

**Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. G. Gillessen-Kaesbach**

**Molekulargenetische Untersuchungen zur dominant
vererbten Ataxie SCA28**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von Janine Wöllner
aus Plauen

Lübeck 2011

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. habil. Peter P. Pramstaller

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.07.2012
-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Tabellen	2
Verzeichnis der Abbildungen	3
Verzeichnis der Abkürzungen	4
1 Einleitung	7
1.1. Ataxie	7
1.2. Spinocerebelläre Ataxien (SCA)	8
1.3. Spinocerebelläre Ataxie Typ 28 (SCA 28).....	11
1.4. Das Gen AFG3L2	12
1.5. Das Protein AFG3L2	13
1.6. Mausmodell	14
1.7. Aufgabenstellung und Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	17
2.1. Material.....	17
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.2. Nukleinsäuren	18
2.1.3. Puffer und Lösungen	19
2.1.4. DNA-Proben	21
2.1.5. Software	21
2.2. Methoden	22
2.2.1. Polymerasekettenreaktion	22
2.2.2. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte.....	26
a) Agarose-Gelelektrophorese	26
b) Single-strand Conformation Polymorphism Analysis (SSCP)	27
2.2.3. DNA-Sequenzierung	28
3 Ergebnisse	31
3.1. SSCP-Analysen	31
3.2. Sequenzanalysen.....	33
3.3. Etablierung einer Allel-spezifischen PCR.....	36
4 Diskussion	42
4.1. Sequenzvariationen im AFG3L2-Gen	42
4.2. Klinische Daten	49
4.3. Ausblick.....	52
5 Zusammenfassung	53
6 Literaturverzeichnis	54
7 Anhang	58
8 Danksagung	59
9 Lebenslauf	60

Verzeichnis der Tabellen

- Tab. 1.1.:** ADCA-Klassifikation nach Harding ergänzt durch neu beschriebene SCA-Formen
- Tab. 1.2.:** Zusammenfassung der betroffenen Gene und Mutationen der SCA-Subtypen (modifiziert nach Soong *et al.*, 2007 und Duenas *et al.*, 2006)
- Tab. 1.3.:** Mutationen im *AFG3L2* nach Cagnoli *et al.* 2008 und DiBella *et al.*, 2008
-
- Tab. 2.1.:** Synthetische DNA-Oligonukleotide für die PCR
- Tab. 2.2.:** Synthetische DNA-Oligonukleotide für die Allel-spezifische PCR
- Tab. 2.3.:** PCR-Ansatz für die Exons 2-17 des *AFG3L2*-Gens
- Tab. 2.4.:** PCR-Ansatz für Exon 1 des *AFG3L2*-Gens
- Tab. 2.5.:** Ansatz für die Allel-spezifische PCR im Exon 16 des *AFG3L2*-Gens
- Tab. 2.6.:** Schematische Darstellung des PCR-Programms für die Exons 2-17 und für die Allel-spezifische PCR des Exon 16
- Tab. 2.7.:** Schematische Darstellung des PCR-Programms für das Exon 1
- Tab. 2.8.:** Sequenzieransatz für die Exons 1-17 des *AFG3L2*-Gens
- Tab. 2.9.:** Sequenzierprogramm für die Exons 1-17 des *AFG3L2*-Gens
-
- Tab. 3.1.:** Sequenzvariationen im *AFG3L2*-Gen
-
- Tab. 4.1.:** Aminosäure-Abfolge des AFG3L2-Proteins der hochkonservierten Region
- Tab. 4.2.:** Zusammenfassung der klinischen Befunde der in der Arbeit untersuchten SCA-Patienten der 4-Generationen-Familie aus Edener *et al.*, 2010
-
- Tab. 7.1.:** Übersicht über die bisher bekannten Varianten im *AFG3L2*-Gen

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1.: Schematische Darstellung des *AFG3L2*-Gens, seiner Proteindomänen und der zu Beginn der Arbeit bekannten Mutationen

Abb. 3.1.: Polyacrylamid-Gel (8 % PAA; 10 % Urea) für 16 Proben

Abb. 3.2.: Polyacrylamid-Gel Ausschnitt

Abb. 3.3.: PCR-Produkte von 19 Patienten auf 1,5 %igem Agarose-Gel

Abb. 3.4.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Exon 16 des *AFG3L2*-Gens

Abb. 3.5.: 4-Generationen Stammbaum der Familie mit SCA28

Abb. 3.6.: PCR-Produkte der Allel-spezifischen PCR

Abb. 3.7.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Introns 7 des *AFG3L2*-Gens

Abb. 3.8.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des 3'UTR des *AFG3L2*-Gens

Abb. 3.9.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Exons 11 des *AFG3L2*-Gens

Abb. 3.10.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Exons 13 des *AFG3L2*-Gens

Abb. 4.1.: In der Arbeit gefundene Sequenzvariationen des *AFG3L2*-Gens

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
A	Alanin
a.d.	aqua dest.
ADCA	autosomal-dominant vererbte cerebelläre Ataxie
<i>AFG3L2</i>	<i>ATPase family gene 3-like 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
D	Deletion
D	Aspartat
DNA	2-Desoxyribonukleinsäure
dATP	2-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2-Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	2,3-Dideoxyribonukleosidtriphosphat
dGTP	2-Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	2-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRPLA	Dentato-rubralen Pallido-Luysischen
dTTP	2-Desoxythymidintriphosphat
E	Glutamat
EA	Episodische Ataxien
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ExoSap	Exonuklease / Shrimp Alkaline Phosphatase
F-Primer	forward primer (Vorwärts-Primer)
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
HPLC	high performance liquid chromatography (Wasser)
I	Isoleucin
K	Lysin

L	Leucin
m	Mitochondrium
M	Methionin
M	molar (mol / l)
Mb	Mega-Basenpaare (10 ⁶ bp)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
MM	Missense-Mutation
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Asparagin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
Q	Glutamin
R	Arginin
RE	Repeat-Expansion
RNA	Ribonukleinsäure
R-Primer	reverse primer (Rückwärts-Primer)
S	Serin
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
Sek.	Sekunden
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
<i>SpG7</i>	<i>spastic paraplegia 7</i>
SSCP	Single-strand Conformation Polymorphism Analysis
T	Thymin
T	Threonin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	NNNN-Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unbekannt
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett

V	Valin
Vol.	Volumen

1 Einleitung

1.1. Ataxie

Als Ataxie wird eine Störung der Koordination von Bewegungsabläufen bezeichnet. Die häufigste Ursache dafür sind Beeinträchtigungen der Funktionen des Kleinhirns und die seiner afferenten und efferenten Leitungsbahnen.

Zu den Symptomen einer cerebellären Ataxie gehören u.a. Gangstörungen (Gangataxie), Gleichgewichtsregulationsstörungen beim Sitzen und Stehen (Rumpfataxie), undeutliches Sprechen (Dysarthrie), ein Nystagmus (□Augenzittern□), Koordinationsstörungen der Handbewegungen (zum Bsp.: Dysdiadochokinese) und ein Aktions- bzw. Intentionstremor. Verschiedenste Faktoren können ursächlich sein für die Schädigung des Kleinhirns: Zum Beispiel entstehen durch Intoxikation mit Alkohol oder Medikamenten (zum Bsp.: Lithium, Barbiturate) akute, reversible Ataxien. Das Schnüffeln von Benzin oder Klebstoffen, aber auch die Einnahme zytotoxischer Chemotherapeutika (zum Bsp.: Fluorouracil) kann akute bzw. subakute Ataxien verursachen. Außerdem können Infektionen mit Erregern wie Toxoplasmen, dem Epstein-Barr-Virus oder Borrelien, um nur einige zu nennen, eine Ataxie hervorrufen. Tumoren und Autoantikörper (zum Bsp.: Ovarial- und Mammakarzinom bzw. Anti-Yo) können ursächlich sein für die sogenannte paraneoplastische cerebelläre Ataxie. Eine akute fokale Ataxie entsteht meist auf dem Boden einer cerebrovaskulären Erkrankung mit der Folge eines ischämischen Infarktes oder einer Kleinhirnblutung. Aber auch Subduralhämatome, bakterielle Abszesse und Raumforderungen im Kleinhirn kommen als Ursache dafür in Frage. Eine chronische Ataxie kann ebenso durch eine Multiple Sklerose verursacht werden, wie durch metabolische Störungen (zum Bsp.: Hypothyreose) oder chronische Infektionen (zum Bsp.: Syphilis). Sich über Monate bis Jahre entwickelnde chronische, symmetrische Ataxien deuten hingegen auf eine hereditäre Form hin.

Es lassen sich demzufolge genetisch bedingte von erworbenen cerebellären Ataxien unterscheiden, wobei die ersteren entweder autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal vererbt werden.

1.2. Spinocerebelläre Ataxien (SCA)

Zu den autosomal-dominanten cerebellären Ataxien (ADCA) gehört die große Gruppe der Spinocerebellären Ataxien (SCA). Dazu zählen die SCAs 1-31, die Dentato-rubrale Pallido-Luysische Atrophie (DRPLA) und die Episodischen Ataxien (EA 1-6). Die Prävalenz beträgt bis zu 5-7 / 100.000 Individuen in einigen Populationen (van de Warrenburg *et al.*, 2002, Craig *et al.*, 2004). Es handelt sich bei den SCAs um eine sowohl klinisch als auch genetisch sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, die zumeist zwischen dem 30. und dem 50. Lebensjahr erstmalig symptomatisch werden. Selten wurden Fälle berichtet, bei denen sich bereits im Kindesalter oder aber erst nach dem 60. Lebensjahr erste Anzeichen einer Kleinhirndysfunktion bemerkbar machten (van de Warrenburg *et al.*, 2002, Craig *et al.*, 2004, Soong, 2004).

Eine ursächliche Behandlung der Spinocerebellären Ataxien ist bisher nicht bekannt. Im Vordergrund stehen funktionserhaltende Therapien mit dem Ziel, Mobilität und Lebensqualität der Patienten über eine lange Zeit zu erhalten (medikamentös, Physiotherapie, Ergotherapie, Logopädie).

Die Einteilung der ADCAs anhand klinischer Symptome ist möglich und unverzichtbar. 1993 differenzierte Harding erstmalig die bis dahin bekannten ADCAs, auf der Basis ihrer Klinik, in drei Hauptgruppen. Diese Klassifikation ist bis heute gültig (siehe Tabelle 1.1.) und jede neu beschriebene Ataxieform wird dieser Einteilung hinzugefügt.

Tab. 1.1.: ADCA-Klassifikation nach Harding ergänzt durch neu beschriebene SCA-Formen

ADCA-Typ	ADCA I	ADCA II	ADCA III
Klinik	Progressive Ataxie mit Sakkadenverlangsamung, Pyramidenbahnzeichen, Muskelatrophien, Sensibilitätsstörungen, Demenz	Progressive Ataxie mit Retinadegeneration	Rein cerebelläre Ataxie
Neuropathologie	Degeneration des Kleinhirns, der Basalganglien, des Kortex, des N.opticus, des pontomedullären Systems, des Rückenmarks, peripherer Nerven	Degeneration des Kleinhirns und der Retina	Degeneration des Kleinhirns
Genloci	SCA 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12, 13, 17, 18, 19/22, 20, 21, 23, 25, 27, 28, DRPLA	SCA 7	SCA 5, 6, 11, 14, 15, 26, 30, 31

Jedoch bleibt eine Zuordnung schwierig und ist nur bedingt möglich. Aus diesem Grund ist es ebenso sinnvoll eine genetische Klassifikation zu verwenden. Bisher sind insgesamt 28 SCA-Loci bekannt. Für mindestens 16 ist das entsprechende Gen identifiziert worden (Duenas *et al.*, 2006). Die SCA-Subtypen 1, 2, 3, 6, 7 und 17 und die DRPLA werden jeweils durch eine CAG-Repeat-Expansion in der kodierenden Region des entsprechenden Gens verursacht. Diese führt im Protein zu einer abnorm langen Polyglutamatkette (Zoghbi and Orr, 2000). SCA 10, 12 und 31 entstehen durch Repeat-Expansionen außerhalb der kodierenden Region der Gene, welche zu einer Fehlregulation in der Genexpression führen (Holmes *et al.*, 1999; Koob *et al.*, 1999; Matsuura *et al.*, 2000). Ursächlich für die SCA 5, 11, 13, 14, 15, 27 und 28 sind verschiedenste Mutationen, wie Deletion, Missense- und Nonsense-Mutation, Insertion usw. in den betreffenden Genen (Ishkawa *et al.*, 2005, Ikeda *et al.*, 2006, Waters *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2003, Yabe *et al.*, 2003, van Swieten *et al.*, 2003, Mariotti *et al.*, 2008).

Tabelle 1.2. zeigt eine Übersicht bisher bekannter SCA-Subtypen.

Tab. 1.2.: Zusammenfassung der betroffenen Gene und Mutationen der SCA-Subtypen (modifiziert nach Soong *et al.*, 2007 und Duenas *et al.*, 2006)

SCA-Typ	Genomlokalisierung	Gen	Mutation
SCA 1	6p23	ATXN 1	CAG-RE
SCA 2	12q24	ATXN 2	CAG-RE
SCA 3	14q32	ATXN 3	CAG-RE
SCA 4	16q22.1	U	U
SCA 5	11q13	SPTBN2	D, MM
SCA 6	19p13	CACNA1A	CAG-RE
SCA 7	3p21.1-p12	ATXN7	CAG-RE
SCA 8	13q21	ATXN8	CTG/CAG-RE
SCA 10	22q13	ATXN 10	ATTCT-RE
SCA 11	15q15.2	TTBK2	MM
SCA 12	5q31	PPP2R2B	CAG-RE
SCA 13	19q13.3-q13.4	KCNC3	MM
SCA 14	19q13.4	PRKCG	MM
SCA 15	3p26-p25	ITPR1	D
SCA 17	6q27	TBP	CAG-RE
SCA 18	7q22-q32	U	U
SCA 19	1p21-q21	U	U
SCA 20	11p13-q11	U	U
SCA 21	7p21.3-p15.1	U	U
SCA 22	1p21-q21	U	U
SCA 23	20p13-p12.3	U	U
SCA 25	2p21-p13	U	U
SCA 26	19p13.3	U	U
SCA 27	13q34	FGF14	MM
SCA 28	18p11.22-q11.2	AFG3L2	MM

SCA-Typ	Genomlokalisierung	Gen	Mutation
SCA 29	3p26	U	U
SCA 30	4q34.3-q35.1	U	U
SCA 31	16q22.1	U	TGGAA-RE

MM: Missense-Mutation; D: Deletion; U: Unbekannt; RE: Repeat-Expansion

Die in Tab. 1.2. gezeigten Mutationen führen früher oder später zur Kleinhirndegeneration und -dysfunktion, woraus schließlich eine cerebelläre Ataxie resultiert.

Obwohl mindestens 28 SCA-Typen beschrieben wurden, ist nicht für jede Form das betroffene Gen bzw. die zu Grunde liegende Mutation bekannt. Die Suche danach bleibt weiterhin Gegenstand der Wissenschaft.

1.3. Spinocerebelläre Ataxie Typ 28 (SCA 28)

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 28 wurde erstmalig 2006 von Cagnoli *et al.* anhand einer italienischen 4-Generationen Familie beschrieben. Der Gruppe gelang es mittels Kopplungsanalysen die Region p11.22-q11.2 auf Chromosom 18 als neuen SCA-Genlocus zu identifizieren.

2008 publizierten Mariotti *et al.* die ersten, sich in dieser Region befindenden, Mutationen. Beschrieben wurde eine Missense-Mutation (GAA → AAA) in einem nicht genannten Gen der Region 18p11.22-q11.2, die bei allen 11 Erkrankten der 4-Generationen-Familie aus Italien auftrat und den Aminosäureaustausch Glutamat gegen Lysin zur Folge hatte. Außerdem beschrieb die Gruppe einen weiteren Missense-Austausch (TCC → TTA, Austausch von Serin gegen Leucin) in dieser Genregion anhand einer zweiten italienischen Familie, bei der es in 2 Generationen 2 Erkrankte gab, denen kein bis dahin bekannter SCA-Locus zugeschrieben werden konnte. Das Erkrankungsalter aller 13 Betroffenen betrug im Durchschnitt 19,6 Jahre und die folgenden Symptome traten gehäuft auf: Gangataxie (100 %), Tremor der oberen Extremitäten (92 %), Dysarthrie (85 %), Sakkaden (66 %), Ptosis (58 %), Nystagmus (38 %), Augenmuskelparesen (77 %), gesteigerte Reflexe (83 %), ein erhöhter Muskeltonus der unteren Extremitäten (27 %) und ein

positives Babinski-Zeichen (40 %). Zudem konnte bei allen Patienten eine Kleinhirnatrophie mittels MRT-Untersuchungen festgestellt werden (Mariotti *et al.*, 2008). Auf dem Treffen der Amerikanischen Gesellschaft für Humangenetik 2008 präsentierten Cagnoli *et al.* und Di Bella *et al.* schließlich das Gen *ATPase family gene 3-like 2* (*AFG3L2*), dessen Mutationen ursächlich für die SCA 28 sind. Auf der Tagung wurden zudem von beiden Gruppen insgesamt 6 verschiedene Mutationen dieses Gens in 8 Familien vorgestellt. Auffällig ist einerseits die Lokalisation dieser 6 Basenaustausche: Sie befinden sich alle in den Exons 15 und 16 des *AFG3L2*-Gens. Darüber hinaus ist bemerkenswert, dass 3 der 6 Mutationen die Aminosäure an Position 666 betreffen und 2 die Position 671. Keine der Mutationen konnte in 200 gesunden Kontrollen gefunden werden. Tabelle 1.3. zeigt eine Übersicht dieser *AFG3L2*-Mutationen.

Tab. 1.3.: Mutationen im *AFG3L2* nach Cagnoli *et al.* 2008 und DiBella *et al.* 2008

Lokalisation im Protein	Aminosäurenaustausch
654	Threonin→Isoleucin
666	Methionin→Arginin Methionin→Threonin Methionin→Valin
671	Glycin→Arginin Glycin→Glutamat

1.4. Das Gen *AFG3L2*

Die Gruppe um Banfi *et al.* entdeckte 1999 auf dem kurzen Arm von Chromosom 18 (Locus: 18:12,687,774-12,711,928) das Gen *ATPase family gene 3-like 2*, kurz *AFG3L2* (Ensembl GeneID: ENSG00000141385). Es umfasst 17 Exons und kodiert für das 797 Aminosäuren lange Protein *AFG3L2*. Bisher ist nur die aus 17 Exons bestehende Splice-Variante bekannt.

In Abbildung 1.1. ist eine schematische Darstellung des *AFG3L2*-Gens und seiner Proteindomänen zu sehen. Die bekannten Varianten im *AFG3L2*-Gen sind in Tabelle 7.1. im Anhang gezeigt (gemäß der Datenbank „Ensembl“ <http://www.ensembl.org/>). Drei der dort aufgeführten SNPs liegen in den Exons 11, 13 und 14 des Gens. Es handelt sich dabei um sogenannte stille Mutationen, die nicht mit einer veränderten Aminosäure im Protein einhergehen. Im Intronbereich befinden sich weitere 9 Polymorphismen und in der splice site kommen an 2 Stellen im Gen jeweils 2 verschiedene Allelvarianten vor. Außerdem existiert eine Variation im 5′UTR und 5 liegen im 3′UTR.

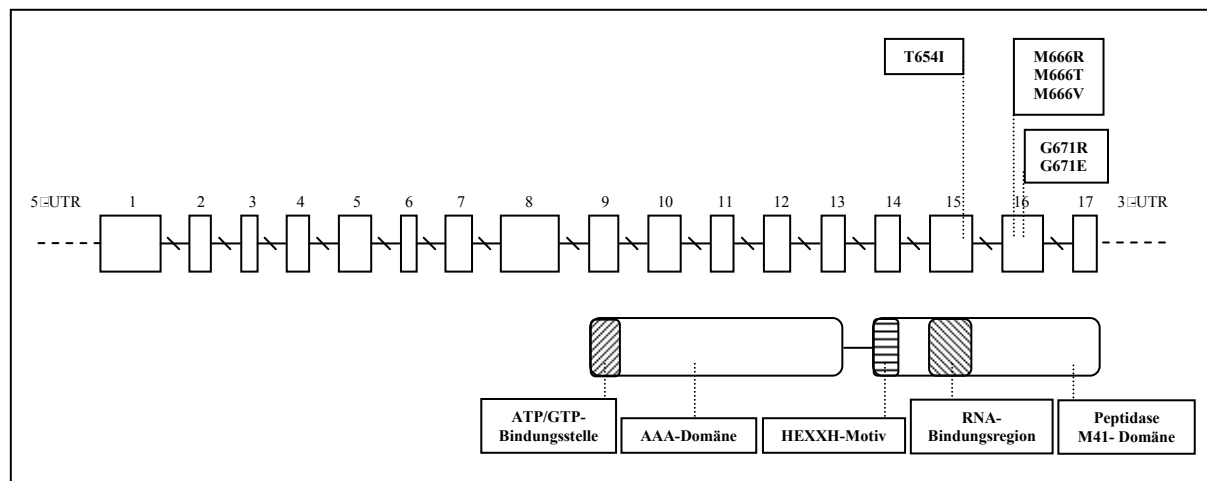


Abb. 1.1.: Schematische Darstellung des *AFG3L2*-Gens, seiner Proteindomänen und der zu Beginn der Arbeit bekannten Mutationen

Die Exons sind maßstabsgetreu gezeigt und die Introns durch \asymp symbolisiert. Die untranslatierten Bereiche (UTR) sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Die bisher bekannten Mutationen sind alle in den Exons 15 und 16 lokalisiert.

1.5. Das Protein AFG3L2

Das Protein AFG3L2 wird ubiquitär exprimiert und ähnelt sehr stark dem Paraplegin, welches durch das Gen *SPG7* kodiert wird. Mutationen in *SPG7* verursachen sowohl die unkomplizierte, als auch die komplizierte autosomal-rezessive Hereditäre Spastische Paraplegie (HSP) (Paulus *et al.*, 2002). Bei dieser Erkrankung kommt es zur retrograden Degeneration kortikaler Motoneurone.

Das Protein beinhaltet eine AAA-Domäne (Adenosin Triphosphatasen mit diversen zellulären Aktivitäten), welche durch Exon 9 bis Exon 13 kodiert wird, mit einer ATP/GTP-Bindungsstelle, kodiert von Exon 9. Desweiteren enthält es eine M41-Peptidase-Domäne mit einem HEXXH-Motiv, welches charakteristisch ist für eine Zinkfingerdomäne und durch Exon 14 kodiert wird, bzw. eine durch Exon 15 kodierte RNA-Bindungsregion (Banfi *et al.*, 1999).

Sowohl bei AFG3L2, als auch bei Paraplegin handelt es sich um mitochondriale Metalloproteasen. Beide Proteine sind Bestandteile der in der inneren Mitochondrienmembran vorkommenden m-AAA-Proteasen, von denen es zwei Isoenzyme gibt: den m-AAA-Heterokomplex, bestehend aus AFG3L2 und Paraplegin sowie dem m-AAA-Homokomplex, der nur aus AFG3L2 besteht. Diese Proteasen übernehmen in Neuronen eine Schlüsselfunktion: Sie sind wichtig für den Aufbau der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette und für die Protein-Qualitätskontrolle. So werden entfaltete Proteine von ihnen gebunden und der Proteolyse zugeführt. AFG3L2 ist darüber hinaus an der Paraplegin-Prozessierung, sowie seiner eigenen Reifungsspaltung während des Transportes in die Mitochondrien beteiligt (Koppen *et al.*, 2009, Maltecca *et al.*, 2008).

1.6. Mausmodell

Ein 2009 von Maltecca *et al.* beschriebenes Mausmodell, das haploinsuffizient für *AFG3L2* ist, beweist die Störung der Balance und der motorischen Koordination aufgrund mitochondrialer Dysfunktion. Haploinsuffizienz bedeutet, dass eine der beiden im Organismus vorhandenen Genkopien durch eine Mutation funktionsunfähig ist und somit keine ausreichende Menge des Genproduktes hergestellt werden kann. Durch diese Insuffizienz kommt es zur Entstehung eines veränderten, "kranken" Phänotypen.

Laut Maltecca *et al.* führt eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale zur "Purkinje cell dark degeneration" und daraufhin zur cerebellären Dysfunktion. Als "dark cell degeneration" wird ein Degenerationsprozess bezeichnet, bei dem die Purkinjezellen ultrastrukturelle Merkmale wie irreguläre Zellform und Zellschrumpfung, kondensiertes Chromatin und dunkles Zytoplasma aufweisen. Die betroffenen Mäuse zeigen ein ähnliches Beschwerdebild wie SCA 28-Patienten.

Dies lässt den Schluss zu, dass das Mausmodell geeignet ist, die Pathophysiologie der SCA 28 zu beschreiben (Maltecca *et al.*, 2009).

Mausmodelle anderer Gruppen bekräftigen ebenfalls die Annahme, dass Mutationen im *AFG3L2*-Gen, welches vor allem in neuronalen Geweben exprimiert wird, die Ursache für die SCA 28 sind (Maltecca *et al.*, 2008, Martinelli *et al.*, 2009).

In *Afg3l2*^{-/-} Mausmutanten kommt es nachgewiesenermaßen zur Störung der Axonentwicklung. Sowohl im zentralen, als auch im peripheren Nervensystem sind eine verminderte Myelinisierung der Nervenfasern und eine Abnahme der Axondicke feststellbar. Zudem liegt eine veränderte Morphologie der Mitochondrien vor. Diese sind geschwollen und weisen beschädigte Cristae auf. Der Metabolismus dieser Zellorganellen ist damit gestört. Vor allem bei den Komplexen I und III der Atmungskette ist eine verringerte Aktivität durch den AFG3L2-Verlust zu verzeichnen. Bei den betroffenen Tieren kommt es zunächst zur Parese der Hinterbeine und schließlich zu einer Tetraplegie und zum schnellen Tod. Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse mit nur einem fehlerhaften Paraplegin-Allel einen milden Phänotyp. Bei ihnen kommt es zwar vor allem in den Motoneuronen zur späten Axondegeneration (late-onset) und zu einer Akkumulation morphologisch veränderter Mitochondrien, dies hat jedoch nur eine leichte und langsam fortschreitende Dysfunktion der Motorik zur Folge (Maltecca *et al.*, 2008).

Auch bei *Spg7*^{-/-} Mausmutanten mit einer heterozygoten *AFG3L2*-Mutation wird die Ausprägung eines ataktischen Phänotyps beschrieben. Ursächlich dafür sind eine beschleunigte Axonopathie, eine Kleinhirndegeneration mit dem Verlust von Purkinjezellen und eine reaktive Astroglia. Die Tatsache, dass es bei diesen Mäusen schneller und stärker zur Ausprägung der Symptome kommt als bei den Tieren, denen ausschließlich das SPG7 fehlt, deutet auf die starke genetische Interaktion zwischen *AFG3L2* und *SPG7* hin. Zwar sind beide m-AAA-Proteasen zur Verhinderung der neuronalen Degeneration notwendig, allerdings ist der AFG3L2-Homokomplex in der Lage, ein Fehlen des SPG7 enthaltenden Heterokomplexes zumindest teilweise zu kompensieren (Martinelli *et al.*, 2009).

1.7. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden inwieweit die SCA 28 bei Ataxie-Patienten in unserer Population eine Rolle spielt und ob und in welchem Rahmen eine geeignete Diagnostik etabliert und angeboten werden muss. Die eindeutige Diagnose der Erkrankung ist für die Betroffenen wichtig, um für sie und ihre Angehörigen eine qualifizierte humangenetische Beratung und eine entsprechende Therapie anbieten zu können.

In dieser Arbeit sollten 140 Proben von Patienten, bei denen eine autosomal-dominante Ataxie diagnostiziert, aber keinem bekannten Genlocus zugeordnet werden konnte, auf Mutationen im *AFG3L2*-Gen hin untersucht werden. Für das Screening der Exons 15 und 16, in denen die publizierten Mutationen liegen, waren SSCP-Analysen durchzuführen. Ergänzend sollte für 20 ausgesuchte Proben die Kodierregion, bestehend aus 17 Exons, vollständig sequenziert werden.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Ammoniumperoxodisulfat, 10%ig	Merck
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
dNTPs	Q-BIOgene
Essigsäure, 100%ig	Merck
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Merck
ExoSAP IT® (Exonuklease / Shrimp Alkaline Phosphatase)	USB
Ficoll 400	Pharmacia Biotech
Formamid	Fluka
Formaldehyd; 37%ig	SIGMA
Hi-Di™-Formamide	Applied Biosystems
HPLC	Merck
Illustra™Sephadex™G-50	GE Healthcare
Q-Solution	QIAGEN
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co KG
Salpetersäure; 65%ig	Merck
Silbernitrat	Caelo, Caesar & Loretz
StarPure Agarose	STARLAB
Taq-DNA Polymerase	Q-BIOgene
TEMED (NNNN-Tetramethylethylenediamine)	SIGMA
Titriplex III (EDTA)	Merck
Tris	MP Biomedicals
Urea	Merck
Xylencyanol	Serva

2.1.2. Nukleinsäuren

Längenstandard: 100 bp DNA Ladder	invitrogen
pBR 322-Marker	Bio.Labs
synthetische DNA-Oligonukleotide (Tab 2.1. und 2.2.)	biomers

Tab. 2.1.: Synthetische DNA-Oligonukleotide für die PCR

Exon	Länge	Primer	Produktlänge F+R
1	284 bp	F 5'ccgagcccgttcccaggcccgcc-3' R 5'ccttgacgtccgctctcccagcc-3'	274 bp
2	100 bp	F 5'gagagagacctttcatctactttatg-3' R 5'gacataagtggaggcaggggaatggg-3'	291 bp
3	78 bp	F 5'gtgatgcatcagctgcttg-3' R 5'gaaactaccaccattatacatg-3'	232 bp
4	107 bp	F 5'gtaactgatcagttgccacag-3' R 5'gccaggttaacctgctgactg-3'	435 bp
5	153 bp	F 5'gagcttaaagagtatctcaag-3' R 5'gtatgaggcaggttttccttc-3'	224 bp
6	75 bp	F 5'gttgaaccgttttagtgaattg-3' R 5'gcaccagggacagaacacagtg-3'	272 bp
7	125 bp	F 5'atcttgaccacatgtgaaagctgg-3' R 5'acttcacagaattataactcag-3'	452 bp
8	274 bp	F 5'cttgaattatttggatacac-3' R 5'catctctagcaagtgcctccatc-3'	294 bp
9	138 bp	F 5'ccgattatttcatttctatc-3' R 5'cgacagagtcagactccatctc-3'	303 bp
10	154 bp	F 5'gtgctcatatgttctgatggtg-3' R 5'gaaaagaaaatcatattgaaacag-3'	264 bp
11	108 bp	F 5'ggtccagtgctcatgagttagg-3' R 5'gtaagaaagtaaaccggtacctgg-3'	279 bp

Exon	Länge	Primer	Produktlänge F+R
13	111 bp	F 5'gtccatattgtgtgactgatcag-3' R 5'gcccaaacagagaaatccctgg-3'	255 bp
14	116 bp	F 5'ctgtctttaatgtcagtgac-3' R 5'cttgagtgactgcagcagcagc-3'	247 bp
15	201 bp	F 5'ctgtttatacacagatgtttgac-3' R 5'cattcatagaatgtcaattctcgtgc-3'	346 bp
16	195 bp	F 5'caggctgctgtgtagattttgc-3' R 5'cagctctatctactcaatc-3'	336 bp
17	840 bp	F 5'atcctttttggaatggggcacctg-3' R 5'gaaagccacagctgaaataatg-3'	390 bp

Tab. 2.2.: Synthetische DNA-Oligonukleotide für die Allel-spezifische PCR

Exon	Primer	Produktlänge F+R
	Fmut 5'ctgcaagattgatagatgata-3'	75
16	F 5'cacgacgttgtaaacgacctgcaagattgatagatg-3' R 5'ctgtgagaagagctactgttc-3'	94

2.1.3. Puffer und Lösungen

Agarosegel 2 %ig bzw. 2,5 %ig	100 ml 1x TBE 2 g / 2,5 g Agarose 5 µl Ethidiumbromid
SSCP-Gel; 8 % PAA; 10 % Urea	7,5 g Urea 20 ml Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) 15 ml 5x TBE 26,5 µl TEMED mit a.d. auf 75 ml auffüllen

Silbernitratlösung	4,04 g Silbernitrat 2 l a.d.
Reducer	59,2 g Natriumbicarbonat 2 l a.d.
10 %ige Ethanol-Lösung	200 ml Ethanol 1800 ml a.d.
10 %ige Essigsäure-Lösung	200 ml Essigsäure 1800 ml a.d.
5x TBE; pH 8,0	215 g Tris 110 g Borsäure 14,8 g Titriplex III auf 4 l a.d.
1x TBE	800 ml 5x TBE in 3200 ml a.d.
Reduktionslösung	1 l Reducer 680 µl Formaldehyd
Salpetersäure-Lösung	31 ml Salpetersäure 1969 ml a.d.
3x Ficoll-Lösung	145 µM Bromphenolblau 186 µM Xylencyanol 7,5 µM (w/v) Ficoll 400
6x Ficoll-Lösung	289 µM Bromphenolblau 371 µM Xylencyanol 15 µM (w/v) Ficoll 400

pBR322-Marker für SSCP-Gel	480 µl 6x Ficoll 660 µl HPLC 60 µl pBR322, Konzentration 50 ng/µl
Längenstandard für Agarosegelelektrophorese	100 µl Ladder 1200 µl HPCL 700 µl 6x Ficoll
2,5x Term.Mix 1.1	Applied Biosystems
5x Sequenzier-Puffer	Applied Biosystems
10x Incubation Mix	Q-BIOgene
10x Puffer	QIAGEN

2.1.4. DNA-Proben

Die 140 DNA-Proben von Personen mit einer bekannten autosomal-dominanten Ataxie wurden im Institut für Humangenetik der Universität Lübeck aus Blutproben extrahiert. Die 200 Kontroll-DNAs stammen ebenfalls aus dem Institut für Humangenetik der Universität.

Die Arbeit ist von der Ethik-Kommission am 15.12.1998 genehmigt worden. Aktenzeichen 98-144.

2.1.5. Software

SeqScape V2.5	Applied Biosystems
Sequencing Analysis 5.2	Applied Biosystems
Seqworks 1.03 beta	Sven Opitz

2.2. Methoden

2.2.1. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde 1983 von K.B.Mullis entwickelt und erlaubt es, *in vitro* sehr schnell von definierten DNA-Abschnitten eine Vielzahl identischer Kopien anzufertigen.

Typischerweise besteht ein PCR-Zyklus aus drei unterschiedlichen Temperaturstufen. Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt, wobei folgende Vorgänge nacheinander ablaufen: Zunächst wird der DNA-Strang durch thermische Denaturierung bei 95 °C in seine zwei Einzelstränge aufgeschmolzen. Da die DNA zu Beginn noch in ihrer komplexen, hochmolekularen Struktur vorliegt, ist hier eine Zeitdauer von ca. 5 Minuten notwendig, um auch GC-reiche Sequenzen zu trennen.

Anschließend findet die Anlagerung der Primer (Annealing) statt. Dabei handelt es sich um Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 20 Nukleotiden, die an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang binden. Durch die Verwendung von zwei Primern, von denen einer am 5'-Strang und der andere am 3'-Strang der DNA bindet, kommt es zur Eingrenzung des zu vervielfältigenden DNA-Bereichs. Bei der Auswahl der Primer gilt es verschiedenen Anforderungen gerecht zu werden: Die zumeist sequenzspezifischen Oligonukleotide sollten eine Länge von 17 Nukleotiden nicht unterschreiten, einen ausgeglichenen G/C- zu A/T-Gehalt aufweisen, einen gemeinsamen Schmelzpunkt zwischen 55 und 80 °C haben und möglichst keine 5'-ungewöhnlichen 3'-Basenabfolgen wie poly-A- oder lange G/C-Abschnitte enthalten.

Für das Annealing wird der Reaktionsansatz für ca. 30 Sekunden auf eine, durch die Primer festgelegte, Temperatur abgekühlt. In der Regel liegt diese knapp (ca. 3 °C) unterhalb der errechneten Schmelztemperatur der Oligonukleotide, bei 55-65 °C. Es entsteht ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, welches entsprechend verlängert werden kann.

Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, dem Aktivitätsoptimum der verwendeten hitzestabilen *Taq*-DNA-Polymerase. Die Polymerase erkennt den Primer-DNA-Komplex und beginnt an dessen freiem 3'-OH-Ende mit der Synthese des Gegenstranges aus den freien dNTPs in 5'→3'-Richtung (Elongation).

Die Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP sollten in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen. Außerdem sorgt eine Pufferlösung für eine geeignete Reaktionsumgebung.

Die Elongationsdauer beträgt 30-60 Sekunden pro 1000 Basenpaare und hängt von der verwendeten DNA-Polymerase ab. Die bekannteste und am häufigsten verwendete hitzestabile *Taq*-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Mit ca. einem Fehler pro 10^5 Basen ist die Fehlerrate dieses Enzyms relativ hoch. Ursächlich hierfür ist die fehlende 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität. Die sogenannten Proof-reading-Polymerasen *Pfu* und *Pwo* besitzen hingegen diese Funktion, die es ihnen erlaubt, falsch eingebaute Basen sofort zu entfernen. Allerdings ist ihre Syntheserate wesentlich geringer als die der *Taq*-Polymerase.

Jeder Zyklus bedeutet eine exponentielle Vervielfachung der Zielsequenz, da auch die jeweils neu gebildeten Stränge als Matrize zur Verfügung stehen.

Nach Beendigung des letzten Zyklus wird die Elongationszeit auf mehrere Minuten verlängert, um alle unvollständigen Produkte zu komplettieren.

Für die meisten PCR-Anwendungen liegt nach spätestens 30 Zyklen genügend Produkt zur weiteren Analyse vor.

Die PCR ist eine extrem empfindliche Methode und anfällig für Kontaminationen durch Fremd-DNA. Aufgrund dessen ist es erforderlich, bei jedem PCR-Versuch einen Kontrollansatz (Negativprobe), welcher keine DNA enthält, mitzuführen.

Außer der beschriebenen Standard-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit eine sogenannte Allel-spezifische PCR durchgeführt, um einen Basenaustausch im Exon 16 des *AFG3L2*-Gens zu untersuchen. Bei dieser Form der Polymerase-Kettenreaktion wird neben den beiden regulären Primern, ein zusätzliches Oligonukleotid, dessen Sequenz die veränderte Base am 3'-Ende enthält, zum Reaktionsansatz zugegeben. Ist die Mutation nicht vorhanden in der abzuschreibenden Matrize, kommt es nicht zur Primer-Hybridisierung und somit nicht zum Entstehen eines PCR-Produktes. Im umgekehrten Fall entsteht sehr wohl ein Produkt, welches in der anschließenden Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann.

Die PCR-Bedingungen für die 17 Exons des *AFG3L2*-Gens sind in den Tabellen 2.6. und 2.7. gezeigt. Die Annealing-Temperatur für Exon 1 musste höher gewählt werden.

Tab. 2.3.: PCR-Ansatz für die Exons 2-17 des *AFG3L2*-Gens

		Hersteller	Volumen in μl
DNA	50 ng/ μ l	-	1,0
F-Primer	10 pmol/ μ l	Biomers	1,0
R-Primer	10 pmol/ μ l	Biomers	1,0
10 x Puffer	Ohne MgCl ₂	Qbiogene	2,5
dNTPs	10 mM	Qbiogene	0,5
H ₂ O	-	Merck	18,95
Taq-Polymerase	5 U/ μ l	Qbiogene	0,05
Ansatzvolumen			25,0

Tab. 2.4.: PCR-Ansatz für Exon 1 des *AFG3L2*-Gens

		Hersteller	Volumen in μl
DNA	50 ng/ μ l	-	1,0
F-Primer	10 pmol/ μ l	Biomers	1,0
R-Primer	10 pmol/ μ l	Biomers	1,0
10 x Puffer	-	QIAGEN	2,5
dNTPs	10 mM	Qbiogene	0,5
Q-Solution	-	QIAGEN	5,0
H ₂ O	-	Merck	13,85
Taq-Polymerase	5 U/ μ l	QIAGEN	0,15
Ansatzvolumen			25,0

Tab. 2.5.: Ansatz für die Allel-spezifische PCR im Exon 16 des *AFG3L2*-Gens

		Hersteller	Volumen in μl
DNA	50 ng/ μ l	-	1,0
F-Primer	10 pmol/ μ l	Biomers	0,5
Fmut-Primer	10 pmol/ μ l	Biomers	4
R-Primer	10 pmol/ μ l	Biomers	1,0
10 x Puffer	-	QIAGEN	2,5
dNTPs	10 mM	Qbiogene	0,5
H ₂ O	-	Merck	15,45
Taq-Polymerase	5 U/ μ l	Qbiogene	0,05
Ansatzvolumen			25,0

Tab. 2.6.: Schematische Darstellung des PCR-Programms für die Exons 2-17 und für die Allel-spezifische PCR des Exon 16

PCR-Schritt	Temperatur in °C	Zeit	
Initialisierung	95	5 Minuten	
Denaturierung	95	30 Sekunden	
Annealing	55	30 Sekunden	30 Zyklen
Elongation	72	30 Sekunden	
Elongation	72	7 Minuten	

Tab. 2.7.: Schematische Darstellung des PCR-Programms für das Exon 1

PCR-Schritt	Temperatur in °C	Zeit	
Initialisierung	95	5 Minuten	
Denaturierung	95	30 Sekunden	
Annealing	65	30 Sekunden	30 Zyklen
Elongation	72	30 Sekunden	
Elongation	72	7 Minuten	

Durchführung der PCR:

Die in den Tabellen 2.3. bis 2.5. gezeigten Reaktionsansätze wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte gegeben, wobei die DNA vorgelegt und anschließend der Mastermix darauf pipettiert wurde. Die Platte wurde dann mit einem Deckel verschlossen und in einem Cycler das gewünschte Programm verwendet. Die Amplifikation des Exons 1 wurde mit einem PCR-Kit von QIAGEN durchgeführt. Dabei erlauben ein spezieller Puffer, eine Q-Solution und eine QIAGEN *Taq*-Polymerase die Vervielfältigung dieses Exons.

2.2.2. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

a) Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese gelingt es sehr einfach DNA-Fragmente aufzutrennen. Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen wandert DNA im elektrischen Feld zur Anode. Entsprechend ihrer Größe und Konformation und abhängig von der Viskosität des Trägermaterials und der angelegten Spannung, bewegen sich die DNA-Fragmente in derselben Zeit verschieden weit. Kleine Fragmente laufen schneller durch die Siebstruktur der Agarose als große.

Der dem Agarosegel zugesetzte Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert währenddessen zwischen die DNA-Basen und macht die Proben schließlich unter einer UV-Lampe sichtbar.

Zur Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente wird außer den Proben noch eine 100 bp Leiter auf das Gel gegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die TBE-Gele mit einer 2 %igen (Standard-PCR) bzw. einer 2,5 %igen (Allel-spezifische PCR) Agarose-Lösung hergestellt. Die Agarose wurde mit dem 1x TBE-Puffer vermischt, in der Mikrowelle aufgekocht, auf ca. 60 °C abgekühlt und mit Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde die Lösung in eine 7 cm x 10 cm große Gelschale gegossen, die mit 2 Kämmen zu jeweils 30 Slots versehen war. Nach der Aushärtung wurden die Geltaschen mit jeweils 3 µl DNA-Probe, verdünnt mit 3 µl 3x Ficoll, gefüllt.

Die Laufzeit der Gele betrug 30 Minuten bei 120 mA.

b) Single-strand Conformation Polymorphism Analysis (SSCP)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine weitere Form der Auftrennung und Darstellung von DNA-Fragmenten. Mit dieser Methode ist es möglich, einen einzigen Basenaustausch in einzelsträngiger DNA, die aufgrund intramolekularer Basenpaarung abhängig von der Basenabfolge verschiedene Sekundärstrukturen annehmen kann, nachzuweisen. Veränderte DNA-Sequenzen können sich von der Wildtyp-DNA in ihrem Wanderverhalten im elektrischen Feld unterscheiden.

Bei der PAGE entstehen die Gele durch Polymerisation von Acrylamid und Vernetzung der linearen Polymere durch N, N'-Methylenbisacrylamid. Initiiert wird die Polymerisation durch Ammoniumpersulfat und TEMED dient dabei als Katalysator.

Durch Zusatz von Harnstoff gelingt eine teilweise Denaturierung der DNA. In der vorliegenden Arbeit wurden Harnstoff-Gele verwendet.

Durchführung:

Zwischen zwei mit einem Abstand von 0,35 mm aufeinander liegenden Glasplatten (39 cm x 33 cm und 42 cm x 33 cm), von denen die kleinere mit Silan beschichtet war, wurde eine Harnstoff-Ammoniumpersulfat-Lösung gegossen. Für ein Gel wurden 75 ml der Urealösung (Zusammensetzung siehe 2.1.3.) mit 500 µl Ammoniumperoxodisulfat vermischt. Am oberen Ende der Platten wurden Haifischzahnkämme zunächst mit den

glatten Seiten ins Gel geschoben. Nach Abschluss der Polymerisation ca. eine Stunde später wurden die Käbme gedreht und mit den Zähnen zur Slot-Bildung ins Gel gesteckt. Anschließend wurden die Gele beladen mit zuvor denaturierten PCR-Produkten (5 Minuten bei 95 °C, dann auf Eis) der Exons 15 und 16 des *AFG3L2*-Gens, verdünnt mit Formamidfarbe, und dem Längenstandard pBR 322. Die Laufzeit der Gele betrug 4 Stunden bei 30 Watt.

Im Anschluss wurden die Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt, die größere, auf der das Gel haften blieb, mit einem 32,5 cm x 38 cm großen Holzrahmen versehen und dann eine Silberfärbung nach folgendem Schema durchgeführt:

Zunächst wurde das Gel zur Fixierung für 10 Minuten mit 10 %igem Ethanol überschichtet und anschließend für 5 Minuten mit 1 %iger Salpetersäure. Nach dreimaligem Spülen mit entionisiertem Wasser fand eine 20 Minuten dauernde Inkubation mit Silbernitrat statt. Dann wurde erneut mit Wasser gespült. Die Entwicklung der Banden geschah durch das Aufbringen einer Reduktionslösung.

Die Färbung wurde durch die Zugabe von 10 %iger Essigsäure gestoppt (3 Minuten). Danach wurde ein letztes Mal für 5 Minuten mit Wasser gespült. Zum Schluss wurde das Gel auf Papier geblottet und mit einer Vakuumpumpe bei 70 °C getrocknet.

Die Färbung machte verschiedene Banden sichtbar: zwei zart gefärbte im oberen Bereich, die den DNA-Einzelsträngen entsprechen und im unterem Bereich des Gels die kräftiger angefärbten DNA-Doppelstränge.

2.2.3. DNA-Sequenzierung

Vor der Sequenzierreaktion wurden 5 µl der PCR-Produkte mit 2 µl ExoSap IT® verdaut, um störende Komponenten abzubauen. Bei der 15minütigen Inkubation des Reaktionsgemischs bei 37 °C wurden Primer und die überschüssigen dNTPs durch die Alkalische Phosphatase zerstört. In den folgenden 15 Minuten bei 80 °C wurden Phosphatase und Polymerase denaturiert und damit inaktiviert.

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger dient der Bestimmung von Basensequenzen und erfolgt nach der sogenannten Kettenabbruchmethode. Die DNA muss hierfür zunächst

denaturiert werden. Anschließend bindet am 3'-Ende des zu sequenzierenden Abschnitts ein Primer. An diesem wird durch eine DNA-Polymerase ein zum DNA-Abschnitt komplementärer Strang synthetisiert. Hierfür enthält der Reaktionsansatz 2'-Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und zusätzlich mit verschiedenen Fluorophoren markierte 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) aller vier Nukleotide. Beim Einbau der Letzteren kommt es zum Kettenabbruch, weil die freie 3'-OH-Gruppe des Zuckers fehlt. Je nach Menge der enthaltenen Dideoxyribonukleosidtriphosphate entstehen schließlich unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren Auftrennung mittels Kapillar-Gelelektrophorese geschieht. Ein Laser im automatischen Sequenzierer regt die markierten ddNTPs zur Fluoreszenz an und liest, je nach Reihenfolge der Farbsignale am Detektor, die entsprechende Basensequenz des untersuchten DNA-Abschnittes ab. Diese wird in farbigen Peaks dargestellt.

Nach der ExoSap-Behandlung wurde die zu sequenzierende DNA zusammen mit dem Primer (Vorwärts-Primer oder Rückwärts-Primer) in eine 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt, der Mix (siehe Tab. 2.8.) dazu pipettiert und die Platte verschlossen in den Cycler gestellt. Die Tabelle 2.9. zeigt das verwendete Programm.

Tab. 2.8.: Sequenzieransatz für die Exons 1-17 des *AFG3L2*-Gens

		Hersteller	Volumen in μl
ExoSap-DNA	ca. 10 ng/ μ l	-	1,0
F- oder R-Primer	10 pmol/ μ l	Biomers	0,5
5 x Seq.-Puffer	-	Applied Biosystems	1,75
H ₂ O	-	Merck	6,25
2,5 x TerminatorMix v.1.1		Applied Biosystems	0,5
Ansatzvolumen			10,0

Tab. 2.9.: Sequenzierprogramm für die Exons 1-17 des *AFG3L2*-Gens

PCR-Schritt	Temperatur in °C	Zeit	
Initialisierung	96	2 Minuten	
Denaturierung	96	10 Sekunden	
Annealing	60	5 Sekunden	25 Zyklen
Elongation	60	1 Minute	

Nach der Sequenzierreaktion wurden je 5 µl Wasser zu den Proben gegeben und dann eine Sephadex-Aufreinigung durchgeführt. Diese funktioniert nach dem Prinzip der Gelfiltration. Moleküle die kleiner sind als 20 bp können die Matrix aus Dextran- und Epichlorhydrinmolekülen nicht passieren. Somit werden die großen Sequenzierprodukte von den kleinen dNTPs und ddNTPs getrennt.

Für diese Art der Aufreinigung wurden die einzelnen Wells einer Multiscreen HV Platte zunächst mit jeweils 45 µl Sephadex und 300 µl Wasser befüllt und ca. eine Stunde zum Quellen beiseite gestellt. Anschließend wurde das überschüssige Wasser bei 2900 U/ min für 5 Minuten herauszentrifugiert. In einem zweiten Waschschrift wurden jeweils 150 µl Wasser in die Wells gegeben und erneut abzentrifugiert. Dann wurden die DNA-Proben vollständig auf die Sephadex-Säulen pipettiert und das Filtrat wiederum bei 2900 U/ min für 5 Minuten herauszentrifugiert. In einem letzten Schritt wurden 4 µl Filtrat mit 10 µl Hi-DiTM-Formamide verdünnt und die Sequenzanalyse durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1. SSCP-Analysen

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Exons 15 und 16 des *AFG3L2*-Gens von 140 nichtverwandten Patienten mit bekannter autosomal-dominanter Ataxie mittels SSCP-Analyse untersucht.

Dieses Screening der beiden Exons zeigte eine Unregelmäßigkeit im Doppelstrang des Exons 16 der Probe 13051. In den Exons 15 und 16 der anderen 139 DNA-Proben waren keine Auffälligkeiten zu erkennen. Die Abbildungen 3.1. und 3.2 zeigen die auffällige Bande des Exons 16 der Probe 13051.

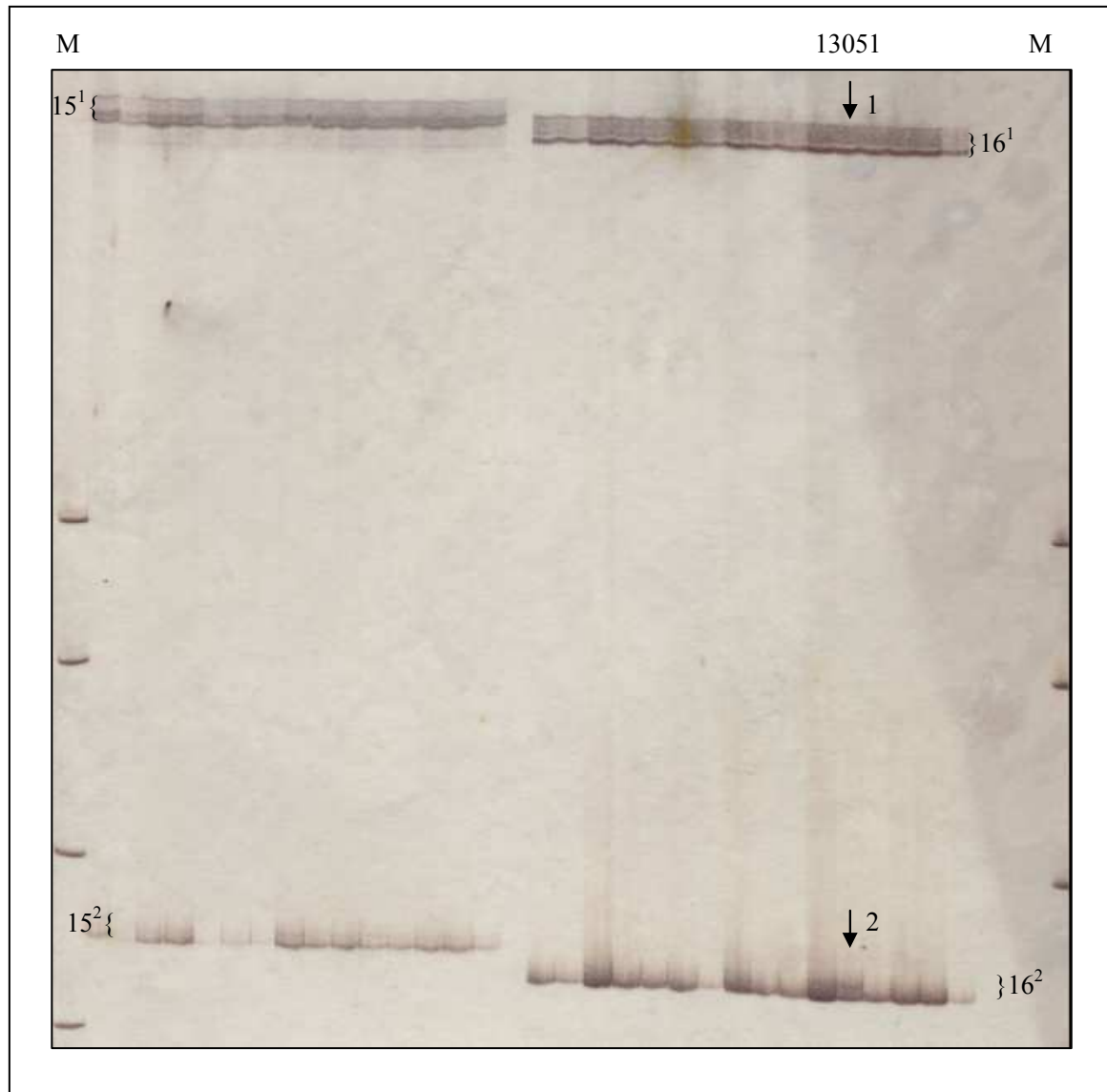


Abb. 3.1.: Polyacrylamid-Gel (8 % PAA; 10 % Urea) für 16 Proben

Nach 4 Stunden Laufzeit zeigt sich diese Auftrennung der DNA-Fragmente der Exons 15 und 16 des *AFG3L2*-Gens im Harnstoffgel. Im oberen Bereich des Gels befinden sich die DNA-Einzelstränge. Die DNA-Doppelstränge sind im unteren Teil zu sehen.

M: Längenstandard; ↓1: DNA-Einzelstränge der Probe 13051; ↓2: DNA-Doppelstränge der Probe 13051 mit Auffälligkeit; 15¹: DNA-Einzelstränge des Exons 15 der aufgetragenen Proben; 15²: DNA-Doppelstränge des Exons 15 der aufgetragenen Proben; 16¹: DNA-Einzelstränge des Exons 16 der aufgetragenen Proben; 16²: DNA-Doppelstränge des Exons 16 der aufgetragenen Proben.

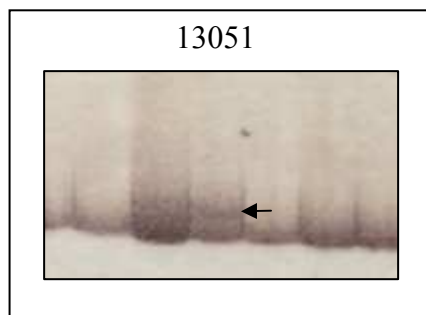


Abb. 3.2.: Polyacrylamid-Gel Ausschnitt
Doppelstränge der Probe 13051 sind als zwei Banden sichtbar.

3.2. Sequenzanalysen

Im Anschluss an die SSCP-Analyse wurden alle 17 Exons des *AFG3L2*-Gens von 20 ausgewählten Patienten-DNAs einschließlich der Probe 13051 mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Überprüft wurde die Spezifität der PCR durch Agarose-Gelelektrophorese wie beispielhaft für Exon 8 in Abbildung 3.3. gezeigt.

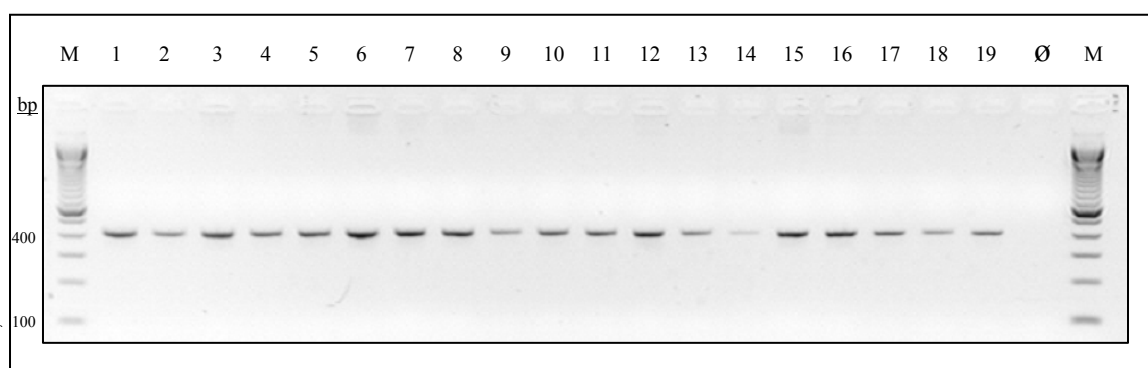


Abb. 3.3.: PCR-Produkte von 19 Patienten auf 1,5 %igem Agarose-Gel
Nach der 30minütigen elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte bei 120 mA sind die erwarteten Fragmente des Exons 8 bei 452 bp sichtbar.
M: Längenstandard (100 bp DNA Ladder); 1-19: DNA-Proben; Ø: Leerprobe

Im Exon 16 der in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese auffälligen DNA 13051 zeigte sich mit Hilfe der Sequenzierung die heterozygote Punktmutation c.2098G>A. Die Abbildung 3.4. zeigt den entsprechenden Ausschnitt aus dem Elektropherogramm.

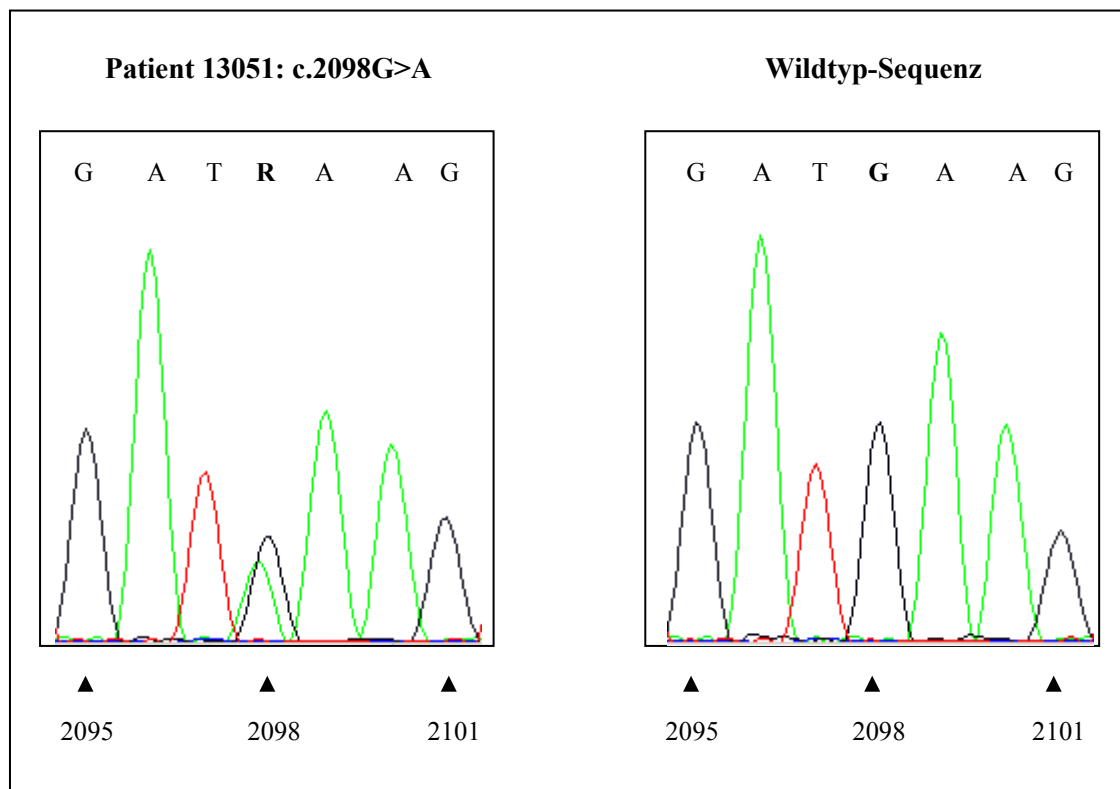


Abb. 3.4.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Exons 16 des *AFG3L2*-Gens
 Links: Der Sequenzausschnitt der Probe 13051 zeigt die heterozygote Missense-Mutation c.2098G>A im Exon 16 des *AFG3L2*-Gens.
 Rechts: Der Ausschnitt zeigt die Wildtyp-Sequenz.

Dieser Basenaustausch führt zu dem Codon AAA anstelle von GAA in der Wildtypsequenz. Im Protein erscheint deshalb an der Position 700 die Aminosäure Lysin anstelle von Glutamat (p.E700K).

In Proben von 4 weiteren Betroffenen dieser Familie konnte diese Punktmutation ebenfalls mittels Sequenzierung nachgewiesen werden. Es handelt sich bei diesen Personen um die Zwillingssöhne der Betroffenen sowie um eine Cousine und deren Sohn.

Im Exon 16 der anderen 19 DNAs wurde die beschriebene Basensubstitution nicht gefunden. Die Abbildung 3.5. zeigt den Stammbaum der Familie.

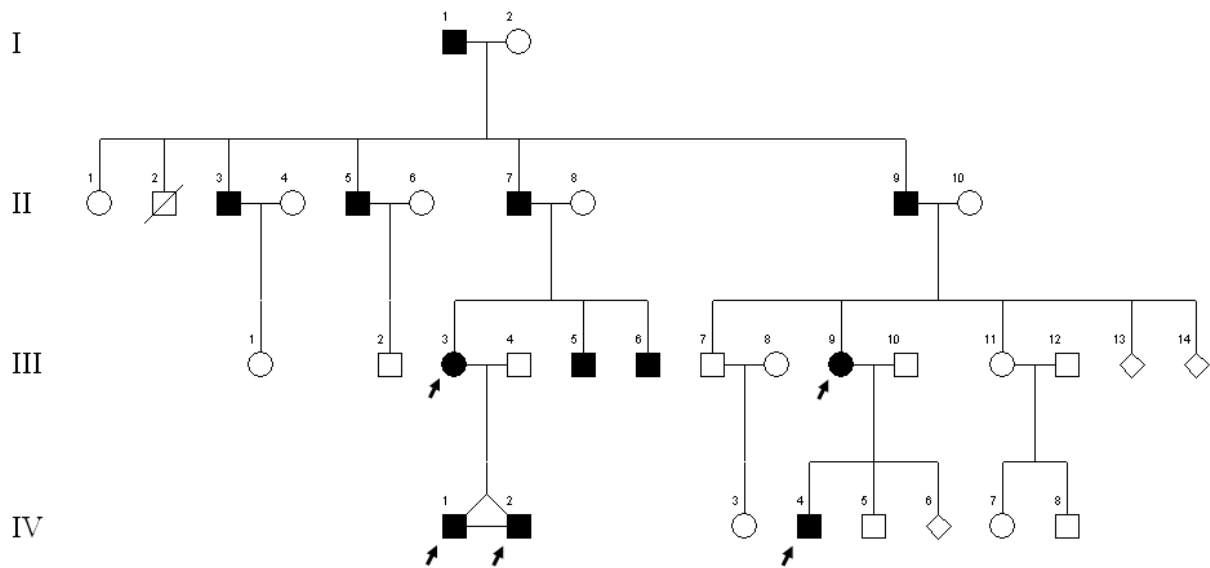


Abb. 3.5.: 4-Generationen Stammbaum der Familie mit SCA28

○: nicht betroffene weibliche Person; ●: betroffene weibliche Person;
 □: nicht betroffene männliche Person; ■: betroffene männliche Person; /: verstorben;
 III₃: Patientin 13051; ↗: in der Arbeit untersuchte Person

3.3. Etablierung einer Allel-spezifischen PCR

Um zu überprüfen, ob der Austausch c.2098G>A auch bei Kontrollen, das heißt bei gesunden Personen aus unserer Population auftritt, wurde eine sogenannte Allel-spezifische PCR etabliert.

In 200 Kontroll-Proben nichtverwandter Individuen, die mit der Allel-spezifischen PCR überprüft wurden, konnte die Punktmutation in Exon 16 nicht gefunden werden.

Abbildung 3.6. zeigt die Agarose-Gelelektrophorese der Produkte der Allel-spezifischen PCR der Kontroll-DNAs. (Primer siehe Material und Methoden)

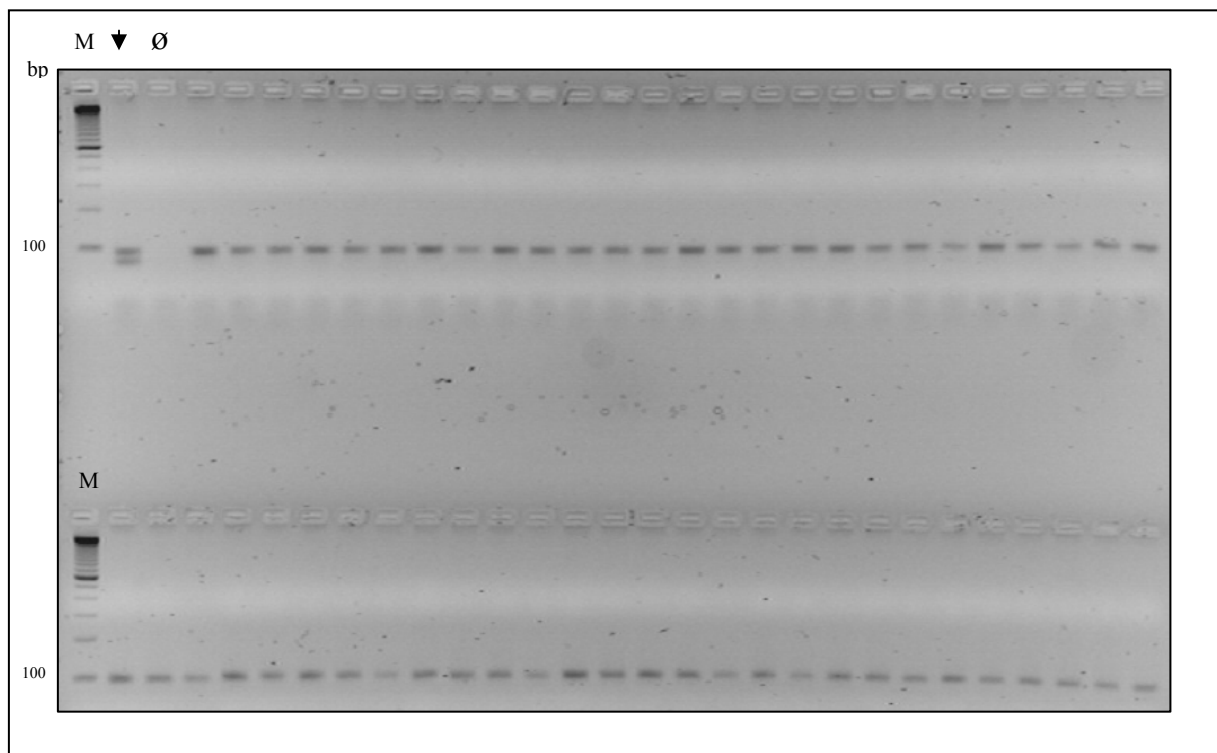


Abb. 3.6.: PCR-Produkte der Allel-spezifischen PCR

Dargestellt sind die Fragmente des Exons 16 der Positivprobe 13051 (Doppelbande) und die der Kontroll-DNAs.

M: Längensstandard; ▼ : Positivprobe (Exon 16 der Probe 13051)

Die obere Bande der Doppelbande ist das Wildtyp-Allel und 94 bp lang. Die untere Bande ist das mutierte Allel und 75 bp lang. Die Längendifferenz ist bedingt durch die Wahl der Primer.

Ø: Leerprobe

Bei 18 der 20 sequenzierten Proben (90 %) wurde im Intron 7 der Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) IVS7+6C>T entdeckt. 40 % der Patienten waren heterozygot für das IVS7+6T Allel und 50 % homozygot. Die Abbildung 3.7. zeigt den entsprechenden Ausschnitt aus dem Elektropherogramm.

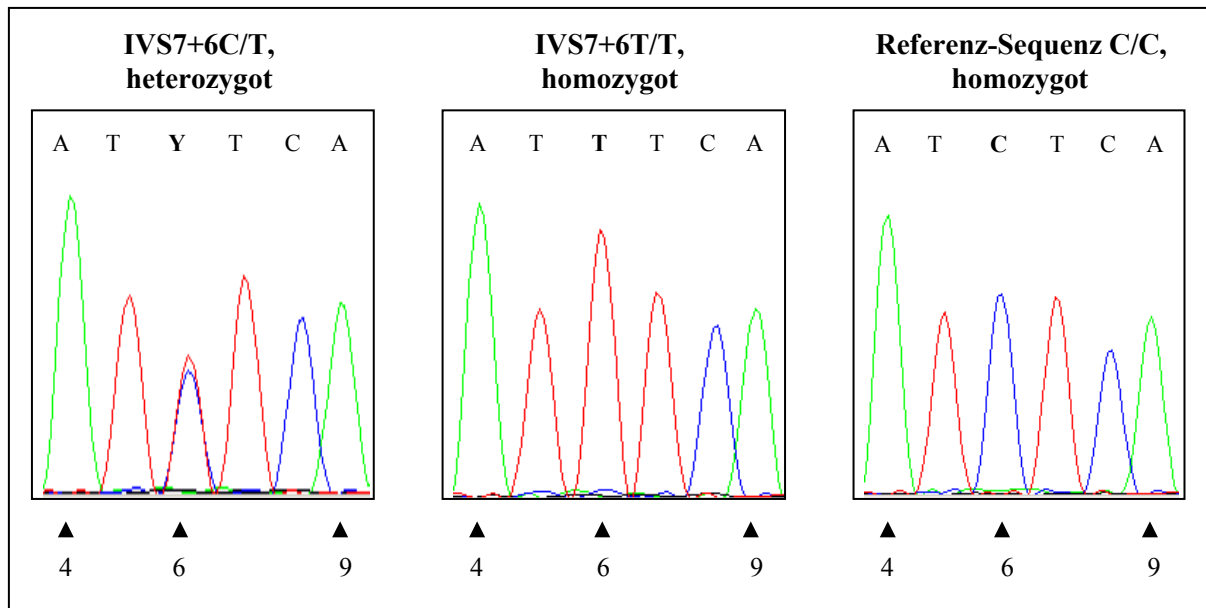


Abb. 3.7.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Introns 7 des *AFG3L2*-Gens

Links: Sequenzausschnitt aus dem Intron 7 des *AFG3L2*-Gens mit dem heterozygoten SNP IVS7+6C>T.

Mitte: Sequenzausschnitt mit dem homozygoten SNP IVS7+6T/T.

Rechts: Der Ausschnitt aus dem Intron 7 des *AFG3L2*-Gens zeigt die Referenz-Sequenz.

Ein weiterer SNP wurde im 3'UTR des *AFG3L2*-Gens bei 10 der 20 DNAs gefunden. Für den Polymorphismus c.*28G>C waren 8 Patienten (40 %) heterozygot und 2 (10 %) homozygot.

Die Abbildung 3.8. zeigt den entsprechenden Ausschnitt aus dem Elektropherogramm.

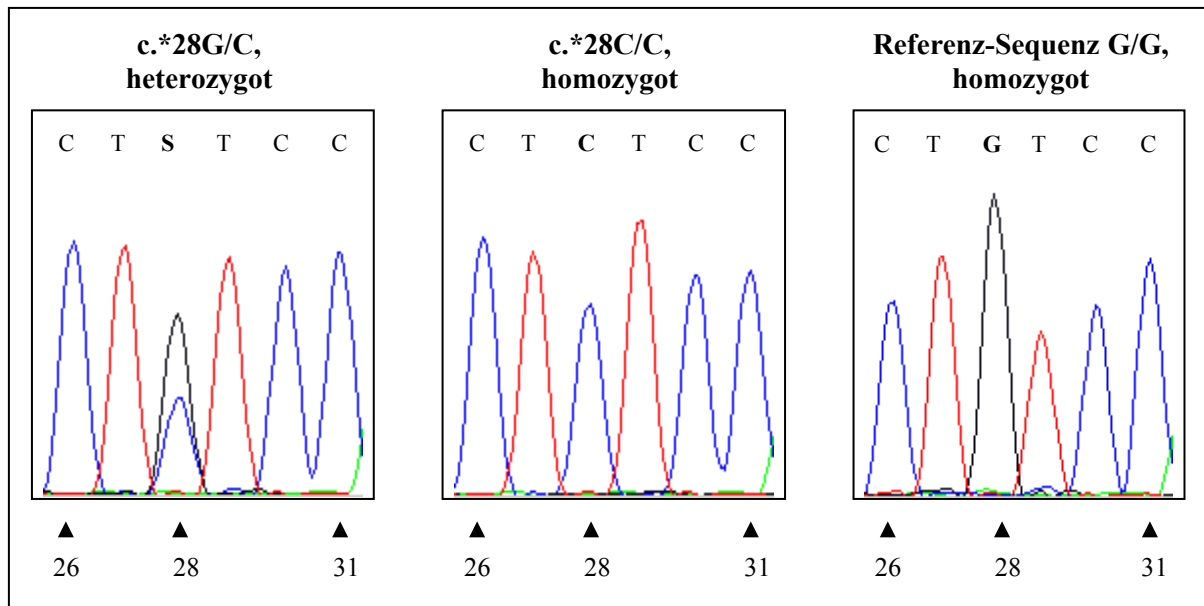


Abb. 3.8.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des 3'UTR des *AFG3L2*-Gens

Links: Gezeigt ist der Sequenzausschnitt mit dem heterozygoten SNP c.*28G>C.

Mitte: Der Sequenzausschnitt zeigt den homozygoten SNP c.*28C/C im 3'UTR im *AFG3L2*-Gen.

Rechts: Der Ausschnitt aus dem 3'UTR des *AFG3L2*-Gens zeigt die Referenz-Sequenz.

Außerdem konnten zwei stille Mutationen (trotz Austausch der Basen in der DNA kein Austausch der Aminosäuren im Protein) in 18 der 20 Proben entdeckt werden: Eine in Exon 11 (c.1389G>A, p.L463) und die andere in Exon 13 (c.1650A>G, p.E550). Für beide Basenaustausche waren 40 % der Patientenproben heterozygot und 50 % homozygot. Die Abbildungen 3.9. und 3.10. zeigen den entsprechenden Ausschnitt aus dem Elektropherogramm.

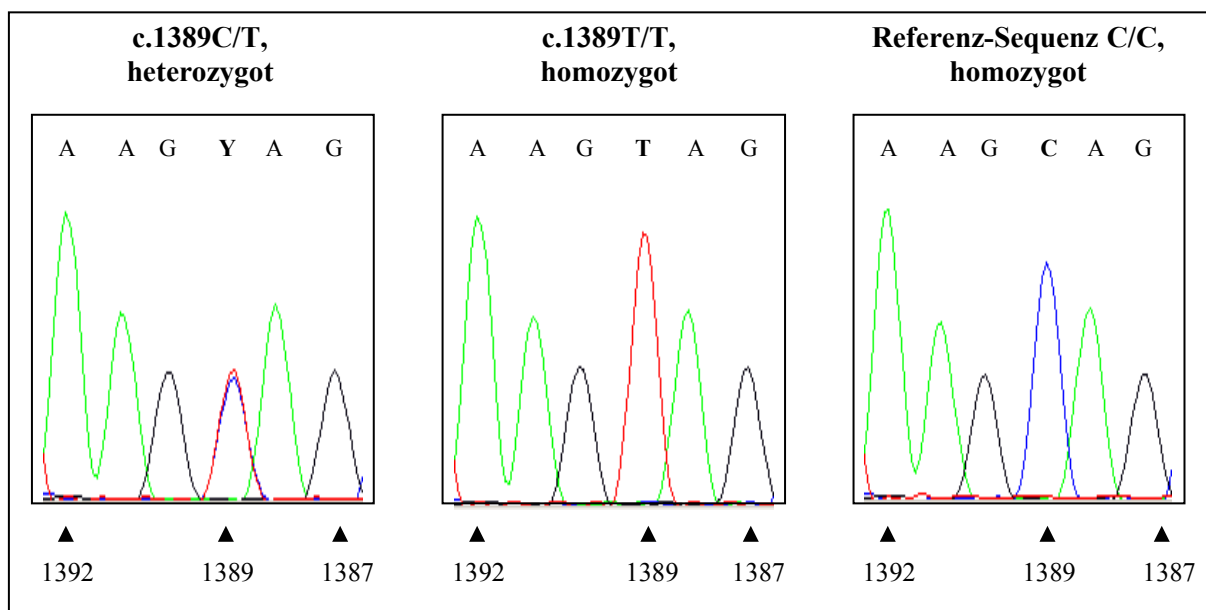


Abb. 3.9.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Exons 11 des *AFG3L2*-Gens; Die dargestellten Sequenzausschnitte zeigen den komplementären Strang.
Links: Sequenzausschnitt aus dem Exon 11 des *AFG3L2*-Gens mit der heterozygoten stillen Mutation c.1389C>T.
Mitte: Sequenzausschnitt mit der homozygoten Mutation c.1389T/T.
Rechts: Der Ausschnitt aus dem Exon 11 des *AFG3L2*-Gens zeigt die Referenz-Sequenz.

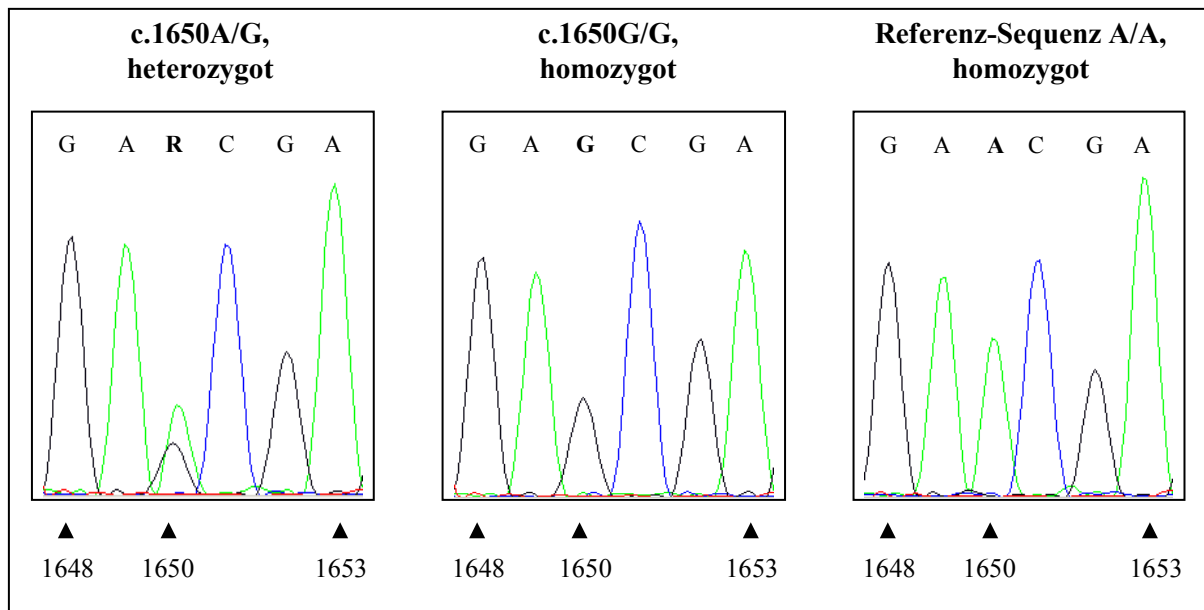


Abb. 3.10.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Exons 13 des *AFG3L2*-Gens
Links: Gezeigt ist der Sequenzausschnitt mit der heterozygoten stillen Mutation c.1650A>G.

Mitte: Der Sequenzausschnitt zeigt die homozygote stille Mutation c.1650G/G im *AFG3L2*-Gen.

Rechts: Der Ausschnitt aus dem Exon 13 des *AFG3L2*-Gens zeigt die Referenz-Sequenz.

Die Tabelle 3.1. zeigt eine Zusammenfassung der gefundenen Sequenzvariationen im Gen *AFG3L2*.

Tab. 3.1.: Sequenzvariationen im *AFG3L2*-Gen

Lokali- sation	DNA- Variation	Missense- Mutation	stille Mutation	SNP ¹	Anz. d. Patienten	Anz. d. Kontrollen
Intron 7	IVS7+6C>T			rs8097342	18 ² /20	
Exon 11	c.1389G>A		p.463L	rs11080572	18 ³ /20	
Exon 13	c.1650A>G		p.550E	rs11553521	18 ⁴ /20	
Exon 16	c.2098G>A	p.E700K			1/140	0/200
3'-UTR	c.*28G>C			rs1129115	10 ⁵ /20	

¹ dbSNP Identifikationsnummer

² 10 von 18 Patienten sind homozygot für das IVS7+6T Allel

³ 10 von 18 Patienten sind homozygot für das c.1389A Allel

⁴ 10 der 18 Patienten sind homozygot für das c.1650G Allel

⁵ 2 der 10 Patienten sind homozygot für das c.*28C Allel

4 Diskussion

Bei den Spinocerebellären Ataxien handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, denen eine Schädigung von Kleinhirnzellen zu Grunde liegt. Bisher sind 28 verschiedene SCA-Subtypen bekannt. Die SCA 28 wurde erstmals 2006 von Cagnoli *et al.* beschrieben. 2008 wurde das Gen *AFG3L2* im Zusammenhang mit der SCA 28 erwähnt (Cagnoli *et al.* und Di Bella *et al.*). Ob und inwieweit diese Form der autosomal dominanten Ataxie in unserer Population auftritt und die Etablierung einer geeigneten Diagnostik erforderlich macht, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Immer wieder wird die Diagnose einer dominanten Ataxie bei Patienten gestellt, denen jedoch keine Mutation einer der bisher bekannten SCA-Genorte als Ursache der Erkrankung zugeschrieben werden kann. Diese Tatsache bildet die Grundlage für die Testung neuer Loci in den betreffenden Familien.

In dieser Arbeit wurden Proben von 140 Patienten mit einer autosomal-dominanten Ataxie und Ausschluss der bekannten Loci auf Mutationen im Gen *AFG3L2* untersucht. Beispielhaft wird hiermit die Wichtigkeit der Suche nach neuen Genen in Bezug auf die SCA verdeutlicht.

4.1. Sequenzvariationen im *AFG3L2*-Gen

In dieser Arbeit wurden einerseits die Exons 15 und 16 des Gens *AFG3L2* von 140 nichtverwandten Patienten mit bekannter familiärer autosomal-dominanter Ataxie mittels SSCP-Analyse gescreent. Die gewählte Region könnte ein "Hot Spot" für Mutationen sein, das heißt, in diesem Bereich treten bevorzugt Sequenzveränderungen auf.

Zur Überprüfung der SSCP-Ergebnisse und um Mutationen bzw. Sequenzvariationen in weiteren Exons aufzuspüren, wurden alle 17 *AFG3L2*-Exons von 20 Indexpatienten sequenziert. Insgesamt wurden dabei 5 verschiedene Einzelnukleotid-Austausche gefunden. Einer der Basenaustausche führt zu einem Aminosäure-Austausch im Protein und wurde mittels Allel-spezifischer PCR in 200 Kontrollen untersucht. Die Positionen aller gefundenen Basen-Austausche sind in Abbildung 4.1. gezeigt.

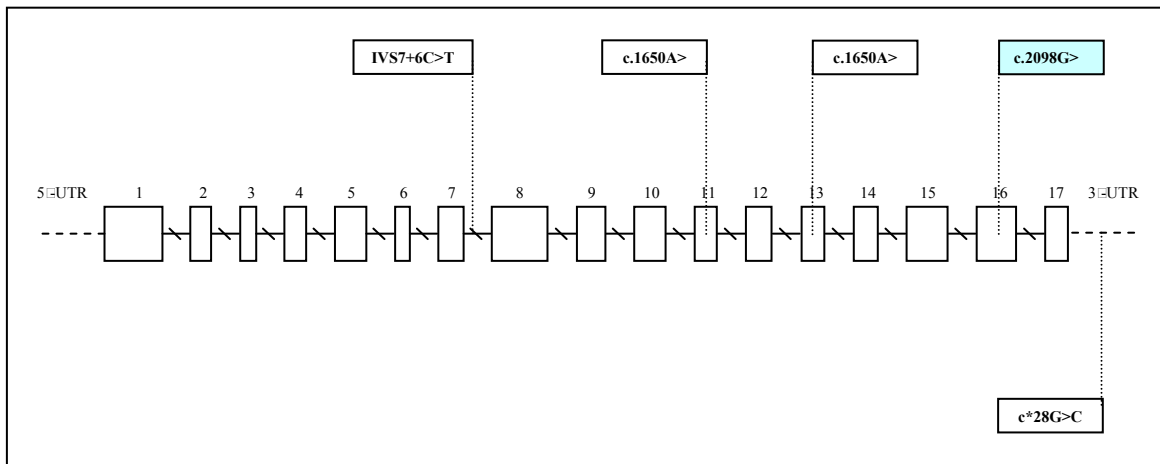


Abb. 4.1.: In der Arbeit gefundene Sequenzvariationen des AFG3L2-Gens

Die Exons sind maßstabsgetreu gezeigt und die Introns durch \rightleftharpoons symbolisiert. Nicht-translatierte Bereiche (UTR) sind gestrichelt dargestellt.

Die Sequenzierung von Exon 16 zeigte in einer von 20 Proben die heterozygote Transition c.2098G>A. Die Mutation hat den Aminosäure-Austausch p.E700K im Protein zur Folge. Diese Probe war bereits in der SSCP-Analyse im Bereich der Doppelstränge auffällig gewesen. Bemerkenswerterweise wurde die genannte Mutation in keiner der 200 nichtverwandten Kontrollen gefunden.

Der Aminosäure-Austausch segregiert in der betroffenen Familie mit der Erkrankung und konnte außer bei der Indexpatientin (III₃) noch bei 4 weiteren betroffenen Mitgliedern der 4-Generationen-Familie gefunden werden: Sowohl die 16jährigen monozygoten Zwillingssöhne (IV₁ und IV₂) der Patientin, als auch die Cousine (III₉, 38 Jahre) und deren 10 Jahre alter Sohn (IV₄) sind betroffen. Der Stammbaum der Familie ist im Ergebnisteil gezeigt (Abb.: 3.5.).

Das Verteilungsmuster der Erkrankten in der Familie spricht dafür, dass der Weitergabe des Gendefektes ein autosomal-dominanter Erbgang zu Grunde liegt, also bereits ein verändertes Allel eine Merkmalsausprägung, den pathogenen Phänotyp, hervorruft. Die prädiktive Testung eines nichtbetroffenen Familienmitglieds zeigte demgegenüber die Wildtypsequenz. Basierend auf diesen Erkenntnissen ist eine pathologische Auswirkung der Missense-Mutation p.E700K sehr wahrscheinlich. Diese Annahme wird unterstützt durch die starke Konservierung der Aminosäure Glutamat an Position 700 in *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Canis familiaris*, *Pongo pygmaeus*, *Pan troglodytes*, *Equus*

caballus und *Bos taurus*. Konservierte, also ähnliche und nahezu unveränderte Bausteine in Genen und korrespondierenden Proteinen, die in verschiedenen Spezies auftreten, deuten auf die Wichtigkeit dieser Position hin. Je konservierter die Aminosäure, desto wahrscheinlicher ist es, dass ihre Mutation einen pathologischen Phänotyp zur Folge hat. Die Tabelle 4.1. zeigt einen Ausschnitt aus der konservierten Proteinregion des AFG3L2-Proteins in den oben genannten Spezies.

Zudem klassifiziert das Onlineprogramm "Mutation T@ster" (<http://www.mutationtaster.org/>) diesen Aminosäureaustausch als mutmaßlich pathologisch. Das Programm führt diverse biologische Tests durch und sendet die Ergebnisse dann an einen Bayes-Klassifikator, der mit knapp 600.000 SNPs bzw. Krankheitsmutationen trainiert wurde.

Tab. 4.1.: Aminosäure-Abfolge des AFG3L2-Proteins der hochkonservierten Region
Rot gekennzeichnet ist die Aminosäure Glutamat, welche in der betroffenen Familie gegen Lysin substituiert ist.

Spezies	Sequenzausschnitt
Homo sapiens	RLIDDEVRILI
Pan troglodytes	RLIDDEVRILI
Pongo pygmaeus	RLIDDEVRILI
Canis familiaris	RLIDDEVRILI
Mus musculus	RMIDDEVRILI
Rattus norvegicus	RMIDDEVRILI
Bos taurus	RLIDDEVRILI
Equus caballus	KLMHKEVKVLK

In der Literatur ist eine pathogene Missense-Mutation E zu K im *AFG3L2*-Gen bereits beschrieben (Mariotti *et al.*, 2008), allerdings spezifizieren die Autoren weder das SCA 28-Gen, noch die exakte Position der Aminosäuresubstitution auf Chromosom 18. Deshalb bleibt unklar, ob die beiden Mutationen identisch sind oder nicht.

Außer der pathogenen Mutation in Exon 16 wurden auch die vier im Folgenden beschriebenen nicht krankheitsverursachenden Sequenzvariationen im *AFG3L2*-Gen gefunden: Bei 90 % der 20 untersuchten Proben konnte im Intron 7 der SNP IVS7+6C>T entdeckt werden (18 von 20 Proben). Davon sind 50 % homozygot für den Genotyp T/T (10 von 20 Proben) und 40 % sind heterozygot (8 von 20 Proben). Dieser SNP ist in der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bekannt und dort mit einer Frequenz von 63,3 % für den T/T-Genotyp und mit 26,7 % für den T/C-Genotyp in der europäischen Population angegeben. Die Häufigkeitsangabe für den homozygoten Genotyp liegt leicht über und diejenige für den heterozygoten Genotyp leicht unter den in dieser Arbeit ermittelten Werten.

Desweiteren wurde der SNP c.*28G>C im 3'UTR des Gens gefunden (10 von 20 Proben). 8 dieser Proben (40 %) waren heterozygot und 2 (10 %) homozygot für das c.*28C Allel. Für die europäische Population gibt die NCBI-Datenbank folgende Frequenzen an: C/G-Genotyp 26,7 %, C/C-Genotyp 10 %. Somit liegt der heterozygote Genotyp bei den in der Arbeit untersuchten Proben häufiger vor als in der Datenbank für die europäische Population angegeben. Die homozygote Häufigkeit hingegen ist identisch in beiden Untersuchungen.

Ein möglicher pathogenetischer Effekt durch ein beeinträchtigtes Splicing wäre für den Austausch IVS7+6C>T im Intron 7 wegen seiner Nachbarschaft zur Exon / Intron-Grenze denkbar. Diese Grenze wird als Splice-Stelle bezeichnet und ist durch bestimmte Nukleotidabfolgen markiert. Es gibt drei klassische Splice-Signale: Am 5'Ende beginnen die meisten Introns mit GT und an ihrem 3'Ende findet sich häufig AG (GT-AG-Regel). Die Bereiche, die direkt neben GT bzw. AT liegen, sind erwiesenermaßen stark konserviert (Lim *et al.*, 2001). Sehr dicht am Ende des Introns (ca. 40 Nukleotide vor dem endständigen AG) liegt die sogenannte branch site, die dritte konservierte, für das Spleißen erforderliche Intronsequenz. Beim Spleißvorgang werden die Intronabschnitte, welche keinerlei genetische Information tragen, aus der RNA herausgeschnitten und verworfen. Lediglich die Exonabschnitte werden an ihren Enden verknüpft.

Durch einen Basenaustausch innerhalb der beschriebenen Signalmotive könnte es einerseits zur Aufhebung der Splice-Stelle kommen und andererseits zu fehlerhaften, möglicherweise pathogenen Transkripten. Die relativ hohe Frequenz sowohl des SNPs im Intron, als auch desjenigen im 3'UTR jedoch, und die Tatsache, dass in beiden Fällen

keine typische Splice-Stelle generiert ist, macht einen pathogenetischen Effekt für den Phänotyp jeweils sehr unwahrscheinlich.

Außer diesen beiden nicht-kodierenden SNPs wurden bei den 20 sequenzierten Proben die zwei stillen Mutationen p.L463 (Exon 11) und p.E550 (Exon 13) detektiert (jeweils 18 von 20 Proben). In beiden Fällen zeigen 40 % der Proben den heterozygoten Genotyp (8 von 20 Proben) und 50 % den homozygoten (10 von 20 Proben) für das c.1389A (p.L463) Allel und das c.1650G (p.E550) Allel. Für den Polymorphismus in Exon 13 liegt in der Datenbank keine Häufigkeitsangabe vor. Das Vorkommen des Genotyps A/G im Exon 11 beträgt in der europäischen Population laut Datenbank 25 % und ist somit um 15 % geringer als die in der Arbeit ermittelte Häufigkeit. Für die homozygote A/A-Variante beträgt die Frequenz in der Datenbank 64,3 % und ist, verglichen mit der in der Arbeit ermittelten (50 %), etwas höher.

Eine pathogenetische Auswirkung der Polymorphismen in Exon 11 und 13, verursacht durch falsches Splicing, ist ebenfalls sehr unwahrscheinlich. Zum einen spricht die ausgesprochene Häufigkeit beider Basenaustausche dagegen, zum anderen die relativ große Entfernung beider zur jeweiligen Splice-Stelle. Um sicher zu gehen, dass diesbezüglich keine Pathogenität vorliegt, könnte RNA von Betroffenen und von Nichtbetroffenen isoliert und auf alternative Splice-Produkte hin überprüft werden.

Die Abweichungen der ermittelten Häufigkeiten der Genotypen in dieser Arbeit von den auf die europäische Bevölkerung bezogenen (NCBI-Datenbank) sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Anzahl der Proben in beiden Untersuchungen zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein sehr kleines Patientenkollektiv untersucht. Weiterhin fällt auf, dass entweder alle der gefundenen Einzelnukleotid-Austausche (SNPs) bei einer Probe vorkommen oder kein einziger. Dementsprechend sind die SNPs entweder alle homozygot oder alle heterozygot. Dies ist erklärbar durch die sogenannte Kopplung von Markern. Als Kopplungsgruppe werden Abschnitte auf Chromosomen bezeichnet, die zahlreiche sich auf ihnen befindliche Gene und damit auch SNPs gemeinsam vererben. Jedoch werden Gene nicht immer absolut gekoppelt weitergegeben. In der Meiose kann es durch Strangbrüche unter Umständen zum Austausch von genetischem Material zwischen den Chromosomen kommen (Rekombination). Es können daher die Haplotypen IVS7+6 C - 1389 G - 1650 A - c*.28 C - und IVS7+6 T - 1389 A - 1650 G □ c*.28 G postuliert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Ataxie-verursachende Mutation im *AF3L2*-Gen bei einem von 140 Patienten gefunden wurde. Die bereits in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einer Doppelbande der Doppelstränge auffällige Probe, zeigte in der Sequenzierung die Mutation c.2098G>A. Dies beweist die gute Verlässlichkeit des SSCP-Screenings.

Bei der Interpretation dieser Daten sollte berücksichtigt werden, dass einerseits nur ein sehr kleines Patientenkollektiv untersucht und andererseits nur ein extrem kleiner Genbereich (Exon 15 und Exon 16) gescreent wurde. Außerdem geschah dies lediglich mittels SSCP-Analyse. Nur bei 20 der Proben wurden schließlich alle 17 Exons sequenziert. Es kann dennoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei der SCA 28 um eine sehr seltene Erkrankung in der deutschen Population handelt.

Bei den bereits bekannten mit der SCA 28 assoziierten Mutationen im *AFG3L2*-Gen handelt es sich um die folgenden Aminosäureaustausche: T654I, M666R, M666T, M666V, G671R und G671E (Cagnoli *et al.*, 2008, DiBella *et al.*, 2008, siehe Tab.: 1.3.). Alle liegen, ebenso wie die hier beschriebene Mutation p.E700K, in den Exons 15 und 16 des Gens. Zwei weitere Mutationen, deren Genort nicht genannt wird und von denen lediglich vermutet werden kann, dass auch sie sich im *AFG3L2* befinden, wurden von Mariotti *et al.* 2008 beschrieben: Glutamat→Lysin und Serin→Leucin.

In einer, erst nach der Anfertigung der vorliegenden Arbeit veröffentlichten, Studie von DiBella *et al.*, 2010 wird schließlich die genaue Lokalisation der zuvor von Mariotti *et al.* beschriebenen Mutationen genannt: E691K und S674L. Beide Sequenzvariationen befinden sich im Exon 16 des Gens.

Außerdem werden dort zwei weitere pathogene Aminosäure-Substitutionen aufgeführt: A694E und R702Q, ebenfalls in Exon 16. Zwei andere pathogene Austausch konnte die Gruppe in Exon 10 und damit in der hochkonservierten ATPase-Domäne des *AFG3L2*-Gens und in Exon 4, also außerhalb seiner proteolytischen Domäne, finden: N432T und H126Q. Keine dieser 6 Missense-Mutationen war in Kontrollen feststellbar.

Das *AFG3L2*-Gen besteht aus insgesamt 17 Exons. Die Exons 9 bis 13 kodieren für eine Protease mit einer ATP-Bindungs- sowie einer ATPase-Domäne (AAA-Domäne). Die proteolytische Domäne des Proteins, welche außer einem HEXXH-Motiv noch eine RNA-Bindungsregion enthält, wird von den Exons 14 bis 17 kodiert (Abb.: 1.1.).

Das Protein AFG3L2 ist in der inneren Membran des Mitochondriums (m) lokalisiert. Es ist Teil eines Komplexes zur Qualitätskontrolle mitochondrialer Proteine. 2010 konnten DiBella *et al.*, in Komplementationsstudien mit Hefezellen nachweisen, dass vier Aminosäure-Substitutionen, die in der proteolytischen Domäne geclustert sind, die Proteinaktivität beeinflussen und zur Akkumulation unprozessierter m-AAA-Substrate führen.

Mutationen im *AFG3L2*-Gen können in dominant negative mit einer starken Penetranz (E691K und N432T) und schwach dominant negative mit reduzierter Penetranz (S674L, A694E, R702Q) unterschieden werden (Di Bella *et al.*, 2010). Die Penetranz einer Mutation gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der sie einen bestimmten Phänotyp in einer Population hervorruft. Die erste Gruppe beeinflusst sowohl den homo- (AFG3L2-AFG3L2-Komplex) als auch den heterooligomeren (AFG3L2-Paraplegin-Komplex) m-AAA-Komplex stärker als die zweite. Die AFG3L2-Dysfunktion, vor allem hervorgerufen durch E691K und N432T (dominant negativ mit starker Penetranz), wirkt sich laut DiBella *et al.* auf zentrale Porenstrukturen des katalytischen Zentrums der ATPase, die eventuell wichtig sind für die Erkennung, Entfaltung, Translokation und Abgabe von Substratproteinen. Außerdem verändert E691K das elektrostatische Potential und die chemischen Eigenschaften der Poren im homo- und heterooligomeren Komplex. Zudem wird die proteolytische Eigenschaft des AFG3L2-Proteins beeinflusst und führt somit zur mitochondrialen Dysfunktion. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese ausschließlich in Purkinjezellen auftritt und nicht in nicht-neuronalen Geweben, wie zum Bsp. dem Skelettmuskel. Die Forschergruppe fand weiterhin heraus, dass es spezifische AFG3L2-Substrate geben muss, deren fehlerfreie Prozessierung essentiell für den Schutz des Kleinhirns vor Neurodegeneration ist.

Inwiefern es durch Mutationen des *AFG3L2*-Gens zur Neurodegeneration kommt, ist noch immer nicht hinreichend geklärt. In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die sogenannte "Purkinje cell dark degeneration" und eine daraus folgende mitochondriale Dysfunktion eine wichtige Rolle in der Ätiologie spielen. Ebenso soll eine gestörte Axonentwicklung als Ursache für die SCA 28 in Frage kommen (Maltecca *et al.*, 2008 und 2009, Martinelli *et al.*, 2009). DiBella *et al.* bestätigten 2010 diese Theorien bezüglich der mitochondrialen Dysfunktion und wiesen darauf hin, dass künftig nach

AFG3L2-spezifischen Substraten gesucht werden muss, zum weiteren und besseren Verständnis der SCA 28-Pathogenese.

Trotz der Tatsache, dass sich die meisten der bis jetzt bekannten *AFG3L2*-Mutationen in den Exons 15 und 16 des Gens befinden, sollte eine zukünftige genetische Diagnostik diese beiden Kodierregionen gegebenenfalls in einem Vorscreening untersuchen, auf die vollständige Sequenzierung aller Exons aber dennoch nicht verzichten, zumal DiBella *et al.* pathogene Mutationen in den Exons 4 und 10 beschreiben.

Vergleichbar verlief die Etablierung der Diagnostik für das *PRKCG*-Gen bei der SCA 14. Anfänglich wurden alle pathogenen Mutationen in den Exons 4 und 5 gefunden, bis schließlich ein krankheitsverursachender Basenaustausch in Exon 2 nachgewiesen werden konnte (Chen *et al.*, 2003, Fahey *et al.*, 2005, Hiramoto *et al.*, 2006, Yabe *et al.*, 2003, Warrenburg *et al.*, 2003, Nolte *et al.*, 2007).

4.2. Klinische Daten

Da es sich um eine der ersten Beschreibungen der SCA 28 handelt, sollen hier die klinischen Daten, die von den betreuenden Ärzten zur Verfügung gestellt wurden, zusammengefasst werden.

Die Indexpatientin III₉ klagte zum ersten Mal im Alter von 10 Jahren über eine Gangunsicherheit und eine gewisse □Tollpatschigkeit□ Bei der ersten neurologischen Untersuchung im Alter von 17 Jahren wies sie sowohl eine Extremitäten- und Gangataxie, als auch eine Dysarthrie auf. Die Reflexe waren zu diesem Zeitpunkt normal und es waren keine pathologischen Pyramidenbahnzeichen feststellbar. Bei der Wiedervorstellung der heute 38jährigen Patientin 19 Jahre später hatte sich die Ataxie verschlimmert. Sie zeigte außerdem eine moderate Dysarthrie und einen beidseitigen Nystagmus. Auch konnte in der MRT-Untersuchung eine Kleinhirnatrophie diagnostiziert werden, wobei die übrigen Hirnareale unauffällig waren. Es wurde eine molekulargenetische Untersuchung durchgeführt, in der das Vorliegen einer SCA 1, 2, 3, 6, 7, 8, 13, 14, 17 oder 27 ausgeschlossen werden konnte. Auffällig waren das junge Erkrankungsalter der Patientin und die milde Verlaufsform der Krankheit über 25 Jahre nach dem Auftreten der ersten Symptome. Beides deutete auf das Vorliegen eines anderen, neuen SCA-Typs hin.

Mit 6 ½ Jahren wurden bei dem Sohn (IV₄) der Indexpatientin III₉ eine Gangataxie und eine nicht dem Alter entsprechende, unterdurchschnittliche Fein- und Grobmotorik festgestellt. Ebenso zeigte das MRT eine cerebelläre Atrophie. Heute im Alter von fast 11 Jahren besucht er die Grundschule und es fällt auf, dass der Junge vor allem Schwierigkeiten beim Schreiben und anderen feinmotorischen Bewegungsabläufen hat. Seine Arbeitsgeschwindigkeit ist dadurch erheblich behindert. Ebenso kommt es durch die fortschreitende Ataxie und Imbalance zu einem vermehrten Stolpern und Hinfallen des Kindes bei Aktivitäten im Freien (zum Bsp.: Fußball spielen). Bei der neurologischen Untersuchung sind zudem eine muskuläre Hypotonie in den unteren Extremitäten und die verminderte Ausdauerfähigkeit der Beine sowie gesteigerte Reflexe und eine Dysdiadochokinese feststellbar.

Bei den Patienten III₃ (Cousine von III₉), III₅, III₆ (beides Cousins von III₉), II₇, II₅ (beides Onkel von III₉) und II₉ (Vater von III₉), die, außer III₃, nur klinisch und nicht genetisch untersucht wurden, traten die ersten Symptome einer Dysarthrie und einer Gangataxie, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Patienten, erst in der 3. Lebensdekade auf.

Die 38jährige Cousine (III₃) bemerkte Balancestörungen und Schwierigkeiten beim Schreiben erstmalig im Alter von 28 Jahren nach der Geburt ihrer Zwillingssöhne. Bei der neurologischen Untersuchung mit 38 Jahren waren eine milde Dysarthrie, ein ataktischer Gang (besonders bei geschlossenen Augen), Koordinationsschwierigkeiten, eine Dysdiadochokinese, eine geringe muskuläre Hypotonie und gesteigerte Reflexe feststellbar.

Bei den monozygoten Zwillingssöhnen IV₁ und IV₂ der Patientin III₃ wurden im Alter von 3 Jahren zum ersten Mal eine Gangataxie und eine globale psychomotorische Entwicklungsverzögerung diagnostiziert. In der neurologischen Untersuchung mit 10 Jahren wiesen beiden Jungen eine Gangataxie, eine Dysdiadochokinese, Koordinationsstörungen, eine muskuläre Hypotonie und gesteigerte Reflexe auf. Momentan besuchen die nunmehr 16jährigen Zwillinge eine Förderschule und erhalten Logopädie, Ergotherapie und physiotherapeutische Übungsbehandlung. Mit Hilfe dieser Fördermaßnahmen sind sie in der Lage frei zu gehen und langsam zu sprechen. Bei beiden liegt eine Kleinhirnatrophie vor. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass die Geburt der Zwillinge zu früh erfolgte und es im Verlauf zu postnatalen Adaptionsschwierigkeiten gekommen war. Beides könnte für die geschilderten Symptome und vor allem für deren sehr frühes Auftreten ursächlich sein (Edener *et al.*, 2010).

Die Tabelle 4.2. zeigt eine Zusammenschau der klinischen Befunde der in der Arbeit untersuchten SCA-Patienten der 4-Generationen-Familie.

Tab. 4.2.: Zusammenfassung der klinischen Befunde der in der Arbeit untersuchten SCA-Patienten der 4-Generationen-Familie aus Edener *et al.*, 2010

Patient	III, 9	IV, 4	III, 3	IV, 1	IV, 2
Erkrankungsalter	10 J.	6 J.	28 J.	3 J.	3 J.
Alter bei Erstuntersuchung	36 J.	10 J.	38 J.	8 J.	8 J.
Geschlecht	weiblich	männlich	weiblich	männlich	männlich
Gangataxie	++	++	++	+	+
Ataxie der Extremitäten (Tremor)	+	-	+	+	+
Dysarthrie	+	-	+	+	+
Nystagmus	+	-	n. u.	n. u.	n. u.
Augenmuskelparesen	-	-	n. u.	n. u.	n. u.
Reflexe	normal	normal	gesteigert	gesteigert	gesteigert
Pyramidenbahnzeichen	-	-	n. u.	n. u.	n. u.
Spastik	-	-	-	-	-
Muskuläre Ermüdung	-	+	-	-	-
Gehschwierigkeiten	+	+	+	+	+
Sensibilitätsstörungen	-	-	-	-	-
Kognitive Beeinträchtigung	-	-	-	+	+
MRT	cerebelläre Atrophie	cerebelläre Atrophie	cerebelläre Atrophie	cerebelläre Atrophie	cerebelläre Atrophie
EEG / Krämpfe	normal / -	sharp waves / -	n. u. / -	normal / Fieberkrämpfe mit 3 J.	normal / Fieberkrämpfe mit 3 J.

n. u.: nicht untersucht

Die neurologische Untersuchung der 5 betroffenen Familienmitglieder unterstützt die bereits vorliegenden Daten der klinischen Präsentation der meisten SCA 28-Patienten, veröffentlicht in der bisher einzigen anderen Arbeit dazu von Mariotti *et al.*, 2008: eine früh auftretende cerebelläre Ataxie mit einem langsam fortschreitenden Phänotyp.

4.3. Ausblick

Zukünftig wird es wichtig sein, weitere betroffene Familien zu suchen, um so das Mutationsspektrum für die SCA 28 präzisieren zu können. Bemerkenswerterweise sind die meisten der bisher bekannten *AFG3L2*-Mutationen in dem kleinen Abschnitt zwischen Aminosäure 653 und 702, und damit in den Exons 15 und 16 lokalisiert. Weitere, für die Entstehung der SCA 28 eine Rolle spielende, Aminosäure-Substitutionen wurden jedoch bereits in den Exons 4 und 10 gefunden. Die Tatsache, dass es sich bei allen bisher gefundenen Mutationen ausschließlich um Missense-Austausche handelt, spricht gegen eine Haploinsuffizienz als Ursache ihrer Pathogenität. Als haploinsuffizient gilt ein Gen, wenn es auf einem der beiden Allele durch eine Mutation funktionsuntüchtig ist und die zweite Kopie durch eine dann insuffiziente Genproduktherstellung allein keinen gesunden Phänotyp bewirken kann.

Wahrscheinlicher ist ein dominant negativer Effekt durch ein "gain of function" des mutierten Gens als Krankheitsursache. Bei diesem Vorgang gewinnt das veränderte Gen an Aktivität und es entsteht ein vollkommen neuer Phänotyp. Das Genprodukt des mutierten Alleles antagonisiert dasjenige des Wildtyp-Alleles.

Die Molekulargenetik der Ataxie ist jedoch bisher nicht vollständig verstanden und bleibt weiterhin Gegenstand der Wissenschaft.

5 Zusammenfassung

Bei den Spinocerebellären Ataxien (SCA) handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, welche bedingt sind durch eine cerebelläre Neurodegeneration, in deren Folge es zu Symptomen wie Gang- und Standataxie, Nystagmus und Dysarthrie kommt. Zu diesen autosomal-dominanten cerebellären Ataxien gehört unter anderem die SCA 28. Sie wird verursacht durch Mutationen im Gen *AFG3L2* und wurde 2006 erstmalig beschrieben.

Das zugehörige Gen wurde 1999 entdeckt und 2008 zum ersten Mal mit der SCA 28 in Zusammenhang gebracht.

Zur Bestimmung der Häufigkeit der SCA 28 in unserer Population wurden in der vorliegenden Arbeit mittels SSCP-Analyse 140 Proben auf Mutationen in den Exons 15 und 16 des Gens hin untersucht. Im Anschluss daran fand die Sequenzierung aller 17 *AFG3L2*-Exons für 20 dieser Proben statt.

In einer einzigen Probe konnte schließlich eine Mutation gefunden werden, die pathogenetisch ist für die SCA 28. In 200 gesunden Kontrollen war dieser Aminosäureaustausch in Exon 16 hingegen nicht nachweisbar. Stattdessen konnte bei 4 weiteren Betroffenen dieser Familie die heterozygote Punktmutation c.2098G>A, welche im Protein an der Position 700 zur Aminosäure Lysin anstelle von Glutamat führt, ebenfalls festgestellt werden. Bei nichtbetroffenen Familienmitgliedern trat die Mutation nicht auf.

Im Rahmen der Arbeit wurden zusätzlich 4 weitere, nicht krankheitsverursachende SNPs im *AFG3L2* gefunden, welche in Datenbanken bereits aufgeführt waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei der SCA 28 um eine seltene in unserer Population vorkommende Form der Spinocerebellären Ataxien handelt.

6 Literaturverzeichnis

- 1 **Banfi S, Bassi MT, Andolfi G et al.** (1999) Identification and characterization of AFG3L2, a novel paraplegin-related gene. *Genomics* 59:51-58.
- 2 **Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F et al.** (2006) SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* 129:235-242.
- 3 **Chen DH, Brkanac Z, Verlinde CL, Tan XJ, Bylenok L, Nochlin D, et al.** (2003a) Missense mutations in the regulatory domain of PKCgamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 72:839-49.
- 4 **Craig K, Keers SM, Archibald K, Curtis A, Chinnery PF** (2004) Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxia type 6. *Ann Neurol* 55:752-5.
- 5 **Di Bella D, Lazzaro F, Brusco A, Plumari M, Battaglia G, Pastore A, Finardi A, Cagnoli C, Tempia F, Frontali M, Veneziano L, Sacco T, Boda E, Brussino A, Bonn F, Castellotti B, Baratta S, Mariotti C, Gellera C, Fracasso V, Magri S, Langer T, Plevani P, Di Donato S, Muzi-Falconi M, Taroni F** (2010) Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nat Genet.* 42:313-21.
- 6 **Duenas AM, Goold R, Giunti P** (2006) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129:1357-1370.
- 7 **Edener U, Wöllner J, Hehr U, Kohl Z, Schilling S, Kreuz F, Bauer B, Bernhard V, Gillessen-Kaesbach G, Zühlke C** (2010) Early onset and slow progression of SCA 28, a rare dominant ataxia in a large four-generation family with a novel AFG3L2 mutation, *European Journal of Human Genetics*, online
- 8 **Fahey MC, Knight MA, Shaw JH, Gardner RJ, du Sart D, Lockhart PJ, Delatycki MB, Gates PC, Storey E** (2005) Spinocerebellar ataxia type 14: study of a family with an exon 5 mutation in the PRKCG gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 76:1720-2.

- 9 **Harding AE** (1993) Clinical features and classification of inherited ataxias. In Harding AE and Deufel T (Eds.). *Inherited ataxias* (Raven, New York) 61:1-14.
- 10 **Hiramoto K, Kawakami H, Inoue K, Seki T, Maruyama H, Morino H, Matsumoto M, Kurisu K, Sakai N** (2006) Identification of a new family of spinocerebellar ataxia type 14 in the Japanese spinocerebellar ataxia population by the screening of PRKCG exon 4. *Mov Disord.* 21:1355-60.
- 11 **Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, et al.** (1999) Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23:391-2.
- 12 **Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, et al.** (2006) Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 38:184-90.
- 13 **Ishkawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, Kobayashi K, Yokota T, et al.** (2005) An autosomal dominant ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with an single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and rho Guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet.* 77:280-96.
- 14 **Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW, et al.** (1999) An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 21:379-84.
- 15 **Koppen M, Bonn F, Ehses S, Langer T** (2009) Autocatalytic processing of m-AAA protease subunits in mitochondria. *Mol Biol Cell* ahead of print.
- 16 **Lim LP, Burge CB** (2001) A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc Natl Acad Sci* 98:11193-8.
-

- 17 **Maltecca F, Aghaie A, Schroeder DG et al.** (2008) The mitochondrial protease AFG3L2 is essential for axonal development. *J Neurosci* 28:2827-2836.
- 18 **Maltecca F, Magnoni R, Cerri F, Cox GA, Quattrini A, Casari G** (2009) Haploinsufficiency of *AFG3L2*, the gene responsible for spinocerebellar ataxia type 28, causes mitochondria-mediated Purkinje cell dark degeneration. *J Neurosci* 29:9244-9254.
- 19 **Mariotti C, Brusco A, Di Bella D et al.** (2008) Spinocerebellar ataxia type 28: A novel autosomal dominant cerebellar ataxia characterized by slow progression and ophthalmoparesis. *Cerebellum* 7:184-188.
- 20 **Martinelli P, La Mattina V, Bernacchia A et al.** (2009) Genetic interaction between the m-AAA protease isoenzymes reveals novel roles in cerebellar degeneration. *Hum Mol Genet* 18:2001-2013.
- 21 **Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, Rasmussen A, Grewal RP, Watase K, et al.** (2000) Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet* 26:191-4.
- 22 **Nolte D, Landendinger M, Schmitt E, Müller U** (2007) Spinocerebellar ataxia 14: novel mutation in exon 2 of *PRKCG* in a German family. *Mov Disord.* 15:265-7.
- 23 **Paulus, W, Engel, W, Sauter, S, Neesen, J** (2002) Hereditäre spastische Paraplegie. *Dtsch Arztebl* 99:A-434 / B-348 / C-326.
- 24 **Soong BW** (2004) Hereditary spinocerebellar ataxias: number, prevalence and treatment prospects. *Hong Kong J* 10:229-230.
- 25 **Soong BW, Paulson HL** (2007) Spinocerebellar ataxias: an update. *Curr Opin Neurol* 20: 438-446.

- 26 **Swieten van JC, Brusse E, de Graaf BM, Krieger E, van de Graaf R, de Koning I, et al.** (2003) A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebral ataxia. *Am J Hum Genet* 72:191-9.
- 27 **Warrenburg van de B, Sinke R, Verschuuren-Bemelmans C, Scheffer H, Brunt E, Ippel P** (2002) Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurol* 58:702-8.
- 28 **Warrenburg van de B, Verbeek DS, Piersma SJ, Hennekam FA, Pearson PL, Knoers NV, Kremer HP, Sinke RJ** (2003) Identification of a novel SCA14 mutation in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family. *Neurol* 23:1760-5.
- 29 **Waters MF, Minassian NA, Stevanin G, Figueroa KP, Bannister JPA, Nolte D, et al.** (2006) Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet* 38:447-51.
- 30 **Yabe I, Sasaki H, Chen DH, Raskind WH, Bird TD, Yamashita I, et al.** (2003) Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a mutation in protein kinase C gamma. *Arch Neurol* 60:1749-51.
- 31 **Zoghbi HY, Orr HT** (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 23:217-47.

7 Anhang

Tab. 7.1.: Übersicht über die bisher bekannten Varianten im *AFG3L2*-Gen

	Position	Allele	Aminosäure (Position)
SNP im Exon	18: 12344152	C/T	E (586)
	18: 12348285	T/C	E (550)
	18: 12351342	C/T	L (463)
SNP im Intron	18: 12340134	T/G	-
	18: 12353178	A/T	-
	18: 12358639	T/C	-
	18: 12358997	A/G	-
	18: 12363683	C/T	-
	18: 12363950	C/T	-
	18: 12366937	C/T	-
	18: 12367442	T/C	-
	18: 12371765	T/G	-
SNP in der splice site	18: 12358661	C/T	-
	18: 12359920	G/A	-
SNP im 5'UTR	18: 12377177	C/G	-
SNP im 3'UTR	18: 12328962	T/G	-
	18: 12329253	A/G	-
	18: 12329536	C/G	-
	18: 12329562	T/C	-
	18: 12328928	A/C	-

8 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei Frau Prof. Dr. G. Gillessen-Kaesbach, der Direktorin des Institutes für Humangenetik, für die Überlassung des Arbeitsplatzes im Labor und der Materialien, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein großer Dank gilt weiterhin meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. C. Zühlke für die Bereitstellung des Themas und die großartige Unterstützung während der gesamten Dauer der Arbeit. Ihre Motivation, das stets offene Ohr und die enge Zusammenarbeit mit Ihr haben mir das Anfertigen dieser Arbeit ermöglicht.

Außerdem danke ich sehr Herrn U. Edener, der sich meiner stets hervorragend angenommen und mir geduldig bei allen großen und kleinen □Problemen□weitergeholfen hat.

Danken möchte ich zudem Frau V. Bernhard, die mir bei meinen Fragen immer gern ihr Ohr geliehen hat.

Für die Einarbeitung in die Methoden und das Erklären der Geräte, die stete Hilfsbereitschaft, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Geduld bedanke ich mich bei Frau U. Gehlken, Frau H. Böttger, Herrn Dr. A. Dalski und Herrn U. Edener.

Allen übrigen Mitgliedern der Humangenetik danke ich für die stets nette Atmosphäre im Institut, die es mir leicht gemacht hat, mich wohl zu fühlen.

Mein Dank gilt zudem den betreuenden Ärzten der in dieser Arbeit untersuchten Patienten, für die Bereitstellung der klinischen Daten.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihr Vertrauen in mich, die Ermöglichung des Studiums und dieser Arbeit.

Meinen Freunden danke ich dafür, dass sie immer für mich dagewesen sind im letzten Jahr.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Janine Wöllner
 Geburtsdatum: 31.01.1985
 Geburtsort: Plauen



Schulbildung

1991 □ 1995: Dittes-Grundschule
 1995 □ 2003: Diesterweg-Gymnasium
 2003: Abitur

Studium

2005: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
 2007: 1. Ärztliche Prüfung
 02/2009 □ 07/2009: Experimenteller Teil der Dissertation am
 Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck

Publikation: **U Edener, J Wöllner, U Hehr, Z Kohl, S Schilling, F Kreuz, P Bauer, V Bernhard, G Gillessen-Kaesbach, C Zühlke** Early onset and slow progression of SCA 28, a rare dominant ataxia in a large four-generation family with a novel *AFG3L2* mutation, *European Journal of Human Genetics*, online, 31.03.2010

Vortrag: **J Wöllner, U Edener, U Hehr, Z Kohl, S Schilling, F Kreuz, V Bernhard, G Gillessen-Kaesbach, C Zühlke** Spinocerebelläre Ataxie 28 □ Mitglied einer wachsenden Familie, Mutationssuche im *AFG3L2*-Gen, *Treffen der Norddeutschen Humangenetiker*, Greifswald, 07.11.2009

Poster: **J Wöllner, G Gillessen-Kaesbach, C Zühlke, U Edener** Vom Symptom zur Diagnose, Molekulare Untersuchung einer dominant vererbten Bewegungsstörung, *4. Lübecker Doktorandentag*, 09.06.2010