

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

---

**Spinozerebelläre Ataxie Typ 17:  
Suche nach modifizierenden Sequenz-Varianten**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Anne-Kathrin Blaum  
aus Krefeld

Lübeck 2009

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

2. Berichtstatter(in): Priv.-Doz. Dr.med Christoph Thorns

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.11.2010

*Für Mama und Papa*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1    Spinozerebelläre Ataxie Typ 17	7
1.2    TATA-Bindeprotein	10
1.2.1.    Genetik	10
1.2.2.    Protein	11
1.3    TBP-ähnliche Proteine: TBPL1 und TBPL2	14
1.4    Aufgabenstellung	17
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1    Material	19
2.1.1.    Chemikalien, Enzyme und Nukleinsäuren	19
2.1.2.    Stammlösungen	20
2.1.3.    Synthetische Oligonukleotide	20
2.1.4.    Geräte und Gebrauchsartikel	22
2.2    Methoden	23
2.2.1.    Probenauswahl	23
2.2.2.    Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.2.3.    Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.4.    DNA-Sequenzierung	28

---

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1 Suche nach Sequenzvariationen im <i>TBP</i> -Gen	31
3.2 Suche nach Sequenzvariationen im <i>TBPL1</i> -Gen	34
3.3 Suche nach Sequenzvariationen im <i>TBPL2</i> -Gen	38
<b>4. Diskussion</b>	<b>44</b>
4.1 Reduzierte Penetranz	44
4.2 Polymorphismen und ihre Auswirkung	45
4.3 Suche nach Sequenzvariationen im <i>TBP</i> -Gen, <i>TBPL1</i> -Gen und <i>TBPL2</i> -Gen	47
4.3.1. <i>TBP</i> -Gen	47
4.3.2. <i>TBPL1</i> -Gen	48
4.3.3. <i>TBPL2</i> -Gen	50
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>55</b>
6.1 Zeitschriften und Bücher	55
6.2 Elektronische Datenbanken	58
<b>7. Anhang</b>	<b>59</b>
7.1 Danksagung	59
7.2 Lebenslauf	60

## Abkürzungsverzeichnis

### Allgemein

A	Base Adenin
C	Base Cytosin
cDNA	<i>engl.:</i> copy-DNA (DNA-Kopie einer RNA-Sequenz)
DNA	<i>engl.:</i> deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ds	<i>engl.:</i> double-strands, doppelsträngige DNA-Fragmente
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Dideoxynukleotidtriphosphat
et al.	<i>et alii</i> („und die anderen“)
G	Base Guanin
mRNA	<i>engl.:</i> messenger RNA, Ribonukleinsäure
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
PCR	<i>engl.:</i> polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
rev	<i>engl.:</i> reverse, Sequenzdarstellung im Gegenstrang
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SNP	<i>engl.:</i> single nucleotide polymorphism
ss	<i>engl.:</i> single-strands, einzelsträngige DNA-Fragmente
T	Base Thymin
TBP	<i>engl.:</i> TATA Box binding protein, TATA-Bindeprotein
TBPL1	<i>engl.:</i> TATA Box binding protein like 1
TBPL2	<i>engl.:</i> TATA Box binding protein like 2
UV	Ultraviolett
(v/v)	Verhältnis Volumen zu Volumen
wt	<i>engl.:</i> wildtype
(w/v)	Verhältnis Gewicht zu Volumen

## Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
g	Gramm
l	Liter
h	Stunde
M	Molarität (Einheit mol/l)
min	Minute
mol	Mol (=Stoffmenge, SI-Basiseinheit)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
U	Unit(s) (Einheit der Enzymaktivitäten)
V	Volt

## Vorsätze

m	Milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
n	Nano ( $10^{-9}$ )
p	Piko ( $10^{-12}$ )

## Aminosäuren

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Cystein	C	Cys
Asparaginsäure	D	Asp
Glutaminsäure	E	Glu
Phenylalanin	F	Phe
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Lysin	K	Lys
Leucin	L	Leu
Methionin	M	Met

Asparagin	N	Asn
Prolin	P	Pro
Glutamin	Q	Gln
Arginin	R	Arg
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Valin	V	Val
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Tertiärstruktur des TBP
- Abb. 1.2 Schematischer Aufbau des TFIID-Komplexes
- Abb. 1.3 Schematischer Aufbau des Initiationskomplexes der RNA-Polymerase II
- Abb. 1.4 Tertiärstruktur TBP, TBPL1, TBPL2 und TRF
- Abb. 2.1 Stammbaum der Familie A
- Abb. 2.2 Stammbaum der Familie B
- Abb. 3.1.1 PCR-Produktbanden des *TBP*-Gens einer Probe auf 2% Agarosegel
- Abb. 3.1.2 Ausschnitt aus der Sequenzierung von Exon 6 des *TBP*-Gens
- Abb. 3.1.3 Ausschnitt aus der Sequenzierung vom Intron zwischen Exon 6 und 7 des *TBP*-Gens
- Abb. 3.1.4 Ausschnitt aus der Sequenzierung des 5'UTR des *TBP*-Gens
- Abb. 3.2.1 PCR-Produktbanden des *TBPL1*-Gens auf 2% Agarosegel
- Abb. 3.2.2 Ausschnitt 1 aus der Sequenzierung des 5'UTR des *TBPL1*-Gens
- Abb. 3.2.3 Ausschnitt 2 aus der Sequenzierung des 5'UTR des *TBPL1*-Gens
- Abb. 3.2.4 Ausschnitt 1 aus der Sequenzierung vom Intron zwischen Exon 4 und 5 des *TBPL1*-Gens.
- Abb. 3.2.5 Ausschnitt 2 aus der Sequenzierung vom Intron zwischen Exon 4 und 5 des *TBPL1*-Gens.
- Abb. 3.3.1 PCR-Produktbanden des *TBPL2*-Gens auf 2% Agarosegel
- Abb. 3.3.2 Ausschnitt aus der Sequenzierung des Exon 1 des *TBPL2*-Gens
- Abb. 3.3.3 Ausschnitt 1 aus der Sequenzierung des 5'UTR des *TBPL2*-Gens



- Abb. 3.3.4 Ausschnitt 2 aus der Sequenzierung des 5'UTR des *TBPL2*-Gens
- Abb. 4.1 Verteilung des Polymorphismus an Position c.771 T/C im *TBP*-Gen für Familie A
- Abb. 4.2 Verteilung des Polymorphismus an Position IVS 6 +19 A/G des *TBP*-Gens für Familie A
- Abb. 4.3 Verteilung des Polymorphismus an Position IVS 4 +5 C/T des *TBPL1*-Gens für Familie A
- Abb. 4.4 Verteilung des Polymorphismus an Position IVS 4 +5 C/T des *TBPL1*-Gens für Familie B
- Abb. 4.5 Verteilung des Polymorphismus an Position c.92G/C des *TBPL2*-Gens für Familie A
- Abb. 4.6 Verteilung des Polymorphismus an Position c.92G/C des *TBPL2*-Gens für Familie B

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 1.1 Charakteristika von *TBPL1* und *TBPL2* im Vergleich zu *TBP*
- Tab. 2.1 Sequenz und Bezeichnungen der Primer für Exon 1-8 des *TBP*-Gens
- Tab. 2.2 Sequenz und Bezeichnungen der Primer für Exon 1-7 des *TBPL1*-Gens
- Tab. 2.3 Sequenzen und Bezeichnungen der Primer für Exon 1-7 des *TBPL2*-Gens
- Tab. 2.4 Bezeichnungen und Sequenzen von zusätzlichen Sequenzprimern für das *TBP*- und *TBPL2*-Gen
- Tab. 2.5 Klinische und radiologische Daten der Familie A
- Tab. 2.6 Programm der PCR
- Tab. 2.7 PCR-Bedingungen für die Exons 1-8 des *TBP*-Gens
- Tab. 2.8 PCR-Bedingungen für die Exons 1-7 des *TBPL1*-Gens
- Tab. 2.9 PCR-Bedingungen für die Exons 1-7 des *TBPL2*-Gens
- Tab. 2.10 Programm der Sequenzreaktion
- Tab. 3.1 Sequenzvariationen im *TBP*-Gen
- Tab. 3.2 Sequenzvariationen im *TBPL1*-Gen
- Tab. 3.3 Sequenzvariationen im *TBPL2*-Gen

# 1 Einleitung

Der Begriff Ataxie stammt aus der griechischen Sprache. So bedeutet „*táxis*“ soviel wie Anordnung oder Einrichtung. Die Vorsilbe „*A*“ deutet die Verneinung an: Nicht-Anordnung oder ohne Ordnung. In der Medizin wird mit dem Begriff Ataxie eine mangelnde Koordination, sowie ein fehlerhaftes Zusammenspiel verschiedener Muskelgruppen bei der Ausführung von Bewegungen bezeichnet.

Die Einteilung dieser Erkrankungen unterscheidet vererbte und nicht-vererbte Ataxien. Die erblichen Ataxien teilt man hinsichtlich des Vererbungsmodus in autosomal-dominante und autosomal-rezessive Formen ein.

Die autosomal-dominant vererbten Ataxien sind eine heterogene Gruppe an Erkrankungen, die sich zum einen durch zusätzliche Symptome und zum anderen durch die die Krankheit verursachende Mutation weiter unterscheiden. Die größte Untergruppe stellen die Spinozerebellären Ataxien (SCA) dar, bei denen die für die Ataxie ursächliche Neurodegeneration sowohl die Bahnen des Kleinhirns als auch die des Rückenmarks betreffen kann. Bislang wurden 30 genetisch unterscheidbare Typen beschrieben, wobei aber noch nicht für jede SCA das betroffene Gen bekannt ist (Tallaksen, 2008 und Storey et al., 2009). Das Hauptsymptom der SCAs, die zerebelläre Ataxie, tritt meist im Erwachsenenalter auf und wird charakterisiert durch eine Gang- und Standunsicherheit, die erschwerte Koordination von Bewegungen der Extremitäten, wie auch Schwierigkeiten bei der Sprachbildung und bei Augenbewegungen.

Im Weiteren wird die SCA Typ 17 genauer besprochen, die Gegenstand dieser Arbeit ist.

## 1.1 Spinozerebelläre Ataxie Typ 17

Die spinozerebelläre Ataxie Typ 17 (SCA17) macht 0.5 – 1% der dominant vererbten Ataxien aus (Craig et al., 2005) und hat eine Prävalenz von 1-10:10.000.000. Die bislang bekannten SCA17-Patienten kommen aus Familien in Deutschland, Frankreich, Italien, Belgien, Finnland, Brasilien, China und Japan.

Das durchschnittliche Alter bei Erstmanifestation der SCA17 ist 30 Jahre, aber in der Literatur ist die beschriebene Bandbreite mit drei bis 55 Jahren groß (De Michele et al., 2003 und Fujigasaki et al., 2001).

Die Klinik der SCA17 ist durch eine phänotypische Variabilität charakterisiert. Das anfängliche Symptom ist meist eine progrediente Ataxie: 67-100% der Patienten stellen sich mit einer Stand- oder Gangataxie oder mit Störungen der Feinmotorik (Dysdiadochokinese) und Zielbewegungen (Dysmetrie) vor. Weitere zerebelläre Symptome können zusätzlich auftreten: Die Dysarthrie, eine Beeinträchtigung des Sprechens, die aufgrund von Störungen der Sprechmotorik entsteht, okulomotorische Symptome wie Sakkadierung oder Defizite in der langsamen Folgebewegung (Mariotti et al., 2007).

Neben zerebellären Symptomen sind Patienten mit SCA17 von kognitiven Beeinträchtigungen bzw. Demenz betroffen. Die Prävalenz dieser Symptome wird auf 50-100% geschätzt. Zu den kognitiven Beeinträchtigungen zählen Konzentrationsschwierigkeiten, zeitliche und örtliche Desorientierung oder ideatorische Apraxie. Hinzu kommen meist psychiatrische Symptome wie Persönlichkeitsveränderungen, Hypersexualität, Depression, Psychose oder Halluzinationen (Rolfs et al., 2003).

Im weiteren Verlauf der Krankheit können extrapyramidale Bewegungsstörungen auftreten: Choreatische Hyperkinesen und dystonische Bewegungsstörungen sowie die Kardinalsymptome des Parkinsonsyndroms, Rigor, Tremor und Akinese, sind beobachtet worden (Hernandez et al., 2003 und Toyoshima et al., 2004). Diese Symptomkomplexe deuten auf eine pathologische Veränderung der Basalganglien hin.

Im späten Stadium der Krankheit können weitere Symptome zu dem ohnehin sehr komplexen Krankheitsbild hinzukommen: Spastische Tonuserhöhung und pathologische Reflexe deuten auf eine Schädigung der Pyramidenbahn hin. Manche Patienten klagen über Urininkontinenz oder Krampfanfälle.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die interindividuelle Divergenz der Symptomatik charakteristisch für die SCA17 ist. Dennoch besteht der Hauptsymptomkomplex dieser Erkrankung aus zerebellärer Ataxie, kognitiver Beeinträchtigung und psychiatrischen Symptomen sowie Basalgangliensymptomen.

Diese variable Symptomatik lässt sich auch in klinischen Untersuchungen feststellen: Das Elektroenzephalogramm und abgeleitete evozierte Potentiale können auffällig sein (Bruni et al., 2004). Zur Darstellung der Veränderung anatomischer Strukturen im Gehirn ist die Magnet-Resonanz-Tomographie geeignet: Dabei können hauptsächlich eine Atrophie des Kleinhirns, aber auch des Kortex, des Hirnstamms und der Nuclei caudati beobachtet

werden. In der Voxel-basierten Morphometrie konnte eine Assoziation zwischen der Klinik einiger Patienten und ihrer Veränderung im MRT nachgewiesen werden (Lasek et al., 2006).

Zu den neuropathologischen Veränderungen zählt an erster Stelle ein signifikant reduziertes Gehirnvolumen, bedingt durch die Atrophie des Zerebellums und des Kortexes (Rolfs et al., 2003). Das Zerebellum ist durch einen starken Verlust der Purkinje-Zellen mit Bergmann-Gliose gekennzeichnet (Fujigasaki et al., 2001). Auf molekularer Ebene ist bei immunhistochemischen Untersuchungen ein weiteres Charakteristikum der SCA17 zu finden: Neuronale intranukleäre Einschlüsse. Dies sind Proteinaggregate bestehend aus Transkriptionsfaktoren, Ubiquitin und Hitzeschockproteinen.

Differentialdiagnostisch ist vor allem die Chorea Huntington wichtig. Bei vielen Patienten ist vor der molekulargenetischen Analyse klinisch eine solche diagnostiziert worden. Andere Typen der SCAs sind klinisch jedoch meist gut von der SCA17 zu unterscheiden (Manto MU, 2005). Zum einen grenzt das häufige Auftreten von kognitiven Beeinträchtigung und psychiatrischen Symptomen die SCA17 von den übrigen Typen ab. Zum anderen treten bei einigen SCAs charakteristische Symptomkomplexe auf, die klinisch den Weg zu richtigen Diagnose weisen können: Zum Beispiel weisen Patienten mit SCA1 häufiger Pyramidenbahnzeichen und Dysphagie auf, während Patienten mit SCA2 eher durch einen abgeschwächten oder gar nicht vorhandenen Achillessehnenreflex auffallen. Patienten mit der SCA3-Mutation klagen oft über Doppelbilder beim Sehen (Bürk et al., 1996). Bei Patienten mit SCA4 ist meist eine schwere periphere Neuropathie zu verzeichnen (Hellenbroich et al., 2003). Bei der SCA6 sind die zerebellären Symptome hauptsächlich auf den Verlust der Tiefensensibilität beschränkt (Zuchenko et al., 1997). SCA7 ist charakterisiert durch einen Visusverlust bedingt durch eine Retinadegeneration.

## 1.2 TATA-Bindeprotein

### 1.2.1 Genetik

Das bei der Spinocerebellären Ataxie Typ 17 betroffene Gen kodiert für den essentiellen Transkriptionsfaktor **TATA-Bindeprotein** (TBP) (Koide et al., 1999) und ist auf Chromosom 6q27 lokalisiert (Imbert et al.; 1994). Das *TBP*-Gen besteht aus acht Exons, die für ein 1867 Basenpaare langes Transkript kodieren. In Exon 3 liegt eine repetitive, polymorphe CAG-Trinukleotid-Sequenz, die auf Proteinebene einer Polyglutamin-Domäne entspricht. Zum heutigen Zeitpunkt ist die physiologische Anzahl an CAG-Triplets in Exon 3 des *TBP*-Gens zwischen 25 und 44 definiert, wobei die häufigsten menschlichen Allele 32 bis 39 Triplets tragen (Zühlke und Bürk, 2007). Der Repeat kann in unterschiedliche Regionen mit zwei polymorphen CAG-Abschnitten aufgeteilt werden:  $(CAG)_3 (CAA)_3 (CAG)_{n1} CAA CAG CAA (CAG)_{n2} CAA CAG$ , wobei  $n1$  zwischen 7 und 11 und  $n2$  zwischen 9 und 21 liegen kann. Zusätzlich gibt es aber auch eine Variation im Aufbau des Repeats: Das CAA CAG CAA – Element, welches die beiden polymorphen CAG-Abschnitte voneinander trennt, ist bei einigen Personen nicht vorhanden. Somit ergibt sich nur ein großer polymorpher CAG-Abschnitt, der mit erhöhter Instabilität bei Transmission zur nächsten Generation einhergeht (Gao et al., 2008).

SCA17-Patienten weisen eine Verlängerung der CAG-Repeat-Sequenz auf, eine so genannte CAG-Repeat-Expansion. Die Mehrheit der Patienten mit SCA17 trägt die expandierte CAG-Sequenz nur auf einem Allel, sie sind heterozygot. Kinder von Betroffenen erben die Mutation mit einer Wahrscheinlichkeit von 50%. Die SCA17 wird autosomal dominant vererbt: Die Mutation kann sowohl auf dem paternalen als auch auf dem maternalen Allel liegen.

Für Allele mit einer CAG-Triplet-Anzahl zwischen 43 und 48 ist eine reduzierte Penetranz beschrieben. In der Genetik wird unter Penetranz die prozentuale Wahrscheinlichkeit verstanden, mit der ein bestimmter Genotyp den zugehörigen Phänotyp in einer Population beziehungsweise Geschwisterreihe ausbildet. Dabei wird eine vollständige Penetranz, bei der es immer zur Ausprägung des Merkmals kommt, von einer unvollständigen oder reduzierten Penetranz unterschieden: Trotz eines identischen Genotyps weisen nicht alle Individuen denselben Phänotyp auf. Im Falle der SCA17

heißt das: Individuen mit einer CAG-Anzahl zwischen 43 – 48 erkranken nicht alle an SCA17.

### 1.2.2 Das Protein und seine Funktion

Das TATA-Bindeprotein (TBP) ist ein 38kD schweres Protein mit einer charakteristischen Struktur: Der aminoterminal Abschnitt enthält eine Polyglutamin-Domäne, dessen Größe von der Anzahl der CAG-Repeats in Exon 3 abhängt. Eine glutaminreiche Domäne ist ein häufiges Motiv in Transkriptionsfaktoren (Purello et al., 1994). Die 180 Aminosäuren lange carboxyterminale Domäne des TBP ist in allen Organismen hoch konserviert und weist die Eigenschaft zur TATA-Box-Bindung auf. Diese ermöglicht TBP seine Funktion als essentieller Transkriptionsfaktor.

Die Transkription als Prozess der mRNA-Synthese kann in drei Schritte eingeteilt werden: Initiation, Elongation und Termination. Ein Enzym zur mRNA-Synthese in eukaryontischen Lebewesen ist die RNA-Polymerase II. Das TBP spielt eine wichtige Rolle am Beginn der Initiation:

Um den abzulesenden DNA-Strang, die Matrize, binden zu können, benötigt die RNA-Polymerase II eine Reihe von allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die zusammen TF II (Transkriptions-Faktor für die RNA-Polymerase II) genannt werden. Die einzelnen Faktoren werden alphabetisch als TFIIA, TFIIB bis TFIIF bezeichnet.

Die Initiation beginnt mit der Bindung von TFIID an die DNA. Das TBP bildet zusammen mit TBP-assozierten Faktoren (TAFs) diesen TFIID-Komplex. In seiner 3D-Formation ähnelt das TBP einem Sattel, siehe Abbildung 1.1 .

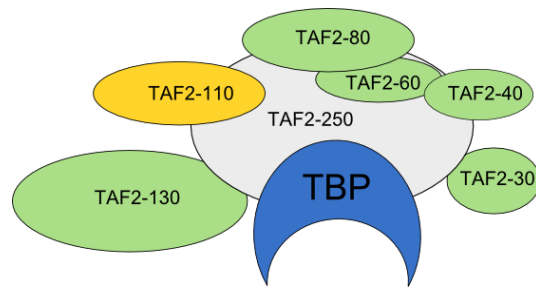


**Abb.1.1** Tertiärstruktur des TBP

Auf der Unterseite befinden sich beiderseits je 5  $\beta$ -Stränge (grün), auf der Oberseite je zwei  $\alpha$ -Helices (rot).

(modifiziert nach Abbildung „tata binding protein“ auf [http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/110300/rna\\_polymerases.htm](http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/110300/rna_polymerases.htm))

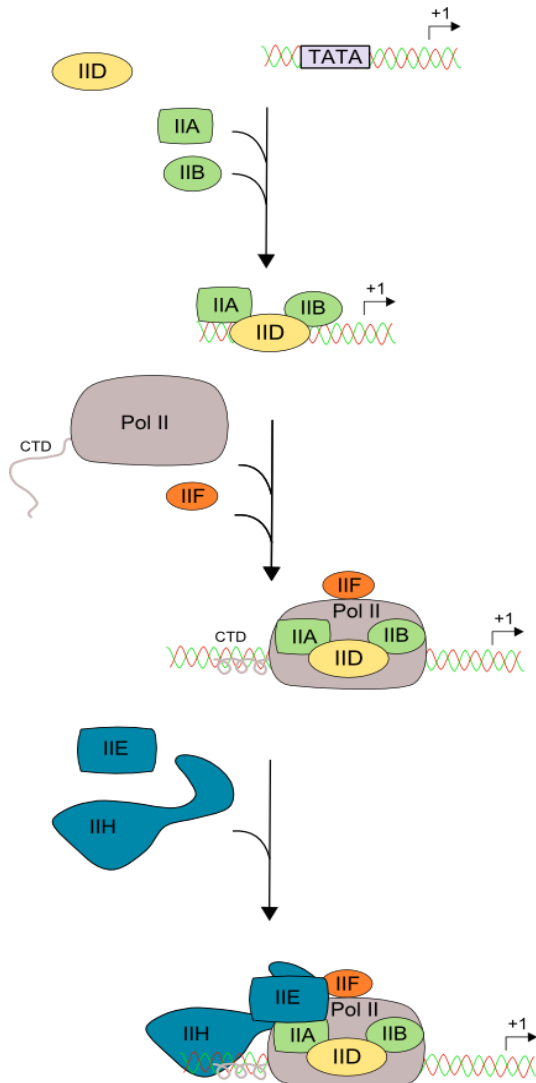
Die konvexe Oberfläche vermittelt die Wechselwirkungen mit den TAFs (Abbildung 1.2), an der konkaven Fläche wird Kontakt zu den Nukleotiden und dem Ribose-Phosphat-Rückgrat der DNA aufgenommen. Abbildung 1.2 zeigt den schematischen Aufbau des TFIID Komplexes mit seinen einzelnen Komponenten, dem TBP und den an ihn bindenden TAFs.



**Abb.1.2** Schematischer Aufbau des TFIID-Komplexes  
(modifiziert nach Knippers, 2001, Abb. 12.16)

Die Anlagerung und Bindung des TBP an die DNA erfolgt an der TATA-Box, einer repetitiven Thymin-Adenin-Sequenz, die zwischen 30 und 100 Nukleotiden in 5'-Richtung des eigentlichen zu transkribierenden Abschnitt auf der DNA-Matrize liegt. Die TATA-Box fungiert als Promotor. Promotoren dienen als Binde- und Erkennungsstelle für die RNA-Polymerase II in Bezug auf das in 3'-Richtung nachfolgende zu transkribierende Gen. Nach der Bindung des TBP an die TATA-Box, kommt es zu einer Konformationsänderung der gebundenen DNA. Weitere Transkriptionsfaktoren binden nun in einer festgelegten Reihenfolge.

In Abbildung 3 ist der schrittweise Aufbau des Initiationskomplexes schematisch zusammengefasst:



1. TFIIA und TFIIB stabilisieren die Bindung von TFIID an die DNA, indem sie mit den entgegengesetzten Bereichen des TFIID in Kontakt treten.

2. TFIID, TFIIA und TFIIB bilden nun eine Art Plattform, auf der sich die RNA-Polymerase II unter Leitung des TFIIFs niederlassen kann.

3. Schließlich lagern sich noch zwei weitere Faktoren, TFIIE und TFIIH, an. Damit ist die Bildung des Initiationskomplexes abgeschlossen und die RNA-Polymerase II kann in ihren Reaktionszyklus eintreten.

**Abb.1.3** Schematischer Aufbau des Initiationskomplexes der RNA-Polymerase II (modifiziert nach Knippers, 2001, Abb. 12.17)

Vor dem Hintergrund der physiologischen Funktion des TBP lassen sich Rückschlüsse auf die möglicherweise veränderte Funktion des TBP in Patienten mit SCA17 ziehen. Bei der Repeat-Expansion im *TBP*-Gen wird davon ausgegangen, dass es sich um eine „gain of function“-Mutation handelt: Das Genprodukt des CAG-Repeats, die Polyglutamin-Domäne im TATA-Bindeprotein, wird vergrößert und erhält damit eine zusätzliche, aber pathologische Funktion. Diese These wird unterstützt durch die zwar seltenen, aber



existierenden Betroffenen, die homozygot für SCA17-Allele sind. Ein kompletter Verlust der TBP-Funktion hingegen ist nach dem bisherigen Stand der Wissenschaft nicht vereinbar mit dem Leben. Der genaue Mechanismus wie ein vergrößerter Polyglutamin-Anteil in einem ubiquitären und essentiellen Protein wie TBP zu einer selektiven Neurodegeneration wie in SCA17 führen kann, ist noch unklar.

TBP ist eines von drei Mitgliedern einer Genfamilie, die im Weiteren beschrieben wird.

### 1.3 TBP-ähnliche Proteine: TBPL1 und TBPL2

In den letzten 10 Jahren sind neben TBP als essentiellen Transkriptionsfaktor weitere Proteine entdeckt worden, die mit TBP verwandt sind. Zu der TBP-Familie im Menschen werden zwei weitere Proteine gezählt: TBPL1 und TBPL2 (TATA-Bindeprotein like 1 und 2). Es gibt auch TBP-ähnliche Proteine in anderen Organismen wie beispielsweise TRF, der TBP-related Faktor in *Drosophila melanogaster*.

Ohbayashi et al. konnten 1999 erst in muriner und später in humaner cDNA die Existenz eines Gens nachweisen, das für ein TBP-ähnliches Protein kodiert. Dieses Protein wurde wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit zu TBP TATA-Bindeprotein like 1, kurz TBPL1 oder TLP genannt. Der Genlocus des TBPL1 konnte via Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung auf den langen Arm des Chromosoms 6 an Position q22.1-22.3 ermittelt werden. Auf demselben Chromosom an Position q27 liegt das *TBP*-Gen.

Auch im strukturellen Aufbau der beiden Proteine lassen sich Ähnlichkeiten entdecken: Das TBP besteht aus einer variablen N-terminalen Region, die den Polyglutamin-Abschnitt enthält, und einer 180 Aminosäuren langen C-terminalen Domäne, die in allen Organismen hoch konserviert ist und die Eigenschaft zur TATA-Box-Bindung aufweist. Im Vergleich der Aminosäuresequenz dieser hoch konservierten Domäne von TBP mit der C-terminalen Region des TBPL1 lässt sich eine 39% Homologie feststellen. Die N-terminale Region von TBPL1 ist sehr kurz und enthält keine Polyglutamin-Domäne.

In einer Northern Blot-Analyse von unterschiedlichen menschlichen Geweben konnte gezeigt werden, dass das 21 kDa schwere TBPL1 wie auch TBP ubiquitär exprimiert sein mit besonders hohem Niveau in Spermatozyten oder Oozyten.

Die Funktion von TBPL1 scheint sich gänzlich von der des TBP abzugrenzen: Trotz der Homologie der Aminosäuresequenz sind einige für die Bindung der TATA-Box unerlässliche Sequenzen in TBPL1 nicht vorhanden, was eine Aufgabe an genau diesem Schritt der Transkription unwahrscheinlich macht. Zusätzlich konnte *in vitro* weder eine DNA-Bindung noch eine Aktivierung der Transkription durch TBPL1 nachgewiesen werden. Mittlerweile wird die Rolle des TBPL1 in der Regulation der Transkription vermutet, möglicherweise über eine Bindung von TFIIA (Chong et al., 2005).

Das bisher letzte Mitglied der TBP-Familie TATA-Bindeprotein like 2, kurz TBPL2 genannt, wurde 2003 identifiziert (Persengiev et al., 2003). Das *TBPL2*-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 14 an Position q22.3. Das *TBPL2*-Gen besteht aus sieben Exons und sechs Introns im Gegensatz zu acht Exons und sieben Introns im *TBP*-Gen. TBPL2 fehlt die Sequenz korrespondierend zu Exon 1 des TBP (Di Pietro et al., 2007).

Auch die Aminosäuresequenz des TBPL2 scheint mit der des TBP nahe verwandt zu sein. Im TBPL2 konnten eine hoch konservierte carboxyterminale Domäne (Aminosäure 184-375) und eine variable aminoternale Domäne (Aminosäure 1-183) festgestellt werden. Die C-terminale Domäne weist eine 93% Sequenzhomologie zu der des TBP auf. Der N-terminalen Region des TBPL2 fehlt die Polyglutamin-Domäne, wie sie in TBP vorhanden ist.

Wie schon TBP und TBPL1 wird TBPL2 in menschlichen Geweben ubiquitär exprimiert, aber im Vergleich zu TBP und TBPL1 in einem geringeren Ausmaß. Die einzigen Gewebearten, in denen eine höhere Expression nachgewiesen werden konnte, sind Spermatozyten und Oozyten.

Dies führte zu der Annahme, dass TBPL2 eine gewebespezifische Funktion inne haben könnte. Doch die hohe Homologie zwischen TBP und TBPL2, vor allem in den Sequenzen verantwortlich für die Funktion von TBP, deutet auf eine mögliche Rolle an der Seite oder auch anstelle von TBP hin. Es konnte 2002 gezeigt werden, dass 4-zellige Mäuseembryonen, die homozygot für einen TBP-Knockout waren, für mehrere Tage *in vitro* überlebten (Martianov et al., 2002). Dieser Bericht wirft die Möglichkeit einer TBP-unabhängigen Transkription auf. Sind eventuell andere Transkriptionsfaktoren wie

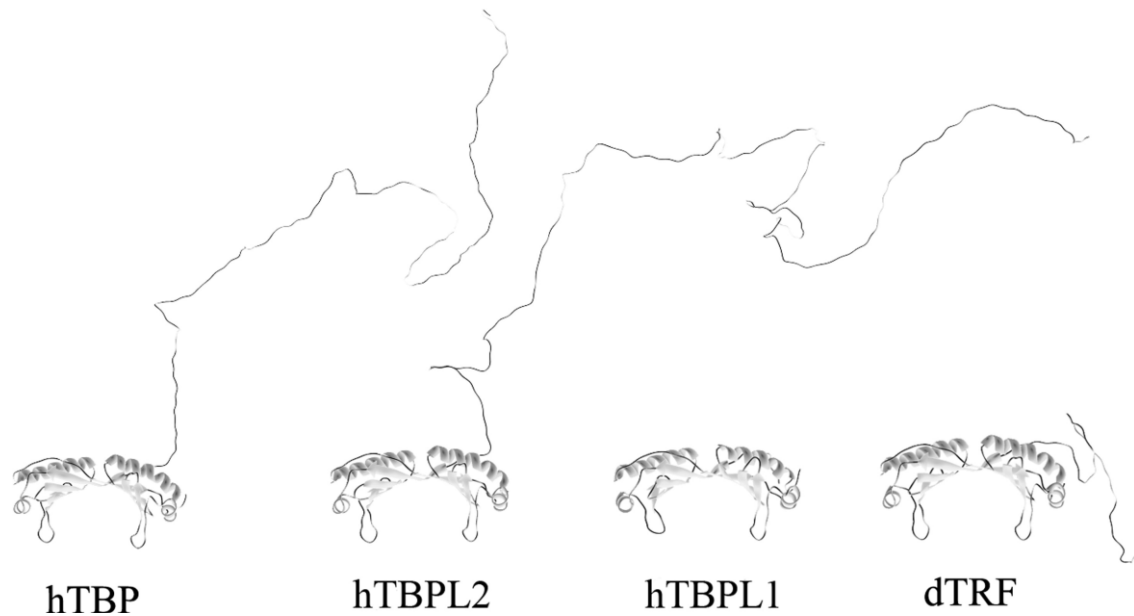
TBPL2 in der Lage sind, Promotoren zu erkennen und Gene zu aktivieren, die z.B. für die Entwicklung oder die Keimzellendifferenzierung eine Rolle spielen?

Die strukturellen und funktionellen Charakteristika von TBP, TBPL1 und TBPL2 sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Charakteristika	TBP	TBPL1	TBPL2
Genlocus	6q27	6q22.1-22.3	14q23.3
Aminosäuresequenz - Carboxyterminal	- Hoch konserviert, TATA-Box-Bindung Eigenschaft	- Hoch konserviert	- Hoch konserviert
- Aminoterminal	- Enthält Polyglutamin- Domäne	- Sehr kurz	- Unstrukturiert, keine Polyglutamin-Domäne
Protein	38 kDa	21 kDa	55kDa
Expression	Ubiquitär	Ubiquitär, hohe Konzentration in Spermatozyten und Oozyten	Ubiquitär auf sehr niedrigem Level, höhere Konzentration in Spermatozyten und Oozyten
Funktion	TATA-Box-Bindung	?	?

**Tab. 1.1** Charakteristika von TBPL1 und TBPL2 im Vergleich zu TBP

Evolutionsgeschichtlich kann man davon ausgehen, dass die Mitglieder der TBP-Familie im Menschen und in anderen Organismen sich aus einem ursprünglichen Gen entwickelt haben. Nach heutiger Auffassung sind TBPL1, TBPL2 und TRF alle aus einer Duplikation des *TBP*-Gens entstanden (Di Pietro et al., 2007). Im Anschluss haben sich einzelne Segmente der „neuen“ Gene unabhängig von dem Vorläufer *TBP*-Gen entwickelt. Sie unterscheiden sich vor allem in der N-terminalen Domäne. Im Zeitablauf gesehen ist das Auftreten des *TBP*-Gens vor 1500 Millionen Jahren mit der Entstehung der Eukaryonten datiert. Die erste Duplikation, die zur Entstehung des *TBPL1*-Gen führte, wird mit dem Erscheinen von Metazoa vor 750 Millionen Jahren gleichgesetzt. Vor 500 Millionen Jahren entwickelten sich die ersten Wirbeltiere und mit der 2. Duplikation aus dem *TBP*-Gen wurde hier der Ursprung für das *TBPL2*-Gen gelegt. Mit dem Erscheinen von *Drosophila* vor 250 Millionen Jahren entstand das *TRF*-Gen aus einer 3. Duplikation. Die Evolution der Mitglieder der TBP-Familie erklärt auch die strukturellen Ähnlichkeiten der Proteine untereinander, siehe Abbildung 1.4.



**Abb.1.4** Tertiärstruktur des TBP, TBPL1, TBPL2 und TRF. h = human, d = drosophila  
Aus Di Pietro et al., Genomics, Evolution and Expression of TBPL2, a member of the TBP Family. (2007)

## 1.4 Aufgabenstellung

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 17 wird durch eine CAG-Repeat-Expansion im Gen für den essentiellen Transkriptionsfaktor TBP hervorgerufen. Der CAG-Repeat liegt in Exon 3 des *TBP*-Gens und kodiert für eine Polyglutamin-Domäne. Eine Repeatlänge von 25-44 CAG-Tripletts wird als physiologisch angesehen, darüber hinaus kann es zum Auftreten der SCA17 kommen. Die klinische Bedeutung von Allelen, die für Gln<sub>43-48</sub> in der Polyglutamindomäne im TBP kodieren, ist zum heutigen Zeitpunkt noch ungeklärt (Oda et al., 2004): Auf der einen Seite werden Symptome wie Ataxie und fortschreitende Demenz bei einem 64-jährigen Patienten auf ein Gln<sub>43</sub>-Allel zurückgeführt (Silveira et al., 2002). Währenddessen wird bei einem Patienten mit „early onset cerebellar ataxia“ (EOCA) und Verdacht auf Friedreichataxie das gefundene Gln<sub>44</sub>-Allel als normal gewertet (Zühlke et al., 2001). Für Allele mit Gln<sub>46</sub> und Gln<sub>48</sub> konnte in zwei Familien eine reduzierte Penetranz gezeigt werden (Stevanin et al., 2003; Zühlke et al., 2003). Allele mit Gln<sub>43-48</sub> sollten also als intermediäre Allele angesehen werden.

In dieser Arbeit wurden elf DNA-Proben aus zwei Familien untersucht. Dabei war in beiden Familien der Genotyp für SCA17, eine Repeat-Expansion im *TBP*-Gen, vorhanden. Dieser Genotyp war aber teils mit einem asymptomatischen, teils mit einem pathologischen Phänotyp assoziiert. Folgende Aufgaben waren gestellt:

- Die 11 DNA-Proben sollten mittels PCR-Technik und Sequenzierung auf Mutationen im 5'-UTR, in den Exons und Übergängen zu Introns des *TBP*-Gens, *TBPL1*-Gens und *TBPL2*-Gens untersucht werden.
- Mögliche Veränderungen sollten gemäß der internationalen Nomenklatur benannt und eventuelle Auswirkungen auf die Proteinebene abgeleitet werden.
- Dabei sollten gefundene Sequenzvarianten mit bereits aus der Literatur bekannten verglichen und wenn möglich eine Unterscheidung zwischen Mutation und Polymorphismus getroffen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Nukleinsäuren

	<b>Hersteller</b>
100 bp DNA Leiter, Molekulargewichtsstandard	Invitrogen
Agarose	Biozym
Big Dye Terminator v1.1/3.1 Kit	Applied Biosystems
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
dNTP-Set	Q Biogene
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck
Ethanol 100%	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Merck
Exonuklease I	USB Corporation
Ficoll 400	Pharmacia
HPLC (high performance liquid chromatography) - Wasser	Merck
HiDi-Formamid	Applied Biosystems
Inkubationspuffer	Q Biogene
Konzentrationsstandard "low mass ladder"	Invitrogen
Magnesiumdichlorid	Q Biogene
Natriumacetat	Applied Biosystems
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB Corporation
Taq-DNA-Polymerase	Q Biogene
Tris	MP Biomedicals
Xylencyanol	Sigma

## 2.1.2 Stammlösungen und Puffer

	Zusammensetzung
3xFicoll-Lösung Bromphenolblau	150 µM 190 µM Xylencyanol 7,5 µM (w/v) Ficoll 400
10xTBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) (pH der Gebrauchslösungen: 8,3)	20 mM EDTA 890 mM Tris 890 mM Borsäure

## 2.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer wurden von Biomers.net GmbH synthetisiert.

**Tab. 2.1** Sequenz und Bezeichnungen der Primer für Exon 1-8 des *TBP*-Gens

TBP	Primerbezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
Exon 1	TBP-ex1-f TBP-ex1-r	CATGAACTGGGAGTGGCAGAAC CGCCAATTCCTAGTCTCTTCC
Exon 2	TBP-ex2-f TBP-ex2-r	GCCATAGAACTGGCTTATAGG GATACCATCTCTTGCAGTTCAG
Exon 3	TBP-ex3-f TBP-ex3-r	GCATCTGTCTTTGCACACCTG GGGACTCCTAAGTGGGAGGA
Exon 4	TBP-ex4-f TBP-ex4-r	CTAACGCCTCATCCAATGAAAC CAGGCATTAGCCACTGTGCC
Exon 5	TBP-ex5-f TBP-ex5-r	GTACTATGTCCTTCCTACCAG ATTCATAACCCATAGACCAG
Exon 6	TBP-ex6-f TBP-ex6-r	CCTATTGCAAGAAGGCTGACC CCATGTCAACTGTTCTCATA
Exon 7	TBP-ex7-f TBP-ex7-r	CCTTTGATGCTGCTTGAAGAA CAAGAAGCTAGCCCACTGTCC
Exon 8	TBP-ex8-f TBP-ex8-r	GACTGGGTATGGTGAGAATTG GCACGGTATGAGCAACTCACAG

**Tab. 2.2** Sequenz und Bezeichnungen der Primer für Exon 1-7 des *TBPL1*-Gens

TBPL1	Primerbezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
Exon 1	TBPL1-ex1-f1 TBPL1-ex1-r1	CGCCTAGTGAGGAATCTCAC CCCCGCGACAATAAATAGAC

	TBPL1-ex1-f2 TBPL1-ex1-r2	CAGTGAGAGCCGGAAATGAGT CACACATCCCACCCCAAGTC
Exon 2	TBPL1-ex2-f TBPL1-ex2-r	GATTACAGACATGAGCCACTG GACAACCAGCACATGGTAAGG
Exon 3 und 4	TBPL1-ex3u4-f TBPL1-ex3u4-r	GAGCAGTTATTGCAGTCTTGG GTACGCATAGTGATTTCTTGAG
Exon 5 und 6	TBPL1-ex5u6-f TBPL1-ex5u6-r	GGATTGCCATTATGAGCAG GAGACTGGTTCCTCTAAAGGG
Exon 7	TBPL1-ex7-f TBPL1-ex7-r	CCAACTCTTCTCACTCCTTCC CCAAAGGGACTGGAGCTTACAC

**Tab. 2.3** Sequenzen und Bezeichnungen der Primer für Exon 1-7 des *TBPL2*-Gens

TBPL2	Primerbezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
Exon 1	TBPL2-ex1-f1 TBPL2-ex1-r1	CCGCCTGTAATTCCAAGTGC CTCGCAATGTGGTCTTTGCTC
	TBPL2-ex1-f2 TBPL2-ex1-r2	CACTTCCATGCACTTGCACC CGCCTCTTATGGTCGCTATGA
Exon 2	TBPL2-ex2-f TBPL2-ex2-r	CTGAATACATTGCCTGCCTGC CCTGAAATTAGTTGTCATCGC
Exon 3	TBPL2-ex3-f TBPL2-ex3-r	CCCCTAGGAAATTGCTAAGGT ACCCTGAGTTGCCAAAAG
Exon 4	TBPL2-ex4-f TBPL2-ex4-r	CAACTGGGATAATGTAACTC CTTCTACTATGTGCTTTAGCAC
Exon 5	TBPL2-ex5-f TBPL2-ex5-r	CCTCACAAAGCCTACAGCTTC CGTAAGCAACCCATAATGTAAC
Exon 6	TBPL2-ex6-f TBPL2-ex6-r	GCACTTTAATACTGGGCCT ACTTTACCATGGTGAACAAAGG
Exon 7	TBPL2-ex7-f TBPL2-ex7-r	GCCATTTCTCAGGTACAGCTA GTTTCTGTGCTGGGCTTATGG

**Tab. 2.4** Bezeichnungen und Sequenzen von zusätzlichen Sequenzprimern für das *TBP*- und *TBPL2*-Gen

TBP	Primerbezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
Exon 3	TBP-ex3-SeqF TBP-ex3-SeqR	GCAGCCGTTCAAGTCAACG GACAGACTATTGGTGTCTG
	Exon 4	TBP-ex4-SeqR
Exon 8	TBP-ex8-SeqR	GAGGCAAGGGTACATGAGAG

TBPL2	Primerbezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
Exon 2	TBPL2-ex2-SeqF TBPL2-ex2-SeqR	CCACAAAGTAGGTTGCCATCAC CAGCCCAACGTCCTGTTCGC
	Exon 3	TBPL2-ex3-SeqF



## 2.1.4 Geräte und Gebrauchsartikel

	<b>Hersteller</b>
Eismaschine	Ziegra ZBE 30-10
Gelträger für Agarose-Gel-Elektrophorese	Serva Electrophoresis GmbH BlueMarine 100
Kammer für Agarose-Gel-Elektrophorese	Serva Electrophoresis GmbH BlueMarine 100
Kämme	Serva 12er/14er Kämme, 1,0/1,5 mm stark
Magnetrührer	Ika-Combimag RCT Ika-Mag Ret
Mikrowelle	Hitachi Micro 700
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt 0,5/1,5 ml Thermo 96er PCR- Mikrotiterplatten + Deckelkette
Pipetten	Gilson Pipetman Pipetten P2, P20, P200, P1000 Labsystems Multikanal-Finnpipette 4510 (0,5-10,0 µl)
Pipettenspitzen	Finntip Micro 0,2-10 µl Molecular BioProducts 0,1-10 µl
Rüttler	Fisher Bioblock Scientific
Sequenziergerät	3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems
Spannungsgeber	Pharmacia LKB Gene Power Supply 200/400
Software	Biometro BioDocAnalyze V1.0 Sequencing Analysis 5.2 und Seq Scape, Applied Biosystems
UV-Kontaktlampe	Vetter GmbH, Chroma 43
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler Applied Biosystems, 2700 / 2720 Thermal Cycler Biometra T-Gradient Biometra UNO II
Waage	Sartorius Laboratory L 420 P
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415C, 5480 Heraeus Sepatech Minifuge RF

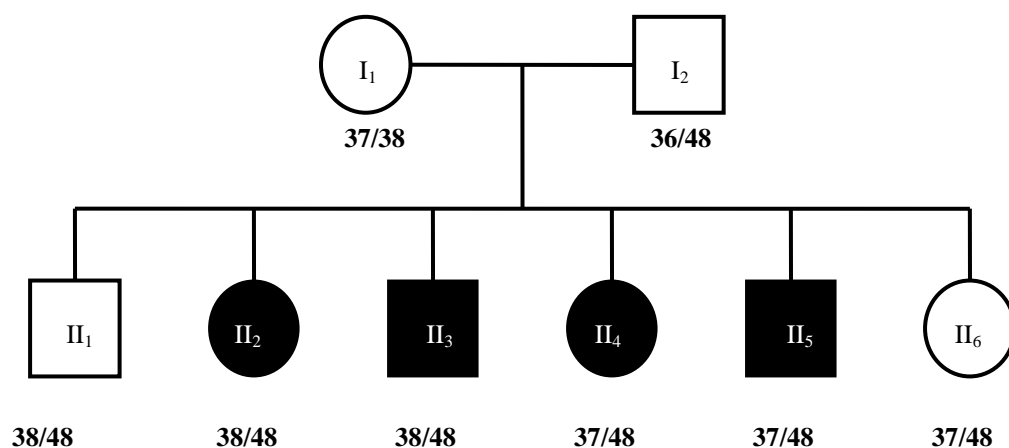
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Probenauswahl

Für die Suche nach Sequenzvarianten im *TBP*-Gen, *TBPL1*-Gen und *TBPL2*-Gen wurden DNA Proben<sup>1</sup> aus zwei Familien ausgewählt. Zu Beginn dieser Arbeit waren die molekulargenetischen Untersuchungen aller Proben mit Bestimmung der Größe des Repeats in Exon 3 des *TBP*-Gens bereits erfolgt.

- **Familie A**

In Familie A wurden acht Mitglieder aus zwei Generationen untersucht (Stammbau siehe Abbildung 1). II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>, II<sub>4</sub> und II<sub>5</sub> zeigten zum Untersuchungszeitpunkt neurologische Symptome wie zerebelläre Ataxie, Chorea und Demenz. Bei I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub>, sowie II<sub>1</sub> und II<sub>6</sub> konnten klinisch keine Anomalitäten festgestellt werden (Zühlke et al., 2003). Der Genotyp aller Mitglieder bezüglich der Größe des Repeats in Exon 3 des *TBP*-Gens ist in Abbildung 2.1 zu sehen. Die klinischen und radiologischen Daten zum Untersuchungszeitpunkt können Tabelle 2.5 entnommen werden.



**Abb. 2.1** Stammbaum der Familie A. I<sub>2</sub> und II<sub>1-6</sub> sind heterozygot für einen verlängerten Repeat, Genotyp bezüglich Repeatlänge auf beiden Allelen unterhalb der Symbole dargestellt

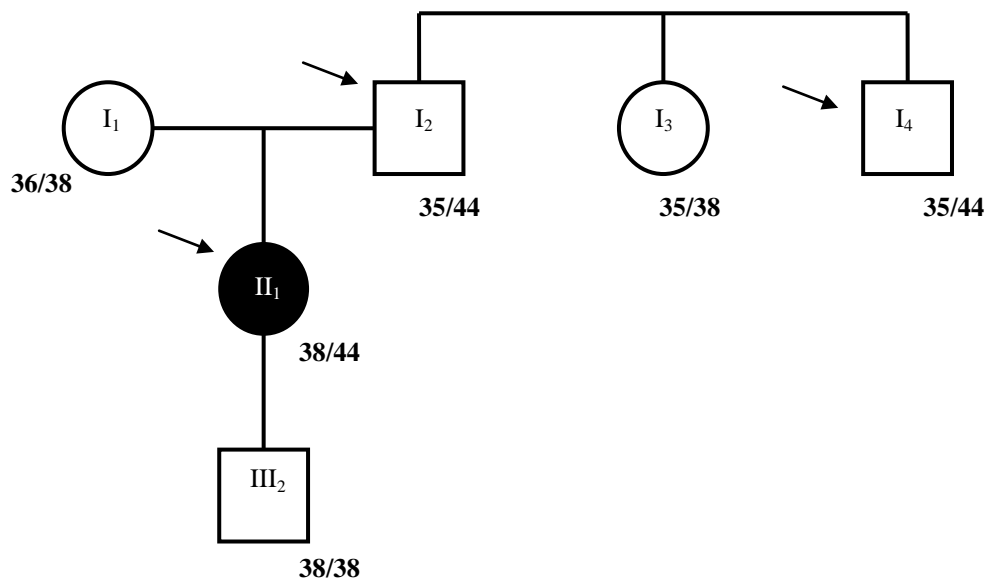
<sup>1</sup> Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Proben wurden von Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik aus peripheren Bluteleukozyten extrahiert.

Individuum	Geschlecht	Alter	Erkrankungs-alter	Klinik	MRT
I <sub>1</sub>	M	69	-	Keine klinischen Auffälligkeiten	Leichte kortikale Atrophie dem Alter entsprechend
I <sub>2</sub>	W	72	-	Diabetes mellitus	Keine Auffälligkeiten
II <sub>1</sub>	M	49	-	Keine klinischen Auffälligkeiten	Keine Auffälligkeiten
II <sub>2</sub>	W	47	38	Ataxie, kognitive Beeinträchtigung, Chorea, Dysarthrie, faziale und linguale Faszikulationen, Extremitätendystonie, Urininkontinenz	Kortikale und Zerebelläre Atrophie
II <sub>3</sub>	M	46	43	Ataxie, kognitive Beeinträchtigung, Urininkontinenz, Blickrichtungsnystagmus, gestörte Propriozeption	Kortikale und Zerebelläre Atrophie
II <sub>4</sub>	W	44	36	Ataxie, kognitive Beeinträchtigung, Dysarthrie, gestörte Propriozeption	-
II <sub>5</sub>	M	42	33	Ataxie, kognitive Beeinträchtigung, Chorea, Dysarthrie	Kortikale und Zerebelläre Atrophie
II <sub>6</sub>	W	38	-	Keine klinischen Auffälligkeiten	Keine Auffälligkeiten

**Tab.2.5** Klinische und radiologische Daten der Familie A; M = männlich, W = weiblich

- **Familie B**

Nur eine Person wies neurologische Symptome auf, die mit einer SCA17 vereinbar sind. Die molekulargenetische Analyse zeigte, dass II<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> und I<sub>4</sub> auf einem Allel im *TBP*-Gen einen Repeat der Länge 44 besitzen. Abbildung 2.2 zeigt den Stammbaum der Familie B und den Genotyp bezüglich der Repeat-Länge im Exon 3 des *TBP*-Gens. Die mit Pfeil markierten Personen sind in der vorliegenden Arbeit untersucht worden.



**Abb. 2.2** Stammbaum der Familie B. I<sub>2</sub>, I<sub>4</sub> und II<sub>1</sub> tragen ein Allel mit 44 Triplets im Repeat. Genotyp bezüglich Repeatlänge auf beiden Allelen unterhalb der Symbole dargestellt

### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht eine schnelle Amplifikation definierter DNA-Sequenzen. Zur Durchführung werden neben der Template-DNA, zwei einzelsträngige Oligonukleotidmoleküle, die vier Desoxyribonucleosid-triphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt.

Die Oligonukleotidmoleküle (*forward* (F) und *reverse* (R) Primer) mit einer durchschnittlichen Länge von 20 bis 40 Nukleotiden sind jeweils dem 3'-Ende eines Stranges des Templates komplementär. Als thermostabile DNA-Polymerase wird ein Enzym aus dem thermophilen, gram-negativen Bakterium *Thermus aquaticus* benutzt, die sog. Taq-Polymerase.

Der Reaktionszyklus der PCR kann in drei Abschnitte eingeteilt werden, die sich durch ihre Reaktionstemperatur unterscheiden. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige Template-DNA bei ca. 94°C in ihre zwei Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Danach wird die Reaktion für das Anlagern der Primer (Annealing) auf 55°C – 65°C heruntergekühlt, wobei die optimale Annealingtemperatur von dem AT:GC Verhältnis des jeweiligen Primers abhängt. Im dritten Schritt synthetisiert die Taq-DNA-

Polymerase bei einer Temperatur von 72°C am 3'-Ende der Primer durch Anheften von den dNTPs einen komplementären Gegenstrang zur Template-DNA (Extension). Dieser Zyklus wird 25-bis 40-mal wiederholt, wobei es in jeder Runde zu einer Verdoppelung der DNA-Kopien kommt, d.h. die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnittes erfolgt exponentiell.

In der vorliegenden Arbeit wurden für einen Reaktionsansatz 50 ng DNA, je 10 pmol Forward (F) Primer und Reverse (R) Primer, 0,25 U Taq-Polymerase, 2,5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer, je 5 pmol der Nukleotide dATP, dTTP, dGTP, dCTP verwendet und auf ein Gesamtvolumen von 25 µl mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Abweichungen von diesem Schema für Primer- oder Taq-Menge können den Tabellen 2.7-2.9 entnommen werden.

Für die PCR wurden die unter Gebrauchsartikel aufgeführten Thermocycler mit folgendem Programm verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer	
1	94°C	5 min	
2	94°C	30 s	Schritte 2 – 4 30 bzw. 35 mal wiederholen
3	50 – 65°C	30s	
4	72°C	1 min	
5	72 °C	7 min	

**Tab. 2.6** Programm der PCR

Die Unterschiede in der Annealing-Temperatur und Zyklenanzahl sind den Tabellen 2.7-2.9 zu entnehmen.

**Tab. 2.7** PCR-Bedingungen für die Exons 1-8 des *TBP*-Gens

<i>TBP</i> – Exon	Produkt -größe	Polymerase-konzentration	Primer-konzentration	Annealing Temperatur	Zyklenanzahl
Exon 1	764 bp	0,25 U	10pmol	55°C	35
Exon 2	339 bp	0,25 U	10pmol	55°C	35
Exon 3	586 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 4	286 bp	0,25 U	10pmol	60°C	30
Exon 5	244 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 6	410 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 7	343 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 8	426 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30

**Tab. 2.8** PCR-Bedingungen für die Exons 1-7 des *TBPL1*-Gens

<i>TBPL1</i> – Exon	Produkt -größe	Polymerase-konzentration	Primer-konzentration	Annealing Temperatur	Zyklenanzahl
Exon 1.1	596 bp	0,25 U	10pmol	60°C	35
Exon 1.2	463 bp	0,5 U	10pmol	60°C	35
Exon 2	463 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 3+4	535 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 5+6	499 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 7	270 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30

**Tab. 2.9** PCR-Bedingungen für die Exons 1-7 des *TBPL2*-Gens

<i>TBPL2</i> – Exon	Produkt -größe	Polymerase-konzentration	Primer-konzentration	Annealing Temperatur	Zyklenanzahl
Exon 1.1	503 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 1.2	558 bp	0,25 U	10pmol	60°C	30
Exon 2	639 bp	0,25 U	10pmol	65°C	30
Exon 3	334 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 4	246 bp	0,25 U	5pmol	55°C	30
Exon 5	371 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 6	275 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30
Exon 7	273 bp	0,25 U	10pmol	55°C	30

### 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Ladung und ihrer Größe, d.h. der Anzahl ihrer Basenpaare.

Da in einer Umgebung mit neutralem pH-Wert die DNA aufgrund ihres hohen Gehaltes an Phosphatgruppen negativ geladen ist, wandern sie im elektrischen Feld zu der ihr entgegen gesetzten Ladung, dem positiven Pol (Anode). Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die Größe der DNA-Fragmente bestimmt: kleinere Fragmente wandern im elektrischen Feld schneller durch das Gel als große. Mit einem gleichzeitig aufgetrennten Längenstandard kann man die Größe der einzelnen DNA-Fragmente abschätzen. Mit Hilfe von Ethidiumbromid, einem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, kann die DNA markiert und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Knippers 2001, 23f).

In der vorliegenden Arbeit wurden 2% Agarose-Gele verwendet. Zur Herstellung wird 4g Agarose in 200ml 1xTBE aufgekocht. Nach Zugabe von 5µl Ethidiumbromid wird die Gellösung im Eisbad auf ca. 50-60°C abgekühlt und anschließend in einen Gelträger gegossen. Durch eingehängte Käbme mit einer Dicke von 1,0 bzw. 1,5 mm können sich im erstarrten Gel Taschen (slots) formen. Das feste Gel wird in der Gelkammer mit dem Laufpuffer 1x TBE überschichtet und die Taschen werden mit einem Gemisch aus 3µl 3xFicollfarbe und 3µl PCR-Produkt beladen. Zusätzlich werden entweder 4,5 µl der Gebrauchsverdünnung der 100 bp Leiter zur Abschätzung der Größe oder 2µl des Standards „low mass ladder“ zur Konzentrationsbestimmung aufgetragen. Anschließend erfolgt die Auftrennung bei einer gleichmäßigen Spannung von 120 V für ca. 25 min. Zur Beurteilung werden die Gele auf eine UV-Kontaktlampe gelegt, wo die Fluoreszenz der Produkt-Banden mit einer Kamera aufgenommen und mit Hilfe des Computerprogramms BioDocAnalyze V1.0 ausgewertet wird.

## 2.2.4 DNA-Sequenzierung

### Prinzip

Ziel der DNA-Sequenzierung ist es, die Abfolge von Nukleotiden in einem DNA-Molekül zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür die Dideoxymethode nach Sanger, auch Kettenabbruchmethode genannt, verwendet (Sanger et al., 1977). Sie basiert auf der Neusynthese eines komplementären DNA-Einzelstranges entlang einer DNA-Matrize.

Diese DNA-Neusynthese erfolgt unter Verwendung der vier Nukleotidtriphosphate dATP, dTTP, dGTP und dCTP. Allerdings werden diesen Nukleotiden zusätzlich Dideoxynukleotide (ddNTPs) beigemischt. Den Dideoxynukleotiden fehlt an der 3'-Stelle der Desoxyribose eine OH-Gruppe. Sobald ein Dideoxynukleotid in den neusynthetisierten Strang eingebaut wird, kommt es zum Syntheseabbruch, denn aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose kann die DNA-Polymerase kein weiteres Nukleotid anfügen. In dem Reaktionsgemisch befinden sich Nukleotide und Dideoxynukleotide in einem bestimmten Verhältnis zueinander, um zu gewährleisten, dass an jeder Basenposition eine später detektierbare Fraktion der Moleküle durch den

Einbau eines Dideoxynukleotids terminiert wird, während die größere Fraktion der Moleküle durch den Einbau eines Nukleotids lediglich verlängert wird.

Die vier verschiedenen Dideoxynukleotide sind jeweils mit einem unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Die Kettenabbruch-Produkte werden nach der Sequenzierungsreaktion mittels Kapillar-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Ein Laser-Licht regt die Farbstoffe zur Emission fluoreszierender Strahlung an, die von einem Detektor erfasst und in elektrische Signale umgewandelt wird. Ein angeschlossener Computer interpretiert diese Signale und rechnet aus der Wellenlänge der detektierten Signale auf die jeweils eingebaute Base zurück. So entsteht letztlich ein Sequenzmuster, das eine zur ursprünglich sequenzierten Matrize komplementäre Basenabfolge zeigt (Knippers 2001, 307f).

## Durchführung

- **Primär PCR:** Vor der Sequenzierung wird eine PCR durchgeführt, die die DNA-Matrizen für die Sequenz-Reaktion liefert. Diese Methode ist schon unter 2.2.2 erläutert worden
- **Enzymatische Aufreinigung der PCR Produkte:** Die durch PCR amplifizierte Genabschnitte werden zunächst mit einem Enzymgemisch aus Exonuklease und Phosphatase („ExoSAP“) behandelt, welches verbliebene Primer und Nukleotidtriphosphate degradiert und dephosphoryliert. Die Aufreinigung ist notwendig, da es sonst zu Störungen in der Sequenzreaktion kommen könnte: Die freien Primer konkurrieren mit den Sequenzprimern und die übrigen Nukleotidtriphosphate verschieben das wichtige Verhältnis von Nukleotiden zu Dideoxynukleotiden.  
Die Reaktion läuft nach folgendem Protokoll ab: 2 µl ExoSAP und 5 µl aufzureinigendes PCR-Produkt wurden 15 min bei 37 °C inkubiert und die Enzyme anschließend für 15 min bei 80 °C denaturiert.
- **Sequenzreaktion:** Der Ansatz für die Sequenzierungsreaktion enthält in einem Volumen von 10 µl 5-10ng der aufgereinigten DNA, 15% (v/v) Puffer, 10% (v/v) Terminormix v1.1 und 5 pmol des jeweiligen Primers. Für besonders große PCR-



Produkte wurden bei der Sequenzierung zusätzliche Primer verwendet (siehe Tabelle 2.10). Jede DNA-Probe wurde doppelsträngig sequenziert, um die Genauigkeit bei Beurteilung der Ergebnisse zu erhöhen. Die Sequenzreaktion wird entweder im Eppendorf Mastercycler oder im Applied Biosystems 2720 Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	
1	96°C	1 min	
2	96°C	10 sec	Schritte 2 – 4 25 mal wiederholen
3	55°C	5 sec	
4	60°C	1 min	
5	4°C	∞	

**Tab. 2.10** Programm der Sequenzreaktion

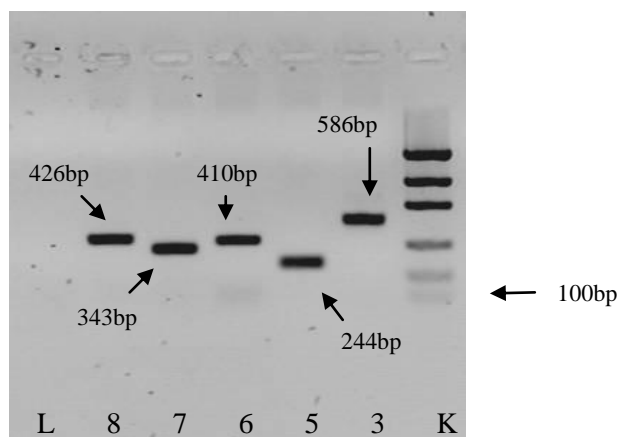
Einzigste Ausnahme für dieses Protokoll ist die Sequenzreaktion mit dem Sequenzprimer für TBP Exon 4, TBP-ex4-SeqR, die 30 Zyklen benötigt. Die Ansätze werden bis zur Natriumacetatfällung bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

- **Aufreinigung durch Natriumacetatfällung:** Um störende Hintergrundsignale z.B. durch fluoreszenz-markierte Nukleotide zu reduzieren, wird das Sequenzprodukt mit einer Natriumacetatfällung aufgereinigt. Dafür werden 10µl Produkt mit 10µl HPLC Wasser, 2µl 3M Natriumacetat pH 4,8 und 50µl 96% Ethanol gemischt. Der Ansatz wird für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 30 min bei 3700 rpm zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wird abpipettiert, das Pellet mit 50 µl Ethanol 70 % gewaschen und für 15 min bei 3700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abpipettiert und das Pellet bei 56 °C kurz getrocknet, um restlichen Alkohol zu verdampfen. Die nun gefällte DNA wird in 15 µl HiDi-Formamid gelöst.
- **Sequenzanalyse:** Anschließend werden die Proben mit dem Kapillar-Sequenzer ABI 3130 analysiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Suche nach Sequenzvariationen im *TBP*-Gen

Auf der Suche nach Sequenzvariationen wurden Exons 1-8 sowie die Promotorregion im 5' – nicht-translatierten (untranslated region = UTR) Bereich des *TBP*-Gens untersucht. In Familie A wurden DNA-Proben von allen acht Mitgliedern getestet, während in Familie B nur die drei untersucht wurden, die heterozygot eine CAG-Repeat-Expansion von 44 aufweisen. Die DNA-Proben wurden exonspezifisch mittels der PCR-Technik amplifiziert, zur Erfolgskontrolle der PCR-Reaktion auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Beispielhaft ist in Abbildung 3.1.1 ein Gel mit fluoreszierenden Produkt-Banden nach der PCR dargestellt.



**Abb. 3.1.1**

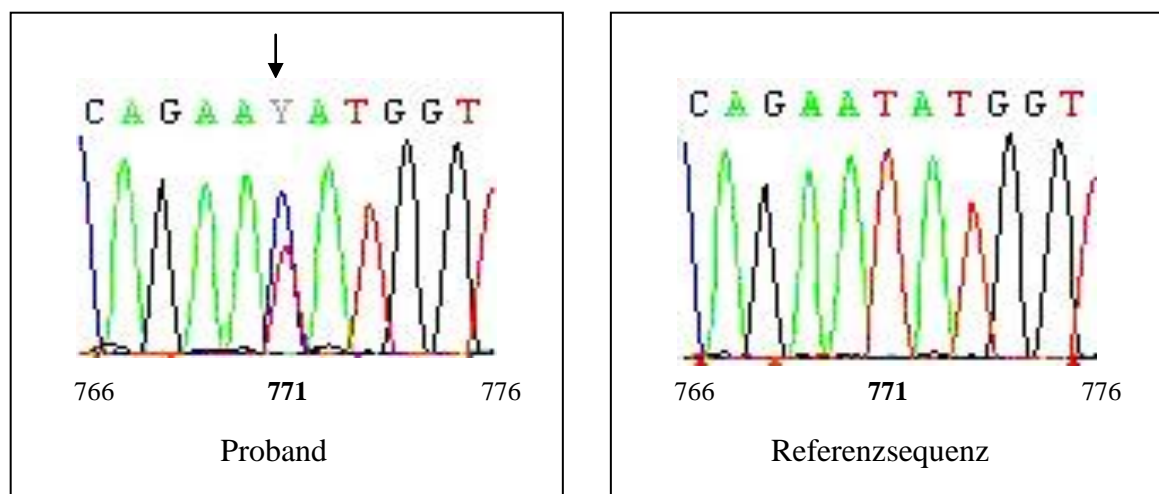
PCR-Produktbanden der Exons 3,5,6, 7 und 8 des *TBP*-Gens einer Probe auf 2% Agarosegel

3,5,6,7 und 8 = Exonnummer, K=Konzentration- und Größenstandard, L=Leerkontrolle

Danach folgte die Sequenzierung der amplifizierten DNA-Proben. Die sequenzierten Genabschnitte wurden mit der Software SeqScape v2.5 ausgewertet und mit der Wildtypsequenz aus der elektronischen NCBI Datenbank (GenBank reference sequences NM\_003194.3) verglichen. Um das Auffinden und die Beurteilung von Veränderungen in der Basenabfolge zu vereinfachen und abzusichern, wurden beide DNA-Stränge eines PCR-Produktes sequenziert.

### Auswertung Familie A

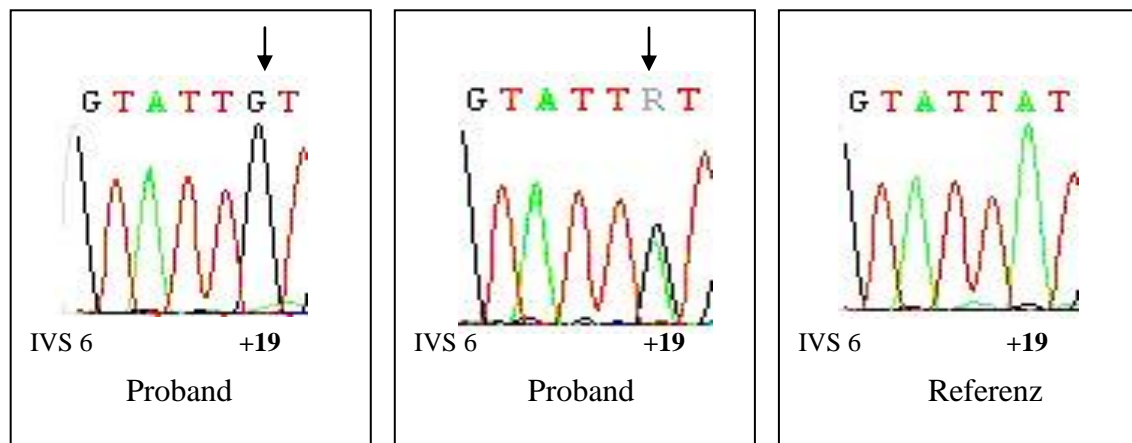
Bei I<sub>2</sub> konnte in Exon 6 ein heterozygoter Basenaustausch von Thymin zu Cytosin nachgewiesen werden (c.771T→C). Dieser Basenaustausch hat keine Änderung der Aminosäure-Sequenz zur Folge (p.N257N) und wurde bereits als Polymorphismus publiziert (refSNP ID: rs1042327 in der NCBI-Datenbank). Bei den restlichen Mitgliedern der Familie A konnte der bekannte Polymorphismus nicht gefunden werden. In Abbildung 3.1.2 ist dieser Sequenzausschnitt von Exon 6 des *TBP*-Gens gezeigt.



**Abb. 3.1.2**

Ausschnitt aus der Sequenzierung von Exon 6 des *TBP*-Gens mit Austausch c.771 T→C. Links ist die Sequenz von I<sub>2</sub> gezeigt, die heterozygot für die Basen Thymin und Cytosin ist. Rechts ist eine Probe dargestellt, die die Referenzsequenz aufweist. Die Zahlen geben die Nukleotidposition an (Nukleotid +1 ist die erste Base des ATG-Startcodons).

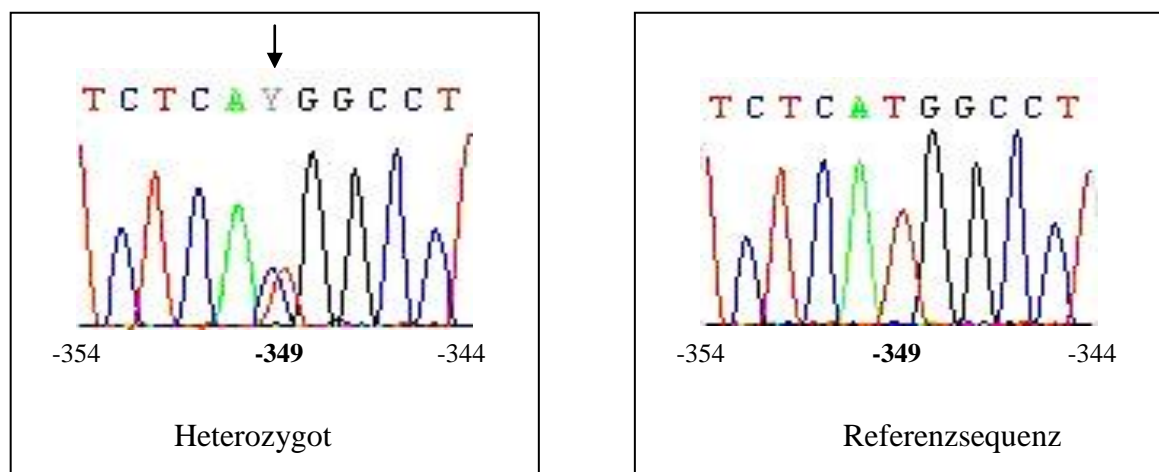
Im Intron zwischen Exon 6 und 7 an Position IVS 6 +19 des *TBP*-Gens konnte ein bekannter Basenaustausch von Adenin zu Guanin festgestellt werden (refSNP ID: rs2235506 in der NCBI-Datenbank). Alle acht DNA-Proben der Familie A wiesen diese Sequenzvariante auf, wobei I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub> und II<sub>3</sub> heterozygot und II<sub>4</sub>, II<sub>5</sub> und II<sub>6</sub> homozygot für die Variante waren. Abbildung 3.1.3 zeigt Sequenzausschnitte des Introns zwischen Exon 6 und 7.

**Abb. 3.1.3**

Ausschnitt aus der Sequenzierung vom Intron zwischen Exon 6 und 7 des *TBP*-Gens mit **IVS 6+19 A→G**

Links ist eine Sequenz einer Person gezeigt, die einen homozygoten Basenaustausch von Adenin zu Guanin aufweist. In der Mitte wird eine Sequenz gezeigt, die an derselben Stelle heterozygot ist. Rechts ist eine Probe dargestellt, die Referenzsequenz aufweist. Die Zahlen geben die Nukleotidposition an (Nukleotid +1 ist die erste Base des ATG-Startcodons).

In der DNA-Probe  $I_2$  aus Familie A konnte im 5'-UTR an Position -349 eine heterozygote Basensubstitution von Cytosin zu Thymin gefunden werden. Die restlichen untersuchten Personen aus der Familie zeigten keine Sequenzvariationen in diesem Abschnitt. Abbildung 3.1.4 zeigt diesen Sequenzabschnitt im 5'-UTR des *TBP*-Gens.

**Abb. 3.1.4**

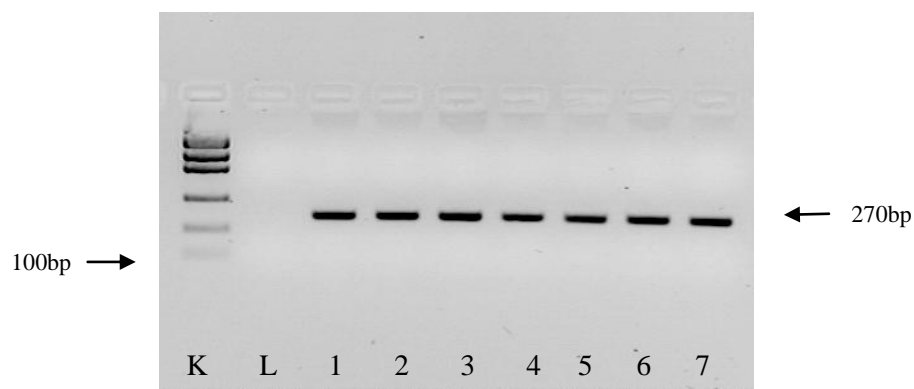
Ausschnitt aus der Sequenzierung des 5'-UTR des *TBP*-Gens mit dem Austausch **-349 T→C**. Links ist die Sequenz von  $I_2$  gezeigt, die heterozygot für die Basen Thymin und Cytosin ist. Rechts ist eine Probe dargestellt, die die Referenzsequenz aufweist. Die Zahlen geben die Nukleotidposition an (Nukleotid -1 ist die erste Base vor dem ATG-Startcodon).

### Auswertung Familie B

Bei allen drei untersuchten Mitgliedern der Familie B konnte in Exon 6 ein heterozygoter Basenaustausch von Thymin zu Cytosin nachgewiesen werden (c.771T→C). Dieser Basenaustausch hat keine Änderung der Aminosäure-Sequenz zur Folge (p.N257N) und wurde bereits als Polymorphismus publiziert (refSNP ID: rs1042327 in der NCBI-Datenbank). Diese Sequenzvariante konnte auch bei I<sub>2</sub> aus Familie A nachgewiesen werden, siehe auch Abbildung 3.1.2.

## 3.2 Suche nach Sequenzvariationen im *TBPL1*-Gen

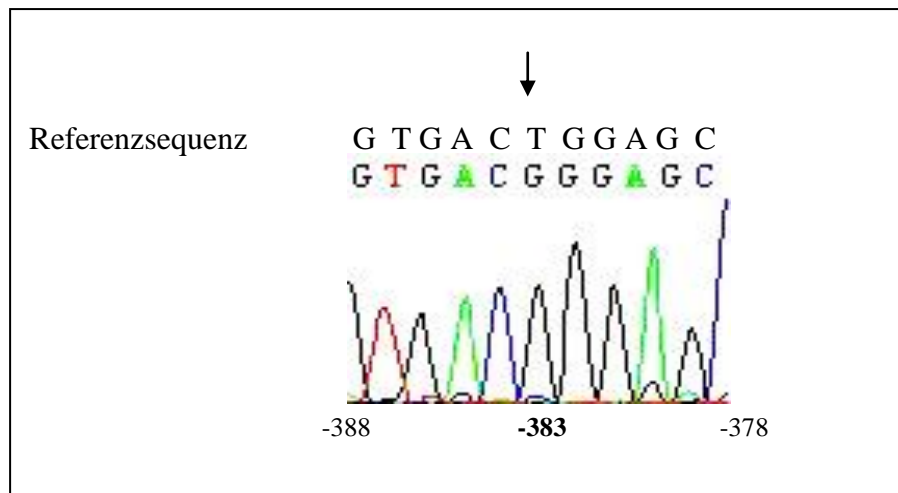
Analog zu der *TBP*-Genanalyse wurden in den Exons 1-7 des *TBPL1*-Gens und in der 5'-UTR nach Sequenzvariationen gesucht. Die zur Verfügung stehenden DNA-Proben aus Familie A und B wurden mittels PCR amplifiziert und nach Kontrolle auf einem 2% Agarosegel doppelsträngig sequenziert. Exon 1 musste aufgrund seiner Länge in zwei Abschnitte aufgeteilt werden, die separat sequenziert wurden, während Exon 3 plus 4 und Exon 5 plus 6 zusammen mit jeweils nur einem Primerpaar für beide Exons sequenziert werden konnte. Abbildung 3.2.1 zeigt exemplarisch ein entsprechendes Agarosegel.



**Abb. 3.2.1**

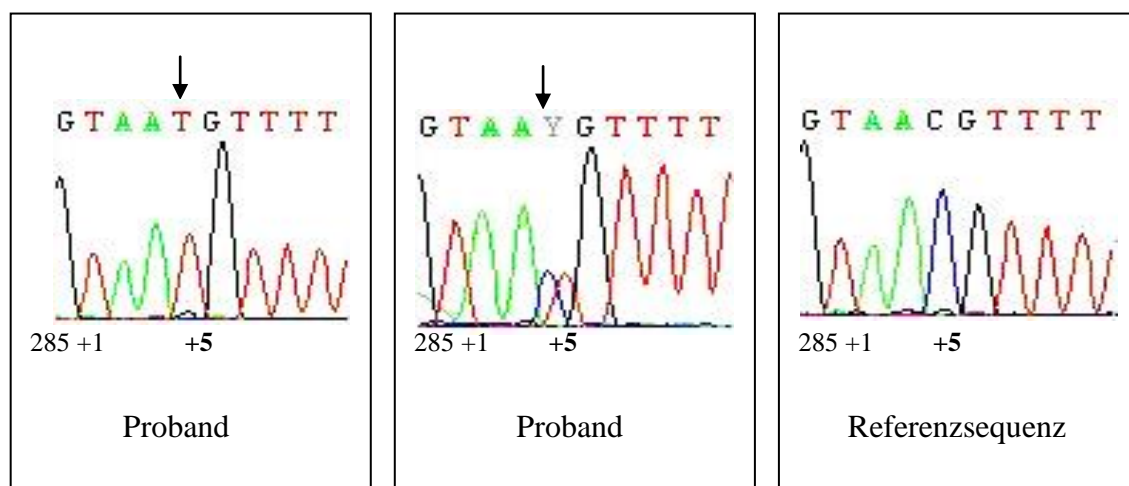
PCR-Produktbanden des Exons 7 des *TBPL1*-Gens auf 2% Agarosegel  
1-7 = Probennummern, L=Leerkontrolle und K= Konzentrationsstandard



**Abb. 3.2.3**

Ausschnitt 2 aus der Sequenzierung des 5'-UTR des *TBPL1*-Gens mit dem Austausch **-383T→G**. Es ist eine Sequenz gezeigt, die einen homozygoten Basenaustausch von Thymin zu Guanin aufweist. Die Zahlen geben die Nukleotidposition an (Nukleotid -1 ist die erste Base vor dem ATG-Startcodon).

Für alle Mitglieder der Familie A konnte im Intron zwischen Exon 4 und Exon 5 an der Position IVS4+5 des *TBPL1*-Gens ein Basenaustausch von Cytosin zu Thymin (c.282+5C→T) nachgewiesen werden. Diese Sequenzvariation ist schon beschrieben (refSNP ID: rs2076583 in der NCBI Datenbank). I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub> und II<sub>4</sub> sind heterozygot für diese Variante, I<sub>1</sub>, II<sub>5</sub> und II<sub>6</sub> homozygot. Beispielhaft ist in Abbildung 3.2.4 ein Sequenzausschnitt mit diesem Basenaustausch sowohl in der heterozygoten als auch der homozygoten Form dargestellt.

**Abb. 3.2.4**

Ausschnitt 1 aus der Sequenzierung vom Intron zwischen Exon 4 und 5 des *TBPL1*-Gens mit dem Austausch **IVS 4+5C→T**. Links ist eine Sequenz von einer Person gezeigt, die einen homozygoten Basenaustausch von Cytosin zu Thymin aufweist. In der Mitte wird eine Sequenz gezeigt die an derselben Stelle heterozygot ist. Rechts ist eine Probe dargestellt, die die Referenzsequenz aufweist. Die Zahlen geben die Nukleotidposition an.

### **Auswertung Familie B**

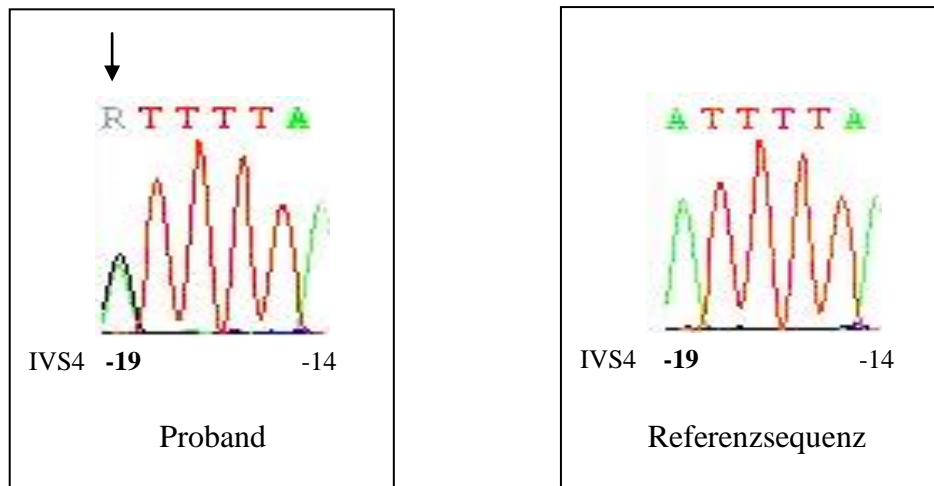
Auch bei den Proben aus Familie B konnten im kodierenden Abschnitt des *TBPLI*-Gens keine Sequenzvarianten gefunden werden. Im 5'-UTR konnten bei allen drei Proben die beiden Sequenzvarianten, die in Familie A gefunden wurden, auch in Familie B nachgewiesen werden: Die erste Sequenzvariante im 5'-UTR an Position – 571 ist ein Basenaustausch von Adenin zu Guanin, welcher in der NCBI Datenbank schon bekannt (refSNP ID: rs229910) ist.

Die zweite Sequenzvariante im 5'-UTR an Position– 383 weist einen Basenaustausch von Thymin zu Guanin auf, der ebenfalls bei allen drei Personen der Familie B nachgewiesen werden konnte. In Abbildung 3.2.2 und 3.2.3 sind diese Sequenzvarianten für Familie A dargestellt.

Für II<sub>1</sub> der Familie B konnte im Intron zwischen Exon 4 und Exon 5 an Position 282+5 des *TBPLI*-Gens ein heterozygoter Basenaustausch von Cytosin zu Thymin (c.282+5C→T) nachgewiesen werden. Diese Sequenzvariation ist schon beschrieben (refSNP ID: rs2076583 in der NCBI Datenbank) und konnte ebenfalls bei allen Mitgliedern der Familie A gefunden werden. Die beiden anderen untersuchten Mitglieder der Familie B zeigten die Referenzsequenz, für eine Darstellung dieser Sequenzvariante siehe auch Abbildung 3.2.4 .

Im Intron zwischen Exon 4 und 5 konnte bei zwei Mitgliedern der Familie B (I<sub>2</sub> und I<sub>4</sub>) eine bekannte Sequenzvariation festgestellt werden (refSNP ID: rs2273097 in der NCBI Datenbank). Hier lag bei beiden DNA-Proben ein heterozygoter Basenaustausch von Adenin zu Guanin vor (IVS 4-19 A/G). Die DNA-Probe von II<sub>1</sub> wies die Referenzsequenz auf. Abbildung 3.2.5 zeigt diesen Sequenzabschnitt.



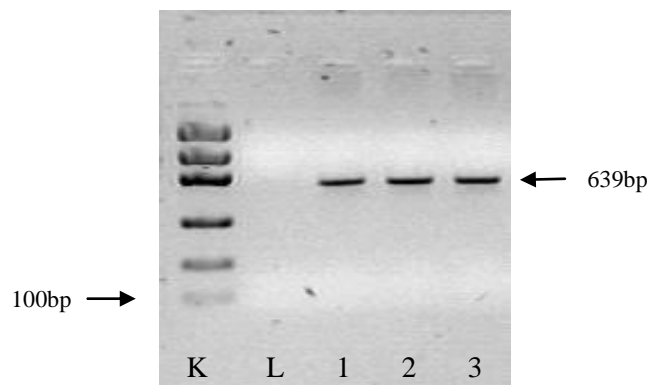
**Abb. 3.2.5**

Ausschnitt 2 aus der Sequenzierung vom Intron zwischen Exon 4 und 5 des *TBPL1*-Gens mit dem Austausch **IVS 4-19 A→G**. Links ist die Sequenz einer Person gezeigt, die einen heterozygoten Basenaustausch von Adenin zu Guanin aufweist. Rechts ist eine Probe dargestellt, die die Referenzsequenz aufweist. Die Zahlen geben die Nukleotidposition an (Nukleotid +1 ist die erste Base des ATG-Startcodons).

### 3.3 Suche nach Sequenzvariationen im *TBPL2*-Gen

Das *TBPL2*-Gen umfasst 7 Exons, in denen ebenso wie im 5'-UTR nach Sequenzvarianten oder Polymorphismen gesucht wurde. Es wurden die DNA-Proben der elf Personen aus Familie A und B untersucht. Dabei stimmte die Vorgehensweise mit den Genanalyse von *TBP* und *TBPL1* überein: Die DNA-Proben wurden exonspezifisch mittels PCR amplifiziert und zur PCR-Reaktionskontrolle auf ein 2% Agarosegel aufgetragen

Abbildung 3.3.1 zeigt exemplarisch das Ergebnis für Exon 2.

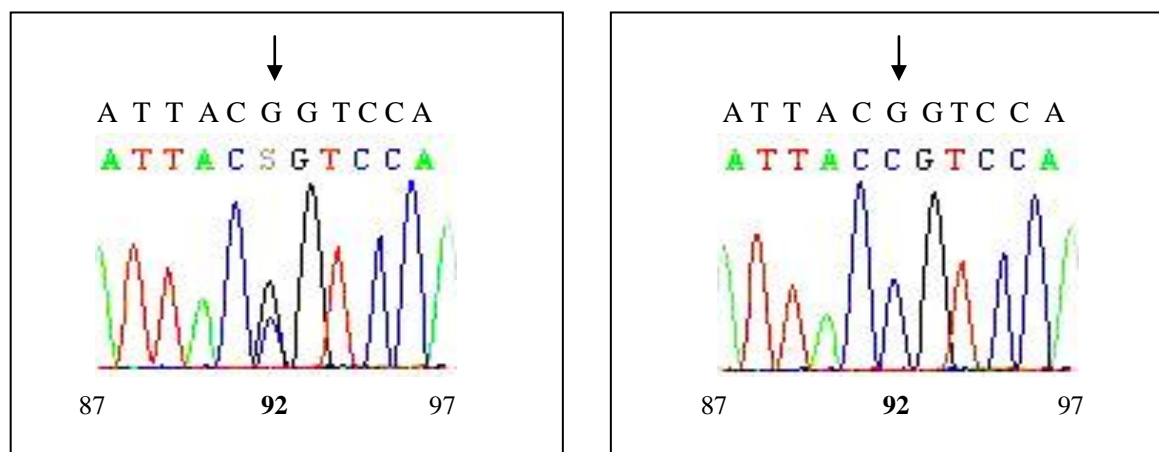
**Abb. 3.3.1**

PCR-Produktbanden des Exons 2 des *TBPL2*-Gens auf 2% Agarosegel  
1-3 = Probennummern, L = Leerkontrolle, K = Konzentrationsstandard

Anschließend wurden die DNA-Proben sequenziert, die Daten mit dem Programm SeqScape v2.5 ausgewertet und die ermittelte Nukleotidsequenz mit der Referenzsequenz aus der NCBI-Datenbank (GenBank reference sequence NM\_199047.2) verglichen. Um eine möglichst genaue und sichere Auswertung zu ermöglichen, wurde doppelsträngig sequenziert. Außerdem wurde Exon 1 des *TBPL2*-Gens wegen seiner Länge in 2 Abschnitte aufgeteilt, die getrennt voneinander sequenziert wurden.

### Auswertung Familie A

Im Exon 1 konnte ein Basenaustausch von Guanin zu Cytosin nachgewiesen werden (c.92G→C). Dieser Austausch an Nukleotid-Position 92 des *TBPL2*-Gens führt zu einem Austausch von Arginin zu Prolin in der Aminosäure-Sequenz des TATA- Bindeprotein like 2 (p.R31P) und wurde bereits als Polymorphismus publiziert (refSNP ID: rs8019270 in der NCBI-Datenbank). Alle acht DNA-Proben aus Familie A wiesen an dieser Position eine Sequenzvariation auf, wobei sowohl die homozygote (I<sub>1</sub> und II<sub>2</sub>) als auch die heterozygote Form (I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>3</sub>, II<sub>4</sub>, II<sub>5</sub> und II<sub>6</sub>) zu beobachten war. In Abbildung 3.3.2 ist dieser SequenzAusschnitt beispielhaft dargestellt.

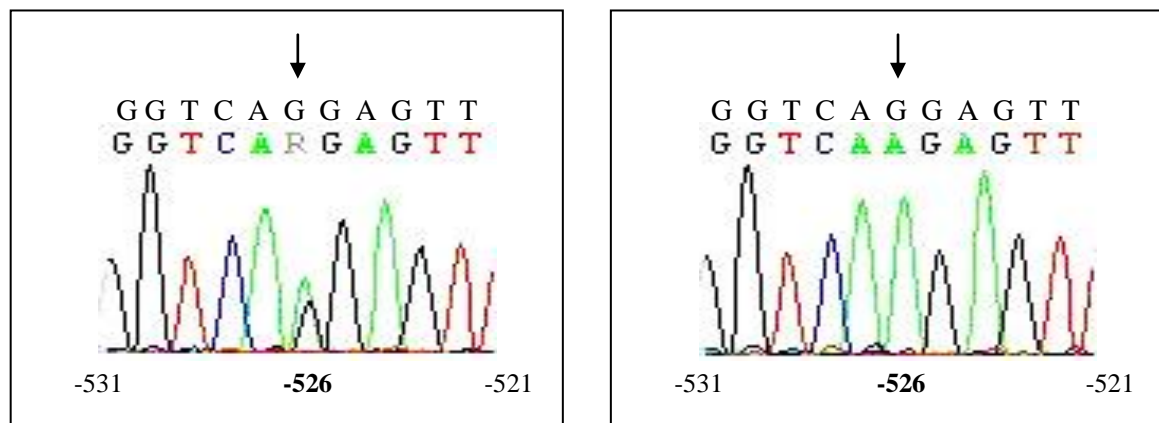


**Abb. 3.3.2**

Ausschnitt aus der Sequenzierung des Exon 1 des *TBPL2*-Gens mit dem Austausch c.92G→C. Links ist die Sequenz einer Probe gezeigt, die heterozygot für die Basen Guanin und Cytosin ist. Rechts ist eine Probe dargestellt, die einen homozygoten Basenaustausch aufweist. Die Zahlen geben die Nukleotidposition an (Nukleotid +1 ist die Base des ATG-Startcodon).

Im 5'-UTR des *TBPL2*-Gens konnten bei allen Mitgliedern der Familie A zwei Sequenzvariationen festgestellt werden. Beide Sequenzvariationen haben keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des TBPL2, da sie sich im nicht-kodierenden Bereich befinden:

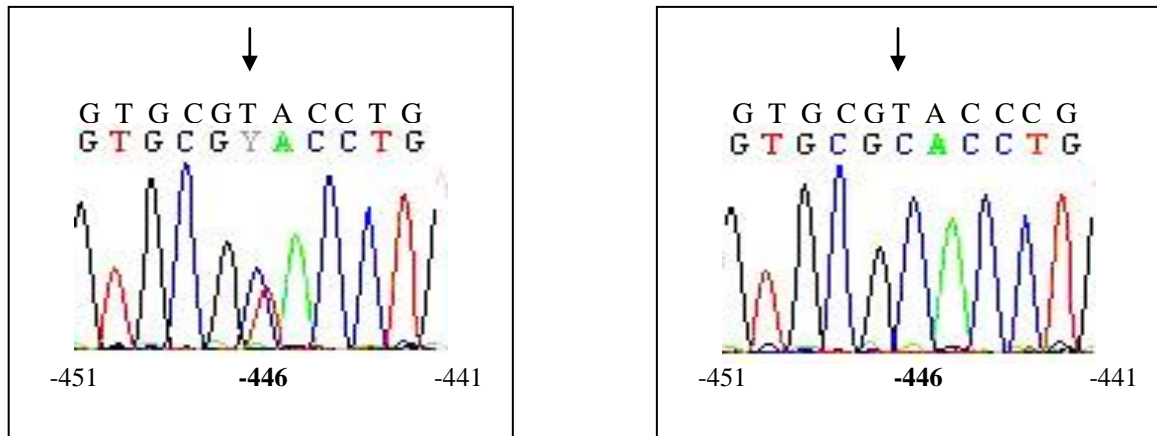
An Position – 526 lag eine Basensubstitution von Guanin zu Adenin vor. Ein Teil der Familie (I<sub>1</sub> und II<sub>2</sub>) war homozygot für diesen Austausch, die anderen Mitglieder (I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>3</sub>, II<sub>4</sub>, II<sub>5</sub> und II<sub>6</sub>) heterozygot (Abbildung 3.3.3).



**Abb. 3.3.3**

Ausschnitt 1 aus der Sequenzierung des 5'-UTR des *TBPL2*-Gens mit dem Austausch -526 G→A. Links ist die Sequenz von einer Probe gezeigt, die heterozygot für die Basen Guanin und Adenin ist. Rechts ist eine Probe dargestellt, die einen homozygoten Basenaustausch aufweist. Die Zahlen geben die Nukleotidposition an (Nukleotid – 1 ist die erste Base vor dem ATG-Startcodon).

Die weitere Abweichung zur Referenzsequenz ließ sich an Position -446 erkennen, wo ein Basenaustausch von Thymin zu Cytosin beobachtet werden konnte. Auch bei dieser Sequenzvariante war der Basenaustausch sowohl in heterozygoter (I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>3</sub>, II<sub>4</sub>, II<sub>5</sub> und II<sub>6</sub>) als auch in homozygoter Form (I<sub>1</sub> und II<sub>2</sub>) vorzufinden. In Abbildung 3.3.4 ist der Sequenzausschnitt um die Position -446 dargestellt.

**Abb. 3.3.4**

Ausschnitt 2 aus der Sequenzierung des 5'UTR des *TBPL2*-Gens mit dem Austausch **-446T→G**. Links ist die Sequenz von einem Probanden gezeigt, der einen heterozygoten Basenaustausch von Thymin zu Guanin aufweist. Rechts ist eine Probe dargestellt, die homozygot für diesen Basenaustausch ist. Die Zahlen geben die Nukleotidposition an (Nukleotid – 1 ist die erste Base vor dem ATG-Startcodon).

### Auswertung Familie B

In Exon 1 konnte bei allen drei untersuchten Mitgliedern der Familie B ein homozygoter Basenaustausch von Guanin zu Cytosin nachgewiesen werden (c.92G→C), der auch in Familie A gefunden werden konnte (siehe oben). Der Austausch an der Nukleotid-Position 92 des *TBPL2*-Gens führt zu einem Austausch von Arginin zu Prolin in der Aminosäure-Sequenz des TATA-Bindeprotein like 2 (p.R31P) und wurde bereits als Polymorphismus publiziert (refSNP ID: rs8019270 in der NCBI-Datenbank).

Im 5'-UTR konnten bei allen drei DNA-Proben zwei Sequenzvariationen festgestellt werden. An Position – 526 lag eine homozygote Basensubstitution von Guanin zu Adenin vor. Die weitere Abweichung zur Referenzsequenz ließ sich auf Position – 446 erkennen, wo ein homozygoter Basenaustausch von Thymin zu Cytosin beobachtet werden konnte. Beide Sequenzvariationen haben keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des *TBPL2*, da sie sich im nicht-kodierenden Bereich befinden.

Die Sequenzvariationen, die im Laufe dieser Arbeit gefunden werden konnten, sind in den folgenden Tabellen 3.1-3.3 zusammenfassend dargestellt.

### ***TBP-Gen***

Position auf DNA-Ebene	Proteinebene	Bezeichnung	Proben	Genotyp
5'-UTR -349	-	Nicht beschrieben	Familie A, I <sub>2</sub>	C/T
c.771	p.N257N	rs1042327	Familie A, I <sub>2</sub> Familie B	T/C T/C
IVS 6 +19	-	rs2235506	Familie A I <sub>1</sub> , I <sub>2</sub> , II <sub>1</sub> , II <sub>2</sub> , II <sub>3</sub> II <sub>4</sub> , I <sub>5</sub> , II <sub>6</sub>	A/G G/G

**Tab. 3.1** Sequenzvariationen im *TBP*-Gen

### ***TBPL1-Gen***

Position auf DNA-Ebene	Proteinebene	Bezeichnung	Proben	Genotyp
5'-UTR -571	-	rs229910	Familie A und B	G/G
5'-UTR -383	-	Nicht beschrieben	Familie A und B	G/G
IVS 4 +5	-	rs2076583	Familie A I <sub>1</sub> , II <sub>5</sub> , II <sub>6</sub> I <sub>2</sub> , II <sub>1</sub> , II <sub>2</sub> , II <sub>3</sub> , II <sub>4</sub>	T/T C/T
			Familie B, II <sub>1</sub>	C/T
IVS 4 -19	-	rs2273097	Familie B, I <sub>2</sub> + I <sub>4</sub>	A/G

**Tab. 3.2** Sequenzvariationen im *TBPL1*-Gen

***TBPL2*-Gen**

Position auf DNA-Ebene	Proteinebene	Bezeichnung	Proben	Genotyp
5'-UTR -526	-	Nicht beschrieben	Familie A I <sub>1</sub> , II <sub>2</sub> I <sub>2</sub> , II <sub>1</sub> , II <sub>3</sub> , II <sub>4</sub> , II <sub>5</sub> , II <sub>6</sub>	A/A G/A
			Familie B	A/A
5'-UTR -446	-	Nicht beschrieben	Familie A I <sub>1</sub> , II <sub>2</sub> I <sub>2</sub> , II <sub>1</sub> , II <sub>3</sub> , II <sub>4</sub> , II <sub>5</sub> , II <sub>6</sub>	C/C T/C
			Familie B	C/C
c.92	p. R31P	rs8019270	Familie A I <sub>1</sub> , II <sub>2</sub> I <sub>2</sub> , II <sub>1</sub> , II <sub>3</sub> , II <sub>4</sub> , II <sub>5</sub> , II <sub>6</sub>	C/C G/C
			Familie B	C/C

**Tab. 3.3** Sequenzvariationen im *TBPL2*-Gen

## 4 Diskussion

### 4.1 Reduzierte Penetranz

In dieser Arbeit wurden Mitglieder zweier Familien untersucht, in denen die Unterschiede im Phänotyp bei identischem Genotyp durch reduzierte Penetranz erklärt werden können. Man spricht von reduzierter oder unvollständiger Penetranz, wenn Personen trotz eines disponierenden Genotyps den korrespondierenden Phänotyp nicht aufweisen bzw. entwickeln. Reduzierte Penetranz ist in der Genetik kein unbekanntes Phänomen. Für viele autosomal dominant vererbte Krankheiten wie Chorea Huntington, Muskeldystrophien oder das Waardenburg Syndrom ist eine unvollständige Penetranz beschrieben.

Einige Mitglieder der hier untersuchten Familien waren an der Spinocerebellären Ataxie Typ 17 erkrankt. Die SCA17 wird durch eine CAG-Repeat-Expansion im *TBP*-Gen hervorgerufen. Dabei gilt eine Repeatlänge über 48 Triplets als pathologisch. Für die SCA17 ist das Phänomen der reduzierten Penetranz bei Allelen mit 43 bis 48 CAG-Repeats beschrieben.

Auf der Suche nach den genauen Hintergründen für diese Beobachtung sollte zuerst ausgeschlossen werden, dass es sich um eine Variabilität des Phänotyps handelt. So kann ein sehr spätes Erkrankungsalter den Eindruck einer reduzierten Penetranz erwecken. Aber auch ein sehr milder Phänotyp, der klinisch nicht auffällig ist, sollte abgegrenzt werden.

Eine Erklärung für Unterschiede in der Penetranz ist in vielen Fällen noch nicht gefunden, aber zwei Faktoren könnten als Ursache in Frage kommen: Zum einen könnten externe Faktoren wie Umwelteinflüsse eine Wirkung auf die Penetranz haben. Zum anderen sind genetische Faktoren wie modifizierende Effekte anderer Gene zu berücksichtigen. Die Suche nach modifizierenden Genen für eine Erkrankung ist in den letzten Jahrzehnten begonnen worden: Einerseits erhofft man sich eine genauere Erklärung des Pathomechanismus für Krankheiten. Andererseits besteht die Hoffnung neue therapeutische Ansätze über solche modifizierenden Gene entwickeln zu können.

Für Familie A wurden acht Mitglieder aus zwei Generationen untersucht (Stammbaum siehe Abbildung 2.1, Material und Methoden). Vier der sechs Geschwister zeigten zum Untersuchungszeitpunkt neurologische Symptome wie zerebelläre Ataxie, Chorea und Demenz. Bei den Eltern, dem ältesten Sohn und der jüngsten Tochter konnten klinisch keine Anomalitäten festgestellt werden. In den molekulargenetischen Analysen der DNA-Proben der Mutter und aller sechs Kinder konnte ein Allel mit einer Repeat-Expansion von 48 Triplets im *TBP*-Gen ermittelt werden, das sowohl mit einem asymptomatischen als auch pathologischen Phänotyp assoziiert sein kann.

Bei Familie B wurden drei Mitglieder einer Familie aus zwei Generationen untersucht (Stammbaum siehe Abbildung 2.2, Material und Methoden). Nur eine Person wies neurologische Symptome, die mit einer SCA17 vereinbar sind, auf. Die molekulargenetische Analyse zeigte, dass die Betroffene, ihr Vater und ihr Onkel auf einem Allel im *TBP*-Gen einen Repeat der Länge 44 besitzen. Auch hier liegt die Situation vor, dass ein und derselbe Genotyp sowohl mit einem gesunden als auch mit einem pathologischen Phänotyp assoziiert ist.

Inhalt dieser Arbeit war die molekulargenetische Analyse der beiden dargestellten Familien, die auf Variationen des *TBP*-, des *TBPL1*- und des *TBPL2*-Gens untersucht wurden. Die Exons und Exon-Intron-Übergänge der drei Gene wurden durch PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Nukleotidsequenz wurde mit Einträgen der NCBI-Datenbank (GenBank reference sequences NM\_003194.3, NM\_004865.2 und NM\_199047.2) abgeglichen.

## 4.2 Polymorphismen und ihre Auswirkungen

In Genen mit potenziell modifizierenden Eigenschaften wird nach Sequenz-Variationen gesucht. Diese Variationen können Mutationen oder Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism) sein. Als Einzelnukleotid-Polymorphismen werden nicht pathogene Variationen von einzelnen Basenpaaren bezeichnet. Die Definition, dass ein SNP bei mindestens 1 % der jeweiligen Gesamtpopulation vorkommen muss, ist nach neueren Erkenntnissen nicht mehr vertretbar. SNPs stellen ca. 90 % aller genetischen Varianten im menschlichen Genom dar. Sie sind nicht gleichmäßig verteilt, sondern ungleichmäßig in verschiedenen



Regionen. Zwei Drittel aller SNPs bestehen aus dem Austausch von Cytosin durch Thymin. Cytosin ist im Wirbeltier-Genom häufig methyliert. Durch spontan auftretende Desaminierung wird aus 5-Methylcytosin Thymin. Polymorphismen können sowohl in kodierenden als auch in nicht-kodierenden Abschnitten eines Gens auftreten. Durch den degenerierten genetischen Code hat ein SNP innerhalb einer kodierenden Sequenz nicht automatisch eine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge. Andererseits kann aber auch ein SNP in nicht-kodierenden Abschnitten eines Gens Konsequenzen auf Genspleißing, Bindung von Transkriptionsfaktoren oder die Sequenz der RNA haben.

Ein Beispiel dafür, wie ein Polymorphismus die Penetranz einer Erkrankung beeinflussen kann, zeigten Risch et al. für die Torsionsdystonie. Die Dystonien sind eine heterogene Gruppe mit unterschiedlichen klinischen Subtypen. Bisher sind sechs Genloci bekannt. Eines dieser Gene, DYT1, ist auf Chromosom 9q24 lokalisiert und weist bei Dystonie-Patienten eine GAG-Deletion in Exon 5 auf. Die Penetranz dieser Mutation wird auf 30% geschätzt, so dass nur 1/3 der Mutationsträger letztendlich auch klinische Symptome präsentieren. Neben der GAG-Deletion konnten weitere Sequenzvariationen in DYT1 gefunden werden, unter anderem ein SNP für Aminosäure 216: Der Polymorphismus kodiert in 88% der Fälle für Aspartat (D) und in 12% für Histidin (H). Es konnte gezeigt werden, dass der vorliegende Genotyp einen Effekt auf die Penetranz der Dystonie haben kann: Die Häufigkeit des 216H-Allels ist in klinisch unauffälligen Mutationsträgern erhöht und scheint mit einem protektiven Effekt einherzugehen, während das 216D-Allel mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert zu sein scheint. Diese Beobachtung in einer nordamerikanischen Kohortengruppe konnten in einer zweiten europäischen Population bestätigt werden (Kamin et al., 2008). Somit kann der D216H-Polymorphismus als modifizierender Faktor für das Auftreten einer Dystonie angesehen werden.

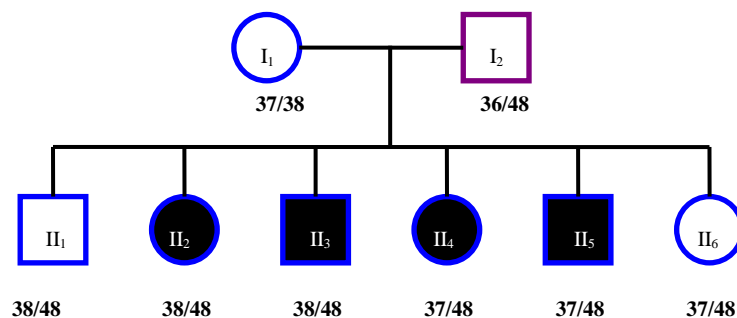
In der vorliegenden Arbeit wurde in *TBP*-, *TBPL1*- und *TBPL2* - Genen nach Sequenzvarianten gesucht, die Auswirkung auf die Penetranz der SCA 17 haben könnten.

### 4.3 Suche nach Sequenzvariationen im *TBP*-Gen, *TBPL1*-Gen und *TBPL2*-Gen

#### 4.3.1 *TBP*-Gen

Im *TBP*-Gen wurden drei verschiedene Polymorphismen nachgewiesen, von denen zwei sich in nicht-kodierenden Regionen des Gens befanden (5'-UTR -349 C/T und IVS 6 +19 A/G) und einer in Exon 6 (c.771 T/C). Es handelt sich bei allen um Einzelnukleotid-Polymorphismen, die keine Änderung der Aminosäure und somit keine Änderung der Primärstruktur des TBPs zur Folge haben. Dieses kommt einerseits durch ihre Lage in nicht-kodierenden Abschnitten des Gens zustande, andererseits durch die so genannte Degenerierung des genetischen Codes (mehrere Triplets codieren für ein und dieselbe Aminosäure). Der Polymorphismus im Exon 6 hat keine Änderung der Aminosäure zur Folge (p.N257N). Laut NCBI-Datenbank ist der heterozygote Genotyp c.771 T/C in der europäischen Population am häufigsten zu finden (47,6% und 59,3% in zwei unterschiedlichen europäischen Studienkohorten).

In Familie A waren der Vater und alle sechs Kinder homozygot für Cytosin. Bei der Mutter aus Familie A und allen untersuchten Mitgliedern aus Familie B konnte der heterozygote Basenaustausch nachgewiesen werden. Die Verteilung von Hetero- und Homozygotie für diesen Polymorphismus innerhalb Familie A macht eine Assoziation mit der Penetranz der Erkrankung unwahrscheinlich, siehe Abbildung 4.1 .



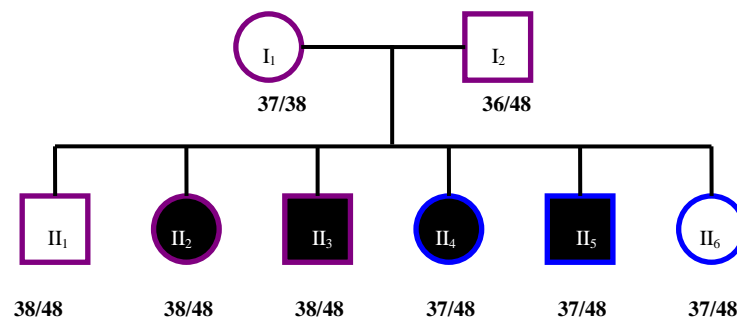
**Abb. 4.1**

Verteilung des Polymorphismus c.771 T/C im *TBP*-Gen für Familie A  
 violett = Genotyp T/C  
 blau = Genotyp C/C

In Familie B sind alle untersuchten Mitglieder heterozygot für den Polymorphismus, was ebenfalls gegen einen Effekt auf die Penetranz spricht.

Die Veränderung 5'-UTR -349 C/T konnte nur bei I<sub>2</sub> in Familie A gefunden werden, was innerhalb der Familie A einen modifizierenden Effekt auf die Penetranz der SCA17 unwahrscheinlich macht.

Der Polymorphismus in Intron 6, IVS 6 +19 A/G, konnte bei allen Mitgliedern der Familie A nachgewiesen werden. Der Genotyp bezüglich Heterozygotie und Homozygotie ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Er spricht gegen eine die Penetranz beeinflussende Wirkung dieses Polymorphismus.



**Abb. 4.2**

Verteilung des Polymorphismus IVS 6 +19 A/G des *TBP*-Gens für Familie A

violett = Genotyp A/G

blau = Genotyp G/G

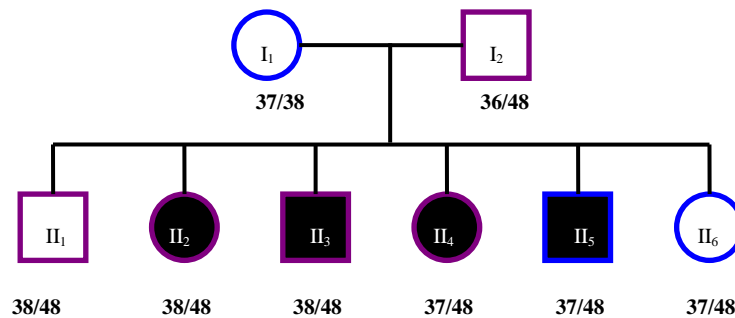
### 4.3.2 TBPL1-Gen

Auch im *TBPL1*-Gen konnten Sequenzvariationen nachgewiesen werden: Es handelt sich um vier Einzelnukleotid-Polymorphismen im nicht-kodierenden Bereich, zwei davon in der 5'-UTR (5'-UTR -571A/G und 5'-UTR -383T/G) und zwei im Intron zwischen Exon 4 und 5 (IVS4 +5C/T und IVS4 -19A/G). Bisher nicht beschrieben ist der Polymorphismus 5'-UTR -383T/G. Die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Genotypen ist nur für den Polymorphismus IVS4 +5C/T bekannt: In einer Stichprobe von 120 Personen (NCBI-Datenbank) sind 26,7% homozygot für Thymin, 51,7% heterozygot für Cytosin und Thymin und 21,7% homozygot für Cytosin.

Zu allen vier im *TBPL1*-Gen gefundenen Polymorphismen lässt sich aber sagen, dass das Verteilungsmuster innerhalb der beiden Familien einen modifizierenden Effekt auf das Auftreten der Erkrankung unwahrscheinlich macht.

Alle untersuchten Proben waren homozygot für die G-Allele an Position -571 und -383. Dieses Allel scheint die häufige Variante in Norddeutschland und nicht eine die Penetranz beeinflussende Variation zu sein.

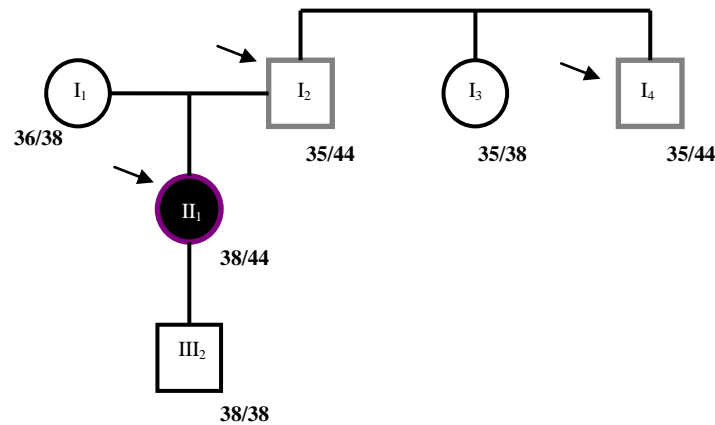
Für den Polymorphismus IVS4 +5C/T sind drei Personen der Familie A (I<sub>1</sub>, II<sub>5</sub> und II<sub>6</sub>) homozygot T/T, die restlichen fünf (I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub> und II<sub>4</sub>) heterozygot C/T, siehe Abbildung 4.3.



**Abb. 4.3**

Verteilung des Polymorphismus IVS 4 +5 C/T des *TBPLI*-Gens für Familie A  
violett = Genotyp C/T  
blau = Genotyp T/T

In der Familie B zeigen I<sub>2</sub> und I<sub>4</sub> die Referenzsequenz für den Polymorphismus an Position IVS4 +5C/T, sie sind homozygot für Cytosin. II<sub>1</sub> weist an dieser Position Heterozygotie für Cytosin und Thymin auf (Abbildung 4.4). Hier stimmt die Verteilung des Allels mit dem Auftreten bzw. Nicht-Auftreten der SCA17 bei Mitgliedern mit einer Repeatlänge von 44 überein. Da aber in Familie A durch die Verteilung des Polymorphismus keine Relevanz nachgewiesen werden konnte, sollte diese Sequenzvariation als eine häufige Variante angesehen werden. Dies ist vereinbar mit der untersuchten Population aus der NCBI-Datenbank, wo der heterozygote Genotyp Cytosin/Thymin mit 51,6 % die höchste Frequenz zeigt.

**Abb. 4.4**

Verteilung des Polymorphismus IVS4 +5C/T des *TBPL1*-Gens für Familie B  
 grau = Genotyp C/C (Referenzsequenz)  
 violett = Genotyp C/T

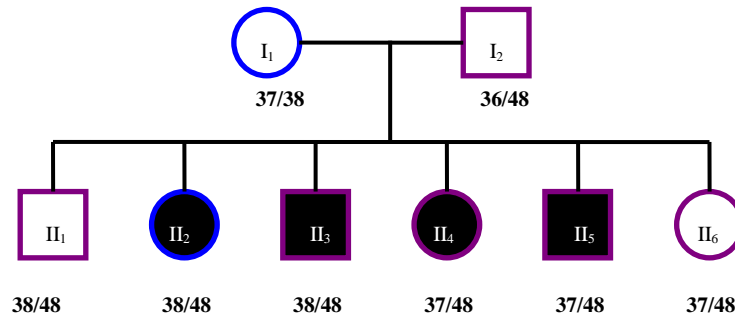
Eine weitere Sequenzvariation im Intron zwischen Exon 4 und 5 des *TBPL1*-Gens ist IVS4 -19A/G, die in Familie B bei I<sub>2</sub> und I<sub>4</sub> gefunden werden konnte. Beide Probanden sind heterozygot für den Basenaustausch Adenin zu Guanin. Innerhalb der Familie B ist hiermit der Polymorphismus bei den Mitgliedern mit fraglicher reduzierter Penetranz gefunden worden. Durch völliges Fehlen dieser Sequenzvariante bei Mitgliedern mit reduzierter Penetranz der Familie A sollte die Verteilung dieser Variation als zufällig übereinstimmend mit dem Nicht-Auftreten der SCA17 angesehen werden und nicht als eine mögliche Ursache für die Penetranz der SCA17.

### 4.3.3 *TBPL2*-Gen

Im *TBPL2*-Gen konnten insgesamt drei Polymorphismen gefunden werden: Die beiden Veränderungen an den Positionen 5'-UTR -526G>A und 5'-UTR -446T>C sind noch nicht beschrieben. Hervorzuheben bei diesen beiden Polymorphismen ist die Tatsache, dass sie bei allen untersuchten Personen zusammen auftraten: homozygot in Familie A bei I<sub>1</sub> und II<sub>2</sub> und heterozygot in Familie A bei I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>3</sub>, II<sub>4</sub>, II<sub>5</sub>, II<sub>6</sub> und Familie B bei I<sub>2</sub>, I<sub>4</sub> und II<sub>1</sub>. Es könnte sich demnach um gekoppelte Polymorphismen handeln.

Die bereits beschriebene cDNA-Veränderung c.92G>C führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Prolin (p.R31P) und entspricht somit einer Missense-Veränderung. Es sind zwei Personen aus Familie A (I<sub>1</sub> und II<sub>2</sub>) homozygot für

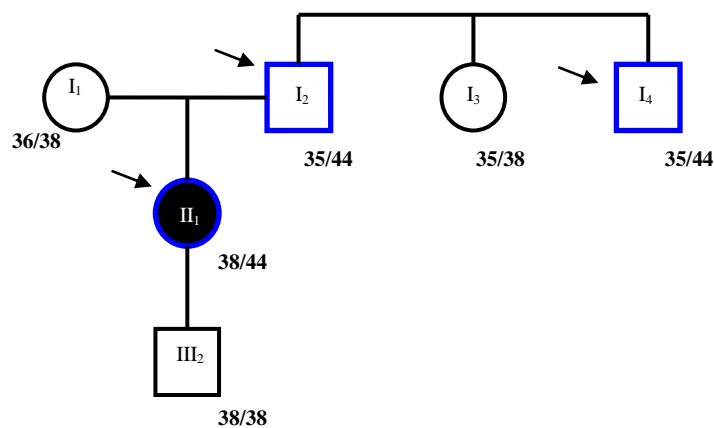
diesen Basenaustausch von Guanin zu Cytosin, während die restlichen Personen aus Familie A (I<sub>1</sub> und II<sub>1</sub> und II<sub>3-6</sub>) heterozygot sind (Verteilungsmuster siehe Abbildung 4.5).



**Abb. 4.5**

Verteilung des Polymorphismus c.92G/C des *TBPL2*-Gens für Familie A  
violett = Genotyp G/C  
blau = Genotyp C/C

Aus Familie B sind die drei untersuchten Mitglieder homozygot C/C an Position c.92.



**Abb. 4.6**

Verteilung des Polymorphismus c.92G/C des *TBPL2*-Gens für Familie B  
blau = Genotyp C/C

Die Allelfrequenz für den Polymorphismus an Position c.92G>C des *TBPL2*-Gens ist in einer europäischen Untersuchungskohorte aus der NCBI-Datenbank wie folgt beschrieben: Der C/C-Genotyp tritt mit einer Häufigkeit von 13,3%, der C/G-Genotyp

von 51,7 % und der G/G-Genotyp von 35,0% auf. Dabei gilt aber natürlich zu beachten, dass sich aus eine Gruppe von 11 zum Teil miteinander verwandten, untersuchten Personen kaum Rückschlüsse auf die Verteilung der Allelfrequenzen in einer Gesamtpopulation ziehen lassen.

Die drei gefundenen Polymorphismen im *TBPL2*-Gen scheinen jedoch aufgrund ihres Verteilungsmuster, siehe auch Abbildung 4.5 und 4.6, eine untergeordnete Bedeutung für die Penetranz der Erkrankung spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zehn Sequenzvariationen in den drei untersuchten Genen gefunden werden konnte, wobei sechs davon publiziert und vier noch nicht bekannt waren. Keine der Variationen scheint Einfluss auf die Penetranz der SCA17 in den untersuchten Individuen zu haben.

Es ist zu berücksichtigen, dass bei der hier durchgeführten Analyse nur die kodierenden Abschnitte eines Gens sowie die Exon-Intron Übergänge untersucht wurden. Die dargestellten DNA-Variationen innerhalb der Introns spiegeln daher nur wenige aus einer vermutlich größeren Anzahl vorhandener Variationen in den Introns wieder. Es ist nicht auszuschließen, dass die nicht untersuchten intronischen Bereiche relevante Mutationen enthalten, die etwa zur Veränderung von Promotorregion oder Spleißstellen führen könnten.

Das Wissen über die Bedeutung der Introns eines Gens für seine Transkription ist bisher nur sehr lückenhaft. Hinweise darauf, dass auch Mutationen in Introns eine Erkrankung auslösen können, finden sich zum Beispiel bei der  $\beta$ -Thalassämie. Hier führt eine Mutation im Intron zum Einbau einer neuen Spleiß-Akzeptor-Stelle. Dadurch kommt es zu einem vorzeitigen Stop-Kodon und das Protein Hämoglobin ist verkürzt und funktionslos (Forget, 1998).

Es ist außerdem anzumerken, dass für die drei untersuchten Gene noch keine Promotorregionen charakterisiert wurden, so dass es auch hier Mutationen geben kann, die durch diese Arbeit nicht erfasst wurden.

Deletionen einzelner Exons könnten ebenfalls übersehen worden sein, da die durchgeführten PCR-Reaktionen keinerlei quantitative Aussagen erlauben. Zu einem Nachweis solcher Veränderungen wären quantitative Messungen der PCR-Produkte (auf DNA-Ebene) oder Expressionsanalysen (auf RNA- oder Proteinebene) notwendig.

Bei einer weitergehenden Suche nach modifizierten Sequenzvarianten sollte man auch andere Kandidatengene als *TBPL1* und *2* in Betracht ziehen. Mögliche andere Gene könnten solche sein, die für Proteine kodieren, mit denen das TBP im Verlauf des Transkriptionsprozess interagiert. Zum Beispiel bildet das TBP in der Initiation zusammen mit TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) einen TFIID-Komplex zur Bindung der DNA. Später spielen noch andere allgemeine Transkriptionsfaktoren eine Rolle, die ebenfalls über eine Bindung dieses TFIID-Komplexes an der Initiation der Transkription Teil haben. Sequenzvariationen in Genen, die für diese Proteine codieren, könnten Auswirkung auf die Funktion und somit auch auf die Interaktion mit TBP haben. Eine Veränderung der physiologischen Prozesse könnte auch einen modifizierenden Effekt auf die Penetranz einer Erkrankung wie die SCA17 haben. Eine genauere Erklärung zur Interaktion der einzelnen Transkriptionsfaktoren untereinander oder mit dem TBP kann den Abbildungen 1.2 und 1.3 in der Einleitung entnommen werden.



## 5 Zusammenfassung

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 17 (SCA17) zählt zu dem Formenkreis der autosomal-dominant vererbaren Ataxien. Zu den Hauptsymptomen der SCA17 gehören progressive Ataxie, kognitive Beeinträchtigung und psychiatrische Symptome. Die Erkrankung wird hervorgerufen durch eine CAG-Repeat-Expansion in Exon 3 des TATA-Bindeprotein-Gens (*TBP*-Gen). Das TBP ist ein essentieller Transkriptionsfaktor, erforderlich für die Initiation der Transkription. Für die SCA17 ist das Phänomen der reduzierten Penetranz beschrieben. Eine Erklärung für einen Mechanismus dieses Phänomen ist jedoch noch nicht gefunden worden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Familien aus Deutschland untersucht, deren Mitglieder trotz identischem Genotyp, einer CAG-Repeat-Expansion im *TBP*-Gen, nicht alle den zu erwartenden Phänotyp präsentieren, also Symptome der SCA17 entwickeln.

In dieser Arbeit wurde bei 11 Personen im *TBP*-Gen, *TBPL1*-Gen (TATA-Bindeprotein like 1-Gen) und *TBPL2*-Gen (TATA-Bindeprotein like 2-Gen) nach Sequenzvariationen gesucht. Dazu wurden die codierenden Exons und Exon-Intron-Übergänge sowie Teile des 5'-UTR mittels der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Nach Kontrolle der Produkte auf Agarose-Gelen wurden die Proben sequenziert.

Es wurden dabei im *TBP*-Gen drei Polymorphismen gefunden. Einer lag im codierenden Bereich, einer im 5'-UTR und einer im Intron zwischen Exon 6 und 7. Der Polymorphismus im 5'-UTR war noch nicht beschrieben. Im *TBPL1*-Gen konnten vier Polymorphismen nachgewiesen werden, von denen zwei im 5'-UTR und zwei im Intron zwischen Exon 4 und 5 lagen. Bis auf einen Polymorphismus im 5'-UTR waren die nachgewiesenen Varianten bereits beschrieben. Im *TBPL2*-Gen konnten drei Sequenzvariationen gefunden werden. Ein bekannter Polymorphismus liegt in Exon 1, zwei bisher nicht beschriebene Sequenzvariationen im 5'-UTR.

Die Verteilung dieser Sequenzvariationen innerhalb der beiden Familien zeigte keine Assoziation mit der Penetranz der Erkrankung. Daher konnte eine modifizierende Funktion von *TBPL1* oder *TBPL2* nicht nachgewiesen werden.

Es gilt aber zu beachten, dass bei der durchgeführten Sequenzanalyse primär Exons betrachtet wurden und die Promotorregionen bisher nicht charakterisiert sind. Die gefundenen DNA-Variationen präsentieren daher mit großer Wahrscheinlichkeit nur wenige einer größeren Anzahl vorhandener Varianten in den drei untersuchten Genen.

## 6 Literaturverzeichnis

### 6.1 Zeitschriften

Bruni AC, Takahashi-Fujigasaki J, Maltecca F, Foncin JF, Servadio A, Casari G, D'Adamo P, Maletta R, Curcio SA, De Michele G, Filla A, El Hachimi KH, Duyckaerts C. Behavioral Disorder, Dementia, Ataxia and Rigidity in a Large Family With TATA Box-Binding Protein Mutation. *Arch Neurol.* 61: 1314-1320 (2004)

Bürk K, Abele M, Fetter M, Dichgans J, Skalej M, Laccone F, Didierjan O, Brice A, Klockgether T. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I clinical features and MRI in families with SCA1, SCA2 and SCA3. *Brain* 119: 1497-1505 (1996)

Chong JA, Moran M, Teichmann M, Kaczmarek JS, Roeder R, Clapham D. TATA-Binding Protein (TBP)-Like Factor (TLF) is a Functional Regulator of Transcription: Reciprocal Regulation of the Neurofibromatosis Type 1 and c-fos Genes by TLF/TRF2 and TBP. *Mol Cell Biol.* 25: 2632-2642 (2005)

Craig K, Keers SM, Walls TJ, Curtis A, Chinnery PF. Minimum prevalence of spinocerebellar ataxia 17 in the north east of England. *J Neurol Sci.* 239: 105-109 (2005)

De Michele G, Maltecca F, Carella M, Volpe G, Orio M, De Falco A, Gombia S, Servadio A, Casari G, Filla A, Bruni A. Dementia, ataxia, extrapyramidal features and epilepsy: phenotype spectrum in two Italian families with spinocerebellar ataxia type 17. *Neurol Sci.* 24: 166-167 (2003)

Di Pietro C, Ragusa M, Duro L, Guglielmino M, Barbagallo D, Carnemolla A, Laganà A, Buffa P, Angelica R, Rinaldi A, Calafato M, Milicia I, Caserta C, Giugno R, Pulvirenti A, Giunta V, Rapisarda A, Die Pietro V, Grillo A, Messina A, Ferro A, Grzeschik KH, Purrelo M. Genomics, Evolution and Expression of TBPL2, a member of the TBP Family. *DNA and Cell Biol.* 26: 369-385 (2007)

Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci.* 850 : 38-44 (1998)

Fujigaski H, Martin JJ, De Deyn PP, Camuzat A, Deffond D, Stevanin G, Dermaut B, Van Broeckhoven C, Dürr A, Brice A. CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia. *Brain* 124: 939-947 (2001)

Gao R, Matsuura T, Coolbaugh M, Zühlke C, Nakamura K, Rasmussen A, Siciliano MJ, Ashizawa T, Lin X. Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *Eur J Hum Genet.* 16: 215-222 (2008)

Hellenbroich Y, Bubel S, Pawlack H, Opitz S, Vieregge P, Schwinger E, Zühlke C. Refinement of the spinocerebellar ataxia type 4 locus in a large German family and exclusion of CAG repeat expansions in this region. *J Neurol.* 250: 668-671 (2003)

Hernandez D, Hanson M, Singleton A, Gwinn-Hardy K, Freeman J, Ravina B. Mutation at the SCA17 locus is not a common cause of parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 9: 317–320 (2003)

Imbert G, Trottier Y, Beckmann J, Mandel JL. The gene for the TATA binding protein (TBP) that contains a highly polymorphic protein coding CAG repeat maps to 6q27. *Genomics* 21: 667-668 (1994)

Kamm C, Fischer H, Garavaglia B, Kullman S, Sharma M, Schrader C, Grundmann K, Klein C, Borggraefe I, Lobsien E, Kupsch A, Nardocci N, Gasser T. Susceptibility to DYT1 dystonia in European patients is modified by the D216H polymorphism. *Neurology* 70: 2261-2262 (2008)

Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S. A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: A new polyglutamine disease? *Hum Mol Genet.* 8: 2047-2053 (1999)

Lasek K, Lencer R, Gaser C, Hagenah J, Walter U, Wolters A, Kock N, Steinlechner S, Nagel M, Zühlke C, Nitschke MF, Brockmann K, Klein C, Rolfs A, Binkofski F. Morphological basis for the spectrum of clinical deficits in spinocerebellar ataxia 17 (SCA17). *Brain* 129: 2341–2352 (2006)

Manto MU. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum* 4: 2-6. (2005)

Mariotti C, Alpini D, Fancellu R, Soliveri P, Grisoli M, Ravaglia S, Lovati C, Fetoni V, Giaccone G, Castucci A, Taroni F, Gellera C, Di Donato S. Spinocerebellar ataxia type 17 (SCA17): Oculomotor phenotype and clinical characterization of 15 Italian patients. *J Neurol.* 254: 1538–1546 (2007)

Martianov I, Viville S, Davidson I. RNA polymerase II transcription in murine cells lacking the TATA binding protein. *Science* 298: 1036-1039 (2002)

Oda M, Maruyama H, Komure O, Morino H, Terasawa H, Izumi Y, Imamura T, Yasuda M, Ichikawa K, Ogawa M, Matsumoto M, Kawakami H. Possible Reduced Penetrance of Expansion of 44 to 47 CAG/CAA Repeats in the TATA-Binding Protein Gene in Spinocerebellar Ataxia Type 17. *Arch Neurol.* 61: 209-212. (2004)

Ohbayashi T, Makino Y, Tamura T. Identification of a mouse TBP-like protein (TLP) distantly related to the Drosophila TBP-related factor. *Nucleic Acids Res.* 27: 750-755 (1999)

Ohbayashi T, Kishimoto T, Makino Y, Shimada M, Nakadai T, Aoki T, Kawata T, Niwa S, Tamura T. Isolation of the cDNA, Chromosome Mapping, and Expression of the Human TBP-Like Protein. *Biochem and Biophys Res Comm.* 255: 137-142 (1999)

Persengiev SP, Zhu X, Dixit BL, Maston GA, Kittler EL, Green MR. TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed. *Proc Nat Acad Sci USA* 100: 14887-14891 (2003)

Purrello M, Di Pietro C, Mirabile E, Rapisarda A, Rimini R, Tinè A, Pavone L, Motta S, Grzeschik KH, Sichel G. Physical mapping at 6q27 of the locus for the TATA box-binding protein, the DNA-binding subunit of TFIID and a component of SL1 and TFIIB, strongly suggests that it is single copy in the human genome. *Genomics* 22: 94-100 (1994)

Risch NJ, Bressman SB, Senthil G, Ozelius LJ. Intragenic Cis and Trans modification of genetic susceptibility in DYT1 torsion dystonia. *Am J Hum Genet.* 80: 1188-93 (2007)

Rolfs A, Koeppen AH, Bauer I, Bauer P, Buhlmann S, Topka H, Schöls L, Riess O. Clinical features and neuropathology of autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA17). *Ann Neurol.* 54: 367-375. (2003)

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 74: 5463-5467 (1977)

Silveira I, Miranda C, Guimaraes I, Moreira MC, Alonso I, Mendonca P, Ferro A, Pinto-Basto J, Coelho J, Ferreira F, Poirier J, Parreira E, Vale J, Januario C, Barbot C, Tuna A, Barros J, Koide R, Tsuji S, Holmes SE, Margolis RL, Jardim L, Pandolfo M, Coutinho P, Sequeiros J. Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded(CAG)<sub>n</sub> allele at the SCA17 locus. *Arch Neurol.* 59: 623-629 (2002)

Stevanin G, Fujigasaki H, Lebre AS, Camuzat A, Jeannequin C, Dode C, Takahashi J, San C, Bellance R, Brice A, Durr A. A Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. *Brain* 126: 1599-1603 (2003)

Storey E, Bahlo M, Fahey M, Sisson O, Lueck CJ, Gardner RJ. A new dominantly inherited pure cerebellar ataxia, SCA 30. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80: 408-411 (2009)

Tallaksen CM. Hereditary ataxias. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 11:1977-1980 (2008)

Toyoshima Y, Yamada M, Onodera O, Shimohata M, Inenaga C, Fujita N, Morita M, Tsuji S, Takahashi H. SCA17 homozygote showing Huntington's disease-like phenotype. *Ann Neurol.* 55: 281-286 (2004)

Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA 6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet.* 15: 62-69 (1997)

Zühlke C, Hellenbroich Y, Dalski A, Kononowa N, Hagenah J, Vieregge P, Riess O, Klein C, Schwinger E. Different types of repeat expansion in the TATA-binding protein gene are associated with a new form of inherited ataxia. *Eur J Hum Genet.* 9: 160-164 (2001)

Zühlke C, Gehlken U, Hellenbroich Y, Schwinger E, Bürk K. Phenotypical variability of expanded alleles in the TATA-binding protein gene. Reduced penetrance in SCA 17? *J Neurol.* 250: 160-163 (2003)

Zühlke C, Bürk K. Spinocerebellar ataxia type 17 is caused by mutations in the TATA-box binding protein. *Cerebellum* 000: 1-8 (2007)

## 6.2 Bücher

Knippers R: Molekulare Genetik. 8. neu bearbeitete Auflage. 23f; 307f Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2001)

Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E: Taschenlehrbuch Humangenetik. 7.Auflage. 243f Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2006)

## 6.3 Elektronische Datenbanken

National Center for Biotechnology Information (NCBI)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,  
humane mRNA des TBP-Gens (Zugangsnummer NM\_003194.3),  
humane mRNA des TBPL1-Gens (Zugangsnummer NM\_004865.2),  
humane mRNA des TBPL2-Gens (Zugangsnummer NM\_199047.2).  
Zuletzt aufgerufen: 15.12.2009

Occidental College, Biology 221- Molecular Biology, Dr. Jonathon Stillman  
[http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/110300/rna\\_polymerases.htm](http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/110300/rna_polymerases.htm)  
Zuletzt aufgerufen: 15.12.2009

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagung

Zum Gelingen und zur Durchführung dieser Dissertation haben viele Menschen beigetragen.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Gabriele Gillessen-Kaesbach, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit an ihrem Institut durchzuführen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Christine Zühlke für ihre intensive Betreuung sowohl bei der experimentellen Durchführung als auch nachher beim Verfassen der Arbeit. Mit viel Zeit und Geduld hat sie meine Fragen beantwortet, das Manuskript sorgfältig korrigiert und mich immer wieder durch ihre tolle Betreuung für diese Dissertation motiviert!

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen MitarbeiterInnen des Instituts bedanken für die freundliche Aufnahme in das Team und die nette Arbeitsatmosphäre. U.Gehlken, J.Atici und S. Purmann möchte ich für die Betreuung bei allen Fragen und Problemen im Labor bedanken. H. Böttger danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Methodik dieser Arbeit. Ein besondere Dank gilt auch V. Bernard, die mir täglich bei Fragen und Probleme immer zur Seite stand.

Meiner Familie möchte ich für ihren unerschütterlichen Glauben an mich danken. Mama, Papa, Christopher, Line und Constantin – Ihr seid mein zu Hause und mein Rückgrat in allen Lebenslagen!

Zum Schluss möchte ich noch meinem Freund danken, der mich in jeder Situation dazu ermutigt, mein Bestes zu geben. David, deine Unterstützung und dein Glauben an mich sind unglaublich wertvoll!