

**Häufigkeit der Spinocerebellären Ataxie Typ 14 (SCA14) in einem Kollektiv von Ataxie-
Patienten: Mutationsscreening des Proteinkinase C γ -Gens (*PRKCG*)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität-Gießen

Vorgelegt von Melanie Landendinger
aus Landshut

Gießen 2011

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Ulrich Müller

Gutachter:
Frau Prof. Dr. Dagmar Nolte

Gutachter:
Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

Tag der Disputation:
08.12.2011

Teile dieser Arbeit wurden publiziert bei:

Nolte D, Landendinger M, Schmitt E, Müller U (2007): Spinocerebellar ataxia 14: novel mutation in exon 2 of *PRKCG* in a German family, *Movement Disorders*, 22(2):265-7.

Landendinger M, Klebe S, Nohl C, Baron R, Müller U, Nolte D (2007): Codon 101 in *PRKCG*: „Hotspot“ for SCA14-causing mutations? Poster auf der 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH)

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wirtschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Klassifikation	1
1.1.1. Symptomatische Ataxien	2
1.1.2. Idiopathische Ataxien	2
1.1.3. Mitochondriale Ataxien	3
1.1.4. X-chromosomale Ataxien	3
1.1.5. Autosomal rezessive Ataxien	4
1.1.6. Autosomal dominante Ataxien	5
1.2. Spinocerebelläre Ataxien	6
1.2.1. Repeat-Expansionsmechanismus im codierenden Bereich	9
1.2.2. Repeat-Expansionsmechanismus im nicht-codierenden Bereich	10
1.2.3. Punktmutationen als Ursache einer SCA	10
1.3. SCA14	11
1.3.1. Klinischer Phänotyp der SCA14	11
1.3.2. Mutationen im <i>PRKCG</i> -Gen	12
1.3.3. Proteinstruktur der Proteinkinase C γ (PKC γ)	14
1.3.4. Tiermodelle	16
1.4. Zielsetzung der Arbeit	18
2. Materialien	19
2.1. Chemikalien	19
2.2. Enzyme und Nukleotide	19
2.3. Kits	19
2.4. Lösungen	20
2.5. Geräte	21
2.6. Verbrauchsmaterialien	22
2.7. Computerprogramme	22
3. Methoden	23
3.1. DNA-Extraktion	23
3.1.1. DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen	23
3.1.2. DNA-Extraktion mit dem NucleoSpin Blood XL Kit der Firma Macherey und Nagel	24
3.2. Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades der DNA	24
3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
3.3.1. Grundlagen	25
3.3.2. Amplifikation der Exone des <i>PRKCG</i> -Gens	27
3.3.3. Reinigung	29
3.4. Agarosegelelektrophorese	30
3.4.1. Prinzip	30
3.4.2. Durchführung	30
3.5. Sequenzierung	31
3.5.1. Grundlagen	31
3.5.2. Durchführung	32
3.5.3. Reinigung der Sequenzierungsansätze	32
3.5.4. Auswertung der Sequenzdaten	33
3.6. Restriktionsanalyse	33

3.6.1. Grundlagen	34
3.6.2. Durchführung	34
4. Ergebnisse	36
4.1. Studienpopulation	36
4.2. Darstellung der Exone ohne krankheitsauslösende Mutationen	37
4.2.1. Exon 1	38
4.2.2. Exon 3	39
4.2.3. Exon 4	41
4.2.4. Exon 5	41
4.2.5. Exon 6	41
4.2.6. Exon 9	43
4.2.7. Exon 11	44
4.2.8. Exon 13	45
4.2.9. Exon 14	46
4.2.10. Exon 15	47
4.2.11. Exon 16	47
4.2.12. Exon 17	48
4.2.13. Exon 18	50
4.3. Nachweis von krankheitsauslösenden Mutationen	50
4.3.1. Exon 2	51
4.3.1.1. Mutationsnachweis in Exon 2	51
4.3.1.2. Analyse eines Kontrollkollektivs	51
4.3.1.3. Konserviertheit der mutierten AS	53
4.3.1.4. Symptome	53
4.3.1.5. Familiengeschichte	53
4.3.2. Exon 4	54
4.3.2.1. Mutationsnachweis in Exon 4	54
4.3.2.2. Analyse eines Kontrollkollektivs	55
4.3.2.3. Konserviertheit der mutierten AS	55
4.3.2.4. Symptome	56
4.3.2.5. Familiengeschichte	56
4.4. Zusammenstellung der nachgewiesenen Sequenzalterationen	56
5. Diskussion	58
5.1. Häufigkeit der SCA14	58
5.2. Genetik der SCA14	59
5.2.1. Identifizierte Mutationen im <i>PRKCG</i> -Gen	59
5.2.2. Identifizierte Polymorphismen im <i>PRKCG</i> -Gen	62
5.2.3. Verteilung bekannter/neuer Mutationen im <i>PRKCG</i> -Gen	63
5.3. Zellphysiologische Auswirkung der Mutationen im <i>PRKCG</i> -Gen	65
5.3.1. Zugewinn einer toxischen Funktion	66
5.3.2. Funktionsverlust	67
5.4. Empfehlungen zur molekulargenetischen Testung von SCA14	68
5.5. Ausblick	70
6. Zusammenfassung	72
7. Summary	73
8. Literaturverzeichnis	74

9. Abkürzungsverzeichnis	81
10. Abbildungsverzeichnis	84
11. Tabellenverzeichnis	85
12. Danksagung	86
13. Lebenslauf	87

1. Einleitung

Ataxie ist ein Oberbegriff für Koordinationsstörungen bei Bewegungsabläufen. Kennzeichnend ist in der Regel eine Rumpf- (Störung der Stabilität des Rumpfs im Sitzen), Stand- (Gleichgewichtsstörungen beim Stehen) oder eine Gangataxie (breitbeiniger schwankender Gang mit ausfahrenden Bewegungen). Die Standataxie kann durch den Romberg-Versuch (bei geschlossenen Augen nimmt die Fallneigung zu) aufgedeckt werden. Charakteristisch für eine Gangataxie ist, dass der sogenannte Seiltänzerengang nicht mehr durchgeführt werden kann. Erkennen kann man die Koordinationsstörung unter anderem (u.a.) als Dysmetrie (falsche Abmessung bei Zielbewegungen), die man beispielsweise mit dem Finger-Nase-Versuch testen kann. Zu den feinmotorischen Störungen gehören die Dysdiadochokinese (Unfähigkeit antagonistische Bewegungen schnell abwechselnd auszuführen), das Rebound-Phänomen (mangelndes Abbremsen nach Wegfall eines Widerstands) und die Asynergie (Störung des exakten Zusammenspiels verschiedener Muskelgruppen). Auch Dysarthrie, Intentionstremor und Veränderungen im Muskeltonus, sowohl Hypo- als Hypertonus, können bei Ataxien auftreten. Außerdem findet man häufig Störungen in der Okulomotorik, wie zum Beispiel (z.B.) Nystagmus oder Ophthalmoplegie. Ursache von Ataxien können Erkrankungen des Kleinhirns sein. Außerdem können auch Läsionen der spinocerebellären Bahnen oder des peripheren sensiblen Nervensystems auslösend sein. In diesem Kontext spricht man von sensibler Ataxie (de Gruyter, 2002; Mariotto et al., 2005).

1.1. Klassifikation

Eine Ataxie kann ein breites Spektrum an Symptomen auslösen. Bis Anfang der 1980er Jahre wurden die Ataxien nach den ihnen zugrunde liegenden neuropathologischen Veränderungen eingeteilt. Dabei wurden spinale, cerebelläre, spinocerebelläre und olivopontocerebelläre Atrophien unterschieden (Holmes, 1907; Greenfield, 1954). Diese Klassifikation erwies sich als ungeeignet, da viele Erkrankungen, die große Unterschiede in der Ätiologie, Klinik und Prognose aufwiesen, aufgrund der ähnlichen neuropathologischen Veränderungen zusammengefasst wurden. Außerdem wurden selbst Angehörige einer Familie verschiedenen Krankheitsgruppen zugeordnet. Aus diesem Grund schlug Anita Harding 1983 eine Klassifikation vor, die zunächst zwischen hereditären und sporadischen Ataxien unterschied. Darüber hinaus teilte sie die genetisch bedingten Ataxien nach dem jeweiligen Erbgang in

autosomal rezessiv, autosomal dominant und X-chromosomal ein (Harding, 1983). Auch Mutationen im mitochondrialen Genom können zu Ataxien führen. Bei den sporadischen Ataxien kann man symptomatische und idiopathische Formen unterscheiden. Im Folgenden werden die wichtigsten Erkrankungen aus den verschiedenen Kategorien kurz erläutert.

1.1.1. Symptomatische Ataxien

Eine der häufigsten Ursachen von symptomatischen Ataxien ist chronischer Alkoholismus. Dieser führt aus ungeklärten Gründen zu einer symmetrischen Atrophie des Kleinhirnvorderlappens. Zu den Symptomen gehören Gangataxie und im weiteren Verlauf auch Stand- und Rumpfataxie sowie eine skandierende Sprache. Außerdem können toxische Stoffe wie Blei und Quecksilber die gleiche Symptomatik auslösen.

Teilweise sind auch Nebenwirkungen von Medikamenten Verursacher einer Ataxie. Dazu gehören beispielsweise Antiepileptika, Chemotherapeutika und Antidepressiva.

Ataxien können paraneoplastische Phänomene sein. Typisch hierfür ist eine Progredienz innerhalb von wenigen Monaten. Meist liegen ein Brust-, Ovarial-, kleinzelliges Lungenkarzinom oder ein Hodgkin-Lymphom zugrunde. Im Blut lassen sich oft antineuronale Antikörper wie z.B. Anti-Hu, Anti-Yo, Anti-Ri nachweisen.

Ebenso kann eine Ataxie durch Vitaminmangel ausgelöst werden. Der Bekannteste ist der Vitamin B₁₂-Mangel, die funikuläre Myelose. Diese führt zu einer Degeneration der Hinter- und Pyramidenbahnseitenstränge des Rückenmarks mit peripherer Neuropathie. Es entwickeln sich meist pathologische Reflexe, Dysästhesien und eine Paraparese der Beine mit sensibler Ataxie.

Außerdem können auch Morbus (M.) Whipple, strukturelle Läsionen, Malformationen oder endokrine Störungen wie z.B. Hypothyreoidismus Ataxien verursachen (Poeck und Hacke, 2001; Masuhr und Neumann, 2005; Brusse et al., 2007).

1.1.2. Idiopathische Ataxien

Multisystematrophie (MSA) ist der häufigste Grund idiopathischer Ataxien. Autonome Regulationsstörungen, Parkinson-Syndrom, cerebelläre Ataxie und Pyramidenbahnläsionen sind Charakteristika der MSA. Es gibt eine parkinsonistische und eine cerebelläre Verlaufsform. Bei beiden Formen sind autonome Störungen wie orthostatische Hypotonie und Harninkontinenz vorhanden. Bei vorherrschender cerebellärer Symptomatik dominieren

Stand- und Gangataxie, Dysarthrie und okulomotorische Störungen. Akinesie, Rigor, Intentionstremor und Dystonie sind bei der parkinsonistischen Verlaufsform führend. MSA beginnt meist im sechsten Lebensjahrzehnt und ist rasch progredient. Die Diagnose wird anhand der typischen Symptomatik und Ausschlusskriterien, wie z.B. positive Familienanamnese für Ataxien, endokrine Störungen wie z.B. Hypothyreoidismus, metabolische Ursachen oder mentale Störungen, gestellt. In der Magnetresonanztomographie (MRT) ist eine unspezifische Atrophie von Pons, Oliven, Cerebellum und Putamen erkennbar. Histopathologisch sind gliale, cytoplasmatische Einschlusskörperchen, die α -Synuclein enthalten, vorhanden. Aus diesem Grund zählt MSA zu den α -Synucleinopathien. Die Überlebenszeit bei MSA beträgt im Mittel sechs bis neun Jahre. Bisher sind keine Therapien bekannt (Wenning et al., 2004; Masuhr und Neumann, 2005).

1.1.3. Mitochondriale Ataxien

Mitochondriopathien sind maternal vererbte Multisystemstörungen, bei denen Ataxien zum Krankheitsbild gehören, aber selten das Leitsymptom sind. Die bekanntesten Mitochondriopathien sind MERRF, MELAS und das Kearns-Sayre-Syndrom.

MERRF ist die Abkürzung für *myoclonic epilepsy with ragged red fibers*. Neben der namensgebenden Epilepsie kommen auch Myopathien, Ataxie, Demenz, Schwerhörigkeit und chronisch progrediente externe Ophthalmoplegie vor. In der Muskelbiopsie findet man mit Hilfe einer Spezialfärbung vergrößerte und vermehrte Mitochondrien, die als „ragged red fibers“ beschrieben werden.

MELAS steht für *mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactat acidosis, stroke like episodes*. Symptome sind Muskelschwäche, Epilepsie, Demenz und rezidivierende Schlaganfälle. Bei der Bestimmung von klinisch-chemischen Parametern fällt eine Laktatazidose auf.

Charakteristisch für das Kearns-Sayre-Syndrom sind progressive externe Ophthalmoplegie, Pigmentdegeneration der Retina, Ataxie und kardiale Reizleitungsstörungen (Poeck und Hacke, 2001; Brusse et al., 2007).

1.1.4. X-chromosomale Ataxien

Das Fragile-X-Tremor-Ataxie-Syndrom (FXTAS) ist eine mögliche Ursache für X-chromosomal vererbte Ataxien. FXTAS wird durch eine sogenannte „Prämutation“ im

F(ragile X)M(ental)R(etardation)I-Gen verursacht. Das Vorliegen einer „Vollmutation“ im *FMRI*-Gen geht mit dem klinischen Bild des Fragilen-X-Syndroms einher. Bei der Prämutation findet man eine C(ytosin)G(uanin)G-Trinukleotid-Expansion mit 55-200 Wiederholungen im 5' untranslatierten Bereich (UTR) des *FMRI*-Gens. Patienten mit FXTAS entwickeln meist nach dem 50. Lebensjahr neben Gangataxie und Intentionstremor auch eine autonome Dysfunktion und kognitive Störungen wie beispielsweise Gedächtnisverlust (Brussino et al., 2005).

1.1.5. Autosomal rezessive Ataxien

Autosomal rezessive Ataxien und autosomal rezessiv vererbte metabolische Störungen, die eine Ataxie auslösen können, sind eine sehr heterogene Gruppe an neurodegenerativen Erkrankungen. Friedreich-Ataxie (FRDA) und Ataxie Teleangiektasie (AT) sind die häufigsten autosomal rezessiven Ataxien.

FRDA wird meist durch eine GA(denin)A-Trinukleotid-Expansion im ersten Intron des *FRDA*-Gens verursacht. Man findet zwischen 90-1300 GAA-Wiederholungen, wobei die Anzahl der Wiederholungen mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Manchmal können auch Punktmutationen oder Deletionen eine FRDA auslösen. Charakteristisch für FRDA sind eine progressive Ataxie, Dysarthrie, fehlende tiefe Sehnenreflexe, Pyramidenbahnzeichen und Sensibilitätsstörungen. Auch ein Hohlfuß, distale Muskelatrophie und Skoliose werden bei FRDA häufig beobachtet. Außerdem können weitere Symptome wie Taubheit, Optikusatrophie, Diabetes und Kardiomyopathie vorliegen. Typisch ist der Erkrankungsbeginn vor dem 25. Lebensjahr, es existiert aber auch eine später beginnende Verlaufsform, bei der die Patienten meist noch erhaltene Sehnenreflexe haben und keine Kardiomyopathie entwickeln. Diese Verlaufsform ist milder und mit einer geringeren Anzahl an GAA-Wiederholungen oder mit einer Kombination von moderater Expansion auf dem einen Allel und einer Punktmutation auf dem anderen Allel verbunden (Klockgether, 2000; Di Donato et al., 2001; Brusse et al., 2007).

AT kann durch viele verschiedene Mutationen im *A(taxia)T(eleangiectasia)M(utated)*-Gen ausgelöst werden. Neben den namensgebenden Teleangiektasien und der progredienten Ataxie sind okulomotorische Bewegungsstörungen, Choreoathetose und Dystonie typisch. Charakteristisch sind auch ein Immundefizit und die erhöhte Neigung zu malignen Tumoren. Kennzeichnend ist das erhöhte α -Fetoprotein (α FP) im Serum (Di Donato et al., 2001; Wallesch, 2005; Brusse et al., 2007).

Andere autosomal rezessive Ataxien sind: Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 1 und 2 und Ataxie mit isoliertem Vitamin-E-Defizit (Di Donato et al., 2001; Brusse et al., 2007).

Zu den autosomal rezessiv vererbten metabolischen Erkrankungen, die eine Ataxie verursachen können, gehört M. Wilson. Bei dieser Erkrankung ist der Kupfermetabolismus gestört und daraus resultiert eine abnorme Kupfereinlagerung in viele Organe. Dies führt u.a. zu Leberschäden und neurologischen Zeichen, wie z.B. Dysarthrie, Ataxie und extrapyramidalen Störungen, und im Spätstadium zu psychiatrischen Störungen. Der Kayser-Fleischer-Kornealring ist pathognomonisch. (Poeck und Hacke, 2001; Kitzberger et al., 2005)

1.1.6. Autosomal dominante Ataxien

Die autosomal dominanten cerebellären Ataxien (ADCA) unterteilte Anita Harding 1983 weiter in drei Hauptgruppen:

ADCAI: Cerebelläre Ataxie mit zusätzlichen nicht cerebellären Symptomen

ADCAII: Cerebelläre Ataxie mit pigmentärer Retinadegeneration

ADCAIII: Rein cerebelläre Ataxie

Durch das humane Genomprojekt wurde die genetische Identifizierung diverser Ataxien möglich, so dass die Klassifikation nach Harding durch eine molekulargenetische Einteilung ersetzt wurde. Zu den autosomal dominanten Ataxien gehören die spinocerebellären Ataxien (SCA), die episodischen Ataxien (EA) und die Dentatorubrale-Pallidolysiale Atrophie (DRPLA).

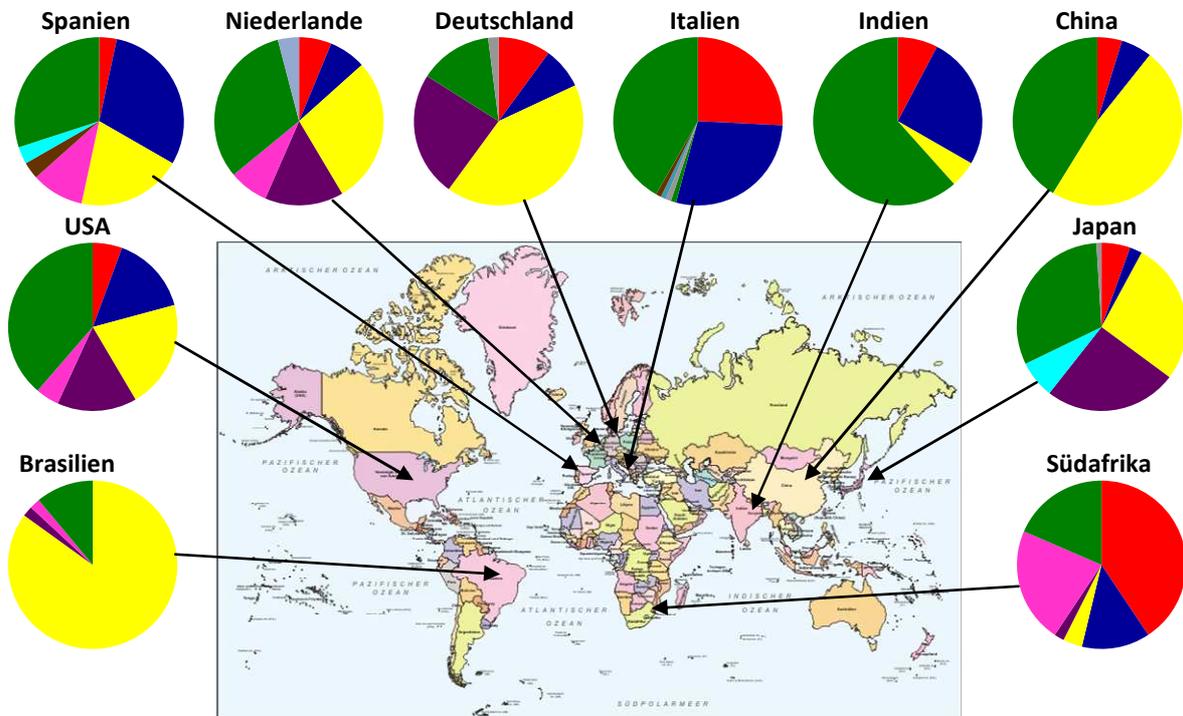
Bei den EA unterscheidet man sechs Formen, wobei EA1 und EA2 am häufigsten vorkommen. Charakteristisch für EA1 sind kurz anhaltende, aber häufige (>15min, bis zu 15x/d) Ataxie-Attacken, die bewegungsinduziert sind. Die Episoden sind meist von Tremor, Muskelkrämpfen und Versteifung der Extremitäten begleitet. Interiktal treten oft Myokymien des Gesichts, der Arme und der Beine auf. EA1 wird durch eine Mutation in einem Kaliumkanal ausgelöst. Die EA2 ist gekennzeichnet durch länger anhaltende Attacken, die bis zu Tagen andauern können und nicht bewegungsinduziert sind. Diese sind oft mit Übelkeit, migräneartigen Kopfschmerzen und (Hemi-)Paresen assoziiert. Es können sich auch permanente Symptome wie Nystagmus und Ataxie entwickeln. Punktmutationen in einem Calciumkanal verursachen EA2 (Brusse et al., 2007).

Die DRPLA ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die durch eine CAG-Expansion im *Atrophin-1*-Gen ausgelöst wird. Die Repeat-Länge korreliert invers mit dem Beginn der Erkrankung. Bei frühem Beginn der Symptome (<20 Jahre) sind eine progrediente cerebelläre Ataxie sowie eine Myoklonusepilepsie Leitsymptome; wenn die Erkrankung nach dem 20. Lebensjahr beginnt, sind Choreaathetose, Psychose und Demenz führend. Die Prävalenz der DRPLA ist regional sehr variabel. In Europa tritt diese Erkrankung nur sehr selten auf, in Japan dagegen ist DRPLA mit 7,3 Prozent die dritthäufigste ADCA (Schöls et al., 2004).

1.2. Spinocerebelläre Ataxien (SCA)

Innerhalb der autosomal dominant vererbten Ataxien bilden die SCA die größte Gruppe. Die unterschiedlichen SCA-Typen sind genetisch sehr heterogen und wurden nach ihrer Beschreibung beziehungsweise (bzw.) nach Kopplungsanalysen in einzelnen Familien mit SCA1-30 benannt. Bei 18 der verschiedenen SCA-Typen sind die involvierten Gene und zugrunde liegenden Mutationen bereits identifiziert. Charakteristische klinische Zeichen sind eine progrediente Ataxie in Kombination mit Dysarthrie und Augenbewegungsstörungen sowie variable andere neurologische Symptome (van de Warrenburg et al., 2002.) Man nimmt an, dass die Prävalenz für SCA zwischen 3/100 000 (van de Warrenburg et al., 2002) und 8/100 000 liegt (Craig et al., 2004). Die Häufigkeiten der verschiedenen Subtypen unterscheiden sich zwischen ethnischen Bevölkerungsgruppen. Gründereffekte tragen zu diesen regionalen Abweichungen bei (Bird, 1998 updated 2010). Die nachfolgende Abbildung stellt die unterschiedlichen Häufigkeiten in einzelnen Ländern dar.

A



B

Weltweite Häufigkeitsverteilung

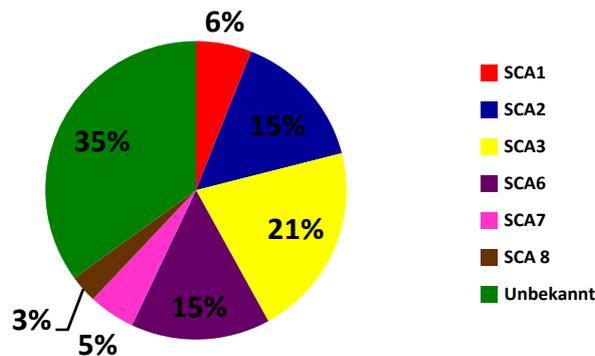


Abbildung 1A: Weltweite Verteilung der SCA-Subtypen (Grafik nach Schöls et al., 2004; Weltkarte nach www.mapsofworld.com; Bird, 1998 updated 2008; Moseley et al., 1998; Saleem et al, 2000; Tang et al, 2000; Maruyama et al., 2002; Silveira et al, 2002; van de Warrenburg et al., 2002; Bryer et al., 2003; Brusco et al., 2004; Schöls et al., 2004; Infante et al, 2005)

Abbildung 1B: Zusammenfassung der weltweiten Verteilung der häufigsten SCA-Subtypen (Schöls et al., 2004)

Es gibt verschiedene genetische Ursachen für die einzelnen SCA-Subtypen. Am häufigsten kommen Repeat-Expansionen im codierenden Bereich vor. Daneben können noch Deletionen oder Punktmutationen vorliegen (Bird, 1998 updated 2010; Schöls et al., 2004). Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die einzelnen SCA-Subtypen und nennt den zugehörigen Mutationsmechanismus, wenn er bekannt ist.

Tabelle 1: Übersicht über die SCA-Typen

SCA	Gen	Chromosomale Lokalisation	Protein	Mutationsart
1	<i>ATXN1</i>	6p23	Ataxin-1	CAG-Repeat
2	<i>ATXN2</i>	12q24	Ataxin-2	CAG-Repeat
3	<i>ATXN3</i>	14q24.3-q31	Ataxin-3	CAG-Repeat
4	<i>SCA4</i>	16q22.1	---	---
5	<i>SPTBN2</i>	11p13	Spectrin β Kette, Brain 2	Deletion, Punktmutation
6	<i>CACNA1a</i>	19p13	Spannungsabhängiger P/Q-Typ Calcium Kanal α 1A Untereinheit	CAG-Repeat
7	<i>ATXN7</i>	3p21.1-p12	Ataxin-7	CAG-Repeat
8	<i>KLHL1AS</i>	13q21	Kelch like 1	CTG-Repeat
9	---	---	---	---
10	<i>ATXN10</i>	22q13	Ataxin-10	ATTCT-Repeat
11	<i>TTBK2</i>	15q14-q15.3	Tau-Tubulin-Kinase 2	Insertion, Deletion
12	<i>PPP2R2B</i>	5q31-q33	Serin/Threonin Protein Phosphatase 2a Untereinheit B β -Isoform	CAG-Repeat
13	<i>KCNC3</i>	19q13.3-q13.4	Spannungsabhängiger Kalium Kanal Subfamilie C Typ 3	Punktmutation
14	<i>PRKCG</i>	19q3.4	Proteinkinase C γ	Punktmutation
15*	<i>ITPR1</i>	3p26-p25	Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptor Typ 1	Deletion
16*	<i>ITPR1</i>	3p26.1	Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptor Typ 1	Deletion

17	<i>TBP</i>	6q27	TATA-Box Bindungsprotein	CAG-Repeat
18	<i>SCA18</i>	7q22-q32	---	---
19	<i>SCA19</i>	1p21-q21	---	---
20	<i>SCA20</i>	11p13-q11	---	---
21	<i>SCA21</i>	7p21-p15.1	---	---
22	<i>SCA22</i>	1p21-q21	---	---
23	<i>SCA23</i>	20p12.3-p13	Prodynorphin	Punktmutation
25	<i>SCA25</i>	2p21-p13	---	---
26	<i>SCA26</i>	19p13.3	---	---
27	<i>FGF14</i>	13q34	Fibroblasten Wachstumsfaktor 14	Punktmutation
28	<i>AFG3L2</i>	18p11.22-q11.2	Mitochondriale Protease	Punktmutation
30	<i>SCA30</i>	4q34.3-q35.1	---	---
16q22-linked	<i>PLEKHG4</i>	16q22	Puratrophin-1	Punktmutation

*SCA15/SCA16 ist ein identisches Krankheitsbild (Gardner, 2008) (Bird, 1998 updated 2008; Duenas et al., 2006; Houlden et al., 2007; Iwaki et al., 2008; Storey et al., 2009; Mariotti et al., 2008; Maltecca et al., 2009; Bakalkin et al., 2010)

1.2.1. Repeat-Expansionsmechanismus im codierenden Bereich

Bei sechs SCA-Subtypen (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17) liegen CAG-Repeat-Expansionen im codierenden Bereich vor. Die Expansionen führen zu einem pathologisch verlängerten Polyglutaminabschnitt im entsprechenden Protein. Dabei korrelieren der Krankheitsbeginn invers und die –ausprägung positiv mit der Länge der Repeats. Die Repeats verhalten sich genetisch instabil und können sowohl bei paternaler als auch bei maternaler Transmission verlängert werden, wobei es bei SCA1, SCA2 und SCA7 durch paternale Vererbung häufiger zu einer Repeat-Verlängerung kommt (van de Warrenburg et al, 2002; Schöls et al., 2004; Infante et al., 2005). Dies führt dazu, dass bei der nachfolgenden Generation der Schweregrad höher und die Manifestation früher ist. Dieses Phänomen nennt man Anticipation (van de Warrenburg et al., 2002, Saleem et al., 2000).

Typisch für SCA-Typen sind eine progressive Neurodegeneration in bestimmten Arealen des Gehirns und Proteinaggregate, die Polyglutaminketten enthalten und charakteristische nukleäre oder cytoplasmatische Einschlüsse bilden (Duenas et al, 2006; Zoghbi und Orr, 2000).

Die Phänotypen dieser Erkrankungen sind sehr variabel und überlappen sich teilweise. Es gibt Symptome, die helfen können, die verschiedenen SCA zu unterscheiden. SCA1 zeigt ein sehr variables Erkrankungsbild. Kennzeichnend sind verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeiten im peripheren Nervensystem oder zentralen motorischen Nervensystem bei motorisch evozierten Potenzialen und Pyramidenbahnzeichen (Schöls et al., 2004; Schmitz-Hübsch et al., 2008). Typisch für SCA2 sind verlangsamte Sakkaden, Hypo- oder Areflexie, Myoklonien oder Tremor (Schöls et al., 1997; Zoghbi und Orr, 2000; Infante et al, 2005). Selten auftretend aber charakteristisch für SCA3 sind Pseudoexophthalmus durch Lidretraktion, faciolinguale Faszikulationen, Dystonien und Rigor (Schöls et al, 1996; Zoghbi und Orr, 2000). Außerdem sind periphere Neuropathien bei spätem und Spastik bei frühem Erkrankungsbeginn kennzeichnend (Schöls et al., 1996; Schöls et al., 1997). SCA6 wird auch oft als rein cerebelläre Ataxie bezeichnet, da die Begleitsymptome meist weniger stark ausgeprägt sind als bei anderen SCA-Formen und die Erkrankung später beginnt (Schöls et al., 1998; Schmitz-Hübsch et al., 2008). Kennzeichen der SCA7 ist eine Makuladegeneration, die häufig bis zur Erblindung führt (Schöls et al., 2004).

1.2.2. Repeat-Expansionsmechanismus im nicht-codierenden Bereich

Die molekularen Mechanismen von SCA8, SCA10 und SCA12 sind ebenfalls Repeat-Expansionen, jedoch im nicht-codierenden Bereich der jeweiligen Gene. Eine CT(hymin)G-Repeat-Expansion, die in einer nicht translatierten Region liegt, ist mit SCA8 assoziiert. SCA10, die bisher nur bei wenigen mexikanischen Familien diagnostiziert wurde, wird durch eine ATTCT-Repeat-Expansion im Intron eines Gens unbekannter Funktion verursacht. Bei SCA12 wurde eine CAG-Repeat-Expansion in dem 5'UTR-Bereich des *Proteinphosphatase-2-regulatory-subunit-B (PPP2R2B)*-Gens gefunden (Schöls et al., 2004).

1.2.3. Punktmutationen als Ursache einer SCA

In jüngerer Zeit wurden in Kandidatengenomen von SCA-Familien Punktmutationen identifiziert, die als molekulare Ursache der Erkrankung in den jeweiligen Familien anzusehen sind. Zu diesen SCA-Typen gehören SCA13, SCA14, SCA27, SCA28 und die 16q22-linked SCA (Duenas et al, 2006).

Auch kleinere und größere Deletionen können Ursache einer SCA sein. Ein Beispiel hierfür ist SCA11 (Houlden et al, 2007).

1.3. SCA14

Yamashita und Mitarbeiter entdeckten 2000 in einer japanischen Ataxie-Familie, bei der zuvor bekannte SCA-Loci ausgeschlossen worden waren, einen neuen Genlocus als Ursache für die Erkrankung. Dieser Locus liegt auf dem Chromosom 19q13.4-qter und wurde als SCA14 bezeichnet. Die Symptome in der japanischen Familie hingen vom Erkrankungsbeginn ab. Bei einem frühen Beginn (<28 Jahre) dominierte ein axialer Myoklonus, eine Ataxie trat erst im Verlauf auf. Bei einem späten Beginn (>38 Jahre) war die Ataxie vorherrschend. Die Erkrankung war bei allen Betroffenen nur sehr langsam progredient und nicht lebenslimitierend (Yamashita et al., 2000). 2002 wurde bei einer amerikanischen 4-Generationen-Familie englischen und holländischen Ursprungs eine SCA mit rein cerebellären Symptomen diagnostiziert. Eine Kopplungsanalyse ergab ebenfalls Assoziation mit der Region 19q13.4-qter (Brkanac et al., 2002). Chen und Mitarbeiter stellten 2003 fest, dass Mutationen im *Proteinkinase Cy Gen (PRKCG)* bei dieser amerikanischen Familie und bei anderen untersuchten Patienten für die Symptome verantwortlich sind (Chen et al., 2003). Auch bei der japanischen Familie konnte eine Mutation im *PRKCG*-Gen festgestellt werden. Daraus folgte man, dass Mutationen im *PRKCG*-Gen SCA14 verursachen (Yabe et al., 2003).

1.3.1. Klinischer Phänotyp der SCA14

Der Erkrankungsbeginn bei SCA14 ist variabel und beginnt typischerweise zwischen dem dritten und dem vierten Lebensjahrzehnt. In Einzelfällen sind erste Symptome auch vor dem zehnten oder nach dem 60. Lebensjahr aufgetreten (Hiramoto et al., 2006; Vlak et al., 2006). Homozygotie ist mit einem schwereren Krankheitsbild verknüpft (Asai et al., 2009).

Die Lebenszeit von Betroffenen ist nicht verkürzt und führt auch nur selten zu schwer beeinträchtigenden körperlichen Behinderungen wie die Bindung an einen Rollstuhl (Chen et al., 2005; Klebe et al., 2005). Jedoch ist die Schwere der Erkrankung variabel, oft sogar innerhalb einer Familie. Insgesamt ist das Krankheitsbild im Vergleich zu den anderen SCA-Typen eher moderat.

Als erstes Symptom fällt meist eine Gang- und Gleichgewichtsstörung auf (Alonso et al., 2005; Fahey et al., 2005). Im Verlauf sind Ataxie, vor allem (v.a.) Gang- und/oder Standataxie, und Dysarthrie typisch (Chen et al., 2005). Häufig sind ebenfalls abnorme Augenbewegungen zu finden. Hierzu gehören Nystagmus, verlangsamte Sakkaden, okuläre

Dysmetrie und sakkadische Augenfolgebewegungen (van de Warrenburg et al., 2003; Fahey et al., 2005). Auch Schreibkrämpfe und Dysphagie können vorkommen (van de Warrenburg, 2003; Stevanin et al., 2004). SCA14 wird häufig als rein cerebelläre Ataxie bezeichnet, da die bisher genannten Zeichen oft die einzigen Symptome sind (Hiramoto et al., 2006).

Zusätzlich können auch ein haltungsbedingter Tremor, fokale Dystonien oder parkinsonähnliche Symptome wie z.B. Rigidität vorhanden sein (van de Warrenburg, 2003; Klebe et al., 2005; Verbeek et al., 2005a). Als Unterscheidungsmerkmal zu anderen SCA können Muskelzuckungen, das heißt (d.h.) faciale Myokymien, Myorhythmien oder Myokloni, dienen, die aber nur selten auftreten (Klebe et al., 2005; Vlak et al., 2006; Wieczorek et al., 2007). Bei der ersten Familie, in der SCA14 diagnostiziert wurde, wurde ein axialer Myoklonus beobachtet (Yamashita et al., 2000). Bei anderen Personen fielen Myokloni auf, die multifokal oder nur an den Extremitäten auftraten (Verbeek et al., 2005a; Vlak et al., 2006; Visser et al., 2007).

Bei einigen Patienten findet sich auch eine periphere Neuropathie. Typisch hierfür sind vermindertes Vibrations- oder Schmerzempfinden (van de Warrenburg et al., 2003; Fahey et al., 2005). Außerdem kann das Reflexverhalten verändert sein (van de Warrenburg et al., 2003; Klebe et al., 2005; Verbeek et al., 2005a). Zusätzlich können Zeichen einer Pyramidenbahnschädigung wie ein positiver Babinski-Reflex vorliegen (Klebe et al., 2005).

Bei SCA14 zeigen sich oft Depressionen oder eine exekutive Dysfunktion, d.h. die herabgesetzte Fähigkeit komplexen Handelns. Beispiele hierfür sind Aufmerksamkeitsdefizite oder Schwierigkeiten beim abstrakten Denken (Stevanin et al., 2004; Chen et al., 2005; Klebe et al., 2005).

Im MRT stellt sich eine Atrophie des Kleinhirns, insbesondere des Vermis, dar. Manchmal sind auch die Pons und der cerebrale Kortex betroffen (Alonso et al. 2005; Klebe et al., 2005).

1.3.2. Mutationen im *PRKCG*-Gen

Das *PRKCG*-Gen, das für die Proteinkinase C γ (PKC γ) codiert, liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 19 in der Bande q13.4. Es besteht aus circa (ca.) 24.400 Basenpaaren (Bp) und beinhaltet 18 Exone, deren Größe von 32 bis 452 Bp variieren (Kofler et al., 2002; www.ensemble.org). Bisher sind 20 Punktmutationen und zwei Deletionen bekannt, wobei die meisten Mutationen davon in Exon 4 lokalisiert sind.

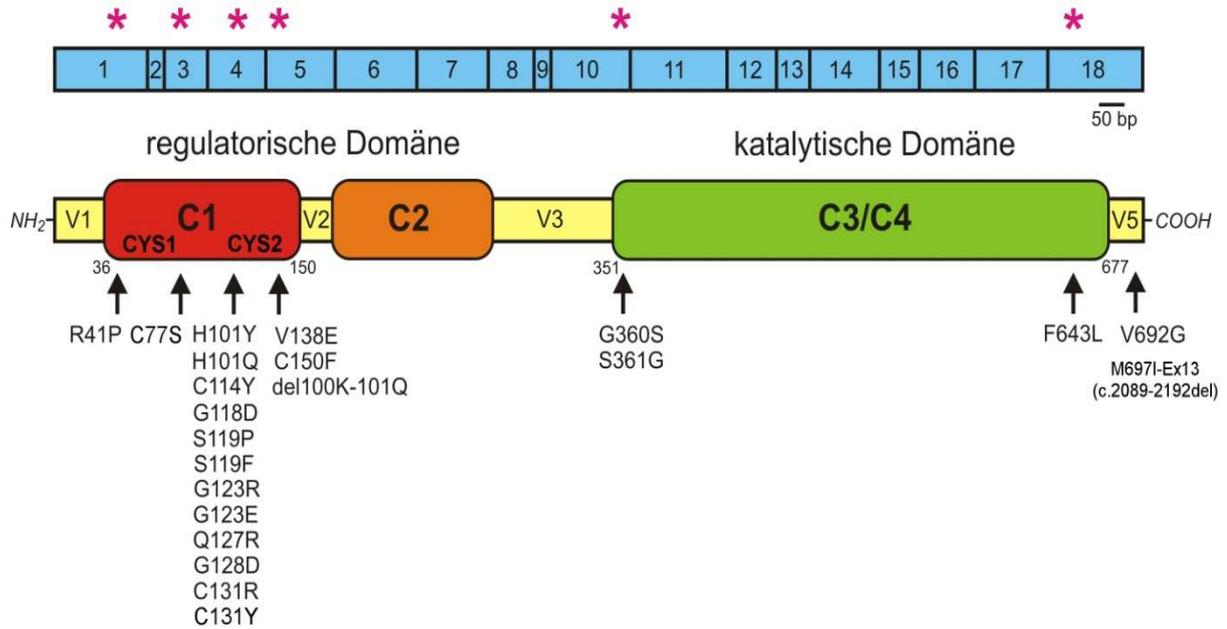


Abbildung 2: Oben: Exonstruktur des *PRKCG*-Gens, wobei die Exone, die Mutationen enthalten, mit einem Sternchen markiert sind.

Unten: Proteinstruktur der PKC γ mit ihren vier Domänen zu sehen. Die verschiedenen Mutationen sind mit einem Pfeil markiert. (Grafik nach Landendinger et al., 2007)

Nachfolgend sind die einzelnen Mutationen in einer Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 2: SCA14 Mutationen im *PRKCG*-Gen

Basenaustausch	Exon	Mutation	Autor
G>C	1	R41P	Chen et al., 2005
T>A	3	C77S	Wieczorek et al., 2007
C>T	4	H101Y	Chen et al., 2003
C>G	4	H101Q	Alonso et al., 2005
----	4	Del100K-101H	Chen et al., 2005
G>A	4	C114Y	Klebe et al., 2005
G>A	4	G118D	Van de Warrenburg et al., 2003
T>C	4	S119P	Chen et al., 2003
C>T	4	S119F	Hiramoto et al., 2006
G>A	4	G123E	Klebe et al., 2005
G>A	4	G123R	Klebe et al., 2005
A>G	4	Q127R	Yabe et al., 2003
G>A	4	G128D	Chen et al., 2003
T>C	4	C131R	Dalski et al., 2006
G>A	4	C131Y	Klebe et al., 2007
T>A	5	V138E	Vlak et al., 2006
GC>TT	5	C150F	Fahey et al., 2005
G>C	10	G360S	Klebe et al., 2005
A>G	10	S361G	Chen et al., 2005
T>C	18	F643L	Stevanin et al., 2004
T>C	18	V692G	Klebe et al., 2005
----	18	M697I-Ex13 (c.2089-2192del)	Asai et al., 2009

1.3.3. Proteinstruktur der Proteinkinase C γ (PKC γ)

Die Proteinkinase C (PKC) gehört zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Es lassen sich verschiedene Isoenzyme unterscheiden, die sich anhand der Struktur, der Gewebeverteilung, der enzymatischen Eigenschaften und der intrazellulären Lokalisation unterscheiden. PKC γ wird nur im zentralen Nervensystem exprimiert, v.a. in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns und den Pyramidenzellen des Hippocampus. Intrazellulär ist sie meist im Cytoplasma oder in

der Nähe der Zellmembran, insbesondere postsynaptisch, lokalisiert (Hug und Sarre, 1993; Tanaka und Nishizuka, 1994).

PKC γ besteht aus vier konservierten (C1-C4) und fünf variablen Domänen (V1-V5). V3 unterteilt das Enzym in eine aminoterminal regulatorische und eine carboxyterminale katalytische Region.

Die regulatorische Domäne besteht aus zwei hoch konservierten Untereinheiten C1 und C2, die für die Aktivierung notwendig sind, und dem Pseudosubstrat, das aminoterminal liegt und als kompetitiver Autoinhibitor wirkt. Die C1-Domäne enthält zwei cysteinreiche Regionen (Cys1 und Cys2). Diese interagieren mit zwei Zinkionen, die die C1-Domäne stabilisieren, und ermöglichen so Bindungen von Diacylglycerol (DAG) und Phorbol ester. Dies führt nicht zu einer Konformationsänderung, sondern zu einer Veränderung der Oberflächenverhältnisse hin zu einer hydrophoben Oberfläche und ermöglicht in Anwesenheit von Phosphatidylserin (PS) die Interaktion mit der Membran. Die C2-Region enthält multiple Aspartat-Reste, die Calcium (Ca^{2+})-Ionen koordinieren. Diese Ionen regulieren die C2-Domänen-Funktion als Membrananker, da sie die Affinität dieser Region für anionische Membranen erhöhen. Sowohl die C1- als auch die C2-Domäne sind unabhängig voneinander in die Bindung von PKC γ an die Membran involviert. Jedoch ist die Bindung von beiden Regionen notwendig, damit das Enzym durch Abgabe des Pseudosubstrates aus dem aktiven Zentrum aktiviert wird.

C3 und C4 sind die konservierten Domänen der katalytischen Einheit, in denen die Phosphorylierung stattfindet. Für die Adenosintriphosphat (ATP)-Bindung ist die C3-Region verantwortlich. Die C4-Domäne besteht aus einer Phosphattransferregion, in der Aspartat für die Übertragung der Phosphatgruppe verantwortlich zu sein scheint, und der Substratbindungsstelle. Außerdem befindet sich in der Kinase-Domäne noch der „Activation Loop“. Dieser wird durch eine Kinase phosphoryliert und ist für die Reifung des Enzyms sowie die Stabilisierung in seiner aktiven Form essentiell.

In der nachfolgenden V5-Region befinden sich zwei weitere Stellen, die für die Reifung und Aktivierung von PKC γ wichtig sind: das „Turn Motif“ und das „Hydrophobic Motif“. Diese beiden werden nach der Phosphorylierung des „Activation Loops“ autophosphoryliert. Das „Turn Motif“ ist für eine suffiziente Funktion von PKC γ wichtig und das „Hydrophobic Motif“ spielt eine Rolle bei der Strukturierung der katalytischen Tasche, beeinflusst die thermische Stabilität und setzt die Anfälligkeit des Enzyms für Phosphatasen und Proteasen herab (Hug und Sarre, 1993; Newton, 2001; Steinberg, 2008).

1.3.4. Tiermodelle

PKC γ ist in eine Vielfalt von zellulären Prozessen involviert, insbesondere bei der Signaltransduktion. Dies geschieht durch Modulation von Ionenkanälen und Rezeptoren sowie durch Regulation des Neurotransmitterausstoßes.

Ein Beispiel hierfür ist die Modulation der synaptischen Plastizität, d.h. die Veränderung der Eigenschaften von Synapsen oder Nervenzellen in Abhängigkeit von der Verwendung. Dies ist die zelluläre Grundlage von Lernen und Gedächtnis. *Long term potentiation* (LTP) und *long term depression* (LTD) sind Formen der synaptischen Plastizität, die beide durch PKC γ beeinflusst werden (Tanaka und Nishizuka, 1994; Saito und Shirai, 2002).

Bei LTP, der langandauernden Verstärkung der synaptischen Transmission, ist PKC γ für die Induktion notwendig. PKC γ -Knockout-Mäuse zeigen veränderte hippocampale LTP-Eigenschaften. Sie können dennoch Tätigkeiten ausführen, die räumliches und kontextabhängiges Lernen voraussetzen. Sie zeigen dabei jedoch milde bis moderate Defizite (Abeliovich und al., 1993; Saito und Shirai, 2002).

LTD ist die dauerhafte Abschwächung der synaptischen Übertragung. Auch die Induktion dieses Prozesses wird durch PKC γ beeinflusst, denn durch PKC-Inhibitoren wird LTD blockiert. Bei PKC γ -defizienten Mäusen ist LTD zwar induzierbar, dennoch zeigen sie eine beeinträchtigte motorische Koordination. Bei den mutanten Mäusen sind die morphologisch unauffälligen und normal differenzierten Purkinje-Zellen mit multiplen Kletterfasern innerviert. Diese werden bei Wildtyp (WT)-Mäusen in den ersten Lebenswochen eliminiert und es entsteht eine eins-zu-eins Innervation. In Abschnitten dieses Ablaufprozesses ist PKC γ involviert und man nimmt an, dass die persistierende multiple Innervation von Kletterfasern bei erwachsenen PKC γ -defizienten Mäusen für die motorische Koordinationsstörung verantwortlich ist (Chen et al., 1995; Kano et al., 1995).

PKC γ beeinflusst außerdem auch die Entwicklung der dendritischen Bäume der Purkinje-Zellen. PKC γ -defiziente Mäuse zeigen ein vermehrtes Wachstum der Dendriten-Stämme und eine höhere Anzahl an Verzweigungen. PKC γ ist also ein negativer Regulator des dendritischen Wachstums in Purkinje-Zellen (Schrenk et al., 2002).

Weiterhin ist PKC γ durch Modulation des spinalen μ -Opioidrezeptors an der Verarbeitung von Schmerzen beteiligt. Bei PKC γ -Knockout-Mäusen wurde eine Hochregulation dieses Rezeptors, der Analgesie und Antinociception vermittelt, festgestellt. D.h., dass PKC γ einen negativen Einfluss auf das spinale μ -Opioid System hat (Narita et al., 2001).

Zudem scheint PKC γ entscheidend für die Entwicklung von neuropathischen Schmerzen zu sein, denn Mäuse, denen PKC γ fehlt, entwickeln zwar eine normale Schmerzantwort auf akute Stimuli, aber kein neuropathisches Schmerzsyndrom nach partieller Nervensektion (Malmberg et al., 1997).

Durch PKC γ wird die Sensitivität für Ethanol vermindert, zum Teil durch Veränderung der Aktivität des γ -Aminobuttersäure Typ A-Rezeptors. Bei mutanten Mäusen, denen PKC γ fehlt, wurden bei Ethanol-Einfluss eine geringere Hypothermieneigung und ein geringerer Verlust des Stellreflexes als bei WT-Mäusen gefunden (Harris et al., 1995).

Außerdem zeigen Ratten, die die *agu*-Mutation, eine Spontanmutation, tragen, ein Parkinson-ähnliches Syndrom mit Bewegungsstörungen. Bei diesen Ratten scheint ein vorzeitiges Stoppcodon im *PRKCG*-Gen, das zu einer starken Reduzierung der Synthese der katalytischen Domäne von PKC γ führt, für die Symptome verantwortlich zu sein (Craig et al., 2001).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ausgangspunkt für diese Arbeit war die Fragestellung, ob Mutationen im *PRKCG*-Gen auch bei der Ätiopathogenese von deutschen ADCA Patienten eine Rolle spielen. Anschließend stellte sich die Frage, welche klinischen Charakteristika die betroffenen Personen aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vorauswahl getroffen. Die ausgewählten Ataxie-Patienten hatten alle eine gesicherte Familienanamnese, die auf einen autosomal dominanten Erbgang hinwies. Außerdem zeigte ihre Erkrankung einen langsam progredienten Verlauf. In der Vortestung wurde bei allen Patienten SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 und SCA17 als Krankheitsursache ausgeschlossen.

Bei der 26 Personen umfassenden Studiengruppe wurden im Gegensatz zu anderen Studien alle 18 Exone des *PRKCG*-Gens durch Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung untersucht, um Mutationen in allen Exonen erfassen zu können.

2. Materialien

2.1. Chemikalien

Betain	Sigma, Steinheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Steinheim
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA
Gelagarose L.E.	Inno-Train, Kronberg
Sephadex G 50	Amersham Bioscience, Buckinghamshire; England
Tris (Trishydroxymethylaminoethan) –Puffer 10mM (pH 7,5)	Sigma, Steinheim

2.2. Enzyme und Nukleotide

Desoxynucleotide (dNTPs)	Peqlab, Erlangen
DNA Größenstandard 50 bp ladder	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England
Enzym HaeIII	New England BioLabs, Ipswich, USA
Taq-DNA-Polymerase 1000 U	Qiagen, Hilden

2.3. Kits

ABI Prism Big Dye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
NucleoSpin Blood XL Kit	Macherey und Nagel, Düren
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.4. Lösungen

Größenstandard 50 bp Ladder	4 ml 50 bp ladder 6 ml Ladepuffer 20 ml H ₂ O
Ladepuffer	40% Sucrose (w/v) 1x TBE 0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylen-Zyanol (w/V)
10x NEB2-Puffer (New England BioLabs)	500 mM NaCl 100 mM Tris-HCl 100 mM MgCl ₂ 10 mM Dithiothreitol pH 7.9 (25°C)
1xPBS	0,223 g KCl 1,135 g Na ₂ HPO ₄ 0,204 g KH ₂ PO ₄ 8,18 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O dd
10xPCR-Puffer (Qiagen)	Tris HCl pH 8,7 (20°) KCl (NH ₄) ₂ SO ₄ 15 mM MgCl ₂
pUC-Größen-Standard	pUC verdaut mit DdeI (Bp-Länge: 890/540/420/409/240/166)
10x TBE (Tris-Borat-EDTA)	545 g Tris-Base 278 g Borsäure 200 ml EDTA 0,5M, pH 8,2-8,4 ad 5000 ml H ₂ O dd
1x TBE	250 ml 10x TBE ad 2500 ml H ₂ O dd
Tris-EDTA (TE)-Puffer	10 mM Tris, pH 7,5 1 mM EDTA

2.5. Geräte

Absauggerät	Millipore, Billerica, USA
Analysenwaage:	
PM400	Mettler, Gießen
PG5002-S Delta Range	Mettler, Toledo
Elektrophorese-Kämme:	
10 Taschen	
16 Taschen	
Eiszubereiter AF 80	Scotsman/Frimont, Pogliano, Italien
Gelschlitten (50 ml, 150 ml)	
Horizontale Gelelektrophorese-Kammern:	
Horizon 58 (klein)	Gibro-BRL, Gaithersburg, USA
(groß)	Kreutz, Reiskirchen
Hybaid Brutschrank Shake 'n' Stack	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikrowellenherd	Sharp, Hamburg
Pipetten:	
10 µl	HTL, Warschau, Polen
20 µl	Gilson, Middleton, USA
100 µl	HTL, Warschau, Polen
1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäßständer (Micro Test Tube Rack)	BrandTech Scientific Inc, Essex, UK
Schüttler (Thermomix compact)	Eppendorf, Hamburg
Sofortbildkamera Bio-Print	Kaiser
Spannungsquellen:	
Biometra	Biometra, Göttingen
EC	Apparatus Corporation, S. Petersburg, USA
Thermocycler MJ Research PTC 200	MJ Research, Waltham, USA
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus/Kendro, Hanau
UV-Illuminator Macro Vue UV 25	Hofer, San Francisco, USA
Vortex	Heidolph, Schwabach

Wasserbad	GFL, Burgwedel
Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau

2.6. Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Gefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon Tube (50 ml)	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamubrg
96-Well-Platte (MAHVS N45)	Millipore, Billerica, USA
96-Well-Platte	Sarstedt, Nürnbergrecht
96-Well-Platte (Montage PCR ₉₆ MANU 030)	Millipore, Billerica, USA
24-Well-Platte Thermo Fast 24	Thermo Scientific, Waltham, USA
24-Well-Platte Thermo Fast 24	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.7. Computerprogramme

SeqAnalysis Version 3.7	Applied Biosystems, Foster City, USA
SeqScape Version 2.5	Applied Biosystems, Foster City, USA

3. Methoden

3.1. Desoxyribonukleinsäuren (DNA)–Extraktion

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus den kernhaltigen Zellen des Menschen zu extrahieren. Die DNA der Patienten, die für diese Arbeit eingesetzt wurde, wurde aus EDTA–Blut durch unterschiedliche Verfahren gewonnen: Zum einen wurde der QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen verwendet, zum anderen wurden größere DNA-Mengen mit dem Kit von Macherey und Nagel extrahiert.

3.1.1. DNA–Extraktion mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen

Für das folgende Verfahren wurden die Gefäße und Reagenzien des Herstellers verwendet. Zuerst wurde 20 µl Protease in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Es wurde 200 µl EDTA Blut zugefügt. 200 µl Buffer AL (Lysepuffer) wurde hinzugegeben und die Probe 15 sec auf dem Vortex gut durchmischt. Nach einer Inkubation von 10 min im Wasserbad bei 52°C wurden 200 µl Ethanol (96%) zugefügt und der Ansatz 15 sec gevortext. Anschließend wurde der Ansatz auf einen QIAamp Säulenfilter, der auf einem 2 ml Auffangröhrchen steckte, umgefüllt und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Auffangröhrchen mit dem Eluat wurde verworfen und der Säulenfilter, der die an das Filtermaterial gebundene DNA enthielt, wurde auf ein neues Auffangröhrchen gesetzt. Auf den Säulenfilter wurden 500 µl Buffer AW1 (Waschpuffer 1) gegeben und dieser wiederum 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Auffangröhrchen mit dem Eluat wurde erneut verworfen und der Säulenfilter auf ein neues Auffangröhrchen gesetzt. 500 µl Buffer AW2 (Waschpuffer 2) wurden auf den Säulenfilter pipettiert und dieser 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Mit einer Pipette wurde die überschüssige Flüssigkeit, welche sich noch an dem Rand des Säulenfilters befand, abgezogen und verworfen. Danach wurde der Säulenfilter kurz anzentrifugiert und das Auffangröhrchen mit Filtrat verworfen. Der Säulenfilter wurde auf ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gestellt und 200 µl Buffer AE (Elutionspuffer) auf den Säulenfilter gegeben. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, so dass sich die Patienten–DNA, welche zuvor durch den Filter gebunden wurde, nun im Eluat befand.

3.1.2. DNA-Extraktion mit dem NucleoSpin Blood XL Kit der Firma Macherey und Nagel

Für das Verfahren, das im Folgenden beschrieben wird, wurden die Gefäße und Reagenzien des Herstellers benutzt. Zuerst wurden 5 ml EDTA-Blut und 500 µl Proteinase K mit 5 ml BQ1 Lysis-Puffer in ein 50 ml Falcon Tube gegeben. Nachdem das Gemisch für 10 sec gevortext wurde, wurde es für 25 min bei 56 ° C in einem Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml Ethanol wurde der Ansatz wieder für 10 sec gemischt und auf Eis für 5 min gekühlt. Nun wurde die Probe auf eine Säule, die sich in einem 50 ml Röhrchen befand, gegeben und für 3 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und 7,5 ml Puffer BQ2 auf die Säule gegeben. Diese wurde jetzt 2 min bei 4500 rpm zentrifugiert und das Eluat wiederum verworfen. Danach wurden erneut 7,5 ml Puffer BQ2 auf die Säule gegeben und für 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule auf ein neues Röhrchen gestellt. Es wurden 500 µl BE-Puffer zur Elution der DNA von der Säule zugegeben und das Ganze für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Röhrchen für 2 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde erneut auf die Säule gegeben und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die restliche DNA aus der Säule zu lösen. Nach dem Zentrifugieren für 2 min bei 4500 rpm wurde das Eluat, in dem die Patienten-DNA enthalten war, in ein dafür vorgesehenes Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurde die Konzentration der DNA bestimmt.

3.2. Bestimmung der Konzentration (c) und des Reinheitsgrades der DNA

Man bestimmt die Konzentration (c) der extrahierten DNA einer Lösung photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Aus der Extinktion lässt sich c berechnen: Bei einer optischen Dichte (OD) von 1 bei der Wellenlänge 260 nm ($OD_{260} = 1$) entspricht der DNA-Gehalt einer Lösung 50 µg Doppelstrang (ds) DNA/ml. Dies folgt aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz: Absorption = $A = \varepsilon \times c \times d$, unter der Bedingung, dass die Schichtdicke (d) der Küvette 1 cm und der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 0,02 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right)^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ beträgt.

Den Reinheitsgrad bestimmt man aus dem Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm OD_{260}/OD_{280} . Dieser sollte optimal zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte darunter oder darüber weisen auf Verunreinigungen hin (Ausubel et al., 2003).

3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.3.1. Grundlagen

1984 wurde von Karl Mullis und seinen Mitarbeitern die Methode der PCR entwickelt. Durch diese ist es möglich, Teile einer DNA selektiv zu amplifizieren. Als Ausgangsmaterial dient meist die genomische Gesamt-DNA, von der man für eine PCR nur eine sehr geringe Menge benötigt.

Um eine PCR durchzuführen, benötigt man zwei Oligonukleotid-Primer. Diese sind einzelsträngig, haben eine Länge von 18–25 Nukleotiden und müssen die Zielsequenz flankieren und sind daher der zu amplifizierenden Sequenz komplementär. Zur Bestimmung des optimalen Primers sind folgende Punkte wichtig: Bei der Basenzusammensetzung sollte der GC-Gehalt ungefähr dem AT-Gehalt entsprechen und die Nukleotide sollten gleichmäßig verteilt sein. Des Weiteren sollte sich die Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer um nicht mehr als 5°C unterscheiden. Der T_m -Wert eines Primers berechnet sich nach der Wallace-Regel: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A + T) + 4^\circ\text{C} \times (G + C)$. Wobei A, T, G und C die einzelnen Nukleotide Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin bezeichnen. Außerdem sollten keine komplementären Bereiche zwischen den jeweiligen Primerpaaren auftreten, damit keine Hybridisierung, also keine Dimerbildung, stattfinden kann. Auch sollten die Primer keine längeren Abschnitte einzelner Basen, keine Palindromsequenzen und keine Sekundärstrukturen enthalten.

Weiterhin müssen noch Taq-Polymerase, die zu amplifizierende DNA, Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und Puffer, zugeben werden. Die Taq-Polymerase ist eine hitzestabile DNA-Polymerase, die aus dem Organismus *Thermus aquaticus* (Taq) stammt. Dieses Enzym benötigt für die Verlängerung Mg^{2+} , das im Puffer enthalten ist.

Das Prinzip der PCR ist eine thermozyklische Reaktion, bei der die Menge an „Template“-DNA exponentiell (2^n) zunimmt. Jeder Zyklus besteht aus folgenden Schritten:

1. Denaturierung: Die als Doppelstrang vorliegende „Template“-DNA wird in zwei Einzelstränge denaturiert. Dies erfolgt bei 93–95°C.
2. Primer-Annealing: Es erfolgt die Anlagerung der Primer, von denen die Neusynthese der DNA ausgeht. Diese Phase wird durch die T_m der Primer bestimmt und liegt in der Regel zwischen 50–70°C.

3. DNA-Extension: Ausgehend von den Primern wird die Template-DNA durch die Taq-Polymerase in Anwesenheit von DNA-Nukleotiden komplementär zu einem Doppelstrang ergänzt. Die Synthese erfolgt bei 70-75°C.

In der folgenden Abbildung werden die einzelnen Schritte der PCR noch einmal graphisch dargestellt.

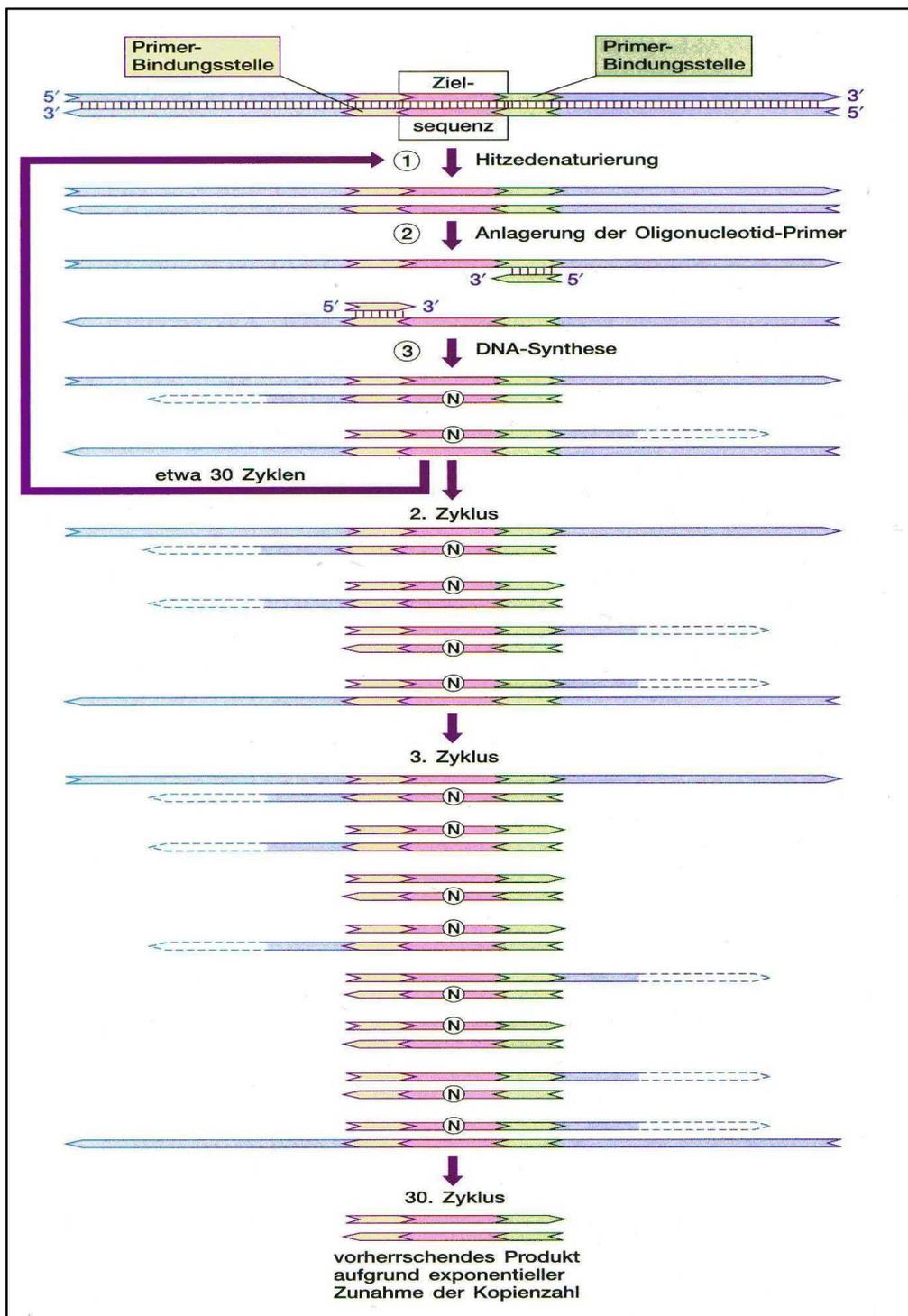


Abbildung 3: Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (Strachan und Read, 2005)

Durch die zunehmende Menge an PCR-Produkten, dem Aktivitätsverlust der Taq-Polymerase und dem kompetitiven Effekt zwischen der „Template“-DNA und den Primern kommt es nach Durchlaufen mehrerer PCR-Zyklen nur noch zu einer linearen Amplifikation. Schließlich wird ein Plateau erreicht, an dem keine entscheidende Neusynthese von DNA mehr stattfindet (Sulger, 2002; Löffler und Petrides, 2003; Strachan und Read, 2005).

3.3.2. Amplifikation der Exone des *PRKCG*-Gens

Als Ausgangsmaterial dienten 26 DNA-Proben, die am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Gießen und Marburg nach den oben beschriebenen Methoden aus Patientenblut gewonnen wurden. Die Nummerierung der Patienten-Proben erfolgt nach dem Datum des Eingangs und wird im Folgenden beibehalten.

Die für die Amplifikation der Exone des *PRKCG*-Gens notwendigen Primer wurden von der Firma Sigma synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden durch Zugabe von 10 mM(olar) Tris-Puffer (p(otentia)H(ydrogenii) 7,5) gelöst und auf eine Konzentration von 50 pmol/μl eingestellt.

Tabelle 3: Primer zur Amplifikation von Exonen des *PRKCG*-Gens

Exon	Primer	Orientierung	PCR-Produkt	Exon
1	5'-GGCTCCCACATTTTCAGCAG-3'	Sense	538 Bp	475 Bp
	5'-GCGTGATAGGAGTCTGCACC-3'	Antisense		
2	5'-GGCTGAACTCCAGTCTAAGG-3'	Sense	318 Bp	32 Bp
	5'-GACCAGAGAACACGTGTGTC-3'	Antisense		
3	5'-CTCTCTGTTGGACTCTCTG-3'	Sense	313 Bp	83 Bp
	5'-GAGAAATTGGGACGGACG-3'	Antisense		
4 – 5	5'-CTAGAGAGCAAGGCAGGAGG-3'	Sense	554 Bp	108 Bp
	5'-GCCAGCACAAGTGCCTTG-3'	Antisense		132 Bp
6	5'-GAACTCTTGATTGCTGACTGG-3'	Sense	325 Bp	157 Bp
	5'-CATCAGCTGCTCTCTGGG-3'	Antisense		
7	5'-GAAGGTCAGAGGTCGGAGA-3'	Sense	289 Bp	135 Bp
	5'-GAGGAGAGAGACCACACACA-3'	Antisense		
8 – 9	5'-TGTGTCCGTCTCTCTGTGTC-3'	Sense	615 Bp	88 Bp
	5'-GTGTGCTCAACTCATGTGTG-3'	Antisense		30 Bp
10	5'-AGCGATTCTCATCCTTTCC-3'	Sense	365 Bp	153 Bp
	5'-ATGCAGGAGCCCAGTCTC-3'	Antisense		
11	5'-CTTAAGAGATGGAGGAAGG-3'	Sense	421 Bp	189 Bp
	5'-CACTCAGAGAGCACAAAGT-3'	Antisense		
12–13	5'-TCCACGTCTGTCCTGAGTGA-3'	Sense	422 Bp	92 Bp
	5'-CAGGAATTGCAAGAAGTGTTG-3'	Antisense		63 Bp
14	5'-TGAATATGTGGCTCTAGACTG-3'	Sense	285 Bp	139 Bp
	5'-GGTGAATACTGGACCATCAG-3'	Antisense		
15	5'-CAGAGTGGGAAGAGCTTGTG-3'	Sense	323 Bp	81 Bp
	5'-CATGGACAGCGCTATTTCG-3'	Antisense		
16	5'-TGGTCAGGTGTGCATGTGG-3'	Sense	335 Bp	108 Bp
	5'-AGTGACTTCAGGAATGGGAGC-3'	Antisense		
17	5'-CCTCCATCTGCCTGTCTC-3'	Sense	314 Bp	141 Bp
	5'-CCACATACAGGTATATTGAGGC-3'	Antisense		
18	5'-GGAGACAGGAGATGAGACTG-3'	Sense	383 Bp	946 Bp
	5'-GCAGGATCTAGAATGGGAC-3'	Antisense		186 Bp Codierend

Zuerst wurde ein Nukleotidmix erstellt:

50 µl dATP (10 mM)

50 µl dCTP (10 mM)

50 µl dGTP (10 mM)

50 µl dTTP (10 mM)

200 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 7,5)

Zu 1 µl Patienten-DNA wurden folgende Chemikalien und Enzyme gegeben:

5 µl 10x PCR Puffer

0-10 µl Betain (für jedes Exon unterschiedlich)

10 µl Nukleotidmix

0,75 µl Primer Sense

0,75 µl Primer Antisense

0,45 µl Taq-Polymerase

ad 50 µl destilliertes Wasser (H₂O) dd

Für die PCR wurde ein PTC-200 Peltier Thermocycler der Firma MJ Research verwendet und das folgende Standardprogramm eingesetzt. Die Amplifikation begann mit einer initialen Denaturierungsphase von 3 min bei 94°C. Danach wurden 35 Zyklen mit je einer Denaturierungsphase von 30 sec bei 94°C, einer Annealingphase von 30 sec bei 54-62°C und einer Extensionsphase von 45 sec bei 72°C durchlaufen. Die Temperatur der Annealingphase richtete sich nach dem verwendeten Primer. Zum Abschluss erfolgte eine Extensionsphase von 2 min bei 72°C. Fakultativ wurde Betain zugegeben, um sich eventuell bildende Sekundärstrukturen zu vermeiden.

3.3.3. Reinigung

Nach Abschluss der PCR wurde das PCR-Produkt gereinigt. Dies geschah nach folgendem Schema: Zu dem 50 µl PCR-Ansatz wurde 150 µl destilliertes H₂O zugegeben. Das Ganze wurde in eine 96 Well-Platte (MANU 030) der Firma Millipore gegeben. Solche Platten besitzen an der Unterseite eine Größenausschlussmembran, die für kleine Moleküle durchlässig ist. Größere Moleküle wie die amplifizierte DNA können die Membran nicht passieren. Anschließend wurde die Platte 8 min auf ein vakuumerzeugendes Absauggerät gestellt, so dass die permeablen Moleküle und die Flüssigkeit durch die Membran wanderten.

Daraufhin wurden je 25 µl destilliertes H₂O auf die einzelnen Wells gegeben. Um das PCR-Produkt wieder in Lösung zu bringen, wurde die Platte für 10 min auf einen Schüttler gestellt. Danach wurden die 25 µl in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß zur Aufbewahrung überführt.

3.4. Agaroseelektrophorese

3.4.1. Prinzip

Die Agaroseelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Größe eines Fragments wird bestimmt, indem man einen Vergleich mit den definierten Banden eines Größenstandards anstellt.

Die Agarose bildet abhängig von ihrer Konzentration unterschiedlich große „Maschen“. Man legt ein elektrisches Feld an, in dem die DNA aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zu positiven Anode wandert. Dabei wirkt die Agarose wie eine Art „Sieb“, in dem größere Moleküle langsamer wandern. Zum Sichtbarmachen der DNA wurde Ethidiumbromid, das sich in die DNA einlagert, als fluoreszierender Farbstoff verwendet (Sulger, 2002; Löffler und Petrides, 2003).

3.4.2. Durchführung

Zuerst wurde ein 1,5 %iges Gel (Ausnahme Exon 1: 2 %ig) gegossen. Dazu wurden zu 750 mg Agarose abgewogen, mit 50 ml 1x TBE-Puffer aufgefüllt und anschließend im Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Zugabe von 15 µl Ethidiumbromid wurde es in eine Gelkammer (7 x 8,5 cm) mit 2 Kämmen gegossen. Es entstanden pro Kamm 10 Taschen. Das Gel wurde bei Raumtemperatur gekühlt.

Nach Einlegen des Gels in die Elektrophoresekammer wurde diese mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt, so dass das Gel bedeckt war. Nun wurden die Proben, die aus 3 µl PCR-Produkt, 7 µl destilliertem H₂O und 1 µl Ladepuffer bestanden, in die einzelnen Taschen pipettiert, wobei in eine Tasche ein Größenstandard kam. Der Ansatz war bei allen Proben gleich, um einen standardisierten Vergleich zu ermöglichen und so die Menge des PCR-Produkts bestimmen zu können. Bei einer Stromstärke von 35 mA(mpere) erfolgte die Auftrennung. Durch den Ladepuffer, der die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylen-Zyanol enthielt und somit die Lauffront optisch sichtbar machte, ließ sich die Wandergeschwindigkeit abschätzen. Beleuchtete man das Gel mit UV-Licht, konnte man die DNA-Banden aufgrund des

fluoreszierenden Ethidiumbromids auf dem Transilluminator sehen und mit einer Sofortbildkamera fotografieren. Ein Beispiel hierfür ist die folgende Abbildung.

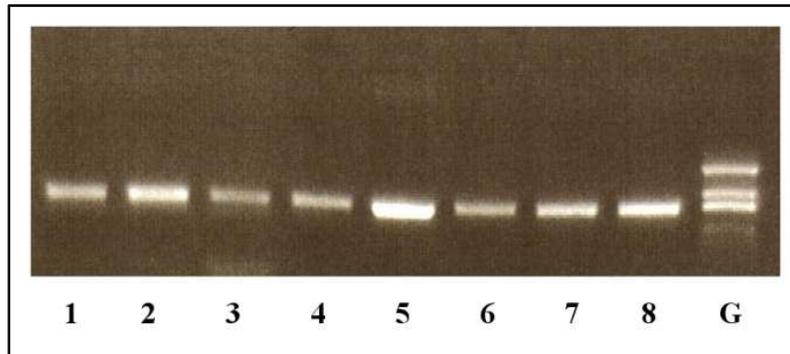


Abbildung 4: Gelelektrophorese mit PCR-Produkten (1-8) und einem Größenstandard (G)
Größenstandard pVC/Dde I: Bandengrößen 890 Bp, 540 Bp, 426 Bp, 409 Bp, 240 Bp, 166 Bp.
Die hier aufgetrennten Fragmente (1-8) sind 421 Bp groß.

3.5. Sequenzierung

3.5.1. Grundlagen

Mit der DNA-Sequenzierung, die auf der Didesoxymethode (Sanger et al, 1977) basiert, kann man die Basenabfolge von DNA-Fragmenten ermitteln und so eventuell vorhandene Mutationen erkennen. Bei dieser Methode werden beide DNA-Stränge getrennt betrachtet.

In dieser Arbeit wurde nach der Cycle-Sequencing-Methode vorgegangen. Bei diesem Verfahren verwendet man einen normalen PCR-Ansatz mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase, der die Schritte Denaturierung, Primer-Annealing und DNA-Extension durchläuft. Jedoch setzt man nur einen Primer ein, so dass nur ein Strang amplifiziert wird.

Nun werden neben den Bausteinen dNTPs auch d(i)d(esoxy)NTPs zugegeben. Diese ddNTPs führen zu spezifischen Strangabbrüchen am 3'-Ende, da ihnen die 3'-Hydroxylgruppe fehlt und so keine weiteren Phosphodiesterbindungen mehr gebildet werden können. Wenn nun ein dNTP in die Kette eingefügt wird, setzt sich diese fort. Bei einem ddNTP kommt es jedoch zu einem Kettenabbruch. Dieser Abbruch ist somit bei jedem DNA-Strang zufällig und so entsteht ein Gemisch von Fragmenten mit unterschiedlicher Länge, wobei, statistisch betrachtet, jede Länge vorhanden ist.

Man verwendet für die verschiedenen ddNTPs fluoreszenzmarkierte ddNTPs mit 4 verschiedenen Fluoreszenzgruppen, welche ihr Maximum bei unterschiedlichen Wellenlängen haben. Nun trennt man die Fragmente längenabhängig auf, so dass man aufgrund der Fluoreszenzmarkierung die Basensequenz ablesen kann. In dieser Arbeit wurde ein

Kapillarsequenzier verwendet. Die zu analysierenden DNA-Fragmente wandern dort durch lange Glaskapillaren, die mit einem Gel gefüllt sind, und werden so elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Ablesen wird ein Laser auf eine bestimmte Stelle der Gelmatrix gerichtet und sobald er auf DNA-Fragmente trifft, fluoreszieren die markierten ddNTPS spezifisch für die jeweilige Base. Ein Detektor zeichnet die Signale auf und die Informationen werden digitalisiert. Nun kann man die Sequenz der DNA am Bildschirm darstellen (Strachan und Read, 2005).

3.5.2. Durchführung

Zur Sequenzierung von PCR-Fragmenten wurde zu 1–7 µl des gereinigten PCR-Produkts abhängig von der Konzentration des DNA-Fragments folgender Ansatz pipettiert:

1 µl 5x Reaktionspuffer

1,2 µl Primer verdünnt auf 3 pmol/µl (entweder sense oder antisense-Primer)

2,5 µl ABI-Mix (enthält die fluoreszenzmarkierten Nukleotide)

ad 15 µl destilliertes H₂O dd

Der Reaktionsansatz wurde in den Thermocycler der Firma MJ Research gestellt. Die Sequenzierung begann mit einer Denaturierungsphase von 1 min bei 96° C. Anschließend folgten 25 Zyklen mit:

Denaturierung:	10 sec	96 °C
Annealing:	10 sec	54–62 °C (die Temperatur war identisch mit derjenigen der PCR)
Extension:	2 min	50/ 60 °C

3.5.3. Reinigung der Sequenzierungsansätze

Nach erfolgter Sequenzierung wurden die Ansätze wieder gereinigt, um überschüssiges Material wie z.B. freie Nukleotide und Primer zu entfernen. Dazu wurde eine 96-Well-Platte (MAHV N45) der Firma Millipore verwendet. Zuerst wurden pro Sequenzierungsansatz 300 µl Sephadex G50-Suspension auf ein Well der Filtermembran gegeben. Zusammen mit einer Auffangplatte wurde die Platte mit dem Sephadex für 2 min bei 730xg (Erdbeschleunigung: 9,81 ms⁻²) zentrifugiert. Die in der Auffangplatte angesammelte Flüssigkeit wurde verworfen und auf jedes Well 15 µl Sequenzierungsansatz pipettiert. Nachdem eine neue 96-Well-Platte

zum Eluieren untergestellt worden war, wurde wieder für 2 min bei 730xg zentrifugiert. Zusammen mit 10 µl Formamid wurden die Proben lichtgeschützt zur Analyse an die Blutbank der Universitätsklinik Gießen (Standort des Sequenzers) gegeben.

3.5.4. Auswertung der Sequenzdaten

Zur Auswertung der Daten der Sequenzierung wurden die Computerprogramme SeqAnalysis Version 3.7 und SeqScape Version 2.5 der Firma Applied Biosystems verwendet. Zuerst wurde mit dem Programm SeqAnalysis überprüft, ob die Elektropherogramme der Sequenzierung auswertbar sind. Wenn die Banden der Elektropherogramme nicht eindeutig sind, kann SeqScape die Daten nicht verarbeiten und dies führt zu einer Überlastung des Programms, so dass mit SeqAnalysis eine Vorselektion getroffen werden musste. Danach wurden die verwendbaren Daten in SeqScape übertragen. Dieses Programm ermöglicht es, die DNA-Sequenzen aller Patienten darzustellen und auszuwerten, da sie sowohl direkt mit einer Referenzsequenz als auch untereinander verglichen werden können. Diese Analyse wurde für jedes Exon einzeln durchgeführt. Die unten stehende Abbildung zeigt eine typische Sequenzierung mit den Banden in den verschiedenen Farben, die einzelnen Nukleotiden entsprechen.

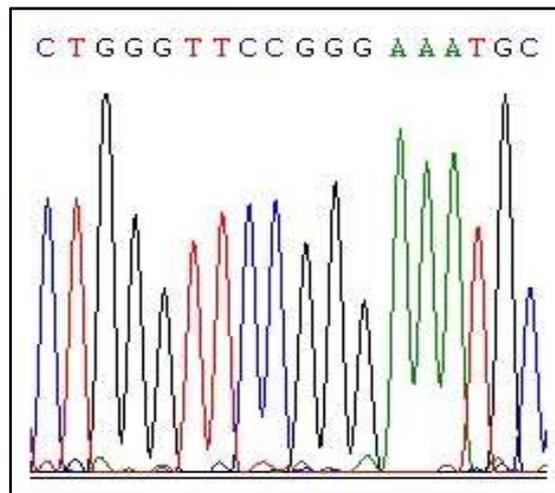


Abbildung 5: Typisches Bild einer Sequenzierung mit SeqAnalysis

3.6. Restriktionsanalyse

Um festzustellen, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein gefundener Basenaustausch krankheitsauslösend ist, wurde untersucht, ob dieser auch in einer Kontrollgruppe ohne

neurologische Erkrankung auftritt. Um möglichst viele Kontrollen schnell zu testen, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

3.6.1. Grundlagen

Für die Analyse benötigt man bakterielle Enzyme, sogenannte Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Diese schützen die Bakterien-DNA vor Bakteriophagen, indem sie deren DNA zerstören. Sie können DNA an Stellen schneiden, die eine spezifische Erkennungssequenz – meist Palindrome - enthalten. Je nach Schnittstelle können verschiedene Enden entstehen: Zum einen „glatte Enden“, wenn sich die Schnittstellen auf einer Symmetrieachse befinden, und zum anderen „überhängende Enden“, wenn der Schnitt versetzt ist. Durch Basenpaarungen können sich diese zusammenlagern. Die Entdeckung dieser Restriktionsenzyme bildet die Grundlage für Klonierungen, denn durch Restriktion standen erstmals DNA-Fragmente in passender Größe zur Verfügung. Außerdem lassen sich Fragmente derselben Art mit „glatten Enden“ leicht verknüpfen und bieten so die Möglichkeit einer künstlichen Rekombination. Des Weiteren sind Restriktionsenzyme wichtig für Genotypisierung. Finden sich Polymorphismen im Bereich der Schnittstelle, kommt es zum Verlust oder Zugewinn einer Schnittstelle und dadurch zu einer Veränderung der Länge der Restriktionsfragmente. Dies wird Restriktionsschnittstellen-Polymorphismus (RFLP) genannt und wird z.B. zur Erkennung von genetischen Erkrankungen genutzt, die auf Veränderung eines einzelnen Nukleotids beruhen (Strachan und Read, 2005).

3.6.2. Durchführung

Zuerst wurde ein PCR-Ansatz nach folgendem Schema erstellt:

Zu 1,5 µl DNA einer Kontrollperson wurden 30 µl des für 15 Proben angesetzten Gemisches gegeben:

50 µl 10x PCR Puffer

100 µl Betain

100 µl Nukleotid-Mix (siehe 3.2.2)

7 µl Primer sense Exon 2

7 µl Primer antisense Exon 2

4 µl Taq-Polymerase

ad 500 µl destilliertes H₂O dd

Die PCR wurde unter den in 3.3.3. genannten Bedingungen durchgeführt. Die Annealing-Temperatur betrug 59°C. Danach wurde das Produkt wie unter 3.3.4. beschrieben aufgereinigt.

Für die Restriktionsanalyse wurde das Enzym HaeIII verwendet, das aus dem Bakterium *Haemophilus aegypticus* stammt und bei der Sequenz 5'-GG[^]CC-3' schneidet. Das Enzym HaeIII teilt die PCR-Produkte des Exon 2 in Fragmente folgender Länge auf: 92 Bp, 67 Bp, 40 Bp, 36 Bp, 33 Bp, 30 Bp und 20 Bp. Die heterozygote Mutation des Patienten 466.1 im Exon 2 des *PRKCG*-Gens verändert diese Sequenz zu 5'-GT[^]CC-3', so dass eine HaeIII-Schnittstelle im PCR-Produkt entfällt. Dadurch entsteht ein zusätzliches Fragment der Länge 159 Bp.

Der Restriktionsansatz für 15 Proben bestand aus:

32 µl 10x Puffer NEB2

7 µl HaeIII

42 µl destilliertes H₂O

Zu 15 µl des PCR-Produkts wurden 5 µl des Restriktions-Mixes gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 4 Stunden wurde der Ansatz mit 2 µl Ladepuffer gestoppt.

Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf einem 2,5 % Agarose-Gel. Dafür wurden 3750 mg Agarose mit 150 ml 1x TBE-Puffer aufgefüllt und daraus ein Gel mit 2 x 16 Taschen gegossen, um möglichst viele Proben gleichzeitig untersuchen zu können. In eine Tasche kam ein Größenstandard (50 Bp ladder) und in eine zweite die Positiv-Kontrolle des Patienten 466.1. In die übrigen Taschen wurden die Restriktionsansätze der Kontrollen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte nach dem Prinzip, das in 3.3.2. beschrieben wurde. Die Elektrophorese wurde bei 70 mA durchgeführt. Da das Gel ebenfalls Ethidiumbromid enthielt, konnte man die Banden der Fragmente im Transilluminator unter dem UV-Licht sehen. Man konnte dadurch die Länge der Fragmente der Kontrollen mit der der Positiv-Kontrolle vergleichen. Die Gele wurden zur Dokumentation mit einer Sofortbildkamera fotografiert.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden 26 nicht verwandte deutsche Patientinnen und Patienten auf Sequenzabweichungen im *PRKCG*-Gen untersucht. Bei allen diesen Personen weist die Familiengeschichte auf eine autosomal dominant vererbte cerebelläre Ataxie mit nur langsamem Fortschreiten der Erkrankung hin. Um SCA14 molekular zu diagnostizieren, wurde an genomischer DNA der Patienten eine PCR zur Amplifizierung aller 18 Exone und flankierender intronischer Sequenzen des *PRKCG*-Gens durchgeführt und die Produkte nachfolgend sequenziert. Die resultierenden Sequenzen wurden über Computerprogramme der Firma Applied Biosystems ausgewertet.

4.1. Studienpopulation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwischen 1997 und 2005 nach üblicher Aufklärung und Einverständniserklärung DNA-Proben von 26 Erwachsenen, die an Ataxien und weiteren variablen Symptomen litten, entnommen und nachfolgend auf SCA14 untersucht. Die Studienpopulation bestand aus 13 männlichen und 13 weiblichen Personen im Alter von 32 bis 77 Jahren. Die Patienten stammen aus Deutschland.

Tabelle 4: Herkunft der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer

Herkunft der Probe	Zahl der Proben
Universitätsklinik Gießen und Marburg	12
Universitätsklinik Kiel	6
Klinikum Koblenz	2
Universitätsklinik Frankfurt	2
Universitätsklinik Heidelberg	1
Universitätsklinik Mainz	1
Universitätsklinik Köln	1
Klinikum Fulda	1

Jeder der 26 Patienten wies eine Bewegungsstörung im Sinne einer Ataxie auf. Außerdem war bei allen Studienteilnehmern mindestens ein betroffener Verwandter ersten Grades zu finden, so dass anhand der Familienanamnese ein autosomal dominanter Erbgang am

wahrscheinlichsten ist. Da sich die bekannten SCA-Typen klinisch schwer voneinander abgrenzen lassen, wurden zuvor alle Patienten auf SCA1, SCA2, SCA3 und SCA6 getestet. An diesen Loci konnte keine krankheitsverursachende Trinukleotid-Expansion nachgewiesen werden. Ebenso zeigten die Probanden keine CAG/CAA-Expansion am SCA17-Lokus (Wißen, 2007). Durch diese Vortestung konnten die häufigsten SCA-Typen als Krankheitsursachen ausgeschlossen werden.

Neben Ataxie traten noch zusätzliche Symptome auf. Bei zwölf Studienteilnehmern war eine Dysarthrie vorhanden. Elf Patienten wiesen Störungen der Okulomotorik auf, die sich z.B. als Nystagmus oder als sakkadierte Blickfolgebewegung äußerten. Gleichgewichtsstörungen und Schwindel zeigten sich jeweils bei drei Personen. Drei Studienteilnehmer litten an einer Dysphagie.

Bei sechs Patienten fiel eine Veränderung der Reflexantwort auf, die sich entweder als verbreiterte Reflexzone, Hypo- oder Hyperreflexie äußerten. Das Babinski-Zeichen war bei zwei Personen positiv. Außerdem litt ein Studienteilnehmer an Hypästhesien und einer an einer Atrophie der Wadenmuskulatur.

Extrapyramidale Störungen wie Rigor oder Dystonie zeigten sich bei jeweils einem Patienten. Tremor fiel bei zwei Personen auf. Spastik kam bei zwei, choreatische Überbewegungen und Klonien bei jeweils einem Studienteilnehmer vor.

Auch Wesensveränderungen, Intelligenzminderung oder eine mentale Retardierung traten bei jeweils einem Patienten auf. Eine Person litt an einer Psychose und Depressionen. Epilepsie fiel ebenfalls bei einem Studienteilnehmer auf.

Bei zehn Patienten wurde ein MRT und bei zwei ein PET-Scan durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten entweder eine reine cerebelläre Atrophie oder Veränderungen im Sinne einer olivo-ponto-cerebellären Atrophie.

Zusammenfassend zeigte sich bei allen untersuchten Personen eine Ataxie und das Fortschreiten der Erkrankung war langsam progredient.

4.2. Darstellung der Exone ohne krankheitsauslösende Mutationen

Im Folgenden werden nun die in den einzelnen Exonen gefundenen Sequenzabweichungen im Vergleich zum WT dargestellt. Als Vergleich dient die Sequenz des *PRKCG*-Gens der Genbank ENSEMBL (Release v33 vom September 2005). Zunächst sollen Sequenzabweichungen, die nicht krankheitsauslösend sind, ausführlich beschrieben werden.

Dabei soll jeweils ein Vergleich zwischen den in unserem Kollektiv detektierten und den in der Literatur beschriebenen Polymorphismen gezogen werden.

4.2.1. Exon 1

Bei vier Proben fand an der Position 72 ein heterozygoter Austausch von Thymin (T) zu Cytosin (C) statt. Hierbei handelt es sich um einen „single nucleotid polymorphism“ (SNP). Die relative Wahrscheinlichkeit dieses Austausches liegt mit 7,7 %, insbesondere unter Beachtung der kleinen Stichprobengröße, sehr nahe bei der des Vergleichskollektivs, die 8,6 % beträgt.

Tabelle 5: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 1 und flankierender Regionen

Referenzsequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung*	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs373228	Exon 1 5'UTR	G → C 5'UTR-222G>C	G : unbekannt C : unbekannt	1.000 0.000
rs446795	Exon 1 5'UTR	C → G 5'UTR-221G>C	C: unbekannt G: unbekannt	1.000 0.000
rs2547362	Exon 1	T → C c.72T>C, (p.A24A)	T : 0.914 C : 0.086	0.923 0.077

*: CSHL-HAPMAP: HapMap-CEU

Die fettgedruckten Sequenzvarianten wurden bei Patienten im Rahmen dieser Doktorarbeit gefunden.

Abbildung 6 zeigt die Auswertung der Sequenzierungen von Patienten anhand von SeqScape (ABI). Bei zwei Studienteilnehmern ist der genannte SNP innerhalb der Markierung zu sehen. Dieser ruft keine Alteration der Aminosäure (AS)-Sequenz hervor, die Aminosäure Alanin (A) bleibt erhalten.

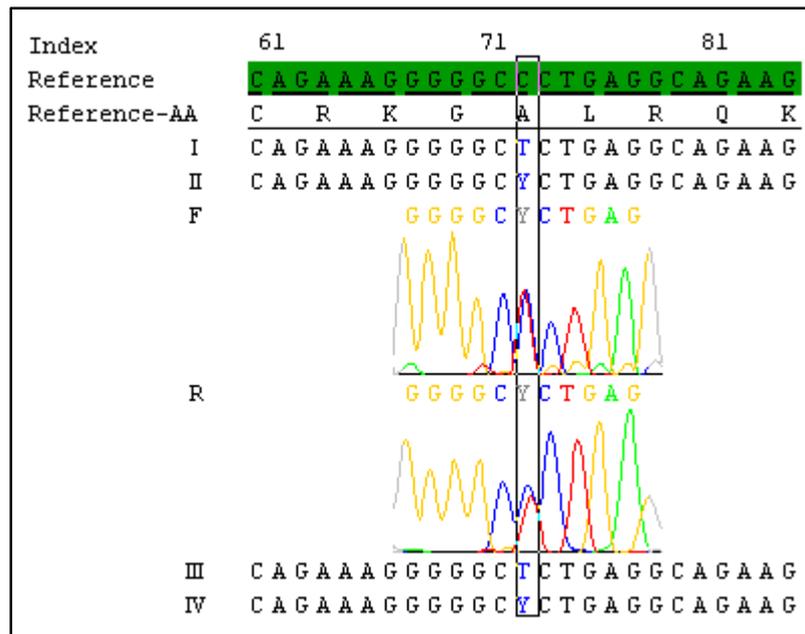


Abbildung 6: Teilbereich der Exon 1 Sequenz des *PRKCG*-Gens. Die Auswertung erfolgte mit SeqScape (ABI). Index zeigt die Nukleinsäureposition an. Reference und Reference-AA sind die Nukleinsäure- bzw. AS-Referenzsequenz. I-IV sind 4 Studienteilnehmer, wobei bei II exemplarisch ein Teil eines Elektropherogramms dargestellt ist. Der heterozygote Austausch von T zu C ist markiert.

In den Sequenzdatenbanken lassen sich zwei weitere Austausche im 5'UTR-Bereich finden, die aber in unserer Studienpopulation nicht vorlagen (Tabelle 5).

4.2.2. Exon 3

Bei zwei Studienteilnehmern wurde der SNP rs307955 in heterozygoter Form nachgewiesen. Durch diesen Austausch bleibt die AS Cystein (C) erhalten und es gibt keine Alteration der AS-Abfolge. Die Auftretenswahrscheinlichkeit dieses Austauschs liegt im Probenkollektiv mit 3,8% deutlich über den 1,5% des Vergleichskollektivs.

Tabelle 6: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 3 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung*	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs307955	Exon3	C → T c.207C>T, (p.C69C)	C : 0.985 T: 0.015	0.962 0.038
rs17854523	Exon 3	C→T c.285C>T, (p.D95D)	C : 0.932 T : 0.068	1.000 0.000

*: APPLERA_GI AGI_ASP population

Die fettgedruckten Sequenzvarianten wurden bei Patienten im Rahmen dieser Doktorarbeit gefunden.

Abbildung 7 zeigt bei einem Patienten innerhalb der Markierung den genannten Austausch.

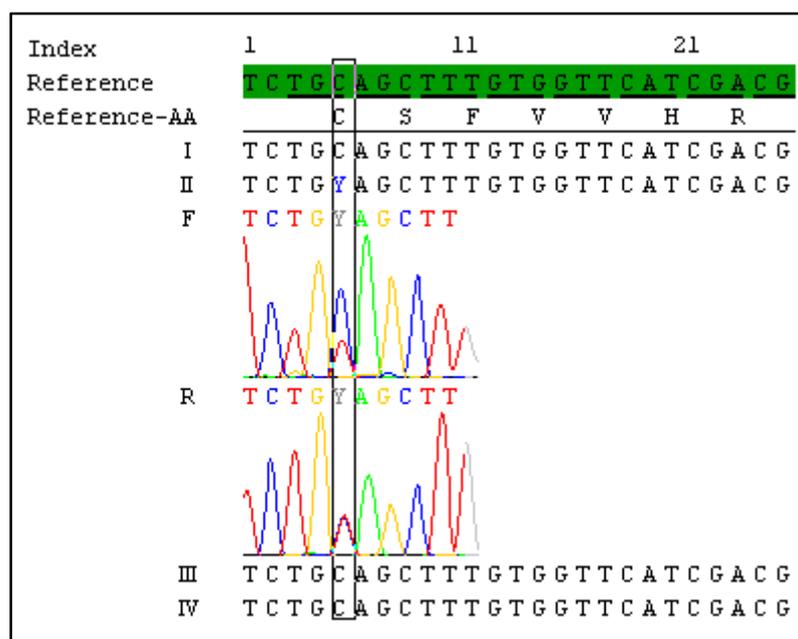


Abbildung 7: Teilbereich der Exon 3 Sequenz des *PRKCG*-Gens. Die Auswertung erfolgte mit SeqScape (ABI). Index zeigt die Nukleinsäureposition an. Reference und Reference-AA sind die Nukleinsäure- bzw. AS-Referenzsequenz. I-IV sind 4 Studienteilnehmer, wobei bei II exemplarisch ein Teil eines Elektropherogramms dargestellt ist. Der heterozygote Austausch von C zu T ist markiert.

Bei dem SNP rs34896593 kommt neben der häufigeren Variante C auch seltener ein T an der Stelle 285 vor. Das ursprüngliche Codon TGC codiert für die AS Aspartat (D), ebenso die SNP basierend Variante TGT. In der Tabelle 7 sind die Häufigkeiten des SNP in der Bevölkerung dargestellt.

4.2.3. Exon 4

An der Position -66 des Introns 3 trat bei einem Patienten ein heterozygoter Austausch von Adenin (A) zu C auf. Dieser SNP ist bereits in der Literatur beschrieben und scheint keinen Einfluss auf die AS-Sequenz zu haben. Die Wahrscheinlichkeiten für diesen Austausch in der Bevölkerung und in unserer Studienpopulation liegen mit 2,5% bzw. 1,9% ähnlich hoch.

Tabelle 7: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 4 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung*	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs307945	Intron3	A → C IVS3-66A>C	A : 0.975 C : 0.025	0.981 0.019

*: CSHL-HAPMAP: HapMap-CEU

Die fettgedruckten Sequenzvarianten wurden bei Patienten im Rahmen dieser Doktorarbeit gefunden

4.2.4. Exon 5

Im Intron 4 und im Intron 5 werden in der Literatur SNPs beschrieben, die in unserem Patienten-Kollektiv nicht nachgewiesen wurden.

Tabelle 8: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 5 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs45459891	Intron 4	G → A IVS4-40G>A	G : unbekannt A : unbekannt	1.000 0.000
rs73599970	Intron 5	G → A IVS5+29G>A	G : unbekannt A : unbekannt	1.000 0.000

4.2.5. Exon 6

Bei 14 der 26 untersuchten Personen fand sich an der Stelle 569 (rs3745406) ein heterozygoter Austausch von T zu C, vier waren homozygot für C. Die AS Asparagin (N) bleibt erhalten, die AS-Sequenz verändert sich nicht.

Tabelle 9: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 6 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs3745406	Exon 6	T → C c.569T>C, (p.N189N)	T : 0.649 C : 0.351	0.577 0.423
rs3745405	Intron 6	G → T IVS6+14G>T	G : 0.658 T : 0.342	0.577 0.423

*: CSHL-HAPMAP: HapMap-CEU

Die fettgedruckten Sequenzvarianten wurden bei Patienten im Rahmen dieser Doktorarbeit gefunden

Abbildung 8 zeigt exemplarisch homozygote, heterozygote und Wildtyp-Sequenzen.

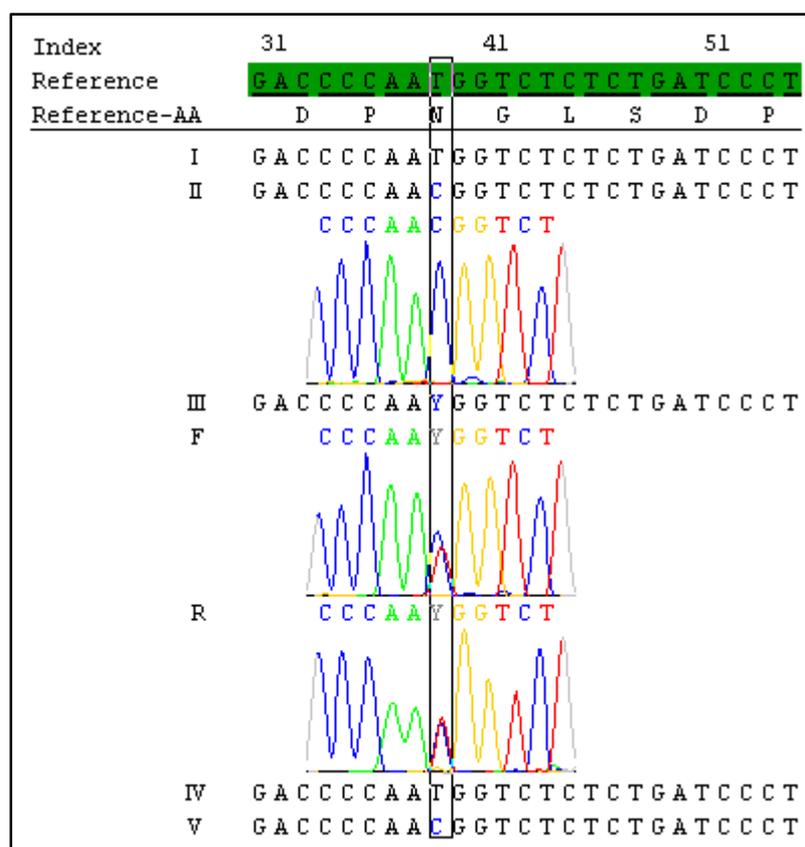


Abbildung 8: Teilbereich der Exon 6 Sequenz des *PRKCG*-Gens. Die Auswertung erfolgte mit SeqScape (ABI). Index zeigt die Nukleinsäureposition an. Reference und Reference-AA sind die Nukleinsäure- bzw. AS-Referenzsequenz. I-V sind 5 Studienteilnehmer, wobei exemplarisch Teile eines Elektropherogramms dargestellt sind. Der homozygote Austausch von T zu C bei II ist markiert. Bei III liegt der SNP rs3745406 in der heterozygoten Form vor.

An der Position +14 der Intervening sequence (IVS) 6 wurde bei 14 Patienten der SNP rs3745405 heterozygot (Guanin (G)/T) nachgewiesen, bei vier Patienten lag er in

homozygoter Form (T/T) vor. Der Austausch liegt nicht im codierenden Bereich und hat keine Auswirkung auf die AS-Abfolge. In der Tabelle 9 lassen sich die Häufigkeiten in der Bevölkerung und in der Studienpopulation ablesen.

Für die Allele der hier untersuchten SNPs rs3745406 und rs3745405 konnte im Probenkollektiv eine Kopplung beobachtet werden. Anhand Abbildung 9 lässt sich erkennen, dass, trotz vier möglicher Haplotypen, in dem hier untersuchten Probenkollektiv nur zwei auftraten.

	SNP ↓		SNP ↓	relative Häufigkeit
Haplotyp1=WT	CCCAA T GGTCT	...	GGGGT G CAGGG	57,7%
Haplotyp2	CCCAA T GGTCT	...	GGGGT T CAGGG	0,0%
Haplotyp3	CCCAA C GGTCT	...	GGGGT G CAGGG	0,0%
Haplotyp4	CCCAA C GGTCT	...	GGGGT T CAGGG	42,3%

Abbildung 9: Mögliche Haplotypen der SNPs rs3745406 und rs3745405 und deren relative Häufigkeiten, WT= Wildtyp, d.h. Ursprungsalles

Die WT-Variante T im Exon 6 tritt zusammen mit der WT-Variante G des Intron 6 auf. Erfolgt ein Austausch von T zu C im Exon, wird auch in der IVS 6 G zu T verändert.

In unserem Probenkollektiv entsprechen 57,7% der Chromosomen der WT-Sequenz, 42,3% der Chromosomen tragen beide SNPs.

4.2.6. Exon 9

Im Exon 9 wurde ein Austausch von C zu G an der Position 924 nachgewiesen, der in unserem Probenkollektiv nicht gefunden wurde. Der Austausch führt zu keiner Alteration in der AS-Sequenz, Prolin (P) bleibt erhalten.

Tabelle 10: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 9 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs56387214	Exon 9	C → G c.924C>G, (p.P308P)	C : unbekannt G : unbekannt	1.000 0.000

4.2.7. Exon 11

An der Position -92 des Introns 10 wurde bei einer Person der heterozygote Austausch von G zu C detektiert. Bei einem weiteren Studienteilnehmer fand sich an der Stelle -86 der IVS 10 ein heterozygoter SNP von G zu C, der bisher noch nicht publiziert wurde.

Tabelle 11: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 11 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs41311973	Intron10	G → C IVS10-92G>C	G : unbekannt C : unbekannt	0.981 0.019
-----	Intron10	G → C IVS10-86G>C	G : --- C : ---	0.981 0.019
rs62637711	Exon11	C → A c. 1321C>A, (p.R408R)	C : unbekannt A : unbekannt	1.000 1.000
rs41303043	Intron 11	T → G IVS11+26T>G	T : unbekannt G : unbekannt	1.000 0.000

Die fettgedruckten Sequenzvarianten wurden bei Patienten im Rahmen dieser Doktorarbeit gefunden.

Der erstmals gefundene SNP wird in der folgenden Abbildung gezeigt.

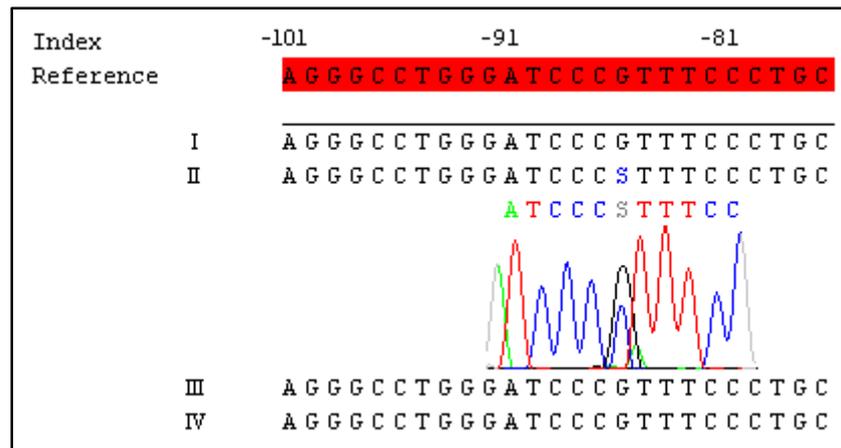


Abbildung 10: Teilbereich der Intron 10 Sequenz des *PRKCG*-Gens. Die Auswertung erfolgte mit SeqScape (ABI). Index zeigt die Nukleinsäureposition in Bezug auf Exon 11 an. Reference ist die Nukleinsäure-Referenzsequenz. I-IV sind 4 Studienteilnehmer, wobei bei II ein Teil des Elektropherogramms dargestellt ist. Der heterozygote Austausch von G zu C ist markiert.

Im Exon 11 wurde der SNP rs62627711 beschrieben. Ein weiterer Austausch ist in Intron 11 lokalisiert. Beide SNPs wurden in unserem Patientenkollektiv nicht nachgewiesen (Tabelle 13).

4.2.8. Exon 13

Im PCR-Produkt, das Exon 13 und die flankierenden Bereiche abdeckt, sind vier SNPs beschrieben. Dabei handelt es sich um zwei 1-Bp-Deletionen in der IVS 12, einen stummen Basenaustausch im Exon 13 und einen weiteren T zu C Austausch im Intron 13. In der Tabelle 12 sieht man, dass in der untersuchten Studienpopulation nur WT-Allele nachgewiesen wurden.

Tabelle 12: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 13 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs67155543	Intron 12	DelA IVS12-74DelA	A : unbekannt - : unbekannt	1.000 0.000
rs35629728	Intron 12	DelT IVS12-23DelT	T : unbekannt - : unbekannt	1.000 0.000
rs35979513	Exon13	C → G c.1404C>G, (p.L468L)	C : 0.907* T : 0.093	1.000 0.000
rs2242245	Intron 13	T → C IVS13+26T>G	T : 0.975** C : 0.025	1.000 0.000

*: APPLERA_GI AGL ASP population

**: CSHL-HAPMAP: HapMap-CEU

4.2.9. Exon 14

Der Austausch im Intron 13 wurde bereits unter 4.2.8. erwähnt. Im Exon 14 existieren in der Literatur zwei SNPs an den Positionen 1449 und 1500. Bei beiden handelt es sich um stumme Austausche, die die AS-Sequenz nicht verändern. In unserer Studiengruppe wurden nur WT-Allele nachgewiesen.

Tabelle 13: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 14 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung*	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs2242245	Intron 13	T → C IVS13+26T>G	T : 0.975 C : 0.025	1.000 0.000
rs56184534	Exon14	G → A c.1449G>A, (p.L483L)	G : unbekannt A : unbekannt	1.000 0.000
rs2242244	Exon14	T → C c.1500T>C, (p.F499F)	T : 0.983 C : 0.017	1.000 0.000

*: CSHL-HAPMAP: HapMap-CEU

4.2.10. Exon 15

Im Intron 14 sind zwei SNPs beschrieben. Dabei handelt es sich um zwei Austausche von G zu A. In unserer Studienpopulation wurden nur die WT-Allele detektiert.

Tabelle 14: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 15 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs56832514	Intron 14	G → A IVS14-121G>A	G : unbekannt A : unbekannt	1.000 0.000
rs59309543	Intron 14	G → A IVS14-1G>A	G : unbekannt A : unbekannt	1.000 0.000

4.2.11. Exon 16

In der Literatur findet man in der im Rahmen dieser Doktorarbeit sequenzierten Region eine Insertion (Ins) und eine Deletion im Intron 15. Außerdem wurden noch zwei SNPs im Exon veröffentlicht. Der Erste verändert die AS Tyrosin (Y) und die AS-Abfolge nicht. Bei dem zweiten SNP (rs541275817) wird die AS Arginin (R) durch Glutamin (Q) ersetzt. Dies scheint keinen Einfluss auf die PKC γ -Funktion zu haben.

Bei einer Probe wurde im Rahmen dieser Arbeit an der Stelle +39/40 die heterozygote Insertion eines T im Intron 16 festgestellt.

Tabelle 15: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 16 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung*	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs35682261	Intron 15	InsG IVS15-120/121InsG	- : unbekannt G : unbekannt	1.000 0.000
rs66493548	Intron 15	DelA IVS15-47DelA	A : unbekannt - : unbekannt	1.000 0.000
rs34616316	Exon 16	C → T c.1722C>T, (p.Y574Y)	C : 0.984 T : 0.016	1.000 0.000
rs541275817	Exon 16	G → A c.1739G>A, (p.R580Q)	G : unbekannt A : unbekannt	1.000 0.000
rs60536476	Intron 16	InsT IVS16+39/40InsT	- : unbekannt T : unbekannt	0.981 0.019

*: APPLERA_GI: AGI_ASP population

Die fettgedruckten Sequenzvarianten wurden bei Patienten im Rahmen dieser Doktorarbeit gefunden.

4.2.12. Exon 17

Die drei in der Tabelle 16 aufgezählten SNPs konnten in unserem Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 16: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon17 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs45548139	Intron 16	G → A IVS16-59G>A	G : unbekannt A : unbekannt	1.000 0.000
rs56211557	Exon17	C → T c.1836C>T, (p.G612G)	C : unbekannt T : unbekannt	1.000 0.000
-----	Intron17	T → G IVS17+29T>G	T : --- G : ---	0.981 0.019
rs73603631	Intron 17	G → C IVS17+72G>C	G : unbekannt C : unbekannt	1.000 0.000

Die fettgedruckten Sequenzvarianten wurden bei Patienten im Rahmen dieser Doktorarbeit gefunden.

Bei einem Patienten konnte an der Position +29 in Intron 17 ein bisher unbekannter SNP bestimmt werden, der einen heterozygoten Austausch von T zu G darstellt. Dieser SNP wird in Abbildung 11 gezeigt.

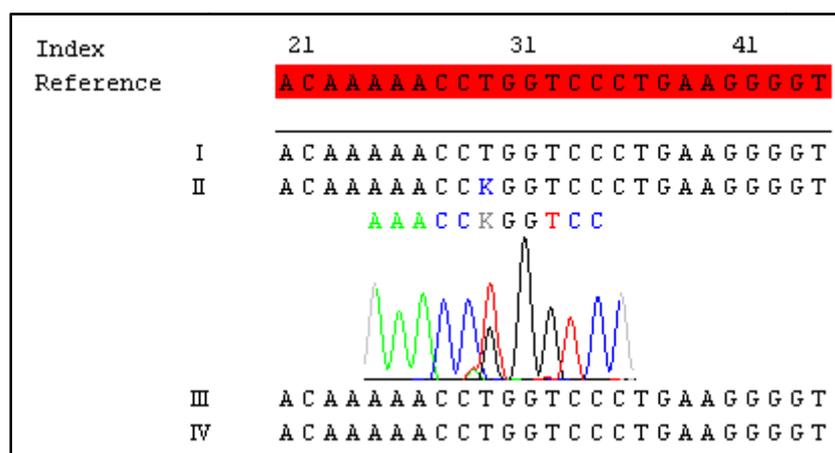


Abbildung 11: Teilbereich der Intron 17 Sequenz des *PRKCG*-Gens. Die Auswertung erfolgte mit SeqScape (ABI). Index zeigt die Nukleinsäureposition in Bezug auf Exon 17 an. Reference ist die Nukleinsäure-Referenzsequenz. I-IV sind 4 Studienteilnehmer, wobei bei II ein Teil eines Elektropherogramms dargestellt ist. Der heterozygote Austausch von T zu G ist markiert.

4.2.13. Exon 18

Im PCR-Produkt, das Exon 18 und die flankierenden Bereiche abdeckt, sind vier SNPs beschrieben. Dabei handelt es sich um einen G zu A Austausch im Intron 17 und zwei stumme Basenaustausche im Exon 18. Außerdem wurde an der Position 2059 noch ein SNP nachgewiesen, der zu einer Veränderung der AS-Sequenz führt. Die AS Serin (S) wird durch Glycin (G) ersetzt. Dies scheint keinen Einfluss auf die Funktion von PKC γ zu haben. Keiner dieser SNPs konnte in unserer Studienpopulation nachgewiesen werden.

Tabelle 17: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 18 und flankierender Regionen

Referenz-sequenz	Lokalisation	Austausch	Allelfrequenz Bevölkerung*	Allelfrequenz Proben-Kollektiv
rs12462083	Intron 17	G \rightarrow A IVS17-11G>A	G : 1.000 A : 1.000	1.000 0.000
rs2242243	Exon 18	C \rightarrow T c1941C>T, (p.F647F)	C : unbekannt T : unbekannt	1.000 0.000
rs55803961	Exon 18	G \rightarrow C c.2043G>C, (p.V681V)	G : unbekannt C : unbekannt	1.000 0.000
rs73937614	Exon 18	A \rightarrow G c.2059A>G, (p.S687G)	A : unbekannt G : unbekannt	1.000 0.000

*: CSHL-HAPMAP:HapMap-CEU

4.3. Nachweis von krankheitsauslösenden Mutationen

Im Folgenden soll auf identifizierte Sequenzvariationen eingegangen werden, die eine Änderung der AS-Sequenz hervorrufen und krankheitsauslösend sein können.

4.3.1. Exon 2

4.3.1.1. Mutationsnachweis in Exon 2

Im Exon 2 des *PRKCG*-Gens wurde bei einem der 26 Patienten eine bisher noch unbekannte Alteration der DNA-Sequenz gefunden. An c(omplementary)DNA-Position 188 fand ein heterozygoter Nukleotidaustausch von G zu T statt. Das ursprüngliche Codon GGC wird durch die Mutation an der zweiten Position im Codon zu GTC modifiziert (Abb.12). Daraus resultiert eine Veränderung der AS-Sequenz an Position 63. Die AS Glycin (G) wird durch Valin (V) ersetzt. Die Bezeichnung für die Mutation auf AS-Ebene lautet G63V. Der AS-Austausch befindet sich in der regulatorischen C1-Domäne in der Cys1-Region von PKC γ .

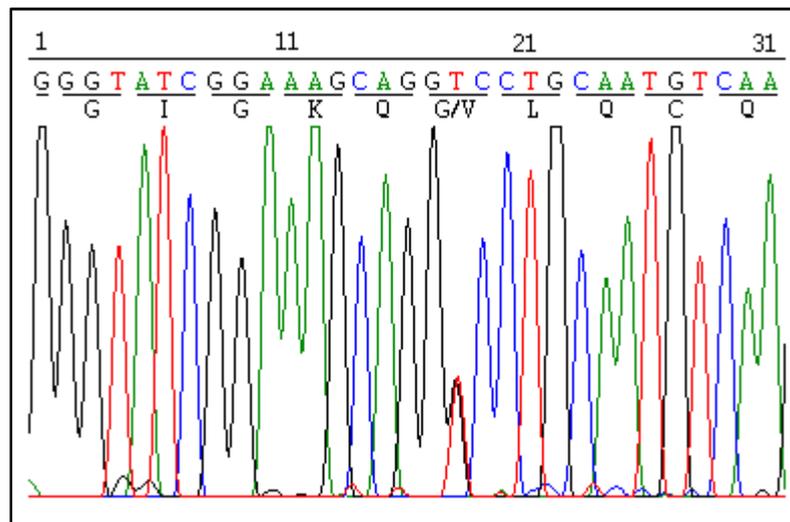


Abbildung 12: Sequenzanalyse von Exon 2 des *PRKCG*-Gens. Dargestellt ist der heterozygote G zu T Austausch. Unterhalb der DNA-Sequenz ist die AS-Sequenz mit der Alteration im Codon 63 angegeben.

4.3.1.2. Analyse eines Kontrollkollektivs

Der Aminosäureaustausch liegt in einer hochkonservierten Region des Proteins. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass die Veränderung in der Nukleotid-Abfolge des *PRKCG*-Gens krankheitsverursachend wirken kann.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der nachgewiesenen Variante um einen Polymorphismus oder eine krankheitsverursachende Mutation handelt, wurde ein Kontrollkollektiv von Probanden ohne neurologische Erkrankung auf die Variante untersucht. Für eine statistisch signifikante Aussage wurde die DNA von 130 Probanden (260 Chromosomen) getestet. Die Analyse wurde über die Bestimmung eines Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP) durchgeführt. Die Methode ermöglicht die zügige Analyse großer Probenmengen über

Restriktionsverdau und Gelelektrophorese, ohne dass die Notwendigkeit besteht, die DNA jeder Kontrolle sequenzieren zu müssen (Abb.13).

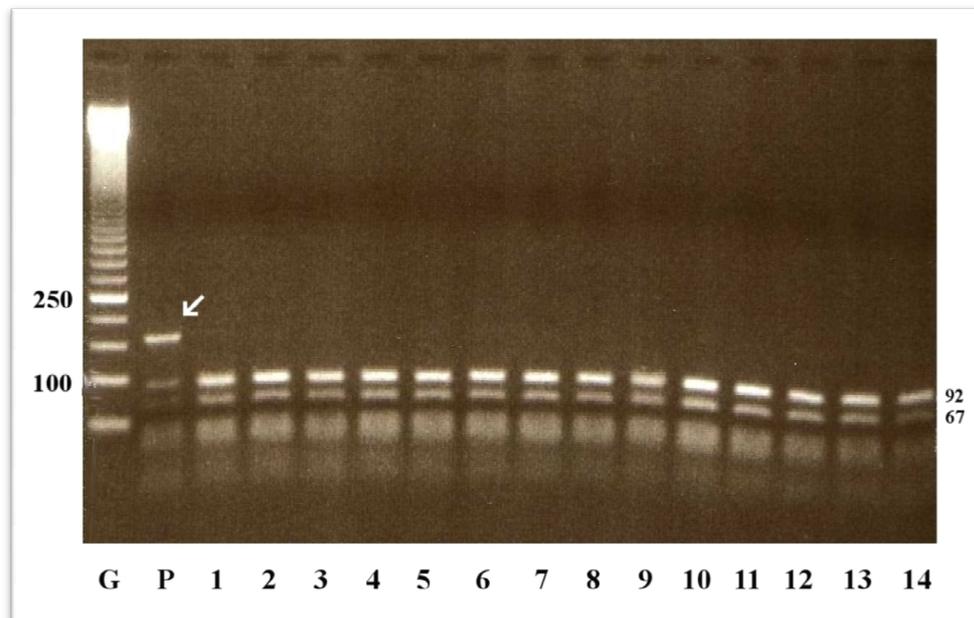


Abbildung 13: Agarose-Gel zur Darstellung der RFLP-Analyse im Exon 2 von *PRKCG*. G: Größenstandard 50Bp-Ladder, P: Positiv-Kontrolle (Patient mit Exon 2 Mutation), 1-14: negative Kontrollen. Der Pfeil markiert die zusätzliche Bande nach Restriktionsverdau des PCR-Fragmentes mit Mutation.

Abbildung 13 zeigt der Reihe nach einen Größenstandard, die Probe des erkrankten Patienten und 14 negative Kontrollen. Das Enzym HaeIII teilt die 318 Bp großen PCR-Produkte des Exon 2 in Fragmente folgender Länge auf: 92 Bp, 67 Bp, 40 Bp, 36 Bp, 33 Bp, 30 Bp und 20 Bp. In der Abbildung sind v.a. die beiden längsten Fragmente (92 und 67 Bp) zu erkennen (Spuren 1-14). Die kleinen Fragmente können aufgrund ihrer geringen Längendifferenz nicht voneinander aufgetrennt werden. Durch die heterozygote Mutation entsteht bei der Positiv-Kontrolle eine Bande mehr, welche die Länge 159 Bp (durch einen Pfeil markiert) besitzt, da eine HaeIII-Schnittstelle verloren geht. Dieses Fragment war bei keiner der neurologisch unauffälligen Personen zu finden. Damit wurde gezeigt, dass bei keiner der Kontrollproben die Mutation vorliegt.

Beim ebenfalls an einer Ataxie erkrankten Vater des Patienten konnte durch Sequenzierung der gleiche heterozygote Basenaustausch in Exon 2 des *PRKCG*-Gens nachgewiesen werden. Andere betroffene Familienmitglieder standen für die molekulare Testung nicht zur Verfügung (Nolte et al., 2007a).

4.3.1.3. Konserviertheit der mutierten AS

Die G63V-Mutation liegt in der hochkonservierten Cys1-Region der C1-Domäne. In der Abbildung 14 wurden Teile der C1 Domäne von Mitgliedern der humanen PKC-Familie verglichen. Der konservierte Glycin-Rest findet sich auch bei anderen Species.

Mutation Exon 2				
PKC γ	Mensch	51-HCTDFIWG-I	GKQGLQCQVC	SFVVHRRCHE
PKC α	Mensch	52-HCTDFIWG-F	GKQGFQCQVC	CFVVHKRCHE
PKC β	Mensch	52-HCTDFIWG-F	GKQGFQCQVC	CFVVHKRCHE
PKC δ	Mensch	174-VCKDFVWG-L	NKQGYKCRQC	NAAIHKKCID
PKC ϵ	Mensch	185-HCRDFIWGVI	GKQGYQCQVC	TCVVHKRCHE
PKC η	Mensch	186-HCREFIWGVF	GKQGYQCQVC	TCVVHKRCHH
PKC θ	Mensch	175-VCHEFVWG-L	NKQGYQCRQC	NAAIHKKCID
PKC γ	Hase	51-HCTDFIWG-I	GKQGLQCQVC	SFVVHRRCHE
PKC γ	Rind(Fragm.)	---HCTDFIWG-I	GKQGLQCQVC	SFVVHRRCHE
PKC γ	Ratte	51-HCTDFIWG-I	GKQGLQCQVC	SFVVHRRCHE

Abbildung 14: Anordnung der AS-Sequenzen der Cys1-Region verschiedener Isoenzyme von PKC sowie PKC γ aus verschiedenen Organismen. Mit rot markiert: evolutionär hochkonservierte AS Glycin (G) (Sequenzen von www.uniprot.org)

4.3.1.4. Symptome

Der 1961 geborene Patient entwickelte 1995 eine dystone Bewegungsstörung des rechten Arms, die sich v.a. als Schreibkrampf äußerte. Außerdem litt er seit Kindheit an Gangunsicherheit, Gleichgewichtsstörungen und einer langsam progredienten Dysarthrie. Ein 1997 durchgeführtes MRT zeigte eine cerebelläre Atrophie. 2001 trat eine Progression der Dystonie im rechten Arm auf. Bei der neurologischen Untersuchung fielen Gangunsicherheit, Nystagmus, Dysarthrie, Schluckstörungen und herabgesetzte Sehnenreflexe der oberen und unteren Extremitäten auf, die auch bei der Messung der Nervenleitgeschwindigkeiten sichtbar waren. In einem zweiten MRT konnte keine Progression der cerebellären Atrophie festgestellt werden. Laborparameter waren unauffällig, auch das Screening auf Autoimmunkrankheiten und Morbus Wilson war negativ. Vitamin B12 und Vitamin E lagen im Normbereich. In der Liquoruntersuchung und im Elektroenzephalogramm (EEG) zeigten sich keine Auffälligkeiten.

4.3.1.5. Familiengeschichte

Die Familienanamnese ergab Hinweise auf eine Gangataxie und Gleichgewichtsstörung bei Vater und Tante, die im Alter von 50 bzw. 45 Jahren auftraten. Außerdem leidet der Cousin des Patienten an Dysarthrie und Gangataxie. Sowohl die Tante als auch der Cousin wünschten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine weitere Abklärung. Der Patient hat drei Kinder,

gesunde Zwillingstöchter und einen 14-jährigen Sohn, der erst mit 17 Monaten zu laufen und mit 3,5 Jahren zu sprechen begann. Zum jetzigen Zeitpunkt zeigt der Sohn leichte Gleichgewichtsstörungen und eine geringe Dysarthrie. Da eine Untersuchung bei Kindern nur dann erfolgen sollte, wenn sich aufgrund des Ergebnisses therapeutische Konsequenzen ergeben (Zerres, 2003), wurden die Kinder des Patienten nicht molekulargenetisch untersucht. Die Abbildung 15 zeigt den Stammbaum der Familie.

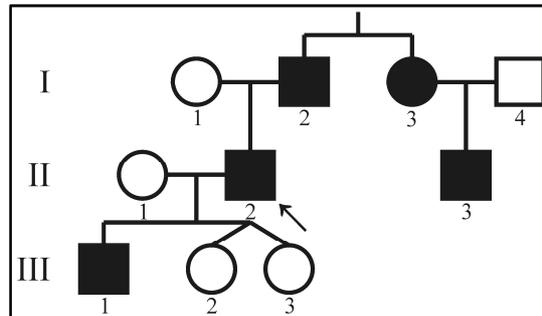


Abbildung 15: Stammbaum der Familie mit Mutation in Exon 2 des *PRKCG*-Gens. Schwarze Symbole kennzeichnen betroffene Personen. Der Index-Patient ist mit einem Pfeil markiert.

4.3.2. Exon 4

4.3.2.1. Mutationsnachweis in Exon 4

Im Exon 4 des *PRKCG*-Gens wurde bei einem der 26 Studienteilnehmer eine bereits bekannte Mutation nachgewiesen. An cDNA-Position 301 findet sich ein heterozygoter Austausch von C zu T. Dieser Austausch wurde bei zwölf Mitgliedern einer amerikanischen Familie holländischen und englischen Ursprungs beschrieben (Chen et al., 2003) und führt zu einer Alteration der AS-Sequenz an der Position 101, da das ursprüngliche Codon CAC durch die Mutation an der ersten Position zu TAC verändert wird. Statt der hydrophoben AS Histidin (H) wird die hydrophile AS Tyrosin (Y) eingebaut. Die Bezeichnung für die Mutation lautet H101Y. Der AS-Austausch befindet sich in der regulatorischen Cys2-Region von PKC γ . Abbildung 16 zeigt das Elektropherogramm unseres SCA14-Patienten mit nachgewiesener Mutation in Exon 4.

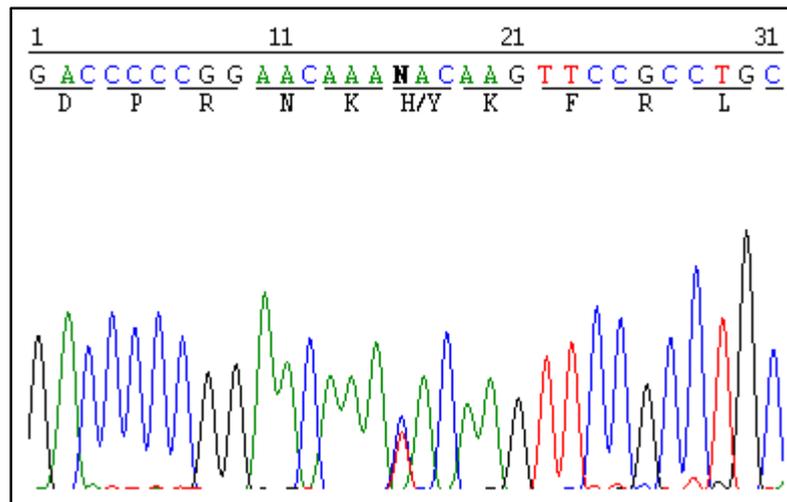


Abbildung 16: Sequenzanalyse von Exon 4 des *PRKCG*-Gens. Dargestellt ist der heterozygote C zu T Austausch. Unterhalb der DNA-Sequenz ist die AS-Sequenz mit der Alteration im Codon 101 angegeben.

4.3.2.2. Analyse eines Kontrollkollektivs

Da die Mutation bereits von einer anderen Arbeitsgruppe als krankheitsverursachend beschrieben wurde (Chen et al. 2003), konnte auf die Testung eines Kontrollkollektivs verzichtet werden. Familienangehörige unseres Patienten standen für eine Mutationsanalyse nicht zur Verfügung.

4.3.2.3. Konserviertheit der mutierten AS

Diese Mutation befindet sich in der regulatorischen C1-Domäne in der Cys2-Region. Die ursprüngliche AS H liegt in einer hochkonservierten Region (Abb.17).

Mutation Exon 4				
PKC γ	Mensch	91-GPQTDDPRNK	H KFRLHSYSS	PTFCDHCGSL
PKC α	Mensch	92-GPDTDDPRSK	H KFKIHTYGS	PTFCDHCGSL
PKC β	Mensch	92-GPASDDPRSK	H KFKIHTYSS	PTFCDHCGSL
PKC δ	Mensch	221-QKERFNIDMP	H RFKVHNYMS	PTFCDHCGSL
PKC ϵ	Mensch	233-GSQRFSVNMP	H KFGIHNYKV	PTFCDHCGSL
PKC η	Mensch	235-AEQRFGINIP	H KFSIHNYKV	PTFCDHCGSL
PKC θ	Mensch	222-HKERFKIDMP	H RFKVYNYKS	PTFCEHCGTL
PKC γ	Hase	91-GPQTDDPRNK	H KFRLHSYSS	PTFCDHCGSL
PKC γ	Rind(Fragm.)	---GPQTDDPRNK	H KFRLHSYSS	PTFCDHCGSL
PKC γ	Ratte	91-GPQTDDPRNK	H KFRLHSYSS	PTFCDHCGSL

Abbildung 17: Anordnung der AS-Sequenzen der Cys2-Region verschiedener Isoenzyme von PKC sowie PKC γ aus verschiedenen Organismen. Mit rot markiert: evolutionär hochkonservierte AS Histidin (H) (Sequenzen von www.uniprot.org)

4.3.2.4. Symptome

Der Patient entwickelte während der Schulzeit einen unsicheren Gang und einen M. Darier. Im Alter von 38 Jahren traten depressive Episoden und eine paranoide Psychose auf. Gangataxie und Tremor der Hände, die laut Patient langsam progredient waren, fielen mit 42 Jahren auf. Ein durchgeführtes MRT zeigte eine cerebelläre Hypoplasie. Weitere neurologische Untersuchungen wurden damals bei dem Patienten nicht durchgeführt, da man die Symptome als Nebenwirkungen der Medikamente gegen die paranoide Psychose betrachtete. Der Patient starb 2002 im Alter von 48 Jahren an einer Kardiomyopathie, so dass keine weitere Diagnostik möglich ist.

4.3.2.5. Familiengeschichte

In der Verwandtschaft traten bei dem Großvater und dem Onkel Bewegungsstörungen auf. Über die Mutter des Patienten sind keine Informationen bekannt. Zum Diagnosezeitpunkt waren alle betroffenen Verwandten bereits verstorben. Die folgende Abbildung veranschaulicht den Stammbaum der Familie (Abb.18).

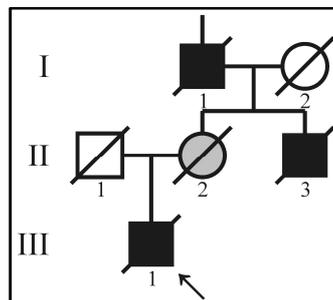


Abbildung 18: Stammbaum der Familie mit Mutation in Exon 4 des *PRKCG*-Gens. Schwarze Symbole kennzeichnen betroffene Personen. Es lagen keine klinischen Daten zu II/2 vor. Der Index-Patient ist mit einem Pfeil markiert.

4.4. Zusammenstellung der nachgewiesenen Sequenzalterationen

In Tabelle 18 werden die in dem untersuchten Patientenkollektiv gefundenen Abweichungen von der WT-Sequenz und deren Auswirkungen auf die AS-Synthese noch einmal zusammengefasst. Krankheitsverursachende Mutationen sind in rot dargestellt.

Tabelle 18: Übersicht über die verschiedenen Abweichungen von der Wildtypsequenz

Exone und ihre flankierenden Bereiche	Abweichung vom Wildtyp
1	C → T c.72C>T, (p.A24A)
2	G → T c.188G>T, (p.G63V)
3	C → T c.207C>T, (p.C69C)
4	A → C IVS3-66A>C C → T c.301C>T, (p.H101Y)
5	Keine
6	T → C c.567T>C, (p.N189N) G → T IVS6+14G>T
7	Keine
8	Keine
9	Keine
10	C → T Int9-95C>T
11	G → C IVS10-92G>C G → C IVS10-86G>C
12	Keine
13	Keine
14	Keine
15	Keine
16	Ins T IVS16+39/40insT
17	T → G IVS17+29T>G
18	Keine

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit SCA14, einer autosomal dominant vererbten Erkrankung, die durch Ataxie, Dysarthrie und weitere neurologische Symptome charakterisiert ist. SCA14 wird durch Mutationen im *PRKCG*-Gen, welches für die PKC γ codiert, verursacht. Da die regionale Verteilung der einzelnen SCA-Subtypen aufgrund von Gründer-Effekten unterschiedlich ist und zum Zeitpunkt der Studie noch keine SCA14 Fälle in Deutschland nachgewiesen waren, wurde für die hier vorliegende Arbeit ein Kollektiv an Ataxie-Patienten zusammengestellt. Die Familiengeschichte der ausgewählten Patienten weist auf eine autosomal dominant vererbte Bewegungsstörung mit nur langsamem Fortschreiten der Erkrankung hin, zudem konnten bei allen Patienten die Trinukleotidexpansionserkrankungen SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 und SCA17 ausgeschlossen werden. Ziel dieser Arbeit war es nun, die 26 ausgewählten Patienten auf Mutationen im *PRKCG*-Gen als Ursache für deren Symptome zu untersuchen und in diesem Zusammenhang festzustellen, ob SCA14 auch bei deutschen ADCA Patienten verbreitet ist.

5.1. Häufigkeit von SCA14

Genauere Angaben über die Häufigkeit der SCA14 liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor, da aufgrund der milden Ausprägung der Erkrankungen und des klinisch nicht eindeutigen Phänotyps wahrscheinlich eine hohe Dunkelziffer an SCA14 Fällen existiert. Zusätzlich durch die aufwändige Testung erschwert, wurde bisher nur bei wenigen Patienten SCA14 detektiert. Schätzungen über die Häufigkeit der SCA14 variieren von Prävalenzen von weniger als einem Prozent (Chen et al., 2005, updated 2010) bis zu annähernd vier Prozent (Verbeek et al., 2005a) der ADCA.

In dieser Arbeit wurden aus einer Gruppe von 350 Ataxie-Patienten 26 Personen aufgrund ihrer Familienanamnese und der klinischen Symptomatik vorselektiert. Bei den untersuchten Personen konnten zwei verschiedene Mutationen im *PRKCG*-Gen detektiert werden.

Es existieren Arbeiten, in denen eine geringere Vorselektion von ADCA Patienten für die nachfolgende Testung von SCA14 erfolgte. Dalski und Mitarbeiter testeten 208 Patienten und konnten eine Mutation detektieren (Dalski et al., 2006). Morita und Mitarbeiter untersuchten 148 Ataxie-Patienten, unter denen sich auch sporadische Fälle befanden, und konnten eine SCA14 Erkrankung nachweisen (Morita et al., 2006).

Klebe und Mitarbeiter testeten 284 Patienten auf SCA14 und konnten fünf Mutationen identifizieren (Klebe et al., 2005). In der Arbeit von van de Warrenburg und Mitarbeitern erfolgte die Untersuchung von 24 vorselektionierten Person. Bei einer Familie konnte SCA14 nachgewiesen werden (van de Warrenburg et al., 2003).

Beim Vergleich der oben beschriebenen Beispiele und der Auswahl der Patienten in dieser Arbeit kann man erkennen, wie bedeutend eine Vorselektion, d.h. der Ausschluss anderer bekannter Ataxie-Erkrankungen und die Einbeziehung eines milden Krankheitsverlaufs, für die Nachweiswahrscheinlichkeit von SCA14 ist.

5.2. Genetik der SCA14

5.2.1. Identifizierte Mutationen im *PRKCG*-Gen

H101Y-Mutation in Exon 4

Bei einem der 26 Studienteilnehmer wurde die bekannte Mutation H101Y nachgewiesen. Diese Mutation wurde bereits 2003 bei zwölf Mitgliedern einer nicht mit unserem Indexpatienten verwandten amerikanischen Familie beschrieben.

Bei der Mutation handelt es sich um einen C zu T Nukleotidaustausch in Exon 4 des *PRKCG*-Gens, der zu einer Änderung der AS-Sequenz führt. Statt Histidin wird an Position 101 Tyrosin eingebaut. Chen und Mitarbeiter konnten bei 192 gesunden Kontrollpersonen (384 Chromosomen) diesen Austausch nicht lokalisieren und folgerten so einen pathophysiologischen Effekt dieses Austausches (Chen et al, 2003).

Exon 4 ist evolutionär in allen Säugetieren, Vertebraten und in allen Cys2-Regionen der PKC-Familie konserviert. Die H101Y-Mutation, die bei unserem Studienteilnehmer und bei den Erkrankten der amerikanischen Familie nachgewiesen wurde, liegt in dieser hochkonservierten Region, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass eine Mutation in Exon 4 das Erscheinungsbild von SCA14 auslösen kann (Abb.17). Weiterhin zeigte sich im „Solution-Structure Modeling“, dass das Rückgrat der mutierten PKC γ im Gegensatz zum WT-Protein instabil war (Chen et al., 2003).

Sowohl die Erkrankten innerhalb der amerikanischen Familie als auch unser Studienteilnehmer wiesen eine langsam progrediente Ataxie und eine im MRT bestätigte cerebelläre Hypoplasie auf. Aufgrund des Todes des Patienten waren keine weiterführenden

neurologischen Untersuchungen möglich. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben den in 4.3.2.4. beschriebenen Symptomen noch weitere vorhanden waren.

Bei Patienten der amerikanischen H101Y-Familie kamen zusätzlich Dysarthrien und Augenbewegungsstörungen wie Nystagmen vor. Das Reflexverhalten der einzelnen Personen war nicht einheitlich und variierte von abgeschwächt bis gesteigert. Weitere Symptome wie z.B. Myoklonien oder mentale Retardierung kamen nicht vor. Insgesamt zeigte sich bei den Erkrankten der amerikanischen SCA14-Familie eine nur milde Symptomatik (Brkanac et al., 2002; Chen et al., 2003).

Im Gegensatz dazu trat bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Patienten zusätzlich ein Tremor beider Hände auf. Außerdem litt er an depressiven Episoden und an einer paranoiden Psychose (Nolte et al., 2007b). Es ist allerdings fraglich, ob diese Symptome auf die Mutation im *PRKCG*-Gen zurückzuführen sind, denn der Studienteilnehmer litt zusätzlich an M. Darier, einer autosomal dominant vererbten Hauterkrankung, bei der neben Hauterscheinungen sehr selten auch psychiatrische Symptome wie bipolare Störungen, Schizophrenie oder Psychosen auftreten können (Sehgal und Srivastava, 2005). Ungewiss ist, ob die psychiatrischen Zeichen des Patienten nur durch M. Darier bedingt sind oder inwieweit auch SCA14 daran beteiligt ist, denn auch bei SCA14-Erkrankten können Depressionen auftreten (Chen et al., 2005). Denkbar wäre, dass SCA14 die durch M. Darier aufgetretenen Symptome aggraviert.

Im Codon 101 wurden zwei weitere Mutationen nachgewiesen, die die AS Histidin betreffen. In einer portugiesischen Familie wurde ein Austausch von C zu G des Nukleotids 303 entdeckt. Anstelle von Histidin wird Glutamin eingebaut (Alonso et al., 2005). In einem sporadischen Fall wurde eine 6-Bp-Deletion gefunden. Dadurch werden Lysin und Histidin deletiert (Chen et al., 2005). Histidin 101 scheint ein „Hot Spot“ für Mutationen zu sein, denn dieses Codon ist bis jetzt am häufigsten von Alterationen betroffen (Nolte et al., 2007b).

Auch bei den Betroffenen der beiden zuletzt genannten Mutationen in Codon 101 wurde eine milde, rein cerebelläre Symptomatik festgestellt. Eine Ausnahme bildet der Studienteilnehmer dieser Arbeit, dessen psychiatrische Zeichen durch M. Darier bedingt und dessen Tremor auch eine Medikamentennebenwirkung sein könnte. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist bei der kleinen Anzahl an Erkrankten jedoch problematisch.

Zusammenfassend weisen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde und die anderer Gruppen darauf hin, dass die Mutation H101Y den Phänotyp einer SCA14 verursacht.

G63V-Mutation in Exon 2

Bei einem der 26 Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurde eine bisher unbekannte Mutation entdeckt. Im Exon 2 des *PRKCG*-Gens wurde ein Nukleotidaustausch von T zu G nachgewiesen, der die AS-Sequenz verändert. Anstelle von Glycin wird an Position 63 Valin eingebaut (G63V). Auch bei dem erkrankten Vater des Indexpatienten konnte die G63V-Mutation identifiziert werden. Diese Variante in der AS-Sequenz konnte bei 130 neurologisch gesunden Kontrollpersonen nicht nachgewiesen werden.

Die G63V-Mutation liegt in der hochkonservierten Cys1-Region der C1-Domäne von PKC γ . Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass diese Veränderung der AS-Sequenz den Phänotyp von SCA14 verursachen kann (Abb.14).

Des Weiteren wurde der Algorithmus des computergestützten Programms SIFT verwendet, um festzustellen, ob der hier nachgewiesene AS-Austausch einen Einfluss auf Struktur und Funktion von PKC γ hat. Dieser beruht auf dem Vergleich einer Sequenz zu ähnlichen homologen und orthologen Sequenzen und unterscheidet anhand von Wahrscheinlichkeiten tolerierte von nicht tolerierten AS-Substitutionen. Mit Hilfe des SIFT-Programmes (Ng und Henikoff, 2001) konnte errechnet werden, dass der G zu V Austausch an der Position 63 nicht toleriert wird. Aus diesen und den oben genannten Gründen ist es sehr wahrscheinlich, dass die G63V-Mutation SCA14 auslöst (Nolte et al., 2007a).

Über die physiologischen Auswirkungen der G63V-Mutation können nur Hypothesen aufgestellt werden. Die AS-Abfolge der Cys1- und Cys2-Region des *PRKCG*-Gens zeigt, dass die AS Glycin an Position 63 der Cys1-Domäne mit der des Glycins an Stelle 128 der Cys2-Region korrespondiert. Im „Solution-Structure Modeling“ konnte vorhergesagt werden, dass Mutationen an Position 128 indirekt die Form der Phorbolster-Bindungsstelle verändern und damit die Bindungsaffinität für Phorbolster reduzieren (Chen et al., 2003). Aus diesem Grund könnte sich auch die G63V-Mutation der Cys1-Domäne auf die Phorbolsterbindungsaffinität auswirken (Nolte et al., 2007a).

Zusätzlich zu der oben beschriebenen G63V-Mutation sind mit den Mutationen R41P (Chen et al., 2005) und C77S (Wieczorek et al., 2007) inzwischen drei Veränderungen innerhalb der Cys1-Region bekannt. Die klinischen Symptome der Patienten variieren.

Unser Indexpatient weist eine seit der Kindheit progressive Gangataxie, Balancestörungen, Dysarthrie und Nystagmus auf. Auch seine Reflexe sind vermindert. Zusätzlich zur

cerebellären Symptomatik fallen Schluckstörungen und eine Dystonie im rechten Arm, die sich v.a. als Schreibkrampf äußert, auf.

Die von Chen und Mitarbeitern identifizierte Mutation R41P löst bei den betroffenen Personen eine leichtere Symptomatik mit Gangataxie, Dysarthrie und einem späteren Erkrankungsbeginn aus. Auch bei der von Wieczorek und Mitarbeitern beschriebenen Patientin mit der Mutation C77S trat die cerebelläre Symptomatik erst im Erwachsenenalter auf. Daneben litt die betroffene Person noch an moderaten depressiven Episoden, die weder in dieser Arbeit noch bei Chen und Mitarbeitern beschrieben wurden. Bei allen Patienten mit einer Mutation in der Cys1-Region ließ sich im MRT eine cerebelläre Atrophie nachweisen (Chen et al., 2005; Wieczorek et al., 2007). Insgesamt zeigt sich bis auf die cerebelläre Symptomatik kein einheitliches Krankheitsbild. Allerdings scheint aufgrund der kleinen Anzahl an betroffenen Personen eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation problematisch.

Die drei verschiedenen Mutationen in der Cys1-Domäne zeigen, dass auch in dieser Region SCA14 verursachende Mutationen auftreten können, wenn auch seltener als in der Cys2-Domäne.

5.2.2. Identifizierte Polymorphismen im *PRKCG*-Gen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten mehrere intronische und exonische SNPs nachgewiesen werden, die in der Literatur bereits bekannt sind. Die Auftretenshäufigkeiten, soweit sie angegeben waren, ähneln denen in dieser Studie. Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs von 26 Patienten ist es nicht möglich, diesbezüglich eine signifikante Aussage zu treffen. Dennoch scheint die untersuchte Studienpopulation hinsichtlich des genetischen Hintergrunds vergleichbar mit dem der Normalbevölkerung von Amerikanern europäischen (CSHL-HAPMAP: HapMap-CEU) oder afrikanischen Ursprungs (APPLERA_GI: AGI_ASP population) zu sein. Andere Polymorphismen, die nur sehr selten auftreten, konnten in dieser Arbeit nicht lokalisiert werden. Dies kann an der verhältnismäßig kleinen Stichprobe liegen, die von uns untersucht wurde.

Zusätzlich trat in dieser Arbeit in Exon bzw. in Intron 6 eine Kopplung der beiden SNPs rs3745406 und rs3745405 auf. Da zwischen den beiden SNPs nur 132 Basenpaare liegen, ist eine gekoppelte Vererbung möglich.

Außerdem zeigten sich zwei bisher nicht bekannte SNPs. Beide liegen in intronischen Bereichen. Der erste Polymorphismus liegt in der IVS 10 an Position -86, d.h. vor dem 5‘

Anfang von Exon 11. Der Zweite befindet sich im Intron 17 an der Stelle +29, d.h. nach dem 3' Ende von Exon 17.

SNPs in konservierten Bereichen eines Introns können durch Beeinträchtigung der Spleißreaktion entweder zu „Exon Skipping“ führen, bei dem ein komplettes Exon zusammen mit den benachbarten IVS aus der transkribierten Sequenz entfernt wird, oder zu „Intron Retention“. Hier wird ein Intron nicht aus der heterogenen nukleären RNA entfernt. Solche hoch konservierten Sequenzen sind die GT – AG Nukleotide, die am Beginn der 5' Seite bzw. am Ende der 3' Seite der IVS stehen. Ebenfalls konserviert sind die die Spleißdonor- (5') und Spleißakzeptor-(3')Nukleotide umgebenden Exon- und Intronsequenzen, die Spleißverzweigungsstelle, die ca. 40 Nukleotide oberhalb des Spleißakzeptors liegt, und ein Polypyrimidin-Abschnitt, der zwischen der 3' Spleißstelle und der Verzweigungsstelle liegt (Berget, 1995; Lim und Burge, 2001; Strachan und Read, 2005).

Die in dieser Arbeit identifizierten neuen SNPs liegen in keinem der genannten Bereiche, so dass es sich um Varianten ohne pathophysiologischen Effekt handelt.

5.2.3. Verteilung bekannter/neuer Mutationen im *PRKCG*-Gen

Wie in der Einleitung beschrieben, enthält $PKC\gamma$ vier konservierte (C1-C4) Regionen, wobei diese in eine regulatorische (C1-C2) und katalytische (C3-C4) Domäne gegliedert werden können. Für die Aktivierung sind in erster Linie die in der C1-Region liegenden zwei cysteinreiche Regionen (Cys1 und Cys2) und die in der C2-Domäne enthaltenen multiplen Aspartat-Reste notwendig, die Calcium (Ca^{2+})-Ionen koordinieren. In der katalytischen Einheit liegt die ATP-Bindungsstelle (C3), die Phosphattransferregion (C4) und die Substratbindungsstelle (C4).

Bis Dezember 2009 waren 23 verschiedene Mutationen im *PRKCG*-Gen bekannt, die SCA14 auslösen. 15 davon befinden sich in der C1 Domäne in der Cys2-Region, die auf DNA-Ebene in erster Linie von Exon 4 und 5 codiert wird. Zusammen mit dem unter 4.3.2. beschriebenen Patienten weisen 18 Familien bzw. ca. 83 Personen Mutationen in dieser Domäne auf. Insgesamt sind 25 Familien bzw. ca. 121 Personen an SCA14 erkrankt. Das heißt, dass ca. 70 Prozent aller SCA14-Fälle Mutationen im Cys2-Bereich tragen. Daraus folgt, dass dieser Bereich anfällig für Mutationen zu sein scheint oder dass v.a. Mutationen in dieser Region so geringe Auswirkungen haben, dass sie lebensfähig sind und damit „sichtbar“ werden.

Betrachtet man die Verteilungshäufigkeit von Mutationen im gesamten *PRKCG*-Gen, so wurden 13 Mutationen in Exon 4 nachgewiesen. Eine Besonderheit ist, dass in Exon 4

lokalisierte Mutationen weltweit unabhängig voneinander aufgetreten sind. Ein Beispiel ist die AS-Position 128 des Exon 4, an der sowohl bei einer amerikanischen (Chen et al., 2003) als auch bei einer japanischen Familie (Morita et al., 2006) ein Austausch von Glycin zu Aspartat nachgewiesen werden konnte. In der von Exon 4 codierten Region finden sich vier weitere AS-Positionen, die zwei verschiedene Mutationen aufweisen können: An der Position 119 kam ein Austausch von Serin durch Prolin (Chen et al., 2003) oder Phenylalanin (Hiramoto et al., 2006), an der Position 123 von Glycin durch Arginin (Klebe et al., 2005) oder Glutamat (Klebe et al., 2005) und an der Position 131 von Cystein durch Arginin (Dalski et al., 2006) oder Tyrosin (Klebe et al., 2007) vor. All diese Mutationen zeigen, dass insbesondere innerhalb von Exon 4 bestimmte Positionen relative „Hotspots“ für Mutationen sind (Chen et al., 2005 updated 2010).

Auch an Position 101 waren bisher sowohl ein Austausch der AS Histidin durch Tyrosin (Chen et al., 2003) als auch durch Glutamin (Alonso et al., 2005) bekannt. In dieser Arbeit konnte die bereits durch Chen und Mitarbeiter detektierte H101Y Mutation bei einem deutschen Patienten nachgewiesen werden. Bis zum heutigen Tag ist die Position 101 die am häufigsten durch Mutationen betroffene Stelle innerhalb des *PRKCG*-Gens.

Von den acht anderen Mutationen im *PRKCG*-Gen liegen drei in der Cys1-Region: R41P (Chen et al., 2005), G63V (diese Arbeit) und C77S (Wieczorek et al., 2007). Drei Weitere befinden sich in der V5-Region, wobei F643L (Stevanin et al., 2004) in der konservierten Region des „Turn Motifs“ liegt. Die beiden anderen Mutationen, V692G (Klebe et al., 2005) und M697I-Ex13(c.2089-2192del) (Asai et al., 2009), finden sich im hochvariablen carboxyterminalen Ende des Enzyms (Steinberg, 2008). Die letzten zwei Mutationen, G360S (Klebe et al., 2005) und S361G (Chen et al., 2005), liegen an der ATP-Bindungsstelle der Kinase-Domäne (Hug und Sarre, 1993).

Auffällig ist, dass bisher in bestimmten Regionen keine Veränderungen der AS-Sequenz detektiert werden konnten. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Ein Austausch kann so geringe Auswirkungen auf die Funktion von PKC γ haben, dass die Mutation nicht pathogen ist, also keine Erkrankung verursacht wird. Dies könnte v.a. für nicht sehr hoch konservierte Regionen zutreffen, in denen eine Punktmutation die Funktion des Enzyms wenig beeinflussen würde.

Ein Beispiel hierfür könnte die C2-Domäne sein, die von Exon 5 (nach der C150F-Mutation) bis Exon 8 codiert wird (Steinberg, 2008). Diese Region ist in vielen Proteinen wie z.B. in der Proteinkinase C oder der Phospholipase C in ähnlicher Struktur vorhanden und zeigt immer die gleiche tertiäre Anordnung von antiparallelen β -Strängen und verbindenden Schleifen.

Dennoch ist die Domäne in ihrer AS-Sequenz sehr variabel (Cho, 2001). Mutationen der C2-Region, die bisher in Versuchen eine Veränderung der Enzymaktivität von Isoenzymen von PKC γ hervorgerufen haben, liegen an hochkonservierten Positionen (Medkova und Cho, 1998; Edwards und Newton, 1997). Dies könnte darauf hinweisen, dass auch bei PKC γ innerhalb der C2-Domäne nur Mutationen an hochkonservierten Stellen eventuell SCA14 auslösen können und dies der Grund ist, warum in diesem Bereich bisher keine Mutationen detektiert werden konnten.

Ein anderer Grund, warum in bestimmten Regionen kein Nachweis von Mutationen gelungen ist, könnte eine so starke Veränderung der Eigenschaften von PKC γ sein, dass diese letal ist oder aufgrund eines so schweren Phänotyps nicht als SCA14 klassifiziert wird. Ein Beispiel hierfür könnte die katalytische Domäne sein, die eine hohe Sequenzhomologie mit verwandten Kinasen und über 60 Prozent Sequenzidentität innerhalb der PKC-Familie aufweist (Xu et al., 2004; Grodsky et al., 2006).

Exon 10 beispielsweise codiert unter anderem für die ATP-Bindungsstelle. Dort verursachen zwei Mutationen SCA14. Auf Proteinebene wird an der AS-Position 360 Glycin gegen Serin getauscht und an der Position 361 Serin gegen Glycin. Diese beiden AS sind in ihren Eigenschaften relativ ähnlich (Grantham, 1974; Strachan und Read, 2005). Dennoch ist dieser Austausch, der durch Mutationen im Exon 10 verursacht wird, krankheitsauslösend. Dies könnte bedeuten, dass ein Austausch von AS, die sich grundlegend in ihren Eigenschaften unterscheiden, an den konservierten Stellen zu einer zu großen Funktionsbeeinträchtigung der Kinase führt. Ein Beispiel hierfür lässt sich bei der PKC θ , einem weiteren Isoenzym von PKC γ , finden: Mutationen in hochkonservierten Bereichen der Kinasedomäne können bis zur katalytischen Inaktivität von PKC γ führen (Xu et al, 2004). Es könnte sein, dass eine so große Beeinträchtigung der Enzymfunktion bei Menschen nicht mehr mit dem Leben vereinbar ist oder einen anderen Phänotyp als SCA14 verursacht.

5.3. Zellphysiologische Auswirkung von PKC γ Mutationen

Es gibt drei mögliche Mechanismen, die die Auswirkungen der Mutationen auf die einzelnen Zellen und damit die Entstehung von SCA14 erklären könnten. Die Mutationen könnten durch Zugewinn einer Funktion, die toxisch für die Zelle ist, durch reinen Funktionsverlust von PKC γ oder durch Funktionsverlust, der zusätzlich einen negativen Effekt auf die endogene PKC γ hat, SCA14 auslösen.

5.3.1. Zugewinn einer toxischen Funktion

Für den Zugewinn einer toxischen Funktion von PKC γ spricht die Aggregatbildung, die von Seki und Mitarbeitern gefunden wurde. In Zusammenhang mit diesen Aggregaten sank die Löslichkeit von PKC γ . Dies führte zu einer Erniedrigung der Aktivität des Enzyms. Außerdem stieg parallel zur Expression auch die Rate an Zellen, die in Apoptose übergingen (Seki et al., 2005). Passend zu dieser Theorie wurde in einer Studie bei normalem Expressionslevel von PKC γ eine mit der Zeit abnehmende Proteinmenge gemessen, die durch den Einschluss in Aggregate verursacht sein könnte (Alonso et al., 2005).

In einer zweiten Studie stellten Seki und Mitarbeiter fest, dass die Aggregate zu einer Anlagerung von Ubiquitin führen. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) dient der Degradation von z.B. falsch-gefalteten cytosolischen Proteinen. Die Anlagerung von Ubiquitin führt zu einer erniedrigten Aktivität des UPS im restlichen Cytoplasma. Durch die verminderte UPS-bedingte Proteindegradation deutete sich in den Zellen die Einleitung der Apoptose an. Diese Kaskade spricht dafür, dass SCA14 durch einen Funktionszugewinn entstehen könnte, der toxisch für die Zelle ist. Die Anlagerung von Ubiquitin konnte nur bei zwei (S119P, G128D) der vier untersuchten Mutationen nachgewiesen werden. Diese beiden Mutationen liegen in der Cys2-Domäne. Bei einer anderen Mutation (S119F) der Cys2-Region zeigte sich keine signifikante Ubiquitinanlagerung (Seki et al., 2007). Auch bei der in dieser Arbeit identifizierten Mutation H101Y konnte von Seki und Mitarbeitern keine signifikant vermehrte Aggregatbildung nachgewiesen werden (Seki et al., 2005), so dass diese Kaskade nicht der ausschlaggebende Pathomechanismus, sondern vielleicht ein Nebeneffekt (Lin und Takemoto, 2007) sein könnte. Außerdem wurden auch bei einer post mortem durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung des Cerebellums keine Einschlüsse in den Purkinje-Zellen entdeckt (Chen et al., 2003).

Kürzlich wurden Aggregate ohne exzessive Expression exogen mutierter PKC γ nachgewiesen. Diese konnten sich aber in den untersuchten Purkinje-Zellen zurückbilden. Außerdem beobachtete man, dass Aggregate zwar die Apoptose triggern, aber nicht der kritische Punkt dafür sind (Seki et al., 2009).

Neben der Aggregatbildung wird in der Literatur eine gesteigerte PKC γ -Aktivität als Funktions-Zugewinn durch PKC γ -Mutationen diskutiert. Die Erhöhung der Kinaseaktivität wurde durch oxidativen Stress verstärkt. In der Studie von Asai und Mitarbeitern wurde durch eine gesteigerte PKC γ -Aktivität die Phosphorylierung von Aprataxin ausgelöst, das bei einer autosomal rezessiven Ataxie mutiert ist. Dadurch wurde die Funktion des Enzyms wie z.B.

die Reparatur von oxidativen DNA-Schäden beeinträchtigt und in den betroffenen Zellen eine verfrühte Apoptose eingeleitet (Asai et al., 2009).

Auch Verbeek und Mitarbeiter beobachteten eine erhöhte katalytische basale Kinaseaktivität der PKC γ bei Vorliegen von Mutationen in der Cys2-Region. Außerdem konnten sie nachweisen, dass bei durch Calcium bedingter Aktivierung von mutierter PKC γ im Vergleich zum WT mehr mutierte Enzyme an die Plasmamembran translozieren. Durch eine mutationsbedingte Konformationsänderung könnte eine Disinhibition und damit eine vermehrte katalytische Aktivität ausgelöst werden (Verbeek et al., 2005b). Diese Konformationsänderung wurde in Strukturmodellen bestätigt (Chen et al., 2003; Lin et al., 2007; Verbeek et al., 2008).

5.3.2. Funktionsverlust

In anderen Studien konnte dagegen eine verminderte Kinaseaktivität nachgewiesen werden, was für einen Funktionsverlust als Auslöser für SCA14 spricht. Verbeek und Mitarbeiter stellten 2008 fest, dass die Kinasefunktion von allen PKC γ , die Mutationen in der Cys2-Region trugen, herabgesetzt ist, obwohl sie eine verstärkte Translokation an die Plasmamembran zeigten. Dies steht im Widerspruch zu der Studie von 2005, wobei dort die PKC γ -Aktivität nicht innerhalb einer lebenden Zelle gemessen wurde (Verbeek et al., 2005b). 2008 zeigte sich, dass verschiedene endogene Substrate, die beispielsweise bei der Zellmigration und bei der synaptischen Plastizität eine Rolle spielen, von mutierten Enzymen in geringerem Maße als durch das WT Enzym phosphoryliert wurden (Verbeek et al., 2008).

Adachi und Mitarbeiter untersuchten 18 PKC γ -Mutationen auf Auswirkungen auf die Kinase-Aktivität. Bei 15 Mutationen fanden sie eine verringerte PKC γ -Aktivität. Von diesen liegen 14 Mutationen in der C1-Domäne und eine (G360S) in der katalytischen Region. Widersprüchlich ist, dass zwei benachbarte Mutationen (G360S, S361G), die in der hochkonservierten Kinase-Region lokalisiert sind, eine konträre Aktivitätsänderung verursachen (Adachi et al., 2008). Weitere Untersuchungen zur Klärung des Sachverhalts sind notwendig.

2009 konnten Seki und Mitarbeiter eine verminderte Translokation des mutierten Enzyms an die Plasmamembran nachweisen, was für einen Funktionsverlust der PKC γ sprechen könnte. Die Translokation der PKC γ ist eines der Schlüsselmomente für die Signaltransduktion in Purkinje-Zellen. Dies könnte die Fehlentwicklung der Dendriten, die von Seki und Mitarbeitern beobachtet wurde, erklären. Die Fehlentwicklung drückt sich u.a. durch eine

behinderte Reifung und in einer Verminderung von dendritischen „spines“ aus, die oft in der frühen Phase von neurodegenerativen Erkrankungen gefunden wird (Seki et al., 2009).

Lin und Mitarbeiter zeigten an neuronalen Zellkulturen, dass oxidativer Stress eine Aktivitätsminderung des mutierten Enzyms bewirkt und die Aktivierung und normale Funktion von endogener PKC γ unterdrückt. Dieser dominant negative Effekt führt zu einer Dysfunktion von „Gap-Junctions“, die Apoptose-Signale ungehindert an Nachbarzellen weiterleiten. So lösen einzelne Zellen, die in die Apoptose übergehen, weitere Purkinje-Zelldegenerationen aus (Lin und Takemoto, 2007; Lin et al., 2007).

Auch Chen und Mitarbeiter wollten einen dominant negativen Effekt nicht ausschließen (Chen et al., 2007). Der Grund für diese Annahme ist, dass SCA14-Patienten einen schwereren neurologischen Phänotyp aufweisen als die von Chen und Mitarbeiter gezüchteten PKC γ -Knockout-Mäuse (Chen et al., 1995; Verbeek et al., 2008).

Für einen dominant negativen Effekt spricht auch, dass bei H101Y-mutierten Mäusen eine veränderte Morphologie und ein Purkinje-Zellverlust im Gegensatz zu der normalen Morphologie bei PKC γ -Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte. Auch der neurologische Phänotyp war schwerer. In in-vitro-Kulturen des Cerebellums wurde erneut bei oxidativem Stress eine Dysfunktion der „Gap-Junctions“ festgestellt (Zhang et al., 2009).

Zum heutigen Zeitpunkt ist eine abschließende Klärung der Pathogenese von SCA14 nicht möglich, da oft nur exemplarisch einzelne Mutationen untersucht worden sind. Dennoch deutet vieles auf einen Funktionsverlust mit dominant negativen Effekt hin. Um zu einer endgültigen Aussage zu kommen, sind weitere Studien mit allen bisher gefunden Mutationen nötig.

5.4. Empfehlungen zur molekulargenetischen Testung von SCA14

Da die Prävalenz von SCA14 in Mitteleuropa bei unselektierten ADCA-Patienten zwischen unter einem und annähernd vier Prozent liegt (Chen et al., 2005, updated 2010; Verbeek et al., 2005), stellt sich die Frage, inwiefern es sinnvoll ist, Ataxie-Patienten auf Mutationen im *PRKCG*-Gen zu untersuchen. Im Moment ist eine molekulargenetische Testung nur in Form von Sequenzierungen möglich, da SCA14 durch verschiedene Punktmutationen oder Deletionen im *PRKCG*-Gen ausgelöst wird. Folglich können keine kommerziellen Kits verwendet werden und die 18 Exone müssen größtenteils einzeln sequenziert und analysiert werden. Dieses ist sehr zeit- und arbeitsaufwändig und damit kostenintensiv.

Da aber SCA14 autosomal dominant vererbt wird, ist es für einen Patienten sehr wichtig, eine genaue Diagnose zu erhalten, denn nur bei Kenntnis der Erkrankung ist eine adäquate genetische Beratung möglich (Brusse et al., 2007). Im Rahmen einer solchen Beratung kann die betroffene Person und deren Familie über Symptome, genetische Vererbung, Krankheitsverlauf, Prognose, eventuell mögliche Therapien oder auch präventive Maßnahmen und andere Unterstützung wie z.B. Selbsthilfegruppen informiert werden. Des Weiteren kann die Kenntnis der Erkrankung hilfreich sein, um so informiert medizinische und persönliche Entscheidungen zu fällen, die die weitere Lebensplanung z.B. in Bezug auf Berufswahl und Kinderwunsch betreffen (Zerres, 2003).

Die zunehmende Diagnosestellung von SCA14 bei Ataxie-Patienten erhöht die Wahrscheinlichkeit herauszufinden, welche pathophysiologischen Auswirkungen Mutationen im *PRKCG*-Gen haben und so zur Entwicklung von Therapiestrategien beitragen. Die genetische Testung auf SCA14 ist daher sinnvoll. Aufgrund der Seltenheit und des Kostenaufwandes sollten jedoch Bedingungen hierfür festgesetzt werden:

Wenn eine subakute cerebelläre Ataxie in der Anamnese und der klinischen Untersuchung festgestellt wurde und im MRT außer einer Kleinhirnatrophie keine weiteren strukturellen Läsionen nachzuweisen sind, sollte eine Familienanamnese zur Klärung des Erbgangs erhoben werden. Bei autosomal dominant vererbten Ataxien sollte eine Stufendiagnostik erfolgen:

Zunächst wird auf SCA1, SCA2, SCA3 und SCA6 als Vertreter der häufigen Trinukleotid-Expansionserkrankungen getestet. Bei Patienten mit Retinopathie sollte zuerst SCA7 ausgeschlossen werden. Anschließend kann auf seltene Erkrankungen wie DRPLA, SCA8, SCA10, SCA12, SCA17 getestet werden (Brusse et al., 2007), die ebenfalls einem Repeat-Expansionsmechanismus folgen. Je nach ethnischen Hintergrund und zusätzlichen Symptomen der Ataxie-Patienten erfolgt die weitere Testung: DRPLA v.a. bei Patienten japanischen Ursprungs oder SCA17 bei Demenz oder psychiatrischen Symptomen (Schöls et al., 2004). Sollte diese Diagnostik ohne Ergebnis bleiben, kann ein Punktmutationscreening auf der Suche nach den sehr seltenen SCA-Typen durchgeführt werden.

An SCA14 sollte man v.a. bei langsamer Progression, rein cerebellärem Erscheinungsbild, axialen Myoklonus und kognitiver oder psychischer Beeinträchtigung denken (Schöls et al., 2004; Chen et al., 2005, updated 2010). Beim *PRKCG*-Mutationsscreening (SCA14) sollte man zuerst mit der Sequenzierung von Exon 4 und 5 beginnen, da hier bisher am häufigsten Mutationen gefunden wurden. Nachfolgend können alle weiteren Exone, in denen bereits Mutationen nachgewiesen wurden, analysiert werden.

5.5. Ausblick

In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal zwei verschiedene SCA14-Mutationen in einem deutschen Patientenkollektiv von 26 Ataxie-Patienten nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass es sinnvoll ist, aufgrund einer weltweiten Verbreitung im Rahmen einer molekulargenetischen Ataxie-Diagnostik auch den Nachweis von SCA14 anzubieten. Eine steigende Anzahl von identifizierten SCA14-Patienten könnte zukünftig zu genaueren Aussagen bezüglich der Genotyp/Phänotyp-Korrelation führen. Als Strategie empfiehlt sich eine Testung mittels Stufendiagnostik (siehe 5.4). Um SCA14 nachzuweisen oder auszuschließen, sollten zuerst Exon 4 und 5 sequenziert werden. Dennoch ist es von Vorteil alle Exone auf Veränderungen zu untersuchen, da im Rahmen dieser Arbeit auch eine Mutation im Exon 2 lokalisiert werden konnte.

Der genaue Pathomechanismus der SCA14 ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Bekannt ist, dass die Erkrankung durch verschiedene Punktmutationen im *PRKCG*-Gen ausgelöst wird.

Den einzelnen SCA-Typen liegen unterschiedliche Mutationsarten zugrunde wie Trinukleotidexpansionen oder Punktmutationen. Die ursächlichen Mutationen der einzelnen SCA sind in Genen bzw. Proteinen unterschiedlichster Funktion lokalisiert (siehe Tabelle 1). Es erscheint daher schwierig, einen gemeinsamen Pathomechanismus für alle SCA zu postulieren. Es könnte jedoch eine gemeinsame Signalkaskade vorliegen, bei der es an individuellen Punkten zu einer Störung der Signaltransduktion kommt. Dies würde zu einer Beeinträchtigung der gemeinsamen Endstrecke und ähnlichen klinischen Symptomen führen (Verbeek et al., 2008).

Für einen gemeinsamen Signalweg verschiedener SCA spricht, dass bei der Autopsie eines SCA14-Patienten ein vermindertes Ataxin-1 in den Purkinje-Zellen nachgewiesen wurde. Ataxin-1 ist das mutierte Protein bei SCA1. Auch bei SCA1-transgenen Mäusen wurde eine veränderte subzelluläre Lokalisation und eine Verminderung an PKC γ nachgewiesen (Skinner et al., 2001). PKC γ scheint Ataxin-1 zu phosphorylieren (Verbeek et al., 2005). Diese Beobachtungen sprechen für eine Verknüpfung der molekularen Pathomechanismen verschiedener Ataxie-Typen. Es sind jedoch weitere Studien notwendig, um den Pathomechanismus von SCA14 zu verifizieren und in der Folge eventuell einen gemeinsamen Signalweg mit anderen SCA-Typen identifizieren zu können.

Bisher gibt es keine Möglichkeit, die Ursache für oder die Symptome von SCA14 zu behandeln. Erst wenn der molekulare Mechanismus analysiert ist, besteht die Möglichkeit,

therapeutische Angriffspunkte z.B. für Pharmazeutika zu finden. Therapeutische Möglichkeiten könnten selektive Inhibitoren oder Aktivatoren der PKC γ -Isoform (Verbeek et al., 2008), Inhibitoren von „Gap-Junctions“ (Lin und Takemoto, 2007), Antioxidantien (Asai et al., 2009) oder die Inhibition von ER-Stress (Zhang et al., 2009) darstellen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kollektiv von 26 deutschen Ataxie-Patienten auf das Vorkommen von SCA14 verursachenden Mutationen untersucht. SCA14 ist eine autosomal dominant vererbte neurologische Erkrankung. Zu den typischen Symptomen gehören Ataxie und Dysarthrie in Kombination mit weiteren neurologischen und/oder psychiatrischen Auffälligkeiten. Verursacht wird SCA14 durch Punktmutationen oder kleine Deletionen im *PRKCG*-Gen, das für die PKC γ codiert.

Bei einem Patienten entwickelte sich während der Schulzeit ein unsicherer Gang, später kamen depressive Episoden, eine paranoide Psychose, eine langsam progrediente Gangataxie und Tremor der Hände hinzu. Das MRT zeigte eine cerebelläre Hypoplasie. Der Patient starb 2002 im Alter von 48 Jahren an einer Kardiomyopathie. Bei der Sequenzierung des *PRKCG*-Gens konnte ein bereits bekannter heterozygoter Nukleotid austausch von C zu T an cDNA-Position 301 festgestellt werden. Daraus resultiert der AS-Austausch H101Y.

Ein bisher unbekannter heterozygoter Nukleotid austausch konnte bei einem weiteren Patienten festgestellt werden. Im Exon 2 des *PRKCG*-Gens konnte ein Basenaustausch G zu T an cDNA-Position 188 festgestellt werden, durch den der AS-Austausch G63V resultiert. Die gleiche Mutation konnte auch beim Vater des Indexpatienten, der ähnliche klinische Symptome zeigte, nicht aber bei 130 neurologisch gesunden Kontrollen detektiert werden. Die G63V Mutation liegt in der hochkonservierten Cys1-Region der C1-Domäne. Der Algorithmus des computergestützten Programms SIFT ergab, dass der G zu V AS-Austausch an der Position 63 nicht toleriert wird. Aus diesen Gründen ist es sehr wahrscheinlich, dass die G63V-Mutation SCA14 in dieser Familie auslöst. Der Indexpatient leidet seit Kindheit an Gangunsicherheit, Gleichgewichtsstörungen und einer langsam progredienten Dysarthrie. In der neurologischen Untersuchung fielen eine dystone Bewegungsstörung des rechten Arms, Nystagmus, herabgesetzte Sehnenreflexe und verminderte Nervenleitgeschwindigkeiten auf. Im MRT zeigte sich eine cerebelläre Atrophie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SCA14 in der deutschen Bevölkerung auftritt, die Integration einer SCA14-Testung in die Ataxie-Diagnostik könnte – an geeigneter Stelle im Rahmen einer Stufendiagnostik – sinnvoll sein. Der Nachweis weiterer/zusätzlicher SCA14-Mutationen in einem größeren Patientenkollektiv sollte angestrebt werden, um eine Genotyp/Phänotyp-Korrelation erstellen zu können. Durch den Nachweis weiterer SCA14-Mutationen erhofft man sich zunehmendes Verständnis der pathophysiologischen Prozesse in der Zelle und letztendlich die Entwicklung von Therapieansätzen.

7. Summary

In the present survey, 26 German ataxia patients were tested for mutations leading to the SCA14 phenotype. SCA14 is an autosomal dominant neurodegenerative disorder. Typical symptoms include slowly progressive ataxia, dysarthria and nystagmus in combination with additional neurological and/or psychiatric features. Point mutations or small deletions in the *PRKCG* gene encoding protein kinase C gamma (PKC γ) are causative for the development of SCA14.

One patient experienced an unsteady gait since childhood. Later in life, episodes of depression, psychosis, a mildly progressive gait ataxia and tremor of both hands occurred. Brain MRI showed cerebellar hypoplasia. At the age of 48 years, the patient died of cardiomyopathia. Molecular analysis of the *PRKCG* gene revealed a heterozygous C to T nucleotide exchange at cDNA position 301. The C to T transition results in the substitution of histidine by tyrosine (H101Y). This mutation has been described previously in an unrelated SCA14 family.

A novel, so far unknown nucleotide exchange within *PRKCG* gene was found in another patient. In exon 2 of *PRKCG* gene, a G to T transversion was detected, which results in the amino acid exchange of glycine by valine (G63V). The same mutation was detected in the similarly affected father of the patient, but not in 130 neurological healthy controls. The G63V mutation is located in the highly conserved Cys1 region of the C1 domain. Computer-based analysis using the SIFT algorithm predicted that the G to V exchange is not tolerated at amino acid position 63. Therefore, we conclude that the G63V mutation is most probably responsible for the SCA14 phenotype in this family. Since childhood, the index patient suffers from gait ataxia, disturbed balance and a slowly progressive dysarthria. During neurological examination dystonia of the right arm, nystagmus, decreased tendon reflexes and decreased nerve conduction velocity were noticed. MRI of the brain showed cerebellar atrophy.

This study demonstrates that point mutations in the *PRKCG* gene occur in German ataxia patients. Therefore SCA14 testing should be integrated into the ataxia diagnostic schedule.

Future aim is to detect more/additional SCA14 mutations in a larger patient collective, which might enable an improved genotype-phenotype-correlation. In addition, elucidation of pathophysiological processes in the cell and therapy approaches for SCA14 will be a future challenge.

8. Literaturverzeichnis

1. (2002) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage, Berlin, New York: Walter de Gruyter
2. Abeliovich A, Paylor R, Chen C, Kim JJ, Wehner JM, Tonegawa S (1993) PKC γ mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell*, 75: 1263-1271
3. Adachi N, Kobayashi T, Takahashi H, Kawasaki T, Shirai Y, Ueyama T, Matsuda T, Seki T, Sakai N, Saito N (2008) Enzymological analysis of mutant protein kinase C γ causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca²⁺ homeostasis. *J Biol Chem*, 283(28):19854-63
4. Alonso I, Costa C, Gomes A, Ferro A, Seixas AI, Silva S, Cruz VT, Coutinho P, Sequeiros J, Silveira I (2005) A novel H101Q mutations causes PKC γ loss in spinocerebellar ataxia type 14. *J Hum Genet*, 50:523-529
5. Asai H, Hirano M, Shimada K, Kiriya T, Furiya Y, Ikeda M, Iwamoto T, Mori T, Nishinaka K, Konishi N, Udaka F, Ueno S (2009) Protein kinase C γ , a protein causative for dominant ataxia, negatively regulates nuclear import of recessive-ataxia-related aprataxin. *Hum Mol Genet*, 18(19):3533-43
6. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (2003) Current protocols in molecular biology. Ringbook edition, John Wiley and Sons Inc.
7. Bakalkin G, Watanabe H, Jezierska J, Depoorter C, Verschuuren-Bemelmans C, Bazov I, Artemenko KA, Yakovleva T, Dooijes D, Van de Warrenburg BPC, Zubarev RA, Kremer B, Knapp PE, Hauser KF, Wijmenga C, Nyberg F, Sinke RJ, Verbeek DS (2010) Prodorphin Mutations Cause the Neurodegenerative Disorder Spinocerebellar Ataxia Type 23. *Am J Hum Genet*, 87: 593-603
8. Berget SM (1995) Exon Recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem*, 270(6):2411-2414
9. Bird TD (1998, updated 2008) Hereditary ataxia overview. GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed August 22, 2008
10. Brkanac Z, Bylenok L, Fernandez M, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Nochlin D, Raskind WH, Bird TD (2002) A new dominant spinocerebellar ataxia linked to chromosome 19q13.4-qter. *Archives of Neurology*, 59(8):1291-1295
11. Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, Fentoni V, Mariotto C, Migone N, Di Donato S, Taroni F (2004) Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: Mutation analysis of spinocerebellar ataxias gene and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch Neurol*, 61:727-733
12. Brusse E, Maat-Kievit JA, van Swieten JC (2007) Diagnosis and management of early and late-onset cerebellar ataxia. *Clin Genet*, 71:12-24
13. Brussino A, Gellera C, Saluto A, Mariotti C, Arduino C, Castellotti B, Camerlingo M, de Angelis V, Orsi L, Tosca P, Migone N, Taroni F, Brusco A (2005) *FMR1* gene premutation is a frequent genetic cause of late-onset sporadic cerebellar ataxia. *Neurology*, 64:145-147
14. Bryer A, Krause A, Bill P, Davids V, Bryant D, Butler J, Heckmann J, Ramesar R, Greenberg J (2003) The hereditary adult-onset ataxias in South Africa. *J Neurol Sci*, 216(1):47-54

15. Chen C, Kano M, Abeliovich A, Chen L, Bao S, Kim JJ, Hashimoto K, Thompson RF, Tonegawa S (1995) Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC γ mutant mice. *Cell*, 83:1233-1242
16. Chen DH, Bird TD, Raskind WH (2005 updated 2010) Spinocerebellar ataxia type 14. GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed April 09, 2010
17. Chen DH, Brkanac Z, Verlinde CLMJ, Tan XJ, Bylenok L, Nochlin D, Masushita M, Lipe H, Wolff J, Fernandez M, Cimino PJ, Bird T., Raskind WH (2003) Missense Mutations in the Regulatory Domain of PKC γ : A new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet*, 72(4):839-849
18. Chen DH, Cimino PJ, Ranum LPW, Zoghbi HY, Yabe I, Schut L, Margolis RL, Lipe HP, Feleke A, Matsushita M, Wolff J, Morgan C, Lau D, Fernandez M, Sasaki H, Raskind WH, Bird TD (2005) The clinical und genetic spectrum of spinocerebellar ataxia 14. *Neurology*, 64:1258-1260
19. Cho W (2001) Membrane targeting by C1 and C2 domains. *J Biol Chem*, 276(35):32407-32410
20. Craig K, Keers SM, Archibald K, Curtis A, Chinnery PF (2004) Molecular Epidemiology of Spinocerebellar Ataxia Type 6. *Ann Neurol*, 55:752-755
21. Craig NJ, Duran Alonso MB, Hawker KL, Shiels P, Glencorse TA; Campbell JM, Bennett NK, Canham M, Donald D, Gardiner M, Gilmore DP, MacDonald RJ, Maitland K, McCallion AS; Russel D, Payne AP, Sutcliffe RG, Davies RW (2001) A candidate gene for human neurodegenerative disorders: a rat PKC γ mutation causes a Parkinsonian syndrome. *Nat Neurosci*, 4(11):1061-2.
22. Dalski A, Mitulla B, Bürk K, Schattenfroh C, Schwinger E, Zühlke C (2006) Mutation of the highly conserved cysteine residue 131 of the SCA14 associated *PRKCG* gene in a family with slow progressive cerebellar ataxia. *J Neurol*, 253:1111-1112
23. Di Donato S, Gellera C, Mariotti C (2001) The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias.II. Autosomal rezessive ataxias. *Neurol Sci*, 22:219-228
24. Duenas AM, Goold R, Giunti P (2006) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*, 129:1357-1370
25. Edwards AS, Newton AC (1997) Regulation of protein kinase C β II by its C2 Domain. *Biochemistry*, 36:15615-15623
26. Fahey MC, Knight MA, Shaw JH, Gardner RJ, du Sart D, Lockhart PJ, Delatycki MB, Gates PC, Storey E (2005) Spinocerebellar ataxia type 14: study of a family with an exon 5 mutation in the *PRKCG* gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76:1720-1722
27. Gardner (2008) "SCA16" is really SCA15. *J Med Genet*, 45:192
28. Grantham R (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*, 185(4154): 862-864
29. Greenfield JG (1954) The spino-cerebellar degenerations. *Proc R Soc*, 47(2):150-152
30. Grodsky N, Li Y, Bouzida D, Love R, Jensen J, Nodes B, Nonomiya J, Grant S (2006) Structure of the catalytic domain of human protein kinase C β II complexed with a Bisindolylmaleimide inhibitor. *Biochemistry*, 45:13970-13981
31. Harding AE (1983) Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet*, 1(8334):1551-1555
32. Harris RA, McQuilkin SJ, Paylor R, Abeliovich A, Tonegawa S, Wehner JM (1995) Mutant mice lacking the γ isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of γ -aminobutyrate type A receptors. *Neurobiology*, 92:2658-3662

33. Hiramoto K, Kawakami H, Inoue K, Seki T, Maruyama H, Morin H, Matsumoto M, Kurisu K, Sakai N (2006) Identification of a new family of spinocerebellar ataxia type 14 in the Japanese spinocerebellar ataxia population by the screening of PRKCG exon 4. *Mov Disord*, 21(9):1355-1360
34. Holmes G (1907) An attempt to classify cerebellar disease with a note on Marie's hereditary cerebellar ataxia. *Brain*, 30:545-67
35. Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe, Lashley T, Hernandez D, Worth P, Singleton AB, Hilton DA, Holton J, Revesz T, Davis MB, Giunti P, Wood NW (2007) Mutations in *TTBK2*, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nat Genet*, 39:1434-1436
36. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/exonview?db=core;transcript=ENST00000263431. Accessed September 28, 2005
37. <http://www.mapsofworld.com/world-political-map.htm>. Accessed August 16, 2008
38. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=5582&mrna=NM_002739.3&ctg=NT_011109.16&prot=NP_002730.1&orien=forward&refresh=refresh. Accessed July 24, 2008
39. <http://www.uniprot.org>. Accessed August 25, 2009
40. Hug H, Sarre TF (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J*, 291:329-343
41. Infante J, Combarros O, Volpini V, Corral J, Llocra J, Berciano J (2005) Autosomal dominant cerebellar ataxias in Spain: molecular and clinical correlations, prevalence estimation and survival analysis. *Acta Neurol Scand*, 111(6):391-399
42. Iwaki A, Kawano Y, Miura S, Shibata H, Matsuse D, Li W, Furuya H, Ohyagi Y, Taniwaki T, Kira J, Fukumaki Y (2008) Heterozygous deletion of *ITPR1*, but not *SUMF1*, in spinocerebellar ataxia type 16. *J Med Genet*, 45:32-35
43. Kano M, Hashimoto K, Chen C, Abeliovich A, Aiba A, Kuirhara H, Watanabe M, Inoue Y, Tonegawa S (1995) Impaired Synapse Elimination during cerebellar development in PKC γ mutant mice. *Cell*, 83(7): 1223-1231
44. Kitzberger R, Madl C, Ferenci P (2005) Wilson disease. *Metabolic Brain Disease*, 20(4): 295-302
45. Klebe S, Durr A, Rentschler A, Hahn-Barma V, Abele M, Bouslam N, Schöls L, Jedynek P, Frlani S, Denis E, Dussert C, Agid Y, Bauer P, Globas , Wüllner U, Brice A, Riess O, Stevanin G (2005) New mutations in protein kinase C γ associated with spinocerebellar ataxia type 14. *Ann Neurol*, 58:720-729
46. Klebe S, Faivre L, Forlani S, Dussert C, Tourbah A, Brice A, Stevanin G, Durr A (2007) Another mutation in Cysteine 131 in protein kinase C γ as a cause of spinocerebellar ataxia type 14. *Arch Neurol*, 64: 913-914
47. Klockgether T (2000) Recent advances in degenerative ataxias. *Curr Opin Neurol*, 13:451-455
48. Kofler K, Erdel M, Utermann G, Baier G (2002) Molecular genetics and structural genomics of the human protein kinase C gene module. *Genom Biol*, 3(3):research0014
49. Landendinger M, Klebe S, Nohl C, Baron R, Müller U, Nolte D (2007): Codon 101 in *PRKCG*: „Hotspot“ for SCA14-causing mutations? Poster auf der 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH)
50. Lim LP, Burge CB (2001) A computational analysis of sequence features involved in recognition of short Introns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20):11193-8.
51. Lin D, Shanks D, Prakash O, Takemoto DJ (2007) Protein kinase C γ mutations in the C1B domain cause caspase-3-linked apoptosis in lens epithelial cells through gap junctions. *Exp Eye Res*, 85(1):113-22
52. Lin D, Takemoto DJ (2007) Protection from ataxia-linked apoptosis by gap junction inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(4):982-7

53. Löffler G, Petrides PE (2003) Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer – Verlag: 235 -236
54. Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI (1997) Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . Science, 278:279-283
55. Maltecca F, Magnoni R, Cerri F, Cox GA, Quattrini A, Casari G (2009) Haploinsufficiency of AFG3L2, the gene responsible for spinocerebellar ataxia type 28 causes mitochondria-mediated Purkinje cell dark degeneration. J Neurosci, 29(29): 9244-9254
56. Mariotti C, Fancellu R, Di Donato S (2005) An overview of the patient with ataxia. J Neurol, 252: 511-518
57. Mariotto C, Brusco A, Di Bella D, Cagnoli C, Seri M, Gellera C, Di Donato S, Taroni F (2008) Spinocerebellar ataxia type 28: A novel autosomal dominant cerebellar ataxia characterized by slow progression and ophthalmoparesis. Cerebellum, 7(2):184-188
58. Maruyama H, Izumi Y, Morino H, Oda M, Toji H, Nakamura S, Kawakami H (2002) Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: A study of 1,286 Japanese patients. Am J Med Genet, 114:578-583
59. Masuhr KF, Neumann M (2005) Neurologie. 5. Auflage, Stuttgart: Thieme Verlag
60. Medkova M, Cho W (1998) Mutagenesis of the C2 Domain of Protein Kinase C α : Differential roles of Ca²⁺ ligands and membrane binding residues. J Biol Chem, 273(28):17544-17552
61. Morita H, Yoshida K, Suzuki K, Ikeda S (2006) A Japanese case of SCA14 with the Gly128Asp mutation. J Hum Genet, 51:1118-1121
62. Moseley ML, Benzow KA, Schut LJ, Bird TD, Gomez CM, Barkhaus PE, Blindauer KA, Labuda M, Pandolfo M, Koob MD, Ranum LPW (1998) Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. Neurology, 51:1666-1671
63. Narita M, Mizoguchi H, Suzuki T, Narita M, Dun NJ, Imai S, Yajima Y, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF (2001) Enhanced μ -Opioid Responses in the Spinal Cord of Mice Lacking Protein Kinase C γ Isoform. J Biol Chem, 276(18):15409-15414
64. Newton AC (2001) protein kinase C. Structural and spatial regulation by phosphorylation cofactors, and macromolecular interactions. Chem Rev, 101:2353-2364
65. Ng PC, Henikoff S (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions. Genome Res, 11(5):863-874
66. Nolte D, Klebe S, Baron R, Deuschl G, Müller U (2007b) Codon 101 of *PRKCG*, a preferential mutation site in SCA14. Mov Disord, 22(12):1831-1832
67. Nolte D, Landendinger M, Schmitt E, Müller U (2007a) Spinocerebellar ataxia 14: Novel mutation in exon 2 of *PRKCG* in a German family. Mov Disord, 22(2):265-7.
68. Poeck K, Hacke W (2001) Neurologie. 11. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer – Verlag
69. Saito N, Shirai Y (2002) Protein kinase C γ (PKC γ): Function of neuron specific isotype. J Biochem, 132:683-687
70. Saleem Q, Choudhry S, Mukerji M, Basham L, Padma MV, Chakravarthy A, Maheshwari MC, Jain S, Brahmachari SK (2000) Molecular analysis of autosomal dominant hereditary ataxias in the Indian population: high frequency of SCA2 and evidence for a common founder mutation. Hum Genet, 106:179-187
71. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, 74(12):5463-7.
72. Schmitz-Hübsch T, Coudert M, Bauer P, Giunti P, Globas C, Baliko L, Filla A, Mariotto C, Rakowicz M, Charles P, Ribai P, Szymanski S, Infante J, van de

- Warrenburg BPC, Dürr A, Timmann D, Boesch S, Fancellu R, Rola R, Depondt C, Schöls L, Zdienicka E, Kang JS, Döhlinger S, Kremer B, Stephenson DA, Melegh B, Pandolfo M, di Donato S, Tezenas du Montcel S, Klockgether T (2008) Spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6: Disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology*, 71(13):782-789
73. Schöls L, Amoiridis G, Epplen JT, Langkafel M, Przuntek H, Riess O (1996) Relations between genotype and phenotype in German patients with the Machado-Joseph disease mutation. *J of Neurol Neurosurg Psychiatry*, 61:466-470
74. Schöls L, Bauwer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*, 3:291-304
75. Schöls L, Krüger R, Amoiridis G, Przuntek H, Epplen JT, Riess O (1998) Spinocerebellar ataxia type 6: genotype and phenotype in German kindreds. *J of Neurol, Neurosurg Psychiatry*, 64:67-73
76. Schöls L, Amoiridis G, Büttner T, Przuntek H, Epplen JT, Riess O (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia: Phenotypic differences in genetically defined subtypes. *Ann Neurol*, 42(6):924-932
77. Schrenk K, Kapfhammer P, Metzger F (2002) Altered dendritic development of cerebellar Purkinje cells in slice cultures from protein kinase C γ -deficient mice. *Neuroscience* 110(4):675-689
78. Sehgal VN, Srivastava G (2005) Darier's (Darier-White) disease/keratosis follicularis. *Int J Dermatol*, 44:184-192
79. Seki T, Adachi N, Ono Y, Mochizuki H, Hiramoto K, Amano T, Matsubayashi H, Matsumoto M, Kawakami H, Saio N, Sakai N (2005) Mutant protein Kinase C γ found in spinocerebellar ataxia type 14 is susceptible to aggregation and causes cell death. *J Biol Chem*, 280(32): 29096-106
80. Seki T, Shimahara T, Yamamoto K, Abe N, Amano T, Adachi N, Takahashi H, Kashiwagi K, Saito N, Sakai N (2009) Mutant γ PKC found in spinocerebellar ataxia type 14 induces aggregate-independent maldevelopment of dendrites in primary cultured Purkinje cells. *Neurobiol Dis*, 33(2):260-73.
81. Seki T, Takahashi H, Adachi N, Abe N, Shimahara T, Saito N, Sakai N (2007) Aggregate formation of mutant protein kinase C γ found in spinocerebellar ataxia type 14 impairs ubiquitin-proteasome system and induces endoplasmic reticulum stress. *Eur J Neurosci*, 26(11):3126-40
82. Silveira I, Miranda C, Guimaraes L, Moreira MC, Alonso I, Medonca P, Ferro A, Pinto-Basto J, Coehlo J, Ferreirinha F, Poirier J, Parreira E, Vale J, Januario A, Barbot C, Tuna A, Barros J, Koide R, Tsuji S, Holmes SE, Margolis RL, Jardim L, Pandolfo M, Coutinho P, Sequeiros J (2002) Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia. *Arch Neurol*, 59:623-629
83. Skinner PJ, Vierra-Green CA, Clark HB, Zoghbi HY, Orr HT (2001) Altered trafficking of membrane proteins in Purkinje cells of SCA1 transgenic mice. *Am J Pathol*, 159(3):905-13
84. Steinberg SF (2008) Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*, 88:1341-1378
85. Stevanin G, Hahn V, Lohmann E, Bouslam N, Guttard M, Soumphonphakdy C, Welter ML, Ollagnon-Roman E, Lemianque A, Ruberg M, Brice A, Dürr A (2004) Mutation in the catalytic domain of protein kinase C γ and extension of the phenotype associated with spinocerebellar ataxia type 14. *Arch Neurol*, 61:1242-1248
86. Storey E, Bahlo M, Fahey M, Sisson O, Lueck CJ, Gardner RJM (2009) A new dominantly inherited pure cerebellar ataxia, SCA30. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80: 408-411

87. Strachan T, Read AP (2005) Molekulare Humangenetik. 3. Auflage, München: Elsevier GmbH: 143 – 144
88. Sulger M (2002) Molekulargenetische Untersuchungen bei Kindern mit Akuter myeloischer Leukämie (AML) und Inversion 16, 21
89. Tanaka C, Nishizuka Y (1994) The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci*, 17:551-67
90. Tang B, Liu C, Shen L, Dai H, Pan Q, Jing L, Ouyang S, Xia J (2000) Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7 and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. *Arch Neurol*, 57: 540-544
91. van de Warrenburg BPC, Sinke RJ, Verschuur-Bemelmans CC; Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, Maat-Kievit JA; Dooijes D, Notermans NC, Lindhout D, Knoers NVAM, Kremer HPH (2002) Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: Prevalence and age at onset varainace analysis. *Neurology*, 58:702-708
92. van de Warrenburg BPC, Verbeek DS, Piersma SJ, Hennekam FAM, Pearson PL, Knoers NVAM, Kremer HPH, Sinke RJ (2003) Identification of a novel SCA14 mutation in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family. *Neurology*, 61:1760-1765
93. Verbeek DS, Goedhart J, Bruinsma L, Sinke RJ, Reits EA(2008) PKC γ mutations in spinocerebellar ataxia type 14 affect C1 domain accessibility and kinase activity leading to aberrant MAPK signaling. *J Cell Sci*, 121(14):2339-49
94. Verbeek DS, Knight MA, Harmison GG, Fischbeck KH, Howell BW (2005b) Protein kinase C gamma mutations in spinocerebellar ataxia 14 increase kinase activity and alter membrane targeting. *Brain*, 28(2):436-42
95. Verbeek DS, Warrenburg BP, Hennekan FA, Dooijes D, Ippel PF, Verschuur-Bemelmans CC, Kremer HP, Sinke RJ (2005a) Gly118Asp is a SCA14 founder mutation in the Dutch ataxia population. *Hum Genet*, 117:88-91
96. Visser JE, Bloem BR, van de Warrenburg BPC (2007) *PRKCG* Mutation (SCA-14) causing a Ramsay Hunt phenotype. *Mov Disord*, 22(7):1024-1026
97. Vlak MHM, Sinke RJ, Rabelink GM, Kremer BPH, van de Warrenburg BPC (2006) Novel *PRKCG*/SCA14 mutation in a Dutch spinocerebellar ataxia family: Expanding the phenotype. *Mov Disord*, 21(7):1025-1028
98. Wallesch CW (2005) Neurologie. Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis. 1. Auflage, München, Jena: Elsevier Urban & Fischer
99. Wenning GK, Colosimo C, Geser F, Poewe W (2004) Multiple system atrophy. *Lancet Neurol*, 3:93-103
100. Wiczorek S, Arning L, Gizewski ER, Alheite I, Timmann D (2007) Benign SCA14 phenotype in a German patient associated with a missense mutation in Exon 3 of the *PRKCG* gene. *Mov Disord*, 22(14):2135-2136
100. Wißen A (2007) Häufigkeit der Spinocerebellären Ataxie Typ 17 (SCA17) bei Patienten mit Bewegungsstörungen: Analyse der Trinukleotid-Expansion im TBP-Gen
101. Xu ZB, Chaudhary D, Olland S, Wolfrom S, Czerwinski R, Malakian K, Lin L, Stahl ML, Joseph-McCarthy D, Benander C, Fitz L, Greco R, Somers WS, Mosyak L (2004) Catalytic domain crystal structure of protein kinase C- θ (PKC θ). *J Biol Chem*, 279(48):50401-50409
102. Yabe I, Sasaki H, Chen DH, Raskind WH, Bird TD, Yamashita I, Tsuji S, Kikuchi S, Tashiro K (2003) Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a mutation in protein kinase C γ . *Arch Neurol*, 60:1749-1751
103. Yamashita I, Sasaki H, Yabe I, Fukazawa T, Nogoshi S, Komeichi K, Takada A, Shiraishi K, Takiyama Y, Nishizawa M, Kaneko J, Tanaka H, Tsuji S, Tashiro K

- (2000) A novel locus for dominant cerebellar ataxia (SCA14) maps to a 10.2-cM interval flanked by D19S206 and D19S605 on chromosom 19q13.4-qter. *Ann Neurol*, 48:156-163
104. Zerres K (2003) Humangenetische Beratung. *Dtsch Arztebl*, 100(42):A2720-2727
105. Zhang Y, Snider A, Willard L, Takemoto DJ, Lin D (2009) Loss of Purkinje cells in the PKC γ H101Y transgenic mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 378(3):524-8
106. Zoghbi HY, Orr HAT (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*, 23:217-247

9. Abkürzungsverzeichnis:

%	Prozent
A	Absorption
A	Adenin
A	Alanin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADCA	autosomal dominante cerebelläre Ataxie
AS	Aminosäure
AT	Ataxie Teleangiektasie
ATM-Gen	<i>Ataxia-Teleangiectasia-Mutation-Gen</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
c	centi
c	complementary
C	Cystein
C	Cytosin
c	Konzentration
C°	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
D	Aspartat
d	desoxy
d	Schichtdicke
d	Tag
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
dd	didesoxy
ddNTP	Didesoxynukleintriphosphat
Del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleintriphosphat
DRPLA	Dentatorubrale-Pallidolysiale Atrophie
ds	Doppelstrang
EA	Episodische Ataxien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalographie
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK2	extracellular signal-regulated kinase 2
F	Phenylalanin
<i>FMRI-Gen</i>	<i>Fragile X-Mental-Retardation1-Gen</i>
FRDA	Friedreich-Ataxie
FXTAS	fragile-X tremor ataxia syndrome
g	Erdbeschleunigung $9,81 \text{ m/s}^2$
G	Glycin
g	Gramm
G	Guanin
H	Histidin

H ₂ O	Wasser
Hae	Haemophilus aegypticus
Ins	Insertion
IVS	intervening sequence
K	Lysin
L	Leucin
l	Liter
LTD	<i>long term depression</i>
LTP	<i>long term potentiation</i>
m	Meter
m	milli
M	molare Masse kg/mol
M.	Morbus
MELAS	<i>mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactat acidosis, stroke like episodes</i>
MERRF	<i>myoclonic eplepsie with ragged red fibers</i>
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie
MSA	Multisystematrophie
N	Asparagin
n	nano
OD	Optische Dichte
p	pico
P	Prolin
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	potentia hydrogenii
PKC	Proteinkinase C
PKC γ	Proteinkinase C γ
<i>PPP2R2B-Gen</i>	<i>Proteinphosphatase2regulatorySubunit2B-Gen</i>
<i>PRKCG-Gen</i>	<i>Proteinkinase Cγ-Gen</i>
PS	Phosphatidylserin
Q	Glutamin
R	Arginin
RFLP	Restriktionslängenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Serin
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
sec	Sekunden
SNP	single nucleotid polymorphism
T	Threonin
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
TRIS	Trishydroxymethylaminoethan
u.a.	unter anderem
UPS	Ubiquitinproteasomsystem
UTR	untranslated region = untranlatierter Bereich
V	Valin
v.a.	vor allem

WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel
α FP	α -Fetoprotein
ε	Extinktionskoeffizient
μ	mikro

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Verteilung der SCA-Subtypen

Abbildung 2: Exonstruktur des *PRKCG*-Gens und Proteinstruktur von PKC γ

Abbildung 3: Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Abbildung 4: Gelelektrophorese

Abbildung 5: Typisches Bild einer Sequenzierung mit SeqAnalysis

Abbildung 6: Teilbereich der Exon 1 Sequenz des *PRKCG*-Gens

Abbildung 7: Teilbereich der Exon 3 Sequenz des *PRKCG*-Gens

Abbildung 8: Teilbereich der Exon 6 Sequenz des *PRKCG*-Gens

Abbildung 9: Mögliche Haplotypen der SNPs rs3745406 und rs3745405 und deren relative Häufigkeiten

Abbildung 10: Teilbereich der Intron 10 Sequenz des *PRKCG*-Gens

Abbildung 11: Teilbereich der Intron 17 Sequenz des *PRKCG*-Gens

Abbildung 12: Sequenzanalyse von Exon 2 des *PRKCG*-Gens

Abbildung 13: Agarose-Gel zur Darstellung der RFLP-Analyse im Exon 2 von *PRKCG*

Abbildung 14: Anordnung der AS-Sequenzen der Cys1-Region verschiedener Isoenzyme von PKC sowie PKC γ aus verschiedenen Organismen

Abbildung 15: Stammbaum der Familie mit Mutation in Exon 2

Abbildung 16: Sequenzanalyse von Exon 4 des *PRKCG*-Gens

Abbildung 17: Anordnung der AS-Sequenzen der Cys2-Region verschiedener Isoenzyme von PKC sowie PKC γ aus verschiedenen Organismen

Abbildung 18: Stammbaum der Familie mit Mutation in Exon 4

11. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Übersicht über die SCA-Typen
- Tabelle 2: SCA14-Mutationen im *PRKCG*-Gen
- Tabelle 3: Primer zur Amplifikation von Exonen des *PRKCG*-Gens
- Tabelle 4: Herkunft der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer
- Tabelle 5: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 1 und flankierender Regionen
- Tabelle 6: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 3 und flankierender Regionen
- Tabelle 7: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 4 und flankierender Regionen
- Tabelle 8: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 5 und flankierender Regionen
- Tabelle 9: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 6 und flankierender Regionen
- Tabelle 10: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 9 und flankierender Regionen
- Tabelle 11: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 11 und flankierender Regionen
- Tabelle 12: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 13 und flankierender Regionen
- Tabelle 13: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 14 und flankierender Regionen
- Tabelle 14: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 15 und flankierender Regionen
- Tabelle 15: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 16 und flankierender Regionen
- Tabelle 16: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 17 und flankierender Regionen
- Tabelle 17: Darstellung der bekannten Sequenzvarianten von *PRKCG* Exon 18 und flankierender Regionen
- Tabelle 18: Übersicht über die verschiedenen Abweichungen von der Wildtypsequenz

12. Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Müller für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großzügigen Arbeitsbedingungen im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich bei PD Dr. Dagmar Nolte für die Vergabe des Themas, ihre hervorragende Betreuung und Unterstützung sowie die kritischen Anmerkungen beim Verfassen dieser Arbeit bedanken.

Den Mitarbeiterinnen des humangenetischen Labors, speziell Frau Christel Nohl und Frau Nicole Bamberger, danke für ihre Einarbeitung in die molekulargenetischen Methoden, ihr großes Engagement und die vielen Ratschläge.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinen Freunden, insbesondere Stefan und Helge, für ihre großzügige Unterstützung und ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**