

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. E. Schwinger

**Ataxien mit autosomal-rezessivem Erbgang:
Nachweis von Mutationen
im Frataxin- und Aprataxin-Gen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Matthias Habeck
aus Rendsburg

Lübeck 2004

1. Berichterstatterin:

Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Peter Karl Müller

Tag der mündlichen Prüfung:

16. Juni 2005

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 16. Juni 2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 2 | Material und Methoden | 8 |
| 2.1 | Material..... | 8 |
| 2.1.1 | Chemikalien..... | 8 |
| 2.1.2 | Primer..... | 10 |
| 2.1.3 | Geräte und Gebrauchsartikel..... | 12 |
| 2.1.4 | Stammlösungen..... | 14 |
| 2.2 | Methoden | 17 |
| 2.2.1 | FRDA-Proben-Auswahl..... | 17 |
| 2.2.2 | AOA1-Proben-Auswahl..... | 17 |
| 2.2.3 | PCR..... | 18 |
| 2.2.4 | Agarose-Gel-Elektrophorese..... | 21 |
| 2.2.5 | SSCP-Analyse..... | 22 |
| 2.2.6 | DNA-Sequenzierung mit der Didesoxymethode nach Sanger..... | 24 |
| 2.2.7 | Klonierung | 26 |
| 2.2.8 | Haplotypanalyse..... | 28 |
| 3 | Ergebnisse..... | 30 |
| 3.1 | Mutationssuche im Frataxin-Gen | 30 |
| 3.2 | Mutationssuche im Aprataxin-Gen | 33 |
| 3.2.1 | Mutation im Aprataxin-Exon 7..... | 33 |
| 3.2.2 | Haplotypanalyse für die Patienten mit der Mutation W293X..... | 35 |
| 3.2.3 | Veränderung im Aprataxin-Exon 4..... | 36 |
| 3.2.4 | Veränderung im Aprataxin-Intron 4 | 37 |

| | | |
|-------|----------------------------------------------------------------|----|
| 3.3 | Isolierung von Aprataxin-Transkripten..... | 38 |
| 3.3.1 | Transkripte mit Exon 1 | 39 |
| 3.3.2 | Transkripte mit vollständiger Exon-2-Sequenz | 40 |
| 4 | Diskussion | 42 |
| 4.1 | Mutationssuche im Frataxin-Gen | 42 |
| 4.1.1 | Genotyp der Patienten 7024 und 8562..... | 42 |
| 4.1.2 | Phänotyp der Patientin 7024 | 43 |
| 4.1.3 | Phänotyp des Patienten 8562 | 44 |
| 4.1.4 | Verteilung der „missense“-Mutationen im Frataxin-Gen..... | 44 |
| 4.1.5 | Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei „compound“-Heterozygoten..... | 45 |
| 4.1.6 | Patienten ohne Nachweis einer Punktmutation..... | 48 |
| 4.2 | Mutationssuche im Aprataxin-Gen | 50 |
| 4.2.1 | Genotyp der Patienten 5466 und 7689..... | 50 |
| 4.2.2 | Gründereffekt..... | 50 |
| 4.2.3 | Phänotyp der an der AOA1 erkrankten Geschwister | 51 |
| 4.2.4 | Phänotyp der Patientin 7689 | 53 |
| 4.2.5 | Patienten mit dem Aminosäureaustausch S158Y | 55 |
| 4.2.6 | Patienten mit möglicher Locus-Heterogenität | 56 |
| 4.2.7 | Veränderungen im Intron-Bereich des Aprataxin-Gens | 56 |
| 4.2.8 | Vergleich der relativen AOA1-Häufigkeiten..... | 58 |
| 4.3 | Isolierung von Aprataxin-Transkripten..... | 60 |
| 4.3.1 | Analyse der nachgewiesenen Transkript-Varianten..... | 60 |
| 4.3.2 | Vergleich mit Datenbank-Varianten | 61 |
| 4.3.3 | Bedeutung der alternativen Spleißvorgänge | 62 |
| 5 | Zusammenfassung | 65 |

| | | |
|-------|---------------------------------------------|----|
| 6 | Anhang..... | 66 |
| 6.1 | cDNA-Sequenzen | 66 |
| 6.1.1 | cDNA-Sequenz des Frataxin-Gens | 67 |
| 6.1.2 | cDNA-Sequenz des Aprataxin-Gens | 69 |
| 6.1.3 | cDNA-Sequenzen der Aprataxin-Isoformen..... | 72 |
| 6.2 | Tabellenverzeichnis | 74 |
| 6.3 | Abbildungsverzeichnis | 75 |
| 6.4 | Literaturverzeichnis | 76 |
| 6.4.1 | Bücher und Zeitschriften..... | 76 |
| 6.4.2 | Elektronische Datenbanken | 81 |
| 6.5 | Danksagung | 82 |
| 6.6 | Lebenslauf..... | 83 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|-------------------------------------------|
| A | Adenin |
| AOA1 | Ataxie mit okulomotorischer Apraxie 1 |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AT | Ataxia teleangiectatica |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| cDNA | „copy“-Desoxyribonukleinsäure |
| CEPH | Centre des Études du Polymorphisme Humain |
| CT | Computertomographie |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| ddATP | Didesoxyadenosintriphosphat |
| ddCTP | Didesoxycytidintriphosphat |
| ddGTP | Didesoxyguanosintriphosphat |
| ddTTP | Didesoxythymidintriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| EDTA | Ethylendinitrilotetraessigsäure |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| et al. | et alteri |
| FRDA | Friedreich-Ataxie |
| FWD | forward |
| G | Guanin |
| HGMD | Human Gene Mutation Database |
| IQ | Intelligenzquotient |
| K | Konzentration |
| LB | Luria-Bertani |
| mRNA | „messenger“-Ribonukleinsäure |
| MRT | Magnetresonanztomographie |

| | |
|------------|-----------------------------------------------|
| Mut | Mutante |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| OMIM | Online Mendelian Inheritance in Man |
| PCR | polymerase chain reaction |
| Pos. | Position |
| REV | reverse |
| Seq. | Sequenzierung |
| SNP | single nucleotide polymorphism |
| SSCP | single-strand conformation polymorphism |
| T | Thymin |
| TBE-Puffer | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| Temed | N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin |
| UNI | universal |
| Wt | Wildtyp |

Buchstabencode für Aminosäuren

| 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 |

1 Einleitung

Heredo-Ataxien sind erblich bedingte Störungen der Koordination von Bewegungsabläufen und der Gleichgewichtsregulation. Einige manifestieren sich bereits in einem frühen Abschnitt des Lebens. Betroffene Kinder, die sich zunächst altersentsprechend entwickelt haben, fallen plötzlich durch ein unsicheres, breitbasiges Gangbild auf und verlieren das Gleichgewicht. Der Krankheitsverlauf ist stets unaufhaltsam progredient, so daß die Betroffenen schließlich auf einen Rollstuhl angewiesen sind.

Die Heredo-Ataxien sind neurodegenerativ bedingt. Sie gehören zur Gruppe der Systematrophien des Zentralnervensystems und betreffen hauptsächlich das Kleinhirn oder die Bahnen des Rückenmarks. Dementsprechend unterscheidet man cerebelläre und spinale Formen der Ataxie. Letztere führen zum Ausfall der Propriozeption und damit zum Verlust der sensiblen Kontrolle über die Motorik. Deshalb werden sie auch synonym als „sensible“ Ataxien bezeichnet (Poock und Hacke, 2001). Der Phänotyp cerebellärer und spinaler Formen zeichnet sich durch eine beträchtliche klinische Heterogenität aus, die eine präzise Diagnose erschwert. Mit Hilfe der Molekulargenetik kann eine Vielzahl der Ataxien hinsichtlich ihrer Ätiologie genau bestimmt werden. Die Kenntnis entsprechender Genotypen führt zu einer zunehmend differenzierteren Klassifikation. Phänotyp-Genotyp-Korrelationen ermöglichen die Formulierung von fakultativen und obligaten Diagnosekriterien, die die klinische Differentialdiagnose erleichtern. Immer häufiger können sich auf diese Weise schon in frühen Stadien der Erkrankung wichtige Hinweise für die Prognose und die Therapie der Ataxie-Patienten ergeben.

Bei den erblichen Ataxien unterscheidet man hinsichtlich des Vererbungsmodus autosomal-dominante Formen wie die spinocerebellären Ataxien von autosomal-rezessiven Formen. Erstere werden in der Regel erst im Erwachsenenalter symptomatisch und beruhen zum Teil auf einer pathologischen Anzahl von CAG-Trinukleotid-Folgen. Von Generation zu Generation läßt sich das Phänomen der Antizipation beobachten: Die Erstmanifestation der Erkrankung erfolgt früher, und ihr Verlauf ist schwerer. Die autosomal-rezessiv vererbten Ataxien treten hingegen oft schon in früher Kindheit auf, wobei sich keine Antizipation erkennen läßt.

Der wichtigste und häufigste Vertreter der autosomal-rezessiv vererbten Ataxien ist die Friedreich-Ataxie (FRDA; „OMIM“-Datenbank, Zugangsnummer #229300). Sie wurde zum

ersten Mal durch den Heidelberger Arzt Nikolaus Friedreich (1863) beschrieben. Ihre Prävalenzrate wird in Mitteleuropa auf etwa 1:29.000 geschätzt (Cossée et al., 1997; Epplen et al., 1997). Das mittlere Alter, in dem die ersten Symptome auftreten, liegt um die Pubertät, allerdings kann das individuelle Alter bei Erstmanifestation erheblich variieren (Dürr et al., 1996). Zum einen gibt es Betroffene mit einer besonders frühen Manifestation, die niemals sicher laufen lernen. Zum anderen gibt es sogenannte „late-onset“-Formen, die erst im Alter von etwa 50 Jahren erkennbar werden. Zuerst manifestiert sich im allgemeinen eine Gangunsicherheit, manchmal aber auch eine Skoliose oder eine hypertrophische Kardiomyopathie. Bei der körperlichen Untersuchung der Patienten finden sich Zeichen einer peripheren Polyneuropathie (schlaffe Lähmung und Sensibilitätsstörungen), positive Pyramidenbahnzeichen und eine Kleinhirn-Symptomatik. Muskelhypotonie, Muskelatrophie, Muskelparese und ein Erlöschen der Muskeleigenreflexe treten zuerst an den unteren Extremitäten auf und sind Ausdruck einer entstehenden schlaffen Lähmung. Aus der muskulären Hypotonie resultieren Skelettdeformitäten wie der bekannte „Friedreich-Hohlfuß“. Unter den sensiblen Ausfallerscheinungen imponiert v. a. eine Verminderung der Tiefensensibilität, die den Lage- und Vibrationssinn beeinträchtigt. Bei der klinischen Untersuchung kann außerdem die Auslösbarkeit des pathologischen Babinski-Reflexes auffallen, die auf eine zusätzliche Beeinträchtigung zentraler absteigender motorischer Bahnen hinweist. Mit zunehmender Dauer des Krankheitsverlaufes kommt es zu einer immer stärkeren Ausprägung des cerebellären Syndroms. Dementsprechend zeigen sich Nystagmus, Dysarthrie, Intentionstremor, Dysmetrie und Dysdiadochokinese (Poeck und Hacke, 2001). Nach einem durchschnittlichen Verlauf von fünfzehn bis zwanzig Jahren erfordert die Krankheit die Nutzung eines Rollstuhls (Harding, 1981). Bei vielen Patienten kann sich jedoch angesichts der interindividuellen Variabilität in der Symptomausprägung die Ausbildung des Vollbilds der FRDA verzögern. Einige FRDA-Patienten entwickeln einen Diabetes mellitus, der aber prognostisch von geringerer Bedeutung ist als die hypertrophe Kardiomyopathie. Letztere stellt den limitierenden Faktor bezüglich der Lebenserwartung von FRDA-Patienten dar (Delatycki et al., 2000).

Trotz zahlreicher Bemühungen sind die pathogenetischen Mechanismen bei der FRDA noch nicht vollständig aufgeklärt. 1996 gelang es einer Forschergruppe um Victoria Campuzano und Laura Montermini, das dieser Erkrankung zugrundeliegende Gen auf Chromosom 9q13 zu isolieren. Das sog. Frataxin-Gen erstreckt sich über sieben Exons (Nomenklatur: Exons 1-4, 5a, 5b, 6), wobei die Exons 1 bis 5a für das 210 Aminosäuren umfassende Genprodukt Frataxin kodieren. Die Aufgabe der Transkript-Variante mit Exon 5b ist unklar. Exon 6 wird nicht

translatiert, da sowohl Exon 5a als auch Exon 5b ein Stop-Codon enthalten (Campuzano et al., 1996).

Frataxin liegt in Assoziation an mitochondriale Membranen vor (Campuzano et al., 1997) und kann dort Eisenatome an sich binden. Aus einer Beeinträchtigung der Frataxin-Expression resultiert möglicherweise durch mitochondriale Eisenüberladung ein oxidativer Zellschaden (Cavadini et al., 2002). Dementsprechend gibt es Hinweise darauf, daß die antioxidativ wirksame Substanz Idebenone den Schweregrad der kardialen Hypertrophie bei Friedreich-Patienten mindern könnte (Hausse et al., 2002).

Die Friedreich-Ataxie ist die einzige bisher bekannte autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, für die die Zunahme der Kopienanzahl einer Trinukleotid-Folge ursächlich ist. Die Anzahl des in Intron 1 des Frataxin-Gens liegenden GAA-Triplets ist dabei von normalerweise zehn (Eppelen et al., 1997) auf bis zu 1.700 Kopien gesteigert (Dürr et al., 1996). Man spricht in diesem Fall von einer sog. „repeat“-Expansion. Ihr Ausmaß korreliert negativ mit der nachweisbaren Frataxin-Menge (Campuzano et al., 1997). Etwa 96 % aller Friedreich-Patienten tragen die Expansion auf beiden Allelen (Cossée et al., 1999). Die molekulare Diagnostik der Erkrankung ist bei ihnen ohne größeren labortechnischen Aufwand durchführbar: Mit Hilfe der PCR-Technik werden die DNA-Abschnitte, die die repetitive Sequenz aufweisen, vervielfältigt und ihre Größe anschließend durch eine Gel-Elektrophorese bestimmt.

Eine nicht unbeträchtliche Anzahl von Ataxie-Patienten zeigt einen für die FRDA als pathognomonisch angesehenen Phänotyp, ohne daß ihr Genotyp zwei expandierte Friedreich-Allele aufweist. Aufgrund ihres Genotyps lassen sich diese Ataxie-Patienten in zwei Gruppen einteilen:

Zur ersten Gruppe gehören diejenigen Patienten, die auf lediglich einem Allel die Expansion des Trinukleotid-„repeats“ aufweisen. Um Träger des Phänotyps der autosomal-rezessiv vererbten FRDA zu sein, müßte auch die Expression des zweiten Allels beeinträchtigt sein. Ein solches Zusammenwirken zweier unterschiedlicher Veränderungen auf beiden Allelen nennt man „compound“-Heterozygotie. Bisher sind im Fall der FRDA über zwanzig Mutationen des zweiten Allels publiziert worden, die ein fehlerhaftes Protein bedingen. Die zweite Gruppe umfaßt diejenigen Patienten, deren Friedreich-Allele beide eine als „normal“ angesehene Kopienanzahl des GAA-Triplets besitzen. Sie könnten auf beiden Allelen Mutationen tragen, auch wenn eine derartige genotypische Konstellation bisher noch nicht beschrieben worden ist. Andererseits ist es denkbar, daß Patienten beider Gruppen an einer anderen Form der Heredo-Ataxie leiden, deren Phänotyp dem der FRDA ähnlich ist.

Die neben der FRDA bekannteste autosomal-rezessiv vererbte Ataxie ist die Ataxia teleangiectatica (AT; Synonym: Louis-Bar-Syndrom). Ihre neurologische Symptomatik ist derjenigen der FRDA sehr ähnlich (Woods und Taylor, 1992). Sie zeichnet sich jedoch durch viele „extraneurologische“ Befunde aus, die sich bei der FRDA nicht nachweisen lassen. Als Phakomatose zeigt sie im Bereich der Konjunktiven okulokutane Teleangiektasien. Die Patienten leiden zudem an rezidivierenden respiratorischen Infekten (verursacht durch einen Immunglobulin-Mangel) und haben ferner ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Malignomen (aufgrund einer gesteigerten Chromosomenbrüchigkeit). Die Differentialdiagnose zwischen FRDA und AT bereitet deshalb in der klinischen Praxis wenig Probleme.

Auch die Ataxie mit primärem Vitamin-E-Mangel sowie die Abetalipoproteinämie, die sich beide durch einen niedrigen Vitamin-E-Spiegel des Blutserums auszeichnen, sind auf einfache Weise diagnostisch auszuschließen (Di Donato et al., 2001).

Die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie 1 (AOA1; „OMIM“-Datenbank, Zugangsnummer #208920) ist hingegen eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, bei der die Differentialdiagnose zur FRDA schwieriger ist. Sie manifestiert sich wie die FRDA in früher Kindheit oder in der Pubertät und ist durch eine langsame Progredienz der neurologischen Symptomatik gekennzeichnet. Zu Beginn der Erkrankung imponieren vor allem eine cerebelläre Ataxie und choreatische Symptome. Später dominiert oft eine schwere periphere Neuropathie, die die ursprünglichen Symptome teilweise maskieren kann (Le Ber et al., 2003). Ein pathognomonischer Befund bei der AOA1 ist die okulomotorische Apraxie. Sie zeichnet sich aus durch die „Unmöglichkeit, willkürlich Sakkaden auszulösen, während reflektorisch ausgelöste Sakkaden normal sind“ (Mumenthaler und Mattle, 2002). Die Betroffenen können die Störung der willkürlichen Augenbewegung teilweise durch ruckartige Kopfbewegungen kompensieren (Colenbrander, 1970).

In der japanischen Population scheint die Friedreich-Ataxie nicht vorzukommen (Sasaki et al., 2000), während die AOA1 dort die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Ataxie ist (Moreira et al., 2001b). Deshalb ist die AOA1 von manchen Autoren anfangs als „japanische Variante“ der FRDA bezeichnet worden (Uekawa et al., 1995). In Tabelle 1 sind FRDA und AOA1 einander vergleichend gegenübergestellt. Das anatomisch-pathologische Korrelat der FRDA besteht neben der primär axonalen Degeneration peripherer Nervenfasern v. a. in einer Degeneration der Hinterstrangbahnen (Fasciculi cuneatus et gracilis), der Kleinhirnseitenstrangbahnen (Tractus spinocerebellares anterior et posterior) und der Pyramidenbahn (Tractus corticospinalis). Die FRDA ist folglich v. a. spinal bedingt und zeigt in der MRT eine Atrophie des Zervi-

kalmarks. Hingegen besteht das morphologische Korrelat der eher cerebellär bedingten AOA1 in einer Kleinhirn-Atrophie (Shimazaki et al., 2002). Eine frühe Differentialdiagnose zwischen FRDA und AOA1 ist trotz der anatomisch-pathologischen Unterschiede bei alleiniger Kenntnis des klinischen Untersuchungsbefundes nur schwer zu stellen: Befunde, die pathognomonisch für eine der beiden Erkrankungen sind, lassen sich oft erst einige Jahre nach dem Auftreten erster Symptome einer Gangataxie erheben (Barbot et al., 2001).

| Ataxie | FRDA | AOA1 |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Prävalenz in der kaukasischen Population | 1:29.000 | ? |
| Vererbung | autosomal-rezessiv | autosomal-rezessiv |
| Alter bei Erstmanifestation | meistens frühe Kindheit | meistens frühe Kindheit |
| Verlauf | progredient | progredient |
| Form der Ataxie | spinale Form | cerebelläre Form |
| typische Befunde | Areflexie, positiver Babinski-Reflex, Skoliose, hypertrophe Kardiomyopathie | Areflexie, negativer Babinski-Reflex, okulomotorische Apraxie, Chorea, mentale Retardierung |
| Laborbefunde | evtl. Hyperglykämie | evtl. Hypoalbuminämie, Hyperlipidämie |
| MRT-Befund | Atrophie des spinalen Zervikalmarks | Kleinhirn-Atrophie |

Tabelle 1: Vergleich von FRDA und AOA1 (Harding, 1981; Barbot et al., 2001; Shimazaki et al., 2002).

Das bei der AOA1 betroffene Gen auf Chromosom 9p13 wurde zeitgleich von zwei verschiedenen Forschergruppen isoliert (Date et al., 2001; Moreira et al., 2001b). Das Aprataxin-Gen besteht aus insgesamt acht Exons, die alternativ gespleißt werden. In der „Ensembl“-Datenbank sind zwei verschiedene Transkripte aufgeführt: Transkript 1 (ENST259603) und 2 (ENST309615). Ihre wesentlichen Merkmale sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Daten zur Transkription des Aprataxin-Gens, die bisher veröffentlicht wurden, sind widersprüchlich: Während das Start-Codon des „Ensembl“-Transkriptes 1 bereits in Exon 1 liegt, nehmen einige Forscher Exon 2 als Lokalisation des Start-Codons an (Date et al., 2001; Moreira et al., 2001b).

| Transkript | Aprataxin-Transkript 1 | Aprataxin-Transkript 2 |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| „Ensembl“-Zugangsnummer | ENST259603 | ENST309615 |
| Länge der cDNA-Sequenz | 1.092 bp | 1.880 bp |
| Lokalisation des Start-Codons | 9. Triplett von Exon 1 | 14. Triplett von Exon 5 |
| Lokalisation des Stop-Codons | 51. Triplett von Exon 8 | 51. Triplett von Exon 8 |
| Größe des exprimierten Proteins | 356 Aminosäuren | 168 Aminosäuren |
| weitere Unterschiede | beginnt mit Exon 1 | beginnt mit Exon 2; 5'-Ende von Exon 2 und 3'-Ende von Exon 8 länger als bei Transkript 1 |

Tabelle 2: Transkripte des Aprataxin-Gens, die in der „Ensembl“-Datenbank veröffentlicht sind.

Mutationen für AOA1-Patienten sind bisher in der japanischen und europäischen Population beschrieben worden. Die Autoren dieser Publikationen (Date et al., 2001; Moreira et al., 2001b; Shimazaki et al., 2002; Le Ber et al., 2003; Tranchant et al., 2003) beschränkten die Mutationsuche auf die 3'-Hälfte des Aprataxin-Gens (Exons 5-8). Die so detektierten Mutationen sind ausschließlich in den Exons 6 und 7 (mit Ausnahme einer intronischen Mutation) lokalisiert und in Tabelle 3 zusammengefaßt. Da die über die Transkription verfügbaren Daten nicht miteinander vereinbar sind und in der 5'-Hälfte des Gens bisher keine Mutationen nachgewiesen wurden, ist die Bedeutung der Exons 1-4 ungeklärt.

Das Aprataxin-Gen kodiert für ein Aprataxin genanntes Protein, dessen Funktion noch unbekannt ist. Es besteht aus mindestens drei verschiedenen Domänen, die bei der Reparatur von DNA-Einzelstrang-Brüchen eine Rolle spielen könnten (Moreira et al., 2001b; Caldecott, 2003). Das Syndrom der cerebellären Ataxie tritt im Rahmen zahlreicher Erkrankungen auf, bei denen DNA-Reparatur-Mechanismen gestört sind. Beispiele hierfür sind die bereits erwähnte Ataxia teleangiectatica sowie die spinocerebelläre Ataxie mit axonaler Neuropathie (SCAN1). Letztere ist mit Mutationen im TDP1-Gen assoziiert, das für ein DNA-Reparatur-Enzym kodiert (Takashima et al., 2002). Anders als bei der AT scheint weder bei der SCAN1 noch bei der AOA1 eine Prädisposition zur Entwicklung von Malignomen zu bestehen.

| Herkunftsland der Patienten | Mutationen | Publikationen |
|------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Japan | H215R | Shimazaki et al., 2002 |
| | P220L, Leserasterverschiebung bei V244 | Date et al., 2001; Moreira et al., 2001b; Shimazaki et al., 2002 |
| | V277G, Leserasterverschiebung bei S295 | Date et al., 2001 |
| Portugal | R213H, W293X | Moreira et al., 2001b |
| Frankreich | K211Q | Tranchant et al., 2003 |
| | A212V, D281G, W293R, g.IVS6+1 | Le Ber et al., 2003 |
| | W293X | Le Ber et al., 2003; Tranchant et al., 2003 |

Tabelle 3: Publierte Aprataxin-Mutationen (Lokalisation auf das erste Start-Codon in Exon 1 bezogen).

Fragestellung

Da die Ursache für die Symptomatik bei einer Vielzahl von Ataxie-Patienten noch nicht geklärt ist, befaßt sich die hier vorliegende Arbeit mit der Mutationssuche in den Frataxin- und Aprataxin-Genen von Betroffenen. Dabei waren folgende Aufgabenstellungen zu bearbeiten:

1. Bei vierzehn Patienten mit der dringenden klinischen Verdachtsdiagnose „Friedreich-Ataxie“, die keine homozygote „repeat“-Expansion in Intron 1 des Frataxin-Gens aufweisen, wurde mittels PCR-Technik, SSCP-Analyse und Sequenzierung nach Mutationen in den sechs kodierenden Exons des Frataxin-Gens gesucht.
2. 165 Ataxie-Patienten, deren Krankheit vor dem 30. Lebensjahr begann und die keine homozygoten Träger der „repeat“-Expansion in Intron 1 des Frataxin-Gens sind, wurden mit Hilfe von PCR-Technik, SSCP-Analyse und Sequenzierung auf Veränderungen in allen Exons des Aprataxin-Gens untersucht.
3. Alternativ gespleißte Transkripte des humanen Aprataxin-Gens wurden mittels PCR, Klonierung und Sequenzierung isoliert und charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| | |
|------------------------|--------------|
| 100 bp DNA Ladder | Gibco BRL |
| 2 N Natronlauge | Merck |
| Acrylease | Stratagene |
| Ampicillin-Natriumsalz | Sigma |
| APS | Serva |
| Aqua ad iniectabilia | Braun |
| Aqua Spüllösung | Delta-Pharma |
| Borsäure | Merck |
| Bromphenolblau | Serva |
| Chloroform 100 % | Merck |
| Dimethylformamid | Merck |
| DMSO 100 % | Merck |
| DNTPs set | Q-Biogene |
| EcoRI-10x-Puffer | Biolabs |
| EcoRI-Enzym | Biolabs |
| EDTA | Merck |
| Essigsäure 100 % | Merck |
| Ethanol 100 % | Merck |
| Ethanol 70 % | Merck |
| Ethidiumbromid | Merck |
| Ficoll 400 | Pharmacia |
| Formaldehyd 37 % | Sigma |
| Formamid 100 % | Fluka |
| Glucose | Merck |
| Glycerin | Fluka |
| Harnstoff | Merck |

| | |
|---------------------------------------------------------|-----------------|
| IRDye 800 Standard 50-350 bp | LI-COR |
| Lambda DNA-Hind III Digest | Biolabs |
| Marathon-Ready cDNA Human Fetal Brain | BD Clontech |
| Mineral Oil | USB |
| Natriumacetat | Merck |
| Natriumcarbonat | Merck |
| Natriumchlorid | Merck |
| Natriumdodecylsulfat | Fluka |
| NucleoSpin Extract 2 in 1 | Macherey-Nagel |
| One Shot Chemically Competent TOP10 (E.coli-) Cells | Invitrogen |
| pBR322 DNA-Msp I Digest | Biolabs |
| PCRII-TOPO TA Cloning Kit | Invitrogen |
| Phenol 100 % | Roth |
| RNAse | Q-Biogene |
| Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid) | Roth |
| Salpetersäure 65 % | Merck |
| Select Yeast Extract | Q-Biogene |
| Select-Agar | Invitrogen |
| SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC | Epicentre |
| Silbernitrat | Caelo |
| Standard-Agarose | BMA |
| Taq DNA Polymerase | Q-Biogene |
| Temed | Sigma |
| Tris | ICN Biomedicals |
| Tris-HCl | Fluka |
| Tryptone Peptone | Invitrogen |
| X-Gal | Q-Biogene |
| Xylencyanol | Sigma |

2.1.2 Primer

Alle Primer wurden von der Firma „Invitrogen“ synthetisiert.

Primer für die Amplifikation des Frataxin-Gens:

| | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Frataxin-Exon 1 | Vorwärts-Primer: 5'- AGT CTC CCT TGG GTC AGG GGT CCT GG-3' Rückwärts-Primer: 5'-CCG CGG CTG TTC CCG G-3' |
| Frataxin-Exon 2 | Vorwärts-Primer: 5'-GTA ACG TAC TTC TTA ACT TTG GC-3' Rückwärts-Primer: 5'-AGA GGA AGA TAC CTA TCA CGT G-3' |
| Frataxin-Exon 3 | Vorwärts-Primer: 5'-GGG TTT TGT GCT TCC TCT GC-3' Rückwärts-Primer: 3'-AAG AAG TCA AGA GGT ACC CC-3' |
| Frataxin-Exon 4 | Vorwärts-Primer: 5'-CCA CCT AAT CCC CTA GAG TGG TG-3' Rückwärts-Primer: 5'-CTT CTG AAC ATA CCT ACA TAC C-3' |
| Frataxin-Exon 5a | Vorwärts-Primer: 5'-TTG TCT TCC AGT GGA CCT AAG CG-3' Rückwärts-Primer: 5'-AAC GGG GCT GGG CAT CAA GCA TC-3' |
| Frataxin-Exon 5b | Vorwärts-Primer: 5'-GAC ATA CTC CTT CTC CTG GAA GG-3' Rückwärts-Primer: 5'-GTT TGG AGA GCA TGG TCC TCA C-3' |

Primer für die Amplifikation des Aprataxin-Gens:

| | |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aprataxin-Exon 1 | Vorwärts-Primer: 5'-TTA GAG AGG TGC TGG TGA CGT-3' Rückwärts-Primer: 5'-AGA AGA GAT AGG CTG ACG ACC-3' |
| Aprataxin-Exon 2 | Vorwärts-Primer: 5'-GTG AAG TCA CTT GCC TCA AG-3' Rückwärts-Primer: 5'-TCT CCA CAT TTC TAT GAC CAG-3' |
| Aprataxin-Exon 3 | Vorwärts-Primer: 5'-AGG AGC AAG TGC CTG GTT CTT-3' Rückwärts-Primer: 5'-GGC ACA GAC ACT CTA AAG TCA-3' |
| Aprataxin-Exon 4 | Vorwärts-Primer: 5'-CTT ACT GTA GGT GCT GTT GCT A-3' Rückwärts-Primer: 5'-CAA AAC AAT TAA GCA GTC AT-3' |
| Aprataxin-Exon 5 | Vorwärts-Primer: 5'-TAT AGG AAG GCA ATG GAG TG-3' Rückwärts-Primer: 5'-TCT GTG GAG TGG TCA TTT AC-3' |
| Aprataxin-Exon 6 | Vorwärts-Primer: 5'-TGG GAA TTA AGT GAC TTA GTG-3' Rückwärts-Primer: 5'-GGG TCT CAG TGC AAT ATG TG-3' |

- Aprataxin-Exon 7 Vorwärts-Primer: 5'-CAG AGG CTT TTC CCA TTT TG-3'
bzw. 5'-AGG AGC AAG TGC CTG GTT CTT-3' für die „nested“-PCR
Rückwärts-Primer: 5'-GTG AAA ACC AAG GAA CAC TG-3'
- Aprataxin-Exon 8 Vorwärts-Primer: 5'-TAG AAT ACC TGG CCT GGC AT-3'
Rückwärts-Primer: 5'-TTC ACA AGC AAC CCA GAA TA-3'

Primer für die Aprataxin-Haplotypanalyse:

- D9S1118 Vorwärts-Primer: 5'-CAG GAT ATT ATG TGA TGG AAT CC-3'
Rückwärts-Primer: 5'-CTG CTG ACT CCA AAA ATA TGC-3'
- D9S304 Vorwärts-Primer: 5'-GTG CAC CTC TAC ACC CAG AC-3'
Rückwärts-Primer: 5'-TGT GCC CAC ACA CAT CTA TC-3'
- D9S1788 Vorwärts-Primer: 5'-AGC TAA CTC CCT CCA CAC TG-3'
Rückwärts-Primer: 5'-GGA CAA ATG GCT GAC ATC AT-3'
- D9S1845 Vorwärts-Primer: 5'-CAA CTT GGC AAA GGT AGG TG-3'
Rückwärts-Primer: 5'-AGC TGG AGC CTC ACA CTG-3'
- D9S1817 Vorwärts-Primer: 5'-AGC TGT AGT GAG CCC TGA T-3'
Rückwärts-Primer: 5'-CGT TAG GAG CCT TGA GAC TT-3'

Primer für die Amplifikation der Transkript-Varianten des Aprataxin-Gens:

- Aprataxin-Exon 1→6 Vorwärts-Primer: 5'-AGC GGT GAG GCA CAG ATG AGT-3'
Rückwärts-Primer: 5'-ATC GGA AGC GGA GTT TGC TGG-3'
- Aprataxin-Exon 2→6 Vorwärts-Primer: 5'-GAG GAC TCG TGC TAG TGG AT-3'
Rückwärts-Primer: 5'-ATC GGA AGC GGA GTT TGC TGG-3'

2.1.3 Geräte und Gebrauchsartikel

| | |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abstandhalter („spacer“) | LI-COR Spacer, 0,2 mm dick LI-COR Spacer, 0,4 mm dick Life Technologies Gibco BRL Spacer Model S2, mylar, 0,35 mm dick |
| Agarosegel-Kammer | Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership BM 100 |
| Agarosegel-Träger | Serva BlueMarine 100 |
| Agarplatten | Greiner Labortechnik Petrischalen 94x16 |
| Brutschrank | Köttermann 2735 |
| Computerprogramme | Biometra BioDocAnalyze V1.0 LI-COR e-Seq V2.0 SeqWorks! V1.01 beta (Sven Opitz, Institut für Human-genetik, Universität zu Lübeck) |
| Eismaschine | Ziegra ZBE 30-10 |
| Glasflaschen | Schott Duran 500 ml/1000 ml |
| Kämme | Labtech International GmbH 48er Haifischzahnkamm, mylar, 0,2 mm dick Labtech International GmbH 48er Haifischzahnkamm, mylar, 0,4 mm dick Life Technologies Gibco BRL 62er Haifischzahnkamm, mylar, 0,35 mm dick Serva 12er/14er Kämme, 1,0/1,5 mm dick |
| Magnetrührer | Heidolph MR 2002 Ika-Combimag RCT |
| Membran-Vakuumpumpe | Vacuubrand MZ 2 C |
| Mikrowelle | Hitachi Micro 700 |
| PCR-Reaktionsgefäße | Sarstedt Tubes 0,5 ml/1,5 ml Sarstedt 96er PCR-Mikrotiterplatte + Deckelkette |
| pH-Meter | WTW pH-Electrode SenTix 61 |
| Pipetten | Eppendorf Pipetten 0,5-10 µl, 50-250 µl, 200-1000 µl Gilson Pipetman Pipetten P2, P20, P200, P1000 Thermo Labsystems Multikanal-Finnpipette 4510 (0,5-10 µl) |

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pipettenspitzen | Finntip Micro 0,2-10 µl Fischer #3510 0,1-10 µl Fischer #3520 0,5-20 µl Sarstedt Blaue Spitzen Sarstedt Gelbe Spitzen |
| Röhrchen mit Überfalldeckel | Greiner Labortechnik PP-Tube 15 ml |
| Rüttler | Heidolph REAX 2000 |
| Schüttelinkubator | New Brunswick Scientific Innova 4300 |
| Sequenziergerät | LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4200 |
| Spannungsgeber | Life Technologies Gibco BRL PS 9009 Life Technologies Gibco BRL PS 9009 TC 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-Trockner | Fröbel Labortechnik G 2000 |
| Sterilisator | Webeco Automat CS/VFKT |
| System zur Agarosegel-Auswertung | Biometra BioDocAnalyze System Vetter GmbH UV-Kontaktlampe Chroma 43 |
| Thermocycler | Biometra T Gradient Biometra UNO II Hybaid OmniGene Stratagene RoboCycler 40 Stratagene RoboCycler Gradient 40 |
| Thermomixer | Eppendorf Thermomixer 5436 |
| Waage | Sartorius Laboratory L 420 P |
| Wasserbad | GFL 1083 |
| Zentrifugen | Heraeus Biofuge Fresco Heraeus Sepatech Minifuge RF Hermle Z 230 M Eppendorf Centrifuge 5415 C |

2.1.4 Stammlösungen

| | |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 100 bp DNA Ladder (K = 50 ng/μl) | 5,0 % (w/v) 100 bp DNA Ladder 33 % (v/v) 6x-Ficoll Lösung |
| 10x-TBE-Puffer | 20 mM EDTA 890 mM Tris 890 mM Borsäure |
| 3x-Ficoll-Lösung | 150 μM Bromphenolblau 190 μM Xylencyanol 7,5 % (w/v) Ficoll 400 |
| 6x-Ficoll-Lösung | 290 μM Bromphenolblau 370 μM Xylencyanol 15 % (w/v) Ficoll 400 |
| Agarosegel-Lösung | 0,63 μM Ethidiumbromid 2,0 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 0,8 % bzw. 1,5 % (w/v) Standard-Agarose |
| Formamid-Ladepuffer | 290 μM Bromphenolblau 370 μM Xylencyanol 20 mM EDTA 95 % (v/v) Formamid |

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gel-Lösung für Haplotypanalyse | 6,0 % (v/v) Acrylamid 0,16 % (v/v) Bisacrylamid 6,7 M Harnstoff 2,0 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 0,060 % (v/v) Temed |
| Glycerin-Gel-Lösung für SSCP-Analyse | 6,0 % (v/v) Acrylamid 0,16 % (v/v) Bisacrylamid 10 % (v/v) wasserfreies Glycerin 2,0 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 0,067 % (v/v) Temed |
| Harnstoff-Gel-Lösung für SSCP-Analyse | 8,0 % (v/v) Acrylamid 0,21 % Bisacrylamid 1,7 M Harnstoff 2,0 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 0,035 % (v/v) Temed |
| HB1-Lösung | 50 mM Glucose 25 mM Tris-Cl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0) ⇒ fünfzehn Minuten lang autoklavieren |
| HB2-Lösung | 0,40 N NaOH 2,0 % (w/v) SDS |
| HB3-Lösung | 3,0 M Natriumacetat |

| | |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lambda DNA-Hind III Digest (K = 50 ng/μl) | 10 % (w/v) Lambda DNA-Hind III Digest 33 % 6x-Ficoll-Lösung ⇒ drei Minuten lang auf 60 °C erhitzen |
| Luria-Bertani-Medium | 1,0 % (w/v) Trypton 0,50 % (w/v) Hefe 1,0 % (w/v) NaCl ⇒ mit NaOH pH-Wert auf 7,0 einstellen |
| pBR322 DNA-Msp I Digest (K = 50 ng/μl) | 5,0 % (w/v) pBR322 DNA-Msp I Digest 33 % (v/v) 6x-Ficoll-Lösung |
| Reduktionslösung | 280 mM Natriumbicarbonat 0,024 % (v/v) Formaldehyd |
| Sequenzier-Gel-Lösung | 5,5 % (v/v) Acrylamid 0,15 % Bisacrylamid 7,0 M Harnstoff 2,0 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 0,067 % (v/v) Temed |
| X-Gal-Lösung | 400 mg X-Gal 10 ml Dimethylformamid |

2.2 Methoden

2.2.1 FRDA-Proben-Auswahl

Für die Suche nach Mutationen im Frataxin-Gen wurden DNA-Proben¹ aus zwei Gruppen von Ataxie-Patienten ausgewählt:

- sechs Ataxie-Patienten, die heterozygot für die GAA-Expansion in Intron 1 des Frataxin-Gens sind

sowie

- acht Ataxie-Patienten ohne Expansion im Frataxin-Gen, deren klinischer Befund jedoch besonders typisch für das Vorliegen einer Friedreich-Ataxie ist.

Zusätzlich wurden zwei Kontrollen untersucht. Als Negativ-Kontrolle für die Mutationssuche in den Frataxin-Exons diente die Probe eines FRDA-Patienten, der homozygot für die GAA-Expansion in Intron 1 des Frataxin-Gens ist. Als Positiv-Kontrolle wurde die DNA eines Patienten mit bereits beschriebener „compound“-Heterozygotie für eine GAA-Expansion in Intron 1 und eine Punktmutation im Start-Codon von Exon 1 verwendet (Zühlke et al., 1998).

2.2.2 AOA1-Proben-Auswahl

Für die Suche nach genetischen Veränderungen im Aprataxin-Gen wurden folgende Einschlusskriterien festgelegt:

- Zum Zeitpunkt der Diagnose-Anforderung mußte der jeweilige Ataxie-Patient jünger als 30 Jahre gewesen sein.
- Es mußte klinisch die Verdachtsdiagnose einer FRDA gestellt worden sein.

¹ Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Proben wurden von Mitarbeitern des Institutes für Human-genetik aus peripheren Blutleukozyten extrahiert. Außerdem war zu Beginn der Experimente bereits die molekulargenetische Untersuchung aller Proben auf das Vorliegen von „repeat“-Expansionen in Intron 1 des Frataxin-Gens durchgeführt worden.

- Es durfte weder eine Friedreich-Ataxie noch eine andere hereditär bedingte Ataxie molekulargenetisch nachgewiesen worden sein.

Die DNA-Bank am Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck umfaßte zum Zeitpunkt der Proben-Auswahl 1.650 Proben von deutschen Ataxie-Patienten, die im Zeitraum vom 04. Mai 1995 bis zum 17. September 2002 eingegangen waren. 165 dieser 1.650 Ataxie-Patienten erfüllten die drei oben genannten Kriterien und wurden deshalb für die Mutationsuche im Aprataxin-Gen ausgewählt. Positiv-Kontrollproben mit bereits bekannten Aprataxin-Mutationen standen nicht zur Verfügung.

2.2.3 PCR

Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) dient der Vervielfältigung eines bestimmten Abschnittes der DNA, der durch zwei Oligonukleotid-Primer definiert wird. Bei diesem Verfahren wird zunächst die doppelsträngige DNA denaturiert (bei 94 °C), damit die Primer an die zu ihnen komplementären DNA-Sequenzen binden können („annealing“, bei einer Primer-spezifischen Temperatur). Eine thermostabile DNA-Polymerase (z. B. „Taq“-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) kann dann in 5'-3'-Richtung eine zum Einzelstrang komplementäre DNA-Sequenz aus einzelnen Nukleotiden synthetisieren („extension“, bei 72 °C). Dieser dreischrittige Zyklus wird 30mal wiederholt und führt zu einer exponentiellen Amplifikation des fraglichen DNA-Abschnittes (Knippers, 2001).

Durchführung

- **PCR-Ansatz:** Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl je Ansatz durchgeführt, das 10 % (v/v) 10x-Puffer, 5,0 nmol von jedem der vier DNA-Nukleotide dATP, dTTP, dGTP und dCTP, 0,25 U „Taq“-Polymerase und 50 ng genomische DNA enthielt. Einzelnen PCR wurde, um die Bildung von Dimeren zu hemmen und die Spezifität der PCR zu erhöhen, Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. Wenn der benutzte Thermocycler keinen Heizdeckel besaß, wurden die Ansätze zusätzlich mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ihre Verdampfung zu verhindern.

- **PCR für die SSCP-Elektrophorese:** Eine Auflistung der verwendeten Primer findet sich im Materialteil, Primer- und DMSO-Konzentrationen sind der Tabelle 4 und 5 zu entnehmen. Als Thermocycler wurde der „Stratagene RoboCycler 40“ benutzt, der das folgende Programm ausführte: acht Minuten Prä-Denaturierung bei 94 °C, pro Zyklus jeweils eine Minute Denaturierung (bei 94 °C), „annealing“ (bei der in Tabelle 4 und 5 aufgeführten Temperatur) und „extension“ (bei 72 °C), 30 Zyklen, 8 Minuten „post-extension“ bei 72 °C und anschließende Abkühlung auf 4,0 °C.

| Frataxin-Exon | Zweck | DMSO-Menge | Primer-Menge | „annealing“-Temperatur |
|---------------|-------|-------------|--------------|------------------------|
| 1 | SSCP | 8,0 % (v/v) | 25 pmol | 60 °C |
| 1 | Seq. | 8,0 % (v/v) | 15 pmol | 65 °C |
| 2 | SSCP | 0 % (v/v) | 50 pmol | 55 °C |
| 2 | Seq. | 2,0 % (v/v) | 10 pmol | 55 °C |
| 3 | SSCP | 0 % (v/v) | 25 pmol | 60 °C |
| 3 | Seq. | 4,0 % (v/v) | 15 pmol | 62 °C |
| 4 | SSCP | 0 % (v/v) | 25 pmol | 55 °C |
| 4 | Seq. | 2,0 % (v/v) | 10 pmol | 55 °C |
| 5a | SSCP | 0 % (v/v) | 25 pmol | 60 °C |
| 5a | Seq. | 3,0 % (v/v) | 10 pmol | 60 °C |
| 5b | SSCP | 0 % (v/v) | 25 pmol | 60 °C |
| 5b | Seq. | 4,0 % (v/v) | 10 pmol | 58 °C |

Tabelle 4: Für die Amplifikation des Frataxin-Gens gewählte PCR-Bedingungen.

- **PCR für die Sequenzierung:** Die **Primer für die Frataxin-Sequenzierung** trugen an ihrem 5'-Ende zusätzlich die M13-UNI-Sequenz 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'. Jede Probe erforderte für eine bidirektionale Sequenzierung zwei Primär-PCR. Die eine wurde mit einem UNI-markierten Vorwärts-Primer, die andere mit einem UNI-markierten Rückwärts-Primer durchgeführt. Die Vorwärts-**Primer für die Aprataxin-Sequenzierung** waren ebenfalls mit der M13-UNI-Sequenz versehen. Hingegen war den Rückwärts-Primern an ihrem 5'-Ende die M13-REV-Sequenz 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3' vorangestellt. Jede Probe erforderte nur eine Primär-PCR mit den beiden entsprechend markierten Primern. Die Primer ohne M13-Sequenzen wurden für die Sequenzierung der Aprataxin-Exons nicht benötigt. Um die Entstehung unspezifischer PCR-Produkte zu mi-

nimieren, war die **Ermittlung möglichst optimaler PCR-Bedingungen** erforderlich. Dazu wurde für jedes Primer-Paar eine Gradienten-PCR auf dem „Stratagene RoboCycler Gradient 40“ durchgeführt, die in 2,0 °C-Schritten den „annealing“-Temperaturbereich von 54 bis 64 °C umfaßte. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und beurteilt. Als „annealing“-Temperatur wurde für die Amplifikation zu sequenzierender DNA-Abschnitte diejenige gewählt, bei der noch keine signifikante Abschwächung der Produkt-Bande festzustellen war. Die „annealing“-Temperatur sowie die verwendeten Primer- und DMSO-Mengen sind den Tabellen 4 und 5 zu entnehmen.

| Aprataxin-Exon | Zweck | DMSO-Menge | Primer-Menge | „annealing“-Temperatur |
|----------------|-------|-------------|--------------|------------------------|
| 1-8 | SSCP | 0 % (v/v) | 10 pmol | 55 °C |
| 1 | Seq. | 1,0 % (v/v) | 7,5 pmol | 60 °C |
| 2 | Seq. | 1,0 % (v/v) | 7,5 pmol | 58 °C |
| 3 | Seq. | 1,0 % (v/v) | 7,5 pmol | 60 °C |
| 4 | Seq. | 1,0 % (v/v) | 7,5 pmol | 54 °C |
| 5-7 | Seq. | 2,0 % (v/v) | 7,5 pmol | 58 °C |
| 8 | Seq. | 4,0 % (v/v) | 5,0 pmol | 56 °C |

Tabelle 5: Für die Amplifikation des Aprataxin-Gens gewählte PCR-Bedingungen.

- **„nested“-PCR für die Sequenzierung des Aprataxin-Exons 7:** Unter einer „nested“-PCR versteht man eine PCR, bei der bestimmte Bereiche eines verdünnten, primären PCR-Produktes amplifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um ein verkürztes Amplifikat von Aprataxin-Exon 7 herzustellen. Diese „nested“-PCR wurde mit 1,0 µl einer 1:1.000-Verdünnung des primären PCR-Produktes und bei einer „annealing“-Temperatur von 60 °C durchgeführt. Die übrigen PCR-Bedingungen unterschieden sich nicht von denen der zuvor durchgeführten Primär-PCR.
- **PCR für die Haplotypanalyse:** Die Vorwärts-Primer für die Haplotypanalyse im Bereich des Aprataxin-Gens trugen an ihrem 5'-Ende zusätzlich die M13-FWD-Sequenz 5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3'. Vom zweiten PCR-Zyklus an konnte deshalb ein „IRD-800“-markierter FWD-Primer partiell den Vorwärts-Primer des DNA-Markers ersetzen und in die Produkte eingebaut werden. Die PCR-Reaktionsansätze hatten ein Gesamtvolumen von 5,0 µl, das 50 ng DNA, 10 % (v/v) 10x-Puffer, 1,0 nmol von jedem der vier dNTP, je-

weils 1,2 pmol von Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 0,10 pmol „IRD-800“-markierten FWD-Primer und 0,15 U „Taq“-Polymerase enthielt. Durchgeführt wurde die PCR auf dem „Biometra T Gradient“-Thermocycler, der folgende Programm-Schritte ausführte: zweieinhalb Minuten Prä-Denaturierung bei 95 °C, 30 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 30 Sekunden „annealing“ bei 55 °C und 30 Sekunden „extension“ bei 72 °C, fünf Minuten „post-extension“ bei 72 °C und Abkühlung auf 4,0 °C.

- **PCR für die Amplifikation der Transkripte des Aprataxin-Gens:** Das PCR-Reaktionsvolumen von 25 µl enthielt 2,5 µl der „Marathon-Ready cDNA“ (Firma „BD Clontech“) und je 10 pmol der beiden im Materialteil aufgelisteten Primer. Auf dem Thermocycler „Stratagene RoboCycler 40“ wurde das folgende Programm durchlaufen: acht Minuten Prä-Denaturierung bei 94 °C, 35 Zyklen mit einer Minute Denaturierung (bei 94 °C), einer Minute „annealing“ (bei 60 °C) und zwei Minuten „extension“ (bei 72°C), 35 Zyklen, acht Minuten „post-extension“ bei 72 °C und anschließende Abkühlung auf 4,0 °C.

2.2.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

Prinzip

Aufgrund ihrer negativen Ladung bewegen sich Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld stets zur Anode hin, wobei ihre Wanderungsgeschwindigkeit in einer Agarose-Matrix vor allem von ihrer Länge abhängig ist (Knippers, 2001). Auf diese Weise gelingt eine Auftrennung unterschiedlicher DNA-Fragmente. Zur Darstellung der DNA wird Ethidiumbromid verwendet, das zwischen die Basenpaare der Nukleinsäure interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert (Seyffert et al., 1998). Die Beurteilung der Fluoreszenz-Intensität dient zur Qualitätskontrolle von PCR-Produkten und Plasmid-DNA-Präparationen. In einem Bereich von 0,3 bis 2,0 % Agarose-Anteil werden kleinere DNA-Fragmente besser bei höheren und größere Fragmente besser bei niedrigeren Agarosekonzentrationen aufgetrennt (Ibelgauf, 1990).

Durchführung

Zur Auftrennung relativ kleiner PCR-Produkte wurden 1,5 %ige Agarosegele verwendet, während für die klonierten Transkript-Varianten des Aprataxin-Gens, die eine Länge von 600 bis

800 bp aufwiesen, auf Gele mit einem Agarose-Gehalt von 0,8 % zurückgegriffen wurde. Die jeweilige Gellösung² wurde aufgekocht, für etwa eine halbe Minute auf Eis abgekühlt und dann auf Gelträger der Maße 7,0 x 10 cm gegossen. Danach wurden Kämme mit einer Dicke von 1,0 bzw. 1,5 mm in die Gellösung eingehängt, um Geltaschen („slots“) zu formen. In diese Taschen wurde nach dem Erstarren des Gels bei Zimmertemperatur jeweils ein Gemisch aus 3,5 µl 3x-Ficoll-Ladepuffer und 4,0 µl PCR-Produkt pipettiert. Um die Größe der aufgetrennten Produkte abschätzen zu können, wurden zusätzlich 5,0 µl der Gebrauchsverdünnung des 100-bp-Längenstandards aufgetragen. Anschließend erfolgte die Elektrophorese 45 Minuten lang in einer Kammer mit 1x-TBE-Puffer bei einer Spannung von 80 V. Die Fluoreszenz der Produkt-Banden unter einer UV-Kontaktlampe wurde mit einer Kamera aufgenommen und mit Hilfe des Computerprogramms „BioDocAnalyse V1.0“ ausgewertet.

2.2.5 SSCP-Analyse

Prinzip

Die SSCP-Analyse („single-strand conformation polymorphism“) ist eine Form der Elektrophorese, die dem Nachweis von Mutationen und Polymorphismen in einem bestimmten Abschnitt der DNA dient. Vor der Elektrophorese werden die betreffenden DNA-Proben mit Hilfe von Hitze und Formamid unvollständig denaturiert, so daß sowohl DNA-Einzelstränge als auch Doppelstränge elektrophoretisch aufgetrennt und dargestellt werden. Für die Elektrophorese werden Polyacrylamid-Gele benutzt, die unterschiedliche Zusätze enthalten können. Bei Verwendung von Harnstoff-Zusätzen migriert einzelsträngige DNA als überwiegend lineares Molekül durch das Gelmedium, so daß Moleküle v. a. nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Glycerin-Zusätze bewirken hingegen eine Auftrennung von Molekülen unter dem Gesichtspunkt ihrer Konformation. Dabei faltet sich einzelsträngige DNA aufgrund von intramolekularen Basenpaarungen auf komplexe Art und Weise. Schon ein minimaler Unterschied in der Nukleinsäure-Sequenz führt zu Veränderungen der molekularen Sekundärstruktur, die Laufzeit-Differenzen verursachen (Sambrook und Russell, 2001).

² Die Zusammensetzungen verwendeter Lösungen sind im Materialteil detailliert beschrieben.

Durchführung

- **Elektrophorese:** Jeweils 75 ml Gellösung wurden 220 μmol APS hinzugefügt, um die Polymerisation des Gels zu ermöglichen. Das noch flüssige Gel wurde zwischen zwei Glasplatten von 39 und 42 cm Länge und 33 cm Breite gegossen, die aufgrund von Abstandhaltern an ihren beiden Längsseiten einen Spalt von 0,35 mm Dicke zwischen sich faßten. Dort, wo die längere Platte überstand, wurde ein ebenfalls 0,35 mm dicker Kamm mit seiner glatten Seite in das Gel zwischen die Platten geschoben. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Kamm entfernt, der Glasplattensatz in die Halterung der Elektrophorese-Kammer geklemmt und die beiden Pufferkammern mit 1x-TBE-Puffer gefüllt. Der zuvor entfernte Haifischzahnkamm wurde nun mit seinen Zähnen voran in das Gel gesteckt, so daß Geltaschen entstanden. Auf 21 μl PCR-Produkt wurden 10 μl Formamid-Farbe gegeben, bevor sie fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und dann auf Eis gesetzt wurden. Je Probe wurden 5,0 μl dieses Ansatzes in die einzelnen Taschen pipettiert. Zusätzlich wurden 2,5 μl der „pBR322-DNA-Msp-I“-Gebrauchsverdünnung als Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde dann bei einer Leistung von 20 W (Glycerin-Gele) bzw. 30 W (Harnstoff-Gele) durchgeführt. Als Anhaltspunkt für die Laufweite der PCR-Produkte diente die Xylencyanol-Farbstoff-Bande. Sie sollte eine Strecke von mindestens 25 cm zurückgelegt haben. Sobald sie die gewünschte Höhe erreicht hatte, wurden die Platten voneinander getrennt.
- **Silberfärbung:** In einem auf das Gel geklemmten Holzrahmen (Maße: 33 x 38 cm) wurden die DNA-Banden mit Silber angefärbt: Zuerst wurde die DNA zehn Minuten mit 10 % (v/v) Ethanol und anschließend fünf Minuten lang mit 1,0 % (v/v) Salpetersäure fixiert. Dann wurde das Gel dreimal mit destilliertem Wasser gespült und zwanzig Minuten lang mit 12 mM Silbernitrat inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Spülen mit destilliertem Wasser wurden die angelagerten Silberionen mit einer Reduktionslösung sichtbar gemacht. Mit 10 % (v/v) Essigsäure wurde der Färbvorgang gestoppt, sobald die Banden ausreichend zu erkennen waren. Abschließend wurde das Gel noch einmal fünf Minuten lang mit destilliertem Wasser inkubiert, bevor es auf Papier übertragen („blotting“) und unter Zuhilfenahme einer Vakuumpumpe zwei Stunden lang auf einem Trockner bei 75 °C getrocknet wurde.

2.2.6 DNA-Sequenzierung mit der Didesoxymethode nach Sanger

Prinzip

Zunächst wird der zu sequenzierende DNA-Abschnitt durch die PCR-Technik in Anwesenheit von sog. M13-Sequenz-Primern vervielfältigt. Entweder wird dies durch eine Primär-PCR erreicht, deren Primer an ihren Enden zusätzlich eine M13-Sequenz tragen, oder ein PCR-Produkt wird in ein Vektorplasmid kloniert, das diese M13-Sequenzen enthält. Für jede Probe werden dann parallel vier Reaktionen mit den Desoxynukleotiden dATP, dTTP, dGTP und dCTP im Rahmen einer Sequenzreaktion durchgeführt. Die vier Ansätze unterscheiden sich voneinander dadurch, daß sie zusätzlich jeweils eines der vier Didesoxynukleotide ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP enthalten. Diese besitzen keine 3'-Hydroxylgruppe und führen deshalb beim zufälligen Einbau zum Syntheseabbruch. Jeder der vier Ansätze erhält dadurch in der Sequenzreaktion DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die entweder mit Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin enden und elektrophoretisch in einem Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt werden können (Sanger et al., 1977). Der Sequenzreaktions-Primer, der an die M13-Sequenz bindet, ist an seinem 5'-Ende fluoreszenzmarkiert und wird am Ende der Elektrophorese von einem Laser angeregt. Ein Computer registriert die verschiedenen Fragmente der Reihe nach und rekonstruiert die DNA-Sequenz (Knippers, 2001).

Durchführung

- **Aufreinigung von PCR-Produkten:** Zur Aufreinigung der Produkte aus der Primär-PCR wurde das „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Kit der Firma „Macherey-Nagel“ verwendet. Ein Gemisch aus 20 µl Primär-PCR-Produkt, 80 µl destilliertem Wasser und 400 µl „NT2“-Puffer wurde gründlich durchmischt, zentrifugiert und auf eine Säule gegeben. Durch einminütige Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde die Bindung der DNA an die Säulenmembran bewirkt und danach das Eluat verworfen. Anschließend wurde die DNA einmal mit 600 µl und zweimal mit 200 µl „NT3“-Ethanol-Puffer gewaschen, und zwar jeweils durch einminütige Zentrifugation bei 14.000 rpm. Beim letzten Waschschrift wurde zwei Minuten lang zentrifugiert, um die Ethanol-Reste möglichst vollständig von der Membran zu entfernen. Schließlich wurde die gewaschene DNA mit 25 µl „NE“-Puffer eine Minute lang bei 14.000 rpm aus der Säulenmembran eluiert und in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefan-

gen. Mittels der Agarose-Gel-Elektrophorese wurde die Qualität des gewaschenen Produktes überprüft.

- **Sequenzreaktion:** Für die Sequenzreaktion wurde das „SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC“ der Firma „Epicentre“ benutzt. Für jede Probe wurden je 2,0 µl des „termination mix A, T, G, C“ auf Eis vorgelegt, das jedes der vier Desoxynukleotide dATP, dTTP, dGTP und dCTP in einer Konzentration von 45 µM enthielt. Die Konzentration der „falschen“ Nukleotide in dem nach ihnen benannten „termination mix“ betrug 450 µM (ddATP in „mix A“ bzw. ddTTP in „mix T“), 30 µM (ddGTP in „mix G“) oder 300 µM (ddCTP in „mix C“). Anschließend wurde das folgende Gemisch auf Eis vorbereitet und mit Aqua ad iniectabilia auf ein Gesamtvolumen von 17 µl gebracht:

- 7,2 µl „3,5x-SequiTherm EXCEL II Sequencing Buffer“
- 0,3 µl 100 % DMSO
- 3,0 µl PCR-Produkt bzw. 6,8 µl „Mini-Präp“-DNA
- 0,7 pmol „IRD-800“-markierter UNI- oder REV-Primer
- 5,0 U „SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase“.

Je 4,0 µl des durchmischten und zentrifugierten Gemisches wurden auf die vorgelegten 2,0 µl des „termination mix A, T, G, C“ gegeben, zentrifugiert und durchliefen dann auf dem „Biomtra UNO II“-Cycler folgendes Programm (Heizdeckeltemperatur = 104 °C): fünf Minuten Prä-Denaturierung bei 94 °C, 30 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 30 Sekunden „annealing“ bei 60 °C und eine Minute „extension“ bei 72 °C, abschließende Abkühlung auf 4,0 °C bis zur Herausnahme der Reaktionsgefäße aus dem Cycler. Nach dem Ende der Sequenzreaktion wurden die Gefäße auf Eis gesetzt, sofort mit 3,0 µl „stop solution“ überschichtet, kurz zentrifugiert, zum Schutz vor Licht in Aluminiumfolie gepackt und bei -20 °C eingefroren.

- **Sequenzierung:** Die Sequenzierungen wurden am „DNA Sequencer Long ReadIR 4200“ der Firma „LI-COR“ durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden dazugehörige Glasplatten von 41 cm Länge und Abstandhalter von 0,20 mm Dicke mit Hilfe von Schienen („rails“) zusammengesetzt. Das Gel wurde mit 45 ml 5,5 % Sequenzier-Gel-Lösung und 130 µmol APS gegossen. Auf den eingesetzten 0,20-mm-Kamm wurde mittels einer Gußplatte („casting plate“) Druck ausgeübt, um ein späteres Aufschwimmen des Kamms zu verhindern. Nach erfolgter Polymerisation des Gels wurde die Gußplatte gegen eine Pufferkam-

mer getauscht, die Platten mit Wasser und 100 % Ethanol gereinigt und in das Sequenzier-Gerät gehängt. Die Pufferkammern wurden mit 1x-TBE-Puffer gefüllt, der Kamm umgedreht und jeweils 1,0 µl Produkt der Sequenzreaktion in die Taschen des Gels pipettiert. Die Produkte wurden vor dem Auftragen fünf Minuten lang bei 95 °C denaturiert und danach auf Eis gesetzt. Die Gel-Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 2.000 V und die Fluoreszenzmessung bei 800 nm Wellenlänge durchgeführt. Mit Hilfe des Computerprogramms „e-Seq V2.0“ wurde das erhaltene Elektrophorese-Ergebnis ausgewertet, in entsprechende SCF-Dateien umgewandelt und zum Schluß in dieser Form mit dem Programm „SeqWorks! V1.01 beta“ analysiert. Dabei wurden die erhaltenen Sequenzen mit den entsprechenden Datenbank-Sequenzen abgeglichen.

2.2.7 Klonierung

Prinzip

Die Klonierung ermöglicht die Auftrennung eines Gemisches von unterschiedlichen DNA-Molekülen in seine einzelnen Bestandteile sowie deren Vervielfältigung. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, die voneinander zu trennenden DNA-Moleküle in Vektorplasmide einzubauen, um sie dann von Bakterien vermehren zu lassen. Durch einen Überschuß von Bakterien gegenüber DNA wird erreicht, daß jedes Bakterium nur jeweils ein Vektorplasmid erhält. Nach Verteilung der Bakterien auf Ampicillin-Agar-Platten entstehen voneinander getrennte Kolonien. Die verwendeten „pCRII-TOPO“-Vektorplasmide besitzen unter anderem ein Gen für die Vermittlung einer Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin und ein Gen für das Enzym β -Galactosidase, das eine „X-Gal“-Verbindung in einen unlöslichen blauen Farbstoff umwandelt. Das Leseraster des β -Galactosidase-Gens wird durch den Einbau eines PCR-Produktes in das Vektorplasmid unterbrochen, so daß das Gen nicht mehr korrekt transkribiert werden kann. Folglich färben sich Bakterienkolonien mit einem Vektorplasmid ohne eingebauten PCR-Produkt blau, während Bakterienkolonien mit im Vektorplasmid eingebauten PCR-Produkt weiß bleiben. Dieses Verhalten wird als „Blau-Weiß-Selektion“ bezeichnet. Bakterienkolonien ohne Aufnahme eines Vektorplasmids können wegen der fehlenden Resistenzvermittlung nicht auf einem Ampicillin-Agar wachsen (Knippers, 2001). Aus weißen Bakterienkolonien werden die Plasmid-DNA-Moleküle schließlich wieder extrahiert. Die einzelnen PCR-

Produkte können nach enzymatischer Abspaltung von den Plasmid-Vektoren mittels Agarose-Gel-Elektrophorese dargestellt werden.

Durchführung

In dieser Arbeit wurde das „TOPO TA Cloning Kit Dual Promoter“ der Firma „Invitrogen“ mit dazugehörigen chemisch kompetenten „TOP10“-E.-coli-Zellen verwendet, um ein Gemisch verschiedener Spleißvarianten des Aprataxin-Gens aus fetaler cDNA aufzutrennen.

- **Vorbereitung der Agar-Platten:** Zunächst wurde 1,0 l Luriani-Bertani-Medium mit 15 g „Select-Agar“ versehen und bei einer Temperatur von 121 °C zwanzig Minuten lang im Autoklaviergerät sterilisiert. Nach Abkühlung auf 55 °C wurden 50 mg Ampicillin hinzugegeben und jeweils 25 ml dieser Lösung in Petrischalen gegossen. Auf dem erst erkalteten und dann wieder auf 37 °C erwärmten Agar wurden anschließend jeweils 40 µl „X-Gal“-Lösung ausplattiert und bei 37 °C fünfzehn Minuten getrocknet.
- **Ligation:** Der Ansatz aus 4,0 µl PCR-Produkt, 1,0 µl „salt solution“ und 1,0 µl „TOPO vector“ wurde fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.
- **Transformation:** 2,0 µl des Ligationsansatzes wurden auf die angetauten E.-coli-Zellen gegeben, die danach erst 30 Minuten lang auf Eis und dann 30 Sekunden lang bei 42 °C im Wasserbad inkubiert wurden. Sie wurden anschließend sofort wieder auf Eis gesetzt. 250 µl auf Raumtemperatur erwärmtes „SOC“-Medium wurden hinzugegeben, bevor der Ansatz für eine Stunde bei 200 rpm und 37 °C auf einen Schüttelblock gestellt wurde. Danach wurden 50 µl des Ansatzes auf einer Agarplatte ausplattiert. Diese Agar-Platte wurde über Nacht bei 37 °C bebrütet.
- **Auswahl der Kolonien:** Weiße Bakterienkolonien wurden mit autoklavierten Zahnstochern punktförmig auf eine neue Agar-Platte überführt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank bebrütet.
- **Anzucht der Kolonien in Luriani-Bertani-Bouillon:** Ausgewählte Kolonien wurden in 5,0 ml autoklaviertes „LB“-Medium mit 250 µg Ampicillin geimpft und über Nacht bei 180 rpm und 37 °C im Schüttelinkubator angezogen.
- **Extraktion der Plasmid-DNA („Mini-Präparation“):** Zunächst wurden dreimal hintereinander jeweils 1,5 ml der „LB“-Bouillon einer Kolonie zwei Minuten lang bei 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment („pellet“) wurde infolge

gründlichen Durchmischens in 100 µl „HB1“-Lösung resuspendiert und zehn Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 µl „HB2“-Lösung aufgefüllt, durch Schwenken gemischt und schließlich fünf Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 170 µl „HB3“-Lösung und wiederholtem Schwenken wurde das entstandene Bakterienlysat erneut für zehn Minuten auf Eis inkubiert, bevor es abschließend zehn Minuten lang bei 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Der so entstandene Überstand wurde in ein neues Gefäß mit 100 µl Phenol und 100 µl Chloroform pipettiert, durch Schwenken vermischt und zwei Minuten lang bei 14.000 rpm zentrifugiert. Von den beiden so erzeugten Phasen wurde die obere in ein neues Gefäß mit 1,0 ml 100 % Ethanol pipettiert. Dieser Ansatz wurde geschwenkt und bei -20 °C eine Stunde lang inkubiert. Durch eine anschließende fünfminütige Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde ein Sediment gewonnen, das durch erneutes Schwenken in 500 µl 70 % Ethanol gewaschen wurde, bevor wie zuvor zentrifugiert wurde. Zum Trocknen des Sediments wurde der Überstand mit einer Pipette sorgfältig abgezogen und das Sediment nicht länger als fünf Minuten unter Verdampfen des restlichen Ethanols auf einem Heizblock getrocknet. Für mindestens eine Stunde wurde es im Anschluß daran im Kühlschrank zusammen mit 1,0 ml 1,5 % (w/v) RNase inkubiert.

- **Restriktion und Elektrophorese:** Zum Herausschneiden des PCR-Produktes aus dem Vektorplasmid wurden 5,0 µl Plasmid-DNA und 5,0 µl Restriktionsgemisch, bestehend aus 20 % (v/v) „EcoRI“-10x-Puffer und 500 U „EcoRI“-Enzym, vermischt und zentrifugiert. Anschließend wurde das Gemisch für drei Stunden auf einem Heizblock bei 37 °C inkubiert. Nach der Restriktion wurden die Fragmente mit Hilfe einer Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

2.2.8 Haplotypanalyse

Prinzip

Unter Haplotypen versteht man Kombinationen von Allelen auf einem Chromosom. Sie können erstellt, verglichen und rekonstruiert werden, wenn mehrere, miteinander verwandte Personen auf ihre Allele hin untersucht werden. Dazu werden im Rahmen einer PCR Primer-Paare eingesetzt, die im Bereich von sogenannter Mikrosatelliten-DNA binden. Unter Mikrosatelliten-DNA versteht man Sequenzen von einigen wenigen Basenpaaren, die im Genom in mehrfacher Kopie direkt hintereinander vorkommen. Mikrosatelliten-DNA ist hoch polymorph, d. h. die

Anzahl der Kopien unterliegt einer ausgeprägten interindividuellen Variabilität. Deshalb werden Mikrosatelliten als DNA-Marker bezeichnet (Knippers, 2001). Die Produkte einer PCR im Bereich eines DNA-Markers werden in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluoreszenz nachgewiesen.

Durchführung

Für die Haplotypanalyse im Bereich des Aprataxin-Gens wurden die in Tabelle 6 aufgeführten DNA-Marker verwendet. Nach Angaben der „NCBI“-Datenbank „Map Viewer Build 34 Version 1“ erstreckt sich das Aprataxin-Gen über den Bereich der Basenpaare 32.962.609 - 32.991.626 von Chromosom 9.

| DNA-Marker-Nr. | Mikrosatellit | „Sequence-Map-Position“ auf Chromosom 9 (in bp) | Entfernung vom Aprataxin-Gen (in bp) |
|----------------|---------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|
| D9S1118 | GATA-“repeat“ | 31.915.342 - 31.915.500 | - 1.047.109 |
| D9S304 | GATA-“repeat“ | 32.314.016 - 32.314.180 | - 648.429 |
| D9S1788 | AC-“repeat“ | 33.125.842 - 33.125.975 | + 134.216 |
| D9S1845 | AC-“repeat“ | 33.146.914 - 33.147.188 | + 155.288 |
| D9S1817 | AC-“repeat“ | 33.849.625 - 33.849.887 | + 857.999 |

Tabelle 6: DNA-Marker für die Aprataxin-Haplotypanalyse („NCBI“-Datenbank „UniSTS“).

Die PCR-Produkte wurden mit jeweils 10 µl Formamid-Ladepuffer überschichtet und dann bei -20 °C eingefroren. Das Vorgehen bei der Elektrophorese entsprach dem bei der Sequenzierung, allerdings ergaben sich dabei folgende Abweichungen: Die Länge der Glasplatten betrug 25 cm, die Abstandhalter- und Kammdicke 0,40 mm. Das Gel wurde mit 30 ml einer 6,0 % Acrylamid-Gel-Lösung und 79 µmol APS gegossen. In die Taschen des Gels wurden von jeder Probe 1,5 µl denaturiertes PCR-Produkt pipettiert, sowie zusätzlich 1,5 µl des im Verhältnis 1:5 verdünnten „LI-COR Size Standard IRDye 800“. Die vorgegebene Elektrophorese-Spannung betrug 1.500 V. Nach der Elektrophorese wurde eine vom Computer erstellte Abbildung des Gels ausgedruckt und ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsuche im Frataxin-Gen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Frataxin-Exons 1-4 sowie beide Exon 5-Varianten in vierzehn ausgewählten DNA-Proben untersucht. Dazu wurden sie mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert. Der PCR-Erfolg wurde mittels einer Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft und anschließend eine SSCP-Analyse sowohl mit Glycerin- als auch mit Harnstoff-Gelen durchgeführt. Es ergab sich jeweils eine Auffälligkeit in Exon 1 (Positiv-Kontrolle), Exon 4 (Probe 7024) und Exon 5a (Probe 8562). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und 8 zusammengefaßt.

| Proben-Nr. | Ergebnisse der SSCP-Analyse im Frataxin-Gen |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Negativ-Kontrolle | keine Auffälligkeiten |
| Positiv-Kontrolle | Einzel- und Doppelstrang von Exon 1 auf Harnstoff-Gel auffällig |
| 8562 | Doppelstrang von Exon 5a auf Glycerin- und Harnstoff-Gel auffällig |
| 9199 | keine Auffälligkeiten |
| 9200 | keine Auffälligkeiten |
| 9202 | keine Auffälligkeiten |
| 5632 | keine Auffälligkeiten |
| 7024 | Doppelstrang von Exon 4 auf Harnstoff-Gel auffällig |

Tabelle 7: Ergebnisse der SSCP-Analyse des Frataxin-Genes bei den Kontrollproben und bei den Proben mit Heterozygotie für die „repeat“-Expansion in Intron 1.

Die Positiv-Kontrollprobe, Probe 7024 und Probe 8562 wurden in den auffälligen Exons sequenziert. Zusätzlich wurden die vier in der SSCP-Analyse unauffällig gebliebenen DNA-Proben mit Heterozygotie für die GAA-Expansion in den sechs kodierenden Exons des Frataxin-Genes sequenziert. Jede der Proben wurde sowohl in Vorwärts- als auch in Rückwärts-Richtung (bidirektional) sequenziert. Abweichungen von der in der „NCBI“-Datenbank „Nucleotide“ veröffentlichten Sequenz U43747 konnten in den drei DNA-Proben nachgewiesen werden, die zuvor in der SSCP-Analyse auffällig gewesen waren (Tab. 9).

| Proben-Nr. | Ergebnisse der SSCP-Analyse im Frataxin-Gen |
|------------|---------------------------------------------|
| 9173 | keine Auffälligkeiten |
| 9348 | keine Auffälligkeiten |
| 9237 | keine Auffälligkeiten |
| 3948 | keine Auffälligkeiten |
| 6418 | keine Auffälligkeiten |
| 7383 | keine Auffälligkeiten |
| 9149 | keine Auffälligkeiten |
| 3431 | keine Auffälligkeiten |

Tabelle 8: Ergebnisse der SSCP-Analyse des Frataxin-Gens bei den Proben ohne „repeat“-Expansion in Intron 1.

Bei der Positiv-Kontrollprobe wurde im Bereich des Start-Codons in Exon 1 auf einem der beiden Allele eine Mutation des Guanins zu Thymin nachgewiesen. Diese Veränderung der Triplet-Seqenz von ATG zu ATT bedingt den Aminosäureaustausch M1I³.

Probe 7024 ist heterozygot für einen Basenaustausch von Cytosin gegen Guanin in Exon 4 an Position 963 der Datenbank-Sequenz. Das betroffene Basentriplett AAC ist folglich auf einem der beiden Allele durch das Triplett AAG ersetzt, was einen Aminosäureaustausch von Asparagin gegen Lysin bewirkt: N146K. Der Vater von Patientin 7024 ist ebenfalls heterozygot für die Punktmutation c.963C>G, die Mutter hingegen ist heterozygot für die „repeat“-Expansion in Intron 1 des FRDA-Locus.

Probe 8562 (SSCP in Abb. 1) ist hingegen heterozygot für einen Basenaustausch von Guanin gegen Thymin in Exon 5a an Position 1082 (Abb. 2). Die Veränderung des betroffenen Basentriplets von CTG zu CGG führt zu einem Aminosäureaustausch von Leucin gegen Arginin: L186R. Die Punktmutation c.1082G>T findet sich auch in heterozygoter Form bei der Mutter von Patient 8562, während der Vater Heterozygotie für die „repeat“-Expansion in Intron 1 des Frataxin-Gens zeigt.

³ Die Nomenklatur identifizierter Mutationen folgt in dieser Arbeit den in der Genetik üblichen Regeln (Dunnen und Antonarakis, 2001).

| Proben-Nr. | Nukleotid-Austausch | Mutations-Bezeichnung |
|-------------------|---------------------|-----------------------|
| Positiv-Kontrolle | c.528G>T | M1I |
| 8562 | c.1082G>T | L186R |
| 9199 | (-) | (-) |
| 9200 | (-) | (-) |
| 9202 | (-) | (-) |
| 5632 | (-) | (-) |
| 7024 | c.963C>G | N146K |

Tabelle 9: Ergebnisse der Sequenzierung des Frataxin-Gens.

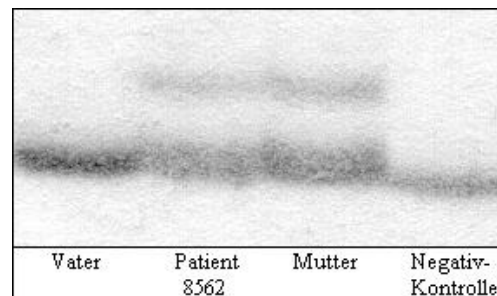


Abbildung 1: SSCP-Gel von Exon 5a des Frataxin-Gens. Patient 8562 und seine Mutter zeigen ein auffälliges Bandenmuster im Vergleich zur Kontrollprobe. Das Bandenmuster des Vaters ist hingegen unauffällig.

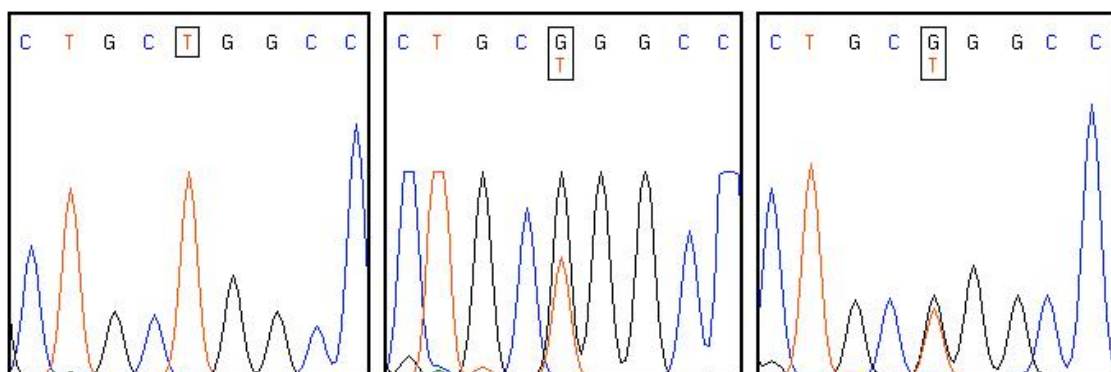


Abbildung 2: Ausschnitt aus der Sequenz von Exon 5a des Frataxin-Gens bei Patient 8562 und seinen Eltern. Während der Vater (links) an der fraglichen Stelle ein Thymin-Signal zeigt, sind Patient 8562 (Mitte) sowie seine Mutter (rechts) heterozygot für einen Basenaustausch von Thymin gegen Guanin.

3.2 Mutationssuche im Aprataxin-Gen

Bei den ausgewählten 165 Ataxie-Patienten wurde nach Veränderungen der Aprataxin-Exons 1-8 gesucht. Diese wurden mittels der PCR-Technik amplifiziert und das Ergebnis mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese geprüft. Für die Mutationssuche wurden einige Proben jedes Exons auf Polyacrylamid-Gele mit Glycerin aufgetragen. Waren die Banden nach ihrer Anfärbung für eine sichere Beurteilung ihrer Laufweite ausreichend scharf, wurden alle Proben nur unter Verwendung von Glycerin-Gelen untersucht. Andernfalls wurden einige Proben des betreffenden Exons zusätzlich in Polyacrylamid-Gelen mit Harnstoff aufgetrennt. Die Gellösung, mit der sich eine bessere Bandenschärfe erzielen ließ, wurde dann für die Untersuchung aller Proben im jeweiligen Exon benutzt. Aus diesem Vorgehen ergab sich die Verwendung von Glycerin-Gel für die Aprataxin-Exons 1-7. Für das Aprataxin-Exon 8 wurde Harnstoff-Gel benutzt. Die auffälligen Proben sowie unauffällige Kontrollproben wurden sowohl vorwärts als auch rückwärts sequenziert und mit den entsprechenden Sequenzen der „Ensembl“-Datenbank (ENST259603 und ENST309615) verglichen.

3.2.1 Mutation im Aprataxin-Exon 7

Die SSCP-Analyse von Aprataxin-Exon 7 zeigte bei den Proben der nicht-verwandten Patienten 5466 und 7689 eine Auffälligkeit. An den Produkten der Primär-PCR wurde eine „nested“-PCR durchgeführt. Bei der anschließenden bidirektionalen Sequenzierung zeigte sich schließlich Homozygotie für den Basenaustausch von Guanin gegen Adenin an Position 903 der cDNA-Sequenz nach ENST259603. Dadurch wird das 293. Triplet zu einem TGA-Stop-Codon. Auf Proteinebene ergibt sich die Mutationsbezeichnung W293X. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Die Untersuchung der Eltern und der Schwester des Patienten 5466 ergab nach SSCP-Analyse (Abb. 3) und Sequenzierung (Abb. 4), daß beide Eltern jeweils heterozygot für c.903G>A sind, während die Schwester wie ihr Bruder homozygot von dieser Punktmutation betroffen ist.

| Proben-Nr. | SSCP-Analyse-Ergebnisse | Sequenzierungs-Ergebnisse |
|------------|-------------------------------------------|---------------------------|
| 5466 | längere Laufstrecke der DNA-Einzelstränge | c.903G>A (W293X) |
| 7689 | längere Laufstrecke der DNA-Einzelstränge | c.903G>A (W293X) |
| 8419 | unauffällige Kontrolle | c.903G (Wildtyp) |

Tabelle 10: Ergebnisse der SSCP-Analyse und Sequenzierung in Aprataxin-Exon 7.

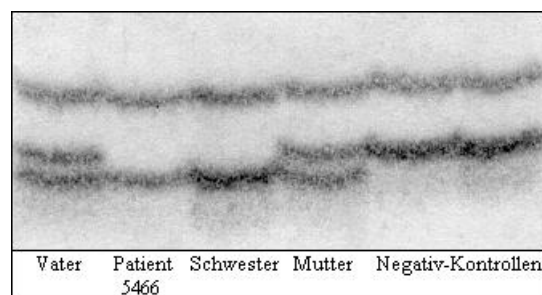


Abbildung 3: SSCP-Gel von Aprataxin-Exon 7. Patient 5466 und seine Schwester sind homozygot für eine Veränderung, für die beide Elternteile heterozygot sind.

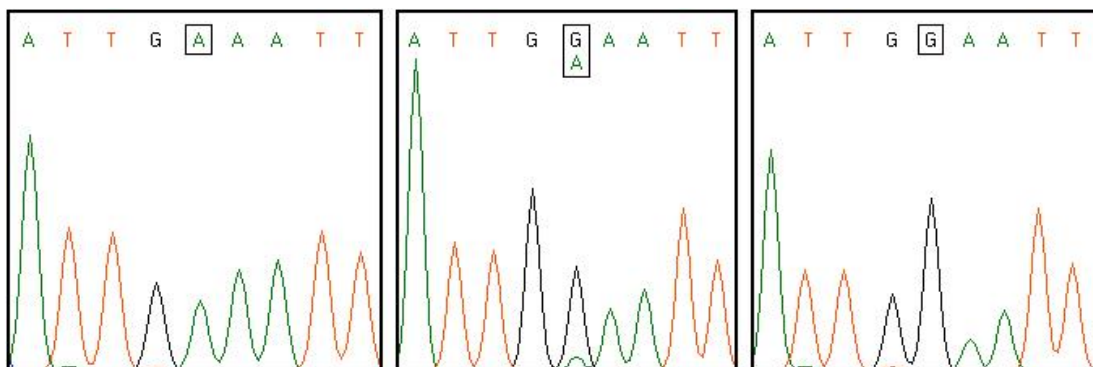


Abbildung 4: Ausschnitt aus der Sequenz von Exon 7 des Aprataxin-Gens bei Patient 5466 und seiner Mutter. Der Betroffene (links) ist im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (rechts) homozygot für einen Austausch von Adenin gegen Guanin. Die Mutter (Mitte) ist für den Basenaustausch heterozygot.

3.2.2 Haplotypanalyse für die Patienten mit der Mutation W293X

Fraglich war, ob Patient 5466, seine Schwester und Patient 7689 einen gemeinsamen Haplotyp für die Mutation W293X tragen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine Haplotypanalyse durchgeführt. Die DNA-Proben zweier „CEPH“-Kontrollen (1331-1, 1332-2), die der Familie des ersten Patienten und die des zweiten Patienten wurden mit den fünf DNA-Markern D9S1118, D9S304, D9S1788, D9S1845 und D9S1817 untersucht. Patient 5466 sowie seine Schwester weisen jeweils die beiden folgenden Haplotypen (Allele in der oben genannten Marker-Reihenfolge) auf: 1/4/2/5/2 (von der Mutter geerbt) und 4/1/1/6/8 (vom Vater geerbt). Patientin 7689 trägt im Bereich der DNA-Marker D9S304, D9S1788 und D9S1817 Allele in homozygoter Form. Im Bereich der Marker D9S1118 und D9S1845 finden sich hingegen jeweils unterschiedliche Allele. Mangels Verfügbarkeit der elterlichen DNA-Proben konnten die Allele von Patientin 7689 keinen eindeutigen Haplotypen zugeordnet werden. Unter der Voraussetzung, daß einer ihrer Haplotypen identisch mit dem Haplotyp 1/4/2/5/2 von Patient 5466 ist, würde sich für den anderen Haplotyp die Allel-Kombination 2/4/2/4/2 ergeben. Die Resultate der Haplotypanalyse sind in Abbildung 5 veranschaulicht.

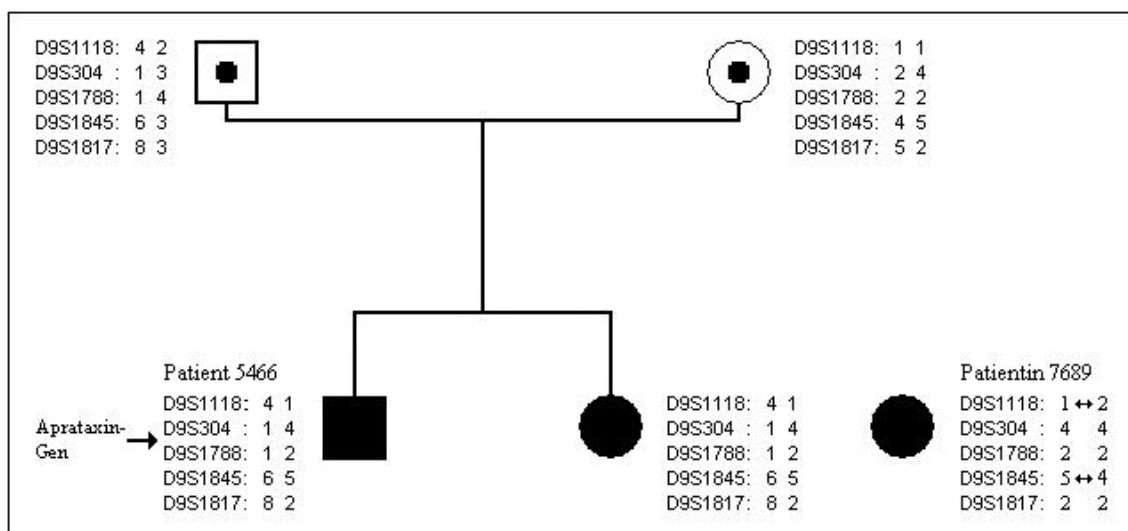


Abbildung 5: Haplotypanalyse für Patient 5466, dessen Familie und Patientin 7689. Die Geschwister, die homozygote Träger der Mutation W293X sind, zeigen zwei verschiedene Haplotypen. Patientin 7689 stimmt im Bereich der Marker D9S304 und D9S1788 mit einem dieser Haplotypen überein.

3.2.3 Veränderung im Aprataxin-Exon 4

Im Aprataxin-Exon 4 wurde bei den DNA-Proben der drei Patienten 4520, 4965 und 6479, die in der SSCP-Analyse zusätzlich zum Wildtyp-Bandenmuster zwei weitere Einzelstrangbanden aufwiesen (Abb. 6), Heterozygotie für die Punktmutation von Cytosin zu Adenin an Position 497 der cDNA-Sequenz nach ENST259603 nachgewiesen. Dies führt auf dem betroffenen Allel zum Austausch der Aminosäure Serin gegen Tyrosin: S158Y. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse und der Sequenzierung sind in Tab. 11 zusammengefasst. Um Mutationen in den Exons des nicht betroffenen Allels auszuschließen, wurden die drei Proben mit der Mutation S158Y in den übrigen sieben Aprataxin-Exons sequenziert. Hier ließen sich keine weiteren Veränderungen nachweisen.

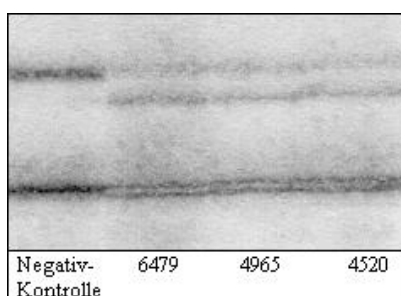


Abbildung 6: SSCP-Gel von Aprataxin-Exon 4 bei den drei Patienten mit Heterozygotie für S158Y.

| Proben-Nr. | SSCP-Analyse-Ergebnisse | Sequenzierungs-Ergebnisse |
|------------|----------------------------------|---------------------------|
| 4520 | 4 Einzelstrangbanden | c.497C>A (S158Y) |
| 4965 | 4 Einzelstrangbanden | c.497C>A (S158Y) |
| 6479 | 4 Einzelstrangbanden | c.497C>A (S158Y) |
| 7645 | 2 Einzelstrangbanden (Kontrolle) | c.497C (Wildtyp) |
| 8349 | 2 Einzelstrangbanden (Kontrolle) | c.497C (Wildtyp) |

Tabelle 11: Ergebnisse der SSCP-Analyse und Sequenzierung in Aprataxin-Exon 4.

3.2.4 Veränderung im Aprataxin-Intron 4

Die SSCP-Analyse von Exon 5 zeigte drei verschiedene Einzelstrangmuster. Es wurden jeweils zwei Proben mit gleichem Bandenmuster sequenziert. Mit Hilfe der Sequenzierung konnte in Aprataxin-Intron 4 an Position -12 vor Exon 5 eine Veränderung innerhalb einer längeren Poly-T-Sequenz nachgewiesen werden. Die Proben 3425 und 3716 sind an der genannten Stelle homozygot für Guanin: 5'...TGT...-3'. Die Proben 3249 und 9245 besitzen an der fraglichen Stelle keinerlei Unterbrechung der Poly-T-Sequenz durch Guanin: 5'...TTT...-3'. Bei den Proben 2998 und 9286 zeigte sich an Position -12 Heterozygotie für Guanin und Thymin. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse findet sich in Tabelle 12. Die Veränderung ist als „single nucleotide polymorphism“ in der „NCBI“-Datenbank „LocusLink“ unter „SNP-Cluster-ID rs1981011“ publiziert. Insgesamt weisen von den 165 in dieser Arbeit untersuchten Proben 64 das SSCP-Bandenmuster von Genotyp Wt/Wt, zwanzig das von Genotyp Mut/Mut und 81 das des heterozygoten Genotyps Wt/Mut auf.

| Proben-Nr. | SSCP-Analyse-Ergebnisse | Sequenzierungs-Ergebnisse | Benennung |
|------------|------------------------------------|---------------------------|-----------|
| 3425, 3716 | zwei „langsame“ Einzelstrangbanden | g.IVS4-12G | Wt/Wt |
| 3249, 9245 | zwei „schnelle“ Einzelstrangbanden | g.IVS4-12T | Mut/Mut |
| 2998, 9286 | vier Einzelstrangbanden | g.IVS4-12G/T | Wt/Mut |

Tabelle 12: Ergebnisse der SSCP-Analyse und Sequenzierung in Aprataxin-Intron 4.

3.3 Isolierung von Aprataxin-Transkripten

In Abbildung 7 sind die beiden vor Beginn der Arbeit bereits bekannten Transkripte des Aprataxin-Gens schematisch dargestellt. Das 3'-Ende der Bereiche mit einem längeren offenen Leseraster ist in beiden Isoformen bis zum ersten Stop-Codon identisch.

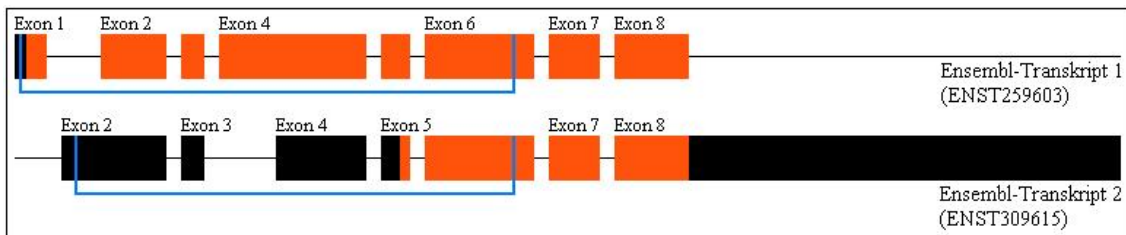


Abbildung 7: Schematische Darstellung der in der „Ensembl“-Datenbank veröffentlichten Transkripte des Aprataxin-Gens. Schwarze Bereiche werden transkribiert, aber nicht translatiert. Rote Bereiche werden sowohl transkribiert als auch translatiert. Der blaumarkierte Bereich wurde in dieser Arbeit amplifiziert.

Zum Nachweis alternativer Transkripte des Aprataxin-Gens wurden die ersten fünf bzw. sechs Exons aus cDNA, die dem Gehirn von zwölf kaukasischen Feten im Alter von 19-23 Wochen entstammte, amplifiziert. Für die Amplifikation wurden zwei verschiedene Vorwärts-Primer verwendet: Vorwärts-Primer VP-1 wurde in das Exon 1 des „Ensembl“-Transkriptes 1 gesetzt, Vorwärts-Primer VP-2 in das Exon 2 des „Ensembl“-Transkriptes 2. Als Rückwärts-Primer wurde ein in beiden Fällen identischer Primer verwendet, dessen komplementäre Sequenz in Exon 6 liegt. Die Auftrennung der Produkte beider PCR-Ansätze in der Agarose-Gel-Elektrophorese zeigte mehrere Banden (linkes Gel in Abb. 8). Die PCR-Produkte wurden kloniert. Nach Restriktion der extrahierten Plasmid-DNA ließen sich acht verschiedene Produkte in der Agarose-Gel-Elektrophorese nachweisen, von denen sieben in Abbildung 8 (rechtes Gel) dargestellt sind. Alle Produkte wurden doppelsträngig sequenziert.

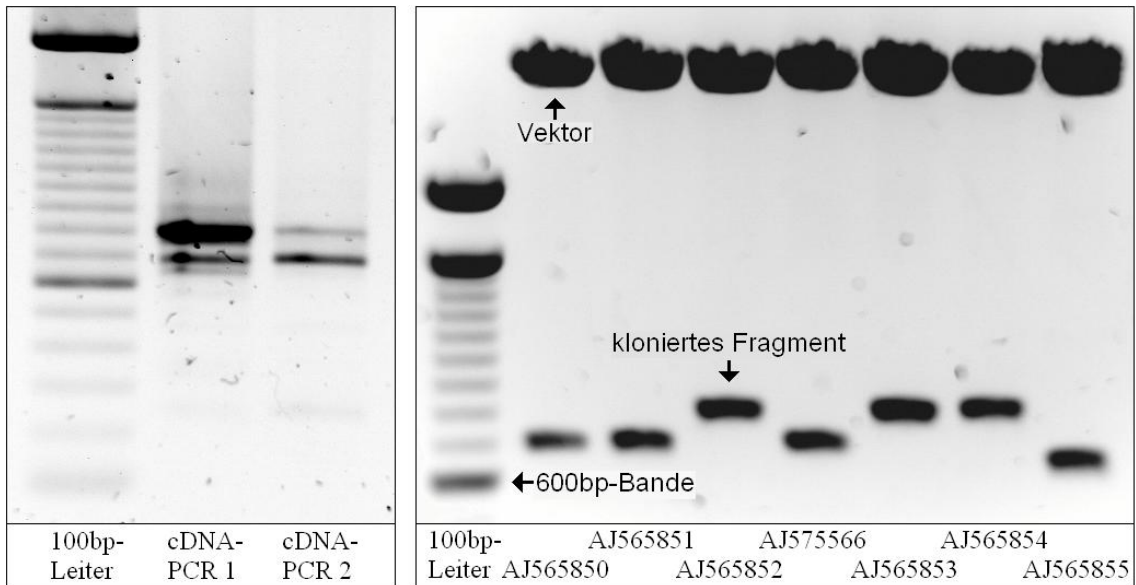


Abbildung 8: Elektrophoretische Auftrennung der Produkte aus den PCR auf cDNA-Ebene (links) und der klonierten Fragmente (rechts).

3.3.1 Transkripte mit Exon 1

Die Plasmid-DNA aus acht E.-coli-Kolonien mit Amplifikaten des Primers VP-1 wurde sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Sequenz des „Ensembl“-Transkriptes 1 (ENST259603) verglichen. Abweichend davon wurde für Exon 3 und 4 eine andere Grenze zugrunde gelegt: Die Basensequenz GTAG, die laut Datenbank am 3'-Ende von Exon 3 stehen soll, liegt nach den Daten der vorliegenden Arbeit am 5'-Ende von Exon 4. In Tabelle 13 und in Abbildung 9 sind die einzelnen Varianten mit Exon 1 aufgeführt. Die Proben sind mit den Zugangsnummern bezeichnet, unter denen sie in der „NCBI“-Datenbank „Nucleotide“ veröffentlicht wurden.

1. Drei Proben (**AJ565851**) fehlen im Vergleich zu Transkript 1 die ersten 115 Basenpaare von Exon 4. Das erste ATG-Codon, auf das ein längeres, bis Exon 8 offenes Leseraster folgt, liegt bei diesen Proben in Exon 5 (564 Basenpaare später als bei Transkript 1). Es fehlen ihnen am 5'-Ende 188 Triplets.
2. Eine Probe (**AJ565850**) unterscheidet sich von Transkript 1 durch das Fehlen der ersten fünf Basenpaare von Exon 3 und der ersten 115 Basenpaare von Exon 4. Das offene Leseraster ist identisch mit dem der Transkript-Variante AJ565851.

3. Vier Proben (**AJ565852**) unterscheiden sich vom Transkript 1 durch die Verkürzung von Exon 3 um die ersten fünf Basenpaare. Daraus ergibt sich der Beginn des offenen Leserasters in Exon 4, 306 Basenpaare (= 102 Triplets) später als bei Transkript 1.

| Transkript-Variante | Exon 1 (62 bp) | Exon 2 (219 bp) | Exon 3 (47 bp) | Exon 4 (303 bp) | Position des Start-Codons |
|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|
| AJ565850 | (+) | 83.-219. bp | 6.-47. bp | 116.-303. bp | Exon 5 |
| AJ565851 | (+) | 83.-219. bp | (+) | 116.-303. bp | Exon 5 |
| AJ565852 | (+) | 83.-219. bp | 6.-47. bp | (+) | Exon 4 |

Tabelle 13: Transkript-Varianten des Aprataxin-Gens mit Exon 1.

3.3.2 Transkripte mit vollständiger Exon-2-Sequenz

Von den Produkten der PCR mit Primer VP-2 wurden ebenfalls acht sequenziert. Die Sequenzen wurden mit der des „Ensembl“-Transkriptes 2 (ENST309615) verglichen. In Tabelle 14 und in Abbildung 9 sind die einzelnen Varianten mit vollständiger Exon-2-Sequenz aufgeführt.

1. Drei der sequenzierten Proben entsprechen exakt dem Transkript 2 mit Beginn des offenen Leserasters in Exon 5, 564 Basenpaare (= 188 Triplets) später als bei Transkript 1.
2. Eine weitere Probe (**AJ575566**) unterscheidet sich von Transkript 2 lediglich durch das Fehlen der ersten fünf Basenpaare von Exon 3, ohne daß dies die Länge des offenen Leserasters verändern würde.
3. Zwei Proben (**AJ565854**) weisen im Gegensatz zu Transkript 2 die gleichen 115 Basenpaare am Anfang von Exon 4 auf wie das Transkript 1. Das erste ATG-Codon liegt deshalb in Exon 2, 14 Triplets später als bei Transkript 1.
4. Eine Probe (**AJ565853**) umfaßt wie Transkript-Variante AJ565854 die vollständige Sequenz von Exon 4, zusätzlich fehlen ihr aber die ersten fünf Basenpaare von Exon 3. In der Konsequenz entsteht ein offenes Leseraster mit vorangehendem Start-Codon erst 306 Basenpaare (= 102 Triplets) später als bei Transkript 1.
5. Bei einer Probe (**AJ565855**) ist Exon 3 vollständig deletiert, die restliche Sequenz stimmt mit der des Transkriptes 2 überein. Im Vergleich zu Transkript-Variante AJ565854 fehlen

dieser Probe mitten im Bereich des offenen Leserasters 204 Basenpaare (= 68 Triplets). Das Leseraster wird dadurch nicht verschoben.

| Transkript-Variante | Exon 1 (62 bp) | Exon 2 (219 bp) | Exon 3 (47 bp) | Exon 4 (303 bp) | Position des Start-Codons |
|------------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------------------|
| „Ensembl“-Transkript 2 | (-) | (+) | (+) | 116-303 bp | Exon 5 |
| AJ565853 | (-) | (+) | 6-47 bp | (+) | Exon 4 |
| AJ565854 | (-) | (+) | (+) | (+) | Exon 2 |
| AJ565855 | (-) | (+) | (-) | 116-303 bp | Exon 2 |
| AJ575566 | (-) | (+) | 6-47 bp | 116-303 bp | Exon 5 |

Tabelle 14: Transkript-Varianten des Aprataxin-Gens mit vollständiger Exon-2-Sequenz.

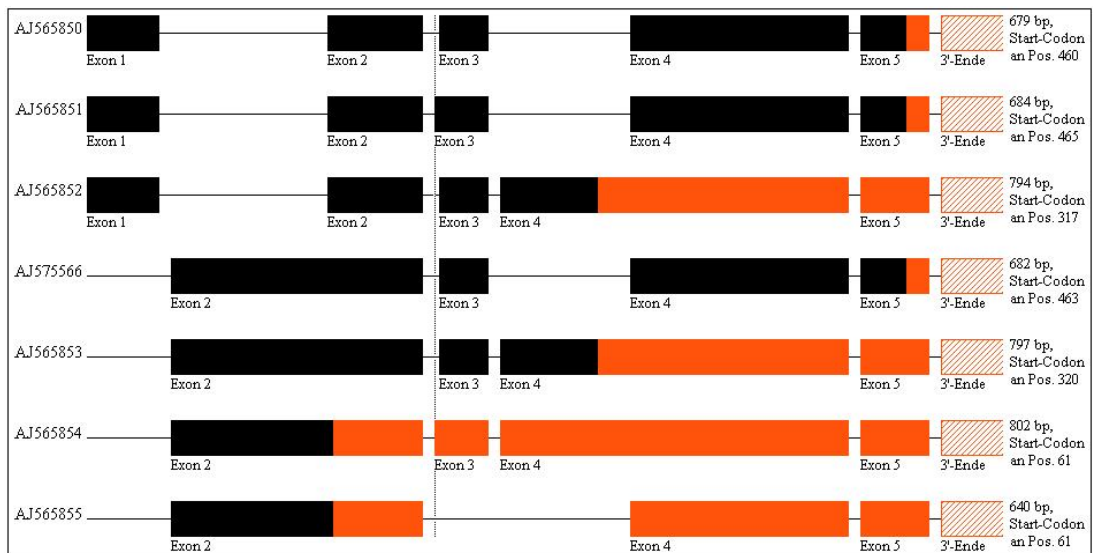


Abbildung 9: Alternative Aprataxin-Transkripte. Schwarze Bereiche werden transkribiert, aber nicht translatiert. Rote Bereiche werden sowohl transkribiert als auch translatiert. Bei den schraffierten Flächen handelt es sich um die verkürzte Darstellung der 3'-Exons.

4 Diskussion

4.1 Mutationssuche im Frataxin-Gen

4.1.1 Genotyp der Patienten 7024 und 8562

Im Rahmen der Mutationssuche im Frataxin-Gen wurden insgesamt vierzehn Patienten mit Verdacht auf eine Friedreich-Ataxie untersucht. Dabei wurde bei zwei Patienten ein heterozygoter Austausch von Aminosäuren („missense“-Mutation) nachgewiesen:

Patientin 7024 trägt die Mutation c.963C>G. Diese bewirkt den Austausch der Aminosäure Asparagin gegen Lysin an Position 146 der Aminosäurekette (N146K). Die Seitenkette von Asparagin trägt das Amid einer Carboxylgruppe, während Lysin eine Aminogruppe in seiner Seitenkette trägt.

Patient 8562 trägt die Mutation c.1082G>T. Diese bewirkt den Austausch von Leucin gegen Arginin an Position 186 (L186R). Leucin besitzt eine verzweigte aliphatische Seitenkette, Arginin eine Seitenkette mit einer Aminogruppe.

Beiden „missense“-Mutationen ist die Substitution einer Aminosäure mit ungeladener Seitenkette durch eine mit positiv geladener Seitenkette gemeinsam. Es ist anzunehmen, daß durch diese Unterschiede in der Ladung der Seitenketten ein Protein mit einer veränderten Tertiärstruktur entsteht, dessen physiologische Funktion auf diese Weise beeinträchtigt wird. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, daß die beiden vom Austausch betroffenen Aminosäuren phylogenetisch hochkonserviert sind („NCBI“-Datenbank „Nucleotide“, homologe Sequenzen des Frataxin-Gens bei *Mus musculus* (NM_008044) und *Rattus norvegicus* (XM_345012)).

Beide Patienten sind für ihre jeweilige Punktmutation heterozygot. Zudem zeigen sie auf jeweils einem Allel eine als pathologisch zu bezeichnende Expansion des GAA-Trinukleotidtripletts in Intron 1 des Frataxin-Gens. Fraglich war, ob die beiden Veränderungen auf verschiedenen Allelen lokalisiert sind. Es konnte gezeigt werden, daß die Eltern beider Patienten heterozygote Anlageträger der Friedreich-Ataxie sind: Der Vater von Patientin 7024 und die Mutter von Patient 8562 sind heterozygot für Punktmutationen (c.963 C>G bzw. c.1082G>T), während die Mutter von Patientin 7024 und der Vater von Patient 8562 heterozygote Träger

von „repeat“-Expansionen in Intron 1 des Frataxin-Gens sind. Jeder Elternteil hat seinem Kind ein Allel mit der Anlage zur Friedreich-Ataxie vererbt. Folglich müssen beide Veränderungen im Genom der Patienten auf unterschiedlichen Allelen lokalisiert sein. Auf diese Weise ist die klinische Verdachtsdiagnose der Friedreich-Ataxie molekulargenetisch bestätigt worden.

Die Tatsache, daß von sechs für die „repeat“-Expansion heterozygoten Ataxie-Patienten zwei eine „missense“-Mutation tragen, zeigt, daß bei dieser speziellen Patientengruppe Punktmutationen im Frataxin-Gen häufig sind. Das Vorliegen einer „repeat“-Expansion auf einem Allel sollte deshalb bei Patienten mit Verdacht auf eine Friedreich-Ataxie als Indikation für die Suche nach Punktmutationen angesehen werden.

4.1.2 Phänotyp der Patientin 7024

Bei Patientin 7024⁴ fiel im Alter von zwölf Jahren die Entwicklung einer Skoliose auf. Vier Jahre später äußerte sich zum ersten Mal eine Ataxie-Symptomatik, die sich in der Folgezeit progredient entwickelte. Bei einer klinischen Untersuchung im Alter von 31 Jahren zeigten sich folgende Symptome:

- distal betonte Muskelatrophie und Muskelparese an den Beinen, beidseitige Hohlfußstellung als Ausdruck der gleichzeitig bestehenden muskulären Hypotonie, Erlöschen sämtlicher Muskeleigenreflexe (**schlaffe Lähmung**)
- Einschränkung der Lageempfindung an den Zehengrundgelenken, Erlöschen des Vibrationsempfindens an den Fußknöcheln (**Sensibilitätsstörung**)
- leichte Dysarthrie, Intentionstremor, mangelhafte Fixationssuppression des vestibulo-okulären Reflexes (**cerebelläres Syndrom**)
- beidseitige Auslösbarkeit des Babinski-Reflexes (**positives Pyramidenbahnzeichen**).

⁴ Für die phänotypische Beschreibung der einzelnen Patienten wurde auf Briefe der behandelnden Ärzte zurückgegriffen.

Seit dem 25. Lebensjahr nutzte die Patientin Gehstützen, seit dem 27. Lebensjahr einen Rollstuhl. Inzwischen kann die Patientin nicht mehr selbständig gehen und stehen. Harding (1981) hatte das mittlere Alter, in dem für FRDA-Patienten ein Rollstuhl erforderlich wird, mit etwa 25 Jahren angegeben. Bis dahin sollte das Auftreten der ersten Krankheitssymptome, zu denen auch die Ausbildung einer Skoliose gehören könne, im Durchschnitt etwa sechzehn Jahre zurückliegen. Der Krankheitsverlauf bei Patientin 7024 paßt somit zu dem klinischen Bild der Friedreich-Ataxie.

4.1.3 Phänotyp des Patienten 8562

Patient 8562 entwickelte sich bis zum Alter von zwei bis drei Jahren psychomotorisch unauffällig, bevor ihm Bewegungsabläufe zunehmend Schwierigkeiten bereiteten. Im Alter von viereinhalb Jahren manifestierte sich bei ihm eine Kardiomyopathie, die aufgrund der Entwicklung von Komplikationen eine stationäre Aufnahme erforderlich machte. Zu diesem Zeitpunkt wurde sein Gangbild aufgrund einer bereits sehr ausgeprägten Gang- und Extremitätenataxie als breitbasig beschrieben. Unter einer gleichzeitig bestehenden Fußdeformität war zudem kein Hackengang möglich. Auch die Feinmotorik der Hände war von der Ataxie betroffen. Der Patellarsehnenreflex ließ sich nicht mehr auslösen. Auffällig am Krankheitsverlauf dieses Patienten ist die ungewöhnlich frühe Dekompensation der Kardiomyopathie. Es liegt deshalb nahe, von einem eher schweren Phänotyp auszugehen. Ein Therapieversuch mit der Substanz Idebenone hat bei ihm eine deutliche Linderung der kardialen Beschwerden bewirkt.

4.1.4 Verteilung der „missense“-Mutationen im Frataxin-Gen

In dieser Arbeit wurden „missense“-Mutationen in den Exons 4 und 5a des Frataxin-Gens identifiziert. Andere Arbeitsgruppen fanden „missense“-Mutationen in diesen beiden Exons und zusätzlich in Exon 3 (Abb. 10). Für die Exons 1 und 2 wurden bisher keine „missense“-Mutationen beschrieben. Die einzige Ausnahme bilden hierbei verschiedene Mutationen des Start-Codons, die aber nicht nur zum Austausch einer einzelnen Aminosäure führen. Sie verursachen einen weiter stromabwärts gelegenen Beginn der Translation, so daß dem Genprodukt eine

längere N-terminale Sequenz fehlt. Nach den Ergebnissen von Campuzano et al. (1997) ist diese u. a. für die mitochondriale Adressierung des Frataxins verantwortlich und somit von essentieller Bedeutung.

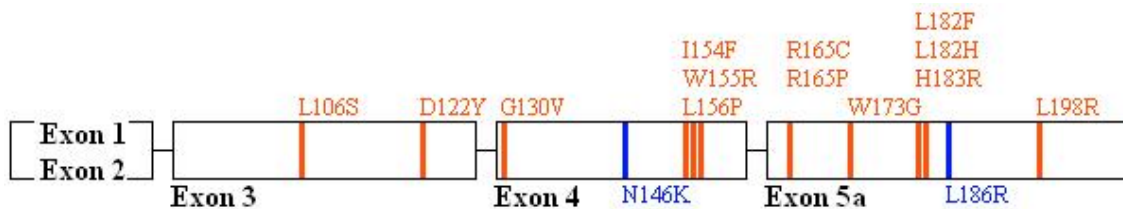


Abbildung 10: Darstellung der bisher beschriebenen „missense“-Mutationen im Frataxin-Gen. Rot markierte Mutationen entstammen der „Human Gene Mutation Database“. Die blaumarkierten Mutationen wurden im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. Die Exons 1 und 2 sind verkürzt dargestellt.

Nicht geklärt ist, warum die bekannten „missense“-Mutationen im engeren Sinne ungleichmäßig über das Frataxin-Gen verteilt sind. Rein statistisch müßte die Wahrscheinlichkeit für ein Mutationsereignis in allen Genabschnitten gleich groß sein. Die Beschränkung auf die letzten drei Exons könnte zum einen Zufall sein, zumal bisher erst dreizehn „missense“-Mutationen beschrieben wurden. Zum anderen wäre es denkbar, daß „missense“-Mutationen in den ersten beiden Exons so geringe Auswirkungen auf die Menge und Funktion des Frataxins haben, daß sie keinerlei Pathologie bewirken und deshalb unentdeckt bleiben. Da zahlreiche Mutationen des Start-Codons bei Patienten mit FRDA beschrieben wurden, scheidet eine Letalität aufgrund von „missense“-Mutationen in den Exons 1 und 2 bei „compound“-Heterozygoten als Erklärungsmöglichkeit aus.

4.1.5 Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei „compound“-Heterozygoten

In der Literatur wird die Frage diskutiert, ob sich die Friedreich-Ataxie bei den „compound“-heterozygoten Patienten anders manifestiert als bei den für die „repeat“-Expansion homozygoten Patienten. Vergleiche von Genotypen und Phänotypen könnten eventuell Hinweise auf die Prognose von „compound“-heterozygoten Patienten ergeben.

Sowohl durch „repeat“-Expansionen als auch durch „missense“-Mutationen wird die Funktion des Genproduktes Frataxin beeinträchtigt, wobei die Ursache auf verschiedenen Ebenen der

Genexpression zu suchen ist: Die Expansion des „repeats“ bewirkt wahrscheinlich aufgrund einer Inhibition der Transkription eine Reduktion der Frataxin-Menge (Bidichandani et al., 1998; Ohshima et al., 1998). Hingegen führt eine „missense“-Mutation im Frataxin-Gen möglicherweise zu einem in der Menge unveränderten, aber funktionell defizienten Frataxin. Fraglich ist, ob einer dieser beiden Mechanismen die Restmenge des funktionell wirksamen Frataxins stärker beeinträchtigt als der andere. In diesem Fall käme es wahrscheinlich zu unterschiedlich schweren Phänotyp-Ausprägungen. Drei verschiedene Möglichkeiten sind prinzipiell denkbar: Zum einen könnte, ähnlich wie bei den für die „repeat“-Expansion homozygoten Patienten, auch bei den „compound“-heterozygoten Patienten die Größe der „repeat“-Expansion negativ mit der Restmenge des Frataxins korrelieren. Zum anderen könnte die Ähnlichkeit der gegeneinander ausgetauschten Aminosäuren sowie ihre Lokalisation innerhalb des Proteins für das Ausmaß der Restaktivität des Genproduktes entscheidend sein. Des weiteren könnte es vom individuellen Einzelfall abhängen, ob entweder das Allel mit der „repeat“-Expansion oder das mit der „missense“-Mutation eine geringere Beeinträchtigung aufweist und die Restmenge des funktionell wirksamen Frataxins bestimmt.

- **Korrelation von „repeat“-Länge und Phänotyp:** Filla et al. (1996) beschrieben eine negative Korrelation von Größe des kleinsten „repeat“-Allels bei homozygoten Patienten und ihrem Alter bei Erstmanifestation. Für „compound“-heterozygote Patienten wurde diese Korrelation bisher nicht beschrieben. Eine Schwierigkeit bei der Überprüfung entsprechender Korrelationen besteht darin, daß aufgrund des in menschlichen Leukozyten vorkommenden somatischen Mosaiks die präzise Bestimmung der Größe von „repeat“-Expansionen kaum möglich ist (Hellenbroich et al., 2001).
- **„Zwei-Domänen-Hypothese“:** Cossée et al. (1999) postulierten, daß Frataxin aus mindestens zwei funktionellen Domänen bestünde: Dabei werde die N-terminale Domäne durch Exon 3 und einen kleinen Teil von Exon 4, die C-terminale Domäne durch Exon 5a und den größeren Teil von Exon 4 kodiert. Über die Bedeutung der Exons 1 und 2 trafen sie keine Aussage. In der N-terminalen Domäne gelegene „missense“-Mutationen (z. B. G130V) würden mildere Formen der FRDA verursachen als solche der C-terminalen Domäne (z. B. I154F). Die Art der gegeneinander ausgetauschten Aminosäuren hätte dagegen keinerlei Einfluß auf den Phänotyp. Diese Hypothese wird durch die von Bartolo et al. (1998) beschriebene L106S-Mutation in Exon 3 mit einem relativ milden FRDA-Phänotyp gestützt. Die beiden in der hier vorliegenden Arbeit beschriebenen Patienten weisen einen eher typischen FRDA-Phänotyp auf. Ihre Punktmutationen liegen im 3'-Bereich des Gens, der die C-terminale Domäne des Frataxins kodiert. Die Identifizierung weiterer Mutationen im Frata-

xin-Gen kann dazu beitragen, die Struktur und Funktion der vermuteten Frataxin-Domänen besser zu verstehen. Die Schwäche der „Zwei-Domänen-Hypothese“ liegt darin, daß sie lediglich die Lokalisation von „missense“-Mutationen innerhalb des Frataxin-Gens berücksichtigt. Die Art des Aminosäureaustausches wird dabei außer acht gelassen. Die geringe Zahl bisher publizierter „missense“-Mutationen läßt keine Formulierung statistisch signifikanter Aussagen zu.

- **Korrelation von „missense“-Mutation und Phänotyp:** Forrest et al. (1998) beschrieben eine Patientin mit der Mutation L182F und einem als relativ mild eingestuften FRDA-Phänotyp: Bei dieser Patientin manifestierte sich die FRDA im Alter von fünfzehn Jahren. Zwölf Jahre später konnte die Muskelschwäche in ihren Beinen noch als leicht bezeichnet werden. Der Patellarsehnenreflex war zu jenem Zeitpunkt ebenfalls noch auslösbar und das EKG zeigte nur geringe Veränderungen der T-Welle. Patient 8562 mit einer L186R-Mutation erkrankte im Vergleich zu dieser Patientin ca. zwölf Jahre früher. Im Alter von fünf Jahren war der Patellarsehnenreflex bei ihm bereits erloschen und die bestehende Kardiomyopathie entgleist. Die FRDA nimmt bei ihm einen deutlich schwereren Verlauf, obwohl die beiden „missense“-Mutationen L182F und L186R relativ eng beieinander liegen und in beiden Fällen die gleiche Aminosäure von der Mutation betroffen ist. Dieses Beispiel zeigt, daß vielleicht nicht immer ausschließlich die Art und die Lokalisation einer ausgetauschten Aminosäure für den Phänotyp entscheidend sind.

Cossée et al. (1999) verglichen 196 homozygote mit 25 „compound“-heterozygoten Patienten. Sie stellten dabei als einzigen statistisch signifikanten Unterschied fest, daß das Erstmanifestationsalter bei den „compound“-heterozygoten Patienten im Mittel geringer als bei den homozygoten sei. Dementsprechend fällt auch Patient 8562 mit der „missense“-Mutation L186R durch den frühen und schweren Beginn seiner Erkrankung auf. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß im Einzelfall eine große „repeat“-Expansion eine stärkere Beeinträchtigung bewirkt als die Substitution einer Aminosäure durch eine ähnliche. Die vorliegenden Daten lassen nicht die Schlußfolgerung zu, daß sich im Fall der „compound“-heterozygoten FRDA-Patienten bei Kenntnis des Genotyps allgemein gültige Rückschlüsse auf die Schwere des Phänotyps ziehen lassen.

4.1.6 Patienten ohne Nachweis einer Punktmutation

In der vorliegenden Arbeit konnte die Ursache der Friedreich-ähnlichen Ataxien bei zwölf Patienten nicht geklärt werden. Dieses Ergebnis kann durch mehrere Faktoren bedingt sein:

- **Unvollständige Mutationsdetektion:** Punktmutationen der kodierenden Bereiche des Frataxin-Gens sind bei den zwölf Patienten durch SSCP-Analysen, die die Auftrennung in zwei unterschiedlichen Gelmedien umfaßten, ausgeschlossen worden. Bei den vier für die „repeat“-Expansion heterozygoten Patienten, die in der SSCP-Analyse kein auffälliges Bandenmuster zeigten, ließen sich auch durch die Sequenzierung der sechs kodierenden Exons keine weiteren Mutationen nachweisen. Mit den angewendeten Methoden, insbesondere den SSCP-Verfahren, liegt die Detektionsrate jedoch unter 100 % (Sambrook und Russell, 2001).
- **Lokalisation von Mutationen in nicht untersuchten Genomregionen:** Es ist nicht auszuschließen, daß die Expression des Frataxin-Gens durch Mutationen beeinträchtigt wird, die nicht durch die Methodik dieser Arbeit erfaßt wurden. Solche Mutationen könnten z. B. in der Promotor-Region des Gens liegen. Bisher sind derartige Veränderungen bei FRDA-Patienten noch nicht publiziert worden.
- **Deletionen des Frataxin-Gens:** Deletionen, die das gesamte Frataxin-Gen oder einzelne Exons mit den angrenzenden Bindungsbereichen der verwendeten PCR-Primer umfassen, könnten ebenfalls übersehen worden sein, da die durchgeführten PCR-Reaktionen keinerlei quantitative Aussagen erlauben. Solche Veränderungen des Frataxin-Gens sind noch nicht gefunden worden. Zu ihrem Nachweis wären quantitative Messungen der PCR-Produkte (auf DNA-Ebene) oder Expressionsanalysen (auf RNA- oder Proteinebene) notwendig.
- **Locus-Heterogenität bei der Friedreich-Ataxie:** Es ist auch zu diskutieren, ob es neben dem Frataxin-Gen weitere Gene gibt, deren Mutation eine FRDA verursachen kann („Locus-Heterogenität“). Immer wieder werden Patienten ohne Veränderungen im Frataxin-Gen beschrieben, deren klinischer Befund pathognomonisch für die Friedreich-Ataxie ist (Kostrzewa et al., 1997; Christodoulou et al., 2001). Daher ist anzunehmen, daß es weitere mit einem FRDA-Phänotyp assoziierte Genloci gibt. Kostrzewa et al. (1997) postulierten eine solche Locus-Heterogenität bei der FRDA, nachdem sie die DNA-Proben von jeweils zwei Geschwistern mit typischer FRDA-Klinik aus zwei unterschiedlichen Familien untersucht hatten. Sie schlossen Mutationen im Frataxin-Gen durch SSCP-Analysen aus.

Eine durchgeführte Haplotypanalyse ergab keine Hinweise auf das Vorliegen einer Koppelung in der Frataxin-Region. Christodoulou et al. (2001) konnten in einer Familie mit drei betroffenen Individuen den FRDA2-Locus auf Chromosom 9p23-9p11 lokalisieren.

Angesichts der Vielzahl von Erklärungsmöglichkeiten ist es zweifelhaft, ob die Ataxie-Patienten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, an der „klassischen“ Form der Friedreich-Ataxie leiden. Weitere molekulargenetische Analysen oder Protein-Studien zum sicheren Ausschluß des Vorliegens einer FRDA müssen folgen. Bei den Personen mit einer einzelnen „repeat“-Expansion könnte es sich um heterozygote Anlageträger der FRDA handeln, die in Deutschland mit einer Frequenz von etwa 1:60 bis 1:90 auftreten (Eppelen et al., 1997).

In der Gruppe der Ataxie-Patienten ohne Expansion des „repeats“ konnte keine Homozygotie oder „compound“-Heterozygotie für Punktmutationen in den Frataxin-Exons gezeigt werden. Man geht davon aus, daß statistisch vier von 10.000 FRDA-Patienten homozygot für eine Punktmutation sein müßten (Pandolfo und Montermini, 1998). Allerdings ist ein solcher Fall noch nicht beschrieben worden. Die Inzidenz bezogen auf die kaukasische Population läge (bei Richtigkeit dieser Schätzung und einer angenommenen Inzidenz der FRDA von 1:29.000) bei etwa 1:72.500.000 und wäre folglich so gering, daß solche Individuen unentdeckt bleiben könnten. Andererseits gibt es Hinweise darauf, daß Mutationen innerhalb des kodierenden Bereiches beider FRDA-Allele für das betroffene Individuum letal sein könnten. Transgene Mäuseembryonen mit Homozygotie für die Deletion des Frataxin-Exons 4 versterben einige Tage nach der Implantation (Cossée et al., 2000).

4.2 Mutationsuche im Aprataxin-Gen

4.2.1 Genotyp der Patienten 5466 und 7689

Bei 165 Ataxie-Patienten wurde nach DNA-Variationen im Aprataxin-Gen gesucht. Dabei konnte bei den Patienten 5466 und 7689 Homozygotie für die Punktmutation c.903G>A nachgewiesen werden. Sie bewirkt die Veränderung des die Aminosäure Tryptophan kodierenden Basentriplets TGG zu einem TGA-Stop-Codon („nonsense“-Mutation W293X). Es entsteht ein Genprodukt, dem aufgrund des vorzeitigen Kettenabbruchs 64 Aminosäuren am Carboxylende fehlen. Da beide Allele bei den Patienten 5466 und 7689 betroffen sind, kann kein intaktes Genprodukt synthetisiert werden. Die Diagnose der Ataxie mit okulomotorischer Apraxie ist somit bei diesen Patienten molekulargenetisch bestätigt.

Der Nachweis von Mutationen im Aprataxin-Gen bei zwei nicht miteinander verwandten Patienten zeigt, daß die AOA1 auch bei deutschen Patienten mit einem Friedreich-ähnlichen Phänotyp vorkommt. Bei einem klinischen Verdacht auf FRDA sollte nach dem Ausschluß des häufigeren Frataxin-Genotyps die molekulargenetische Diagnostik im Aprataxin-Gen durchgeführt werden.

4.2.2 Gründereffekt

Es wurden Betroffene aus zwei voneinander unabhängigen Familien mit Homozygotie für die Mutation W293X gefunden. Deshalb wurde im Rahmen einer Haplotypanalyse untersucht, ob die Mutation von einem gemeinsamen Gründer („founder“) stammen könnte. Wenn ein nachweisbarer Gründereffekt vorläge, dürften die Betroffenen in der Region des Aprataxin-Gens nur einen einzigen, identischen Haplotyp aufweisen (Rimoin et al., 2002). Anderenfalls müßte in früheren Generationen an dieser Stelle ein Rekombinationsereignis stattgefunden haben.

Patient 5466 sowie seine Schwester, deren Stammbaum in Abbildung 5 wiedergegeben ist, tragen jeweils die beiden Haplotypen 1/4/2/5/2 und 4/1/1/6/8. Keines der fünf Allele liegt dabei in homozygoter Form vor. Einen Hinweis auf das Vorliegen eines Gründereffektes gibt es folglich bei ihnen nicht.

Bei Patientin 7689 wären die Haplotypen 1/4/2/5/2 und 2/4/2/4/2 denkbar. Die Allele dieser beiden Haplotypen sind im Bereich der DNA-Marker D9S304 und D9S1788, die dem Aprataxin-Gen stromaufwärts bzw. stromabwärts am nächsten liegen, identisch, d. h. sie kommen in homozygoter Form vor. Deshalb könnte für die Mutationen bei Patientin 7689 ein Gründereffekt angenommen werden. Bei Richtigkeit dieser Hypothese wären die unterschiedlichen Allele in den Marker-Regionen D9S1118 und D9S1845 auf Rekombinationsereignisse zurückzuführen, die nach dem Auftreten der Gründer-Mutation stattgefunden hätten.

Die geschilderten Ergebnisse legen die Hypothese nahe, daß es bei deutschen AOA1-Patienten mit Homozygotie für die „nonsense“-Mutation W293X mindestens zwei Haplotypen gibt, die auf voneinander unabhängige Mutationsereignisse zurückzuführen sind. Um das Ausmaß des Gründereffektes abschätzen zu können, sollten weitere Familien mit der Mutation W293X untersucht werden. Es ist denkbar, daß es sich bei dem 293. Basentriplett des kodierenden Aprataxin-Genbereiches um eine Prädispositionsstelle („hot spot“) für Mutationen handelt. Diese Annahme wird durch den Nachweis einer weiteren Mutation desselben Triplets (W293R) bei AOA1-Patienten unterstützt (Le Ber et al., 2003).

4.2.3 Phänotyp der an der AOA1 erkrankten Geschwister

Patient 5466 fiel im Alter von zwei bis drei Jahren durch eine zunehmende Gangunsicherheit und ausgeprägte Bewegungsunruhe auf. In der MRT ließ sich eine Kleinhirnatrophie in den Hemisphären und in der Wurmregion nachweisen. Ab dem siebenten Lebensjahr nutzte der Patient zur Fortbewegung einen Rollstuhl. Mit elfeinhalb Jahren wurde bei ihm eine Verlangsamung der Augenfolgereaktionen diagnostiziert. Es fielen ferner schleudernde Bewegungen der Extremitäten auf. Die Muskeleigenreflexe waren noch seitengleich auslösbar, der Muskeltonus normoton und die Sensibilität unbeeinträchtigt. Neurophysiologische Untersuchungsbefunde sprachen jedoch für eine beginnende sensible Neuropathie. Pathologische Laborwerte konnten nicht erhoben werden.

Die Schwester des Patienten zeigte im Alter von viereinhalb Jahren erste Auffälligkeiten: Es bestand eine Rumpfataxie mit Retropulsionsneigung. Einbeinstand und monopodales Hüpfen waren nur noch mit fremder Hilfe möglich, und auch im Seiltänzerengang zeigten sich Unsicherheiten. Bei der Untersuchung der Augen fiel eine okulomotorische Apraxie auf. Im kranialen CT ließ sich eine ausgeprägte cerebelläre Atrophie nachweisen. Zwei Jahre später waren die

Muskeleigenreflexe immer noch seitengleich, wenn auch schwach, auslösbar. Der Muskeltonus war erkennbar herabgesetzt. Nun zeigten sich auch Dysmetrie und Intentionstremor. Das Gesamteiweiß und die Lipidwerte befanden sich im Normbereich, die Testung der sensiblen und motorischen Nervenleitgeschwindigkeiten ergab keinen pathologischen Befund.

Das Alter der beiden Geschwister von zwei bis vier Jahren bei Erstmanifestation der Gangataxie ist typisch für die AOA1. Das mittlere Alter portugiesischer AOA1-Patienten zum Zeitpunkt der Erstmanifestation liegt bei ca. fünf Jahren (Barbot et al., 2001). Ebenso pathognomonisch ist die Nachweisbarkeit einer Kleinhirnatrophie. Die frühe Verwendung des Rollstuhls im Fall des Bruders spricht für einen eher schweren Krankheitsverlauf. Bei portugiesischen Patienten wurde ein Rollstuhl im Durchschnitt erst sieben bis zehn Jahre nach Erstmanifestation der Ataxie notwendig. Atypisch erscheint die Tatsache, daß die Muskeleigenreflexe erhalten geblieben sind und die Sensibilität lange unbeeinträchtigt blieb. Barbot et al. forderten das Vorliegen einer Areflexie als diagnostisches Kriterium für die AOA1, wenn auch erst nach einer Krankheitsdauer von mindestens fünf Jahren. Bei diesem Patienten ließen sich mögliche Zeichen einer peripheren Neuropathie erst knapp zehn Jahre nach Erkrankungsbeginn durch neurophysiologische Untersuchungen nachweisen. Diese späte Manifestation eines wichtigen Kriteriums für die Diagnose der AOA1 zeigt die interindividuelle Variabilität im Erscheinungsbild dieser Krankheit. Hieraus ergeben sich Schwierigkeiten bei dem Versuch einer frühen klinischen Differentialdiagnose zwischen FRDA und AOA1. Zwei Symptome, die nicht zum Erscheinungsbild der FRDA gehören, können die Diagnosestellung im Fall der AOA1 erleichtern:

- **Chorea:** Die schleudernden Extremitätenbewegungen des Bruders könnten durchaus Ausdruck einer choreatischen Bewegungsstörung gewesen sein. Diese wurde bei portugiesischen Patienten nicht beschrieben und fand deshalb auch keine Berücksichtigung in einem Vorschlag für die Diagnosekriterien der AOA1 (Barbot et al., 2001). Nach den Befunden von Shimazaki et al. (2002) ist eine choreatische Bewegungsstörung jedoch durchaus pathognomonisch für die AOA1. Besonders Le Ber et al. (2003) stellten die Bedeutung der choreatischen Bewegungsstörung als Frühsymptom der AOA1 heraus.
- **Okulomotorische Apraxie:** Mit elfeinhalb Jahren zeigte der Bruder auffallend langsame Augenfolgereaktionen. In den verfügbaren Arztbriefen wurden diese aber nicht näher interpretiert. Sie könnten Ausdruck einer Augenbewegungsstörung sein, die von vielen Autoren als okulomotorische Apraxie bezeichnet wird. Laut Definition setzt diese eine gestörte Initiation von willkürlichen Sakkaden, d. h. ruckartigen Augenbewegungen, voraus (Leigh

und Zee, 1991). Le Ber et al. (2003) konnten jedoch im Fall von drei elektrookulographisch untersuchten AOA1-Patienten mit Manifestation einer Augenbewegungsstörung eine entsprechende Latenzzeit-Verlängerung ausschließen. Sie beschrieben die Sakkaden bei ihren AOA1-Patienten vielmehr als hypometrisch (von erniedrigter Amplitude) und stufenartig. Strenggenommen handele es sich somit um eine Augenbewegungsstörung, die nicht der klassischen Definition der okulomotorischen Apraxie entspreche. Klinisch äußere sie sich durch eine Unfähigkeit zur Koordination von Kopf- und Augenbewegungen bei Blickwendung auf ein lateral gelegenes Zielobjekt: Der Kopf erreiche die Endposition früher als die Augen. Die Sakkaden würden bei der körperlichen Untersuchung verlangsamt erscheinen. Es liegt deshalb nahe, eine derartige Form der okulären Bewegungsstörung auch beim Bruder anzunehmen. Bei der Schwester konnte bereits im Alter von viereinhalb Jahren die Verdachtsdiagnose AOA1 in Erwägung gezogen werden, weil dem untersuchenden Neurologen die zu diesem Zeitpunkt bereits bestehende okulomotorische Apraxie auffiel.

4.2.4 Phänotyp der Patientin 7689

Nach als normal bezeichneter frühkindlicher Entwicklung zeigte Patientin 7689 im Alter von zwei Jahren Auffälligkeiten im Gangbild und eine Fallneigung. Bereits zu diesem Zeitpunkt waren die Muskeleigenreflexe abgeschwächt. Der weitere Verlauf war progredient. Im Alter von sieben Jahren wurde zum ersten Mal eine völlige Areflexie diagnostiziert. In dieser Zeit wurde die mentale Entwicklung der Patientin noch als altersentsprechend angesehen. Eine psychomotorische Testung im Alter von neun Jahren ergab jedoch eine unterdurchschnittliche Intelligenz mit einem IQ von 88. Zwei Jahre später erreichte die Patientin bei einer erneuten Testung einen Wert von 82. Aufgrund der zunehmenden Schwierigkeiten bei der Fortbewegung wurde ein Rollstuhl verordnet. MRT-Aufnahmen, die im Alter von zwölf Jahren angefertigt wurden, zeigten eine deutliche cerebelläre Atrophie. Gleichzeitig waren nun die sensiblen und motorischen Nervenleitgeschwindigkeiten deutlich verlangsamt bzw. nicht mehr meßbar. Weitere klinische Befunde einer Untersuchung im Alter von vierzehn Jahren sind dem cerebellären Symptomkomplex zuzuordnen: Dysarthrie, Dysdiadochokinese, Dysmetrie und Intentionstremor. Außerdem konnte nun eine okulomotorische Apraxie festgestellt werden. Die Laborwerte zeigten keine Auffälligkeiten, auch die Lipidwerte befanden sich im Normbereich.

Ähnlich wie Patient 5466 und seiner Schwester erkrankte auch Patientin 7689 früh an der AOA1. Im Unterschied zu ihnen bestand aber bei ihr bereits im Alter von sieben Jahren eine vollständige Areflexie. Auch nach zwölf Jahren Krankheitsverlauf sind die Laborwerte bei Patientin 7689 unauffällig geblieben. Die Wertigkeit der Kriterien Hypoalbuminämie und Hyperlipidämie für eine Differentialdiagnose zu anderen Formen der Ataxie erscheint deshalb zweifelhaft, zumal auch bei Patient 5466 und seiner Schwester keine pathologischen Laborwerte erhoben werden konnten. Die Untersuchung von Le Ber et al. (2003) ließ hingegen bei 83 % der AOA1-Patienten eine Hypoalbuminämie erkennen. Le Ber et al. empfahlen häufigere Wiederholungen der Laborwert-Bestimmung, da die Werte bei ihren Patienten erheblich schwanken würden. Besonders interessant am Krankheitsverlauf der Patientin 7689 ist die Feststellung eines unterdurchschnittlichen Intelligenzquotienten. Shimazaki et al. (2002) diagnostizierten bei fünf von sechs untersuchten japanischen AOA1-Patienten eine mentale Beeinträchtigung. Barbot et al. (2001) forderten hingegen für die Diagnose der AOA1 das Fehlen einer mentalen Retardierung, da bei 22 untersuchten portugiesischen Patienten keinerlei mentale Beeinträchtigung nachgewiesen werden konnte. Dieser Unterschied zwischen japanischen und portugiesischen Patienten wurde in der Literatur mit folgender Genotyp-Phänotyp-Korrelation erklärt: Die portugiesischen Patienten seien alle homozygot bzw. „compound“-heterozygot für die W293X-Mutation. Diese „nonsense“-Mutation liege weiter stromabwärts als die meisten „japanischen“ Mutationen. Sie lasse deshalb das sog. „HIT“-Motiv HhHhHhh des Proteins, gekennzeichnet durch das alternierende Aufeinanderfolgen von Histidin (H) und einer hydrophoben Aminosäure (h), intakt (Moreira et al., 2001b). Das Fehlen der mentalen Retardierung bei europäischen AOA1-Patienten wurde auch von Tranchant et al. (2003) für eine Patientin aus Italien, die homozygot für die W293X-Mutation ist, und für zwei französische Geschwister, die „compound“-heterozygot für die Mutationen W293X und K211Q sind, bestätigt. Der Befund bei Patientin 7689 spricht dafür, daß auch in Europa AOA1-Patienten mit mentaler Retardierung vorkommen und daß das Vorliegen einer W293X-„nonsense“-Mutation auf zumindest einem Allel nicht zwangsläufig einen protektiven Faktor in dieser Hinsicht darstellt. Inzwischen wurden drei weitere europäische Patienten mit mentaler Retardierung beschrieben (Le Ber et al., 2003). Das Fehlen einer mentalen Retardierung sollte deshalb nicht länger ein Diagnosekriterium für die AOA1 bleiben, zumal die mentale Retardierung besonders bei japanischen AOA1-Patienten häufig zu sein scheint.

4.2.5 Patienten mit dem Aminosäureaustausch S158Y

Bei drei der 165 untersuchten Patienten wird auf einem Allel an Position 158 der Aminosäurekette Serin, das eine ungeladene Seitenkette mit einer Hydroxylgruppe trägt, gegen Tyrosin, das eine aromatische Seitenkette besitzt, ausgetauscht. Demzufolge sind die Patienten 4520, 4965 und 6479 heterozygote Träger der „missense“-Mutation S158Y. Auch bei ihnen wäre eine Veränderung der Tertiärstruktur des Genproduktes mit zumindest einer Einschränkung der physiologischen Funktion des Proteins zu erwarten. Da die AOA1 rezessiv vererbt wird, müßte zur molekulargenetischen Bestätigung der Diagnose bei diesen Patienten auch eine Beeinträchtigung der Expression des zweiten Allels nachgewiesen werden. Punktmutationen in den übrigen Exons des Aprataxin-Gens wurden durch SSCP und Sequenzierung ausgeschlossen. Denkbar wären außerdem Mutationen in der Promotor-Region des Aprataxin-Gens oder größere Deletionen. Derartige Veränderungen sind für das Aprataxin-Gen bisher noch nicht beschrieben worden. Da sie nicht ausgeschlossen werden können, bleibt die molekulargenetische Diagnose bei den Patienten 4520, 4965 und 6479 ungeklärt.

Angesichts der fraglichen Wertigkeit der Veränderung S158Y muß erörtert werden, ob es sich bei ihr um eine Mutation im engeren Sinn handelt. In diesem Zusammenhang sind in der Genetik die Begriffe Mutation und Polymorphismus voneinander abzugrenzen. Für diese Abgrenzung stehen zwei Kriterien zur Verfügung:

- Eine Definition für den Begriff „Polymorphismus“ fordert, daß die Frequenz der entsprechenden DNA-Variation in der Gesamtpopulation mehr als ein Prozent beträgt. Da insgesamt 165 Proben untersucht wurden, kann die Häufigkeit des Allels im hier untersuchten Kollektiv auf $3:330 = 0,909\%$ geschätzt werden. Angesichts der Probenselektion kann keine Aussage über die Häufigkeit der S158Y-Veränderung in der Gesamtpopulation gemacht werden. Daten, die die Häufigkeit der Veränderung S158Y betreffen, sind noch nicht publiziert worden. Auch in der „NCBI“-Datenbank „LocusLink“ ist kein Polymorphismus in den kodierenden Regionen des Aprataxin-Gens aufgeführt.
- Nach einer neueren Definition wird jede genomische Veränderung ohne Krankheitswert („non-disease-causing change“) als Polymorphismus bezeichnet. Eine genomische Veränderung, die in der Konsequenz eine Krankheit bedingen könnte („disease-causing change“), wird hingegen als Mutation bezeichnet (Dunnen und Antonorakis, 2001). Coutinho et al. (2002, Datenbank „GeneTests“) klassifizierten die Veränderung S158Y als Polymorphis-

mus, da sie bei einem gesunden Geschwisterkind vorkam und bei seinem von der AOA1 betroffenen Bruder fehlte (persönliche Mitteilung von Frau Maria-Céu Moreira). Wenn keine der Veränderungen durch Spontanmutation neu aufgetreten sein sollte, muß ein Elternteil dieser Kinder auf einem Allel die Veränderung S158Y und auf dem anderen Allel eine Anlage zur AOA1 tragen. Unter der Voraussetzung, daß dieser Elternteil gesund ist, handelt es sich bei S158Y unter Anwendung dieser zweiten Definition tatsächlich um einen Polymorphismus.

4.2.6 Patienten mit möglicher Locus-Heterogenität

Auch im Falle der AOA scheint eine Locus-Heterogenität zu bestehen (Moreira et al., 2001a). Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Geschwister 9199 und 9200, die heterozygot für die „repeat“-Expansion sind und bei denen keine weiteren Veränderungen im FRDA- und Aprataxin-Gen nachgewiesen werden konnten, leiden neben ihrer seit dem ersten Lebensjahr bestehenden hypoton-ataktischen Bewegungsstörung auch an einer okulomotorischen Apraxie. Es wäre möglich, daß sie an der AOA-Variante 2 leiden, deren Genlocus auf dem Chromosom 9q34 vermutet wird (Németh et al., 2000).

4.2.7 Veränderungen im Intron-Bereich des Aprataxin-Gens

Angesichts der hohen Frequenz der Veränderung in Intron 4 des Aprataxin-Gens (g.IVS4-12G>T) ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich hierbei um einen Polymorphismus handelt. Die Allelverteilung soll im folgenden näher geprüft werden.

Laut Hardy-Weinberg-Gesetz (Rimoin et al., 2002) sind die Allelhäufigkeiten in Populationen in einem stabilen Gleichgewicht:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p : Häufigkeit des Wildtypallels, q : Häufigkeit des selteneren Mutanten-Allels.

Der χ^2 -Anpassungstest (Grafen und Hails, 2002) ermöglicht den Vergleich einer empirischen mit einer vermuteten theoretischen Verteilung:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(B_i - E_i)^2}{E_i}$$

k : Zahl der unterschiedlichen Klassen

B_i : gefundene Individuenzahl einer Klasse, E_i : erwartete Individuenzahl einer Klasse.

Der sog. p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der rein zufällig eine ebenso große oder schlechtere Übereinstimmung von empirischer und erwarteter Häufigkeit gefunden wird. Als Schwelle für eine statistisch signifikante Abweichung vom Erwartungswert wird $p = 1\%$ gewählt.

Auswertung der SSCP-Gele von Exon/Intron 4 (Gesamtzahl der Proben = 165):

ermittelte Häufigkeit des Genotyps AA = 64

ermittelte Häufigkeit des Genotyps Aa = 81

ermittelte Häufigkeit des Genotyps aa = 20

Berechnung der Allelhäufigkeiten im Patienten-Kollektiv:

$$p = (64 \cdot 2 + 81) \div (165 \cdot 2) = 209 \div 330 = 63,3\%$$

$$q = (20 \cdot 2 + 81) \div (165 \cdot 2) = 121 \div 330 = 36,7\%$$

Berechnung der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz zu erwartenden Häufigkeit:

$$\text{erwartete Häufigkeit des Genotyps AA} = p^2 \cdot 165 = 0,401 \cdot 165 = 66,2$$

$$\text{erwartete Häufigkeit des Genotyps Aa} = 2pq \cdot 165 = 0,464 \cdot 165 = 76,6$$

$$\text{erwartete Häufigkeit des Genotyps aa} = q^2 \cdot 165 = 0,134 \cdot 165 = 22,1$$

Berechnung des χ^2 – Wertes:

$$\chi^2 = \sum^k \frac{(64 - 66,2)^2}{66,2} + \frac{(81 - 76,6)^2}{76,6} + \frac{(20 - 22,1)^2}{22,1} = 0,525$$

Interpretation des Ergebnisses:

Bei einer Anzahl von drei unterschiedlichen Klassen (zwei Freiheitsgraden) ergibt sich für p ein Wert zwischen 0,50 und 0,90. Mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 50 % wird rein zufällig eine schlechtere Übereinstimmung gefunden. Die Allelverteilung in dem Kollektiv der Ataxie-Patienten weicht folglich nicht in statistisch signifikanter Weise von den Werten ab, die nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz zu erwarten gewesen wären. Die Abweichungen können als zufällig angesehen werden.

4.2.8 Vergleich der relativen AOA1-Häufigkeiten

Die Publikation von Le Ber et al. (2003) beschreibt die bisher größte Gruppe von Patienten mit molekulargenetisch bestätigter AOA1-Diagnose. In ihre Untersuchung schlossen sie die DNA-Proben von 227 Ataxie-Patienten (überwiegend französischen Ursprungs) ein, bei denen zuvor eine „repeat“-Expansion in Intron 1 des Frataxin-Gens ausgeschlossen worden war. Sie konnten bei vierzehn Patienten aus neun verschiedenen Familien auf molekulargenetischer Basis die Diagnose AOA1 stellen. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen die DNA-Proben von 165 Ataxie-Patienten untersucht. Als Einschlusskriterien wurde nicht nur der molekulargenetische Ausschluß der FRDA verlangt, sondern auch ein Alter der Betroffenen von weniger als 30 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnose-Anforderung. Das mittlere Manifestationsalter der AOA1 liegt bei fünf bis sieben Jahren (Barbot et al., 2001; Le Ber et al., 2003). Unter der Voraussetzung, daß Le Ber et al. in ihrer Publikation alle Einschlusskriterien genannt haben, die zur Bildung ihres Patientenkollektivs führten, wurden die Einschlusskriterien in vorliegender Arbeit folglich enger gewählt. Man hätte einen größeren Anteil von AOA1-Patienten an der Gesamtzahl von Ataxie-Patienten mit Ausschluß der FRDA erwarten können. Tatsächlich konnten aber nur zwei der 165 Ataxie-Patienten als AOA1-Patienten identifiziert werden. Es ergibt sich somit für die deutschen AOA1-Patienten ein wesentlich geringerer prozentualer Anteil an der Gesamtzahl

von ungeklärten Ataxie-Patienten: 1,21 % (im Vergleich zu 6,17 % für die französischen Patienten). Eine geringere Sensitivität der Mutationsdetektion scheidet als alleinige Erklärungsmöglichkeit aus: Elf der vierzehn von Le Ber et al. identifizierten Patienten sind homozygot oder zumindest „compound“-heterozygot für die Mutation W293X. Diese Mutation tragen auch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Patienten. Die für die SSCP-Analyse gewählten Bedingungen waren folglich geeignet, diese Mutation zu detektieren. Die relativ geringe Anzahl deutscher AOA1-Patienten könnte angesichts engerer Einschlusskriterien und ähnlicher Sensitivität der Mutationsdetektion auf eine geringere relative Häufigkeit der Mutation W293X in der Population deutscher Ataxie-Patienten zurückgeführt werden.

4.3 Isolierung von Aprataxin-Transkripten

4.3.1 Analyse der nachgewiesenen Transkript-Varianten

Die Amplifikation der Aprataxin-Exons 2-6 führte zur Identifikation von acht unterschiedlichen Transkript-Varianten, von denen sieben nicht in der „Ensembl“-Datenbank veröffentlicht waren.

Ein Schritt bei der Prozessierung von prä-mRNA ist das Spleißen, bei dem die Introns und eventuell einzelne Exons entfernt werden. Beim konstitutiven Spleißen werden ausschließlich Introns herausgetrennt, beim alternativen Spleißen auch Teile bestimmter Exons, so daß in der Konsequenz verschiedene reife mRNA-Populationen entstehen. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, daß es im Aprataxin-Exon 3 eine bisher nicht publizierte Stelle des alternativen Spleißens gibt, die eine Sequenz von fünf Basenpaaren am 5'-Ende des Exons umfaßt. Des weiteren scheint die Basensequenz GTAG, die laut „Ensembl“-Datenbank (Transkript-Variante ENST259603) am 3'-Ende von Exon 3 steht, zum 5'-Ende von Exon 4 zu gehören. Die GT-AG-Regel für Introns, die besagt, daß Introns oft mit der Sequenz GT anfangen und auf der Sequenz AG enden (Knippers, 2001), bleibt hiervon unberührt.

Es scheint im Aprataxin-Gen mindestens fünf verschiedene Stellen des alternativen Spleißens zu geben:

- Die beiden am weitesten stromaufwärts gelegenen Spleißvorgänge führen zu zwei verschiedenen Transkripten: Das eine trägt das 62 bp lange Exon 1 und die letzten 137 bp des 3'-Endes von Exon 2, das andere beginnt mit dem 219 bp langen Exon 2.

Die übrigen drei Spleißvorgänge bedingen jeweils zwei unterschiedliche Varianten:

- Das alternative Spleißen von Exon 3 bringt Isoformen hervor, die sich durch das Vorhandensein von fünf Basenpaaren am 5'-Ende des Exons 3 unterscheiden (siehe Sequenz im Anhang).
- Das alternative Spleißen von Exon 4 führt zu Isoformen, die sich durch das Vorhandensein von 115 Basenpaaren am 5'-Ende des Exons 4 unterscheiden (siehe Sequenz im Anhang).
- In Exon 8 findet ein alternativer Spleißvorgang erst stromabwärts von der Lokalisation des ersten Stop-Codons statt. Dieser dürfte dementsprechend keinen Einfluß auf das translatierte Genprodukt haben und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Die beiden alternativen Spleißvorgänge in Exon 1 und 2 sowie die voneinander unabhängigen Spleißvorgänge in Exon 3 und Exon 4 bedingen jeweils zwei unterschiedliche Varianten. Durch Kombination dieser Varianten wären theoretisch $2 \cdot 2 \cdot 2 = 8$ verschiedene Transkript-Varianten ableitbar.

In dieser Arbeit konnten sieben von ihnen nachgewiesen werden. Es fehlte die Variante, die Exon 1 sowie Exon 3 und Exon 4 in voller Länge umfaßt. Sie unterscheidet sich von der Variante AJ565852 lediglich dadurch, daß bei ihr Exon 3 in voller Länge vorkommt. Da das alternative Spleißen in Exon 3 Produktgrößen-Differenzen von lediglich fünf Basenpaaren verursacht, konnte die fehlende Variante in der Agarose-Gel-Elektrophorese nicht von der Variante AJ565852 unterschieden werden. Sie entspricht exakt dem 5'-Ende von „Ensembl“-Transkript 1 und wurde inzwischen auch unter einer weiteren Zugangsnummer (AY040777) in der „NCBI“-Datenbank „Nucleotide“ veröffentlicht. Somit ist ihre Existenz bereits bewiesen worden. Alle Transkript-Varianten, die aus den alternativen Spleißvorgängen theoretisch ableitbar sind, kommen „in vivo“ vor.

4.3.2 Vergleich mit Datenbank-Varianten

Nach Abschluß der experimentellen Untersuchungen wurden in der „NCBI“-Datenbank „Nucleotide“ fünf weitere Aprataxin-Isoformen veröffentlicht (Abb. 11). Sie unterscheiden sich von den bisher beschriebenen Varianten v. a. dadurch, daß sie Sequenzen aus den Introns 1 und 7 beinhalten. Es wäre deshalb denkbar, daß es sich hierbei um noch nicht vollständig prozessierte prä-mRNA-Stücke oder um fehlerhafte Produkte des Spleißapparates handelt. Nur die Transkript-Variante NM_175071, die keine intronischen Sequenzen aufweist, wurde in der vorliegenden Arbeit als Variante AJ565851 nachgewiesen.

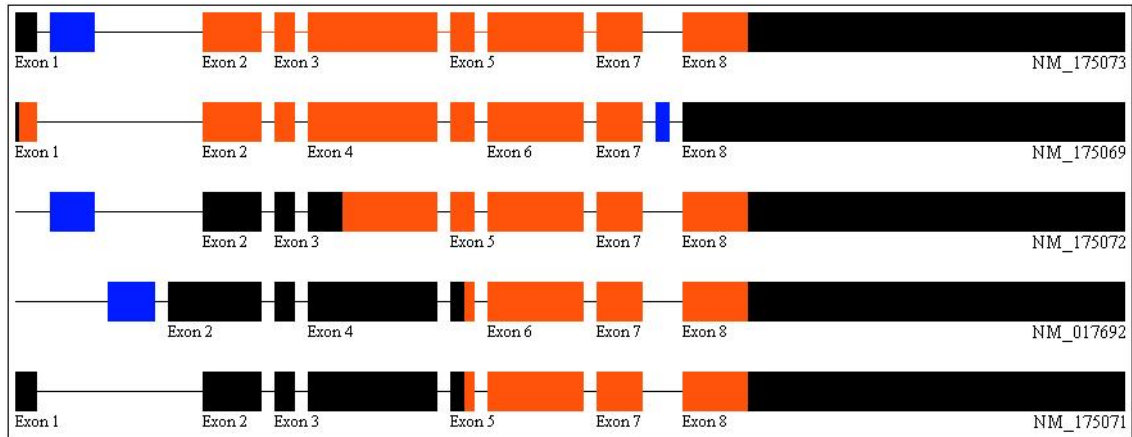


Abbildung 11: Transkript-Varianten des Aprataxin-Gens, veröffentlicht in der „NCBI“-Datenbank „Nucleotide“. Schwarze Bereiche werden transkribiert, aber nicht translatiert. Rote Bereiche werden sowohl transkribiert als auch translatiert. Blaue Bereiche entsprechen intronischen Sequenzen, die bisher als nicht kodierend angesehen wurden.

4.3.3 Bedeutung der alternativen Spleißvorgänge

Alle bisher bekannten Exons des Aprataxin-Gens sind in den zahlreichen Transkript-Varianten in unterschiedlichen Kombinationen vertreten. Das 3'-Ende aller sequenzierten Transkripte und Datenbank-Transkripte (mit Ausnahme der Transkript-Variante NM_175069) ist spätestens ab dem ersten der beiden ATG-Codons in Exon 5 identisch. Somit besitzen fast alle Produkte des Aprataxin-Gens am C-terminalen Ende die gleiche Aminosäuresequenz. Wenig bekannt ist die Funktion der verschiedenen N-terminalen Enden. Alternatives Spleißen im allgemeinen vermehrt die Kodierungsmöglichkeiten eines Gens. Ein Gen kann so für mehrere Proteine kodieren. Es wäre denkbar, daß die verschiedenen Produkte des Aprataxin-Gens unterschiedliche Aufgaben im Organismus erfüllen. Es gibt zwei Hinweise, die für diese Hypothese sprechen:

1. Moreira et al. (2001b) postulierten, daß Aprataxin eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen spielen könnte. Das 356 Aminosäuren umfassende Translationsprodukt von „Ensembl“-Transkript 1 bestehe aus mindestens drei verschiedenen Domänen (Abb. 12):

- “PANT”-Domäne (gebildet von den Aminosäuren 20-116): Sie sei dem N-Terminus der Polynukleotid-Kinase-3'-Phosphatase (PNKP) ähnlich, der für die Interaktion mit DNA-Polymerasen und DNA-Ligasen verantwortlich sein könnte.
- “HIT-Motiv”-Domäne (gebildet von den Aminosäuren 187-287): Diese Domäne weise das sogenannte HIT-Motiv HhHhHhh (Aminosäuren 272-278) auf, das alternierend aus Histidin

(H) und einer hydrophoben Aminosäure (h) besteht. Es soll den Phosphatrest von Purin-Nucleotiden binden können.

- “Zink-Finger”-Domäne (gebildet von den Aminosäuren 331-353): Das sogenannte Zink-Finger-Motiv CX₂CX₁₂HX₃H (In dieser Kurzschreibweise geben Ziffern die Anzahl beliebiger Aminosäuren „X“ an, während „C“ für Cystein und „H“ für Histidin steht.) erstreckt sich über die Aminosäuren 333 bis 353 und könnte eine DNA-Bindungsstelle darstellen.

Es konnte gezeigt werden, daß HIT- und Zink-Finger-Motiv auch in Proteinen von Drosophila, Pflanzen und Hefe zusammen vorkommen. Die Kombination aus diesen beiden Motiven und der PANT-Domäne ließ sich hingegen nur bei Säugetieren nachweisen. Sie kommt nicht nur im „Ensembl“-Transkript 1, sondern auch in den Aprataxin-Transkript-Varianten AJ565854 und AJ565855 vor, während sie in den übrigen Varianten fehlt oder zumindest unvollständig ist. Möglicherweise sind Aprataxin-Genprodukte ohne PANT-Domäne entwicklungs geschichtlich älter als solche mit PANT-Domäne.

2. Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß verschiedene Aprataxin-Genprodukte gewebsspezifisch in unterschiedlichen Mengen exprimiert werden: Während eine 589 bp-lange Transkript-Variante in vielen menschlichen Geweben zu dominieren scheint, exprimieren Leberzellen eine 474 bp-lange Variante ebenso häufig wie die 589 bp-lange Variante (Moreira et al., 2001b).

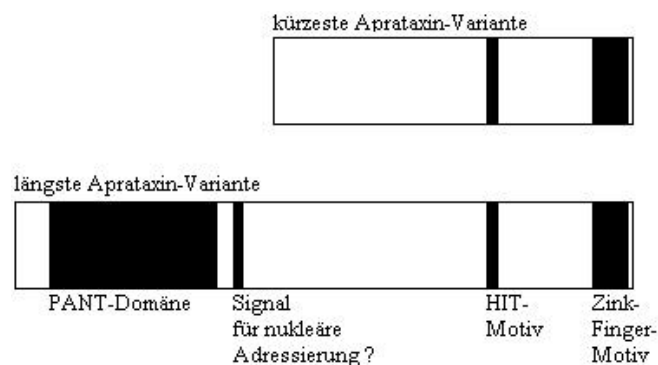


Abbildung 12: Darstellung der beiden Aprataxin-Varianten, die sich aus den „Ensembl“-Transkripten 1 und 2 ergeben. In der kürzeren Variante fehlt die sog. PANT-Domäne vollständig.

Die Hypothese, es gebe nur zwei verschiedene Transkripte des Aprataxin-Gens, hat sich nach den Ergebnissen dieser Arbeit als nicht zutreffend erwiesen. Die Vermutung, daß das „Ensembl“-Transkript 1 das häufigste und damit wichtigste sei, ist zu bezweifeln: Die von Moreira et al. (2001b) publizierten Daten berücksichtigen nicht, daß sich hinter einer breiten Elektro-

phorese-Bande mehrere ähnlich lange Transkript-Varianten verbergen könnten. So unterscheiden sich zum Beispiel die Längen von drei der neun in dieser Arbeit identifizierten Varianten um maximal fünf Basenpaare. Deshalb bleibt vorerst unklar, welches Transkript in welchem menschlichen Gewebe am häufigsten vorkommt. Angesichts der bisher vorliegenden Daten muß die in der Forschung gängige Praxis, die Mutationssuche im Aprataxin-Gen auf die vier stromabwärts gelegenen Exons zu beschränken, hinterfragt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch Mutationen in den Exons 1-4 den Phänotyp der AOA1 bewirken können. Zur weiteren Charakterisierung der gewebsspezifischen Expression des Aprataxin-Gens sollten verschiedene Organe auf die Art und die Quantität der in ihnen exprimierten Transkript-Varianten untersucht werden.

Bisher erschienene AOA1-Publikationen (Date et al., 2001; Moreira et al., 2001b; Shimazaki et al., 2002) nehmen unterschiedliche Lokalisationen des Start-Codons an. So fehlt bei Date et al. (2001) in der Abbildung zur Genorganisation das Exon 1 des „Ensembl“-Transkriptes 1, obwohl es das Start-Codon dieses Transkriptes enthält und somit kodierende Funktion besitzt. Dementsprechend beziehen sich europäische Forscher bei der Nomenklatur von Mutationen auf das nächste, weiter stromabwärts gelegene Start-Codon in Exon 2 (Moreira et al., 2001b; Le Ber et al., 2003; Tranchant et al., 2003). Shimazaki et al. nehmen an, daß beim Menschen das „Ensembl“-Transkript 1 geringere Bedeutung als Transkript 2 habe, und beziehen ihre Mutationen auf das Start-Codon dieses zweiten Transkriptes in Exon 5 (Shimazaki et al., 2002). Die Nomenklatur der Mutationen erfolgt in der Konsequenz uneinheitlich und erschwert den Vergleich der Ergebnisse verschiedener Forschergruppen. Hilfreich wäre es, alle Mutationen auf das erste Start-Codon der längstmöglichen Transkript-Variante („Ensembl“-Transkript 1 (ENST259603)) zu beziehen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hat die molekulargenetische Untersuchung von Patienten zum Inhalt, bei denen initial der klinische Verdacht auf die autosomal-rezessiv vererbte Friedreich-Ataxie (FRDA) geäußert wurde. Im Gegensatz zu 96 % aller FRDA-Patienten sind die hier untersuchten Patienten nicht homozygot für die „repeat“-Expansion in Intron 1 des Frataxin-Gens. Die Arbeit setzt sich aus drei Teilen zusammen: Im ersten Teil wurde bei sechs für die „repeat“-Expansion heterozygoten Patienten und bei acht Patienten ohne „repeat“-Expansion nach Mutationen im Frataxin-Gen gesucht. Mittels PCR-Technik, Gel-Elektrophorese, SSCP-Analyse und DNA-Sequenzierung konnte bei zwei Patienten „compound“-Heterozygotie für die bisher nicht beschriebenen „missense“-Mutationen N146K bzw. L186R nachgewiesen werden. Im zweiten Teil wurde der Frage nachgegangen, ob die Differentialdiagnose zur FRDA, die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie 1 (AOA1), auch in der deutschen Population auftritt. Dazu wurden 165 DNA-Proben von Patienten analysiert, deren Ataxie-Symptomatik sich vor dem 30. Lebensjahr manifestierte und bei denen der initiale Verdacht auf eine FRDA nicht molekulargenetisch bestätigt werden konnte. Mit Hilfe von PCR-Technik, Gel-Elektrophorese, SSCP-Analyse und DNA-Sequenzierung wurde die „nonsense“-Mutation W293X in homozygoter Form bei zwei nicht miteinander verwandten Patienten sowie bei der Schwester eines Patienten gefunden. Das Ergebnis der Haplotypanalyse legt nahe, daß diese Veränderung auf zwei voneinander unabhängige Mutationsereignisse zurückzuführen ist. Bei drei weiteren Patienten wurde die „missense“-Mutation S158Y in heterozygoter Form nachgewiesen. Auch in Deutschland sollte bei klinischem Verdacht auf eine FRDA an die Differentialdiagnose der AOA1 gedacht werden. Die relative Häufigkeit der AOA1 scheint aber in Deutschland geringer als in Frankreich zu sein. Die AOA1-Patientin 7689 gehört zu den ersten kaukasischen Patienten, bei denen eine mentale Retardierung beschrieben wird. Dieser Befund legt eine Berücksichtigung bei der Formulierung der Kriterien für die AOA1-Diagnose nahe. Der dritte Teil beschäftigt sich mit den unterschiedlichen Transkript-Varianten des Aprataxin-Gens. Auf der Grundlage einer PCR an fetaler cDNA wurden die Exons 1-6 amplifiziert, kloniert und sequenziert. Dadurch wurden sieben bisher unveröffentlichte Transkript-Varianten isoliert. Ihr Vergleich belegt, daß es eine bisher unbekannte Stelle des alternativen Spleißens am 5'-Ende von Exon 3 gibt. Die Art der hier identifizierten Transkript-Varianten stellt die bisher gängige Praxis, die Mutationssuche auf die 3'-Hälfte des Aprataxin-Gens zu beschränken, in Frage. Die Nomenklatur aller Aprataxin-Mutationen sollte zudem einheitlich auf das bisher in Publikationen nicht berücksichtigte Start-Codon in Exon 1 bezogen werden.

6 Anhang

6.1 cDNA-Sequenzen

Legende:

- Kleinbuchstaben → cDNA-Nukleotide
- Kleinbuchstaben, die durch Schriftgröße und Rotfärbung hervorgehoben sind → Exon-Beginn
- Kleinbuchstaben, die durch Kursivdruck und Rotfärbung hervorgehoben sind → Bereiche der Aprataxin-Exons 2 und 3, die alternativ gespleißt werden
- Großbuchstaben → Aminosäuren (im Einbuchstabencode)
- atg → Start-Codon
- tga → Stop-Codon
- N146K, L186R, S158Y → „missense“-Mutationen
- W293X → „nonsense“-Mutation

6.1.1 cDNA-Sequenz des Frataxin-Gens⁵

Bereich zwischen erstem Start-Codon in Exon 1 und erstem Stop-Codon in Exon 5a:

→ EX 1

1 atgtggactc tcgggcgccg cgcagtagcc ggcctcctgg cgtcaccag
M W T L G R R A V A G L L A S P S

51 cccggcccag gccagaccc tcaccgggt cccgcccgcg gcagagttgg
P A Q A Q T L T R V P R P A E L A

101 ccccactctg cggccgccgt ggcctgcgca ccgacatcga tgcgacctgc
P L C G R R G L R T D I D A T C

→ EX 2

151 acgccccgcc gcgcaagttc gaaccaacgt ggcctcaacc agatttgaa
T P R R A S S N Q R G L N Q I W N

201 tgtcaaaaag cagagtgtct atttgatgaa tttgaggaaa tctggaactt
V K K Q S V Y L M N L R K S G T L

→ EX 3

251 tgggccaccc aggctctcta gatgagacca cctatgaaag actagcagag
G H P G S L D E T T Y E R L A E

301 gaaacgctgg actccttagc agagtttttt gaagaccttg cagacaagcc
E T L D S L A E F F E D L A D K P

→ EX 4

351 atacacgttt gaggactatg atgtctcctt tgggagtgggt gtcttaactg
Y T F E D Y D V S F G S G V L T V

⁵ Nach: „NCBI“-Datenbank „Nucleotide“, Zugangsnummer U43747.

aag (N146K)

401 tcaaactggg tggagatcta ggaacctatg tgatcaacaa gcagacgcca
K L G G D L G T Y V I N K Q T P

→ EX 5a

451 aacaagcaaa tctggctatc ttctccatcc agtggaccta agcgttatga
N K Q I W L S S P S S G P K R Y D

501 ctggactggg aaaaactggg tgttctccca cgacggcgtg tccctccatg
W T G K N W V F S H D G V S L H E

cgg (L186R)

551 agctgctggc cgcagagctc actaaagcct taaaaaccaa actggacttg
L L A A E L T K A L K T K L D L

601 tcttggttgg cctattccgg aaaagatgct tga
S W L A Y S G K D A !

6.1.2 cDNA-Sequenz des Aprataxin-Gens⁶

Bereich zwischen erstem Start-Codon in Exon 1 und erstem Stop-Codon in Exon 8:

```

→ Exon 1                                → Exon 2
1  atgagtaacg tgaatttgtc cgtctccgac ttctggagag tgatgatgcg
   M S N V  N L S  V S D  F W R V  M M R

51  ggtgtgctgg ttggtgagac aggacagccg gcaccagcga atcagacttc
    V C W  L V R Q  D S R  H Q R  I R L P

101  cacatttgga agcagttgtg attgggctgtg gcccagagac caagatcact
     H L E  A V V  I G R G  P E T  K I T

→ Exon 3
151  gataagaaat gttctcgaca gcaagtacag ttgaaagcag agtgtaacaa
     D K K C  S R Q  Q V Q  L K A E  C N K

→ Exon 4
201  gggatatgtc aaggtaaagc aggtaggagt caatcccacc agcattgact
     G Y V  K V K Q  V G V  N P T  S I D S

251  cagtcgtaat tgggaaggac caagaggtga agctgcagcc tggccaggtt
     V V I  G K D  Q E V K  L Q P  G Q V

301  ctccacatgg tgaatgaact ttatccatat attgtagagt ttgaggaaga
     L H M V  N E L  Y P Y  I V E F  E E E

351  ggcaaagaac cctggcctgg aaacacacag gaagagaaag agatcaggca
     A K N  P G L E  T H R  K R K  R S G N

```

⁶ Nach: „Ensembl“-Datenbank, Zugangsnummer ENST259603.

401 acagtgattc tatagaaagg gatgctgctc aggaagctga ggctgggaca
 S D S I E R D A A Q E A E A G T

tat (S158Y)

451 gggctggaac ctgggagcaa ctctggccaa tgctctgtgc ccctaaagaa
 G L E P G S N S G Q C S V P L K K

→ Exon 5

501 gggaaaagat gcacctatca aaaaggaatc cctgggccac tggagtcaag
 G K D A P I K K E S L G H W S Q G

→ Exon 6

551 gcttgaagat ttctatgcag gacccccaaa tgcaggttta caaagatgag
 L K I S M Q D P K M Q V Y K D E

601 caggtggtgg tgataaagga taaatacca aaggcccggt accattggct
 Q V V V I K D K Y P K A R Y H W L

651 ggtcttaccg tggacctcca tttccagtct gaaggctgtg gccagggaac
 V L P W T S I S S L K A V A R E H

701 accttgaact ccttaagcat atgcacactg tgggggaaaa ggtgattgta
 L E L L K H M H T V G E K V I V

751 gattttgctg ggtccagcaa actccgcttc cgattgggct accacgccat
 D F A G S S K L R F R L G Y H A I

→ Exon 7

801 tccgagtatg agccatgtac atottcatgt gatcagccag gattttgatt
 P S M S H V H L H V I S Q D F D S

tga (W293X)

851 ctccctgcct taaaaacaaa aaacattgga attctttcaa tacagaatac
 P C L K N K K H W N S F N T E Y

→ Exon 8

901 ttcctagaat cacaagCtgt gatcgagatg gtacaagagg ctggtagagt
F L E S Q A V I E M V Q E A G R V

951 aactgtccga gatgggatgc ctgagctctt gaagctgccc cttcgttgtc
T V R D G M P E L L K L P L R C H

1001 atgagtgccca gcagctgctg ccttccattc ctcagctgaa agaacatctc
E C Q Q L L P S I P Q L K E H L

1051 aggaagcact ggacacagtg a
R K H W T Q !

6.1.3 cDNA-Sequenzen der Aprataxin-Isoformen⁷

AJ565850:

agcggtgaggcacagatgagtaacgtgaatttgtccgtctccgacttctggagagtgatgatgcgggtgt
 gctggttggtgagacaggacagccggcaccagcgaatcagacttccacatttgggaagcagttgtgattgg
 gcgtggcccagagaccaagatcactgataagaaatgttctcgacagcaagttgaaagcagagtgtaaaca
 gggatatgtcaaggtaaagcagagtttgaggaagaggcaagaaccctggcctggaaacacacaggaaga
 gaaagagatcaggcaacagtgattctatagaaagggatgctgctcaggaagctgaggctgggacagggct
 ggaacctgggagcaactctggccaatgctctgtgccctaaagaagggaaaagatgcacctatcaaaaag
 gaatccctgggccaactggagtcaaggcttgaagatttctatgcaggacccccaaaatgcaggtttacaag
 atgagcaggtggtggtgataaaggataaatacccaaaggcccgttaccattggctggtcttaccgtggac
 ctccatttccagctctgaaggctgtggccagggaaacaccttgaactccttaagcatatgcacactgtgggg
 gaaaaggtgattgtagattttgctgggtccagcaaactccgcttccgat

AJ565851:

agcggtgaggcacagatgagtaacgtgaatttgtccgtctccgacttctggagagtgatgatgcgggtgt
 gctggttggtgagacaggacagccggcaccagcgaatcagacttccacatttgggaagcagttgtgattgg
 gcgtggcccagagaccaagatcactgataagaaatgttctcgacagcaagttgaaagcagagtgt
 aacaagggatatgtcaaggtaaagcagagtttgaggaagaggcaagaaccctggcctggaaacacacag
 gaagagaagagatcaggcaacagtgattctatagaaagggatgctgctcaggaagctgaggctgggaca
 gggctggaaacctgggagcaactctggccaatgctctgtgccctaaagaagggaaaagatgcacctatca
 aaaaggaatccctgggccaactggagtcaaggcttgaagatttctatgcaggacccccaaaatgcaggttta
 caaagatgagcaggtggtggtgataaaggataaatacccaaaggcccgttaccattggctggtcttaccg
 tggacctccatttccagctctgaaggctgtggccagggaaacaccttgaactccttaagcatatgcacactg
 tgggggaaaaggtgattgtagattttgctgggtccagcaaactccgcttccgat

AJ565852:

agcggtgaggcacagatgagtaacgtgaatttgtccgtctccgacttctggagagtgatgatgcgggtgt
 gctggttggtgagacaggacagccggcaccagcgaatcagacttccacatttgggaagcagttgtgattgg
 gcgtggcccagagaccaagatcactgataagaaatgttctcgacagcaagttgaaagcagagtgtaaaca
 gggatatgtcaaggtaaagcaggtaggagtcaatcccaccagcattgactcagtcgtaattgggaaggac
 caagaggtgaagctgcagcctggccaggttctccacatggtgaatgaactttatccatatattgtagagt
 ttgaggaagaggcaagaaccctggcctggaaacacacaggaagagaagagatcaggcaacagtgattc
 tatagaaagggatgctgctcaggaagctgaggctgggacagggctggaacctgggagcaactctggccaa
 tgctctgtgcccctaaagaagggaaaagatgcacctatcaaaaaggaatccctgggccaactggagtcaag
 gcttgaagatttctatgcaggacccccaaaatgcaggtttacaagatgagcaggtggtggtgataaagga
 taaatacccaaaggcccgttaccattggctggtcttaccgtggacctccatttccagctctgaaggctgtg
 gccagggaaacaccttgaactccttaagcatatgcacactgtgggggaaaaggtgattgtagattttgctg
 ggtccagcaaactccgcttccgat

⁷ Veröffentlicht in der „NCBI“-Datenbank „Nucleotide“.

AJ565853:

gaggactcgtgctagtgatctgtttttctagtgattcttttgtttgtcccttagagtgatgatgcggg
tgtgctggttgggtgagacaggacagccggcaccagcgaatcagacttccacatttggagcagttgtgat
tgggcgtggcccagagaccaagatcactgataagaaatgttctcgacagcaagttgaaagcagagtgtaa
caagggatatgtcaaggtaaagcaggtaggagtcaatcccaccagcattgactcagtcgtaattgggaag
gaccaagaggtgaagctgcagcctggccaggttctccacatggtgaatgaactttatccatataattgtag
agtttgaggaagaggcaagaaccctggcctggaaacacacaggaagagaaagagatcagggaacagtgat
tctatagaaagggatgtgctcaggaagctgaggctgggacagggctggaacctgggagcaactctggc
caatgctctgtgccctaaagaagggaaaagatgcacctatcaaaaaggaatccctgggccaactgggagtc
aaggcttgaagatttctatgcaggacccccaaaatgcaggtttacaaagatgagcaggtgggtgataaa
ggataaatacccaaaggcccgttaccattggctggtcttaccgtggacctccatttccagctctgaaggct
gtggccagggaaacaccttgaactccttaagcatatgcacactgtgggggaaaaggtgattgtagattttg
ctgggtccagcaaacctccgcttccgat

AJ565854:

gaggactcgtgctagtgatctgtttttctagtgattcttttgtttgtcccttagagtgatgatgcggg
tgtgctggttgggtgagacaggacagccggcaccagcgaatcagacttccacatttggagcagttgtgat
tgggcgtggcccagagaccaagatcactgataagaaatgttctcgacagcaagttgaaagcagag
tgtaacaagggatatgtcaaggtaaagcaggtaggagtcaatcccaccagcattgactcagtcgtaattg
ggaaggaccaagaggtgaagctgcagcctggccaggttctccacatggtgaatgaactttatccatata
tgtagagtttgaggaagaggcaagaaccctggcctggaaacacacaggaagagaaagagatcagggaac
agtgattctatagaaagggatgtgctcaggaagctgaggctgggacagggctggaacctgggagcaact
ctggccaatgctctgtgccctaaagaagggaaaagatgcacctatcaaaaaggaatccctgggccaactg
gagtcaggcttgaagatttctatgcaggacccccaaaatgcaggtttacaaagatgagcaggtgggtg
ataaaggataaatacccaaaggcccgttaccattggctggtcttaccgtggacctccatttccagctctga
aggctgtggccagggaaacaccttgaactccttaagcatatgcacactgtgggggaaaaggtgattgtaga
tttctgctgggtccagcaaacctccgcttccgat

AJ565855:

gaggactcgtgctagtgatctgtttttctagtgattcttttgtttgtcccttagagtgatgatgcggg
tgtgctggttgggtgagacaggacagccggcaccagcgaatcagacttccacatttggagcagttgtgat
tgggcgtggcccagagaccaagatcactgataagaaatgttctcgacagcaagttgaggaagaggca
aagaaccctggcctggaaacacacaggaagagaaagagatcaggcaacagtgattctatagaaagggatg
ctgctcaggaagctgaggctgggacagggctggaacctgggagcaactctggccaatgctctgtgccct
aaagaagggaaaagatgcacctatcaaaaaggaatccctgggccaactggagtcaaggcttgaagatttct
atgcaggacccccaaaatgcaggtttacaaagatgagcaggtgggtgataaaggataaatacccaaagg
cccgttaccattggctggtcttaccgtggacctccatttccagctctgaaggctgtggccagggaaacacct
tgaactccttaagcatatgcacactgtgggggaaaaggtgattgtagattttgctgggtccagcaaacct
cgcttccgat

AJ575566:

gaggactcgtgctagtgatctgtttttctagtgattcttttgtttgtcccttagagtgatgatgcggg
tgtgctggttgggtgagacaggacagccggcaccagcgaatcagacttccacatttggagcagttgtgat
tgggcgtggcccagagaccaagatcactgataagaaatgttctcgacagcaagttgaaagcagagtgtaa
caagggatatgtcaaggtaaagcagagtttgaggaagaggcaagaaccctggcctggaaacacacagga
agagaagagatcaggcaacagtgattctatagaaagggatgtgctcaggaagctgaggctgggacaggg
gctggaacctgggagcaactctggccaatgctctgtgccctaaagaagggaaaagatgcacctatcaaaa
aaggaatccctgggccaactggagtcaaggcttgaagatttctatgcaggacccccaaaatgcaggtttaca
aagatgagcaggtgggtgataaaggataaatacccaaaggcccgttaccattggctggtcttaccgtg
gacctccatttccagctctgaaggctgtggccagggaaacaccttgaactccttaagcatatgcacactgtg
gggaaaaggtgattgtagattttgctgggtccagcaaacctccgcttccgat

6.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Vergleich von FRDA und AOA1 | 5 |
| Tabelle 2: „Ensembl“-Transkripte des Aprataxin-Gens | 6 |
| Tabelle 3: Publierte Aprataxin-Mutationen | 7 |
| Tabelle 4: Für die Amplifikation des Frataxin-Gens gewählte PCR-Bedingungen..... | 19 |
| Tabelle 5: Für die Amplifikation des Aprataxin-Gens gewählte PCR-Bedingungen..... | 20 |
| Tabelle 6: DNA-Marker für die Aprataxin-Haplotypanalyse..... | 29 |
| Tabelle 7: SSCP-Analyse des Frataxin-Gens (I)..... | 30 |
| Tabelle 8: SSCP-Analyse des Frataxin-Gens (II) | 31 |
| Tabelle 9: Sequenzierung des Frataxin-Gens. | 32 |
| Tabelle 10: SSCP-Analyse und Sequenzierung in Aprataxin-Exon 7 | 34 |
| Tabelle 11: SSCP-Analyse und Sequenzierung in Aprataxin-Exon 4 | 36 |
| Tabelle 12: SSCP-Analyse und Sequenzierung in Aprataxin-Intron 4..... | 37 |
| Tabelle 13: Aprataxin-Transkript-Varianten mit Exon 1 | 40 |
| Tabelle 14: Aprataxin-Transkript-Varianten mit vollständiger Exon-2-Sequenz | 41 |

6.3 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: SSCP-Gel von Exon 5a des Frataxin-Gens..... | 32 |
| Abbildung 2: Sequenz von Exon 5a des Frataxin-Gens bei Patient 8562 und seinen Eltern | 32 |
| Abbildung 3: SSCP-Gel von Aprataxin-Exon 7 | 34 |
| Abbildung 4: Sequenz von Exon 7 des Aprataxin-Gens bei Patient 5466 und seiner Mutter | 34 |
| Abbildung 5: Haplotypanalyse für Patient 5466, dessen Familie und Patientin 7689 | 35 |
| Abbildung 6: SSCP-Gel von Aprataxin-Exon 4 | 36 |
| Abbildung 7: „Ensembl“-Transkripte des Aprataxin-Gens | 38 |
| Abbildung 8: Auftrennung der cDNA-PCR-Produkte und der klonierten Fragmente | 39 |
| Abbildung 9: Alternative Aprataxin-Transkripte | 41 |
| Abbildung 10: „missense“-Mutationen im Frataxin-Gen | 45 |
| Abbildung 11: Transkript-Varianten des Aprataxin-Gens..... | 62 |
| Abbildung 12: „Ensembl“-Varianten des Aprataxins..... | 63 |

6.4 Literaturverzeichnis

6.4.1 Bücher und Zeitschriften

- 1 Barbot C, Coutinho P, Chorão R, Ferreira C, Barros J, Fineza I, Dias K, Monteiro JP, Guimarães A, Mendonça P, Moreira MC, Sequeiros J: Recessive ataxia with ocular apraxia - Review of 22 Portuguese patients. *Arch Neurol* 2001; 58: 201-205
- 2 Bartolo C, Mendell JR, Prior TW: Identification of a missense mutation in a Friedreich's ataxia patient: implications for diagnosis and carrier studies. *Am J Med Genet* 1998; 79: 396-399
- 3 Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI: The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 111-121
- 4 Caldecott KW: DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia. *Cell* 2003; 112: 7-10
- 5 Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, Trottier Y, Kish SJ, Faucheux B, Trouillas P, Authier FJ, Dürr A, Mandel JM, Vescovi A, Pandolfo M, Koenig M: Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1771-1780
- 6 Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Cañizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, Michele G, Filla A, Frutos R, Palau F, Patel PI, Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M: Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996; 271: 1423-1427
- 7 Cavadini P, O'Neill HA, Benada O, Isaya G: Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 217-227

- 8 Christodoulou K, Deymeer F, Serdaroglu P, Özdemir C, Poda M, Georgiou DM, Ioannou P, Tsingis M, Zamba E, Middleton LT: Mapping of the second Friedreich's ataxia (FRDA2) locus to chromosome 9p23-p11: evidence for further locus heterogeneity. *Neurogenetics* 2001; 3: 127-132
- 9 Colenbrander MC: Congenital ocular apraxia. *Ophthalmologica* 1970; 160: 96-97
- 10 Cossée M, Dürr A, Schmitt M, Dahl N, Trouillas P, Allinson P, Kostrzewa M, Nivelon-Chevallier A, Gustavson KH, Kohlschütter A, Müller U, Mandel JL, Brice A, Koenig M, Cavalcanti F, Tammara A, Michele G, Filla A, Coccozza S, Labuda M, Montermini L, Poirier J, Pandolfo M: Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann Neurol* 1999; 45: 200-206
- 11 Cossée M, Puccio H, Gansmuller A, Koutnikova H, Dierich A, LeMeur M, Fischbeck K, Dollé P, Koenig M: Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1219-1226
- 12 Cossée M, Schmitt M, Campuzano V, Reutenauer L, Moutou C, Mandel JL, Koenig M: Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7452-7457
- 13 Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S, Tsuji S: Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* 2001; 29: 184-188
- 14 Delatycki MB, Williamson R, Forrest SM: Friedreich's ataxia: an overview. *J Med Genet* 2000; 37: 1-8
- 15 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
- 16 Dunnen JT, Antonarakis E: Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001; 109: 121-124
- 17 Dürr A, Cossée M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, Brice A, Koenig M: Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 1996; 335: 1169-1175

- 18 Epplen C, Epplen JT, Frank G, Mitterski B, Santos EJM, Schöls L: Differential stability of the (GAA)_n tract in the Friedreich ataxia (STM7) gene. *Hum Genet* 1997; 99: 834-836
- 19 Filla A, Michele G, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Campanella G, Coccozza S: The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 554-560
- 20 Forrest SM, Knight M, Delatycki MB, Paris D, Williamson R, King J, Yeung L, Nassif N, Nicholson GA: The correlation of clinical phenotype in Friedreich ataxia with the site of point mutations in the FRDA gene. *Neurogenetics* 1998; 1: 253-257
- 21 Friedreich N: Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchow's Arch Pathol Anat* 1863; 26: 433-459
- 22 Grafen A, Hails R: Modern statistics for the life sciences – Learn how to analyse your experiments. 1. Auflage, Kap. 13, S. 265-269, Oxford University Press, Oxford, 2002
- 23 Harding AE: Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and interfamilial clustering of clinical features. *Brain* 1981; 104: 589-620
- 24 Hausse AO, Aggoun Y, Bonnet D, Sidi D, Munnich A, Rötig A, Rustin P: Idebenone and reduced cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Heart* 2002; 87: 346-349
- 25 Hellenbroich Y, Schwinger E, Zühlke C: Limited somatic mosaicism for Friedreich's ataxia GAA triplet repeat expansions identified by small pool PCR in blood leukocytes. *Acta Neurol Scand* 2001; 103: 188-192
- 26 Ibelgaufts H: Gentechnologie von A bis Z. 1. Aufl., Kap. G, S. 211, VCH, Weinheim, 1990
- 27 Knippers R: Molekulare Genetik. 8. Aufl., Kap. 2, S. 23, Kap. 10, S. 289-291, 299, 304-310, Kap. 14, S. 408, Kap. 17, S. 475-476, 476-480, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001
- 28 Kostrzewa M, Klockgether T, Damian MS, Müller U: Locus heterogeneity in Friedreich ataxia. *Neurogenetics* 1997; 1: 43-47

- 29 Le Ber I, Moreira MC, Rivaud-Péchoux S, Chamayou C, Ochsner F, Kuntzer T, Tardieu M, Saïd G, Habert MO, Demarquay G, Tannier C, Beis JM, Brice A, Kœnig M, Dürr A: Cerebellar ataxia with oculomotor apraxia type 1: clinical and genetic studies. *Brain* 2003; 126: 2761-2772
- 30 Leigh RJ, Zee DS: *The neurology of eye movements*. 2. Auflage, Kap. 3, S. 114, F. A. Davis Company, Philadelphia, 1991
- 31 Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Mendonça P, Barros J, Coutinho P, Sequeiros J, Kœnig M: Homozygosity mapping of Portuguese and Japanese forms of ataxia-oculomotor apraxia to 9p13, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2001a; 68: 501-508
- 32 Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, Mendonça P, Costa M, Barros J, Yanagisawa T, Watanabe M, Ikeda Y, Aoki M, Nagata T, Coutinho P, Sequeiros J, Kœnig M: The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet* 2001b; 29: 189-193
- 33 Mumenthaler M, Mattle H: *Neurologie*. 11. Auflage, Kap. 9, S. 660, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002
- 34 Németh AH, Bochukova E, Dunne E, Huson SM, Elston J, Hannan MA, Jackson M, Chapman CJ, Taylor AMR: Autosomal recessive cerebellar ataxia with oculomotor apraxia (ataxia-teleangiectasia-like syndrome) is linked to chromosome 9q34. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1320-1326
- 35 Ohshima K, Montermini L, Wells RD, Pandolfo M: Inhibitory effects of expanded GAA·TTC triplet repeats from intron 1 of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273: 14588-14595
- 36 Pandolfo M, Montermini L: Prenatal diagnosis of Friedreich ataxia. *Prenat Diagn* 1998; 18: 831-833
- 37 Poeck K, Hacke W: *Neurologie*. 11. Auflage, Kap. 3, S. 106-115, S. 123-127, Kap. 24, S. 536-537, Kap. 32, S. 638-639, Springer Verlag, Berlin, 2001
- 38 Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR: *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*. 4. Auflage, Band 1, Kap. 13, S. 425, Churchill Livingstone, London, 2002

- 39 Sambrook J, Russell DW: Molecular cloning: a laboratory manual. 3. Auflage, Kap. 13, S. 13.49-13.52, 13.90, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001
- 40 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5463-5467
- 41 Sasaki H, Yabe I, Yamashita I, Tashiro K: Prevalence of triplet repeat expansion in ataxia patients from Hokkaido, the northernmost island of Japan. J Neurol Sci 2000; 175: 45-51
- 42 Seyffert W (Hrsg.), 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, Schartl M, Tautz D, Weber P: Lehrbuch der Genetik. 1. Aufl., Kap. B, S. 975-979, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1998
- 43 Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, Ikeguchi K, Nijima K, Kaneko J, Namekawa M, Ogawa T, Date H, Tsuji S, Nakano I, Nishizawa M: Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia - The aprataxin gene mutations. Neurology 2002; 59: 590-595
- 44 Takashima H, Boerkoel CF, John J, Saifi GM, Salih MA, Armstrong D, Mao Y, Quioco FA, Roa BB, Nakagawa M, Stockton DW, Lupski JR: Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. Nat Genet 2002; 32: 267-272
- 45 Tranchant C, Fleury M, Moreira MC, Koenig M, Warter JM: Phenotypic variability of aprataxin gene mutations. Neurology 2003; 60: 868-870
- 46 Uekawa K, Yuasa T, Kawasaki S, Makibuchi T, Ideta T: A hereditary ataxia associated with hypoalbuminemia and hyperlipidemia: a variant form of Friedreich's disease or a new clinical entity? Rinsho Shinkeigaku 1995; 35: 83-86 (Nur die Zusammenfassung dieser Publikation ist ins Englische übersetzt worden.)
- 47 Woods CG, Taylor AMR: Ataxia teleangiectasia in the British isles: the clinical and laboratory features of 70 affected individuals. Q J Med 1992; 82: 169-179
- 48 Zühlke C, Laccone F, Cossée M, Kohlschütter A, Koenig M, Schwinger E: Mutation of the start codon in the FRDA1 gene: linkage analysis of three pedigrees with the ATG to ATT transversion points to a unique common ancestor. Hum Genet 1998; 103: 102-105

6.4.2 Elektronische Datenbanken⁸

- 1 Coutinho P, Barbot C, Moreira MC, Koenig M (Updated 21 March 2002). Ataxia with oculomotor apraxia. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2003. Available at <http://www.genetests.org/>. Accessed 07 october 2002.
- 2 Ensembl Genome Browser, The Wellcome Trust Sanger Institute. World Wide Web URL: <http://www.ensembl.org/>. Accessed 12/22/2002.
- 3 Human Gene Mutation Database (HGMD), Institute of Medical Genetics in Cardiff, College of Medicine, University of Wales. World Wide Web URL: <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>. Accessed 11/18/2003.
- 4 LocusLink, National Center for Biotechnology Information (NCBI). World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink/>. Accessed 07/09/2003.
- 5 Map Viewer, National Center for Biotechnology Information (NCBI). World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>. Accessed 11/28/2003.
- 6 Nucleotide, National Center for Biotechnology Information (NCBI). World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide>. Accessed 07/09/2003.
- 7 Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: #208920 (07/10/2003). World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>. Accessed 07/15/2003.
- 8 Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: #229300 (05/06/2003). World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>. Accessed 07/15/2003.
- 9 UniSTS, National Center for Biotechnology Information (NCBI). World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists>. Accessed 11/28/2003.

⁸ Die Angaben folgen den Richtlinien der einzelnen Datenbank-Betreiber, sofern diese verbindliche Regeln für die Zitierung ihrer Internet-Seiten aufgestellt haben.

6.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. Schwinger danke ich für das Bereitstellen des Arbeitsplatzes im Labor sowie für seine immer freundliche, entgegenkommende Art.

Frau Prof. Dr. Ch. Zühlke danke ich für die Überlassung der Arbeit und ihre stets präsente Bereitschaft, mir bei der Lösung der kleinen und großen Probleme des Forscheralltags mit ihrer Erfahrung beruhigend beizustehen.

Herrn Dr. Y. Hellenbroich danke ich für seinen Anteil an der Gestaltung des Themas dieser Arbeit und seine empathische Betreuung, ohne die ich die Erlebnisse mit dem „LI-COR“ und Aprataxin-Transkript-Varianten sicherlich nicht so gut verarbeitet hätte.

Herrn Dr. S. Opitz danke ich für sein Bemühen, auch die scheinbar unlogischen Phänomene erklärbar zu machen. Ohne das von ihm geschriebene Computerprogramm wäre die Auswertung der Sequenz-Daten nicht so übersichtlich gelungen.

Frau U. Gehlken und Frau H. Pawlack verdanke ich die gute und gewissenhafte Einarbeitung in die Methoden der Arbeit, die mich vor vielen Fehlern bewahrt hat. Beiden gebührt ebenso wie Herrn Dr. A. Dalski, Frau M. Albrecht und Frau J. Atici Dank dafür, daß die Arbeitsatmosphäre im Forscherlabor so nett war. Sie alle hatten immer ein offenes Ohr für mich und meine Fragen.

Meinen Eltern sei dafür gedankt, daß sie mir das Studium und damit auch diese Arbeit ermöglicht haben.

Meiner Freundin danke ich für viele anregende Gespräche, ihre Gesellschaft an vielen einsamen Laborwochenenden und ihren Trost während der Phasen, in denen der „LI-COR“ nicht kooperieren wollte.

6.6 Lebenslauf

| | |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Name | Matthias Habeck |
| Geburtsdatum | 17. Mai 1977 |
| Geburtsort | Rendsburg |
| Schullaufbahn | |
| 1983 bis 1987 | Obereider-Grundschule, Rendsburg |
| 1987 bis 1996 | Herder-Gymnasium, Rendsburg |
| 1996 | Abitur |
| Zivildienst | |
| 1996 bis 1997 | Rettungssanitäter, DRK-Rettungswache Tarp |
| Universitäre Laufbahn | |
| 1997 bis 1998 | Jurastudium an der Universität Trier |
| 1998 | Beginn des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck |
| 2000 | Ärztliche Vorprüfung |
| 2001 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 2001 bis 2002 | Auslandssemester an der Università degli Studi di Parma, Italien |
| 2002 bis 2003 | Experimentelle Arbeit am Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck |
| 2004 bis 2005 | Praktisches Jahr |
| 2005 | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |