

Analyse von Kandidatengeneten bei primären Dystonien:

**Dopa-responsive Dystonie (DYT5) und
Paroxysmale kinesiogene Choreoathetose (DYT10)**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Juliane Dorothee Bitsch aus Gießen

Gießen 2007

Aus dem Klinischen Zentrum für Labordiagnostik und Pathologie (ZLP)

Institut für Humangenetik

Leiter: Prof. Dr. U. Müller

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. U. Müller

Gutachter: Prof. Dr. B. Neubauer

Tag der Disputation: 19.06.2008

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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 in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

1 Einleitung

1.1 Dystonie	1
1.2 Dopa-responsive Dystonie (DRD) / DYT 5	2
1.2.1 Tetrahydrobiopterin (BH4).....	5
1.2.2 Sepiapterin-Reduktase	8
1.3 Paroxysmale kinesiogene Choreoathetose (PKC) / DYT 10	11
1.3.1 Paroxysmale Störungen des Nervensystems als Ionenkanalerkrankungen	14
1.3.2 Natrium-Glucose-Cotransporter	16
1.4 Zielsetzung	18

2 Patienten

2.1 Von DRD betroffene Patienten	19
2.1.1 Patient 256.....	19
2.1.2 Patientin 297	20
2.2 Von PKC betroffene Patienten	20

3 Methoden

3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
3.1.1 Konstruktion der Primer.....	23
3.1.2 Durchführung	23
3.1.3 PCR mit radioisotopischen Nucleotiden.....	24
3.1.4 Reverse Transkription (RT)-PCR.....	27
3.1.4.1 Isolation von RNA aus Vollblut.....	27
3.2 Single strand conformation polymorphism-Analyse (SSCP)	28

3.3 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode	29
3.3.1 Cycle Sequencing.....	30
3.3.2 Aufreinigung der DNA-Vorlage	30
3.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	31
3.4.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
3.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
3.4.2.1 Autoradiographie	33
4 Ergebnisse	
4.1 Einführung	34
4.2 Molekulargenetische Untersuchungen am <i>SPR</i>-Gen	34
4.2.1 Patient 256.....	34
4.2.2 Patientin 297	37
4.3 Molekulargenetische Untersuchungen am <i>RKST</i>-Gen	38
5 Diskussion	
5.1 Einführung	39
5.2 Patienten mit Mutationen im <i>SPR</i>-Gen	39
5.2.1 Patientin 297: Mutationen im 5'-UTR-Bereich.....	40
5.2.2 Patient 256: Mutationen im Intron-Bereich.....	46
5.3 Patienten ohne Befund	55
5.4 Mögliche Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion des Genprodukts	58
5.4.1 Mögliche Auswirkungen der Mutation bei Patientin 297.....	58
5.4.2 Mögliche Auswirkungen der Mutation bei Patient 256	60

5.5 Mögliche weiterführende Untersuchungen	61
5.5.1 Patienten mit Befund.....	61
5.5.2 Patienten ohne Befund	62
6 Zusammenfassung	65
6.1 Deutsche Zusammenfassung	65
6.2 English Summary	66
7 Material	67
8 Literaturverzeichnis	71
9 Abkürzungen	79
10 Danksagung	81
11 Lebenslauf	82

1 Einleitung

1.1 Dystonie

Die Dystonie ist durch unwillkürliche, stereotype Muskelkontraktionen gekennzeichnet, die meist langsam ablaufen und bis hin zum dystonen Krampf gehen können, der sich auch passiv nicht lösen lässt (Masuhr et al. 1998).

Dabei können Minuten bis Stunden andauernde Fehlstellungen und abnorme Haltungen eingenommen werden, die oftmals sehr schmerzhaft sind.

Bei der generalisierten Dystonie sind unterschiedliche Muskelgruppen des ganzen Körpers betroffen, die fokale Dystonie hingegen manifestiert sich lokal, z.B. als oromandibuläre Dystonie mit unwillkürlichen Bewegungen von Lippen und Kiefer oder als zervikale Dystonie bzw. Torticollis spasmodicus, einer Verdrehung des Halses. Fokale Dystonien werden häufig durch Willkürbewegungen provoziert, die nicht selten sehr spezifisch sind, so kann beispielsweise beim Gehen ein dystones Syndrom auftreten, aber nicht beim Tanzen (Friedman et al. 2001).

Durch psychische Faktoren wie Stress kann Auftreten und Intensität der dystonen Symptomatik verstärkt werden.

Im allmählich progredienten Verlauf insbesondere der generalisierten Dystonie kann es zu schweren Muskelkontrakturen und Skelettdeformitäten kommen (z.B. Skoliose).

Es werden primäre von sekundären Dystonien unterschieden. Die sekundären Dystonien treten auf dem Boden einer Grundkrankheit, wie z.B. M. Parkinson auf, aber auch Traumen, Medikamente etc. kommen als Ursache in Betracht. Mit primärer Dystonie werden die idiopathischen Formen bezeichnet, sie kommt familiär oder sporadisch vor.

Dystonien, die in Kindheit oder Jugend beginnen, neigen häufig dazu, zu generalisieren und sind meist genetisch bedingt, während Dystonien, die erst im Erwachsenenalter auftreten, eher fokal begrenzt bleiben und sporadisch auftreten (Klein et al. 2000).

Eine Einteilung der Dystonien, die auf ätiologischen und klinischen Kriterien beruht, aber auch genetische Aspekte miteinbezieht, zeigt Abb. 1.

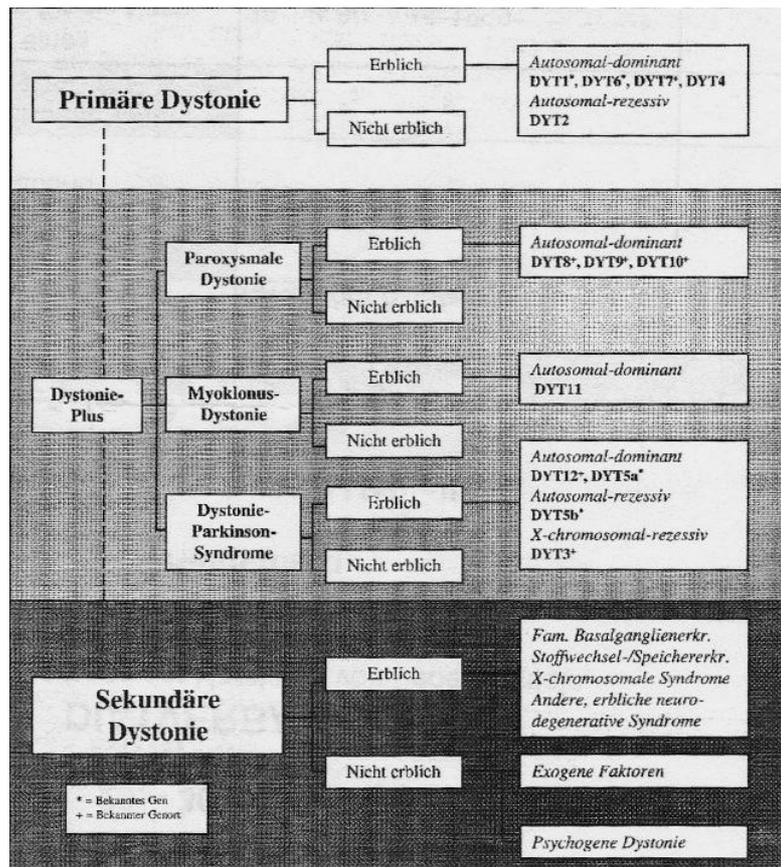


Abb.1 Einteilung der Dystonien. (In Anlehnung an Marsden 1988, Fahn et al. 1998 und Müller et al. 1998). (Anm. d. Verf.: Die DYT 13 ist in dieser Abbildung nicht mit aufgeführt.)

Aus: Klein et al. 2000

Primäre, genetisch definierte Dystonien werden z.Zt. in der Literatur dreizehn unterschieden (Klein et al. 2002). Zwei davon waren Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit. Beide werden in der Gruppe der primären Dystonien zu den sogenannten Dystonie-plus-Formen gezählt, da sie mit anderen Bewegungsstörungen zusätzlich zur Dystonie einhergehen.

1.2 Dopa-responsive Dystonie (DRD) / DYT 5

Die Dopa-responsive Dystonie (DRD) zeichnet sich durch Dystonie in Verbindung mit Parkinsonismus aus. Charakteristisch sind tageszeitliche Schwankungen der Symptomatik und ein hervorragendes Ansprechen auf eine Therapie mit L-Dopa (Müller et al. 1998, Klein et al. 2000).

Die Erkrankung beginnt normalerweise in der Kindheit, oftmals mit einer dystonen Fehlhaltung des Fußes mit daraus resultierender Gangstörung und greift im Verlauf auf andere Körperregionen über (Klein et al. 2000, Bandmann et al. 2002). Das Spektrum der Symptome reicht von fokalen Dystonien, wie z.B. einer Supinationsstellung der Füße, einem Torticollis u.a., bis hin zur generalisierten Dystonie, durch die Patienten auf den Rollstuhl angewiesen sind (Steinberger et al. 1996, Müller et al. 1998). Dazu finden sich typischerweise parkinsonoide Krankheitszeichen: Tremor, Rigor, Bradykinesie und Verlust von Haltungsreflexen treten einzeln oder in Kombination auf. In etwa 75% der Fälle zeigen sich die Beschwerden je nach Tageszeit unterschiedlich, und zwar insofern, als daß sich die Symptomatik gegen Abend hin verschlechtert und morgens bzw. nach längerem Schlaf lindert oder sogar völlig sistiert.

Fehldiagnosen sind häufig, so kann die DYT 5 bei Kindern wie eine infantile Zerebralparese erscheinen, erst im Erwachsenenalter auftretende DRD eine der häufigeren Formen des Parkinson-Syndroms vortäuschen. Die vielfach auftretende Supinationsstellung der Füße kann als orthopädisches Problem verkannt werden und die zirkadiane Schwankung der Symptomatik auf eine psychische Störung fehlschließen lassen.

Im Unterschied zu anderen früh einsetzenden Parkinson-Syndromen mit Dystonie (z.B. juveniler Parkinsonismus) ist die DRD mit L-Dopa behandelbar. Die Beschwerden remittieren vollständig und anhaltend schon bei relativ niedrigen Dosierungen und auch noch nach längerer Krankheitsdauer. Die unter der L-Dopa-Therapie des M.Parkinson häufig auftretenden Nebenwirkungen, wie z.B. das „on-off-Phänomen“, sind hierbei nicht zu beobachten.

Genetisch sind zwei Formen der DRD bekannt: Zum einen eine autosomal-dominant, zum anderen eine autosomal-rezessiv vererbte Variante.

Bei der häufigeren autosomal-dominanten Form der DRD wurde ein Genlokus für die Erkrankung auf Chromosom 14q kartiert, und im auf Chromosom 14q22.1-q22.2 befindlichen *GCH1*-Gen konnten mittlerweile an die 100 unabhängige Mutationen bei von DRD betroffenen Familien nachgewiesen werden (Thöny et al. 2006). *GCH1* codiert für die GTP-Cyclohydroxylase 1 (GTPCH1), welche das Schlüsselenzym für die Biosynthese von Tetrahydrobiopterin (BH4) ist. So zeigen typische Laborbefunde bei DYT 5 auch verminderte Konzentrationen von GTPCH1, Neopterin (einer Vorstufe von BH4) und

Biopterin (einem Abbauprodukt von BH4) im Liquor bzw. in Zytokin-stimulierten Fibroblasten (Segawa 2000, Bandmann et al. 2002, Blau et al. 2001).

BH4 ist ein essentieller Co-Faktor u.a. für die Tyrosin-Hydroxylase, welche die Umwandlung von Tyrosin in L-Dopa katalysiert, was das prompte Ansprechen auf geringe Gaben von L-Dopa bei Patienten mit DRD erklärt (Müller et al. 1998, Ichinose et al. 1999, Löffler et al. 1997). So fanden neuropathologische Untersuchungen bei einer 19-jährigen tödlich verunglückten DRD-Patientin auch einen erniedrigten Dopamingehalt in Substantia nigra und Striatum (Beom SJ 1997, Segawa 2000). Anders aber als bei anderen mit Parkinsonismus einhergehenden Erkrankungen bestand kein degenerativer Prozeß; genauso zeigen PET- und SPECT-Untersuchungen bei DYT 5-Patienten charakteristischerweise keine entsprechenden Auffälligkeiten - wie verminderte Fluorodopa-Aufnahme bzw. Zellverlust - im nigrostriatalen System. Dies begründet die vollständige Reversibilität der DRD-Beschwerden nach L-Dopa-Gabe.

Ist ein Patient homozygot für Mutationen in *GCH1*, entwickelt er eine Hyperphenylalaninämie und zeigt schwere neurologische Symptome wie Entwicklungsstörungen, zerebrale Krampfanfälle, Parkinsonoid, Hyperthermie-Episoden u.a. Im Gegensatz zu heterozygoten Individuen tritt keine Dystonie auf (Ichinose et al. 1999).

Kürzlich wurde bei einer Patientin mit autosomal-dominant vererbter DRD ein weiterer Krankheitsloкус auf Chromosom 14q13 entdeckt (Grötzsch et al. 2002, Furukawa 2004). Die 77-jährige Frau zeigte die typischen klinischen Zeichen einer DYT 5, die klassisch mit einer Dystonie der unteren Extremitäten in der Kindheit begann, welche sich im Laufe der Zeit verschlechterte und bis auf die oberen Extremitäten ausbreitete, so daß die Patientin an den Rollstuhl gefesselt war. Die Symptomatik verbesserte sich dramatisch nach Gabe von L-Dopa. Weder im codierenden Bereich noch den Exon-Intron-Grenzen von *GCH1* konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Über eine Genom-weite Kopplungsanalyse schließlich konnte der Genloкус für die Erkrankung in dieser Familie auf Chromosom 14q13, klar außerhalb des *GCH1*-Gens, kartiert werden.

Die autosomal-rezessive DRD wird verursacht durch Mutationen im Tyrosin-Hydroxylase (TH)-Gen, welches sich auf Chromosom 11p15.5 befindet. Je nach Art der Mutation ist der Verlust an Aktivität der TH unterschiedlich stark ausgeprägt und

erscheint als milde Form des TH-Mangels mit Symptomatik wie bei autosomal-dominanter DRD oder als schwer verlaufende Form ohne Dystonie mit früh einsetzendem Parkinsonoid (Ichinose et al. 1999, Bandmann et al. 2002). Auch ein kombiniert heterozygoter Fall von TH-Mangel, der mit dem klinischen Bild einer Spastischen Paraplegie einherging, ist mittlerweile beschrieben (Furukawa et al. 2001). Aufgrund des z.T. sehr vom klassischen Bild der DRD abweichenden Beschwerdebilds subsumieren nicht alle Autoren den TH-Mangel unter DRD, sondern betrachten ihn als eigenständige Krankheitsentität (de Rijk-van Andel et al. 2000).

Ca. 40-50% der Patienten mit klinisch manifester DRD-Symptomatik haben keine Mutation im codierenden Bereich bzw. den Exon-Intron-Grenzen von *GCH1* (Furukawa et al. 1999, Ichinose et al. 1999). Möglicherweise liegen hier Sequenzänderungen im nicht-codierenden Bereich von *GCH1* der Erkrankung zugrunde. Da zur Routine-Diagnostik von DRD häufig die DNA-Sequenzierung als Methode eingesetzt wird, könnten außerdem Deletionen übersehen worden sein, da diese, sofern sie heterozygot vorliegen, hierbei nicht entdeckt werden (Steinberger et al. 2007, Furukawa et al. 1999). Es könnten aber auch Mutationen in anderen Genen an der Pathogenese der DRD bei diesen Patienten beteiligt sein. Neben dem *TH*-Gen kämen u.a. insbesondere die Gene infrage, die für die weiteren an der BH₄-Synthese beteiligten Enzyme codieren.

1.2.1 Tetrahydrobiopterin (BH₄)

Tetrahydrobiopterin (BH₄) wird de novo aus GTP über zwei Zwischenprodukte synthetisiert (Thöny et al. 2000). Dazu werden die drei Enzyme GTP-Cyclohydroxylase 1 (GTPCH1), 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin-Synthase (6-PTS) und Sepiapterin-Reduktase (SR) benötigt (s. Abb. 2).

BH₄ ist essentiell für den Phenylalanin-Metabolismus der Leber und die Neurotransmitter-Biosynthese im Zentralnervensystem, indem es als Co-Faktor für die drei Aminosäure-Monooxygenasen Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Hydroxylase fungiert. - Die Phenylalanin-Hydroxylase katalysiert die Synthese von Tyrosin aus Phenylalanin. Die Tyrosin-Hydroxylase ist das erste Enzym der Katecholamin-Biosynthese und ist verantwortlich für die Umwandlung von Tyrosin in L-Dopa, aus welchem in weiteren Reaktionsschritten Dopamin, Noradrenalin und

Adrenalin gebildet werden. Die Tryptophan-Hydroxylase synthetisiert aus L-Tryptophan 5-Hydroxytryptophan, das wiederum in Serotonin umgewandelt wird (Löffler et al. 1997). Ferner benötigt die Glycerylether-Monooxygenase BH₄ als Co-Faktor, ebenso wie sämtliche Isoformen der Nitroxid (NO)-Synthase (Thöny et al. 2000).

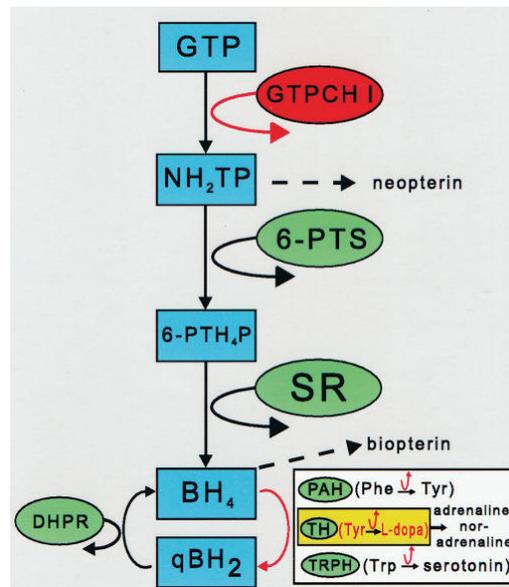


Abb. 2 De novo Biosynthese und Regeneration von Tetrahydrobiopterin (BH₄)

(GTP Guanosinriphosphat, NH₂TP Dihydroneopterinriphosphat, 6-PTH₄P 6-Pyruvoyltetrahydropterin, BH₄ Tetrahydrobiopterin, qBH₂ Quinoiddihydrobiopterin, GTPCH1 GTP-Cyclohydroxylase 1, 6-PTS 6-Pyruvoyltetrahydropterin-Synthase, SR Sepiapterin-Reduktase, PAH Phenylalanin-Hydroxylase, TH Tyrosin-Hydroxylase, TRPH Tryptophan-Hydroxylase, Phe Phenylalanin, Tyr Tyrosin, Trp Tryptophan, DHPR Dihydropteridin-Reduktase, ↘ Einsatz von BH₄ als Co-Faktor)

Aus: Müller et al. 1998

Bis auf die NO-Synthese wird BH₄ bei allen enzymatischen Reaktionen, an welchen es beteiligt ist, konsekutiv zu Tetrahydrobiopterin-4a-carbinolamin oxidiert, anschließend über einen Zwischenschritt mittels der Enzyme Pterin-4a-carbinolamin-Dehydratase (PCD) und Dihydropteridin-Reduktase (DHPR) regeneriert.

Als Co-Faktor der NO-Synthase hingegen wirkt BH₄ stabilisierend auf die Dimerisation des Proteins (Moens et al. 2006). Offenbar nimmt es an der Oxidation von Arginin zu NO (und Citrullin) unmittelbar teil und wird dabei zum BH₃-Radikal; die exakte Rolle von BH₄ bei der NO-Synthese bleibt aber noch eingehender zu erforschen.

Die Freisetzung von Dopamin und Serotonin erhöht BH4 auch unabhängig von seiner Rolle als Co-Faktor der Tyrosin-Hydroxylase.

Weiterhin ist eine zellproliferative Wirkung von BH4 nachgewiesen, und schließlich spielt BH4 auch eine Rolle beim nekrotischen und apoptotischen Zelltod, besitzt aber auch zytoprotektive Wirkungen (Werner-Felmayer et al. 2002). Womöglich hat BH4 unspezifische antioxidative Effekte zusätzlich zu seiner Funktion bei der NO-Synthese (Moens et al. 2006).

Es existiert ein alternativer, sozusagen „Pterin-Wiederverwertungs“-Stoffwechselweg zur Bildung von BH4, wobei BH4 aus Sepiapterin mittels der o.g. Sepiapterin-Reduktase synthetisiert wird, welche Sepiapterin zunächst in Dihydrobiopterin umwandelt, das wiederum durch die Dihydrofolat-Reduktase zu BH4 metabolisiert wird (Ohye et al. 1998, Thöny et al 2000). Dieser alternative Stoffwechselweg kann Defekte der BH4-Biosynthese allerdings nicht kompensieren (Moens et al. 2006).

BH4-Mangel führt meist zu atypischer Hyperphenylalaninämie, welche auf phenylalaninarme Diät nicht anspricht (Thöny et al. 2000). Er beinhaltet eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die alle Organe, inklusive das Zentralnervensystem, betreffen oder aber auf das periphere hepatische Phenylalaninhydroxylase-System beschränkt bleiben können. Die Symptome treten üblicherweise im Alter von einigen Monaten auf (Blau 1988). Klassischerweise findet sich ein abgeschwächter Muskeltonus, daraus resultierende Schluckstörungen und verminderte Kontrolle der Kopfhaltung, Hypertonie der Extremitäten-Muskulatur sowie Hyperthermie-Episoden ohne vorangegangene Infektion. Weiterhin treten athetotische Bewegungsstörungen und zerebrale Krampfanfälle auf, viele Patienten sind in ihrer intellektuellen Entwicklung zurückgeblieben.

BH4-Mangel kann durch Mutationen in allen Genen, die für Enzyme seiner Biosynthese oder Regeneration codieren, verursacht werden.

Eine Besonderheit unter den BH4-Mangelerkrankungen stellen der autosomal-dominante GTPCH1-Mangel bzw. DRD und der Sepiapterin-Reduktase-Mangel dar, da sie ohne Hyperphenylalaninämie einhergehen. Eine latente Insuffizienz der Phenylalanin-

Hydroxylase in der Leber lässt sich bei diesen Erkrankungen nur durch den sogenannten Phenylalanin-Belastungstest detektieren.

Auch was das klinische Erscheinungsbild betrifft, weicht insbesondere die autosomal-dominante DRD z.T. deutlich vom klassischen BH4-Mangel ab; beim homozygoten Sepiapterin-Reduktase-Mangel hingegen finden sich sowohl Symptome wie bei autosomal-dominanter DRD als auch typische BH4-Mangel-Zeichen (Thöny et al. 2006), mitunter wird er auch als Unterform der DRD bzw. atypisch verlaufende Form klassifiziert (Neville et al. 2005, Farrugia et al. 2006, Abeling et al. 2006).

Somit erscheint bei Patienten, welche die klinische Symptomatik einer DRD zeigen, im *GCH1*-Gen aber keine Mutation aufweisen, das Gen, welches für die Sepiapterin-Reduktase codiert, als eines der naheliegendsten Kandidatengene. So wurde das Sepiapterin-Reduktase-Gen im Rahmen dieser Dissertation bei 100 solcher Patienten auf mögliche Veränderungen hin untersucht.

1.2.2 Sepiapterin-Reduktase

Die Sepiapterin-Reduktase (SR) ist ein homodimeres Protein. Sie katalysiert den letzten Schritt der de novo BH4 -Biosynthese, ebenso wie den ersten Schritt der BH4-Synthese aus Sepiapterin. Außerdem scheint Sepiapterin eine (oder mehrere) Funktionen außer der Beteiligung an der BH4-Synthese zu besitzen, da Sepiapterin-Reduktase im Gehirn auch in den Pyramidenzellen des cerebralen Cortex nachgewiesen werden konnte, welche weder monoaminerg sind noch NO-Synthase-Aktivität besitzen (Ikemoto et al. 2002). Außerhalb des Zentralnervensystems ist Sepiapterin-Reduktase in den meisten Geweben lokalisiert außer im Muskel, Magen und Dünndarm (Ohye et al. 1998).

Das Gen für die humane Sepiapterin-Reduktase (*SPR*) befindet sich auf Chromosom 2p13. Es weist eine Länge von annähernd 4 kb auf und besteht aus 3 Exons. In der Region innerhalb 300bp strangaufwärts des 5'-Endes von Exon 1 befindet sich keine TATA- oder CAAT-Box, vielmehr konnte eine GC-Box als Erkennungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 ausfindig gemacht werden. Dies und die oben erwähnte Tatsache, daß Sepiapterin-Reduktase in den meisten Geweben lokalisiert ist, läßt vermuten, daß es sich beim *SPR*-Gen um ein Haushaltsgen handelt.

2001 wurden erstmals zwei Patienten mit Sepiapterin-Reduktase-Mangel von Bonafé et al. beschrieben; mittlerweile sind fünfzehn Patienten, welche an dieser Erkrankung leiden, bekannt. Als Kardinalsymptome gelten früh einsetzende Hypotonie der Muskulatur mit im Verlauf hinzutretender Dystonie, auch Spastik, okulogyrische Krisen und Tremor treten auf sowie fast immer eine Intelligenzminderung (Neville et al. 2005, Abeling et al. 2006, Friedman et al. 2006). Ähnlich wie bei der DRD zeigen sich tageszeitliche Schwankungen der Haltungs- und Bewegungsstörungen und deren dramatische, wenn auch nicht vollständige Besserung nach Gabe von L-Dopa.

Ebenso gemeinsam mit der DRD gehört der Sepiapterin-Reduktase-Mangel zu den BH₄-Mangelkrankheiten, welche ausnahmsweise ohne Hyperphenylalaninämie einhergehen. Dies sowie normale Pterin-Konzentrationen im Urin und annähernd normale Sepiapterin-Reduktase-ähnliche Aktivität in den Erythrozyten bei betroffenen Patienten läßt vermuten, dass bei der BH₄-Biosynthese im peripheren Gewebe Sepiapterin-Reduktase durch Aldose-Reduktase (AR), Carbonyl-Reduktase (CR) und Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) ersetzt werden kann, wohingegen im Gehirn nur Aldose-Reduktase und Carbonyl-Reduktase ausreichend vorhanden sind. (s. Abb. 3)

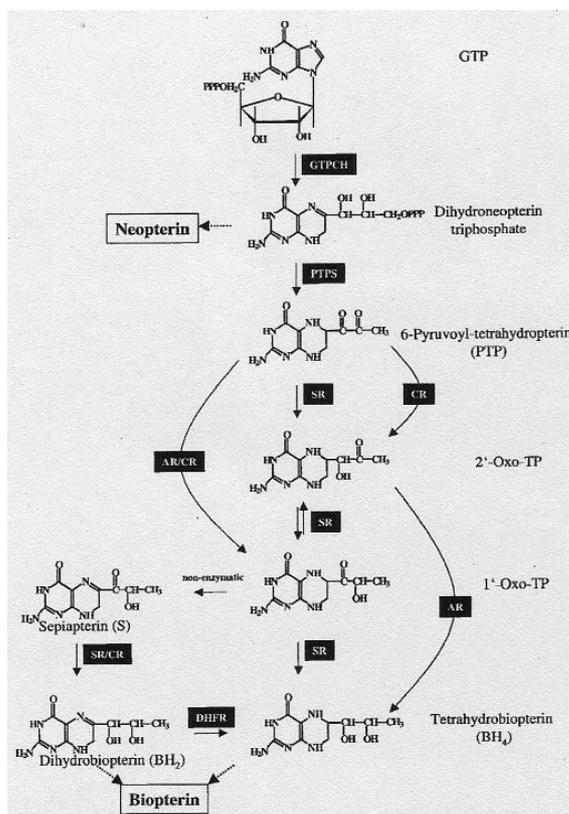
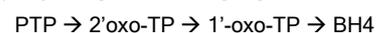
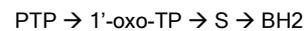


Abb. 3: Tetrahydrobiopterin-Biosynthese und alternative Stoffwechselwege bei Sepiapterin-Reduktase-Mangel

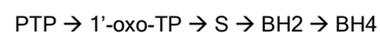
a) Physiologische Bedingungen:



b) Sepiapterin-Reduktase-Mangel/Gehirn:



c) Sepiapterin-Reduktase-Mangel/peripheres Gewebe:



Die in der Abbildung dargestellte Reaktion $\text{PTP} \rightarrow 2'\text{-Oxo-TP}$ mittels CR findet nur in untergeordnetem Maße statt.

(CR Carbonyl-Reduktase, AR Aldose-Reduktase, DHFR Dihydrofolat-Reduktase)

Aus: Blau et al. 2001

Der alternative Stoffwechselweg im Gehirn würde zur Akkumulation von Dihydrobiopterin (BH₂) führen, welches zu Biopterin verstoffwechselt wird; so findet man bei Personen mit Sepiapterin-Reduktase-Mangel auch erhöhte Biopterin-Werte im Liquor, und ebenfalls erhöhte Sepiapterin-Spiegel weisen auf die Bildung von BH₂ aus Sepiapterin hin (Zorzi et al. 2002).

Was die Pathogenese des Sepiapterin-Reduktase-Mangels angeht, so wird vermutet, daß hierbei der erhöhte Dihydrobiopterin- und Sepiapterin-Spiegel eine zentrale Rolle spielen. Dihydrobiopterin ist ein kompetitiver Inhibitor der Tyrosin- und Tryptophan-Hydroxylase, dadurch ist bei gleichzeitig erniedrigten BH₄-Konzentrationen die Katecholamin- und Serotoninproduktion stark reduziert (Blau et al. 2001).

Des Weiteren sind sowohl Dihydrobiopterin als auch Sepiapterin in der Lage, Tetrahydrobiopterin von der NO-Synthase (zumindest der endothelialen Isoform) zu verdrängen, was letztlich die NO-Produktion unterbindet und zur Entstehung von Peroxynitrit führt (Vasquez-Vivar et al. 2002, Blau et al. 2001, Zorzi et al. 2002). Peroxynitrit wiederum kann durch Oxidation von Lipiden, Proteinen und DNA die Apoptose neuronaler Zellen herbeiführen.

Die den Sepiapterin-Reduktase-Mangel verursachenden Defekte im gleichnamigen Gen sind bei den außerhalb dieser Doktorarbeit untersuchten Patienten allesamt homozygot bzw. kombiniert heterozygot (Bonafé et al. 2001, Blau et al. 2001, Farrugia et al. 2006, Abeling et al. 2006, Friedman et al. 2006), umfassen bei sieben Patienten eine vermutete Spleißmutation, ansonsten Mutationen innerhalb codierender DNA. Die Spleißmutation zerstört die unveränderliche AG-Sequenz der Akzeptor-Spleißstelle von Intron 2. Die Mutationen innerhalb der codierenden *SPR*-DNA führen teils zu vorzeitigen Stopcodons und somit sehr wahrscheinlich zu verkürzter mRNA, welche dem sogenannten Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau unterliegen würde (Bonafé et al. 2001). Für einen nicht-synonymen Basenaustausch von A zu G innerhalb Exon 2 wiederum, welcher bei mehreren SR-Mangel-Patienten gefunden wurde, wurde mittels bakterieller Expressionssysteme die resultierende Dysfunktionalität des codierten Proteins nachgewiesen.

1.3 Paroxysmale kinesiogene Choreoathetose (PKC) / DYT 10

Von den nicht-kinesiogenen paroxysmalen Dystonien lässt sich die Paroxysmale kinesiogene Choreoathetose (PKC) dadurch unterscheiden, dass sie durch willkürliche Bewegungen ausgelöst wird.

Bei der PKC sind zusätzlich zur Dystonie-Symptomatik Chorea, Athetose und Ballismus feststellbar (Klein et al. 2000, Friedman et al. 2001). Die Beschwerden treten anfallsweise auf, wichtig ist somit die Abgrenzung gegenüber anderen paroxysmalen Erkrankungen, v.a. der Epilepsie.

Das Krankheitsbild manifestiert sich zwischen Kindheit und frühem Erwachsenenalter.

Die Dyskinesien werden zumeist durch plötzliche Bewegungen, wie z.B. schnelles Aufstehen ausgelöst, aber auch kontinuierliche körperliche Anstrengung, Hyperventilation oder Erschrecken können den Attacken vorausgehen (Bathia 1999). Manche Patienten verspüren vor Beginn eine Aura mit unterschiedlichen Sensationen wie beispielsweise Schwindel, Parästhesien oder Spannungsgefühl (Klein et al. 1998, Lotze et al. 2003). Sind die Attacken gering ausgeprägt, können die Betroffenen ihre bisherige Tätigkeit fortsetzen, z.B. langsam weitergehen, schwerere Dyskinesien jedoch können dazu führen, dass der Patient zu Boden stürzt.

Am häufigsten sind die Extremitäten von den Anfällen betroffen; typisch können z.B. Dyskinesien des Armes mit Flexion im Ellenbogengelenk und Krallenposition der Finger sein. Aber auch faciale Dyskinesien treten auf, beispielsweise mit Zurücktreten der Augenlider und Zähneblecken. Ebenso kann die Stimme durch Dystonie beeinträchtigt werden.

Die Dauer der Attacken beträgt nur wenige Minuten, doch können sie mehrmals täglich, bis an die 100mal und häufiger, auftreten.

Die Anfälle können sowohl uni- als auch bilateral, aber auch fokal lokalisiert sein, das Bewusstsein bleibt immer erhalten; EEG-Ableitungen zeigen sich in der Regel nicht pathologisch. Zwischen diesen Episoden sind die Patienten neurologisch unauffällig.

Im Gegensatz zu den nicht-kinesiogenen Formen spricht die PKC auf antikonvulsive Therapie, meist Carbamazepin, an. Im Längsschnitt zeigt sie eine gute Spontanprognose.

Die Pathogenese betreffend wird bei der PKC, ebenso wie bei den anderen Dystonien, eine gestörte Funktion im Bereich der Basalganglien diskutiert (Bhatia et al. 1999, Lotze et

al. 2003). Ein Hauptargument für diese These ist daher auch die Ähnlichkeit der bei der PKC beobachteten Dyskinesien mit der Symptomatik von Basalganglienerkrankungen. Iktale und interiktale SPECT-Analysen ergaben außerdem Hinweise auf einen erhöhten zerebralen Blutfluß in den Basalganglien einiger PKC-Patienten. In neuropathologischen Untersuchungen an DYT 10-Patienten dagegen konnten bislang keine signifikanten Auffälligkeiten festgestellt werden.

Über den genauen Pathomechanismus müsste spekuliert werden, allgemein läßt sich nur sagen, daß Inhibition oder aber Disinhibition thalamo-kortikaler Projektionen aufgrund direkter Schädigung oder veränderter Impulsgabe von Substantia nigra, Globus pallidus und/oder Striatum Dyskinesien verursachen kann (Masuhr et al. 1998).

So zeigt sich auch der Thalamus bei symptomatischer PKC (s.a.u.), z.B. infolge eines Hirninfarktes, relativ häufig betroffen, weshalb vermutet wird, daß - da diese Hirnstruktur an sensorischen Prozessen (u.a. Propriozeption) beteiligt ist - dies zur kinesiogenen Natur der Erkrankung führt.

- Gegen einen kortikalen und für einen subkortikalen Ursprung der PKC sprechen weiterhin das Fehlen von pathologischen EEG-Veränderungen, das Unterbleiben der Generalisation der Attacken und das während der Dyskinesien stets erhaltene Bewusstsein.

Ätiologisch kommt die PKC sporadisch, familiär und symptomatisch vor.

Als Ursache der symptomatischen Form findet sich meist ein Diabetes mellitus oder ein Hypoparathyreoidismus, aber auch Multiple Sklerose, Zustände nach perinataler Hypoxie und Kopfverletzungen können mit einer PKC einhergehen, und nicht zuletzt kann ein Hirninfarkt eine PKC zur Folge haben.

Die familiäre PKC folgt offensichtlich einem autosomal-dominanten Erbgang.

Szepetowski et al. diagnostizierten 1997 bei vier französischen Familien ein Syndrom bestehend aus nicht-fieberhaften Krämpfen im Kindesalter und paroxysmaler, bei einem Teil der betroffenen Familienmitglieder auch kinesiogener, Choreoathetose („familial infantile convulsions and choreoathetosis“/ICCA) und lokalisierten das zugehörige Gen in der perizentromeren Region von Chromosom 16.

Bei acht japanischen Familien mit klassischer PKC zeigten sich signifikante Hinweise einer Kopplung zu Markern einer den Locus für ICCA überlappenden Region auf Chromosom 16 (Tomita et al. 1999).

Da die Verknüpfung von PKC mit dem Vorkommen von Krampfanfällen in der Kindheit bereits mehrfach beschrieben und auch bei den genannten Familien teilweise festgestellt wurde, warfen die genannten Befunde die Frage auf, ob es sich beim Genort der ICCA gleichzeitig um den der PKC handelt.

Dies wurde in Frage gestellt durch die Entdeckung eines klar vom ICCA-Lokus und vom PKC-Lokus der japanischen Familien getrennten Krankheitslokus in einer großen indischen Familie mit PKC ohne infantile Krämpfe auf Chromosom 16q13-q22.1 (Valente et al. 2000) (s. Abb. 4).

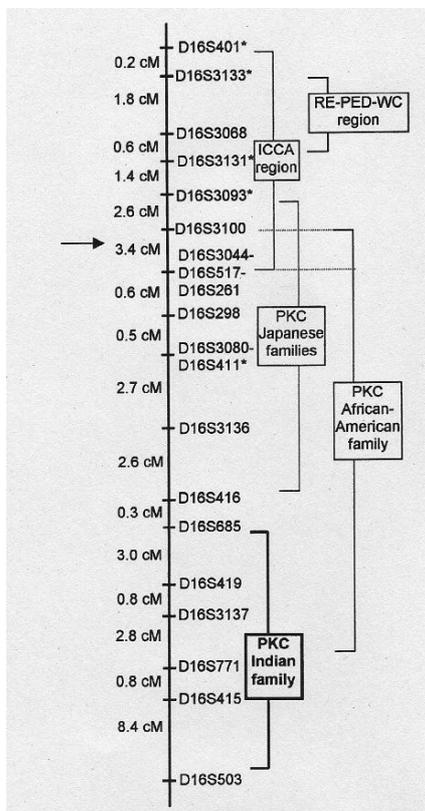


Abb. 4 Schematische Darstellung eines Teils der genetischen Karte von Chromosom 16.

Angezeigt sind:

- die von Szepetowski et al. 1997 bestimmte ICCA-Region (flankierende Marker: *D16S401* und *D16S517*)

- die von Tomita et al. 1999 bestimmte PKC-Region (flankierende Marker: *D16S3093* und *D16S416*)

- die von Bennett et al. 2000 bestimmte PKC-Region (flankierende Marker: *D16S3100* und *D16S771*)

- die von Valente et al. 2000 bestimmte PKC-Region (flankierende Marker: *D16S685* und *D16S503*), welche klar von der ICCA-Region und der PKC-Region der japanischen Familien getrennt ist.

Auf die weiterhin angezeigte RE-PED-WC-Region soll hier nicht weiter eingegangen werden.

→ Zentromer

Aus: Valente et al. 2000

Womöglich existiert also eine ganze Genfamilie in der perizentromeren Region von Chromosom 16, welche paroxysmale Dyskinesien verursacht. Aufgrund methodischer Unschärfen jedoch bleibt zumindest fraglich, ob nicht doch ein kleiner überlappender Bereich zwischen den kartierten Genorten für ICCA und PKC existiert (Kato et al. 2006).

- Auch im Vorfeld dieser Doktorarbeit wurde bei einer vierköpfigen französisch-deutschen Familie mit PKC der Krankheitsloкус auf Chromosom 16 kartiert (Steinberger, unveröffentlicht).

Das/die PKC verursachende/n Gen/e selbst konnten bislang noch nicht eindeutig identifiziert werden. Würde das jedoch gelingen, so könnte dies entscheidend zum Verständnis der Pathogenese der Erkrankung beitragen. Als mögliche Kandidatengene kommen vor allem solche, die für Ionenkanäle kodieren, in Frage.

So entdeckten Kikuchi et al. 2007 bei von PKC betroffenen Individuen auch einen nichtsynonymen Basenaustausch im Gen eines nicht-spannungsabhängigen Natriumkanals (*SCNN1G*). Ein kausaler Zusammenhang mit der Erkrankung wurde zwar nicht nachgewiesen, aber bei 400 gesunden Kontrollpersonen fand sich der Basenaustausch nicht.

1.3.1 Paroxysmale Störungen des Nervensystems als Ionenkanalerkrankungen

Mutationen in Genen, die für Ionenkanäle kodieren, konnten bislang für eine Vielzahl neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen verantwortlich gemacht werden. So liegen beispielsweise einigen myotonen Syndromen Mutationen in einem Natriumkanalgen zugrunde, wie z.B. bei der periodischen hyperkaliämischen Lähmung oder der Paramyotonia congenita (Ptáček 1997, Bathia et al. 2000). Die Episodischen Ataxien wiederum beruhen auf dem Defekt eines Gens, welches für einen Kalium- (Typ 1) bzw. Kalziumkanal (Typ 2) kodiert usw. – Mit anderen episodischen neurologischen Erkrankungen, deren ursächlicher Gendefekt noch nicht identifiziert worden ist, wie eben der PKC, ist vielen Ionenkanalerkrankungen gemein, dass sie anfallsweise auftreten und die betroffenen Patienten zwischen den Anfällen beschwerdefrei sind. Ebenso ähneln sich die Faktoren, die die Attacken hervorrufen: Erschöpfung, Streß, Koffein oder Änderungen des Kalium-Spiegels sind oftmals Auslöser unterschiedlichster paroxysmaler Ereignisse. Epilepsien, Migräne und Paroxysmale Dyskinesien teilen weiterhin das klinische Merkmal des Vorhandenseins einer Aura vor Einsetzen der Anfälle bei vielen Patienten. Schließlich gibt es auch Überschneidungen bei der medikamentösen Therapie: Sowohl Epilepsien als auch Paroxysmale Dyskinesien sprechen auf Antikonvulsiva an.

Da elektrische Signale für die Funktion von Nerven- und Muskelzellen unabdingbar sind, ist die Tatsache, dass Ionenkanäle in der Pathophysiologie verschiedener paroxysmaler neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen die zentrale Rolle spielen, nicht weiter verwunderlich. Weil die Funktion insbesondere von spannungsabhängigen Kaliumkanälen bei einigen Neuronen wie z.B. den Purkinje-Zellen mit deren Reifung und Entwicklung sowie deren Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress verknüpft ist, können allerdings bei Störungen derselben auch neurodegenerative Erkrankungen resultieren (Waters et al. 2006).

– Die am besten verstandenen Ionenkanalerkrankungen sind solche, welche die Erregbarkeit der Muskelzelle beeinflussen und somit neuromuskuläre Störungen verursachen. So besteht z. B. bei der oben schon erwähnten periodischen hyperkaliämischen Lähmung eine (zeitweise) Unerregbarkeit der Muskelzellmembran, da deren veränderte Natrium-Kanäle zu lange geöffnet bleiben, so dass kein Membranpotential aufgebaut werden kann (Yang et al. 1994, Masuhr et al. 1998). Im Gegensatz dazu ist bei Patienten mit Paramyotonia congenita eine Übererregbarkeit des Sarkolemms feststellbar, was zu wiederholten Aktionspotentialen und somit zu Myotonie führt.

Das paroxysmale Auftreten dieser Erkrankungen lässt sich dadurch erklären, dass zwischen den Anfällen die Dysfunktion des Ionenkanals kompensiert wird und spezifische exogene oder endogene Trigger notwendig sind, um einen Anfall auszulösen (Lehmann-Horn et al. 2002). Ein solcher Trigger ist bei der periodischen hyperkaliämischen Lähmung beispielsweise, wie der Name schon sagt, der Kaliumspiegel.

Die pathophysiologischen Mechanismen von Erkrankungen, die durch defekte neuronale Ionenkanäle verursacht werden, sind hingegen weniger genau bekannt. Aber auch hier treten Abweichungen in der Funktion des betroffenen Ionenkanals, wie verminderte oder erhöhte Erregbarkeit, Änderungen von Amplitude oder Dauer des Aktionspotentials oder gestörte Depolarisation auf, was die neuronale Funktion beeinträchtigt (Kullmann 2002). Daß eine erhöhte Erregbarkeit neuronaler Ionenkanäle epileptogen sein kann, konnte am Beispiel der GEFS+ („generalised epilepsy with febrile seizures plus“) bereits gezeigt werden (Graves et al. 2005).

Für paroxysmale Dyskinesien allgemein und die hier untersuchte PKC speziell existieren zudem Tiermodelle: die „tottering“ Maus und die „medl“ Maus. Bei der „tottering“ Maus als Modell für paroxysmale Dyskinesien allgemein liegt eine Mutation eines Gens für einen neuronalen Kalzium-Kanal der Störung zugrunde (Fureman et al. 2002). Bei der „medl“ Maus liegt eine Mutation eines neuronalen Natriumkanals vor (Sprunger et al. 1999, Hamann et al. 2003). Bewegungen lösen bei ihr Dystonien aus, EEG-Veränderungen zeigen sich dabei nicht und das Bewusstsein bleibt während der Attacken erhalten. Dies führte dazu, dass die „medl“ Maus als Modell für PKC angesehen wurde. Die Zweckmäßigkeit als Tiermodell für PKC wurde allerdings nach eingehenden Untersuchungen von Hamann et al. 2003 in Frage gestellt, da diese enthüllten, daß bei der „medl“ Maus die motorischen Störungen nicht paroxysmal auftreten, sondern vielmehr permanent vorhanden sind. Weiterhin gilt die Muskelschwäche, die bei den Tieren zusätzlich vorliegt, als untypisch für Dystonie.

Dennoch kann aufgrund der für eine Ionenkanalerkrankung typischen klinischen Charakteristika der PKC ebenso wie aufgrund der Ähnlichkeit zu Tiermodellen, die Mutationen in Ionenkanalgenen aufweisen, ein Gen, welches für einen Ionenkanal kodiert, als exzellentes Kandidatengen für die PKC angesehen werden. Ein weiterer Hinweis stellt die Tatsache dar, dass die DYT 10 gut auf oftmals niedrige Dosen von Carbamazepin anspricht, welches spannungsabhängige Natrium-Kanäle blockiert (Bonev et al. 2002).

So wurde in der vorliegenden Dissertation ein innerhalb der o.g. kartierten Region auf Chromosom 16p12-p11 befindliches Gen für einen u.a. auch im Gehirn exprimierten Natrium-Glucose-Cotransporter (*RKST1*) bei der erwähnten französisch-deutschen Familie auf eventuell vorhandene Mutationen überprüft. In etwa zeitgleich geschah dies (ebenso) erfolglos durch Roll et al. 2002.

1.3.2 Natrium-Glucose-Cotransporter

Natrium-Glucose-Cotransporter sind eine Familie von Natrium-gekoppelten Membrantransportproteinen (Roll et al. 2002). Die Art der transportierten Stoffe reicht dabei von verschiedenen Zuckern bis hin zu anorganischen Anionen, d.h. auch ungekoppelter, passiver Natriumtransport ist möglich. Strukturell weisen sie mit einem

gemeinsamen Kern aus 13 Transmembran-Helices untereinander große Ähnlichkeit auf; das codierte Transportprotein, dessen DNA hier untersucht wurde, besteht aus 14 Helices.

Die untersuchte *RKST1*-DNA besteht aus 15 codierenden Exons. Offenbar existiert ein alternativ gespleißtes Transkript, welchem Exon 4A fehlt.

Eine pathogene Mutation im *RKST1*-Gen konnte bislang nicht entdeckt werden. Im Gen eines verwandten Natrium-Glucose-Cotransporters hingegen können Sequenzänderungen zu einem Glukose-Galaktose-Malabsorptionssyndrom führen.

1.4 Zielsetzung

In dieser Dissertation sollte bei zwei primären Dystonien, der Dopa-responsiven Dystonie/DYT 5 und der Paroxysmalen kinesiogenen Choreoathetose/DYT 10, jeweils ein Kandidatengen bei Patienten mit entsprechender Symptomatik auf eventuelle krankheitsverursachende Mutationen hin untersucht werden .

Das zu analysierende Kandidatengen für die Dopa-responsive Dystonie war das Sepiapterin-Reduktase-Gen, welches für das gleichnamige am BH4-Stoffwechsel beteiligte Enzym kodiert, in welchem bei in der Literatur beschriebenen Patienten mit Symptomatik ähnlich einer DRD sich bereits Mutationen fanden (Neville et al. 2004, Thöny et al. 2006). Die Untersuchung des *SPR*-Gens wurde bei 100 Patienten, die die klinischen Kriterien einer Dopa-responsiven Dystonie erfüllten und im sonst DRD-verursachenden *GCH1*-Gen keine Mutation aufwiesen, durchgeführt.

Für die Paroxysmale kinesiogene Choreoathetose diente als Kandidatengen das *RKST1*-Gen, welches für einen Natrium-Glucose-Cotransporter kodiert und sich innerhalb eines zuvor bei einer französisch-deutschen von PKC betroffenen Familie auf Chromosom 16 kartierten Krankheitslokus befindet. Die Mitglieder jener Familie dienten gleichzeitig auch als Probanden für das Mutationsscreening.

2 Patienten

2.1 Von DRD betroffene Patienten

Bei 100 Patienten mit Dopa-responsiven Bewegungsstörungen, bei denen sich zuvor keine Mutation in den sechs Exonen sowie flankierenden intronischen Sequenzen von *GCHI* gefunden hatte, wurde das Sepiapterin-Reduktase-Gen auf mögliche Mutationen hin untersucht.

Die Patienten rekrutierten sich aus solchen, welche entweder an einer generalisierten Dystonie erkrankt waren oder an einer fokalen Dystonie litten, in letzterem Fall dabei eine positive Familienanamnese, eine signifikante tageszeitliche Bindung der Symptome, einen Beginn der Erkrankung in den unteren Extremitäten oder eine relevante Besserung der Symptomatik unter der Einnahme von L-Dopa aufwiesen.

Näher eingegangen werden soll im folgenden auf das Beschwerdebild der beiden Patienten, bei denen in der vorliegenden Doktorarbeit eine Mutation im Sepiapterin-Reduktase-Gen gefunden wurde.

2.1.1 Patient 256

Die klinischen Untersuchungen des Patienten 256 waren im Vorfeld dieser Doktorarbeit durch das Universitätsklinikum Würzburg erfolgt.

Bei Zustand nach OP eines zervikalen Bandscheibenvorfalles litt der Patient unter persistierenden Schmerzen und Muskelverspannungen im Schulter-Nacken-Bereich ohne klinische oder radiologische Zeichen einer erneuten akuten Wurzelkompression, weswegen dystone Fehlhaltungen als Auslöser der Beschwerden diskutiert werden können.

Bei einer transkraniellen Sonographie des Neurocraniums fiel eine echodichte Zone im Bereich der Basalganglien auf, ein ebenfalls bei Dystonie-Patienten möglicher Befund.

2.1.2 Patientin 297

Die klinischen Untersuchungen der Patientin 297 waren zuvor von der Neurologischen Universitätsklinik in Freiburg durchgeführt worden.

Bei dieser Patientin fiel bereits in der Kindheit ein Zehengang, womöglich aufgrund eines Pes equinovarus auf, welcher bis zur Pubertät wieder verschwand. Im Alter von 15 Jahren bemerkte die Patientin abnorme Bewegungen des 4. und 5. Fingers der linken Hand, welche zunächst durch beabsichtigte Bewegungen ausgelöst wurden, später spontan auftraten. Im Verlauf traten Gangstörungen mit Innenrotation, Adduktion und Extension des linken, schließlich dystone Fehlhaltungen des rechten Beines sowie ein Tremor des rechten Armes hinzu. Durch Anstrengung wurde das Beschwerdebild verstärkt, nach einer Schwangerschaft zeigte sich eine weitere Verschlechterung.

Zum Untersuchungszeitpunkt fand sich eine Dystonie des linken Beines mit daraus resultierender Gangstörung, eine Dystonie des vierten und fünften Fingers der linken Hand, ein Tremor des linken Armes sowie ein intermittierender Stimmtremor. Es bestanden ausgeprägte tageszeitliche Schwankungen der Symptomatik.

Eine Verbesserung der Beschwerden zeigte sich unter Gabe von L-Dopa (3x200g Madopar/d), eine kontinuierliche Verabreichung wurde aber von der Patienten wegen unerwünschter Arzneimittelwirkungen wie Cephalgien und Nausea nicht toleriert.

2.2 Von PKC betroffene Patienten

Bei einer französisch-deutschen Familie, in der Symptome einer Paroxysmalen kinesiogenen Choreoathetose auftraten, wurde das *RKST1*-Gen untersucht.

Die folgenden klinischen Angaben sind den Berichten institutsfremder Ärzte und Kliniken entnommen.

Der Indexpatient der Familie, der zum Untersuchungszeitpunkt 15 Jahre alt war, litt seit dem Alter von 6 Jahren bei schnellen Bewegungen an kurzen Verkrampfungen unterschiedlicher Lokalisation. Insbesondere wenn er sich beeilen wollte, verkrampften beim Laufen Arme und Beine dyston, was einige Sekunden lang anhielt. Des weiteren

zeigten sich unregelmäßig kurze Muskelkontraktionen und Drehbewegungen unterschiedlicher Lokalisation einschließlich Augen, Mund und Zunge, ebenfalls Sekunden dauernd. Derartige Zustände traten mitunter bis zu 150mal am Tag auf, ohne ein regelhaftes tageszeitliches Auftreten zu zeigen.

Ein Therapieversuch mit Carbamazepin zeigte mäßigen Erfolg, musste wegen Unverträglichkeit jedoch ausgesetzt werden.

Die Mutter des Indexpatienten zeigte bis zu ihrer ersten Schwangerschaft eine ähnliche Symptomatik, Vater und Bruder sind gesund.

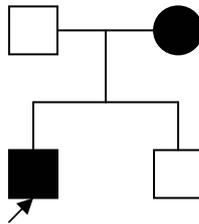


Abb. 5 Stammbaum der französisch-deutschen Familie
→ Indexpatient

3 Methoden

3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine in vitro-Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten (Mullis et al. 1986). Dabei wird mittels eines Enzyms anhand einer DNA-Vorlage bzw. -Matrize der gewünschte Abschnitt kopiert.

Das Enzym, eine DNA-Polymerase, benötigt als Startpunkt ein Oligonucleotid, einen sogenannten Primer, den es mit Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) oder Nucleotiden, den DNA-Bausteinen, verlängert (Mülhardt 2002). Es werden die zur jeweiligen Matrize komplementären Nucleotide eingebaut, die nichtkovalent durch Wasserstoffbrücken binden.

Für eine PCR werden zwei Primer so konstruiert, dass sie an den Randbereichen des zu vervielfältigenden Fragments sequenzspezifisch anlagern oder „annealen“, einer antiparallel zum A-, der andere zum B-Strang, und den gewünschten Abschnitt dabei einrahmen. Da auch die neu synthetisierten DNA-Abschnitte wieder als Vorlage dienen können, wird bei erneutem Annealing und wiederholter Amplifizierung das von den Primern begrenzte DNA-Stück überwiegen.

Zu Beginn jeder Amplifizierung muß die als Doppelstrang vorliegende DNA denaturiert, d.h. aufgetrennt werden, damit die Primer anlagern können. Da hierzu der Reaktionsansatz erhitzt wird, werden für PCRs hitzestabile DNA-Polymerasen benutzt. Die weiteste Verbreitung hat hierbei die aus dem - in heißen Quellen lebenden - Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isolierte Taq-Polymerase, da sie eine sehr hohe DNA-Syntheserate besitzt.

So wird bei der PCR die Temperatur zyklisch verändert, nach dem Denaturierungsschritt bei meist 94-96°C erfolgt das Annealing bei 50-70°C. Bei letzterem hängt die jeweilige Temperatur von der Schmelztemperatur der Primer ab. Die Schmelztemperatur meint hier die Temperatur, bei der die betrachteten DNA-Moleküle zu 50% denaturiert sind bzw. einzelsträngig vorliegen (Gassen et al. 1999). Temperaturen in der Nähe der Schmelztemperatur sollten niedrig genug sein, daß die Primer ausreichend anlagern

können und gleichzeitig hoch genug, daß die Hybridisierung spezifisch ist, und keine Fehlbasenpaarungen vorkommen.

Nach dem Annealing folgt die Kettenverlängerung bzw. „Extension“ bei 72°C, da hier das Arbeitsoptimum der Taq-Polymerase liegt.

Die genannten Schritte werden 25-40mal wiederholt, um eine bestmögliche Ausbeute an Reaktionsprodukt zu erzielen.

3.1.1 Konstruktion der Primer

Bei der Konstruktion der Primer einer bestimmten PCR sollten folgende Punkte Beachtung finden (Mülhardt 2002, Gassen et al. 1999):

- die Länge sollte zwischen ca. 18-30 bp liegen
- die Sequenz der Primer sollte möglichst spezifisch sein, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass die Primer auch an anderen als den vorhergesehenen Stellen anlagern können, sollte gering sein
- eine Sequenz mit mehr als vier gleichen Basen hintereinander sollte vermieden werden, um keine Leserasterverschiebungen zu erhalten
- die Primer sollten weder in sich noch untereinander hybridisieren können, da dies die Menge an verfügbarem Primer drastisch reduzieren würde
- die Schmelztemperatur der beiden Primer sollte in einem ähnlichen Bereich liegen, um optimale Reaktionsbedingungen einstellen zu können

Zum Primerdesign wurde das Computerprogramm Oligo™ verwendet.

3.1.2 Durchführung

Jede PCR wurde zunächst mit folgendem nicht-radioaktiven Reaktionsansatz ausgetestet, um die jeweils optimalen Parameter, insbesondere die Annealingtemperatur und eventuelle Zusätze, ermitteln zu können:

4µl	Nucleotid-Mix (je 25mM)	
2µl	10x PCR-Puffer,	<i>bei Verwendung von Q-Solution: 10x Qia-Puffer</i>
1µl	Primer A (10-15pmol/µl)	
1µl	Primer B (10-15pmol/µl)	
0.5µl	Taq-DNA-Polymerase,	<i>bei Verwendung von Q-Solution: 0,1µl Qia-Taq</i>
1µl	DNA (40ng/µl)	

Zusatz: 0,8/1,6µl MgCl₂ (25mM) / 2µl DMSO / 4µl Betain / 1µl Taq extender (1:10 v) / 4µl Q-Solution

ad 20µl H₂O dest.

Dieser wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet in einen Thermocycler gegeben. Nach Ablauf des PCR-Programms wurde die Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

- Bezüglich der Sequenzen der für die im Rahmen der vorliegenden Dissertation konstruierten Primer sowie Reaktionsbedingungen der zugehörigen PCRs s. Tab. 1 und 2.

3.1.3 PCR mit radioisotopischen Nucleotiden

Um DNA für bestimmte Weiterverwendungen zu markieren, können einer PCR-Reaktion radioisotopische Nucleotide zugegeben werden (Mülhardt 2002, Cotton 1998). Zur DNA-Markierung für eine später folgende SSCP wurde hier dem PCR-Reaktionsansatz α -³²P-dCTP als Substrat zugegeben. Zur Weiterverwendung für eine DNA-Sequenzierung hingegen wurden α -³³P-markierte ddNTPs verwendet, welches eine geringere Strahlungsenergie besitzt. Dies führt zwar zu längeren Expositionszeiten aber auch zu einer – zur Auswertung einer Sequenzierung vorteilhaften – genaueren Auflösung.

Tab. 1 Primer und Reaktionsbedingungen für die PCRs zur molekulargenetischen Untersuchung des *SPR*-Gens

Exon	Primer	Sequenz	Produktlänge	PCR-Programm	Zusatz
1	FPE 1-1 BPE 1-1	ACT GGG CTC CCG CCA CGG TTT GAC CAG CCC GCC CTC CAT GCT CCT GTT	233 bp	95°-10 min 94°-1 min 10 s 67°-30 s 36x 72°-30 s 72°-7 min	4µl Betain
	FPE 1-2 BPE 1-2	GCA CCG CCT CCT GCC TGG TCT CG CTC CAG CTG GCG CAG TGC CTC GTC	207 bp	95°-10 min 94°-1 min 10 s 62°-30 s 35x 72°-30 s 72°-7 min	4µl Betain
	FPE 1-3 BPE 1-3	CCG CTC CTG GCC TCG CTG CTG TC AGT GGG CGC TCA CAT GGG GAG TCC	277 bp	94°-3 min 94°-40 s 70°-30 s 38x 72°-20 s 72°-7 min	4µl Q-Sol/ Qia-Taq
	FPE 1-4* BPE 1-4*	CAC CAG CAA CCA AGG GAA CCA GAT TGC GGG CGC TAA GGA CAA G	315 bp	94°-5 min 94°-50 s 65°-30 s 35x 72°-30 s 72°-7 min	4µl Betain
2	FPE 2-1 BPE 2-1	GAA AGC CCC GCC TGC ACT GAG TTA GCA GGG CAC AGA GGG ACG AGA TGT	226 bp	94°-3 min 94°-30 s 63°-30 s 34x 72°-20 s 72°-7 min	1µl T.ext./ 1:10
	FPE 2-2 BPE 2-2	CCC GGA CAG TCC TGG CCT CAA CAG GCC GCT TGC CCA GCC CCA GAG	240 bp	94°-3 min 94°-30 s 63°-30 s 38x 72°-10 s 72°-7 min	1µl T.ext./ 1:10
3	FPE 3 BPE 3	TGT TCC CTC ATC GTC TCC TAA AAG TGG GGG CAA AAA GGT TCA	266 bp	94°-3 min 94°-40 s 56°-30 s 38x 72°-30 s 72°-7 min	1µl T.ext./ 1:10; je 2µl DNA
cDNA	cDNA	CCC CTA TCT CTG TGG TTA TGG		37°-60 min	je 6µl RNA
cDNA- Transkript	RT-2A RT-2B	CGG GCT GGG GCG TGC TGT GT CGT GGG CTC CAG ACT TGA ACT CGT	758 bp	94°-5 min 94°-1 min 62°-1 min 35x 72°-1 min 72°-7 min	4µl Q-Sol

*) nur zur Sequenzierung eingesetzt statt FPE u. BPE 1-2

Tab. 2 Primer und Reaktionsbedingungen für die PCRs zur molekulargenetischen Untersuchung des *RKST1*-Gens

Exon	Primer	Sequenz	Produktlänge	PCR-Programm	Zusatz
1	rkts1 1A rkts1 1B	TCA TCC CCC ATC CCC CAG TG GCA TTT GCC CTT CCT CAG	208 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 57° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq
2	rkts1 2A rkts1 2B	GAC AGA ATC CCA GCA CTT GA GCC TAG GCC ATT TTG AGA T	207 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 53° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	4µl Q-Sol/ Qia-Taq
3	rkts1 3A rkts1 3B	TTT TTA AAG TGC AGG GCA TTC ACA GTC TCC AAG ATC TGA CCC GTC CAT	233 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 56° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq
3A	rkts1 3A A rkts1 3A B	AAA TGG GTA CCT TGT TGT GAG C GGG AGG GAT GGC GGG ATG AG	208 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 56° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq
4	rkts1 4A rkts1 4B	CAC GTG CTG GTG GTG AAG T ATG CTG CAT GGG TGA GG	197 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 55° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq
4A	rkts1 4A A rkts1 4A B	GAA CCT GTG CTG CAA ATG TCC A CCC TGC CCA CTG CCT CTG CTA	226 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 56° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq
5	rkts1 5A rkts1 5B	GGC CTT CCA GGT TCC CTT GGT G CTG TTG TCC GCC CCA GTG ACC	201 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 60° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	4µl Q-Sol/ Qia-Taq
6	rkts1 6A rkts1 6B	TTG CCA TGG ACC AAT CTG AGT TCC ACC AGA GGG ATG GGA TGG ACA TTC	241 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 59° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq
7	rkts1 7A rkts1 7B	GGG TGG GGA CAC AAC CAA ACT A TGA GAC TCA CAT ACC AAT GAC CTC	244 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 56° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq
8	rkts1 8A rkts1 8B	GGG CTC TGG GGG CCT GAC TG CCC ATC CGG TGA TCT CCT TTC TGG	222 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 60° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	4µl Q-Sol/ Qia-Taq
9	rkts1 9A rkts1 9B	CGG CTG CTT TGG CAG AAA AGG AC GGG TGG GCT CAG CTC TCT CTT C	259 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 60° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq
10	rkts1 10A rkts1 10B	GAG GGA AAG AGG AGT AAA TGT TCA GGC ATA GTG GGA GCC ATC C	257 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 57° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	4µl Q-Sol/ Qia-Taq
11	rkts1 11A rkts1 11B	CCA GAG CCC TTG GCG TCT C AGT CTC AAC GGA TCT AGC CAT CAG	297 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 58° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq
12	rkts1 12A rkts1 12B	CGG CCC CAC CTC CAC CAC A CCT TCT TGC TGT AAC TGA GGA GAG	254 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 57° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq
13	rkts1 13A rkts1 13B	CTG GGA GAT ACA GAC CAC CTC TAC G GAG TTT GGA CCC CTG GGT TCA CC	285 bp	94° - 5 min 94° - 30 s 58° - 30 s 72° - 30 s 72° - 7 min 35x	Qia-Taq

3.1.4 Reverse Transkription (RT)-PCR

Bei der RT-PCR kann RNA als Ausgangssubstrat benutzt werden. Dazu wird die RNA zunächst in sogenannte complementary DNA (cDNA) umgeschrieben, welche im Anschluß als Vorlage für eine PCR verwendet werden kann (Mülhardt 2002, Newton et al. 1997).

In dieser Dissertation wurde die RT-PCR angewandt, um die Genexpression auf Stufe der mRNA zu untersuchen und eventuelle Spleißvarianten zu finden.

Die Umschreibung oder Reverse Transkription erfolgt mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Eine solche wird im Allgemeinen aus Retroviren wie dem Avian-Myoblastosis-Virus (AMV), dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MMLV) oder dem Human-Immundeficiency-Virus (HIV) gewonnen.

Hier wurde als Polymerase die Omniscript Transkriptase der Firma Qiagen eingesetzt, welche in E.coli exprimiert wird. Außer ihrer enzymatischen Aktivität als RNA-abhängige DNA-Polymerase besitzt sie eine Funktion als Hybrid-abhängige Exoribonuklease (RNase H), welche ausschließlich in RNA/DNA-Hybriden befindliche RNA abbaut, und eine als DNA-abhängige DNA-Polymerase, welche ein erstes Transkript der cDNA synthetisiert.

Für die Reverse Transkription wurde entsprechend dem Begleitbogen des Omniscript Reverse Transcription Kits vorgegangen. Um die RNA vor Abbau durch RNasen zu schützen, wurde der Reaktion ein RNase-Inhibitor zugesetzt. Als Primer wurde ein sequenzspezifischer Primer verwendet.

3.1.4.1 Isolation von RNA aus Vollblut

RNA wird isoliert nach Lyse der jeweiligen Zellen und Inaktivierung vorhandener RNasen. Hier wurde RNA aus Leukozyten isoliert.

Bei der Isolation von RNA aus Vollblut werden zunächst die Erythrozyten selektiv lysiert und die Leukozyten durch Zentrifugation abgetrennt. Diese werden dann in Gegenwart eines Guanidinisothiocyanat (GTC) - haltigen Puffers lysiert. GTC ist ein chaotropes Salz, welches Proteine denaturiert und somit auch RNasen inaktiviert (Mühlhardt, 2002). Es erfolgt die Bindung der RNA an eine Silica-Membran, in mehreren Waschschr

werden Verunreinigungen entfernt. Schließlich wird die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

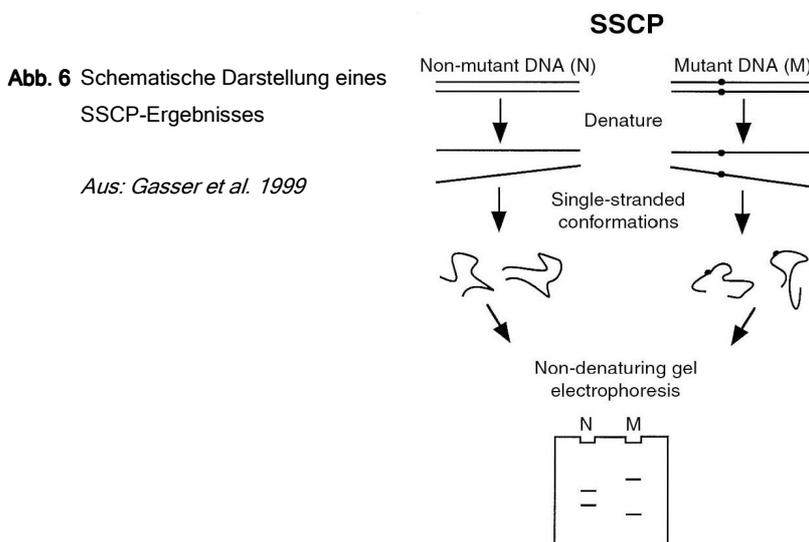
Die RNA-Isolation aus je 10ml Vollblut wurde mit Hilfe des RNeasy Midi Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

3.2 Single strand conformation polymorphism-Analyse(SSCP)

Die Single strand conformation polymorphism-Analyse (SSCP) dient dem Mutationsscreening. Sie kann das Vorhandensein einer Mutation in einem DNA-Abschnitt anzeigen, die Art der Mutation aber wird dabei nicht erkennbar.

Zur Analyse wird einzelsträngige DNA verwendet und nicht-denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen. Unter diesen nicht-denaturierenden Bedingungen ist der DNA-Einzelstrang gefaltet; die dadurch entstehende Form des Stranges wird bestimmt durch intramolekulare Basenpaarungen, welche durch die Sequenz vorgegeben sind, doch auch Reaktionsbedingungen, insbesondere Temperatur und pH-Wert, zeigen einen Einfluß (Cotton et al. 1998, Newton et al. 1997).

Unterscheidet sich nun ein DNA-Molekül in seiner Sequenz vom Wildtyp, kann dies daher eine veränderte Konformation des DNA-Einzelstrangs zur Folge haben. Die dadurch wiederum veränderten Laufeigenschaften fallen in der Gelelektrophorese als sogenannter „band-shift“ auf.



Mittels PCR wurde der zu untersuchende Abschnitt vervielfältigt und durch Zugabe radioisotopischer Nukleotide gleichzeitig markiert.

Durch Erhitzen auf 94°C für drei Minuten wurden die PCR-Produkte denaturiert, anschließend erfolgte die Elektrophorese. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde diese jeweils unter zwei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt:

	<i>1. Lauf</i>	<i>2. Lauf</i>
<i>Temperatur</i>	Raum-	4°C
<i>Leistung/ Spannung</i>	30W	450V
<i>Gelmatrix</i>	TME	MDE

3.3 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung kann die Nucleotidsequenz eines DNA-Moleküls entschlüsselt werden.

Bei der Sequenzierung mittels der Didesoxymethode werden anhand des zu sequenzierenden DNA-Abschnitts als Vorlage mit einer DNA-Polymerase Fragmente unterschiedlicher Länge erzeugt.

Das geschieht dadurch, dass als Substrat außer dNTPs noch ddNTPs oder Didesoxynukleotide beigefügt werden, welchen die 3'-OH-Gruppe fehlt, die für die Kettenverlängerung erforderlich ist (Alphey, 1998). Die DNA-Synthese bricht also an der Stelle, an der ein ddNTP eingebaut wird, ab. Der Einbau der ddNTPs erfolgt zufällig, die Synthese kann somit hinter jeder Base des DNA-Abschnitts abbrechen. Verwendet man pro Reaktionsansatz jeweils nur eines der vier ddNTPs, weiß man, mit welcher Base die verschiedenen entstandenen DNA-Ketten enden. Trennt man dann die vier benötigten

Ansätze nebeneinander in einem denaturierenden Polyacrylamidgel auf, wird die Sequenz des DNA-Abschnitts lesbar, da die Laufstrecke der Länge der jeweiligen Fragmente entspricht (Mülhardt 2002).

3.3.1 Cycle Sequencing

Die Erzeugung der DNA-Fragmente geschah hier durch das sogenannte Cycle Sequencing, eine Spielart der PCR. Es wird u.a. dann angewandt, wenn nur wenig Matrizen-DNA, z.B. solche aus einer PCR-Reaktion, zur Verfügung steht (Mülhardt 2002). Im Unterschied zur konventionellen PCR werden dabei A- und B-Strang getrennt amplifiziert, indem jeweils nur einer der beiden Primer zugegeben wird.

Die zugegebenen ddNTPs waren radioaktiv markiert, um die DNA-Fragmente nach Auftrennung im Polyacrylamid-Gel sichtbar machen zu können.

Für die zyklische Sequenzierung wurde der Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit der Firma Amersham verwendet.

Vor der anschließend folgenden Elektrophorese wurden die Produkte der Sequenzierungsreaktion bei 80°C für zwei Minuten denaturiert. Die Denaturierung im Gel wurde durch Zugabe von Harnstoff erreicht, welcher Wasserstoffbrückenbindungen bricht.

Der Gellauf erfolgte bei 60W.

3.3.2 Aufreinigung der DNA-Vorlage

Die DNA-Vorlage für die Sequenzierung entstammte einer vorhergehenden PCR. Da die in einer PCR-Reaktionsmischung enthaltenen Reagenzien die Sequenzierungsreaktion stören können, mußte das Reaktionsprodukt einer vorherigen Aufreinigung unterzogen werden.

Hierzu wurden je zweimal 20µl des jeweiligen PCR-Produktes im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des Nucleo Spin Extract Kits der Firma Macherey und Nagel eluiert. Dieser macht sich zunutze, dass DNA pH-Wert-abhängig in Gegenwart von hohen Konzentrationen chaotroper Salze an

Silica-Material bindet (Mülhardt 2002). Diese chaotropen Salze lösen auch gleichzeitig die Agarose auf. Nach mehreren Waschschrinen, in denen Verunreinigungen wie z.B. Agarose-Reste, Nukleotide oder Enzym entfernt werden, wird die DNA unter alkalischen Bedingungen durch Lösungen mit geringer Salzkonzentration eluiert.

3.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nucleinsäuren können durch Gelelektrophorese ihrer Größe und/oder Form nach separiert werden.

DNA wandert im elektrischen Feld zur Anode, da sie bei neutralem pH-Wert negativ geladen ist. Hierdurch ist es möglich, Mischungen verschiedener DNA-Fragmente elektrophoretisch aufzutrennen. Bei der Gelelektrophorese erfolgt die Trennung einzelner Moleküle nicht nur durch deren unterschiedliche Nettoladungen bzw. dem jeweiligen Verhältnis von Ladung zu Masse, sondern zusätzlich noch durch einen Siebeffekt des Gels aufgrund der unterschiedlichen Größe und Form der zu trennenden Teilchen (Gassen et al. 1999).

Ansonsten wird das Laufverhalten der zu analysierenden Moleküle v.a. durch die jeweilige elektrische Feldstärke, die Porengröße des Gels bzw. die Konzentration des Trägermaterials, pH-Wert und Ionenkonzentration des Elektrophoresepuffers und, insbesondere in Polyacrylamidgelen, die Temperatur beeinflusst.

3.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele werden für die Analyse von Molekülen über 10nm Durchmesser verwendet, da sie entsprechend große Poren besitzen (Gassen et al. 1999).

Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus Meeresalgen gewonnen.

In Wasser oder Puffer gelöste Agarose schmilzt beim Aufkochen und geliert beim Abkühlen. Die Gele werden durch Ausgießen in entsprechende Plastikformen erzeugt. Mithilfe eines eingesetzten Kammes entstehen Taschen, in welche die DNA-Lösung pipettiert werden kann. Die DNA-Lösung wird vorher mit Auftragungspuffer versetzt, welcher die Dichte der Lösung erhöht, was das Auftragen in die Geltaschen erleichtert.

Außerdem sind im Auftragungspuffer Farbstoffe enthalten, um den Lauf der DNA-Fragmente während der Elektrophorese verfolgen zu können (Mülhardt 2002).

Um die Länge der untersuchten DNA-Fragmente abschätzen zu können, wird ein Größenmarker mit aufgetragen.

Als Elektrophoresepuffer wurde hier TBE-Puffer verwendet. Sämtliche untersuchten Fragmente ließen sich in 1%igen Agarosegelen ausreichend auftrennen.

Um die DNA im Agarosegel erkennbar zu machen, wurde dieses anschließend mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen von Nucleinsäuren und nach Anregung durch UV-Licht wird der Farbstoff-Nucleinsäurekomplex sichtbar (Gassen et al. 1999).

In Agarose-Gelsystemen können mit dieser Färbung < 5ng DNA detektiert werden.

3.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamidgele besitzen gegenüber Agarosegelen ein höheres Auflösungsvermögen kleiner DNA-Fragmente bis 1000 bp. Sie ermöglichen die Separierung von DNA-Molekülen, die sich in ihrer Länge um weniger als 0.2% unterscheiden (Maniatis et al. 1989).

Polyacrylamid entsteht aus Acrylamid, welches in Gegenwart freier Radikale zu linearen Ketten polymerisiert und Methylenbisacrylamid, welches die Ketten untereinander quervernetzt. Die freien Radikale werden dabei üblicherweise von Ammoniumpersulfat (APS) gebildet, was wiederum durch Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert wird.

Die Formen für Polyacrylamidgele bestehen aus zwei gründlich gereinigten und beschichteten Glasplatten, welche mit Klammern aufeinander fixiert werden. Zwischen den Platten befindliche Abstandhalter (Spacer) schaffen den Platz für das Gel. Hier hinein wird die Gellösung zügig gegossen und ist nach etwa einer Stunde polymerisiert.

Bei TME-Gelen diente TME-Puffer als Elektrophoresepuffer, bei MDE- und Sequenzierungsgelen TBE-Puffer.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf Blotting-Papier überführt und auf einem Vakuum-Geltrockner getrocknet.

3.4.2.1 Autoradiographie

Da Polyacrylamid die Fluoreszenz von Ethidiumbromid stark abschwächt und zudem die Affinität von Ethidiumbromid zu einzelsträngig vorliegenden Nukleinsäuren geringer ist (Maniatis et al. 1989, Gassen et al. 1999), wurde zur Detektion von DNA nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei SSCP bzw. Sequenzierung die Autoradiographie angewandt.

Hierbei wird ein mit Silberbromid beschichteter Röntgenfilm mit dem getrockneten Acrylamidgel exponiert. Die von den zuvor radioaktiv markierten DNA-Fragmenten im Gel ausgehende Strahlung versetzt die Silberionen in einen aktivierten Zustand, sodaß diese bei der anschließenden Entwicklung des Films zu atomarem Silber reduziert werden können (Mühlhardt 2002). Selbiges erscheint auf dem Röntgenfilm als schwarze Bande.

4 Ergebnisse

4.1 Einführung

Bei der Analyse der Kandidatengene *SPR* und *RKST1* von DRD- bzw. PKC-Patienten wurde zunächst nach Vervielfältigung des jeweiligen DNA-Abschnitts durch PCR mittels SSCP nach möglichen Mutationen gescreent. (Die DNA war bereits im Vorfeld aus Vollblut extrahiert worden.) Auffällige Bereiche wurden daraufhin sequenziert. Zeigte sich in der Sequenzierung eine Mutation, so wurden erneut SSCP-Analysen des betroffenen Fragments bei Kontrollpersonen durchgeführt, um einen Polymorphismus auszuschließen. In einem Fall wurde im Anschluß die jeweilige cDNA mit Hilfe der RT-PCR auf Spleißvarianten hin untersucht.

4.2 Molekulargenetische Untersuchungen am *SPR*-Gen

Bei den 100 unter 2.1 beschriebenen Patienten wurden alle 3 Exone sowie flankierende Exon-Intron-Grenzen des *SPR*-Gens durch SSCP untersucht.

In besagtem DNA-Abschnitt von 98 der 100 Patienten ließen sich in der SSCP-Analyse keine Auffälligkeiten feststellen. Bei zweien hingegen zeigte sich ein band-shift.

4.2.1 Patient 256

Bei diesem Patienten zeigte sich in der SSCP eine Bandenveränderung sowohl im Gellauf bei Raumtemperatur als auch bei 4°C im Intron 1 des *SPR*-Gens (*SPR* 2-1).

K₁ K₂ K₃ K₄ 256 K₅

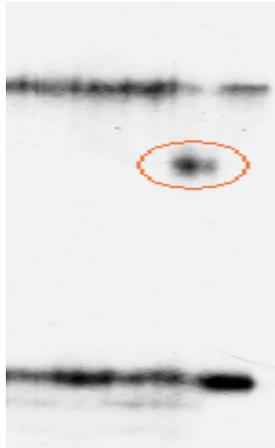


Abb. 7 SSCP des Intron 1 von *SPR* (*SPR* 2-1)

K₁₋₅ - Kontrollen, 256 - Patient 256

Der band-shift ist orange markiert.

Die nachfolgende Sequenzierung dieses DNA-Abschnitts ergab heterozygot einen Basenaustausch von Thymin (T) zu Cytosin (C) an Position -12 des Intron 1.

- Um einen Polymorphismus auszuschließen, wurde der gleiche DNA-Abschnitt von 138 Kontrollpersonen per SSCP untersucht, welche allesamt den bei Patient 256 gefundenen band-shift nicht aufwiesen. Um einen womöglich Regionen-spezifischen Polymorphismus nicht zu übersehen, waren in den 138 Kontrollpersonen 38 türkischer Nationalität enthalten.

Zur Überprüfung der Relevanz dieser Mutation für die Genexpression wurde nach RNA-Isolation aus Leukozyten des Patienten über RT-PCR die cDNA untersucht. Eine Amplifizierung der cDNA des *SPR*-Gens über deren fast vollständige Länge gelang hierbei nicht.

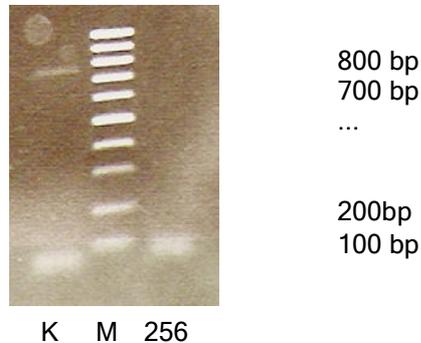


Abb. 8 Agarose-Gelelektrophorese der nahezukompletten cDNA von *SPR* (erwartete Produktlänge: 758 bp)
 K- Kontrolle, 256 - Patient 256, M- Marker
 Die unteren Banden sind als Primerartefakte zu interpretieren.

Um zu überprüfen, inwieweit die Ausbeute der RNA-Extraktion bei Patient 256 für einen cDNA-Nachweis überhaupt ausreichend war, wurde ein kleinerer Abschnitt der cDNA zur Analyse ausgewählt, welcher vollständig im Exon 1 des *SPR*-Gens eingeschlossen ist (*SPR* 1-2).

Die Amplifikation dieses Fragments bei Patient 256 war erfolgreich, die optisch abgeschätzte Größe der Bande im Agarose-Gel entsprach dabei in etwa der der Kontrolle.

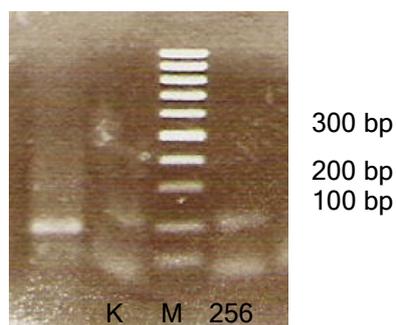


Abb. 9 Agarose-Gelelektrophorese der cDNA von *SPR* 1-2 (erwartete Produktlänge: 207 bp)
 K- Kontrolle (leider verrutscht), 256- Patient 256, M- Marker
 Ganz links ist eine Kontrolle genomischer DNA aufgetragen.
 Die unteren Banden sind als Primerartefakte zu interpretieren.

4.2.2 Patientin 297

Die SSCP des *SPR*-Gens dieser Patientin ergab einen band-shift bei 4°C im Exon 1 (*SPR* 1-2).

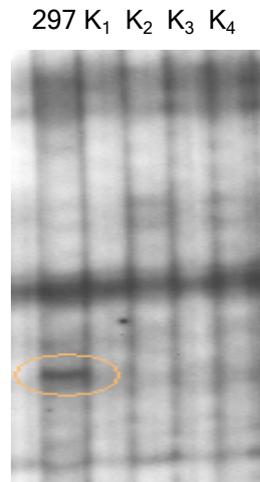


Abb. 10 SSCP des Exon 1 von *SPR* (*SPR* 1-2)
K₁₋₄ - Kontrollen, 297 - Patient 297
Der band-shift ist orange markiert.

Bei der anschließenden Sequenzierung ließ sich heterozygot ein Basenaustausch von Guanin (G) zu Adenin (A) an Position -13 des 5'-untranslatierten (5'UTR-) Bereiches nachweisen.

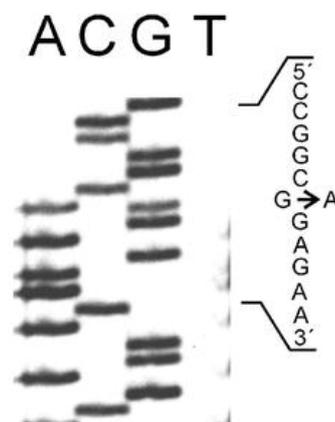


Abb. 11 Zyklische Sequenzierung des Gegensinnstrangs von *SPR* 1-2 der Patientin 297

Auch hier wurde zum Ausschluß eines Polymorphismus der gleiche DNA-Abschnitt von 100 plus 38 türkischen Kontrollpersonen mittels SSCP untersucht, bei welchen sich der bei Patientin 297 gefundene band-shift wiederum nicht zeigen ließ.

4.3 Molekulargenetische Untersuchungen am *RKST1*-Gen

Bei allen vier Mitgliedern der unter 2.2 beschriebenen französisch-deutschen Familie wurden die 15 Exone sowie angrenzende intronische Sequenzen des *RKST1*-Gens mittels SSCP auf eventuell vorhandene Mutationen überprüft.

Ein band-shift fand sich in keiner der SSCP-Untersuchungen. Stichprobenartig durchgeführte Sequenzierungen einiger Exons beim Indexpatienten sowie der ebenfalls betroffenen Mutter ergaben ebenfalls keine Auffälligkeiten.

5 Diskussion

5.1 Einführung

In der vorliegenden Dissertation wurde bei zwei primären Dystonien, der Dopa-responsiven Dystonie/DYT 5 und der Paroxysmalen kinesiogenen Chorea/DYT 10, in jeweils einem Kandidatengen nach krankheitsauslösenden Veränderungen der genomischen Sequenz gesucht. Bei zwei Patienten mit Symptomen einer DRD konnte dabei jeweils ein Basenaustausch im *SPR*-Gen, einer davon im Intron 1, der andere im 5'-UTR-Bereich, entdeckt werden. Ein Vergleich mit jeweils 138 Kontrollpersonen sowie den jeweils verbleibenden 99 DRD-Patienten, die allesamt den zum jeweiligen Basenaustausch zugehörigen SSCP-band-shift nicht aufwiesen, läßt vermuten, daß dieser in beiden Fällen keinen Polymorphismus, sondern eine pathogene Mutation darstellt.

Das Mutationsscreening im *RKST1*-Gen einer von PKC betroffenen Familie blieb dagegen erfolglos.

Im Folgenden soll nun näher auf den möglichen Effekt der hier detektierten Mutationen auf die Genexpression eingegangen werden, außerdem auf die Möglichkeiten der weiteren Abklärung der vorliegenden positiven wie negativen Befunde.

5.2 Patienten mit Mutationen im *SPR*-Gen

Beide in dieser Doktorarbeit entdeckten Basenaustausche befinden sich im nicht-codierenden Bereich des *SPR*-Gens, d.h. der genetische Triplet-Code, welcher für die entsprechende Aminosäuresequenz steht, bleibt unverändert.

Vielmehr müssen Mechanismen wie veränderte Spleißvorgänge (bei Mutationen im Intron-Bereich eines Gens) oder Störungen der Regulation der Translation (bei Mutationen im 5'-UTR-Bereich) in Überlegungen zur möglichen Pathogenese miteinbezogen werden (Strachan et al. 2005).

5.2.1 Patientin 297: Mutationen im 5'-UTR-Bereich

Der bei Patientin 297 detektierte Basenaustausch von Guanin zu Adenin befindet sich an Position -13 des *SPR*-Gens, also im untranslatierten Bereich des 5'-Endes (5'-UTR) des Gens.

Dieser Bereich wird bei der Transkription in mRNA umgeschrieben, codiert aber bei der Translation nicht für die Proteinsequenz, sondern hat dort eine eher regulatorische Funktion insbesondere die Initiation betreffend inne (Strachan et al. 2005, Alberts et al. 2002).

Der Initiation der Translation kommt bei der Genexpression in zweierlei Hinsicht große Bedeutung zu: Zum einen ist sie meist die letzte Stufe, auf der entschieden werden kann, ob die jeweilige mRNA tatsächlich in das betreffende Protein umgeschrieben werden soll und somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteinsynthese. Zum anderen ist das Auffinden des richtigen Startpunktes entscheidend für das Leseraster und somit die Aminosäuresequenz, da bei verschobenem Leseraster ein in seiner Funktion verändertes oder gar funktionsloses Protein die Folge sein könnte.

Bei der eukaryotischen Translationsinitiation bindet zunächst die Initiator-tRNA mit verschiedenen Proteinen, den sogenannten eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs) an die kleine ribosomale Untereinheit und bildet so den Präinitiationskomplex. Dieser erkennt nun das 5'-Ende der mRNA über deren Cap sowie weiterer am Cap gebundenen eIFs. Daraufhin bewegt sich die kleine ribosomale Untereinheit strangabwärts und „scannt“ so mit Hilfe von Helicasen zur Überwindung der Sekundärstruktur der mRNA nach dem Startcodon. Die Sequenz des Startcodons fast jeder Translation ist AUG (in einigen Fällen ist es auch ACG, CUG oder GUG) und in 90% der mRNAs endet die Translationsinitiation und beginnt die Proteinsynthese am ersten AUG, welches der Präinitiationskomplex findet. Die Effizienz der AUG-Erkennung hängt in Eukaryoten von den Nucleotiden in unmittelbarer Nähe der Startstelle ab.

Regulatorische Elemente in der 5'-UTR, welche die Translation negativ beeinflussen können, müssten also entweder über eine alterierte Konsensussequenz des Startcodons der Translation oder über eine veränderte Sekundärstruktur der mRNA wirken (Cazzola et al. 2000).

Als bestgeeignete Sequenz zur Erkennung des Translationsstarts gilt $GCC^A/GCCaugG$ (Strachan et al. 2005, Kozak 1987). Untersuchungen eukaryotischer mRNAs sowie

Mutagenesis-Analysen ergaben, daß hierbei die entscheidende Rolle dem drei Nucleotide vor dem AUG-Codon gelegenen Purin sowie dem unmittelbar strangabwärts gelegenen G zukommt sowie eine Verstärkung der Translation durch das Motiv ^A/_GCC in festgelegter Position wahrscheinlich ist. Da die im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit entdeckte Mutation sich 13 Nucleotide vor dem Startcodon der Translation und somit außerhalb der allgemein als solcher akzeptierten Konsensussequenz befindet und auch kein ^A/_GCC-Motiv zerstört, ist es somit eher unwahrscheinlich, daß sie über den beschriebenen Mechanismus Einfluß auf die Synthese des Sepiapterin-Reduktase-Enzyms nimmt.

Eine gut untersuchte Art der Translationskontrolle über die Sekundärstruktur der mRNA ist die über sogenannte Eisen-responsive Elemente („Iron responsive Elements“/IREs), welche an der Regulation des Eisenstoffwechsels bei Vertebraten beteiligt sind (Pickering et al. 2005, Strachan et al. 2005, Alberts et al. 2002, Cazzola 2000, Mikulits et al. 1999). IREs sind Haarnadelstrukturen im untranslatierten Bereich des 5'- und 3'-Endes insbesondere der mRNAs von am Eisenstoffwechsel beteiligten Proteinen, welche von trans-aktiven Elementen, sogenannten IRPs, gebunden werden können, wodurch die Translation der entsprechenden mRNAs kontrolliert wird. Die Fähigkeit der IRPs zur Bindung an die IREs hängt dabei von der Menge des intrazellulär verfügbaren Eisens ab; so binden bei Eisenmangel IRPs an IREs der 5'-UTR von mRNAs, welche für Untereinheiten des Eisenspeicherproteins Ferritin kodieren, wodurch die Ansammlung des Präinitiationskomplexes der Translation blockiert und somit die Proteinsynthese unterbunden wird. Gleichzeitig wird über Bindung von IRPs an die 3'-UTR der für den Transferrin-Rezeptor kodierenden mRNA dessen Synthese gefördert, somit bei Eisenmangel ein weiteres Absinken des Eisenspiegels durch Speicherung verhindert und dessen Verteilung in die Peripherie gefördert. Verschiedene Mutationen - insbesondere singuläre Basenaustausche - innerhalb von IREs der Ferritin-mRNAs sind bekannt, die eine Erbkrankheit verursachen, welche die frühzeitige Entwicklung eines beidseitigen Kataraktes zur Folge hat und mit erhöhten Serum-Ferritin-Spiegeln einhergeht. Diese Mutationen stören die Bindung der IRPs an die IREs, entweder, indem sie die notwendigen Basenpaarungen zwischen mRNA und transaktivem Element unterbinden, und/oder indem sie deren Sekundärstruktur zerstören; die Ferritinsynthese kann nur unzureichend gesteuert werden und es resultiert das beschriebene Krankheitsbild. – Ein einzelner Basenaustausch innerhalb eines 5'-UTR einer mRNA, wie in dieser Doktorarbeit

entdeckt, kann also durch Beeinträchtigung der Regulation der Translation eine Erkrankung zur Folge haben. Da das genannte Beispiel der erblichen Eisenstoffwechselstörung jedoch auf Wechselwirkungen mit spezifischen mRNA-bindenden Proteinen beruht und deren Existenz im hier vorliegenden Fall rein spekulativ wäre, soll desweiteren auf Experimente, welche sich auf den alleinigen Effekt der Sekundärstruktur der mRNA auf die Translation beziehen, näher eingegangen werden. - Marilyn Kozak untersuchte 1989 in zellfreien Translationssystemen den Einfluß von Haarnadelstrukturen im 5'UTR-Bereich einer mRNA auf die Translation in Abhängigkeit von der Stabilität der Haarnadelstruktur und deren Lokalisation. Dabei kam sie zu dem Ergebnis, daß eine Haarnadelschleife mit einer freien Energie von -30 kcal/mol die Translation nur hemmt, wenn sie nahe der Cap (in diesem Fall 12 Nucleotide entfernt) lokalisiert ist, und zwar vermutlich dadurch, daß sie die Anlagerung des Präinitiationskomplexes verhindert (s.Abb. 12). Weiter von der mRNA-Cap entfernt, kann sie offenbar mittels der Helicase überwunden werden und das ribosomale „Scanning“ kann ungehindert ablaufen. Eine Haarnadel mit einer freien Energie von -61 kcal/mol hingegen hemmt die Translation auch dann, wenn sie sich weiter weg von der Cap befindet, sie kann der Aktivität der Helicase widerstehen. – Auch in vivo ist die Inhibition der Translation durch stabile Sekundärstrukturen innerhalb der 5'-UTR mittlerweile nachgewiesen (Babendure et al. 2006, Pickering et al. 2005). Weiterhin konnte ein von der berechneten freien Energie unabhängiger Effekt des GC-Gehaltes einer mRNA-Sekundärstruktur festgestellt werden; die Effizienz der Translation sinkt dabei mit zunehmendem GC-Gehalt einer Haarnadel einer 5'-UTR trotz gleichbleibender Thermostabilität.

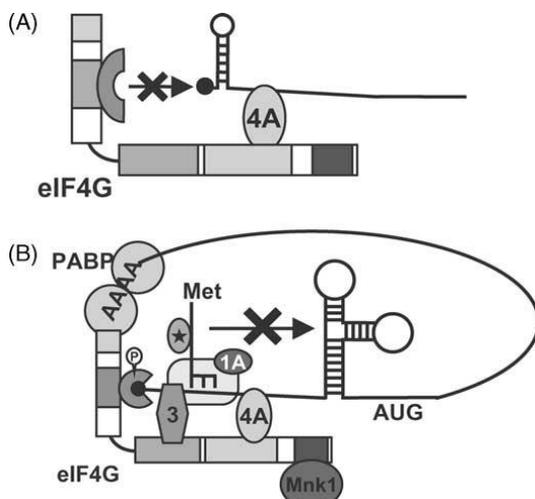


Abb. 12 Kontrolle der Translationsinitiation über 5'-UTRs

(A) GC- reiche Regionen mit Hairpins mit einer freien Energie von -30kcal/mol in der Nähe der Cap lokalisiert behindern die Anlagerung des 43S-Präinitiationskomplexes

(B) GC- reiche Regionen mit Hairpins mit einer freien Energie kleiner -50kcal/mol verhindern das Fortschreiten des Ribosoms, da sie von der Helicase eIF4A nicht entwirren werden können

Aus: Pickering et al. 2005

Zur Ermittlung der Sekundärstruktur des in dieser Dissertation untersuchten untranslatierten Bereich am 5'-Ende des *SPR*-Gens wurde das Computerprogramm „Mfold“ (Zuker et al. 2003) benutzt (s. Abb. 13 und 14). Zur Vereinfachung wurden nur die Strukturen mit der jeweils niedrigsten freien Energie der 5'-UTR des Wildtyps und des mutierten Allels verglichen.

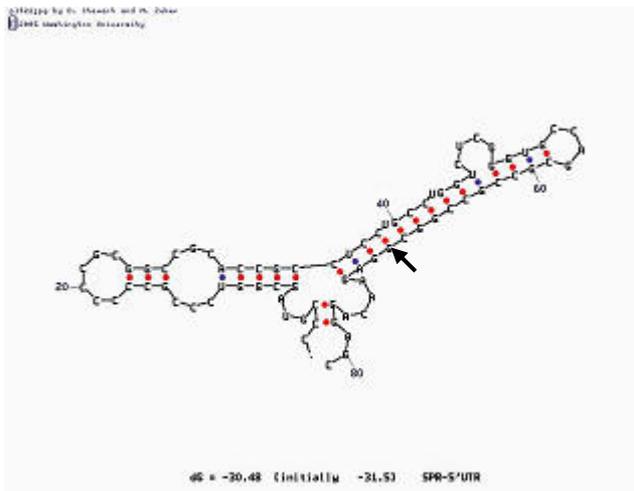


Abb. 13 Mit dem Computerprogramm „Mfold“ konstruierte mögliche Sekundärstruktur des Wildtyps der 5'-UTR des *SPR*-Gens. Der Pfeil markiert die Base, welche im mutierten Allel ausgetauscht wird.

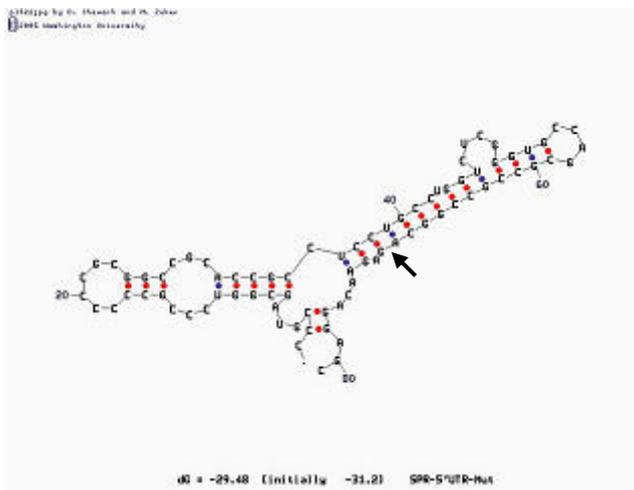


Abb. 14 Mit dem Computerprogramm „Mfold“ konstruierte mögliche Sekundärstruktur der 5'-UTR des mutierten Allels des *SPR*-Gens. Der Pfeil markiert die Stelle des Basenaustausches.

Wie auch aus genannten Abbildungen ersichtlich, bildet die 5'-UTR des *SPR*-Gens, sowohl im Wildtyp als auch im mutierten Allel, im Wesentlichen zwei Haarnadelstrukturen aus, in deren „Knotenpunkt“ sich beim mutierten Allel allerdings eine Umgestaltung der Sekundärstruktur findet. Es ist zwar anzumerken, daß sich die durch den Basenaustausch veränderte Sekundärstruktur relativ weit weg (mehr als 70

Nucleotide) von der Cap und somit dem Zielpunkt des Präinitiationskomplexes befindet. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, daß - ähnlich wie bei Kozak 1989 beschrieben - aufgrund der veränderten Faltung der mRNA des mutierten *SPR*-Gens die Anlagerung des Präinitiationskomplexes der Translation an die 5'-UTR behindert und so die Proteinsynthese gehemmt wird, zumal davon auszugehen ist, daß die Computersimulation die Verhältnisse in vivo nur unzureichend abbilden kann (s.a. Kap. 5.2.2). - Daß die anders geartete Faltung auch die Helicase beim Entwinden der mRNA zu stören in der Lage ist, ist dagegen schwer vorstellbar: Weder die freie Energie des Ribonucleotids noch dessen GC-Gehalt - wovon nach Kozaks bzw. Babendures Theorie (s.a.o.) die Funktion des Enzyms abhängt - ändern sich durch den Basenaustausch entscheidend.

Um beim oben beschriebenen Experiment von Kozak zu bleiben, so fand diese außerdem eine von der Salzkonzentration des Mediums abhängige Inhibition der Translation aufgrund von Interaktionen zwischen der 5'- und der 3'-UTR. Im Allgemeinen wird aber eher davon ausgegangen, daß die mRNA-Cap am 5'-Ende und der Poly-A-Schwanz des 3'-Endes synergistisch die Translationsinitiation fördern (Alberts et al. 2002, Borman et al. 2002). Daß offenbar Wechselwirkungen zwischen 5'- und 3'-Ende der mRNA existieren, welche die Translation beeinflussen, wirft die Frage auf, inwieweit Veränderungen der Basenfolge (und damit auch ggf. der Sekundärstruktur) der 5'-UTR diese Wechselwirkungen und so letztlich die Proteinsynthese stören könnten. Niepel et al. analysierten 1999 den Einfluß von Sekundärstrukturen in den untranslatierten Regionen von mRNAs in Pflanzen- und Hefezellen auf deren Interaktion. Sie konnten dabei - wie schon Kozak - eine Inhibition der Translation durch Sekundärstrukturen in UTRs feststellen, aber keine Beeinträchtigung der 5'-3'-Interaktion.

In bestimmten Fällen kann Sekundärstruktur innerhalb der 5'-UTR einer mRNA als sogenannte interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) einen alternativen Startpunkt für die Translation darstellen, nämlich dann, wenn für die Translationsinitiation notwendige Proteine an sie binden können (Alberts et al. 2002, Vagner et al. 2001). Störungen der IRES-Funktion wiederum, z.B. durch eine Mutation derselben, können in ihren Auswirkungen letztlich pathogen sein, so beispielsweise bei der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit, einer neurodegenerativen Erkrankung. Mutationen im Connexin-32-Gen konnten mit der Erkrankung in Verbindung gebracht werden, so auch ein Basenaustausch

in einer nachgewiesenermaßen als IRES fungierenden Region der 5'-UTR der Connexin-32-mRNA (Vagner et al. 2001, Hudder et al. 2000). Dieser Basenaustausch beeinträchtigt die Aktivität des IRES, interessanterweise allerdings, PC-Simulationen zufolge, ohne dessen Sekundärstruktur zu zerstören.

Auf den in dieser Dissertation entdeckten Basenaustausch bezogen bleibt ein solcher Mechanismus jedoch eher hypothetisch, da die Existenz eines IRES innerhalb der 5'-UTR-SPR-mRNA bislang nicht beschrieben ist. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß durch den Basenaustausch ein IRES entsteht, indem er die Sekundärstruktur der 5'-UTR derart verändert, daß der Proteinkomplex, welcher die Translation initiiert, Cap-unabhängig binden kann.

- Bei Bakterien ist bekannt, daß bei der Initiation der Translation auch Basenpaarungen zwischen dem 3'-Ende der ribosomalen 16S rRNA und der 5'-UTR der mRNA eine Rolle spielen (Verrier et al. 2000). Ein eindeutiger Nachweis hierfür auch in der eukaryotischen Translation steht noch aus, verschiedene Studien aber lieferten Hinweise darauf, daß auch bei Eukaryoten über Wechselwirkungen zumindest von spezifischen Regionen der 18S rRNA mit der mRNA die Translation beeinflusst werden kann. So untersuchten Verrier et al. 2000 den Einfluß in die 5'-UTR eingebauter Gegensinn-rRNA-Fragmente auf die Translation der entsprechenden mRNA in vivo. Hierbei wurde auch der mögliche Einfluß anderer Mechanismen, wie z.B. die Bildung stabiler Sekundärstrukturen, auf die Effizienz der Translationsinitiation berücksichtigt. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß zwar ein großer Teil der 18S rRNA-Sequenz nicht mit der mRNA annealen kann - entweder, weil er in die kleine ribosomale Untereinheit eingebettet ist, oder, weil er während des Scannens einfach nicht optimal positioniert ist, um mit der mRNA interagieren zu können. Bestimmte Strukturen am 3'-Ende der 18S rRNA aber können ganz offenbar Basenpaarungen mit der 5'-UTR eingehen und so auch die Translation beeinflussen. Dabei konnten Deletionen in einem mRNA-Fragment, welches zu einer Inhibition der Translation durch Basenpaarungen mit der rRNA führte, diese Inhibition abmildern, zum Teil schon wenn sie nur 8bp lang waren. Inwieweit dies auch für einen einzelnen Basenaustausch - wie hier entdeckt - zutreffen würde, wurde von Verrier et al. zwar leider nicht untersucht, dennoch läßt das beschriebene Experiment die Möglichkeit, daß ein Basenaustausch an einer kritischen Stelle der mRNA-rRNA-Interaktion Einfluß auf die Translation nehmen könnte, durchaus denkbar erscheinen.

Der sehr wahrscheinlich pathogene Basenaustausch im *SPR*-Gen von Patientin 297 könnte also auf die Translation Einfluß nehmen. Eine der denkbarsten Möglichkeiten wäre, daß er die Polypeptidsynthese hemmt, indem er über Veränderung der 5'-UTR-Sekundärstruktur die Anlagerung des Präinitiationskomplexes behindert oder aber das Scannen der kleinen ribosomalen Untereinheit durch die veränderte Basenpaarung stört. Das würde zu einer verringerten Proteinausbeute führen. Womöglich entsteht aber über Veränderung der Sekundärstruktur auch eine interne Ribosomeneintrittsstelle und der Translationsstartpunkt würde verschoben. Dann würde ein verkürztes und damit im Zweifelsfall dysfunktionales Protein entstehen.

5.2.2 Patient 256: Mutationen im Intron-Bereich

Der bei Patient 256 entdeckte Basenaustausch von Thymin zu Cytosin ist im ersten Intron des *SPR*-Gens zu finden, und zwar 12 Basenpaare vor Beginn von Exon 2.

Introns sind DNA-Abschnitte, die beim sogenannten RNA-processing im Anschluß an die Transkription herausgeschnitten bzw. -gespleißt werden und somit bei der Polypeptidsynthese nicht für Aminosäuren codieren können (Strachan et al. 2005).

Anders als ursprünglich angenommen, sind aber Introns für die Expression eukaryotischer Gene nicht bedeutungslos: So vermögen sie die Effizienz der Transkription zu beeinflussen, indem sie cis-aktive Elemente beherbergen, welche die Transkription verstärken („enhancer“) oder unterdrücken („silencer“) können (Le Hir et al. 2003). Auch sind sie in der Lage, die Transkription dadurch zu regulieren, daß sie die Position des Nucleosoms und folglich auch den Zugang zur DNA kontrollieren. Die Spleißsignale eines Introns können über Interaktion mit der RNA-Polymerase die weitere Transkription stimulieren. Nicht zuletzt ist das Spleißen an sich von Bedeutung für den weiteren Ablauf der Genexpression. Ein ungestörter Spleißvorgang ist Voraussetzung für die korrekte Weitergabe der genetischen Information, oftmals mit dem RNA-Editing, d.h. dem posttranskriptionellen Redigieren der RNA gekoppelt, fördert den nachfolgenden Transport der mRNA aus dem Zellkern und verhindert den Abbau der reifen mRNA.

Sequenzänderungen im Intron-Bereich eines Gens könnten sich also einerseits auf die Regulation der Transkription der DNA auswirken, vor allem jedoch sind pathogene Mutationen in Introns als Spleißmutationen bekannt. Der Anteil der krankheitsverursachenden Punktmutationen beim Menschen, welchen als Pathomechanismus ein fehlerhaftes Spleißen der Prä-mRNA zugrunde liegt, beträgt

annähernd 15% (Krawczak et al. 1992), wenn man allein Mutationen innerhalb von konservierten Nucleotidsequenzen eines Introns berücksichtigt (Faustino et al. 2003). Zählt man pathogene Mutationen in veränderlichen Intronabschnitten hinzu, dürfte der Anteil noch wesentlich größer sein.

Beim Mechanismus des Spleißens der RNA spielen konservierte Nucleotidsequenzen an den Exon-Intron-Grenzen sowie im Intron eine bedeutende Rolle, da sie u.a. das Vorhandensein eines Introns und dessen Beginn und Ende anzeigen (Strachan et al. 2005). Die Startsequenz - auch Spleißdonorstelle genannt - praktisch jeden Introns ist GT, das Ende – bzw. die Spleißakzeptorstelle - ist so gut wie immer durch die Nucleotide AG gekennzeichnet. Auch deren benachbarte Sequenzen sind hochkonserviert und weiterhin existiert eine konservierte Sequenz maximal 40 Nucleotide vom Intronende entfernt, die sogenannte „branch site“, in welcher das Nucleotid Adenin im Allgemeinen die zentrale Bedeutung innehat (s. Abb. 15). - Als wirklich unveränderliche Konsensussequenzen eines Introns sind allerdings nur Spleißdonor und –akzeptor anzusehen, die übrigen genannten können von einer Vielzahl von Nucleotiden gebildet werden, auch das zentrale Adenin der branch site ist letztlich variabel (Alberts et al. 2002).

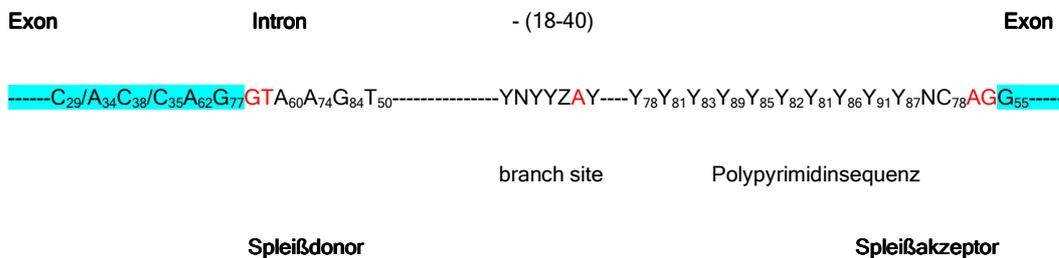


Abb. 15 Konsensussequenzen der Spleißstellen in den Introns höherer Eukaryoten

Die konservierten Nucleotide der Spleißdonor- sowie Spleißakzeptorstelle inklusive der branch site sind rot markiert.

Bei den restlichen Nucleotiden geben die Zahlen unterhalb die Häufigkeit ihres Auftretens an der jeweiligen Stelle in Prozent an.

Y - Pyrimidin, Z - Purin, N - nicht näher bezeichnetes Nucleotid

Nach Nissim-Rafinia et al. 2002 und Strachan et al. 2005

Darüberhinaus existieren innerhalb der unreifen mRNAs von Säugetieren in der Regel eine Vielzahl von Sequenzen, welche den Konsensussequenzen in einer Weise ähneln, daß sie Exon-Intron-Grenzen markieren könnten, aber nicht oder zumindest nicht regelmäßig

als Spleißstellen benutzt werden (Faustino et al. 2003, Sun et al. 2000). Um die Exonererkennung zu gewährleisten, sind daher zusätzliche Signale vonnöten, welche als cis-aktive Elemente sowohl in Introns als auch in Exons zu finden sind. Sie wirken wiederum als „enhancer“ oder „silencer“ zumeist über Wechselwirkungen mit Proteinen und sind so am korrekten Ablauf sowohl des konstitutiven als auch des alternativen Spleißens beteiligt (Baralle et al. 2005).

Katalysiert wird das RNA-Spleißen durch kleine RNA-Proteinkomplexe (snRNPs) unter der Beteiligung weiterer Proteine, die zusammen das sogenannte Spleißosom bilden (Alberts et al. 2002). Die jeweiligen Spleißstellen werden dabei über Wechselwirkungen der snRNPs - über deren snRNAs - mit der unreifen mRNA erkannt und deren reagierende Gruppen über weitere Wechselwirkungen zwischen den snRNPs untereinander zusammengeführt (Koolman et al. 1998). So wird die Spaltung der Exon-Intron-Grenzen, die Freisetzung des Introns und die Verknüpfung der beiden Exons ermöglicht. Die Exonererkennung im Rahmen des Spleißens wird durch eine Gruppe von Spleißosomkomponenten, den sogenannten SR-Proteinen, dadurch unterstützt, daß diese sich an Exons anlagern und dort mit regulatorischen Sequenzen interagieren (Strachan et al. 2005, Alberts et al. 2002). Weitere RNA-Protein-Komplexe, die hnRNPs, lagern wiederum bevorzugt an Introns an und treten dabei auch mit nicht-konservierten Spleißstellen in Wechselwirkung.

Mutationen, welche zu einem fehlerhaften Spleißen der RNA führen, schwächen oder unterbinden die Exonererkennung durch das Spleißosom oder aber aktivieren kryptische Spleißstellen (Nissim-Rafinia et al. 2002). Betreffen Spleißmutationen unveränderliche Sequenzen der Spleißstellen eines Introns, wird die Exonererkennung durch die Spleißmaschinerie vollständig unterbunden, so daß keinerlei korrekt gespleißte Transkripte entstehen können. Daher sind solche Mutationen zumeist mit schweren Krankheitsbildern assoziiert. Spleißmutationen innerhalb von veränderlichen Intronsequenzen, welche keine definierte Bedeutung für das Spleißen besitzen, können die Exonererkennung schwächen, doch wird die Erzeugung normaler Transkripte zumindest zu einem gewissen Teil erhalten bleiben. Dementsprechend ist auch die Veränderung im Phänotyp milder ausgeprägt.

Der im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit entdeckte Basenaustausch bei Patient 256 nun befindet sich, den allgemein anerkannten Kriterien für die Basenfolge von

eukaryotischen Spleißstellen folgend, offensichtlich innerhalb einer nicht konservierten Nucleotidsequenz des Intron 1 des *SPR*-Gens (s. Abb. 16).

Exon 1	Intron 1					Exon 2	
661	TTATCAACAA	CGCGG	TAAG	ACCCCGGGGC	TGGAGCGGAC	TCCCCATGTG	AGCGCCCACT
721	TCCTCCACCG	CTGGGGAATT	TAAGGGCTAC	TCCTAGGGGT	CAGATAGGAC	GCCTAGAAAT	
781	CTAAAGCCCT	AGTTGTTCCA	GCTTGAGTAG	CAAGTGGAGG	CGAGGTGTAC	AGGAAGACTC	
841	GGTGCCGTCG	GGACAACAGT	CTGCCCCCAC	TTCCTGGAAA	ATTGGCCAGC	CGGGTTTTCC	
901	AAAGCGCCTG	TAGAACTTC	CCGAGCCCCT	TGCTCTGCGC	CCTCTGGCGG	AGGCTGAGT	
961	CAGGGCTTGG	AGTCTCCAAA	CAAGTAAACT	CTCTGCTTCT	CCAAAGGACC	GCTAGAGCTT	
1021	TCCTTCAGCC	CCACGGGCAA	GGCAGGTGCC	TTCTCATTCT	GCAGCTTGGG	ATGGCTAGGT	
1081	TCCCAGCTG	TGTCTTCCG	CAGAGCTGGG	GAAGAGAGAA	GCCTCTCAG	AAGCGCTAGG	
1141	CAGCTTCCCT	CTCTAGGTCT	GCATGGGAAG	AGGATATCTG	GAGGAACTTG	GGAGGGCTGG	
			branch site?	branch site?	PPS*		
1201	GGAAGAAGAA	AGCCCCGCCT	<u>GC</u> ACTGAGTT	ACTCCTAAGG	GCTGGTTTT	CAGGCTCTCT	
1261	TGGGGATGTG	TCCAAAGGCT	TCGTGGACCT	GAGTGACTCC	ACTCAAGTGA	ACAACTACTG	

Abb. 16 Ausschnitt aus dem *SPR*-Gen des mutierten Allels von Patient 256: Intron 1 mit angrenzenden Teilen von Exon 1 und Exon 2

Die konservierten Nucleotide der Spleißdonor- sowie Spleißakzeptorstelle inklusive der (vermuteten) branch site(s) sind rot markiert.

Weitere (vermutete) Spleißstellen sind unterstrichen. - Im Intron 1 des *SPR*-Gens fand sich keine den Kriterien für eine branch site höhergradiger Eukaryoten vollständig entsprechende Sequenz, daher wurden die zwei wahrscheinlichsten, weil den Kriterien am besten entsprechenden, markiert.

Der Basenaustausch von T zu C ist gelb markiert.

*) Polypyrimidinsequenz

Nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=3885361>

Falls er Einfluß auf das RNA-Spleißen haben sollte, wäre er also am ehesten der zweitgenannten Gruppe der Spleißmutationen zuzurechnen.

Um einen solchen eventuell vorhandenen Einfluß nachzuweisen, wurde in dieser Doktorarbeit die cDNA der *SPR*-mRNA von Patient 256 untersucht.

Hierbei ergab sich, daß die cDNA in deren fast vollständiger Länge im Gegensatz zu der einer Kontrollperson mittels Agarose-Gelelektrophorese nicht nachweisbar war. Ein

kleinerer Abschnitt der cDNA jedoch, welcher einem im *SPR*-Gen vollständig im Exon 1 eingeschlossenen Abschnitt entsprach (*SPR* 1-2), ließ sich nicht nur bei der Kontroll-cDNA, sondern auch bei der von Patient 256 amplifizieren, offenbar auch in etwa gleicher Menge wie bei der Kontrolle.

Somit lag die cDNA des *SPR*-Gens von Patient 256 – und damit auch die mRNA – ganz offenbar überwiegend in einer verkürzten Form vor.

Störungen im prä-mRNA-Spleißen können zwar zu verkürzter mRNA führen (s.u.), bei einer wie hier vorliegenden heterozygoten Mutation als möglicher Spleißmutation aber hätte zusätzlich ein unverändertes bzw. vollständiges cDNA-Fragment von *SPR* nachweisbar sein müssen. Daher dürfte am ehesten ein methodischer Fehler als Ursache für das ausschließliche Vorhandensein eines verkürzten Nucleotids vorgelegen haben.

Da sowohl die cDNA-Amplifikation als auch die vorangegangene RNA-Extraktion aus Vollblut jeweils innerhalb eines gemeinsamen experimentellen Ansatzes von Patient 256 und der Kontrollperson durchgeführt wurden, erscheint ein Fehler auf dieser Ebene eher unwahrscheinlich. Die Zeit zwischen der Blutentnahme und der RNA-Extraktion aber war (aufgrund eines längeren Transportweges) bei Patient 256 wesentlich länger als bei der Kontrollperson, so daß denkbar wäre, daß dessen RNA einem verstärkten enzymatischen Abbau durch RNAsen unterlegen hatte (Mülhardt et al. 2002).

Die Pathogenität der bei Patient 256 vorliegenden Mutation im Intron 1 des *SPR*-Gens konnte so leider weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Falls jedoch krankheitsverursachend, könnte der innerhalb einer veränderlichen Intronsequenz gelegene Basenaustausch die Erkennung der üblichen Spleißstellen beeinträchtigen (Faustino et al. 2003) bzw. deren Zugänglichkeit aufgrund einer veränderten Sekundärstruktur erschweren (Buratti et al. 2004) und/oder kryptische Spleißstellen aktivieren (Strachan et al. 2005).

Daß zur Erkennung der Exon-Intron-Grenzen eines Gens neben den Konsensussequenzen zusätzliche Signale vonnöten sind, wurde oben schon angedeutet. So befinden sich auch innerhalb eines Introns entsprechende cis-aktive Elemente, die „intronic splicing enhancer“ (ISEs) und „intronic splicing silencer“ (ISSs), welche durch eine Mutation zerstört werden könnten (Faustino et al. 2003).

Die Zerstörung eines ISEs würde die gegebenen Spleißstellen und somit die Erkennung der Exon-Intron-Grenzen schwächen, gegebenenfalls auch indirekt Pseudospleißstellen stärken. - In der Literatur sind an Mutationen, welche über die Zerstörung eines ISEs krankheitsverursachend wirken, bislang nur solche, welche das alternative Spleißen betreffen, beschrieben, d.h. die durch eine Spleißmutation verstärkt erzeugten Transkripte sind nicht an sich abnorm, sondern nur deren Menge.

So detektierten Cogan et al. 1997 im humanen Wachstumshormon-Gen von Personen, welche unter autosomal-dominant vererbtem isolierten Wachstumshormonmangel Typ II litten, Mutationen in einem Intron des Gens, die nicht innerhalb der bekannten Spleißstellen lagen. Sequenzanalysen von RT-PCR-Produkten der in Expressionssystemen erzeugten mRNA-Transkripte der mutierten Allele zeigten den Verlust von Exon 3, welcher bei der Translation die Produktion der verkürzten Isoform des Wachstumshormons zur Folge haben würde. Die Mutationen zerstörten dabei repetitive G-Triplet-Sequenzen nahe der 5'-Spleißstelle, die in vielen ISEs, welche strangaufwärts gelegene Exons – sowohl im Rahmen des konstitutiven als auch des alternativen Spleißens - aktivieren, enthalten sind (McCullough et al. 2000, Carlo et al. 1996). Auch hier wurde deren Funktion als wesentlicher Teil eines ISEs in vivo nach gezielter Mutagenese einzelner Basen mit anschließender Bestimmung der jeweiligen Veränderung des Spleißmusters über Expressionssysteme nachgewiesen (McCarthy et al. 1998). – Derartige G-reiche Sequenzen können den Spleißfaktor U1-snRNP über Basenpaarungen mit dessen U1-snRNA binden und so die Wahl der 5'-Spleißstelle beeinflussen (McCullough et al. 2000), doch auch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen (so z.B. mit hnRNPs (Chabot et al.1997)) sind beschrieben, durch die ebenso prä-mRNA-Spleißen reguliert wird.

Der in dieser Doktorarbeit entdeckte Basenaustausch befindet sich nun in unmittelbarer Nachbarschaft eines G-Triplets, zerstört dabei allerdings kein solches und ist außerdem nahe des 3'-Ende eines Introns lokalisiert. ISEs von Säugetieren enthalten hingegen zumeist G-reiche (ggf. auch C-reiche) Sequenzen (Yeo et al. 2004), spielen bei der Erkennung der 5'-Spleißstelle eine Rolle und befinden sich zumeist auch in der Nähe derselben (McCullough et al. 2000). Eine einheitliche Konsensussequenz für ISEs (oder andere am Spleißen beteiligte cis-aktive Elemente) ist aber nicht definiert (Baralle et al. 2005, Faustino et al. 2003) und auch ISEs, welche weder G-reiche Sequenzen enthalten noch nahe der 5'-Spleißstelle befindlich sind, sind identifiziert (Dredge et al. 2003). Weiterhin spielen ISEs nicht nur bei der Regulation des alternativen, sondern auch bei der

des konstitutiven Spleißens, welches ja für das *SPR*-Gen beschrieben ist, eine Rolle (s.a.o.), und so lässt sich keinesfalls ausschließen, daß der entdeckte Basenaustausch ein cis-aktives Element, welches das Spleißen der *SPR*-prä-mRNA verstärkt, betrifft.

Die Tatsache, daß solche cis-aktiven Elemente den Spleißvorgang im Allgemeinen über Wechselwirkungen mit bestimmten Proteinen steuern, wirft die Frage auf, inwieweit ein solitärer Basenaustausch derartige Wechselwirkungen beeinflussen könnte. In den erwähnten Experimenten von McCullough et al. im Jahr 2000 konnten Wechselwirkungen eines ISEs über Basenpaarungen mit U1 snRNP als trans-aktivem Element *in vivo* nachgewiesen werden, welche das prä-mRNA-Spleißen des alpha-Globin-Gens beeinflussten. Die kleinste Einheit, für die ein solcher Einfluß nachgewiesen wurde, waren aber drei Basen, der Einfluß eines einzelnen Basenaustausches wurde nicht untersucht. Im oben aufgeführten Beispiel einer Spleißmutation allerdings, welche über Zerstörung eines ISEs pathogen wirken kann, ist das Auftreten eines Wachstumshormonmangels bei Betroffenen, welche lediglich eine Transition von G zu A innerhalb eines Introns aufweisen, beschrieben. Und Chabot et al. zeigten 1997, das bereits ein einzelner Basenaustausch von G zu C innerhalb eines ISEs der murinen hnRNP prä-mRNA nicht nur dessen Fähigkeit zur Bindung an hnRNP A1 herabsetzen, sondern auch die Wahl der (alternativen) Spleißstelle beeinflussen kann. - Jedoch muß an dieser Stelle wieder darauf hingewiesen werden, dass all diese Mutationen G-reiche Sequenzen zerstören. Daher soll noch das Beispiel von Dredge et al. von 2003 aufgeführt werden, die einen ISE innerhalb eines Introns des Gens eines GABA-Rezeptors entdeckten, welcher als zentrales Element repetitive CA-Sequenzen aufwies. Basenaustausche innerhalb dieses Elements resultierten auch hier in Beeinträchtigung der Bindung zum trans-aktiven Element (dem sogenannten Nova-1 Protein) *in vitro* und Alteration des Spleißmusters, allerdings waren wieder mindestens drei Basen ausgetauscht worden.

- Auch daß über Generierung eines „intrinsic splicing silencer“ durch eine Mutation die Erkennung einer Spleißstelle geschwächt werden und hierdurch krankheitsauslösend sein kann, ist denkbar, aber bislang so in der Literatur nicht beschrieben.

Weiterhin wäre eine sozusagen indirekte Schwächung einer Spleißstelle durch Stärkung einer kryptischen Spleißstelle möglich im Falle einer Generierung eines ISE oder Zerstörung eines ISS. Eine direkte Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle durch Entstehung einer zusätzlichen Spleiß-Konsensussequenz ist bei Patient 256 hingegen nicht offensichtlich (s. Abb.16).

Ein Beispiel für die Verursachung einer hereditären Erkrankung über Neuentstehung eines ISE liefern Miné et al. 2003 bei einem von x-chromosomal-rezessiv vererbtem partiellem Pyruvatdehydrogenase-Defekt betroffenen Jungen. Sie entdeckten im Intron 7 des *E1 α -PDH*-Gens einen Basenaustausch, der zu einer Veränderung des jeweiligen Spleißmusters führte, eben am wahrscheinlichsten dadurch, daß er als Teil eines neuentstandenen ISE eine kryptische Spleißstelle aktivierte.

Die Bindung der unreifen mRNA zu basalen Spleißfaktoren bzw. trans-aktiven Elementen ist aber oftmals nicht allein von Basenpaarungen abhängig, sondern kann auch durch die Sekundärstruktur der RNA beeinflusst werden (Buratti et al. 2004). Die Sekundärstruktur der RNA wiederum kann durch einen einzelnen Basenaustausch verändert werden (Shen et al. 1999) und somit wäre auch beim hier diskutierten Basenaustausch im Intron 1 des *SPR*-Gens möglich, daß er die Sekundärstruktur der entsprechenden prä-mRNA so verändert, daß darüber die Bindung zu Proteinen, welche an der Regulation des Spleißvorgangs beteiligt sind, beeinflusst wird.

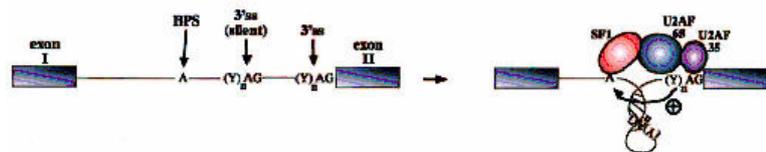
Daß eine durch Mutation veränderte prä-mRNA-Sekundärstruktur nicht nur deren Bindung zu Proteinen beeinflussen, sondern dabei auch pathogen wirken kann, wurde am besten am Beispiel einer hereditären Form der frontotemporalen Demenz, und zwar der sogenannten FTDP-17, nachgewiesen (Buratti et al. 2004, Grover et al. 1999, Varani et al. 1999, Jiang et al. 2000) :

Die FTDP-17 wird autosomal-dominant vererbt und ist mit Mutationen an der Exon 10/Intron 10-Grenze des tau-Gens assoziiert, die zu einer Verschiebung des Verhältnisses der Isoformen des tau-Proteins führen, welches durch alternatives Spleißen reguliert wird. Untersuchungen des Spleißens der RNA des entsprechenden Gen-Abschnittes in vitro zeigten, daß als krankheitsverursachend bekannte Mutationen (auch solche innerhalb des Introns) zu eben der pathologischen Verschiebung des alternativen Spleißmusters führten (Grover et al. 1999). Varani et al. konnten dabei 1999 mittels NMR-Spektroskopie weiterhin den Verdacht bestätigen, daß die mit der Erkrankung assoziierten Basenaustausche eine stem-loop der prä-mRNA zerstören und Jiang et al. 2000 konnten zeigen, daß die pathogene Veränderung des Spleißmusters (durch eine intronische Mutation an Position 14) in vitro in Gegenwart von U1-snRNP erfolgt, welches verstärkt an das mutierte RNA-Fragment bindet. – Ein einzelner Basenaustausch innerhalb einer nicht-konservierten Sequenz des Introns eines Gens kann also die Sekundärstruktur der jeweiligen prä-mRNA verändern, welches wiederum Einfluß auf

deren Bindung zu Spleiß-Proteinen und somit den Spleißvorgang an sich ausüben und so krankheitsauslösend sein kann.

Auf eine etwas indirektere Art und Weise kann die Sekundärstruktur eines Introns einer unreifen mRNA auch eine Rolle bei der Wahl der AG-Sequenz der distalen Spleißstelle spielen, und zwar, indem sie den Abstand zwischen der branch site und der distalen Spleißstelle bestimmt (Buratti et al. 2004, Chen et al. 2000, Deshler et al. 1991). Auch in diesem Fall können Mutationen, die die Konformation der unreifen mRNA ändern, hierüber Einfluß auf den Spleißvorgang nehmen; so zeigten Deshler et al. 1991 am Aktin-Gens der Hefe *K. lactis*, daß Punktmutationen im Intron, welche eine Haarnadelstruktur zwischen branch site und 3'-Spleißstelle gelegen zerstören, die übliche 3'-Spleißstelle schwächen und eine kryptische Spleißstelle aktivieren (s. Abb. 17). Die Zerstörung der Haarnadel ändert dabei die Positionierung der üblichen Spleißstelle gegenüber der branch site, erleichtert aber offenbar auch die Zugänglichkeit der kryptischen Spleißstelle.

Abb. 17 Intron des *K. lactis*-Aktin-Gens.
Eine stumme 3'-Spleißstelle wird nicht benutzt, solange eine Haarnadelstruktur deren Zugänglichkeit erschwert und die eigentliche Spleißstelle für das Spleißosom optimal positioniert.



Aus Buratti et al. 2004

Dieses Beispiel ist für die vorliegende Doktorarbeit besonders interessant, da der gefundene Basenaustausch augenscheinlich ebenfalls zwischen branch site und 3'-Spleißstelle eines Introns befindlich ist und multiple AG-Sequenzen als womögliche kryptische Spleißstellen nahe gelegen sind (s.a. Abb. 16).

Anders als bei Patientin 297 wurde die Computersimulation „Mfold“ zur Ermittlung von RNA-Sekundärstrukturen bei Patient 256 nicht eingesetzt, da die versuchte Herstellung von Zusammenhängen zwischen mittels Computerprogramm ermittelten Sekundärstrukturen einerseits und Spleißmustern andererseits in der Vergangenheit durch Studien mehrfach in Frage gestellt wurde (Buratti et al. 2004). Weiterhin hängen die vorausgesagten möglichen Sekundärstrukturen stark von der Länge des in Betracht gezogenen RNA-Abschnitts ab, dessen Ermittlung bei Patient 256, da im Intron 1 gerade inmitten des Gens befindlich, schwierig wäre.

Zusammengefaßt läßt sich also sagen, daß der bei Patient 256 im Intron 1 des *SPR*-Gens entdeckte Basenaustausch möglicherweise als Spleißmutation pathogen sein könnte, da er eine für die Erkennung der korrekten Spleißstellen wichtige prä-mRNA-Sequenz verändern könnte. Aufgrund der Position der Mutation könnten v.a. die Erkennung von branch site und/oder 3'-Spleißstelle beeinträchtigt sein.

Wird die physiologische Spleißstelle nicht mehr richtig erkannt, findet an dieser Stelle entweder gar kein Spleißen statt, d.h., das Intron wird auch in der reifen mRNA beibehalten, oder das Spleißosom nutzt eine andere Spleißstelle (Strachan et al. 2004). Wird dabei eine physiologische Spleißstelle benutzt, wird ein Exon übersprungen und die fertige mRNA um selbiges verkürzt, wird eine kryptische Spleißstelle benutzt, ist, je nach Lage derselben, sowohl eine teilweise Beibehaltung von Intronsequenzen als auch eine teilweise Verkürzung um Exonsequenzen möglich.

Da die Spleißreaktion die Bildung eines Nucleoproteinkomplexes zur Folge hat, welcher den Transport der reifen mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma gewährleistet, bedeutet ein Ausfallen derselben zumeist auch, daß die mRNA im Zellkern zurückbleibt (Strachan et al. 2004, Luo et al. 1999). Das Translationssystem jedoch befindet sich im Zytoplasma, somit kann eine Proteinsynthese gar nicht stattfinden.

Ein Ausführen der Spleißreaktion an einer anderen als der physiologischen Spleißstelle hingegen stört den mRNA-Export nicht, die Sequenz der gespleißten mRNA ist aber um bestimmte Nucleotide verlängert oder verkürzt. Ist die fehlende oder zusätzliche Zahl von Nucleotiden nicht durch drei teilbar, führt dies zu einer Rasterverschiebung im genetischen Tripletcode und es entsteht ein vorzeitiges Stoppcodon (Strachan et al. 2004). Messenger-RNAs wiederum, welche ein solches vorzeitiges Stoppcodon aufweisen, unterliegen im Allgemeinen dem sogenannten Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau (nonsense mediated mRNA-decay, NMD) und werden, noch bevor die Translation beginnen kann, zerstört. NMD ist die häufigste Konsequenz, wenn mRNAs vorzeitige Terminationscodons enthalten, hängt aber vom Vorhandensein einer strangabwärts gelegenen Exon-Exon-Verknüpfung ab, welche mindestens 50 Nucleotide entfernt liegen muß (Maquat 2005). So kann in seltenen Fällen auch eine mRNA mit vorzeitigem Stoppcodon translatiert werden, sodaß ein verkürztes Polypeptid entsteht.

Auch wenn keine Rasterverschiebung entsteht, kann die Translation der veränderten mRNA stattfinden; dem entstehenden Polypeptid fehlen aber Aminosäuren oder es sind

zusätzliche eingebaut, sodaß auch die ursprüngliche Funktion des Proteins verändert sein wird.

5.3 Patienten ohne Befund

Bei 98 der 100 Patienten mit DRD-ähnlicher Symptomatik fand sich kein band-shift in der SSCP-Untersuchung des *SPR*-Gens, ebenso nicht im *RKST1*-Gen bei den vier Patienten der Familie, in welcher PKC auftrat. Ein negatives SSCP-Ergebnis aber schließt das Vorhandensein einer Mutation keinesfalls aus (Hayashi 1992). Die Sensitivität der SSCP ist abhängig davon, wie eine Mutation die Faltung der untersuchten einzelsträngigen DNA beeinflusst und wie die veränderte Faltung wiederum das Laufverhalten in der Gelelektrophorese beeinflusst, was beides letztlich nicht genau voraussagen ist. So läßt sich auch hier die Wahrscheinlichkeit, daß Mutationen unentdeckt blieben, bestenfalls abschätzen.

Insbesondere die Länge des jeweiligen DNA-Fragments gilt als entscheidend dafür, daß vorhandene Abweichungen von der Wildtypsequenz in der SSCP auch als zusätzliche Bande auffällig werden können. Untersuchungen aus mehreren Laboren ließen die Schlußfolgerung zu, daß bei einer Fragmentlänge von 150-200 bp über 90% aller vorhandenen Basenaustausche eines DNA-Moleküls mittels SSCP gefunden werden können, bei längeren, aber auch kürzeren Fragmenten sinkt die Sensitivität jedoch deutlich erniedrigt (Sheffield et al. 1993, Hayashi 1992). Einige Experimente bezüglich der Einflußfaktoren auf die Sensitivität der SSCP hingegen konnten ausdrücklich keinen ausgeprägten Einfluß der Fragmentlänge feststellen (Highsmith et al. 1999, Nataraj et al. 1999). Highsmith et al. beispielsweise untersuchten Fragmente, welche zwischen 100 und 600 bp lang waren und einen vorbekanntem Basenaustausch enthielten per SSCP-Analyse; die Wahrscheinlichkeit, auch in den 600 bp- Fragmenten die Mutation zu finden, sank dabei - auch bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (z.B. unterschiedlichen Temperaturen) - zumeist nicht wesentlich. Als ein entscheidender die Sensitivität der SSCP beeinflussende Faktor erschien dagegen der GC-Gehalt des untersuchten DNA-Abschnitts. Es wurden DNA-Moleküle mit einem GC-Gehalt zwischen 40 und 60% analysiert, wobei bei niedrigerem GC-Gehalt die SSCP erst bei einer Temperatur von 4°C erfolgreich war, bei einem GC-Gehalt von 60% blieb die Sensitivität auch bei Raumtemperatur hoch bzw. sank geringfügiger. – Die Position des Basenaustausches – in

der Mitte des DNA-Fragments oder nahe des 5'- oder 3'-Endes gelegen – hatte keinen Einfluß auf das Laufverhalten in der SSCP, ebenso wenig die Art (z.B. G zu C oder G zu A). Andere Autoren wiederum beschreiben einen entscheidenden Einfluß der die Mutation umgebenden Sequenz (Sheffield et al. 1993, Highsmith et al. 1999). Als weitere für die Sensitivität der SSCP bedeutsame Faktoren gelten die Bedingungen, unter welcher die Gelelektrophorese stattfindet, also die Temperatur, der pH-Wert oder die Zusammensetzung der Gelmatrix (Nataraj et al. 1999).

Innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit wurden mittels SSCP DNA-Abschnitte mit einer Länge zwischen ca. 200 und 300 bp analysiert, mit jeweils zwei Gelläufen bei unterschiedlicher Temperatur (Raumtemperatur und 4°C) sowie unterschiedlicher Zusammensetzung der Gelmatrix (laboreigen hergestellte und kommerziell erhältliche (MDE-) Gellösung). Die einzigen beiden entdeckten Basenaustausche befanden sich dabei in einem DNA-Fragment mit einem äußerst hohen GC-Gehalt von ca. 75% sowie einer Länge von 207 bp (im Exon 1 des *SPR*-Gens) und in einem DNA-Fragment mit einem mittleren GC-Gehalt von ca. 55% sowie einer Länge von 226 bp (im Übergangsbereich von Intron 1 zu Exon 2 des *SPR*-Gens). Dabei war ersterer der genannten Basenaustausche nur bei 4°C und mit MDE-Gelmatrix, der andere in beiden Gelläufen als „band-shift“ auffällig. Interessanterweise befand sich der erstgenannte Basenaustausch noch innerhalb eines weiteren untersuchten Fragments (mit gleich hohem GC-Gehalt und 26 bp länger), da diese überlappend angeordnet waren, wo sich der „band-shift“ in der SSCP nicht nachweisen ließ.

Somit war hier die Wahrscheinlichkeit, daß ein Basenaustausch letztlich auch zu einem veränderten Laufverhalten des DNA-Moleküls in einer SSCP-Analyse führt, bei niedrigerem GC-Gehalt höher, was den erwähnten Ergebnissen von Highsmith et al. widerspricht. Daß auch eine niedrigere Gellauf-Temperatur sowie die Verwendung von MDE-Lösung als Gelmatrix günstiger erscheint, wird wiederum in der Literatur zahlreich bestätigt (Highsmith et al. 1999, Nataraj et al. 1999). Auch, daß die Änderung der den jeweiligen Basenaustausch umgebenden Sequenz, wie hier bei den überlappenden Fragmenten in Exon 1 des *SPR*-Gens, das SSCP-Ergebnis beeinflussen kann, konnte, wie oben bereits erwähnt, schon oftmals beobachtet werden. Die Länge der Abschnitte, in welchem per SSCP Mutationen entdeckt werden konnten, lag mit knapp über 200 bp ebenfalls in einem als günstig angesehenen Bereich. Letztlich bleibt aber das Laufverhalten eines DNA-Fragments in einer SSCP nicht vorhersagbar und auch in dem konkreten Fall hier dürften sich aus den zwei entdeckten „band-shifts“ im *SPR*-Gen kaum

die konkreten Parameter einer erfolgreicherer SSCP-Analyse für die sämtlich denkbaren (!) Mutationen ableiten. Viele der untersuchten Fragmente erscheinen jedoch mit an die 300 bp eher lang (wobei auch hier in der Literatur wie gesagt nicht wenige anderslautende Beurteilungen zu finden sind), womöglich könnte daher die Aufteilung der untersuchten Gene in kürzere Abschnitte mittels zusätzlicher PCR-Primer die SSCP erfolgreicher sein lassen. Auch die Verwendung ganz anderer Primer, um die eine mögliche Mutation umgebende Sequenz abzuändern, könnte zu weiteren SSCP-Ergebnissen führen. Viele Autoren empfehlen außerdem die Gabe von Zusätzen, wie z.B. Glycerol bzw. eine Veränderung des pH-Wertes (Highsmith et al. 1999, Hayashi 1992).

- Neben einer womöglich mangelnden Sensitivität bezüglich detektierbarer Sequenzänderungen ist die SSCP zur Ermittlung bestimmter Gendefekte kaum bzw. gar nicht geeignet: heterozygote Deletionen, insbesondere, wenn sie – was häufig der Fall ist – ganze Exons umfassen, liefern in einer SSCP, in welcher einzeln amplifizierte Exons - wie hier geschehen - untersucht werden, kein Produkt (Strachan et al. 2005). Zur Erfassung solcher Deletionen müssten andere Methoden, wie beispielsweise die FISH-Analyse oder quantitative real-time PCR bzw. MLPA Anwendung finden (Steinberger et al. 2007).

5.4 Mögliche Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion des Genprodukts

Sollten die beiden im *SPR*-Gen von Patientin 297 bzw. Patient 256 entdeckten Basenaustausche pathogen wirken, müssten sie Auswirkungen auf das codierte Enzym, die Sepiapterin Reduktase zeigen. Da beide Patienten heterozygot für die jeweilige Mutation sind, existiert bei ihnen in jedem Fall je ein gesundes Allel und die Gen- bzw. Enzymaktivität dürfte auch bei einer pathogenen Mutation um nur etwa 50% verringert sein.

5.4.1 Mögliche Auswirkungen der Mutation bei Patientin 297

Patientin 297 wurde außerhalb dieser Doktorarbeit weiterfolgend untersucht. Die Enzymaktivität der Sepiapterin-Reduktase in - von der Neurologischen Universitätsklinik Freiburg entnommenen - Fibroblasten der jungen Frau wurde durch die Abteilung für Klinische Chemie und Biochemie des Kinderhospitals Zürich bestimmt, außerdem die vorhandene Menge des Proteins (Steinberger et al. 2004). Weiterhin wurde die

Konzentration von Neopterin, Tetrahydrobiopterin und Biopterin nach Zytokin-Stimulation der Fibroblasten ermittelt.

Die SR-Aktivität ebenso wie die -Menge zeigte sich hierbei gegenüber Kontrollen signifikant reduziert. Die Konzentration sowohl von Tetrahydrobiopterin, dessen Bildung durch die Sepiapterin Reduktase katalysiert wird wie auch von Biopterin, zu welchem Tetrahydrobiopterin nachfolgend verstoffwechselt wird, war ebenfalls reduziert, was zusätzlich für eine herabgesetzte SR-Aktivität bei der Patientin spricht. Die Neopterin-Konzentration hingegen, welches im Pteridin-Stoffwechselweg (s.a. Abb. 2) unabhängig der Sepiapterin-Reduktase entsteht, befand sich innerhalb des Referenzbereiches.

Was das klinische Bild angeht, so wies Patientin 297 zum Untersuchungszeitpunkt im Wesentlichen eine Dystonie des linken Beines mit daraus resultierender Gangstörung auf, eine Dystonie des vierten und fünften Fingers der linken Hand, einen Tremor des linken Armes sowie einen intermittierenden Stimmtremor. Die Symptomatik war ausgeprägten tageszeitlichen Schwankungen unterworfen und sprach auf Behandlung mit L-Dopa an.

Alle weiteren in der Literatur näher beschriebenen Patienten mit Mutationen im *SPR*-Gen sind homozygot oder kombiniert heterozygot für den jeweiligen Gendefekt (Bonafé et al. 2001, Blau et al. 2001, Farrugia et al. 2006, Abeling et al. 2006, Friedman et al. 2006). Die Enzymaktivität der Sepiapterin Reduktase, so sie bestimmt wurde, lag bei diesen Patienten zumeist unterhalb bzw. nur knapp oberhalb der Bestimmungsgrenze; bei Patientin 297 hingegen wies das Enzym, verglichen mit Kontrollen, noch eine Aktivität von annähernd 62% auf (Steinberger et al. 2004). Die Reduktion der SR-Aktivität bei Patientin 297 ist also geringer ausgeprägt als bei homozygoten Individuen, dabei aber als signifikant anzusehen. Ihre Beschwerden sind im Vergleich milderer Natur, bestimmte Merkmale, wie die fast immer beim Sepiapterin-Reduktase-Mangel vorliegende Intelligenzminderung, fehlen ganz. Auf das Vorliegen einer leichteren Störung der BH₄-Biosynthese wäre der klinische Befund jedoch zurückführbar, insbesondere, wenn man mit dem ebenfalls autosomal-dominanten GTPCH1-Mangel bzw. der klassischen DRD vergleicht, mit welchem das Beschwerdebild von Patientin 297 sogar die Charakteristika, nämlich die tageszeitlichen Schwankungen sowie das gute Ansprechen auf L-Dopa, teilt. Letztere wiederum sind auch beim autosomal-rezessiven Sepiapterin-Reduktase-Mangel zu finden. Und schließlich findet sich in der Literatur in einer Beschreibung einer Sepiapterin-Reduktase-Mangel-Patientin mit homozygotem Basenaustausch im *SPR*-Gen auch ein Hinweis auf deren – potenziell für den Gendefekt heterozygote - Verwandtschaft

mütterlicherseits, welche zwar nicht eingehender untersucht wurde, aber Haltungsanomalien der Gliedmaßen zeigte (Friedman et al. 2006).

Als heterozygot diagnostizierte Eltern anderer von Sepiapterin-Reduktase-Mangel betroffenen Personen (mit andersartigen Gendefekten) werden als asymptomatisch beschrieben (Neville et al. 2004). Zusammenfassend liegt daher die Vermutung nahe, daß zumindest bestimmte Defekte im Sepiapterin-Reduktase-Gen über eine Haploinsuffizienz einen Sepiapterin-Reduktase-Mangel hervorrufen können, so auch der in dieser Dissertation entdeckte Basenaustausch im 5'-UTR-Bereich des *SPR*-Gens von Patientin 297.

5.4.2 Mögliche Auswirkungen der Mutation bei Patient 256

Der Basenaustausch, welcher bei Patient 256 entdeckt wurde, liegt, wie bereits erwähnt, in einem Bereich des *SPR*-Gens, in welchem er, sollte er Auswirkungen auf die Genfunktion haben, am ehesten als Spleißmutation, welche die Exonererkennung schwächt, aber nicht vollständig unterdrückt, fungieren würde. Somit wären sehr wahrscheinlich auch die Auswirkungen auf den Phänotyp weniger stark ausgeprägt.

Bestimmungen der SR-Enzymaktivität bzw. -Menge bei Patient 256 stehen noch aus. Was das klinische Bild anbelangt, so imponierten beim Patienten zum Untersuchungszeitpunkt bei Zustand nach zervikaler Bandscheiben-OP persistierende Schmerzen und Muskelverspannungen im Schulter-Nacken-Bereich ohne klinische oder radiologische Zeichen einer erneuten Wurzelkompression. Bei einer transkraniellen Ultraschalluntersuchung des Gehirns durchgeführt im Rahmen einer Studie in der neurologischen Abteilung des Universitätsklinikums Würzburg zeigte sich beim Patienten eine echodichte Zone im Bereich der Basalganglien. - Transkranielle Ultraschalluntersuchungen des Gehirns bei Dystonie-Patienten können einen ähnlichen Befund ergeben, was womöglich auf einen bei Patienten mit primärer Dystonie oftmals erhöhten Kupfergehalt im Nucleus lentiformis zurückzuführen ist, welcher wiederum mit einer ebenfalls beobachteten Reduktion des Menke-Proteins, einem Kupfertransportprotein, zusammenhängen kann (Becker et al. 2002).

Becker et al. untersuchten 2002 13 Patienten mit vergleichbarer Symptomatik wie Patient 256, d.h. verbleibenden nicht-radikulären Schulter-Nacken-Beschwerden nach bzw. trotz zervikaler Bandscheiben-OP. Der größte Teil von ihnen wies bei Ultraschalluntersuchung eine echodichte Zone im Nucleus lentiformis auf, MRT-Untersuchungen des Gehirns

lieferten entsprechende Ergebnisse und Menke-Protein-mRNA-Konzentrationen in Patienten-Leukozyten waren reduziert. Klinisch fand sich bei allen Patienten ein tonischer Schulterhochstand mit Hypertrophie des M. trapezius und somit erinnern die Befunde dieses Patienten-Kollektivs an die Befunde bei Patienten mit zervikaler Dystonie.

Daß eine zervikale Dystonie vielfache orthopädische und neurologische Komplikationen nach sich ziehen kann, ist in der Literatur oftmals beschrieben (Konrad et al. 2004). Bandscheibenvorfälle im HWS-Bereich stehen dabei zumeist im Zusammenhang mit generalisierter Dystonie bzw. infantiler Zerebralparese; spezifisch auf die Dopa-responsive Dystonie bezogen ist die Beschreibung derartiger Komplikationen nicht typisch, zumal auch eine zervikale Dystonie nicht als ein vorherrschendes Symptom der Erkrankung gilt.

Einige wenige Fälle von Patienten mit als Dopa-responsiv klassifizierter Dystonie, bei welchen eine zervikale Dystonie im Vordergrund des Beschwerdebildes steht, sind allerdings beschrieben (Schneider et al. 2005). Vier von ihnen - aus zwei verschiedenen Familien stammend - durchliefen molekulargenetische Untersuchungen des *GCH1*-Gens, welche allesamt unauffällige Befunde ergaben. Drei Geschwister aus der ersten Familie wurden außerdem auf Veränderungen des *TH*- sowie *SPR*-Gens hin untersucht, ebenfalls ohne auffälliges Ergebnis, die vierte Patientin hingegen nicht, da sich hier der Erbgang klar autosomal-dominant darstellte. Wie aber oben bei Patientin 297 bereits dargelegt, erscheint eine heterozygote Mutation im *SPR*-Gen als Ursache für den Phänotyp einer DRD möglich. Somit ist keinesfalls auszuschließen, daß bei der vierten molekulargenetisch untersuchten Patientin mit Dopa-responsiver zervikaler Dystonie eine Veränderung im *SPR*-Gen deren Krankheitsbild verursachte.

Ein Zusammenhang zwischen der Symptomatik bei Patient 256 und der entdeckten Mutation im Intron 1 des *SPR*-Gens könnte also bestehen. Dies müsste jedoch, ebenso wie die anderen vorliegenden Ergebnisse, durch weiterführende Untersuchungen abgeklärt werden.

5.5 Mögliche weiterführende Untersuchungen

Die weitere Abklärung der vorliegenden Ergebnisse erscheint sowohl bei den Patienten, welche eine möglicherweise krankheitsverursachende Mutation aufwiesen, als auch bei den Patienten, bei welchen sich eine solche nicht fand, sinnvoll. Bei den Patienten mit

Befund wäre insbesondere wichtig zu klären, inwieweit ein Zusammenhang zwischen bestehendem Krankheitsbild und molekulargenetischer Auffälligkeit nachweisbar ist. Bei den Patienten ohne Befund stellt sich die Frage nach weiteren geeigneten Kandidatengen.

5.5.1 Patienten mit Befund

Letztlich existiert eine Vielzahl möglicher weiterer Untersuchungen, um eventuelle Auswirkungen der hier beschriebenen Basenaustausche abklären zu können. Im folgenden soll kurz auf die wichtigsten eingegangen werden.

Bezüglich Patientin 297 betrifft der spekulierte Pathomechanismus sehr wahrscheinlich die Translation des *SPR*-Gens. An weiterführenden Experimenten sind daher insbesondere Simulationen der Translation, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, z.B. mittels bakterieller Expressionssysteme, zu nennen. Interessant wäre hier nicht nur ein Vergleich zwischen der Translationsausbeute von der betroffenen Patientin und einer gesunden Person, zumal ja bei Patientin 297 eine Reduktion der SR-Proteinmenge bereits nachgewiesen ist. Wichtig zu überprüfen wäre auch, inwieweit die gezielte Einführung des in dieser Doktorarbeit entdeckten Basenaustausches in *SPR*-Wildtyp-DNA per Mutagenese bzw. „site-directed mutagenesis“ die Proteinausbeute beeinflusst.

Bei Patient 256 steht zunächst die Bestimmung der Sepiapterin Reduktase-Enzymaktivität sowie -Proteinmenge, welche ja bei Patientin 297 bereits erfolgt ist, aus, ebenso wie eine Bestimmung der Pterine in Zytokin-stimulierten Fibroblasten. Die Fortführung der hier begonnenen Untersuchung der cDNA bei womöglich verändertem Spleißvorgang insbesondere über eine Sequenzierung wäre außerdem sinnvoll. Und schließlich kann auch bei Patient 256 der Einfluß der detektierten Mutation auf die Proteinsynthese über *in vitro*- und/oder *in vivo*-Translationssysteme nach gezielter Mutagenese näher eingegrenzt werden.

5.5.2 Patienten ohne Befund

Abgesehen von der oben diskutierten Möglichkeit, daß vorhandene Mutationen bei den Patienten ohne Befund schlicht nicht entdeckt wurden, könnte deren Symptomatik durch Veränderungen der Basenfolge in anderen Genen verursacht sein.

Bei den 98 von DRD betroffenen Patienten ohne Befund erscheinen hierbei zunächst die Gene, welche für die weiteren Enzyme des Tetrahydrobiopterin-Stoffwechsels kodieren, als Kandidatengene naheliegend. Innerhalb dieser Gene wurde allerdings bereits außerhalb dieser Dissertation erfolglos nach möglichen Mutationen gescreent. Dabei ist außerdem zu bedenken, daß Patienten mit anderen BH4-Mangelerkrankungen als GTPCH1- oder SR-Mangel bezüglich der klinischen Symptomatik in der bisher veröffentlichten Literatur als z.T. sehr deutlich von der DRD abweichend beschrieben werden (Thöny et al. 2006).

Tassin et al. untersuchten im Jahr 2000 22 Familien mit dem Phänotyp einer Dopa-responsiven Dystonie auf mögliche krankheitsverursachende Veränderungen des Genoms hin. Bei einem großen Teil der Probanden fanden sich Mutationen im *GCH1*-Gen, drei Familien aber wiesen – sowohl homo- als auch heterozygote - Deletionen im Parkin-Gen auf. Mutationen im Parkin-Gen (*PARK2*) treten bei Patienten mit autosomal-rezessivem juvenilen Parkinsonismus auf, welcher im klinischen Erscheinungsbild durchaus Ähnlichkeiten mit der DRD aufweisen kann (Klein et al. 2001). So beginnt der juvenile Parkinsonismus früh, teilweise schon im Kindesalter, zeigt eine Dystonie als Begleit- oder sogar Erstsymptom sowie tageszeitliche Schwankungen der Symptomatik. Anders als bei der Dopa-responsiven Dystonie aber treten bei den Betroffenen häufig L-Dopa-induzierte Dyskinesien auf. Solche Dyskinesien wurden allerdings auch schon bei Patienten mit Mutationen im *GCH1*-Gen beobachtet, sodaß eine klare Unterscheidung zwischen den beiden Krankheitsbildern mitunter nur molekulargenetisch gelingt. Somit wäre bei den 98 Patienten mit dem Phänotyp einer DRD, welche hier ohne auffälligen Befund blieben, wie auch bei anderen *GCH1*-negativen DRD-Patienten das Parkin-Gen als mögliches Kandidatengen zu nennen.

Nicht selten findet sich als ein Krankheitslokus auch eine Genfamilie, welche als Cluster im Genom vorliegt (Strachan et al. 2005). Was die Dopa-responsive Dystonie angeht, so sind betroffene Familien beschrieben, bei welchen der Krankheitslokus auf Chromosom 14q kartiert werden, dabei aber keine Mutation im *GCH1*-Gen nachgewiesen werden konnte (Furukawa et al. 1999), kürzlich auch eine 77-jährige Patientin, bei welcher der Genort der Erkrankung klar außerhalb des *GCH1*-Gens, nämlich auf Chromosom 14q13 lokalisiert werden konnte (Grötzsch et al. 2002, Furukawa 2004). Somit könnten auch die *GCH1* umgebenden Gene als mögliche Kandidaten für eine weitere Suche nach krankheitsverursachenden Mutationen sinnvoll erscheinen.

Letztlich ist auch das für die Tyrosin Hydroxylase codierende Gen als mögliches Kandidatengen bei DRD-Patienten ohne Mutation in *GCHI* in Betracht zu ziehen (Furukawa et al. 1999). TH-Mangel gilt bei den meisten Autoren als autosomal-rezessive Form der DRD; die mild verlaufende Variante kann in jedem Fall Ähnlichkeiten im Krankheitsbild aufweisen (Ichinose et al. 1999).

Die Mutationssuche bei der von PKC betroffenen Familie verlief ebenfalls ergebnislos. Auch anderen Arbeitsgruppen gelang ein eindeutiger Nachweis einer pathologischen Veränderung im Genom PKC-Erkrankter bislang nicht, Kikuchi et al. entdeckten 2007 allerdings bei zwei Familien jeweils einen nicht-synonymen Basenaustausch, welcher ausschließlich bei den erkrankten Familienmitgliedern, bei 400 gesunden Kontrollen hingegen nicht auftrat. Bei der einen der beiden Familien befand sich die Substitution innerhalb eines Gens, welches für einen nicht-spannungsabhängigen Natriumkanal codiert (*SCNN1G*), bei der anderen im Integrin-alpha-Vorläufer-Gen (*ITGAL*), einem Gen für ein Adhäsionsprotein.

Daß ein Defekt eines Ionenkanals mit einer paroxysmalen Erkrankung des Nervensystems in Zusammenhang stehen kann, wurde bereits ausführlich dargelegt (s. Kap. 1.3.1). Verbunden mit der Tatsache, daß die Substitution im *SCNN1G*-Gen bei gesunden Kontrollen nicht auftrat und zu einem Aminosäureaustausch führte, läßt deren Pathogenität äußerst wahrscheinlich erscheinen. Daher wäre eine Analyse dieses Gens auch bei der hier beschriebenen von PKC betroffenen Familie sinnvoll.

Genetisch bedingte Veränderungen von Integrinen können eine Rolle bei der Entstehung neuromuskulärer Erkrankungen spielen (Sewry et al. 1999), inwieweit auch bei paroxysmalen neurologischen Erkrankungen, ist nicht bekannt. Aber auch der Basenaustausch im *ITGAL*-Gen war nicht-synonym und bei gesunden Kontrollpersonen nicht nachweisbar, weswegen auch dieses Gen bei PKC-Patienten als mögliches Kandidatengen erscheint.

Ansonsten wurden innerhalb der vielfach als PKC-Krankheitsloкус kartierten Region auf Chromosom 16 in der Vergangenheit zahlreiche Gene untersucht; die erwähnte Studie von Kikuchi et al. mit 157 untersuchten Genen dürfte die umfangreichste sein. Doch auch dort verblieben innerhalb des kartierten Krankheitsloкус sieben Gene nicht analysiert, weiterhin besteht die Möglichkeit, daß PKC durch Veränderungen in nicht-codierenden DNA-Bereichen oder aber in noch zu entdeckenden Genen verursacht wird.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde bei zwei primären Dystonien, der Dopa-responsiven Dystonie/DYT 5 und der Paroxysmalen kinesio-genen Choreoathetose/DYT 10, jeweils ein Kandidatengen bei Patienten mit entsprechender Symptomatik auf eventuelle Veränderungen der genomischen Sequenz hin untersucht. Als Screeningverfahren diente hierbei SSCP, der, im Fall einer Auffälligkeit, DNA-Sequenzierung angeschlossen wurde. In einem Fall wurde weiterhin die jeweilige cDNA mittels RT-PCR untersucht.

Bei 100 Patienten, die das klinischen Erscheinungsbild einer Dopa-responsiven Dystonie aufwiesen, bei denen sich zuvor keine Mutation im hauptsächlich als krankheitsverursachend angesehenen *GCH1*-Gen gefunden hatte, wurde das Sepiapterin-Reduktase-Gen analysiert. Dessen Genprodukt ist, ebenso wie das von *GCH1*, am Stoffwechsel von BH4 beteiligt, welches u.a. bei der Biosynthese von Neurotransmittern, u.a. auch L-Dopa, als Co-Faktor dient.

Bei einer vierköpfigen von PKC betroffenen französisch-deutschen Familie wurde das *RKST1*-Gen untersucht, welches sich innerhalb eines zuvor bei derselben Familie kartierten Krankheitslokus im perizentromeren Bereich von Chromosom 16 befindet. Das *RKST1*-Gen codiert für einen Natrium-Glucose-Cotransporter, welcher als Ionenkanal ein geeignetes Kandidatengen einer paroxysmalen neurologischen Erkrankung darstellt.

Bei zwei DRD-Patienten konnte dabei jeweils ein heterozygoter Basenaustausch im *SPR*-Gen, einer davon im Intron 1, der andere im 5'-UTR-Bereich, entdeckt werden. 138 Kontrollpersonen wiesen keinen der beiden zum jeweiligen Basenaustausch zugehörigen SSCP-band-shifts auf.

Die Untersuchung der cDNA des Patienten, bei welchem die intronische Mutation entdeckt wurde, lieferte aufgrund methodischer Schwächen leider keine verwertbaren Ergebnisse.

Bei weiterführenden Untersuchungen der Patientin mit einem Basenaustausch im 5'-UTR-Bereich außerhalb der vorliegenden Doktorarbeit fiel eine auf etwa die Hälfte reduzierte

Sepiapterin-Reduktase-Enzymaktivität auf, welcher eine Haploinsuffizienz des zugehörigen Gens zugrunde liegen könnte.

Bislang waren nur homo- bzw. kombiniert heterozygote Mutationen als Ursache von DRD-ähnlicher Symptomatik beschrieben worden.

Das Mutationsscreening im *RKST1*-Gen der Familie, in welcher PKC auftrat, blieb dagegen erfolglos. Mindestens ein Screening außerhalb dieser Dissertation bei PKC-Patienten im gleichen Gen lieferte ebenfalls keinerlei auffälligen Ergebnisse. Auch ansonsten gelang ein eindeutiger Nachweis einer pathogenen DNA-Sequenzänderung, welche PKC verursacht, bislang nicht.

6.2 English Summary

In this doctoral thesis in two primary dystonias, namely Dopa-responsive dystonia (DYT 5) and Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (DYT 10), a candidate gene of patients suffering from one of the diseases was searched for mutations respectively. SSCP was used as a screening test and, in case of a suspicious finding, followed by DNA-sequencing. In one patient also RT-PCR of the cDNA was carried out.

In 100 Patients showing the clinical signs of Dopa-responsive dystonia and having no mutation in *GCH1* - which is usually considered as disease gene in DRD - the gene coding for sepiapterin reductase was investigated. This gene, as well as *GCH1*, codes for an enzyme involved in the biosynthesis of BH₄, which i.a. is an essential cofactor for the biosynthesis of neurotransmitters and also for L-Dopa.

In four members of a family with PKC the *RKST1*-gene was analysed, which maps to a disease locus in the pericentromeric region of chromosome 16 defined before by linkage analysis in the same family. *RKST1* encodes a sodium/glucose cotransporter protein and is as an ion channel gene considered to represent a good candidate in paroxysmal neurological disorders.

In two patients with DRD a heterozygous base exchange could be detected respectively, one of them in intron 1, the other one in the 5'-untranslated region of *SPR*. In 138 unaffected controls the mutations were not observed.

The result of the investigation of the cDNA of the patient carrying the mutation in intron 1 was unfortunately not evaluable.

Further investigations of the patient having a base exchange in the 5'-untranslated region of *SPR* outside this doctoral thesis showed a significantly reduced sepiapterin reductase enzyme activity, indicating haploinsufficiency of the gene to be the molecular pathological mechanism.

Other published mutations of *SPR* causing DRD-like symptoms have all been homozygous respectively combined heterozygous.

The search of mutations in *RKST1* in the family with PKC, however, did not lead to any results. Another recently published search in the same gene in patients with PKC did not either. Furthermore, the identification of a DNA sequence change clearly being causative for PKC still failed at all.

7 Material

Geräte und Zubehör

Biometra UNO Thermoblock	Biometra, Göttingen
Bioprint System	Mitsubishi, Japan
Cronex Röntgenfilm	Sterling Diagnostic Imaging
Cronex Röntgenkassetten	Sterling Diagnostic Imaging
DNA Thermocycler	Perkin Elmer Cetus, UK
Geiger-Müller-Zähler Mini Monitor Series 900	American Bioanalytics, USA
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gelelektrophoresekammern Modell S2	Gibco BRL Life Technologies, USA
Modell H5	Gibco BRL Life Technologies, USA
Mikrotiterplatten Thermowell C96	Costar
Multi [®] -Ultra-Tubes	Eppendorf, Hamburg
Pipetten: P10, P20, P200, P1000	Gilson
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
Slab Gel Dryer	Hoefer Scientific Instruments, USA
Spannungsquellen	LKB, USA
Vortexer RS1	IDL

Chemikalien und Kits

Acrylamid 30%	Roth, Karlsruhe
Acrylease	Stratagene
Agarose	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid 2%	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Entwickler: Cronex MD-Developer	Sterling Diagnostic Imaging
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fixierer: Cronex MF-E-Fixer	Sterling Diagnostic Imaging
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Gelatine	Amersham, Braunschweig
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid)	Sigma, Taufkirchen
MDE	Biozym
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Qiagen, Hilden
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Na ₂ EDTA	Sigma, Taufkirchen
NaOH	Merck, Darmstadt
Nucleo Spin Extract Kit	Macherey-Nagel
Omniscript Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Hilden
Q-Solution	Qiagen, Hilden

Qia-Puffer
RNeasy Midi Kit
Rotiphorese 40
Sigmacote
Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator
Cycle Sequencing Kit
Tris Base(C₄H₁₁NO₃)
Tris(Trishydroxymethylaminoethan) HCl
Temed (Tetramethylethyldiamin)
Xylencyanol

Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Roth, Karlsruhe
Sigma, Taufkirchen

Amersham, Braunschweig
Sigma, Taufkirchen
USB, Braunschweig
Sigma, Taufkirchen
Merck, Darmstadt

Enzyme und Nucleotide

α -³²P dCTP
 α -³³P dCTP
Desoxyribonucleotide (dNTPs)
Größenmarker: 100 bp ladder
1 kb DNA ladder
Oligonukleotide
Taq-DNA-Polymerase

Amersham, Braunschweig
Amersham, Braunschweig
Promega, Heidelberg
Invitrogen, USA
Gibco BRL, Berlin
MWG Biotech, Ebersberg
institutseigen
Qiagen, Hilden

Lösungen und Puffer

PCR-Puffer (10x)

100mM Tris HCL pH 8,3
500mM KCl
15mM MgCl₂
0,1% Gelatine

Auftragungspuffer (5x)

0,1M EDTA
50% Glycerin 87%
0,1% Bromphenolblau
0,1% Xylencyanol
ad 10ml 5x TBE

Stoppuffer

80% Formamid
10mM NaOH
1mM EDTA
0,1% Bromphenolblau
0,1% Xylencyanol

TBE-Puffer (5x)

0,45M Borsäure
0,45M Tris Base
12,5mM EDTA

TME-Puffer (10x)

0,3M Tris Base
0,35M MES
10mM Na₂EDTA

TME-Gellösung	<p>42,5ml H₂O dest. 9,9ml Acrylamid-Lösung 30% 1,5ml Bisacrylamid-Lösung 2% 6ml TME-Puffer(10x) 400µl APS 10% 40µl Temed</p>
MDE-Gellösung	<p>37,8ml H₂O dest. 15ml MDE 7,2ml TBE-Puffer(5x)</p>
Sequenzierungsgellösung	<p>9ml Rotiphorese 40 42ml 10M Urea 6ml TBE-Puffer (10x) 3ml H₂O dest.</p>

8 Literaturverzeichnis

Abeling NG, Duran M, Bakker HD, Stroomer L, Thöny B, Blau N, Booj J, Poll-The BT (2006) Sepiapterin reductase deficiency an autosomal recessive Dopa-responsive dystonia. *Molecular Genetics and Metabolism* 89: 116-120

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molekularbiologie der Zelle. Englische Übersetzung herausgegeben von Jaenicke L (2004). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Alphay, L (1998) DNA-Sequenzierung. Aus dem Englischen übersetzt von Beginnen K. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin

Babendure JR, Babendure JL, Ding JH, Tsien RY (2006) Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA* 12: 851-861

Bandmann O, Wood NW (2002) Dopa-responsive dystonia – the story so far. *Neuropediatrics* 33: 1-5

Bathia KP (1999) The paroxysmal dyskinesias. *Journal of Neurology* 246: 149-155

Bathia KP, Griggs RC, Ptáček L (2000) Episodic movement disorders as channelopathies. *Movement Disorders* 15 (3): 429-433

Baralle D, Baralle M (2005) Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of Medical Genetics* 42: 737-748

Becker G, Berg D, Kruse N, Schröder U, Warmuth-Metz M, Rieckmann P, Naumann M, Reiners K (2002) Evidence for shoulder girdle dystonia in selected patients with cervical disc prolapse. *Movement disorders* 17 (4): 710-716

Beom SJ (1997) Dopa-responsive dystonia: A syndrome of selective nigrostriatal dopaminergic deficiency. *Journal of Korean Medical Science* 12: 269-279

Bennett LB, Roach ES, Bowcock AM (2000) A locus for paroxysmal kinesigenic choreoathetosis maps to human chromosome 16. *Neurology* 54: 125-130

Blau N (1988) Inborn errors of pterin metabolism. *Annual Review of Nutrition* 8: 185-209

Blau N, Bonafé L, Thöny B (2001) Tetrahydrobiopterin deficiencies without hyperphenylalaninemia: Diagnosis and genetics of Dopa-responsive dystonia and sepiapterin reductase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 74: 172-185

Bonafé L, Thöny B, Penzien JM, Czarnecki B, Blau N (2001) Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *American Journal of Human Genetics* 69: 000-000

- Bonev VI, Gledhill RF (2002) Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis because of cryptogenic myelitis. Remission with carbamazepine and the pathogenetic role of altered sodium channels. *European Journal of Neurology* 9: 517-520
- Borman AM, Michel YM, Malnou CE, Kean KM (2002) Free poly(A) stimulates capped mRNA translation in vitro through the eIF4G-poly(A)-binding protein interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 277(39): 36818-36824
- Buratti E, Baralle FE (2004) Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Molecular and Cellular Biology* 24 (24): 10505-10514
- Carlo T, Sterner DA, Berget SM (1996) An intron splicing enhancer containing a G-rich repeat facilitates inclusion of a vertebrate micro-exon. *RNA* 2: 342-353
- Cazzola M, Skoda RC (2000) Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood* 95 (11): 3280-3288
- Chabot B, Blanchette M, Lapierre I, La Branche H (1997) An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Molecular and Cellular Biology* 17 (4): 1776-1786
- Chen S, Anderson K, Moore MJ (2000) Evidence for a linear search in bimolecular 3' splice site AG selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97 (2): 593-598
- Cogan JD, Prince MA, Lekhakula S, Bunday S, Futrakul A, Mc Carthy EMS, Phillips JA (1997) A novel mechanism of aberrant pre- mRNA splicing in humans. *Human Molecular Genetics* 6 (6): 909-912
- Cotton RGH, Edkins E, Forrest S (Editors) (1998) Mutation Detection – A Practical Approach. Oxford University Press
- Deshler JO, Rossi JJ (1991) Unexpected point mutations activate cryptic 3' splice sites by perturbing a natural secondary structure within a yeast intron. *Genes & Development* 5: 1252-1263
- Dredge BK, Darnell RB (2003) Nova regulates GABA_A receptor γ 2 alternative splicing via a distal downstream UCAU-rich intronic splicing enhancer. *Molecular and Cellular Biology* 23 (13): 4687-4700
- Farrugia R, Scerri CA, Montalto SA, Parascandolo R, Neville BGR, Felice AE (2006) Molecular genetics of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiency in the Maltese population. *Molecular Genetics and Metabolism* Epub ahead of print
- Faustino NA, Cooper TA (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & Development* 17: 419-437
- Friedman J, Standaert DG (2001) Dystonia and its disorders. *Neurological Clinics* 19(3): 681-705
- Friedman J, Hyland K, Blau N, MacCollin M (2006) Dopa-responsive hypersomnia and mixed movement disorder due to sepiapterin reductase deficiency. *Neurology* 67: 2032-2035

- Fureman BE, Jinnah HA, Hess EJ (2002) Triggers of paroxysmal dyskinesia in the calcium channel mouse mutant tottering. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 73: 631-637
- Furukawa Y, Kish, SJ (1999) Dopa-responsive dystonia: Recent advances and remaining issues to be addressed. *Movement disorders* 14 (5): 709-715
- Furukawa Y, Graf WD, Wong H, Shimadzu M, Kish SJ (2001) Dopa-responsive dystonia simulating spastic paraplegia due to tyrosine hydroxylase (TH) gene mutations. *Neurology* 2001 56: 260-263
- Furukawa Y (2004) Update on Dopa-responsive dystonia: Locus heterogeneity and biochemical features. *Advances in Neurology* 94: 127-138
- Gassen HG, Schrimpf Gangolf (Hrsg.) (1999) Gentechnische Methoden, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin
- Gasser RB, Zhu XQ (1999) Sequence-based Analysis of Enzymatically Amplified DNA Fragments by Mutation Detection Techniques. *Parasitology Today* 15 (11): 462-465
- Graves TD, Hanna MG (2005) Neurological channelopathies. *Postgraduate Medical Journal* 81: 20-32
- Grötzsch H, Pizzolato GP, Ghika J, Schorderet D, Vingerhoets FJ, Landis T, Burkhard PR (2002) Neuropathology of a case of Dopa-responsive dystonia associated with a new genetic locus, DYT 14. *Neurology* 58: 1839-1842
- Grover A, Houlden H, Baker M, Adamson J, Lewis J, Prihar G, Pickering-Brown S, Duff K, Hutton M (1999) 5' Splice site mutations in tau associated with the inherited dementia FTDP-17 affect a stem-loop structure that regulates alternative splicing of exon 10. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (21): 15134-15143
- Hayashi K (1992) PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *Genetic Analyses, Techniques and Applications* 9 (3) 73-79
- Hamann M, Meisler MH, Richter A (2003) Motor disturbances in mice with deficiency of the sodium channel gene *Scn8a* show features of human dystonia. *Experimental Neurology* 184: 830-838
- Highsmith Jr. WE, Nataraj AJ, Jin Q, O'Connor JM, El-Nabi SH, Kusukawa N, Garner MM (1999) Use of DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. II: Evaluation of single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis* 20: 1195-1203
- Hudder A, Werner R (2000) Analysis of a Charcot-Marie-Tooth disease mutation reveals an essential internal ribosomal entry site element in the connexin-32 gene. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (44): 34586-34591
- Ichinose H, Suzuki T, Inagaki H, Ohye T, Nagatsu T (1999) Molecular genetics of Dopa-responsive dystonia. *Biological Chemistry* 380: 1355-1364

- Ikemoto K, Suzuki T, Ichinose H, Ohye T, Nishimura A, Nishi K, Nagatsu I, Nagatsu T (2002) Localization of sepiapterin reductase in the human brain. *Brain Research* 954: 237-246
- Jiang Z, Cote J, Kwon JM, Goate AM, Wu JY (2000) Aberrant splicing of tau pre-mRNA caused by intronic mutations associated with the inherited dementia Frontotemporal Dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17. *Molecular Cell Biology* 20(11): 4036–4048
- Kato N, Sadamatsu M, Kikuchi T, Niikawa N, Fukuyama Y (2006) Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis: From first discovery 1892 to genetic linkage with benign familial infantile convulsions. *Epilepsy research* (70S): S174-S184
- Kikuchi T, Nomura M, Tomita H et al. (2007) Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC): confirmation of linkage to 16p11-q21, but unsuccessful detection of mutations among 157 genes at the PKC-critical region in seven PKC families. *Journal of Human Genetics* (52): 334-341
- Klein C, Vieregge P (1998) Nichtepileptische paroxysmale Bewegungsstörungen. *Der Nervenarzt* 69:647-659
- Klein C, Kann M, Kis B, Pramstaller PP, Breakefield XO, Ozelius LJ, Vieregge P (2000) Genetik der Dystonien. *Der Nervenarzt* 71: 431-441
- Klein C (2001) Zur Genetik des Parkinson-Syndroms. *Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis* 2001 (90): 1015-1023
- Klein C, Ozelius LJ (2002) Dystonia: Clinical features, genetics and treatment. *Current Opinions in Neurology* 15: 491-497
- Koolman J, Röhm KH (1998) Taschenatlas der Biochemie, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
- Konrad C, Vollmer-Haase KA, Knecht S (2004) Orthopedic and neurological complications of cervical dystonia – review of the literature. *Acta Neurologica Scandinavica* 109: 369-373
- Kozak M (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology* 196: 947-950
- Kozak M (1989) Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eukaryotic mRNAs. *Molecular and Cell Biology* 9 (11): 5134-5142
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human Genetics* 90: 41-54
- Kullmann DM (2002) The neuronal channelopathies. *Brain* 125: 1177-1195
- Le Hir H, Nott A, Moore MJ (2003) How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in Biochemical Sciences* 28 (4): 215-220

- Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K, Rudel R (2002) Periodic paralysis: understanding channelopathies. *Current Neurological Neuroscience* 2 (1): 61-69
- Löffler G, Petrides PE (1997) Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- Lotze T, Jankovic J (2003) Paroxysmal kinesigenic dyskinesias. *Seminars in Pediatric Neurology* 10 (1): 68-79
- Luo MJ, Reed R (1999) Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 21 (96): 14937-14942
- Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Maquat LE (2005) Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *Journal of cell science* 118 (9): 1773-1776
- Masuhr KF, Neumann M (1998) Neurologie, 4. Auflage. Hippokrates Verlag, Stuttgart
- McCarthy EMS, Phillips JA (1998) Characterization of an intron splice enhancer that regulates alternative splicing of human GH pre-mRNA. *Human Molecular Genetics* 7 (9): 1491-1496
- McCullough AJ, Berget SM (2000) An intronic splicing enhancer binds U1 snRNP to enhance splicing and select 5'-splice sites. *Molecular and Cellular Biology* 20 (24): 9225-9235
- Mikulits W, Schranzhofer M, Beug H, Müllner EW (1999) Post-transcriptional control via iron-responsive elements: the impact of aberrations in hereditary disease. *Mutation research* 437: 219-230
- Miné M, Brivet M, Touati G, Grabowski P, Arbitol M, Marsac C (2003) Splicing error in E1 α pyruvate dehydrogenase mRNA caused by novel intronic mutation responsible for lactic acidosis and mental retardation. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (14): 11768-11772
- Moens AL, Kass DA (2006) Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 26: 2439-2444
- Mülhardt C (2002) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin
- Müller U, Steinberger D, Nemeth AH (1998) Clinical and molecular genetics of primary dystonias. *Neurogenetics* 1: 165-177
- Mullis KB (1986) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262 (4): 56-61, 64-65
- Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith Jr. WE (1999) Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 20: 1177-1185

- Newton CR, Graham A (1997) PCR, 2. Auflage. Aus dem Englischen übersetzt von Beginnen K. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford
- Neville BGR, Parascandalo R, Farrugia R, Felice A (2005) Sepiapterin reductase deficiency: a congenital dopa-responsive motor and cognitive disorder. *Brain* 128: 2291-2296
- Niepel M, Ling J, Gallie DR (1999) Secondary structure in the 5'-leader or 3'-untranslated region reduces protein yield but does not affect the functional interaction between the 5'-cap and the poly(A) tail. *FEBS Letters* 462: 79-84
- Nissim-Rafinia M, Kerem B (2002) Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends in Genetics* 18 (3): 123-127
- Ohye T, Hori T, Katoh S, Nagatsu T, Ichinose H (1998) Genomic organization and chromosomal localization of the human sepiapterin reductase gene. *Biochemical and biophysical research communications* 251: 597-602
- Pickering BM, Willis AE (2005) The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16: 39-47
- Ptáček LJ (1997) Channelopathies: Ion channel disorders of muscle as a paradigm for paroxysmal disorders of the nervous system. *Neuromuscular disorders* 7: 250-255
- de Rijk-van Andel JF, Gabreëls FJM, Geurtz B, Steenbergen-Spanjers GCH, van den Heuvel LPWJ, Smeitink JAM, Wevers RA (2000) L-dopa-responsive infantile hypokinetic rigid parkinsonism due to tyrosine hydroxylase deficiency. *Neurology* 55: 1926-1928
- Roll P, Massacrier A, Pereira S, Robaglia-Schlupp A, Cau P, Szepietowski P (2002) New human sodium/glucose cotransporter gene (KST1): Identification, characterization and mutation analysis in ICCA (infantile convulsions and choreoathetosis) and BFIC (benign familial infantile convulsions) families. *Gene* 285: 141-148
- Schneider SA, Mohire MD, Trender-Gerhard I, Asmus F, Sweeney M, Davis M, Gasser T, Wood NW, Bhatia KP (2005) Familial Dopa-responsive cervical dystonia. *Neurology* 66: 599-601
- Segawa M (2000) Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Brain & Development* 22: S65-S80
- Sewry CA, Muntoni F (1999) Inherited disorders of the extracellular matrix. *Current Opinions in Neurology* 12(5): 519-526
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16: 325-332
- Shen LX, Babilion JP, Stanton Jr. VP (1999) Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 7871-7876

- Sprunger LK, Escayg A, Tallaksen-Green S, Albin RL, Meisler MH (1999) Dystonia associated with mutation of the neuronal sodium channel *Scn8a* and identification of the modifier locus *Scnm1* on mouse chromosome 3. *Human Molecular Genetics* 8(3): 471-479
- Steinberger D, Müller U (1996) Molekulargenetik und Klinik der Dopa-responsiven Dystonie. *Deutsches Ärzteblatt* 93(24): 57-59
- Steinberger D, Blau N, Goriunov D, Bitsch J, Zuker M, Hummel S, Müller U (2004) Heterozygous mutation in 5-untranslated region of sepiapterin reductase gene (SPR) in a patient with Dopa-responsive dystonia. *Neurogenetics* 2004 (5): 187-190
- Steinberger D, Trübenbach J, Zirn B, Leube B, Wildhardt G, Müller U (2007) Utility of MLPA in deletion analysis of GCH1 in dopa-responsive dystonia. *Neurogenetics* 8: 51-55
- Strachan T, Read AP (2005) Molekulare Humangenetik, 3. Auflage. Aus dem Englischen übersetzt von Seidler L. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag
- Sun H, Chasin LA (2000) Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Molecular and Cellular Biology* 20: 6414-6425
- Szepietowski P, Rochette J, Berquin P, Piussan C, Lathorp GM, Monaco AP (1997) Familial Infantile Convulsions and Paroxysmal Choreoathetosis: A new neurological syndrome linked to the pericentrometric region of human chromosome 16. *American Journal of Human Genetics* 61: 889-898
- Tassin J, Dürr A, Bonnet AM et al. (2000) Levodopa-responsive dystonia: GTP cyclohydrolase or parkin mutations? *Brain* (2000) 123, 1112-1121
- Tomita H, Nagamitsu S, Wakui K et al. (1999) Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis locus maps to chromosome 16p11.2-q12.1. *American Journal of Human Genetics* 65 (6): 1688-1697
- Thöny B, Auerbach G, Blau N (2000) Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochemical Journal* 347: 1-16
- Thöny B, Blau N (2006) Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase and dihydropteridine reductase. *Human Mutation* 27 (9): 870-878
- Vagner S, Galy B, Pyronnet S (2001) Irresistible IRES – attracting the translation machinery to internal ribosomal entry sites. *EMBO reports* 2 (10): 893-898
- Valente EM, Spacey SD, Wali GM, Bhatia KP, Dixon PH, Wood NW, Davis MB (2000) A second paroxysmal kinesigenic choreoathetosis locus (EKD2) mapping on 16q13-q22.1 indicates a family of genes which give rise to paroxysmal disorders on human chromosome 16. *Brain*, 123: 2040-2045
- Varani L, Hasegawa M, Spillantini MG, Smith MJ, Murrell JR, Ghetti B, Klug A, Goedert M, Varani G (1999) Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96(14): 8229–8234

Vasquez-Vivar J, Martasek P, Whitsett J, Joseph J, Kalyanaraman B (2002) The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin controls superoxide release from endothelial nitric oxid synthase: An EPR spin trapping study. *Biochemical Journal* 362 (Pt 3): 733-739

Verrier SB, Jean-Jean O (2000) Complementarity between the mRNA 5' untranslated region and 18S ribosomal rRNA can inhibit translation. *RNA* 6: 584-597

Werner-Felmayer G, Golderer G, Werner ER (2002) Tetrahydrobiopterin biosynthesis, utilization and pharmacological effects. *Current Drug Metabolism* 3: 159-173

Waters MF, Minassian NA, Stevanin G, Figuerora KP, Bannister JP, Nolte D, Mock AF, Evidente VGH, Fee DB, Müller U, Dürr A, Brice A, Papazian DM, Pulst SM (2006) Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nature Genetics Advance Online Publication*: 1-5

Yang N, Ji S, Zhou M, Ptáček LJ, Barchi RL, Horn R, George AL Jr. (1994) Sodium channel mutations in paramyotonia congenita exhibit similar biophysical phenotypes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 12785-12789

Yeo G, Hoon S, Venkatesh B, Burge CB (2004) Variation in sequence and organization of splicing regulatory elements in vertebrate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101 (44): 15700-15705

Zorzi G, Redweik U, Trippe H, Penzien JM, Thöny B, Blau N (2002) Detection of sepiapterin in CSF of patients with sepiapterin reductase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 75: 174-177

Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31(13): 3406-3415
<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>

9 Abkürzungen

A	Adenin, eine der vier Basen der DNA
BH4	Tetrahydrobiopterin, Co-Enzym u.a. in der Katecholaminbiosynthese
bp	Basenpaare
C	Cytosin, eine der vier Basen der DNA
CTP	Cytosintriphosphat
DHPR	Dihydropteridin-Reduktase, Enzym im BH4-Stoffwechsel
DNA	„Desoxyribonucleic acid“/Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre („complementary“) DNA
DRD	Dopa-responsive Dystonie
DYT	Dystonie
G	Guanin, eine der vier Basen der DNA
<i>GCH1</i>	Gen, welches für GTPCH 1 kodiert
GTP	Guanosintriphosphat
GTPCH1	GTP-Cyclohydroxylase 1, Enzym im BH4-Stoffwechsel
ICCA	„Familial infantile convulsions and choreoathetosis“, ein Syndrom mit nicht-fieberhaften Krämpfen im Kindesalter und paroxysmaler Choreoathetose
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle
ISE	„Intronic splicing enhancer“, Intron-Element zur Spleißregulation
ISS	„Intronic splicing silencer“, Intron-Element zur Spleißregulation
NO	Nitroxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
PCR	„Polymerase chain reaction“/Polymerasekettenreaktion
PKC	Paroxysmale kinesiogene Choreoathetose
<i>RKST1</i>	Gen, welches für einen Natrium-Glucose-Cotransporter kodiert
RNA	„Ribonucleic acid“/Ribonukleinsäure
hnRNP	„high molecular weight nuclear RNA“
mRNA	„messenger RNA“
rRNA	„ribosomal RNA“
snRNA/P	„small nuclear RNA“
tRNA	„transfer RNA“

RT	Reverse Transkription
SSCP	„Single strand conformation polymorphism“
SR	Sepiapterin Reduktase, Enzym im BH4-Stoffwechsel
<i>SPR</i>	Gen, welches für SR codiert
T	Thymin, eine der vier Basen der DNA
TH	Tyrosin-Hydroxylase, Enzym in der Katecholamin-Biosynthese
UTR	„untranslated Region“/untranslatierter Bereich

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Müller für das freundliche Überlassen des Themas dieser Doktorarbeit, die Gewährung sämtlicher Mittel und Wege zu deren Erstellung sowie die beständige Betreuung und Unterstützung währenddessen.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Daniela Steinberger für den weiteren umfassenden inhaltlichen wie auch sonstigen unentwegten Beistand und die wertvollen Anregungen bei der Planung und Durchführung bedanken.

Nicht weniger danke ich Herrn Marco Emmerich und Frau Dr. Stefanie Zanssen für die geduldige und gründliche Einarbeitung in die verwandten Methoden.

Der gesamten Arbeitsgruppe der molekulargenetischen Abteilung danke ich sehr für die freundliche Aufnahme und kollegiale Atmosphäre.

Und schließlich möchte ich mich bei meiner lieben Familie bedanken, die mich immer unterstützt und motiviert hat.

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

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