskörperchen der Nervenzellen sind. Sie bestehen aus  $\alpha$ -Synuclein, Ubiquitin, Neurofilament und anderen Proteinablagerungen und wurden zuerst mit der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht. Das rechte Bild zeigt einen Ausschnitt der Kleinhirnrinde mit den typischen Purkinje-Zellen und Torpedos (blaue Pfeile).

## 1.1.2 Diagnose

Die Diagnosestellung des essentiellen Tremors erfolgt bislang rein nach klinischen Diagnosekriterien. Da noch keine biologischen Marker für den ET identifiziert werden konnten, können keine Labortests bei der Diagnose helfen. Das Fehlen einheitlicher Diagnosekriterien führt zu großen Problemen bei epidemiologischen Studien zum ET, wie z.B. abweichender Prävalenzangaben von 0,008% bis 22% (Louis *et al.*, 1998b). Zusätzlich erschweren Überschneidungen der Symptome mit anderen neurologischen Erkrankungen die Diagnosestellung.

Heutzutage werden meist die Konsensuskriterien der „*Tremor Investigation Group*“ (TRIG) (Findley & Koller, 1995) der „*Movement Disorder Society*“ (MDS) (Deuschl *et al.*, 1998) benutzt. Seltener werden aber auch die WHIGET-Diagnosekriterien (Louis *et al.*, 1998a) verwendet. Die derzeit eingesetzten Kriterien gleichen sich inzwischen jedoch in vielen Punkten. Die Überschneidungen der ET-Symptome mit den Symptomen anderer neurologischer Erkrankungen werden bei der Diagnosestellung nach der TRIG beachtet. Aufgrund der Strenge der Diagnosekriterien der TRIG und ihres häufigen Gebrauchs in epidemiologischen Studien wurden diese auch in der vorliegenden Studie angewendet, da der ET so am besten gegen Tremores anderer Genese abgrenzt werden kann. In Tabelle 1-1 sind die Einschluss- und Ausschlusskriterien der TRIG dargestellt.

**Tabelle 1-1: Diagnosekriterien des ET der Tremor Investigation Group (TRIG).**  
Nach (Findley & Koller, 1995).

ET Klasse	Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
definitiver ET	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bilateraler, sichtbarer, anhaltender Halte- oder Bewegungstremor der Hände und Unterarme</li> <li>- Tremor besteht seit mehr als 5 Jahren</li> <li>- Amplitude kann schwanken</li> <li>- Tremor kann aber muss nicht unangenehm sein</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- andere neurologische Erkrankungen</li> <li>- Bekannte Gründe für physiologischen Tremor (z.B. Drogen, Medikamente, Angst, Depressionen)</li> <li>- Neurologisches Trauma innerhalb von drei Monaten vor Beginn des Tremors</li> <li>- plötzlicher Beginn oder schrittweise Verschlechterung des Tremors</li> </ul>
wahrscheinlicher ET	<ul style="list-style-type: none"> <li>- gleiche Einschlusskriterien wie bei definitiven ET</li> <li>- Tremor kann sich auf andere Teile des Körpers beschränken, als auf Hände/Arme</li> <li>- Dauer der Symptome: länger als 3 Jahre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- gleiche Ausschlusskriterien wie bei definitiven ET</li> <li>- primär orthostatischer Tremor</li> <li>- isolierter Tremor der Stimme, Kinn und Zunge</li> <li>- Positions- und Aufgabenspezifischer Tremor</li> </ul>
möglicher ET	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ungenügende Erfüllung der Kriterien von definitiven und wahrscheinlichen ET</li> <li>- zusätzliche neurologische Erkrankungen (Parkinson, Dystonie)</li> <li>- andere neurologische Zeichen, die schwer zuordenbar</li> <li>- keine Angaben der Mindestdauer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bekannte Gründe für physiologischen Tremor (z.B. Drogen, Medikamente, Angst, Depressionen)</li> <li>- Neurologisches Trauma innerhalb von drei Monaten vor Beginn des Tremors</li> </ul>

### 1.1.3 Epidemiologie und Genetik

Die Prävalenz des ET liegt weltweit bei ungefähr 0,4-3,9 % (Louis *et al.*, 1998b). Die Häufigkeit des Vorkommens nimmt mit ansteigendem Alter zu und liegt bei der Bevölkerung über 65-Jahren bei ungefähr 14 % (Moghal *et al.*, 1994). Die zwei Erkrankungsgipfel des ET liegen im zweiten und sechsten Jahrzehnt, wobei Personen aller Altersstufen ohne Geschlechtspräferenz erkranken können (Louis & Dogu, 2007, Louis *et al.*, 1998b). Hinweise auf einen großen Einfluss genetischer Faktoren beim ET zeigten Zwillingsstudien mit einer Konkordanzrate von 60-93 % bei monozygoten und 27-29 % bei dizygoten Zwillingen (Lorenz *et al.*, 2004, Tanner *et*

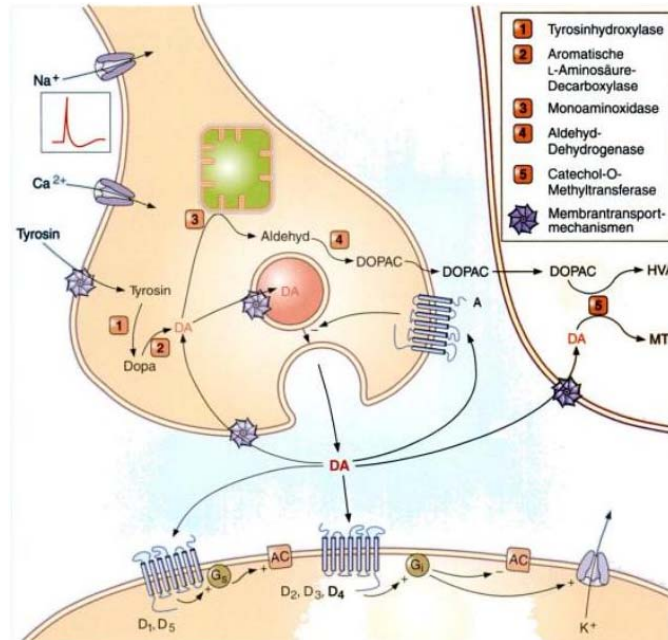
*al.*, 2001). Darüber hinaus scheinen auch Umweltfaktoren einen Anteil bei der Manifestation des Phänotyps zu haben, so dass bis zu einem gewissen Grad ein Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren bei der Entstehung dieser Krankheit eine Rolle spielt (Tanner *et al.*, 2001). Bislang konnten noch keine Umweltfaktoren eindeutig identifiziert werden, die bei der Entwicklung des ET mit von Bedeutung sind. Diskutiert werden in erster Linie Belastungen, die von der Agrarwirtschaft aus gehen. Neben den Pestiziden konnten auch eine Tremor-induzierende Wirkung von Blei-Verbindungen und  $\beta$ -Carboline-Alkaloiden in Tier-Modellen festgestellt werden (Goldings & Stewart, 1982, Louis *et al.*, 2006, Paterson *et al.*, 2009). Hingegen wird bei dem Konsum von Ethanol und Nikotin von einem eher protektiven Effekt ausgegangen (Louis *et al.*, 2008, Rautakorpi *et al.*, 1983).

Neben den Zwillingsstudien spricht auch eine positive Familienanamnese, die bei 17-100 % der ET-Patienten zu finden ist, für eine Prädisposition von genetischen Faktoren beim ET (Busenbark *et al.*, 1996). Je nach Studie handelte es sich bei den Teilnehmern um Patienten in oder außerhalb einer Klinik. Klinikfälle wiesen mit 4,73-fach größerer Wahrscheinlichkeit, einen Erkrankten in ihrer Familie auf (Louis *et al.*, 2001a). Innerhalb von Familien mit einem wahrscheinlich monogenen Erbgang folgt die Vererbung meist einem anscheinend autosomal-dominanten Muster (Findley, 2000). Das Vorkommen von nicht familiären (sporadischen) ET Fällen, die im Phänotyp dem familiären ET gleichen, sowie das relative Risiko von 4,7 für Verwandte ersten Grades an ET zu erkranken, lässt bei sporadischen ET-Patienten einen autosomal-dominanten Erbgang mit sehr geringer Penetranz oder aber wahrscheinlicher ein Zusammenwirken von vielen genetischen Varianten mit Umweltfaktoren vermuten (Louis *et al.*, 2001b). Bei einer autosomal-dominanten Vererbung mit vollständiger Penetranz würde das relative Risiko für Verwandte ersten Grades 50 % und bei einer autosomal-rezessiven Vererbung 25 % betragen. Der sporadische, ätiologisch komplexe ET ist wesentlich häufiger als der wahrscheinlich monogen verursachte. Ähnlich wie bei anderen neurologischen Erkrankungen wie z.B. beim Morbus Parkinson, ist der ET bei den meisten Erkrankten höchstwahrscheinlich als komplexe Erkrankung anzusehen (Galvin, 2009). Komplexe Erkrankungen werden im Gegensatz zu Erbkrankheiten mit monogenem Erbgang durch viele prädisponierende genetische Varianten und durch verschiedene Umweltfaktoren hervorgerufen. Die Risikofaktoren komplexer Erkrankungen mit meist moderatem Einfluss unterliegen stets einer unvollständigen

Penetranz. Als weitere alternative Erklärung für die Genetik des ET werden bei einem Teil der Fälle die Thesen eines mitochondrialen Ursprungs, X-chromosomale- und nicht-Mendelnde Vererbungsmuster diskutiert (Baughman *et al.*, 1973, Ma *et al.*, 2006, Yoo *et al.*, 2008).

### **1.1.3.1 Monogener, wahrscheinlich autosomal dominanter ET: ETM-Kopplungsregionen**

Bislang konnten drei chromosomale Loci (*ETM1*, *ETM2* und *ETM3*) mit vermutlich monogenem, autosomal dominanten ET in Zusammenhang gebracht werden. *ETM1* wurde 1997 mittels einer genomweiten-Kopplungsstudie (GWKS) in 16 isländischen Familien identifiziert (Gulcher *et al.*, 1997). In der Region auf Chromosom 3 ist u.a. das Gen für den Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor (*DRD3*; OMIM: 126451) lokalisiert. Der *DRD3* gehört zu den Dopamin-Rezeptoren der Gruppe 2, die eine hemmende Wirkung bei der Erregungsleitung haben (Abbildung 1-2). Die Expression des *DRD3* Gens konnte im Kleinhirn und in Purkinje-Zellen nachgewiesen werden, wodurch das Gen als Kandidatengen von Interesse ist. Eine Kopplung der Ser9Gly Variante des *DRD3* Gens mit dem Phänotyp des ET konnte in 23 von 30 untersuchten französischen Familien nachgewiesen werden (Lucotte *et al.*, 2006). In anderen Studien wurde gezeigt, dass Patienten mit dem homozygoten Auftreten der Ser9Gly Variante einen schwereren ET oder/und einen früheren Erkrankungsbeginn aufweisen (Garcia-Martin *et al.*, 2009, Jeanneteau *et al.*, 2006). Das Ser9Gly Allel führt zu einer vierfachen Zunahme der Dopamin-vermittelten cAMP-Antwort und einem verstärkten Signal der Mitogen-assoziierten Protein-Kinase (MAP-Kinase) (Jeanneteau *et al.*, 2006).



**Abbildung 1-2: Dopaminerge Erregungsleitung an der Synapse.**

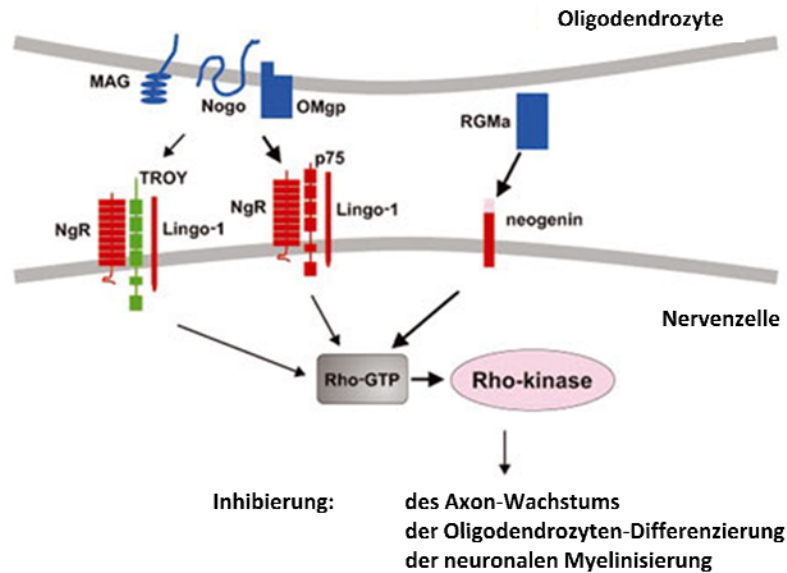
Die Dopamin-Rezeptoren sind in zwei Gruppen (D1- und D2-Gruppe) eingeteilt. Das Dopamin (DA) im präsynaptischen Spalt bindet an die Dopamin-Rezeptoren (D1, D2, D3, D4 und D5) der postsynaptischen Zelle. D1- und D5-Rezeptoren bewirken eine G-Protein vermittelte Aktivierung der Adenylylcyclase (AC). Hingegen wird durch eine Bindung von DA an die D2-, D3- und D4-Rezeptoren die Adenylylcyclase gehemmt und eine Öffnung der Kalium-Kanäle vermittelt. (Quelle: (Aktories *et al.*, 2005))

Der *ETM2* Locus wurde in einer großen amerikanischen Familie tschechischen Ursprungs auf Chromosom 2 mittels Kopplungsanalyse identifiziert (Higgins *et al.*, 1997). Als Kandidatengen in dieser Region wird das *HS1-binding protein 3* Gen (*HS1-BP3*; OMIM: 609359) diskutiert. Die 828C→G Mutation in Exon 7 des Gens segregiert in zwei Familien mit dem Phänotyp des ET (Higgins *et al.*, 2005). Das HS1-BP3 Protein bindet an Proteine, die stark in motorischen Neuronen und Purkinje Zellen exprimiert werden, was auf einen pathophysiologischen Zusammenhang mit dem ET deuten könnte.

Der *ETM3* Locus wurde 2006 durch eine GWKS mit sieben nordamerikanischen Familien identifiziert (Shatunov *et al.*, 2006). Die Region auf Chromosom 6 beinhaltet 15 Gene. Die Sequenzierung dieser Gene konnte keine den Phänotyp verursachende Variante identifizieren (Shatunov *et al.*, 2006).

### 1.1.3.2 Genetisch komplexer ET: *LINGO1*

Zwölf Jahre nach der Veröffentlichung des ersten chromosomalen Locus des ET, ohne dass seitdem ein kausales Gen gefunden werden konnte, konnte in der ersten genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) auf dem Gebiet des ET in einer isländischen Population *LINGO1* (*leucine rich repeat (LRR) and immunoglobulin domain-containing, Nogo receptor-interacting proteine gene 1*; OMIM: 609791) als Risikogen identifiziert werden (Stefansson *et al.*, 2009). Da das *LINGO1* Protein eine wichtige Rolle in der Biologie des zentralen Nervensystems (ZNS) spielt, scheint die Hypothese von *LINGO1* als Kandidatengen schlüssig. *LINGO1* ist evolutionär hoch konserviert und gehört der LRR-Genfamilie an, die eine Schlüsselrolle im zentralen Nervensystem hat. Die Expression des Gens erfolgt gewebs- und entwicklungspezifisch. Das *LINGO1* Protein inhibiert als Komponente von verschiedenen Komplexen das Wachstum der Axone, die Differenzierung von Oligodendrozyten und die Myelinisierung von Axonen (Abbildung 1-3). In Modellen für die Multiple-Sklerose und die Parkinson-Erkrankung konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von *LINGO1* einen positiven Einfluss auf das Überleben der Neurone hatte und eine Remyelinisierung sowie eine Regeneration erfolgten (Inoue *et al.*, 2007, Mi *et al.*, 2007). *LINGO1* konnte auch in einer Studie mit dem Phänotyp des Parkinson in zwei unterschiedlichen Populationen (Nord-Amerika und Norwegen) assoziiert werden (Vilarino-Guell *et al.*, 2009).



**Abbildung 1-3: Regulierung des Wachstums von Axonen im zentralen Nervensystem.**

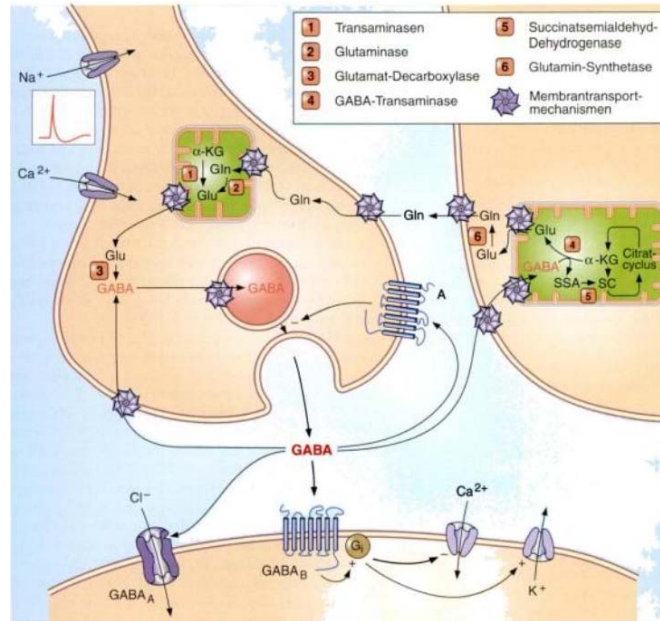
LINGO-1 bildet Komplexe mit dem Nogo66-Rezeptor (NgR1)/p75 Neurotrophin-Rezeptor und NgR1/TROY. Die verschiedenen Rezeptorkomplexe hemmen bei Anwesenheit eines der drei Myelinisierungs-Inhibitoren Nogo66 (Nogo), Myelin-assoziierten Glycoprotein (MAG), and Oligodendrozyten-Myelin-Glycoprotein (OMgp) die Regenerierung der Axone durch den RhoA-Signalweg (Abbildung nach (Hata *et al.*, 2006))

### 1.1.3.3 Pathophysiologische Kandidatengene

Neben den genannten Kandidatengenen, gibt es noch viele Gene, die angesichts pathophysiologischer Überlegungen eine Rolle bei der Entwicklung des ET spielen könnten. Als erstes zu nennen wären die Gene für die Untereinheiten der Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren der Klasse A ( $GABA_A$ -R). Der Ligand GABA ist der wichtigste hemmende Neurotransmitter und reguliert mit anderen Transmittern die neuronale Aktivität im Gehirn (Abbildung 1-4).

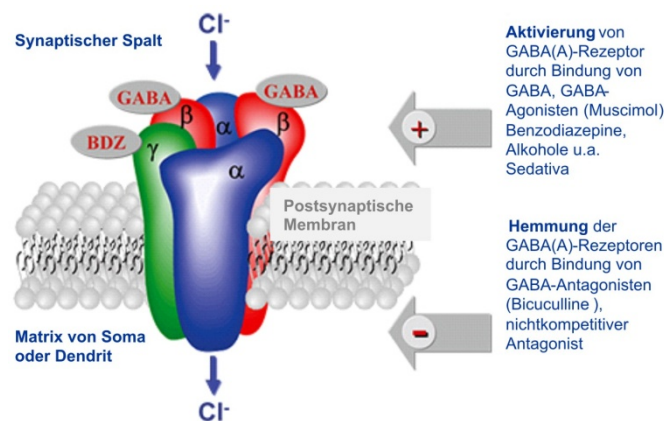
Verschiedene klinische Aspekte des ET, wie der positive Effekt nach Alkoholgabe und zerebellare Symptome, scheinen auf eine Beteiligung der  $GABA_A$ -R zu deuten. Gestützt wird diese Hypothese durch Knockout-Mäuse für das  $GABA_A$ -R  $\alpha$  1 Gen (*GABRA1*) und das GABA-Transportergen *GAT1*, die dem ET vergleichbare motorische Störungen aufweisen (Chiu *et al.*, 2005, Kralic *et al.*, 2005). Auch wiesen Untersuchungen an ET Patienten eine erhöhte GABA-Rezeptor-Bindung im Thalamus nach (Boecker *et al.*, 1996).





**Abbildung 1-4: GABAerge synaptische Übertragung.**

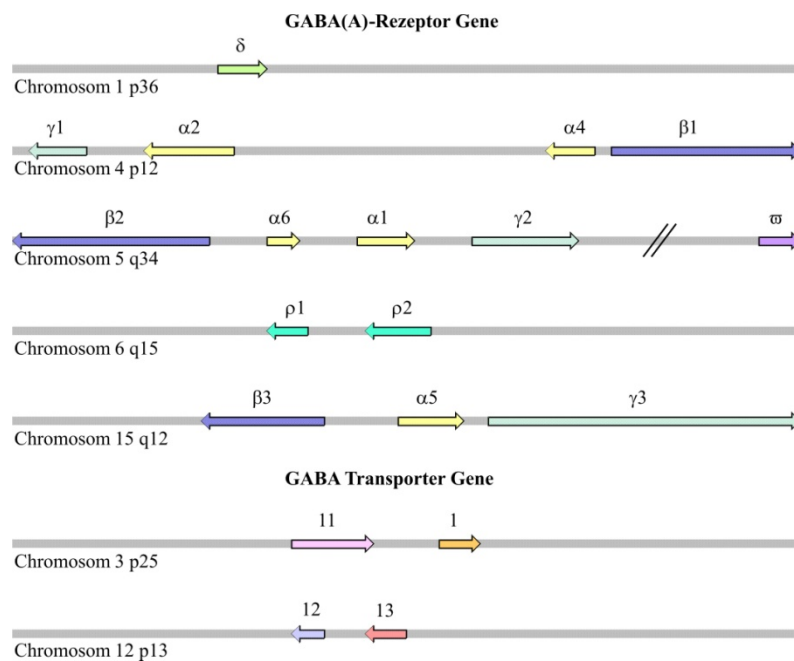
Beim Eintreffen des Aktionspotentials in der hemmenden Synapse, wird durch den Calcium-Einstrom die GABA-Freisetzung in den synaptischen Spalt hervorgerufen. Der Botenstoff GABA kann an der postsynaptischen Membran an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren oder an GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren binden. Die ligandengesteuerten GABA<sub>A</sub>-R öffnen sich, wodurch Chlorid-Ionen in die Zelle strömen. Bei dem GABA<sub>B</sub>-R hingegen handelt es sich um ein Transmembranprotein, das durch die GABA-Bindung eine Signaltransduktionskette in Gang setzt, in deren Folge G-Protein-vermittelt Kalium-Kanäle geöffnet und Calcium-Kanäle geschlossen werden. Durch die Bindung von GABA an die Rezeptoren wird das ohnehin schon negative Ruhemembranpotenzial der Neuronen noch negativer und es kann kein neues Aktionspotential entstehen. Das überschüssige GABA wird durch die GABA-Transporter aus dem synaptischen Spalt zurück in die Synapse oder in Gliazellen befördert. (Quelle: (Aktories *et al.*, 2005))



**Abbildung 1-5: Aufbau des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors.**  
(nach (Rupprecht & Zwanzger, 2003))

Die GABA<sub>A</sub>-R, welche der Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle angehören, bestehen meistens aus fünf Untereinheiten. Am häufigsten setzen sie sich aus zwei  $\alpha$  und zwei  $\beta$  Untereinheiten sowie einer  $\gamma$  Untereinheit zusammen (Abbildung 1-5) (Rupprecht & Zwanzger, 2003).

Neunzehn unterschiedliche Gene kodieren für die acht verschiedenen GABA<sub>A</sub>-R-Unterklassen ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  und  $\rho$ 1-3) (Dalby, 2003, Sarup *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass die verschiedenen Gene für die einzelnen Untereinheiten aus Duplikationen und Insertionen hervorgegangen sind. Die Orientierung zueinander im Cluster ist evolutionär stark konserviert. Für die GABA-Transporter kodieren vier Gene: *solute carrier family 6 member 1, 11, 12 und 13* (*SLC6A1, 11, 12 und 13*) (Abbildung 1-6).



**Abbildung 1-6: Anordnung und Lokalisation der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und GABA-Transporter Gene.** Länge und Abstände der Gene sind schematisch und nicht wahrheitsgetreu abgebildet.

Zahlreiche Studien haben eine Überlappung zwischen dem ET-Phänotyp und anderen neurologischen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson, der Dystonie, erblichen peripheren Neuropathien und Ataxien beschrieben (Jankovic, 2002, Shahed & Jankovic, 2007). Aufgrund der Hypothese eines gemeinsamen genetischen Hintergrundes bei Erkrankungen mit gleichen Phänotypen, kann die Analyse von bekannten Suszeptibilitätsfaktoren, von Krankheiten die in Beziehung zum ET stehen, Aufschlüsse über die Genetik des ET liefern. In erster Linie wurden

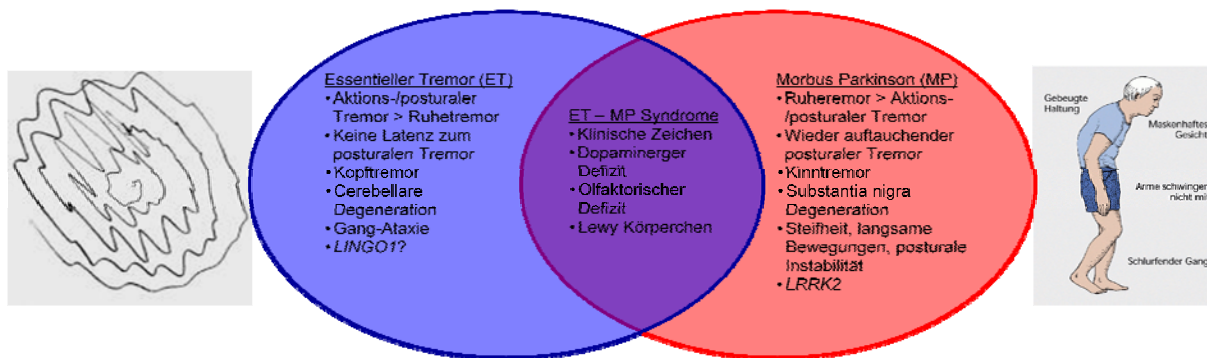
in Kandidatengenstudien des ET genetische Varianten untersucht, die bei Morbus Parkinson (Abschnitt 1.2) eine Rolle spielen, wie Varianten im *Histamine N-Methyltransferase* Gen (*HNMT*) (Keeling *et al.*, 2009b, Ledesma *et al.*, 2008), im *alpha-synuclein* Gen (*SNCA*) (Tan *et al.*, 2000), im *alpha-2-macroglobulin* Gen (*A2M*) (Xiao & Zhang, 2006) oder im *leucine rich repeat kinase 2* Gen (*LRRK2*) (Clark *et al.*, 2009, Tan *et al.*, 2008a). Andere Studien umfassten die Untersuchung von genetischen Varianten im kausalen Gen (*FMRI*) des fragilen X-Syndrom und des fragilen X-assoziierten Tremor-/Ataxie-Syndroms (Garcia Arocena *et al.*, 2004, Tan *et al.*, 2004) sowie des *DYT1* Gens, welches kausal für eine Form der monogenen Dystonie ist (Illarioshkin *et al.*, 2002). Da die Tremor-Reduktion nach Alkoholgabe pathophysiologisch eine Rolle beim ET spielt, suchte Martinez *et al.* (2007) nach einer Assoziation zwischen dem Alkohol-Dehydrogenase Gen und dem ET-Phänotyp (Martinez *et al.*, 2007).

Die meisten dieser Untersuchungen blieben jedoch erfolglos oder hatten nur einen fraglichen Erfolg, da die untersuchten Studienstichproben zu klein waren und die Befunde nicht in unabhängigen Studienstichproben repliziert werden konnten.

## 1.2 Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson (MP) ist eine chronisch-degenerative neurologische Erkrankung mit einem Haupt-Erkrankungsalter zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr (Rajput & Birdi, 1997). Bei der Parkinson-Krankheit führt das Absterben von dopaminproduzierenden Nervenzellen in der *Substantia nigra* zu einem Mangel an Dopamin, wodurch es zu einer Verminderung der aktivierenden Wirkung der Basalganglien auf die Großhirnrinde kommt. Das Fehlen von Dopamin resultiert in den für den MP typischen Symptomen, wie der asymmetrischen Muskelsteifigkeit (Rigor), Bewegungsarmut (Akinese) bzw. Verlangsamung der Bewegungen (Bradykinese), einem Ruhetremor und posturalen Störungen (Braak & Del Tredici, 2008). Obwohl der ET und der MP verschiedene Krankheiten sind, wird eine mögliche genetische als auch physiologische Verbindung zwischen diesen Krankheiten diskutiert, obwohl diese nur selten beim selben Patienten beobachtet werden (Shahed & Jankovic, 2007). Seit einiger Zeit gibt es Überlegungen dass der ET eine neurodegenerative Erkrankung ist. Diese wurden u.a. hervorgerufen durch die Entdeckung von für den MP typischen Lewy-Körperchen sowie von

dopaminergen- und olfaktorischen Defiziten bei einigen ET-Patienten (Louis *et al.*, 2009, Shahed & Jankovic, 2007). Für eine Verbindung dieser Erkrankungen spricht auch das nicht seltene gemeinsame Auftreten von ET- und MP-Phänotypen in einer Familie, bzw. das – allerdings seltene – Auftreten von ET und MP beim selben Patienten. Zusätzlich können ET-Patienten MP-Symptome präsentieren und umgekehrt (Rocca *et al.*, 2007, Spanaki & Plaitakis, 2009). Dennoch gibt es klare Unterschiede zwischen dem ET und dem MP, die hauptsächlich in der Art des Tremors und in der Lokalisation der zerebralen Pathologie liegen (Abbildung 1-7).



**Abbildung 1-7: Überlappung der Syndrome des Essentiellen Tremor und des Morbus Parkinson.**

Zeichnung der Archimedesspirale durch einen ET-Patienten mit starkem Aktionstremor (Bild ganz links); Merkmale des ET (blaue Ellipse); typische Symptome beim MP (Bild ganz rechts); Merkmale des MP (rote Ellipse); übereinstimmende Merkmale von ET und MP (überlappenden Bereich von blauer und roter Ellipse) (nach (Shahed & Jankovic, 2007))

Auch der MP gehört zu den genetisch komplexen Erkrankungen, bei denen viele Risikofaktoren eine Rolle spielen. Varianten im *alpha-Synuclein-* (*SNCA*), im *Microtubule-assoziierten Protein Tau-* (*MAPT*), im *Glucocerebrosidase-* (*GBA*) und im *Leucine rich repeat kinase 2* (*LRRK2*) Gen konnten als häufige Risikofaktoren in sporadischen MP-Patienten identifiziert werden (Lesage & Brice, 2009, Pankratz *et al.*, 2009). Mutationen im *LRRK2* Gen, besonders die G2019S *missense* Mutation, sind die häufigsten Ursachen des monogenen familiären MP (Lesage *et al.*, 2006, Paisan-Ruiz *et al.*, 2008), sind aber auch in 3-4 % der sporadischen Fälle anzutreffen (Berg *et al.*, 2005). Interessanter Weise konnte in einem toxin-induzierten MP-Nager-Modell gezeigt werden, dass die Hemmung von *LINGO1* das Überleben von dopaminergen Neuronen verlängert und deren Funktion verbessert. Auch konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Konzentration von *LINGO1* in der *Substantia nigra* in MP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöht ist (Inoue *et al.*, 2007). Diese Entdeckungen lassen vermuten, dass *LINGO1* nicht nur

beim ET eine kausative Rolle spielt, sondern auch mit dem MP assoziiert sein kann und somit eine genetische Verbindung zwischen den beiden Krankheiten darstellt.

### **1.3 Identifizierung der Ursachen genetisch bedingter Krankheiten**

Bei der Suche nach dem genetischen Ursprung von Erbkrankheiten ist es von Bedeutung den Vererbungsmodus zu kennen. Bei monogenen Krankheiten sind nur Mutationen in einem Gen kausal für die Erkrankung. Die genetische Variation kann durch ein Mendelsches Vererbungsmuster (autosomal dominant, autosomal rezessiv, X-chromosomal dominant und X-chromosomal rezessiv) weitergegeben werden und hat jeweils einen großen Effekt mit hoher Penetranz. Im Gegensatz dazu spielen bei komplexen Erkrankungen eine Vielzahl von genetischen Veränderungen und Umwelteinflüssen und deren Wechselwirkungen eine Rolle (Dempfle *et al.*, 2008, Risch, 2000). Die Suche nach den genetischen Risikofaktoren ist hier erschwert, da davon ausgegangen wird, dass viele verschiedene Gene einen jeweils moderaten Einfluss auf den Phänotyp haben und dass auch die gesunde Bevölkerung (ohne nachweislichen Phänotyp) Träger der Risikoallele ist (Page *et al.*, 2003). Bei komplexen Erkrankungen liegt eine unvollständige Penetranz der einzelnen genetischen Risikofaktoren vor. Heutzutage wird der Übergang von monogenen zu komplexen Krankheiten als fließend angesehen, da die stark variable Expressivität des Phänotyps und das Phänomen der reduzierten Penetranz bei monogenen Krankheiten mit genetischen Varianten in nicht direkt Krankheits-ursächlichen Genen – sogenannten Modifiern – in Verbindung gebracht werden können, d.h. dass auch hier Varianten in mehrerer Genen den Phänotyp definieren.

Für die Identifizierung und Lokalisation disponierender Gene für Krankheiten stehen grundsätzlich zwei Methoden zur Verfügung: Kopplungs- (Abschnitt 1.3.1) und Assoziationsstudien (Abschnitt 1.3.2). Das wichtigste Werkzeug hierbei sind genetische Marker. Als Marker werden bestimmte Sequenzabschnitte der DNA bezeichnet, die in verschiedener Ausprägung (Allele) vorkommen und deren Weitergabe an Nachkommen durch spezifische Vererbungsmuster erfolgt. Die Lage der Marker ist in genetischen Karten festgehalten. Am häufigsten werden als Marker Mikrosatelliten (auch *short tandem repeats*; STRs) und

Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*; SNPs) verwendet. Mikrosatelliten sind 10-50 Sequenzwiederholungen von ein bis vier Basenpaaren (bp). Zwischen 50 000-100 000 solcher Mikrosatelliten sind über das Genom des Menschen verteilt. Für genetische Analysen ist es vom großen Vorteil, dass die Anzahl der Wiederholungen eines Mikrosatelliten hoch polymorph sein kann. Die biallelischen SNPs sind zwar weniger polymorph als manche Mikrosatelliten, dafür sind sie aber mit einer geschätzten Anzahl von sieben Millionen, häufiger im humanen Genom vertreten. Durch die bessere genetische Abdeckung, begründet in der enormen Dichte im Genom, lösen SNPs immer mehr die Mikrosatelliten als Marker ab. Da SNPs häufig in kodierenden Sequenzen vorkommen, können sie auch eine direkte Auswirkung auf die Genfunktion haben. Bei Mikrosatelliten kommt so etwas nur selten vor wie z.B. bei der Erkrankung Fragiles-X-Syndrom. Hier führt eine Überschreitung von 59 Wiederholungen des Trinukleotidrepeat CGG zu einer Störung der Expression des FRM1 Genes und somit zu der Ausbildung des Phänotyps (Tan *et al.*, 2004).

### 1.3.1 Kopplungsstudien

Als Kopplungsanalyse werden Familienanalysen bezeichnet, bei denen geprüft wird, ob die Segregation von phänotypischen Merkmalen in Familien an die Segregation bestimmter Markerallele über den Verlauf von mehreren Generationen gekoppelt ist (Kruglyak *et al.*, 1996). Ob ein Marker mit dem Phänotyp gekoppelt oder nicht gekoppelt ist, ist abhängig vom Auftreten von Rekombinationen. Als Rekombination wird ein Prozess während der Meiose bezeichnet, bei dem es zum Austausch homologer Segmente von väterlichen und mütterlichen Chromosomen (*crossing over*) kommt. Befinden sich zwei Loci auf verschiedenen Chromosomen, so werden sie unabhängig vererbt. Liegen sie jedoch auf dem gleichen Chromosom nahe beieinander, so werden sie meist gemeinsam vererbt und sind in diesem Fall gekoppelt. Je näher zwei Loci benachbart sind, desto seltener werden sie durch Rekombination getrennt. Somit dient die Rekombinationsrate als Maß für den Abstand zweier Loci auf dem Chromosom. Bei vollständiger Kopplung beträgt die Rekombinationshäufigkeit  $\theta$  null. Wenn keine Kopplung vorliegt, kann  $\theta$  maximal 0,5 betragen, was der Fall ist, wenn zwei Loci, z.B. das Krankheitsgen und ein genetischer Marker, auf verschiedenen Chromosomen liegen. Eine Rekombinationshäufigkeit von 1 % bedeutet, dass zwei Loci in 100 untersuchten Meiosen 99mal

gemeinsam und einmal getrennt vererbt werden und entspricht einem genetischen Abstand von einem Centi-Morgan (cM). Über das gesamte Genom gemittelt besteht ein cM aus etwa einer Million Basenpaaren ( $1 \text{ cM} \approx 1000 \text{ kb} \approx 1 \text{ Mb}$ ). Für genomweite Kopplungsstudien (GWKS) reichen schon einige hundert Mikrosatelliten aus, um das Genom komplett abzudecken (Kruglyak, 1997). In der Regel werden ungefähr 400-800 Mikrosatelliten für die Abdeckung in einem Abstand von 5-10 cM verwendet (Kruglyak, 1997). Die so identifizierten Kandidatenregionen sind meist mehrere Megabasen (Mb) groß, da die Zahl der Rekombinationen relativ begrenzt ist, da in einer Familien meistens nur zwei bis drei Generationen und 7-20 von der Krankheit betroffenen Familienmitglieder untersucht werden können. Eine gewisse Eingrenzung der Region kann durch eine anschließende Feinkartierung erzielt werden, d.h. die Untersuchung zusätzlicher Marker zwischen den die Kandidatenregion begrenzenden Markern. Bei der Kartierung von Krankheitsgenen bedient man sich meist dieses hypothesenfreien Ansatzes der GWKS. Bei dem hypothesengetriebenen Verfahren hingegen, werden gezielt eine oder mehrere Regionen aufgrund pathophysiologischer Hypothesen auf Kopplung mit dem Phänotyp untersucht.

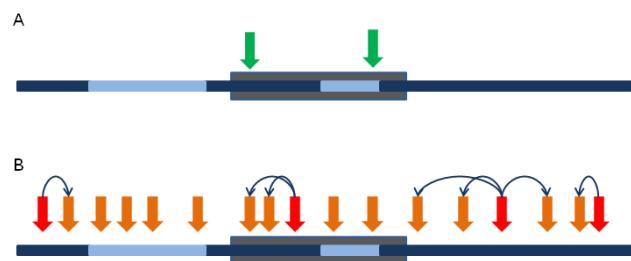
Bei der statistischen Auswertung von Kopplungsdaten wird zwischen parametrischer (modellabhängiger) und nicht-parametrischer (modellfreier) Analyse unterschieden. Das Maß der Kopplung wird meist als LOD- (*logarithm of odds*) Wert angegeben. Der LOD-Wert ist definiert als der Logarithmus zur Basis 10 des Verhältnisses von der Wahrscheinlichkeit, dass zwei Loci gekoppelt sind zu der Wahrscheinlichkeit, dass diese Loci nicht gekoppelt sind. Bei der parametrischen Kopplungsanalyse („*LOD-Score*“-*Methode*) geht man davon aus, dass die genetische Komponente der Krankheit nach einem bestimmten Modell (z.B. autosomal dominant, autosomal rezessiv oder X-chromosomal) vererbt wird. Dieses genetische Modell wird vorab definiert (Kruglyak *et al.*, 1996). Bei der Analyse von Familien, bei denen die Parameter der Vererbung nicht ausreichend bekannt sind (z.B. bei komplexen Erkrankungen) findet meist die nicht-parametrische Kopplungsanalyse (auch „*non-parametric linkage analysis*“; NPL) Anwendung, da hier keine Hypothesen zum Vererbungsmodell vorausgesetzt werden müssen. Die NPL soll nachweisen, dass das beobachtete Vererbungsmuster eines chromosomalen Abschnitts überzufällig häufig gemeinsam bei den betroffenen Personen einer Familie auftritt.

### 1.3.2 Assoziationsstudien

Eine Alternative zur Kopplungsanalyse stellt die populationsbasierte Assoziationsanalyse dar. Bei dieser Methode, die für komplexe Erkrankungen angewendet wird, vergleicht man die Allelfrequenz genetischer Marker in einer untereinander nicht verwandten Studienpopulation aus Kontroll- und Fallindividuen. Die Probanden der beiden zu vergleichenden Stichproben sollten sich dabei idealerweise nur in dem Vorhandensein/Nichtvorhandensein des untersuchten Phänotyps (z.B. erkrankt an ET (Fallindividuen)/nicht erkrankt an ET (Kontrollindividuen)) unterscheiden. Zusätzlich ist bei der Erstellung der Stichproben darauf zu achten, dass sie möglichst bezüglich ihrer Herkunft bzw. ethnischen Zugehörigkeit und der Ausprägung des Phänotyps in ihrer Zusammensetzung homogen sind. Auch sollte das Verhältnis der Geschlechter ausgewogen sein. Sind für eine Krankheit weitere Risikofaktoren bereits bekannt (sog. „Störvariablen“ oder „Confounder“), so sollten diese mit erhoben werden, um die zu erwartenden Unterschiede in der Frequenz und Ausprägung dieser Faktoren zu erfassen. Unterscheiden sich Frequenz und Ausprägung dieser Merkmale dann in der untersuchten Stichprobe tatsächlich signifikant zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe, so sollte in der statistischen Auswertung für diese Faktoren adjustiert werden. Als Marker werden überwiegend SNPs verwendet. Die meisten SNPs liegen nicht in proteinkodierenden Regionen und haben wahrscheinlich keinen direkten biologischen Einfluss auf den Krankheitsphänotyp. In der direkten Assoziationsanalyse werden funktionelle SNPs (*coding SNP* = cSNPs) untersucht, die einen unmittelbaren Einfluss auf die Funktionalität des Genproduktes haben, indem sie entweder eine veränderte Aminosäuresequenz bewirken, oder wichtige regulatorische Bindestellen beeinflussen und somit die Genexpression hemmen oder fördern. Da aber die Lage und die Struktur der regulatorischen Bereiche nicht genügend bekannt sind, bedient man sich häufig des indirekten Ansatzes. Ziel hierbei ist es, eine möglichst große Region mit nur wenigen miteinander korrelierten SNPs abzudecken, um den chromosomalen Bereich, der die kausale Variante enthält zu detektieren (Abbildung 1-8). Diese Methode bedient sich des Kopplungsungleichgewichtes auch *linkage disequilibrium* (LD) genannt. Das Kopplungsungleichgewicht beschreibt eine Allelkombination, die in einer Population häufiger vorkommt, als man es bei unabhängiger Kombination der Allele erwarten würde (Bickeböller & Fischer, 2007). Dieses wird hervorgerufen durch eine geringere Frequenz von Rekombinationen zwischen benachbarten Loci, als diese aufgrund des physikalischen Abstandes zu erwarten wäre.



In diesem Fall sind die Allele eng miteinander gekoppelt und stehen in starkem LD zueinander, d.h. aus dem Vorliegen des einen Allels im ersten Marker kann man das Allel des zweiten Markers mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagen. Im Genom wechseln sich Regionen, mit einem solchen LD mit Regionen ab, in denen fast kein LD nachweisbar ist (Jeffreys *et al.*, 2001). In den Regionen mit geringem LD, die als Rekombinations-Hotspots bezeichnet werden, ereigneten sich nahezu alle Rekombinationsereignisse der Populationsgeschichte. Durch Kopplung von Genloci in Regionen mit geringer Rekombinationsrate ist die Anzahl möglicher SNP-Allelkombinationen stark eingeschränkt. Die beobachteten Kombinationen der Markerallele werden als Haplotyp bezeichnet. Die verschiedenen Haplotypen lassen sich meistens durch eine kleine Zahl von Polymorphismen, sogenannten *haplotype-tagging*-SNPs (htSNPs), sicher voneinander unterscheiden. Somit ist nur die Genotypisierung einer geringen Anzahl der in einer Region vorhandenen SNPs notwendig, um einen LD-Block ausreichend charakterisieren zu können. Die htSNPs können einzeln für die Assoziationsanalysen verwendet werden, oder es wird ein Haplotyp von mehreren htSNPs untersucht (Haplotypanalyse).



**Abbildung 1-8: Prinzip der direkten (A) und indirekten (B) Assoziationsanalyse.**

Blaue Linien symbolisieren die genomische Sequenz, wobei in den dunkelblauen Abschnitten die Haplotypen gemeinsam vererbt werden und in den hellblauen Abschnitten die Haplotypen durch Rekombinationsereignisse getrennt vererbt werden können. Der graue Balken stellt ein Exon eines Gens dar. A: Grüne Pfeile sind cSNPs, die im direkten Ansatz genotypisiert werden. B: Rote Pfeile symbolisieren htSNPs, die in starken LD mit SNPs der jeweiligen dunkelblauen Region sind (angezeigt durch blaue Pfeile). SNPs (orange Pfeile) in Bereichen mit hoher Rekombinationsrate (hellblauen Linien) müssen einzeln genotypisiert werden.

Wie bei den Kopplungsstudien gibt es auch bei den Assoziationsanalysen die Möglichkeit der hypothesenfreien Untersuchung des gesamten Genoms. Bei dieser Herangehensweise werden bis zu einer Millionen SNPs verwendet. So konnte das *Wellcome Trust Case-Control Consortium* (WTCCC) neue genetische Risikofaktoren für komplexe Erkrankungen wie z.B. Koronare

Herzkrankheit, Morbus Crohn, Typ1- und Typ2-Diabetes identifizieren (Parkes *et al.*, 2007, Samani *et al.*, 2007, Todd *et al.*, 2007, Zeggini *et al.*, 2007). Kürzlich wurde in der ersten Genomweiten Assoziationsstudie zum ET das *LINGO1* Gen als Suszeptibilitätsfaktor identifiziert. Alternativ können auch in Assoziationsstudien bestimmte chromosomale Regionen untersucht werden, die pathophysiologisch interessante Kandidatengene enthalten.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die vorhandenen Studienpopulationen bestehend aus ET-Familien mit vermutlich größtenteils monogenem Erbgang und Gruppen aus nicht verwandten ET-Patienten und gesunden Kontrollindividuen mit den Methoden der Kopplungs- und Assoziationsanalyse untersucht werden (Abbildung 1-9).

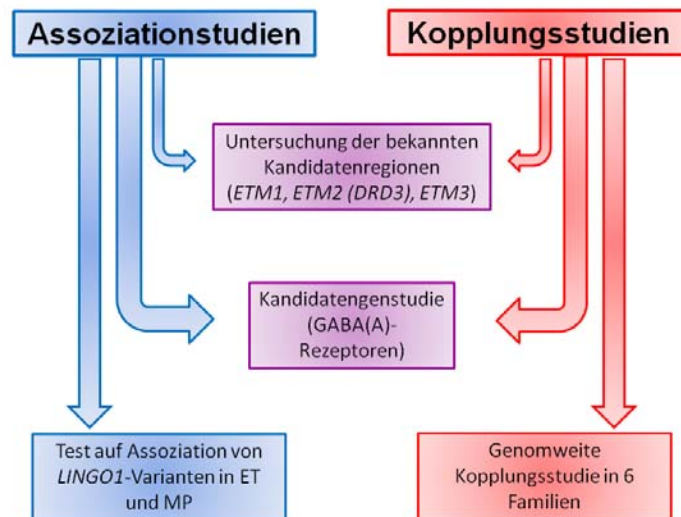
Mit der Kopplungsanalyse wurden folgende Aufgaben- bzw. Fragestellungen bearbeitet:

- Können die mittels Kopplung identifizierten Kandidatenregionen (*ETM1*, *ETM2* und *ETM3*) in einem Kollektiv bestehend aus 20 informativen Familien repliziert werden?
- Besteht eine Kopplung der Ser9Gly Variante des *DRD3* Gens mit dem ET in den 20 Familien?
- Weisen die Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten Kopplung mit dem Phänotyp auf?
- Kann eine genomweite Kopplungsstudie (GWKS) in den sechs größten Familien bekannte Loci bestätigen oder eine neue Kandidatenregion identifizieren?
- Kann diese Studie neue Aufschlüsse über die Genetik des ET und dem Vererbungsmuster des ET liefern?

In den Assoziationsstudien wurden einige Punkte mit der Kopplungsstudie überschneidend bearbeitet, aber es wurden auch weitere Fragestellungen bearbeitet:

- Zeigt die Ser9Gly Variante des *DRD3* Gens im Rahmen einer Fall-Kontroll-Analyse signifikante Assoziationssignale?
- Kann eine Assoziation der Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten mit dem ET mittels LD-basierter *haplotype-tagging*-Methode detektiert werden?

- Spielen Varianten des *LINGO1* Gens als Suszeptibilitätsfaktor für den ET auch in unseren europäischen Stichproben eine Rolle?
- Können potentiell relevante Polymorphismen in einer Exon-Sequenzierung eines innerhalb der genomischen Region des *LINGO1* Gen gelegenen Transkripts identifiziert werden?
- Ist das *LINGO1* Gen eine genetische Verbindung von ET und MP?



**Abbildung 1-9: Aufgabenstellung dieser Arbeit.**

Zur Anwendung kamen Assoziations- (blau) und Kopplungsstudien (rot). Die Replikationsversuche sowie die Untersuchung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wurden mit beiden Herangehensweisen bearbeitet (lila).

## 2 Material und Methoden

Im Folgenden werden alle Materialien und Methoden, die für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, aufgeführt und gegebenenfalls erläutert.

### 2.1 Reagenzien und Gebrauchsmittel

Material	Hersteller
0,8/1,2 ml Lagerplatte (96 Well)	Abgene; Epsom, UK
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
250 µl Lagerplatte (384 Well)	Abgene; Epsom, UK
250 µl Lagerplatte (96 Well)	Corning B.V; Amsterdam, Niederlande
8er-Streifen	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Agarose	Eurogentec; Köln, Deutschland
AmpliTaQ Gold® PCR Reagent Kit	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
Betaine (5 M)	Sigma; München, Deutschland
BigDye® Xterminator™ Purification Kit	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
BigDye® v1.1 Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma; München, Deutschland
dNTP Set (100 mM)	Amersham Biosciences; Freiburg, Deutschland
DreamTaq, Green Master Mix	Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
EDTA Blutröhrchen 9 ml	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 / 1,5 / 2,0 ml)	Eppendorf; Köln, Deutschland
Ethanol (70%)	Merck; Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Exonuklease I	Amersham Biosciences; Freiburg, Deutschland
Genescan® 400 HD Size Standard	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit	GE Healthcare; Buckinghamshire, UK
Glyzerol	Sigma; München, Deutschland
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
HyperLadder™ I	Bioline GmbH; Luckenwalde, Deutschland
Invisorb® Blood Universal Kit	Invitek; Berlin, Deutschland
Isopropanol	Merck; Darmstadt, Deutschland
MicroAmp™ Einzelröhrchen	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
MicroAmp™ optical 96 Well-Platte	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
Microtiter 384-Well-Platte	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Microtiter 384-Well-Platte	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Microtiter 96-Well-Platte	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Microtiter 96-Well-Platte	Corning B.V; Amsterdam, Niederlande
NaClO (1 %, 5 %)	Sigma; München, Deutschland
PCR-Puffer (10×)	Qiagen; Hilden, Deutschland
PicoGreen	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Pipettenfilterspitzen (10 / 200 / 1000 µl)	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (steril 5 / 10 / 25 ml)	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
POP-7™ Polymer	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
Proteinase K	Molecular Research Center; Cincinnati, Ohio, USA
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Qiagen Taq DNA Polymerase PCR Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland

Material	Hersteller
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
RNAeasy Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
Röhrchen, steril (15 ml)	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen, steril (50 ml)	BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland
Shrimp Alkaline Phosphatase	Amersham Biosciences; Freiburg, Deutschland
SNPlex™ Allelic Ladder, 48-plex	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ Amplification Kit	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ Assay Standard Kit	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ Hybridisation Kit	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ Ligation Probes	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ Pools	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ Purification Kit	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ Sample Loading Reagent	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ Size Standard, 48-plex	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ System Ligation Kit	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ System Matrix Standard (10×)	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
SNPlex™ System Phosphorylation Kit	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Qiagen; Hilden, Deutschland
TaqMan® Genotyping Master Mix	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
Taqman-Assays	Applied Biosystems; Weiterstadt, Deutschland
TBE Puffer 10x	Amresco; Solon, OH, USA
TE (1%)	Merck; Darmstadt, Deutschland

## 2.2 Geräte

Gerät/Zubehör	Hersteller
3700 DNA Analyzer	Applied Biosystems Inc.; Foster City, CA, USA
3730xl DNA Analyzer	Applied Biosystems Inc.; Foster City, CA, USA
7900HT Fast Real-time PCR-Systems	Applied Biosystems Inc.; Foster City, CA, USA
ABI Prism 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems Inc.; Foster City, CA, USA
Biometra T Gradient	Whatman Biometra GmbH; Göttingen, Deutschland
Biometra T1 Thermocycler	Whatman Biometra GmbH; Göttingen, Deutschland
Gel Doc XR	Bio-Rad; München, Deutschland
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems Inc.; Foster City, CA, USA
GFL 1086 Schüttel-Wasserbad	GFL; Burgwedel, Deutschland
Heraeus 3 incubator	Kendro; Hanau, Deutschland
Heraeus Kelvitron® t	Kendro; Hanau, Deutschland
Heraeus Biofuge fresco	Kendro; Hanau, Deutschland
Heraeus Biofuge pico	Kendro; Hanau, Deutschland
Heraeus Labofuge 400	Kendro; Hanau, Deutschland
Heraeus Multifuge 3S-R	Kendro; Hanau, Deutschland
Heraeus Varifuge 3.2RS	Kendro; Hanau, Deutschland
High Performance UV Transilluminator	VWR; Hamburg, Deutschland
Horizontal Electrophoresis Apparatus	Bio-Rad; München, Deutschland
Hydra 384 Robbins Scientific	Dunn Labortechnik; Asbach, Deutschland
Hydra 96 Robbins Scientific	Dunn Labortechnik; Asbach, Deutschland
MicroLumatPlus Luminometers	Berthold; Bad Wildbad, Deutschland
Micro Zentrifuge	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Microwave R-2V18	Sharp Electronics; Hamburg, Deutschland
Mini Vortexer VM-3000	VWR; Darmstadt, Deutschland
PCR-Kammer	Bä-RO Technology; Leichlingen, Deutschland

Gerät/Zubehör	Hersteller
Plattensealer ALPS-300	Abgene; Epsom, UK
Power Pac 300 Electrophoresis Power Supply	Bio-Rad; München, Deutschland
Tecan Freedom Evo 150	Tecan, Deutschland; Crailsheim, Deutschland
Tecan Freedom Evo 200	Tecan, Deutschland; Crailsheim, Deutschland
Tecan Genesis RSP 150	Tecan, Deutschland; Crailsheim, Deutschland
Tecan Genesis Workstation 150	Tecan, Deutschland; Crailsheim, Deutschland
Tecan Genesis Workstation 200	Tecan, Deutschland; Crailsheim, Deutschland
Tecan Spectrafluor Plus	Tecan, Deutschland; Crailsheim, Deutschland
Te-MO	Tecan, Deutschland; Crailsheim, Deutschland
Te-MO mit Cooling Rack	Tecan, Deutschland; Crailsheim, Deutschland
Thermomixer 5437	Eppendorf; Köln, Deutschland
Ultrospec 3100pro	Amersham Biosciences; Freiburg, Deutschland
UVB light source	Philips; Hamburg, Deutschland
Vortex-GENIE 2 G-560E	Scientific Industries; Bohemia, NY, USA
Sub-Cell® GT	Bio-Rad; München, Deutschland
Gel-Caster	Bio-Rad; München, Deutschland
Gel-Tray	Bio-Rad; München, Deutschland
Gel-Comb	Bio-Rad; München, Deutschland

## 2.3 Internetdatenbanken und Programme

Datenbank/Programm	Quelle/URL
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
Celera	<a href="http://www.celera.com">http://www.celera.com</a>
COCAPHASE v 2.403	<a href="http://portal.litbio.org/Registered/Help/unphased/">http://portal.litbio.org/Registered/Help/unphased/</a>
Ensemble Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
FASTLINK	<a href="http://linkage.rockefeller.edu/ott/linkhelp.htm">http://linkage.rockefeller.edu/ott/linkhelp.htm</a>
Genemapper 4.0	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Haploview 3.32	<a href="http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/">http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/</a>
HapMap	<a href="http://www.hapmap.org">http://www.hapmap.org</a>
Merlin	<a href="http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/Merlin/download/">http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/Merlin/download/</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
NovoSNP v2.0.3	<a href="http://www.molgen.ua.ac.be/bioinfo/novosnp/">http://www.molgen.ua.ac.be/bioinfo/novosnp/</a>
PLINK V 1.04	<a href="http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink">http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink</a>
Primer Express 2.0	<a href="http://www.appliedbiosystems.com">http://www.appliedbiosystems.com</a> ; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Primer3 v.0.4.0	<a href="http://primer3.sourceforge.net">http://primer3.sourceforge.net</a>
PS 2.1.31	<a href="http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize">http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed</a>
RepeatMasker	<a href="http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/">http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/</a>
Sequencher 4.2	<a href="http://www.genecodes.com">http://www.genecodes.com</a>
SISA	<a href="http://home.clara.net/sisa/">http://home.clara.net/sisa/</a>
SNPbrowser3.5	<a href="http://www.allsnps.com">http://www.allsnps.com</a> ; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tagger	<a href="http://www.broad.mit.edu/mpg/tagger/">http://www.broad.mit.edu/mpg/tagger/</a>
UCSC Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a>

## 2.4 Studienpopulation

Die für die Kopplungsstudien verwendeten Familien umfassen am ET erkrankte Mitglieder und solche, die vom ET nicht betroffen waren (Abschnitt 2.4.1.3). Für die Kopplungsstudien standen insgesamt 20 Familien aus Deutschland, Dänemark und Frankreich zur Verfügung. Die Studienpopulation für die Assoziationsstudien setzte sich aus der „Fallstichprobe“, welche den ET Phänotyp aufwies und der „Kontrollstichprobe“, die diesen Phänotyp nicht aufwies, zusammen. Auch für die Assoziationsanalysen wurden Probanden aus Deutschland, Dänemark und Frankreich verwendet. Die Größe der Studienstichproben sowie die Zusammensetzung aus Fällen und Kontrollen in den einzelnen Projekten der Kopplungs- und Assoziationsanalysen dieser Arbeit ist in Tabelle 2-1 dargestellt. Die Unterschiede in der Anzahl der Probanden der einzelnen Assoziationsprojekte sind auf die arbeitsbegleitende Rekrutierung und damit stetig wachsende Studienpopulation zurückzuführen. Daher weisen die einzelnen Studienstichproben Überlappungen in den verwendeten Probanden auf.

**Tabelle 2-1: Zusammensetzung der Studienstichproben in den einzelnen Projekten der Kopplungs- und Assoziationsanalysen.**

Kopplungsstudien ET		Deutsche (n Familien)	Franzosen (n Familien)	Dänen (n Familien)	Summe (n Familien)
Kandidatenstudien		6	12	2	20
Genomweite Kopplungsstudie		4		2	6
Assoziations-Projekte ET		Deutsche (Fälle/Kontrollen)	Franzosen (Fälle/Kontrollen)	Dänen (Fälle/Kontrollen)	Summe (Fälle/Kontrollen)
<i>DRD3</i>		219/311	52/165	28/52	299/528
GABA Rezeptor /- Transporter	Stufe 1	184/426			184/426
	Stufe 2	288/334		31/58	319/392
<i>LINGO1</i>	Stufe 1	284/334			284/334
	Stufe 2		48/240		48/240
Assoziations-Projekt MP		Kiel (Fälle/Kontrollen)	Lübeck (Fälle/Kontrollen)	Tübingen (Fälle/Kontrollen)	Summe (Fälle/Kontrollen)
<i>LINGO1</i>		619/490	511/225	668/767	1798/1482

Alle Studienteilnehmer wurden ausführlich über die Verwendung ihres Blutes und ihrer DNA informiert und unterschrieben eine Einverständniserklärung. Im Rahmen der Datenerfassung wurden die Proben anonymisiert und pseudonymisiert, um den Datenschutz zu gewährleisten und eine Rückverfolgung zum Blutspender zu verhindern. Alle Erfassungs- und Datenverarbeitungsverfahren wurden vor Beginn der Studie von der Ethikkommission der Kieler

Medizinischen Fakultät bewilligt und vom unabhängigen Landesdatenschutzzentrum Schleswig-Holstein geprüft (von Eller-Eberstein *et al.*, 2007).

## **2.4.1 Essentieller Tremor**

### **2.4.1.1 Fallstichprobe**

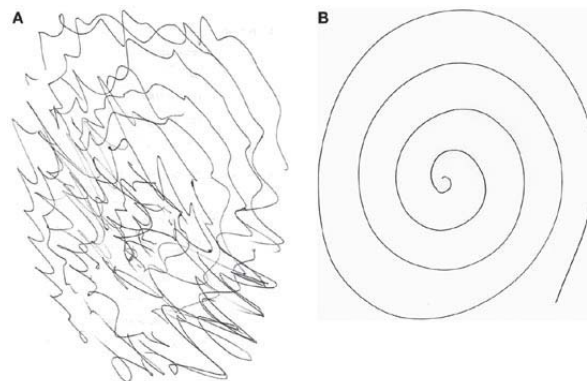
Die Fallstichprobe für die verschiedenen Assoziationsstudien beinhaltete insgesamt 503 deutsche ET-Patienten und 28 dänische ET Patienten sowie 52 französische ET-Patienten. Die verwendeten Probanden waren nicht miteinander verwandt und wurden klinisch mit Hilfe der TRIG-Kriterien (Abschnitt 1.1.2) als definitiver oder wahrscheinlicher ET klassifiziert. Patienten mit einem möglichen ET wurden von den Analysen ausgeschlossen, um den Risikohaplotyp in der Stichprobe anzureichern und eventuelle Fehldiagnosen auszuschließen. Die klinischen Angaben der Probanden bezüglich des Alters, der Geschlechterverteilung, des Alters bei Erkrankungsbeginn, der Familienanamnese sowie der Alkoholsensitivität sind in den jeweiligen Ergebnisteil der einzelnen Assoziationsstudien (Abschnitt 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3) dargestellt. Die Rekrutierung der dänischen Probanden erfolgte in den Jahren 2001 bis 2002 im Rahmen einer dänischen Zwillingsstudie (Lorenz *et al.*, 2004). Bei den französischen Patienten handelte es sich um Indexpatienten (erstes Mitglied einer Familie, bei dem die ET-Diagnose gestellt wurde) aus ET Familien, die von verschiedenen neurologischen Ambulanzen französischer Krankenhäuser rekrutiert wurden. Die deutschen ET Patienten wurden seit 2002 in Kiel und Umgebung (Eckernförde, Neumünster und Rendsburg) über Zeitungsartikel/-annoncen und Einwohnermeldeämter sowie über die Klinik der Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel kontaktiert und rekrutiert. Es folgte die Untersuchung durch einen auf Bewegungsstörungen spezialisierten Neurologen des UKSH in Kiel, der den ET mit Hilfe der TRIG-Kriterien diagnostizierte und den Tremorschweregrad anhand der Fahn-Tolosa-Marin Skala (Fahn *et al.*, 1993) ermittelte. Ein Teil der Fälle (n = 184) stammt aus der durch die POPGEN Biobank (Krawczak *et al.*, 2006) initiierte Facharztrekrutierung, bei der Fachärzte aus Schleswig-Holstein kontaktiert und um Mithilfe gebeten wurden.



### 2.4.1.2 Kontrollstichprobe

Die Kontrollstichprobe setzte sich aus 760 deutschen, 58 dänischen und 240 französischen Probanden zusammen. Alle Probanden der Kontrollstichprobe waren untereinander nicht verwandt und wiesen keine Verwandtschaft zu den Individuen der Fallstichprobe auf. Ein weiteres Kriterium war ein Mindestalter von 50 Jahren, um das angenommene Risiko zukünftig noch an ET zu erkranken, bei Annahme einer vollständigen Penetranz der Erkrankung um das 60.-65. Lebensjahr, zu verringern. Die dänischen und französischen Kontrollprobanden stammten aus der oben beschriebenen Zwillingsrekrutierung. Ein Teil der deutschen Kontrollprobanden wurde über die Klinik der Neurologie des UKSH, Campus Kiel rekrutiert. Die über diese Zentren rekrutierten deutschen, dänischen und französischen Kontrollen wurden durch ein auf Bewegungsstörungen spezialisierten Facharzt untersucht.

Zusätzlich wurden deutsche Kontrollen (ACO = *aging controls*) von der „Forschungsgruppe Gesundes Altern“ und von POPGEN (SPCs = *special phenotyped controls*) verwendet. Die ACO- und SPC-Kontrollen wurden mit Hilfe von zugeschickten Fragebögen zum eigenen sowie familiären Gesundheitszustand befragt. Diese Fragebögen schlossen neurologische Erkrankungen mit ein. Zusätzlich mussten die Teilnehmer eine Archimedes Spirale (Abbildung 2-1) ausfüllen, um einen Tremor auszuschließen. Alle Kontrollen die aus der ACO und SPC Kohorte stammten wurden entweder durch eine ärztliche Untersuchung oder durch ein validiertes Screening-Verfahren (Lorenz *et al.*, 2008b), welches einen Patienten Fragebogen und die Zeichnung einer Archimedes Spirale umfasst, als negativ für den ET diagnostiziert.



**Abbildung 2-1: Archimedes Spirale.**

A: gezeichnet von einem ET-Patienten mit sicherem ET und B: gezeichnet von einer Person ohne ET. Quelle: (Benito-Leon & Louis, 2006)

### 2.4.1.3 Familien

Das Kollektiv für die Kopplungsanalysen bestand aus 20 Familien (Abbildung 7-1) aus Deutschland (n = 6), Dänemark (n = 2) sowie Frankreich (n = 12), in denen ET gehäuft auftritt (ET-Familien). Die Anzahl der an der ET-Studie teilnehmenden Mitglieder variierte von 4 bis zu 26 pro Familie über zwei bis drei Generationen verteilt. Insgesamt wurde die DNA von 189 Personen für die familiären Segregationsuntersuchungen verwendet. Für die Berechnungen der Kopplungsanalysen wurden die Patienten mit dem definitiven und wahrscheinlichen ET als „betroffen“ (n = 88), die mit dem möglichen ET als „unbekannt“ (n = 15) und die mit keinen ET-Anzeichen als „nicht betroffen“ (n = 86) betrachtet.

## 2.4.2 Morbus Parkinson

Die Studienpopulation bestand aus Morbus Parkinson (MP) Patienten und Kontrollprobanden, die aus drei verschiedenen deutschen Einrichtungen rekrutiert wurden.

### 2.4.2.1 Fallstichprobe

Die demographischen und klinischen Daten sind in Tabelle 7-8 aufgeführt. Alle MP Patienten wurden auf die G2019S Mutation im *Leucine Rich Repeat Kinase 2* Gen (*LRRK2*) untersucht. Träger dieser Mutation wurden nicht in der Assoziationsanalyse verwendet, um die häufigste monogen vererbte Variante dieser Erkrankung auszuschließen. Die Kieler Arbeitsgruppe stellte 619 MP-Patienten zur Verfügung, die in einer Zusammenarbeit von der Klinik für Neurologie des UKSH, Campus Kiel mit der Biobank POPGEN (Krawczak *et al.*, 2006) rekrutiert wurden. Die Klinik für Neurologie von dem UKSH, Campus Lübeck brachte 511 Fälle in die Studie mit ein. Die Diagnose der Kieler und Lübecker Patienten erfolgte durch auf Bewegungsstörungen spezialisierte Neurologen an Hand der *UK Brain Bank* Diagnosekriterien (Hughes *et al.*, 1992) und die Einschätzung und Quantifizierung der Parkinson Symptomatik an Hand der *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS), Teil III (motorischer Teil) (Gibb & Lees, 1988). Die 668 Patienten der Stichprobe aus Tübingen wurden ebenfalls mit den *UK Brain Bank* Diagnosekriterien (Hughes *et al.*, 1992) von Bewegungsstörungsspezialisten der Universitäten München und Tübingen diagnostiziert.

### **2.4.2.2 Kontrollstichprobe**

Als Kontrollen für die Studienstichprobe aus Kiel wurden 490 nicht verwandte SPC-Kontrollen (POPGEN) verwendet. Die 225 Kontrollprobanden aus Lübeck setzen sich aus anonymen Blutspendern und nicht betroffenen Ehepartnern von MP-Patienten zusammen. Die teilnehmenden Kontrollindividuen der Stichprobe aus Tübingen wurden über Zeitungsannoncen und in lokalen Firmen rekrutiert. Die Kontrollen aller drei beteiligten Zentren waren älter als 50 Jahre und wiesen keine MP Diagnose auf.

## **2.5 Probenpräparation zur Genotypisierung**

Das von den Studienteilnehmern zur Verfügung gestellte Blut wurde wie in den folgenden Abschnitten beschrieben für die Genotypisierung weiterverarbeitet.

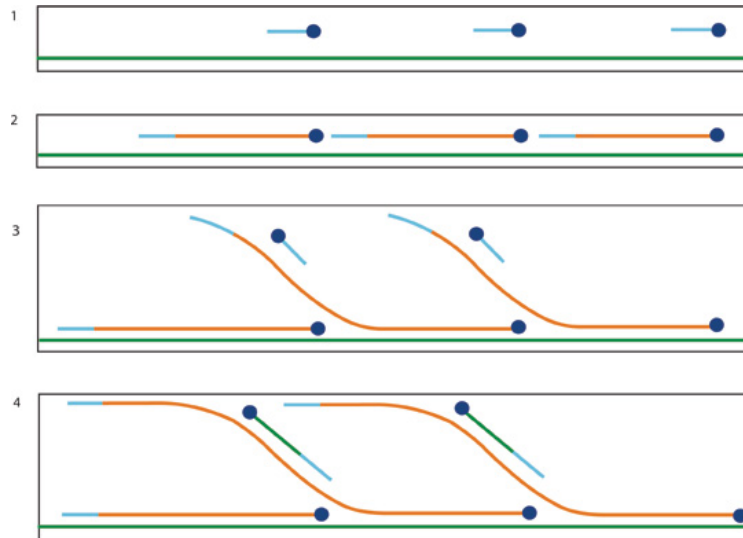
### **2.5.1 DNA Isolierung aus EDTA-Vollblut**

Die Extraktion genomischer DNA aus Blutproben erfolgte mit dem Invisorb® Blood Universal Kit (Invitex; Berlin, Deutschland). Das Blut wurde entweder sofort verarbeitet oder bei -80 °C eingelagert. Gefrorene Blutproben wurden in einem Wasserbad bei 10 bis 20 °C langsam aufgetaut. Die weiteren Vorgehensweisen glichen sich für frisches und gelagertes Blut. Zunächst wurde die Lyse der Erythrozyten hervorgerufen. Nach der Überführung des Blutes in ein 50 ml Röhrchen wurden 30 ml Puffer I auf 10 ml Blut gegeben und die Lösung wurde für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Probe 3 min bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen und verworfen. Dieser Schritt wurde mit 20 ml Puffer I so lange wiederholt, bis das verbleibende Zellpellet, welches die kernhaltigen Leukozyten enthielt, farblos und somit frei von Erythrozyten war, um eine Störung der PCR (*Polymerase chain reaction*; Polymerasekettenreaktion) durch das Hämoglobin zu vermeiden. Um die verbleibenden Leukozyten zu lysieren wurde das Pellet nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 3 ml Puffer II resuspendiert. Durch die Zugabe von 50 µl Proteinase K wurden die Proteine verdaut. Nach einem kurzen Vortexschritt wurde die Probe bei 60°C für zwei Stunden in einem Wasserbad bei kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Zur Fällung der Proteine und somit zur Trennung von der DNA wurden 1,8 ml Puffer III hinzugefügt und nach

kurzem Schütteln wurde die Probe für 5 min auf Eis gelagert. Nach 15 min Zentrifugation bei 5000 U/min wurde der klare Überstand in ein neues 15 ml Röhrchen überführt und mit Isopropanol zur DNA-Fällung versetzt. Die nach vorsichtigem Schwenken ausgefallene DNA wurde mittels einer 1000 µl Pipettenspitze in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml 70 %igem Ethanol überführt. Nach kurzem Vortexen wurde das DNA-Pellet bei 13000 U/min für 2 min abzentrifugiert. Im Anschluss wurde der Ethanol-Überstand verworfen und das DNA-Pellet bei RT für 10 min getrocknet. Das Pellet wurde zuletzt in 500 µl Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die Menge der so isolierten genomischen DNA sollte ungefähr 270-400 µg betragen.

### **2.5.2 Gesamt-Genom-Amplifikation**

Da die durch Extraktion gewonnene DNA ein kostbares aber begrenztes Gut bei der Erforschung von Krankheiten darstellt, wurde diese um ein Vielfaches vermehrt (Abbildung 2-2). Für die Gesamt-Genom-Amplifikation (*whole genome amplification* = WGA) wurde das GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare; United Kingdom) verwendet. Die Bakteriophagen DNA-Polymerase Phi29 von *Bacillus subtilis* vervielfältigte mit randomisierten Hexamer-Primern in einer sog. *multiple displacement amplification* (MDA) die DNA. Die Oligonukleotide banden gleichzeitig an vielen Stellen der denaturierten genomischen DNA, so dass eine Vielzahl von Replikationen parallel initiiert wurde. Während die Replikation fortschritt, wurde der DNA-Rückwärtsstrang durch die Polymerase von seinem Gegenstrang abgelöst und bildete somit einen neuen Einzelstrang, von dem wiederum eine Kopie entstand. Letztendlich erhält man mit dieser Methode die ca. 100-fache Menge an doppelsträngiger DNA mit einer Fragmentlänge von 10 bis 100 kb, wobei der Prozess Unterschiede in der DNA-Konzentration tendenziell ausgleicht (Dean *et al.*, 2002).



**Abbildung 2-2: Prinzip der gesamt-Genom-Amplifikation.**

(1) die Primer (blaue Linien) binden an die denaturierte einzelsträngige DNA (grüne Linien); (2) die  $\Phi 29$  DNA-Polymerase (blaue Kreise) verlängert die Primer bis sie neu-synthetisierte doppelsträngige DNA (orange Linie) erreicht; (3) das Enzym fährt mit der Polymerisierung fort und verdrängt so den neu-synthetisierten Strang, während Primer an die neu-synthetisierte DNA binden; (4) Polymerisierung am neuen Strang. (Quelle: (Spits *et al.*, 2006))

### 2.5.3 Gelelektrophorese

Die Qualität wurde nach der DNA-Isolierung und nach der WGA durch eine Gelelektrophorese überprüft, bei der 1  $\mu$ l der DNA mit 9  $\mu$ l 5:4 verdünntem Ladepuffer auf ein 0,8 %iges Gel (100 ml TE-Puffer + 0,8 g Agarose) aufgetragen wurde und für eine Stunde bei 120 V und 400 A gelaufen ist. Die Kontrolle der Amplifikation kurzer DNA-Fragmente nach der PCR für die Mikrosatelliten-Analysen (Abschnitt 2.6.2) und für die Sequenzierung (Abschnitt 2.8) erfolgte mit einem 2 %igem Gel (100 ml TE-Puffer + 2 g Agarose) unter den gleichen Laufbedingungen.

### 2.5.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Ausbeute der Gesamt-Genom-Amplifikation wurde durch eine PicoGreen-Konzentrationsbestimmung (Ahn *et al.*, 1996, Rengarajan *et al.*, 2002) mit Hilfe des Pipettierroboters Genesis RSP 150 nachgewiesen.

## 2.5.5 Herstellung von Platten für die SNPlex™- und TaqMan®-Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurden die durch WGA vervielfältigten DNA-Proben in einer 1:10 (für SNPlex™) oder einer 1:400 Verdünnung (für TaqMan®) nach einem definierten Verteilungsschema, dem so genannten Plattenlayout, im 96er Format angeordnet (Abbildung 2-3), um ein Hochdurchsatzverfahren zu gewährleisten. Eine Platte enthielt jeweils 92 DNA-Proben, drei Positionen (D3, D10 und H12) ohne DNA dienten als Leerwertkontrollen, und eine Position (C3) war mit der DNA einer *CEPH* (*Centre d'Etude du Polymorphisme Humain*)-Zelllinie beladen, welche als Kontroll-DNA für die Qualitätskontrolle der Genotypisierung benutzt wurde. Jeweils vier dieser Platten wurden mit einem Hydra-Mikrodispenser zu einer 384-*Deepwell*-Platte zusammengefügt. Somit befanden sich je vier DNA-Proben derselben *CEPH*-Zelllinie auf der finalen 384er-Platte und dienten so als Positiv- und Qualitätskontrolle. Verschiedene Genotypen dieser vierfach vorhandenen *CEPH*-Probe würden auf Kontaminierung oder andere Probleme bei der Genotypisierung hinweisen. Als zusätzliche Kontrolle erhielten jede 96er- und 384er-Platten einen individuellen Strichcode mit Identifikationsnummer. Diese Strategie gewährleistete eine zweifelsfreie Erkennung und Zuordnung der jeweiligen Platten und der darauf verwendeten Assays. Daraufhin wurden jeweils 5 µl der Arbeitsverdünnung in die 384-Genotypisierungsplatte überführt. Diese Platten wurden für ca. 2 Stunden bei 60 °C getrocknet, mit einer Deckfolie verschweißt und bei Raumtemperatur gelagert. Für eine TaqMan®-Genotypisierung wurden so etwa 2 ng der durch WGA amplifizierte DNA eingesetzt und für eine SNPlex™-Typisierung ca. 100 ng.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DNA01	DNA09	DNA17	DNA23	DNA31	DNA39	DNA47	DNA55	DNA63	DNA71	DNA78	DNA86
B	DNA02	DNA10	DNA18	DNA24	DNA32	DNA40	DNA48	DNA56	DNA64	DNA72	DNA79	DNA87
C	DNA03	DNA11	CEPH	DNA25	DNA33	DNA41	DNA49	DNA57	DNA65	DNA73	DNA80	DNA88
D	DNA04	DNA12	LEER	DNA26	DNA34	DNA42	DNA50	DNA58	DNA66	LEER	DNA81	DNA89
E	DNA05	DNA13	DNA19	DNA27	DNA35	DNA43	DNA51	DNA59	DNA67	DNA74	DNA82	DNA90
F	DNA06	DNA14	DNA20	DNA28	DNA36	DNA44	DNA52	DNA60	DNA68	DNA75	DNA83	DNA91
G	DNA07	DNA15	DNA21	DNA29	DNA37	DNA45	DNA53	DNA61	DNA69	DNA76	DNA84	DNA92
H	DNA08	DNA16	DNA22	DNA30	DNA38	DNA46	DNA54	DNA62	DNA70	DNA77	DNA85	LEER

**Abbildung 2-3: Anordnung der Proben im 96er-Format.**

92 DNA-Proben, DNA aus einer "*CEPH*"-Zelllinie als Positivkontrolle und drei Positionen ohne DNA als Negativkontrolle.

## 2.6 Genotypisierung

Für die Kopplungsstudien wurden hauptsächlich Mikrosatelliten (STR (*small tandem repeat*)-Marker) verwendet und mittels *Touch down*-PCR (Abschnitt 2.6.2) in der genomischen DNA der Probanden amplifiziert. Als Marker der Assoziationsanalysen wurden SNPs mit der SNPlex<sup>™</sup>- und TaqMan®-Technologie genotypisiert.

### 2.6.1 Auswahl der STR-Marker

Die Mikrosatelliten und die dafür notwendigen Primersequenzen wurden in den Datenbanken „Ensemble Genome Browser“ (<http://www.ensembl.org/index.html>) und „Human Genome Browser“ (<http://genome.ucsc.edu/>) herausgesucht. Bei der Wahl der STR-Marker wurde auf möglichst hohe Heterozygotie (>60 %) unter Nutzung der Datenbank „Genome Database“ (<http://www.gdb.org/>; nicht mehr existent) geachtet (Tabelle 7-1). Eine genügend große Abdeckung der untersuchten Kandidatenregion/-gen wurde durch einen Markerabstand bis 10 cM gewährleistet. Der Marker *STIR1-1107* wurde eigens gestaltet, indem nach repetitiven Sequenzen in der Region von Interesse mit Hilfe des „Human Genome Browsers“ gesucht wurde. Die dafür notwendigen Primer, die die variable Repeat-Region einschließen, wurden mit dem Internet-Programms „Primer3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) ermittelt. Genauere Angaben zum Primer Design sind im Abschnitt 2.7 zu finden.

Der genomweite Scan für die Kopplungsstudie erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit dem „Institut für Molekulargenetik“ der Universität zu Antwerpen. Die 440 verwendeten autosomalen STR-Marker wurden von dem Institut für Molekulargenetik extra für GWKS zusammengestellt und zeichnen sich durch eine hohe Heterozygotie sowie hohe Qualität der Amplifikationsprodukte aus. Die Marker wiesen einen durchschnittlichen Abstand von 8 cM auf.

### 2.6.2 Amplifikation

Jeweils ein Primer der Primerpaare wurde am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (HEX, FAM oder TAMRA) markiert, wodurch die Detektion mit Hilfe des 3700xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Forster City, USA) garantiert wurde. Die Primer wurden bei der Firma

Metabion (Martinsried, Deutschland) bestellt und in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  geliefert. Nach einer 1:10 Verdünnung wurden die Primer für den folgenden PCR-Reaktionsansatz verwendet (Tabelle 2-2).

**Tabelle 2-2: PCR-Ansatz für STR-Marker.**  
Verwendet wurde das AmpliTaq Gold® PCR Reagent Kit

Reagenz	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Puffer	1
MgCl <sub>2</sub>	1,2
dNTP's (10 $\mu\text{M}$ )	0,2
Vorwärtsprimer (10 $\mu\text{M}$ )	0,16
Rückwärtsprimer (10 $\mu\text{M}$ )	0,16
AmpliTaQ® Gold	0,06
DNA (10 ng/ $\mu\text{l}$ )	2
H <sub>2</sub> O	7.02

Die Amplifikation der Mikrosatelliten erfolgte mit *Touch down*-PCR in einer PCR-Maschine (GeneAmp PCR System 9700) mit dem in Tabelle 2-3 aufgezeigten Programm. Bei der *Touch down*-PCR wurde die Temperatur für die Anlagerung der Primer (*Annealing*) über den erwarteten Schmelzpunkt gesetzt und in den ersten 16 Zyklen pro Zyklus um 0,5 °C gesenkt. Durch diese Methode binden die Primer mit erhöhter Spezifität und die Ausbeute der PCR steigt an. Die *Annealing*-Temperaturen wurden spezifisch für die verwendeten Primer angepasst. Die optimalen *Annealing*-Temperaturen wurden in einer vorherigen Optimierungsreaktion ermittelt.

**Tabelle 2-3: Programm der Touch down PCR.**  
T\*: die obere und untere Annealing-Temperatur wurden in einer vorherigen Optimierungsreaktion ermittelt

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
DNA-Denaturierung / Enzymaktivierung	95 °C	12 min	
DNA-Denaturierung	95 °C	30 s	16
Annealing	obere T*	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
DNA-Denaturierung	95 °C	30 s	22
Annealing	untere T*	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Extension	72 °C	15 min	
Kühlschritt	4 °C	$\infty$	

Der Erfolg der PCR wurde mittels einer Gelelektrophorese überprüft. Das Gelbild gab auch Aufschluss über die Höhe der Verdünnung (1/10-1/50) des PCR-Produktes für die anschließende Detektion der STR-Marker. 1  $\mu\text{l}$  der verdünnten DNA wurde mit 0,15  $\mu\text{l}$  GeneScan™ 400HD ROX™ Size Standard und 12  $\mu\text{l}$  Hi-Di Formamide versetzt. Nach 3 min Denaturierung bei 95 °C erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Mikrosatelliten-Allele mit dem 3730xl



DNA-Analyzer (Applied Biosystems, Forster City). Die Bestimmung der Allelgrößen erfolgte mit dem Programm GeneMapper Analysis Software v4.0 (Applied Biosystems, Forster City).

Die 440 verwendeten autosomalen STR-Marker des genomweiten Scans wurden in mehreren Multiplex-Ansätzen amplifiziert. Hierbei wurden Primer für mehrere unterschiedliche Mikrosatelliten simultan in einer PCR-Reaktion verwendet, wobei auf eine gleiche optimale *Annealing*-Temperatur für die Primer geachtet werden musste. Die PCR-Produkte eines Multiplex-Ansatzes sollten unterschiedliche Längen aufweisen oder mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sein. PCR-Reagenzien und -Programme glichen den oben aufgeführten.

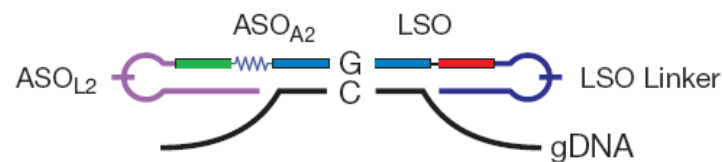
### **2.6.3 SNP-Auswahl und Pooldesign**

Um die gesamte genetische Variabilität der Kandidatengene zu erfassen, wurden in den Assoziationsstudien LD-basierte Haplotypblöcke definiert (Abschnitt 1.3.2) und htSNPs für die Analyse ausgewählt. Berechnungen des LD erfolgten für die biallelischen SNP-Marker paarweise mit dem Programm Haploview (Barrett *et al.*, 2005). Der in diesem Programm implementierte Algorithmus nach Gabriel (Gabriel *et al.*, 2002) definierte anhand der LD-Werte Haplotypblöcke aus denen anschließend die haplotypkennzeichnenden Marker gewählt wurden. Um eine gute Bindung der SNplex™-Assays an die Sequenz um den zu untersuchenden SNP zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass in einem Abstand von 5 bp kein weiterer SNP lag und dass der zu genotypisierende Marker in keiner repetitiven Sequenz lokalisiert war. Die ausgewählten SNPs wurden von Applied Biosystems (Applied Biosystems; Forster City, USA) in geeigneter Weise auf 48plex-Pools aufgeteilt. Einzelne SNPs für die Replikation früherer Ergebnisse oder für die Verifizierung von Assoziationssignalen aus einer Hypothesengenerierung wurden als TaqMan®-Assay geordert.

### **2.6.4 SNplex™-Technologie**

Die SNplex™-Genotypisierungsmethode (Applied Biosystems; Forster City, USA) erlaubt die simultane Typisierung von 48 SNPs in einer Reaktion (Tobler *et al.*, 2005) und ist somit besonders auf Hochdurchsatzverfahren ausgerichtet. Die Methode basiert auf einem

Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA) zur Diskriminierung der Allele und einer Multiplex-PCR zur Amplifizierung der Zielsequenz. Jeder Assay für die Genotypisierung eines SNPs beinhaltet drei SNP-spezifische Oligonukleotide. Bei zwei von ihnen handelt es sich um Allel-spezifische Oligos (ASOs), bei denen das SNP detektierende Nukleotid am 3'-Ende einer Locus-spezifischen Sequenz sitzt. Somit gibt es in einem 48er Kit 96 verschiedene ASOs, an die je eine einzigartige *ZipCode*-Sequenz bindet. Das dritte Oligonukleotid eines Assays ist ein Locus-spezifischer Oligo (LSO) mit einer Locus-spezifischen Sequenz, die an der 3'-Seite des SNPs bindet. In der OLA-Reaktion bindet an den zu detektierenden SNP ein Komplex aus einem ASO, einer *ZipCode*-Sequenz, einem LSO und zwei Verbindungsmolekülen (*Linker*) (Abbildung 2-4). Der ASO-spezifische *Linker* besitzt eine universelle Primer Sequenz. Im Gegensatz dazu befindet sich auf dem LSO-spezifischen *Linker* eine Bindestelle für einen universellen Rückwärts-Primer.



**Abbildung 2-4: Ligationsprodukt der Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA) -Reaktion.**

ASOA2: Allel-spezifischer Oligo für das Allel A2 mit ZipCode-Sequenz, ASOL2: ASOA2 spezifischer Linker mit universeller PCR Primer-Sequenz (grüner Balken), LSO: Locus-spezifischer Oligo, LSO Linker: LSO-spezifischer Linker mit Bindestelle für einen universellen Rückwärts-Primer (roter Balken) (aus SNPlex™ Genotyping System 48-plex User Guide)

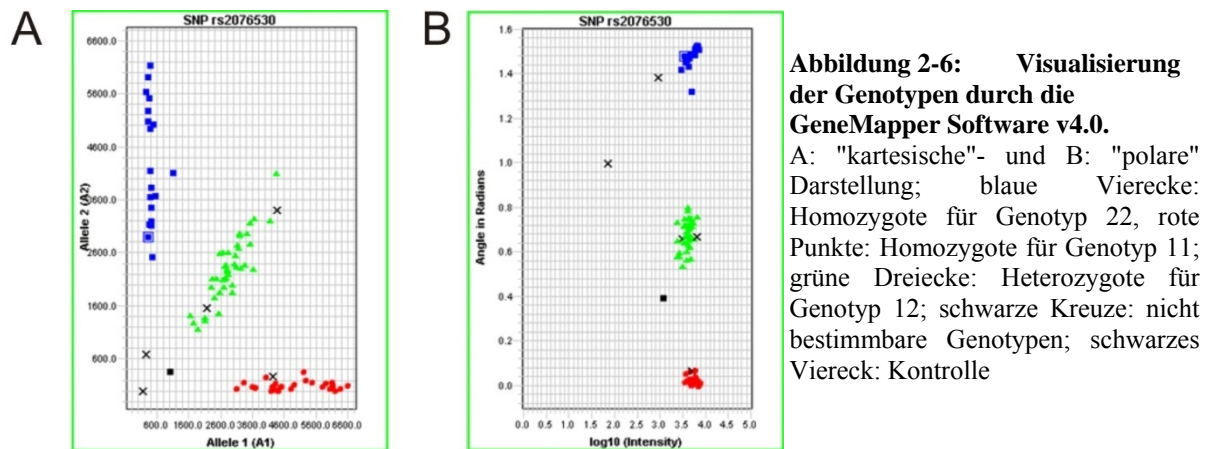
Nach der OLA-Reaktion werden ungebundene Proben, die genomische DNA und Teile der Verbindungsmoleküle durch Exonuklease I und  $\lambda$ -Exonuklease verdaut. Das verbleibende Produkt wird in einer PCR mit universellen Primern, von denen einer eine Biotin-Markierung trägt, amplifiziert (Abbildung 2-5).



**Abbildung 2-5: PCR des allelspezifischen Produkts bei der SNPlex™ Genotypisierung.**

Ziel der PCR ist die Amplifikation des SNP-spezifischen ZipCodes mit zusätzlicher Biotin-Markierung. (aus SNPlex™ Genotyping System 48-plex User Guide)

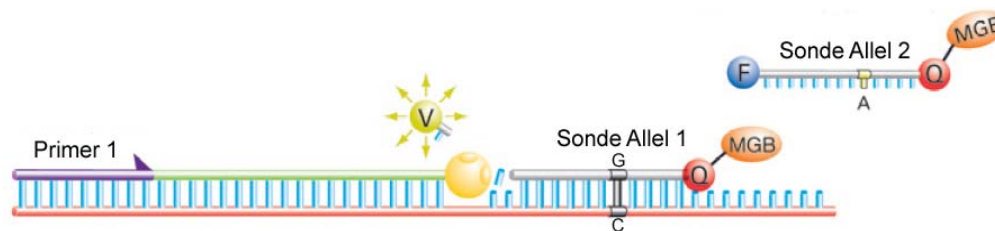
Die biotinmarkierten PCR-Produkte werden auf mit Streptavidin überzogene Mikrotiter-Platten zurückgehalten, die unmarkierten Amplikons und die PCR-Reagenzien werden aber durch mehrere Waschschrte entfernt. Die an der Platte gebundenen Einzelstrangmoleküle mit den amplifizierten *ZipCodes* werden nun mit einem Mix aus 96 *ZipChute*-Molekülen hybridisiert. Für jeden SNP gibt es zwei *ZipChute*-Proben, eine mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff und die andere mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff. Die verschiedenen Marker werden durch sogenannte Mobilitäts-Modifikatoren, die zusätzlich an den *ZipChutes* gebunden sind, erkannt. Nach der Entfernung ungebundener Moleküle durch letzte Waschschrte erfolgt die Eluierung aller gebundenen *ZipChutes* und deren Identifizierung mit dem Applied Biosystems 3730xl DNA-Analyzer (Applied Biosystems, Forster City, USA). Die Zuordnung der Genotypen erfolgt mit der GeneMapper Analysis Software v4.0 (Applied Biosystems, Forster City, USA), die die Signalintensität der Fluoreszenzfarbstoffe durch eine vektorgraphische Aufteilung in drei *Allelcluster* darstellt (Abbildung 2-6). Die automatische Zuordnung der Genotypen durch die Software wurde stets manuell kontrolliert und falls nötig korrigiert. Die Verarbeitung und Speicherung der Daten erfolgte in der SQL Datenbank *IBDbase*.



Die SNplex<sup>TM</sup>-Reaktionen wurden mit ca. 100 ng der durch WGA amplifizierte DNA im 384er Plattenformat durchgeführt. Der Prozess verlief automatisiert mit den Pipettierroboter Tecan Genesis RSP 150 und Tecan Te-MO (Tecan, Deutschland; Crailsheim, Deutschland), welche über die institutseigene Software *Pipettor* gesteuert wurden. Für die einzelnen Reaktionsschrte wurden die Kits *SNplex<sup>TM</sup> System Phosphorylation Kit*, *SNplex<sup>TM</sup> System Ligation Kit*, *SNplex<sup>TM</sup> Purification Kit*, *SNplex<sup>TM</sup> Amplification Kit*, *SNplex<sup>TM</sup> Hybridisation Kit* und das *SNplex<sup>TM</sup> Assay Standard Kit* entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet.

## 2.6.5 TaqMan®-Genotypisierung

Die robuste TaqMan®-Technologie wurde für die Genotypisierung einzelner SNPs verwendet. Bei diesem PCR-basiertem Verfahren wird die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase ausgenutzt. Während einer PCR wird mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsprimern das DNA-Fragment mit dem interessierenden Polymorphismus amplifiziert. Innerhalb dieses Fragments bindet die TaqMan®-Sonde an die DNA-Sequenz. Die Sonde trägt am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (meist VIC oder FAM) und am 3'-Ende den sogenannten Quencher (mit TAMRA-Farbstoff oder *minor groove binder* = MGB), der die Fluoreszenz durch seine räumliche Nähe überlagert. Während der PCR wird die TaqMan®-Sonde durch die Taq-Polymerase abgebaut, wodurch das Fluoreszenzsignal von dem Quencher getrennt und aktiviert wird (Abbildung 2-7). Somit nimmt gleichzeitig mit der Amplifizierung der DNA-Fragmente durch die PCR-Reaktion auch die Stärke der Fluoreszenz zu. Bei einem homozygoten Genotyp wird nach Beendigung der PCR-Reaktion mittels Laser-Scan-Technologie ein einzelnes Fluoreszenzsignal detektiert, je nach SNP-Allel entweder VIC oder FAM. Im Falle von Heterozygotie treten entsprechend beide Signale auf, was die direkte Zuordnung der Genotypen erlaubt.



**Abbildung 2-7: Prinzip der TaqMan®-Genotypisierung.**

Während der PCR baut die Taq-Polymerase die an dem SNP (G/C) hybridisierte Taq-Man®-Sonde ab. Damit wird die Überlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes (VIC = V; FAM = F) durch den Quencher (Q) aufgehoben. MGB = minor groove binder. (Quelle: <http://www.medicine.tcd.ie>)

Die TaqMan®-Genotypisierung wurde im 96er oder im 384er Format mit etwa 2 ng getrockneter, WGA-amplifizierter DNA nach einem einheitlichen PCR-Protokoll durchgeführt. Gegebenenfalls wurde die Anlagerungstemperatur der Primer angepasst (auf 58 °C oder 62 °C). In einem semi-automatisierten Prozess wurde mit dem Pipettierroboter Tecan Genesis RSP 150 (Tecan; Crailsheim, Deutschland) der PCR-Reaktions-Mix auf die Genotypisierungsplatten überführt. Für die PCR-Reaktion wurde das GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied

Biosystems; Forster City, USA) verwendet. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem Fluoreszenz-Lesegerät ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems; Forster City, USA). Nach der Messung wurden die Daten mit der *Sequence Detection System Software 2.0* (Applied Biosystems; Forster City, USA) verarbeitet und gespeichert. Analog zur SNPlex<sup>TM</sup>-Genotypisierung erfolgte die Darstellung der Genotypen vektorgraphisch in einem zweidimensionalen Koordinatensystem. Ebenso wurde gegebenenfalls manuell kontrolliert und korrigiert. Auch bei der TaqMan®-Genotypisierung kam die SQL Datenbank *IBDbase* zur Verarbeitung und Speicherung der Daten zum Einsatz.

## 2.7 Expressionsstudie des Transkripts *BC038758*

Um sicherzustellen, dass das im „Human Genome Browser“ (<http://genome.ucsc.edu/>) annotierte Transkript *BC038758* auch wirklich exprimiert wird, wurde versucht die Expression der Sequenz nachzuweisen. Die Expressionsstudie erfolgte mit mRNAs aus verschiedenen humanen Geweben (gesamtes Gehirn, Cortex, peripheren Blut-Leukozyten, Leber und Skelett-Muskulatur).

Es wurden zum einen kommerzielle komplementäre DNAs (*complementary DNA*; cDNAs) aus den verschiedenen oben aufgeführten Geweben verwendet (Clontech; Heidelberg, Deutschland) oder cDNA wurde aus Blutproben selbst hergestellt. Dafür wurde RNA mit dem RNAeasy Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland) aus den peripheren Blutproben extrahiert. Anschließend wurde die RNA mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. In einer ersten Reaktion wurde die in der mRNA-Probe enthaltene genomische DNA (gDNA) eliminiert. Dafür wurde in ein Reaktionsgefäß 1 µg RNA mit 2 µl gDNA *Wipeout* Puffer mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 14 µl gebracht. Nach einer 2 minütigen Inkubation bei 42 °C wurde die gesamte Lösung für die *Reverse*-Transkription eingesetzt, in dem noch 1 µl *Reverse Transcriptase*, 4 µl *Quantiscript RT* Puffer und 1 µl *RT Primer Mix* hinzugefügt wurden. Die *reverse* Transkription wurde für 15 min bei 42 °C durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase vollzogen. Nach der Inaktivierung des Enzyms *Reverse Transcriptase* wurde die erhaltene Lösung für verschiedene PCR-Reaktionen eingesetzt.

### ***Primerdesign***

Für die Identifizierung der Expression einer mRNA von *BC038758* wurden Exon-übergreifende Primer konzipiert. Die Primer wurden so gewählt, dass der Vorwärts-Primer im Exon 2 an die Zielsequenz bindet und der Rückwärtsprimer im Exon 3 bindet. Die Intron-Sequenz zwischen den beiden Primern sollte möglichst nicht größer als 600 bp sein, damit genomische DNA als Positivkontrolle für das Funktionieren der Primer und der PCR verwendet werden konnte, aber trotzdem eine Kontrolle für eine Verunreinigung der cDNA mit genomischer DNA möglich ist. Für das Primerdesign wurde das Programm Primer3 unter Verwendung folgender Parameter verwendet:

- Produktlänge: 300-800 bp
- Primerlänge: 18-30 Nukleotide (nt), optimal: 24 nt
- Schmelztemperatur der Primer: 57-63 °C, optimal: 60 °C, maximale Differenz: 2 °C
- GC-Gehalt der Primer: 40-60 %, optimal: 50 %
- bessere Bindungsfähigkeit durch GC am 3' Ende ("GC clamp: 1")

Die ermittelten Primersequenzen (Tabelle 2-4) wurden mit der PrimerExpress® Software v2.0 (Applied Biosystems, Forster City) auf die Ausbildung von Haarnadelstrukturen oder Primer-Dimeren überprüft. Auf den Internetseiten des „Human Genome Browser“ (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) wurde zusätzlich geprüft, ob die PCR-Primer an mehreren Stellen im Genom binden können und dadurch ggf. mehrere unerwünschte PCR-Produkte entstehen könnten. Durch das gewählte Primerpaar für *BC038758* sollte die Länge des PCR-Produktes der cDNA ohne dem dazwischen liegenden Intron 390 bp betragen. Die Amplifikation mit gDNA würde jedoch aufgrund des Introns ein Fragment mit der Größe von 920 bp liefern. Zur Überprüfung der Integrität der verwendeten cDNA wurde zusätzlich die Expression des sogenannten *housekeeping*-Gens *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (*GAPDH*) nachgewiesen. Die Temperaturoptimierung sowie die Amplifikation der Zielsequenzen erfolgte wie unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben. Das Programm und der Ansatz der PCR-Reaktion entsprachen dem unter demselben Abschnitt beschriebenen. Das PCR-Produkt wurde auf ein 2 %iges Gel aufgetragen.

**Tabelle 2-4: Primer für die Expressionsstudie des Transkripts *BC038758*.**  
Vorwärtsprimer bindet an Sequenz in Exon2 und Rückwärtsprimer an Sequenz in Exon3 von *BC038758*

Name	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Fragmentlänge gen.DNA/cDNA (bp)
<i>BC038758</i> e23	CAATGTGGTTGGAGGAGAGG	CTAGTTCCTCCTCCCTGTGC	928/390

## 2.8 Exon-DNA-Sequenzierung des Transkripts *BC038758*

Nach der Bestätigung der Transkription von *BC038758*, wurden alle drei Exone dieses Transkripts sequenziert. Hierdurch wurden 96 ET Patienten und 96 Kontrollen auf Punktmutationen sowie kleine Insertionen und Deletionen innerhalb von *BC038758* überprüft. Die Primer wurden so gewählt, dass sie mindestens 100 bp stromaufwärts und stromabwärts des jeweiligen Exons lagen. Das Primer Design wurde wie in Abschnitt 2.7 geschildert durchgeführt. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 2-5 aufgelistet. Nach Optimierung der Primer und erfolgreicher Amplifikation (Abschnitt 2.6.2) wurden 8 µl des PCR-Produktes mit den Enzymen Exonuklease1 und Shrimp Alkaline Phosphatase unter Zugabe von destilliertem Wasser aufgereinigt. Die Reaktion erfolgte für 15 min bei 37 °C mit anschließender Inaktivierung der Enzyme für 15 min bei 72 °C. Nach dem alle verbliebenen Primer und dNTPs entfernt wurden, wurde die Probe für die Sequenzierreaktion nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) vorbereitet. Die Sequenzierung wurde hierbei als eine Variation einer PCR mittels *BigDye® v1.1 Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Forster City) durchgeführt. Pro Reaktion kam jeweils nur ein Primer zum Einsatz (entweder Vorwärtsprimer oder Rückwärtsprimer). Zusätzlich zu den üblichen PCR-Reagenzien wurden dem Ansatz auch Didesoxynukleotide (ddNTPs) hinzugefügt. Die vier ddNTPs trugen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe. Die Bindung eines der vier ddNTPs an den neusynthetisierten Strang führte zum Kettenabbruch und in einer anschließenden Kapillar-Gelelektrophorese konnte die Sequenz durch die Fragmentlänge und das Fluoreszenzsignals identifiziert werden. Zur Vermeidung von Hintergrundfluoreszenzen wurde der Ansatz nach den PCR-Zyklen mit dem *BigDye® Xterminator™ Purification Kit* (Applied Biosystems, Forster City) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (Mort *et al.* 1998). Die abschließende Kapillar-Gelelektrophorese wurde auf dem Hochdurchsatz-96-Kapillar-Sequenzierer ABI PRISM 3700 DNA Analyzer durchgeführt, wobei mit Hilfe eines Lasers und eines spektrographischen Detektors die Ermittlung der basenspezifischen Fluoreszenz erfolgte.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte durch Sequenzvergleiche der Chromatogramme mit der Software novoSNP v2.0.3.

**Tabelle 2-5: Primer der Sequenzierreaktion der Tanskriptvariante BC038758**

Für die Sequenzierung des ersten Exons wurde das Primerpaar BC038758\_e1 verwendet, für das zweite Exon BC038758\_e2 und für das dritte Exon BC038758\_e3

Primer	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Fragmentlänge (bp)
BC038758_e1	TCCTGGTGGAGAGGAAAGG	GGGAGGAATCAGAAGTAATGTCC	550
BC038758_e2	AAACAAGCCCTGCCACTATG	CTCCTCAGCCCTATGCTCTG	650
BC038758_e3	GAGATGAGGGGTGCTCTCAG	CCATGGGTCGTCCTTCTAAA	1051

## 2.9 Statistik

Für die Ermittlung von krankheitsrelevanten Regionen oder Genen wurden die Genotypdaten mittels statistischer Methoden ausgewertet. Für die Kopplungsanalysen wurden die LOD-Werte berechnet, welche ein Maß der Kopplung von Marker und Phänotyp (ET) darstellen. Für die Assoziationsanalysen hingegen wurde nach signifikanten Unterschieden in den Allel- und Genotypfrequenzen von Kontroll- und Fallgruppe gesucht.

### 2.9.1 Kopplungsanalysen

Nach der Genotypisierung wurden die Allele der Mikrosatelliten in die Stammbäume eingetragen um eventuell die Segregation eines Risikoallels zu beobachten. Zusätzlich wurden alle Familien zusammen mit parametrischer und nicht-parametrischer Analyse auf Kopplung untersucht. Die Berechnung der LOD-Werte erfolgte nach Terwilliger und Ott (Terwilliger & Ott, 1994).

#### 2.9.1.1 Die statistische Teststärke und Signifikanzschwellen

Vor Beginn der Kopplungsstudien, wurde die statistische Teststärke (*Power*) einzelner Familien und des gesamten Kollektivs berechnet. Dafür wurden mit Hilfe der Programme Slink (für die parametrische Analyse) und Merlin (für die nicht-parametrische Analyse) die maximal möglichen erreichbaren LOD-Werte unter gegebener Familienstruktur und Phänotypen geschätzt. So konnte ermittelt werden ob die Familien-/Kollektivgröße zur Erlangung von statistischer Signifikanz ausreichend ist und welche maximalen LOD-Werte erreicht werden können. Klare Richtlinien



für Kopplungsergebnisse werden benötigt, um eine Flut falsch-positiver Ergebnisse zu vermeiden. Somit werden für die parametrische/nicht-parametrische Kopplungsanalyse LOD-Werte 3,3/3,6 (korrespondierende p-Werte  $< 5 \times 10^{-5}/2 \times 10^{-5}$ ) für signifikante Kopplung und 1,9/2,2 (korrespondierende p-Werte  $< 2 \times 10^{-3}/7 \times 10^{-4}$ ) für wahrscheinliche Kopplung gefordert. Bei LOD-Werten kleiner als -2 wird eine Kopplung des Locus mit dem untersuchten Phänotyp als ausgeschlossen angesehen. Ein LOD-Wert von 3,3 bedeutet statistisch, dass eine Kopplung der untersuchten Loci ungefähr 2000mal wahrscheinlicher ist, als dass die Loci durch Zufall gemeinsam vererbt werden. Bei LOD-Werten zwischen -2 und 1,9/2,2 besteht eine mögliche Kopplung, die statistisch gesehen jedoch keine Aussagekraft besitzt (Lander & Kruglyak, 1995). Die von Lander und Kruglyak (1995) postulierten Grenzwerte für Kopplung sind in Tabelle 2-6 dargestellt. Um Kopplung zu bestätigen wird wahrscheinliche Kopplung mit einem korrespondierenden p-Wert von 0,01 benötigt.

**Tabelle 2-6: Signifikanzschwellen genomweiter Kopplungsanalysen.**  
Nach (Lander & Kruglyak, 1995)

Analyse Methode	Wahrscheinliche Kopplung p-Wert (LOD-Wert)	Signifikante Kopplung p-Wert (LOD-Wert)
Nicht-parametrischer LOD-Wert	$7,4 \times 10^{-4}$ (2,2)	$2,2 \times 10^{-5}$ (3,6)
Nicht-parametrischer Zmean	$7,4 \times 10^{-4}$ (3,2)	$2,2 \times 10^{-5}$ (4,1)
Parametrischer LOD-Wert	$1,7 \times 10^{-3}$ (1,9)	$4,9 \times 10^{-5}$ (3,3)

### 2.9.1.2 Parametrische Analysen

Die Standard-LOD-Wert-Analyse ist eine parametrische Kopplungsanalyse (*parametric linkage analysis*; PL), die auf ein präzises genetisches Modell angewiesen ist. Mit dem Modell müssen Angaben über Erbgang, Allelfrequenz, Phänokopie und Penetranz der Krankheit gemacht werden. Die PL ist eine leistungsstarke Methode, bei der die Rekombinationsrate geschätzt wird. Ihr Anwendungsbereich liegt meist bei monogenen Erkrankungen, mit einfachem bekannten Vererbungsmodus, da sie unter Annahme eines falschen Modells (z.B. bei komplexen Erkrankungen) viel an ihrer Aussagekraft verliert (Clerget-Darpoux *et al.*, 1986).

Aufgrund der Stammbäume der Familien wurde bei der PL von einer autosomal dominanten Vererbung des ET ausgegangen. Die Angaben über Frequenzen und Penetranzen wurden aus anderen ET-Studien (Gulcher *et al.*, 1997, Kovach *et al.*, 2001) übernommen. Letztendlich wurden die Berechnungen unter Tabelle 2-7 aufgezeigter Modellannahme durchgeführt.

**Tabelle 2-7: Verwendetes Modell für die parametrische Kopplungsanalyse.**

Die Penetranzen sind als Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des ET-Phänotyps bei null (Phänokopie), bei einer und bei zwei Kopien des Risikoallels (11 / 12 / 22) angegeben.

Modell	Allelfrequenz des Risikoallels	Penetranz bei 11 / 12 / 22	Referenz
A	0,005	0,1 / 0,9 / 0,9	Nach (Gulcher <i>et al.</i> , 1997)

Die parametrische Zwei-Punkt-Kopplungsanalyse der genomweiten Kopplungsstudie wurde mit dem Programm MLINK aus dem Paket FASTLINK (Cottingham *et al.*, 1993) durchgeführt. Für die parametrischen sowie nicht-parametrischen (Abschnitt 2.9.1.3) Mehrpunkt-Kopplungsanalysen wurde das Programm MERLIN (Abecasis *et al.*, 2002) verwendet. Für die Qualitätskontrolle konnten die in der Software implementierten Programme PEDSTATS, MENDELCHECK und PEDWIPE genutzt werden, um die Einhaltung der Familienstruktur und der Mendelschen Gesetze zu prüfen sowie um unwahrscheinliche Genotypen zu entfernen.

### 2.9.1.3 Nicht-parametrische Analysen

Da die Angaben über die Penetranzen des ET sowie über die Phänokopieraten stark variieren wurde auch die nicht-parametrische Kopplungsanalyse (NPL; *non-parametric linkage analysis*) für die statistische Auswertung verwendet. Für Erkrankungen bei denen keine genauen Angaben über das zugrunde liegende genetische Modell gemacht werden können, ist die NPL geeignet. Die NPL bedient sich der „*affected-sib-pair*“-Methode (Penrose, 1935). Bei diesem Verfahren lässt man nicht-erkrankte Personen außer Acht und sucht stattdessen nach chromosomalen Abschnitten, die bei betroffenen Personen gemeinsam auftreten. Dabei ist es wichtig, zwischen Abschnitten zu unterscheiden, die mit Sicherheit aufgrund der gemeinsamen Abstammung übereinstimmen (*identical by descent*, IBD), und solchen, bei denen dies nicht sicher festgestellt werden kann (*identical by state*, IBS). Allerdings haben modellfreie Methoden den Nachteil, dass sie über eine geringere statistische Teststärke zum Nachweis tatsächlich bestehender Kopplung verfügen (Terwilliger & Ott, 1994). Die Berechnungen wurden mit dem Programm Merlin durchgeführt, welches die Ergebnisse als LOD-Wert und als Zmean ausgibt. Nach der Betrachtung der Markerallele bei den Verwandten, wurde die einer Normalverteilung folgende Teststatistik für den Anteil von IBD-Markerallelen in Form des Zmean (Whittemore & Halpern, 1994) und ein daraus abgeleiteter LOD-Score (Kong & Cox, 1997) berechnet. Unter der Nullhypothese von keiner Kopplung zwischen dem Marker und dem Krankheitslocus nähert sich Zmean dem minimal zu erreichenden Wert an. In der Präsenz von Kopplung

(Alternativhypothese) hingegen, weicht die Verteilung der elterlichen Allele (IBD vererbt) signifikant von der erwarteten IBD Verteilung unter der Nullhypothese ab. Die genomweite Signifikanzschwelle für  $Z_{mean}$  liegt bei 4,1.  $Z_{mean}$  und die LOD-Werte der nicht-parametrischen Analyse wurden mit dem exponentiellen Algorithmus berechnet, der sich besonders bei einer kleinen Anzahl von untersuchten Familien eignet (Kong & Cox, 1997).

## 2.9.2 Assoziationsanalysen

Für die Berechnungen der Einzelmarkeranalyse wurde das Programm PLINK (Purcell *et al.*, 2007) verwendet.

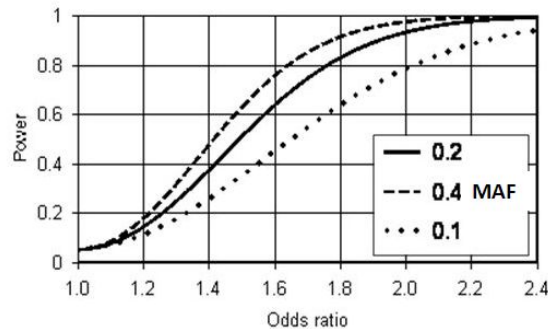
Die wichtigste Methode bei den Berechnungen der Assoziationsstudie war die Einzelmarkeranalyse. Hier wurden hauptsächlich die Allel- und Genotypfrequenzen des Markers in den Fällen und Kontrollen (*case control*, CC) unter Verwendung eines  $\chi^2$ -Tests berechnet.

Zur Qualitätskontrolle gehörte die Überprüfung einiger statistischer Daten. Eingehend betrachtet wurden hierbei das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (*Hardy-Weinberg-Equilibrium*; HWE) in den Kontrollen, die Allelfrequenz des seltenen Allels (*minor allele frequency*; MAF) in Fällen und Kontrollen und die Genotypisierungsrate (*call rate*; CR) von Markern und Proben. Die Ausschlusskriterien für einen Marker waren  $P_{HWE} < 0,01$ ,  $MAF < 0,01$  und  $CR < 0,95$ .

### 2.9.2.1 Die statistische Teststärke

Vor Beginn einer jeden Assoziationsstudie sollte jedoch die Prüfung der statistischen Teststärke erfolgen. Diese gibt an, wie hoch bei gegebener Studiengröße die Wahrscheinlichkeit ist, moderate Effekte in den Fällen detektieren zu können, bei der Annahme einer bestimmten Allelfrequenz des selteneren Allels in den Kontrollen (MAF; *minor allele frequency*). In Abbildung 2-8 ist exemplarisch die Powerkalkulation für die Hypothesengenerierung der Assoziationsstudie der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Abschnitt 3.2.2) dargestellt. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass mit der verwendeten Stichprobengröße von 184 Fällen und 426 Kontrollen ein moderater Effekt ab einem relativen Risiko von 1,75 mit einer Teststärke von mindestens 80 % detektiert werden kann (bei einer Allelfrequenz des seltenen Allels von mindestens 20 %). Die Teststärke verhält sich proportional zu den Einflussgrößen wie der Stichprobengröße, dem *odds*

ratio und der Allelfrequenz des seltenen Allels. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  und die Größe des Unterschiedes zwischen der spezifischen Alternative und der Nullhypothese haben ebenfalls einen proportionalen Effekt auf die Teststärke. Für die Berechnung der statistischen Teststärke kam das Programm „Power and Sample Size“ PS 2.1.31 (Dupont & Plummer, 1998) zum Einsatz.



**Abbildung 2-8: Graphische Darstellung zur Berechnung der statistischen Teststärke.** Unter der Verwendung von 184 Fällen und 426 Kontrollen. Es wurde die Teststärke (*Power*; y-Achse) gegen das *odds ratio* (OR; x-Achse) beim Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  und verschiedenen Allelfrequenzen des seltenen Allels der Kontrollen (MAF; MAF = 0.1, gepunktete Linie; MAF = 0.2, durchgehende Linie und MAF = 0.4, gestrichelte Linie) aufgetragen.

### 2.9.2.2 $\chi^2$ -Test

Um festzustellen, ob sich die erhaltenen Genotyp- bzw. Allelfrequenzen von Fällen und Kontrollen signifikant voneinander unterscheiden, wurde der Mehrfelder- $\chi^2$ -Test nach Pearson angewendet (Ott, 1985). Dieser bestimmt den Unterschied zwischen dem Beobachtungswert und dem Erwartungswert zweier Merkmale und überprüft ob diese Merkmale voneinander unabhängig sind. In der vorliegenden Studie sind die beiden Merkmale zum einen der Phänotyp (betroffen/unbetroffen) und zum anderen der biallelische Marker (Allel 1/Allel 2 oder Genotyp 11/22/12) unter der Nullhypothese, dass die Allel- oder Genotypfrequenzen in der Fallgruppe denen der Kontrollgruppe entsprechen. Der allelische  $\chi^2$ -Wert wird basierend auf einer 2x2-Felder-Kontingenztabelle (Tabelle 2-8) mit einem Freiheitsgrad (df) berechnet und der genotypische  $\chi^2$ -Wert basierend auf einer 2x3-Felder-Kontingenztabelle (Tabelle 2-9) und 2 df.

**Tabelle 2-8: Kontingenztabelle des allelischen  $\chi^2$ -Test**

	Allel 1	Allel 2	Summe
<b>Fälle</b>	$2n_{11} + n_{12}$	$n_{12} + 2n_{22}$	$2n$
<b>Kontrollen</b>	$2m_{11} + m_{12}$	$m_{12} + 2m_{22}$	$2m$

**Tabelle 2-9: Kontingenztabelle des genotypischen  $\chi^2$ -Test**

	Genotyp 11	Genotyp 12	Genotyp 22	Summe
Fälle	$n_{11}$	$n_{12}$	$n_{22}$	$n$
Kontrollen	$m_{11}$	$m_{12}$	$m_{22}$	$m$

$n_{11}$ : Anzahl der Fälle homozygot für Allel 1

$n_{22}$ : Anzahl der Fälle homozygot für Allel 2

$n_{12}$ : Anzahl der Fälle heterozygot

$m_{11}$ : Anzahl der Kontrollen homozygot für Allel 1

$m_{22}$ : Anzahl der Kontrollen homozygot für Allel 2

$m_{12}$ : Anzahl der Kontrollen heterozygot

Somit ergibt sich für die Berechnung des allelischen  $\chi^2$  Werts:

$$\chi^2 = \frac{((2n_{11} + n_{12}) \times (m_{12} + 2m_{22}) - (n_{12} + 2n_{22}) \times (2m_{11} + m_{12}))^2}{(2n_{11} + n_{12} + 2m_{11} + m_{12}) \times (n_{12} + 2n_{22} + m_{12} + 2m_{22}) \times 2n \times 2m}$$

Mit der  $\chi^2$ -Verteilung wurde der allelische p-Wert ( $p_{CCA}$ ) und der genotypische p-Wert ( $p_{CCG}$ ) bestimmt. Ein Testausgang wurde als signifikant betrachtet, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war. Bei mehreren gleichen Tests wurde die p-Wertschranke durch die Bonferroni-Korrektur nach unten korrigiert (Bland & Altman, 1995).

### 2.9.2.3 Logistische Regression

Die logistische Regression wurde in dieser Arbeit angewendet, um den Einfluss der Kovariable „Geschlecht“ ( $\text{♀}/\text{♂}$ ) auf die Zielvariable „Phänotyp“ (ET betroffen/nicht betroffen) im Falle einer nicht ausgeglichenen Studienstichprobe bezüglich des Geschlechtes zu untersuchen. Da die Zielvariable in diesem Fall ein binäres Messniveau besitzt, ist die lineare Regression nicht anzuwenden.

### 2.9.2.4 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Einhaltung des Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (*Hardy-Weinberg-Equilibrium*; HWE), welches zur Qualitätskontrolle eingesetzt wurde, wird auch mit einem  $\chi^2$ -Test (2×3 Kontingenztabelle mit zwei Freiheitsgraden) geprüft. Das HWE postuliert unter bestimmten Voraussetzungen, dass sich nach einer Generation in einer sehr großen Population an einem biallelischen Locus ein Gleichgewicht für die Genotypen einstellt. Wenn folglich bei einer Studienstichprobe angenommen wird, dass es sich um eine quasi unbegrenzt große Population handelt, mit zufälligem Paarungsverhalten, Abwesenheit von Migration, Mutation und Selektion,

können aus den Allelfrequenzen die Genotypfrequenzen hervorgesagt werden. Bei Abweichung der Genotypfrequenzen vom HWE ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ) in der Kontrollpopulation, eventuell verursacht durch Genotypisierungsfehler oder Populationsstratifizierung, wurden die Marker von den Analysen ausgeschlossen (Wigginton *et al.*, 2005).

### **2.9.2.5 Odds Ratio**

Das *odds ratio* (OR) ist ein Maß für den Effekt, den eine Mutation auf eine Krankheit ausübt. In einer Fall-Kontroll-Studie wird das OR definiert als die Wahrscheinlichkeit für das Ereignis A, geteilt durch die Wahrscheinlichkeit für das Nicht-Auftreten von A,  $P(A)/(1-P(A))$  (Bickeböllner & Fischer, 2007). Das OR kann Werte zwischen Null und Unendlich annehmen. Ein gleiches Chancenverhältnis ist erreicht, wenn das OR einen Wert von 1 einnimmt. Weicht allerdings das OR signifikant von 1 ab und wird in dem 95 %-Konfidenzintervall der Wert von 1 nicht eingeschlossen (entsprechend einem  $p\text{-Wert} < 0.05$ ), wird angenommen, dass der untersuchte Marker mit dem Phänotyp assoziiert ist.

## **2.10 Datenmanagement**

Die Verwaltung und Speicherung jeglicher Information, welche im Zusammenhang mit dem verwendeten Probenmaterial der Probanden erfasst oder generiert wurde, erfolgte über das interne Datenbank Management System (*Laboratory Information Management System*; LIMS; Hampe *et al.* 2001). Dazu gehörten die klinischen Daten der Probanden (Alter, Geschlecht und Herkunft), Informationen zu den Genotypisierungs-Assays (Primer-/Probensequenzen, Chromosomenposition, Locusinformation usw.), Anordnung der Proben auf den Genotypisierungsplatten sowie die entsprechend generierten Genotypdaten. Auch waren Informationen über Lagerungsort und Menge vorhanden. Die Verknüpfung all dieser Daten zu den dazugehörigen Proben erfolgte über eine einmalig zugeordnete eindeutige Identifikationsnummer, um eine Probenverwechslung und die Rückverfolgung der Identität eines Patienten auszuschließen.

Für die Abfrage der Daten standen hauseigene Software-Programme zur Verfügung. Der Datenexport aus dem LIMS-System geschah im Linkageformat, was den Kriterien der für die Datenanalyse verwendeten Programme entsprach.

## 3 Ergebnisse

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Identifizierung von genetischen Ursachen und Risikofaktoren für den Phänotyp des ET. Dabei wurden Kopplungs- und Assoziationsanalysen als molekularbiologisches Instrument angewendet.

### 3.1 Kopplungsanalyse der ET-Familien

Die Kopplungsanalyse beinhaltete die hypothesengetriebene Untersuchung der bekannten Kopplungsregionen (*ETM1*, *ETM2* und *ETM3*) sowie die Untersuchung der Gene für die GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten. Eine genomweite Kopplungsanalyse wurde bei den sechs größten Familien durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten sowohl mit der parametrischen Kopplungsanalyse (*parametric linkage analysis*; PL) als auch mit der nicht-parametrischen Kopplungsanalyse (*non-parametric linkage analysis*; NPL).

#### 3.1.1 Replikation der ETM-Regionen

Zu Beginn dieser Arbeit wurden alle 20 informativen Familien (deutscher, dänischer und französischer Herkunft) auf Kopplung zu den bekannten Regionen *ETM1* auf Chromosom 3 (Gulcher *et al.*, 1997), *ETM2* auf Chromosom 2 (Higgins *et al.*, 1997) und *ETM3* auf Chromosom 6 (Shatunov *et al.*, 2006) getestet. Hierfür wurden für jede Region vier Mikrosatelliten verwendet.

Die PL erfolgte unter der Annahme eines autosomal dominanten Modells mit einer Risikoallelfrequenz von 0,005, einer Phänokopierate von 0,1 und einer Penetranz von 0,9 (Tabelle 2-7). Für alle drei ETM-Regionen wurde bei gemeinsamer Analyse aller Familien mit der PL negative LOD-Werte  $< -2$  erzielt (Tabelle 3-1).

In der NPL konnte bei gemeinsamer Analyse aller Familien in keiner der drei *ETM*-Regionen ein signifikanter LOD Wert  $> 3,6$  detektiert werden (Tabelle 3-1). Der theoretische maximal zu erreichende LOD-Wert für alle 20 Familien zusammen unter Annahme vollständiger Locus-

Homogenität betrug 29,80. Unter vollständiger Locus-Homogenität versteht man, dass alle Familien Kopplung mit dem gleichen chromosomalen Locus zeigen, was aber – wie bei anderen Krankheiten gezeigt – sehr selten ist. Die untersuchten Marker von *ETM1* und *ETM3* zeigten nicht signifikante LOD-Werte in der Nähe des Nullwertes, wobei der maximale LOD-Wert von *ETM1* 0,42 und von *ETM3* 0,06 betrug. Den höchsten LOD-Wert mit 1,46 ( $P = 0,005$ ) wies der Marker D2S144 in der *ETM2* Region auf. Die LOD-Werte der anderen drei Marker aus dem Bereich auf Chromosom 2 waren auch im positiven Bereich.

**Tabelle 3-1: Ergebnisse der Kopplungsanalyse für die ETM-Regionen.**

Angegeben sind der Zmean und der LOD-Wert der nicht-parametrischen (LOD NPL)- inklusive p-Wert und der LOD-Wert der parametrischen (LOD PL) gemeinsamen Berechnung von 20 ET-Familien für die analysierten Marker der einzelnen Regionen. Die ersten beiden Zeilen zeigen die maximal und minimal möglichen Ergebnisse für die Datenserie der np-Analyse.

	Marker	Zmean	p-Wert	LOD NPL	p-Wert	LOD P
	min	-4,07	1	-12,22	1,0	
	max	15,31	0,0000	29,80	0,00000	
<b>ETM1</b>	D3S1552	0,81	0,2	0,19	0,2	-10,73
	D3S3652	1,05	0,15	0,32	0,11	-11,22
	D3S1278	0,28	0,4	0,02	0,4	-11,65
	D3S3641	1,03	0,2	0,42	0,08	-7,20
<b>ETM2</b>	D2S224	1,75	0,04	0,71	0,04	-2,91
	D2S2150	1,87	0,03	0,80	0,03	-3,02
	D2S144	2,60	0,005	1,46	0,005	-4,14
	D2S405	2,47	0,007	1,38	0,006	-3,72
<b>ETM3</b>	D6S202	0,08	0,5	0,00	0,5	-5,78
	D6S1279	0,09	0,5	0,00	0,5	-5,66
	D6S1006	0,28	0,4	0,02	0,4	-4,52
	D6S289	0,44	0,3	0,06	0,3	-4,18

Zusätzlich wurden die Allele der genotypisierten Mikrosatelliten in die Stammbäume eingetragen, um die Segregation von gleichen Haplotypen bei erkrankten Individuen zu verfolgen. Dadurch konnten die Regionen *ETM1* und *ETM3* als Suszeptibilitätsregion zum ET für alle Familien ausgeschlossen werden. In drei Familien (TEX, GUY und 853-TRI) konnte jedoch die Segregation eines Haplotyps in der *ETM2* Region in den betroffenen Individuen gefunden werden. Deswegen wurden in diesen drei Familien zusätzliche STR-Marker (Abschnitt 3.1.1.1) verwendet um eine genaue Analyse des *ETM2* Locus in diesen Familien durchzuführen.



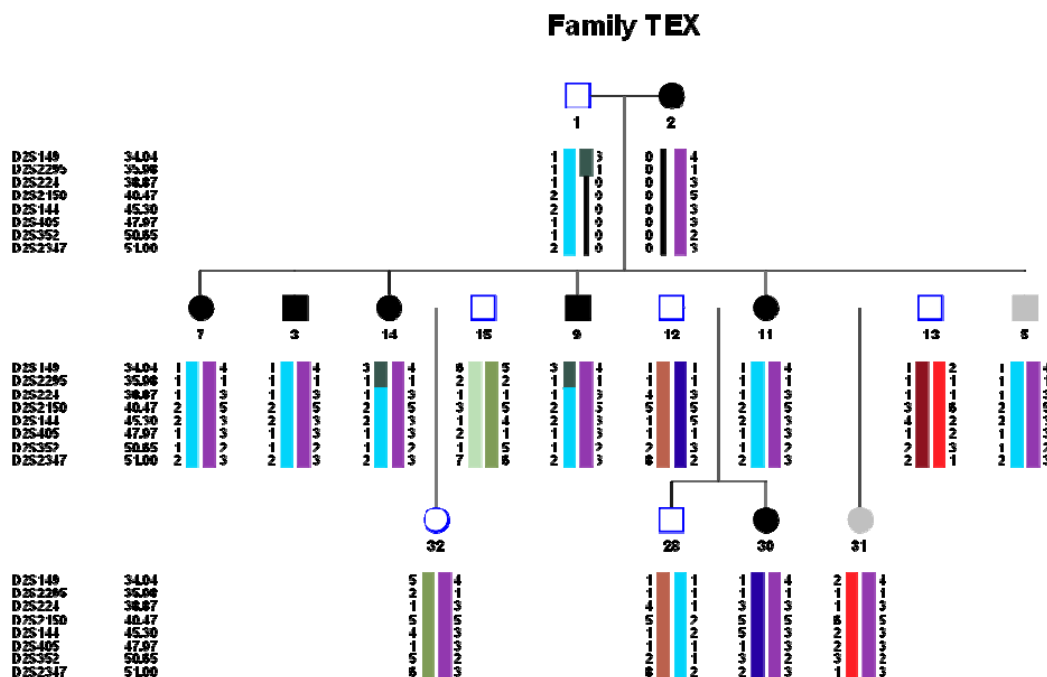
### 3.1.1.1 Feinkartierung der *ETM2*-Region

Eine Betrachtung der LOD-Werte für die einzelnen Familien zeigte, dass Familie TEX hauptsächlich zu dem positiven Kopplungssignal in der *ETM2* Region beiträgt. Von dieser Familie sind von 15 Personen die Genotypdaten über drei Generationen vorhanden. Der maximal zu erreichende LOD-Wert der NPL für Familie TEX beträgt 2,71. In der anschließenden Feinkartierung wurden zusätzlich je zwei Marker 5' (D2S149 und D2S2295) und 3' (D2S352 und D2S2347) der untersuchten Region in der Familie TEX genotypisiert (Tabelle 3-2).

**Tabelle 3-2: Ergebnisse der Kopplungsanalyse für die *ETM2*-Region der ET-Familie TEX.**  
Die fett gedruckten Marker wurden im Rahmen der Feinkartierung typisiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der nicht-parametrischen Mehrpunkt-Kopplungsanalyse des genomweiten Scans und der Feinkartierung.

Marker	genomweiter Scan				Feinkartierung			
	Zmean	p <sub>Z</sub> -Wert	LOD NPL	p <sub>LOD</sub> -Wert	Zmean	p <sub>Z</sub> -Wert	LOD NPL	p <sub>LOD</sub> -Wert
min	-0.78	0.8	-0.68	1	-0.78	0.8	-0.64	1
max	5.74	0	2.71	0.0002	5.74	0	2.71	0.0002
<b>D2S149</b>	/	/	/	/	2.37	0.009	0.91	0.02
<b>D2S2295</b>	/	/	/	/	2.85	0.002	1.39	0.006
D2S224	3.99	0.00003	2.31	0.0005	3.8	0.00007	2.16	0.0008
D2S2150	4.08	0.00002	2.34	0.0005	4.17	0.00001	2.33	0.0005
D2S144	4.08	0.00002	2.33	0.0005	4.24	0.00001	2.34	0.0005
D2S405	3.95	0.00004	2.3	0.0006	4.23	0.00001	2.34	0.0005
<b>D2S352</b>	/	/	/	/	4.14	0.00002	2.32	0.0005
<b>D2S2347</b>	/	/	/	/	4.11	0.00002	2.32	0.0005

Der Marker D2S2150 zeigte in der NPL der Familie das höchste Kopplungssignal mit einem LOD-Wert von 2,34 ( $p = 0,0005$ ). Um die Region einzuschränken, wurden zusätzlich jeweils 2 Mikrosatelliten 5' und 3' der äußersten möglicherweise gekoppelten Marker untersucht. Doch konnte die Region nicht durch die weiteren Mikrosatelliten eingegrenzt werden. Somit erstreckte sich das positive Kopplungssignal über einen Bereich von 17 cM (Abbildung 3-1). Bei der Betrachtung des Stammbaums der Familie TEX zeigte sich die Segregation eines Haplotyps der verwendeten Marker bei allen vom ET betroffenen Mitgliedern. Auch trat dieser Haplotyp bei einer gesunden Person auf.



**Abbildung 3-1: Stammbaum der ET-Familie TEX mit Haplotypen von *ETM2*.**

Vierecke symbolisieren Männer und Kreise Frauen. Die schwarz ausgefüllten Symbole stehen für Personen mit definitivem ET, grau ausgefüllte mit möglichem ET oder unklaren Phänotyp und nicht ausgefüllte Symbole für gesunde Individuen. In allen Patienten segregiert der lila markierte Haplotyp. Person 32 ist nicht vom ET betroffen, ist aber Träger des lila markierten Haplotyps. Von den Personen 1 und 2 wurden die Haplotypen zurückgerechnet, da keine Genotypdaten vorhanden waren.

### 3.1.1.2 Dopamin-Rezeptor D3 Gen

Zusätzlich wurde die Ser9Gly-Variante (SNP rs6280) im *DRD3* Gen, welches in der *ETM1* Region lokalisiert ist und in einer Studie als prädisponierend für den ET gezeigt wurde (Jeanneteau *et al.*, 2006), in 21 Familien genotypisiert. In vier Familien konnte die Segregation der Ser9Gly-Variante dadurch ausgeschlossen werden, dass mindestens zwei ET-Patienten einer Familie homozygot entweder für das Ser (Serin) oder das Gly (Glycin) Allel waren. In 13 Familien konnte eine Transmission des Ser Allels beobachtet werden und in vier Familien eine Transmission des Gly Allels. Die parametrische Zweipunkt-Analyse ergab einen kombinierten LOD-Wert von -7,16 bei  $\theta=0$  (LOD-Werte der einzelnen Familien von -1,85 bis 0,67). Somit kann für alle Familien zusammen eine Kopplung des G Allels der Ser9Gly-Variante

ausgeschlossen werden (LOD = -7,16). Zusätzlich konnten die Kopplungssignale der separat analysierten Familien eine Kopplung von der Ser9Gly-Variante zum ET nicht bestätigen. Die Ergebnisse sind in Kombination mit einer Assoziationsanalyse des SNPs rs6280 in einer Publikation zusammengefasst (Lorenz *et al.*, 2008a).

### 3.1.2 GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten als Kandidatengene

Die 15 autosomal codierten Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten wurden jeweils mit möglichst zwei Mikrosatelliten 5' und 3' des codierenden Bereich untersucht. Die Anzahl der Mikrosatelliten pro Gen oder Gencluster sowie die Positionen sind der Tabelle 7-1 im Anhang zu entnehmen. Mit beiden Analysemethoden (PL und NPL) konnten in der gemeinsamen Analyse aller Familien keine Kopplungssignale mit LOD-Werten > 0,12 für einen der verwendeten Marker detektiert werden, wobei die parametrische Mehrpunkt-Analyse LOD-Werte von < -2 ergab (Tabelle 3-3). In der PL ist eine Kopplung von genetischen Markern in den genomischen Regionen der GABA<sub>A</sub>-R Gene so gut wie ausgeschlossen, da LOD-Werte < -2 in der PL als sicheres Ausschlußkriterium für eine Kopplung gelten.

**Tabelle 3-3: Ergebnisse der Kopplungsanalyse für die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten**

Angegeben sind die Zmeans und LOD-Werte der nicht-parametrischen- (LOD NPL) inklusive p-Wert und der parametrischen (LOD PL) Berechnung von 20 ET-Familien für die analysierten Marker der einzelnen Regionen. Die ersten beiden Zeilen zeigen die maximal und minimal möglichen Ergebnisse für die Datenserie der NPL.

Marker	Zmean	p-Wert	LOD NPL	p-Wert	LOD PL
min	-4,01	1	-12,03	1	
max	16,47	0	31,2	0	
STIR1-1107	-0,31	0,6	-0,03	0,6	-7,16
D1S1328	-0,25	0,6	-0,02	0,6	-7,215
D1S243	-0,17	0,6	-0,01	0,6	-7,219
D1S468	-0,06	0,5	0	0,5	-5,402
D4S3357	0,53	0,3	0,07	0,3	-6,027
D4S1547	0,52	0,3	0,07	0,3	-6,218
D4S396	0,5	0,3	0,06	0,3	-6,37
D4S1635	0,49	0,3	0,06	0,3	-6,097
D5S403	0,49	0,3	-0,26	0,9	-9,839
D5S1476	-0,3	0,6	-0,04	0,7	-9,778
D5S529	-0,3	0,6	-0,29	0,9	-9,924
D5S2066	-0,82	0,8	-0,34	0,9	-8,678
D5S397	-0,79	0,8	-0,04	0,7	-8,198

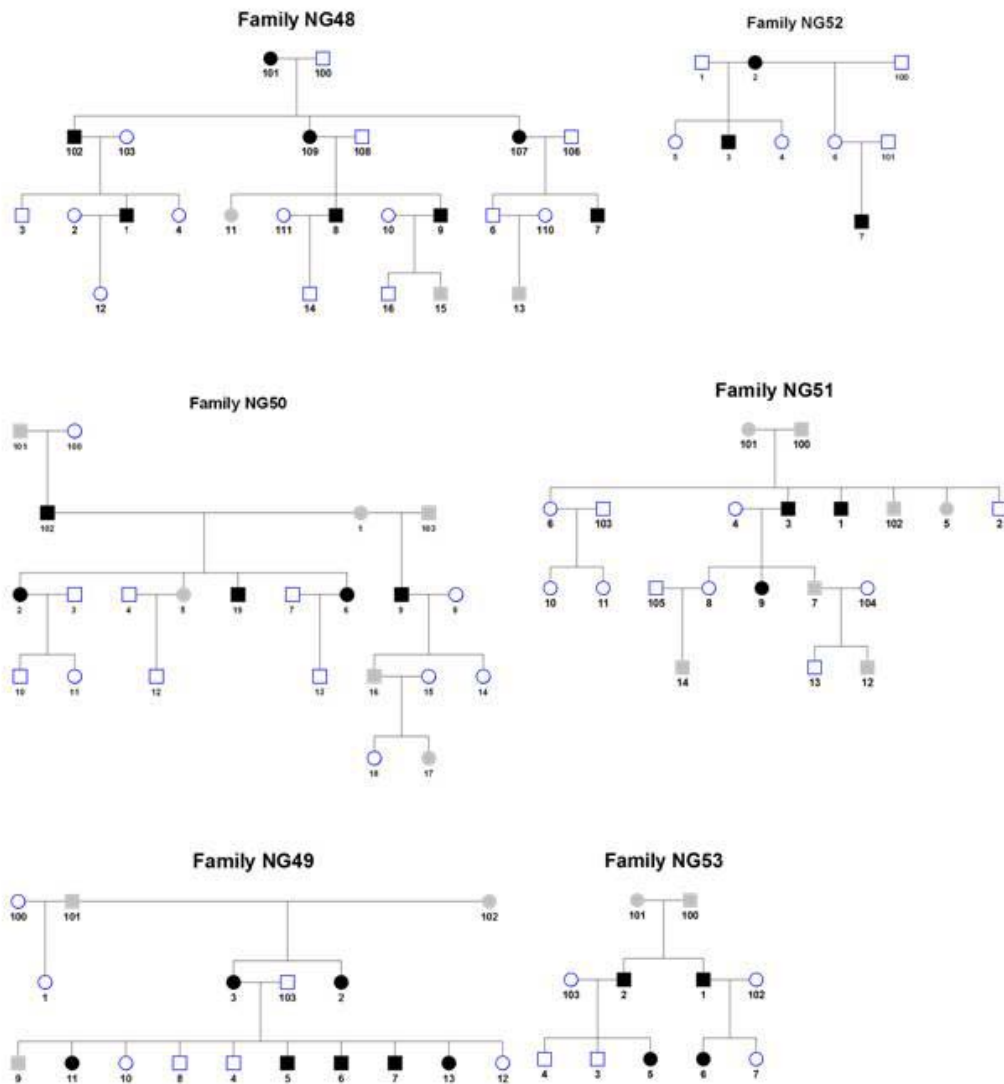
Marker	Zmean	p-Wert	LOD NPL	p-Wert	LOD PL
D5S462	-0,24	0,6	-0,01	0,6	-9,098
D5S429	-0,17	0,6	-0,01	0,6	-9,215
D6S1609	-0,16	0,6	0,08	0,3	-4,762
D6S1644	0,59	0,3	0,12	0,2	-4,584
D6S482	0,7	0,2	0,02	0,4	-5,368
D6S1570	0,28	0,4	0,04	0,3	-5,011
D15S1513	0,38	0,4	-0,37	0,9	-5,865
D15S97	-1,01	0,8	-0,45	0,9	-5,594
D15S1002	-1,11	0,9	-0,27	0,9	-5,565
D15S156	-0,85	0,8	-0,27	0,9	-5,541

Auch die Haplotypanalyse in den Stammbäumen der einzelnen Familien ließ keine Segregation eines Risikohaplotyps in den vom ET betroffenen Mitgliedern der ET-Familien erkennen, was eine auf einzelne Familien beschränkte Kopplung mit den GABA<sub>A</sub>-R nahezu ausschließt.

### 3.1.3 Genomweite Kopplungsstudie (GWKS)

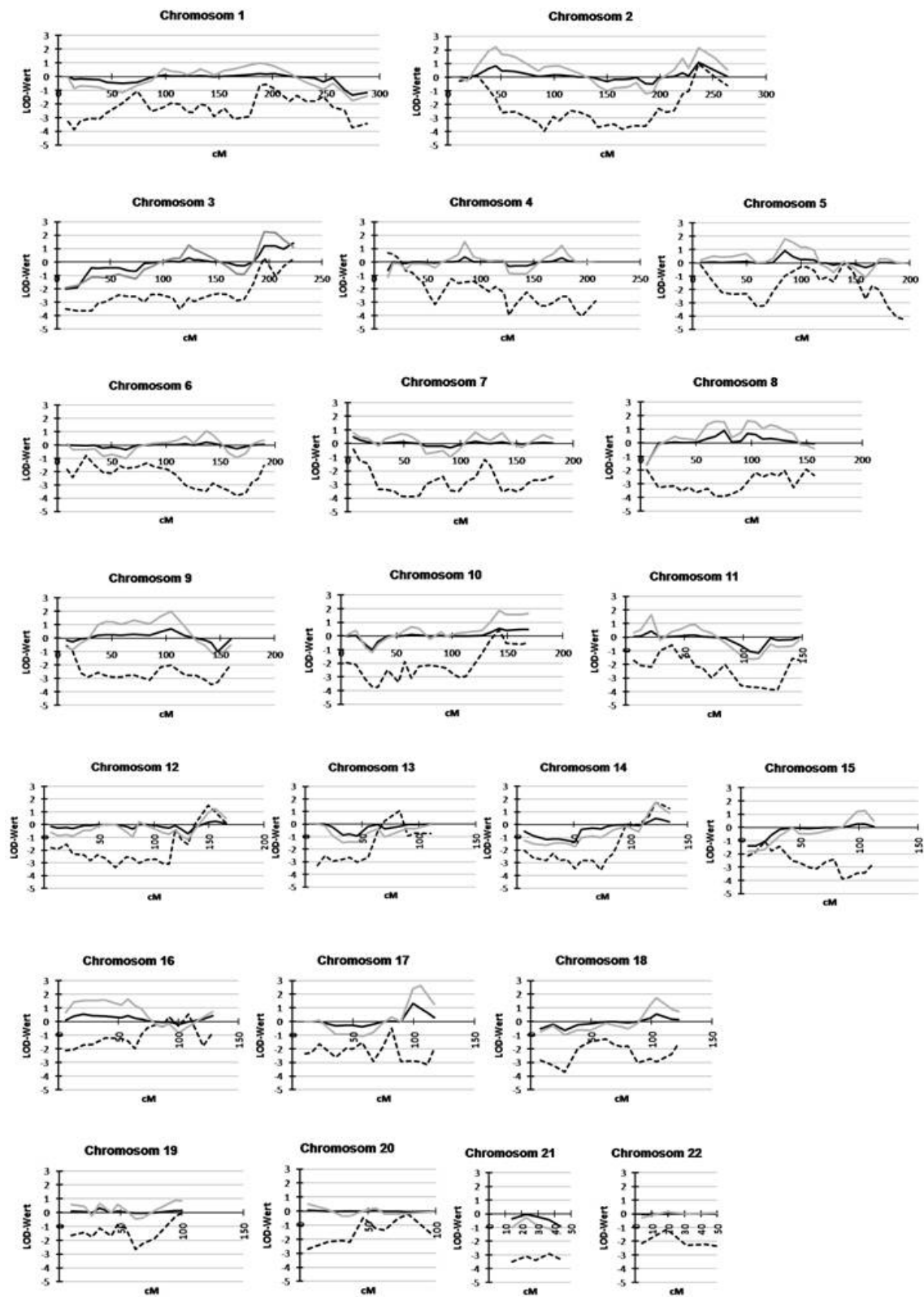
Für die hypothesenfreie Untersuchung auf Kopplung wurden sechs informative deutsche Familien mit der höchsten statistischen Teststärke mit 421 autosomalen Mikrosatelliten mittels einer genomweiten Kopplungsstudie (GWKS) untersucht (Abbildung 3-2). Die sechs Familien stammen aus dem Kollektiv der 20 Familien für die Kandidatengenstudien und setzten sich aus neun bis 25 Mitgliedern verteilt auf drei bis vier Generationen zusammen. Der theoretische maximal zu erreichende LOD-Wert unter Annahme vollständiger Locus-Homogenität für alle sechs Familien zusammen beträgt in der NPL 9,23 und in der PL 6,39. Weder die NPL noch die PL ergaben signifikante Kopplungssignale mit LOD-Werten  $> 3$  in der gemeinsamen Analyse aller Familien (Abbildung 3-3). Wie man der Abbildung entnehmen kann, lagen die LOD-Werte der NPL überwiegend im Bereich von Null. Die maximalen Kopplungssignale stammten von Chromosom 2 (LOD = 1,1), Chr. 3 (LOD = 1,21) und Chr. 17 (LOD = 1,33).

Die PL ergab hauptsächlich negative LOD-Werte (Abbildung 3-3). Die höchsten Kopplungssignale waren auf Chr. 2 (LOD = 0,97), Chr. 12 (LOD = 1,52), Chr. 13 (LOD = 1,07) und Chr. 14 (LOD = 1,72) zu finden.



**Abbildung 3-2: Darstellung der sechs ET-Familien für die GWKS.**

Die schwarz ausgefüllten Symbole stellen Individuen mit definitivem oder wahrscheinlichem ET dar, grau ausgefüllte Symbole kennzeichnen Individuen mit möglichem ET oder mit unbekanntem Krankheitsstatus. Gesunde Personen sind mit klaren Symbolen dargestellt. Von Personen mit einer Kennnummer >100 sind keine Genotypinformationen vorhanden.

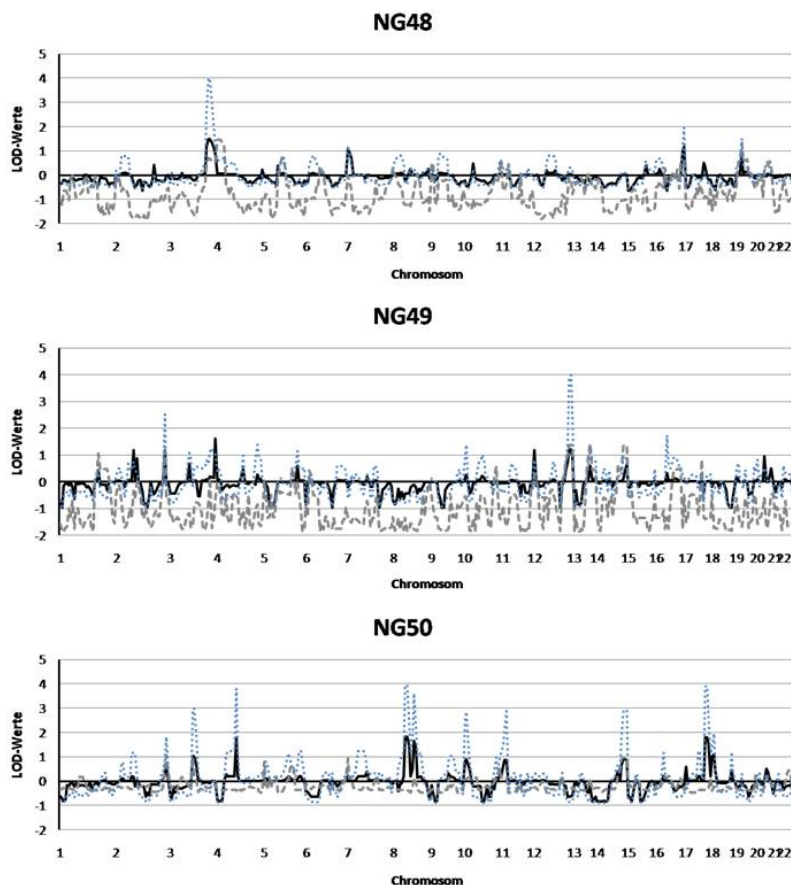


**Abbildung 3-3: Graphische Darstellung der Ergebnisse der GWKS.**

Es sind die Zmeans (graue durchgehende Linie) und LOD-Werte der nicht-parametrischen (schwarze durchgehende Linie) und die LOD-Werte der parametrischen Analyse (schwarze gestrichelte Linie) gegen die cM Position der Marker für die jeweiligen Chromosomen aufgetragen.

### 3.1.3.1 Analyse der einzelnen Familien

Da bei monogenen Krankheiten häufig eine sogenannte Locus-Heterogenität zu finden ist, d.h. dass Mutationen in unterschiedlichen Genen die Ursache der Krankheit in verschiedenen Familien sind, wurden die größeren Familien (NG48, NG49 und NG50) zusätzlich einzeln analysiert. Die theoretisch maximal möglichen LOD-Werte ( $LOD_{max}$ ) in der NPL (PL) für diese Familien betragen bei NG48:  $LOD_{max} = 2,47$  (2,49); NG49:  $LOD_{max} = 2,95$  (2,35) und NG50:  $LOD_{max} = 1,81$  (1,87). In der Auswertung wiesen die drei Familien Kopplungssignale in unterschiedlichen Regionen auf (Abbildung 3-4). Übereinstimmungen in den Regionen mit positiven Kopplungssignalen konnten in der NPL in den Familien NG48 ( $LOD = 1,48$ ) und NG49 ( $LOD = 1,6$ ) auf Chromosom 3 und in der PL in den Familien NG49 ( $LOD = 1,16$ ) und NG50 ( $LOD = 1,05$ ) auf Chromosom 2 gefunden werden. Das höchste Kopplungssignal von Familie NG48 in der NPL stammte von Chr. 3 ( $LOD = 1,48$ ;  $Z = 4,01$ ) und in der PL von Chr. 4 mit einem LOD-Wert von 1,47. Die stärksten Kopplungssignale der NPL und PL von Familie NG49 waren auf Chr. 12 ( $LOD_{NPL} = 1,2$ ;  $Z = 4$ ) und auf Chr. 13 ( $LOD_{PL} = 1,44$ ) zu finden. In der Familie NG50 konnten mittels der NPL diverse Kopplungssignale mit LOD-Werten  $> 1$  detektiert werden, wobei das stärkste Signal von Chr. 8 ( $LOD_{NPL} = 1,81$ ;  $Z = 3,93$ ) stammte. Die PL erzielte mit  $LOD = 1,05$  auf Chr. 13 den höchsten LOD-Wert. Ein LOD-Wert  $> 2$  wurde in keiner Familie gefunden. Somit blieben die LOD-Werte von den Familien NG48 und NG49 weit unter den maximal möglich erreichbaren LOD-Werten. Familie NG50 hingegen lag nur knapp unter dem geschätzten  $LOD_{max}$  von 1,81 mit Kopplungssignalen der NPL von Chr. 4 ( $LOD = 1,79$ ) und Chr.17 ( $LOD = 1,8$ ). Auf Chr. 8 konnte sogar der  $LOD_{max}$  erreicht werden ( $LOD = 1,81$ ).



**Abbildung 3-4: Ergebnisse der GWKS für einzelne ET-Familien.**

Es sind die LOD-Werte der nicht-parametrischen (schwarze durchgehende Linie) und der parametrischen Analyse (graue gestrichelte Linie) sowie die Zmeans (blaue gepunktete Linie) der nicht-parametrischen Analyse gegen die Chromosomen aufgetragen.

### 3.1.3.2 Feinkartierung des putativen Locus auf Chromosom 3q26.31 bis 3q29

In einer Feinkartierung wurde die Region von 185.40 bis 222.83 cM auf Chromosom 3 weiterverfolgt. Bei der NPL aller sechs Familien zeigten sechs Marker einen positiven LOD-Wert in dieser Region, wobei das höchste Kopplungssignal von dem Marker D3S3583 (LOD = 1,21) stammte (Tabelle 3-4). Auch bei der Betrachtung der einzelnen Familien konnten Marker dieser Region LOD-Werte  $> 1$  in den Familien NG48 und NG49 erreichen (LOD = 1,48 und LOD = 1,6). Für die Feinkartierung wurden zusätzlich vier Mikrosatelliten (D3S2421, D3S3041, D3S3730 und D3S1232) mit hoher Heterogenität in den sechs Familien der GWKS genotypisiert. Die anschließende NPL zeigte einen Anstieg der LOD-Werte der Marker aus dem genomweiten Scan mit Ausnahme von ATA57D10, D3S2455 und D3S1265. Von den Markern



der Feinkartierung zeigte D3S1232 den höchsten LOD-Wert mit 1,83. Jedoch führten die zusätzlichen Marker zu keinen signifikanten Kopplungssignalen in der Gesamtanalyse aller sechs Familien (Tabelle 3-4). Die p-Werte für die LOD-Werte der Feinkartierung wiesen zwar auf eine nominal signifikante Kopplung hin ( $p\text{-Wert} < 0,05$ ), konnten aber keine genomweite Signifikanz von  $p\text{-Wert} < 1,18 \times 10^{-4}$  erreichen. Auch erreichten die LOD-Werte nicht die theoretisch berechneten Maximalwerte. Familie NG48 zeigte die stärksten Kopplungssignale bei der Einzelanalyse (Tabelle 7-2). Bei Betrachtung der Haplotypen in den Stammbäumen der einzelnen Familien konnte in den Familien NG48 und NG49 der vermutete Risikohaplotyp auch in nicht vom ET betroffenen Personen ermittelt werden. Zudem fehlte in Familie NG49 bei einem an ET erkrankten Familienmitglied der vermutete Risikohaplotyp. Exemplarisch ist der Stammbaum von Familie NG48 in der Abbildung 7-2 im Anhang dargestellt.

**Tabelle 3-4: Ergebnisse der Feinkartierung von Chromosom 3 in allen sechs Familien der GWKS.** Die fett gedruckten Marker wurden im Rahmen der Feinkartierung typisiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der nicht-parametrischen Mehrpunkt-Kopplungsanalyse.

Marker	genomweiter Scan				Feinkartierung			
	Zmean	p <sub>Z</sub> -Wert	LOD NPL	p <sub>LOD</sub> -Wert	Zmean	p <sub>Z</sub> -Wert	LOD NPL	p <sub>LOD</sub> -Wert
min	-2,27	1	-3,2	1	-2,29	1	-3,2	1
max	8,7	0	8,99	0	8,37	0	8,99	0
D3S1763	-0,91	0,8	-0,27	0,9	0,25	0,4	0,14	0,2
D3S2425	0,02	0,5	0	0,5	1,28	0,1	0,54	0,06
<b>D3S2421</b>	/	/	/	/	2,16	0,02	1,12	0,011
<b>D3S3041</b>	/	/	/	/	2,52	0,006	1,27	0,008
D3S3037	1,19	0,12	0,51	0,06	2,59	0,005	1,3	0,007
<b>D3S3730</b>	/	/	/	/	2,95	0,002	1,55	0,004
<b>D3S1232</b>	/	/	/	/	3,17	0,0008	1,83	0,002
D3S3583	2,28	0,011	1,21	0,009	2,69	0,004	1,4	0,006
ATA57D10	2,18	0,015	1,2	0,009	2,11	0,02	1,12	0,012
D3S2455	1,66	0,05	0,99	0,02	1,51	0,07	0,89	0,02
D3S1265	1,12	0,13	1,42	0,005	0,99	0,2	0,83	0,03

### 3.1.3.3 Feinkartierung des putativen Locus auf Chromosom 19p13.2-19p13.12

Zusätzlich zu der Mehrpunkt-Analyse wurden die Familien der GWKS auch mittels Zwei-Punkt-Analyse untersucht. Bei der Zwei-Punkt-Kopplungsanalyse wird die Segregation von nur einem Marker mit dem Krankheitslocus betrachtet. Diese Analyse kann unterschiedliche Ergebnisse zu dem hier sonst angewandten Mehrpunkt-Verfahren liefern. Den höchsten LOD-Wert der

parametrischen Zwei-Punkt-Analyse zeigte Marker D19S586 (LOD = 1,84) in Familie NG48 (Tabelle 3-5). Dieses Kopplungssignal wurde von den leicht positiven LOD-Werten der beiden eingrenzenden Nachbarmarker (D19S922, LOD = 0,33 und ATA37G08, LOD = 0,23) unterstützt. Auch zeigten die Marker dieser Region in der parametrischen Mehrpunkt-Analyse positive LOD-Werte in Familie NG48, wobei der Marker D19S586 hier einen LOD-Wert von 1,38 erreichte (siehe Tabelle). Für die weitere Charakterisierung des Kopplungssignals aus dieser Region wurden vier zusätzliche Marker (D19S391, D19S865, D19S221 und D19S226) in diesem Bereich ausgesucht und in der Familie NG48 analysiert (Tabelle 3-5). Dabei konnte die parametrische Zwei-Punkt-Analyse keinen Anstieg in den Kopplungssignalen verzeichnen. Da die anderen fünf Familien in dieser Region keine oder nur schwache Kopplungssignale zeigten, wurden sie nicht in der Feinkartierung eingeschlossen. In der Mehrpunkt-Analyse konnte durch die zusätzlichen Mikrosatelliten eine Erhöhung der LOD-Werte von D19S586 und ATA37G08 erreicht werden. Auch nach der Information der vier zusätzlichen Marker zeigte D19S586 immer noch das höchste Kopplungssignal. Jedoch konnte im Rahmen der Feinkartierung keine statistisch signifikante Kopplung des Locus auf Chromosom 19 mit dem ET-Phänotyp festgestellt werden. Auch konnte mit dem LOD-Wert von 1,63 nicht der  $LOD_{max} = 2,47$  der Familie NG48 erreicht werden. Die Haplotypanalyse im Stammbaum von Familie NG48 (Abbildung 7-3) zeigte das Vorkommen des Risiko-Haplotyps in einem vom ET nicht betroffenen Familienmitglied und das Fehlen des Haplotyps in zwei Personen mit unbekanntem (jedoch möglichen ET) Phänotyp.

**Tabelle 3-5: Ergebnisse der Feinkartierung von Chromosom 19.**  
Die fett gedruckten Marker wurden im Rahmen der Feinkartierung typisiert.  
Dargestellt sind die Daten der parametrischen Kopplungsanalyse.

Marker	genomweiter Scan		Feinkartierung	
	LOD Zwei-Punkt- Analyse	LOD Mehrpunkt- Analyse	LOD Zwei-Punkt- Analyse	LOD Mehrpunkt- Analyse
D19S427	-0,49	0,658	-0,6	0,584
D19S922	0,23	0,683	0,18	0,631
<b>D19S391</b>	/	/	1,46	1,296
<b>D19S865</b>	/	/	0,58	1,611
D19S586	1,84	1,382	1,67	1,613
<b>D19S221</b>	/	/	-0,17	0,673
<b>D19S226</b>	/	/	-0,42	0,741
ATA37G08	0,33	0,653	0,2	0,838

### 3.1.3.4 Ergebnisse der ETM-Regionen in der GWKS

Die Ergebnisse der *ETM*-Regionen im genomweiten Scan entsprechen denen unter Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Ergebnissen der *ETM*-Regionen in 20 ET-Familien. *ETM1* (114.02-149.8 cM) zeigte in der PL negative Kopplungssignale und in der NPL leicht über Null liegende Werte. Auch in der GWKS zeigte die *ETM2*-Region (38.87-47.97 cM) geringfügig positive Signale in der NPL, aber nicht in der PL. Die LOD-Werte von *ETM3* (22.73-29.93 cM) waren in beiden Analysemethoden negativ (Abbildung 3-3).

Für die *ETM2*-Region wurde die NPL außerdem mit den Markerinformationen aus der früheren Studie für die sechs betreffenden Familien wiederholt. Auch die zusätzlichen drei Mikrosatelliten aus der *ETM*-Studie ließen die LOD-Werte nicht in den signifikanten Bereich ansteigen (Tabelle 3-6). Der höchste LOD-Wert von D2S144 mit 0,83 in dieser Region sank mit der zusätzlichen Information auf 0,78.

**Tabelle 3-6: Kombination der *ETM2*-Marker mit den Markern der GWKS auf Chromosom 2.**

Die fett gedruckten Marker wurden im Rahmen der *ETM2*-Untersuchung (Abschnitt 3.1.1) typisiert. Dargestellt sind die Daten der nicht-parametrischen Mehrpunkt-Kopplungsanalyse.

Marker	genomweiter Scan		Feinkartierung	
	LOD NPL	p-Wert	LOD NPL	p-Wert
D2S1400	0,16	0,2	0,51	0,06
D2S1360	0,65	0,04	0,63	0,04
<b>D2S224</b>	/	/	0,63	0,04
<b>D2S2150</b>	/	/	0,60	0,05
D2S144	0,83	0,03	0,78	0,03
<b>D2S405</b>	/	/	0,75	0,03
D2S352	0,47	0,07	0,50	0,06
D2S2230	0,47	0,07	0,49	0,07
D2S2306	0,41	0,08	0,42	0,08

### 3.1.3.5 GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Loci in der GWKS

Die GWKS bestätigt auch die negativen Befunde der Kopplungsanalyse der GABA-Rezeptor- $\alpha$ -Untereinheiten in 20 ET-Familien. Die Regionen 0-5 cM auf Chr. 1, 63-67 cM auf Chr. 4, 162-180 cM auf Chr. 5, 92-100 cM auf Chr. 6 und 8-16 cM auf Chr. 15 zeigten in der NPL maximal positive LOD-Werte bis 0,02 und in der PL maximal -1,05 (Abbildung 3-3).

## 3.2 Assoziationsanalyse von Kandidatengen

Mittels Assoziationsanalyse wurden Kandidatengenstudien durchgeführt. Hierbei wurden die auf pathophysiologischen Überlegungen basierenden Kandidatengene der Kopplungsstudien (*DRD3* und *GABA<sub>A</sub>-R*-Untereinheiten) aufgegriffen. Zusätzlich wurde das kürzlich publizierte *LINGO1* Gen in einem Kandidatengenansatz auf Assoziation zum ET (und MP) überprüft.

### 3.2.1 *DRD3*

Als Replikationsversuch einer kürzlich publizierten Arbeit, in der die Ser9Gly-Variante (rs6280) des *Dopaminrezeptor D3 (DRD3)* Gens als prädisponierend für den ET beschrieben wird (Jeanneteau *et al.*, 2006), wurde auch in dieser Arbeit die vorhandene Studienstichprobe auf Assoziation zum *DRD3* Gen untersucht. In der Arbeit von Jeanneteau *et al.* (2006) wurde zudem gezeigt, dass die homozygoten Träger des selteneren Gly Allels einen stärkeren Phänotyp sowie einen früheren Krankheitsbeginn aufweisen.

Der SNP rs6280 wurde in einer Stichprobe aus 299 nicht verwandten ET Indexpatienten deutscher (n = 219), französischer (n = 52) und dänischer (n = 28) Herkunft und 528 nicht verwandten Kontrollen aus Deutschland (n = 311), Frankreich (n = 165) und Dänemark (n = 52) genotypisiert. Die 299 ET-Patienten setzten sich aus 202 Patienten mit positiver Familienanamnese (FA) und 97 ET-Patienten ohne Familienanamnese zusammen. Die anschließende Assoziationsanalyse erfolgte für diese zwei Untergruppen sowie für die gesamte Stichprobe. Die klinischen Daten wie das Alter der Probanden bei der Probensammlung, Alter zu Erkrankungsbeginn, Tremorschweregrad, Alkoholsensitivität und die Dauer der Erkrankung sind für die Untergruppen in Tabelle 7-3 und Tabelle 7-4 aufgeführt.

In der Assoziationsanalyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Allel- und Genotypfrequenzen aller ET-Patienten (n=299) und aller Kontrollen (n=528) detektiert werden (Tabelle 3-7). Auch die Subgruppenanalyse der ET-Patienten mit (n=202) oder ohne (n=97) positiver FA lieferte keine signifikante Assoziation zum ET. Die Analyse der deutschen Patienten mit positiver FA ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten und Kontrollen, da diese Gruppe (n=135) den größten Teil der gesamten Stichprobe

ausmachte und ansonsten auch ein Assoziationssignal in der gesamten Stichprobe mit positiver FA zu erwarten gewesen wäre. Hingegen konnte bei der Analyse der französischen Patienten mit positiver FA (n=49) eine signifikante Assoziation im allelischen sowie im genotypischen  $\chi^2$ -Test gefunden werden. Nach der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen (für sechs Tests, wegen der multiplen Vergleiche; Tabelle 3-7) blieb die Signifikanz jedoch nicht erhalten. Die Ergebnisse dieser Assoziationsstudie wurden zusammen mit den Ergebnissen der Kopplungsstudie des *DRD3* Gens publiziert (Lorenz *et al.*, 2008a).

**Tabelle 3-7: Vergleich der Allelfrequenzen von SNP rs6280 des *DRD3* Gens zwischen ET-Patienten und Kontrollen unter Beachtung der Herkunft und der Familienanamnese.**

Probanden stammen aus Deutschland (D), Dänemark (DK) und Frankreich (F); FA = Familienanamnese; Stichprobengröße: (1) n (D/DK/F) = 311/52/165, (2) n (D/DK/F) = 219/28/52, (3) n (D/DK/F) = 84/10/3, (4) n (D/DK/F) = 135/8/49;  $\nabla$  = statistischer Vergleich der nummerierten verschiedenen Fall-Kontroll-Gruppen; padj = p-Wert für multiples Testen korrigiert

Probanden	Allelfrequenzen		Statistischer Vergleich $\nabla$	PCCA	Padj	PCCG	Padj
	A	G					
(1) Kontrollen (D/DK/F)	0,68	0,32	-	-	-	-	-
(2) Fälle (D/DK/F)	0,67	0,33	(1)-(2)	0,45		0,68	
(3) Fälle ohne FA (D/DK/F)	0,71	0,29	(1)-(3)	0,54		0,68	
(4) Fälle mit FA (D/DK/F)	0,65	0,35	(1)-(4) (3)-(4)	0,17		0,24 0,16	
(5) Deutsche Kontrollen	0,68	0,32	-	-	-	-	-
(6) Deutsche Fälle mit FA	0,68	0,32	(5)-(6)	0,97		0,94	
(7) Französische Kontrollen	0,68	0,32	-	-	-	-	-
(8) Französische Fälle mit FA	0,57	0,43	(7)-(8)	0,046	0,39	0,0262	0,16

### 3.2.2 GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten

Für die Assoziationsanalyse der 15 autosomalen Gene der GABA<sub>A</sub>R-Untereinheiten wurde ein zweistufiges Design gewählt. Zweihundertvierzig htSNPs wurden in der ersten Stufe, der Hypothesengenerierung, in 184 Fällen und 426 Kontrollen genotypisiert, um evaluieren zu können welche der 15 Gene einen möglichen Effekt auf den Phänotyp des ET haben können. Die klinischen Daten der Studienpopulationen sind in der Tabelle 7-5 dargestellt. Eine Simulation der statistischen Teststärke zeigte, dass bei einer statistischen Teststärke von 80 % und der Größe der Studienpopulation in der Hypothesengenerierungsphase *odds ratios* (ORs) von  $\geq 1,8$  detektiert werden können (Abbildung 2-8). Die 240 htSNPs wurden nach der LD-basierten *haplotype-tagging*-Methode (Abschnitt 1.3.2) für die untersuchten Gene inklusive ihrer 3'- und

5'-Regionen ausgewählt. Die untersuchten Gene/Genregionen sowie die Anzahl der verwendeten htSNPs pro Gen sind der Tabelle 7-6 zu entnehmen. Nach logistischer Regression für das Geschlecht, aufgrund des unausgeglichene Geschlechtsverhältnisses in den Fällen (Tabelle 7-5), zeigten neun Marker nominal signifikante p-Werte (p-Werte von  $5,2 \times 10^{-4}$  bis  $4,9 \times 10^{-2}$ ) beim allelbasierten  $\chi^2$ -Test (Tabelle 3-8). Die neun Marker sind auf drei Chromosomen (Chromosom 4, 5 und 15) verteilt und in fünf unterschiedlichen Genen (*GABRB1*, *GABRG1*, *GABRP*, *GABRG3* und *GABRB3*) lokalisiert.

**Tabelle 3-8: Ergebnisse der neun nominal signifikanten SNPs der 1. Stufe der Assoziationsanalyse der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten.**

Getestet wurden 184 ET-Patienten und 426 Kontrollen. MAF = Allelfrequenz des seltenen Allels; pCCA = p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll  $\chi^2$  Tests nach Geschlechts-Adjustierung; OR = odds ratio; SNPs, die in der 2. Stufe genotypisiert wurden, sind fett hervorgehoben.

Chr.	Gene	dbSNP ID	MAF Kontrollen	MAF Fälle	PCCA	OR
4	<i>GABRG1</i>	<b>rs6833256</b>	0,46	0,54	0,02425	1,34
	<i>GABRB1</i>	<b>rs971353</b>	0,25	0,33	0,01402	1,42
5	<i>GABRP</i>	<b>rs1559159</b>	0,45	0,34	0,00052	0,63
	<i>GABRP</i>	<b>rs11745599</b>	0,29	0,36	0,00824	1,43
	<i>GABRP</i>	<b>rs7722089</b>	0,44	0,54	0,00112	1,55
15	<i>GABRB3</i>	rs4542636	0,41	0,35	0,03722	0,76
	<i>GABRG3</i>	rs11635966	0,38	0,45	0,02817	1,33
	<i>GABRG3</i>	rs6606877	0,10	0,06	0,03266	0,59
	<i>GABRG3</i>	rs4887564	0,38	0,31	0,04852	0,77

Zur Überprüfung des Befundes wurden die fünf SNPs (rs6833256, rs971353, rs1559159, rs11745599 und rs7722089) mit der höchsten Teststärke für eine Verifizierung in einer unabhängigen Stichprobe bestehend aus 319 Fällen und 392 Kontrollen genotypisiert. Dabei konnte für keinen dieser Marker eine Assoziation mit dem ET bestätigt werden (Tabelle 3-9). Die Ergebnisse der Assoziationsstudie zu den GABA<sub>A</sub>R-Untereinheiten wurden in dem Manuskript (Thier *et al.*, 2010, submitted) zusammengefasst.

**Tabelle 3-9: Assoziationsergebnisse der fünf nachverfolgten SNPs in der 2. Stufe.**

Verifizierung der SNPs in 319 Fälle und 392 Kontrollen; MAF = Allelfrequenz des seltenen Allels; pCCA = p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll  $\chi^2$  Tests; OR = odds ratio

dbSNP ID	1. Stufe (Hypothesengenerierung)				2. Stufe (Verifizierung)			
	MAF Kontrollen	MAF Fälle	PCCA	OR	MAF Kontrollen	MAF Fälle	PCCA	OR
rs6833256	0,46	0,54	0,02425	1,34	0,51	0,49	0,50	1,08
rs971353	0,25	0,33	0,01402	1,42	0,25	0,27	0,30	1,14
rs1559159	0,45	0,34	0,00052	0,63	0,37	0,36	0,77	0,97
rs11745599	0,29	0,36	0,00824	1,43	0,31	0,34	0,30	1,13
rs7722089	0,44	0,54	0,00112	1,55	0,49	0,48	0,69	0,96

### 3.2.3 LINGO1

In dieser Arbeit wurden 10 haplotypbasierte htSNPs in der *LINGO1* Region auf Chromosom 15q24.3 von 75,68 bis 75,77 MB (NCBI Build 36.1) einschließlich der zwei SNPs aus der initialen isländischen Studie (Stefansson *et al.*, 2009) ausgesucht. Die 10 htSNPs wurden in einer Stichprobe bestehend aus 284 Patienten mit definitivem ET und 334 Kontrollen genotypisiert. Die klinischen Daten der Stichprobe sind der Tabelle 7-7 zu entnehmen. Der allelische  $\chi^2$ -Test unter der Annahme eines multiplikativen Risikomodells ergab p-Werte von 0,0001 bis 0,8287 (Tabelle 3-10). Drei Marker zeigten eine nominale Signifikanz mit einem Anstieg der Allelfrequenz des seltenen Allels in den Fällen im Vergleich zu den Kontrollen. Darunter befanden sich die zwei Marker, die auch in der Studie von Stefansson *et al.* 2009 (Stefansson *et al.*, 2009) Assoziation mit dem ET mit  $p = 9,1 \times 10^{-4}$  (rs9652490) und  $p = 3,6 \times 10^{-2}$  (rs11856808) zeigten. Zusätzlich erreichte ein weiterer SNP im Intron 3 des *LINGO1* Gens eine nominale Signifikanz mit  $p = 1,0 \times 10^{-4}$  (rs8030859). Dieser stark assoziierte Marker sowie der SNP mit der stärksten Signifikanz der Studie von Stefansson *et al.* (2009) hielten der Bonferroni-Korrektur für zehn Tests stand (p-Wert-Grenze für zehn Tests bei  $p = 0,005$ ). Die ORs der Marker rs8030859, rs9652490 und rs11856808 waren 1,72 (Konfidenzintervall (C.I.): 1,31-2,26), 1,61 (C.I.: 1,21-2,14), und 1,30 (C.I.: 1,02-1,66).

**Tabelle 3-10: Assoziationsergebnisse der 10 *LINGO1* htSNPs.**

Verglichen wurden die Allelfrequenzen von 284 ET-Patienten und 334 Kontrollen deutscher Herkunft; MAF = Allelfrequenz des seltenen Allels;  $p_{CCA}$ , p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll  $\chi^2$  Tests;  $p_{adj}$  =  $p_{CCA}$  p-Wert nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ( $n = 10$ ); OR = *odds ratio*; C.I. = Konfidenzintervall für das OR

dbSNP ID	Position auf Chr. 15 (bp)	MAF Kontrollen	MAF Fälle	$p_{CCA}$	$p_{adj}$	OR	95% C.I.
rs907389	75684531	0,37	0,36	0,6912	1	0,95	0,76-1,20
rs9806139	75692079	0,28	0,26	0,4501	1	0,91	0,70-1,17
rs2271396	75694590	0,34	0,36	0,5055	1	1,08	0,86-1,37
rs8024724	75702196	0,08	0,10	0,2230	1	1,28	0,86-1,89
rs2292417	75730913	0,05	0,05	0,8287	1	0,94	0,56-1,59
rs8030859	75742571	0,18	0,27	0,0001	0,001	1,72	1,31-2,26
rs9652490	75750942	0,16	0,24	0,0009	0,009	1,61	1,21-2,14
rs11856808	75759825	0,28	0,33	0,0360	0,360	1,30	1,02-1,66
rs7178761	75761515	0,12	0,09	0,1525	1	0,77	0,53-1,11
rs4243047	75771535	0,33	0,34	0,8125	1	1,03	0,81-1,31

Zusätzlich wurde eine Subgruppenanalyse der deutschen Stichprobe vorgenommen, bei der die Allelfrequenzen von ET-Patienten mit einer positiven Familienanamnese (FA; 177 Fälle) und von ET-Patienten mit negativer FA (112 Fälle) gegen die Allelfrequenzen der 334 Kontrollen

verglichen wurden (Tabelle 3-11). Die Gruppe der Patienten mit positiver FA wies eine nominale Assoziation zu den drei oben beschriebenen Markern auf. Das höchste Assoziationssignal stammte von einem SNP, der auch in der isländischen Studie typisiert wurde (rs9652490;  $p = 1,8 \times 10^{-4}$ ), gefolgt von dem neu zum ET assoziierten SNP rs8030859 mit einem p-Wert von  $3,2 \times 10^{-3}$ . Hingegen war in der Gruppe mit negativer FA nur rs8030859 signifikant ( $p = 4,2 \times 10^{-4}$ ) mit dem ET assoziiert (Tabelle 3-11).

**Tabelle 3-11: Subgruppenanalyse von rs8030859, rs9652490 und rs11856808.**

Verglichen wurden 177 Fälle mit positiver Familienanamnese (positive FA) und 112 Fälle mit negativer Familienanamnese (negative FA) gegen 334 Kontrollen. Erklärung der Abkürzungen siehe Tabelle 3-10

dbSNP ID	Positive FA				Negative FA			
	MAF Kontrollen	MAF Fälle	p <sub>CCA</sub>	OR	MAF Kontrollen	MAF Fälle	p <sub>CCA</sub>	OR
rs8030859	0,18	0,25	0,00324	1,60	0,18	0,29	0,00042	1,89
rs9652490	0,16	0,26	0,00018	1,81	0,16	0,20	0,14930	1,33
rs11856808	0,28	0,34	0,03787	1,34	0,28	0,33	0,11620	1,30

### 3.2.3.1 Replikation in unabhängiger Stichprobe

Für die Replikation des Befundes wurden die drei nominal signifikanten htSNPs in einer unabhängigen Stichprobe französischer Herkunft, bestehend aus 48 Fällen und 240 Kontrollen, auf eine Assoziation mit dem ET untersucht. Eine nominale Signifikanz wurde bei den Markern rs9652490 ( $p = 4,7 \times 10^{-2}$ ) und rs11856808 ( $p = 3,5 \times 10^{-2}$ ) detektiert (Tabelle 3-12). Marker rs8030859 verfehlte mit einem p-Wert von  $5,3 \times 10^{-2}$  nur knapp die Signifikanzgrenze von  $p = 0,05$ . Die ORs der drei SNPs lagen mit 1,66 bis 1,70 im gleichen Bereich wie bei der deutschen Stichprobe.

**Tabelle 3-12: Ergebnisse der Replikation der drei LINGO1 SNPs.**

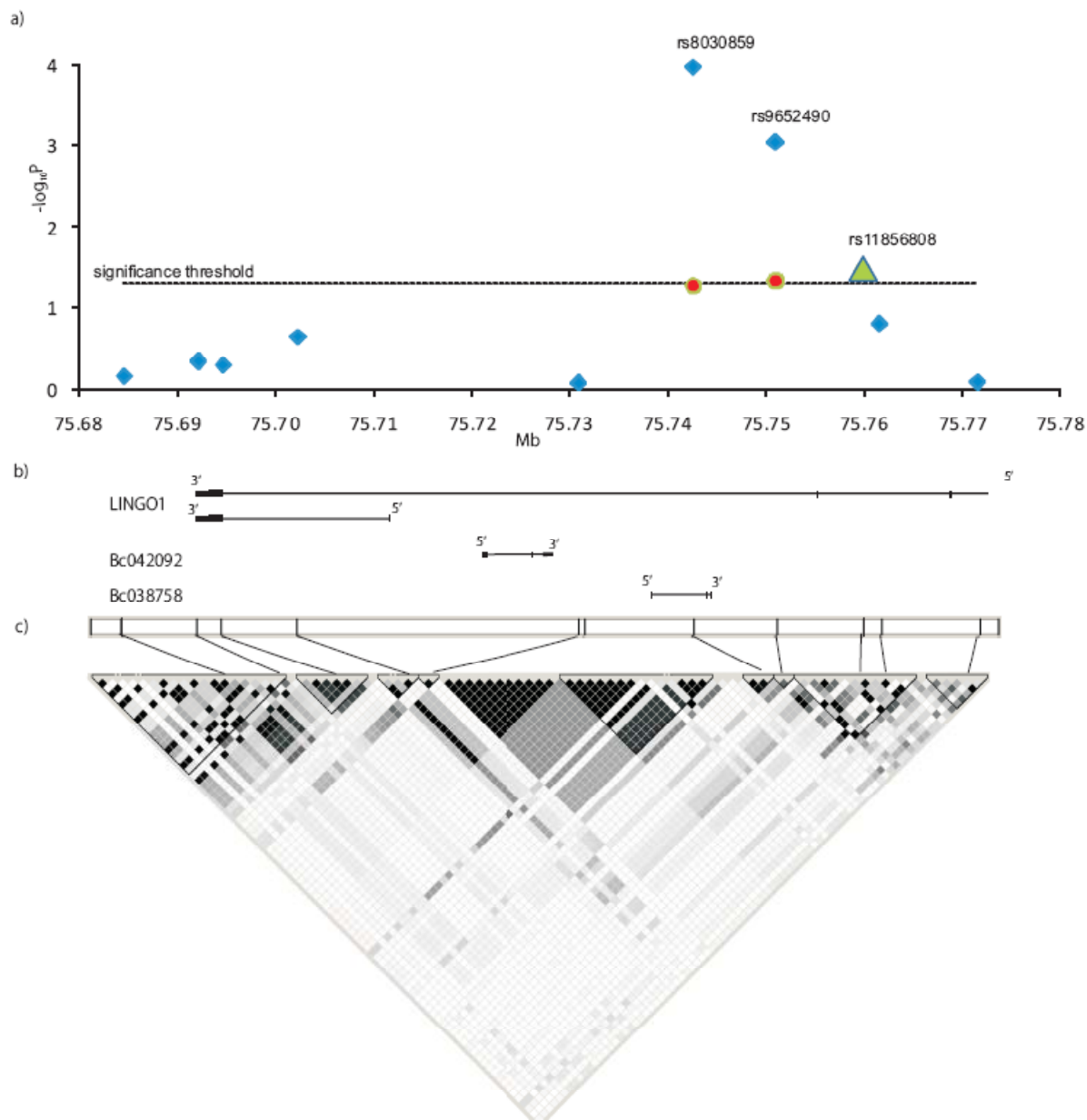
Genotypisierungsdaten von rs8030859, rs9652490 und rs11856808 in 48 ET-Patienten und 240 Kontrollen französischer Herkunft. MAF = Allelfrequenz des seltenen Allels; p<sub>CCA</sub>, p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll  $\chi^2$  Tests; OR = odds ratio

dbSNP ID	MAF Kontrollen	MAF Fälle	p <sub>CCA</sub>	OR
rs8030859	0,19	0,28	0,05277	1,67
rs9652490	0,17	0,26	0,04669	1,70
rs11856808	0,30	0,42	0,03460	1,66

Die Ergebnisse der Assoziationsanalysen in der deutschen und französischen Stichprobe sind in Abbildung 3-5 zusammengefasst und wurden erfolgreich unter Thier *et al.* (2010) publiziert (Thier *et al.*, 2010). Wie dem Teil b) der Abbildung zu entnehmen ist, sind in der untersuchten



Region eine lange und eine kurze Variante des *LINGO1* Gens sowie zwei zusätzliche in der Sequenz des humanen Genoms annotierte Transkripte (*BC042092* und *BC038758*) enthalten. Die mRNA Expression dieser Transkripte wurde aber bisher nicht experimentell bestätigt. Der SNP rs8030859 mit dem stärksten Assoziationssignal in der deutschen Stichprobe ist in einer LD-Region lokalisiert, die der LD-Region benachbart ist, in welcher auch die SNPs rs9652490 und rs11856808 liegen (Abbildung 3-5, c). Der Marker rs8030859 liegt in einem Sequenzabschnitt, der für die Transkript *BC038758* kodiert.



**Abbildung 3-5: Übersicht der untersuchten SNPs in der *LINGO1* Region (100 kb).**

a) Graphik der physikalischen Position in Mb (x-Achse) von allen 10 genotypisierten htSNPs gegen ihren allelischen p-Wert ( $-\log_{10} P$ ) auf der y-Achse. Quadrate symbolisieren die Ergebnisse in der deutschen Stichprobe, Kreise die Ergebnisse der französischen Stichprobe. HtSNP rs11856808 zeigte in beiden Stichproben einen ähnlichen p-Wert und ist deswegen als Dreieck dargestellt. b) schematische Darstellung der *LINGO1* Genstruktur und der beiden zusätzlichen in dieser Region annotierten Transkripte. c) LD-Blöcke der Region basierend auf den  $r^2$ -Werten (Generierung mit Hilfe des Haploview-Programms durch Nutzung der CEU HapMap Daten)

### 3.2.3.2 Assoziationsanalyse des *LINGO1* Gens in einer Morbus Parkinson-Studienpopulation

Da der ET und der MP zu den häufigsten Bewegungsstörungen zählen und in einigen Fällen eine klinische Überlappung aufweisen, wurden die drei in der deutschen ET-Stichprobe assoziierten SNPs (rs8030859, rs9652490 und rs11856808) in einer großen MP-Stichprobe auf Assoziation mit dem MP-Phänotyp untersucht. Die Studienpopulation ( $\Sigma = 1798$  Fälle und 1482 Kontrollen) setzte sich aus Proben aus Kiel (619 Fälle und 490 Kontrollen), Lübeck (511 Fälle und 225 Kontrollen) und Tübingen (668 Fälle und 767 Kontrollen) zusammen. Die klinischen Daten der Probanden sind in der Tabelle 7-8 aufgelistet. Alle Patienten wurden auf die häufigste monogene G2019S Mutation des MP im *LRRK2* Gen getestet. Die G2019S Mutation wurde in 0,64 % der Patienten des Kieler Kollektivs und in 0,94 % der Patienten des Lübecker Kollektivs gefunden. Diese Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen. Die statistische Teststärke der kombinierten Proben aus Kiel, Lübeck und Tübingen unter der Annahme eines allelischen (multiplikativen) genetischen Risikomodells betrug über 80 % für ORs > 1,3 und für Allelfrequenzen des seltenen Allels (MAF) zwischen 0,15 und 0,35.

Die Ergebnisse der allelischen sowie genotypischen Assoziationsanalyse der drei Stichproben ,separat und kombiniert, sind in Tabelle 3-13 zusammengefasst. Keiner der drei Marker zeigte eine nominal signifikante Assoziation ( $p < 0,05$ ) mit dem Phänotyp bei dem Vergleich der allelischen und genotypischen Frequenzen von Fällen und Kontrollen. Die allelischen p-Werte der Kieler Untersuchungsgruppe lagen knapp über der nominalen Signifikanzschwelle ( $p = 0,05$ ) mit Werten von  $p = 0,054$  für rs8030859 bis  $p = 0,087$  für rs9652490. Die allelischen p-Werte der Kollektive aus Lübeck und Tübingen hingegen zeigten keinen Trend in Richtung nominaler Signifikanz. Auch die Kombination aller Proben aus den drei Zentren ergab keine signifikanten allelischen p-Werte. Die genotypischen p-Werte lagen für die drei einzelnen Zentren und für die Kombination dieser Zentren zwischen 0,115 und 0,988.

**Tabelle 3-13: Ergebnisse der Assoziationsanalyse in einer deutschen Morbus Parkinson-Stichprobe.**

Allelische und genotypische Assoziationsanalysen in Proben aus Kiel (619 Fälle und 490 Kontrollen), aus Lübeck (511 Fälle und 225 Kontrollen), aus Tübingen (668 Fälle und 767 Kontrollen) und der Kombination aller Proben (1798 Fälle und 1482 Kontrollen). MAF = Allelfrequenz des seltenen Allels;  $p_{CCA}$ , p-Wert des allelbasierten Fall-Kontroll  $\chi^2$  Tests (ein Freiheitsgrad = 1 FG);  $p_{CCG}$ , p-Wert des genotypischen Fall-Kontroll  $\chi^2$  Tests (2 FG); OR = odds ratio; C.I. = Konfidenzintervall für das OR

dbSNP	MAF Fälle	MAF Kontrollen	$p_{CCA}$	$p_{CCG}$	OR (95 % C.I.)
<b>Kiel</b>					
rs8030859	0,26	0,22	0,054	0,115	1,22 (1,00-1,48)
rs9652490	0,24	0,21	0,087	0,178	1,19 (0,97-1,46)
rs11856808	0,34	0,31	0,061	0,165	1,19 (0,99-1,42)
<b>Lübeck</b>					
rs8030859	0,23	0,22	0,490	0,782	1,10 (0,84-1,45)
rs9652490	0,21	0,21	0,913	0,988	0,98 (0,75-1,3)
rs11856808	0,33	0,35	0,297	0,538	0,88 (0,7-1,12)
<b>Tübingen</b>					
rs8030859	0,20	0,23	0,143	0,349	0,87 (0,73-1,05)
rs9652490	0,19	0,20	0,446	0,601	0,93 (0,77-1,12)
rs11856808	0,34	0,32	0,502	0,652	1,06 (0,90-1,24)
<b>Alle drei Zentren</b>					
rs8030859	0,23	0,22	0,507	0,748	1,04 (0,93-1,17)
rs9652490	0,21	0,21	0,485	0,546	1,04 (0,93-1,18)
rs11856808	0,33	0,35	0,261	0,525	1,04 (0,93-1,17)

Zusätzlich wurde eine Subgruppenanalyse von Patienten mit positiver Familienanamnese (FA) und von Patienten mit einem Alter < 50 Jahre bei Krankheitsbeginn (age at onset, AAO) durchgeführt. Die Allelfrequenzen der drei SNPs der 303 Patienten der FA-Gruppe und der 428 Patienten der AAO-Gruppe aus den drei Zentren wurden mit den 1482 Kontrollen aus Kiel, Lübeck und Tübingen verglichen. In beiden Subgruppen konnte keine Assoziation der drei SNPs und MP gefunden werden (Tabelle 3-14).

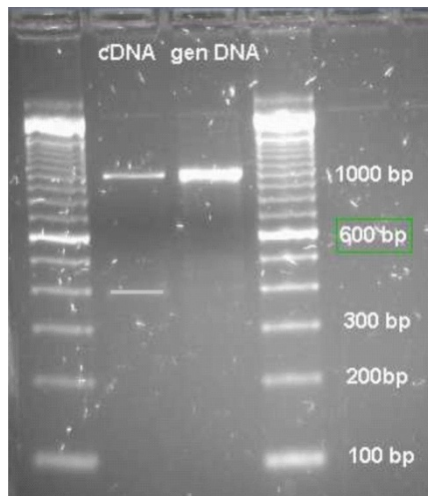
**Tabelle 3-14: Ergebnisse der Subgruppenanalyse in der Morbus Parkinson-Stichprobe.**

FA: 303 Fälle mit positiver Familienanamnese (303 Fälle und 1482 Kontrollen), AAO: 428 Fälle mit Alter bei Erkrankung < 50 Jahre (428 Fälle und 1482 Kontrollen). Weitere Erklärungen siehe Tabelle 3-13.

dbSNP	MAF Fälle	MAF Kontrollen	$p_{CCA}$	OR (95 % C.I.)
<b>FA</b>				
rs8030859	0,22	0,22	0,770	0,97 (0,78-1,20)
rs9652490	0,21	0,21	0,736	1,04 (0,84-1,29)
rs11856808	0,34	0,32	0,474	1,07 (0,89-1,29)
<b>AAO</b>				
rs8030859	0,24	0,22	0,325	1,10 (0,91-1,31)
rs9652490	0,21	0,21	0,776	1,03 (0,85-1,24)
rs11856808	0,34	0,32	0,440	1,07 (0,91-1,26)

### 3.3 Expressionsstudien des Transkripts *BC038758*

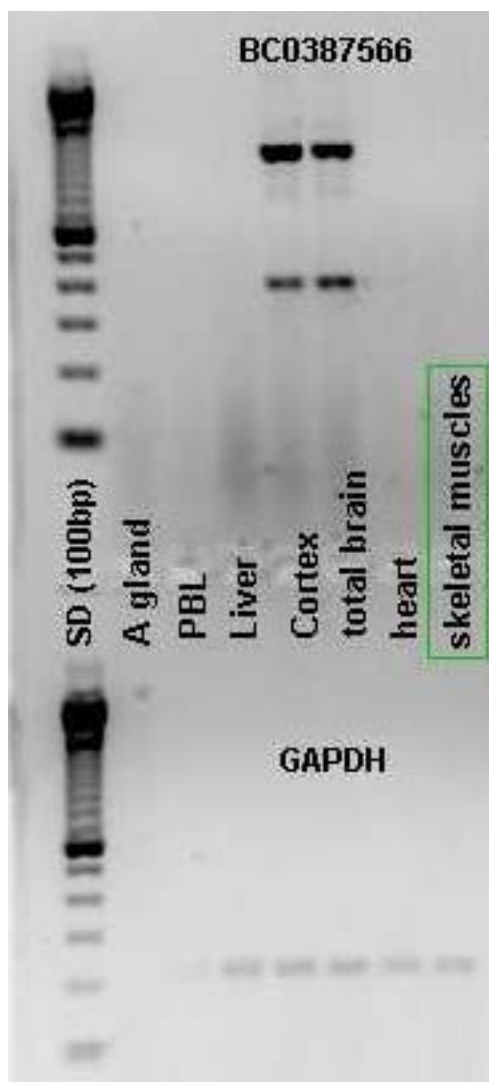
Für die Überprüfung der Expression des in der Sequenz des humanen Genoms annotierten Transkripts *BC038758* (korrespondierend mit einem humanen cDNA Klon aus „GenBank“); aus dessen Region das stärkste Signal der *LINGO1*-Assoziationsanalyse der deutschen ET-Stichprobe stammte; wurde ein Exon-übergreifendes Primerpaar konstruiert (Abschnitt 2.7). Die Überprüfung der Expression war notwendig da: 1) annotierte Transkripte, die nur auf einer cDNA Sequenz aus GenBank beruhen häufig Artefakte sind und 2) um die Gewebs-spezifische Expression im zentralen Nervensystem zu untersuchen. Die Primer wurden so konstruiert, dass sie bei einer Amplifikation von gDNA ein Produkt mit einer Länge von 974 bp und von cDNA ein Produkt mit einer Länge von 390 bp liefern (Abbildung 3-6).



**Abbildung 3-6: Expressionsnachweis von *BC038758* im Gehirn.**

In der ersten und vierten Geltasche wurde eine 100 bp Standardleiter aufgetragen. Die cDNA aus dem Gehirn (Quelle: Pathologie Münster) wurde in die zweite Tasche aufgetragen und zum Vergleich wurde die genomische DNA in die dritte Tasche aufgetragen.

Bei der Amplifikation von cDNA aus verschiedenen Geweben konnte die Expression von *BC038758* nur in Gehirngeweben (cDNA aus Cortex und cDNA aus gesamtem Gehirn) nachgewiesen werden (Abbildung 3-7). Hier konnten zwei starke Banden in der Größe von ca. 400 bp und 1000 bp detektiert werden. Zusätzlich war eine schwache Bande bei ca. 800 bp sichtbar. In den anderen untersuchten Geweben (Leber, Nebenniere, periphere Blutlymphozyten sowie Skelettmuskeln) war der Expressionsnachweis von *BC038758* negativ. Der Expressionsnachweis des *housekeeping*-Gens *GAPDH* als Qualitätskontrolle der cDNA-Proben erzielte mit der cDNA aus der Nebenniere keine Bande (zweite Tasche). Alle anderen cDNA-Proben zeigten eine Bande als Expressionsnachweis des *GAPDH* Gens.



**Abbildung 3-7: Expressionsnachweis in verschiedenen Gewebepanels.**

Im oberen Teil des Bildes ist das PCR-Produkt des Transkripts *BC038758* und im unteren Teil das PCR-Produkt des *GAPDH* Gens, welches als Qualitätskontrolle für die cDNA mit amplifiziert wurde, zu sehen. Die Expression wurde mit cDNA aus der Niere, peripheren Blutlymphozyten, der Leber, der Cortex, gesamtem Gehirn, Herz und Muskelgewebe untersucht. Die verschiedenen cDNAs stammten aus dem Gewebepanel der Firma Clontech. In der ersten Tasche wurde eine 100 bp Standardleiter aufgetragen.

### 3.4 Exon-Sequenzierung des Transkripts *BC038758*

Unter der Hypothese, dass die Assoziationssignale aus dem *LINGO1* Gen, in dem keine assoziierten funktionell relevanten SNPs bekannt sind, durch eine funktionelle, die Aminosäuresequenz verändernde genetische Variante im *BC038758* Transkript bedingt sein könnten, wurden die Exon-Bereiche dieser Variante sequenziert. Das Transkript *BC038758* wurde mit Hilfe der unter Abschnitt 2.8 beschriebenen Primerpaare für die drei mutmaßlichen Exone in 95 Patienten und 96 Kontrollen sequenziert. Die verwendeten Patienten sind Träger des Risikoallels (rs8030859), die Kontrollen hingegen nicht. Acht SNPs wurden in den untersuchten Proben gefunden (Tabelle 3-15). Drei dieser SNPs waren in den einschlägigen SNP-

Datenbanken nicht verzeichnet (BC038758\_1, \_2, \_3) und wurden somit erstmals identifiziert. Drei SNPs (BC038758\_1, rs73457840 und BC038758\_4) konnten nur in jeweils einer Kontrollperson detektiert werden. Die restlichen SNPs wurden lediglich in den Patienten detektiert, wobei SNP BC038758\_3 in einer Person, rs58727273 und BC038758\_2 in zwei Personen und die SNPs rs73457842 und rs73457843 in vier Personen aufzufinden waren. Die Allelfrequenz des mutierten Allels bei den Fällen betrug somit für die Marker rs73457842 und rs73457843 0,04. In den SNP-Datenbanken (HapMap, NCBI und UCSC) waren keine Angaben über die Allelfrequenzen dieser beiden SNPs zu finden.

**Tabelle 3-15: Ergebnis der Mutationsdetektion im Transkript BC038758.**

Neu identifizierte SNPs sind als BC038758\_Nr deklariert. Positionsangaben und Angabe zur Lage (Intron/Exon) gemäß UCSC (UCSC Genome Browser on Human Mar. 2006 (NCBI36/hg18 Assembly). Das häufigere Allel des SNPs ist in der Sequenz fett dargestellt. Angegeben ist auch die Genotypfrequenz (11/12/22; 11: homozygot für das häufigere Allel, 12: heterozygot, 22: homozygot für das mutierte Allel) der SNPs in 95 Fällen und 96 Kontrollen.

SNP	Position (bp)	Lage	Variante	Sequenz	n Genotypen 11/12/22
BC038758_1	75739438	3'UTR	C> G	CTCCA	190/1/0
rs58727273	75739489	Exon 1	C> T	TACTT	189/2/0
BC038758_2	75739602	Intron 1	C> T	GGCCC	189/2/0
rs73457840	75746616	Intron 2	C> T	GCCGG	190/1/0
rs73457842	75746956	Intron 2	A> C	TGAGT	187/4/0
BC038758_3	75747062	Intron 2	T> G	TCTGC	190/1/0
rs73457843	75747081	Exon 3	T> C	GCTGT	187/4/0
BC038758_4	75747124	Exon 3	T> C	AATGA	190/1/0

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe von Kopplungs- und Assoziationsstudien neue genetische Faktoren, die für den ET prädisponieren zu identifizieren und bekannte chromosomale Loci oder Kandidatengene in unserer Studienpopulation zu replizieren. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert. Anhand der Ergebnisse soll die Eignung der verwendeten Methoden (Kandidatengenansatz/genomweite Untersuchung) und der Analysen (Kopplungs-/Assoziationsanalyse) für die Kartierung von Krankheitsgenen des ET herausgearbeitet werden. Nach Diskussion der einzelnen Ergebnisse sowie möglicher Fehlerquellen, werden abschließend Schlussfolgerungen für genetischen Studien des ET gezogen und ein Ausblick auf die zukünftige genetische ET-Forschung gegeben. Die Fragen aus der Einleitung zu den Zielen der Arbeit werden dabei aufgegriffen und beantwortet.

### 4.1 Ergebnisse der Kopplungsanalyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 20 Familien mit deutscher, dänischer und französischer Herkunft untersucht. Die hypothesengetriebenen Studien, wie der Replikationsversuch der ETM-Regionen einschließlich des *DRD3* Gens und die Analyse der autosomalen Gene für GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten, sowie der hypothesenfreie Ansatz der genomweiten Kopplungsstudie spiegeln in ihren Ergebnissen die Heterogenität des ET wider, da die positiven Ergebnisse früherer Studien hier nicht repliziert werden konnten. Auch konnte die genomweite Kopplungsstudie nur hinweisende, aber keine signifikanten Kopplungssignale für die sechs untersuchten Familien detektieren.

#### 4.1.1 Ergebnisse mit Markern in den ETM-Regionen

In der Vergangenheit konnten drei chromosomale Kandidatenregionen (*ETM1*, *ETM2* und *ETM3*) mittels Kopplungsanalysen identifiziert werden, die auch als Teil dieser Arbeit in den vorhandenen 20 Familien auf Kopplung mit dem ET untersucht wurden.



***Können die mittels Kopplung identifizierte Kandidatenregionen (ETM1, ETM2 und ETM3) in einem Kollektiv bestehend aus 20 informativen Familien repliziert werden?***

Bei der Analyse der drei Regionen ergaben sich im Gesamtkollektiv weder bei der parametrischen noch bei der nicht-parametrischen Methode signifikante Hinweise auf eine Kopplung der Marker mit dem ET in den 20 Familien. In der Analyse der einzelnen Familien wurden hinweisende Signale auf den Chromosomen 3 und 19 gefunden, die jedoch weder die für eine signifikante Kopplung in der parametrischen Analyse einzelner Familien beweisende Schwelle von 3,3 überschritten, noch die in einer Simulation ermittelten maximal möglichen LOD-Werte erreichten.

***Besteht eine Kopplung der Ser9Gly Variante des DRD3 Gens mit dem ET in dem Familienkollektiv?***

Eine Kopplung der Ser9Gly Variante des *DRD3* Gens, welches im *ETM1*-Locus lokalisiert ist, konnte nicht bestätigt werden.

#### **4.1.1.1 *ETM1***

Für die Untersuchung der *ETM1*-Region wurden vier Mikrosatelliten in der Umgebung des Markers mit dem stärksten Kopplungssignal (D3S1267) aus der initialen *ETM1*-Publikation (Gulcher *et al.*, 1997), analysiert. Die in der vorliegenden Studie untersuchte Region beinhaltete die *ETM1*-Region und das darin lokalisierte *DRD3* Gen. Die LOD-Werte der gemeinsamen Analyse aller Familien lagen in der parametrischen Untersuchung bei den vier Markern zwischen -7,20 und -11,65. Somit ist gemäß der Definition von Terwilliger und Ott, die bei einem LOD-Score  $< -2.0$  eine Kopplung als ausgeschlossen ansieht (Terwilliger & Ott, 1994), eine Kopplung der Familien mit *ETM1* unter dem angewendeten genetischen Modell ausgeschlossen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit anderen Studien, die Kopplung mit Markern in der *ETM1* Region mit parametrischen LOD-Werten  $< -2$  in einer italienischen und in fünf amerikanischen Familien ausschließen konnten (Aridon *et al.*, 2008, Kovach *et al.*, 2001, Ma *et al.*, 2006). Hingegen zeigten Gulcher *et al.* (1997) in einem genomweiten Scan in 16 isländischen Familien unter demselben wie hier angewendeten Modell einen LOD-Wert von 3,71.

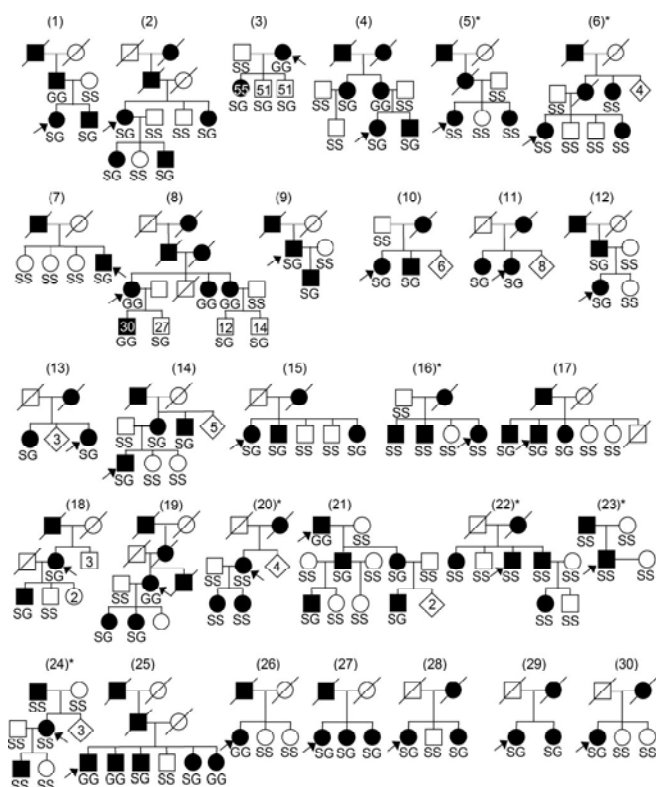
Die NPL resultierte in der letztgenannten Studie in einem Zmean von 4,70 (Gulcher *et al.*, 1997). In den hier getesteten 20 europäischen Familien konnte in der Region jedoch nur ein Zmean von 1,05 (LOD = 0,32) detektiert werden. Die niedrigen Werte der NPL lassen möglicherweise eine Kopplung vermuten, reichen aber nicht für eine Replikation des *ETMI*-Locus aus. Laut Lander *et al.* (Lander & Kruglyak, 1995) ist ein Kopplungsergebnis erst nach Erreichen von wahrscheinlicher Kopplung repliziert.

Das Scheitern der Replikation einer Kopplung von *ETMI* zum ET in der gemeinsamen Analyse der hier untersuchten Stichprobe kann durch die heterogene Stichprobe bezüglich der geographischen Herkunft (deutsche, französische und dänische Familien) und der daraus resultierenden Locus-Heterogenität verursacht worden sein. Die 16 isländischen Familien der initialen Studie zu *ETMI* eignen sich aufgrund der isländischen Geschichte (Abschnitt 4.3.3) und dem daraus resultierenden Gründer Effekt besonders gut für genetische Studien zur Kartierung von Krankheitsgenen. Der Gründereffekt beschreibt die geringe genotypische Vielfalt in einer isolierten Population, die aus Allelen einer geringen Anzahl von Ahnen hervorgegangen ist. Diese hohe genetische Homogenität von Familien aus Isolationspopulationen erhöht die statistische Teststärke bei der Identifizierung genetischer Risikofaktoren. So konnten Illarioshkin *et al.* (2000) in vier von fünf Familien eines Isolats aus Nord-Tadschikistan die Segregation eines Haplotyps, der den *ETMI*-Locus einschließt, nachweisen (Illarioshkin *et al.*, 2000). Auch in der Analyse der einzelnen Familien konnte aufgrund der fehlenden Co-Segregation eines Haplotyps mit dem Phänotyp in den einzelnen Familien eine Kopplung zum *ETMI*-Locus ausgeschlossen werden. Dies spricht dagegen, dass ein großer Anteil zentraleuropäischer ET-Familien Kopplung mit dem *ETMI*-Locus zeigt.

#### **4.1.1.2 *DRD3***

In der *ETMI*-Region ist auch das Gen für den Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor (*DRD3*) lokalisiert. Lucotte *et al.* (2006) zeigte, dass die Ser9Gly Variante des *DRD3* Gens mit dem ET-Phänotyp in einer amerikanischen Familie gekoppelt ist (Lucotte *et al.*, 2006). Wegen der möglichen pathologischen Verbindung des Dopamin Rezeptors D<sub>3</sub> zum ET, wurde diese Variante auch in unserer Studienpopulation auf Kopplung und Assoziation untersucht.

Die Segregationsanalyse der Ser9Gly-Variante des *DRD3* Gens wurde mit 22 Familien (16 französische, vier deutsche und zwei dänische) durchgeführt. Der mittels parametrischer Zwei-Punkt-Analyse erhaltene LOD-Wert von -7,16 für alle Familien, konnte eine Kopplung aller Familien mit diesem Polymorphismus ausschließen. Die LOD-Werte der einzelnen Familien lagen in einem Bereich zwischen 0,67 und -1,85. Die Berechnungen wurden mit einem autosomal dominanten Modell mit einer Mutations- und einer Phänokopierate von 0,01 sowie einer Penetranz von 90 % durchgeführt. Dieses Modell erzielte die höchsten LOD-Werte in der zitierten Arbeit (Lucotte *et al.*, 2006). Doch konnte weder die Analyse aller Familien zusammen noch die separate Analyse der Familien das G Allel der Ser9Gly-Variante des *DRD3* Gens als Risikofaktor für den ET in allen hier verwendeten Familien bestätigen (Abschnitt 3.1.1.2). In der Studie von Lucotte *et al.* (Lucotte *et al.*, 2006) konnte die Segregation des G Allels in 23 von 30 französischen Familien beobachtet und ein parametrischer LOD-Wert von 7,99 unter der Verwendung des oben beschriebenen Modells ermittelt werden.



**Abbildung 4-1:** Familien von Lucotte *et al.* und Jeanneteau *et al.* für Kopplungsnachweis zum *DRD3* Gen. In den mit einem Stern markierten Familien segregiert nicht die Gly-9-Variante (G), sondern nur die Ser-9-Variante (S). Keine Angaben über den IBD-Status sind bei den Familien 7, 11, 13, 15, 17, 25, 26, 27, 28, 29 und 30 möglich (eingeschränkter Informationsgehalt). Bild aus (Jeanneteau *et al.*, 2006, Lucotte *et al.*, 2006)

Bei den untersuchten Familien handelte es sich jedoch überwiegend um Familien, in denen nur Geschwister einer Generation untersucht werden konnten (Abbildung 4-1). Dadurch ist der Informationsgehalt der Familien stark eingeschränkt, da keine Angaben über den IBD-Status gemacht werden können und in manchen Familien das G Allel bei allen Mitgliedern homozygot auftritt. So kann das gehäufte Auftreten des G Allels auch durch die hohe Allelfrequenz von 0,35 dieses Allels in den Kaukasiern (CEU Daten von HapMap; [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) erklärt werden. Damit ist nicht auszuschließen, dass das erhaltene Kopplungssignal in der Studie von Lucotte *et al.* einen Studienbias darstellt. Da in der vorliegenden Studie ebenfalls 16 französische Familien eingeschlossen wurden, die einzeln und als Gruppe betrachtet ebenfalls keine positiven Kopplungssignale zeigten, können die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien nicht durch Unterschiede im genetischen Hintergrund bedingt sein. Die Kopplung von *DRD3* konnte bisher noch nicht von anderen Gruppen repliziert werden (Blair *et al.*, 2008). In drei amerikanischen Familien wurden lediglich parametrische LOD-Werte von maximal 0,78 berechnet. Auch ist nicht bekannt, ob das Gly Allel der Ser9Gly-Variante in den 16 isländischen Familien der initialen *ETMI*-Studie segregiert (Gulcher *et al.*, 1997).

Somit scheint fraglich ob eine Kopplung zwischen dem *DRD3* Gen und dem ET besteht. Interessanterweise spielt das *DRD3* Gen wahrscheinlich eine Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson (MP). In Rattenmodellen für MP vermittelten *DRD3*-Agonisten eine Verlangsamung der Krankheitsprogression (Van Kampen & Eckman, 2006). Die Expression von *DRD3* konnte in den Basalganglien und im Zerebellum nachgewiesen werden (Diaz *et al.*, 1995, Hall *et al.*, 1996). Da vermutet wird, dass das Zerebellum im Zusammenhang mit der Pathogenese des ET steht (Louis *et al.*, 2002), schien die Rolle von *DRD3* als ET-Kandidatengen plausibel. Die kontroversen Ergebnisse zu *DRD3* als Risikogen, können auch, nicht aber alleine durch die Locus-Heterogenität des ET verursacht sein, da in der Analyse der einzelnen Familien ebenfalls keine Segregation des Risikoallels gefunden wurde. Für weitere Studien zu Varianten des *DRD3* Gens als Suszeptibilitätsfaktor für den ET eignen sich nur Assoziationsanalysen mit sehr großen Studienstichproben, da bei dem sporadischen komplexen ET von vielen verschiedenen Varianten mit geringen Effekten ausgegangen wird.

### 4.1.1.3 *ETM2*

Die *ETM2*-Region wurde ursprünglich in einer Untersuchung von Higgins *et al.* (1998) identifiziert (Higgins *et al.*, 1998). Sie wurde von uns in den bereits beschriebenen 20 Familien auf Kopplung zum ET getestet. Mit parametrischen LOD-Werten von  $< -2$  in der Analyse des gesamten Kollektivs konnte eine Kopplung der hier verwendeten Marker zu der *ETM2*-Region ausgeschlossen werden. Somit konnte mit der parametrischen Mehrpunkt-Analyse die von Higgins *et al.* (1998) entdeckte Kopplung (LOD = 5,92) des ET zu *ETM2*, trotz Verwendung desselben genetischen Modells für die Analyse, nicht repliziert werden. Mit den hier erhaltenen negativen LOD-Werten konnten die negativen Befunde anderer Gruppen bestätigt werden, die auch an einer Replikation der ETM-Regionen mittels parametrischer Kopplungsanalysen scheiterten (Aridon *et al.*, 2008, Kovach *et al.*, 2001, Ma *et al.*, 2006, Illarioshkin *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu der PL, konnte die NPL positive Kopplungssignale erzielen. Der Marker D2S144 erreichte die höchsten Werte in der Analyse des gesamten Kollektivs mit LOD = 1,46 (p-Wert = 0,005). Somit kann der hier erhaltene Befund als Replikation der Kopplung von *ETM2* zu ET (Higgins *et al.*, 1998) angesehen werden, da laut Definition eine Kopplung mit p-Werten  $< 0,01$  als repliziert gilt. In dieser p-Wertschranke ist eine Korrektur für multiples Testen enthalten (Lander & Kruglyak, 1995). Der Ausschluss von Kopplung mit der PL und die Bestätigung von Kopplung mit der NPL lassen auf die Verwendung eines unzureichenden genetischen Modells bei der PL für das in dieser Studie verwendete Familienkollektiv schließen (Abschnitt 4.1.3.1). Ist das der PL zugrunde liegende genetische Modell korrekt, so sind die statistische Teststärke und damit der resultierende LOD-Wert höher als in der NPL. Die Nutzung derselben Modellannahmen wie bei Higgins *et al.* (1998) deutet auf andere Risikoallelfrequenzen und Penetranzen in unserem Kollektiv hin.

Hiermit konnten wir eine Kopplung des *ETM2*-Locus mit dem ET bestätigen, welche Higgins *et al.* in verschiedenen Studien in insgesamt fünf von 21 untersuchten Familien identifizierte (Higgins *et al.*, 2005, Higgins *et al.*, 2004a, Higgins *et al.*, 1998, Higgins *et al.*, 1997). Jedoch konnten Ma *et al.* (2006) in vier amerikanische Familien mit scheinbar autosomal-dominanten Erbgang keine Kopplung des ET-Phänotyps mit *ETM2* nachweisen (Ma *et al.*, 2006). Gründe hierfür könnten an den unterschiedlichen Diagnosekriterien (nach den Kriterien von dem *National Institute of Health*, NIH) des ET im Vergleich zu den Patienten von Higgins *et al.*

(1998), welche die TRIG-Kriterien benutzten, liegen. Auch die Verwendung von Familien, in denen auch Dystonie und Morbus Parkinson auftreten, könnten zu dem Negativbefund geführt haben. Beim Auftreten von zusätzlichen neurologischen Erkrankungen, ist eine eindeutige Abgrenzung des ET-Phänotyps zum Teil schwierig aufgrund überlappender Symptome. Hinzu kommt die erschwerte Detektion von Kopplung des ET mit dem Risikohaplotyp, durch eventuell falsch positiv oder falsch negativ diagnostizierte Personen, die zu falschen Ergebnissen in den Kopplungsanalysen führen können. Auch in der Negativ-Studie von Aridon *et al.* (2008) wurde die Diagnose nach den Kriterien der NIH vorgenommen, wodurch es zu einer unterschiedlichen Klassifizierung von ET-Patienten im Vergleich zu den Studien von Higgins *et al.* (1998) gekommen sein könnte (Aridon *et al.*, 2008). Zudem wurde in einigen Studien, die keine Kopplung von *ETM2* mit dem ET finden konnten, mit anderen genetischen Modellen bei der PL gerechnet (Aridon *et al.*, 2008, Kovach *et al.*, 2001). Die Verwendung von unterschiedlichen Modellen ist zum Teil durch die Annahme von Locus-Heterogenität sinnvoll, da unterschiedliche Risikogene unterschiedliche Vererbungsmodi aufweisen können. Jedoch sollte bei Replikationsversuchen keine große Abweichung vom genetischen Modell der initialen Studie vorhanden sein.

#### 4.1.1.4 Feinkartierung der *ETM2*-Region

In Hinblick auf die 20 hier verwendeten Familien und einen theoretisch maximal zu erwartenden LOD-Wert von 29,80, erscheint das Kopplungssignal (LOD = 1,46) recht schwach. Bei einer Analyse der einzelnen Familien wiesen 10 der 20 untersuchten Familien in der *ETM2* Region niedrige aber positive LOD-Werte und damit eine mögliche Kopplung auf. Eine gemeinsame Betrachtung nur der Familien mit positiven Kopplungssignalen in dieser Region würde zu einer statistischen Verzerrung aufgrund eventuell zufällig gleich verteilter Allele führen und somit könnte ein falsch-positives Ergebnis aus diesem Studienbias resultieren. Die separate Analyse von Familien eines Kollektivs ist hingegen, sofern diese Familien groß genug sind, um einen ausreichenden LOD-Wert zu erzielen, eine bewährte Methode bei der Krankheitskartierung von monogenen Krankheiten mit hoher Locus-Heterogenität. Das stärkste Kopplungssignal stammte von einer drei Generationen Familie (Familie TEX), mit sechs ET-Patienten und insgesamt 15 Personen. Bei einer Haplotypanalyse in den Stammbäumen der anderen neun Familien konnte der Risikohaplotyp bei einigen vom ET betroffenen Individuen im *ETM2*-Bereich nicht gefunden

werden. Der fehlende Risikohaplotyp bei einigen ET-Patienten könnte durch das Auftreten von Phänokopien bedingt sein. Alternativ liegt der Krankheitslocus für den ET bei diesen Familien in einer anderen Region des Genoms. Jedoch wirkt sich die Berücksichtigung von Phänokopien im genetischen Modell der PL negativ auf die statistische Teststärke aus, wodurch die Teststärke zur Detektion von Kopplung bei kleineren Familien nicht mehr ausreichend sein kann. Andere Familien (GUY und TRI-853; Abbildung 7-1), bei denen eine Segregation eines Haplotyps mit dem Phänotyp beobachtet werden konnte, waren zu klein, so dass bei einer Einzelanalyse keine aussagekräftigen Werte erreicht werden konnten. Somit wurde bei der näheren Betrachtung von *ETM2* nur die Familie TEX berücksichtigt. Alle vier untersuchten Marker konnten eine Kopplung von *ETM2* zum ET in dieser Familie bestätigen. Die vier Marker erreichten mit LOD-Werten von 2,30-2,34 und mit p-Werten von  $6 \times 10^{-4}$ - $5 \times 10^{-4}$  die Signifikanzschwelle (Tabelle 2-6) für wahrscheinliche Kopplung (Lander & Kruglyak, 1995). Der Zmean ( $Z_{\text{mean}} = 4,08$ ;  $p = 2 \times 10^{-5}$ ) für die Marker D2S2150 und D2S144 zeigte sogar signifikante Kopplung mit dem ET auf. Der Zmean ist für ein inkomplettes Datenset (nicht typisierte Individuen, niedrige Hererozygotie der Marker und weite Abstände der Marker) sensitiver als der konservative NPL LOD-Wert. In der Feinkartierung wurden jeweils zwei weitere Marker stromaufwärts und stromabwärts der untersuchten *ETM2*-Region genotypisiert. Die anschließende Analyse konnte keine weitere Erhöhung der LOD-Werte in dieser Region verzeichnen. Jedoch stieg durch die Information der zusätzlichen Marker der Zmean für die Marker D2S2150 ( $Z = 4,17$ ), D2S144 ( $Z = 4,24$ ) und D2S405 ( $Z = 4,23$ ). Dies kommt dadurch zustande, dass bei Mehr-Punkt-Analysen die Information der Nachbarmarker mit einfließt. Jedoch konnte der maximal mögliche Zmean von 5,74 dieser Familie nicht erreicht werden. Alle vom ET betroffenen Mitglieder dieser Familie sind Träger des Risikohaplotyps. Dieser Haplotyp ist auch bei einer vom ET nicht betroffenen Person zu finden (Person 32 in Abbildung 3-1). Dieser zum Zeitpunkt der Untersuchung 53 Jahre alte Proband zeigte keine klinischen Zeichen eines ET. Aufgrund des Alters des Patienten kann man aber nicht mit Sicherheit ausschließen, dass er noch den ET Phänotyp entwickeln wird, da das Erkrankungsrisiko mit dem Lebensalter proportional zunimmt. Falls der Proband auch in Zukunft nicht erkrankt, könnte es sich um einen Fall von verminderter Penetranz handeln. Da bei der NPL nur die erkrankten Familienmitglieder in die Berechnung eingehen, könnte das Verfehlen der maximal möglichen Werte an einem zu geringen Informationsgehalt der verwendeten Marker liegen. Ist die Informativität eines Markers gering,

kann man in der NPL oft nicht zwischen IBD und IBS unterscheiden. Hierdurch ist es häufig nicht möglich eindeutig zu bestimmen ob das mit dem Phänotyp segregierende Markerallel vom betroffenen oder vom nicht betroffenen Elternteil stammt, was einen verminderten LOD-Wert zur Folge hat. Hoch polymorphe Marker mit einer Heterozygotie  $> 0,7$  eignen sich daher am besten für Kopplungsstudien. Durch fehlende Rekombinationsereignisse bei Patienten konnten die vier zusätzlichen Marker der Feinkartierung die Region nicht eingrenzen. Die positive Kopplung erstreckt sich damit über einen Bereich in dem 137 Gene liegen, darunter auch das *HS1-binding protein 3* Gen (*HS1-BP3*; OMIM: 609359). Dieses Gen gilt als Kandidatengen, seit dem die Segregation der 828C→G Variante in Exon 7 mit dem Phänotyp des ET in zwei Familien nachgewiesen werden konnte (Higgins *et al.*, 2005). In dieser Studie wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung das Risikoallel (G) der 828C→G Variante in allen ET-Patienten aber nicht bei den Personen ohne ET-Phänotyp der einen Familie und auch nicht bei zwei ET-Patienten der anderen untersuchten Familie detektiert. Die letztgenannte Familie wies aber 11 vom ET betroffene Personen auf. Über die Genotypen dieser fehlenden Patienten und die der restlichen Familienmitglieder werden aber keine Angaben gemacht, was den Wert der Untersuchung stark einschränkt. Einhundertfünfzig nicht vom ET betroffene Kontrollpersonen waren für das Wildtyp-Allel (C) homozygot. Das HS1-BP3 Protein bindet an Proteine, die stark in motorischen Neuronen und Purkinje Zellen exprimiert werden. Das könnte auf einen pathophysiologischen Zusammenhang mit dem ET hindeuten. Über die funktionelle Auswirkung der *missense* Mutation, welche eine Aminosäure-Substitution verursacht (im Protein wird an Position 265 ein Glycin anstelle eines Alanins eingebaut), ist noch nichts bekannt. Higgins *et al.* konnten in verschiedenen Studien den *ETM2*-Locus und das *HS1-BP3* Gen als Suszeptibilitätsfaktoren für den ET bestätigen (Higgins *et al.*, 2003, Higgins *et al.*, 2006, Higgins *et al.*, 2005, Higgins *et al.*, 2004a, Higgins *et al.*, 2004b, Higgins *et al.*, 1998, Higgins *et al.*, 1997). Eine weitere Studie untermauerte den Befund, dass es sich bei der 828C→G Variante um ein Risikoallel handelt, da 12 von 73 amerikanischen ET-Patienten heterozygot für das Risikoallel waren, 304 nicht betroffene Kontrollen aber homozygot für das Wildtyp-Allel (Higgins *et al.*, 2006). Andere Studien kamen allerdings zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich *HS1BP3* (Deng *et al.*, 2005, Higgins *et al.*, 2005, Shatunov *et al.*, 2005). So konnten zum Beispiel Higgins *et al.* das Risikoallel bei 73 ET-Patienten aus Singapur nicht nachweisen. Dies könnte durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der asiatischen Population



begründet sein. Auch segregierte das Risikoallel in zwei Studien von Shatunov *et al.* (2005) und Deng *et al.* (2005) in jeweils einer untersuchten amerikanischen Familie nicht mit dem ET Phänotyp. Zusätzlich konnte keine Assoziation der 828C→G Variante des *HS1-BP3* Gens mit dem ET in einer Stichprobe von 222 familiären ET Patienten und 132 Kontrollen amerikanischer Herkunft gefunden werden (Deng *et al.*, 2005). Da es sich bei dieser Variante um eine seltene Variante handelt, ist der Nachweis einer Assoziation zwischen Risikoallel und Krankheit aufgrund der zu geringen Teststärke in einer Assoziationsstudie bei sporadischen ET-Patienten schwierig. Um präzise Aussagen zu der Rolle von *HS1BP3* als Suszeptibilitätsgen in unseren Familien, speziell in der Familie TEX machen zu können, müssten weitere Analysen folgen, wie z.B. die Sequenzierung der Exons in allen Familienmitgliedern.

#### **4.1.1.5 *ETM3***

Auch für den dritten ETM-Locus konnte in der gemeinsamen Analyse aller Familien durch negative LOD-Werte ( $< -2$ ) in der PL eine Kopplung mit dem ET ausgeschlossen werden. Die NPL lieferte für *ETM3* niedrige LOD-Werte (LOD-Werte von 0 bis 0,06), wodurch eine Kopplung zwar nicht ausgeschlossen werden kann, jedoch als unwahrscheinlich anzusehen ist. Somit konnte der Befund von Shatunov (Shatunov *et al.*, 2006) nicht repliziert werden. In dieser einzigen Studie mit positiven Befund hinsichtlich einer Kopplung des ET zu *ETM3*, zeigten zwei von sieben nordamerikanischen Familien in einer GWKS Kopplungssignale auf Chromosom 6. Eine der Familien erreichte mit einem NPL LOD-Wert von 3,28 eine wahrscheinliche Kopplung zu *ETM3*. Die andere Familie zeigte für den gleichen Marker ebenfalls einen positiven NPL LOD-Wert von 2,13 und konnte somit nur vermutliche Kopplung zum Locus aufweisen. Nach Definition kann die Kopplung eines Locus erst als gesichert angesehen werden, wenn signifikante Kopplung detektiert und in mindestens einer zweiten Familie bzw. Stichprobe mit wahrscheinlicher oder signifikanter Kopplung repliziert worden ist (Lander & Kruglyak, 1995). In der von Shatunov *et al.* beschriebenen Familie mit einem LOD-Wert von 3,28 treten allerdings noch andere Erkrankungen auf. Von den 14 vom ET betroffenen Familienmitgliedern, sind sechs zusätzlich von Dystonie betroffen. Auch ist eine maligne Hyperthermie in dieser Familie präsent. Laut der TRIG-Kriterien darf aber bei ET-Patienten (mit definitiven oder wahrscheinlichen ET) keine zusätzliche neurologische Erkrankung vorkommen. Daher bleibt *ETM3* bis heute ohne Replikation (Aridon *et al.*, 2008).

## 4.1.2 Untereinheiten der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren

In der hier durchgeführten Kandidatengenstudie wurden die 15 autosomal kodierten Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten auf Kopplung mit dem ET in dem beschriebenen Familienkollektiv untersucht.

### *Weisen die Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten Kopplung mit dem ET-Phänotyp auf?*

Die 23 genotypisierten Mikrosatelliten gaben in der gemeinsamen Analyse aller Familien keine Hinweise auf Kopplung mit LOD-Werten in der NPL von  $< 0,12$  und konnten in der parametrische Mehrpunkt-Analyse mit LOD-Werten von  $< -2$  eine Kopplung zum ET eindeutig ausschließen. Die Haplotypanalyse in den Stammbäumen der Familien konnte die Befunde der PL und NPL bestätigen.

Bisher gibt es noch keine andere Kopplungsstudie des ET bezüglich der GABA<sub>A</sub>-R als Kandidatengene für den ET. Jedoch wurde in keiner der publizierten genomweiten Kopplungsstudien eine Kopplung zu einer der chromosomalen Regionen der GABA<sub>A</sub>-R beschrieben (Gulcher *et al.*, 1997, Shatunov *et al.*, 2006). Trotz der pathophysiologischen Bedeutung des GABAergen Systems ist bis heute lediglich eine Assoziationsstudie zum *GABRA1* Gen und ET publiziert (Deng *et al.*, 2006).

Obwohl in den hier untersuchten 20 Familien keine Kopplung der chromosomalen Regionen der GABA<sub>A</sub>-R zum ET gefunden werden konnte, müssen die GABA<sub>A</sub>-R als Suszeptibilitätsgene für den ET nicht ausgeschlossen sein. Die unter Abschnitt 1.1.3.3 beschriebenen pathophysiologischen Aspekte sprechen stark für eine Beteiligung der GABA<sub>A</sub>-R bei der Entwicklung des ET-Phänotyps. Mögliche Risikovarianten der GABA<sub>A</sub>-R könnten z.B. bei der sporadischen aber nicht bei der monogenen Form des ET eine Rolle spielen. Darüber hinaus haben Kopplungsuntersuchungen für schwache genetische Risikofaktoren, wie sie typisch für genetisch komplexe Krankheiten sind, eine geringe statistische Teststärke und können diese daher nicht identifizieren. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der GABA<sub>A</sub>-R als Suszeptibilitätsgene für den ET eignen sich Assoziationsanalysen. Deshalb wurden für eine weitergehende Untersuchung die GABA<sub>A</sub>-R in einer Assoziationsstudie untersucht (siehe Abschnitt 3.2.2).

In mehreren Studien wurde vermutet, dass die Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten auf Chromosom 5 und 15 einer epigenetischen Regulation (Imprinting) unterliegen (Kim *et al.*, 2008, Pun *et al.*, 2010). Bei Genen, die dem Imprinting unterliegen, ist die Genaktivität abhängig von der elterlichen Herkunft des vererbten Allels, meist durch differentielle DNA Methylierung an oder ausgeschaltet. Bei der Betrachtung der Stammbäume, der hier verwendeten Familie, konnte keine maternale oder paternale Vererbung des Risikos am ET zu erkranken beobachtet werden, was ein Imprinting unwahrscheinlich macht. Allerdings besteht ein schwaches Restrisiko, dass fehlendes Imprinting durch Phänokopien vorgetäuscht wird. In sich an diese Arbeit anschließenden Studien, sollten die Familien auf Kopplung, mit Hilfe eines parametrischen Modells, welches Imprinting berücksichtigt, untersucht werden (Strauch *et al.*, 2000).

### **4.1.3 Genomweite Kopplungsstudie**

Die genomweite Kopplungsstudie (GWKS) wurde in den sechs größten und informativsten Familien durchgeführt.

***Kann eine genomweite Kopplungsstudie (GWKS) in den sechs größten Familien bekannte Loci bestätigen oder eine neue Kandidatenregion identifizieren?***

Die GWKS konnte keine signifikante Kopplung in der PL oder NPL erreichen und somit auch keine neuen Kopplungsregionen identifizieren. Auch konnten die bekannten ET-Loci nicht bestätigt werden.

#### **4.1.3.1 Gemeinsame Analyse aller Familien**

Es konnte weder eine signifikante noch eine wahrscheinliche Kopplung von einem der Marker zum ET-Phänotyp mittels nicht-parametrischer oder parametrischer Mehr-Punkt-Analyse detektiert werden. Die NPL aller Familien zusammen ergab einen maximalen LOD-Wert von 1,33. Dieser Wert entspricht lediglich einer möglichen Kopplung und ist im Vergleich zu einem theoretisch zu erreichenden LOD-Wert von 8,99 um mehr als das Sechsfache kleiner. Die Kopplungspeaks der PL sind, mit Ausnahme des Kopplungssignals von Chromosom 2, an anderen Positionen als die der NPL zu finden. Die höchsten parametrischen Kopplungssignale

der Mehr-Punkt-Analyse erreichten LOD-Werte bis maximal 1,72. Aber auch die LOD-Werte der PL blieben deutlich unter dem berechneten maximal möglichen LOD-Wert von 6,39 und zeigten nur mögliche Kopplung. Die unterschiedlichen Regionen der Kopplungssignale der NPL und der PL sind durch die zwei verschiedenen Analysemethoden hervorgerufen (Abschnitt 2.9.1.2 und 2.9.1.3). Die NPL bedient sich der IBD-Methode, bei der die Übereinstimmung der Allele nach der Herkunft in den betroffenen Familienmitgliedern betrachtet wird. Als genetisches Ähnlichkeitsmaß wird der IBD-Status zwischen verwandten Personen verwendet. Bei der PL wird die Rekombinationsrate geschätzt. Als Verfahren wird hier die klassische LOD-Wert Methode angewendet. Zusätzlich fließen bei der PL die Annahmen des genetischen Modells in die Berechnung mit ein (Amos & Williamson, 1993, Williamson & Amos, 1990). Die höchsten Kopplungssignale der NPL und der PL sind in chromosomalen Regionen, die noch nicht mit dem ET zuvor in Verbindung gebracht werden konnten. Die Loci der ETM-Regionen konnten mit dieser GWKS nicht bestätigt werden, da die LOD-Werte in den ETM-Regionen unter den Grenzwerten von wahrscheinlicher und signifikanter Kopplung liegen. Auch zeigen die genetischen Regionen der Kandidatengene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten und des *LINGO1* Gens keine Hinweise auf Kopplung.

Die bisher publizierten GWKS konnten signifikante Kopplung erreichen und somit die drei Kandidatenregionen (*ETM1*, *ETM2* und *ETM3*) des ET identifizieren. Anschließende Replikationsstudien konnten eine Kopplung dieser Loci nicht konstant oder gar nicht bestätigen. Es ist anzunehmen, dass beim ET Locus-Heterogenität eine große Rolle spielt, so dass bei verschiedenen Familien mit vermutlich monogener Vererbung des Krankheitsphänotyps dieser durch genetischen Varianten an unterschiedlichen Loci verursacht wird. Auch bei anderen neurologischen Erkrankungen wie z.B. den hereditären Neuropathien, Morbus Parkinson, Ataxien und Hereditären Spastischen Spinalparalyse, ist bei monogenen Formen der Krankheit eine Locus-Heterogenität zu finden (Auer-Grumbach *et al.*, 2003, Lesage & Brice, 2009, Salinas *et al.*, 2008, Schols *et al.*, 2004). Die unbefriedigenden Ergebnisse dieser GWKS sind sicherlich zu einem großen Teil auf die Locus-Heterogenität zurückzuführen. Wenn unterschiedliche Loci bei den hier verwendeten sechs Familien für den ET prädisponieren, dann ist bei einer Gesamtanalyse des Studienkollektivs die statistische Teststärke für deren Identifizierung limitiert. Die GWKS, in welcher der *ETM1*-Locus durch die Untersuchung von 16 Familien identifiziert wurde, konnte die Locus-Heterogenität größtenteils durch die Verwendung eines

homogenen isländischen Kollektivs umgehen (Abschnitt 4.3.3) (Gulcher *et al.*, 1997). Der *ETM2*-Locus hingegen, wurde nur in einer großen monogenen Familie identifiziert und in folgenden Studien in zusätzlichen Familien repliziert (Higgins *et al.*, 2006, Higgins *et al.*, 1998, Higgins *et al.*, 1997).

Bei der Kopplungsanalyse von komplexen Erkrankungen, deren Vererbungsmodus in der Regel nicht bekannt ist, ist die NPL der PL vorzuziehen, da hier kein genetisches Modell benötigt wird. Die PL kann jedoch bei der Verwendung eines falschen genetischen Modells stark an Teststärke verlieren. Die Parameter des genetischen Modells (wie z.B. Penetranzen, Phänokopieraten, Risikoallelfrequenz) sind bei den komplexen Erkrankungen schwer zu schätzen. Das hier auf die Familien mit vermutet monogener Vererbung angewendete Modell entspricht dem, welches in den vorherigen Kopplungsstudien bei der Etablierung der *ETM1*- und *ETM2*-Region angewendet wurde (Gulcher *et al.*, 1997, Higgins *et al.*, 1997). Trotz derselben Annahmen zu Penetranzen, Phänokopien und Risikoallelfrequenz lagen die LOD-Werte der PL stets unter denen in der NPL. Dies lässt auf suboptimale Modellannahmen für unsere Familien schließen. Die richtigen Parameter für das genetische Modell zu finden, ist beim ET offensichtlich schwierig. In einigen Studien ist z.B. das relative Risiko für Verwandte ersten Grades deutlich  $> 50\%$  (Kovach *et al.*, 2001, Ma *et al.*, 2006), was einer Mendelschen Vererbung widerspricht, die bei einem autosomal-dominanten Erbgang von ca.  $50\%$  ET-Patienten in jeder Subfamilie mit einem betroffenen Elternteil ausgeht. In anderen Familien sind hingegen deutlich weniger als  $50\%$  der Mitglieder mit einem betroffenen Elternteil an ET erkrankt, wie in einer populationsbasierten Studie gezeigt wurde (Louis *et al.*, 2001a). In unseren verwendeten Familien scheint bei Betrachtung der ET-Patienten mit definitiven, wahrscheinlichen und möglichen ET eine autosomal-dominante Vererbung des ET vorzuliegen. Bei den meisten epidemiologischen Studien zum ET werden jedoch nur die Patienten mit definitiven ET als „betroffen“ für die Analyse gewertet. In diesem Fall läge das relative Risiko für Verwandte ersten Grades in unseren Familien deutlich unter  $50\%$ . Durch diese Unterschiede in der Frequenz des ET-Phänotyps in den verschiedenen Familien, ist es schwierig Angaben über Penetranzen und Phänokopien zu machen. Hinzu kommt, dass auch wenig über die altersabhängige Penetranz bekannt ist, insbesondere bei Individuen unter 65 Jahren. Zusätzlich erschwerend für die Einschätzung der Rate der Penetranz und der Phänokopien ist die häufig nicht klar zu stellende Diagnose. Aufgrund der verschiedenen Diagnosekriterien und der Überlappung der ET-Symptome mit den

Symptomen anderer neurologischer Krankheiten gibt es Unterschiede in Klassifizierung der ET-Patienten in den verschiedenen Studien.

#### 4.1.3.2 Separate Analyse der einzelnen Familien

Da die oben genannte Locus-Heterogenität die Detektion von Kopplung in einer Stichprobe aus mehreren Familien erschweren kann, wurden die größten drei Familien der sechs in der GWKS untersuchten Familien einzeln analysiert, um Signale erfassen zu können, die nur in einer der untersuchten Familien zur Ausprägung des Phänotyps beitragen. Die unterschiedliche Lokalisation der höchsten Kopplungssignale in den einzelnen Familien bestätigt die angenommene Heterogenität des ET. Die maximal möglichen LOD-Werte (LODmax) der einzelnen Familien konnten nicht erreicht werden. Zudem liegen die LODmax-Werte unter der Grenze für signifikante Kopplung, so dass mit diesen einzelnen Familien lediglich wahrscheinliche Kopplung detektiert werden kann. Übereinstimmungen in den Regionen mit positiven Kopplungssignalen konnte in der NPL in den Familien NG48 und NG49 auf Chromosom 3 und in der PL in den Familien NG49 und NG50 auf Chromosom 2 gefunden werden. Jedoch erreichte kein Marker in einer der Familien ein LOD-Wert größer 2. Zusätzlich blieben die LOD-Werte in den Familien NG48 und NG49 weit unter den maximal möglich erreichbaren LOD-Werten. Familie NG50 hingegen lag in der PL nur knapp unter dem geschätzten LODmax von 1,87 mit Kopplungssignalen auf Chromosom 4 (LOD = 1,79), Chromosom 8 (LOD = 1,81) und Chromosom 17 (LOD = 1,8). Wie bei Familie NG50 ergab auch die Analyse der anderen Familien mehrere gleich hohe LOD-Werte pro Familie (Abbildung 3-4). Nur bei der Zmean-Berechnung gab es bei den Familien NG48 und NG49 nur einen Peak, der deutlich höher als alle anderen Peaks war. Erfahrungsgemäß werden bei mehreren Kopplungssignalen im Bereich von wahrscheinlicher Kopplung in genomweiten Scans von Familien mit einer monogenen Vererbung des Phänotyps, alle Kopplungssignale bis auf eins bei einer Feinkartierung demaskiert. Es wäre allerdings auch möglich, dass aufgrund einer falschen Modellwahl alle erhaltenen Kopplungssignale nicht echt sind. Jedoch sind bei der Analyse einer Familie mit oligogener Vererbung mehrere gleich hohe Kopplungssignale möglich, die meist auch einer Feinkartierung standhalten (Ewald *et al.*, 2003). Um weiter zu evaluieren welches dieser Signale der separaten Analyse der Familien echt ist und um eventuell noch höhere LOD-Werte erzielen zu können, müssten zumindest alle LOD-Werte  $>1$  durch Feinkartierung mit

weiteren Markern in der Region weiter verfolgt werden. Bei drei Familien und ungefähr fünf Loci mit LOD-Werten größer als eins pro Familie, wäre dies allerdings ein großer Aufwand für die Identifizierung einer echten Kopplung, die aufgrund der Familiengröße keine Signifikanz erreichen kann.

Auch in der separaten Analyse konnte mit keiner der Familien die Kopplung mit einem der bekannten chromosomalen Loci für den ET in unseren Familien bestätigt werden.

Ein großes Problem bei der separaten Analyse der einzelnen Familien stellte die Größe der Familien dar. Für die Kopplungsanalysen waren die Genotypdaten von maximal 15 Familienmitgliedern und über maximal vier Generationen verteilt, vorhanden. Wie schon bei der Berechnung der theoretisch möglichen LOD-Werte für diese Familien gezeigt wurde, konnte mit der statistischen Teststärke in der PL und der NPL lediglich wahrscheinliche Kopplung für die einzelnen Familien erreicht werden. Zusätzlich zu dem geringen Informationsgehalt, der aus den eingeschränkten Rekombinationsereignissen bei kleineren Familien mit wenigen Generationen resultiert, wirkt die wahrscheinlich reduzierte Penetranz und die angenommene hohe Phänokopierate limitierend auf die statistische Teststärke. Die Annahme einer hohen Phänokopierate erklärt sich aus der hohen Prävalenz der sporadischen, genetisch komplexen Form des ET in der Bevölkerung. Diese beträgt, je nach Untersuchung, mehrere Prozent, was dazu führt, dass in den meisten größeren Familien ein- oder mehrere Individuen mit einem sporadischen ET zu finden sind. Die bereits ausführlich dargestellten diagnostischen Schwierigkeiten führen darüber hinaus zu falsch positiven Diagnosen, die sich in der Kopplungsanalyse wie eine Phänokopie auswirken. Falsch negative Diagnosen entsprechen dagegen einer verminderten Penetranz, da der Patient, obwohl er Träger des Krankheitsgens ist, als nicht betroffen eingestuft wird. Die jüngste Generation ist meist aufgrund des geringen Alters der Probanden nicht aussagekräftig, da es sich bei dem ET meist um eine spät manifestierende Erkrankung handelt und so die Probanden nicht sicher als betroffen (ET-Phänotyp) oder nicht-betroffen (kein ET-Phänotyp) eingestuft werden können. Somit ist die statistische Teststärke dieser Familien nicht ausreichend zur Detektion neuer noch unbekannter Loci, wohl aber in einigen Familien zur Replikation bekannter Loci.

#### 4.1.3.3 Feinkartierung des putativen Locus auf Chromosom 3q26.31-3q29

Im Zuge einer Feinkartierung wurde das Kopplungssignal von Marker D3S3583 weiterverfolgt. Obwohl die nicht-parametrischen LOD-Werte nur eine mögliche Kopplung zwischen diesem Marker und dem ET anzeigten, wurde diese Region mit zusätzlichen Markern näher untersucht, da positive Kopplungssignale in der kombinierten Analyse aller sechs Familien sowie in der separaten Analyse von den Familien NG48 und NG49 erhalten wurden. Durch die zusätzlichen vier Marker konnte in der Analyse der sechs Familien eine Steigung der LOD-Werte von D3S3583 sowie der zentromerisch dieses Markers gelegenen Marker (D3S1763, D3S2425 und D3S3037) verzeichnet werden (Tabelle 3-4). Hingegen bewirkte die zusätzliche Information der vier hinzu gekommenen Marker eine leichte Schwächung der Kopplungssignale der von D3S3583 telomerisch gelegenen Marker. In der Feinkartierung zeigt der Marker D3S1232 den höchsten LOD-Wert mit 1,83. Somit bleiben weiterhin die Kopplungssignale aus der untersuchten Region im Bereich von möglicher Kopplung und konnten nicht die maximal möglichen LOD-Werte in der Gesamtanalyse aller Familien erreichen. Statistisch betrachtet kann für die untersuchte Region eine Kopplung zu ET weder ausgeschlossen noch bewiesen werden. Um zu detektieren an welcher Stelle auf dem Chromosom das Kopplungssignal abfällt und ob eventuell nicht noch eine weitere Erhöhung der LOD-Werte ermittelt werden kann, sollten weitere Marker zwischen D3S3583 und ATA57D10 genotypisiert werden. Bei einem Abstand von mehr als 10 cM zwischen D3S3583 und ATA57D10, ist es möglich, dass ein Marker in diesem Bereich stärker mit dem Phänotyp gekoppelt ist, als die schon untersuchten. Auch könnten Marker mit einer höheren Heterozygotie zu einer Erhöhung der LOD-Werte beitragen.

Die nicht-parametrische separate Analyse der Feinkartierung in den Familien NG48 und NG49 zeigte ähnliche Ergebnisse (Tabelle 7-2). Auch hier konnte ein geringfügiger Anstieg der LOD-Werte der von D3S3583 zentromerisch gelegenen Marker und ein Abfall der LOD-Werte der telomerisch gelegenen Marker verzeichnet werden. Der Anstieg der LOD-Werte reichte weder an die maximal möglichen LOD-Werte der Familien heran, noch an die Schwelle für wahrscheinliche Kopplung. Im Gegensatz zur Familie NG48, in der die vier vom ET betroffenen Mitglieder den Risikohaplotypen im Stammbaum aufwiesen (Abbildung 4-1), fehlte der Risikohaplotyp bei einem betroffenen Mitglied der Familie NG49. Dass in der Familie NG48



trotz Segregation des Risikohaplotyps nicht die maximal möglichen LOD-Werte erreicht werden konnten, ist einer nicht ausreichenden Markerinformativität zuzuschreiben.

#### **4.1.3.4 Feinkartierung des putativen Locus 19p13.2 bis 19p13.12**

Der Locus 19p.13.2 bis 19p13.12 wurde in der Familie NG48 feinkartiert. Im genomweiten Scan erzielte die parametrische Zwei-Punkt-Kopplungsanalyse der Familie NG48 den höchste LOD-Wert für den Marker D19S586 (LOD = 1,84). Die parametrische Mehrpunkt-Analyse konnte für den Marker D19S586 einen LOD-Wert von 1,38 errechnen (Tabelle 3-4). Die Kopplungssignale aus der Region, stiegen auch nach Einbeziehung der Information vier zusätzlicher Marker weder in der parametrischen Zwei-Punkt-Kopplungsanalyse noch in der die parametrische Mehrpunkt-Kopplungsanalyse über die Grenze einer möglichen Kopplung an. In der Zwei-Punkt-Kopplungsanalyse fielen die LOD-Werte der Marker aus dem genomweiten Scan bei der Feinkartierung etwas niedriger aus, obwohl die Zwei-Punkt-Analyse hier die gleichen Werte liefern sollte. Der Grund für diese leichte Veränderung der LOD-Werte liegt in der Verwendung anderer Allelfrequenzen in der Feinkartierungsstudie als in der GWKS. In der Feinkartierungsstudie wurden der Einfachheit halber gleiche Allelfrequenzen für alle Allele angenommen wurden. Unter der Annahme von gleichen Allelfrequenzen werden seltene Varianten als häufiger angenommen, was in einem niedrigeren LOD-Wert resultiert, da die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass rekombinanten Meiosen vorkommen. Im genomweiten Scan hingegen wurden die Allelfrequenzen aus allen genotypisierten Individuen berechnet ( $n = 78$ ). Allerdings konnte mit der Mehrpunkt-Kopplungsanalyse eine minimale Zunahme der LOD-Werte für die Marker aus dem genomweiten Scan mit einem maximalen LOD-Wert des Markers D19S586 von 1,61 verzeichnet werden. Die neu typisierten telomerisch des Markers D19S586 gelegenen Marker, erzielten LOD-Werte  $> 1$ , die aber niedriger als die von D19S586 waren. Die zwei zusätzlichen Marker, die centromerisch von D19S586 liegen, erzielten nur LOD-Werte  $< 1$ . Die Haplotypanalyse im Stammbaum der Familie NG48 zeigt die Begrenzung des Risikohaplotyps durch informative Rekombinationen in den Individuen 7 und 9 (Abbildung 7-3). Durch die Rekombinationen in diesen Individuen liegt der Risikohaplotyp in einer 10 cM ( $\sim 4,5$  Mb) großen Region zwischen den Markern D19S922 und D19S221. Dieser Risikohaplotyp ist in allen vier ET Patienten (Individuen 1, 7, 8 und 9) dieser Familie nachweisbar. Zusätzlich ist der Risikohaplotyp in einer Person ohne ET-Phänotyp (Individuum

12) vorhanden sowie in einer Person mit möglichen ET (Individuum 15). Falls der Risikohaplotyp wirklich mit dem ET gekoppelt ist und Individuum 12 in Zukunft nicht an ET erkrankt, kann in diesem Fall von einer reduzierten Penetranz ausgegangen werden. Unter der Annahme einer autosomal dominanten Vererbung, einer Risikoallelfrequenz von 0,5% und einer Phänokopierate von 0,1, ist der maximal zu erreichende LOD-Wert dieser Familie 2,47. Die mit diesem Modell berechneten LOD-Werte der Feinkartierung lagen aber deutlich unter dem  $LOD_{max}$ -Wert. Die Gründe hierfür können an einer unzureichenden Markerinformativität oder einem falschen zugrundeliegenden genetischen Modell liegen.

## 4.2 Ergebnisse der Assoziationsanalysen

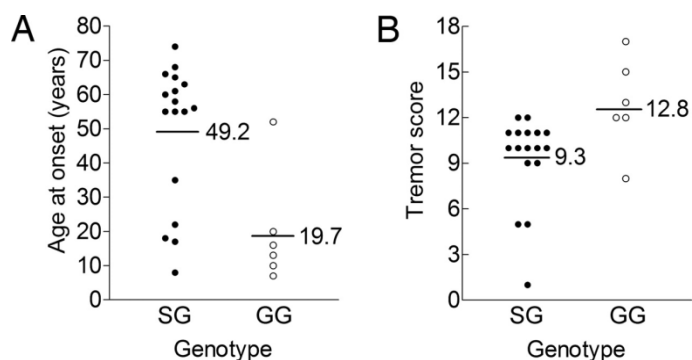
Wie die Ergebnisse der Kopplungsstudie zeigten, ist die Kartierung von Krankheitsgenen aufgrund der genetischen Heterogenität des ET und der wahrscheinlich schwachen Effekte der Risikovariante(n) wenig erfolgsversprechend. Da für komplexe Erkrankungen die Assoziationsanalysen geeigneter sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit die vorhandene Stichprobe nicht verwandter Individuen (ET-Patienten und nicht vom ET betroffene Personen) auf Assoziation von verschiedenen Kandidatengenen zum ET geprüft.

### 4.2.1 *Dopamin-Rezeptor D3 Gen*

*Zeigt die Ser9Gly Variante des DRD3 Gens im Rahmen einer Fall-Kontroll-Analyse signifikante Assoziationssignale?*

Die Ser9Gly-Variante des *Dopamin-Rezeptor D3 (DRD3)* Gens, wurde zusätzlich zu der Kopplungsstudie (Abschnitt 4.1.1.2) auch auf Assoziation zum ET in einer europäischen (Deutschland, Frankreich und Dänemark) Stichprobe aus 299 nicht verwandten ET-Indexpatienten und 528 nicht verwandten Kontrollen getestet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Allel- und Genotypfrequenz zwischen den Patienten und den Kontrollen detektiert werden. Für eine weitere Analyse wurde die gesamte Stichprobe in zwei Untergruppen mit ET-Patienten mit positiver Familienanamnese (FA; n = 202) und ohne FA (n = 97) eingeteilt, da eine positive ET-Familienanamnese ein wichtiger Risikofaktor für die Ausbildung des Phänotyps zu sein scheint (Louis *et al.*, 2001a). Hierbei konnte nur in den französischen

Patienten mit FA (n = 49) eine nominal signifikante Assoziation des allelischen und genotypischen p-Wertes gefunden werden. Interessanter Weise war jedoch im Gegensatz zu früheren Studien mit amerikanischen und französischen Stichproben, in denen das Gly Allel als Risikofaktor zu wirken scheint, das Ser Allel häufiger bei unseren Patienten als bei den Kontrollen vorhanden (Jeanneteau *et al.*, 2006, Lucotte *et al.*, 2006). Für eine gute statistische Aussagekraft ist die hier verwendete französische Untergruppe von 49 Patienten mit FA zu klein. Zudem blieb die Signifikanz nach einer Korrektur für multiples Testen nicht bestehen. Jeanneteau *et al.* 2006 konnte das homozygote Vorkommen des Risikoallels in Zusammenhang mit dem Alter bei Krankheitsbeginn und mit der Tremorstärke bringen (Abbildung 4-2). In unseren Probanden besteht keine Beziehung zwischen dem Alter bei Erkrankungsbeginn oder dem Schweregrad des Tremors und dem DRD3 Ser9Gly Genotyp (Tabelle 7-3 und Tabelle 7-4).



**Abbildung 4-2: Zusammenhang vom homozygotem Vorkommen des Risikoallels der Ser9Gly-Variante mit dem Alter bei Krankheitsbeginn und mit der Tremorstärke in der Studie von Jeanneteau *et al.*.**

(A) Das Erkrankungsalter ist bei Gly-9 Homozygoten (GG) niedriger als bei Heterozygoten (SG). (B) Der Tremor Score ist höher bei Homozygoten (GG) als bei Heterozygoten (SG). (Jeanneteau *et al.*, 2006)

Mit unserer Stichprobe (299 ET-Patienten und 528 Kontrollen) betrug die statistische Teststärke 80 % bei einer OR von 1,6 und einer Risikoallelfrequenz von 32 %. Trotz unserer gering größeren Stichprobe im Vergleich zu den amerikanischen Kollektiv (Fälle = 276 und Kontrollen = 184) (Jeanneteau *et al.*, 2006), konnten wir keine Assoziation des ET mit dem *DRD3* detektieren. Die gefundene Assoziation in der amerikanischen Stichprobe kann einer Populationsstratifizierung zugrunde liegen, da die Stichprobe aus Amerikanern mit kaukasischem Hintergrund zusammengesetzt war, die aus geographisch sehr unterschiedlichen Regionen Amerikas gekommen waren. Zusätzlich war die Kontrollgruppe der Studie im Vergleich zur Fallgruppe zu klein. Die gefundene Assoziation in dem französischen Kollektiv von Jeanneteau *et al.*, 2006 ist ebenfalls in Frage zu stellen, da diese sehr kleine Stichprobe aus

30 Patienten und 50 Kontrollen eine geringe statistische Teststärke besitzt und es allgemein bekannt ist, dass positive Assoziationsstudien mit kleinen Fallzahlen meist nicht reproduzierbar sind. Die Assoziation zwischen genetischen Varianten im *DRD3* Gen und dem ET konnte auch in anderen Assoziationsstudien nicht bestätigt werden (Blair *et al.*, 2008, Garcia-Martin *et al.*, 2009, Inashkina *et al.*, 2008, Tan *et al.*, 2007, Vitale *et al.*, 2008). Auch bei der Schizophrenie, beim Morbus Parkinson und bei der Migräne konnte keine Assoziation zwischen dem *DRD3* Gen und der Krankheit gefunden werden (Garcia-Martin *et al.*, 2010, Talkowski *et al.*, 2006, Van Kampen & Eckman, 2006, Paus *et al.*, 2010). Unsere Studie schließt aber eine Assoziation von Polymorphismem im *DRD3* Gen mit dem ET in unserer Stichprobe nicht grundsätzlich aus, da nur der Ser9Gly Polymorphismus untersucht wurde. Hierzu ist eine gute Abdeckung des Gens mit Polymorphismen, die alle häufigen Haplotypen innerhalb des Gens abdecken erforderlich, wie wir sie für die Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten durchgeführt haben.

#### 4.2.2 GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten

*Kann eine Assoziation der Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten mit dem ET mittels LD-basierter haplotype-tagging-Methode detektiert werden?*

In einer zwei-stufigen Assoziationsstudie wurden die 15 autosomalen Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten sowie die vier GABA Transporter Gene auf Assoziation in insgesamt 503 Fällen und 818 Kontrollen untersucht. Von den 240 htSNPs, die in der ersten Stufe getestet wurden, zeigten nur neun SNPs nominale Signifikanz (p-Werte von 0,001 bis 0,049). Da diese erste Stufe als Hypothesengenerierung genutzt wurde, wurde keine Korrektur für multiples Testen angewendet. Die neun SNPs sind in fünf verschiedenen Genen lokalisiert und zeigten jeweils moderate Effekte mit ORs zwischen 0,59 und 1,55. In einer zweiten Stufe wurden die fünf SNPs mit der höchsten statistischen Teststärke (53-81 %) für eine Verifizierung in einer unabhängigen Stichprobe getestet werden. In dieser zweiten Stufe konnte jedoch keiner der SNPs signifikante Assoziation mit dem ET-Phänotyp erreichen.

Die erste Phase dieser Assoziationsstudie war durch die relativ geringe Anzahl von ET-Patienten limitiert. Mit den 184 Fällen und 426 Kontrollen konnten mit einer angenommenen statistischen Teststärke von 80 %, ORs von 1,75 bei einer Allelfrequenz des seltenen Allels von 0,2 detektiert werden. Dies sind relativ starke Effekte, wie sie bei komplexen Erkrankungen nicht sehr häufig

zu erwarten sind. So ist es möglich, dass die erhaltenen Assoziationssignale der ersten Stufe falsch-positive Ergebnisse sind und wahre Assoziation aufgrund der geringen Studiengröße übersehen wurden. Dies würde auch das Scheitern der Verifizierung dieser Befunde in der zweiten Stufe erklären. Auch die statistische Teststärke der zweiten Stufe mit 53-81 % war durch die Stichprobengröße eingeschränkt (319 Fälle und 392 Kontrollen). Trotzdem wurde in dieser Assoziationsstudie das derzeitige größte ET-Kollektiv weltweit analysiert und die umfassendste Assoziationsstudie mit den wahrscheinlich funktionell bedeutendsten Kandidatengenomen des ET durchgeführt. Trotz der mutmaßlichen Rolle der GABA<sub>A</sub>-R beim ET existiert bis heute erst eine Assoziationsstudie zum *GABRA1* Gen (Deng *et al.*, 2006). In dieser Studie wurden zunächst die kodierenden Regionen des Gens in 76 ET-Patienten sequenziert. Dabei wurden 2 SNPs gefunden, von denen einer bereits bekannt war. Kontrollen wurden jedoch nicht sequenziert und somit konnte auch keine Aussage über die Häufigkeit der gefundenen Varianten in der Normalbevölkerung gemacht werden. Von den beiden gefundenen Varianten wurde die bereits bekannte Variante in der anschließenden Stufe auf Assoziation zum ET-Phänotyp in 121 ET-Patienten und 114 Kontrollen geprüft. Die bisher unbekannte Variante wurde nur bei einem ET-Patienten gefunden, so dass mit dieser Variante keine sinnvolle Assoziationsstudie durchgeführt werden konnte. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen Fällen und Kontrollen detektiert werden. Auch hier war die Aussagekraft der Studie durch eine geringe Anzahl von Probanden eingeschränkt. Die Assoziationsstudie beschränkt sich ausschließlich auf die Exons und die direkt angrenzenden Intronbereiche, die in der Sequenzierung untersucht wurden. Im Intron oder Promotorbereich gelegene Varianten wurden daher nicht identifiziert. Auch wurden die Exons 1 und 2 nicht sequenziert. Dadurch könnten Varianten, die dort lokalisiert sind und einen möglichen Einfluss auf die Genexpression oder die Funktionalität des Proteins haben, übersehen worden sein. Die erste genomweite Assoziationsstudie (GWAS) in der isländischen Population (Fälle = 452 und Kontrollen = 14394) berichtete nicht von Assoziationssignalen in den Genen der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten (Stefansson *et al.*, 2009). Im Vergleich zu unserer Studie hatte diese GWAS eine Teststärke von 80 % für die Detektion von ORs > 1,37. Somit hätten auch moderatere Effekte als in unserer Studie gefunden werden können. Trotz der Verwendung des LD-basierten Illumina HumanHap300 Chips, der über 300 000 htSNPs typisiert, können aufgrund des durchschnittlichen SNP-Abstandes von 9 kb Assoziationen übersehen worden sein. Alternativ ist

es möglich, dass diese Gene nur in einer Untergruppe von ET-Patienten eine Rolle spielen, wie z.B. der der alkoholsensitiven Patienten. Gene, die nur in Untergruppen einer Krankheit eine Rolle spielen, können nur durch Stratifizierung bezüglich des Subphänotyps gefunden werden. Dies ist in der isländischen Studie nicht geschehen, da Subphänotypen wahrscheinlich nicht erhoben wurden. Die Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten scheinen also bei den isländischen ET-Patienten keinen oder einen geringen Einfluss auf die Ausbildung des ET-Phänotyps zu haben. Verschiedene Studien konnten einen Zusammenhang zwischen den Genen der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten und der Schizophrenie, der bipolaren Störung, dem Autismus, der Epilepsie sowie dem fragilen X-Syndrome und dem fragilen X-assoziierten Tremor/Ataxie Syndrome herstellen (Cossette *et al.*, 2002, D'Hulst *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2005, Petryshen *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2008, Pun *et al.*, 2010). Die ORs für die Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten lagen in diesen Studien zwischen 1,42 und 1,83 und hätten somit sowohl in unserer Untersuchung als auch in der isländischen GWAS zum ET detektiert werden können.

Die Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten unterliegen einer epigenetischen Regulation, wie viele andere Gene, die im Gehirn exprimiert werden. Das menschliche zentrale Nervensystem gehört zu den am weitesten entwickelten und kompliziertesten biologischen Systemen. Die enorm hohe Zahl an Neuronen und Gliazellen sowie der Aufbau der komplizierten neuronalen Netzwerke erfordern eine komplizierte und weitreichende (epigenetische) Regulation von Auf- und Umbauprozessen. Zu den epigenetischen Mechanismen gehört auch das Imprinting, bei dem in der Gametogenese Expressionsmuster durch Methylierung festgelegt werden. Dadurch erfolgt eine zeit- und ortsspezifische Expression der maternalen oder paternalen Gene. Eine Störung des seit Generationen festgelegten Musters; durch z.B. Mutationen in Genen, die für den Methylierungsprozess verantwortlich sind oder nicht korrekt durchgeführt wurde; kann zur Entstehung einer Krankheit führen. Ob das Imprinting der Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten einen Einfluss auf den ET-Phänotyp hat, könnte durch Methylierungs- und Expressionsstudien untersucht werden.

### **4.2.3 *LINGO1* als Suszeptibilitätsfaktor für den ET**

*Spielen Varianten des LINGO1 Gens als Suszeptibilitätsfaktoren für den ET auch in unserer europäischen Stichproben eine Rolle?*

Vor Kurzem zeigte die erste genomweite Assoziationsstudie (GWAS) zum ET, dass zwei Varianten (rs9652490 und rs11856808) im *LINGO1* Gen (*leucine rich repeat and immunoglobulin domain-containing, Nogo receptor-interacting protein gene 1*; OMIM: 609791) in einer isländischen Studienpopulation von 452 ET Patienten und 14.394 Kontrollen mit dem ET assoziiert waren (Stefansson *et al.*, 2009). Die Assoziation von SNP rs9652490 konnte in einer zweiten Stichprobe von 300 ET Patienten aus Österreich, Deutschland, den Vereinigten Staaten und Island bestätigt werden. Um die Assoziation von SNPs im *LINGO1* Gen und dem ET in unserer deutschen Stichprobe zu testen, entwarfen wir eine Assoziationsstudie mit zehn htSNPs, die das *LINGO1* Gen einschließlich der genomischen Bereiche 1 kb 3'- und 5'- der proteinkodierenden Region charakterisieren. Diese htSNPs schließen die in der isländischen Stichprobe mit dem ET assoziierten SNPs mit ein. Die Analyse der zehn htSNPs zeigte eine signifikante Assoziation von drei SNPs (rs8030859, rs9652490 und rs11856808) mit dem ET in 284 Fällen und 334 Kontrollen deutscher Herkunft. Nach Bonferroni-Korrektur für zehn Tests, blieben die SNPs rs8030859 ( $p = 1,0 \times 10^{-3}$ ) und rs9652490 ( $p = 9,1 \times 10^{-3}$ ) signifikant assoziiert. In der Analyse einer französischen Replikationsstichprobe (48 Fälle und 240 Kontrollen) waren die SNPs rs11856808 ( $p = 3,5 \times 10^{-2}$ ) und rs9652490 ( $p = 4,7 \times 10^{-2}$ ), trotz der kritisch geringen Anzahl an Probanden, signifikant assoziiert. Das höchste Assoziationssignal in der deutschen Stichprobe wurde für SNP rs8030859 gefunden, welcher nicht in der isländischen Studie beschrieben wurde (Stefansson *et al.*, 2009). In der französischen Stichprobe blieb dieser SNP knapp unter der Signifikanzgrenze ( $p = 5,3 \times 10^{-2}$ ). Die in der ersten GWAS zum ET beschriebene Assoziation zwischen dem intronischen SNP rs9652490 im *LINGO1* Gen und dem ET konnte also durch uns in einer unabhängigen deutschen und französischen Stichprobe bestätigt werden. Der zweite, in der Studie von Stefansson *et al.* 2009 erwähnte SNP rs11856808 war in unseren deutschen ET-Patienten lediglich nominal signifikant. Die ORs der drei Marker in der deutschen Stichprobe stimmten mit denen der isländischen Studie überein. Auch die geschätzte OR von 2,42 für rs9652490 unter der Annahme eines rezessiven Modells entsprach dem aus der isländischen Studie, was für die Echtheit unseres Befundes spricht.

Der neu detektierte SNP rs8030859 ist in einer *linkage disequilibrium* (LD) Region, benachbart zu der von den zwei von Stefansson *et al.* identifizierten SNPs, lokalisiert (Abbildung 4-3). In

der LD-Region sind zwei weitere SNPs lokalisiert, die im starken LD mit rs8030859 stehen ( $r^2 = 0.95$  im HapMap CEU Kollektiv). Aufgrund der starken Korrelation wurden diese beiden SNPs nicht zusätzlich getestet, da davon ausgegangen werden kann, dass sie die gleichen Assoziationssignale wie rs8030859 zeigen. Der SNP rs8030859 ist in einer Region des *LINGO1* Gens lokalisiert, die zusätzlich für ein anderes unabhängiges Transkript kodiert (NCBI GenBank number *BC038758*). Interessanterweise wird dieses Transkript, bestehend aus drei Exons, laut der Internetdatenbank (UCSC Genome Browser) in entgegengesetzter Richtung zum *LINGO1* Gen abgelesen. Es ist bekannt dass gegenläufige Transkripte die Genexpression regulieren können und besonders bei der Regulierung der entwicklungspezifischen Genexpression im Gehirn von Bedeutung sind (Mercer *et al.*, 2010). Bei der Regulierung der Genexpression spielen z.B. lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) eine bedeutende Rolle. Diese sind häufig innerhalb, der zu regulierenden Gene kodiert. Die meisten (bekanntesten) Gene, deren Expression durch lncRNAs reguliert werden, sind essentiell für die Entwicklung (Qureshi *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten Unterschiede in den Assoziationssignalen zwischen der französischen Stichprobe und der deutschen Stichprobe beobachtet werden. Ein Erklärungsversuch für dieses Ergebnis ist, dass die signifikanten SNPs in LD mit einer unbeobachteten Variante in der Umgebung stehen. Diese könnte die eigentliche ursächliche Risikovariante darstellen, von der das Assoziationssignal des *LINGO1* Gens ausgeht. In der Replikationsstichprobe der isländischen Arbeit wurde eine Feinkartierung durchgeführt, die allerdings nur die genomische Region 3' von rs9652490 betrachtete. Da das Assoziationssignal von rs9652490 aber aus einer LD-Region in 5'-Richtung stammt, könnte dadurch eine wahre assoziierte Variante übersehen worden sein. Um nach möglicherweise kausalen, mit ET assoziierten Varianten zu suchen, wurde das Transkript *BC038758* bei 96 Patienten mit ET sequenziert (Abschnitt 4.2.3.3). Ziel der Sequenzierung war es, bisher unbekannte Varianten zu identifizieren und diese auf Assoziation mit dem ET zu testen.

Zusätzlich führten wir eine Analyse in der Subgruppe der deutschen ET-Patienten mit positiver Familienanamnese (FA) durch. Bei der deutschen Stichprobe konnte für alle drei SNPs eine signifikante Assoziation bei ET Patienten mit positiver FA gefunden werden. Der SNP rs8030859 zeigte zusätzlich signifikante Assoziationssignale in der deutschen Untergruppe ohne FA. Diese Ergebnisse können durch eine unterschiedliche Rolle der SNPs in den beiden Untergruppen hervorgerufen sein. Die allelische Korrelation zwischen den drei SNPs sowie die



Ergebnisse einer (AIC)-basierten Regression zur Modellwahl zeigten, dass alle SNPs das gleiche Signal der Region repräsentieren (Daten nicht gezeigt).

Auch andere Studien belegten, dass Polymorphismen im *LINGO1* Gen ein Suszeptibilitätsfaktor für den ET sind (Clark *et al.*, 2010, Tan *et al.*, 2009, Vilarino-Guell *et al.*, 2009). Diese Studien bestätigen die aufgeführten Befunde der vorliegenden Studie. So konnten Clark *et al.* (2010) zwar keine Assoziation von dem SNP rs9652490 mit dem Hauptsignal aus der isländischen Studie zum ET nachweisen, jedoch zeigten zwei stromabwärts gelegene SNPs in der gleichen LD-Region eine signifikante Assoziation in der untersuchten nordamerikanischen Stichprobe (Clark *et al.*, 2010). Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass keiner der bisher getesteten SNPs die kausale Variante darstellt, sondern in LD mit dieser steht. Zusätzlich sprechen auch die stark variierenden Allelfrequenzen in den einzelnen Studien sowie die Tatsache, dass in verschiedenen Studien zum Teil das eine, zum Teil das andere Allel (von SNP rs9652490) mit dem ET assoziiert war (Vilarino-Guell *et al.*, 2009), für eine Korrelation der betrachteten SNPs mit der noch unentdeckten funktionellen Variante. Eine weitere Studie verfehlte zwar den Nachweis einer Assoziation von rs9652490 mit dem ET in einer Stichprobe aus Singapur, konnte allerdings bei einer Subgruppenanalyse eine signifikante Assoziation dieses SNPs bei Patienten mit positiver FA zeigen (Tan *et al.*, 2009). Auch in unserer Subgruppenanalyse der Patienten mit FA zeigte der SNP rs9652490 ein stärkeres Assoziationssignal als in der gesamten Stichprobe. Erst kürzlich konnte in einer weiteren asiatischen Stichprobe keine Assoziation von den SNPs rs9652490 und rs11856808 mit dem ET in 109 Patienten und 430 Kontrollen aus China detektiert werden (Zuo *et al.*, 2010). Auch die Subgruppenanalyse der ET-Patienten mit positiver FA (n=82) konnte keine Assoziation detektieren. Trotz der geringen Stichprobengröße des gesamten Kollektivs, erstreht nach Stratifizierung bezüglich positiver FA, scheint der SNP rs9652490 und die mit ihm korrelierten SNPs im *LINGO1* Gen in der asiatischen Population mit dem ET assoziiert zu sein.

Einige der Studien zeigten Limitierungen im Studiendesign, wie eine zu geringe statistische Teststärke, Populationsstratifizierung und nicht geeignete Kontrollen. So wurden in einigen Studien die Subgruppenanalysen mit zu wenigen Fällen durchgeführt (Clark *et al.*, 2010, Tan *et al.*, 2009) und religiös und/oder ethnisch divergierende Gruppen in einer Stichprobe zusammengefasst (Clark *et al.*, 2010). In einigen Studien wurden Kontrollen verwendet, die nicht

auf das Vorhandensein von ET überprüft wurden oder die 20-25 Jahre jünger als die Fälle waren (Stefansson *et al.*, 2009). Das die genetische Assoziation von *LINGO1* mit dem ET möglicherweise eine pathogenetische Bedeutung des *LINGO1* Gens für den ET widerspiegelt, wird durch die Funktion des LINGO1 Proteins im zentralen Nervensystem (ZNS) gestützt. *LINGO1* spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Die Expression ist im adulten Organismus wesentlich geringer als während der Entwicklung. Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass *LINGO1* bei anderen neurologischen Erkrankungen, wie z.B. dem Morbus Parkinson und Multiple Sklerose eine Rolle spielt. LINGO1 ist eine Komponente des Nogo-66-Rezeptor (NgR1)/p75/LINGO1 Signalkomplexes, welcher die Oligodendrozyten-Differenzierung, die axonale Myelinisierung und Regeneration sowie das neuronale Überleben hemmt (Inoue *et al.*, 2007, Ji *et al.*, 2006, Mi *et al.*, 2007). Daher ist es eine plausible Hypothese, dass die mit ET assoziierten SNPs, bzw. die mit ihnen im LD stehenden bisher wahrscheinlich nicht identifizierten kausalen genetischen Varianten die Expression von *LINGO1* verstärken und zu einer Degeneration der für den ET relevanten Teile des zentralen Nervensystems beitragen. Ob zwischen den mit ET assoziierten SNP-Allelen und der *LINGO1* Expression eine Korrelation besteht, ließe sich durch eine Expressionsanalyse an Gehirnen Verstorbener untersuchen, die mit einer Genotypisierung der mit ET assoziierten SNPs gekoppelt wird.

#### **4.2.3.1 *LINGO1* und Morbus Parkinson**

##### ***Ist das LINGO1 Gen eine genetische Verbindung von ET und MP?***

Um zu prüfen, ob genetische Varianten im *LINGO1* auch mit dem Morbus Parkinson (MP) assoziiert sind, wurden die drei *LINGO1* SNPs, die in der deutschen Stichprobe zum ET assoziiert waren, in drei unabhängigen deutschen MP-Stichproben ( $\Sigma$ : 1798 Fälle und 1482 Kontrollen) untersucht. Die gesamte Stichprobe verfügte über eine genügend große statistische Teststärke für die Detektion von ORs zwischen 1,2 und 1,4 bei einer nominalen Signifikanzgrenze von 0,05. Diese Werte liegen in dem Bereich der ORs von komplexen Erkrankungen. Die Untersuchung konnte keine allelische oder genotypische Assoziation zwischen MP und den drei getesteten SNPs (rs8030859, rs9652490 und rs11856808) in den drei einzelnen und in der kombinierten Stichprobe finden. Dieser Befund entspricht dem von anderen Gruppen. So scheiterte die Suche nach Assoziation von *LINGO1* zu MP in einer österreichischen

Stichprobe und in einer polnischen Stichprobe (Bialecka *et al.*, 2010, Haubenberger *et al.*, 2009). Jedoch konnte die Gruppe um Vilarino-Güell *et al.* in zwei verschiedenen Studien eine signifikante Assoziation des SNPs rs9652490 mit dem MP-Phänotyp in Stichproben aus Nordamerika und Norwegen finden (Vilarino-Güell *et al.*, 2009, Vilarino-Güell *et al.*, 2010). Wie bei der Studie zum ET war auch hier, im Gegensatz zu der isländischen und auch unserer Studie, das häufigere A Allel in den Patienten überpräsent. Zudem konnte in einer der Studien eine signifikante Assoziation von rs9652490 nur unter der Annahme eines rezessiven Modells detektiert werden. In unserer Stichprobe war die Assoziation im rezessiven Modell nicht statistisch signifikant. Hingegen konnte in den allelbasierten Tests für alle drei untersuchten Marker in der Kieler Stichprobe ein Trend in Richtung signifikanter Assoziation im multiplikativen Modell beobachtet werden. Das multiplikative Modell geht davon aus, dass zwei verschiedene Risikofaktoren zur Ausprägung des Phänotyps beitragen. Dieser Trend zeigte sich jedoch nicht bei der genotypischen Analyse. Auch ergab die Analyse der gesamten deutschen Stichprobe, welche eine erhöhte statistische Teststärke aufwies, keine signifikante Assoziation des *LINGO1* Gens mit dem MP. Die bislang durchgeführten genomweiten Assoziationsanalysen und Metanalysen mit MP-Patienten bestätigen unseren Negativbefund, da diese das *LINGO1* Gen nicht als Suszeptibilitätsfaktor identifizieren konnten (Edwards *et al.*, 2010, Fung *et al.*, 2006, Maraganore *et al.*, 2005, Pankratz *et al.*, 2009). Der Trend in der Kieler Stichprobe in Richtung Signifikanz der drei untersuchten SNPs könnte durch zufällige Fluktuation verursacht sein. Die Aussage über eine fehlende Assoziation von *LINGO1* mit dem MP-Phänotyp in der vorliegenden Studie beschränkt sich nur auf die drei untersuchten SNPs und den mit diesen aufgrund der LD-Struktur korrelierten. Da in den Assoziationsstudien zum *LINGO1* Gen die Assoziationssignale auch von anderen *LINGO1* SNPs als den hier typisierten stammten, kann eine Assoziation des *LINGO1* Gens mit dem MP-Phänotyp in der untersuchten deutschen Stichprobe nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Jedoch handelt es sich bei unserer Stichprobe um die größte Stichprobe aller bisher durchgeführten Studien. Aufgrund der kontroversen Daten bezüglich *LINGO1* als Suszeptibilitätsfaktor für den MP, kann momentan eine genetische Verbindung der beiden Krankheiten ET und MP weder sicher bestätigt noch ausgeschlossen werden. Möglicherweise hat die kausale Variante einen zu geringen Effekt und kann nicht in heterogenen Stichproben detektiert werden. Der MP zeichnet sich ebenso wie der ET durch eine große phänotypische Variation aus, wodurch die Kartierung von ursächlichen

Genen erschwert ist. Bei komplexen Erkrankungen ist eine Strategie zur Einschränkung der Heterogenität die Aufspaltung der gesamten Fall-Stichprobe in Sub-Phänotyp spezifische Untergruppen. Allerdings kommt es aufgrund der reduzierten Stichprobengröße im Gegenzug zu einer Reduzierung der statistischen Teststärke, die den positiven Effekt der Stratifizierung durchaus aufwiegen oder übertreffen kann. In einigen Studien konnte die Anhäufung von genetischen Suszeptibilitätsfaktoren in MP-Patienten mit einem frühen Krankheitsbeginn sowie mit positiver FA nachgewiesen werden (Chan *et al.*, 2008, Maraganore *et al.*, 2005). Unsere Untergruppenanalyse der Patienten mit positiver FA und mit einem Alter bei Erkrankungsbeginn < 50 Jahre zeigte keine signifikanten Assoziationsergebnisse. Hingegen konnten Vilarino-Güell *et al.* (2010) in ihrer Subgruppenanalyse von MP-Patienten mit einem 5 Jahre späteren Krankheitsbeginn als bei dem Durchschnitt der gesamten Stichprobe (Vilarino-Güell *et al.*, 2010) zwei assoziierte Varianten finden. Diese zwei Varianten zeigten in der gesamten Stichprobe keine Assoziationssignale und der SNP rs9652490, welcher unter dem rezessiven Modell in der gesamten Stichprobe signifikant assoziiert war, war es in dieser Subgruppe mit später Krankheitsmanifestation nicht mehr. Da diese Ergebnisse bisher nicht repliziert wurden, ist es nicht klar, ob sie nicht auf zufälliger Fluktuation innerhalb der Stichprobe beruhen. Haubenber *et al.* (2009) verglichen die Subgruppen von MP-Patienten mit dominanten Tremor, mit Patienten ohne dominanten Tremor, wobei keine signifikanten Unterschiede der Allel- oder Genotypfrequenzen der untersuchten *LINGO1*-SNPs gefunden wurden (Haubenberger *et al.*, 2009). Des Weiteren ergab auch der Vergleich der familiären MP-Patienten mit den sporadischen MP-Patienten keine signifikanten Unterschiede in den Frequenzen der SNPs zwischen den beiden Subgruppen. Ein Vergleich dieser Subgruppen mit der Kontrollgruppe wurde in dieser Arbeit nicht beschrieben, wodurch eine Assoziation einer der untersuchten *LINGO1*-Varianten mit einem der Sub-Phänotypen nicht ausgeschlossen werden kann.

*LINGO1* ist ein interessantes Kandidatengen, welches durch seine Schlüsselrolle im ZNS stark mit der Pathophysiologie von ET und MP verbunden sein kann. Seit langem wird nach einer genetischen Verbindung zwischen den beiden neurologischen Erkrankungen gesucht da MP und ET zum Teil gemeinsame klinische Merkmale aufweisen. So ist eine Überlappung der klinischen Diagnose von ET und MP in 2-19 % zu beobachten (Shahed & Jankovic, 2007). Für ET-Patienten wurde ein 4-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von MP ermittelt (Benito-Leon *et al.*, 2009). Umgekehrt ist eine ET-Diagnose in MP-Patienten 5-10 mal wahrscheinlicher als in

Kontrollindividuen (Tan *et al.*, 2008b). Des Weiteren wurde für Verwandte ersten Grades von MP-Patienten ein erhöhtes Risiko an einem ET zu erkranken gezeigt (Rocca *et al.*, 2007). Für eine Verknüpfung von beiden Erkrankungen sprechen zusätzlich neuropathologische Untersuchungen, die in einigen ET-Patienten Lewy-Körperchen fanden, die auch bei einer Vielzahl von MP Patienten gefunden werden (Louis *et al.*, 2007).

*LINGO1* weist mit seinen Leucin reichen Wiederholungen interessanterweise Ähnlichkeiten mit dem *Leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2)* Gen auf, welches als häufigste Ursache des monogenen MP identifiziert wurde (Berg *et al.*, 2005, Farrer *et al.*, 2005, Gilks *et al.*, 2005, Lesage *et al.*, 2006, MacLeod *et al.*, 2006, Paisan-Ruiz *et al.*, 2008). *LRRK2* besitzt eine Kinaseaktivität und reguliert über Phosphorylierung die Signaltransduktion während der Neuritogenese (MacLeod *et al.*, 2006). *LINGO1* wird selektiv im ZNS exprimiert und agiert ähnlich wie *LRRK2* als Inhibitor der Oligodendrozyten-Differenzierung und neuronalen Myelinisierung. In Toxin induzierten MP-Nagetiermodellen konnte durch die Inhibierung von *LINGO1* durch *LINGO1*-Antagonisten oder in Knockout-Mäusen eine Verlängerung des Überlebens und eine Verbesserung der Funktion von dopaminergen Neuronen festgestellt werden (Inoue *et al.*, 2007). Somit scheint *LINGO1* ein gutes Kandidatengen für MP und ET zu sein und könnte die erste genetische Verbindung zwischen MP und ET darstellen.

Inwiefern *LINGO1* als Suszeptibilitätsfaktor für den MP fungiert muss noch in weiteren Studien untersucht werden. Eine genetische Verbindung zwischen dem ET und MP konnte bei Assoziationsanalysen, die bei beiden Krankheiten andere bekannte oder hypothetische Risikovarianten untersuchten, bisher noch nicht hergestellt werden. So scheiterten frühere Versuche die Assoziation von Kandidatengen (*DRD3*, *HS1BP3*) mit dem ET auch für den MP zu zeigen (Keeling *et al.*, 2009a). Auch konnten die bisher identifizierten möglichen Suszeptibilitätsgene des MP (*HNMT*, *SNCA*, *A2M*, *LRRK2*) nicht für den ET bestätigt werden (Clark *et al.*, 2009, Keeling *et al.*, 2009b, Tan *et al.*, 2008a, Tan *et al.*, 2000, Xiao & Zhang, 2006). Hierzu ist allerdings zu sagen, dass weder die genetischen Assoziation zwischen dem ET und dem *DRD3*- sowie dem *HS1BP3*-Gen noch die Assoziation zwischen der PD und den Genen *HNMT* und *A2M* ausreichend durch Replikationsstudien gesichert ist. Allein die Assoziation zwischen *SNCA* und PD in Stichproben unterschiedlicher Ethnizität, sowie *LRRK2* und PD in kaukasisch/europäischen Stichproben kann aufgrund neuer GWAS Befunde, die ausreichend

große Replikationsstudien einschlossen, als gesichert gelten (Satake *et al.*, 2009, Simon-Sanchez *et al.*, 2009). In den letztgenannten Studien wurde darüber hinaus eine Assoziation zwischen der PD und den Genen für das *Mikrotubulus-Assoziierte Protein Tau (MAPT)* sowie mit einem außerhalb bekannter Gene gelegenen SNP (rs823128) gefunden, die bisher nicht in ET-Stichproben untersucht wurden.

#### 4.2.3.2 Expressionsstudien des Transkriptes *BC038758*

Nach der Detektion des höchsten Assoziationssignals der *LINGO1*-Assoziationsstudie in der Region des Transkripts *BC038758*, wurde dieses Transkript näher untersucht, für welches bisher nur ein cDNA-Klon gefunden wurde. Da in der menschlichen Genomsequenz annotierte Transkripte, die nur auf einem cDNA-Klon beruhen erfahrungsgemäß häufig Artefakte sind und daher nicht exprimiert werden, haben wir zunächst die Expression von *BC038758* in unserem Zielgewebe Gehirn und verschiedenen anderen peripheren Geweben analysiert. In den Expressionstudien wurde die Transkription von *BC038758* im Gehirn nachgewiesen aber nicht in peripheren Blutlymphozyten, der Leber, im Herz und in Muskelgewebe. Das verwendete Exon-übergreifende Primerpaar ist in den Exons 2 und 3 lokalisiert und sollte bei der Amplifikation mit cDNA ein Produkt von 390 bp Länge und bei Amplifikation von gDNA ein Produkt von 974 bp Länge liefern, welche durch Gelelektrophorese visualisiert und differenziert werden können. Diese Sequenz setzt sich aus der amplifizierten Sequenz der Exons 2 und 3 und des dazwischen liegenden Introns zusammen. Die Gelelektrophorese des Amplifikationsproduktes der cDNA aus menschlichem Gehirngewebe zeigte zwei Banden mit den Größen von 974 und 390 bp. Hierbei beschreibt die Bande mit der Größe von 390 bp die amplifizierte Sequenz der Exons 2 und 3 ohne das dazwischen liegende Intron. Die 974 bp Bande könnte durch eine nicht vollständig eliminierte gDNA hervorgerufen sein. Allerdings wurde die 974 bp Bande auch mit unabhängigen und kommerziellen cDNA-Proben erhalten. Es ist daher auch möglich, dass es sich bei dieser Bande um eine alternative Transkriptionsvariante handelt, bei der das zwischen den Exons 2 und 3 liegende Intron nicht gespleißt wird. Zusätzlich konnte eine schwache Bande bei ca. 800 bp im Amplifikationsprodukt der cDNA aus dem Gehirn identifiziert werden. Bei dieser Bande handelt es sich wahrscheinlich um eine weitere Transkriptvariante von *BC038758*. Laut der Datenbank UCSC ist im dritten Exon eine mögliche Splice-Stelle vorhanden, die jedoch kein Intron flankiert. Wird nun nicht das zweite Intron des Transkripts *BC038758*

herausgeschnitten sondern die Sequenz, die von den Splice-Stellen der Intron-/Exon-Grenze sowie der vermutlichen Splice-Stelle innerhalb des dritten Exons flankiert ist, so würde das Amplikon nach der PCR mit den oben beschriebenen Primern eine Länge von 878 bp aufweisen. Im Gehirn, welches lebenswichtige Funktionen steuert, wird bei vielen Genen durch alternatives Splicen die Genexpression an die aktuellen Bedürfnisse angepasst. Um die Länge und Zusammensetzung des alternativen Spliceprodukts zu klären, müsste die Bande bei ca. 800 bp aus einem Agarosegel ausgeschnitten, gereinigt und sequenziert werden.

Der Nachweis des Transkripts *BC038758* im menschlichen Gehirn ist mit der Hypothese vereinbar, dass zwischen dem Transkript *BC038758* und der Expression des *LINGO1* Gens ein Zusammenhang besteht, wodurch dem Transkript *BC038758* eine Rolle in der Pathogenese des ET zukommen könnte. Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Transkriptvarianten von *BC038758* muss in sich an diese Arbeit anschließenden Studien untersucht werden. Durch die fehlende Expression in peripheren Blutlymphozyten sind Genotyp-assoziierte Expressionsstudien mit ET-Patienten leider sehr eingeschränkt, da nur sehr wenige Gehirne von ET Patienten weltweit verfügbar sind.

#### **4.2.3.3 Sequenzierung des Transkriptes *BC038758***

***Können potentiell relevante Polymorphismen in einer Exon-Sequenzierung eines im *LINGO1* Gen gelegenen Transkripts identifiziert werden?***

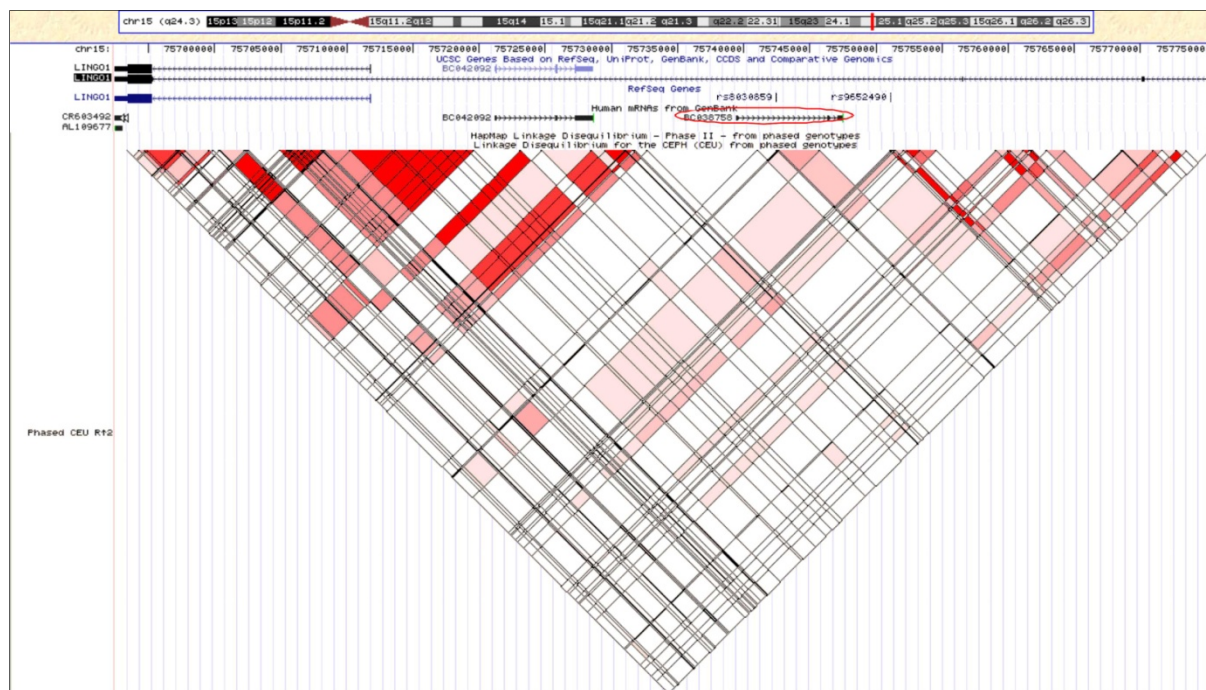
Nach der Bestätigung der Transkription von *BC038758* im humanen Gehirngewebe, wurden die drei Exons bei 95 Fällen und 96 Kontrollen sequenziert. Alle in der Sequenzierung detektierten SNPs kamen in maximal vier Individuen vor. Die bereits vorher bekannten SNPs rs73457840 und rs5872723 besitzen laut dbSNP Datenbank eine Frequenz des seltenen Allels (*minor allele frequency*, MAF) von 0,045 bzw. 0,26. Über die Allelfrequenzen der anderen in der Sequenzierung detektierten SNPs können keine Angaben gemacht werden. Die Häufigkeit ihres Vorkommens in der untersuchten Stichprobe von 95 Fällen und 96 Kontrollen lässt jedoch eine  $MAF < 0,04$  vermuten. Die Wahrscheinlichkeit für die Detektion einer signifikanten Assoziation bei einer Nachverfolgung der drei seltenen SNPs in der deutschen Stichprobe der *LINGO1*-Assoziationsstudie ist aufgrund der kleinen MAF und der relativ kleinen Assoziationsstichprobe daher gering. Bei einer MAF von 0,04 und bei einer OR von 1,3 bis 1,7 beträgt die statistische

Teststärke zwischen 3 und 14 %. Hingegen steigt die Teststärke bei rs5872723 (MAF = 0,26) auf 72 % bei einer angenommenen OR von 1,7.

Die funktionelle Relevanz der detektierten SNPs des Transkripts *BC038758* ist nicht bekannt, da wenig über die genetische Struktur sowie die Funktion des Transkripts bekannt ist. Die Sequenz der mRNA von *BC038758* beginnt nicht mit dem Startcodon (AUG) der Translation. Das nächste Startcodon ist einige Nukleotide (in 3'- oder 5'-Richtung) von dem Beginn der mRNA Sequenz entfernt. Auch konnte in der Umgebung der AUG-Startcodons in der Sequenz der mRNA sowie in den 100 bp 5' davon keine Kozak-Konsensus-Sequenz gefunden werden. Daraus ergeben sich Fragen zum Leseraster und daraus folgend zu der Aminosäuresequenz. Durch das unbekannte Leseraster kann schlecht abgeschätzt werden ob ein SNP synonym oder nicht-synonym ist. Unter Verwendung der angegebenen Sequenz der mRNA und unter der Annahme dass der Beginn der Sequenz auch der Beginn des Leserasters ist, hätten die exonischen SNPs rs5872723, rs73457843 und *BC038758\_4* eine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz und somit auf das eventuell kodierte Protein. So würde z.B. der Austausch des C Allels gegen ein T Allel bei dem SNPs rs5872723 einen Aminosäureaustausch von Threonin zu Isoleucin bewirken. Die HapMap Daten konnten keine Korrelation dieses SNPs mit dem SNP (rs8030859) zeigen, welcher das höchste Assoziationssignal in der deutschen Stichprobe der *LINGO1*-Assoziationsstudie aufwies. Jedoch liegen der SNP rs8030859 und der SNP rs9652490 aus der isländischen GWAS-Studie (Stefansson *et al.*, 2009) in LD mit einem möglicherweise nicht-synonymen SNP (rs73457843) in Exon 3 von *BC038758*. Das seltene Allel von SNP rs73457843 trat in vier der sequenzierten Patienten, aber bei keiner der sequenzierten Kontrollen auf. Träger dieser Variante würden statt für die Aminosäure Cystein für Arginin kodieren. Die intronischen SNPs haben zwar keinen direkten Einfluss auf die Proteinstruktur, können aber indirekt wirken, indem sie Splicing-Prozesse beeinflussen oder eine Änderung von Bindestellen für regulatorische Elemente bewirken können. Jedoch wäre es möglich, dass die mRNA von *BC038758* nicht für ein Protein kodiert sondern eine regulatorische Funktion z.B. bei der Expression des *LINGO1* Gens besitzt. Dafür sprechen die zum *LINGO1* entgegengesetzte Leserichtung des Transkripts sowie die relativ kleine Größe von 661 bp ohne Introns. Die Länge von ca. 8 Mb inklusive der Introns des Transkripts lässt aber auch eine Funktion als kleine RNA (z.B. miRNA, siRNA) ausschließen, die lediglich eine Länge um die 20 bp aufweisen. Auch konnte die Nutzung verschiedener Vorhersageprogramme (ExpASy Proteomics Server, SMART



und Phyre) für Proteine und deren Domänen und Funktion auf kein funktionelles Protein deuten (Kelley & Sternberg, 2009, Schultz *et al.*, 1998, Wilkins *et al.*, 1999). Zudem finden sich in der Sequenz der mRNA viele Stopcodons, was zusätzlich gegen die Funktion von *BC038758* als proteinkodierendes Transkript spricht.



**Abbildung 4-3: Genomische Region des *LINGO1* Gens.**

Darstellung der Lokalisation der assoziierten SNPs rs8030859 und rs9652490 in Zusammenhang mit den verschiedenen Varianten des *LINGO1* Gens sowie der antisense Transkripte *BC038758* und *BC042092* und unter Betrachtung der LD-Struktur.

Die Sequenzierung aller fünf Exons des *LINGO1* Gens durch Stefansson *et al.* (2009) sowie der drei Exons des Transkripts *BC042092* durch uns konnte keinen SNP finden, der den SNP rs9652490 mit dem stärksten Assoziationssignal dieser Studie unterstützt (Stefansson *et al.*, 2009). Die Sequenzierung der Exons des *LINGO1* Gens erfolgte in 93 isländischen Patienten und ist somit vergleichbar mit unserer Stichprobe. Die Gruppe um Vilarino-Guell *et al.* sequenzierte ebenfalls die fünf Exone von *LINGO1* in 95 ET-Patienten (Vilarino-Guell *et al.*, 2010). Drei der sechs neu detektierten SNPs wurden in zwei kleinen Familien mit ET-Betroffenen und in einer Familie mit an ET und MP erkrankten Personen genotypisiert, wobei keine Segregation des seltenen Allels beobachtet werden konnte. Die anderen drei neu detektierten SNPs sowie die fünf gefundenen bekannten SNPs wurden wegen der geringen Frequenz nicht weiter betrachtet. Somit

konnten durch die Sequenzierungen der verschiedenen Arbeitsgruppen seltene SNPs (MAF < 0,16) gefunden werden, jedoch keine Assoziation dieser SNPs mit dem ET gezeigt werden. Auch in der vorliegenden Studie wurden seltene neue und bekannte SNPs bei der Sequenzierung detektiert. Im Gegensatz zu den beiden erwähnten Studien, wurde das in der Region der langen *LINGO1*-Variante gelegene Transkript *BC038758* sequenziert. Das Risiko der in der im Transkript *BC038758* gefunden SNPs wurde aufgrund der geringen Frequenzen des seltenen Allels noch nicht weiter evaluiert. In Abbildung 4-3 ist die genetische Region des *LINGO1* Gens dargestellt. Funktionelle Studien zum *LINGO1* Protein beschreiben immer das Protein, welches von der kurzen Variante kodiert wird. Im Gegensatz zu der kurzen *LINGO1* Variante liegt das Transkript *BC038758* in einer Region mit schwacher LD-Struktur. Es ist davon auszugehen, dass mehrere SNPs das Assoziationssignal der ursprünglichen Risikovariante unterstützt hätten, wenn diese in der starken LD-Region der kurzen Variante lokalisiert wäre. Hingegen sprechen die wenigen SNPs, die eine Assoziation aufzeigten und in der Region des schwachen LDs lokalisiert sind für eine Lokalisation der Risikovariante in dem Bereich des schwachen LDs und des Transkripts *BC038758*.

### 4.3 Limitierungen dieser Arbeit

Bei dem Studiendesign von Kopplungs- und Assoziationsstudien von Erkrankungen wie dem ET, beim dem die sporadische Form genetisch komplex ist, während die familiären Patienten wahrscheinlich ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster, bzw. eine noch nicht bekannte Art der Vererbung des Phänotyps zeigen, müssen einige Besonderheiten, die zu Limitierungen führen können, beachtet werden. Zu den methodischen Einflussgrößen genetischer Studien zählen die Populationsstratifizierung, eine ungenügende genetische Abdeckung durch die Marker und das multiple Testen. Die Heterogenität komplexer Erkrankungen hat enorme Auswirkungen auf die Teststärke sowie auf die Replizierbarkeit von positiven Befunden. Besonders wichtig für eine ausreichende statistische Teststärke ist ein ausreichend großer Umfang der Patienten- und Kontrollstichproben bei der Untersuchung der sporadischen Form. Die notwendige Stichprobengröße hängt vor allem von der erwarteten Effektstärke ab. Bei der Untersuchung der familiären Form mit postulierter monogener Genese ist es wünschenswert Familien zur Verfügung zu haben, die auch in der Analyse der Einzelfamilien einen signifikanten LOD-Wert

generieren können. Dies ist aber leider häufig bei dem ET nicht möglich. Die Identifizierung großer Familien kann durch eine späte Krankheitsmanifestation limitiert sein, da die Eltern der Patienten meist bereits verstorben sind und die Kinder in einem Alter sind, in dem die Krankheit sich noch nicht manifestiert. Des Weiteren sind eindeutige Diagnosekriterien sowie gut charakterisierte Probanden für einen Erfolg der Kartierung von Suszeptibilitätsgenen notwendig.

### 4.3.1 ET-Diagnose als Fehlerquelle

Epidemiologische Studien zum ET sind kritisch zu betrachten, da es bislang keine allgemein akzeptierten Kriterien zur absolut sicheren Identifizierung des ET gibt (Findley, 2000) und die Diagnose ET wahrscheinlich zu häufig gestellt wird (Jain *et al.*, 2006). Dies beruht am ehesten auf einer fehlerhaften diagnostischen Zuordnung anderer Tremorformen zum ET. Eine Fehldiagnose kann zu falsch-positiven (ET wird diagnostiziert obwohl der Patient keinen ET hat) oder falsch-negativen (der ET wird bei dem Patienten nicht festgestellt) Befunden führen. Da neben der klinischen Untersuchung keine robusten Diagnose-Parameter existieren, ist vor der Diagnosestellung der Ausschluss symptomatischer Ursachen wie z.B. einer Schilddrüsenfunktionsstörung oder einer Medikamentennebenwirkung (z.B. Lithium) zu fordern. Optimal ist die einmalige Anfertigung einer cerebralen Magnetresonanztomographie (cMRT) zum Ausschluss von symptomatischen Ursachen. Einige seltene, spät auftretende Erkrankungen können in der Frühphase aufgrund eines dem ET-Tremor ähnlichen Bildes mit diesem verwechselt werden. Hierzu zählt z.B. das fragile X-assoziierte Tremor-/Ataxie-Syndrom (FXTAS), das aber in den meisten Fällen Veränderungen (z.B. Leukencephalopathie) in der cMRT zeigen. Die häufigste Ursache einer falsch-positiven ET-Diagnose ist der Morbus Parkinson (MP) mit Auftreten eines posturalen Tremors (Jain *et al.*, 2006). Bei Zweifeln an der klinischen Diagnose kann die Anfertigung eines DAT-Scans (bildgebende Methode, mit der die Dopamin-freisetzenden Nervenzellen dargestellt werden) helfen, der bei ET Patienten im Gegensatz zu Patienten mit einem Morbus Parkinson einen Normalbefund ergibt (Kagi *et al.*). Weitere Differentialdiagnosen, die in Betracht zu ziehen sind, sind der dystone Tremor und der verstärkte physiologische Tremor. Dabei erscheint der dystone Tremor meist irregulärer und kann durch eine sogenannte „Geste antagonistische“ unterbrochen werden (Lorenz & Deuschl, 2007). Eine genetische Verbindung zwischen dem ET und den ihm ähnelnden Erkrankungen konnte bislang nicht gezeigt werden. Studien zu den kausativen Genen von MP, Dystonie und

dem FXTAS zeigten keine Assoziation zum Phänotyp des ET (Clark *et al.*, 2009, Keeling *et al.*, 2009b, Ledesma *et al.*, 2008, Tan *et al.*, 2008a, Tan *et al.*, 2000, Xiao & Zhang, 2006). Eine eindeutige Diagnose wird auch durch das teilweise parallele Auftreten von MP und ET erschwert (Rocca *et al.*, 2007, Spanaki & Plaitakis, 2009), was sich in den Diagnosekriterien widergespiegelt (TRIG Kriterien siehe Abschnitt 1.1.2). Bei einer zusätzlich vorhandenen neurologischen Erkrankung kann die Diagnose eines definitiven bzw. wahrscheinlichen ET nicht gestellt werden (Findley & Koller, 1995). In der Literatur sind aber auch falsch-negative Befunde beschrieben. So kann z.B. der größte Anteil an den Fehldiagnosen eines MP dem ET zugeschrieben werden (Meara *et al.*, 1999). Da der ET in seinem Phänotyp sehr heterogen ist, kann der Tremor auch den Tremores (Ruhetremor, dystone Tremor, etc.) anderer Bewegungsstörungen (MP, Dystonie, Ataxie, etc.) ähneln.

Die Diagnose muss sehr sorgfältig erfolgen, da gut charakterisierte Probanden für den Erfolg genetischer Studien unabdingbar sind. Der heterogene Phänotyp des ET, insbesondere das Alter bei Krankheitsbeginn, vorhandene Familienanamnese, Tremor-Schweregrad, -Lokalisation und die Alkoholsensitivität müssen für eventuelle Untergruppenanalysen ausreichend dokumentiert werden. In den hier vorliegenden Studien erfolgte die Diagnose aller Patienten nach den weithin anerkannten Konsensuskriterien der *Tremor Investigation Group* (TRIG) (Findley & Koller, 1995). Alle Subphänotypen wurden dokumentiert und für spätere Untergruppenanalysen wie zum Beispiel die der Patienten mit positiver Familienanamnese verwendet. Im Vergleich zu falsch positiv diagnostizierten Patienten sind falsch negativ diagnostizierte Patienten bei Assoziationsstudien komplexer Krankheiten ein geringeres Problem, da diese Personen nicht in die Patientengruppe eingeschlossen werden. Falls – was sehr unwahrscheinlich ist - sehr viele Personen falsch negativ diagnostiziert werden und diese ein genetisch bedingtes Merkmal aufweisen, das bei den Kontrollpersonen in ungefähr gleichem Anteil vorkommt, so kann es, da diese Personen in der Kontroll- aber nicht der Patientenstichprobe eingeschlossen wurden, allerdings zu einer unerkannten Stratifizierung der Stichprobe kommen (Abschnitt 4.3.3). Diese kann zu falschen Assoziationsbefunden führen, da echte genetische Assoziationen mit diesem unbekanntem Merkmal fälschlich als Assoziation mit der Krankheit fehlgedeutet werden. Viel gravierender sind Fehldiagnosen bei der Untersuchung von Familien mit vermutet monogener Krankheitsursache, da hier falsch positiv diagnostizierte Patienten einer Phänokopie entsprechen, während falsch negativ diagnostizierte Patienten einem Fall fehlender Penetranz entsprechen.

### 4.3.2 Statistische Teststärke

Die statistische Teststärke gibt an wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass die Nullhypothese (keine Assoziation) verworfen wird, so dass die Alternativhypothese (vorhandene Assoziation) anzunehmen ist. Die Teststärke wird angegeben als  $1-\beta$ , wobei  $\beta$  den Fehler 2. Ordnung (Falsch-Negativ-Entscheidung) darstellt. Dabei besteht eine positive Korrelation von der Teststärke mit dem Signifikanzniveau, der Risikoallelfrequenz sowie dem Stichprobenumfang und eine negative Korrelation mit der Effektstärke (OR) und dem Fehler 2. Ordnung. So muss eine genügend große Anzahl an Probanden vorhanden sein, um eine echte Assoziation von einer genetischen Variante mit dem Phänotyp mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch wirklich nicht zu übersehen (Fehler 2. Ordnung). Bei komplexen Erkrankungen, die durch eine Vielzahl von Risikofaktoren mit geringen Effekten gekennzeichnet sind, stellt sich das Problem, dass sehr große Stichproben benötigt werden, um die nötige Teststärke für die Detektion dieser Effekte aufbringen zu können. In Abhängigkeit von der Allelfrequenz werden in vielen Fällen mindestens 500 Fälle und idealer Weise doppelt so viele Kontrollen benötigt, um bei komplexen Erkrankungen genetische Assoziation detektieren zu können (Long & Langley, 1999). Die Studien des *Wellcome Trust Case-Control Consortium* (WTCCC) zeigten jedoch, dass Stichproben mit ca. 10000 Individuen erforderlich sind um moderate Effekte (*odds ratio* [OR] 1,1-1,5) mit hoher Sicherheit zu detektieren (Cardon & Bell, 2001). Je kleiner die untersuchte Stichprobe und je niedriger die Frequenz des seltenen Allels, desto höher ist das Risiko, eine echte Assoziation zu übersehen. Zur Anreicherung von Risikovarianten ist es zum Teil sinnvoll die Fallstichprobe in verschiedene Subphänotypen zu unterteilen. Dadurch kann trotz der verringerten Probandenanzahl eine Steigung der statistischen Teststärke erreicht werden, da man hypothetisch die genetische Heterogenität der Krankheit in der Stichprobe reduziert. Bei einer Krankheit mit einer hohen Heritabilität wie dem ET sind genetische Assoziationen mit einer OR im Bereich von 1,5 bis 2,0 zu erwarten (Hemminki *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit verwendeten deutschen Stichprobengrößen ermöglichen bei einer Teststärke von 80 % und einer Allelfrequenz des seltenen Allels von 30 % die Detektierung von OR von etwa 1,5. Es ist daher zu berücksichtigen, dass echte Suszeptibilitätsfaktoren mit niedrigen Allelfrequenzen (<30 %) und einem relativen Risiko kleiner als 1,5 verpasst worden sein könnten.

Die Schätzung der Teststärke von Kopplungsstudien erfolgt durch die Berechnung der maximal möglich erreichbaren LOD-Werte mit einer gegebenen Familienstruktur. Als Informationen aus der Familienstruktur fließen die Anzahl der möglichen Rekombinationsereignisse sowie die Anzahl der Phänotyp-tragenden Mitglieder in der untersuchten Familie oder des Familienkollektivs ein. Die Kopplungsstudien im Rahmen dieser Arbeit unter der Verwendung des gesamten Kollektivs von 20 oder sechs (GWKS) Familien europäischer Herkunft wiesen eine Teststärke für das Erreichen von signifikanter Kopplung ( $LOD_{max} > 3.3$ ) auf. Die Berechnung der Teststärke der separat analysierten Familien (GWKS) zeigte aufgrund der geringen Anzahl an Generationen und (am ET erkrankten) Mitgliedern leider nur die Möglichkeit zur Identifizierung von wahrscheinlicher Kopplung ( $1,9 < LOD_{max} < 3,3$ ). Bei der parametrischen Kopplungsanalyse wird zusätzlich ein genetisches Modell verwendet, welches durch die Schätzung der Risikoallelfrequenz und der Penetranzen Auskunft über den Vererbungsmodus gibt (Boehnke, 1986, Ott, 1999). Unter einem falsch angenommenen genetischen Modell kann die Teststärke drastisch sinken. Die Stammbäume der hier verwendeten Familien sprechen für eine autosomal-dominante Vererbung des ET. Deshalb wurde wie bei den meisten Kopplungsstudien zum ET von einer hohen, jedoch nicht vollständigen Penetranz sowie dem Vorkommen von Phänokopien ausgegangen (z.B. (Gulcher *et al.*, 1997, Higgins *et al.*, 1998)). Wobei sich die Annahme von niedrigen Penetranzraten sowie hohen Phänokopieraten negativ auf die Teststärke auswirkt (Kruglyak *et al.*, 1996). Die Chancen für die Detektion von Kopplung erhöhen sich bei möglichst vielen Rekombinationen (große Familien mit mehreren Generationen) und einem möglichst homogenen Familienkollektiv. Jedoch kann ein Studienkollektiv aus mehreren Familien und aus unterschiedlichen geographischen Regionen (in diesem Fall Deutschland, Dänemark und Frankreich) bei einer genetisch heterogenen Erkrankung wie dem ET die Teststärke limitieren (Abschnitt 4.3.3). Je mehr Familien bei Kopplungsstudien verwendet werden, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass aufgrund der Locus-Heterogenität nicht die Segregation eines Risikohaplotyps angereichert wird, sondern vieler verschiedener Haplotypen und so die Teststärke nicht ausreichend ist um eine aussagekräftige Kopplung zu detektieren. Um die Heterogenität der Stichprobe möglichst gering zu halten, ist es angebracht bei ausreichender Größe der Familien, diese sowohl gemeinsam als auch separat zu untersuchen.

Die meist negativen LOD-Werte der PL, der hier untersuchten Projekte, lassen jedoch die Verwendung eines falschen genetischen Modells vermuten. Diese Vermutung wird durch die stets höheren LOD-Werte der NPL unterstützt. Die NPL verwendet für die Berechnungen keine genetischen Modelle und weist somit eine höhere Teststärke für die Untersuchung von Krankheiten auf, die keinem einfachen Mendelschen Vererbungsmodus unterliegen (Kruglyak *et al.*, 1996). Solche meist komplexe Krankheiten sind durch eine gewisse genetische und phänotypische Heterogenität gekennzeichnet (Chiu *et al.*, 2002). Die Heterogenität hat einen negativen Effekt auf die Teststärke. Jedoch kann die Betrachtung eines Subphänotyps bei der Analyse die Teststärke durch eine eventuelle Anreicherung des Risikohaplotyps erhöhen.

### 4.3.3 Populationsstratifizierung

Die Populationsstratifizierung (PS) stellt eine systematische Störvariable bei Fall-Kontroll-Assoziationsstudien da. Sie tritt auf, wenn die untersuchte Stichprobe aus zwei oder mehr unerkannten Untergruppen mit unterschiedlichen Allelfrequenzen und Krankheitsrisiken besteht. Die genetischen Unterschiede innerhalb einer Stichprobe können durch eine Durchmischung von genetisch verschiedenen Subpopulationen hervorgerufen werden (mit unterschiedlichen sozialen, religiösen und ethnischen Strukturen). Das Fehlen einer zufälligen Partnerwahl kann zu unterschiedlichen und nicht bekannten Gründereffekten führen (Cavalli-Sforza & Piazza, 1993). PS kann falsch-positive Testergebnisse hervorrufen, ohne dass ein biologischer Zusammenhang zwischen Marker und Krankheit besteht, geringe Effekte verstärken oder wahre Assoziation maskieren (Heiman *et al.*, 2004). Um das Risiko des Vorkommens von PS zu verringern, können verschiedene Strategien angewendet werden. Es sollte bei der Rekrutierung der Probanden (Fälle und Kontrollen) darauf geachtet werden, dass möglichst wenig Heterogenität in Bezug auf Herkunft, Phänotyp und Alter besteht. Es sollten nicht nur Fälle und Kontrollen untereinander möglichst wenig heterogen sein, sondern ist es auch von Vorteil, wenn die Kontrollen speziell auf die Fälle abgestimmt sind (Lee, 2004). Verschiedene statistische Tests wurden entwickelt, um PS bei Assoziationsstudien aufzudecken und geeignet zu korrigieren. Eine der gebräuchlichsten Methoden ist die Verwendung von genomischen Kontrollen (Devlin & Roeder, 1999). Hierbei werden zahlreiche zusätzliche Marker, die möglichst nicht mit dem Phänotyp assoziiert sind, genotypisiert und damit der Varianzinflationsfaktor  $\lambda$  berechnet. Mit  $\lambda$  als

Korrekturfaktor kann die Verteilung der Teststatistik für PS adjustiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Vermeidung von PS bei der Kartierung von Krankheitsgenen kann die Anwendung von Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT) oder Kopplungsanalysen darstellen. Das TDT-Verfahren ist eine Form der Assoziationsanalyse, bei der die Segregation des Risikoallels in Kernfamilien (Trios) nach der Ähnlichkeit der Markerallele bei Verwandten 1. Grades (*identical by state*; IBS) beobachtet wird. Da die hier verwendeten Kontrollen, aus den nicht erkrankten Eltern bestehen, ist die Wahrscheinlichkeit der PS sehr gering. Kopplungsanalysen sind für eine PS nicht anfällig, solange einzelne Familien untersucht werden. Sobald das Studienkollektiv aber aus mehreren Familien besteht, die gemeinsam analysiert werden, kommt das Problem der PS wieder zum Tragen, insbesondere bei unterschiedlicher ethnischer und geographischer Herkunft. Die in der dieser Arbeit für die Kopplungsstudien verwendeten Familien stammen aus Nord-Deutschland, Dänemark und Frankreich. Es konnte gezeigt werden, dass die Populationen in Nord-Europa untereinander genetisch relativ homogen sind (Lao *et al.*, 2008). Jedoch nimmt diese genetische Vielfalt mit der geographischen Distanz zu und ist somit zwischen Frankreich und Nord-Deutschland/Dänemark nicht mehr zu vernachlässigen. Selbst innerhalb Frankreichs ist ein Gradient in der genetischen Diversität zu beobachten (Lao *et al.*, 2008). Da in dieser Arbeit bei den Kopplungsstudien keine Rücksicht auf die geographische Herkunft genommen wurde, kann das Ausbleiben von signifikanter Kopplung der einzelnen untersuchten Loci zum ET in dem gesamten Stichprobenkollektiv durch PS verursacht sein. Um PS zu vermeiden, ist es sinnvoll auf eine möglichst homogene Stichprobe zurückzugreifen. Eine homogene Stichprobe ist idealer Weise eine große Familie über mehrere Generationen. Auch kann eine homogene Stichprobe aus mehreren Familien bestehen, die auf den gleichen genetischen Hintergrund zurückzuführen sind und somit keiner PS unterliegen. Dafür eignen sich Familien, die historisch betrachtet aus einer geographisch (z.B. Inselbevölkerung) oder ethnisch (z.B. Amische) isolierten Regionen stammen. So konnte Gulcher mit der Analyse von 16 isländischen Familien die Kopplung vom ET mit dem *ETM1*-Locus detektieren (Gulcher *et al.*, 1997). Die isländische Bevölkerung wird gerne aufgrund ihrer genetischen Ähnlichkeit für genetische Studien für die Kartierung von Krankheitsgenen herangezogen (Gulcher & Stefansson, 1998). Island wurde im 9. Jahrhundert von den Wikingern bevölkert und seither leben die Isländer geographisch isoliert. Zusätzlich haben Naturkatastrophen wie Hungersnöte oder Seuchen die Bevölkerungszahl immer wieder drastisch



reduziert, so dass die jetzige Bevölkerung von wenigen Urmüttern und Urvätern abstammt. Bei genetischen Analysen ist diese reduzierte genetische Heterogenität bei der Identifizierung von Assoziation oder Kopplung von Vorteil.

#### **4.3.4 Multiples Testen, falsch-positive Ergebnisse und Signifikanzschwellen**

Eine Störgröße beim statistischen Testen stellen Fehler der 1. Ordnung (falsch-positive Ergebnisse) dar. Falsch-positive Ergebnisse treten auf, wenn die Nullhypothese zurückgewiesen wird, obgleich sie wahr ist. Fehler der 1. Ordnung nehmen mit der Anzahl der Tests zu, da umso mehr Marker getestet werden, die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass die erhaltene Signifikanz ( $P < 0,05$ ) durch zufällige Fluktuation auftritt. Obwohl kein universeller Grenzwert für die statistische Signifikanz festgelegt werden kann, so bietet jedoch die Bonferroni-Korrektur eine Möglichkeit die Fehler der 1. Ordnung zu minimieren. Bei dieser Korrektur wird das Signifikanzniveau  $\alpha$  für  $k$  Tests korrigiert ( $\alpha/k$ ). Eine stringente Korrektur der Fehler erster Ordnung zieht aber eine Zunahme der Fehler zweiter Ordnung mit sich. Bei Assoziationsanalysen kann diese sehr stringente Form der Korrektur daher dazu führen, dass beim Testen von vielen Markern z.B. bei GWAS, tatsächlich vorhandene Assoziation nicht mehr detektiert werden. Aus diesem Grund wird die Untersuchung einer hohen Anzahl von Marker oft als hypothesengenerierender Schritt angesehen. Um falsch-positive Assoziation von Markern, die in der ersten Stufe nominal signifikant mit dem Phänotyp assoziiert waren, auszuschließen, müssen diese in einer zweiten Stufe verifiziert und in einer dritten Stufe repliziert werden. Bei der Nachverfolgung der Marker in einer zweiten und dritten Stufe ist eine Bonferroni-Korrektur unumgänglich. Bei Kopplungsstudien hingegen gibt es allgemein gültige Signifikanzschwellen für die LOD-Werte, Zmeans und die p-Werte (Abschnitt 2.9.1.1), die die Korrektur für multiples Testen schon beinhalten, um Fehler der 1. Ordnung zu vermeiden.

#### **4.3.5 Replizierbarkeit der Suszeptibilitätsfaktoren heterogener Erkrankungen**

Aufgrund der großen Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen, speziell bei unzureichender Korrektur für multiples Testen, ist eine Replikation positiver Ergebnisse von

Kopplungs- oder Assoziationsanalysen in einer unabhängigen Stichprobe unerlässlich. Jedoch wird eine positive Replikation dadurch erschwert, dass das Testergebnis der ersten Studie überschätzt wird, da es meist einer Verzerrung unterliegt. Dieser Studienbias wird hervorgerufen durch zufällige Schwankungen in der Allelverteilung, wodurch schwache Effekte die Signifikanzgrenze erreichen können und stärkere Effekte unterhalb der Signifikanzgrenze liegen bleiben (Hirschhorn, 2005, Lander & Kruglyak, 1995). Weiterhin wird die Wahrscheinlichkeit einer positiven Replikation durch den moderaten Risikobeitrag der Suszeptibilitätsfaktoren, durch Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen und durch eine zu geringe Teststärke des Studiendesigns sowie durch den Einfluss von unterschiedlichen genetischen Varianten in verschiedenen Populationen, negativ beeinflusst. Dadurch lassen sich die zahlreichen unterschiedlichen und scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse für den ET (und andere komplexe Erkrankungen) erklären.

## 4.4 Schlussfolgerungen

### 4.4.1 Kopplungsanalysen zum ET

***Kann diese Studie neue Aufschlüsse über die Genetik des ET und dem Vererbungsmuster des ET liefern?***

Die Stammbäume der Familien, in denen der ET gehäuft vorkommt, lassen einen autosomal-dominanten Erbgang vermuten. Die wenigen bisher bekannten Kopplungsbefunde zum ET wurden auch unter monogenen Modellannahmen mit reduzierter Penetranz und dem Vorhandensein von Phänokopien erhalten (Gulcher *et al.*, 1997, Higgins *et al.*, 1998, Kovach *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit hingegen erzielte die PL unter diesen Annahmen konstant schlechtere Ergebnisse als die NPL (ohne genetischem Modell). Aber auch die Änderungen der Parameter konnten die LOD-Werte der PL nicht in mit der NPL vergleichbare Bereiche steigen lassen (Daten nicht gezeigt), was an einer zu geringen Teststärke aufgrund von zu niedrigen Penetranzen und zu hohen Phänokopieraten im genetischen Modell gelegen haben könnte. Zusätzlich scheinen die Kopplungssignale in mehreren genomischen Regionen bei der separaten Analyse in einzelnen Familien auf eine gewisse intra-familiäre Heterogenität und somit auf eine oligogene Vererbung zu deuten. Auch in anderen Studien wurde das Vorhandensein von anderen

Vererbungsmustern diskutiert (Louis *et al.*, 2001a, Louis *et al.*, 2001b, Ma *et al.*, 2006). Da Kopplungsbefunde für den ET nur selten repliziert werden konnten, sollte auch eine andere, nicht einfach mendelnde Vererbung in Betracht gezogen werden. So könnte in den Familien ein Hauptgen ein monogenes Erscheinungsbild in den ET-Familien hervorrufen und andere Gene mit geringerem Risiko bei der Entstehung des Phänotyps mitwirken. Dieser Vererbungsmodus liegt an der Grenze zwischen monogenem und polygenem. Alternativ kann es auch sein, dass verschiedene Patienten in derselben Familie klinisch-diagnostisch den gleichen Phänotyp aufweisen, aber tatsächlich zwei biologisch und damit auch genetisch unterschiedliche Krankheiten in derselben Familie vorkommen (Sidransky, 2006, Winkelmann *et al.*, 2008). Dies ist bei einer sehr häufigen Krankheit und einer Krankheit, die schwierig gegen andere Krankheiten abzugrenzen ist wie dem ET natürlich wesentlich wahrscheinlicher als bei einer seltenen Krankheit. In einer Studie zum *restless legs syndrom* (RLS) wurde nur die Subgruppe von Patienten mit frühem Krankheitsbeginn (< 32 Jahre) innerhalb einer Familie bei der Analyse als erkrankt eingestuft, wodurch Kopplungssignale erhalten wurden. Die Analyse aller RLS-Phänotyp tragender Individuen hingegen erzielte negative LOD-Werte (Liebetanz *et al.*, 2006). So könnte aber auch eine nicht ausreichend differenzierte Diagnose für die zum Teil hohe Transmission des ET in den Familien verantwortlich sein.

Als Konsequenz der Heterogenität des ET, sollte in weiteren Kopplungsstudien auf ein einheitliches Familienkollektiv, in dem alle Patienten sorgfältig auf weitere, biologisch eventuelle wichtige Merkmale wie Manifestationsalter, Schwere des Tremors, Alkoholsensitivität und andere Krankheitsparameter untersucht wurden, verwendet werden. Eine getrennte Analyse von Familien unterschiedlicher geographischer Herkunft erscheint sinnvoll. Als weitere Analysemethode könnte in anschließenden Studien ein parametrisches Modell verwendet werden, welches Imprinting berücksichtigt (Strauch *et al.*, 2000), da eventuell Faktoren beim ET beteiligt sein könnten, die unter einer epigenetischen Kontrolle stehen. Bei der genomweiten Kopplungsstudie sollten abschließend alle Loci mit positiven Kopplungssignalen mit zusätzlichen Markern untersucht werden, um Kopplung zu festigen oder auszuschließen. Desweiteren könnte bei möglichen vielversprechenden Loci eine Aufstockung des Kollektivs helfen.

## 4.4.2 Assoziationsanalysen zum ET

Assoziationsstudien weisen bei der Identifizierung von Risikofaktoren komplexer Erkrankungen höhere Teststärken auf als Kopplungsstudien. Laut der „*common disease, common variant*“ Hypothese werden häufige Krankheiten durch Varianten mit hoher Allelfrequenz verursacht (Reich & Lander, 2001). Jede der Varianten hat einen additiven oder multiplikativen kleinen Effekt auf den Krankheitsphänotyp. Im Gegensatz dazu steht die „*common disease, rare variant*“ Hypothese, die polygene Volkskrankheiten durch das Auftreten von vielen seltenen genetischen Varianten erklärt, die einen starken Effekt haben und in Wechselwirkung mit der Umwelt stehen (Pritchard, 2001). Jedoch sind Assoziationsstudien eigentlich nur für die Identifizierung von häufigen Varianten, wie bei der „*common disease, common variant*“ Hypothese ausgelegt. Für seltene Varianten mit Allelfrequenzen  $< 10\%$  ist trotz der vermuteten großen Effekte die Teststärke von Assoziationsstudien zu gering. Die bisher verwendeten Stichprobengrößen hatten lediglich eine Teststärke für die Detektion von sehr starken Effekten bei Allelfrequenzen im Bereich von  $\geq 30\%$ , wie die einzelnen Studien zeigten. Zur Detektion sehr seltener Allele sind Assoziationsstudien prinzipiell, selbst bei sehr starken Effekten kaum geeignet, da z.B. bei einer Allelfrequenz von  $1/1000$  eine Stichprobe von 10.000 Patienten erforderlich wäre, um auch nur 10 Träger der Variante zu finden. Allerdings ist es durchaus möglich, dass verschiedene seltene Varianten mit starkem Effekt auf die Pathogenese einer Krankheit gehäuft in einem Gen auftreten und durch Addition der Varianten über das Gen die Gesamtzahl der Mutationen doch eine statistische Aussage erlaubt. Ein Beispiel aus der Neurologie sind heterozygote Träger von Varianten im *Glucocerebrosidase* Gen. Homozygot verursachen diese Varianten den autosomal rezessiven Morbus Gaucher. Heterozygot sind sie ein starker genetischer Risikofaktor der Parkinson-Krankheit (Sidransky, 2006, Sidransky *et al.*, 2009).

## 4.4.3 Ausblicke

Für die Erhöhung der statistischen Teststärke muss der Stichprobenumfang vergrößert werden. In Zukunft werden phänotypisch unterteilte Subgruppenanalysen in den Assoziationsstudien zum ET immer mehr zunehmen, um die Anreicherung eines Risikoallels zu bewirken. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Stichprobengröße sowie der statistischen Teststärke ist eine sogenannte Metaanalyse, bei der die Daten von übereinstimmenden Markern unterschiedlicher

Kooperationspartner zusammen ausgewertet werden. In Anbetracht der bisherigen Studien zum ET würde für eine Metaanalyse eine Kopplungsstudie zu den *ETM*-Regionen oder eine Assoziationsstudie zum *LINGO1* Gen in Frage kommen. Metaanalysen werden insbesondere mit Daten aus genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) durchgeführt. Mit GWAS konnten in den vergangenen Jahren viele neue genetische Risikofaktoren für komplexe Krankheiten identifiziert werden (McCarthy *et al.*, 2008). Solche genomweiten Assoziationsstudien eignen sich für die Identifizierung von häufigen Varianten mit relativ kleinen Effekten von komplexen Phänotypen (Lander & Kruglyak, 1995, Risch, 2000). Im Anschluss an diese Arbeit steht die Auswertung der Daten von 410 ET-Patienten mit 928 Kontrollen einer GWAS mit dem Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0. Mit dieser hypothesenfreien Assoziationsstudie sollen Risikovarianten für den ET gefunden werden, die nicht in den bisher vermuteten Kandidatengenomen liegen. Nachfolgend sollen die vielversprechendsten SNPs in einer unabhängigen zweiten Stichprobe aus ca. 600 ET-Patienten und 1000 Kontrollen verifiziert werden. Anschließend an diese GWAS könnten diese Daten mit denen der isländischen GWAS (Stefansson *et al.*, 2009) für eine Metaanalyse kombiniert werden.

Der Affymetrix® Array 6.0 enthält zusätzlich mehr als 946.000 Proben zur Detektierung von *copy number variations* (CNV). CNVs werden definiert als DNA-Segmente mit einer variablen Kopienanzahl im Vergleich zu einem Referenzgenom und sind größer als 1 kb (Redon *et al.*, 2006). Die variablen Kopienanzahlen können hierbei durch Deletionen, Insertionen oder Duplikationen hervorgerufen sein. Diese Strukturvariationen resultierte in einer enormen Erhöhung der Komplexität des humanen Genoms, da nicht nur die Zahl der Strukturgene sondern auch deren Regulation betroffen sein kann. Dreizehn Prozent des gesamten Genoms sind von bereits bekannten Duplikationen und Deletionen betroffen. Innerhalb dieser Regionen liegen mehrere tausend Gene, die von CNVs betroffen sein können (Stankiewicz & Lupski, 2010). Die meisten CNVs sind allerdings relativ häufig und es ist bisher nicht bekannt, ob es sich um Suszeptibilitätsfaktoren für komplexe Krankheiten handelt. Seit langem ist bekannt, dass CNVs sporadische Erkrankungen verursachen können. Aber auch bei einem Teil der komplexen Erkrankungen wie z.B. Autismus, Schizophrenie und Epilepsie konnten seltene CNVs in wenigen Patienten und in nicht in den Kontrollen detektiert werden und scheinen eine Auswirkung bei der Entstehung der Erkrankung zu haben (Stankiewicz & Lupski, 2010). Somit könnte die Analyse der CNVs zu der Aufdeckung von Risikovarianten des ET beitragen. Bei der

CNV-Analyse in einer GWAS wird nach seltenen CNVs gefahndet, da davon ausgegangen wird, dass die häufigen CNVs durch SNPs abgedeckt werden.

Für die Identifizierung der kausalen Mutation im Bereich des *LINGO1* Gens, sollten die in den Sequenzierungen der Exone der *LINGO1*-Varianten und von *BC038758* gefundenen Polymorphismen in einer genügend großen Fall-Kontroll-Stichprobe auf Assoziation zum ET getestet werden. Bei außerhalb von Exonen lokalisierten Risikovarianten, kann eine effiziente Re-Sequenzierung von Genen oder chromosomaler Regionen mittels der *next generation sequencing*-Technologien hilfreich sein. Weitere Expressionsstudien sowie *long range sequencing* der mRNA können Aufschlüsse über die genaue Genstruktur in diesem Bereich liefern und vielleicht dazu beitragen die funktionelle Relevanz von *BC038758* zu klären. Die Erzeugung von transgenen Mäusen kann Erkenntnisse über dem ET zugrundeliegenden Pathomechanismus liefern. Diverse Quantifizierungsexperimente zur motorischen Leistung, Genexpression, metabolischen Veränderungen, usw. können zum besseren Verständnis des ET beitragen und somit einen therapeutischen Ansatz bieten. Interessanterweise wurde bei den bisher bestehenden *LINGO1* knockout-Mäusen noch von keinen pathologischen Phänotyp oder gar Tremor-ähnlichen Bewegungsstörungen berichtet (Mi *et al.*, 2005). Desweiteren konnte zwar in funktionellen Studien ein Zusammenhang zwischen *LINGO1* und Multipler Sklerose (MS) sowie PD hergestellt werde, aber in Assoziationsstudien konnte *LINGO1* bisher noch nicht als Risikofaktor bestätigt werden (Bialecka *et al.*, 2010, Edwards *et al.*, 2010, Fung *et al.*, 2006, Haubenberger *et al.*, 2009, Hoffjan & Akkad, 2010, Klebe & Thier, 2010, Pankratz *et al.*, 2009). Lediglich eine amerikanische Gruppe konnte eine Assoziation von *LINGO1* mit dem MP finden (Vilarino-Guell *et al.*, 2009, Vilarino-Guell *et al.*, 2010).

Weitere genetische Faktoren, die einen Einfluss auf die Entwicklung von Krankheiten haben können, sind in der Epigenetik zu finden. Zu den Hauptmechanismen der Epigenetik gehören DNA-Methylierung, Histon-Modifizierung, nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) sowie RNA-Editierung und DNA-Umkodierung. Es ist seit Längerem bekannt, dass epigenetische Mechanismen eine entscheidende Rolle bei der komplexen Regulierung der Genexpression im Gehirn spielen (Mehler, 2008). Für folgende Fragestellungen wäre somit eine Untersuchung der Methylierungsmuster oder der Genexpression von ET-Patienten im Vergleich zu Kontroll-Individuen interessant. Jedoch sind solche Experimente nur an Geweben des ZNS sinnvoll, da

der Ursprung des ET im Gehirn zu liegen scheint. Da es sich hierbei um ein sehr limitiertes biologisches Gut handelt, werden solche Studien in näherer Zukunft wohl noch nicht durchgeführt werden. Als Alternative müssten ET-Tiermodelle verwendet werden.

## 5 Zusammenfassung

Der essentielle Tremor (ET) zählt zu den häufigsten Bewegungsstörungen. Charakteristisch für den ET ist das Auftreten eines unwillkürlichen Aktionstremors, welcher zu einer starken Einschränkung der Lebensqualität führen kann. Der meist sporadische ET weist einen variablen Phänotyp auf und unterliegt einem Zusammenspiel aus polygenen Ursachen und Umweltfaktoren. Darüber hinaus ist eine Reihe von großen Familien bekannt, in denen der ET einer autosomal dominanten Vererbung unterliegen könnte. Aufgrund der Komplexität dieser Erkrankung und der bisher kleinen Studienstichproben, ist noch nicht viel über die genetischen Risikofaktoren des ET bekannt. Die kürzlich erste genomweite Assoziationsstudie für den ET konnte das *LINGO1* Gen als Suszeptibilitätsgen identifizieren. In der vorliegenden Doktorarbeit konnte die Assoziation des *LINGO1* Gens mit dem ET in einer deutschen (rs9652490:  $p = 9,1 \times 10^{-4}$ ) und französischen (rs9652490:  $p = 4,7 \times 10^{-2}$ ) Stichprobe repliziert werden. Der Versuch eine genetische Verbindung vom ET zu der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Parkinson (MP) über das *LINGO1* Gen zu finden scheiterte, da keine Assoziation zwischen *LINGO1* und MP entdeckt werden konnte. Der SNP rs8030859 mit dem niedrigsten p-Wert in der deutschen Stichprobe stammte aus einer genetischen Region des *LINGO1* Gens, welche zusätzlich für das antisense Transkript *BC038758* kodiert. In Expressionsstudien konnte eine gewebsspezifische Expression von *BC038758* und das Vorkommen im Gehirn nachgewiesen werden. Eine anschließende Sequenzierung der drei Exone in 95 ET-Patienten und 96 Kontrollen konnte acht verschiedene Polymorphismen mit jedoch sehr geringen Allelfrequenzen des selteneren Allels detektieren. Die kausale Mutation in der *LINGO1* Region konnte nicht identifiziert werden. Auch ist die Funktion des Transkripts *BC038758* unbekannt. Desweiteren wurden 15 autosomale Gene der GABA<sub>A</sub>-R-Untereinheiten mit 240 htSNPs in einem Kandidatengenansatz auf Assoziation zum ET untersucht. Die fünf nominal signifikant assoziierten SNPs ( $p = 5,2 \times 10^{-4}$ – $2,4 \times 10^{-2}$ ) aus der Hypothesengenerierung, die in einer zweiten unabhängigen Stichprobe nachverfolgt wurden, konnten nicht verifiziert werden. Auch die Kopplungsstudien mit 20 monogen erscheinenden Familien deutscher, französischer und dänischer Herkunft konnten keine Kopplung des ET mit STR-Markern in der genomischen Region der für die GABA-R-Untereinheiten kodierenden Gene ermitteln. Der



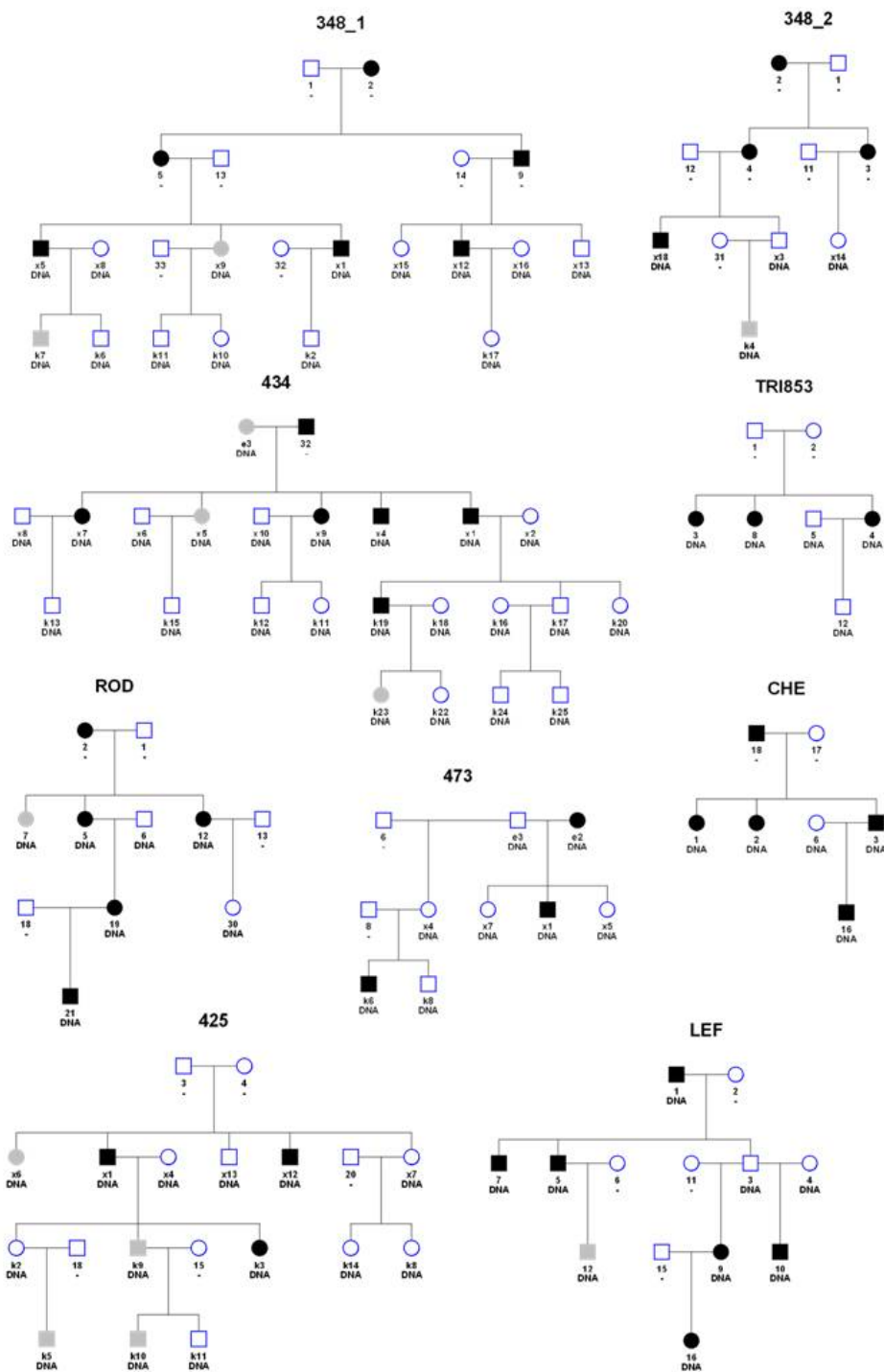
Replikationsversuch, der durch Kopplungsstudien identifizierten *ETM*-Regionen sowie des *DRD3* Gens, konnte lediglich *ETM2* mit einem LOD-Wert von 1,87 ( $p = 0,002$ ) in der gemeinsamen Analyse der 20 untersuchten Familien bestätigen. Ein genomweiter Kopplungsscan in sechs Familien erzielte nur schwache Signale über das gesamte Genom. Die LOD-Werte konnten auch nicht durch eine Feinkartierung in den signifikanten Bereich ansteigen. Obgleich diese Arbeit keine neuen Suszeptibilitätsgene des ET finden konnte, so sind die Ergebnisse von besonderer Relevanz für die weitere Erforschung der genetischen Ursachen des ET. So wurde deutlich, dass die Genetik des ET äußerst komplex ist und wahrscheinlich vielen seltenen Varianten mit geringen Effekten zugrunde liegt. Als Konsequenz sollten in nachfolgenden Assoziationsstudien möglichst große Stichproben mit einheitlichen Phänotypen verwendet werden. Darüber hinaus werden in den nächsten Jahren Genom- oder Exomweite Resequenzierungsstudien wichtige Hinweise auf die Rolle seltener Varianten liefern. Zur Analyse von Familien mit möglicherweise monogenem Erbgang sollten unbedingt größere, klinisch detailliert charakterisierte Familien rekrutiert werden und alternative Vererbungsmodelle, wie z.B. das Vorkommen mehrerer ursächlicher Gene sowie das Imprinting in Betracht gezogen werden.

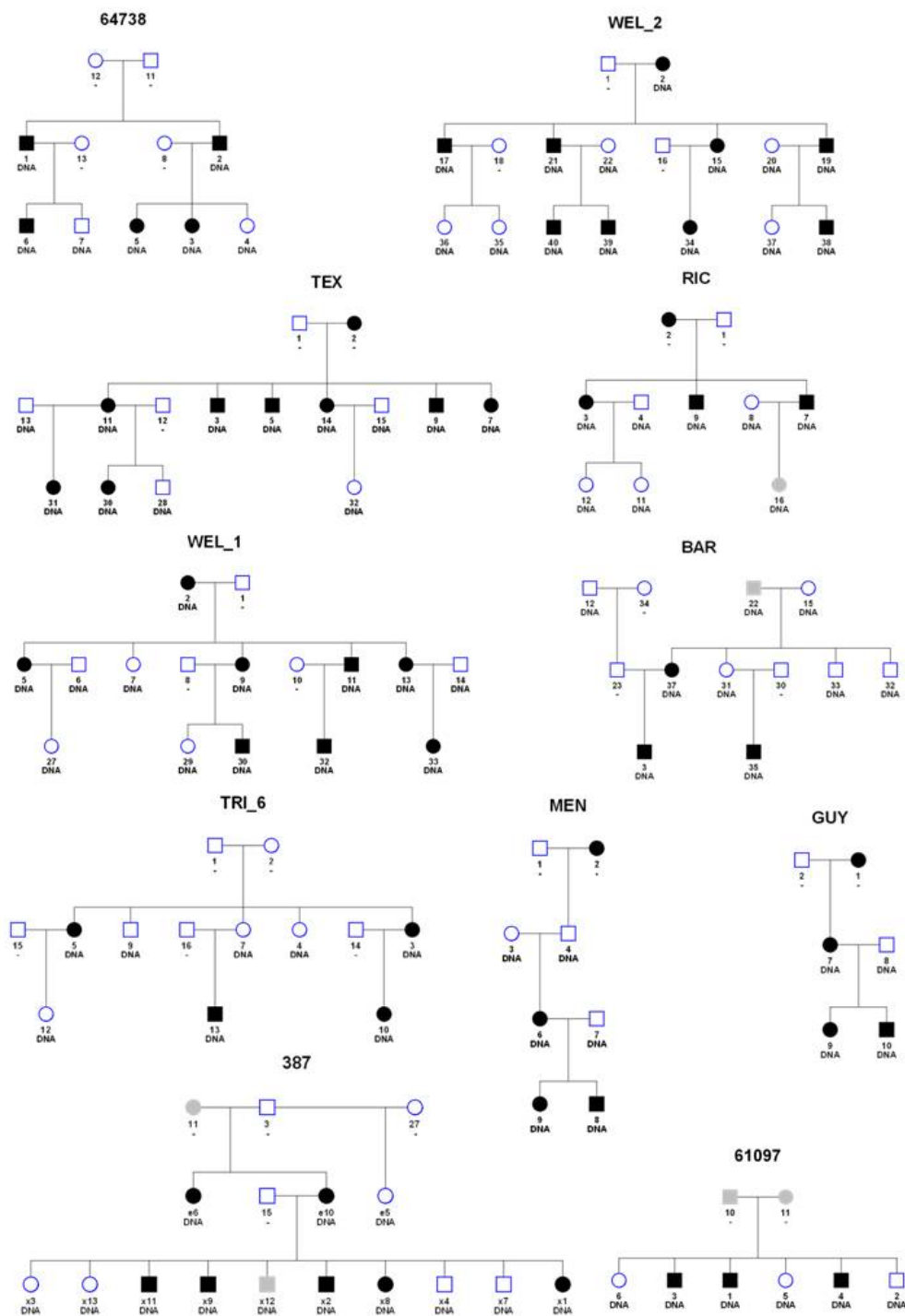
## 6 Summary

The essential tremor (ET) is one of the most common movement disorders, characterized by postural and action tremor that may lead to severe impairment of the quality of life. The variability in its phenotype is probably due to complex interactions of multiple variants/genes and environmental factors. Although ET is a common neurological disorder, genetic complexity and relatively small sample sizes indeed complicate the investigation of the genetic background. In addition to the sporadic occurrence of ET, many families are known with an apparently autosomal dominant mode of inheritance. Very recently, the first genome-wide association study identified the *LINGO1* gene as a susceptibility gene for ET. The present study at first confirmed the association between sequence variants in the *LINGO1* gene and the ET phenotype, in independent German (rs9652490:  $P = 9.1 \times 10^{-4}$ ) and French (rs9652490:  $P = 4.7 \times 10^{-2}$ ) ET samples. Surprisingly, the test of the hypothesis that *LINGO1* is a potential susceptibility factor that might be shared between ET and Parkinson's disease did not reveal significant association signals of the three investigated SNPs, namely, rs8030859, rs9652490 and rs11856808. The SNP rs8030859 with the lowest p-value is located in a region of *LINGO1* that also codes for another independent antisense transcript (*BC038758*). The expression of *BC038758* could be demonstrated, but only in brain and not in other tissues. Thereafter, all the three exons comprising *BC038758* transcript were sequenced in 95 ET cases and 96 controls. Noticeably, all eight detected SNPs have shown very low minor allele frequencies ( $MAF \leq 0.04$ ). Furthermore, 15 autosomal GABA<sub>A</sub>-R genes were investigated with 240 htSNPs in a candidate gene approach. Out of the initial nine nominal significant associated SNPs ( $P$  values from  $4.9 \times 10^{-2}$ - $5.2 \times 10^{-4}$ ), the five most promising SNPs were used for verification in an independent sample. Unfortunately, none of the latter five SNPs showed significant association signals ( $P$  values from 0.30-0.77). Moreover, none of the investigated microsatellites in the region of the 15 autosomal GABA<sub>A</sub>-R genes could be linked to ET in a segregation analysis of 20 suggestive monogeneous families from Germany and France. For replication, the ETM regions and the Ser9Gly variant of the *DRD3* gene were explored in a linkage approach. In fact, only *ETM2* could be replicated (LOD score = 1.87,  $P = 0,002$ ). Furthermore, the six largest and most informative families were investigated in a genome-wide linkage scan using 421 autosomal microsatellites. All obtained

positive linkage signals in this genome-wide scan were very low and could not be increased to significant linkage with a fine mapping. Even though no variation that predisposes to ET could be identified as significant, this finding is of special relevance for genetic studies of ET. Indeed, the results clearly demonstrate that the ET phenotype is rather complicated by a variety of rare variants; apparently each with small effect size. Accordingly, future association studies, with larger sample sizes and preferably clearly phenotypic characterized samples for subgroup analysis, will be employed to improve the statistical power. For linkage analysis it is also important to recruit large families, with almost similar clinical background. A targeted next-generation re-sequencing approach of all candidate genes might also hold promise to decipher all causative genetic variations (common, rare, and structural) associated with ET in a genome-wide fashion. Additionally, alternative modes of inheritance, e.g. the occurrence of several causal genes and the imprinting of genes, should be considered for analysis.

# 7 Anhang





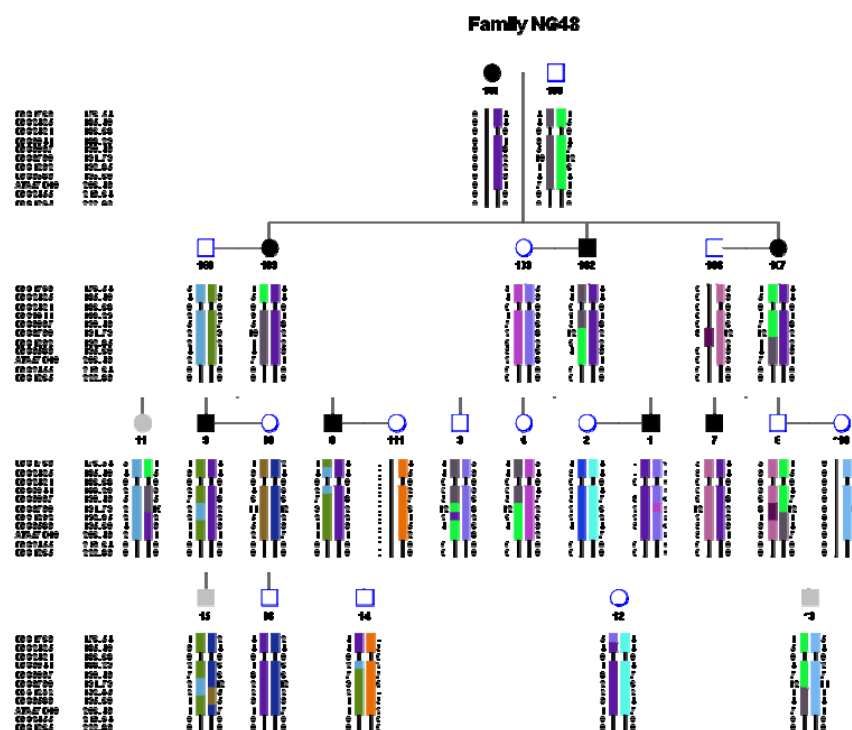
**Abbildung 7-1: Stammbäume der 20 ET-Familien für die Kopplungsstudien.**

Männliche Individuen sind als Vierecke und weibliche Individuen als Kreise dargestellt. Personen mit definitivem oder wahrscheinlichem ET werden als schwarz gefüllte Symbole gezeigt. Grau gefüllte Symbole stehen für einen unbekanntem Krankheitsstatus. Nicht vom ET betroffene Personen sind mit nicht gefüllten Symbolen dargestellt. Individuen mit vorhandenen Genotypdaten sind mit DNA gekennzeichnet.

**Tabelle 7-1: Auflistung der verwendeten Mikrosatelliten für die Segregationsanalyse der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Gene.**

Positionsangaben nach Marshfield-Kartierung; \* Schätzung der Positionsangaben

Chr.	Gen	Genposition (bp)	Marker	Markerposition (bp)	cM Position
1	GABRD	1940628-1952052	STIR1-1107	1797736-1797891	0*
			D1S1328	1939611-1939880	0,16*
			D1S243	2129099-2129416	0,36*
			D1S468	3574722-3575045	4,22
4	GABRG1	45732544-45820839	D4S3357	43052661-43052977	63,85
			D4S1547	43884689-43885036	64,27
4	GABRA2	45946339-46086153	D4S396	46012451-46012780	65,2
4	GABRA4	46615674-46690337	D4S401	46024890-46025207	65,66
4	GABRB1	46728052-47123204	D4S1635	48479594-48479847	66,38
5	GABRB2	160648014-160907708	D5S403	159818161-159818432	162,2
5	GABRA6	161045236-161062176	D5S529	160146638-160146841	162,47
5	GABRA1	161206775-161259543	D5S1476	160350820-160351092	162,33
5	GABRG2	161427226-161515123	D5S2066	163285255-163285566	165,13
			D5S397	169540006-169540322	175,34
5	GABRP	170143301-170173626	D5S462	171131261-171131478	178,57
			D5S429	171273164-171273525	179,11
6	GABRR1	89943942-89984215	D6S1609	84442200-84442438	92,25
			D6S1644	89784582-89784943	96,05
6	GABRR2	90023958-90081686	D6S482	90492335-90492456	97,1
			D6S1570	91250652-91250933	99,01
15	GABRB3	24339787-24570020	D15S1513	23732576-23732977	8,6
15	GABRA5	24662959-24777102	D15S97	24382615-24382758	11,07
15	GABRG3	24799175-25451967	D15S1002	25523217-25523454	15,05
			D15S156	25580600-25580939	15,25



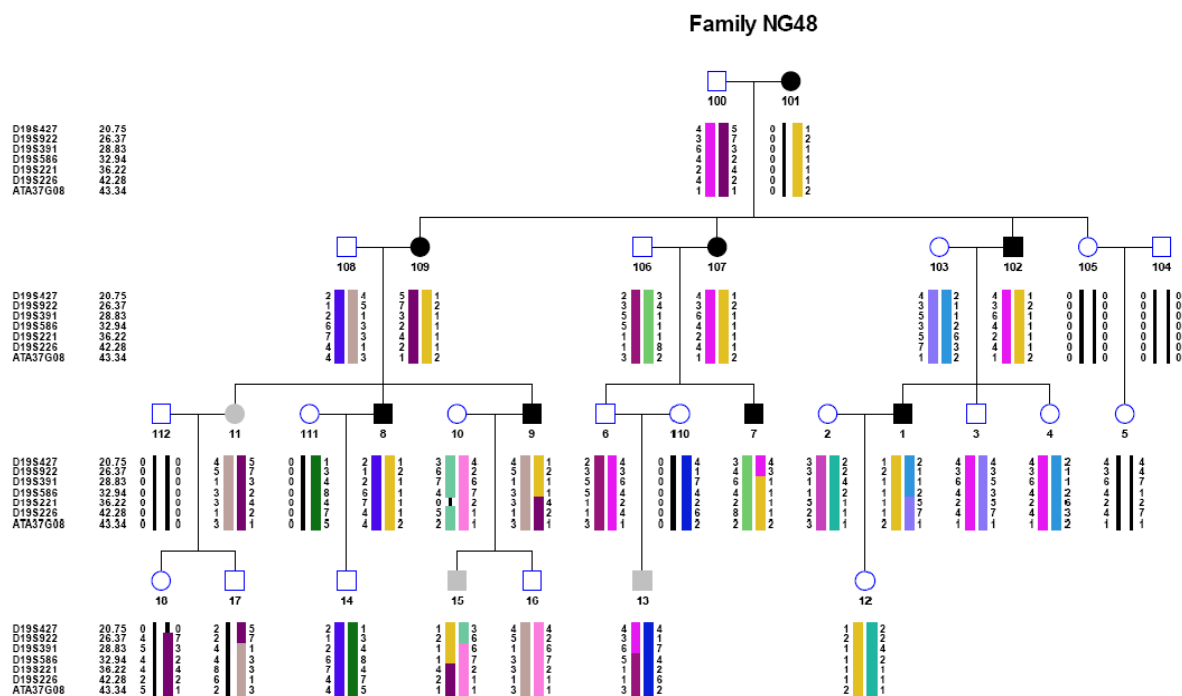
**Abbildung 7-2: Haplotypanalyse von NG48 Chromosom 3.**

Der Risikohaplotyp ist als lila Allel dargestellt und ist auch bei Individuen ohne dem ET-Phänotyp (Individuum 16 und 12) zu finden.

**Tabelle 7-2: Ergebnisse der Feinkartierung von Chromosom 3 in Familie NG48.**

Die fett gedruckten Marker wurden im Rahmen der Feinkartierung typisiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der nicht-parametrischen Mehrpunkt-Kopplungsanalyse.

Marker	genomweiter Scan				Feinkartierung			
	Zmean	p <sub>Z</sub> -Wert	LOD NPL	p <sub>LOD</sub> -Wert	Zmean	p <sub>Z</sub> -Wert	LOD NPL	p <sub>LOD</sub> -Wert
min	-0,6	0,7	-0,43	0,9	-0,6	0,7	-0,43	0,9
max	6,91	0	2,47	0,0004	6,91	0	2,47	0,0004
D3S1763	0,47	0,3	0,04	0,3	1,89	0,03	1,09	0,013
D3S2425	2,55	0,005	1,19	0,01	3,47	0,0003	1,35	0,006
<b>D3S2421</b>	/	/	/	/	3,7	0,00011	1,4	0,006
<b>D3S3041</b>	/	/	/	/	4,01	0,00003	1,45	0,005
D3S3037	4,01	0,00003	1,48	0,005	4,07	0,00002	1,49	0,004
<b>D3S3730</b>	/	/	/	/	4,06	0,00002	1,48	0,005
<b>D3S1232</b>	/	/	/	/	4,05	0,00003	1,48	0,005
D3S3583	3,98	0,00004	1,48	0,005	4,03	0,00003	1,48	0,004
ATA57D10	2,96	0,002	1,33	0,007	2,96	0,002	1,33	0,007
D3S2455	1,92	0,03	1,13	0,011	1,93	0,03	1,13	0,011



**Abbildung 7-3: Feinkartierung des putativen Chromosom 19 Locus in der ET-Familie NG48**

Für die Erklärung der Symbole siehe Abbildung 3-1. Der Risikohaplotyp ist als ocker farbiger Balken dargestellt. Der Risikohaplotyp ist in allen als betroffen deklarierten Individuen (1, 7, 8 und 9), in einer Person mit unbekanntem Phänotyp (15) sowie in einer nicht vom ET betroffenen Person (12) anzutreffen. Durch erfolgte Rekombination bei den Individuen 9 und 7 kann die Suszeptibilitätsregion zwischen den Markern D19S922 und D19S221 kartiert werden. Von den Personen mit Nummerierung von 100 bis 112 wurden die Haplotypen zurückgerechnet, da keine Genotypdaten vorhanden waren.



**Tabelle 7-3: Klinische Daten der ET-Probanden mit positiver Familienanamnese der DRD3 Assoziationsstudie.**

Angabe des Alters bei Erkrankungsbeginn, Tremor Dauer und Tremor Schweregrad für die Genotypen der Ser9Gly Variante; n.v. = nicht verfügbar; \* Teil A der Fahn-Burke-Marsden Tremor Skalierung (Fahn *et al.*, 1993); ∇ = Tremor-Dauer ≥ 5 Jahre; ; a = Angabe in Jahren; M = Mittelwert; SD = Standardabweichung

Klinisches Merkmal	Deutsche ET-Fälle (n=135)	Französische ET-Fälle (n=49)	Dänische ET-Fälle (n=18)	Alle (n=202)
Mann / Frau	88/47	22/27	9/9	119/83
Alter bei Blutentnahme (a): M ± SD (Spanne)	59,1 ± 14,6 (18-84)	52,9 ± 18,6 (19-84)	75,2 ± 5,1 (70-89)	58,7 ± 16,1 (18-89)
Alter bei Erkrankungsbeginn (a): M ± SD (Spanne)	29,7 ± 19,2 (5-75)	28,6 ± 19,2 (5-70)	n.v.	29,4 ± 19,2 (5-75)
AA	29 ± 19,3 (5-74)	27,4 ± 21,6 (5-70)	n.v.	
AG	30,2 ± 19,2 (5-75)	29,1 ± 18,4 (6-60)	n.v.	
GG	30,2 ± 20,4 (2-65)	31,3 ± 18,7 (14-56)	n.v.	
Tremor Schweregrad*: M ± SD (Spanne)	7,2 ± 3,7 (2-21)	11,5 ± 6,2 (2-26)	7,1 ± 2,6 (3-12)	8,2 ± 4,7 (2-26)
AA	7,4 ± 3,3 (3-17)	8,1 ± 5,7 (2-22)	5,3 ± 1,8 (3-8)	
AG	7,5 ± 4,2 (2-21)	13,5 ± 6 (3-26)	7,8 ± 2,3 (5-11)	
GG	5 ± 1,2 (4-8)	13,3 ± 4,2 (10-18)	9,3 ± 3,1 (6-12)	
Tremor Dauer (a): M ± SD (Spanne)	28,4 ± 16,3 (5-60)	25,8 ± 15,5 (3-69)	∇	27,6 ± 16,1 (3-69)
AA	31 ± 16,9 (7-60)	29,4 ± 18,5 (3-69)	∇	
AG	28,1 ± 16,7 (5-60)	23,2 ± 13,3 (7-55)	∇	
GG	21,7 ± 11,9 (5-40)	27 ± 16,1 (14-50)	∇	
Alkoholsensibilität des Tremors (%)	81 (60)	n.v.	7 (38,9)	88 (43,6)

**Tabelle 7-4: Klinische Daten der ET-Probanden ohne positive Familienanamnese der DRD3 Assoziationsstudie.**

Erklärungen siehe Tabelle 7-3

Klinisches Merkmal	Deutsche ET-Fälle (n=84)	Französische ET-Fälle (n=3)	Dänische ET-Fälle (n=10)	Alle (n=97)
Mann / Frau	49/35	2/1	6/4	57/40
Alter bei Blutentnahme (a): M ± SD (Spanne)	61 ± 15,7 (17-91)	77 ± 1,4 (76-78)	75,9 ± 5,6(70-86)	62,4 ± 15,7 (17-91)
Alter bei Erkrankungsbeginn (a): M ± SD (Spanne)	30,2 ± 20,9 (2-80)	42 ± 31,1 (20-64)	n.a.	30,6 ± 21,1 (2-80)
AA	29,4 ± 19,9 (10-75)	42 ± 31,1 (20-64)	n.a.	
AG	32,7 ± 21,7 (5-80)	--	n.a.	
GG	22,4 ± 25,2 (2-65)	--	n.a.	
Tremor Schweregrad*: M ± SD (Spanne)	7,3 ± 4,2 (2-26)	17,5 ± 0,7 (17-18)	5,4 ± 1,9 (3-8)	7,4 ± 4,3 (2-26)
AA	7,4 ± 4,8 (3-26)	17,5 ± 0,7 (17-18)	5,7 ± 2,1 (3-8)	
AG	7,2 ± 3,6 (2-16)	--	7 ± 0 (7)	
GG	8 ± 3,3 (4-13)	--	4 ± 0 (4)	
Tremor Dauer (a): M ± SD (Spanne)	29,4 ± 18,4 (5-70)	35 ± 32,5 (12-58)	∇	29,5 ± 18,6 (5-70)
AA	30,9 ± 18,2 (5-70)	35 ± 32,5 (12-58)	∇	
AG	27,2 ± 19,4 (5-60)	--	∇	
GG	31,4 ± 16,9 (12-50)	--	∇	
Alkoholsensibilität des Tremors (%)	35 (41,7)	n.a.	5 (55,5)	40 (42,1)

**Tabelle 7-5: Klinische Daten der Stichproben der GABA<sub>A</sub>R-Assoziationsanalyse**

\* Die Daten vom Alter bei Erkrankungsbeginn sind nicht von allen Patienten vorhanden; a = Angabe in Jahren; M = Mittelwert; SD = Standardabweichung

Klinisches Merkmal	Stichprobe der 1. Stufe		Stichprobe der 2. Stufe	
	Fälle (n=184)	Kontrollen (n=426)	Fälle (n=319)	Kontrollen (n=392)
Mann / Frau	103 / 81	146 / 280	190 / 129	211 / 181
Alter bei Blutentnahme (a): M ± SD (Spanne)	70,74 ± 11,22 (19-91)	65,61 ± 7,51 (48-77)	60,35 ± 15,90 (17-93)	70,21 ± 5,92 (59-93)
Alter bei Erkrankungsbeginn* (a): M ± SD (Spanne)	63,59 ± 10,18 (17-89)	-	31,11 ± 20,51 (2-80)	-
Positive Familienanamnese vom Tremor (%)	74 (11,95)	-	209 (65,52)	-
Alkoholsensibilität des Tremors (%)	55 (30)	-	155 (48,59)	-

**Tabelle 7-6: Regionen für die Assoziationsstudie der Gene der GABA<sub>A</sub>R-Untereinheiten und der GABA-Transporter.**

SNPs nach Qualitätskontrolle (QC) beinhaltet die Anzahl (n) der SNPs, die die QC überstanden haben (CR> 95%, HWE> 0,01 und MAF> 0,02)

Chr.	Gen	Genregion für SNP-Auswahl (kbp)	Länge der Region (kbp)	Funktion	SNPs nach QC (n=192)
1	GABRD			Rezeptor	3
3	SLC6A11	10,822,917-10,955,144	132,2	Transporter	14
	SLC6A1	11,000,456-11,055,935	55,48	Transporter	11
4	GABRG1	45,870,000-45,980,000	110	Rezeptor	7
	GABRA2	46,090,000-46,250,000	160	Rezeptor	6
	GABRA4	46,760,000-46,860,000	100	Rezeptor	7
	GABRB1	46,860,000-47,270,000	410	Rezeptor	22
5	GABRB2	160,648,014-160,940,629	292,6	Rezeptor	16
	GABRA6	161,040,629-161,065,000	24,37	Rezeptor	3
	GABRA1	161,200,629-161,260,000	59,37	Rezeptor	4
	GABRG2	161,415,629-161,515,000	99,37	Rezeptor	10
	GABRP	170,133,000-170,173,626	40,63	Rezeptor	4
6	GABRR1	89,944,691-89,993,686	49	Rezeptor	12
	GABRR2	90,021,686-90,091,686	70	Rezeptor	5
12	SLC6A12	169,513-200,052	30,54	Transporter	4
	SLC6A13	200,052-252,263	52,21	Transporter	5
15	GABRB3	24,339,789-24,580,020	240,2	Rezeptor	21
	GABRA5	24,653,151-24,786,749	133,6	Rezeptor	2
	GABRG3	24,789,263-25,451,729	662,5	Rezeptor	36

**Tabelle 7-7: Klinische Daten der deutschen und französischen ET-Patienten für die LINGO1 Studie**  
n.v. = nicht verfügbar; \* Teil A der Fahn-Burke-Marsden Tremor Skalierung (Fahn *et al.*, 1993)

Klinische Daten	Deutsche ET-Patienten (n =284)	Französische ET-Patienten (n=48)
Männer / Frauen	180/104	23/25
Alter bei Blutentnahme (a): M ± SD (Spanne)	62 ± 15 (17-93)	55 ± 19 (19-84)
Alter bei Erkrankungsbeginn (a): M ± SD (Spanne)	33 ± 21 (2-86)	29 ± 20 (5-70)
Tremor-Schweregrad*: M ± SD (Spanne)	6 ± 5 (1-35)	12 ± 6 (2-26)
Tremor Dauer (a): M ± SD (Spanne)	29 ± 18 (5-73)	26 ± 16 (2-69)
Positive Familienanamnese vom Tremor (%)	177 (62)	48 (100)
Alkoholsensibilität des Tremors (%)	145 (51)	n.v.

**Tabelle 7-8: Klinische Daten der Parkinson Patienten für die LINGO1 Assoziationsstudie.**

Altersangaben in Jahren unter Verwendung des Mittelwertes (MW), gefolgt von der Standardabweichung (SD) und der Spannweite; AAO: Alter bei Erkrankungsbeginn

Klinische Daten	Kieler Patienten (n = 619)	Lübecker Patienten (n=511)	Tübinger Patienten (n=668)
Männer / Frauen	353 / 266	287 / 224	403 / 265
Alter (Jahre): MW ± SD (Spanne)	70,74 ± 9,22 (32-93)	65,92 ± 12,65 (19-102)	62,95 ± 11,14 (29-89)
AAO (Jahre): MW ± SD (Spanne)	63,59 ± 10,18 (17-89)	50,09 ± 14,35 (10-79)	55,64 ± 11,75 (24-81)
Positive Familienanamnese (%)	74 (11,95)	76 (14,87)	153 (22,90)

## 8 Referenzen

- Abecasis, G.R., Cherny, S.S., Cookson, W.O. & Cardon, L.R. (2002) Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet*, 30, 97-101.
- Ahn, S.J., Costa, J. & Emanuel, J.R. (1996) PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Res*, 24, 2623-5.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F.B. & Starke, K. (2005) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München: Elsevier.
- Amos, C.I. & Williamson, J.A. (1993) Robustness of the maximum-likelihood (LOD) method for detecting linkage. *Am J Hum Genet*, 52, 213-4.
- Aridon, P., Ragonese, P., De Fusco, M., Salemi, G., Casari, G. & Savettieri, G. (2008) Further evidence of genetic heterogeneity in familial essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord*, 14, 15-8.
- Auer-Grumbach, M., De Jonghe, P., Verhoeven, K., Timmerman, V., Wagner, K., Hartung, H.P. & Nicholson, G.A. (2003) Autosomal dominant inherited neuropathies with prominent sensory loss and mutilations: a review. *Arch Neurol*, 60, 329-34.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21, 263-5.
- Baughman, F.A., Jr., Higgins, J.V. & Mann, J.D. (1973) Sex chromosome anomalies and essential tremor. *Neurology*, 23, 623-5.
- Benito-Leon, J. & Louis, E.D. (2006) Essential tremor: emerging views of a common disorder. *Nat Clin Pract Neurol*, 2, 666-78; quiz 2p following 691.
- Benito-Leon, J., Louis, E.D. & Bermejo-Pareja, F. (2009) Risk of incident Parkinson's disease and parkinsonism in essential tremor: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80, 423-5.
- Berg, D., Schweitzer, K., Leitner, P., Zimprich, A., Lichtner, P., Belcredi, P., Brussel, T., Schulte, C., Maass, S. & Nagele, T. (2005) Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease\*. *Brain*, 128, 3000-11.
- Bialecka, M., Kurzawski, M., Tan, E.K. & Drozdziak, M. (2010) Analysis of LINGO1 (rs9652490) polymorphism in sporadic Parkinson's disease in a Polish population, and a meta-analysis. *Neurosci Lett*, 472, 53-5.
- Bickeböller, H. & Fischer, C. (2007) *Einführung in die Genetische Epidemiologie*. Berlin: Springer Verlag GmbH & Co.

- Blair, M.A., Ma, S., Phibbs, F., Fang, J.Y., Cooper, M.K., Davis, T.L. & Hedera, P. (2008) Reappraisal of the role of the DRD3 gene in essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord*, 14, 471-5.
- Bland, J.M. & Altman, D.G. (1995) Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ*, 310, 170.
- Boecker, H., Wills, A.J., Ceballos-Baumann, A., Samuel, M., Thompson, P.D., Findley, L.J. & Brooks, D.J. (1996) The effect of ethanol on alcohol-responsive essential tremor: a positron emission tomography study. *Ann Neurol*, 39, 650-8.
- Boehnke, M. (1986) Estimating the power of a proposed linkage study: a practical computer simulation approach. *Am J Hum Genet*, 39, 513-27.
- Braak, H. & Del Tredici, K. (2008) Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 70, 1916-25.
- Busenbark, K., Barnes, P., Lyons, K., Ince, D., Villagra, F. & Koller, W.C. (1996) Accuracy of reported family histories of essential tremor. *Neurology*, 47, 264-5.
- Cardon, L.R. & Bell, J.I. (2001) Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*, 2, 91-9.
- Cavalli-Sforza, L.L. & Piazza, A. (1993) Human genomic diversity in Europe: a summary of recent research and prospects for the future. *Eur J Hum Genet*, 1, 3-18.
- Chan, D.K., Mok, V., Ng, P.W., Yeung, J., Kwok, J.B., Fang, Z.M., Clarke, R., Wong, L., Schofield, P.R. & Hattori, N. (2008) PARK2 mutations and clinical features in a Chinese population with early-onset Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 115, 715-9.
- Chiu, C.S., Brickley, S., Jensen, K., Southwell, A., Mckinney, S., Cull-Candy, S., Mody, I. & Lester, H.A. (2005) GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *J Neurosci*, 25, 3234-45.
- Chiu, Y.F., Mcgrath, J.A., Thornquist, M.H., Wolyniec, P.S., Nestadt, G., Swartz, K.L., Lasseter, V.K., Liang, K.Y. & Pulver, A.E. (2002) Genetic heterogeneity in schizophrenia II: conditional analyses of affected schizophrenia sibling pairs provide evidence for an interaction between markers on chromosome 8p and 14q. *Mol Psychiatry*, 7, 658-64.
- Clark, L.N., Kisselev, S., Park, N., Ross, B., Verbitsky, M., Rios, E., Alcalay, R.N., Lee, J.H. & Louis, E.D. (2009) Mutations in the Parkinson's disease genes, Leucine Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) and Glucocerebrosidase (GBA), are not associated with essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord*, 16, 132-5.
- Clark, L.N., Park, N., Kisselev, S., Rios, E., Lee, J.H. & Louis, E.D. (2010) Replication of the LINGO1 gene association with essential tremor in a North American population. *Eur J Hum Genet*.

- Clerget-Darpoux, F., Bonaiti-Pellie, C. & Hochez, J. (1986) Effects of misspecifying genetic parameters in lod score analysis. *Biometrics*, 42, 393-9.
- Colebatch, J.G., Findley, L.J., Frackowiak, R.S., Marsden, C.D. & Brooks, D.J. (1990) Preliminary report: activation of the cerebellum in essential tremor. *Lancet*, 336, 1028-30.
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., Saint-Hilaire, J.M., Carmant, L., Verner, A., Lu, W.Y., Wang, Y.T. & Rouleau, G.A. (2002) Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet*, 31, 184-9.
- Cottingham, R.W., Jr., Idury, R.M. & Schaffer, A.A. (1993) Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet*, 53, 252-63.
- D'hulst, C., Heulens, I., Brouwer, J.R., Willemsen, R., De Geest, N., Reeve, S.P., De Deyn, P.P., Hassan, B.A. & Kooy, R.F. (2009) Expression of the GABAergic system in animal models for fragile X syndrome and fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain Res*, 1253, 176-83.
- Dalby, N.O. (2003) Inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures. *Eur J Pharmacol*, 479, 127-37.
- Dean, F.B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A.F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J., Driscoll, M., Song, W., Kingsmore, S.F., Egholm, M. & Lasken, R.S. (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 5261-6.
- Dempfle, A., Scherag, A., Hein, R., Beckmann, L., Chang-Claude, J. & Schafer, H. (2008) Gene-environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur J Hum Genet*, 16, 1164-72.
- Deng, H., Le, W.D., Guo, Y., Huang, M.S., Xie, W.J. & Jankovic, J. (2005) Extended study of A265G variant of HS1BP3 in essential tremor and Parkinson disease. *Neurology*, 65, 651-2.
- Deng, H., Xie, W.J., Le, W.D., Huang, M.S. & Jankovic, J. (2006) Genetic analysis of the GABRA1 gene in patients with essential tremor. *Neurosci Lett*, 401, 16-9.
- Deuschl, G. (1999) Differential diagnosis of tremor. *J Neural Transm Suppl*, 56, 211-20.
- Deuschl, G., Bain, P. & Brin, M. (1998) Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee. *Mov Disord*, 13 Suppl 3, 2-23.
- Deuschl, G. & Elble, R. (2009) Essential tremor--neurodegenerative or nondegenerative disease towards a working definition of ET. *Mov Disord*, 24, 2033-41.

- Deuschl, G., Wenzelburger, R., Loffler, K., Raethjen, J. & Stolze, H. (2000) Essential tremor and cerebellar dysfunction clinical and kinematic analysis of intention tremor. *Brain*, 123 ( Pt 8), 1568-80.
- Devlin, B. & Roeder, K. (1999) Genomic control for association studies. *Biometrics*, 55, 997-1004.
- Diaz, J., Levesque, D., Lammers, C.H., Griffon, N., Martres, M.P., Schwartz, J.C. & Sokoloff, P. (1995) Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience*, 65, 731-45.
- Dupont, W.D. & Plummer, W.D., Jr. (1998) Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Control Clin Trials*, 19, 589-601.
- Edwards, T.L., Scott, W.K., Almonte, C., Burt, A., Powell, E.H., Beecham, G.W., Wang, L., Zuchner, S., Konidari, I., Wang, G., Singer, C., Nahab, F., Scott, B., Stajich, J.M., Pericak-Vance, M., Haines, J., Vance, J.M. & Martin, E.R. (2010) Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet*, 74, 97-109.
- Elble, R.J. (1998) Animal models of action tremor. *Mov Disord*, 13 Suppl 3, 35-9.
- Elble, R.J. (2000) Diagnostic criteria for essential tremor and differential diagnosis. *Neurology*, 54, S2-6.
- Ewald, H., Kruse, T.A. & Mors, O. (2003) Genome wide scan using homozygosity mapping and linkage analyses of a single pedigree with affective disorder suggests oligogenic inheritance. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 120B, 63-71.
- Fahn, S., Tolosa, E. & Marin, C. (1993) Parkinson's Disease and Movement Disorders. *Baltimore: Williams & Wilkins*, 271-280.
- Farrer, M., Stone, J., Mata, I.F., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Strain, K.J. & Maraganore, D.M. (2005) LRRK2 mutations in Parkinson disease. *Neurology*, 65, 738-40.
- Findley, L.J. (2000) Epidemiology and genetics of essential tremor. *Neurology*, 54, S8-S13.
- Findley, L.J. & Cleeves, L. (1984) Tremor. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 288, 1536-7.
- Findley, L.J. & Koller, W.C. (1995) *Definition and behavioral classifications*. New York: Marcel Dekker, INC.
- Fung, H.C., Scholz, S., Matarin, M., Simon-Sanchez, J., Hernandez, D., Britton, A., Gibbs, J.R., Langefeld, C., Stiegert, M.L., Schymick, J., Okun, M.S., Mandel, R.J., Fernandez, H.H., Foote, K.D., Rodriguez, R.L., Peckham, E., De Vrieze, F.W., Gwinn-Hardy, K., Hardy, J.A. & Singleton, A. (2006) Genome-wide genotyping in Parkinson's disease and

- neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *Lancet Neurol*, 5, 911-6.
- Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., Defelice, M., Lochner, A., Faggart, M., Liu-Cordero, S.N., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E.S., Daly, M.J. & Altshuler, D. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 296, 2225-9.
- Galvin, J.E. (2009) When a tremor is not just a tremor: cognitive and functional decline in essential tremor, a more complex disorder than we thought. *J Am Med Dir Assoc*, 10, 218-20.
- Garcia-Martin, E., Martinez, C., Alonso-Navarro, H., Benito-Leon, J., Puertas, I., Rubio, L., Lopez-Alburquerque, T., Agundez, J.A. & Jimenez-Jimenez, F.J. (2009) Dopamine receptor D3 (DRD3) genotype and allelic variants and risk for essential tremor. *Mov Disord*, 24, 1910-5.
- Garcia-Martin, E., Martinez, C., Serrador, M., Alonso-Navarro, H., Navacerrada, F., Agundez, J. & Jimenez-Jimenez, F.J. (2010) Dopamine receptor 3(DRD3) polymorphism and risk for migraine. *Eur J Neurol*, aheadofprint.
- Garcia Arocena, D., Louis, E.D., Tassone, F., Gilliam, T.C., Ottman, R., Jacquemont, S. & Hagerman, P.J. (2004) Screen for expanded FMR1 alleles in patients with essential tremor. *Mov Disord*, 19, 930-3.
- Gibb, W.R. & Lees, A.J. (1988) A comparison of clinical and pathological features of young- and old-onset Parkinson's disease. *Neurology*, 38, 1402-6.
- Gilks, W.P., Abou-Sleiman, P.M., Gandhi, S., Jain, S., Singleton, A., Lees, A.J., Shaw, K., Bhatia, K.P., Bonifati, V., Quinn, N.P., Lynch, J., Healy, D.G., Holton, J.L., Revesz, T. & Wood, N.W. (2005) A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet*, 365, 415-6.
- Goldings, A.S. & Stewart, R.M. (1982) Organic lead encephalopathy: behavioral change and movement disorder following gasoline inhalation. *J Clin Psychiatry*, 43, 70-2.
- Gulcher, J. & Stefansson, K. (1998) Population genomics: laying the groundwork for genetic disease modeling and targeting. *Clin Chem Lab Med*, 36, 523-7.
- Gulcher, J.R., Jonsson, P., Kong, A., Kristjansson, K., Frigge, M.L., Karason, A., Einarsdottir, I.E., Stefansson, H., Einarsdottir, A.S., Sigurthorardottir, S., Baldursson, S., Bjornsdottir, S., Hrafnkelsdottir, S.M., Jakobsson, F., Benedickz, J. & Stefansson, K. (1997) Mapping of a familial essential tremor gene, FET1, to chromosome 3q13. *Nat Genet*, 17, 84-7.
- Hall, H., Halldin, C., Dijkstra, D., Wikstrom, H., Wise, L.D., Pugsley, T.A., Sokoloff, P., Pauli, S., Farde, L. & Sedvall, G. (1996) Autoradiographic localisation of D3-dopamine receptors in the human brain using the selective D3-dopamine receptor agonist (+)-[3H]PD 128907. *Psychopharmacology (Berl)*, 128, 240-7.



- Hata, K., Kubo, T., Yamaguchi, A. & Yamashita, T. (2006) Signaling mechanisms of axon growth inhibition. *Drug News Perspect*, 19, 541-7.
- Haubenberger, D., Hotzy, C., Pirker, W., Katzenschlager, R., Brucke, T., Zimprich, F., Auff, E. & Zimprich, A. (2009) Role of LINGO1 polymorphisms in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 24, 2404-7.
- Heiman, G.A., Hodge, S.E., Gorroochurn, P., Zhang, J. & Greenberg, D.A. (2004) Effect of population stratification on case-control association studies. I. Elevation in false positive rates and comparison to confounding risk ratios (a simulation study). *Hum Hered*, 58, 30-9.
- Hemminki, K., Lorenzo Bermejo, J. & Forsti, A. (2006) The balance between heritable and environmental aetiology of human disease. *Nat Rev Genet*, 7, 958-65.
- Higgins, J.J., Jankovic, J., Lombardi, R.Q., Pucilowska, J., Tan, E.K., Ashizawa, T. & Ruszczyk, M.U. (2003) Haplotype analysis of the ETM2 locus in familial essential tremor. *Neurogenetics*, 4, 185-9.
- Higgins, J.J., Lombardi, R.Q., Pucilowska, J., Jankovic, J., Golbe, L.I. & Verhagen, L. (2006) HS1-BP3 gene variant is common in familial essential tremor. *Mov Disord*, 21, 306-9.
- Higgins, J.J., Lombardi, R.Q., Pucilowska, J., Jankovic, J., Tan, E.K. & Rooney, J.P. (2005) A variant in the HS1-BP3 gene is associated with familial essential tremor. *Neurology*, 64, 417-21.
- Higgins, J.J., Lombardi, R.Q., Pucilowska, J. & Ruszczyk, M.U. (2004a) Integrated physical map of the human essential tremor gene region (ETM2) on chromosome 2p24.3-p24.2. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 127B, 128-30.
- Higgins, J.J., Lombardi, R.Q., Tan, E.K., Jankovic, J., Pucilowska, J. & Rooney, J.P. (2004b) Haplotype analysis at the ETM2 locus in a Singaporean sample with familial essential tremor. *Clin Genet*, 66, 353-7.
- Higgins, J.J., Loveless, J.M., Jankovic, J. & Patel, P.I. (1998) Evidence that a gene for essential tremor maps to chromosome 2p in four families. *Mov Disord*, 13, 972-7.
- Higgins, J.J., Pho, L.T. & Nee, L.E. (1997) A gene (ETM) for essential tremor maps to chromosome 2p22-p25. *Mov Disord*, 12, 859-64.
- Hirschhorn, J.N. (2005) Genetic approaches to studying common diseases and complex traits. *Pediatr Res*, 57, 74R-77R.
- Hoffjan, S. & Akkad, D.A. (2010) The genetics of multiple sclerosis: An update 2010. *Mol Cell Probes*.

- Hughes, A.J., Daniel, S.E., Kilford, L. & Lees, A.J. (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55, 181-4.
- Illarioshkin, S.N., Ivanova-Smolenskaya, I.A., Rahmonov, R.A., Markova, E.D., Stevanin, G. & Brice, A. (2000) Clinical and genetic study of familial essential tremor in an isolate of Northern Tajikistan. *Mov Disord*, 15, 1020-3.
- Illarioshkin, S.N., Rakhmonov, R.A., Ivanova-Smolenskaia, I.A., Brice, A., Markova, E.D., Miklina, N.I., Kliushnikov, S.A. & Limborskaia, S.A. (2002) [Molecular genetic analysis of essential tremor]. *Genetika*, 38, 1704-9.
- Inashkina, I., Radovica, I., Smeltere, L., Vitols, E. & Jankevics, E. (2008) Case-control study of patients with essential tremor in Latvia. *Eur J Neurol*, 15, 988-90.
- Inoue, H., Lin, L., Lee, X., Shao, Z., Mendes, S., Snodgrass-Belt, P., Sweigard, H., Engber, T., Pepinsky, B., Yang, L., Beal, M.F., Mi, S. & Isacson, O. (2007) Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 14430-5.
- Jain, S., Lo, S.E. & Louis, E.D. (2006) Common misdiagnosis of a common neurological disorder: how are we misdiagnosing essential tremor? *Arch Neurol*, 63, 1100-4.
- Jankovic, J. (2002) Essential tremor: a heterogenous disorder. *Mov Disord*, 17, 638-44.
- Jeanneteau, F., Funalot, B., Jankovic, J., Deng, H., Lagarde, J.P., Lucotte, G. & Sokoloff, P. (2006) A functional variant of the dopamine D3 receptor is associated with risk and age-at-onset of essential tremor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10753-8.
- Jeffreys, A.J., Kauppi, L. & Neumann, R. (2001) Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat Genet*, 29, 217-22.
- Jenkins, I.H., Bain, P.G., Colebatch, J.G., Thompson, P.D., Findley, L.J., Frackowiak, R.S., Marsden, C.D. & Brooks, D.J. (1993) A positron emission tomography study of essential tremor: evidence for overactivity of cerebellar connections. *Ann Neurol*, 34, 82-90.
- Ji, B., Li, M., Wu, W.T., Yick, L.W., Lee, X., Shao, Z., Wang, J., So, K.F., McCoy, J.M., Pepinsky, R.B., Mi, S. & Relton, J.K. (2006) LINGO-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci*, 33, 311-20.
- Kagi, G., Bhatia, K.P. & Tolosa, E. (2010) The role of DAT-SPECT in movement disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81, 5-12.
- Keeling, B.H., Vilarino-Guell, C., Ross, O.A., Wszolek, Z.K., Uitti, R.J. & Farrer, M.J. (2009a) DRD3 Ser9Gly and HS1BP3 Ala265Gly are not associated with Parkinson disease. *Neurosci Lett*, 461, 74-5.

- Keeling, B.H., Vilarino-Guell, C., Soto-Ortolaza, A.I., Ross, O.A., Uitti, R.J., Rajput, A., Wszolek, Z.K. & Farrer, M.J. (2009b) Histamine N-methyltransferase Thr105Ile is not associated with Parkinson's disease or essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord*, 16, 112-4.
- Kelley, L.A. & Sternberg, M.J. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, 4, 363-71.
- Kim, S.J., Brune, C.W., Kistner, E.O., Christian, S.L., Courchesne, E.H., Cox, N.J. & Cook, E.H. (2008) Transmission disequilibrium testing of the chromosome 15q11-q13 region in autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B, 1116-25.
- Klebe, S. & Thier, S. (2010) LINGO1 is not associated with Parkinson's disease in German patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*.
- Koller, W.C. & Biary, N. (1984) Effect of alcohol on tremors: comparison with propranolol. *Neurology*, 34, 221-2.
- Kong, A. & Cox, N.J. (1997) Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet*, 61, 1179-88.
- Kovach, M.J., Ruiz, J., Kimonis, K., Mueed, S., Sinha, S., Higgins, C., Elble, S., Elble, R. & Kimonis, V.E. (2001) Genetic heterogeneity in autosomal dominant essential tremor. *Genet Med*, 3, 197-9.
- Kralic, J.E., Criswell, H.E., Osterman, J.L., O'buckley, T.K., Wilkie, M.E., Matthews, D.B., Hamre, K., Breese, G.R., Homanics, G.E. & Morrow, A.L. (2005) Genetic essential tremor in gamma-aminobutyric acidA receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Clin Invest*, 115, 774-9.
- Krawczak, M., Nikolaus, S., Von Eberstein, H., Croucher, P.J., El Mokhtari, N.E. & Schreiber, S. (2006) PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. *Community Genet*, 9, 55-61.
- Kruglyak, L. (1997) What is significant in whole-genome linkage disequilibrium studies? *Am J Hum Genet*, 61, 810-2.
- Kruglyak, L., Daly, M.J., Reeve-Daly, M.P. & Lander, E.S. (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet*, 58, 1347-63.
- Lander, E. & Kruglyak, L. (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*, 11, 241-7.
- Lao, O., Lu, T.T., Nothnagel, M., Junge, O., Freitag-Wolf, S., Caliebe, A., Balasckova, M., Bertranpetit, J., Bindoff, L.A., Comas, D., Holmlund, G., Kouvatsi, A., Macek, M., Mollet, I., Parson, W., Palo, J., Ploski, R., Sajantila, A., Tagliabracci, A., Gether, U., Werge, T., Rivadeneira, F., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Gieger, C., Wichmann, H.E.,

- Ruther, A., Schreiber, S., Becker, C., Nurnberg, P., Nelson, M.R., Krawczak, M. & Kayser, M. (2008) Correlation between genetic and geographic structure in Europe. *Curr Biol*, 18, 1241-8.
- Ledesma, M.C., Garcia-Martin, E., Alonso-Navarro, H., Martinez, C., Jimenez-Jimenez, F.J., Benito-Leon, J., Puertas, I., Rubio, L., Lopez-Alburquerque, T. & Agundez, J.A. (2008) The nonsynonymous Thr105Ile polymorphism of the histamine N-methyltransferase is associated to the risk of developing essential tremor. *Neuromolecular Med*, 10, 356-61.
- Lee, W.C. (2004) Case-control association studies with matching and genomic controlling. *Genet Epidemiol*, 27, 1-13.
- Lesage, S. & Brice, A. (2009) Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet*, 18, R48-59.
- Lesage, S., Durr, A., Tazir, M., Lohmann, E., Leutenegger, A.L., Janin, S., Pollak, P. & Brice, A. (2006) LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med*, 354, 422-3.
- Liebetanz, K.M., Winkelmann, J., Trenkwalder, C., Putz, B., Dichgans, M., Gasser, T. & Muller-Myhsok, B. (2006) RLS3: fine-mapping of an autosomal dominant locus in a family with intrafamilial heterogeneity. *Neurology*, 67, 320-1.
- Long, A.D. & Langley, C.H. (1999) The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Res*, 9, 720-31.
- Lorenz, D. & Deuschl, G. (2007) Update on pathogenesis and treatment of essential tremor. *Curr Opin Neurol*, 20, 447-52.
- Lorenz, D., Frederiksen, H., Moises, H., Kopper, F., Deuschl, G. & Christensen, K. (2004) High concordance for essential tremor in monozygotic twins of old age. *Neurology*, 62, 208-11.
- Lorenz, D., Klebe, S., Stevanin, G., Thier, S., Nebel, A., Feingold, J., Frederiksen, H., Denis, E., Christensen, K., Schreiber, S., Brice, A., Deuschl, G. & Durr, A. (2008a) Dopamine receptor D3 gene and essential tremor in large series of German, Danish and French patients. *Eur J Hum Genet*.
- Lorenz, D., Papengut, F., Frederiksen, H., Kopper, F., Klebe, S., Christensen, K., Schreiber, S. & Deuschl, G. (2008b) Evaluation of a screening instrument for essential tremor. *Mov Disord*, 23, 1006-12.
- Lorenz, D., Schwieger, D., Moises, H. & Deuschl, G. (2006) Quality of life and personality in essential tremor patients. *Mov Disord*, 21, 1114-8.
- Louis, E.D., Benito-Leon, J. & Bermejo-Pareja, F. (2008) Population-based prospective study of cigarette smoking and risk of incident essential tremor. *Neurology*, 70, 1682-7.

- Louis, E.D. & Dogu, O. (2007) Does age of onset in essential tremor have a bimodal distribution? Data from a tertiary referral setting and a population-based study. *Neuroepidemiology*, 29, 208-12.
- Louis, E.D., Factor-Litvak, P., Parides, M., Andrews, L., Santella, R.M. & Wolff, M.S. (2006) Organochlorine pesticide exposure in essential tremor: a case-control study using biological and occupational exposure assessments. *Neurotoxicology*, 27, 579-86.
- Louis, E.D., Faust, P.L., Vonsattel, J.P., Honig, L.S., Rajput, A., Pahwa, R., Lyons, K.E., Ross, W.G., Elble, R.J., Erickson-Davis, C., Moskowitz, C.B. & Lawton, A. (2009) Torpedoes in Parkinson's disease, Alzheimer's disease, essential tremor, and control brains. *Mov Disord*, 24, 1600-5.
- Louis, E.D., Faust, P.L., Vonsattel, J.P., Honig, L.S., Rajput, A., Robinson, C.A., Rajput, A., Pahwa, R., Lyons, K.E., Ross, G.W., Borden, S., Moskowitz, C.B., Lawton, A. & Hernandez, N. (2007) Neuropathological changes in essential tremor: 33 cases compared with 21 controls. *Brain*, 130, 3297-307.
- Louis, E.D., Ford, B., Frucht, S., Barnes, L.F., M, X.T. & Ottman, R. (2001a) Risk of tremor and impairment from tremor in relatives of patients with essential tremor: a community-based family study. *Ann Neurol*, 49, 761-9.
- Louis, E.D., Ford, B., Frucht, S. & Ottman, R. (2001b) Mild tremor in relatives of patients with essential tremor: what does this tell us about the penetrance of the disease? *Arch Neurol*, 58, 1584-9.
- Louis, E.D., Ford, B., Lee, H., Andrews, H. & Cameron, G. (1998a) Diagnostic criteria for essential tremor: a population perspective. *Arch Neurol*, 55, 823-8.
- Louis, E.D., Ottman, R. & Hauser, W.A. (1998b) How common is the most common adult movement disorder? estimates of the prevalence of essential tremor throughout the world. *Mov Disord*, 13, 5-10.
- Louis, E.D., Shungu, D.C., Chan, S., Mao, X., Jurewicz, E.C. & Watner, D. (2002) Metabolic abnormality in the cerebellum in patients with essential tremor: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Neurosci Lett*, 333, 17-20.
- Louis, E.D. & Vonsattel, J.P. (2008) The emerging neuropathology of essential tremor. *Mov Disord*, 23, 174-82.
- Lucotte, G., Lagarde, J.P., Funalot, B. & Sokoloff, P. (2006) Linkage with the Ser9Gly DRD3 polymorphism in essential tremor families. *Clin Genet*, 69, 437-40.
- Ma, D.Q., Whitehead, P.L., Menold, M.M., Martin, E.R., Ashley-Koch, A.E., Mei, H., Ritchie, M.D., DeLong, G.R., Abramson, R.K., Wright, H.H., Cuccaro, M.L., Hussman, J.P., Gilbert, J.R. & Pericak-Vance, M.A. (2005) Identification of significant association and gene-gene interaction of GABA receptor subunit genes in autism. *Am J Hum Genet*, 77, 377-88.

- Ma, S., Davis, T.L., Blair, M.A., Fang, J.Y., Bradford, Y., Haines, J.L. & Hedera, P. (2006) Familial essential tremor with apparent autosomal dominant inheritance: should we also consider other inheritance modes? *Mov Disord*, 21, 1368-74.
- Macleod, D., Dowman, J., Hammond, R., Leete, T., Inoue, K. & Abeliovich, A. (2006) The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron*, 52, 587-93.
- Maraganore, D.M., De Andrade, M., Lesnick, T.G., Strain, K.J., Farrer, M.J., Rocca, W.A., Pant, P.V., Frazer, K.A., Cox, D.R. & Ballinger, D.G. (2005) High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 77, 685-93.
- Martinez, C., Garcia-Martin, E., Alonso-Navarro, H., Benito-Leon, J., Puertas, I., Rubio, L., Lopez-Alburquerque, T., Agundez, J.A. & Jimenez-Jimenez, F.J. (2007) Alcohol dehydrogenase 2 genotype and allelic variants are not associated with the risk for essential tremor. *Clin Neuropharmacol*, 30, 196-200.
- Mccarthy, M.I., Abecasis, G.R., Cardon, L.R., Goldstein, D.B., Little, J., Ioannidis, J.P. & Hirschhorn, J.N. (2008) Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*, 9, 356-69.
- Meara, J., Bhowmick, B.K. & Hobson, P. (1999) Accuracy of diagnosis in patients with presumed Parkinson's disease. *Age Ageing*, 28, 99-102.
- Mehler, M.F. (2008) Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Prog Neurobiol*, 86, 305-41.
- Mercer, T.R., Qureshi, I.A., Gokhan, S., Dinger, M.E., Li, G., Mattick, J.S. & Mehler, M.F. (2010) Long noncoding RNAs in neuronal-glia fate specification and oligodendrocyte lineage maturation. *BMC Neurosci*, 11, 14.
- Mi, S., Hu, B., Hahm, K., Luo, Y., Kam Hui, E.S., Yuan, Q., Wong, W.M., Wang, L., Su, H., Chu, T.H., Guo, J., Zhang, W., So, K.F., Pepinsky, B., Shao, Z., Graff, C., Garber, E., Jung, V., Wu, E.X. & Wu, W. (2007) LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*, 13, 1228-33.
- Mi, S., Miller, R.H., Lee, X., Scott, M.L., Shulag-Morskaya, S., Shao, Z., Chang, J., Thill, G., Levesque, M., Zhang, M., Hession, C., Sah, D., Trapp, B., He, Z., Jung, V., Mccoy, J.M. & Pepinsky, R.B. (2005) LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci*, 8, 745-51.
- Moghal, S., Rajput, A.H., D'arcy, C. & Rajput, R. (1994) Prevalence of movement disorders in elderly community residents. *Neuroepidemiology*, 13, 175-8.
- Most, G.F. (1836) *Enzyklopädie der gesamten medizinischen und chirurgischen Praxis*. Leipzig.

- Nicoletti, G., Manners, D., Novellino, F., Condino, F., Malucelli, E., Barbiroli, B., Tonon, C., Arabia, G., Salsone, M., Giofre, L., Testa, C., Lanza, P., Lodi, R. & Quattrone, A. (2010) Diffusion tensor MRI changes in cerebellar structures of patients with familial essential tremor. *Neurology*, 74, 988-94.
- Ott, J. (1985) A chi-square test to distinguish allelic association from other causes of phenotypic association between two loci. *Genet Epidemiol*, 2, 79-84.
- Ott, J. (1999) *Analysis of Human Genetic Linkage*. Baltimore: Johns Hopkins.
- Page, G.P., George, V., Go, R.C., Page, P.Z. & Allison, D.B. (2003) "Are we there yet?": Deciding when one has demonstrated specific genetic causation in complex diseases and quantitative traits. *Am J Hum Genet*, 73, 711-9.
- Paisan-Ruiz, C., Nath, P., Washecka, N., Gibbs, J.R. & Singleton, A.B. (2008) Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neurologically normal controls. *Hum Mutat*, 29, 485-90.
- 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. (2009) Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum Genet*, 124, 593-605.
- Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A., Roberts, R.G., Nimmo, E.R., Cummings, F.R., Soars, D., Drummond, H., Lees, C.W., Khawaja, S.A., Bagnall, R., Burke, D.A., Todhunter, C.E., Ahmad, T., Onnie, C.M., Mcardle, W., Strachan, D., Bethel, G., Bryan, C., Lewis, C.M., Deloukas, P., Forbes, A., Sanderson, J., Jewell, D.P., Satsangi, J., Mansfield, J.C., Cardon, L. & Mathew, C.G. (2007) Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*, 39, 830-2.
- Paterson, N.E., Malekiani, S.A., Foreman, M.M., Olivier, B. & Hanania, T. (2009) Pharmacological characterization of harmaline-induced tremor activity in mice. *Eur J Pharmacol*, 616, 73-80.
- Paus, S., Gadow, F., Kaut, O. & Knapp, M. (2010) Tremor in Parkinson's disease is not associated with the DRD3 Ser9Gly polymorphism. *Parkinsonism Relat Disord*, [Epub ahead of print].
- Penrose, L.S. (1935) The detection of autosomal linkage in data which consist of pairs of brothers and sisters of unspecified parentage. *Ann. Eugen.*, 8, 133-138.
- Petryshen, T.L., Middleton, F.A., Tahl, A.R., Rockwell, G.N., Purcell, S., Aldinger, K.A., Kirby, A., Morley, C.P., McGann, L., Gentile, K.L., Waggoner, S.G., Medeiros, H.M., Carvalho, C., Macedo, A., Albus, M., Maier, W., Trixler, M., Eichhammer, P., Schwab, S.G., Wildenauer, D.B., Azevedo, M.H., Pato, M.T., Pato, C.N., Daly, M.J. & Sklar, P. (2005) Genetic investigation of chromosome 5q GABAA receptor subunit genes in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 10, 1074-88, 1057.

- Pritchard, J.K. (2001) Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am J Hum Genet*, 69, 124-37.
- Pun, F.W., Zhao, C., Lo, W.S., Ng, S.K., Tsang, S.Y., Nimgaonkar, V., Chung, W.S., Ungvari, G.S. & Xue, H. (2010) Imprinting in the schizophrenia candidate gene GABRB2 encoding GABA(A) receptor beta(2) subunit. *Mol Psychiatry*, [Epub ahead of print].
- Putzke, J.D., Whaley, N.R., Baba, Y., Wszolek, Z.K. & Uitti, R.J. (2006) Essential tremor: predictors of disease progression in a clinical cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77, 1235-7.
- Qureshi, I.A., Mattick, J.S. & Mehler, M.F. (2010) Long non-coding RNAs in nervous system function and disease. *Brain Res*, 1338, 20-35.
- Rajput, A.H. & Birdi, S. (1997) Epidemiology of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 3, 175-86.
- Rautakorpi, I., Marttila, R.J. & Rinne, U.K. (1983) Alcohol consumption of patients with essential tremor. *Acta Neurol Scand*, 68, 177-9.
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., Fiegler, H., Shapero, M.H., Carson, A.R., Chen, W., Cho, E.K., Dallaire, S., Freeman, J.L., Gonzalez, J.R., Gratacos, M., Huang, J., Kalaitzopoulos, D., Komura, D., Macdonald, J.R., Marshall, C.R., Mei, R., Montgomery, L., Nishimura, K., Okamura, K., Shen, F., Somerville, M.J., Tchinda, J., Valsesia, A., Woodwark, C., Yang, F., Zhang, J., Zerjal, T., Armengol, L., Conrad, D.F., Estivill, X., Tyler-Smith, C., Carter, N.P., Aburatani, H., Lee, C., Jones, K.W., Scherer, S.W. & Hurles, M.E. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444, 444-54.
- Reich, D.E. & Lander, E.S. (2001) On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet*, 17, 502-10.
- Rengarajan, K., Cristol, S.M., Mehta, M. & Nickerson, J.M. (2002) Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores. *Mol Vis*, 8, 416-21.
- Risch, N.J. (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405, 847-56.
- Rocca, W.A., Bower, J.H., Ahlskog, J.E., Elbaz, A., Grossardt, B.R., McDonnell, S.K., Schaid, D.J. & Maraganore, D.M. (2007) Increased risk of essential tremor in first-degree relatives of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*, 22, 1607-14.
- Rupprecht, R. & Zwanzger, P. (2003) Die Bedeutung von GABAA-Rezeptoren für Pathophysiologie und Therapie der Panikstörung. *Der Nervenarzt*, 74, 543-551.
- Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A. & Warner, T.T. (2008) Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol*, 7, 1127-38.



- Samani, N.J., Erdmann, J., Hall, A.S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., Dixon, R.J., Meitinger, T., Braund, P., Wichmann, H.E., Barrett, J.H., Konig, I.R., Stevens, S.E., Szymczak, S., Tregouet, D.A., Iles, M.M., Pahlke, F., Pollard, H., Lieb, W., Cambien, F., Fischer, M., Ouwehand, W., Blankenberg, S., Balmforth, A.J., Baessler, A., Ball, S.G., Strom, T.M., Braenne, I., Gieger, C., Deloukas, P., Tobin, M.D., Ziegler, A., Thompson, J.R. & Schunkert, H. (2007) Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, 357, 443-53.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- Sarup, A., Larsson, O.M. & Schousboe, A. (2003) GABA transporters and GABA-transaminase as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2, 269-77.
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., Tomiyama, H., Nakashima, K., Hasegawa, K., Obata, F., Yoshikawa, T., Kawakami, H., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M., Nakamura, Y. & Toda, T. (2009) Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*, 41, 1303-7.
- Schols, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T. & Riess, O. (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*, 3, 291-304.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5857-64.
- Shahed, J. & Jankovic, J. (2007) Exploring the relationship between essential tremor and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 13, 67-76.
- Shatunov, A., Jankovic, J., Elble, R., Sambuughin, N., Singleton, A., Hallett, M. & Goldfarb, L. (2005) A variant in the HS1-BP3 gene is associated with familial essential tremor. *Neurology*, 65, 1995; author reply 1995.
- Shatunov, A., Sambuughin, N., Jankovic, J., Elble, R., Lee, H.S., Singleton, A.B., Dagvadorj, A., Ji, J., Zhang, Y., Kimonis, V.E., Hardy, J., Hallett, M. & Goldfarb, L.G. (2006) Genomewide scans in North American families reveal genetic linkage of essential tremor to a region on chromosome 6p23. *Brain*, 129, 2318-31.
- Sidransky, E. (2006) Heterozygosity for a Mendelian disorder as a risk factor for complex disease. *Clin Genet*, 70, 275-82.
- Sidransky, E., Nalls, M.A., Aasly, J.O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E.R., Bar-Shira, A., Berg, D., Bras, J., Brice, A., Chen, C.M., Clark, L.N., Condroyer, C., De Marco, E.V., Durr, A., Eblan, M.J., Fahn, S., Farrer, M.J., Fung, H.C., Gan-or, Z., Gasser, T., Gershoni-Baruch, R., Giladi, N., Griffith, A., Gurevich, T., Januario, C., Kropp, P., Lang, A.E., Lee-Chen, G.J., Lesage, S., Marder, K., Mata, I.F., Mirelman, A., Mitsui, J., Mizuta, I., Nicoletti, G., Oliveira, C., Ottman, R., Orr-Urtreger, A., Pereira, L.V., Quattrone, A., Rogaeva, E., Rolfs, A., Rosenbaum, H., Rozenberg, R., Samii, A.,

- Samaddar, T., Schulte, C., Sharma, M., Singleton, A., Spitz, M., Tan, E.K., Tayebi, N., Toda, T., Troiano, A.R., Tsuji, S., Wittstock, M., Wolfsberg, T.G., Wu, Y.R., Zabetian, C.P., Zhao, Y. & Ziegler, S.G. (2009) Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 361, 1651-61.
- Simon-Sanchez, J., Schulte, C., Bras, J.M., Sharma, M., Gibbs, J.R., Berg, D., Paisan-Ruiz, C., Lichtner, P., Scholz, S.W., Hernandez, D.G., Kruger, 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, 1308-12.
- Spanaki, C. & Plaitakis, A. (2009) Essential tremor in Parkinson's disease kindreds from a population of similar genetic background. *Mov Disord*, 24, 1662-8.
- Spits, C., Le Caignec, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steirteghem, A., Liebaers, I. & Sermon, K. (2006) Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nat Protoc*, 1, 1965-70.
- Stankiewicz, P. & Lupski, J.R. (2010) Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*, 61, 437-55.
- Stefansson, H., Steinberg, S., Petursson, H., Gustafsson, O., Gudjonsdottir, I.H., Jonsdottir, G.A., Palsson, S.T., Jonsson, T., Saemundsdottir, J., Bjornsdottir, G., Botcher, Y., Thorlacius, T., Haubenberger, D., Zimprich, A., Auff, E., Hotzy, C., Testa, C.M., Miyatake, L.A., Rosen, A.R., Kristleifsson, K., Rye, D., Asmus, F., Schols, L., Dichgans, M., Jakobsson, F., Benedikz, J., Thorsteinsdottir, U., Gulcher, J., Kong, A. & Stefansson, K. (2009) Variant in the sequence of the LINGO1 gene confers risk of essential tremor. *Nat Genet*, 41, 277-9.
- Strauch, K., Fimmers, R., Kurz, T., Deichmann, K.A., Wienker, T.F. & Baur, M.P. (2000) Parametric and nonparametric multipoint linkage analysis with imprinting and two-locus-trait models: application to mite sensitization. *Am J Hum Genet*, 66, 1945-57.
- Talkowski, M.E., Mansour, H., Chowdari, K.V., Wood, J., Butler, A., Varma, P.G., Prasad, S., Semwal, P., Bhatia, T., Deshpande, S., Devlin, B., Thelma, B.K. & Nimgaonkar, V.L. (2006) Novel, replicated associations between dopamine D3 receptor gene polymorphisms and schizophrenia in two independent samples. *Biol Psychiatry*, 60, 570-7.
- Tan, E.K., Lee, J., Lim, H.Q., Yuen, Y. & Zhao, Y. (2008a) Essential tremor and the common LRRK2 G2385R variant. *Parkinsonism Relat Disord*, 14, 569-71.
- Tan, E.K., Lee, S.S., Fook-Chong, S. & Lum, S.Y. (2008b) Evidence of increased odds of essential tremor in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23, 993-7.

- Tan, E.K., Matsuura, T., Nagamitsu, S., Khajavi, M., Jankovic, J. & Ashizawa, T. (2000) Polymorphism of NACP-Rep1 in Parkinson's disease: an etiologic link with essential tremor? *Neurology*, 54, 1195-8.
- Tan, E.K., Prakash, K.M., Fook-Chong, S., Yih, Y., Chua, E., Lum, S.Y., Wong, M.C., Pavanni, R. & Zhao, Y. (2007) DRD3 variant and risk of essential tremor. *Neurology*, 68, 790-1.
- Tan, E.K., Teo, Y.Y., Prakash, K.M., Li, R., Lim, H.Q., Angeles, D., Tan, L.C., Au, W.L., Yih, Y. & Zhao, Y. (2009) LINGO1 variant increases risk of familial essential tremor. *Neurology*, 73, 1161-2.
- Tan, E.K., Zhao, Y., Puong, K.Y., Law, H.Y., Chan, L.L., Yew, K., Tan, C., Shen, H., Chandran, V.R., Teoh, M.L., Yih, Y., Pavanni, R., Wong, M.C. & Ng, I.S. (2004) Fragile X premutation alleles in SCA, ET, and parkinsonism in an Asian cohort. *Neurology*, 63, 362-3.
- Tanner, C.M., Goldman, S.M., Lyons, K.E., Aston, D.A., Tetrud, J.W., Welsh, M.D., Langston, J.W. & Koller, W.C. (2001) Essential tremor in twins: an assessment of genetic vs environmental determinants of etiology. *Neurology*, 57, 1389-91.
- Tedeschi, G., Bertolino, A., Campbell, G., Barnett, A.S., Duyn, J.H., Jacob, P.K., Moonen, C.T., Alger, J.R. & Di Chiro, G. (1996) Reproducibility of proton MR spectroscopic imaging findings. *AJNR Am J Neuroradiol*, 17, 1871-9.
- Terwilliger, J. & Ott, J. (1994) *Handbook of Human Genetic Linkage*. New York: John Hopkins University Press.
- Thier, S., Kühlenbäumer, G., Lorenz, D., Nothnagel, M., Nebel, A., Christensen, K., Schreiber, S., Deuschl, G., Klebe, S. (submitted) Focus on GABA<sub>A</sub> Receptor Genes as Candidate Genes for Essential Tremor. *Eur J Neurol*
- Thier, S., Lorenz, D., Nothnagel, M., Stevanin, G., Durr, A., Nebel, A., Schreiber, S., Kühlenbaumer, G., Deuschl, G. & Klebe, S. (2010) LINGO1 polymorphisms are associated with essential tremor in Europeans. *Mov Disord*, 25, 709-15.
- Tobler, A.R., Short, S., Andersen, M.R., Paner, T.M., Briggs, J.C., Lambert, S.M., Wu, P.P., Wang, Y., Spoonde, A.Y., Koehler, R.T., Peyret, N., Chen, C., Broomer, A.J., Ridzon, D.A., Zhou, H., Hoo, B.S., Hayashibara, K.C., Leong, L.N., Ma, C.N., Rosenblum, B.B., Day, J.P., Ziegler, J.S., De La Vega, F.M., Rhodes, M.D., Hennessy, K.M. & Wenz, H.M. (2005) The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping. *J Biomol Tech*, 16, 398-406.
- Todd, J.A., Walker, N.M., Cooper, J.D., Smyth, D.J., Downes, K., Plagnol, V., Bailey, R., Nejentsev, S., Field, S.F., Payne, F., Lowe, C.E., Szeszko, J.S., Hafler, J.P., Zeitels, L., Yang, J.H., Vella, A., Nutland, S., Stevens, H.E., Schuilenburg, H., Coleman, G., Maisuria, M., Meadows, W., Smink, L.J., Healy, B., Burren, O.S., Lam, A.A., Ovington, N.R., Allen, J., Adlem, E., Leung, H.T., Wallace, C., Howson, J.M., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Simmonds, M.J., Heward, J.M., Gough, S.C., Dunger, D.B., Wicker, L.S.

- & Clayton, D.G. (2007) Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*, 39, 857-64.
- Van Kampen, J.M. & Eckman, C.B. (2006) Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *J Neurosci*, 26, 7272-80.
- Vilarino-Guell, C., Ross, O.A., Wider, C., Jasinska-Myga, B., Cobb, S.A., Soto-Ortolaza, A.I., Kachergus, J.M., Keeling, B.H., Dachsel, J.C., Melrose, H.L., Behrouz, B., Wszolek, Z.K., Uitti, R.J., Aasly, J.O., Rajput, A. & Farrer, M.J. (2009) LINGO1 rs9652490 is associated with essential tremor and Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*.
- Vilarino-Guell, C., Wider, C., Ross, O.A., Jasinska-Myga, B., Kachergus, J., Cobb, S.A., Soto-Ortolaza, A.I., Behrouz, B., Heckman, M.G., Diehl, N.N., Testa, C.M., Wszolek, Z.K., Uitti, R.J., Jankovic, J., Louis, E.D., Clark, L.N., Rajput, A. & Farrer, M.J. (2010) LINGO1 and LINGO2 variants are associated with essential tremor and Parkinson disease. *Neurogenetics*.
- Vitale, C., Gulli, R., Ciotti, P., Scaglione, C., Bellone, E., Avanzino, L., Lantieri, F., Abbruzzese, G., Martinelli, P., Barone, P. & Mandich, P. (2008) DRD3 Ser9Gly variant is not associated with essential tremor in a series of Italian patients. *Eur J Neurol*, 15, 985-7.
- Von Eller-Eberstein, H., Will, M., Krawczak, M. & Schreiber, S. (2007) PopGen Bevölkerungsbasierte Rekrutierung von Patienten und Kontrollen für die Untersuchung komplexer Genotyp-Phänotyp-Beziehungen. *Information Technology*, 6, 374-380.
- Whittemore, A.S. & Halpern, J. (1994) Probability of gene identity by descent: computation and applications. *Biometrics*, 50, 109-17.
- Wigginton, J.E., Cutler, D.J. & Abecasis, G.R. (2005) A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet*, 76, 887-93.
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D. & Hochstrasser, D.F. (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-52.
- Williamson, J.A. & Amos, C.I. (1990) On the asymptotic behavior of the estimate of the recombination fraction under the null hypothesis of no linkage when the model is misspecified. *Genet Epidemiol*, 7, 309-18.
- Winkelmann, J., Lichtner, P., Schormair, B., Uhr, M., Hauk, S., Stiasny-Kolster, K., Trenkwalder, C., Paulus, W., Peglau, I., Eisensehr, I., Illig, T., Wichmann, H.E., Pfister, H., Golic, J., Bettecken, T., Putz, B., Holsboer, F., Meitinger, T. & Muller-Myhsok, B. (2008) Variants in the neuronal nitric oxide synthase (nNOS, NOS1) gene are associated with restless legs syndrome. *Mov Disord*, 23, 350-8.

- Xiao, Y. & Zhang, B.S. (2006) [Association of the polymorphism in alpha-2 macroglobulin gene with essential tremor and Parkinson's disease]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 23, 84-5.
- Yoo, Y.M., Lee, C.J., Lee, U. & Kim, Y.J. (2008) Mitochondrial DNA in patients with essential tremor. *Neurosci Lett*, 434, 29-34.
- Zeggini, E., Weedon, M.N., Lindgren, C.M., Frayling, T.M., Elliott, K.S., Lango, H., Timpson, N.J., Perry, J.R., Rayner, N.W., Freathy, R.M., Barrett, J.C., Shields, B., Morris, A.P., Ellard, S., Groves, C.J., Harries, L.W., Marchini, J.L., Owen, K.R., Knight, B., Cardon, L.R., Walker, M., Hitman, G.A., Morris, A.D., Doney, A.S., McCarthy, M.I. & Hattersley, A.T. (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*, 316, 1336-41.
- Zuo, X., Jiang, H., Guo, J.F., Yu, R.H., Sun, Q.Y., Hu, L., Wang, L., Yao, L.Y., Shen, L., Pan, Q., Yan, X.X., Xia, K. & Tang, B.S. (2010) Screening for two SNPs of LINGO1 gene in patients with essential tremor or sporadic Parkinson's disease in Chinese population. *Neurosci Lett*, 481, 69-72.

## 9 Lebenslauf

### ■ Persönliche Daten

Name: Sandra Thier  
Geburtstag: 25.04.1980  
Geburtsort: Berlin  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Kinder: eine Tochter, 6 Jahre

### ■ Schul- und Ausbildung

2006/12 – Promotion zur Erlangung des Doktors der Naturwissenschaften an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel, Fachrichtung: Zellbiologie  
  
Doktorarbeit mit dem Thema: „Genetik und Ätiologie des Essentiellen Tremors“

1999/10 – 2006/04 Abschluss mit Diplom des Studiums der Fachrichtung Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin, Hauptfach: Genetik, Nebenfächer: Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie  
  
Diplomarbeit mit dem Thema „Metabolomanalyse am Gerstenblatt“ am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Golm (Arbeitsgruppe von Dr. Peter Geigenberger „Stoffwechsel der Kohlenstoffspeicherung“)

1996/07 – 1999/06 Abschluss mit Abitur an der 3. Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe, Berlin

**■ Publikationen**

**Thier S**, Kuhlenbäumer G, Lorenz D, Nothnagel M, Nebel A, Christensen K, Schreiber S, Deuschl G, Klebe S (under review) Focus on GABA<sub>A</sub> Receptor Genes as Candidate Genes for Essential Tremor. Eur J Neurol

**Thier S**, Lorenz D, Nothnagel M, Stevanin G, Durr A, Nebel A, Schreiber S, Kuhlenbaumer G, Deuschl G, Klebe S (2010) *LINGO1* polymorphisms are associated with essential tremor in Europeans. Mov Disord

Klebe S\*, **Thier S\***, Lorenz D, Nothnagel M, Schreiber S, Klein C, Hagenah J, Kasten M, Berg D, Srulijes K, Gasser T, Deuschl G, Kuhlenbäumer G (2010) *LINGO1* is not associated with Parkinson's disease in German patients. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet

Lorenz D, Klebe S, Stevanin G, **Thier S**, Nebel A, Feingold J, Frederiksen H, Denis E, Christensen K, Schreiber S, Brice A, Deuschl G, Durr A (2008) Dopamine receptor D3 gene and essential tremor in large series of German, Danish and French patients. Eur J Hum Genet

\* gleichberechtigte Erstautorenschaft

## 10 Danksagung

**Herrn Prof. Dr. med. Günther Deuschl** möchte ich für die Gelegenheit danken, über dieses interessante Thema an der renommierten Klinik für Neurologie des UKSH, unter ausgezeichneten Bedingungen und vielen Fortbildungsmöglichkeiten, promovieren zu können.

**Frau Prof. Dr. Manuela Dittmar** danke ich für die Übernahme meiner Betreuung, ihr Interesse an meinem Thema, die freundliche Unterstützung und den fachlichen Gesprächen.

Des Weiteren bin ich **Prof. Dr. med. Stefan Schreiber**, Direktor des Instituts für Klinische Molekularbiologie (IKMB), für die Bereitstellung von Arbeitsplatz, fachlicher Expertise und modernster Labortechnik dankbar.

Ein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. med. Stephan Klebe**, der mit großem Engagement, unvergleichbarem Optimismus und konstruktiven Anregungen mir stets zur Seite stand und stets ein offenes Ohr für anfallende Probleme hatte.

Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe des Institutes für Experimentelle Medizin der Klinik für Neurologie, insbesondere **Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer** und **Dr. Silke Appenzeller**, für ihre außerordentliche freundliche und aufmunternde Unterstützung sowie für ihre fachliche Kompetenz insbesondere bei den Kopplungs- und Expressionsstudien.

**Frau Dr. Delia Lorenz** sei für ihren beinahe unermüdlichen Einsatz bei Rekrutierung für das weltweit größte ET-Kollektiv sowie der Beantwortung von ständigen Fragen zu den klinischen Daten der Patienten ausdrücklich gedankt.

Den Mitarbeitern des IKMBs bin ich für die herzliche Aufnahme in das Kollegium sowie der fachlichen Unterweisung in die Thematik der genetischen Assoziationsstudien dankbar. Insbesondere möchte ich mich bei den Kollegen des ehemaligen „Main Office“: **Dr. Rabea Kleindorp**, **Dr. Annegret Fischer** und **Dr. Friedericke Flachsbart** für die familiäre Atmosphäre sowie die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei regelmäßigem Wissensbedarf meinerseits bedanken. Especially, I want to acknowledge **Dr. Abdou El**



**Sharawy**. With his Egyptian way of life and the scientific and private conversation he helped me managing work and family.

Den technischen Assistentinnen aus dem DNA-Labor (**Ilona Urbach, Meike Davids, Susan Ehlers, Irene Pauselius, Mareike Newsky, Katja Cloppenburg-Schmidt, Ines Spitzer**), dem Sequenzierungslabor (**Anita Dietsch, Catharina von der Lancken, Lena Bossen, Melanie Friskovec, Ina Baumgartner und Sandra Greve**) und der Genotypisierung (**Tanja Wesse, Tanja Henke und Catharina Fürstenau**) danke ich für Ihre gewissenhafte, qualitativ hochwertige und schnelle Arbeit. Insbesondere **Frau Katja Cloppenburg-Schmidt**, die mir mit ihrer Berliner Schnauze ein Heimatgefühl vermittelte, möchte ich hiermit ausdrücklich danken.

Weiterhin danke ich für ihre Arbeit im IT-Bereich **Andreas Klein, Marcus Will, Markus Teuber, Michael Wittig und Rainer Vogler** und für die Datenverwaltung durch POPGEN **Huberta von Eberstein, Birgitt Timm und Lukas Tittmann**.

Bei **Christiana Pubanz** möchte ich mich ganz besonders für ihre stetige Anteilnahme und Problembewältigung per Telekommunikation in den letzten Jahren sowie für die fleißige Korrekturhilfe bedanken.

**Johanna Thier** möchte ich dafür danken, dass sie mit ihrer überaus offenen und fröhlichen Art den Stress von mir nahm und mir immer wieder Kraft spendete. Letztendlich gilt mein größter Dank meinen Eltern **Cornelia und Jürgen Thier**, die mir stets meinen Weg ebneten und mir mit Rat und Tat in allen nur erdenklichen Lebenslagen zur Seite standen. Ohne ihre beständige und aufopferungsvolle Unterstützung, ihren unermesslichen Glauben an meine Fähigkeiten und andauernden Aufmunterungen wäre ich nicht so weit gekommen.

Vielen Dank!

## 11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt.

Der Zulassung von Zuhörern / Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

---

Sandra Thier

Kiel, den 27.10.2010