

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

**Glutamattransporter und genetisch bedingte
Ataxien:
Mutationssuche im *EAAT1*- und *EAAT4*-Gen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Juliane Hiltcher
aus Heidelberg

Lübeck 2009

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.12.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1 Ataxien.....	4
1.1.1 Spinocerebelläre Ataxien (SCA).....	7
1.1.2 Episodische Ataxien (EA).....	8
1.2 Glutamat.....	10
1.3 Glutamattransporter (EAAT).....	11
1.4 Ionenkanäle.....	13
1.5 Aufgabenstellung.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Materialien.....	15
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	15
2.1.2 Stammlösungen und Puffer.....	16
2.1.3 Synthetische Oligonukleotide.....	18
2.1.4 Geräte und Gebrauchsartikel.....	20
2.1.5 Software-Programme.....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Probenauswahl.....	22
2.2.2 RNA-Extraktion aus humanem Vollblut.....	22
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.2.3.1 PCR für SSCP-Analysen.....	24
2.2.3.2 Primär-PCR für die Sequenzierung.....	26
2.2.4 RT-PCR.....	27
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.2.6 SSCP (“single-strand conformation polymorphism”)-Analyse.....	30
2.2.7 DNA-Sequenzierung.....	33
3. Ergebnisse.....	35
3.1 Mutationssuche im <i>EAAT1</i> -Gen.....	35
3.1.1 Vorgehensweise.....	35
3.1.2 Ergebnisse der SSCP-Analysen des <i>EAAT1</i> -Gens.....	35

3.1.2.1 Exon 2.....	36
3.1.2.2 Exon 3.....	37
3.1.2.3 Exon 4, Exon 5, Exon 7 und Exon 8.....	38
3.1.2.4 Exon 6.....	38
3.1.2.5 Exon 9.....	39
3.1.2.6 Exon 10.....	40
3.1.3 Ergebnisse der Sequenzierung des <i>EAAT1</i> -Gens.....	41
3.1.3.1 Exon 2.....	42
3.1.3.2 Exon 3.....	42
3.1.3.3 Exon 4, Exon 5, Exon 7 und Exon 8.....	42
3.1.3.4 Exon 6.....	43
3.1.3.5 Exon 9.....	43
3.1.3.6 Exon 10.....	44
3.1.3.7 Übersichtstabelle.....	45
3.1.4 Ergebnis der RNA-Analyse des <i>EAAT1</i> -Gens.....	45
3.1.4.1 Ergebnis der RT-PCR.....	45
3.1.4.2 Ergebnis der Sequenzierung.....	46
3.2 Mutationssuche im <i>EAAT4</i> -Gen.....	47
3.2.1 Vorgehensweise.....	47
3.2.2 Ergebnisse der SSCP-Analysen des <i>EAAT4</i> -Gens.....	48
3.2.2.1 Exon 1.....	48
3.2.2.2 Exon 2 bis Exon 6.....	48
3.2.2.3 Exon 7.....	49
3.2.2.4 Exon 8.....	50
3.2.2.5 Exon 9.....	51
3.2.3 Ergebnisse der Sequenzierung des <i>EAAT4</i> -Gens.....	52
3.2.3.1 Exon 1.....	52
3.2.3.2 Exon 2, Exon 4, Exon 5, Exon 6.....	54
3.2.3.3 Exon 3.....	54
3.2.3.4 Exon 7.....	55
3.2.3.5 Exon 8.....	55
3.2.3.6 Exon 9.....	56

3.2.3.7 Übersichtstabelle.....	57
3.2.4 Ergebnis der RNA-Analyse des <i>EAAT4</i> -Gens.....	57
3.2.4.1 Ergebnis der RT-PCR.....	57
4. Diskussion.....	58
4.1 Suche nach Mutationen im <i>EAAT1</i> -Gen.....	59
4.1.1 Polymorphismus c.675G>C.....	60
4.1.2 Polymorphismus c.181+28_181+29insA.....	61
4.1.3 Polymorphismus c.1290-46G>C.....	62
4.1.4 Polymorphismus c.*33G>A.....	63
4.1.5 Sequenzvariante c.319+37_319+38insT.....	64
4.1.6 Sequenzvariante c.1425-8G>C.....	64
4.2 Suche nach Mutationen im <i>EAAT4</i> -Gen.....	67
4.2.1 Polymorphismus c.30G>T.....	68
4.2.2 Polymorphismus c.1482T>C.....	69
4.2.3 Polymorphismus c.205+33A>G.....	70
4.2.4 Polymorphismus c.548+11C>T.....	70
4.2.5 Polymorphismen c.1170-28A>G und c.1170-30C>A.....	70
4.2.6 Polymorphismus c.*23delG.....	71
4.2.7 Sequenzvariante c.73C>T.....	72
4.3 SSCP-Analyse.....	74
5. Zusammenfassung.....	76
6. Literaturverzeichnis.....	78
7. Anhang.....	87
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	87
7.2 Buchstabencode für Aminosäuren.....	90
8. Danksagung.....	91
9. Lebenslauf.....	92

1. Einleitung

1.1 Ataxien

Das Wort „Ataxie“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet soviel wie „keine Ordnung“, „ohne Ordnung“.

Im neurologischen Kontext ist damit eine mangelnde Koordination bei der Ausübung von Bewegungen und Bewegungsabläufen gemeint. Diese Funktionsstörung kann entweder angeboren oder erworben sein und beruht auf einem Fehlen oder fortschreitenden Untergang von Nervenzellen (Neurodegeneration), besonders im Kleinhirn (Cerebellum) und Rückenmark.

Einerseits ist die Vielzahl von Erkrankungen mit dem Symptom Ataxie anhand ihrer klinischen Merkmale oft nicht sicher auseinander zuhalten, andererseits können Mutationen in verschiedenen Genen zu recht ähnlichen Krankheitsbildern führen. Eine Einteilung der Ataxien unterscheidet zwischen genetisch bedingten und nicht-genetisch bedingten Formen (10).

Die genetisch bedingten Ataxien kann man hinsichtlich ihres Vererbungsmodus in solche mit autosomal-dominantem, mit autosomal-rezessivem, mit X-chromosomal rezessivem und mit mitochondrialem Erbgang unterteilen.

Autosomal-dominant vererbte Ataxien

Zu den autosomal-dominant vererbten cerebellären Ataxien (ADCA) gehören als größte Untergruppe die Spinocerebellären Ataxien (SCA), die noch eingehender besprochen werden. Auch die Episodischen Ataxien (EA) und die primär in Japan auftretende dentato-rubro-pallido-luysiane Atrophie (DRPLA) kann man zu dieser Gruppe hinzuzählen.

Das Hauptsymptom, eine Kleinhirnstörung (cerebelläre Ataxie), ist allen autosomal-dominant vererbten Ataxien gemeinsam. Die Kleinhirnveränderung ist für Symptome wie Gang- und Standunsicherheit, erschwerte Koordination von Hand- und Beinbewegungen, veränderte Sprache (Dysarthrie) und Augenbewegungsstörungen wie Nystagmus und Doppelbilder verantwortlich.

Autosomal-rezessiv vererbte Ataxien

In der Gruppe der autosomal-rezessiven Ataxien sind bislang mehr als 20 verschiedenen Formen bekannt. Die häufigste autosomal-rezessive Ataxie ist die Friedreich-Ataxie mit einer Häufigkeit von 1-2:50.000 (20, 52). Des Weiteren gehören zu dieser Gruppe die Ataxia-Teleangiektasia (AT), die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie (AOA) Typ 1 und 2, die A-Beta-Lipoproteinämie (Bassen-Kornzweig-Syndrom), die Ataxie mit isoliertem Vitamin-E-Mangel (AVED), die Cerebrotendinöse Xanthomatose (CTX) und die infantile spinocerebelläre Ataxie (IOSCA) (19, 20).

Diese Ataxien sind durch einen sehr frühen Krankheitsbeginn, meist schon vor dem 20. Lebensjahr, gekennzeichnet (52). Bei der IOSCA treten die ersten Symptome bei bis dahin unauffälligen Kindern bereits zwischen dem 9. und 18. Lebensmonat auf (51).

X-chromosomal vererbte Ataxien

Bei den X-chromosomal vererbten Ataxien ist das Fragile-X-Tremor-Ataxie-Syndrom (FXTAS) zu nennen. Dieses Syndrom ist eine bei etwa 1/3 der älteren (>50 J.) männlichen Träger einer *FMR1*-Prämutation auftretende neurologische Störung, die durch einen ausgeprägten Aktionstremor und eine cerebelläre Ataxie gekennzeichnet ist. Zusätzlich können kognitive Störungen und weitere neurologische Symptome auftreten (20, 26).

Mitochondrial vererbte Ataxien

Mutationen in der Mitochondrien-DNA wirken sich auf verschiedene Stoffwechselfvorgänge aus und führen oft zu schweren Krankheitsbildern, bei denen die Ataxie und Muskelerkrankungen die wichtigsten neurologischen Symptome sind. Weitere Symptome sind Herzerkrankungen, Diabetes mellitus, hormonelle Störungen, Störungen der Sinnesorgane und Funktionsstörungen der inneren Organe (Leber, Bauchspeicheldrüse, Nieren).

Zu dieser Gruppe der Ataxien zählen die Lebersche Hereditäre Optikusatrophie (LHON), die Neuropathie, Ataxie, Retinopathia pigmentosa (NARP), die

Mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose und schlaganfall-ähnliche Episoden (MELAS), die chronisch-progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO), das Kearns-Sayre-Syndrome und das Syndrom der myoklonischen Epilepsie mit ragged red fibres (MERFF) (23, 67).

Ataxien ohne (bekannten) genetischen Hintergrund

Die nicht-genetisch bedingten Ataxien können in erworbene und in sporadische Formen unterteilt werden (10, 40).

Bei den erworbenen Ataxien ist die Krankheitsursache bekannt. Eine Form der erworbenen Ataxie stellt die alkoholische Kleinhirndegeneration aufgrund eines chronischen Alkoholabusus dar. Hier stehen eine Stand- und Gangataxie im Vordergrund. Eine weitere Form ist die paraneoplastische Kleinhirndegeneration (PCD) (40). Dies ist eine mit bösartigen Tumoren assoziierte Autoimmunkrankheit. Sie ist durch eine Stand-, Gang- und Extremitätenataxie, die häufig auch mit Dysarthrie und Okulomotorikstörungen verbunden ist, gekennzeichnet (20). Des Weiteren zählen beispielsweise die Ataxie bei Glutensensitivität und die Ataxie in Folge einer Schwermetallvergiftung zu dieser Gruppe.

Bei den sporadischen Ataxien ist die Krankheitsursache nicht bekannt. Sie sind durch eine progressive Ataxie und einen Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter gekennzeichnet.

Hierzu zählen die sporadische, im Erwachsenenalter beginnende Ataxie unbekannter Ursache (sporadic adult onset ataxia, SAOA), die auch idiopathische, spät beginnende cerebelläre Ataxie (idiopathic late onset cerebellar ataxia, IDLOCA) genannt wird und die Multisystematrophie (MSA) (1, 25, 40).

Die MSA ist eine seltene, sporadische, progressiv verlaufende Erkrankung des mittleren und höheren Erwachsenenalters (20), die durch Neurodegeneration in den Basalganglien, im Kleinhirn, im Hirnstamm und den intermediolateralen Zellsäulen des Rückenmarks gekennzeichnet ist. Klinisch ist sie durch das gemeinsame Auftreten von zentralen Bewegungsstörungen (Parkinson-Syndrom, cerebelläre Ataxie) und schwerem autonomen Versagen gekennzeichnet (69).

1.1.1 Spinocerebelläre Ataxien (SCA)

Die Spinocerebellären Ataxien (SCA), die größte Gruppe der autosomal-dominanten cerebellären Ataxien (ADCA), können nach Anita Harding anhand klinischer Symptome in 3 Gruppen eingeteilt werden (27):

ADCA I: Kleinhirnsymptome (Ataxie) und andere ZNS-Symptome (z.B. Optikusatrophy, Dysphagie, Akinese, Rigor, Demenz, extrapyramidale Symptome): z.B. SCA1, SCA2, SCA3, SCA4, SCA8, SCA12, SCA17, SCA27, SCA28.

ADCA II: Kleinhirnsymptome (Ataxie) und eine Netzhautdegeneration mit Pigmentierungsstörungen: SCA7.

ADCA III: "Nur" Kleinhirnsymptome (mit spätem Beginn, >60. LJ.): z.B. SCA5, SCA6, SCA10, SCA11, SCA14, SCA15, SCA22, SCA26, SCA30.

Mittlerweile sind mehr als 30 genetisch unterschiedliche Formen der SCA bekannt. Für mindestens 14 dieser Unterformen konnte inzwischen das ursächliche Gen mit seiner Mutation bestimmt werden (41).

Spinocerebelläre Ataxien treten weltweit mit einer Häufigkeit von 1-4:100.000 auf. In bestimmten Regionen kann die Häufigkeit aber variieren und höher liegen, wie z.B. die Häufigkeit für die SCA2 in Cuba oder die SCA3 auf den Azoren. Die am weitesten verbreiteten Unterformen sind die SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 und SCA7, wobei die SCA3 wahrscheinlich die häufigste SCA der Welt ist (48).

SCA beginnen meist erst im Erwachsenenalter ab dem 30. LJ. (59), doch kann der Erkrankungsbeginn bei den einzelnen Unterformen stark variieren. So können bei der SCA1, SCA2, SCA3, SCA7, SCA8, SCA12, SCA13, SCA17 oder SCA25 die ersten Symptome bereits in den ersten 10 Lebensjahren auftreten, wohingegen die SCA6 oft erst nach dem 65. LJ. beginnt.

Da die Neurodegeneration oft nicht nur auf das Kleinhirn beschränkt ist, sondern sich auch auf die Retina, den Sehnerv, den Hirnstamm, die Basalganglien, den Großhirn-Cortex, das Rückenmark und das periphere Nervensystem ausweitet, sind mit der Ataxie oft extracerebelläre Symptome assoziiert. Die Ursache mehrerer SCA liegt in einer pathologisch gesteigerten Anzahl von CAG-

Trinukleotid-Folgen, die für einen Polyglutamin-Baustein kodieren (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17). Es besteht eine inverse Korrelation zwischen der Länge des Repeats und dem Manifestationsalter (48, 58). Die SCA12 ist durch eine CAG-Expansion verursacht, die außerhalb der Kodierregion liegt. Im Weiteren wurde ein CTG-Nukleotid-Repeat als Ursache der SCA8 (30, 44) und ein Repeat des Pentanukleotids ATTCT als Ursache der SCA10 identifiziert (49).

Neben den Repeat-Expansionen können auch Punktmutationen und Deletionen z.B. bei der SCA4, SCA5, SCA13, SCA14 und SCA27 in bestimmten Genen krankheitsverursachend sein (11, 31, 33, 66, 68).

So sind für die SCA5 eine Missense-Mutation und zwei Deletionen im *SPTBN2*-Gen, das für β III-Spectrin kodiert, beschrieben worden (31). Die Funktion von β III-Spectrin liegt in der Stabilisierung von Membranproteinen. Die Assoziation mit Golgi- und Vesikelmembranen zusammen mit der Tatsache, dass es an die Dynactin-Untereinheit Centractin (ARP-1) bindet, lässt eine mögliche Rolle bei Transportmechanismen vermuten (62). Weiter wird β III-Spectrin in den Purkinjezellen hoch exprimiert und scheint auch den Purkinjezell-spezifischen Glutamattransporter EAAT4 zu stabilisieren. Dieser Glutamattransporter wurde in der vorliegenden Arbeit molekulargenetisch untersucht.

Bei der SCA6 liegt die Mutation, wie bei der EA2, im *CACNA1A*-Gen welches für einen spannungsabhängigen Kalziumkanal kodiert. Jedoch sind jeweils andere Mutationen krankheitsursächlich.

1.1.2 Episodische Ataxien (EA)

Die Episodischen Ataxien (EA) beschreiben ein heterogenes Syndrom, bei dem die Ataxie nicht dauerhaft, sondern in Phasen auftritt. Solche Ataxie-Phasen können wenige Minuten bis mehrere Tage andauern. Sie manifestieren sich meistens in der frühen Kindheit. Zwischen den einzelnen Phasen zeigen die Patienten annähernd normale neurologische Funktionen.

Es lassen sich heute mindestens sechs Typen von autosomal-dominant vererbten Episodischen Ataxien unterscheiden. Am besten charakterisiert sind die Episodische Ataxie Typ 1 und Typ 2.

Die Episodische Ataxie Typ 1 (EA1) beruht auf Punktmutationen im *KCNA1*-Gen. Dieses Gen kodiert für einen spannungsabhängigen Kaliumkanal, der im Kleinhirn und Skelettmuskel exprimiert wird (32, 34, 54).

Die ataktischen Anfälle dauern bei der EA1 nur Sekunden bis Minuten an und werden durch Startbewegungen („kinesiogene Ataxie“), emotionalen und körperlichen Stress ausgelöst (9, 20). Zusätzlich kommt es zu interiktalen Myokymien (Bild des „Muskelwogens“, mit geringem oder gar keinem Bewegungseffekt) vor allem der Gesichts-, der Hand- und der Fußmuskulatur (8, 47). Gelegentlich können Aura-ähnliche Symptome wie das Gefühl des Fallens oder Schwäche auftreten. Es gibt Phänotypvarianten, die mit partiellen Epilepsien oder einer Verkürzung der Achillessehne von Kindern kombiniert sind (34).

Der Episodischen Ataxie Typ 2 (EA2) liegen Veränderungen in der Alpha-1A-Untereinheit des spannungsabhängigen Kalziumkanals (*CACNA1A*-Gen) der Nervenzellen zugrunde, die zu einem Funktionsverlust des Kanals führen (55). Mutationen in diesem Gen können auch zur SCA6 führen.

Die EA2 ist bei weitem die häufigste Episodische Ataxie (34). Sie ist charakterisiert durch länger andauernde Anfälle (mehrere Stunden oder gar Tage) und einem interiktalen Nystagmus. Wie bei der EA1 sind die Anfälle durch emotionalen Stress oder körperliche Belastung auslösbar, jedoch nicht durch Startbewegungen (20). Die Episoden können sich entweder als reine Ataxie oder als Ataxie in Kombination mit Symptomen, die eine Beteiligung des Kleinhirns oder Hirnstamms anzeigen, darstellen. Schwindel, Übelkeit und Erbrechen sind die häufigsten assoziierten Symptome und treten bei ca. 50% der Patienten auf. Auch Doppelbilder oder Dysarthrie können beobachtet werden.

EA2 ist allelisch mit der familiären hemiplegischen Migräne Typ 1. Manche Patienten können Episoden von beidem, Ataxie und hemiplegischer Migräne, haben. EA2-Patienten können außerdem von epileptischen Anfällen (36) und einer im späteren Verlauf hinzukommenden interiktalen Dystonie betroffen sein, die sich als Torticollis oder segmentale Dystonie manifestieren kann (8, 34).

Neben EA1 und EA2 wurde eine episodisch auftretende Ataxie (EA6) bei einem zehn Jahre alten Patienten beschrieben, bei dem als Krankheitsursache eine Mutation (c.1047C>G; p.P290R) im Glutamattransporter EAAT1 (*SCL1A3*-Gen) identifiziert werden konnte. Die Mutation führt zu einer Abnahme der

Transporteraktivität aufgrund veränderter biophysilogischer Eigenschaften und einer verminderten Oberflächenexpression des veränderten Transporters. Dadurch kommt es zu einem fast kompletten Ausfall der Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt (35). Diese Mutation ist ursächlich für einen sehr schweren Phänotyp. Der klinische Schweregrad der EA6 scheint sehr eng mit der Leistungsfähigkeit des Transporters zur Glutamat-Wiederaufnahme zu korrelieren. So wurde bei drei Mitgliedern einer Familie mit Episodischer Ataxie (EA6) eine andere heterozygote Sequenzvariation des Glutamattransporters EAAT1 (c.556T>A; p.C186S) gefunden, die nur zu einer Verminderung der Glutamat-Wiederaufnahme führt und somit einen wesentlich milderen Phänotyp zeigt (15).

Die Beeinflussung der Glutamat-Wiederaufnahme bei der EA6 und die Veränderung der Stabilität des Glutamattransporter EAAT4 bei der SCA5 deuten auf eine wichtige Rolle des Glutamatüberschusses und der Glutamattransporter bei der Entstehung von verschiedenen Ataxie-Formen hin.

1.2 Glutamat

Glutamat ist eine nicht-essentielle Aminosäure, die aufgrund ihrer zentralen Stellung überall im Gehirn anzutreffen ist (24) und dort in erheblich höheren Konzentrationen vorliegt als andere Aminosäuren (45). Es ist die einzige Aminosäure, die im Gehirn oxidiert, transaminiert, aminiert und decarboxyliert wird.

Glutamat stellt einen wichtigen Funktionsbaustein bei der Synthese von Proteinen (z.B. Folsäure) und Peptiden (z.B. Glutathion) dar und dient als Vorstufe für andere Aminosäuren wie Glutamin und Ornithin (24). Des Weiteren ist Glutamat für die Detoxifikation von Ammoniak durch dessen Bindung zuständig.

Im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugern ist Glutamat darüber hinaus der wichtigste erregende Neurotransmitter und führt durch seine Decarboxylierung noch zu einem weiteren wichtigen Neurotransmitter, der inhibitorisch wirkenden γ -Aminobuttersäure (GABA) (56). Im Vergleich zu anderen wichtigen Neurotrans-

mittern wie Dopamin, Noradrenalin und Serotonin weist Glutamat eine 100-fach höhere Konzentration im ZNS auf (12, 61).

Glutamat erfüllt alle 4 Kriterien, die zur Klassifizierung eines Neurotransmitters notwendig sind: 1. ist es präsynaptisch in spezifischen Neuronen lokalisiert und wird 2. auf entsprechende Stimuli hin in ausreichend hohen Dosen in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, um eine postsynaptische Antwort hervorzurufen. Der Effekt des Glutamats kann 3. durch einen Antagonisten blockiert werden und es gibt 4. hochaffine Transportersysteme, die für seine rasche und effiziente Entfernung aus dem synaptischen Spalt sorgen (24).

Glutamat ist intrazellulär in synaptischen Vesikeln gespeichert. Durch ein Aktionspotential wird die Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran ausgelöst und das Glutamat wird in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dies bewirkt einen Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration von 2-5 μ M auf 0,1-1mM. An der nachgeschalteten Nervenzelle (Postsynapse) löst das freigesetzte Glutamat ein Generatorpotential über den Glutamatrezeptoren aus.

Um die Signalwirkung von Glutamat auf die Rezeptoren zu beenden und somit eine präzise Erregungsweiterleitung zu ermöglichen, muss es schnell und effektiv nach seiner Freisetzung wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt werden (12). Dies verhindert auch die neurotoxischen Eigenschaften des Glutamats, denn eine exzessive Aktivierung von Glutamatrezeptoren kann diejenigen Zellen schädigen, die diese Rezeptoren exprimieren (50).

Diese wichtige Aufgabe der Glutamatelimination aus dem synaptischen Spalt übernehmen hochaffine Glutamattransporter, die in Astrozyten und Neuronen lokalisiert sind.

1.3 Glutamattransporter EAAT1 und EAAT4

Die für diese Arbeit wichtigen Na⁺-abhängigen Glutamattransporter EAAT1 (=GLAST-1) und EAAT4 gehören zur Familie der "Excitatory Amino Acid Transporter", für die bisher 5 Mitglieder identifiziert werden konnten (EAAT1-5). Die Vertreter dieser Familie wurden fortlaufend benannt: EAAT1 (GLAST-1) (63, 65), EAAT2 (GLT-1) (14, 53), EAAT3 (EAAC1) (37), EAAT4 (16, 22, 70) und EAAT5 (5).

Der Glutamattransporter EAAT1 wird durch das *EAAT1*-Gen (*SLC1A3*-Gen, Ensembl ID: ENSG00000079215) kodiert, das auf Chromosom 5p13 lokalisiert ist. Das *EAAT4*-Gen (*SLC1A6*-Gen, Ensembl ID: ENSG00000105143), das für den Glutamattransporter EAAT4 kodiert, liegt auf Chromosom 19p13.

Glutamattransporter sind in der Plasmamembran lokalisiert und bestehen aus acht Transmembran-Domänen mit intrazellulär gelegenen Carboxyl- und Amino-Gruppen. Sie kommen hauptsächlich als Trimere vor (transmembranale Glykoproteine) (43), können jedoch auch wie im Falle von EAAT4 nur als Dimere auftreten (16). Sie sind Na^+ -abhängig und zeichnen sich durch ihre hochaffinen Eigenschaften gegenüber Glutamat aus. Strukturell und funktionell unterscheiden sie sich grundlegend von anderen Familien innerhalb der Neurotransmitter-Transporter (13, 38).

Die einzelnen Glutamattransporter zeigen Unterschiede z.B. in ihrer Gewebeverteilung, in der Membrantopologie und in ihrer Kinetik (6, 14, 37, 63).

So kommt EAAT1 in Bergman-Gliazellen und in Astrozyten vor (46). EAAT2 findet sich in Astrozyten und Neuronen (14, 46). EAAT3 hingegen ist weit verbreitet. Er befindet sich sowohl im Gehirn und im Dünndarm als auch in den Nieren, der Leber und dem Herzen (37). EAAT4 ist ein Purkinjezell-spezifischer Transporter (16), EAAT5 kommt hauptsächlich in den Müllerzellen der Retina, sowie in Muskeln und der Leber vor (5).

Der Na^+ -abhängige Glutamattransport ist der vorherrschende Wiederaufnahmekonzept von Glutamat im zentralen Nervensystem (ZNS) (3). Die extrazellulären Na^+ - und intrazellulären K^+ -Ionen bilden einen Ionengradienten über der Zellmembran aus, der den aktiven Transport von Glutamat entgegen seines Konzentrationsgradienten ins Zellinnere ermöglicht. Die genaue Stöchiometrie ist bislang jedoch noch nicht sicher geklärt. Elektrophysiologische Messungen deuten darauf hin, dass Glutamat im Symport mit drei Na^+ -Ionen und einem H^+ -Ion im Austausch gegen ein K^+ -Ion in die Zelle transportiert wird oder das Glutamat mit nur zwei Na^+ -Ionen im Austausch mit einem K^+ -Ion und einem H^+ -Ion in die Zelle gelangt (3, 7, 16, 21, 71). Die Aktivierung der Transporter erfolgt abhängig von Na^+ -Ionen über eine Glutamatbindung. Die Bindung von

Glutamat an den Transporter triggert seine Leitfähigkeit für Anionen, so dass angenommen wird, dass Glutamattransporter zusätzlich zu der Eigenschaft als Transportproteine noch Eigenschaften von Ionenkanälen zeigen (13, 21).

1.4 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Proteinkomplexe, die in der Zellmembran eingelagert sind und elektrisch geladenen Teilchen (Ionen) das Durchqueren dieser Membranen ermöglichen. Dieser Ionenfluss ist die Grundlage für eine Vielzahl physiologischer Prozesse wie Erregungsbildung und -fortleitung in Nervenzellen und am Herzen, die Kontraktion der Muskulatur, die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes oder die Freisetzung von Transmittern und Hormonen. Bislang sind mehr als 100 Arten von Ionenkanälen entdeckt worden. Sie unterscheiden sich in ihrer Ionenselektivität und in ihrer Regulation, d.h. den Bedingungen die das Öffnen und Schließen beeinflussen.

Die Selektivität der Kanäle für bestimmte Ionen (Natrium, Kalium, Kalzium oder Chlorid) ergibt sich aus den Ladungsverhältnissen und dem Durchmesser dieser Kanäle.

Anhand ihrer Regulation kann man die Ionenkanäle in spannungsregulierte, ligandenregulierte und mechanischregulierte Ionenkanäle einteilen.

Die spannungsregulierten Kanäle öffnen sich in Abhängigkeit von dem Membranpotential. Diese Art von Kanal ist in allen Nervenzellen anzutreffen.

Bei ligandenregulierten Kanälen wird die Öffnung des Kanals durch Bindung eines Moleküls (Ligand) an den Kanal herbeigeführt. Man findet sie z.B. an Synapsen oder in vielen Sinneszellen.

Die Öffnung von mechanischregulierten Kanälen erfolgt durch eine mechanische Kraft, die auf den Kanal ausgeübt wird. Diese Kanäle findet man in den Haarsinneszellen im Ohr (2).

1.5 Aufgabenstellung

Bisher konnten noch nicht alle Ursachen genetisch bedingter Ataxien identifiziert werden.

In der internationalen Forschung wurden bereits vier Patienten mit einer Episodischen Ataxie (EA6) beschrieben, die Mutationen in dem Glutamattransporter EAAT1 zeigen. Zudem ist bekannt, dass Mutationen im *SPTBN2*-Gen die SCA5 verursachen. Das *SPTBN2*-Gen kodiert für das β -III Spectrin, welches stabilisierend auf den Purkinjezell-spezifischen Glutamattransporter EAAT4 wirkt.

Um die Frage zu klären, ob Mutationen in dem *EAAT1*-Gen (*SLC1A3*-Gen) oder dem *EAAT4*-Gen (*SLC1A6*-Gen) in dem zur Verfügung stehenden Patientenkollektiv mit genetischen Ataxien krankheitsursächlich sind, sollten die DNA-Proben mittels PCR amplifiziert und eine SSCP-Analysen durchgeführt werden. Hierbei auffällige Bandenmuster sollten nachfolgend sequenziert und die Veränderungen interpretiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Bezeichnung:	Hersteller:
100 bp DNA Ladder	Gibco BRL
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Aqua Spüllösung	Delta-Pharma
Big Dye Terminator v1.1	Applied Biosystems
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
Dimethyldichlorsilan	Serva
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Qbiogene
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol 70%	Merck
Ethanol 100%	J.T.Baker / Universitäts Apotheke
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure, Titriplex III)	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase (Exo-sap)	USB
Ficoll 400	Pharmacia
Formaldehyd 37%	Sigma
Formamid 100%	Fluka
HPLC-Wasser	Merck
HiDi-Formamid	Applied Biosystems
Low Mass DNA Ladder	Invitrogen
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Merck
One Step RT-PCR-Kit	Qiagen
PAXgene Blood RNA-Kit	PreAnalytiX

pBR322 DNA-Msp I Digest	Biolabs
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid)	Roth
Salpetersäure 65%	Merck
Silbernitrat	Caelo
Standard-Agarose	Biozym
Taq-DNA-Polymerase	Qbiogene
Taq-Puffer mit Mg ²⁺ (10x)	Qbiogene
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Sigma
Tris	MP Biomedicals
Urea	Merck
Xylencyanol	Sigma

2.1.2 Stammlösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung:
3x Ficoll-Lösung	150 µM Bromphenolblau 190 µM Xylencyanol 7,5 µM (w/v) Ficoll 400
6x Ficoll-Lösung	290 µM Bromphenolblau 370 µM Xylencyanol 15 µM (w/v) Ficoll 400
10x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) (Gebrauchslösungen: 5x und 1x TBE-Puffer)	20 mM EDTA 890 mM Tris 890 mM Borsäure

2. Material und Methoden

Agarose-Gellösung	1,5% (w/v) Standard-Agarose 2 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 0,63 µM Ethidiumbromid
Harnstoff-Gellösung für SSCP (10% Harnstoff, 8% PAGE)	8% (v/v) Acrylamid 0,21% Bisacrylamid 1,7 M Urea 2 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 0,035% (v/v) Temed
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dTTP 10 mM dGTP
Formamid-Ladepuffer	290 µM Bromphenolblau 370 µM Xylencyanol 20 mM EDTA 95% (v/v) Formamid

2.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH synthetisiert.

Tabelle 1: Primer für die Exons 2 bis 10 des *EAAT1*-Gens

<i>EAAT1</i> -Gen	Primerbezeichnung	Primersequenz 5' → 3'
Exon 2	EAAT1-Ex2-F	gaggaggtttggctttctgtg
	EAAT1-Ex2-R	gggcagccagatgccccagag
Exon 3	EAAT1-Ex3-F	ctcattttgctagggctgtc
	EAAT1-Ex3-R	catccagcagaaacctaaagc
Exon 4	EAAT1-Ex4-F	gttccattgtttccactg
	EAAT1-Ex4-R	gtaaccagtaagagggtctgg
Exon 5	EAAT1-Ex5-F	ccatttgctgctgggtcaatgc
	EAAT1-Ex5-R	atgagcagggaaaagagggtc
Exon 6	EAAT1-Ex6-F	caccttaatcctcgtgtgac
	EAAT1-Ex6-R	catgttgatggcaataaccatctc
Exon 7	EAAT1-Ex7-F	cttgggtgaaaccagactcc
	EAAT1-Ex7-R	atggcttctctacaccctac
Exon 8	EAAT1-Ex8-F	ggaactgtctgtcccaaagaccaaacg
	EAAT1-Ex8-R	ggcattctaagaaagggtgtatag
Exon 9	EAAT1-Ex9-F	caccgtgcgtattttgcagc
	EAAT1-Ex9-R	ctgtgacagtgagctggaatgc
Exon 10	EAAT1-Ex10-F	gtgatgctcacgggagcctcg
	EAAT1-Ex10-R	gaaggaggaaaggggaagatg

Tabelle 2: Primer für die RT-PCR des *EAAT1*-Gens

Primerbezeichnung	Primersequenz 5' → 3'
EAAT1-ex3c-f	ctccgaccatacagaatgagc
EAAT1-ex3_4c-f	cttgtcacaggaatggcggc
EAAT1-ex4_5c-r	catgttctgatcaagtcc
EAAT4-ex6c-r(für EAAT1)	cgaagcacatggagaagac
EAAT1-ex8c-f	gtgcctggaagagaacaatgg
EAAT1-ex10c-r	cgtgacaagtgtccacaatc

Tabelle 3: Primer für das Exon 3 des *EAAT1*-Gens für die Sequenzierung

Primerbezeichnung	Primersequenz 5' → 3'
EAAT1-Ex3-M13-F	actggccgctggtttacattttccttcagggtacaatcc
EAAT1-Ex3-M13-R	actggccgctggtttacaccaacaactgcttatggtagc

Tabelle 4: Primer für die Exons 1 bis 9 des *EAAT4*-Gens

<i>EAAT4</i> -Gen	Primerbezeichnung	Primersequenz 5' → 3'
Exon 1	EAAT4-Ex1-F	cacgccggccttctgtcctg
	EAAT4-Ex1-R	atttcctgaagtccccgcc
Exon 2	EAAT4-Ex2-F	accctgcctggggctgagcgac
	EAAT4-Ex2-R	ttcaagctgaggctctagacg
Exon 3	EAAT4-Ex3-F	gagttggtgatatggggagg
	EAAT4-Ex3-R	ttcaaatgtgtatattgtgg
Exon 4	EAAT4-Ex4-F	atcacccctagatgcccttc
	EAAT4-Ex4-R	ccaagctcccaccaccctc
Exon 5	EAAT4-Ex5-F	gcgcaatctctctctatttc
	EAAT4-Ex5-R	ccgtgggcacagaccaggac
Exon 6	EAAT4-Ex6-F	cttcagacctgcaagggagg
	EAAT4-Ex6-R	ggacatgaaggacaagaagtg
Exon 7	EAAT4-Ex7-F	ttcccagccccgccccacc
	EAAT4-Ex7-R	ccagccaagctgatgaccg
Exon 8	EAAT4-Ex8-F	tcctctctctcctcatcgc
	EAAT4-Ex8-R	caggggaaagcagtgtgtgc
Exon 9	EAAT4-Ex9-F	cctctttctgtgaagcttttc
	EAAT4-Ex9-R	ccaggactcccctcccagcc

Tabelle 5: Primer für die RT-PCR des *EAAT4*-Gens

Primerbezeichnung	Primersequenz 5' → 3'
EAAT4-ex3c-f	gcagctgtgtactacatgggtg
EAAT4-ex4_5c-f	gcttcaaacagttcaagacg
EAAT4-ex6c-r	gtgacgaggaagtagatgagg
EAAT4-ex7c-r	gcaatgaagatggcagccag

2.1.4 Geräte und Gebrauchsartikel

Agarosegel-Kammer	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership BM100
Agarosegel-Träger	Serva BlueMarine 100
Eismaschine	Ziegra ZBE 30-10
Glasflaschen	Schott Duran 500 ml/1000 ml/ 2000 ml
Färberahmen	Universitäts-Werkstatt
Kämme	Life Technologies Gibco BRL 25er Haifischzahnkamm, mylar, 0,4 mm dick Serva 14er Kämme, 1,5 mm dick
Magnetrührer	Ikamag RET Ikamag RH Ika-Combimag RCT
Mikrowelle	Hitachi Micro 700
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt Tubes 0,2 ml ABgene 96er PCR-Mikrotiterplatte + Deckelkette
Pipetten	Eppendorf Pipetten 0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl Thermo Labsystems Multikanal-Finnpipette 4510 (0,5-10 µl)
Pipettenspitzen	Finntip Micro 0,2-10 µl Fischer #3510 0,1-10 µl Sarstedt Blaue Spitzen Sarstedt Gelbe Spitzen
Reaktionsgefäße	Sarstedt 0,5/1,0/2,0 ml
Sequenziergeräte	Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer
Spacer	Life Technologies Gibco BRL Spacer Model S2, mylar, 0,35 mm dick

Spannungsgeber	Life Technologies Gibco BRL PS 3003 Life Technologies Gibco BRL PS 3002 ST Pharmacia Gene Power Supply GPS 200 Pharmacia Gene Power Supply GPS 400
SSCP-Elektrophorese-Kammer	Life Technologies Gibco BRL Sequencing System Model S2
SSCP-Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, GB 002, 460 x 570 mm
SSCP-Gel-Trockner	Savant Slab Gel Dryer SGD 2000
Stoppuhr	Junghans
Thermocycler	Biometra T Gradient Biometra UNO II Applied Biosystems 2720 Applied Biosystems 2700
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436
Thermostat	Eppendorf Thermostat 5320
Vakuumpumpe	Savant Universal Vacuum System Plus UVS 400A
Vortexer	Fischer Bioblock Scientific
Waage	Sartorius Laboratory L 420 P
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415 C Eppendorf Centrifuge 5804 Sprout Minifuge

2.1.5 Software-Programme

BioDocAnalyze V 1.0	Firma Biometra
IrfanView	Irfan Skiljan
Sequencing Analysis 5.2	Applied Biosystems
SeqScape v2.5	Applied Biosystems
Seqworks	Sven Opitz

2.2 Methoden

2.2.1 Probenauswahl

Für die Suche nach genetischen Veränderungen im *EAAT1*- und *EAAT4*-Gen standen DNA-Proben von Patienten mit dominant vererbten Ataxien aus dem Patientenkollektiv des Instituts für Humangenetik der Universität zu Lübeck zur Verfügung. Bei diesen Patienten waren alle bekannten Mutationen in Ataxie-Genen bereits ausgeschlossen worden.

Für die Analyse des *EAAT1*-Gens wurden 98 der o.g. DNA-Proben verwendet. Zusätzlich wurden 13 Proben von Patienten untersucht, bei denen der Verdacht auf eine episodische Ataxie besteht. Für die Untersuchung des *EAAT4*-Gens wurden 99 Proben des o.g. Kollektivs untersucht.

2.2.2 RNA-Extraktion aus humanem Vollblut

Zur Isolierung von RNA aus humanem Vollblut wurde das PAXgene Blood RNA-Kit von PreAnalytiX verwendet.

Die Blutentnahme erfolgte in die PAXgene Blood RNA Tubes, welche ein Reagenz enthalten, das auf einer patentierten RNA-Stabilisierungsmethode basiert. Dieses Reagenz schützt RNA-Moleküle vor Abbau durch RNasen und reduziert die Induktion der Genexpression auf ein Minimum. Diese PAXgene Blood RNA Tubes wurden bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert, um die vollständige Lyse der Blutzellen zu erreichen.

Die Aufreinigung der RNA und Entfernung von Zellbestandteilen erfolgte über eine PAXgene Homogenisier-Spinsäule (Anionenaustauscher-Säule aus Silica-Gel).

Im ersten Schritt wurde das Erythrozytenlysat 10 Min. bei 4800 rpm zentrifugiert, um ein Pellet aus Nukleinsäuren und Zellrückständen zu erhalten. Der Überstand wurde vorsichtig durch pipettieren entfernt. Danach erfolgte die Zugabe von 4 ml RNase-freiem Wasser, um das Pellet zu waschen und zu resuspendieren.

Anschließend erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt für 10 Min. bei 4800 rpm, nach dem der Überstand erneut verworfen wurde.

Nach der vollständigen Resuspendierung des Pellets in Resuspendierungspuffer (BR1) wurde die Probe in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden der Bindungspuffer (BR2) und eine Proteinase K-Lösung (PK) hinzugegeben, gemischt und für 10 Min. in einem Schüttelinkubator inkubiert, um die Proteine abzubauen. Anschließend wurde das Lysat auf eine PAXgene Homogenisierungssäule aufgetragen und für 3 Min. zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100%igem Ethanol gemischt. Die Probe wurde nun auf eine PAXgene RNA-Spinsäule aufgetragen und 1 Min. zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang wiederholt. Anschließend wurde die an die Säule gebundene RNA durch Zugabe von Waschpuffer 1 (BR3) gereinigt, erneut für 1 Min. zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Für den DNA-Verdau wurde eine DNase-I-Inkubationsmischung (10 µl DNase-I-Stammlösung und 70 µl DNA-Verdaupuffer) direkt auf die Membran der PAXgene RNA-Spinsäule gegeben und diese bei 20-30°C für 15 Min. inkubiert. Nach Zugabe von Waschpuffer 1 wurde sie erneut für 1 Min. zentrifugiert und der Vorgang mit Waschpuffer 2 (BR4) wiederholt. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nun erfolgte noch eine dritte Waschung mit Waschpuffer 2 und Zentrifugation von insgesamt 4 Min., der Durchfluss wurde verworfen.

Zur Elution der RNA wurden 35 µl Elutionspuffer (BR5) direkt auf die Membran pipettiert. Nach Zentrifugation von 1 Min. wurden erneut 35 µl Elutionspuffer (BR5) auf die Membran gegeben, so dass die Probe nun ein gesamtes Elutionsvolumen von 70 µl umfasst. Abschließend wurde das Eluat für 5 Min. auf 65°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) ist eine Methode, eine spezifische DNA-Sequenz zwischen zwei Oligonukleotiden (Primer) zu amplifizieren. Dabei binden die Oligonukleotide an die komplementären 3'-Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz.

Der erste Schritt der PCR ist die Denaturierung. Hierbei wird der zu vervielfältigende Doppelstrang bei einer Temperatur von 94°C in seine Einzelstränge aufgetrennt. Beim zweiten Schritt, dem Annealing, binden die Primer an die Einzelstränge. Die Annealing-Temperatur hängt von der Basenzusammensetzung AT:GC des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes ab und liegt im Allgemeinen in einem Temperaturbereich von 50°C bis 65°C. In der nun folgenden Extension kann eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) dann in 5'-3'-Richtung eine zum Einzelstrang komplementäre DNA-Sequenz aus einzelnen Nukleotiden synthetisieren (bei 72°C). Dieser dreischrittige Zyklus (Denaturierung, Annealing, Extension) wird 30mal wiederholt und führt zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes, d.h. dass sich die DNA-Kopien mit jedem Zyklus verdoppeln (42).

2.2.3.1 PCR für SSCP-Analysen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reaktionsgemische enthielten in einem Volumen von 25 µl 1 µl genomische DNA (50ng/µl), 0,05 µl Taq-DNA-Polymerase, 2,5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer, jeweils 5 pmol der Desoxyribonukleotide sowie 10 pmol von jedem der beiden Primer (s. Tabelle 6). Die Reaktionsansätze wurden zunächst für 5 Min. bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten 30 PCR-Zyklen. Die Denaturierung im PCR-Zyklus erfolgte bei 94°C für 30 Sek. Das Annealing wurde abhängig von dem jeweiligen zu amplifizierenden Genabschnitt bei einer Temperatur zwischen 50°C und 65°C für 30 Sek. durchgeführt (s. Tabelle 7 und Tabelle 8). Für den dritten Schritt, die Extension, wurden bei einer Temperatur von 72°C Synthesezeiten von 30 Sek.

verwendet. Abgeschlossen wurde die Reaktion mit einer weiteren Extensionsphase von 7 Min. bei 72°C (s. Tabelle 9).

Tabelle 6: PCR-Ansatz für die Exons 1 bis 9 des *EAAT4*-Gens und die Exons 2 bis 10 des *EAAT1*-Gens

Reagenzien	Konzentration	Volumen	Menge
Genomische DNA	50 ng/µl	1,00 µl	50 ng
Vorwärts-Primer	10 pmol/µl	1,00 µl	10 pmol
Rückwärts-Primer	10 pmol/µl	1,00 µl	10 pmol
dNTP-Mix	10 pmol/µl je dNTP	0,50 µl	5 pmol je dNTP
Puffer	10x	2,50 µl	
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,05 µl	0,25 U
Aqua dest.		18,95 µl	
	Gesamt:	25,00 µl	

Tabelle 7: PCR-Bedingungen für die Exons 2 bis 10 des *EAAT1*-Gens

<i>EAAT1</i>	Annealing-temperatur	Extensionszeit	Zykluszahl	Polymerase-Konzentration	Primer-Konzentration	Produktgröße
Exon 2	55°C	30 Sek.	30	5 U/µl	10 pmol/µl	319 bp
Exon 3	55°C	30 Sek.	30	5 U/µl	10 pmol/µl	313 bp
Exon 4	55°C	30 Sek.	30	5 U/µl	10 pmol/µl	339 bp
Exon 5	55°C	30 Sek.	30	5 U/µl	10 pmol/µl	240 bp
Exon 6	55°C	30 Sek.	30	5 U/µl	10 pmol/µl	386 bp
Exon 7	55°C	30 Sek.	30	5 U/µl	10 pmol/µl	361 bp
Exon 8	55°C	30 Sek.	30	5 U/µl	10 pmol/µl	322 bp
Exon 9	55°C	30 Sek.	30	5 U/µl	10 pmol/µl	256 bp
Exon10	55°C	30 Sek.	30	5 U/µl	10 pmol/µl	271 bp

Tabelle 8: PCR-Bedingungen für die Exons 1 bis 9 des *EAAT4*-Gens

<i>EAAT4</i>	Annealing-temperatur	Extensionszeit	Zykluszahl	Polymerase-Konzentration	Primer-Konzentration	Produktgröße
Exon 1	65°C	30 Sek.	30	5 U/μl	10 pmol/μl	327 bp
Exon 2	55°C	30 Sek.	30	5 U/μl	10 pmol/μl	255 bp
Exon 3	50°C	30 Sek.	30	5 U/μl	10 pmol/μl	335 bp
Exon 4	55°C	30 Sek.	30	5 U/μl	10 pmol/μl	160 bp
Exon 5	55°C	30 Sek.	30	5 U/μl	10 pmol/μl	390 bp
Exon 6	55°C	30 Sek.	30	5 U/μl	10 pmol/μl	355 bp
Exon 7	55°C	30 Sek.	30	5 U/μl	10 pmol/μl	317 bp
Exon 8	55°C	30 Sek.	30	5 U/μl	10 pmol/μl	259 bp
Exon 9	55°C	30 Sek.	30	5 U/μl	10 pmol/μl	317 bp

Tabelle 9: Programm der PCR für die SSCP-Analyse

Schritt Nr.	Temperatur	Dauer	
0	94°C	Pause	vorheizen
1	94°C	5 Min.	
2	94°C	30 Sek.	Schritt 2 bis 4: 30 x wiederholen
3	50°C/55°C/65°C	30 Sek.	
4	72°C	30 Sek.	
5	72°C	7 Min.	
6	4°C	Pause	

2.2.3.2 Primär-PCR für die Sequenzierung

Zur Herstellung von Ausgangsmaterial für die Sequenzanalyse wurde erneut eine PCR zur DNA-Amplifikation durchgeführt. Alle Bedingungen entsprachen den unter Kapitel 2.2.3.1 „PCR für SSCP-Analysen“ beschriebenen Bedingungen.

2.2.4 RT-PCR

Die RT-PCR („Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion“) ist eine Methode, um die Expression von spezifischen Genen in Blut, Geweben oder Zellen nachzuweisen.

Da bei der DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) spezifische DNA-abhängige DNA-Polymerasen verwendet werden, die nicht in der Lage sind, RNA zu amplifizieren, wird bei der RT-PCR zuerst eine Reverse Transkriptase eingesetzt. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Diese cDNA dient bei der anschließenden PCR als Ausgangsmaterial.

In der vorliegenden Arbeit wurde das One Step RT-PCR-Kit von Qiagen verwendet. Die Reaktionsgemische enthielten in einem Volumen von 25 μl 1,5 μl RNA, 1,0 μl Enzym-Mix, 5,0 μl 5x-Puffer, 1,0 μl dNTPs (jeweils 10 pmol der Nukleotide), 1,5 μl (15 pmol) von jedem der beiden Primer, sowie 13,5 μl RNase-freies Wasser (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: RT-PCR-Ansatz für das *EAAT1*- und *EAAT4*-Gen

Reagenzien	Konzentration	Volumen	Menge
RNA		1,50 μl	
Vorwärts-Primer	10 pmol/ μl	1,50 μl	15 pmol
Rückwärts-Primer	10 pmol/ μl	1,50 μl	15 pmol
dNTP-Mix	10 pmol/ μl je dNTP	1,00 μl	10 pmol je dNTP
Puffer	5x	5,00 μl	
Enzym-Mix		1,00 μl	
RNase-freies Wasser		13,50 μl	
	Gesamt:	25,00 μl	

Tabelle 11: PCR-Bedingungen für die RT-PCR des *EAAT1*-Gens

Primer	Annealing-temperatur	Extensionszeit	Zykluszahl	Enzym-Mix-Konzentration	Primer-Konzentration	Produktgröße
Ex 3_4c-f/ Ex 4_5c-r	55°C	30 Sek.	35	Vom Hersteller nicht genannt	10 pmol/µl	222 bp
Ex 3c-f/ Ex 4_5c-r	60°C	30 Sek.	35	Vom Hersteller nicht genannt	10 pmol/µl	330 bp
Ex 8c-f/ Ex 10c-r	55°C	1 Min.	35	Vom Hersteller nicht genannt	10 pmol/µl	240 bp

Tabelle 12: PCR-Bedingungen für die RT-PCR des *EAAT4*-Gens

Primer	Annealing-temperatur	Extensionszeit	Zykluszahl	Enzym-Mix-Konzentration	Primer-Konzentration	Produktgröße
Ex 3c-f/ Ex 7c-r	50°C/55°C/ 60°C	30 Sek.	35/40	Vom Hersteller nicht genannt	10 pmol/µl	927 bp
Ex 4_5c-r/ Ex 6c-r	50°C/55°C/ 60°C	30 Sek.	35/40	Vom Hersteller nicht genannt	10 pmol/µl	518 bp
Ex 3c-f/ Ex 6c-r	55°C/ 60°C	30 Sek.	35/40	Vom Hersteller nicht genannt	10 pmol/µl	708 bp
Ex 4_5c-r/ Ex 7c-r	55°C/ 60°C	30 Sek.	35/40	Vom Hersteller nicht genannt	10 pmol/µl	737 bp

Tabelle 13: Programm der RT-PCR

Schritt Nr.	Temperatur	Dauer	
0	50°C	Pause	vorheizen
1	50°C	30 Min.	
2	95°C	15 Min.	
3	95°C	30 Sek.	Schritt 3 bis 5: 35 x wiederholen
4	55°C/60°C	30 Sek.	
5	72°C	30 Sek.	
6	72°C	7 Min.	
7	4°C	Pause	

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und schnelle Methode, PCR-Produkte nach ihrer Größe, d.h. der Anzahl ihrer Basenpaare, aufzutrennen, darzustellen und so den Erfolg der PCR zu kontrollieren.

Deshalb wurde die Agarose-Gelelektrophorese in dieser Arbeit sowohl zur Überprüfung von PCR-Produkten der Primär-PCR für die Sequenzierung als auch der PCR-Produkte für die SSCP-Analyse angewendet.

Das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese beruht darauf, Moleküle auf ein Träger-Gel aufzutragen und mit Hilfe eines elektrischen Feldes nach Form, Größe und Ladung aufzutrennen. Die DNA bewegt sich aufgrund ihrer negativen Ladung (hoher Gehalt an negativ geladenen Phosphatgruppen) im elektrischen Feld auf die Anode (positiv geladener Pol) zu. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei u. a. abhängig von ihrer Molekülgröße, der Viskosität der Trägersubstanz (d. h. der Agarose-Konzentration des verwendeten Gels) sowie der angelegten Spannung.

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wird ein Längenstandard mitgeführt. Die Agarose-Gellösung wird mit Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, mit dessen Hilfe die DNA markiert und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht wird (42, 60).

Durchführung:

In der vorliegenden Arbeit wurden 2%ige Standard-Agarose-Gele verwendet. Dabei wurden 4 g Agarose in 200 ml 1xTBE-Lösung aufgeköcht, anschließend auf ca. 60°C abgekühlt und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Diese Lösung wurde in Gelformen gegossen. Zur Herstellung der „Slots“ (Aussparungen für die aufzutragenden PCR-Produkte) wurden (14er-)Kämme in das noch flüssige Gel eingesetzt. Nach ca. 30 Min. wurden die Geltaschen des nun erstarrten Gels mit einem Proben-Farbgemisch bestehend aus 4 µl PCR-Produkt und 3 µl 3x Ficoll-Farbe beladen. Zusätzlich wurden 2 µl bzw. 5 µl eines Längen- und Konzentrationsstandards (Low Mass DNA Ladder bzw. 100bp-Leiter) zur Größen- und Konzentrationsbestimmung der jeweiligen PCR-Produkte auf das Gel

aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde jeweils für 25 Min. bei 110 V in einer mit 1x TBE-Lösung gefüllten Elektrophoresekammer durchgeführt. Anschließend wurden die fluoreszierenden DNA-Banden unter einer UV-(Kontakt)Lampe sichtbar gemacht und mit einer Kamera aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes BioDocAnalyse V 1.0 der Firma Biometra.

2.2.6 SSCP (“single-strand conformation polymorphism”)-Analyse

Die SSCP-Analyse („single-strand conformation polymorphism“ oder Einzelstrang-Konformationspolymorphismus) ist eine Elektrophoresemethode, die eine extrem differenzierte Auftrennung der PCR-Produkte erlaubt und so dem Nachweis von Mutationen und Polymorphismen in einem bestimmten Abschnitt der DNA dient.

Da sich die Wildtyp-DNA bezüglich ihres Migrationsverhaltens im elektrischen Feld von DNA mit abweichender Basen-Sequenz unterscheidet, können Veränderungen der DNA-Sequenz mit dieser Methode relativ sicher entdeckt werden. Das unterschiedliche Migrationsverhalten ist durch die komplexe Faltung und Schleifenbildung einzelsträngiger DNA zu dreidimensionalen Strukturen bedingt. Schon der Austausch einer einzigen Base genügt, um diese Struktur und somit das Laufverhalten des DNA-Fragments nachhaltig zu verändern (57).

Die Sensitivität der SSCP-Analyse variiert in Abhängigkeit vom verwendeten Gelyp. In dieser Arbeit wurden Acrylamid-Gele verwendet, da diese in der Regel optimale Ergebnisse erzielen. Des Weiteren wurden die Elektrophoresebedingungen durch Zusatz von Harnstoff (denaturierend) und Glycerin (nicht-denaturierend) modifiziert, wobei man davon ausgeht, dass die Auftrennung bei Harnstoffgelen eher nach dem Gesichtspunkt der Größe und bei Glyceringelen eher nach der Konformation des DNA-Abschnittes erfolgt (57).

Vor der Elektrophorese wurden die DNA-Proben bei 95°C in Formamid-Farbe unvollständig denaturiert (21 µl PCR-Produkt und 11 µl Formamid-Farbe), so dass sich sowohl DNA-Einzelstränge als auch Doppelstränge elektrophoretisch auftrennen und darstellen lassen.

Das fertige Gel zeigt nach Abschluss der Elektrophorese im oberen Bereich in der Regel zwei relativ zarte Banden, die den DNA-Einzelsträngen entsprechen, sowie eine kräftigere Bande im unteren Gelbereich, die den Doppelstrang repräsentiert.

Durchführung:

Zunächst wurde eine Stammlösung für je 5 Gele zur Durchführung der SSCP-Analyse hergestellt. Diese setzt sich aus 100 ml Polyacrylamid-Lösung, 75 ml 5x TBE-Puffer, 37,5 g Harnstoff, 132,5 µl TEMED und Aqua dest. zusammen, mit welchem auf ein Volumen von 375 ml aufgefüllt wurde. Somit erhält man eine 8%ige Polyacrylamid- und 10%ige Harnstoff-Lösung. Diese wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Jeweils 75 ml dieser Stammlösung wurden pro Gel entnommen, entgast und mit 500 µl APS (Ammoniumpersulfat-Lösung) versetzt, um die Polymerisation des Gels zu ermöglichen. Das noch flüssige Gel wurde nun zügig und luftblasenfrei zwischen zwei Glasplatten gegossen, die vorher gründlich mit 100%igem Ethanol gereinigt wurden.

Die Glasplatten hatten eine Länge von 39 cm und 42 cm. Die kleinere der beiden Platten besaß eine Silanbeschichtung. Zwischen diesen Platten dienten zwei „spacer“ mit 0,35 mm Dicke als Abstandshalter und bestimmten somit die Dicke des Gels (0,35 mm). Dort, wo die längere Platte überstand, wurden zwei 0,4 mm dicke Haifischzahnkämme mit ihrer glatten Seite in das noch flüssige Gel zwischen die Platten geschoben, um einen Hohlraum für die späteren Taschen zu schaffen. Die Glasplatten mit den dazwischen liegenden „spacern“ wurden von insgesamt sechs Klammern fixiert, bis das Gel polymerisiert war. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Klammern entfernt. Die Kämmen wurden herausgenommen und nun vorsichtig mit ihrer gezahnten Seite voran in den Hohlraum zwischen den Glasplatten bis in die Gelkante vorgeschoben. Auf diese Weise entstanden die Geltaschen. Nun wurden die Glasplatten mit dem sich dazwischen befindenden Gel in die Gelkammer eingebaut und die beiden Pufferkammern mit 1x TBE-Puffer gefüllt, welcher als Laufpuffer diente. Nach Entfernen von Luftblasen aus den Taschen wurden diese mit 5 µl der denaturierten Probe befüllt. Die äußersten Geltaschen wurden mit 2,5 µl eines M1-

Markers befüllt. Bei 30 Watt wurde je nach Größe des zu untersuchenden Exons eine Laufzeit von 3 bis 4,5 Stunden benötigt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten aus der Gelkammer herausgenommen und mit Hilfe eines Keils voneinander getrennt, wobei das Acrylamid-Gel an der nicht-silanisierten Platte haften blieb. Nach Entfernen der Käbme und der „spacer“ wurde ein hölzerner Färberahmen von 32x38 cm Größe aufgesetzt und mit vier Klammern fixiert. Zur Darstellung der Elektrophoresebanden wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

Silberfärbung:

Zunächst wurde das Gel mit 10%igem Ethanol für 10 Min. und anschließend mit 1%iger Salpetersäure für 5 Min. überschichtet um die DNA zu fixieren. Danach erfolgte eine dreimalige Spülung mit Aqua dest.. Daraufhin wurde das Gel zum Färben für 20 Min. mit einer Silbernitrat-Lösung (2,02 g AgNO₃/l) überschichtet.

Nach erneutem zweimaligen gründlichen Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Entwicklung nach Sicht, indem das Gel mit einer Reduktionslösung, welche die angelagerten Silberionen sichtbar macht, überschichtet wurde. Diese Entwicklungslösung bestand aus 29,6 g wasserfreiem Natriumcarbonat (Na₂CO₃) und 680 µl 37%igem Formaldehyd pro Liter. Nachdem klare Banden erkennbar waren, wurde die Färbung durch Zugabe einer 10%igen Essigsäure-Lösung für 3 Min. gestoppt. Anschließend wurde das Gel noch einmal für 5 Min. mit Aqua dest. überschichtet.

Nach Beendigung der Färbung wurde der Holzrahmen entfernt und das Gel geschnitten. Nun wurde es auf ein ausreichend großes Stück Papier übertragen („blotting“) und mit Hilfe eines Trockners mit Vakuumpumpe bei 64°C eine Stunde lang getrocknet. Das getrocknete Gel wurde mit einer durchsichtigen Folie beklebt und beschriftet.

2.2.7 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode

Die DNA-Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Abschnitt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Didesoxymethode nach Sanger verwendet, welche auch Kettenabbruch-Methode genannt wird. Dieses Verfahren beruht auf der Neusynthese eines DNA-Einzelstrangs, welcher komplementär zur vorhandenen DNA-Matrize ist. Die DNA-Neusynthese erfolgt in Gegenwart der vier Nukleotidtriphosphate dATP, dTTP, dCTP und dGTP, denen in niedriger Konzentration Didesoxynukleotide (Nukleotide, denen die 3'-OH-Gruppe an der Desoxyribose fehlt) beigemischt sind. Die vier verschiedenen Didesoxynukleotide sind jeweils mit einem unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoff markiert.

Der Einbau eines Didesoxynukleotids in den neusynthetisierten Strang führt zu einem Kettenabbruch, da die DNA-Polymerase aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am 3'-Ende kein weiteres Nukleotid anlagern kann. Da der Einbau eines der vier Didesoxynukleotide zufällig erfolgt, entsteht eine Mischung neusynthetisierter DNA-Stränge mit unterschiedlicher Länge, die entweder auf Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin enden.

Mittels Kapillar-Gelelektrophorese werden die entstandenen Kettenabbruchprodukte entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die Abfolge der Farbsignale, die an einem Detektor erscheinen, werden von einem Computer registriert und so die Basenabfolge des sequenzierten DNA-Moleküls rekonstruiert.

Durchführung:

Vor der Sequenzierung wurde eine PCR durchgeführt, die die DNA-Matrizen für die Sequenzreaktion liefert (s. Kapitel 2.2.3 „Polymerase-Kettenreaktion“).

Um die PCR-Produkte vor der DNA-Sequenzierung von überschüssigen Primern und Nukleotidtriphosphaten zu befreien, welche die Sequenzreaktion durch Hintergrundsignale stören können, wurden die PCR-Produkte mit einem Enzymgemisch aus Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase behandelt.

Der für die Sequenzreaktion benötigte Ansatz von 10 µl bestand aus 5-10 ng (1 µl) des vorbehandelten DNA-Moleküls, 15% (v/v) Puffer (1,5 µl), 10% (v/v) Terminatormix v1.1 (0,5 µl), 5 pmol des jeweiligen Primers (0,5 µl) und Aqua dest. (6,5 µl) (s. Tabelle 14).

Nach der Sequenzreaktion (s. Tabelle 15) wurden die Produkte einer Ethanol-Fällung unterzogen und anschließend in 15 µl HiDi-Formamid bei 4°C über Nacht gelöst. Abschließend wurden die Proben mit dem Kapillar-Sequenzierer ABI 3130 analysiert.

Tabelle 14: Ansatz für die Sequenzreaktion

Reagenzien	Konzentration	Volumen	Menge
PCR-Produkt		1,00 µl	
Vorwärts-/Rückwärts-Primer	10 pmol/µl	0,50 µl	5 pmol
Puffer	5x	1,50 µl	
Terminatormix v1.1		0,50 µl	
Aqua dest.		6,50 µl	
	Gesamt:	10,00 µl	

Tabelle 15: Programm der Sequenzreaktion

Schritt Nr.	Temperatur	Dauer	
0	96°C	Pause	vorheizen
1	96°C	1 Min.	
2	96°C	10 Sek.	Schritt 2 bis 4: 25 x wiederholen
3	60°C	5 Sek.	
4	60°C	1 Min.	
5	4°C	Pause	

3. Ergebnisse

3.1 Mutationssuche im *EAAT1*-Gen

3.1.1 Vorgehensweise

Es wurden für 98 DNA-Proben von Personen mit dominant vererbten Ataxien und für 13 DNA-Proben von Personen, bei denen der Verdacht auf eine episodische Ataxie besteht, die kodierenden Exons 2 bis 10 des *EAAT1*-Gens mittels PCR amplifiziert (s. Kapitel 2.2.3 „Polymerase-Kettenreaktion“). Anschließend wurde der Erfolg jeder PCR stichprobenartig anhand von 12 Proben durch Agarose-Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.2.5 „Agarose-Gelelektrophorese“) kontrolliert. Bei erfolgreicher PCR wurde daraufhin eine SSCP-Analyse mit anschließender Silberfärbung (s. Kapitel 2.2.6 „SSCP-Analyse“) durchgeführt. Für diese Analyse wurden Polyacrylamid-Gele genutzt, denen Harnstoff zugesetzt war. Anschließend wurde bei den in der SSCP-Analyse auffälligen Proben die Nukleotid-Sequenz bestimmt (s. Kapitel 2.2.7 „DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode“) und mit der Wildtyp-Sequenz aus der Datenbank Ensembl, Zugangsnummer ENSG 00000079215 (release 54 - May 2009), verglichen.

3.1.2 Ergebnisse der SSCP-Analysen des *EAAT1*-Gens

Die SSCP-Gele zeigten bei der Mehrzahl der Amplifikate im oberen Bereich die Einzelstränge (ss = single stranded, einzelsträngig) als zwei schwache Banden und im unteren Bereich den Doppelstrang (ds = double stranded, doppelsträngig) als eine deutliche Bande. Sowohl im Bereich der Einzelstränge als auch im Bereich der Doppelstränge können SSCP-Gele unterschiedliche Bandenmuster auftrennen, welche auf Konformationsunterschiede der DNA-Hybride und somit auf Veränderungen in der Nukleotid-Sequenz hinweisen.

3.1.2.1 Exon 2

Für Exon 2 zeigten 24 der 111 Proben eine Abweichung im Bandenmuster (M2 und M3) der ds-DNA-Bande gegenüber dem Wildtyp (M1). Von den 24 auffälligen Proben zeigten 19 Proben eine Doppelbande im Doppelstrangbereich (M2), 5 Proben nur die obere Bande (M3) (s. Abb. 1).



Abb. 1: Ausschnitt aus SSCP-Gel für Exon 2
M1 - M3 = unterscheidbare Laufmuster

3.1.2.2 Exon 3

Für Exon 3 konnte durch die SSCP-Analyse ein abweichendes Bandenmuster (M2) im Doppelstrang in Probe 15544 entdeckt werden. Bei den Übrigen 110 Proben fand sich die Wildtyp-Sequenz (M1) (s. Abb. 2).

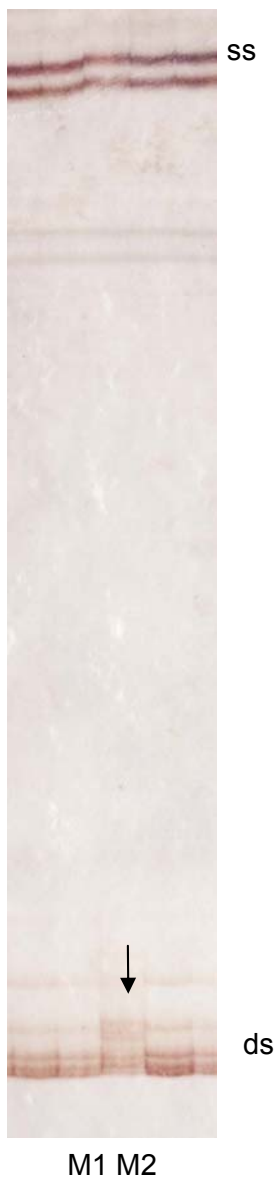


Abb. 2: Ausschnitt aus SSCP-Gel für Exon 6

M1 – M2 = unterscheidbare Laufmuster

M2 = Probe Nr. 15544

3.1.2.3 Exon 4, Exon 5, Exon 7 und Exon 8

Für Exon 4, Exon 5, Exon 7 und Exon 8 wiesen in der SSCP-Analyse alle 111 Proben das gleiche Bandenmuster auf.

3.1.2.4 Exon 6

Für Exon 6 konnte in der SSCP-Analyse nur in Probe 13785 eine Auffälligkeit im Doppelstrang (M2) (s. Abb. 3) entdeckt werden.



Abb.3: Ausschnitt aus SSCP-Gel für Exon 6

M1 – M2 = unterscheidbare Laufmuster

M2 = Probe Nr. 13785

3.1.2.5 Exon 9

Für Exon 9 konnten in der SSCP-Analyse neben den 92 Proben die den Wildtyp (M1) zeigen, 19 auffällige Proben (M2) entdeckt werden. Diese zeigten im Bereich der oberen ss-DNA-Bande eine Veränderung im Sinne einer Doppelbande (s. Abb. 4).



Abb. 4: Ausschnitt aus SSCP-Gel für Exon 9

M1 – M2 = unterscheidbare Laufmuster

3.1.2.6 Exon 10

Für Exon 10 lieferten 40 Proben Abweichungen im Bandenmuster gegenüber dem Wildtyp (M1). Diese Veränderung zeigte sich in Form einer Doppelbande im ds-DNA-Banden-Bereich (M2). Das Muster M1:M2 steht im Verhältnis 71:40. Zusätzlich zu dieser Veränderung im ds-DNA-Bereich wies die Probe 9753 auch im ss-DNA-Bereich ein eigenständiges Bandenmuster (M3) im Sinne von Mehrfachbanden auf (s. Abb. 5).

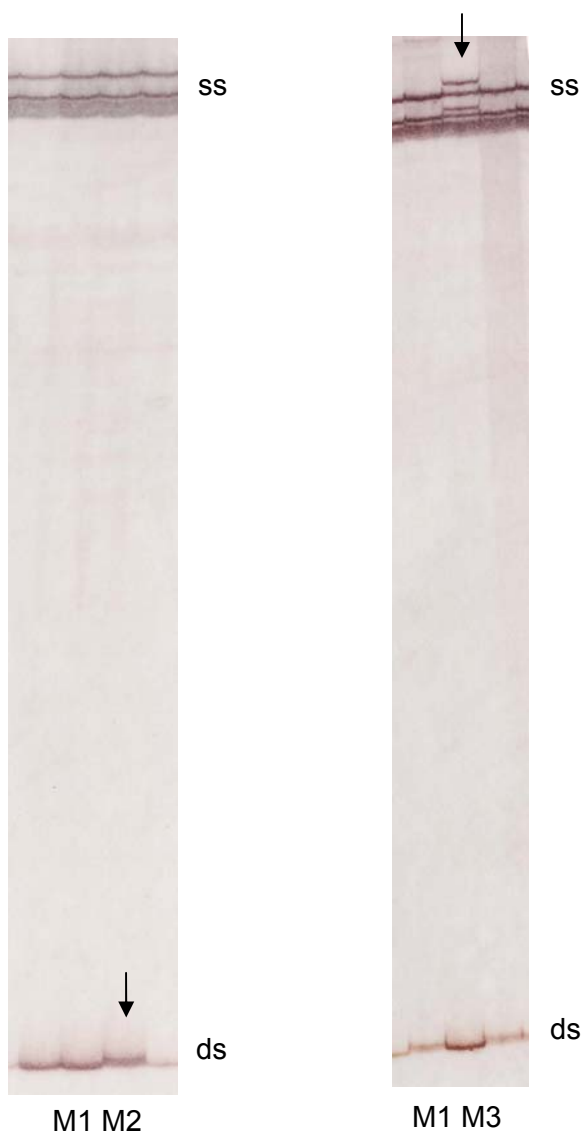


Abb. 5: Ausschnitt aus SSCP-Gel für Exon 10

M1-M3 = unterscheidbare Laufmuster

M3 = Probe Nr. 9753

Zur Abklärung, ob es sich bei dem in Probe 9753 gefundenen Bandenmuster M3 um einen Polymorphismus oder um eine seltene DNA-Variante handelt, wurde bei 136 weiteren DNA-Proben von Kontrollpersonen eine SSCP-Analyse durchgeführt. Keine der Kontrollen zeigte das Muster M3 wie Probe 9753. Bei 83 Proben konnte die Wildtyp-Sequenz (M1) gefunden werden. Die restlichen 53 Proben wiesen das Bandenmuster M2 auf.

3.1.3 Ergebnisse der Sequenzierung des *EAAT1*-Gens

Von allen Proben, die bei der SSCP-Analyse ein auffälliges Bandenmuster lieferten, wurden zufällig ein bis drei Proben ausgesucht und im entsprechenden Exon sequenziert. Zusätzlich wurden ein bis drei Proben ausgewählt, die augenscheinlich das Wildtyp-Muster zeigten. Wenn es nicht ersichtlich war, welches der aufgetretenen verschiedenen Bandenmuster der Wildtyp-Sequenz entsprach, wurde für jedes Bandenmuster mindestens eine Probe sequenziert. Außerdem wurden von Gelen, bei denen alle Proben in der SSCP-Analyse gleich aussahen, per Zufall zwei Proben ausgewählt und sequenziert.

Somit ergaben sich insgesamt 24 Sequenzierungen für Exons des *EAAT1*-Gens.

Die Sequenzierung wurde grundsätzlich doppelsträngig durchgeführt, um das Auffinden und die Beurteilung von Veränderungen in der Sequenz abzusichern. Die ermittelte Sequenz wurde mit dem Eintrag in die Datenbank Ensembl, Zugangsnummer ENSG00000079215, verglichen. Damit konnten sowohl homozygote als auch heterozygote Veränderungen im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz entdeckt werden.

Die Sequenzveränderungen wurden entsprechend der internationalen Nomenklatur benannt (4, 17). Die identifizierten Veränderungen sind nachfolgend für die einzelnen Exons dargestellt und in einer Übersichtstabelle (s. Tabelle 16, S. 45) zusammengefasst.

3.1.3.1 Exon 2

Die SSCP-Analyse für Exon 2 zeigte drei unterschiedliche Bandenmuster (s. Abb. 1, S. 36). Die Proben 8873 und 13484 zeigten das Bandenmuster M1 und entsprachen der Wildtyp-Sequenz. Drei Proben (8567, 9100 und 9528) mit dem Bandenmuster M2 zeigten eine heterozygote DNA-Variation im Intron-Bereich (c.181+28_181+29insA; Polymorphismus rs3216728). In Probe 7372 liegt die Insertion homozygot vor (Bandenmuster M3) (s. Abb. 6).

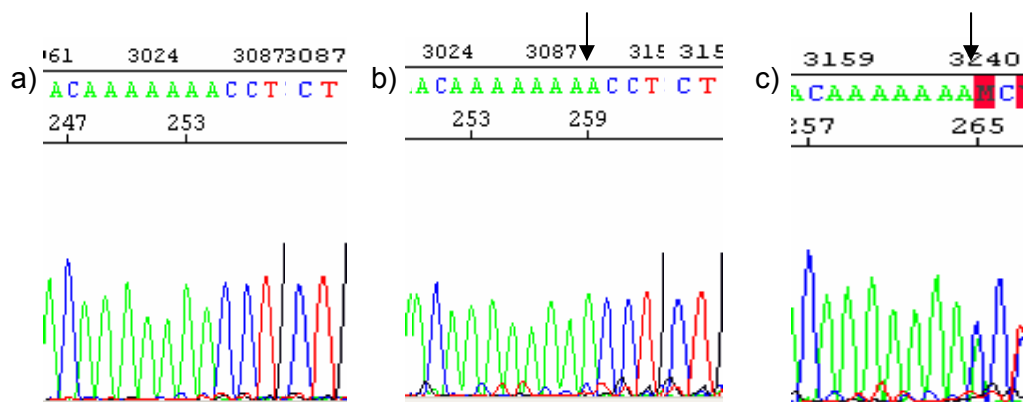


Abb. 6: a) Wildtyp-Sequenz b) Variante: c.181+28_181+29insA homozygot
 c) Variante: c.181+28_181+29insA heterozygot

3.1.3.2 Exon 3

In der SSCP-Analyse für Exon 3 war nur die Probe 15544 auffällig (s. Abb. 2, S. 37). Es wurden zwei Proben sequenziert. Die Probe 15535 zeigte die Wildtyp-Sequenz. Bei der Sequenzierung der Probe 15544 zeigte sich eine DNA-Variation im Intron-Bereich (c.319+37_319+38insT), für die Probe 15544 heterozygot ist.

3.1.3.3 Exon 4, Exon 5, Exon 7 und Exon 8

Da in der SSCP-Analyse für Exon 4, Exon 5, Exon 7 und Exon 8 alle Proben gleich aussahen, wurden jeweils zufällig zwei Proben (Exon 4: 3001 und 16578, Exon 5: 14756 und 14915, Exon 7: 14459 und 14756, Exon 8: 9139 und 14499) zur Sequenz ausgewählt. Beide Proben zeigten jeweils die publizierte Wildtyp-Sequenz.

3.1.3.4 Exon 6

In der SSCP-Analyse des Exons 6 zeigte nur die Probe 13785 ein auffälliges Bandenmuster (s. Abb. 3, S. 38). Es wurden zwei Proben sequenziert. Die Probe 16033 zeigte die Wildtyp-Sequenz. Bei Probe 13785 konnte eine heterozygote DNA-Variation (c.657G>C; p.E219D) im Exon entdeckt werden (Polymorphismus rs2032892). Der Austausch von Guanin gegen Cytosin wirkt sich auf die Aminosäureabfolge im Protein aus. Das betroffene Tripletts kodiert Asparaginsäure statt Glutaminsäure.

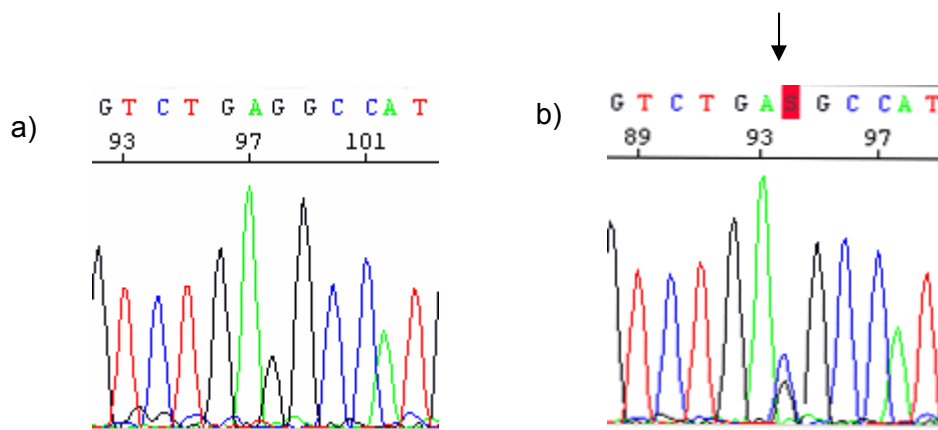


Abb. 7: a) Wildtyp-Sequenz b) Variante: c.657G>C heterozygot

3.1.3.5 Exon 9

In der SSCP-Analyse für Exon 9 konnten zwei unterschiedliche Bandenmuster entdeckt werden (s. Abb. 4, S. 39). Es wurden drei Proben sequenziert. Die Probe 15657 mit dem Bandenmuster M1 zeigte die Wildtyp-Sequenz. Die Proben 15640 und 10745 mit dem Bandenmuster M2 zeigten heterozygot die DNA-Variation c.1290-46G>C im Intron-Bereich.

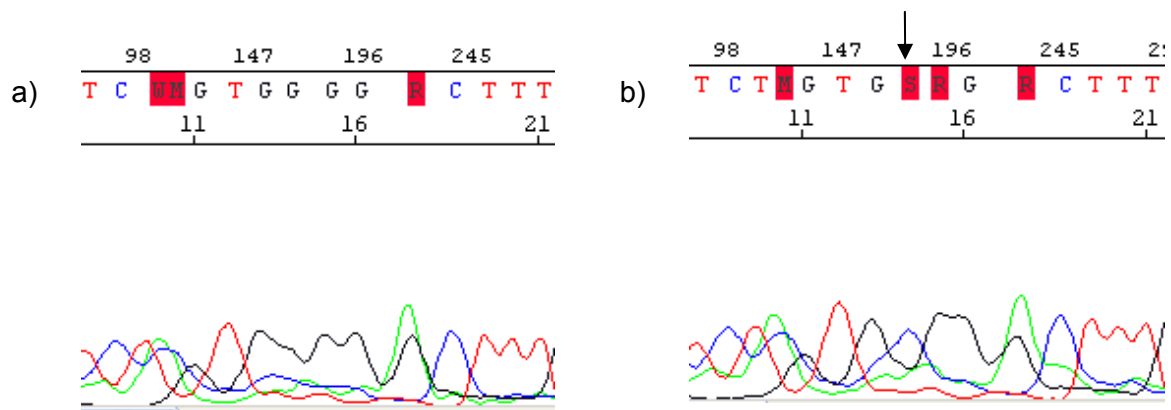


Abb. 8: a) Wildtyp-Sequenz b) Variante: c.1290-46G>C heterozygot

3.1.3.6 Exon 10

Die SSCP-Analyse für Exon 10 lieferte 3 verschiedene Bandenmuster (Abb. 5, S. 40). Bei Probe 9831 mit dem Bandenmuster M1 fand sich die Wildtyp-Sequenz. Die Proben 9753 und 9902 hatten das Bandenmuster M2 und zeigten eine heterozygote DNA-Variation (c.*33G>A) im 3'-UTR-Bereich (Polymorphismus rs2229894).

Zusätzlich zu dieser Variation fällt Probe 9753 durch das Bandenmuster M3 auf, das Folge der heterozygoten DNA-Variation c.1425-8G>C im Intron-Bereich ist (s. Abb. 9).

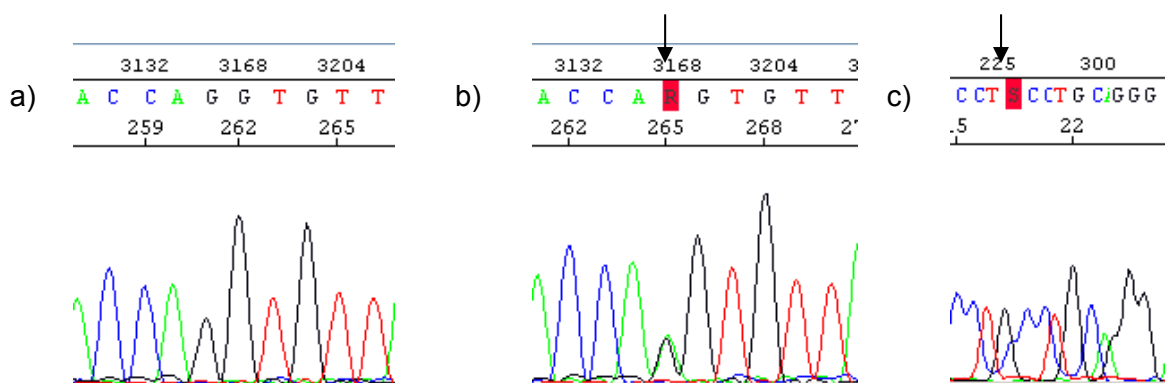


Abb. 9: a) Wildtyp-Sequenz b) Variante: c.*33G>A heterozygot c) Variante: c.1425-8G>C heterozygot

3.1.3.7 Übersichtstabelle

Tabelle 16: Sequenzvariationen des *EAAT1*-Gens

<i>EAAT1</i>	Wildtyp	Variante	Frequenz Wildtyp	Frequenz Variante	Polymorphismus
Exon 6	221 Allele	1 Allel c.657G>C, p.E219D	0,9955	0,0045	rs2032892
Intron 2	193 Allele	29 Allele c.181+28_181+29 insA	0,8694	0,1306	rs3216728
Intron 3	221 Allele	1 Allel c.319+37_319+38 insT	0,9955	0,0045	nicht bekannt
Intron 8	203 Allele	19 Allele c.1290-46G>C	0,9144	0,0856	rs56256473
Intron 9	221 Allele	1 Allel c.1425-8G>C	0,9955	0,0045	nicht bekannt
3'-UTR	182 Allele	40 Allele c.*33G>A	0,8198	0,1802	rs2229894

3.1.4 Ergebnis der RNA-Analyse

3.1.4.1 Ergebnis der RT-PCR

Die RNA der Probe 9753, bei der in der SSCP-Analyse eine Auffälligkeit in Exon 10 (c.1425-8G>C) gefunden wurde (s. Abb. 5, S. 40) und eine Kontroll-RNA konnten mit den Primern Ex8c-f und Ex10c-r in der RT-PCR amplifiziert werden (Bedingungen s. Kapitel 2.2.4 „RT-PCR“; s. Tabelle 11, S. 28). In der Agarose-Gelelektrophorese zeigten sich jeweils zwei Banden, die einmal 375 bp und einmal 240 bp entsprechen (s. Abb. 10).

Die RT-PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert.

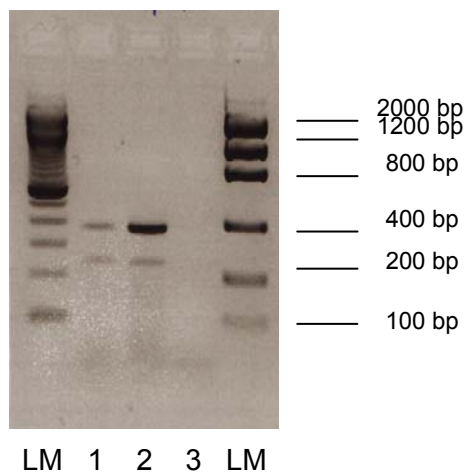


Abb. 10: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR der Probe Nr. 9753

LM= Längenstandard, 1= RT-PCR-Produkt der Probe Nr. 9753, 2= RT-PCR-Produkt der Kontrolle, 3= Leerwert

3.1.4.2 Ergebnis der Sequenzierung

Die Sequenz der RT-PCR-Produkte ließ sich für Exon 3 und Exon 4 sowohl in Vorwärts- als auch in Rückwärtsrichtung gut darstellen.

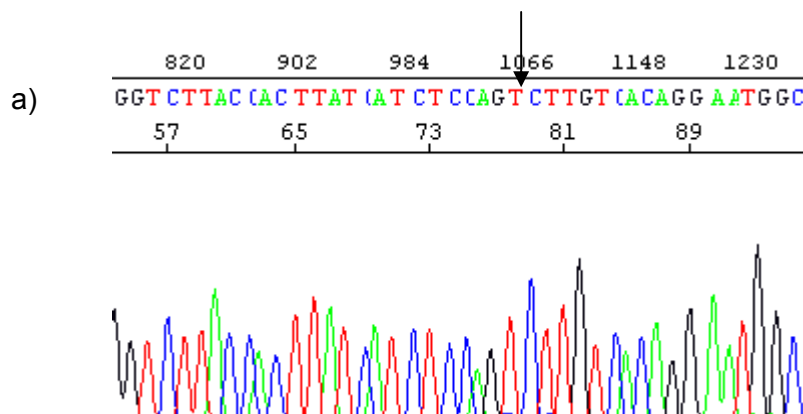


Abb. 11: a) Ausschnitt der Sequenz des RT-PCR-Produktes. → = Übergang von Exon 3 zu Exon 4.

Die Sequenzierung der RT-PCR-Produkte aus Patienten-Probe 9753, bei der sich in der SSCP-Analyse eine Auffälligkeit in Exon 10 (c.1425-8G>C) gezeigt hatte, und der RNA-Probe einer Kontrolle lieferte im Bereich zwischen Exon 8 bis Exon 10 einen Hinweis auf 2 unterschiedliche Transkripte. Das längere Transkript enthält die Exone 8, 9 und 10, das kürzere lediglich Exon 8 und Exon 10.

3.2 Mutationssuche im *EAAT4*-Gen

3.2.1 Vorgehensweise

Es wurden für 99 DNA-Proben von Personen mit dominant vererbten Ataxien die kodierenden Exons 1 bis 9 des *EAAT4*-Gens mittels PCR amplifiziert (s. Kapitel 2.2.3 „Polymerase-Kettenreaktion“). Anschließend wurde der Erfolg jeder PCR stichprobenartig anhand von 12 Proben durch Agarose-Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.2.5 „Agarose-Gelelektrophorese“) kontrolliert. Bei erfolgreicher PCR wurde daraufhin eine SSCP-Analyse mit anschließender Silberfärbung (s. Kapitel 2.2.6 „SSCP-Analyse“) durchgeführt. Für diese Analyse wurden Polyacrylamid-Gele genutzt, denen Harnstoff zugesetzt war. Anschließend wurde bei den in der SSCP-Analyse auffälligen Proben die Nukleotid-Sequenz bestimmt (s. Kapitel 2.2.7 „DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode“) und mit der Wildtyp-Sequenz aus der Datenbank Ensembl, Zugangsnummer ENSG00000105143 (release 54 - May 2009), verglichen.

3.2.2 Ergebnisse der SSCP-Analysen des *EAAT4*-Gens

3.2.2.1 Exon 1

Für Exon 1 zeigten sich in der SSCP-Analyse mehrere (mindestens 5) unterschiedliche Bandenmuster. Die Komplexität der Bandenmuster in der SSCP-Analyse erlaubte keine genaue Zuordnung. Exemplarisch wurden 74 Proben anhand der Bandenmuster M1 bis M4 ausgezählt. Das Bandenmuster M1 zeigte sich bei 28 Proben, das Muster M2 bei 24 Proben und 15 Proben wiesen das Bandenmuster M3 auf. Bei 7 Proben fand sich das Muster M4. Des Weiteren zeigte Probe 12787 als einzige ein weiteres auffälliges Bandenmuster, M5. Die restlichen Bandenmuster wurden unter „komplexe Banden“ zusammengefasst (24 Proben) (s. Abb. 12).

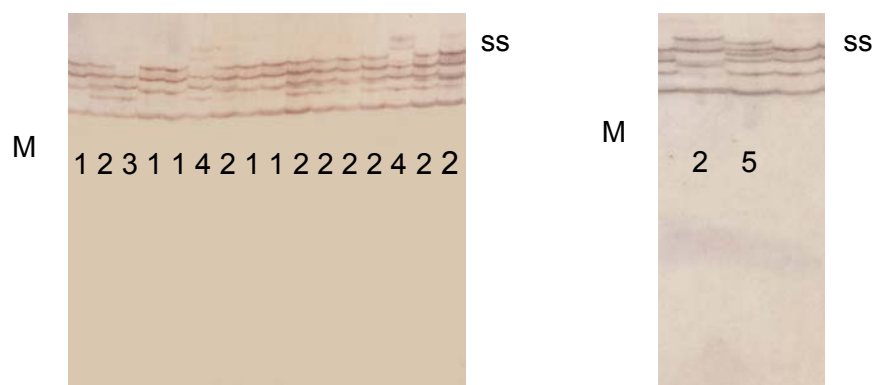


Abb. 12: Ausschnitte aus SSCP-Gelen für Exon 1

M1 - M5 = unterscheidbare Laufmuster

3.2.2.2 Exon 2 bis Exon 6

In der SSCP-Analyse der Exons 2 bis 6 wiesen alle 99 Proben das gleiche Bandenmuster auf.

3.2.2.3 Exon 7

Für Exon 7 konnten in der SSCP-Analyse 3 unterschiedliche Bandenmuster entdeckt werden. 57 von den 99 Proben zeigten die Einzelstränge als zwei Banden (M1), 27 Proben zeigten nur eine Bande unten (M2), 12 Proben zeigten die Einzelsträngen als eine Bande oben (M3) (s. Abb. 13).



Abb. 13: Ausschnitt aus einem SSCP-Gel für Exon 7

M1 - M3 = unterscheidbare Laufmuster

3.2.2.4 Exon 8

Für Exon 8 konnten in der SSCP-Analyse 16 auffällige Proben mit verändertem Bandenmuster (M2) bezogen auf die Wildtyp-Sequenz (M1) entdeckt werden. Die auffälligen Proben zeigen im ds-DNA-Bereich eine Veränderung im Sinne einer Doppelbande (s. Abb. 14).



Abb. 14: Ausschnitt aus SSCP-Gel für Exon 8
M1 - M2 = unterscheidbare Laufmuster

3.2.2.5 Exon 9

Für Exon 9 konnten in der SSCP-Analyse im Wesentlichen zwei Muster unterschieden werden: M1 in 53 Proben und M2 in 43 Proben. Bei dem Muster M1 zeigte sich im Bereich der Einzelstränge eine einzelne Bande, bei M2 fanden sich im Bereich der Einzelstränge zwei Banden. In 3 Proben zeigte sich im Bereich der Einzelstränge eine Bande unten (M3) (s. Abb. 15).



Abb. 15: Ausschnitt aus SSCP-Gel für Exon 9

M1 - M3 = unterscheidbare Laufmuster

3.2.3 Ergebnisse der Sequenzierung des *EAAT4*-Gens

Die Auswahl der zu sequenzierenden Proben entsprach den in Kapitel 3.1.3 „Ergebnisse der Sequenzierung des *EAAT1*-Gens“ beschriebenen Kriterien.

Somit wurden insgesamt 57 Proben für einzelne Exons des *EAAT4*-Gens sequenziert.

Die ermittelten Daten wurde mit der Referenz-Sequenz aus der Datenbank Ensembl; Zugangsnummer ENSG00000105143, verglichen.

Die identifizierten Veränderungen sind nachfolgend für die einzelnen Exons dargestellt und in einer Übersichtstabelle (s. Tabelle 17, S. 57) zusammengefasst.

3.2.3.1 Exon 1

Die Sequenz von Exon 1 wurde für insgesamt 13 Proben bestimmt. Dabei zeigten sich zwei unterschiedliche DNA-Variationen, von denen eine im Exon-Bereich (c.30G>T; p.L10L) (Polymorphismus rs3746295) und die andere im Intron-Bereich (c.205+33A>G, Polymorphismus rs3746294) liegt (s. Abb. 16). Der Austausch von Guanin gegen Thymin an Position 30 wirkt sich nicht auf die Aminosäurenabfolge im Protein aus.

Die Proben 7372 und 14499 mit dem Bandenmuster M1 wiesen für beide Variationen den Wildtyp (30G/G; +33A/A) auf. Für das Bandenmuster M2 wurden die Proben 8873, 7716 und 14360 sequenziert. Diese sind für die Variation im Exon-Bereich heterozygot. Im Intron-Bereich zeigten sie den Wildtyp (30G/T; +33A/A). Das Bandenmuster M3 zeigte sich bei den Proben 8934, 12628 und 14178. Diese sind für die Veränderung im Exon-Bereich homozygot. Für die Variation im Intron-Bereich ist die Probe 14178 heterozygot (30T/T; +33A/G). Die Proben 8934 und 12628 zeigten die Wildtyp-Sequenz (30T/T; +33A/A). Für das Bandenmuster M4 wurden die Proben 14756 und 14755 sequenziert. Diese sind für die Variation im Exon-Bereich homozygot. Bei der Variation im Intron-Bereich konnte nicht eindeutig bestimmt werden, ob sie für die Veränderung homozygot oder heterozygot sind. Die Proben 12805 und 9009 konnten auf dem SSCP-Gel keinem der bisher genannten Bandenmuster M1 bis M5 zugeordnet werden. Die Probe 12805 ist homozygot für die Variation im Exon-Bereich (30T/T).

Es konnte aber nicht eindeutig festgestellt werden, ob sie für die Veränderung im Intron-Bereich homozygot oder heterozygot ist, da die Auswertung der Sequenz in diesem Bereich nicht möglich war. Bei Probe 9009 konnte die Sequenz für beide Veränderungen nicht eindeutig ausgewertet werden, so dass nicht festzustellen war, ob die Probe homozygot oder heterozygot für die Variationen ist. Probe 12787 mit dem Bandenmuster M5 zeigte die Veränderung im Exon-Bereich homozygot, im Intron-Bereich ließ sich der Wildtyp feststellen (30T/T; +33A/A). Zusätzlich zeigte diese Probe eine weitere heterozygote Veränderung im Exon-Bereich (c.73C>T; p.R25W) (s. Abb. 16). Dieser Austausch von Cytosin gegen Thymin im Exon-Bereich wirkt sich auf die Aminosäureabfolge im Protein aus. Daraufhin wurden 10 Proben von Familienangehörigen zu Probe 12787 sequenziert. Von diesen 10 Familienmitgliedern sind drei Personen ebenfalls erkrankt. Keine der Proben zeigt die Veränderung im Exon-Bereich (c.73C>T; p.R25W) mit Aminosäureaustausch.

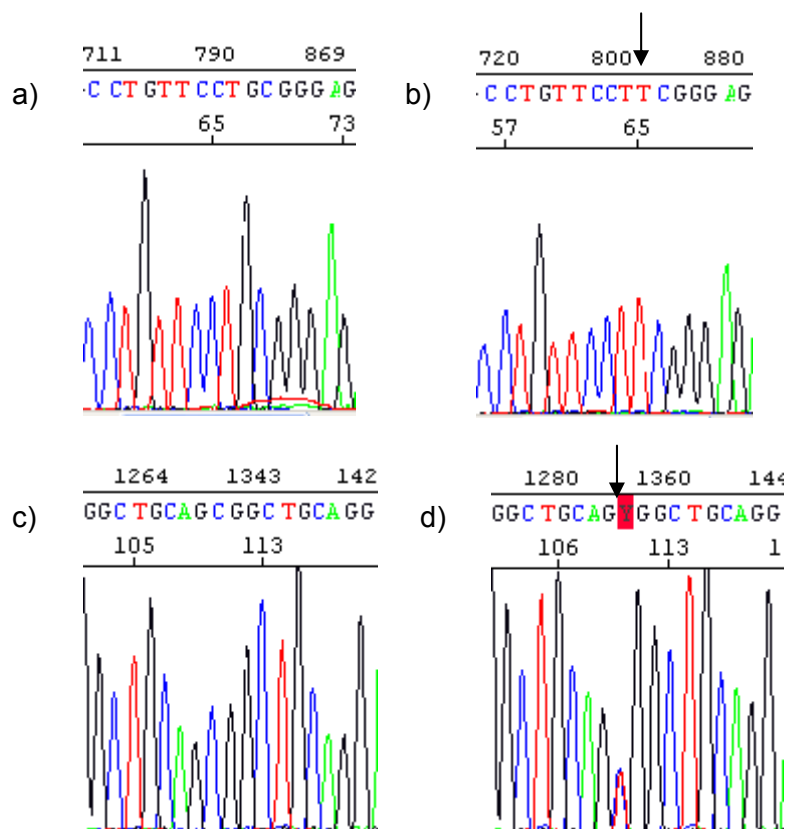


Abb. 16: a) Wildtyp-Sequenz c.30G/G b) Variation: c.30G>T homozygot
 c) Wildtyp-Sequenz c.73C/C d) Variation: c.73C>T heterozygot

3.2.3.2 Exon 2, Exon 4, Exon 5 und Exon 6

In der SSCP-Analyse der Exons 2, 4, 5 und 6 zeigten alle 99 Proben das gleiche Bandenmuster. Die zwei zufällig ausgewählten und sequenzierten Proben (Exon 2: 14178 und 14978, Exon 4: 13626 und 14915, Exon 5: 11141 und 10365, Exon 6: 2952 und 14756) stimmten mit der Referenz-Sequenz überein.

3.2.3.3 Exon 3

In der SSCP-Analyse zeigten alle 99 Proben das gleiche Bandenmuster. Bei der Sequenzierung von 3 Proben (16213, D237/07 und D294/07) fielen unterschiedliche Sequenzen in Form einer DNA-Veränderung im Intron-Bereich (c.548+11C>T) auf. Deshalb wurden noch weitere Proben untersucht, so dass insgesamt 11 Proben sequenziert wurden. Die Proben 9018, 9902, 11115, 14558, 15686, 16213 und D294/07 zeigten die Wildtyp-Sequenz. Die Proben 8176, 11014, 16578 und D237/07 waren für die o.g. DNA-Veränderung heterozygot (Polymorphismus rs11668879) (s. Abb. 17).

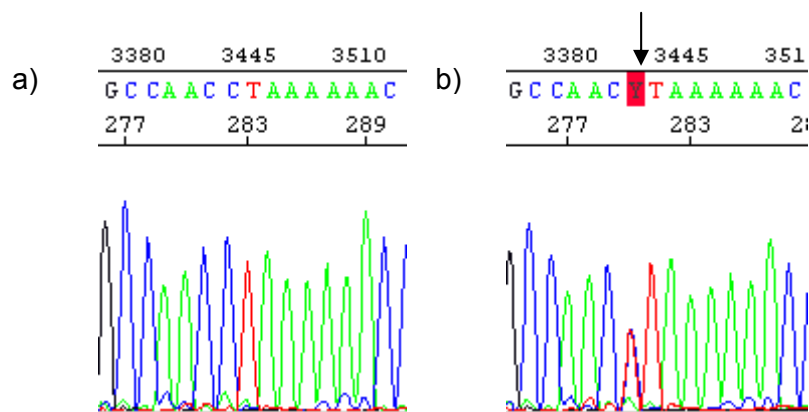


Abb. 17: a) Wildtyp-Sequenz b) Variante: c.548+11C>T heterozygot

3.2.3.4 Exon 7

Die SSCP-Analyse für Exon 7 zeigte 3 verschiedene Bandenmuster (Abb. 13, S. 49). Von jedem Muster wurden zwei Proben sequenziert. Die Proben 15201 und 15532 zeigten das Bandenmuster M1, die Proben 15535 und 15686 das Muster M2 und die Proben 15484 und 15544 das Bandenmuster M3. Bei der Sequenz fanden sich zwei unterschiedliche DNA-Variationen im Intron-Bereich: c.1170-28A>G (Polymorphismus rs757465) und c.1170-30C>A (Polymorphismus rs2269914). Probe 15201 zeigte für c.1170-28A>G den Wildtyp (-28A/A). Die Proben 15535, 15686 und 15544 zeigten die Variation homozygot (-28G/G), die Proben 15484 und 15532 waren für diese Variation heterozygot (-28A/G).

Für c.1170-30C>A zeigten die Proben 15201, 15484, 15535 und 15686 die Wildtyp-Sequenz. Probe 15544 ist homozygot für diese Variation (-30A/A). Probe 15532 ist für diese Variation heterozygot (-30C/A). Daraus folgt, dass sich aus dem Bandenmuster keine Rückschlüsse auf die vorliegende Sequenz ziehen lassen, da sich die zwei Variationen in der SSCP-Analyse teilweise gegenseitig aufheben.

3.2.3.5 Exon 8

In der SSCP-Analyse für Exon 8 zeigten sich zwei verschiedene Bandenmuster (Abb. 14, S. 50). Es wurden insgesamt vier Proben sequenziert. Die Proben 9139 und 15686 mit dem Bandenmuster M1 zeigten die Wildtyp-Sequenz. Die zwei Proben mit dem Bandenmuster M2 (Probe 15657 und 16388) zeigten eine heterozygote DNA-Variation im Exon-Bereich (c.1482T>C; p.I494I). Der Austausch von Thymin gegen Cytosin wirkt sich nicht auf die Aminosäureabfolge im Protein aus (Polymorphismus rs2229896).

3.2.3.6 Exon 9

Die SSCP-Analyse des Exons 9 zeigte drei verschiedene Bandenmuster (Abb. 15, S. 51). Es wurden insgesamt fünf Proben sequenziert. Zwei Proben (8955 und 16199) mit dem Bandenmuster M1 zeigten die Wildtyp-Sequenz. Eine Probe (8934) mit dem Bandenmuster M3 zeigte eine homozygote DNA-Variation im 3'-UTR-Bereich (c.*23delC, Polymorphismus rs5827264). Die gleiche DNA-Variation im 3'-UTR-Bereich zeigten zwei Proben (8875 und 16523) mit dem Bandenmuster M2. Allerdings war diese DNA-Variation bei diesen zwei Proben heterozygot.

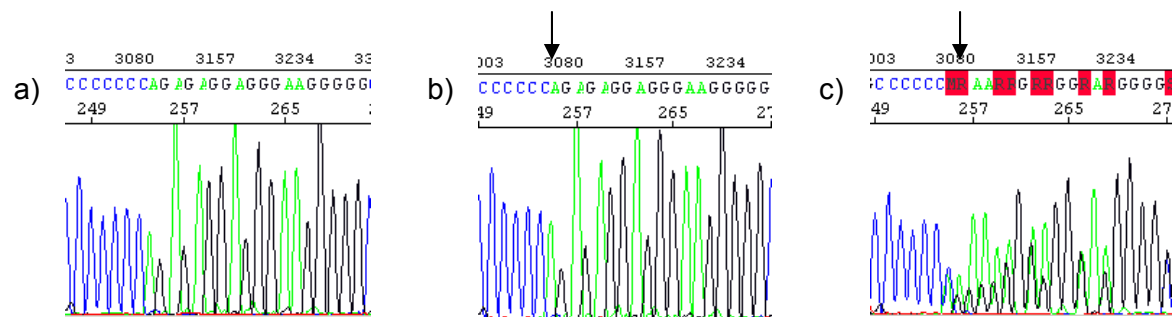


Abb.18: a) Wildtyp-Sequenz b) Variante: c.*23delC homozygot c) Variante: c.*23delC heterozygot

3.2.3.7 Übersichtstabelle

Tabelle 17: Sequenzvariationen des *EAAT4*-Gens

<i>EAAT4</i>	Wildtyp Allele	Variante	Frequenz Wildtyp	Frequenz Variante	Polymorphismus
Exon 1	80 Allele	70 Allele c.30G>T; p.L10L	0,5333	0,4666	rs3746295
	197 Allele	1 Allel c.73C>T; p.R25W	0,9949	0,005	nicht bekannt
Exon 8	182 Allele	16 Allele c.1482T>C; p.I494I	0,9192	0,0808	rs2229896
Intron 1	*	c.205+33A>G	*	*	rs3746294
Intron 3	*	c.548+11C>T	*	*	rs11668879
Intron 6	*	c.1170-28A>G	*	*	rs757465
		c.1170-30C>A			rs2269914
3'-UTR	149 Allele	49 Allele c.*23delC	0,7525	0,2475	rs5827264

* = anhand der SSCP-Analyse nicht auszählbar, die Frequenz konnte nicht bestimmt werden

3.2.4 Ergebnis der RNA-Analyse

3.2.4.1 Ergebnis der RT-PCR

Bei der RT-PCR konnten mit den in Kapitel 2.2.4 „RT-PCR“ (s. Tabelle 12, S. 28) genannten verschiedenen Primer-Kombinationen und Bedingungen keine Produkte amplifiziert werden.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Mutationen im *EAAT1*-Gen (*SLC1A3*) oder im *EAAT4*-Gen (*SLC1A6*) vorliegen, die verantwortlich für eine Episodische Ataxie (EA) oder für eine Spinocerebelläre Ataxie (SCA) sein könnten. Hierzu wurden mittels PCR die kodierenden Exons des *EAAT1*- und *EAAT4*-Gens amplifiziert. Danach wurde eine SSCP-Analyse dieser Proben durchgeführt und anschließend die Proben, die ein auffälliges Muster zeigten, sequenziert und interpretiert. Dabei sollte auch zwischen Mutationen und Polymorphismen unterschieden werden.

Mutationen beeinflussen oft die Struktur und die Funktion des Genprodukts. Die Folgen können mehr oder weniger schwerwiegend sein. So kann schon der Austausch einer einzigen Aminosäure schwere Folgen haben. Da die Seitenkette einer Aminosäure ihre chemischen Eigenschaften bestimmt, hat sie erheblichen Einfluss auf das Protein, dessen Tertiärstruktur vor allem auf der spezifischen Interaktion der Seitenketten beruht. Wenn sich nun z.B. bei einer Missense-Mutation (Punktmutation) die neue Aminosäure von der ursprünglichen Aminosäure im Aufbau ihrer Seitenkette unterscheidet, kann das beispielsweise eine komplette Neuorientierung der Proteinabschnitte zueinander zur Folge haben. Die komplette Verschiebung des Leserasters eines Gens, zu der es häufig bei Deletionen und Insertionen kommt, hat meist noch massivere Strukturveränderungen des Proteins zur Folge.

Der Begriff Mutation steht für seltene Sequenzveränderungen mit einer Häufigkeit <1%, bei denen eine Krankheitsrelevanz („disease-causing change“) erwartet wird (18). Ein Polymorphismus hingegen ist durch das Vorhandensein von zwei oder mehr Varianten gekennzeichnet, die in einer Population mit signifikanter Häufigkeit auftreten und nicht krankheitsursächlich sind („non disease-causing change“) (18). In der Molekulargenetik sind damit Sequenzvarianten gemeint, die mit einer Häufigkeit von >1% auftreten. Die häufigste Sequenzvariation ist der Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP). Dabei ist lediglich eine einzige Base oder ein Basenpaar des Genoms verändert. Die SNPs können in kodierenden und in nicht-kodierenden Gen-Abschnitten liegen. Viele

SNPs haben keinen Einfluss auf das Protein bzw. die Zellfunktion, aber es wird angenommen, dass manche zu gewissen Krankheiten prädisponieren, so dass sie immer mehr in das Interesse der Wissenschaftler gerückt sind. Mittlerweile sind SNPs bekannt, die beispielsweise mit dem Auftreten von Myokardinfarkten assoziiert sind (39).

In dieser Arbeit sind sowohl Punktmutationen, Insertionen und kleine Deletionen gefunden worden.

4.1 Suche nach Mutationen im *EAAT1*-Gen

Bei der molekulargenetischen Untersuchung des Kollektivs von 98 Patienten mit dominant vererbten Ataxien und 13 Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Episodische Ataxie bestand, konnten vier bereits publizierte Polymorphismen und zwei heterozygote Veränderungen in nicht-kodierenden Regionen nachgewiesen werden.

Schematisch ist in Abb. 19 das *EAAT1*-Gen mit den hier gefundenen Sequenzvarianten dargestellt.

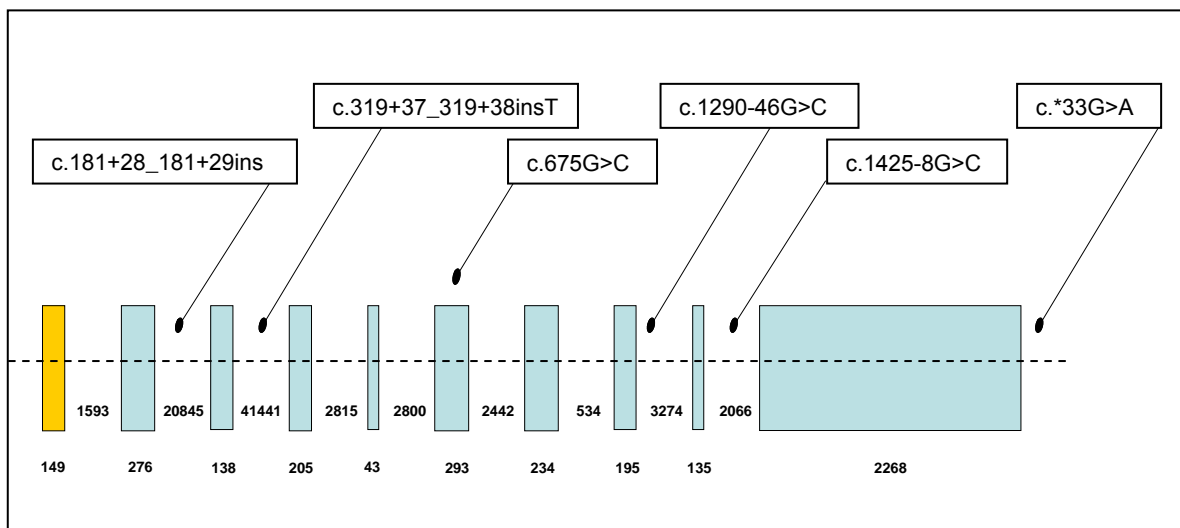


Abb. 19: Schematische Darstellung des *EAAT1*-Gens. Die Zahlen unter den Exons und Introns geben ihre Länge an. Die Positionen der DNA-Varianten sind markiert durch ●. = kodierende Exons, = nicht-kodierende Exons.

Die theoretische Verteilung der verschiedenen Allel-Kombinationen wurde mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes, das ein stabiles Verhältnis der Allel-Häufigkeiten innerhalb einer Population postuliert, berechnet und mit der tatsächlichen Häufigkeit verglichen.

Hardy-Weinberg-Gesetz: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

p = Häufigkeit des Wildtyp-Allels (wt)

q = Häufigkeit des veränderten Allels (mut)

Dabei wurde es als gute Übereinstimmung gewertet, wenn die tatsächlichen Ergebnisse eine Abweichung von <5% zu den theoretischen Ergebnissen zeigten.

4.1.1 Polymorphismus c.675G>C

Der Polymorphismus c.675G>C (p.E219D) kommt in der europäischen Bevölkerung mit einer Frequenz von 98,3% für das Wildtyp-Allel G und 1,7% für das veränderte Allel C vor (refSNP ID: rs2032892 in der NCBI-Datenbank). Dieser Polymorphismus konnte in einer der 111 Patientenproben nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich für die in dieser Arbeit erhobenen Daten eine Allel-Frequenz von 99,55% für G und 0,45% für C. Dieser Austausch von Guanin zu Cytosin wirkt sich auf die Aminosäureabfolge im Protein aus. Das betroffene Triplet kodiert anstelle für Glutaminsäure nun für Asparaginsäure.

Gesamtzahl der Proben = 111

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 110

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 1

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 0

Berechnung der Allel-Häufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $111 \cdot 2 = 222$

$p(\text{wt}) = (110 \cdot 2 + 1) \div 222 = 221 \div 222 = 0,9955 = 99,55\%$

$q(\text{mut}) = (0 \cdot 2 + 1) \div 222 = 1 \div 222 = 0,0045 = 0,45\%$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

theoretische Anzahl von wt/wt = $p^2 \cdot 111 = 0,9955^2 \cdot 111 = 110$

theoretische Anzahl von wt/mut = $2pq \cdot 111 = 2 \cdot 0,9955 \cdot 0,0045 \cdot 111 = 1$

Theoretisches Ergebnis und tatsächliches Ergebnis stimmen sehr gut überein.

4.1.2 Polymorphismus c.181+28_181+29insA

Die Veränderung c.181+28_181+29insA hat keinen Aminosäure-Austausch zur Folge, da sie in Intron 2 des *EAAT1*-Gens liegt. Sie konnte in insgesamt 24 der 111 Proben gefunden werden. Bei 19 Patienten lag die Veränderung heterozygot vor, bei 5 Patienten konnte sie homozygot nachgewiesen werden. Hieraus folgt eine Allel-Frequenz für das kleine hier untersuchte Kollektiv von 86,94% für den Wildtyp und 13,06% für die Variante. Über die Verteilung der Allele für diesen Polymorphismus in der europäischen Bevölkerung liegen keine Daten vor (refSNP ID: rs3216728 in der NCBI-Datenbank).

Gesamtzahl der Proben = 111

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 87

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 19

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 5

Berechnung der Allel-Häufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $111 \cdot 2 = 222$

$p(\text{wt}) = (87 \cdot 2 + 19) \div 222 = 193 \div 222 = 0,8694 = 86,94\%$

$q(\text{mut}) = (5 \cdot 2 + 19) \div 222 = 29 \div 222 = 0,1306 = 13,06\%$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

$$\text{theoretische Anzahl von wt/wt} = p^2 \cdot 111 = 0,8694^2 \cdot 111 = 84$$

$$\text{theoretische Anzahl von wt/mut} = 2pq \cdot 111 = 2 \cdot 0,8694 \cdot 0,1306 \cdot 111 = 25$$

$$\text{theoretische Anzahl von mut/mut} = q^2 \cdot 111 = 2$$

Theoretisches Ergebnis und tatsächliches Ergebnis stimmen gut überein.

4.1.3 Polymorphismus c.1290-46G>C

Der Polymorphismus c.1290-46G>C konnte in 19 von insgesamt 111 Proben heterozygot identifiziert werden. Daraus ergibt sich eine Frequenz von 91,44% für das Wildtyp-Allel G und 8,56% für das veränderte Allel C für die in dieser Arbeit erhobenen Daten. Über die Verteilung der Allele in der europäischen Bevölkerung liegen noch keine Daten vor (refSNP ID: rs56256473 in der NCBI-Datenbank).

Dieser zuvor beschriebene Nukleotid-Austausch im Intron-Bereich hat scheinbar keine Auswirkungen auf die Aminosäuren-Sequenz des Proteins.

Gesamtzahl der Proben = 111

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 92

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 19

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 0

Berechnung der Allel-Häufigkeiten:

$$\text{Gesamtzahl der Allele} = 111 \cdot 2 = 222$$

$$p(\text{wt}) = (92 \cdot 2 + 19) \div 222 = 203 \div 222 = 0,9144 = 91,44\%$$

$$q(\text{mut}) = (0 \cdot 2 + 19) \div 222 = 19 \div 222 = 0,0856 = 8,56\%$$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

$$\text{theoretische Anzahl von wt/wt} = p^2 \cdot 111 = 0,9144^2 \cdot 111 = 93$$

$$\text{theoretische Anzahl von wt/mut} = 2pq \cdot 111 = 2 \cdot 0,9144 \cdot 0,0856 \cdot 111 = 18$$

Theoretisches Ergebnis und tatsächliches Ergebnis stimmen sehr gut überein.

4.1.4 Polymorphismus c.*33G>A

Bereits bekannt war auch der Polymorphismus c.*33G>A im 3'-UTR-Bereich, der in 40 Proben heterozygot gefunden werden konnte. Daraus ergibt sich eine Frequenz für das Wildtyp-Allel G von 81,98% und eine Allel-Frequenz der Variante A von 18,02%. Die Verteilung in der europäischen Bevölkerung für diesen Polymorphismus liegt bei 85,7% für das Wildtyp-Allele und bei 14,3% für das veränderte Allel (refSNP ID: rs2229894 in der NCBI-Datenbank). Diese Veränderung liegt im 3'-UTR-Bereich des *EAAT1*-Gens und hat somit scheinbar keinen Einfluss auf das Protein.

Gesamtzahl der Proben = 111

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 71

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 40

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 0

Berechnung der Allel-Häufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $111 \cdot 2 = 222$

$p(\text{wt}) = (71 \cdot 2 + 40) \div 222 = 182 \div 222 = 0,8198 = 81,98\%$

$q(\text{mut}) = (0 \cdot 2 + 40) \div 222 = 40 \div 222 = 0,1802 = 18,02\%$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

theoretische Anzahl von wt/wt = $p^2 \cdot 111 = 0,8198^2 \cdot 111 = 75$

theoretische Anzahl von wt/mut = $2pq \cdot 111 = 2 \cdot 0,8198 \cdot 0,1802 \cdot 111 = 33$

theoretische Anzahl von mut/mut = $q^2 \cdot 111 = 0,1802^2 \cdot 111 = 3$

Theoretisches Ergebnis und tatsächliches Ergebnis stimmen überein.

4.1.5 Sequenzvariante c.319+37_319+38insT

Die Sequenzvariante c.319+37_319+38insT, die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, liegt in Intron 3 des *EAAT1*-Gens und wurde in dieser Arbeit bei einem Patienten gefunden. Daraus ergibt sich für die hier erhobenen Daten eine Allel-Frequenz von 99,55% für den Wildtyp und von 0,45% für die Variante (insT). Diese Variation liegt in einem Poly-T-Strech im Intron-Bereich und hat wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Aminosäuren-Sequenz.

Gesamtzahl der Proben = 111

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 110

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 1

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 0

Berechnung der Allel-Häufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $111 \cdot 2 = 222$

$p(\text{wt}) = (110 \cdot 2 + 1) \div 222 = 221 \div 222 = 0,9955 = 99,55\%$

$q(\text{mut}) = (0 \cdot 2 + 1) \div 222 = 1 \div 222 = 0,0045 = 0,45\%$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

theoretische Anzahl von wt/wt = $p^2 \cdot 111 = 0,9955^2 \cdot 111 = 110$

theoretische Anzahl von wt/mut = $2pq \cdot 111 = 2 \cdot 0,9955 \cdot 0,0045 \cdot 111 = 1$

Theoretisches Ergebnis und tatsächliches Ergebnis stimmen sehr gut überein.

4.1.6 Sequenzvariante c.1425-8G>C

Die zweite noch nicht bekannte Sequenzvariante c.1425-8G>C, liegt in Intron 9 des *EAAT1*-Gens. Diese heterozygote DNA-Variation konnte bei einem Patienten nachgewiesen werden. Für diese Variation ergibt sich für das hier untersuchte

Kollektiv eine Allel-Frequenz von 99,55% für den Wildtyp (G) und von 0,45% für die Variante (C).

Gesamtzahl der Proben = 111

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 110

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 1

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 0

Berechnung der Allel-Häufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $111 \cdot 2 = 222$

$p(\text{wt}) = (110 \cdot 2 + 1) \div 222 = 221 \div 222 = 0,9955 = 99,55\%$

$q(\text{mut}) = (0 \cdot 2 + 1) \div 222 = 1 \div 222 = 0,0045 = 0,45\%$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

theoretische Anzahl von wt/wt = $p^2 \cdot 111 = 0,9955^2 \cdot 111 = 110$

theoretische Anzahl von wt/mut = $2pq \cdot 111 = 2 \cdot 0,9955 \cdot 0,0045 \cdot 111 = 1$

Theoretisches Ergebnis und tatsächliches Ergebnis stimmen sehr gut überein.

Zur Abklärung, ob es sich bei dieser Variation um einen Polymorphismus oder um eine seltene DNA-Variante handelt, wurde bei 136 weiteren DNA-Proben von Kontrollpersonen eine SSCP-Analyse durchgeführt. Keine der Kontrollen zeigte die Sequenzvariation c.1425-8G>C. DNA-Proben von Familienmitgliedern standen für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

Um auszuschließen, dass diese Variation einen Einfluss auf das Spleißen hat, wurde zusätzlich eine RNA-Analyse durchgeführt. Bei dieser Analyse konnten im Vergleich zu einer Kontroll-RNA keine veränderten Transkripte nachgewiesen werden. In beiden Proben wurden jeweils zwei Transkripte amplifiziert (vgl. Kapitel 3.1.4 „Ergebnis der RNA-Analyse“). Daher wird eine Beeinflussung der Transkription bzw. des Spleißens durch diese Veränderung weitgehend ausgeschlossen. Diese Variante scheint als Krankheitsursache bei unserem Patienten nicht in Betracht zu kommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vier bekannte Polymorphismen und zwei Sequenzvarianten im *EAAT1*-Gen (*SCL1A3*-Gen) gefunden werden konnten. Jedoch konnte die publizierte heterozygote Neumutation c.1047C>G (p.P290R) im *EAAT1*-Gen, die bei einem zehn Jahre alten Junge, der an einer Episodischen Ataxie (EA6) erkrankt ist, gefunden und als Krankheitsursache identifiziert werden konnte (35), bei den hier untersuchten DNA-Proben nicht nachgewiesen werden. Dieser Austausch von Cytosin zu Guanin führt zu einem Arginin anstelle des Prolins an einer hoch konservierten Stelle innerhalb der fünften Transmembran-Domäne des Glutamattransporters EAAT1 (35).

Ebenso konnte die heterozygote Sequenzvariante c.556T>A (C186S), die bei drei Betroffenen einer EA6 gefunden wurde (15), bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten nicht identifiziert werden.

Das lässt darauf schließen, dass es sich bei diesen beiden Mutationen um „private Mutationen“ handelt und die EA6 für die deutsche Population von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. Zudem können die hier gefundenen Veränderungen für die untersuchten Patienten, die an einer SCA erkrankt sind, nicht als krankheitsursächlich gewertet werden.

4.2 Suche nach Mutationen im *EAAT4*-Gen

Für die Suche nach Mutationen im *EAAT4*-Gen wurden in dieser Arbeit 99 DNA-Proben von Patienten mit dominant vererbten Ataxien untersucht.

Hierbei konnten sieben bereits publizierte Polymorphismen und eine heterozygote Veränderung, die zu einem Aminosäure-Austausch führt, nachgewiesen werden.

In Abb. 20 ist das *EAAT4*-Gen schematisch mit den hier gefundenen Sequenzvarianten dargestellt.

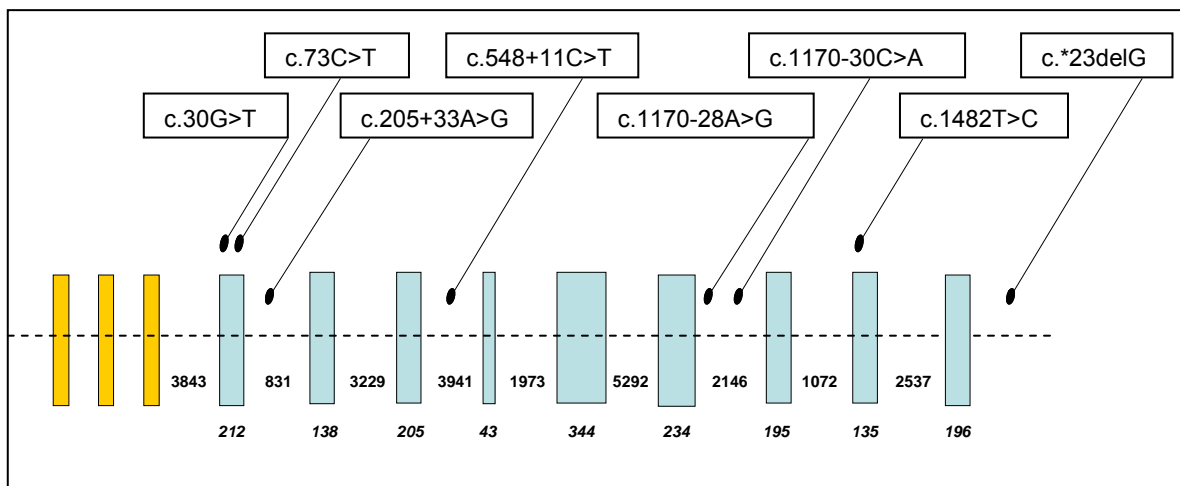


Abb. 20: Schematische Darstellung des *EAAT4*-Gens. Die Zahlen unter den Exons und Introns geben ihre Länge an. Die Positionen der DNA-Varianten sind markiert durch ●. = kodierende Exons, = nicht-kodierende Exons.

Die theoretische Verteilung der Allel-Kombinationen wurde mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz errechnet und mit den Verteilungen der vorliegenden Arbeit verglichen (s. Kapitel 4.1 „Suche nach Mutationen im *EAAT1*-Gen“).

4.2.1 Polymorphismus c.30G>T

Der bekannte Polymorphismus c.30G>T (p.L10L) konnte in dieser Arbeit sowohl als heterozygote als auch als homozygote Form gefunden werden. Seine Frequenz konnte jedoch nicht vollständig bestimmt werden, da die komplexen Bandenmuster auf dem SSCP-Gel nicht alle auswertbar waren. Exemplarisch wurden 75 Proben ausgezählt, bei denen die Zuordnung zu einem Muster eindeutig war. Die Frequenz des Wildtyp-Allels G entsprach dabei 53,33%, die des veränderten Allels T lag bei 46,67%.

Die Frequenz in der europäischen Bevölkerung liegt bei 55% für das T-Allel und bei 45% für das G-Allel (refSNP ID: rs3746295 in der NCBI-Datenbank). Der Austausch von Guanin zu Thymin an Position 30 in Exon 1 hat keine Veränderung auf Proteinebene zur Folge, da beide Tripletts (CTG und CTT) für Leucin (L10L) kodieren. Es handelt sich somit um eine „stille Mutation“ bzw. einen SNP.

Die Berechnung der Allel-Häufigkeiten und der theoretischen Verteilung wurde für 75 Proben durchgeführt. Eine dieser Proben zeigte in Exon 1 noch eine weitere Sequenzvariation: c.73 C>T (p.R25W) (s. Kapitel 4.2.7 „Sequenzvariation“).

Gesamtzahl der Proben = 75

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 28

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 24

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 23

Berechnung der Allel-Häufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $75 \cdot 2 = 150$

$p(\text{wt}) = (28 \cdot 2 + 24) \div 150 = 80 \div 150 = 0,5333 = 53,33\%$

$q(\text{mut}) = (23 \cdot 2 + 24) \div 150 = 70 \div 150 = 0,4667 = 46,67\%$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

theoretische Anzahl von wt/wt = $p^2 \cdot 75 = 0,5333^2 \cdot 75 = 22$

theoretische Anzahl von wt/mut = $2pq \cdot 75 = 2 \cdot 0,5333 \cdot 0,4667 \cdot 75 = 37$

theoretische Anzahl von mut/mut = $q^2 \cdot 75 = 0,4667^2 \cdot 75 = 16$

Das theoretische Ergebnis hat eine Abweichung von dem tatsächlichen Ergebnis von >5%. Das kann entweder von der untersuchten Population abhängig sein oder von der Größe der Stichprobe. Denn das Hardy-Weinberg-Gesetz setzt eine ideale Population voraus. Dies schließt gewisse Faktoren, die auf eine reale Population Einfluss haben, wie z. B. Mutation, Migration, Selektion und Gendrift, aus. Außerdem wird von einer völlig zufälligen Paarung ausgegangen, was in einer realen Population nicht der Fall ist.

4.2.2 Polymorphismus c.1482T>C

Der bekannte Polymorphismus c.1482T>C (p.I494I) kommt in der Bevölkerung mit einer Frequenz für das Wildtyp-Allel T von 83,3% und 16,7% für das veränderte Allel C vor (refSNP ID: rs2229896 in der NCBI-Datenbank). In dieser Arbeit konnte er bei 16 der 99 Patientenproben als heterozygote Variante gefunden werden. Dies entspricht einer Wildtyp-Allel-Frequenz von 91,92% und einer Frequenz für das veränderte Allel von 8,08%. Der Austausch von Thymin zu Cytosin hat keine Veränderung auf Proteinebene zur Folge, da sowohl das Wildtyp-Triplett (ATT) als auch das veränderte Triplett (ATC) für die Aminosäure Isoleucin kodieren („stille Mutation“ bzw. SNP).

Gesamtzahl der Proben = 99

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 83

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 16

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 0

Berechnung der Allel-Häufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $99 \cdot 2 = 198$

$p(\text{wt}) = (83 \cdot 2 + 16) \div 198 = 182 \div 198 = 0,9192 = 91,92\%$

$q(\text{mut}) = (0 \cdot 2 + 16) \div 198 = 16 \div 198 = 0,0808 = 8,08\%$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

$$\text{theoretische Anzahl von wt/wt} = p^2 \cdot 99 = 0,9192^2 \cdot 99 = 84$$

$$\text{theoretische Anzahl von wt/mut} = 2pq \cdot 99 = 2 \cdot 0,9192 \cdot 0,0808 \cdot 99 = 15$$

Theoretisches Ergebnis und tatsächliches Ergebnis stimmen sehr gut überein.

4.2.3 Polymorphismus c.205+33A>G

Der Polymorphismus c.205+33A>G konnte in seiner Frequenz anhand dieser Arbeit nicht bestimmt werden, da eine Auswertung der SSCP-Analyse aufgrund von komplexen Bandenmustern nicht möglich war. Über die Verteilung in der Bevölkerung liegen noch keine Daten vor (refSNP ID: rs3746294 in der NCBI-Datenbank). Die Berechnung der Allel-Häufigkeiten und eine Berechnung der theoretischen Verteilung waren nicht möglich.

4.2.4 Polymorphismus c.548+11C>T

Die Allel-Verteilung für den Polymorphismus c.548+11C>T liegt in der europäischen Bevölkerung bei 81,7% für das Wildtyp-Allel C und bei 18,3% für das veränderte Allel T (refSNP ID: rs11668879 in der NCBI-Datenbank). Eine Frequenz-bestimmung für das hier untersuchte Kollektiv war nicht möglich, da in der SSCP-Analyse alle Proben identisch aussahen. Die Berechnung der Allel-Häufigkeiten und eine Berechnung der theoretischen Verteilung konnte deshalb nicht durchgeführt werden.

4.2.5 Polymorphismen c.1170-28A>G und c.1170-30C>A

Die Frequenzen der bekannten Polymorphismen c.1170-28A>G und c.1170-30C>A konnten anhand meiner Daten für das Kollektiv nicht bestimmt werden, da sich die zwei Variationen in der SSCP-Analyse teilweise gegenseitig aufhoben und

das Bandenmuster somit keine Rückschlüsse auf die vorliegende Sequenz zuließ. Die Berechnung der Allel-Häufigkeiten und eine Berechnung der theoretischen Verteilung waren deshalb nicht möglich. Es liegen keine Daten über die Allel-Häufigkeiten in der europäischen Bevölkerung vor (refSNP ID: rs757465 und rs2269914 in der NCBI-Datenbank).

4.2.6 Polymorphismus c.*23delG

Der Polymorphismus c.*23delG im 3'-UTR-Bereich konnte in 46 der 99 Proben gefunden werden. Über die Verteilung der Allele für diesen Polymorphismus in der europäischen Bevölkerung liegen keine Angaben vor (refSNP ID: rs5827264 in der NCBI-Datenbank). In dieser Arbeit wiesen 43 Patienten den Genotyp C/delC auf, während die anderen drei Patienten den Genotyp delC/delC zeigten. Aus diesen Ergebnissen folgt eine Wildtyp-Allel-Frequenz für diesen Polymorphismus von 75,25%. Das veränderte Allel liegt mit einer Häufigkeit von 24,75% in dem hier untersuchten Kollektiv vor.

Gesamtzahl der Proben = 99

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 53

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 43

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 3

Berechnung der Allel-Häufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $99 \cdot 2 = 198$

$p(\text{wt}) = (53 \cdot 2 + 43) \div 198 = 149 \div 198 = 0,7525 = 75,25\%$

$q(\text{mut}) = (3 \cdot 2 + 43) \div 198 = 49 \div 198 = 0,2475 = 24,75\%$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

theoretische Anzahl von wt/wt = $p^2 \cdot 99 = 0,7525^2 \cdot 99 = 56$

theoretische Anzahl von wt/mut = $2pq \cdot 99 = 2 \cdot 0,7525 \cdot 0,2475 \cdot 99 = 37$

theoretische Anzahl von mut/mut = $q^2 \cdot 99 = 0,2475^2 \cdot 99 = 6$

Theoretisches Ergebnis und tatsächliches Ergebnis stimmen gut überein.

4.2.7 Sequenzvariante c.73 C>T

Die Sequenzvariante c.73C>T (p.R25W), die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, liegt in Exon 1 des *EAAT4*-Gens. Sie konnte bei einem Patienten identifiziert werden. Die Allel-Frequenz des Wildtyps (C) beträgt 99,5%, die Frequenz des veränderten Allels (T) beträgt 0,5% in dieser Arbeit. Dieser Austausch von Cytosin zu Thymin im kodierenden Exon-Bereich wirkt sich auf die Aminosäureabfolge im Protein aus. Das Triplett TGG kodiert nun Tryptophan anstelle von Arginin (Triplett CGG).

Gesamtzahl der Proben = 99

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 98

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 1

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 0

Berechnung der Allel-Häufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $99 \cdot 2 = 198$

$p(\text{wt}) = (98 \cdot 2 + 1) \div 198 = 197 \div 198 = 0,9949 = 99,49\%$

$q(\text{mut}) = (0 \cdot 2 + 1) \div 198 = 1 \div 198 = 0,005 = 0,5\%$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

theoretische Anzahl von wt/wt = $p^2 \cdot 99 = 0,9949^2 \cdot 99 = 98$

theoretische Anzahl von wt/mut = $2pq \cdot 99 = 2 \cdot 0,9949 \cdot 0,005 \cdot 99 = 1$

Theoretisches Ergebnis und tatsächliches Ergebnis stimmen sehr gut überein.

Die entsprechende Sequenzvariante R25W konnte in einer DNA-Probe nachgewiesen werden (Person 1; s. Abb. 21). In den daraufhin untersuchten 10 DNA-Proben von Familienangehörigen konnte die Sequenzvariante weder bei den drei ebenfalls an Ataxie erkrankten Personen (Personen 2-4; s. Abb. 21) noch bei

den sieben nicht-betroffenen Personen (Personen 5-11; s. Abb. 21) nachgewiesen werden.

Bei dieser Veränderung scheint es sich demnach um eine vom Vater vererbte Variante oder um eine Neumutation zu handeln. Leider stand keine DNA-Probe des Vaters für eine weiterführende Untersuchung zur Verfügung.

Die Resultate der Sequenzanalyse schließen die Sequenzvariation (c.73C>T) als Krankheitsursache weitgehend aus.

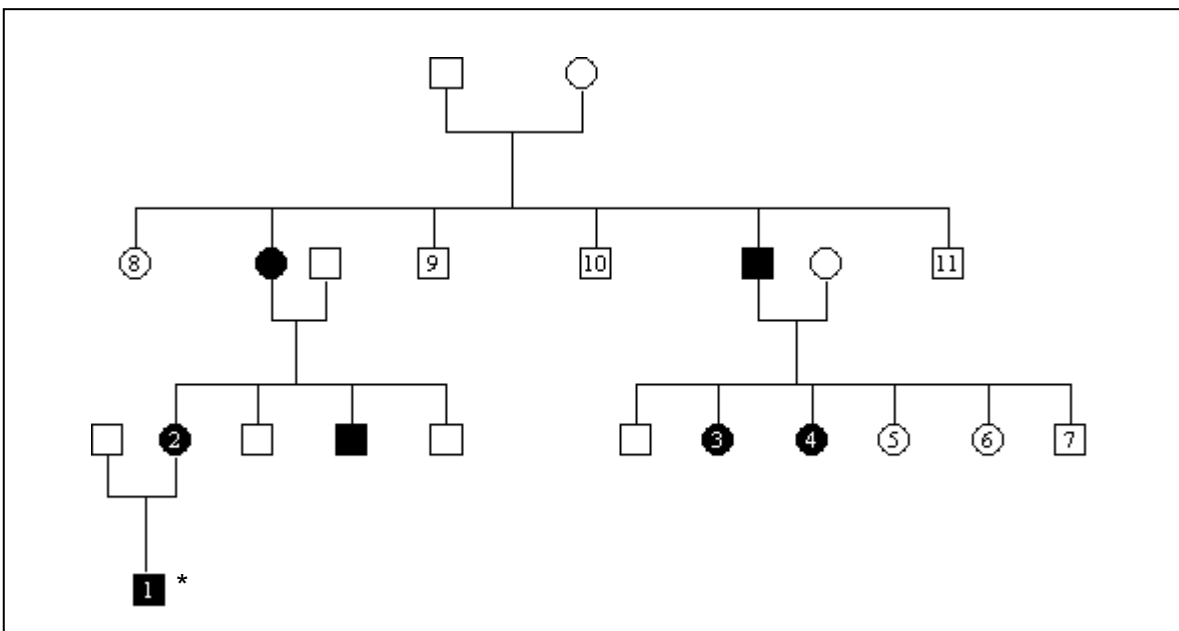


Abb. 21: Stammbaum der Familie des Patienten mit der Sequenzvariante c.73C>T im *EAAT4*-Gen. Kreise: weibliche Personen; Kästchen: männliche Personen; schwarz: betroffene Personen; weiß: nicht-betroffene Personen; Stern: Betroffener mit der Sequenzvariante c.73C>T; DNA-Proben der Personen 1-11 standen für diese Untersuchung zur Verfügung.

Des Weiteren zeigt der Vergleich der Aminosäure-Sequenz von Mensch, Hund, Pferd, Huhn, Maus und Ratte, dass die Aminosäure Arginin (R) an Position 25 nicht durchgehend konserviert ist (s. Abb. 22). Es wird angenommen, dass Veränderungen von Aminosäuren, die nicht streng konserviert sind eher von geringerer Bedeutung sind, wo hingegen Veränderungen von Aminosäuren, die

eine starke Konservierung zeigen, von großer Bedeutung für die Funktion des entstehenden Proteins sind.

<i>EAAT1_Homo_sapiens</i>	MTKS-----NGE EPK ---M GG RMER F Q Q G V R K R T LLAKKKV Q NIT KE	39
<i>EAAT4_Homo_sapiens</i>	MSSHG---NSLFL RES Q RL GR V GW L Q RI Q ES L Q Q R AL R TR L RL Q TM TLE	47
<i>EAAT4_Canis_familiaris</i>	MSSHG---NSLFL RES Q RL GR V GW L Q RI Q ES L Q Q R AL R TR L RL Q TM TRE	47
<i>EAAT4_Equus_caballus</i>	MSSHG---NSLFL RES Q RL GR A GW L Q RI Q ES L Q Q R AL R TR L RL Q TM TRE	47
<i>EAAT4_Gallus_gallus</i>	M SE Q SH V NS L FL N ED A AK R L H A E GR V Q R I R Q A V Q K R A A R A K K R M S S I T A D	50
<i>EAAT4_Mus_Musculus</i>	MSSHG---NSLFL RES G AGG ---G CL Q GL Q DS L Q Q R AL R TR L RL Q TM TRE	44
<i>EAAT4_Rattus_norvegicus</i>	MSSHG---NSLFL RES G AGG ---G CL Q GL Q DS L Q Q R AL R TR L RL Q TM TRE	44
	* : . : : : : : : : * : : : : : : : * : : : : : : * :	

Abb. 22: Konservierung der Aminosäure des *EAAT4*-Gens. Der Balken kennzeichnet die Position 25. Die Protein-Sequenzen wurden der Datenbank Ensembl entnommen (*EAAT1* Mensch ID: ENSP00000265113, *EAAT4* Mensch ID: ENSP00000221742, Hund ID: ENSBTAG00000013502, Pferd ID: ENSECAG00000018959, Huhn ID: ENSGALG00000000558, Maus ID: ENSMUSG00000005357, Ratte ID: ENSRNOG00000007509)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sieben bekannte Polymorphismen und eine Sequenzvarianten mit Aminosäuren-Austausch im *EAAT4*-Gen (*SCL1A6*-Gen) gefunden werden konnten. Die in dieser Arbeit gefundenen Veränderungen können für die untersuchten Patienten jedoch nicht als krankheitsursächlich gewertet werden.

4.3 SSCP-Analyse

Die SSCP-Analyse ist ein einfaches, schnelles und kostengünstiges Screening-Verfahren um Mutationen zunächst in einem Gen zu lokalisieren. Da schon kleinste Veränderungen der Nukleotid-Sequenz zu einem veränderten Laufverhalten in der Elektrophorese führen können, hat diese Methode eine hohe Sensitivität. So können mit ihrer Hilfe Punktmutationen, kleine Insertionen und Deletionen entdeckt werden (29). Unter optimalen Bedingungen können 80-90% der Nukleotid-Veränderungen mit dieser Methode identifiziert werden (64).

Die Sensitivität dieser Methode wird u.a. durch den pH-Wert, die Temperatur und die Länge des Gen-Segments beeinflusst (28).

In dieser Arbeit wurde die SSCP-Analyse bei insgesamt 18 Exons des *EAAT1*- und *EAAT4*-Gens mit ihren angrenzenden Intron-Bereichen durchgeführt. Das Ergebnis der SSCP-Analyse konnte bei 17 Exons durch die anschließende Sequenzierung bestätigt werden.

Nur in der Analyse eines Exons (Exon 3) des *EAAT4*-Gens, in dem sich ein Basen-Austausch (c.548+11C>T) befindet, zeigten alle Proben das gleiche Laufverhalten, obwohl in der anschließenden Sequenzierung der bekannte Polymorphismus identifiziert werden konnte. Die SSCP-Analyse besitzt auf die Daten dieser Arbeit bezogen eine Sensitivität von 94,44%

Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass möglicherweise nicht alle Sequenzvariationen unter den angewendeten Bedingungen entdeckt wurden (falsch Negative).

5. Zusammenfassung

Ataxien sind eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von Erkrankungen des Nervensystems, bei denen besonders das Kleinhirn (Cerebellum) betroffen ist. Dabei treten hauptsächlich motorische Probleme wie z.B. eine gestörte Koordination von Bewegungen auf.

Genetisch bedingte Ataxien, die durch cerebelläre Neurodegeneration verursacht werden, können eine Folge eines Transmitterüberflusses sein. Glutamat, der bedeutendste erregende Neurotransmitter des zentralen Nervensystems, wird durch spezielle Transporter (excitatory amino acid transporters (EAAT)) aus dem synaptischen Spalt entfernt. Diese Transporter spielen wegen ihrer schnellen und effizienten Arbeitsweise eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung des extrazellulären Glutamatspiegels unterhalb einer neurotoxischen Konzentration. Der Glutamattransporter EAAT1 wird hauptsächlich in den Gliazellen des caudalen Hirnstamms und im Kleinhirn exprimiert. EAAT4 hingegen ist ein Purkinjezell-spezifischer Glutamattransporter.

Da einerseits die EAAT4-Konzentration bei Patienten mit Spinocerebellärer Ataxie Typ 5 reduziert ist und andererseits Missense-Mutationen im *EAAT1*-Gen bei vier Patienten mit episodischer Ataxie beschrieben wurden, stellte sich die Frage, ob Patienten mit dominant vererbten Ataxien Mutationen in Glutamattransporter-Genen tragen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden mittels PCR die kodierenden Exons des *EAAT1*- und *EAAT4*-Gens amplifiziert und SSCP-Analysen für die Produkte durchgeführt. Anschließend wurden die Proben, die ein auffälliges Muster zeigten, sequenziert.

Bei der Analyse des *EAAT1*-Gens konnte ein Polymorphismus in Exon 6 sowie fünf Variationen innerhalb von Introns oder des 3'-UTR gefunden werden. Drei dieser fünf Veränderungen stellen einen Einzel-Nukleotid-Austausch dar, die anderen zwei Veränderungen zeigen eine Einzel-Nukleotid-Insertion. Zwei dieser fünf Variationen sind nicht in einer öffentlichen Datenbank beschrieben.

Durch Analyse des *EAAT4*-Gens konnte der Aminosäureaustausch p.R25W in der Probe eines Patienten gefunden werden. In der anschließenden Untersuchung

von Familienmitgliedern dieses Patienten, die teilweise ebenfalls erkrankt sind, konnte diese Mutation jedoch nicht identifiziert werden.

Es ist davon auszugehen, dass die Sequenzveränderung entweder von dem nicht-betroffenen Vater vererbt wurde oder dass es sich um eine Neumutation handelt. Der Missense-Austausch p.R25W kann nicht als krankheitsursächlich interpretiert werden, da die ebenfalls betroffene Mutter an dieser Gen-Position die Wildtyp-Sequenz trägt.

Zusätzlich konnten zwei häufige aber stille Variationen (in Exon 1 und Exon 8) gefunden werden. Die fünf Varianten innerhalb der Introns und des 3'-UTR, die alle häufig vorkamen (5% bis 25%), sind bereits in einer Datenbank beschrieben worden.

Von den aufgezeigten 6 Varianten im *EAAT1*-Gen und den 8 Variationen im *EAAT4*-Gen ist die Mehrzahl in nicht-kodierenden Regionen der untersuchten Gene gelegen. Das Ergebnis dieser Studie lässt darauf schließen, dass Mutationen in den Genen *EAAT1* und *EAAT4* keine häufige Ursache für dominant vererbte Ataxien in unserer Bevölkerung darstellen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Abele M, Minnerop M, Urbach H, Specht K, Klockgether T. Sporadic adult onset ataxia of unknown etiology: a clinical, electrophysiological and imaging study. *J Neurol.* 2007; **254**: 1384-1389.
- 2 Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*: WILEY-VCH Verlag 2001.
- 3 Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia.* 2000; **32**: 1-14.
- 4 Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat.* 1998; **11**: 1-3.
- 5 Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; **94**: 4155-4160.
- 6 Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci.* 1994; **14**: 5559-5569.
- 7 Barbour B, Brew H, Attwell D. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature.* 1988; **335**: 433-435.
- 8 Brandt T, Strupp M. Episodic ataxia type 1 and 2 (familial periodic ataxia/vertigo). *Audiol Neurootol.* 1997; **2**: 373-383.
- 9 Brunt ER, van Weerden TW. Familial paroxysmal kinesigenic ataxia and continuous myokymia. *Brain.* 1990; **113 (Pt 5)**: 1361-1382.
- 10 Brusse E, Maat-Kievit JA, van Swieten JC. Diagnosis and management of early- and late-onset cerebellar ataxia. *Clin Genet.* 2007; **71**: 12-24.

- 11 Chen DH, Brkanac Z, Verlinde CL, Tan XJ, Bylenok L, Nochlin D, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Fernandez M, Cimino PJ, Bird TD, Raskind WH. Missense mutations in the regulatory domain of PKC gamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet.* 2003; **72**: 839-849.
- 12 Danbolt NC. The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog Neurobiol.* 1994; **44**: 377-396.
- 13 Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001; **65**: 1-105.
- 14 Danbolt NC, Pines G, Kanner BI. Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain. *Biochemistry.* 1990; **29**: 6734-6740.
- 15 de Vries B, Mamsa H, Stam AH, Wan J, Bakker SL, Vanmolkot KR, Haan J, Terwindt GM, Boon EM, Howard BD, Frants RR, Baloh RW, Ferrari MD, Jen JC, van den Maagdenberg AM. Episodic ataxia associated with EAAT1 mutation C186S affecting glutamate reuptake. *Arch Neurol.* 2009; **66**: 97-101.
- 16 Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci.* 1998; **18**: 3606-3619.
- 17 den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.* 2000; **15**: 7-12.
- 18 den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 2001; **109**: 121-124.

- 19 Di Donato S, Gellera C, Mariotti C. The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias. II. Autosomal recessive ataxias. *Neurol Sci.* 2001; **22**: 219-228.
- 20 Diener H-Ch PN, Berlit P Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Vol. 4. überarbeitete Auflage 2008. Georg Thieme Verlag Stuttgart 2008; 654 ff.
- 21 Fairman WA, Amara SG. Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. *Am J Physiol.* 1999; **277**: F481-486.
- 22 Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 1995; **375**: 599-603.
- 23 Finsterer J. Central nervous system manifestations of mitochondrial disorders. *Acta Neurol Scand.* 2006; **114**: 217-238.
- 24 Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem.* 1984; **42**: 1-11.
- 25 Gilman S, Low P, Quinn N, Albanese A, Ben-Shlomo Y, Fowler C, Kaufmann H, Klockgether T, Lang A, Lantos P, Litvan I, Mathias C, Oliver E, Robertson D, Schatz I, Wenning G. Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. American Autonomic Society and American Academy of Neurology. *Clin Auton Res.* 1998; **8**: 359-362.
- 26 Hagerman PJ, Hagerman RJ. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004; **10**: 25-30.
- 27 Harding AE. The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth'. *Brain.* 1982; **105**: 1-28.
- 28 Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1991; **1**: 34-38.
-

- 29 Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat.* 1993; **2**: 338-346.
- 30 Ikeda Y, Dalton JC, Moseley ML, Gardner KL, Bird TD, Ashizawa T, Seltzer WK, Pandolfo M, Milunsky A, Potter NT, Shoji M, Vincent JB, Day JW, Ranum LP. Spinocerebellar ataxia type 8: molecular genetic comparisons and haplotype analysis of 37 families with ataxia. *Am J Hum Genet.* 2004; **75**: 3-16.
- 31 Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, Stevanin G, Durr A, Zuhlke C, Burk K, Clark HB, Brice A, Rothstein JD, Schut LJ, Day JW, Ranum LP. Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet.* 2006; **38**: 184-190.
- 32 Imbrici P, D'Adamo MC, Kullmann DM, Pessia M. Episodic ataxia type 1 mutations in the KCNA1 gene impair the fast inactivation properties of the human potassium channels Kv1.4-1.1/Kvbeta1.1 and Kv1.4-1.1/Kvbeta1.2. *Eur J Neurosci.* 2006; **24**: 3073-3083.
- 33 Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, Kobayashi K, Yokota T, Amino T, Owada K, Fujigasaki H, Sakamoto M, Tomimitsu H, Takashima M, Kumagai J, Noguchi Y, Kawashima Y, Ohkoshi N, Ishida G, Gomyoda M, Yoshida M, Hashizume Y, Saito Y, Murayama S, Yamanouchi H, Mizutani T, Kondo I, Toda T, Mizusawa H. An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a 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.* 2005; **77**: 280-296.
- 34 Jen JC, Graves TD, Hess EJ, Hanna MG, Griggs RC, Baloh RW. Primary episodic ataxias: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain.* 2007; **130**: 2484-2493.

-
- 35 Jen JC, Wan J, Palos TP, Howard BD, Baloh RW. Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. *Neurology*. 2005; **65**: 529-534.
- 36 Jouvenceau A, Eunson LH, Spauschus A, Ramesh V, Zuberi SM, Kullmann DM, Hanna MG. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet*. 2001; **358**: 801-807.
- 37 Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*. 1992; **360**: 467-471.
- 38 Kanner BI. Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. *J Exp Biol*. 1994; **196**: 237-249.
- 39 Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, Mannucci PM, Anand S, Engert JC, Samani NJ, Schunkert H, Erdmann J, Reilly MP, Rader DJ, Morgan T, Spertus JA, Stoll M, Girelli D, McKeown PP, Patterson CC, Siscovick DS, O'Donnell CJ, Elosua R, Peltonen L, Salomaa V, Schwartz SM, Melander O, Altshuler D, Merlini PA, Berzuini C, Bernardinelli L, Peyvandi F, Tubaro M, Celli P, Ferrario M, Fetiveau R, Marziliano N, Casari G, Galli M, Ribichini F, Rossi M, Bernardi F, Zoncin P, Piazza A, Yee J, Friedlander Y, Marrugat J, Lucas G, Subirana I, Sala J, Ramos R, Meigs JB, Williams G, Nathan DM, MacRae CA, Havulinna AS, Berglund G, Hirschhorn JN, Asselta R, Duga S, Sreafico M, Daly MJ, Nemesh J, Korn JM, McCarroll SA, Surti A, Guiducci C, Gianniny L, Mirel D, Parkin M, Burt N, Gabriel SB, Thompson JR, Braund PS, Wright BJ, Balmforth AJ, Ball SG, Hall AS, Linsel-Nitschke P, Lieb W, Ziegler A, Konig I, Hengstenberg C, Fischer M, Stark K, Grosshennig A, Preuss M, Wichmann HE, Schreiber S, Ouwehand W, Deloukas P, Scholz M, Cambien F, Li M, Chen Z, Wilensky R, Matthai W, Qasim A, Hakonarson HH, Devaney J, Burnett MS, Pichard AD, Kent KM, Satler L, Lindsay JM, Waksman R, Epstein SE, Scheffold T, Berger K, Huge A, Martinelli N, Olivieri O, Corrocher R, McKeown P, Erdmann E, Konig IR, Holm H, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Do R, Xie C, Siscovick D. Genome-wide association of early-
-

- onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet.* 2009; **41**: 334-341.
- 40 Klockgether T. Parkinsonism & related disorders. Ataxias. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007; **13 Suppl 3**: S391-394.
- 41 Klockgether T. The clinical diagnosis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias. *Cerebellum.* 2008; **7**: 101-105.
- 42 Knippers R. *Molekulare Genetik.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2001.
- 43 Koch HP, Larsson HP. Small-scale molecular motions accomplish glutamate uptake in human glutamate transporters. *J Neurosci.* 2005; **25**: 1730-1736.
- 44 Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW, Ranum LP. An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet.* 1999; **21**: 379-384.
- 45 Krebs HA. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J.* 1935; **29**: 1951-1969.
- 46 Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci.* 1995; **15**: 1835-1853.
- 47 Litt M, Kramer P, Browne D, Gancher S, Brunt ER, Root D, Phromchotikul T, Dubay CJ, Nutt J. A gene for episodic ataxia/myokymia maps to chromosome 12p13. *Am J Hum Genet.* 1994; **55**: 702-709.
- 48 Manto MU. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum.* 2005; **4**: 2-6.
- 49 Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, Rasmussen A, Grewal RP, Watase K, Khajavi M, McCall AE, Davis CF, Zu L, Achari M, Pulst SM, Alonso E,

- Noebels JL, Nelson DL, Zoghbi HY, Ashizawa T. Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet.* 2000; **26**: 191-194.
- 50 Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1990; **11**: 379-387.
- 51 Nikali K, Suomalainen A, Saharinen J, Kuokkanen M, Spelbrink JN, Lonnqvist T, Peltonen L. Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Hum Mol Genet.* 2005; **14**: 2981-2990.
- 52 Palau F, Espinos C. Autosomal recessive cerebellar ataxias. *Orphanet J Rare Dis.* 2006; **1**: 47.
- 53 Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature.* 1992; **360**: 464-467.
- 54 Rajakulendran S, Schorge S, Kullmann DM, Hanna MG. Episodic ataxia type 1: a neuronal potassium channelopathy. *Neurotherapeutics.* 2007; **4**: 258-266.
- 55 Robbins MS, Lipton RB, Laureta EC, Grosberg BM. CACNA1A Nonsense Mutation is Associated With Basilar-Type Migraine and Episodic Ataxia Type 2. *Headache.* 2009.
- 56 Roberts E, Frankel S. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem.* 1950; **187**: 55-63.
- 57 Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; 13.49-13.52, 13.90.
- 58 Schols L, Amoiridis G, Epplen JT, Langkafel M, Przuntek H, Riess O. Relations between genotype and phenotype in German patients with the Machado-Joseph disease mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996; **61**: 466-470.

- 59 Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 2004; **3**: 291-304.
- 60 Seyffert W, Balling R, Couet HG, Fischbach KF, Frey A, Gassen HG, Glätzer KH, Hagemann R, Hess O, Hofbauer M, Hollenberg CP, Jäckle H, Jäger R, Jürgens G, Krawinkel U, Lachmund A, Melchers I, Minol K, Neiss G, Nordheim A, Sachse E, Schaefer U, Scharl M, Tautz D, Weber P. *Lehrbuch der Genetik.* Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1998.
- 61 Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int.* 2007; **51**: 333-355.
- 62 Stankewich MC, Tse WT, Peters LL, Ch'ng Y, John KM, Stabach PR, Devarajan P, Morrow JS, Lux SE. A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; **95**: 14158-14163.
- 63 Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; **89**: 10955-10959.
- 64 Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol.* 2000; **9**: 1699-1710.
- 65 Tanaka K. Expression cloning of a rat glutamate transporter. *Neurosci Res.* 1993; **16**: 149-153.
- 66 van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, Krieger E, van de Graaf R, de Koning I, Maat-Kievit A, Leegwater P, Dooijes D, Oostra BA, Heutink P. A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *Am J Hum Genet.* 2003; **72**: 191-199.

- 67 Vedanarayanan VV. Mitochondrial disorders and ataxia. *Semin Pediatr Neurol.* 2003; **10**: 200-209.
- 68 Waters MF, Minassian NA, Stevanin G, Figueroa KP, Bannister JP, Nolte D, Mock AF, Evidente VG, Fee DB, Muller U, Durr A, Brice A, Papazian DM, Pulst SM. Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet.* 2006; **38**: 447-451.
- 69 Wenning GK, Tison F, Ben Shlomo Y, Daniel SE, Quinn NP. Multiple system atrophy: a review of 203 pathologically proven cases. *Mov Disord.* 1997; **12**: 133-147.
- 70 Yamada K, Watanabe M, Shibata T, Tanaka K, Wada K, Inoue Y. EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. *Neuroreport.* 1996; **7**: 2013-2017.
- 71 Zerangue N, Kavanaugh MP. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature.* 1996; **383**: 634-637.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADCA	autosomal-dominant vererbte cerebelläre Ataxien
AOA	Ataxie mit okulomotorischer Apraxie
APS	Ammoniumpersulfat
ARP-1	Contractin
AT	Ataxia-Teleangiektasia
AVED	Ataxie mit isoliertem Vitamin-E-Mangel
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
cDNA	„copy“-Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CPEO	chronisch-progressive externe Ophthalmoplegie
CTX	Cerebrotendinöse Xanthomatose
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dest.	destiliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DRPLA	dentato-rubro-pallido-luysiane Atrophie
ds	doppelsträngig

dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EA	Episodischen Ataxien
EAAT	Excitatory Amino Acid Transporter
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
Ex	Exon
Exo-sap	Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase
F, f	forward (vorwärts)
FXTAS	Fragile-X-Tremor-Ataxie-Syndrom
g	Gramm
G	Guanin
GABA	γ -Aminobuttersäure
IDLOCA	idiopathische, spät beginnende cerebelläre Ataxie
IOSCA	Infantile spinocerebelläre Ataxie
l	Liter
LHON	Lebersche Hereditäre Optikusatrophie
LJ.	Lebensjahr
LM	Low Mass DNA Ladder (Längenstandard)
m	Milli ($=10^{-3}$)
mm	Millimeter
M	Molarität
MELAS	Mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose und schlaganfall-ähnliche Episoden
MERFF	Syndrom der myoklonischen Epilepsie mit ragged red fibres
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mol	Mol (=Stoffmenge)
MSA	Multisystematrophie
mut	Mutation
μ	Micro ($=10^{-6}$)
n	Nano ($=10^{-9}$)
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinopathia pigmentosa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nr.	Nummer

o.g.	oben genannt
p	Pico (=10 ⁻¹²)
PCD	paraneoplastische Kleinhirndegeneration
PCR	polymerase chain reaction
PK	Proteinase K
R, r	reverse (rückwärts)
rmp	<i>rotation per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
S.	Seite
SAOA	sporadische, im Erwachsenenalter beginnende Ataxie unbekannter Ursache
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
Sek.	Sekunden
ss	Einzelstränge
SNP	single nucleotide polymorphism
SSCP	single-strand conformation polymorphism
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N' . Tetramethylethylendiamin
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	ultra-violett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Verhältnis Gewicht zu Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

7.2 Buchstabencode für Aminosäuren

Tabelle 18: Abkürzungen der Aminosäuren mit dem Ein- und Dreibuchstabencode

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

8. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Frau Prof. Dr. G. Gillessen-Kaesbach, Direktorin des Instituts, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Humangenetischen Institut der Universität zu Lübeck bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ch. Zühlke, meiner „Doktormama“, für die Überlassung des Themas und die hervorragende und intensive Betreuung. Sie hatte stets ein offenes Ohr für jegliche Probleme und Fragen und konnte mir mit wertvollen Tipps weiterhelfen. Durch die immer schnelle und gründliche Korrektur dieser Arbeit und Ihre Motivation hat Sie mir bei der Verfassung sehr geholfen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau V. Bernard, die mich während der gesamten Zeit im Labor und danach intensiv und geduldig betreut hat, meine Zweifel und Fragen immer ernst genommen hat und mir darüber hinaus eine gute Freundin geworden ist.

Für die Einarbeitung in die Methoden und die Handhabung der Geräte, die stete Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei Frau U. Gehlken, Frau J. Atici und bei Frau V. Bernard. Sie alle hatten immer ein offenes Ohr für mich und meine Fragen.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die nette Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima, was ganz erheblich dazu beigetragen hat, dass ich mich dort immer sehr wohl gefühlt habe.

Meiner Familie danke ich von Herzen für die Ermöglichung des Studiums und somit dieser Doktorarbeit, das Vertrauen in mich und die liebevolle Unterstützung und Motivation in allen Phasen der Arbeit.

Meinem Freund und meinen Freunden danke ich für ihre unendliche Geduld an all den Tagen, an denen ich furchtbar gestresst und ungenießbar war, und für ihre moralische Unterstützung.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Juliane Hiltcher
Geburtsdatum: 02.07.1982
Geburtsort: Heidelberg

Schulbildung

1989-1993: Grundschule Schatthausen
1993-2002: Gymnasium Wiesloch
2002: Abitur

Studium

10/2003-09/2005: Studium der Zahnmedizin an der Universität Heidelberg
09/2005: 1. Ärztliche Prüfung (Physikum)
Seit 10/2005: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
05/2007-03/2008: Experimenteller Teil der Dissertation am Institut für Humangenetik an der Universität zu Lübeck
08/2008-07/2009: Praktisches Jahr
11/2009: 2. Ärztliche Prüfung

Publikation

03/2008: Hiltcher J, Bernard V, Gehlken U, Gillissen-Kaesbach G, Zuehlke C. Sequence variations in glutamate transporter genes in patients with inherited ataxias. *medizinische genetik*. 2008; **20**:119