

Aus dem Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. med. Gillessen-Kaesbach
vertreten in der TNF durch das Institut für Biologie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Hartmann

**Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2:
Charakterisierung des Mutationsspektrums
im *SETX*-Gen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät –

vorgelegt von
Veronica Bernard
aus Lübeck

Lübeck 2010

1. Berichtstatter/Berichtstatterin: Herr Prof. Dr. rer. nat. E. Hartmann
2. Berichtstatter/Berichtstatterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. C. Zühlke

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2010

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 21. September 2010

Erklärung

Hiermit versichere ich, Veronica Bernard, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Lübeck, den

Vorwort

In der bis heute gültigen Verfassung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahre 1946 wird die Gesundheit definiert als ein Zustand des vollständigen körperlichen, geistigen und sozialen Wohlergehens. Die Gesundheit ist grundlegend für das Glück aller Völker, für ihre harmonischen Beziehungen und ihre Sicherheit und damit Grundbedingung für den Weltfrieden.

Trotz allem wird es immer wieder Erkrankungen geben. Heute wissen wir, dass an der Ätiologie der meisten Krankheiten genetische Faktoren beteiligt sind. Besonders schwerwiegend ist es für den einzelnen Betroffenen, wenn genetische Veränderungen eine nach außen deutlich sichtbare Behinderung verursachen. Erst am 15. November 1994 trat das nach der deutschen Wiedervereinigung überarbeitete Grundgesetz der Bundesrepublik Deutschland in Kraft, in das erstmalig ein Benachteiligungsverbot für behinderte Menschen aufgenommen wurde (Artikel 3, GG): „Niemand darf wegen seiner Behinderung benachteiligt werden“.

Gegenstand meiner Arbeit ist eine genetische bedingte Form der Bewegungsstörung, speziell die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 (AOA2). Menschen, die unter einer Ataxie leiden, fallen auf durch ihren unsteten Gang. Betroffene berichten, dass dies häufig missgedeutet wird: „Ich kann mir doch kein Schild an den Rücken heften, dass ich nicht betrunken bin, sondern unter einer Bewegungsstörung leide...“ oder „Wir alle, die Behinderten sind, wollen normal behandelt werden und brauchen wir Hilfe, sagen wir es...“.

Segensreich für diese Patientengruppe ist die Deutsche Heredo-Ataxie Gesellschaft e.V. (DHAG). Auf den regelmäßigen Treffen und im Kontakt über die Internetplattform der DHAG haben Betroffene und ihre Angehörigen die Möglichkeit, sich auszutauschen, Informationen über Hilfsmöglichkeiten zu bekommen und Gemeinschaft zu erleben. Die DHAG wirbt auf ihrer Internetseite (Juni 2010) für Verständnis in der Öffentlichkeit:

- „für Betroffene, weil sie den Verlust ihrer Fähigkeiten erleben und bewältigen müssen, sie Angst vor Isolation und Pflegebedürftigkeit haben, sie sich Sorgen um ihre Nachkommen machen.
- für Risikopersonen, weil sie in der Angst leben, selbst krank zu werden, sie Probleme der Familien- und Lebensplanung bewältigen müssen, sie Sorge um ihre Nachkommen haben.

- und für Angehörige, weil sie Probleme im Umgang mit den Kranken und in der Partnerschaft bewältigen müssen, sie häufig körperlicher und seelischer Überforderung ausgesetzt sind, sie mit Isolation in ihrer Familie konfrontiert werden und sie Angst um ihre Nachkommen haben.“

Ich selber habe zweimal an Treffen der DHAG teilgenommen. Es hat mich tief beeindruckt, zu sehen, wie viel Energie und welchen Lebensmut Menschen aufbringen können, obwohl sie an einer so schweren Erkrankung leiden. Ich war berührt, dass ich als Außenstehende so herzlich in die Gruppe aufgenommen wurde. Die Menschen interessierten sich für mich und waren dankbar, weil ich mich für die Erforschung ihrer Erkrankung einsetze. Erst durch diese persönlichen Begegnungen wurde mir bewusst, weshalb und wofür meine Forschungstätigkeit wichtig ist. Ich wünsche mir sehr, dass meine Arbeit dazu beitragen möge, das Schicksal der Betroffenen in Zukunft erleichtern zu können.

Viele dieser Menschen sind bereit, sich selber und ihre Familien genetisch untersuchen zu lassen. Grundsätzlich werden genetische Untersuchungen heute nach dem am 1. Februar 2010 in Kraft getretenen Gendiagnostikgesetz (GenDG) geregelt. Ziel des Gendiagnostikgesetzes ist es, die mit der Untersuchung menschlicher genetischer Eigenschaften verbundenen möglichen Gefahren und genetische Diskriminierung zu verhindern und gleichzeitig die Chancen des Einsatzes genetischer Untersuchungen für den Einzelnen zu wahren. Zu den Grundprinzipien des Gesetzes zählt das Recht des Einzelnen auf informationelle Selbstbestimmung, d.h. sowohl das Recht zu haben, die eigenen genetischen Befunde zu kennen (Recht auf Wissen) als auch das Recht, diese nicht kennen zu wollen (Recht auf Nichtwissen).

Zu Beginn meiner Arbeit im Oktober 2006 standen fünf Publikationen zum Thema der Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 (AOA2) zu Verfügung. Erst im Jahr 2004 wurde die AOA2 mit Mutationen im *SETX*-Gen in Verbindung gebracht. Mittlerweile sind mehr als 18 Arbeiten über die AOA2 veröffentlicht. Im Rahmen meiner eigenen Arbeit sind zwei Publikationen entstanden, die einen Beitrag zu dem Wissen über die AOA2 leisten. Des Weiteren bin ich an fünf Arbeiten über genetisch bedingte Ataxien beteiligt. Die Möglichkeit hierfür hat mir das Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck gegeben.

Der Slogan des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein lautet „Wissen schafft Gesundheit“. Dies verdeutlicht den Zusammenhang von Forschung und Lehre mit daraus

folgender Anwendung im medizinischen Bereich. Im Allgemeinen umfasst der Weg der Forschung das Schaffen einer Grundlage zum Erhalt von wissenschaftlichen Daten wie z.B. dem Etablieren diagnostischer Methoden und den Aufbau von Wissen, also die Interpretation der gewonnenen Daten. Im Idealfall folgt hieraus ein Nutzen für den Erhalt oder die Wiedererlangung der Gesundheit.

Die AOA2 gehört zu den autosomal-rezessiv vererbten Bewegungsstörungen. Eine der Schwierigkeiten bei der genetischen Analyse autosomal-rezessiv vererbter Erkrankungen ist es, dass es innerhalb einzelner Familien nur einen oder wenige Betroffene gibt, da die Familien in unserem Land heutzutage eher klein sind. Somit ist oft nicht leicht zu erkennen, dass es sich bei den auffallenden Störungen um eine genetische Erkrankung handelt.

Ziel meiner Arbeit ist es, durch molekulargenetische Untersuchungsmethoden einen Beitrag zur Diagnostik der AOA2 zu leisten, neue Mutationen zu identifizieren und die erhaltenen Daten zu interpretieren.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1 Abstract	1
1.2 Zusammenfassung	2
2. Einleitung	3
2.1 Ataxien	3
2.2 Rezessive Ataxien	3
2.3 Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 (AOA2)	4
2.4 Senataxin	5
2.5 Zielsetzungen der Arbeit	6
3. Material und Methoden	7
3.1 Materialien	7
3.1.1 Chemikalien	7
3.1.2 Stammlösungen und Puffer	8
3.1.3 Kits	8
3.1.4 Enzyme	9
3.1.5 Nukleinsäuren und Marker	9
3.1.6 Bakterienstamm	9
3.1.7 Synthetische Oligonukleotide	9
3.1.8 DNA-Proben	12
3.1.9 Software-Programme	12
3.2 Methoden	14
3.2.1 Probenauswahl	14
3.2.2 Sequenzanalyse	14
3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
3.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	16
3.2.2.3 DNA-Sequenzierung	16
3.2.3 Quantitative Analysen und Bruchpunktbestimmung	17
3.2.3.1 Real-Time-PCR mit SYBR-Green	17
3.2.3.2 MLPA	18
3.2.3.3 Bruchpunktbestimmung	18
3.2.4 RNA-Analysen	19
3.2.4.1 RNA-Extraktion und Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	19

3.2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung	19
3.2.4.3 Klonierung der RT-PCR-Produkte	20
3.2.5 Kopplungsanalyse	21
4. Ergebnisse	23
4.1 Mutationssuche	23
4.2 Mutationen im <i>SETX</i> -Gen	24
4.2.1 Patienten mit zwei Veränderungen im <i>SETX</i> -Gen	24
4.2.2 Patienten mit einer Veränderung im <i>SETX</i> -Gen	38
4.2.3 Kontrollproben	39
4.3 Haplotyp-Analyse	41
5. Diskussion	44
5.1 Mittels Sequenzierung identifizierte Mutationen und Polymorphismen	46
5.2 Umfangreiche Genveränderungen im <i>SETX</i> -Gen	50
5.3 Identische Mutationen in nicht verwandten Patienten	58
5.4 Klinische Daten	60
5.5 Heterozygote Missense-Veränderungen	64
5.6 Häufigkeit der AOA2	67
5.7 Ausblick	68
6. Literaturverzeichnis	70
7. Anhang	77
7.1 Bekannte Mutationen im <i>SETX</i> -Gen	77
7.2 Aminosäure-Code	79
7.3. Abkürzungen	80
8. Danksagung	81
9. Lebenslauf	82

1. Zusammenfassung

1.1 Abstract

The recessively inherited ataxia-oculomotor apraxia type 2 (AOA2) is a neurodegenerative disorder characterised by onset at juvenile to adolescent age, gait ataxia, cerebellar atrophy, axonal sensorimotor neuropathy, oculomotor apraxia, and elevated serum AFP level. AOA2 is caused by mutations within the senataxin gene (*SETX*) located on chromosome 9q34. The *SETX* gene encodes a large 2677 amino acid protein, named senataxin. The protein senataxin is the ortholog of the yeast RNA helicase Sen1p and contains a DNA/RNA helicase domain at its C terminus and a putative protein interaction domain at its N terminus. Senataxin is predicted to play a role in transcription and RNA processing. Although senataxin possesses a putative DNA/RNA helicase domain, no activity has yet been ascribed to the protein.

Mutation analyses in patients showing a clinical phenotype consistent with AOA2 revealed homozygous or compound heterozygous mutations in the *SETX* gene for 12 of 79 patients (~15%). A wide spectrum of different mutations could be detected: a nonsense mutation, ten missense mutations, a splice site mutation, a 2 bp-deletion, two 4 bp-deletions, and four gross gene rearrangements. Four of 19 mutations detected in the *SETX* gene are gross gene rearrangements. The *SETX* gene harbours a high content of transposable elements (TE) concerning the average of the human genome and therefore seems to be predisposed to recombinogenic events. Three gross deletions were detected, which are predicted to arise from TE-mediated homologous or non-homologous recombination. Furthermore, a ~1.3 kb-deletion generated by L1-endonuclease-dependent retrotransposition was identified. This kind of mutation has not yet been described in AOA2 patients.

Additionally, eight patients showed a heterozygous missense exchange, whereas in the samples of the other 59 patients no sequence variation could be detected in the *SETX* gene. The AOA2 seems to be the most frequent form of known recessive ataxias after Friedreich's ataxia.

1.2 Zusammenfassung

Die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 (AOA2) ist eine neurodegenerative Erkrankung. AOA2 wird autosomal-rezessiv vererbt und tritt in der Regel in einem Alter zwischen dem 10. und 25. Lebensjahr auf. Die Erkrankung beginnt mit einer Gang-Ataxie gefolgt von peripherer Neuropathie und in einigen Fällen okulomotorischer Apraxie. Zudem ist bei AOA2-Patienten ein erhöhter α -Fetoproteinspiegel im Serum nachweisbar. AOA2 wird durch Mutationen im *Senataxin* Gen (*SETX*) verursacht, das auf Chromosom 9q34 lokalisiert ist. Das *SETX*-Gen kodiert für das Senataxin, ein 2677 Aminosäure großes Protein, das Homologien zum Hefeprotein Sen1p aufweist. C-terminal besitzt das Senataxin eine postulierte DNA/RNA-Helikasedomäne. Mittlerweile wurde eine Reihe von Funktionen des Senataxins bei der Transkription und in der DNA-Reparatur beschrieben. Es wurde bisher jedoch keine Helikaseaktivität des Senataxins nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurde bei einem Kollektiv aus 79 Patienten mit klinischem Verdacht auf AOA2 eine Mutationsanalyse durchgeführt.

Für 12 Patienten (~15%) konnte die klinische Diagnose der AOA2 molekulargenetisch bestätigt werden. Hierbei konnte ein breites Mutationsspektrum identifiziert werden. Neben einer Nonsense-Mutation wurden zehn Missense-Mutationen, eine Spleißmutation, eine 2 bp-Deletion, zwei 4 bp-Deletionen sowie vier umfangreiche Genveränderungen detektiert. Von besonderem Interesse sind hier die umfangreichen Genveränderungen. Das *SETX*-Gen besitzt einen hohen Anteil an transponierbaren Elementen (47,5%) und scheint dadurch bevorzugt von Rekombinationsereignissen betroffen zu sein. So konnten drei umfangreiche Deletionen identifiziert werden, die wahrscheinlich durch homologe und nicht-homologe Rekombination zwischen transponierbaren Elementen entstanden sind. Eine ganz neue Mutationsart, die so zuvor noch nicht für die AOA2 beschrieben wurde, stellt die ~1,3 kb-Insertion dar. Diese Insertion ist voraussichtlich durch L1-Endonuklease abhängige Retrotransposition nach dem Mechanismus des „Twin primings“ entstanden.

Für acht weitere Patienten konnte lediglich eine heterozygote Sequenzveränderung nachgewiesen werden, während 59 der 79 Patienten keine Veränderung im *SETX*-Gen aufwiesen.

Die AOA2 scheint in der deutschen Population die zweithäufigste Form der bekannten autosomal-rezessiven Ataxien nach der Friedreich-Ataxie darzustellen.

2. Einleitung

2.1 Ataxien

Die Ataxien stellen eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen dar, die als Leitsymptom eine cerebelläre Bewegungsstörung aufweisen. Den meisten dieser Bewegungsstörungen liegt ein fortschreitender Untergang von Nervenzellen im Kleinhirn und im Rückenmark zugrunde. Es gibt eine Vielzahl von Ataxie-Erkrankungen, die anhand der Symptome oft nicht auseinander zu halten sind. Mutationen in völlig verschiedenen Genen können zu ähnlichen Krankheitsbildern führen. Die Einteilung der Ataxie-Erkrankungen erfolgt in erster Linie danach, ob sie genetisch oder nicht genetisch bedingt sind. Die genetisch bedingten Ataxie-Erkrankungen (Heredo-Ataxien) lassen sich nach der Art ihrer Vererbung in Ataxien mit einem autosomal-dominanten, einem autosomal-rezessivem, X-chromosomalen oder mitochondrialen Erbgang einteilen. Den größten Anteil an den Heredo-Ataxien stellen die autosomal-dominant und die autosomal-rezessiv vererbten Formen dar.

2.2 Rezessive Ataxien

Die autosomal-rezessiven cerebellären Ataxien (ARCA) sind eine heterogene Gruppe neurologischer Erkrankungen, die durch die Degeneration oder die abnormale Entwicklung von Cerebellum und Rückenmark charakterisiert werden und in der Regel vor dem 20. Lebensjahr auftreten ⁽¹⁾. In Familien, in denen beide Eltern heterozygot für eine Mutation in einem „Ataxie-Gen“ sind, beträgt das Erkrankungsrisiko für jedes Kind 25%. Bislang sind mehr als 20 verschiedenen Formen der ARCA bekannt. Zu den häufigsten Vertretern dieser Gruppe zählen die Friedreich-Ataxie (FRDA; 2-4:100.000; OMIM #229300) und die Ataxia Teleangiectatica (AT; 1-2,5:100.000; OMIM #208900). Die Friedreich-Ataxie wird in 96% der Patienten durch eine homozygote GAA-Repeatexpansion im Intron 1 des *FXN*-Gens verursacht ⁽²⁾. Die Ataxia Teleangiectatica wird mit Mutationen im *ATM*-Gen assoziiert ⁽³⁾. Weitere Formen der rezessiven Ataxien sind die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 1 (AOA1; OMIM #208920), die durch Mutationen im *APTX*-Gen verursacht wird ⁽⁴⁾, und die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 (AOA2; OMIM #606002). Die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 wird in dieser Arbeit genauer behandelt.

2.3 Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 (AOA2)

Die autosomal-rezessiv vererbte Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 (AOA2; ataxia with oculomotor apraxia type 2) beginnt in der Regel zwischen dem 10. und 22. Lebensjahr. Primär wird die Erkrankung durch eine cerebelläre Ataxie charakterisiert, die bei nahezu allen Patienten (93%) von einer sensomotorischen Neuropathie und in einigen Fällen von der namensgebenden okulomotorischen Apraxie (47%) begleitet wird^(5, 6). Übereinstimmend mit der cerebellären Ataxie weisen AOA2-Patienten eine cerebelläre Atrophie im MRT auf. Eine postmortale Studie zeigte einen Verlust an Purkinjezellen im Cortex des Kleinhirns⁽⁷⁾. Bei etwa 86% der Patienten ist ein erhöhter α -Fetoproteinspiegel im Serum nachweisbar. Des Weiteren wurden gelegentlich erhöhte Serumkonzentrationen an Creatinkinase, Cholesterin und Immunglobulinen beobachtet, während die Albuminkonzentration im Serum im Normalbereich liegt. Überdies können weitere Symptome auftreten, die scheinbar sehr variabel sind, wie z.B. Strabismus, pyramidale Zeichen und choreatische und dystonische Bewegungen⁽⁵⁻¹⁰⁾.

Die AOA2 wird mit Mutationen im *Senataxin*-Gen (*SETX*; GenBank Accession-Nummer: NM_015046; OMIM *608465) assoziiert, das auf Chromosom 9q34 lokalisiert ist⁽⁵⁾. Das *SETX*-Gen besteht aus 26 Exons, wobei Exon 3 bis 26 kodierend sind (Abb.1, S. 5). Für das *SETX*-Gen sind zwei Transkripte mit einer Größe von 9 bzw. 11,5 kb bekannt, die in zahlreichen Geweben exprimiert werden^(5, 11). Dieses Gen ist sehr polymorph. Derzeit sind mindestens 39 Einzelnukleotid-Austausche im *SETX*-Gens bekannt, von denen 29 sogar eine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge haben, aber nach derzeitigem Kenntnisstand nicht krankheitsverursachend sind (NCBI dsSNP Build 130). Zusätzlich wurden bisher mindestens 66 Mutationen im *SETX*-Gen publiziert, die die AOA2 verursachen^(5, 7-10, 12-22). Bei der Mehrzahl dieser Mutationen handelt es sich um Missense-Mutationen, Nonsense-Mutationen, kleinere Deletionen und Insertionen, die zu einem Leserasterverschub führen, sowie Spleißmutationen. In seltenen Fällen wurden auch größere Genveränderungen wie Deletionen mehrerer Exons^(7, 9, 10) und eine ~10 kb-Duplikation⁽¹⁶⁾ beschrieben. Einige dieser Mutationen wurden in homozygoter Form nachgewiesen, während andere Mutationen in compound heterozygoter Form auftreten. Neben der AOA2 wird auch die autosomal-dominant vererbte amyotrophe Lateralsklerose mit juvenilem Beginn (ALS4; OMIM #602433) durch Mutationen im *SETX*-Gen verursacht⁽¹¹⁾. Das klinische Bild der ALS4 unterscheidet sich jedoch stark von dem der AOA2. Die ALS4 ist durch eine langsam fortschreitende Motoneuropathie gekennzeichnet,

deren erste Symptome vor dem 25. Lebensjahr auftreten. Hauptmerkmale dieser Erkrankung sind eine distale Muskelschwäche und -atrophie mit pyramidalen Zeichen. Bislang wurden vier Missense-Mutationen (p.T3I, p.L389S, p.R2136H⁽¹¹⁾ und p.T1118I⁽²³⁾) beschrieben, die mit der ALS4 assoziiert sind. Keine dieser Missense-Mutationen konnte bisher mit der AOA2 in Verbindung gebracht werden.

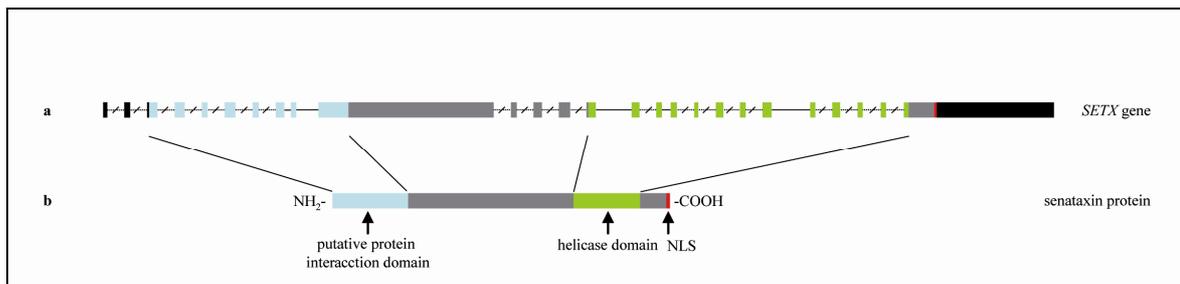


Abb. 1: (a) Schematische Darstellung des *SETX*-Gens. Exons (Kästchen) und kleinere Introns (Linien) sind maßstabsgetreu abgebildet. Introns mit einer Größe von > 1 kb sind als unterbrochene Linien gezeigt. Der nicht kodierende Bereich ist schwarz dargestellt. (b) Schematische Darstellung des Senataxins. Die mutmaßliche Proteininteraktionsdomäne ist hellblau abgebildet. Der grüne Bereich stellt die Helikasedomäne dar und die Kernlokalisations-Sequenz (NLS) ist rot dargestellt. (modifiziert nach Bernard *et al.* 2009)

2.4 Senataxin

Das *SETX*-Gen kodiert für ein 302.8-kD Protein, das Senataxin⁽¹¹⁾. Senataxin besitzt eine Länge von 2677 Aminosäuren. Die Bezeichnung Senataxin wurde für das Protein aufgrund der Homologie zum Hefeprotein Sen1p gewählt⁽⁵⁾. Das Sen1p-Protein spielt eine Rolle beim Spleißen und der Termination von tRNA, snRNA und snoRNA und weist eine RNA-Helikaseaktivität auf, die von dem C-terminalen Teil des Proteins kodiert wird⁽²⁴⁾. Das Senataxin ist vermutlich eine DNA/RNA-Helikase, da es C-terminal Homologie zu einer DNA/RNA-Helikasedomäne aufweist (Aminosäureposition 1931 – 2456, Abb. 1, S. 5)^(5, 25). Der N-terminale Bereich des Senataxins (Aminosäureposition 1 – 600) ist wahrscheinlich für die Protein-Interaktion verantwortlich. Die C-terminalen Bereiche des Hefeproteins und des Senataxins weisen eine klassische 7-Motiv-Domäne auf, die für alle Helikasen der Superfamilie 1 (DExxQ-box Familie) beschrieben ist⁽²⁶⁾. Beide Proteine zeigen eine signifikante Ähnlichkeit zu RENT1/Upf1 und IGHMBP2, die ebenfalls zur Superfamilie 1 der Helikasen gehören⁽⁵⁾. Das Protein RENT1/Upf1 ist in den „nonsense-mediated mRNA decay“ (NMD) involviert⁽²⁷⁾, während Mutationen im IGHMBP2-Protein zu einer Form der spinalen Muskelatrophie führen⁽²⁸⁾. Senataxin ist im Zellkern lokalisiert

und in die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress involviert ⁽²⁹⁾. AOA2-Zellen haben scheinbar einen Defekt bei der DNA-Reparatur, da sie sensitiv auf oxidierende Reagenzien reagieren ⁽²⁹⁾. Sie zeigen jedoch keine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung ⁽³⁰⁾. Steinmetz *et al.* 2006 zeigten, dass ein Aminosäureaustausch im Sen1p-Protein die genomweite Verteilung der RNA-Polymerase II verändert, was darauf hinweist, dass das Hefeprotein bei der Transkription eine Rolle spielt ⁽³¹⁾. Im Jahr 2009 identifizierten Suraweera *et al.* Proteine, die mit dem Senataxin interagieren. Diese Proteine einschließlich der RNA-Polymerase II sind in Mechanismen wie Transkription und RNA-Prozessierung involviert. Weitere funktionelle Analysen zeigten, dass das Senataxin ähnlich wie das Hefeprotein Sen1p eine wichtige Rolle bei verschiedenen Regulationsmechanismen der Transkription spielt ⁽³²⁾. Das Senataxin scheint also neben der Rolle bei der DNA-Reparatur eine vielseitige Funktion in der Genexpression zu besitzen. Obwohl das Senataxin eine postulierte Helikasedomäne besitzt, wurde eine solche Aktivität bisher nicht nachgewiesen.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Mutationen im *SETX*-Gen zu identifizieren, die die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 verursachen.

Für 79 DNA-Proben von Patienten mit klinischem Verdacht auf AOA2 werden die kodierenden Exons und flankierende Intronsequenzen des *SETX*-Gens sequenziert. Bei Vorliegen einer heterozygoten Veränderung oder dem Hinweis auf umfangreiche Genveränderungen werden zusätzlich quantitative Analysen durchgeführt und die nicht kodierenden Exons 1 und 2, sowie ~500 Basen des 5'-UTR-Bereiches sequenziert. Weiter ist geplant den Effekt umfangreicher Genveränderungen anhand von RNA-Analysen zu überprüfen.

Detektierte Sequenzveränderungen sollen dann charakterisiert und bezüglich ihrer Pathogenität beurteilt werden. Hierfür sollen Familienanalysen, Haplotyp-Analysen sowie Untersuchungen von Kontrollproben zur Einschätzung der Frequenz der Veränderungen durchgeführt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

	Hersteller:
10x Taq-Puffer mit MgCl ₂	Qbiogene
Agar	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Roth
Bacto Yeast Extract	BD Bacto
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
EDTA	Merck
Essigsäure (100%)	Merck
Ethanol (100%)	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ficoll 400	Pharmacia Biotech
Formaldehydlösung (37%)	Sigma-Aldrich
Glycerin	Calbiochem
HPLC-Wasser	Merck
HiDi-Formamid	Applied Biosystems
Illustra Sephadex G-50	GE Healthcare
Kaliumacetat	Merck
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Merck
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	MP Biomedicals
Tryptone Peptone	BD Bacto
Rotiphorese Gel 30	Roth
Salpetersäure (65%)	Merck
Silbernitrat	Caelo

Standard-Agarose	Starlab
XGal	Fermentas
Xylencyanol	Serva

3.1.2 Stammlösungen und Puffer

Tabelle 1: Puffer für die Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3xFicoll-Ladepuffer	150 µM Bromphenolblau; 190 µM Xylencyanol; 7,5 µM (w/v) Ficoll 400
5xTBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,3)	12,6 mM EDTA; 445 mM Tris; 445 mM Borsäure
10x-Glycerin-Ladepuffer + EDTA	0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % Xylencyanol; 25% Glycerin; 0,01M EDTA

Tabelle 2: Stammlösungen für die Bakterienkultur

Stammlösungen	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Tryptone Peptone; 5 g/l Bacto Yeast Extract; 10 g/l NaCl
LB/Amp/XGal-Agarplatten	10 g/l Tryptone Peptone; 5 g/l Bacto Yeast Extract; 10 g/l NaCl; 8 g/l Agar; Ampicillin (Endkonzentration: 0,1 mg/ml); XGal (Endkonzentration: 0,08 mg/ml);

Tabelle 3: Puffer für die Plasmidpräparation (Mini-Präparation)

Puffer	Zusammensetzung
Puffer 1	10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl; 100 µg/ml RNase A
Puffer 2	0,2 M NaOH; 1% SDS
Puffer 3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5 (einstellen mit Essigsäure)

3.1.3 Kits

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Expand High Fidelity PCR System	Roche
GC-RICH PCR System	Roche
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
PAXgene Blood RNA-Kit	PreAnalytiX
pGEM T Easy Vektor System I	Promega
Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorf
SALSA MLPA KIT P316-B1	MRC-Holland
SYBR-Green I core reagent Kit	Applied Biosystems

3.1.4 Enzyme

<i>EcoRI</i>	New England Biolab
ExoSAP IT	USB
RNase A	Fermentas
Taq DNA Polymerase (5U/ μ l)	Qbiogene

3.1.5 Nukleinsäuren und Marker

100 bp-Längenstandard	Invitrogen
dNTPs Mix	Qbiogene
GENESCAN 400 HD [ROX] Size Standard	Applied Biosystems
Hyperladder I	BIOLINE
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen
pBR322 DNA-MspI Digest	BioLabs

3.1.6 Bakterienstamm

<i>E. coli</i> DH5 α	Clontech
-----------------------------	----------

3.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Alle synthetischen Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind von der Firma Biomers.net synthetisiert worden.

Tabelle 4 a: Primersequenzen für PCR und Sequenzierung des *SETX*-Gens (5'-UTR, Exon 1 bis 4)

Exon	Produktlänge [bp]	Primerbezeichnung	Primersequenz
5'-UTR	486 bp	SETX-E1-F	5' gcgagggtattactctgctgtgttg 3'
		SETX-E1-RM	5' ggccgctgctttctggttttggtg 3'
5'-UTR und 1	592 bp	SETX-E1-FM	5' gggccgaggtcaaggttccgcgg 3'
		SETX-E1-R	5' gcagtgtagacaacggaaggacagg 3'
2	430 bp	SETX-E2-F	5' ccacagccaagttgtctaac 3'
		SETX-E2-R	5' caaccagtgtgcaagctcttc 3'
3	328 bp	SETX1_E3-F	5' tcttgacacacagtaggtctg 3'
		SETX1_E3-R	5' ctgaatactccaacggagtt c 3'
4	365 bp	SETX1_E4-F	5' ggaaaaggcttctaggtcg 3'
		SETX1_E4-R	5' taagcctaaattctatggtac 3'

Tabelle 4 b: Primersequenzen für PCR und Sequenzierung des *SETX*-Gens (Exon 5 bis 21)

Exon	Produktlänge [bp]	Primerbezeichnung	Primersequenz
5	254 bp	SETX1_E5-F	5' gcccaaggagcctaatttagg 3'
		SETX1_E5-R	5' ccgctattatagctatctataggtac 3'
6	305 bp	SETX1_E6-F	5' ctgtgtcttctgctgtttgtagac3'
		SETX1_Ex6-R	5' agttaggaataataactcac 3'
7	270 bp	SETX1_E7-F	5' gcaactaaaccaggcattagtagatag 3'
		SETX1_E7-R	5' caattctgcagtgcactatc 3'
7	270 bp	SETX1_E7-F	5' gcaactaaaccaggcattagtagatag 3'
		SETX1_E7-R	5' caattctgcagtgcactatc 3'
8	335 bp	SETX1_E8-F	5' gttgggttgctactaccaga3'
		SETX1_E8-R	5' gctggaacacacttctatagag3'
9	203 bp	SETX1_E9-F	5' cccctcgtttcagtaatt 3'
		SETX1_E9-R	5' attatacaaaatagtctacac 3'
10-1	508 bp	SETX1_E10AF	5' gaacctgcatagtggtgct 3'
		SETX1_E10BR	5' cattgctgttcctttggagca 3'
10-2	739 bp	SETX1_E10CF	5' tgtgccaagcttctaccact 3'
		SETX1_E10DR	5' tgtcacatcccctttctggac 3'
10-3	842 bp	SETX1_E10EF	5' gtacaaggaagcagaagtctg 3'
		SETX1_E10FR	5' ttgcagctgcgatgagttct 3'
10-4	787 bp	SETX1_E10GF	5' cgttcccatccgattcacct 3'
		SETX1_E10HR (RH)	5' tggactttctgatgggttct 3'
10-5	756 bp	SETX1_E10IF (FI)	5' tcagagagccactacggtttc 3'
		SETX1_E10JR (RJ)	5' agggcttctgaagtggagac 3'
10-6	708 bp	SETX1_E10KF (FK)	5' tgggtctccagcaactgatga 3'
		SETX1_E10LR (RL)	5' cggagactgaggatgaagaac 3'
10-7	459 bp	SETX1_E10MF2	5' agtcaaaggggatacagtcga 3'
		SETX1_E10MR2	5' ctacagcaaggtaaagaggtaac 3'
11	269 bp	SETX1_E11-F	5' ctagcttctgattttactgttgc 3'
		SETX1_E11-R	5' tctctcttaattagaaatctcc 3'
12	354bp	SETX1_E12-F	5' gcagagctcttagtctgtg 3'
		SETX1_E12-R	5' gattattagatgagactgtatctg 3'
13	360 bp	SETX1_E13-F	5' gacctttacaactaggcagca 3'
		SETX1_E13-R	5' aaaatatgatgctttaacatc 3'
14	409 bp	SETX1_E14-F	5' ccttgcttctgtctgaccataac 3'
		SETX1_E14-R	5' caaagaggaaatggcatgt 3'
15	326 bp	SETX1_E15-F	5' ctatgtaatagagctcaccc 3'
		SETX1_E15-R	5' aagctattaccaggactggcc 3'
16	256 bp	SETX1_E16-F	5' caggattgatcagcagtgctcc 3'
		SETX1_E16-R	5' cagactaattctggaggcttc 3'
17	226 bp	SETX1_E17-F	5' gtatatgtgtgagttttag 3'
		SETX1_E17-R	5' actagttcgtatacctgag 3'
18	225 bp	SETX1_E18-F	5' ttagaggtagtcattggaaggc 3'
		SETX1_E18-R	5' gcttctctgaacagtcactact 3'
19	304 bp	SETX1_E19-F	5' gtaaacataggcctgcatag 3'
		SETX1_E19-R	5' cctcaacatttcagcagccac 3'
20	309 bp	SETX1_E20-F	5' gatatttgggtgcaggagaagtg 3'
		SETX1_E20-R	5' gaaagatgtctctcctcctg 3'
21	393 bp	SETX1_E21-F	5' cttatgctacctgaacgttgc 3'
		SETX1_E21-R	5' gacaagacctaagacgacag 3'

Tabelle 4 c: Primersequenzen für PCR und Sequenzierung des *SETX*-Gens (Exon 22 bis 26)

Exon	Produktlänge [bp]	Primerbezeichnung	Primersequenz
22	318 bp	SETX1_E22-F	5' gccacatcaccacacagaa 3'
		SETX1_E22-R	5' gtgaacatgactgtgcctg 3'
23	379 bp	SETX1_E23-F	5' cctatctgcctgcctttac 3'
		SETX1_E23-R	5' gcacagaccactcettaagag 3'
24	313 bp	SETX1_E24-F	5' cgacagagtgagactccgt 3'
		SETX1_E24-R	5' gcaaatgggttctctaactgt 3'
25	329 bp	SETX1_E25-F	5' gtccaccttctctcacatgg 3'
		SETX1_E25-R	5' aggcgaatgggtcacgtgtac 3'
26	957 bp	SETX1_E26-F	5' ctatgctccaagcagtgtc 3'
		SETX1_E26-R	5' gag gctcaggtgtaaggatg 3'

Tabelle 5: Zusätzliche Primersequenzen für die Sequenzierung von großen PCR-Produkten

Exon	Primer	Primersequenz
10-1	SETX1_E10BF	5' gacatgcgtgttcataacagca 3'
10-1	SETX1_E10AR	5' agatccatgagggactggac 3'
10-2	SETX1_E10DF	5' caaagcacctccatgtaact 3'
10-2	SETX1_E10CR	5' ctagacgtcttccccattgt 3'
10-3	SETX1_E10ER	5' catccagaacaccactagggt 3'
10-3	SETX1_E10FF	5' gatacaggagttcagaaaggagat 3'
10-4	SETX1_E10HF	5' tggcaagatcatccagacgat 3'
10-4	SETX1_E10GR	5' gtacaacctgaccattgtag 3'
10-5	SETX1_E10IR	5' ttgggtctgatctgcctttgc 3'
10-5	SETX1_E610JF	5' ctctcagaacctgtctgtca 3'
10-6	SETX1_E10LF	5' attctgtaagtgcgcctcagt 3'
10-6	SETX1_E10KR	5' gctgcttctcactcagagtgt 3'
13	SETX1_Ex13-R	5' ctctcagatgttagtca 3'
18	SETX1_Ex18-R	5' gctacaggtgaactacttacc 3'
26	SETX-ex26c-r1	5' gtcagagggtgtgtgtatag 3'
26	SETX-ex26c-f2	5' gtgatgacccggaagaggag 3'

Tabelle 6: Primersequenzen für die RT-PCR

Patient	Mutation	Primersequenz	Position
P7	c.6847_6850delACAG	5'- gccattctacagctcactg -3'	Exon 21
		5'- gctgaaatggccaatctgatg -3'	Exon 22
P8	c.5401_5402ins1280bp	5'- cacaagaatggctcaactctc -3'	Exon 11
		5'- actaccaacagagacatggc -3'	Exon 13
P9	c.5374+9369_5950-254del6107bp	5'- cacaagaatggctcaactctc -3'	Exon 11
		5'- ggctgtccaactgaacttttag -3'	Exon 16
P10 und P11	c.5274+13396_6107-3547del20729bp	5'- gtctgtctctgacaccttcg -3'	Exon 10
		5'- ggctgtccaactgaacttttag -3'	Exon 16

Tabelle 7: Primersequenzen für die Lokalisierung der Insertion und der Deletionsbruchpunkte

Patient	Mutation	Primersequenz	Position	Produkt
P8	c.5401_5402ins1280bp	5'- gcagagtccttagtgctgtg -3'	Intron 11	1634 bp (Wildtyp 354 bp)
		5'- gattattagatgagactgtatctg -3'	Intron 12	
P9	c.5374+9369_5950- 254del6107bp	5'- gagtgcgaatggcgcaatcttg -3'	Intron 11	359 bp
		5'- gcatctacatctaactg -3'	Intron 14	
P10, P11	c.5274+13396_6107- 3547del20729bp	5'- gtatagccatcaccacaaccag-3'	Intron 10	586 bp
		5'- gagcttgctaatgccacaag -3'	Intron 15	

Tabelle 8: Primersequenzen für die Kopplungsmarker

Marker	Primersequenz
D9S159	5'- cacgacgttgtaaaacgaccttctgacggcagccaggt -3' 5'- agctggaatgagtgtgggc -3'
D9S1831	5'- cacgacgttgtaaaacgaccagtgaatcgaggtcgc -3' 5'- ccagtgttaaagtcagccg -3'
D9S1863	5'- cacgacgttgtaaaacgacttgggcccaccataaaata -3' 5'- cttagagaccaggcaattctt -3'
D9S1847	5'- cacgacgttgtaaaacgactacagcggcagatttgg -3' 5'- ggcaggagccgtgtg-3'
D9S1830	5'- cacgacgttgtaaaacgaccagagtggggactcaa -3' 5'- agctgcagactgccttc-3'
D9S1793	5'- cacgacgttgtaaaacgacgggtggaaccaggactaac-3' 5'- cagagcgagtgtaatccg-3'

3.1.8 DNA-Proben

Für diese Arbeiten standen aus Vollblut (EDTA) extrahierte, genomische DNA-Proben (50 ng/μl) aus dem Patientenkollektiv des Instituts für Humangenetik der Universität zu Lübeck und 100 genomische DNA-Proben von Kontrollpersonen zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere DNA-Proben von Familienangehörigen der Patienten gesammelt.

3.1.9 Software-Programme

BLASTN

ClustralW2

Hersteller:

NCBI-Homepage

EBI

Cyrillic.210	Cyrillic Software
PolyPhen-2	EMBL
RepeatMasker version open-3.2.7	Systems Biology
REST-version2	M.W. Pfaffl
SEQUENCE Pilot module MLPA v3.3	JSI medical systems
Sequencing Analysis 5.2	Applied Biosystems
SeqScape v2.5	Applied Biosystems
Seqworks	Sven Opitz

3.2 Methoden

3.2.1 Probenauswahl

Für diese Arbeit standen 79 in unserem Institut extrahierte DNA-Proben von nicht verwandten Ataxie-Patienten zur Verfügung. Bei diesen Patienten wurden Mutationen im *FXN*-Gen, die mit der Friedreich-Ataxie assoziiert sind, bereits ausgeschlossen. Aufgrund der früh beginnenden Symptomatik bei der AOA2 wurden Patienten mit einem Erkrankungsalter unter 30 Jahren ausgewählt. Bei einigen Patienten war ein weiteres Einschlusskriterium neben dem Verdacht auf einen rezessiven Erbgang in der Familie ein erhöhter α -Fetoproteinspiegel im Serum der Patienten.

3.2.2 Sequenzanalyse

3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; „polymerase chain reaction“) ist eine effektive Methode, spezifische DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Für diese Methode werden dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), eine hitzebeständige Polymerase, zwei Primer und DNA als Template benötigt. Primer sind kurze Oligonukleotide, die der zu amplifizierenden DNA-Sequenz an beiden 3'-Enden komplementär sind. Im ersten Schritt der PCR, der Denaturierung, wird der zu amplifizierende Doppelstrang bei einer Temperatur von ca. 94°C in seine Einzelstränge aufgeschmolzen, damit sich im zweiten Schritt, dem Annealing, die Primer an die Einzelstränge anlagern können. Die optimale Annealing-Temperatur der Primer hängt von der Basenzusammensetzung AT:GC ab und liegt meist in einem Temperaturbereich von 54 bis 65°C. Im dritten Schritt, der Extension, wird bei einer Temperatur von 72°C die Taq DNA-Polymerase aktiv und synthetisiert einen zweiten Strang, der komplementär zum Template ist. Diese drei Schritte werden zyklisch wiederholt, wobei in jedem Zyklus die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt wird.

Die Amplifikation der Exons 2 bis 26 des *SETX*-Gens wurde mit Hilfe der Standard Taq DNA-Polymerase der Firma Qiogene durchgeführt. Die verwendeten Reaktionsgemische enthielten in einem Volumen von 25 μ l 50 ng genomische DNA, 0,5 bzw. 0,25 U Taq DNA-Polymerase, 10% (v/v) Taq-Puffer, jeweils 5 nmol der Nukleotide sowie 10 pmol bzw. 5 pmol von jedem der beiden Primer (Tabelle 4 a, b und c, S. 9-11). Die Reaktionsansätze wurden zunächst für 5 min bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten die PCR-Zyklen mit einer Zyklenanzahl zwischen 30 und 35. Die Denaturierung im PCR-

Zyklus erfolgte bei 94°C für 30 sek. Das Annealing wurde abhängig von dem jeweiligen zu amplifizierenden Genabschnitt bei einer Temperatur zwischen 50°C und 60°C für 30 sek durchgeführt. Für den dritten Schritt des PCR-Zyklus, der Extension, wurden bei einer Temperatur von 72°C Extensionszeiten von 30 sek bzw. 60 sek verwendet. Abgeschlossen wurde die Reaktion mit einer weiteren Extensionsphase von 7 min bei 72°C.

Die Unterschiede bei der Amplifizierung der einzelnen Genabschnitte in dieser Arbeit sind als Übersicht in Tabelle 9 zusammengefasst.

Der 5'-UTR-Bereich und das Exon 1 des *SETX*-Gens wurden mit den Primern SETX-E1-F (5'-gcgagggattactctgctgtgtg-3') und SETX-E1-R (5'-gcagtgtagacaacggaaggacagg-3') in einem Fragment amplifiziert. Die PCR wurde mit dem GC-RICH PCR System gemäß der Angaben des Herstellers (Roche) durchgeführt.

Tabelle 9: PCR-Bedingungen für die Exons 2 bis 26 des *SETX*-Gens

SETX-Gen	Annealing-temperatur	Extensionszeit	Zyklusanzahl	Polymerase-Konzentration	Primer-Konzentration
Exon 2	60°C	30 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 3	55°C	30 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 4	55°C	30 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 5	60°C	60 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 6	55°C	30 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 7	60°C	60 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 8	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 9	50°C	30 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 10-1	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 10-2	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 10-3	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 10-4	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 10-5	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 10-6	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 10-7	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 11	55°C	30 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 12	55°C	30 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 13	55°C	30 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 14	55°C	30 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 15	60°C	60 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 16	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 17	55°C	30 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 18	60°C	60 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 19	60°C	60 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 20	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 21	60°C	60 sek	30	0,25 U	10 pmol
Exon 22	60°C	60 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 23	60°C	60 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 24	55°C	30 sek	35	0,25 U	5 pmol
Exon 25	60°C	60 sek	30	0,50 U	10 pmol
Exon 26	60°C	60 sek	30	0,50 U	10 pmol

3.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache Methode, DNA-Fragmente aufzutrennen. Das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese beruht darauf, Moleküle auf ein Träger-Gel aufzutragen und mit Hilfe eines elektrischen Feldes nach Form, Größe und Ladung aufzutrennen. Die DNA trägt eine negative Ladung und wandert im elektrischen Feld zur Anode. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wird ein Längenstandard mitgeführt. Die Agarosegellösung wird mit Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, mit dessen Hilfe die doppelsträngigen DNA-Fragmente markiert und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 0,8%-2%ige Standard-Agarosegele verwendet. Die Gele wurden mit einem Proben-Farbgemisch bestehend aus 4 µl PCR-Produkt und 3 µl 3xFicoll-Farbe beladen. Zusätzlich wurden 2 µl eines Markers (Low DNA Mass Ladder) zur Größen- und Konzentrationsbestimmung der jeweiligen PCR-Produkte auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für 30 min bei 110 V durchgeführt.

3.2.2.3 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung der genauen Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sequenziermethode ist die Didesoxymethode nach Sanger, welche auch als Kettenabbruch-Synthese bezeichnet wird. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass DNA-Polymerase an Einzelstrang-DNA von einem Primer aus einen neuen DNA-Strang synthetisieren kann. Diese Synthese erfolgt in Gegenwart von Nukleotidtriphosphaten, denen in niedriger Konzentration Didesoxynukleotide, d.h. Nukleotide, denen die 3'-OH-Gruppe an der Desoxyribose fehlt, beigefügt sind. Es kommt unter diesen Bedingungen zu einem Abbruch der DNA-Synthese, sobald ein Didesoxynukleotid in den neusynthetisierten Strang eingebaut wird, da aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose die DNA-Polymerase kein weiteres Nukleotid anfügen kann. Die vier verschiedenen Didesoxynukleotide sind jeweils mit einem unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Der Einbau der fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotide erfolgt zufällig, so dass eine Mischung von neusynthetisierten DNA-Strängen unterschiedlicher Länge entsteht. Die entstehenden Kettenabbruch-Produkte werden mittels Kapillar-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz

angeregt. Die Abfolge der Farbsignale, die an einem Detektor erscheinen, gibt nun die Basenabfolge des sequenzierten DNA-Abschnittes wieder.

In der vorliegenden Arbeit wurden die PCR-Produkte vor der DNA-Sequenzierung mit einem Enzymgemisch aus Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase behandelt (ExoSAP IT). Dieses Enzymgemisch dient aufgrund seiner Exonuklease- und Phosphatase-Funktion dazu, die PCR-Produkte von überschüssigen Primern- und Nukleotid-triphosphatresten zu befreien, welche die Sequenzreaktion stören würden. Der Sequenzansatz enthielt in einem Volumen von 10 µl 5-10 ng des vorbehandelten DNA-Moleküls bzw. der Plasmid-DNA, 15% (v/v) Sequenz-Puffer, 10% (v/v) Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems Inc.) und 5 pmol des jeweiligen Primers. Für besonders große PCR-Produkte wurden bei der Sequenzierung zusätzliche Primer verwendet (Tabelle 5, S. 11). Die Sequenzreaktion wurde bei 96°C für 1 min gefolgt von 25 Zyklen mit 96°C für 10 sek und 60°C für 1 min durchgeführt. Die Aufreinigung der Sequenz-Produkte erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Illustra Sephadex G-50 von GE Healthcare. Anschließend wurden die Proben mit HiDi-Formamid verdünnt und mit dem Kapillar-Sequencer ABI 3130 *xl* Genetic Analyser (Applied Biosystems Inc.) sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software SeqScape v2.5 (Applied Biosystems Inc.).

3.2.3 Quantitative Analysen und Bruchpunktbestimmung

3.2.3.1 Real-Time-PCR mit SYBR-Green

Die Real-Time-PCR beruht auf der herkömmlichen PCR-Methode und dient der Quantifizierung von Nukleinsäuren. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen wird während der PCR-Zyklen die Menge der entstandenen PCR-Produkte bestimmt.

Die Real-Time-PCR wurde in Anwesenheit von SYBR-Green (SYBR-Green I core reagent kit including Ampli-Taq-Gold polymerase; Applied Biosystems Inc.) durchgeführt. Die verwendeten Reaktionsgemische enthielten in einem Volumen von 25 µl 25 ng genomische DNA und 10 pmol von jedem der beiden Primer. Ansonsten erfolgte die PCR-Reaktion gemäß der Angaben des Herstellers, auf dem ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems Inc.). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt und entsprechen den Primern für die Sequenzanalyse des *SETX*-Gens. Die Ergebnisse der Real-Time-PCR wurden mit dem REST-version2-Programm (M.W. Pfaffl, <http://www.gene-quantification.de>) berechnet und ausgewertet.

3.2.3.2 MLPA

Die MLPA-Analyse (**M**ultiplex **L**igation-dependent **P**robe **A**mplifikation) ist eine quantitative Methode zur Detektion von Dosisunterschieden von bis zu 50 verschiedenen Nukleinsäurefragmenten in einem Reaktionsansatz.

Für die MLPA-Analyse wurde das SALSA MLPA KIT P316-B1 der Firma MRC-Holland verwendet. Dieses Kit beinhaltet einen Sondenmix für die Exons der Gene *FRX*, *SETX* und *APTX*, d.h. in einem Reaktionsansatz können Gendosisunterschiede für die drei rezessiven Ataxien, die Friedreich-Ataxie, die AOA2 und die AOA1, getestet werden.

Die Durchführung der MLPA-Analyse erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers. Im ersten Schritt fand die Hybridisierung der Sonden an die spezifische Sequenz der genomischen DNA statt. Nach der Hybridisierung wurden die Sonden ligiert und anschließend wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden nach Angaben des Herstellers mit dem Illustra Sephadex G-50-System von GE Healthcare aufgereinigt und zusammen mit dem GENESCAN 400 HD [ROX] Size Standard (Applied Biosystems Inc.) mit Hilfe des Kapillarsequenzers 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems Inc.) aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm SEQUENCE Pilot module MLPA Version 3.3 der Firma JSI medical systems GmbH (<http://www.jsi-medisys.com>) ausgewertet.

3.2.3.3 Bruchpunktbestimmung

Zur Bestimmung der Bruchpunkte wurde eine Long-range-PCR mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. Hierfür wurden Primer verwendet, die die potentiellen Deletionen flankieren. Konnte mittels Long-range-PCR kein PCR-Produkt erhalten werden, so wurden die Introns 5' und 3' der Deletionen durch Primer-Walking näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden Primerpaare entworfen, die etwa 200 bp große PCR-Produkte hervorrufen. Mit Hilfe dieser Primer erfolgte erneut eine Real-Time-PCR mit SYBR-Green und die Quantität der PCR-Produkt wurde mit dem REST version2-Programm berechnet (siehe 3.2.3.1). Lieferte die Berechnung einen Hinweis auf das Vorhandensein beider Allele, wurden neue Primerpaare generiert, die „näher“ an der Bruchstelle liegen. Letztendlich wurden die Deletionen durch eine bruchpunktüberspannende PCR mit der Standard-Polymerase (Qbiogene) auf genomischer Ebene verifiziert. Die Primersequenzen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

3.2.4 RNA-Analysen

3.2.4.1 RNA-Extraktion und Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die Isolierung der RNA aus humanem Vollblut erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers mit dem PAXgene Blood RNA-Kit der Firma PreAnalytiX.

Die RT-PCR wurde mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. Die Besonderheit des OneStep RT-PCR Kits liegt darin, dass es ein Enzymmix aus reverser Transkriptase und Polymerase enthält. Dadurch kann in einem Reaktionsansatz sowohl die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgen als auch die PCR-Reaktion stattfinden. Für die RT-PCR wurden genspezifische Primer verwendet, die in Tabelle 6 aufgeführt sind. Die PCR-Produkte wurden auf einem 0,8%igen Agarosegel neben einem 100 bp-Längenstandard aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und entsprechend der Anleitung des Herstellers mit dem Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf) aus dem Gel eluiert. Die eluierten Proben wurden dann kloniert (siehe 3.2.4.3) und nachfolgend sequenziert (siehe 3.2.2.3).

3.2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung

Das Prinzip der Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist das Gleiche wie bei der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2.2). Die beiden Elektrophoreseverfahren unterscheiden sich nur durch das verwendete Träger-Gel. Das Polyacrylamidgel hat im Gegensatz zum Agarosegel sehr kleine Poren. Dadurch lassen sich auch DNA-Moleküle trennen, die sich in der Länge nur um ein einziges Nukleotid unterscheiden.

Für dieses Experiment wurde ein 8%iges nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel genutzt.

Zum Herstellen der Gele wurden je 75 ml der Gellösung (8% PAA) wie folgt angesetzt:

20 ml Rotiphorese Gel 30

15 ml 5xTBE

26,5 µl TEMED

mit a. d. auf 75 ml auffüllen

500 µl APS

Die PCR-Proben wurden in einem Verhältnis von 3:2 mit 3xFicoll-Farbe vermischt und 5 µl der Proben-Farbgemische, sowie 2,5 µl des Markers (pBR322 DNA-MspI Digest)

wurden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 30 W für 2,5 Stunden. Nach der Gelelektrophorese wurde eine Silberfärbung der Gele durchgeführt, um die Banden auf dem Gel sichtbar zu machen. Für den Färbevorgang wurden jeweils 300 ml der einzelnen Färbelösungen auf das Gel gegeben. Im ersten Schritt wurde das Gel für 10 min mit 10%igem Ethanol und für 5 min mit 1%iger Salpetersäure fixiert und anschließend dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Dann folgte für 20 min die Färbung mit Silbernitrat (2,02 g AgNO_3 /l). Nach der Färbung wurde das Gel erneut zweimal mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden 500 ml der Reduktionslösung (29,6 g Na_2CO_3 /l) mit 300 μl Formaldehyd auf das Gel gegeben, und es wurde solange entwickelt, bis Banden auf dem Gel zu erkennen waren. Die Entwicklung des Gels wurde durch Zugabe von 10%iger Essigsäure für 3 min gestoppt.

3.2.4.3 Klonierung der RT-PCR-Produkte

Ligation

Die Ligation der RT-PCR-Produkte mit dem pGEM T Easy-Vektor erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers mit dem pGEM T Easy Vektor System I (Promega) für 1 h bei Raumtemperatur (RT).

Ligationsansatz (10 μl):

2x-Puffer	5,0 μl
pGEM Vektor	0,5 μl (25 ng)
T-Ligase	1,0 μl
RT-PCR-Produkt	3,5 μl

Transformation

Für die Transformation wurden 5 μl des Ligationsansatzes zu 50 μl kompetenten Zellen (*E. coli* Stamm DH5 α) gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. Nach einer erneuten Inkubation für 2 min auf Eis wurde 450 μl LB-Medium hinzu gegeben. Daraufhin wurde eine einstündige Inkubation im Schüttler bei 37°C (225 rpm) durchgeführt.

Abschließend wurde der Transformationsansatz zu 1/3 bzw. 2/3 auf zwei selektiven LB/Amp/XGal-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37°C.

Animpfen von Übernachtskulturen

Für die Übernachtskultur wurden 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration: 0,1 mg/ml) versetzt. Von jedem Ansatz wurden 8 Klone gepickt. Die Auswahl der positiven Klone erfolgte über die *lacZ*-vermittelte Blau-Weiß-Selektion. Die Inkubation der Zellsuspension erfolgte über Nacht im Schüttler bei 37°C (250 rpm).

Mini-Plasmidpräparation

Von der Übernachtskultur wurden 1,5 ml in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube pipettiert und für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 300 µl Puffer 1 resuspendiert und mit 300 µl Puffer 2 lysiert. Mit 300 µl Puffer 3 erfolgte dann die Fällung der SDS-Proteinkomplexe für 5 min auf Eis. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 min bei 10000 rpm (4°C) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und mit 500 µl 100%igem Ethanol vermischt. Nun erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol für 5 min bei 13000 rpm gewaschen. Abschließend wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl HPLC-Wasser gelöst. Zur Überprüfung, ob die Plasmide das richtige Konstrukt enthalten, wurde ein Restriktionsverdau mit *EcoRI* durchgeführt. Anschließend wurde der Restriktionsansatz in einem Verhältnis von 3:1 mit einem 10x-Glycerin-Ladepuffer vermischt und neben 2 µl eines Markers (Hyperladder I) auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Der pGEM T Easy-Vektor enthält auf beiden Seiten der Insertionsstelle eine Schnittstellen für *EcoRI*, so dass durch den Restriktionsverdau neben der Vektor-DNA das Fragment der richtigen Größe vorhanden sein sollte. Die Plasmide, die Fragmente der richtigen Größe aufwiesen, wurden anschließend sequenziert (3.2.2.3).

3.2.5 Kopplungsanalyse

Die Haplotyp-Analysen der AOA2 Region wurde mit den Markern D9S159, D9S1831, D9S1863, D9S1847, D9S1830 und D9S1793 durchgeführt (Primersequenzen sind in Tabelle 8 aufgeführt). Die PCR-Reaktion erfolgte mit der Standard Taq DNA-Polymerase

der Firma Qbiogene und einem FAM-markierten M13-Primer (5'-cacgacgttgtaaacgac-3'). Die verwendeten Reaktionsgemische enthielten in einem Volumen von 25 µl 50 ng genomische DNA, 0,75 U Taq DNA-Polymerase, 10% (v/v) Taq-Puffer, jeweils 5 nmol der Nukleotide, 10 pmol der beiden Primer, sowie 1,5 pmol des M13-FAM-Primers. Die Reaktionsansätze wurden zunächst für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend folgten die 35 PCR-Zyklen: 94°C für 30 sek, 55°C für 30 sek, 72°C für 30 sek. Abgeschlossen wurde die Reaktion mit einer weiteren Extensionsphase von 7 min bei 72°C. Nach der PCR-Reaktion wurden die PCR-Produkte nach Angaben des Herstellers mit dem Illustra Sephadex G-50-System von GE Healthcare aufgereinigt und zusammen mit dem GENESCAN 400 HD [ROX] Size Standard (Applied Biosystems) mit Hilfe des Kapillarsequenzers 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems) aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Cyrillic.210 (<http://www.cyrillicsoftware.com>) ausgewertet.

4. Ergebnisse

Diese Arbeit befasst sich mit der Mutationssuche im *SETX*-Gen von Betroffenen und dem Nachweis zahlreicher Punktmutationen, kleinerer Deletionen und einer Spleißmutation sowie von zuvor selten beschriebenen größeren intragenen Deletionen und einer ~1,3 kb-Insertion, die eine ganz neue Mutationsvariante für die AOA2 darstellt.

Ergänzend wurden Untersuchungen an Kontrollproben zur Abschätzung der Frequenz detektierter Sequenzvarianten durchgeführt. Hierfür wurden 50 bzw. 100 DNA-Proben auf das Vorhandensein verschiedener Missense-Veränderungen getestet, um herauszufinden, ob es sich bei diesen Sequenzveränderungen um Mutationen oder Normvarianten (Polymorphismen) handelt.

Um die Frage zu klären, ob gleiche Mutationen in DNA-Proben von nicht verwandten Patienten auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen sind, wurden die Haplotypen für den 5,4 cM Bereich zwischen den Kopplungsmarkern D9S159 und D9S1793 auf Chromosom 9 bestimmt.

Weiter wurden Expressionsanalysen zum Nachweis veränderter Spleißprodukte durchgeführt.

4.1 Mutationssuche

Zunächst wurden für 79 DNA-Proben von Patienten mit klinischem Verdacht auf AOA2 die 24 kodierenden Exons des *SETX*-Gens mit Hilfe der PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Um nach umfangreichen Genveränderungen zu suchen, wurde bei elf dieser DNA-Proben (P8, P9, P10 und P13-P20) zusätzlich eine Real-Time-PCR durchgeführt. Bei Hinweis auf größere Veränderungen im *SETX*-Gen wurden ergänzend Bruchpunkt- und RNA-Analysen durchgeführt.

Für 12 von 79 Patienten (P1 bis P12) konnten jeweils zwei Mutationen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 10, S. 37). Für die Patienten P13 bis P20, bei denen im ersten Screen lediglich eine Mutation detektiert werden konnte, wurde zusätzlich die Sequenzierung der nicht kodierenden Exons 1 und 2 des *SETX*-Gens sowie die Sequenzierung von ~500 Basen des 5'-UTR-Bereiches durchgeführt.

4.2 Mutationen im *SETX*-Gen

4.2.1 Patienten mit zwei Veränderungen im *SETX*-Gen

Patient P1

Patient P1 ist homozygot für eine Transition von G zu A in Exon 25 des *SETX*-Gens. Diese Transition an Position 7241 der cDNA führt zu einem Austausch von Arginin zu Glutamin in der Aminosäure-Sequenz des Senataxins (c.7241G>A, p.R2414Q). Die Untersuchung von DNA-Proben der konsanguinen Eltern zeigte erwartungsgemäß Heterozygotie für diese Mutation.

Patient P2

Patient P2 weist zwei homozygote Veränderungen im *SETX*-Gen auf. In der Familie von Patient P2 ist ebenfalls Konsanguinität bekannt. In Exon 10 des *SETX*-Gens wurde an Position 2975 der cDNA ein Basenaustausch von A zu G gefunden, wodurch es zu einem Austausch von Lysin zu Arginin in der Aminosäure-Sequenz des Senataxins kommt (c.2975A>G, p.K992R). Dieser Basenaustausch konnte auch in zwei von 50 Kontrollproben nachgewiesen werden. Die zweite Veränderung in Exon 26 des *SETX*-Gens war die Transition c.7331G>A, die zu einem Austausch von Arginin zu Histidin in der Aminosäure-Sequenz des Senataxins führt (p.R2444H). Beispielhaft für einen homozygoten Sequenzaustausch ist die Transition c.7331G>A in Abb. 2 gezeigt.

Patient P3

Patient P3 ist compound heterozygot für zwei Missense-Mutationen. Die Transversion von Thymin zu Guanin an Position 6464 der cDNA befindet sich in Exon 19 des *SETX*-Gens und hat eine Änderung von Leucin zu Tryptophan auf Protein-Ebene zur Folge (c.6464T>G, p.L2155W). Die zweite Veränderung, eine Transition von Adenin zu Guanin, konnte in Exon 24 detektiert werden. Diese Basensubstitution an Position 7144 der cDNA führt zu einem Austausch von Lysin zu Glutaminsäure in der Aminosäure-Sequenz des Senataxins (c.7144A>G, p.K2382E).

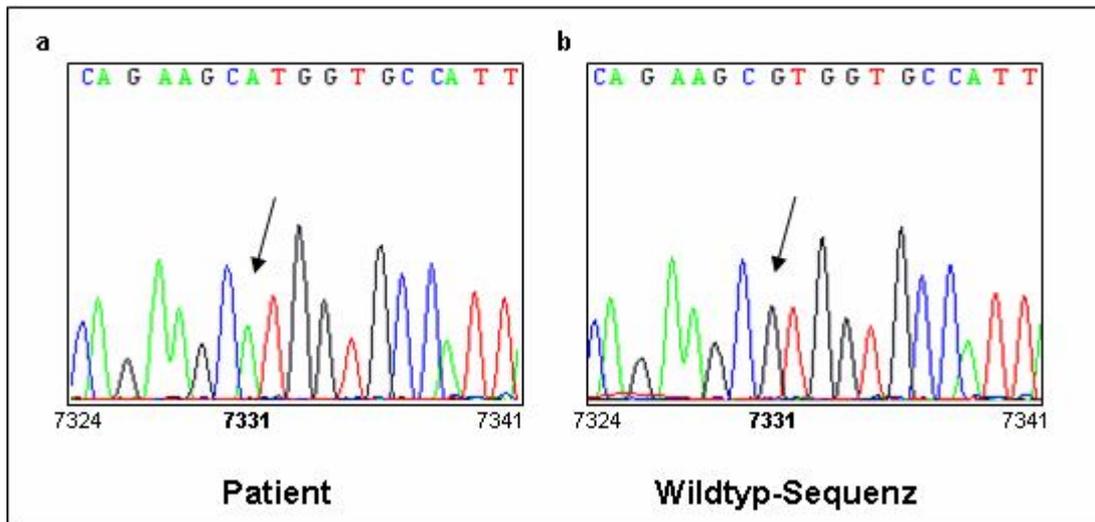


Abb. 2: Beispiel für einen homozygoten Basenaustausch. Gezeigt ist ein Ausschnitt von Exon 26 des *SETX*-Gens.
(a) Sequenz des Patienten P2, der an der Nukleotid-Position 7331 homozygot für Adenin ist (c.7331G>A).
(b) Wildtyp-Sequenz. Die Zahlen geben die Nukleotid-Position der cDNA an (Nukleotid +1 ist die erste Base des ATG-Startcodons).

Patient P4

Patient P4 ist ebenfalls compound heterozygot für zwei Missense-Mutationen. In Exon 20 des *SETX*-Gens konnte ein Basenaustausch von Adenin zu Thymin an Position 6620 der cDNA gefunden werden. Diese Basensubstitution hat auf Protein-Ebene einen Austausch von Asparaginsäure zu Valin zur Folge (c.6620A>T, p.D2207V). Zusätzlich konnte an Position 7117 der cDNA eine Transversion von Adenin zu Cytosin nachgewiesen werden. Diese Transversion in Exon 24 des *SETX*-Gens führt zu einem Austausch von Threonin zu Prolin in der Aminosäure-Sequenz des Senataxins (c.7117A>C, p.T2373P).

Patient P5

Bei Patient P5 zeigten sich drei heterozygote Veränderungen im *SETX*-Gen. In Exon 3 konnte eine Basensubstitution von Guanin zu Adenin nachgewiesen werden. Die Veränderung an Position 59 der cDNA verursacht einen Austausch von Arginin zu Histidin auf Protein-Ebene (c.59G>A, p.R20H). Bei der zweiten Sequenzvariante in Exon 26 des *SETX*-Gens handelt es sich um einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin. Dieser Basenaustausch an Position 7330 der cDNA bedingt einen Austausch von Arginin zu Cystein in der Aminosäure-Sequenz des Senataxins (c.7330C>T, p.R2444C). Somit ist bei Patient P5 das gleiche Arginin verändert, das bei Patient P2 betroffen ist. Anstelle des

Histidins bei Patient P2 kodiert das Tripletts hier jedoch Cystein. Zusätzlich konnte eine 2 bp-Deletion in Exon 10 gefunden werden. Die 2 bp-Deletion betrifft jeweils ein Thymin an den Positionen 4095 und 4096 des *SETX*-Gens. Diese Deletion führt zu einem Leserasterverschub und so auf Protein-Ebene zu der Generierung eines vorzeitigen Stopp-Codons (c.4095_4096delTT, p.S1366X). Beispielhaft für einen heterozygoten Sequenzverschub ist die 2 bp-Deletion in Exon 10 in Abb. 3 dargestellt. Für die weitere Untersuchung standen DNA-Proben der Eltern zur Verfügung. Auf dem paternalen Allel konnte die Missense-Mutation p.R2444C in heterozygoter Form nachgewiesen werden. Das maternale Allel ist heterozygot für den Missense-Austausch in Exon 3 (p.R20H) und die 2 bp-Deletion in Exon 10 des *SETX*-Gens. Der Missense-Austausch p.R20H konnte auch in zwei von 100 Kontrollproben gefunden werden.

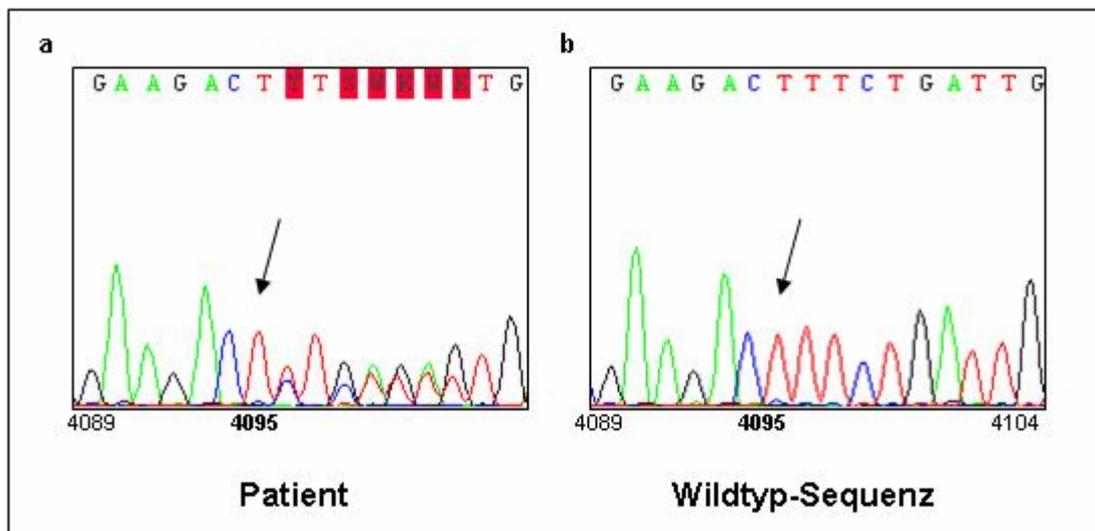


Abb. 3: Beispiel für einen Sequenzverschub.

Gezeigt ist ein Ausschnitt von Exon 10 des *SETX*-Gens.

(a) Sequenz des Patienten P5, der heterozygot für die 2 bp-Deletion c.4095_4096delTT ist.

(b) Wildtyp-Sequenz.

Patient P6

Patient P6 ist compound heterozygot für eine Missense-Mutation in Exon 13 und eine 4 bp-Deletion in Exon 11 des *SETX*-Gens. Die Missense-Mutation wird bedingt durch eine Transversion von C zu A an Position 5645 der cDNA. Diese Transversion bewirkt einen Austausch von Serin zu Tyrosin in der Aminosäure-Sequenz des Senataxins (c.5645C>A, p.S1882Y). Die 4 bp-Deletion betrifft das Tetranukleotid GAGA an Position 5308 bis 5311 des *SETX*-Gens. Durch diese Deletion kommt es zu einem Leserasterverschub, der zu einem verkürzten Protein führt (c.5308_5311delGAGA, p.E1770IfsX15).

Patient P7

Patient P7 ist compound heterozygot für eine Missense-Mutation in Exon 8 und eine 4 bp-Deletion an der Akzeptor-Spleißstelle von Intron 21 des *SETX*-Gens. Bei der Missense-Mutation handelt es sich um eine Basensubstitution von Cytosin zu Thymin an Position 932 der cDNA, die zu einem Austausch von Prolin zu Leucin in der Aminosäure-Sequenz des Senataxins führt (c.932C>T, p.P311L). Bei der 4 bp-Deletion ist ein ACAG von drei ACAG-Motiven an der Akzeptor-Spleißstelle von Intron 21 des *SETX*-Gens deletiert (c.6847_6850delACAG).

Expressionsanalysen P7

Senataxin wird im Blut exprimiert. Aus diesem Grund ist es möglich, funktionelle Konsequenzen von potentiellen Spleißmutationen mittels Expressionsanalysen an RNA, die aus Vollblut isoliert wurde, zu untersuchen.

Um die Frage zu klären, ob die Deletion dieses Tetranukleotids einen Effekt auf das Spleißen hat, wurde an RNA von Patient P7 eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden Primer in Exon 21 und 22 generiert, die zu einem 140 bp großen Wildtyp-Transkript führen (Tabelle 6, S. 11). Die Lage der Primer wurde so ausgewählt, dass die Möglichkeit besteht, ein 4 bp kürzeres Transkript auf einem Polyacrylamidgel darzustellen. Tatsächlich gelang die Auftrennung des RT-PCR-Produktes für Patient P7 mit Hilfe eines 8%igen Polyacrylamidgels in das 140 bp große Wildtyp-Transkript, das auch für eine Kontroll-RNA amplifiziert werden konnte, und das 4 bp kürzere Transkript (siehe Abb. 4a, S. 28). Die Klonierung und anschließende Sequenzierung des RT-PCR-Produktes bestätigte letztendlich die 4 bp-Deletion auf mRNA-Ebene. Diese Deletion führt zu einem Leserasterverschub und zu einem vorzeitigen Stopp-Codon (p.T2283KfsX32, Abb. 4b, S. 28).

Patient P8

Patient P8 ist heterozygot für eine Nonsense-Mutation in Exon 10 des *SETX*-Gens. Hier konnte an Position 4816 der cDNA ein Transition von Cytosin zu Thymin gefunden werden. Diese Basensubstitution bewirkt auf Protein-Ebene die Generierung eines Stopp-Codons (c.4816C>T, p.R1606X). Die Nonsense-Mutation ist als Beispiel für einen heterozygoten Basenaustausch in Abb. 5 dargestellt.

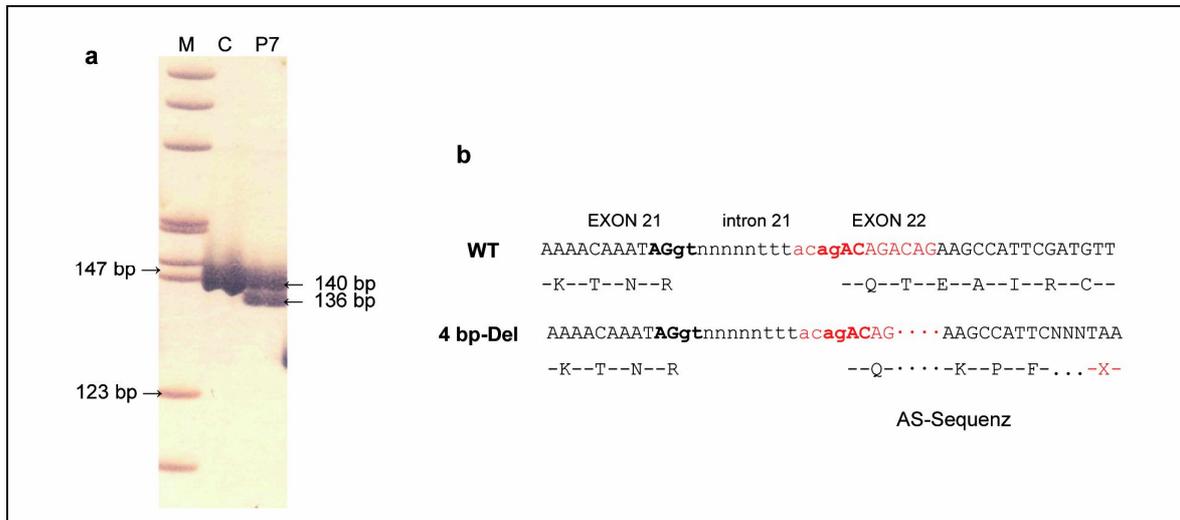


Abb. 4: RNA-Analysen für die Spleißmutation bei Patient P7.

(a) 8%iges PAA-Gel der RT-PCR-Produkte von Patient P7. M: Marker pBR322 Msp I digest. Die Kontrollprobe C zeigt eine Bande bei 140 bp, während die Probe von Patient P7 eine zusätzliche Bande mit einer Größe von 136 bp aufweist.

(b) Oben ist die Wildtyp-Sequenz (WT) dargestellt. Die untere Sequenz zeigt die Deletion und die Leserasterveränderung.

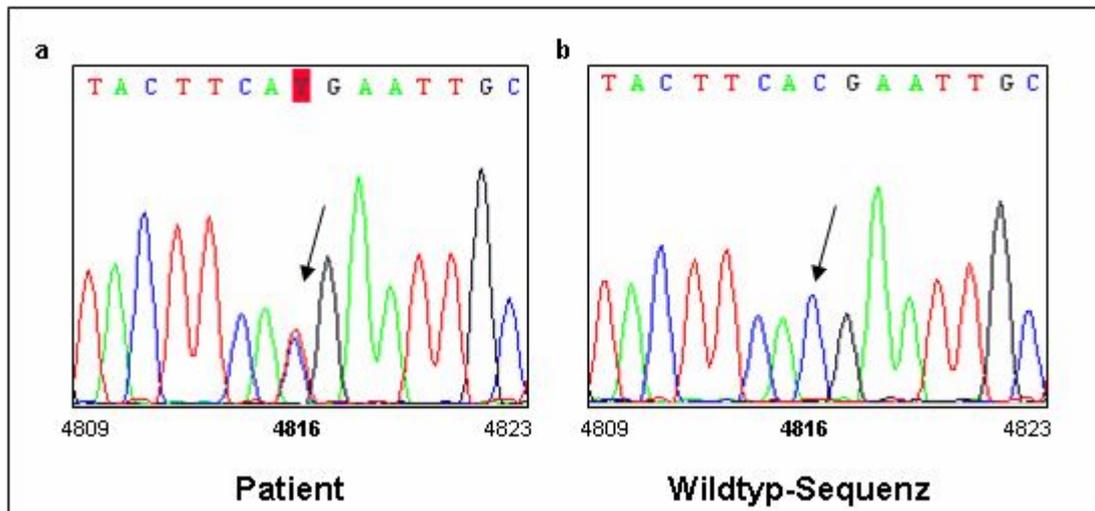


Abb. 5: Beispiel für einen heterozygoten Basenaustausch.

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus Exon 10 des *SETX*-Gens.

(a) Sequenz des Patienten P8, der an der Nukleotid-Position 4816 des *SETX*-Gens heterozygot für die Basen Cytosin und Thymin ist (c.4816C>T).

(b) Wildtyp-Sequenz.

Real-Time-PCR P8

Da bei diesem Patienten mit Hilfe der Sequenzierung keine weitere Veränderung im *SETX*-Gen gefunden werden konnte, wurde zusätzlich eine Real-Time-PCR der einzelnen Exons an genomischer DNA durchgeführt. Diese lieferte den Hinweis, dass Exon 12 im Vergleich zu den anderen Exons des Gens in einer geringeren Menge amplifiziert wird.

Long-range-PCR P8

Die anschließend durchgeführte Long-range-PCR mit Primern, die das Exon 12 flankieren (siehe Tabelle 7, S. 12), führte neben dem Wildtyp-Fragment mit einer Größe von 354 bp (Fragment 2) zu einem ~1,6 kb großen PCR-Produkt (Fragment 1, Abb. 6a, S. 30). Die Sequenzierung dieses zusätzlichen PCR-Produktes zeigte eine ~1,3 kb-Insertion in Exon 12 des *SETX*-Gens (c.5401_5402ins1280bp). Dieses ~1,3 kb große Fragment ist nach Nukleotid 26 in Exon 12 des *SETX*-Gens inseriert. Zusätzlich liegen die 15 Nukleotide vor der Insertion in duplizierter Form vor und flankieren die Insertion somit. Weiter enthält die Insertion einen großen PolyA-Bereich. Deshalb konnte die Sequenzierung mit dem Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer jeweils nur bis zu diesem PolyA-Bereich erfolgen. Aufgrund der Größe des PCR-Produktes (Abb. 6a, S. 30) kann jedoch davon ausgegangen werden, dass außer der exakten Länge der PolyA-Region die Sequenz vollständig bestimmt werden konnte.

Datenbankabgleich P8

Zur Identifizierung dieser Insertion wurde ein Datenbankabgleich mit dem BLASTN-Programm auf der NCBI-Homepage durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Das BLASTN-Programm gleicht eine Nukleotidsequenz gegen eine Nukleotidsequenzdatenbank ab. Für die Insertion lieferte dieser Sequenzabgleich sehr viele Treffer nahezu überall im menschlichen Genom. Aus diesem Grund wurde die Insertion mit dem RepeatMasker-Programm, einem Programm zur Bestimmung repetitiver Elemente, genauer analysiert (<http://www.repeatmasker.org>). Diese Analyse wies darauf hin, dass es sich bei der Insertion um ein LINE1-Element handelt. Der Vergleich mit mehreren LINE1-Elementen wiederum zeigte, dass die Insertion aus einem am 5'-Ende verkürzten L1HS-Element besteht, wobei der erste Teil des Elements bezogen auf das *SETX*-Gen in Antisense-Orientierung und der zweite Teil in Sense-Orientierung angeordnet ist. Eine schematische Darstellung dieser Insertion ist in Abb. 6b gezeigt.

Für die weitere Untersuchung standen DNA- und RNA-Proben der Eltern (Mutter M8 und Vater V8) von Patient P8 zur Verfügung. In der maternalen DNA wurde die Nonsense-Mutation p.R1606X in heterozygoter Form detektiert. In der paternalen DNA konnte das ~1,6 kb große PCR-Produkte der Long-range-PCR nachgewiesen werden, während in der maternalen DNA nur das Wildtyp-Fragment gefunden wurde (Abb. 6a, S. 30). Die Sequenzierung bestätigte, dass der Vater V8 heterozygoter Träger der ~1,3 kb-Insertion ist.

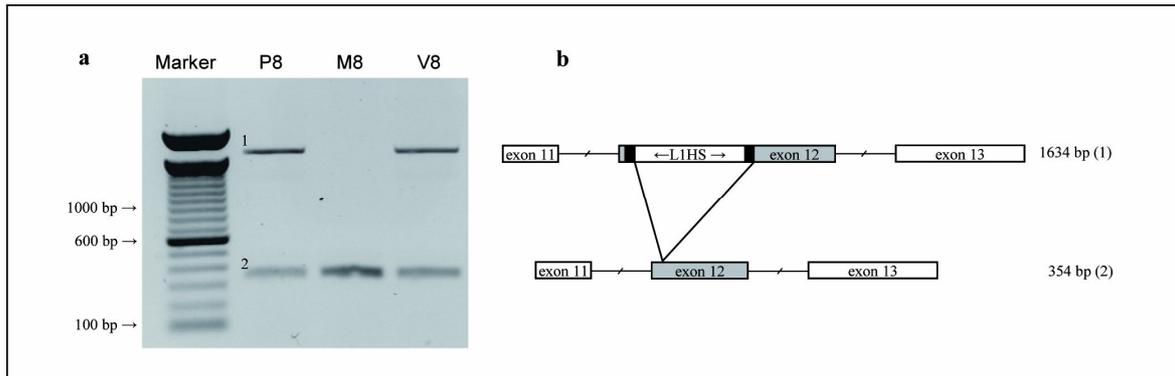


Abb. 6: L1HS-Insertion

(a) 0,8%iges Agarosegel. Gezeigt sind die Long-range-PCR-Produkte für Patient P8, für die Mutter M8 und für den Vater V8. Marker: 100 bp-Längenstandard. Die Bande bei 354 bp stellt den Wildtyp dar und das 1634 bp-Fragment zeigt das PCR-Produkt mit der ~1,3 kB-Insertion.

(b) Schematische Darstellung der L1HS-Insertion. Die schwarzen Kästchen stellen die 15 bp duplizierte Region dar. Die Pfeile geben die Orientierung des L1HS-Elements an, der erste Teil ist bezogen auf das *SETX*-Gen in Antisense-Orientierung, der zweite Teil in Sense-Orientierung angeordnet.

RNA-Analyse P8

Um den Effekt der Insertion auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Aus RNA-Proben von Patient P8, seiner Eltern und einer Kontrollperson wurde cDNA für Exon 11 bis 13 synthetisiert (Tabelle 6, S. 11) und anschließend auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Die RT-PCR führte bei der Mutter (M8) und bei der Kontroll-RNA (C) zu einem 416 bp großen Fragment (Fragment 1, Abb. 7a und 7b, S. 31). Dieses Transkript enthält das vollständige Exon 12. Die RT-PCR-Produkte für Patient P8 und den Vater V8 ließen sich neben dem Fragment 1 in zwei zusätzliche Transkripte mit einer Länge von 350 bp und 242 bp auftrennen (Fragment 2 und 3, Abb. 7a und 7b, S. 31). Die Klonierung und Sequenzierung dieser Transkripte ergab, dass dem 350 bp-Transkript die ersten 66 bp von Exon 12 fehlen, während bei dem 242 bp-Transkript das komplette Exon 12 deletiert ist. Das Fehlen der 66 Basen führt auf Protein-Ebene zu einem Protein

bei dem 22 Aminosäuren deletiert sind (p.V1792_L1813del). Das Transkript mit der Deletion des kompletten Exons 12 kodiert ein Protein, bei dem anstatt der Aminosäure-Sequenz zwischen den Positionen 1792 und 1850 ein Valin inseriert ist, also zu einem 58 Aminosäuren kürzeren Protein (p.V1792_M1850delinsV). Beide Transkripte kodieren also ein verkürztes Protein, dessen ursprüngliches Leseraster jedoch erhalten bleibt.

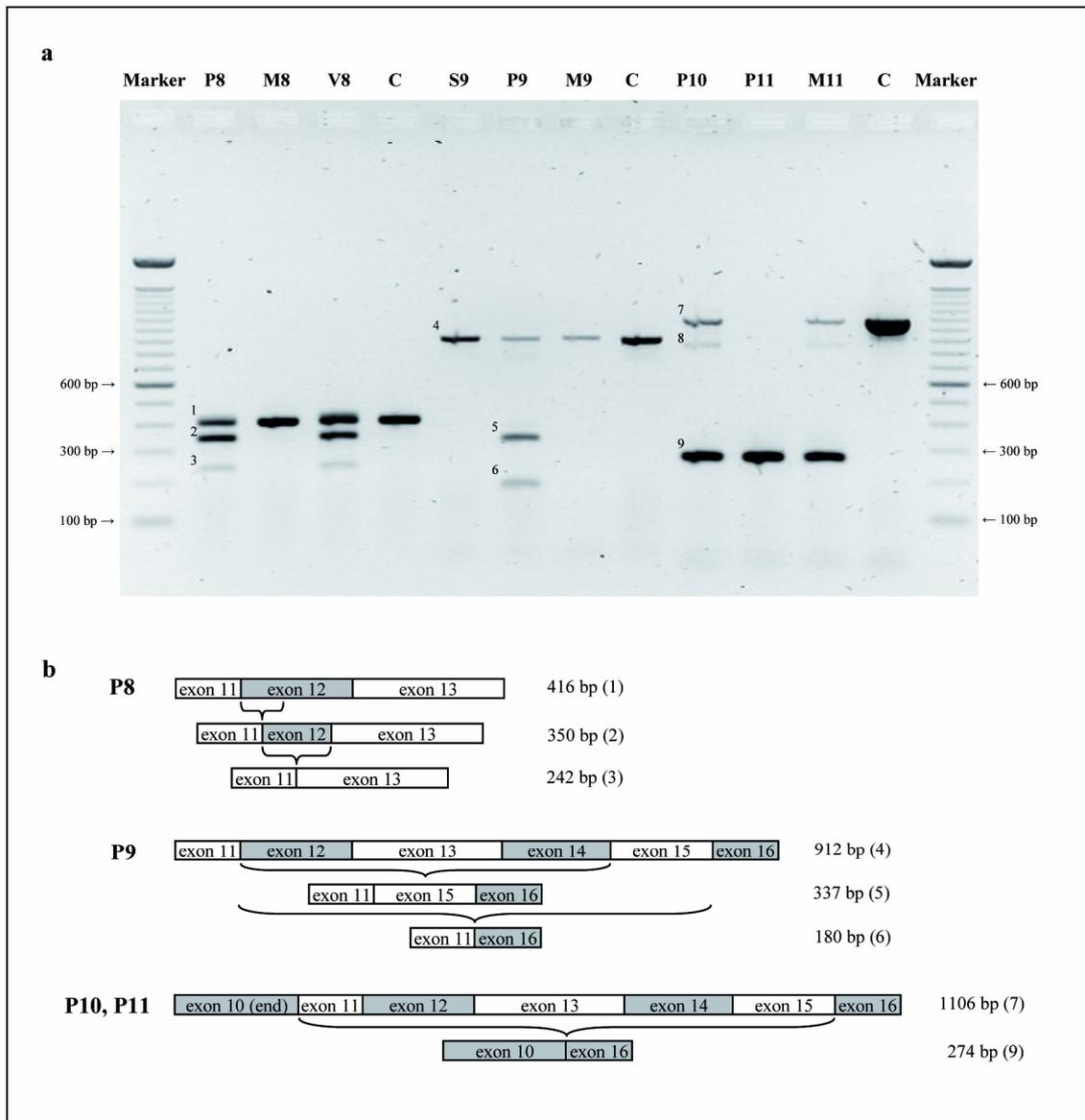


Abb. 7: Transkriptanalyse für 4 Patienten und Angehörige 1. Grades

- (a) 0,8%iges Agarosegel mit den RT-PCR-Produkten. Marker: 100 bp-Längenstandard, 1-9: RT-PCR-Produkte, P: Patient, M: Mutter, V: Vater, S: Schwester, C: Kontrolle.
 (b) Schematische Darstellung der unterschiedlichen Transkripte.

Patient P9

Patient P9 ist heterozygot für die gleiche Nonsense-Mutation (c.4816C>T, p.R1606X), die auch schon bei Patient P8 gefunden wurde. Durch die Sequenzierung konnte keine weitere Mutation detektiert werden.

Real-Time-PCR P9

Die nachfolgend durchgeführte Real-Time-PCR an genomischer DNA deutete jedoch auf eine heterozygote Deletion der Exons 12 bis 14 hin.

Bruchpunktbestimmung P9

Mit einer Long-range-PCR gelang es nicht, diesen Bereich zu amplifizieren. Daher wurden die Introns 11 und 14 mittels Primer-Walking näher untersucht. Hierfür wurden nach und nach 11 Primerpaare generiert, mit deren Hilfe die Deletion immer näher eingegrenzt werden konnte. So konnte bei Patient P9 letztendlich nach einer aufwendigen Analyse ein bruchpunktüberspannendes PCR-Produkt hergestellt werden (Tabelle 7, S. 12). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes führte zu der Detektion einer ~6,1 kb großen Deletion zwischen den Introns 11 und 14 (c.5374+9369_5950-254del6107bp). Eine Sequenzanalyse dieser Intronbereiche mit dem RepeatMasker-Programm zeigte, dass sich beide Bruchstellen in Alu-Elementen (AluSq bzw. AluSz) befinden. In Abb. 8a ist ein Sequenzvergleich des Bruchpunktbereiches bei Patient P9 und der 5'- und 3'-Wildtyp-Regionen um die Bruchpunkte gezeigt. Die Regionen um die beiden Bruchstellen weisen eine große Homologie auf, ein Bereich von 28 Basen ist sogar identisch.

RNA-Analysen P9

An der RNA-Probe von Patient P9 wurde eine RT-PCR durchgeführt und die Produkte anschließend auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Hierfür wurden Primer genutzt, die in Exon 11 und 16 lokalisiert sind und somit die Deletion umgeben (Tabelle 6, S. 11). Das RT-PCR-Produkt ließ sich auf dem Agarosegel in drei Banden mit einer Größe von 912 bp, 337 bp und 180 bp auftrennen (Fragment 4-6, Abb. 7a, S. 31). Die drei Banden wurden aus dem Gel eluiert, kloniert und anschließend sequenziert. Das 912 bp große Fragment entspricht dem Wildtyp-Transkript, welches die Exons 11 bis 16 enthält. Die Sequenzierung des 337 bp-Transkripts zeigte, dass hier die Exons 12 bis 14 fehlen (Fragment 5, Abb. 7b, S. 31). Dies führt auf Protein-Ebene zu einem Leserasterverschub an der Aminosäure-Position 1792 und somit zu einer vorzeitigen Termination des Proteins

(p.V1792EfsX31). Dem 180 bp großen Transkript fehlen die Exons 12 bis 15 (Fragment 6, Abb. 7b, S. 31), wobei das ursprüngliche Leseraster erhalten bleibt. Das Transkript kodiert ein verkürztes Protein, bei dem die Aminosäuren an den Position 1792 bis 2035 deletiert sind (p.V1792_L2035del). Für die weitere Analyse standen DNA- und RNA-Proben der Mutter M9 und der nicht betroffenen Schwester S9 zur Verfügung. Die Sequenzanalyse dieser Proben zeigte, dass die Mutter M9 heterozygote Trägerin der Nonsense-Mutation p.R1606X ist, während für die Schwester S9 an dieser Position der Wildtyp nachgewiesen wurde. Die RT-PCR führte für die Proben M9, S9 und eine Kontroll-RNA C zu dem Nachweis der 912 bp-Bande, die dem Wildtyp-Transkript von Exon 11 bis 16 entspricht (Fragment 4, Abb. 7a und 7b, S. 31). DNA- und RNA-Proben des verstorbenen Vaters waren leider nicht vorhanden.

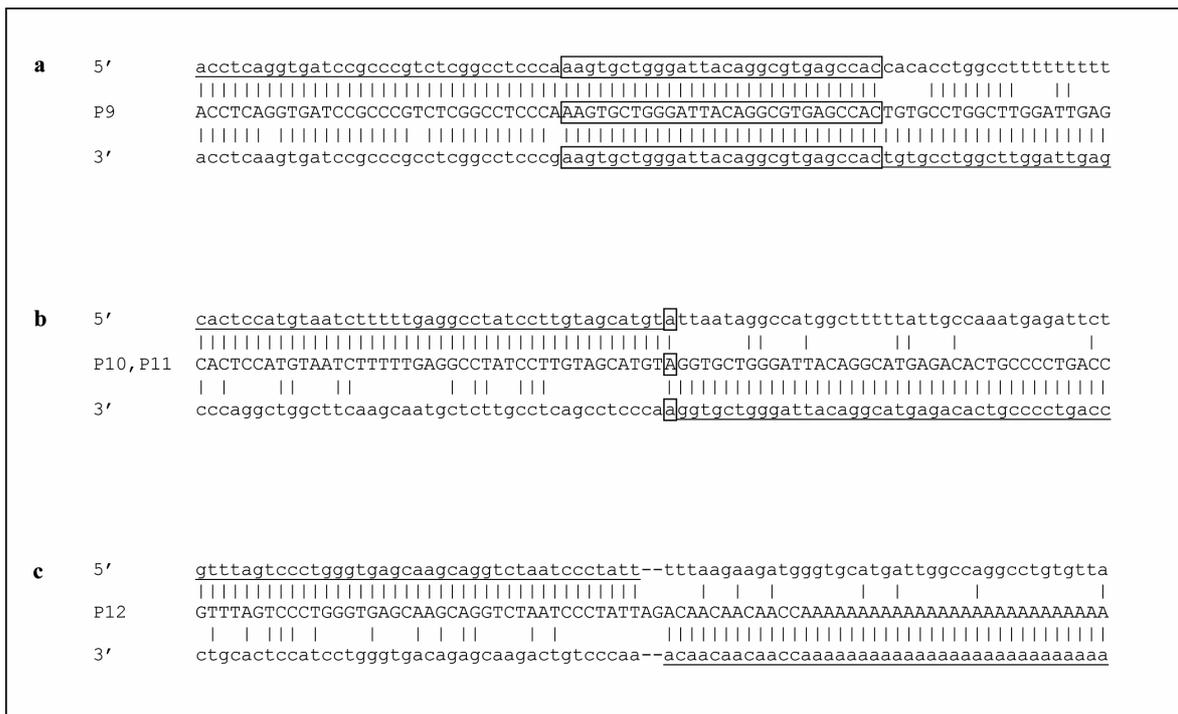


Abb. 8: Sequenzvergleich der 5'- und 3'-Bruchpunkte mit der DNA-Sequenz der Patienten.
(a) Die 5'- und 3'-Bruchpunktregionen bei Patient P9 weisen eine große Homologie auf. Der umrandete Bereich zeigt, dass 28 bp sogar identisch sind.
(b) Der Sequenzvergleich der 5'- und 3'-Bruchpunktregionen von Patient P10 und P11 zeigt keine Homologie.
(c) Stellt den Sequenzvergleich der 5'- und 3'-Bruchpunktregionen für Patient P12 dar. Hier ist ebenfalls keine Homologie der Sequenzen zu erkennen.

Patient P10

Die Sequenzierung bei Patient P10 zeigte eine heterozygote 4 bp-Deletion in Exon 10 des *SETX*-Gens. Diese Deletion betrifft das Tetranukleotid AGTG an Position 4633 bis 4636 der cDNA und führt zu einem Leserasterverschub, was auf Protein-Ebene ein vorzeitiges Stopp-Codon zur Folge hat (c.4633_4636delAGTG, p.S1545AfsX26). Eine zweite Mutation wurde durch die Sequenzierung nicht gefunden.

Real-Time-PCR P10

Bei der anschließend durchgeführten Real-Time-PCR an genomischer DNA konnte jedoch eine reduzierte Gendosis für die Exons 11 bis 15 nachgewiesen werden.

Bruchpunktbestimmung P10

Die Long-range-PCR mit den diesen Bereich flankierenden Primern führte zu keinem Ergebnis. Deshalb wurden die Introns 10 und 15 mittels Primer-Walking näher untersucht. Um die Bruchpunkte erfolgreich eingrenzen zu können, mussten im Laufe dieser langwierigen Analyse 10 Primerpaare generiert werden. Letztendlich konnte so für Patient P10 ein PCR-Produkt amplifiziert werden, das den Bruchpunkt überspannt. Die Sequenzierung dieses PCR-Produkts führte zu der Identifizierung einer ~20,7 kb großen Deletion zwischen den Introns 10 und 15 des *SETX*-Gens (c.5274+13396_6107-3547del20729bp, Tabelle 7, S. 12). Diese Intronbereiche wurden anschließend mit dem RepeatMasker-Programm analysiert. Die 5'-Bruchstelle liegt in einem LINE1-Element (L1MB7), während die 3'-Bruchstelle in einem Alu-Element (AluJr) lokalisiert ist. Im Gegensatz zur ~6,1 kb-Deletion gibt es bei dieser Deletion keinen Hinweis auf eine Sequenzhomologie der Bruchstellen (Abb. 8b, S. 33).

RNA-Analysen P10

Um den Effekt dieser Deletion auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde mit Primern aus Exon 10 und Exon 16 eine RT-PCR an der RNA-Probe von Patient P10 durchgeführt (Tabelle 6, S. 11). Auf einem 0,8%igen Agarosegel ließ sich das RT-PCR-Produkt für Patient P10 in zwei Fragmente mit einer Größe von 1106 bp und 274 bp und in eine schwache Bande bei ~900 bp auftrennen (Fragment 7-9, Abb. 7a und 7b, S. 31). Nachfolgend wurden die Banden aus dem Gel eluiert, kloniert und sequenziert. Das 1106 bp-Fragment entspricht dem Wildtyp-Transkript und enthält die Exons 10 bis 16 (Fragment 7, Abb. 7b, S. 31). Dem kleineren 274 bp-Fragment fehlen die Exons 11 bis 15

(Fragment 9, Abb. 7b, S. 31). Die Deletion von Exon 11 bis 15 verursacht einen Leserasterverschub und führt auf Protein-Ebene zu einem verkürzten Protein (p.V1759EfsX6). Die Sequenzierung zeigte, dass es sich bei der schwachen Bande (Fragment 8) um einen Heteroduplex aus den anderen beiden Transkripten handelt. Da für Patient P10 keine RNA-Proben von Familienangehörigen vorhanden waren, wurde bei der RT-PCR eine RNA-Kontrolle mitgeführt. Für diese RNA-Kontrolle konnte nur das 1106 bp-Fragment nachgewiesen werden, das dem Wildtyp-Transkript entspricht.

Für die weitere Analyse stand eine DNA-Probe der Mutter M10 von Patient P10 zur Verfügung. Die Mutter M10 ist heterozygote Trägerin der 4 bp-Deletion in Exon 10 des *SETX*-Gens, während die Deletion der Exons 11 bis 15 nicht nachgewiesen werden konnte.

Patient P11

Bei Patient P11 ließen sich die Exons 11 bis 15 des *SETX*-Gens nicht amplifizieren. In den anderen Exons konnte keine krankheitsursächliche Mutation nachgewiesen werden.

Bruchpunkt- und RNA-Analysen P11

Bruchpunkt- und RNA-Analysen bestätigten, dass Patient P11 homozygot für die ~20,7 kb große Deletion ist, die auch bei Patient P10 nachgewiesen werden konnte (c.5274+13396_6107-3547del20729bp, p.V1759EfsX6). In der Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte zeigte sich bei Patient P11 nur das 274 bp-Transkript (Fragment 9, Abb. 7a und 7b, S. 31).

Zur weiteren Abklärung dieser Mutation standen DNA-Proben der Eltern (Mutter M11 und Vater V11), sowie eine RNA-Probe der Mutter zur Verfügung. An beiden DNA-Proben konnte das bruchpunktüberspannende PCR-Produkt, sowie die Exons 11 bis 15 des *SETX*-Gens amplifiziert werden. Das ließ darauf schließen, dass die Mutter M11 und der Vater V11 von Patient P11 heterozygote Träger der ~20,7 kb-Deletion sind und konnte nachträglich durch eine Sequenzierung bestätigt werden. Für die Mutter M11 konnte dies zusätzlich durch eine RT-PCR abgesichert werden. Das RT-PCR-Produkt der Mutter M11 wies neben dem 1106 bp großen Wildtyp-Transkript (Fragment 7) das 274bp-Transkript mit der Deletion auf (Fragment 9, Abb. 7a und 7b, S. 31).

Patient P12

Patient P12 ist heterozygot für eine Transition von Adenin zu Guanin in Exon 10 des *SETX*-Gens. Diese Basensubstitution an Position 971 der cDNA hat einen Austausch von

Tyrosin zu Cystein in der Aminosäure-Sequenz zur Folge (c.971A>G, p.Y324C). Eine weitere Sequenzveränderung im *SETX*-Gen wurde bei der Sequenzierung nicht entdeckt. Die nachfolgend durchgeführte MLPA-Analyse, die mittlerweile etabliert wurde, lieferte jedoch einen Hinweis auf eine heterozygote Deletion der Exons 18 bis 26 des *SETX*-Gens (Abb. 9, S. 36).

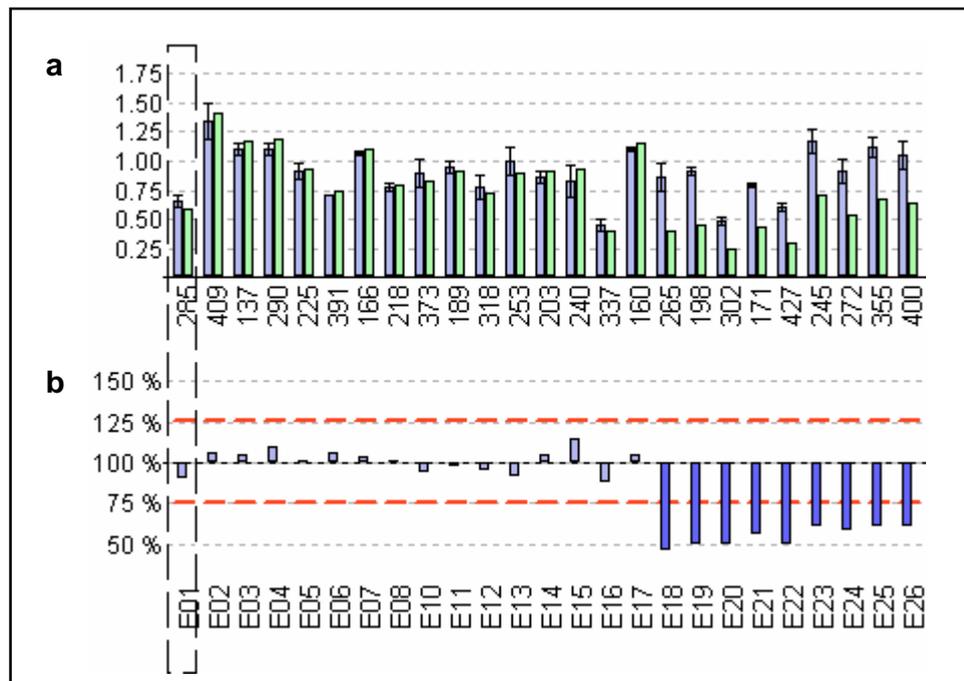


Abb. 9: MLPA-Analyse bei Patient P12.

(a) Balkendiagramm der Patienten-DNA (grün) im Vergleich zu einer Kontroll-DNA (blau).

(b) Ergebnis der MLPA-Analyse: für die Exons 18 bis 26 kann nur 50% Produkt nachgewiesen werden, d.h. hier liegt eine heterozygote Deletion vor.

Bruchpunktbestimmung P12

Zur Bruchpunktbestimmung wurde das Intron 17 und der Bereich 3' des *SETX*-Gens mittels Primer-Walking näher untersucht. Hierfür wurden nach und nach 8 Primerpaare generiert, um den Bruchpunkt immer weiter einzugrenzen. Letzten Endes konnte so auch für Patient P12 ein bruchpunktüberspannendes PCR-Produkt amplifiziert werden (Tabelle 7, S. 12). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes führte zum Nachweis einer ~26,8 kb großen Deletion, die von einer 2 bp-Insertion begleitet wird. Diese komplexe Veränderung führt dazu, dass ab Position c.6325-361 im Intron 17 der Rest des *SETX*-Gens deletiert ist (AL159997.14:g.48148_74944del126797bpinsAG). Die 3'-Bruchstelle liegt zwischen dem *SETX*- und dem *NTNG2*-Gen, die in entgegengesetzten Orientierungen zueinander angeordnet sind (Abb. 10, S. 37). Die Sequenzanalyse mit dem RepeatMasker-Programm

zeigte, dass die 5'-Bruchstelle in einem LTR-Element (MLT1K) in Intron 17 des *SETX*-Gens liegt, während die 3'-Bruchstelle in einem Alu-Element (AluSx1) lokalisiert ist. Die beiden Bruchpunkte weisen keine Sequenzhomologie auf (Abb. 8c, S. 33).

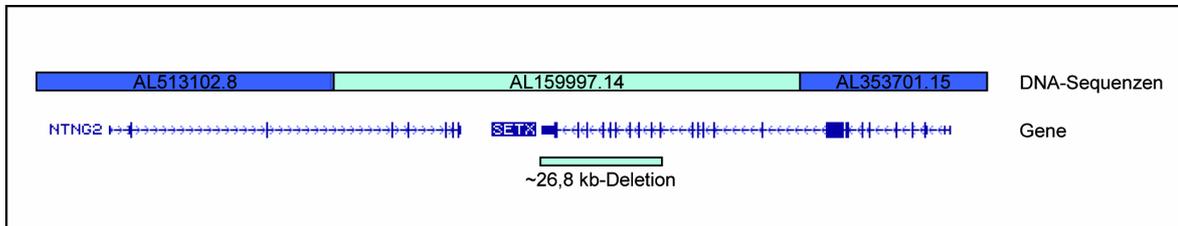


Abb. 10: Lokalisation der ~26,8 kb-Deletion. Die schematische Darstellung der Gene *NTNG2* und *SETX* wurde aus der UCSC-Datenbank übernommen.

Tabelle 10: Mutationen und Polymorphismen im *SETX*-Gen

Patient	Variation auf cDNA-Ebene	Variation auf Protein-Ebene	Mutationsstatus
Patient 1	c.7241G>A	p.R2414Q	homozygot
Patient 2	c.2975A>G c.7331G>A	p.K992R* p.R2444H	homozygot
Patient 3	c.6464T>G c.7144A>G	p.L2155W p.K2382E	compound heterozygot
Patient 4	c.6620A>T c.7117A>C	p.D2207V p.T2373P	compound heterozygot
Patient 5	c.7330C>T c.4095_4096delTT c.59G>A	p.R2444C p.S1366X p.R20H*	compound heterozygot
Patient 6	c.5645C>A c.5308_5311delGAGA	p.S1882Y p.E1770IfsX15	compound heterozygot
Patient 7	c.932C>T c.6847_6850delACAG	p.P311L p.T2283KfsX32	compound heterozygot
Patient 8	c.4816C>T c.5401_5402ins1280bp	p.R1606X p.V1792_L1813del, p.V1792_M1850delinsV	compound heterozygot
Patient 9	c.4816C>T c.5374+9369_5950-254 del6107bp	p.R1606X p.V1792EfsX31, p.V1792_L2035del	compound heterozygot
Patient 10	c.4633_4636delAGTG c.5274+13396_6107-3547 del20729bp	p.S1545AfsX26 p.V1759EfsX6	compound heterozygot
Patient 11	c.5274+13396_6107-3547 del20729bp	p.V1759EfsX6	homozygot
Patient 12	c.971A>G ab Position c.6325-361 del26797bpinsAG	p.Y324C Deletion Exon 18 bis 26	compound heterozygot

*Polymorphismus

4.2.2 Patienten mit einer Veränderung im *SETX*-Gen

Weiter konnten in acht DNA-Proben von Ataxie-Patienten (Patient P13 bis P20) Missense-Veränderungen gefunden werden, die nachfolgend in einer Übersichtstabelle zusammengefasst sind (Tabelle 11, S. 38). Durch Real-Time-PCR, MLPA-Analysen oder Sequenzierung der nicht kodierenden Exons 1 und 2 sowie der 500 Basen des 5'-UTR-Bereiches des *SETX*-Gens konnte für keine der DNA-Proben eine zweite Veränderung nachgewiesen werden.

Tabelle 11: heterozygote Sequenzveränderungen im *SETX*-Gen mit unklarer Auswirkung

Patient	Variation auf cDNA-Ebene	Variation auf Protein-Ebene	Mutationsstatus
Patient 13	c.472T>G	p.L158V	heterozygot
Patient 14	c.472T>G	p.L158V	heterozygot
Patient 15	c.1157T>C	p.M386T	heterozygot
Patient 16	c.1750C>G	p.L584V	heterozygot
Patient 17	c.2278A>G	p.T760A	heterozygot
Patient 18	c.3229G>A	p.D1077N	heterozygot
Patient 19	c.4660T>G	p.C1554G	heterozygot
Patient 20	c.4660T>G	p.C1554G	heterozygot

Patient P13 und P14

Patient P13 und P14 sind heterozygot für eine Basensubstitution in Exon 5 des *SETX*-Gens. Diese Basensubstitution von Thymin zu Guanin an Position 472 der cDNA führt auf Protein-Ebene zu einem Austausch von Leucin zu Valin (c.472T>G, p.L158V). Die Patienten P13 und P14 sind nicht verwandt. Die Mutter von Patient P13 ist allerdings heterozygote Trägerin dieser Veränderung und zeigt ebenfalls Symptome einer ataktischen Bewegungsstörung.

Patient P15

Patient P15 ist heterozygot für eine Transition von Thymin zu Cytosin in Exon 10 des *SETX*-Gens. Diese Transition an Position 1157 der cDNA hat einen Austausch von Methionin zu Threonin in der Aminosäure-Sequenz zur Folge (c.1157T>C, p.M386T).

Patient P16

Patient P16 weist eine heterozygote Transversion in Exon 10 des *SETX*-Gens auf. Diese Transversion von Cytosin zu Guanin an Position 1750 der cDNA bedingt auf Protein-Ebene einen Austausch von Leucin zu Valin (c.1750C>G, p.L584V).

Patient P17

Patient P17 ist heterozygot für einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin an Position 2278 des *SETX*-Gens. Dieser Basenaustausch in Exon 10 des *SETX*-Gens bewirkt auf Protein-Ebene einen Austausch von Threonin zu Alanin (c.2278A>G, p.T760A).

Patient P18

Bei Patient P18 wurde in Exon 10 des *SETX*-Gens eine heterozygote Basensubstitution nachgewiesen. Diese Basensubstitution von Guanin zu Adenin an Position 3229 der cDNA hat auf Protein-Ebene einen Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin zur Folge (c.3229G>A, p.D1077N).

Patient P19 und P20

Patient P19 und P20 sind heterozygot für eine Transversion von Thymin zu Guanin in Exon 10 des *SETX*-Gens. Diese Transversion an Position 4660 der cDNA führt auf Protein-Ebene zu einem Austausch von Cystein zu Glycin (c.4660T>G, p.C1554G). Die Patienten P19 und P20 sind nicht verwandt. Allerdings ist die ebenfalls betroffene Schwester von Patient P19 sogar homozygot für diese Missense-Veränderung und die Mutter, die auch Symptome einer Ataxie zeigt, ist heterozygote Trägerin der Missense-Veränderung.

4.2.3 Kontrollproben

Zur Abschätzung der Frequenz von Missense-Veränderungen wurden 50 bzw. 100 Kontrollproben auf das Vorhandensein dieser Veränderungen getestet.

Um die Häufigkeit des Missense-Austauschs p.K992R abschätzen zu können, wurde für 50 Kontrollproben dieser Bereich des *SETX*-Gens mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Tatsächlich konnte dieser Missense-Austausch in heterozygoter Form in zwei Kontrollproben nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten beide Kontrollproben in demselben Fragment Heterozygotie für eine weitere Veränderung. Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine Insertion des Trinukleotids GAT (c.3072_3073insGAT). Auf Protein-Ebene führt diese Insertion zu einem zusätzlichen Asparaginsäurerest zwischen den Aminosäure-Positionen 1024 und 1025 (p.D1024_E1025insD) und verlängert somit einen Strang von fünf Asparaginsäureresten um einen weiteren Asparaginsäurerest.

Zur Bestimmung der Frequenz der Missense-Veränderung p.R20H wurden 100 Kontrollproben untersucht. Der Missense-Austausch p.R20H konnte in heterozygoter Form in zwei der 100 Kontrollproben detektiert werden.

Des Weiteren wurden 100 Kontrollproben auf das Vorhandensein der Missense-Mutationen p.P311L, p.Y324C, p.R2444H und p.R2444C überprüft. Keine dieser Veränderungen konnte in den 100 Kontrollproben nachgewiesen werden.

Für die Missense-Mutationen p.D1077N, p.L2155W, p.K2382E, p.D2207V, p.T2373P, und p.R2414Q wurden 50 Kontrollproben getestet. Hier konnte ebenfalls in keiner der 50 Kontrollproben diese Veränderungen identifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in insgesamt 20 der 79 untersuchten DNA-Proben mit Hilfe der Sequenzierung eine Veränderung im *SETX*-Gen identifiziert werden konnte. Dabei handelte es sich um 18 Missense-Veränderungen, eine Nonsense-Mutation, eine 2 bp-Deletion, zwei 4 bp-Deletionen und eine Spleißmutation (Tabelle 10, S. 37 und 11, S. 38). Weiter wurden mittels Real-Time-PCR, MLPA-Analysen, sehr arbeits- und zeitaufwendigen Bruchpunktbestimmungen und umfangreichen RNA-Analysen drei exonübergreifende Deletionen und eine ~1,3 kb-Insertion identifiziert. Die ~1,3 kb-Insertion stellt eine neue Art von Mutation dar, die so für das *SETX*-Gen bisher noch nicht beschrieben wurde.

Insgesamt konnte für 12 Patienten (Patient P1 bis P12) die Diagnose der Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 molekulargenetisch bestätigt werden. Für acht Patienten (Patient P13 bis P20) konnte nur eine heterozygote Veränderung detektiert werden und für die Patienten P21 bis P79 konnte keine Veränderung im *SETX*-Gen nachgewiesen werden.

4.3 Haplotyp-Analyse

Für nicht verwandte Patienten mit gleichen Mutationen wurde eine Haplotyp-Analyse der 5,4 cM Region auf Chromosom 9 zwischen den Kopplungsmarkern D9S159 und D9S1793 durchgeführt. Das *SETX*-Gen ist zwischen den Markern D9S1863 und D9S1847 lokalisiert (siehe Abb. 11, S. 42 und Abb. 12, S. 43).

Nonsense-Mutation p.R1606X

Die Nonsense-Mutation p.R1606X konnte in den DNA-Proben von Patient P8 und P9 nachgewiesen werden. Beide Patienten erben diese Mutation von ihrer Mutter (roter Balken, Abb. 11, S. 42).

Familie P8

Für die Haplotyp-Analyse bei Patient P8 stand auch die DNA-Probe des Vaters V8 zur Verfügung. Der Vater V8 ist heterozygoter Träger der ~1,3 kb-Insertion in Exon 12 des *SETX*-Gens, die er an seinen Sohn vererbte (grüner Balken, Abb. 11, S. 42).

Familie P9

Bei Patient P9 wurde die DNA-Probe der nicht betroffenen Schwester S9 mit in die Analyse einbezogen. Patient P9 wies eine Rekombination auf dem mütterlichen Allel auf. Interessanterweise scheinen Patient P9 und seine Schwester S9 das gleiche Allel vom Vater geerbt zu haben (blauer Balken, Abb. 11, S. 42). Die ~6,1 kb-Deletion, die als zweite Mutation in der DNA-Probe von Patient P9 detektiert wurde, konnte weder bei der Schwester S9 noch bei der Mutter M9 nachgewiesen werden. Die DNA-Probe des verstorbenen Vaters stand für Untersuchungen leider nicht zur Verfügung. Deshalb konnte nicht geklärt werden, ob die ~6,1 kb-Deletion bei Patient P9 von dem Vater vererbt wurde oder ob es sich um eine Neumutation handelt. Die Tatsache, dass die gesunde Schwester S9, keine Trägerin der Deletion ist, aber dennoch das gleiche Allel vom Vater geerbt hat wie Patient P9, stärkt die Vermutung einer Neumutation.

Für Patient P8 und Patient P9 konnte kein Hinweis auf einen gemeinsamen Haplotyp gefunden werden.

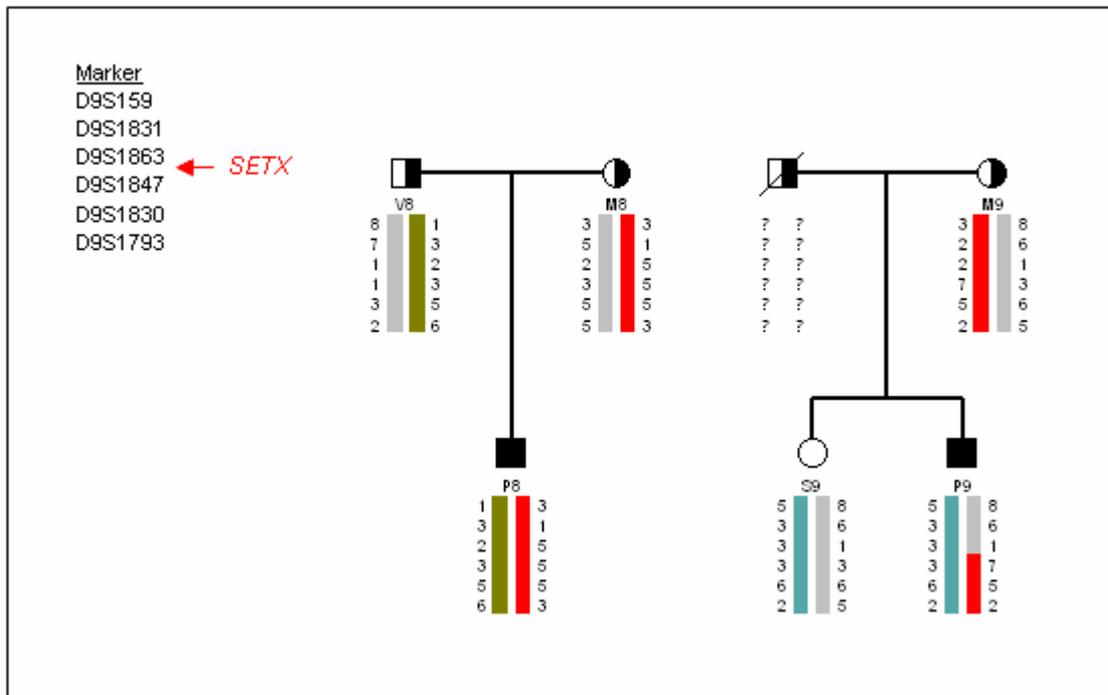


Abb. 11: Haplotyp-Analyse der 5,4 cM Region auf Chromosom 9 für Patient P8 und P9. Das Allel mit der Nonsense-Mutation ist rot dargestellt.

Deletion der Exons 11 bis 15

Die ~20,7 kb große Deletion der Exons 11 bis 15 des *SETX*-Gens (c.5274+13396_6107-3547del20729bp) wurde in DNA-Proben der Patienten P10 und P11 gefunden. Das betroffene Allel ist als roter Balken in Abb. 12 dargestellt.

Familie P10

Patient P10 erbt diese Deletion wahrscheinlich von seinem Vater, dessen DNA-Probe nicht zur Verfügung stand. Die Mutter M10 ist heterozygot für die 4 bp-Deletion in Exon 10 des *SETX*-Gens (c.4633_4636delAGTG) und gab diese an ihren Sohn weiter (blauer Balken, Abb. 12, S. 43). Das Allel mit der Deletion ist rot dargestellt.

Familie P11

Patient P11 ist homozygot für die ~20,7 kb große Deletion. Für die Haplotyp-Analyse standen die DNA-Proben der Eltern zur Verfügung. Beide Elternteile gaben ein betroffenes Allel an ihren Sohn weiter (roter Balken, Abb. 12, S. 43).

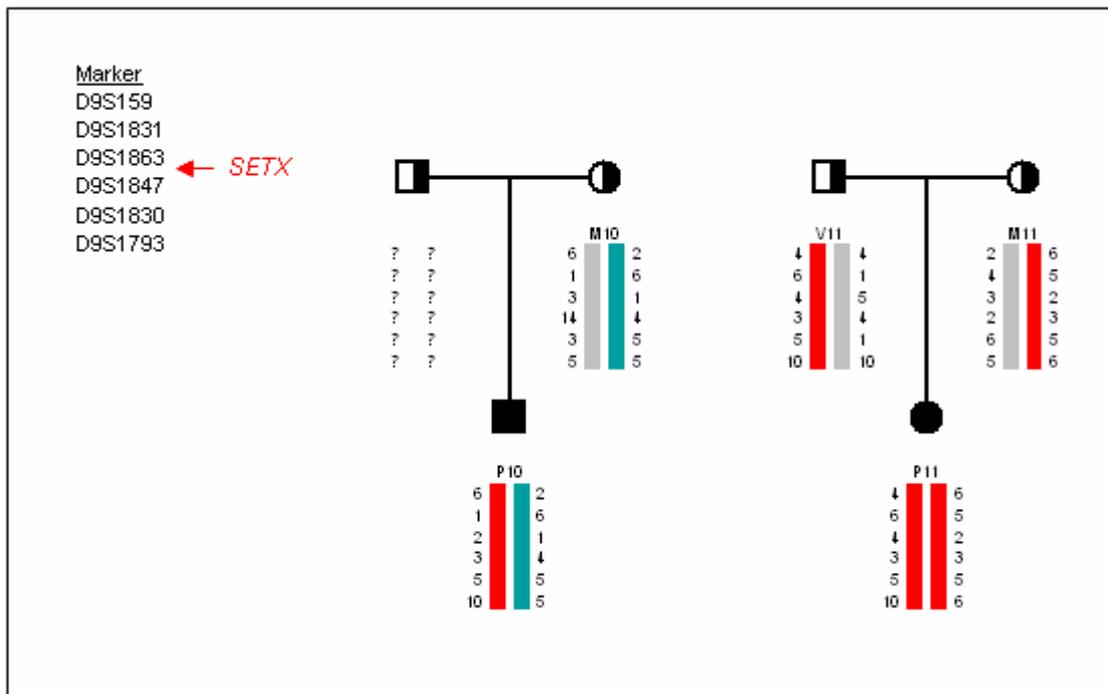


Abb. 12: Haplotyp-Analyse der 5,4 cM Region auf Chromosom 9 für Patient P10 und P11.
Das Allel mit der ~ 20,7 kB-Deletion ist rot dargestellt.

Ein gemeinsamer Ursprung des Haplotyps kann bei den Patienten P10 und P11 nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die Allele für die Marker D9S1847 und D9S1830 übereinstimmten. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Allelfrequenz dieser beiden Marker in 90 Kontrollproben (180 Allele) untersucht. Das Allel, welches die beiden Patienten für den Marker D9S1847 aufwiesen, konnte bei den Kontrollen als das zweit häufigste Allel nachgewiesen werden (14,4%). Das Allel für den Marker D9S1830 stellte mit 42% sogar das häufigste Allel dar. Diese Daten lassen keine signifikanten Schlüsse über einen möglichen gemeinsamen Ursprung der ~20,7 kb-Deletionen zu.

5. Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, in einem Kollektiv von 79 Ataxie-Patienten, neue Mutationen zu identifizieren, das Mutationsspektrum zu charakterisieren und die Häufigkeit der AOA2 in der deutschen Population abzuschätzen.

Inzwischen wurden mindestens 66 verschiedene Mutationen im *SETX*-Gen beschrieben, die mit der AOA2 assoziiert sind (Tabellen 19 a, b und c, S. 77-79)^(5, 7-10, 12-22). Bei der Mehrzahl dieser Mutationen handelt es sich um Nonsense- oder Missense-Mutationen. Es werden aber auch kleinere Deletionen und Insertionen, sowie Spleißmutationen beschrieben. Des Weiteren wurden sechs Fälle von größeren Genveränderungen publiziert^(7, 9, 10, 16). Neben dieser Vielzahl an Mutationen sind 39 nicht-pathogene Sequenzvarianten im *SETX*-Gen bekannt (NCBI dsSNP Build 130), was zeigt, dass sich zahlreiche Normvarianten aber keine einheitliche Wildtyp-Sequenz benennen lassen.

Eine besondere Herausforderung der Molekulargenetik ist es, die Frage zu klären, ob es sich bei einer Sequenzveränderung um eine Mutation oder um einen Polymorphismus handelt. Der Begriff Mutation steht für seltene Sequenzveränderungen mit einer Häufigkeit <1%, bei denen eine Krankheitsrelevanz („disease-causing change“) erwartet wird⁽³³⁾. Ein Polymorphismus hingegen ist eine Sequenzvariante, die mit signifikanter Häufigkeit auftreten kann und nicht krankheitsursächlich („non disease-causing change“) ist⁽³³⁾. In der Molekulargenetik sind damit Sequenzvarianten gemeint, die mit einer Häufigkeit von >1% in der Population auftreten. Diese Unterscheidung ist besonders schwierig für noch nicht beschriebene Missense-Veränderungen. Hier kann der Austausch einer einzelnen Aminosäure schwerwiegende Veränderungen des Proteins zur Folge haben. Die Änderung der Proteinstruktur kann zu einem Verlust der üblichen Proteinfunktion („loss of function mutation“) führen oder sogar den Gewinn einer toxischen Proteinfunktion („gain of function mutation“) nach sich ziehen. Andererseits sind viele Polymorphismen im *SETX*-Gen bekannt, die auf Protein-Ebene zu einer Änderung der Proteinsequenz führen, aber dennoch keinen pathogenen Effekt zu haben scheinen. Diese Vielzahl möglicher Isoformen des *SETX*-Gens erschwert die Interpretation, ob eine Veränderung in der Proteinsequenz krankheitsursächlich ist und wirft so Probleme in der Diagnosestellung auf. Von besonderem Interesse ist es daher, anhand von molekulargenetischen Analysen bei Familienangehörigen und Kontrollpersonen zu klären, ob es sich bei solchen Sequenzvarianten um Mutationen handelt.

Leichter fällt die Interpretation bei Nonsense-Mutationen oder Deletionen und Insertionen einzelner Nukleotide, die einen Leserasterverschub verursachen und somit zu einem verschobenen Stopp-Codon führen. Hier kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich um pathogene Veränderungen handelt, die entweder zu einem „nonsense-mediated mRNA decay“ (NMD) oder zur Zerstörung der normalen Proteinfunktion führen. Der NMD ist ein Kontrollmechanismus der vorzeitige Stopp-Codone („premature termination codon“, PTC) in der mRNA erkennt, die mRNA abbaut und somit die Expression verkürzter Proteine verhindert⁽³⁴⁾.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei 79 Patienten mit Verdacht auf die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2 nach Mutationen im *SETX*-Gen gesucht. Für 12 Patienten konnte die klinische Diagnose der AOA2 molekulargenetisch bestätigt werden (Tabelle 10, S. 37). Bei diesen Patienten konnten homozygote oder compound heterozygote Mutationen im *SETX*-Gen nachgewiesen werden. Bei 8 weiteren Patienten konnte lediglich eine Sequenzveränderung im *SETX*-Gen gefunden werden (Patient P13 bis P20, Tabelle 11, S. 38) und bei den restlichen 59 Patienten konnte keine Sequenzveränderung im *SETX*-Gen nachgewiesen werden.

Bisher wurden zwei Domänen im Senataxin beschrieben, die vermutlich wichtig für die Funktion des Proteins sind. Zum einen die C-terminal gelegene DNA/RNA-Helikasedomäne, die die Aminosäurereste 1931 bis 2456 umfasst und zum anderen die N-terminale Domäne von Aminosäure-Position 1 bis 600, die vermutlich für die Protein-Interaktion zuständig ist^(5, 25) (Abb. 13, S. 45).

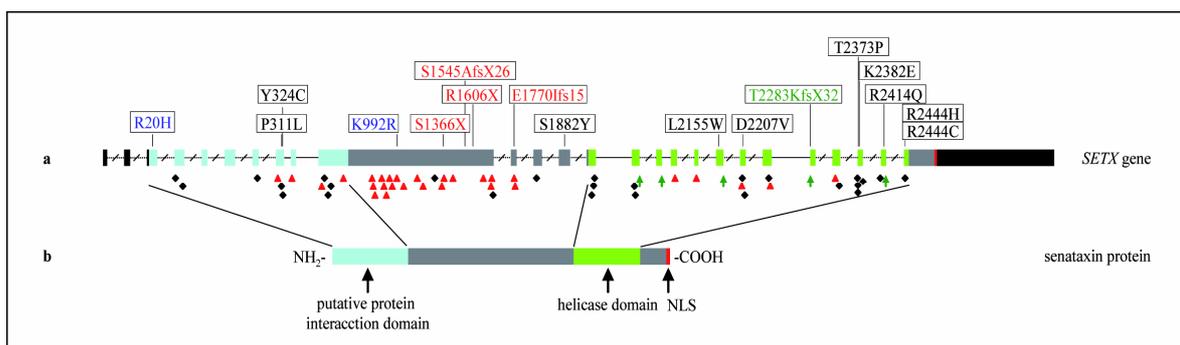


Abb. 13: (a) Schematische Darstellung des *SETX*-Gens. Über der Genstruktur sind die mittels Sequenzierung identifizierte Mutationen angegeben. schwarz: Missense-Mutationen, rot: Nonsense- und Leseraster-Mutationen, grün: Spleißmutation, blau: Polymorphismen. Unter der Genstruktur sind die bekannten Mutationen in den entsprechenden Farben dargestellt.

(b) Schematische Darstellung des Proteins Senataxin mit den postulierten Domänen. (modifiziert nach Bernard *et al.* 2009)

5.1 Mittels Sequenzierung identifizierte Mutationen und Polymorphismen

Missense-Mutationen in der Helikasedomäne

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit sieben Missense-Mutationen identifiziert werden, die in der C-terminalen DNA/RNA-Helikasedomäne des Senataxins liegen (Abb. 13, S. 45). Diese Missense-Mutationen p.L2155W, p.D2207V, p.T2373P, p.K2383E, p.R2414Q, p.R2444H, und p.R2444C verändern Aminosäure-Positionen des Senataxins, die zwischen den verschiedenen Spezies (*Homo sapiens* Ensembl ENSG00000107290, *Mus musculus* Ensembl ENSMUSG00000043535, *Rattus norvegicus* Ensembl ENSRNOG00000013491, *Canis familiaris* Ensembl ENSCAFG00000019897, *Bos taurus* Ensembl ENSBTAG00000024822, *Felis catus* Ensembl ENSFCAG00000007102, *Gallus gallus* Ensembl ENSGALG00000003661, Abb. 14, S. 47) sehr stark konserviert sind. Die Missense-Mutationen p.R2414Q und p.R2444H wurden in homozygoter Form nachgewiesen, während die restlichen fünf Missense-Mutationen compound heterozygot mit anderen Mutationen aufgetreten sind. Neben der Tatsache, dass sich diese Mutationen in der funktionell wichtigen Domäne des Senataxins befinden und die betroffenen Aminosäurereste stark konserviert sind, konnte keine dieser Veränderungen in 100 bzw. 200 Kontroll-Allelen gefunden werden. Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Veränderungen um pathogene Mutationen handelt.

Missense-Mutationen in der Protein-Interaktionsdomäne

In der mutmaßlichen Protein-Interaktionsdomäne konnten die beiden Missense-Mutationen p.P311L und p.Y324C identifiziert werden (Abb. 13, S. 45). Diese Missense-Mutationen wurden beide in compound heterozygoter Form mit anderen Mutationen nachgewiesen. Auch bei diesen Mutationen ist eine starke Konservierung der betroffenen Aminosäure-Positionen zu beobachten (Abb. 14, S. 47). Des Weiteren wiesen 100 getestete Kontrollproben an diesen Aminosäure-Positionen die Wildtyp-Sequenz auf. Folglich werden diese Missense-Mutationen als pathogen bewertet.

Missense-Mutationen außerhalb der funktionellen Domänen

Die Missense-Mutation p.S1882Y liegt außerhalb der beiden bekannten funktionellen Domänen des Senataxins (Abb. 13, S. 45). Es sind allerdings bereits zwei Missense-Mutationen bekannt (p.F1756S und p.P1805S), die außerhalb dieser Domänen liegen und

dennoch mit der AOA2 assoziiert werden ^(5, 10). Zudem ist das Serin an der Aminosäure-Position 1882 stark konserviert (Abb. 14, S. 47). Die Missense-Mutation p.S1882Y wurde in compound heterozygoter Form mit einer 4 bp-Deletion (c.5308_5311delGAGA, p.E1770IfsX15) nachgewiesen. Interessanterweise wurde diese 4 bp-Deletion bereits als homozygote Mutation in einer zypriotischen Familie beschrieben ⁽¹⁷⁾. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Missense-Mutation ebenfalls um eine pathogene Veränderung handelt.

	R20H	P311L	Y324C	K992R
Mus_musculus	IDVLR R YASST	GQLID P IEAFQ	INNES Y NREIQ	LQ--- R GDKRC
Rattus_norvegicus	IDVLR C YASST	GQLID P IEAFQ	INNES Y NREIQ	LQ--- R DDKRC
Canis_familiaris	-----	-----	-----	-----
Bos_taurus	TDFL C RYASRT	GQLID P IEAFQ	INNV S YNREIQ	IQRK V KDEKRC
Homo_sapiens	IDFL R YASNT	GQL M DPIVAFQ	INN A SYNREIR	LQRK V KEDKRC
Felis_catus	ADFL R YASRT	GQRID P IEAFQ	INN M SYNREIQ	LQRK V KD--KRC
Gallus_gallus	TEYL R S S YASKQ	GQLID P VQAFQ	INS V SYNNEIK	HN-- I CDVKRK
	D1024_E1025insD	S1882Y	L2155W	D2207V
Mus_musculus	DEE E DEDE---	CIVISS L VTTQ	VICCT L STSGG	LILV G DPKQLP
Rattus_norvegicus	DEED D ADEQDE	CIVISS L VTTQ	VICCT L STSGG	LVLV G DPKQLP
Canis_familiaris	-----	CVV I SSLVTTQ	VICCT L STSGG	LILV G DPKQLP
Bos_taurus	D-----D E DE	CFV I SSLVTTQ	IICCT L STSGG	LVLV G DPKQLP
Homo_sapiens	D-----D D DE	CIVISS L VTTQ	IICCT L STSGG	LILV G DPKQLP
Felis_catus	D-----D D DGD	CTV I SSLVTTQ	VICCT L STSGG	LILV G DPKQLP
Gallus_gallus	HGN K IIIIID S	CMV V GS L VPTQ	IICCT L STSGG	LVLV G DPKQLP
	T2373P	K2382E	R2414Q	R2444H/C
Mus_musculus	PAEVD T VDAFQ	FQGR R DCIIV	NVTIT R AKYSL	QDAQ R FGAIK
Rattus_norvegicus	PAEVD T VDAFQ	FQGR R DCIIV	NVTIT R AKYSL	QDAQ R FGAIK
Canis_familiaris	PAEVD T VDGFQ	FQGR R DCVIV	NVTIT R AKYSL	QDAQ R FGAIK
Bos_taurus	AAEVD T VDAFQ	FQGR R DCVIV	NVTIT R AKYSL	QDAQ R FGAIK
Homo_sapiens	PAEVD T VDAFQ	FQGR R DCVIV	NVTIT R AKYSL	QDAQ R FGAIK
Felis_catus	PAEVD T VDAFQ	FQGR R DCVIV	NVTIT R AKYSL	XXXXXXXXXXXX
Gallus_gallus	PGEVD T VDAFQ	FQGR R DCIIV	NVTIT R ARFSL	QDAQ R FGAIK

Abb. 14: Ausschnitte aus dem Sequenzvergleich der verschiedenen Orthologe des Senataxin. Die Bezeichnung der Veränderungen ist über den Sequenzen angegeben (blau: Polymorphismen, schwarz: Missense-Mutationen) und die betroffene Aminosäure-Position ist umrandet. Der Sequenzvergleich wurde mit dem ClustralW2-Programm erstellt (EBI, <http://www.ebi.ac.uk>).

Polymorphismen

Im Rahmen der Diagnostik wurden viele Polymorphismen detektiert, die jedoch bereits in der NCBI-Datenbank bekannt waren und deshalb nicht näher untersucht wurden. Die zu dem damaligen Zeitpunkt noch unbekanntem Missense-Veränderungen p.R20H und p.K992R, die jeweils in einem Patienten nachgewiesen werden konnten, sind mittlerweile

als Polymorphismen in der NCBI-Datenbank aufgenommen worden (NCBI dsSNP Build 130). Über die Frequenz dieser Polymorphismen liegen allerdings noch keine Daten vor.

Der Polymorphismus p.R20H (c.59G>A, refSNP ID: rs79740039) wurde in zwei von 100 getesteten Kontrollproben detektiert. Daraus ergibt sich für die hier erhobenen Daten eine Frequenz von 98% für den Genotyp G/G und 2% für den Genotyp G/A. Zudem ist diese Aminosäure-Position im Senataxin nicht stark konserviert (Abb. 14, S. 47).

Der Polymorphismus p.K992R (c.2975A>G, refSNP ID: rs61742937) konnte in heterozygoter Form in zwei von 50 Kontrollproben gefunden werden. Hieraus folgt für diesen Polymorphismus eine Frequenz von 96% für den Genotyp A/A und von 4% für den Genotyp A/G für das kleine hier untersuchte Kontroll-Kollektiv. Zusätzlich wiesen dieselben zwei Kontrollproben eine heterozygote Insertion des Trinukleotids GAT auf, das auf Protein-Ebene fünf existierende Asparaginsäureresten um einen weiteren Asparaginsäurerest verlängert (c.3072_3073insGAT, p.D1024_E1025insD). Diese Art Längen-Polymorphismus ist zuvor noch nicht für das Senataxin beschrieben worden. Allerdings scheint dieser Bereich, genauso wie die Aminosäure-Position 992 des Senataxins nicht sehr stark konserviert zu sein (Abb. 14, S. 47).

Nonsense-Mutation und kleinere Deletionen

Für das *SETX*-Gen sind eine Vielzahl von Nonsense- und Leseraster-Mutationen bekannt (Abb. 13, S. 45). Auffällig ist hier, dass diese Mutationen gehäuft in dem großen Exon 10 des *SETX*-Gens auftreten.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Nonsense-Mutation p.R1606X, eine 2 bp-Deletion (c.4095_4096delTT, p.S1366X) und zwei 4 bp-Deletionen (c.4633_4636del AGTG, p.S1545AfsX26, c.5308_5311delGAGA, p.E1770IfsX15) identifiziert werden. Diese Mutationen befinden sich ebenfalls in Exon 10 und 11 des *SETX*-Gens. Auf Protein-Ebene würden diese Mutationen, falls die Transkripte nicht dem NMD unterliegen, zu verkürzten Proteinen führen, denen die komplette Helikasedomäne fehlt.

Spleißmutation

Bisher wurden vier Spleißmutationen für das *SETX*-Gen publiziert (grüne Pfeile, Abb. 13, S. 45) ^(7, 9, 18, 20). Diese Spleißmutationen befinden sich alle innerhalb von Donor-Spleißstellen im *SETX*-Gen. Die Zerstörung der Donor-Spleißstellen hat in der Regel das Überspringen des vorherigen Exons zur Folge.

Literaturabgleich

Literaturabgleiche zeigten, dass vier der 23 durch Sequenzierung identifizierten Veränderungen bereits in Assoziation mit der AOA2 publiziert wurden.

Der Aminosäure-Austausch p.K992R konnte in homozygoter Form bei Patient P2 detektiert werden. Dieser Missense-Austausch ist ebenfalls bereits in der Literatur publiziert worden ⁽¹³⁾. Fogel *et al.* 2006 beschrieb eine Familie in der der Austausch p.K992R mit einer Missense-Mutation (p.H2197R) segregiert. Ein möglicher pathogener Effekt des Austauschs p.K992R konnte in dieser Familie nicht ausgeschlossen werden. Mittlerweile ist diese Missense-Veränderung jedoch als Polymorphismus in der NCBI-Datenbank aufgenommen worden (refSNP ID: rs61742937).

Die Missense-Mutation p.R2444H, die in der DNA-Probe von Patient P2 nachgewiesen wurde und sich in der Helikasedomäne des Senataxins befindet, wurde bereits als krankheitsursächliche Mutation bei einem französischen AOA2-Patienten beschrieben ⁽¹⁵⁾. Interessanterweise ist bei Patient P5 das gleiche Arginin betroffen, dass bei Patient P2 zu Histidin verändert ist, nur dass das neue Codon hier für Cystein kodiert (p.R2444C).

Die 4 bp-Deletion c.5308_5311delGAGA, die compound heterozygot mit der Missense-Mutation p.S1882Y bei Patient P6 gefunden wurde, ist als homozygote Mutation für eine zypriotischen Familie bekannt ⁽¹⁷⁾.

Die 4 bp-Deletion c.6847_6850delACAG, die die Akzeptor-Spleißstelle von Intron 21 verändert, wurde bereits in homozygoter Form für eine algerische Familie beschrieben ⁽⁹⁾.

5.2 Umfangreiche Genveränderungen im *SETX*-Gen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für vier Patienten große, exonübergreifende Deletionen und für einen Patienten eine ~1,3 kb-Insertion im *SETX*-Gen identifiziert werden. Interessanterweise sind alle Deletionsbruchstellen innerhalb von transponierbaren Elementen lokalisiert. Die ~1,3 kb-Insertion besteht sogar insgesamt aus einem transponierbaren Element und stellt eine ganz neue Art von Mutation für das *SETX*-Gen dar.

Fast die gesamte repetitive Sequenz im menschlichen Genom stammt von transponierbaren Elementen ab ⁽³⁵⁾. Transponierbare Elemente, auch Transposons genannt, sind häufig wiederkehrende DNA-Sequenzen, die die Möglichkeit besitzen, ihren Ort im Genom zu verändern (Transposition). Sie sind überall im menschlichen Genom anzutreffen und

machen insgesamt ca. 45% der Sequenz aus. Die transponierbaren Elemente lassen sich in vier Klassen einteilen: die LINE-Elemente („long interspersed nuclear elements“), die SINE-Elemente („short interspersed nuclear elements“), die LTR-Retrotransposons (Retrovirus-ähnliche Elemente mit langen terminalen Wiederholungssequenzen, „long terminal repeats“) und DNA-Transposons⁽³⁵⁾. Es gibt zwei Arten der Transposition. Bei den Retrotransposons, zu denen die LINE-, SINE- und die LTR-Retrotransposons zählen, wird aus RNA-Transkripten durch eine Reverse Transkriptase zuerst eine cDNA-Kopie hergestellt. Diese cDNA-Kopie wandert und integriert sich an einer anderen Stelle ins Genom. Bei den DNA-Transposons wird die Sequenz nicht kopiert, sondern herausgeschnitten und an anderer Stelle ins Genom eingefügt. Besitzen die Elemente die Fähigkeit unabhängig eine Transposition durchzuführen, werden sie als autonom bezeichnet. Anderenfalls handelt es sich um nichtautonome Elemente.

~1,3 kb-Insertion

Die entdeckte ~1,3 kb-Insertion im *SETX*-Gen weist Homologie zu L1HS-Elementen auf. L1HS-Elemente gehören zu den LINE-1-Elementen und sind spezifisch für das menschliche Genom. LINE-Elemente machen ca. 20% des menschlichen Genoms aus und lassen sich in die drei Familien LINE-1, LINE-2 und LINE-3 unterteilen. Nur vollständige LINE-1-Elemente (L1) besitzen noch die Fähigkeit, aktiv Transpositionen durchzuführen⁽³⁵⁾. Aktive L1-Elemente sind etwa 6,1 kb lang und besitzen eine 5'-UTR-Region mit einem internen Polymerase II-Promotor, zwei offene Leseraster (ORF), einen 3'-UTR-Bereich und einen 3'-PolyA-Schwanz. Das erste offene Leseraster kodiert ein RNA-bindendes Protein und das zweite kodiert ein Protein mit einer Endonuklease- und einer Reverse-Transkriptase-Aktivität⁽³⁶⁾. In der Literatur sind bereits L1-Retrotranspositionen beschrieben, die mit genetischen Erkrankungen assoziiert werden⁽³⁷⁾, wie z.B. bei der Duchenne Muskeldystrophie⁽³⁸⁾ oder der Hämophilie A⁽³⁹⁾. Der Mechanismus, nach dem die L1-Retrotransposition wahrscheinlich abläuft, wird als „target primed reverse transcription“ (TPRT) bezeichnet⁽⁴⁰⁾. Bei diesem Vorgang wird ein Strang der genomischen DNA an einer bestimmten Konsensus-Zielsequenz (3'-A/TTTT-5') von der L1-Endonuklease geschnitten, sodass eine freie 3'-OH-Gruppe entsteht. Diese 3'-OH-Gruppe dient dann als Primer für die reverse Transkription der L1-RNA durch die L1-Reverse Transkriptase. Nach der reversen Transkription wird der zweite Strang der genomischen DNA geschnitten und es erfolgt die Integration der entstandenen cDNA in die genomischen DNA⁽⁴¹⁾. Es gibt verschiedene charakteristische Merkmale, die bei der

Insertions-Mutagenese auf eine L1-vermittelte Retrotransposition hinweisen. So sind integrierte L1-Elemente meist am 5'-Ende unvollständig (trunkiert), besitzen einen 3'-PolyA-Schwanz und werden von einer kurzen Zielsequenzduplikation („target site duplication“, TSD), die in der Regel nicht länger als 20 bp ist, flankiert ⁽³⁷⁾. Die ~1,3 kb-Insertion, die im *SETX*-Gen detektiert wurde, zeigt ebenfalls typische Merkmale der L1-vermittelten Retrotransposition. So wurde das L1HS-Element an der Schnittstelle 3'-A/TTTGT-5' in die Zielsequenz integriert. Es handelt sich bei der ~1,3 kb-Insertion um ein 5'-trunkiertes L1HS-Element, dessen vorderer Teil in Antisense-Orientierung und dessen hinterer Teil in Sense-Orientierung bezogen auf das *SETX*-Gen angeordnet ist. Zusätzlich besitzt die ~1,3 kb-Insertion am 3'-Ende einen PolyA-Schwanz und ist von einer 15 bp Zielsequenzduplikation umgeben. L1-Elemente können bezogen auf das betroffene Gen in entgegengesetzter Richtung oder in gleicher Orientierung integriert werden ⁽³⁷⁾. Es sind jedoch auch L1-vermittelte Retrotranspositionen beschrieben, bei denen das inserierte L1-Element, so wie in unserem Fall „neu angeordnet“ (invertiert) wurde ^(38, 39). Dieses Phänomen wird durch eine Variante des TPRT-Mechanismus, dem so genannten „Twin priming“, erklärt. Der Unterschied zum TPRT-Mechanismus liegt darin, dass bei dem „Twin priming“ die Spaltung des zweiten DNA-Stranges bereits während der reversen Transkription der L1-RNA erfolgt. Die dadurch entstehende überhängende Sequenz am 3'-Ende der Schnittstelle dient dann als zweiter Primer, der an die interne L1-RNA bindet und hier eine reverse Transkription startet ^(41, 42). Auch für den „Twin priming“-Mechanismus gibt es charakteristische Merkmale ⁽⁴²⁾, die in dem Fall der ~1,3 kb-Insertion wieder zu finden sind. So sind die vier Nukleotide am 3'-Ende der Schnittstelle des zweiten DNA-Stranges komplementär zu den Nukleotiden des invertierten L1-Abschnittes und am Inversionspunkt gibt es fünf Nukleotide, die theoretisch vom in Antisense- oder Sense-Orientierung angeordneten L1-Element abstammen könnten. Demnach deutet alles darauf hin, dass die ~1,3 kb-Insertion durch L1-Endonuklease abhängige Retrotransposition nach dem Mechanismus des „Twin primings“ entstanden ist. Zudem scheint diese Insertion stabil vererbt zu werden, da die identische Insertion auch in der paternalen DNA des Patienten nachgewiesen werden konnte.

Die ~1,3 kb-Insertion bedingt auf mRNA-Ebene zwei Spleißvarianten. RNA-Analysen mit Primern aus Exon 11 und Exon 13 des *SETX*-Gens führten neben dem Wildtyp-Transkript, das die Exons 11 bis 13 enthält, zu zwei veränderten Transkripten. Die Insertion scheint die Akzeptor-Spleißstelle von Intron 11 zu zerstören. Dem ersten Transkript fehlen 66 Basen des Exons 12. Hier scheint eine alternative Spleißstelle innerhalb von Exon 12

genutzt zu werden. Dem zweiten Transkript hingegen fehlt das komplette Exon 12. In diesem Fall kommt es also durch die Zerstörung der Spleißstelle zu einem Überspringen des Exons. Auf Protein-Ebene führt die Deletion der 66 Basen zu einem Protein, dem 22 Aminosäuren fehlen (p.V1792_L1813del), während die Deletion des Exon 12 zu einem Protein führt, dem 58 Aminosäuren fehlen (p.V1792_M1850delinsV). Es entsteht also in beiden Fällen ein verkürztes Protein, dessen ursprüngliches Leseraster erhalten bleibt. Bislang ist für diesen Bereich des Senataxins keine Funktion bekannt. Dennoch wird davon ausgegangen, dass Deletionen so großer Bereiche einen Effekt auf die Faltung und somit die Funktion des Proteins haben können. Im β III-Spectrin sind z.B. zwei Deletionen von 13 und fünf Aminosäuren beschrieben, die eine autosomal-dominante Form der Ataxie, die Spinocerebelläre Ataxie Typ 5, verursachen⁽⁴³⁾.

Exonübergreifende Deletionen

In der vorliegenden Arbeit konnten drei umfangreiche Deletionen im *SETX*-Gen identifiziert werden, die mehrere Kilobasen genomischer DNA umfassen. Eine schematische Darstellung dieser Deletionen ist in Abb. 16, S. 54 gezeigt.

Es gibt zwei Mechanismen, die für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen verantwortlich sind: die ungleiche homologe Rekombination und die nicht-homologe Rekombination⁽⁴⁴⁾. Während für die genomische Integrität die korrekte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen erforderlich ist, können umfangreiche Genomstrukturierungen durch eine Fehlpaarung von DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen. Umfangreiche Genomstrukturierungen werden häufig mit Hotspots für Rekombinationen assoziiert. Solche Hotspots sind DNA-Sequenzen, die entweder eine ungleiche homologe Rekombination oder eine nicht-homologe Rekombination begünstigen⁽⁴⁵⁾. In der Literatur wurden bisher viele umfangreiche Deletionen beschrieben, die durch Rekombinationen zwischen repetitiven Elementen entstanden sind^(45, 46). Eine besondere Rolle scheinen hier die Alu-Elemente einzunehmen. Alu-Elemente gehören zu den SINE-Elementen („short interspersed nuclear elements“), die etwa 13% des menschlichen Genoms ausmachen. Die SINE-Elemente lassen sich in drei Subklassen einteilen: die Alu-Elemente, die die größte Untergruppe der SINE-Familie darstellen, die MIR-Elemente („mammalian-wide interspersed repeat“) und die MIR3-Elemente⁽³⁵⁾.

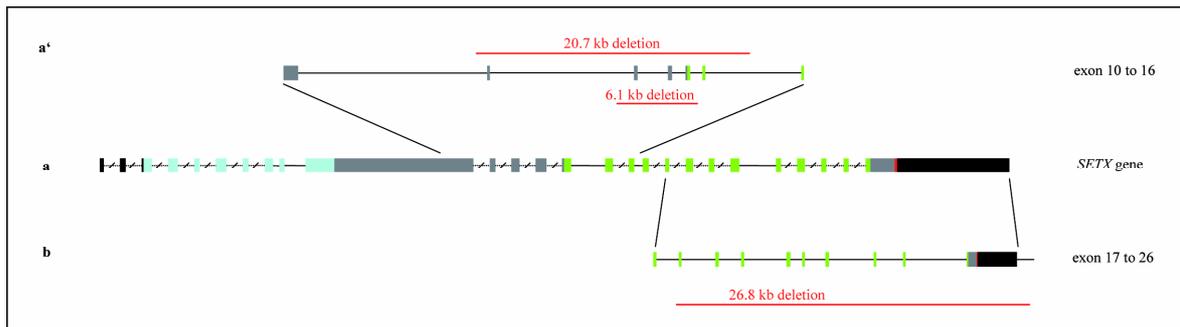


Abb. 16: (a) Schematische Darstellung des *SETX*-Gens.

(a') Exon 10 bis 16 des *SETX*-Gens. Die ~6,1 kb- und die ~20,7 kb-Deletionen sind maßstabsgetreu dargestellt.

(b) Exon 17 bis 26 des *SETX*-Gens. Die ~26,8 kb-Deletion ist maßstabsgetreu dargestellt und reicht bis in einen Bereich der 3' des Gens gelegen ist.

(modifiziert nach Bernard *et al.* 2009)

Die Alu-Element vermittelte homologe Rekombination, also eine durch Fehlpaarung homologer Alu-Elemente generierte Rekombination, scheint eine häufige Ursache genetischer Erkrankungen zu sein⁽⁴⁷⁾. So sind z.B. viele umfangreiche Deletionen im Gen für den LDL-Rezeptor beschrieben, die mit der familiären Hypercholesterinämie assoziiert werden^(48, 49).

Es wird aber auch von einem Einfluss der Alu-Elemente auf die nicht-homologe Rekombination berichtet. Alu-Elemente besitzen eine 26 bp Kernsequenz (5'-CCTGTAATC-CCAGCACTTTGG-GAGGC-3'), die wahrscheinlich einen rekombinogenen Effekt hat und somit einen Hotspot für homologe und nicht-homologe Rekombinationen darstellt⁽⁴⁶⁾. Zusätzlich enthält diese 26 bp Kernsequenz das Pentanukleotid CCAGC, das auch Teil der 8 bp langen Chi-Sequenz ist, die die RecBC vermittelte Rekombination in *E. coli* stimuliert⁽⁴⁶⁾. Es wurde eine Reihe von Deletionen beschrieben, die durch eine nicht-homologe Rekombination zwischen einem Alu-Element und einem „Nicht-Alu-Element“ entstanden sind^(46, 49). Ein Beispiel hierfür sind Deletionen im α -Globin Cluster, die eine Form der Thalassämie hervorrufen⁽⁵⁰⁾. Häufig werden die Deletionen, die durch nicht-homologe Rekombination entstanden sind, von kurzen Insertionen oder Duplikationen begleitet⁽⁴⁴⁾.

Bei der Betrachtung der drei in dieser Arbeit entdeckten Deletionen fällt auf, dass sich alle Deletionsbruchpunkte innerhalb von transponierbaren Elementen befinden (Tabelle 12, S. 55). Bemerkenswert ist außerdem, dass mindestens ein Alu-Element in das Deletionsereignis involviert ist.

Tabelle 12: Transponierbare Elemente an den Deletionsbruchpunkten

Deletion	5'-Bruchpunkt		3'-Bruchpunkt	
	Intron	Element	Intron	Element
~6,1 kb	11	Alu (AluSq)	14	Alu (AluSz)
~20,7 kb	10	L1 (L1MB7)	15	Alu (AluJr)
~26,8 kb	17	LTR (MLT1K)	3' des Gens	Alu (AluSx1)

~6,1 kb-Deletion

Bei der entdeckten ~6,1 kb-Deletion zwischen Intron 11 und Intron 14 des *SETX*-Gens befinden sich beide Bruchstellen innerhalb von Alu-Elementen (Tabelle 12, S. 55). Beide Alu-Elemente sind in Antisense-Orientierung, bezogen auf das *SETX*-Gen, angeordnet. Das 5' gelegene AluSq-Element weist eine starke Homologie zu dem 3' gelegenen AluSz-Element auf. Das AluSq-Element enthält die 26 bp Kernsequenz (5'-CCTGTAATC-CCAGCACTTTGG-GAGGC-3'), von der berichtet wird, dass sie Rekombinationen begünstigt ⁽⁴⁶⁾. Das AluSz-Element beinhaltet, abgesehen von einem Basenaustausch, die gleiche 26 bp Kernsequenz (5'-CCTGTAATC-CCAGCACTT**C**GG-GAGGC-3'). Im Fall der ~6,1 kb-Deletion hat sich die Rekombination genau zwischen diesen beiden Kernsequenzen ereignet. Dadurch kommt es an der neuen Verbindungsstelle zu einer 28 bp Mikrohomologie, d.h. einem Bereich, bei dem nicht zu unterscheiden ist, von welchem Alu-Element die Sequenz ursprünglich abstammt (Abb. 8 a, S. 33). Die Daten sprechen dafür, dass die ~6,1 kb-Deletion durch Fehlpaarung dieser homologen Alu-Elemente und somit durch den Mechanismus der homologen Rekombination entstanden ist.

Die ~6,1 kb-Deletion, die auf cDNA-Ebene die Exons 12 bis 14 umfasst, führt auf mRNA-Ebene zu zwei Spleißvarianten. Die RT-PCR mit Primern aus Exon 11 und 16 führte neben dem Wildtyp-Transkript, das die Exons 11 bis 16 enthält, zu zwei weiteren Transkripten. Dem ersten veränderten Transkript fehlen die Exons 12 bis 14, während bei dem zweiten Transkript die Exons 12 bis 15 deletiert sind. Auf genomischer Ebene existiert die Akzeptor-Spleißstelle von Intron 14 demnach noch vollständig und scheint teilweise funktionell zu sein. Die Deletion von Exon 12 bis 14 verändert das Leseraster und führt, wenn es nicht dem NMD unterliegt, auf Protein-Ebene zu einem verkürzten Protein, dem die gesamte Helikasedomäne fehlt (p.V1792EfsX31). Bei der Deletion der Exons 12 bis 15 bleibt das ursprüngliche Leseraster erhalten. Auf Protein-Ebene entsteht hier ein verkürztes Protein, bei dem die Aminosäuren an der Position 1792 bis 2035 deletiert sind und somit die ersten Aminosäuren der Helikasedomäne fehlen (p.V1792_L2035del).

~20,7 kb-Deletion

Die 5'-Bruchstelle der ~20,7 kb-Deletion zwischen Intron 10 und Intron 15 des *SETX*-Gens liegt in einem L1-Element (L1MB7), während die 3'-Bruchstelle in einem AluJr-Element lokalisiert ist (Tabelle 12, S. 55). Das L1MB7-Element und das AluJr-Element weisen keinerlei Homologie zueinander auf (Abb. 8 b, S. 33). Allerdings enthält das AluJr-Element ebenfalls bis auf einen Basenaustausch die 26 bp Kernsequenz (5'-CCTGTAATC-CCAGCACTT**C**GG-GAGGC-3') und der 3'-Bruchpunkt liegt genau in dieser Sequenz. Es wird daher davon ausgegangen, dass die ~20,7 kb-Deletion durch eine nicht-homologe Rekombination entstanden ist und diese durch das AluJr-Element begünstigt wurde.

Die ~20,7 kb-Deletion bedingt auf mRNA-Ebene eine Spleißvariante. Die RT-PCR mit Primern aus Exon 10 und Exon 16 führte bei Patient P10 neben dem Wildtyp-Transkript zu einem veränderten Transkript, dem die Exons 11 bis 15 fehlen. Die Deletion der Exons 11 bis 15 hat einen Leserasterverschub zur Folge und führt, wenn das Transkript nicht dem NMD unterliegt, auf Protein-Ebene zu einem verkürzten Protein, dem die gesamte Helikasedomäne fehlt (c.5274+13396_6107-3547del20729bp, p.V1759EfsX6).

~26,8 kb-Deletion

Die 5'-Bruchstelle der ~26,8 kb-Deletion liegt in Intron 17 des *SETX*-Gens und ist in einem LTR-Element (MLT1K) lokalisiert. Die 3'-Bruchstelle befindet sich zwischen dem *SETX*-Gen und dem *NTNG2*-Gen innerhalb eines AluSx1-Elements (Tabelle 12, S. 55). In diesem Fall ist ebenfalls keinerlei Homologie zwischen den beiden transponierbaren Elementen zu beobachten (Abb. 8 c, S. 33). Allerdings führt das Rekombinationsereignis hier neben der Deletion zu der Insertion des Dinukleotids AG (AL159997.14:g.48148_74944del26797bpinsAG). Das AluSx1-Element enthält auch hier die rekombinogene 26bp Kernsequenz (5'-CCTGTAATC-CCAGCACTTTGG-GAGGC-3'). In diesem Fall liegt die 3'-Bruchstelle zwar in dem AluSx1-Element, jedoch nicht innerhalb der Kernsequenz. Dennoch wird vermutet, dass auch diese Deletion durch eine nicht-homologe Rekombination entstanden ist, die durch die Kernsequenz stimuliert wurde.

Der Effekt dieser Mutation auf mRNA-Ebene konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, da keine RNA-Probe des Patienten zur Verfügung stand.

Somit konnten für alle drei Deletionen Merkmale typischer Rekombinationen nachgewiesen werden. Dennoch gibt es höchst wahrscheinlich noch eine Reihe von anderen Faktoren, die in die komplexen Prozesse der Rekombinationsmechanismen mit einfließen. So sind zahlreiche weitere rekombinogene Sequenzmotive bekannt⁽⁴⁵⁾. Außerdem scheint die Ausbildung von Sekundärstrukturen repetitiver Elemente an den Einzelstrang-Enden der Bruchpunkte eine wichtige Rolle bei dem Rekombinationsereignis einzunehmen⁽⁵¹⁾.

In der Literatur wurden bisher fünf umfangreiche Deletionen und eine ~10 kb-Duplikation im *SETX*-Gen publiziert, die mit der AOA2 assoziiert werden^(7, 9, 10, 16). Die ~10 kb-Duplikation ist durch homologe Rekombination zwischen zwei AluY-Elementen entstanden⁽¹⁶⁾. Die Tatsache, dass sowohl Deletionen als auch Duplikationen Ergebnisse homologer Rekombinationen sind, wurde ebenfalls bereits beschrieben^(49, 52). Für das LDL-Rezeptorgen ist z.B. eine Duplikation bekannt, die Folge einer homologen Rekombination zwischen zwei Alu-Elementen ist und die familiären Hypercholesterinämie verursacht⁽⁵³⁾.

Neben dem rekombinogenen Effekt einzelner transponierbarer Elemente scheint auch der prozentuale Gehalt an transponierbaren Elementen in einem Gen einen Einfluss auf die Entstehung von umfangreichen Genveränderungen zu haben. Im Jahr 2008 zeigten van Zelm *et al.*, dass ein hoher Gehalt an transponierbaren Elementen (>40%) mit einer höheren Frequenz an umfangreichen Deletionen assoziiert ist. Außerdem befinden sich die Deletionsbruchpunkte überwiegend in den Subklassen derjenigen transponierbaren Elemente, die bezogen auf die normale Verteilung im Genom überrepräsentiert sind⁽⁵⁴⁾. Im *SETX*-Gen stellen die transponierbaren Elemente 47,5% der genomischen Sequenz dar. Zusätzlich ist der Gehalt an Alu-Elementen mit ~24% sehr hoch, da diese nur ~10% des menschlichen Genoms ausmachen⁽³⁵⁾.

Bei 6 von den 66 in der Literatur für die AOA2 beschriebenen Mutationen (9,1%) handelt es sich um umfangreiche Genveränderungen, die wahrscheinlich durch Rekombinationen zwischen transponierbaren Elementen entstanden sind. In dieser Arbeit konnten insgesamt 19 Mutationen im *SETX*-Gen identifiziert werden, die die AOA2 verursachen und von denen einige bereits publiziert wurden^(55, 56). Neben Punktmutationen und kleinen Deletionen, konnten drei umfangreiche Deletionen und eine L1-Insertion detektiert werden, d.h. bei 4 dieser 19 Mutationen (21%) handelt es sich um umfangreiche Genveränderungen. Dieser Unterschied in der Häufigkeit von komplexen Mutationen könnte damit zu erklären sein, dass die Sequenzierung lange die einzige

Untersuchungsmethode für die molekulargenetische Diagnostik der AOA2 war. Umfangreiche Genveränderungen, die in heterozygoter Form vorliegen, können bei der Sequenzierung nicht nachgewiesen werden. Mittlerweile existiert jedoch ein MLPA-Kit für rezessive Ataxien (SALSA MLPA KIT P316-B1, MRC-Holland), das das *SETX*-Gen umfasst, und somit umfangreiche Deletionen und Duplikationen detektieren kann. Die im Nachhinein durchgeführte MLPA-Analyse konnte neben der ~26,8 kb-Deletion auch die anderen beiden umfangreichen Deletionen bestätigen. Allerdings konnte die L1-Insertion mit Hilfe des MLPA-Kits nicht nachgewiesen werden, da sie außerhalb der Bindungsstelle für die MLPA-Sonde lag. Demnach würden so komplexe Mutationen, wie die L1-Insertion, weiterhin übersehen werden, sofern sie nicht die direkte Bindungsstelle der MLPA-Sonde verändern.

Die hier erhobenen Daten deuten darauf hin, dass umfangreiche Genveränderungen im *SETX*-Gen eine häufige Ursache der AOA2 sein können.

5.3 Identische Mutationen in nicht verwandten Patienten

Haplotyp-Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Mutationen im *SETX*-Gen detektiert werden, die jeweils in zwei nicht verwandten Patienten gefunden wurden. Um die Frage zu klären, ob die Entstehung dieser Mutationen auf einen Gründer-Effekt zurückzuführen ist, wurden die Haplotypen für den 5,4 cM Bereich zwischen den Kopplungsmarkern D9S159 und D9S1793 auf Chromosom 9 bestimmt.

p.R1606X

Die Nonsense-Mutation p.R1606X konnte in heterozygoter Form in den DNA-Proben von Patient P8 und Patient P9 nachgewiesen werden. Die durchgeführte Haplotyp-Analyse zeigte, dass ein gemeinsamer Ursprung dieser Mutation sehr unwahrscheinlich ist (Abb. 11, S. 42).

Vielmehr könnte die Transition C>T des Trinukleotids CGA, die die Generierung eines Stopp-Codons TGA zur Folge hat, durch das CpG-Dinukleotid begünstigt worden sein. Das oft methylierte Cytosin (5-Methylcytosin) des CpG-Dinukleotids ist chemisch instabil und neigt zur Desaminierung, wodurch ein Thymin entsteht. Bei einem beachtlichen Teil

an Einzelnukleotid-Veränderungen, die genetische Erkrankungen verursachen, handelt es sich um C>T-Transitionen bzw. um G>A-Transitionen auf dem komplementären DNA-Strang⁽⁵⁷⁾. Deshalb wird vermutet, dass Transitionen an einem CpG-Dinukleotid häufiger und wiederkehrend, d.h. durch unabhängige Ereignisse, auftreten können.

Zwei weitere Beispiele für Sequenzveränderungen im *SETX*-Gen, die möglicherweise durch CpG-Dinukleotide begünstigt wurden, sind die Einzelnukleotid-Veränderungen an den Aminosäure-Positionen 2414 und 2444 des Senataxins.

In der vorliegenden Arbeit konnte an der Aminosäure-Position 2414 ein Austausch von Arginin zu Glutamin (p.R2414Q) identifiziert werden. Des Weiteren ist eine Nonsense-Mutation (p.R2414X) für einen französischen Patienten beschrieben, die an derselben Aminosäure-Position das Arginin zu einem Stopp-Codon verändert⁽¹⁰⁾. Das Trinukleotid CGA wird also im ersten Fall durch eine G>A-Transition der zweiten Base zu einem Glutaminrest (CAA) verändert und im zweiten Fall verursacht eine C>T-Transition der ersten Base den Austausch zu einem Stopp-Codon (TGA).

Weiter wurden die beiden Missense-Mutationen p.R2444H und p.R2444C in den DNA-Proben von zwei nicht verwandten Patienten identifiziert. Hier wird das Arginin (CGT) an der Aminosäure-Position 2444 des Senataxins durch eine C>T-Transition der ersten Base zu einem Histidin (TGT) bzw. durch eine G>A-Transition der zweiten Base zu Cystein (CAT) verändert. Die Missense-Mutation p.R2444H wurde zusätzlich auch für einen Patienten aus Frankreich beschrieben⁽¹⁵⁾. Demnach führten drei scheinbar unterschiedliche Ereignisse an diesem CpG-Dinukleotid zu der Generierung von krankheitsursächlichen Mutationen.

Die Haplotyp-Analyse für Patient P9 führte zu einer weiteren interessanten Entdeckung. Patient P9 ist compound heterozygot für die Nonsense-Mutation p.R1606X und die ~6,1 kb-Deletion. Die Nonsense-Mutation erbte Patient P9 von seiner Mutter M9, die heterozygote Trägerin der Mutation ist. Auf dem maternalen Allel konnte eine Rekombination beobachtet werden (Abb. 11, S. 42). Die gesunde Schwester S9 von Patient P9 weist weder die Nonsense-Mutation noch die ~6,1 kb-Deletion auf, trägt aber den gleichen paternalen Haplotyp wie Patient P9. Dies lässt vermuten, dass es sich bei der ~6,1 kb-Deletion um eine Neumutation handelt, die durch eine homologe Rekombination zwischen zwei Alu-Elementen entstanden ist. Allerdings konnte diese Hypothese nicht überprüft werden, da keine Probe des Vaters für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand.

~20,7 kb-Deletion

Die ~20,7 kb-Deletion konnte in heterozygoter Form in der DNA-Probe von Patient P10 nachgewiesen werden, der diese Mutation wahrscheinlich von seinem Vater erbte. Leider war es nicht möglich, eine Probe des Vaters zu bekommen. Patient P11 ist sogar homozygot für diese Deletion. Die Eltern von Patient P11 sind beide heterozygote Träger dieser Deletion. Um die Frage zu klären, ob die Deletion auf einem gemeinsamen Gründereffekt beruht, wurden Haplotyp-Analysen durchgeführt (Abb. 12, S. 43). Ein gemeinsamer Ursprung kann bei den Patienten P10 und P11 nicht vollständig ausgeschlossen werden, da alle drei Allele für die Marker D9S1847 und D9S1830 übereinstimmten. Die Bestimmung der Allelfrequenz dieser beiden Marker in 90 Kontrollproben (180 Allele) zeigte allerdings, dass es sich in beiden Fällen um häufig auftretende Allele handelt.

Bisher wurden noch keine Fälle beschrieben, bei denen nicht verwandte Patienten dieselbe umfangreiche Deletion tragen. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass solche Mutationen in der Vergangenheit aufgrund von Detektionsschwierigkeiten „übersehen“ wurden. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die nicht-homologe Rekombinationen wiederkehrend auftreten können, zumal den Alu-Elementen ein rekombinogener Effekt nachgesagt wird. Zusammenfassend lassen die Daten jedoch darauf schließen, dass ein gemeinsamer Ursprung der ~20,7 kb-Deletion eher unwahrscheinlich ist.

5.4 Klinische Daten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für 12 Patienten, die klinische Symptome der AOA2 zeigten, die Diagnose der AOA2 auch molekulargenetisch bestätigt werden. Einige klinische Daten dieser 12 Patienten sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

In dem kleinen hier untersuchten Patientenkollektiv von 12 AOA2-Patienten war die Geschlechterverteilung gleich. Das entspricht den Erwartungen bei einem autosomal-rezessiven Erbgang, da die genetischen Veränderungen hier unabhängig vom Geschlecht vererbt werden. Der Erkrankungsbeginn der Patienten lag zwischen dem 8. und 21. Lebensjahr mit einem mittleren Erkrankungsalter von 14,5 Jahren. Alle 12 Patienten zeigten Symptome einer cerebellären Ataxie und wiesen eine Neuropathie auf. Weiter konnte bei 10 von 12 Patienten (83%) eine okulomotorische Apraxie beobachtet werden,

während nur bei einem Patienten pyramidale Zeichen nachzuweisen waren. MRT-Untersuchungen bestätigten in allen elf getesteten Patienten eine cerebelläre Atrophie.

Tabelle 13: Klinische Zeichen und morphologische Veränderungen

Patient	Geschlecht	Erkrankungsbeginn	Cerebelläre Ataxie	OA	Neuropathie	Pyramidale Zeichen	MRI
Nr.		[Jahre]					(Atrophie)
1	m	11	ja	ja	ja	nein	Cerebellum
2	w	18	ja	ja	ja	nein	Cerebellum
3	w	8	ja	ja	ja	nein	n.b.
4	w	17	ja	nein	ja	ja	Cerebellum
5	m	11	ja	ja	ja	nein	Cerebellum
6	m	12	ja	ja	ja	nein	Cerebellum
7	w	20	ja	ja	ja	nein	Cerebellum
8	m	12	ja	ja	ja	nein	Cerebellum
9	m	15	ja	ja	ja	nein	Cerebellum
10	m	17	ja	ja	ja	nein	Cerebellum
11	w	12	ja	nein	ja	nein	Cerebellum
12	w	21	ja	ja	ja	nein	Cerebellum

Legende:

m/w = männlich/weiblich

OA = okulomotorische Apraxie

n.b. = nicht bekannt

Tabelle 14: Erkrankungsdauer und Laborparameter

Patient	Geschlecht	Alter	Erkrankungsdauer	AFP	Cholesterol	CK
Nr.		[Jahre]	[Jahre]	[< 5 ng/ml]	[< 220 mg/dl]	[< 171U/l]
1	m	18	7	15,7	209	81
2	w	54	36	164	321	88
3	w	40	32	145	239	112
4	w	21	4	34	284	263
5	m	35	24	21,4	207	97
6	m	26	14	38	194	normal
7	w	22	2	n.b.	n.b.	n.b.
8	m	25	13	9,7	179	138
9	m	28	13	12,6	normal	193
10	m	29	12	56	155	220
11	w	33	21	32	n.b.	171
12	w	24	3	45,9	215	188

Legende:

m/w = männlich/weiblich

AFP = alpha-Fetoprotein

CK = Creatinkinase

n.b. = nicht bekannt

Neben den klinischen Symptomen können laborchemische Parameter wichtige Kriterien für die molekulargenetische Diagnostik rezessiver Ataxien darstellen. Die Laborparameter

der 12 Patienten sind in Tabelle 14 aufgeführt. In allen elf getesteten Patienten konnte ein erhöhter α -Fetoproteinspiegel im Serum festgestellt werden. Allerdings war die Spannweite mit Werten zwischen 9,7 ng/ml bis 164 ng/ml hier sehr groß (Mittelwert: 52,2 ng/ml). In 3 von 10 Patienten konnte ein erhöhter Cholesterinspiegel nachgewiesen werden und 4 von 11 Patienten wiesen einen erhöhten Creatinkinase-Wert auf.

Im Jahr 2009 veröffentlichten Anheim *et al.* eine klinische Studie zur AOA2 ⁽¹⁰⁾. Diese Studie umfasst 90 AOA2-Patienten aus 15 verschiedenen Ländern und beschreibt somit das bisher größte Patientenkollektiv für die AOA2. Aus diesem Grund werden die klinischen Daten der 12 Patienten in der vorliegenden Arbeit anlehnend an diese Studie ausgewertet (Tabelle 15, S. 62).

Tabelle 15: Klinische Daten im Vergleich zu Anheim *et al.* ⁽¹⁰⁾

AOA2	Anheim <i>et al.</i> 2009	Daten dieser Arbeit
Anzahl der Patienten	90	12
Erkrankungsalter [Jahre]	14,0 (7 bis 25)	14,5 (8 bis 21)
Cerebelläre Ataxie	100%	100%
Neuropathie	97,5%	100%
Okulomotorische Apraxie	51%	83%
Pyramidale Zeichen	20,5%	8,3%
Erhöhtes α -Fetoprotein	99%	100% (11 Patienten)
Erhöhte Creatinkinase	13% (3 von 23 Patienten)	36% (4 von 11 Patienten)

Das mittlere Erkrankungsalter lag bei unseren Patienten bei 14,5 Jahren und entspricht somit den Angaben aus der oben genannten Studie. Damit liegt das mittlere Erkrankungsalter bei der AOA2 über dem mittleren Erkrankungsalter von 7 Jahren bei der Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 1 (AOA1) und 2-3 Jahren bei der Ataxia Teleangiectatica (AT) ^(58, 59). Das mittlere Erkrankungsalter der Friedreich-Ataxie liegt bei 15,5 Jahren, jedoch ist die Spannweite von 2 bis 52 Jahren größer als bei der AOA2 (7-25 Jahre) ^(10, 60).

Cerebelläre Ataxie und Neuropathie konnten in 100% der Patienten beobachtet werden, was ebenfalls mit den zuvor beschriebenen Daten korreliert. Bei der okulomotorischen Apraxie, die in der oben genannten Studie nur in der Hälfte der Patienten nachgewiesen wurde, ist allerdings ein großer Unterschied zu sehen. In dem kleinen hier untersuchten Patientenkollektiv weisen 83% der Patienten eine okulomotorische Apraxie auf, was einem wesentlich höheren Prozentsatz entspricht. Pyramidale Zeichen hingegen konnten nur für einen Patienten nachgewiesen werden (8,3%) und treten demnach seltener auf, als in der von Anheim *et al.* 2009 veröffentlichten Studie.

Ein diagnostisch wichtiger Parameter für die AOA2 ist der α -Fetoproteinspiegel im Serum der Patienten. Das α -Fetoprotein ist eine Hauptkomponente der Plasmaproteine im fetalen Gewebe, über dessen Funktion bisher kaum etwas bekannt ist. Bei gesunden Erwachsenen ist die α -Fetoproteinkonzentration sehr niedrig. In der Studie von Anheim *et al.* 2009 wurde für die 90 AOA2-Patienten ein mittlerer α -Fetoproteinspiegel von 31 ng/ml gemessen, wobei einer der 90 AOA2-Patienten einen normalen α -Fetoproteinspiegel aufwies. Beobachtungen des α -Fetoproteinspiegels einiger Patienten über einen bestimmten Zeitraum zeigten, dass dieser in einigen Fällen in der präsymptomatischen Phase der AOA2 ansteigen kann, sich dann jedoch stabilisiert⁽¹⁰⁾. Insgesamt konnte also in 99% der 90 AOA2-Patienten ein erhöhter α -Fetoproteinspiegel nachgewiesen werden. In dem hier untersuchten kleinen Kollektiv wiesen 100% der Patienten einen erhöhten α -Fetoproteinspiegel auf, allerdings war die Spannbreite dieser Werte sehr groß und es muss beachtet werden, dass die Werte in unterschiedlichen Laboren gemessen wurden. Insgesamt scheint das α -Fetoprotein jedoch einen guten Biomarker für die AOA2 darzustellen. Die Frage, ob erhöhte α -Fetoproteinspiegel einen pathogenen Effekt haben, oder ob es sich hier lediglich um einen Marker handelt, bleibt jedoch zum jetzigen Zeitpunkt offen. Für AT-Patienten wird ebenfalls ein erhöhter α -Fetoproteinspiegel beobachtet, der im Verlauf der Erkrankung sogar noch weiter ansteigen kann⁽⁶¹⁾. Im Gegensatz zur AT wird bei der AOA2 jedoch keine gesteigerte Sensitivität auf ionisierende Strahlung und keine Anfälligkeit zur Tumorentwicklung beobachtet⁽³⁰⁾.

In selteneren Fällen können auch erhöhte Creatinkinase-Konzentrationen im Serum der AOA2-Patienten beobachtet werden^(5, 6). In der Studie von Anheim *et al.* 2009 zeigten 3 von 23 Patienten (13%) einen leicht erhöhten Creatinkinase-Wert, während in der vorliegenden Arbeit 4 von 11 Patienten (36%) eine erhöhte Konzentration an Creatinkinase aufwiesen.

Genotyp/Phänotyp-Korrelation

Über eine mögliche Genotyp/Phänotyp-Korrelation bei der AOA2 ist wenig bekannt. Anheim *et al.* 2009 zeigten, dass Patienten mit Missense-Mutationen innerhalb der Helikasedomäne einen mildereren Phänotyp aufwiesen, als Patienten mit einer Missense-Mutation außerhalb dieser Domäne oder als Patienten mit „Protein-verkürzenden“-Mutationen. Weiter scheinen die Missense-Mutationen innerhalb der Helikasedomäne häufiger mit pyramidalen Zeichen und Dystonie assoziiert zu sein⁽¹⁰⁾. Eine mögliche

Ursache für die niedrigere Frequenz an pyramidalen Zeichen in Patienten mit Missense-Mutationen außerhalb der Helikasedomäne und in Patienten mit „Protein-verkürzenden“-Mutationen, könnte darin liegen, dass pyramidalen Zeichen durch die schwere Neuropathie übersehen werden. Eine Aussage über die Genotyp/Phänotyp-Korrelation bei der AOA2 gestaltet sich demnach sehr schwierig, besonders, wenn in Betracht gezogen wird, dass die Mutationen oft in compound heterozygoter Form auftreten.

Allerdings spricht der schwere Phänotyp bei Patienten mit Missense-Mutationen außerhalb der Helikasedomäne dafür, dass das Senataxin noch weitere funktionell wichtige Domänen besitzt.

5.5 Heterozygote Missense-Veränderungen

Die Beurteilung von Missense-Veränderungen gestaltet sich in der Molekulargenetik oft sehr schwierig. Nicht immer kann geklärt werden, ob es sich bei einem Missense-Austausch um eine pathogene Veränderung oder lediglich um eine seltene Sequenzvariante handelt. Hilfreich für die Interpretation dieser Veränderungen können Familienanalysen sein. Allerdings sind in unserem Land die Familien heutzutage eher klein, so dass es innerhalb dieser Familien nur einen oder wenige Betroffene gibt. So ist insbesondere bei einem rezessiven Erbgang oft nicht eindeutig zu erkennen, ob die Erkrankung einer genetischen Ursache unterliegt oder ob es sich um einen sporadischen Fall handelt. Weiter kann die Untersuchung von Kontrollproben einen Hinweis auf die Frequenz der Missense-Veränderungen in der deutschen Population geben.

Zudem gibt es Programme wie beispielsweise das Polyphen2-Programm (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), welches dazu dient, den möglichen Einfluss eines kodierenden Aminosäure-Austauschs auf die Struktur und die Funktion eines humanen Proteins abzuschätzen ⁽⁶²⁾. Mit Hilfe dieses Programms kann eine Vorhersage zu pathogenen Effekten von Missense-Veränderungen getroffen werden. Diese Programme gewinnen im Rahmen der sich ständig weiterentwickelnden Sequenzieretechnologie immer mehr an Bedeutung, da z.B. bei der genomweiten Sequenzierung unzählige DNA-Varianten detektiert werden, deren pathogener Effekt beurteilt werden muss ⁽⁶³⁾.

In dieser Arbeit konnte in acht Ataxie-Patienten lediglich eine heterozygote Missense-Veränderungen im *SETX*-Gen nachgewiesen werden (Tabelle 11, S. 38).

Der Missense-Austausch p.L158V konnte in den DNA-Proben von zwei Patienten nachgewiesen werden. Dieser Missense-Austausch befindet sich innerhalb der mutmaßlichen Protein-Interaktionsdomäne und das Leucin an der Aminosäure-Position 158 ist stark konserviert (Abb. 17, S. 65). Von dem PolyPhen2-Programm wird dieser Missense-Austausch als möglicherweise pathogen eingestuft. Dennoch spricht die Tatsache, dass diese Sequenzveränderung in zwei nicht verwandten Patienten aufgetreten ist und in beiden Patienten keine weitere Veränderung im *SETX*-Gen nachgewiesen werden konnte, eher dafür, dass es sich um einen Polymorphismus handelt. Zudem konnte für beide Patienten ein normaler α -Fetoproteinspiegel im Serum nachgewiesen werden. Die Mutter des einen Patienten ist heterozygote Trägerin der Missense-Veränderung und zeigt ebenfalls Symptome einer Ataxie-Erkrankung. In dieser Familie ist demnach eher ein autosomal-dominanter Erbgang anzunehmen und die autosomal-rezessiv vererbte AOA2 wird als Erkrankung ausgeschlossen. Autosomal-dominant vererbte Mutationen im *SETX*-Gen verursachen die amyotrophe Lateralsklerose mit juvenilem Beginn (ALS4)^(11, 23), eine Erkrankung mit einem vollständig anderen klinischen Bild als das der AOA2. Des Weiteren sind die Eltern von AOA2-Patienten in der Regel symptomfreie Anlageträger. Die Frage, ob autosomal-dominant vererbte Mutationen an bestimmten Positionen im *SETX*-Gen ein weiteres Ataxie-Syndrom verursachen können bleibt zu diskutieren.

	L158V	M386T	L584V
Mus_musculus	GIYLF <u>L</u> VHPNE	NMYE <u>E</u> MTLAN	QETH <u>E</u> LQMCLK
Rattus_norvegicus	GIYLF <u>L</u> VHPNE	NMYE <u>E</u> MTLAN	QETH <u>E</u> LQMCLK
Canis_familiaris	-----	-----	-----
Bos_taurus	GIYLF <u>L</u> VHPNE	NMYE <u>E</u> MTLAN	QETH <u>E</u> LQTCLK
Homo_sapiens	GIYLF <u>L</u> VHPNE	NMYE <u>E</u> MTLAS	QETH <u>E</u> LQSCLK
Felis_catus	GIYLF <u>L</u> VHPNE	NMYE <u>E</u> MTLAS	XXXXXXXXXXXX
Gallus_gallus	GIYLF <u>L</u> VHPNE	NMYE <u>D</u> MTLAN	QET <u>Q</u> ELQTCLK
	T760A	D1077N	C1554G
Mus_musculus	MEQV <u>S</u> TSNEDV	EFED <u>S</u> ESQVFE	CKYK <u>D</u> CVETTK
Rattus_norvegicus	LEKV <u>S</u> TSNEDV	EFED <u>S</u> ESQVFE	CKYK <u>D</u> CVETTK
Canis_familiaris	-----	-----	-----
Bos_taurus	LEKV <u>S</u> ASDEDV	EFEE <u>S</u> DSQFFE	CKYK <u>D</u> CVETLK
Homo_sapiens	LEKV <u>S</u> TSNEDV	QFEE <u>S</u> DSQCFE	CKYK <u>D</u> CLETTK
Felis_catus	LEK <u>A</u> STSTEDF	XXXXXXXXXXXX	CKYK <u>D</u> CVAAQ
Gallus_gallus	QET <u>E</u> MVSPAYL	PLED <u>C</u> DSQVFE	CKYK <u>D</u> CTEKVK

Abb. 17: Ausschnitte aus dem Sequenzvergleich der verschiedenen Orthologe des Senataxin. Die Bezeichnung der Missense-Veränderungen ist über den Sequenzen angegeben und die betroffene Aminosäure-Position ist umrandet. Der Sequenzvergleich wurde mit dem ClustalW2-Programm erstellt (EBI, <http://www.ebi.ac.uk>).

Der Missense-Austausch p.M386T konnte in einer DNA-Probe detektiert werden. Dieser Missense-Austausch befindet sich ebenfalls in der Protein-Interaktionsdomäne des Senataxins und betrifft eine Aminosäure-Position, die stark konserviert ist (Abb. 17, S. 65). Nach Einschätzung des PolyPhen2-Programms handelt es sich bei diesem Missense-Austausch um eine pathogene Veränderung. Im Rahmen eines anderen Projektes wurde in der DNA-Probe desselben Patienten der Missense-Austausch p.N736S im *POLG*-Gen gefunden (GenBank Accession-Nummer: NM_002693). Das *POLG*-Gen kodiert für die katalytische Untereinheit der mitochondrialen DNA-Polymerase γ . Mutationen im *POLG*-Gen werden mit einem breiten Spektrum an klinischen Phänotypen assoziiert. So wird z. B. das mitochondriale rezessive Ataxie-Syndrom (MIRAS) durch Mutationen im *POLG*-Gen verursacht ⁽⁶⁴⁾. In der Literatur werden bereits einige Fälle von digener Vererbung diskutiert. Interessanterweise ist bereits ein Fall digener Vererbung beschrieben, bei dem rezessive Mutationen im *POLG*-Gen und im *C10orf2*-Gen, das für das mitochondriale Protein Twinkle kodiert, eine Form der progressiven externen Ophthalmoplegie verursachen ⁽⁶⁵⁾. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Fall der möglichen digenen Vererbung nicht überprüft werden, da leider keine DNA-Proben von Familienangehörigen zur Verfügung standen und bisher keine Kontrollproben auf das Vorhandensein dieser Sequenzveränderung getestet wurden. Demnach kann nicht eindeutig geklärt werden, ob diese Missense-Veränderungen Ursache der ataktischen Bewegungsstörung des Patienten sind.

Der Missense-Austausch p.L584V konnte in heterozygoter Form bei einem Patienten nachgewiesen werden. Der betroffene Aminosäurerest befindet sich in der mutmaßlichen Protein-Interaktionsdomäne und ist stark konserviert (Abb. 17, S. 65). Dieser Missense-Austausch wird von dem PolyPhen2-Programm als pathogen bewertet. Der nicht betroffene Bruder weist an dieser Aminosäure-Position die Wildtyp-Sequenz auf. Dennoch kann ohne eine zweite Veränderung im *SETX*-Gen die Diagnose der AOA2 nicht gestellt werden.

Der Missense-Austausch p. T760A in Exon 10 des *SETX*-Gens konnte in der DNA-Probe eines Patienten detektiert werden. Dieser Austausch ist außerhalb der beiden postulierten funktionellen Domänen des Senataxins lokalisiert und betrifft einen Aminosäurerest der nicht durchgehend konserviert ist (Abb. 17, S. 65). Zusätzlich wird dieser Missense-Austausch von dem PolyPhen2-Programm als nicht pathogen eingestuft. Deshalb wird angenommen, dass es sich hierbei um einen Polymorphismus handelt.

Der Missense-Austausch p.D1077N, der in der DNA-Probe eines Patienten nachgewiesen wurde, befindet sich ebenfalls außerhalb der beiden mutmaßlichen Domänen des Senataxins und ist nicht stark konserviert (Abb. 17, S. 65). Das PolyPhen2-Programm schätzt diese Veränderung als möglicherweise pathogen ein. Für die Eltern des Patienten ist Konsanguinität bekannt. Demnach wäre wahrscheinlich eine homozygote Mutation eher zu erwarten als eine heterozygote Veränderung. Jedenfalls lässt sich der Verdacht der AOA2 ohne eine zweite Veränderung im *SETX*-Gen nicht bestätigen.

Der Missense-Austausch p.C1554G konnte in zwei nicht verwandten Patienten gefunden werden. Dieser Austausch befindet sich nicht in einer der postulierten funktionellen Domänen, der betroffene Aminosäurerest ist aber stark konserviert (Abb. 17, S. 65) und das PolyPhen2-Programm bewertet diesen Austausch als pathogen. Die ebenfalls betroffene Schwester des einen Patienten ist homozygot für den Missense-Austausch. Dieser molekulargenetische Unterschied spricht gegen das Vorliegen einer AOA2, die zudem autosomal-rezessiv vererbt wird. Da die Mutter der beiden Schwestern auch eine ataktische Bewegungsstörung zeigt, ist in dieser Familie eher ein autosomal-dominanter Erbgang anzunehmen. Der zweite Patient, der heterozygot für diese Missense-Veränderung ist, weist einen normalen α -Fetoproteinspiegel im Serum auf. Für diesen Patienten standen leider keine DNA-Proben von Familienangehörigen zur Verfügung, d.h. ohne eine zweite Veränderung im *SETX*-Gen kann die Diagnose der AOA2 auch in diesem Fall nicht bestätigt werden.

In diesen acht Fällen ist eine eindeutige Interpretation der im *SETX*-Gen identifizierten Veränderungen nicht möglich und die molekulargenetische Diagnose der AOA2 kann somit nicht gestellt werden. Da für keinen dieser Patienten eine zweite Veränderung im *SETX*-Gen gefunden werden konnte, wurden keine weiterführenden Untersuchungen an Kontrollproben durchgeführt. Für alle acht Patienten wurde neben der Sequenzierung und der Real-Time-PCR auch eine MLPA-Analyse durchgeführt. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Sequenzvarianten in regulatorischen Elementen in den 5'- und 3'-UTR-Bereichen oder in Intronsequenzen des *SETX*-Gens vorliegen, die möglicherweise einen pathogenen Effekt auf die Expression des Senataxins haben.

5.6 Häufigkeit der AOA2

Insgesamt konnte für 12 von 79 Patienten die klinische Diagnose der AOA2 molekulargenetisch bestätigt werden. Bei allen Patienten lag die Vermutung nahe, dass sie

an einer autosomal-rezessiven Bewegungsstörung leiden. Das Vorliegen einer Friedreich-Ataxie (FRDA) war molekulargenetisch ausgeschlossen worden.

Le Ber et al. 2004 konnten in ihrer Studie für ~8% der Patienten, die an einer autosomal-rezessiv vererbten Ataxie leiden und nicht von der Friedreich-Ataxie betroffen sind, die AOA2 diagnostizieren. Damit scheint die AOA2 nach der Friedreich-Ataxie die zweithäufigste Form der rezessiven Ataxien zu sein ^(6, 9, 10).

In unserem hier untersuchten Kollektiv konnte für ca. 15 % der Patienten die Diagnose der AOA2 molekulargenetisch gesichert werden. Bei acht weiteren Patienten (~10%) konnte nur eine Veränderung im *SETX*-Gen nachgewiesen werden.

Bei 59 der 79 Patienten konnte keine Veränderung im *SETX*-Gen gefunden werden. Mittlerweile konnten allerdings im Rahmen der Diagnostik für drei der 59 Patienten compound heterozygote Mutationen im *APTX*-Gen nachgewiesen werden. Mutationen im *APTX*-Gen werden mit der AOA1 assoziiert ⁽⁵⁸⁾.

Es sind mittlerweile mindestens 20 verschiedene Formen der autosomal-rezessiv vererbten Ataxien bekannt. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die AOA2 in der deutschen Population nach der Friedreich-Ataxie zu den häufigsten Formen der autosomal-rezessiv vererbten Ataxien zu zählen scheint und häufiger auftritt als die AOA1.

5.7 Ausblick

Zu Beginn dieser Arbeit standen 5 Publikationen zur AOA2 zur Verfügung. Mittlerweile sind mindestens 18 Arbeiten zu dieser Ataxie veröffentlicht, von denen zwei Daten aus diesem Projekt zum Inhalt haben. Im Focus weiterer Arbeiten stehen funktionelle Analysen zum Senataxin, über dessen Rolle in der Zelle wenig Konkretes bekannt ist.

Obwohl die genaue Funktion des Senataxins noch nicht geklärt ist, gibt es dennoch eine Reihe zellulärer Prozesse, bei denen dem Senataxin eine wichtige Rolle zugesagt wird. Die C-terminale Domäne des Senataxins ist am stärksten konserviert und weist Homologie zu der Superfamilie 1 der Helikasen auf. Der Verlust der Funktion scheint zu einer abnormalen Prozessierung von RNA zu führen, wie im Hefe-Ortholog Sen1p gezeigt werden konnte ⁽²⁴⁾. Die Helikasefunktion des humanen Senataxins wurde bisher noch nicht nachgewiesen und stellt die Grundlage für ein weiterführendes Projekt dar.

Erste Vorarbeiten funktioneller Analysen zur Helikaseaktivität des Senataxins wurden im Rahmen des hier dargestellten Projektes von mir durchgeführt. Ziel war die Herstellung und Aufreinigung eines rekombinanten Proteins der Helikasedomäne, um in nachfolgenden

Projekten die ATPase- und Helikaseaktivität des Senataxins nachzuweisen und den pathogenen Effekt der identifizierten Mutationen untersuchen zu können.

Zu Beginn wurde mittels PCR an einem humanen cDNA-Klon (DKFZp686E18109) ein Fragment (SETX1) amplifiziert, das die postulierte Helikasedomäne (Aminosäure 1931 bis 2456) enthält. Daraufhin wurden das Fragment sowie ein 6xHis-Tag in den Vektor pGEX-4T-2 kloniert und verschiedene Expressionsbedingungen, wie Expressionsdauer, IPTG-Konzentration und verschiedene Expressionsstämme, ausgetestet. Diese Vorversuche hatten zur Folge, dass die Proteinexpression des pGEX-SETX2-6xHis-Fusionsproteins in den *E. coli* BL21(DE3)-RIL-Zellen mit einer IPTG-Konzentration von 0,25 mM über Nacht durchgeführt wurde. Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte über GST-Sepharose. Ein Western Blot zeigte jedoch, dass die Proteinausbeute sehr gering ist. Eine Aufgabe für die Zukunft ist also in erster Linie größere Mengen an Protein herzustellen, indem entweder die Proteinexpression und Aufreinigung weiter optimiert werden, oder die Anzucht der Zellen in einem viel größeren Maßstab durchgeführt wird. Versuche zur alternativ möglichen His-Tag-Aufreinigung und zur Isolierung des rekombinanten Proteins aus den Einschlusskörperchen sind ebenfalls bereits in Arbeit.

In weiteren Experimenten soll die funktionelle Expression des rekombinanten Senataxinfragments in *E. coli* durch einen ATPase- und Helikasetest bestätigt werden.

Untersuchungen zur Expression und Funktion von Proteinen sind notwendig, um zur Aufklärung der zellulären Mechanismen beizutragen, die zu den krankhaften Veränderungen im Nervensystem führen, um das Krankheitsgeschehen zu begreifen und dadurch Therapieansätze entwickeln zu können.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Palau F, Espinos C. Autosomal recessive cerebellar ataxias. *Orphanet J Rare Dis.* 2006; **1**: 47.
- 2 Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, *et al.* Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science.* 1996; **271**: 1423-7.
- 3 Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, *et al.* A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 1995; **268**: 1749-53.
- 4 Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, *et al.* The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet.* 2001; **29**: 189-93.
- 5 Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Nemeth AH, Le Ber I, Moniz JC, *et al.* Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet.* 2004; **36**: 225-7.
- 6 Le Ber I, Bouslam N, Rivaud-Pechoux S, Guimaraes J, Benomar A, Chamayou C, *et al.* Frequency and phenotypic spectrum of ataxia with oculomotor apraxia 2: a clinical and genetic study in 18 patients. *Brain.* 2004; **127**: 759-67.
- 7 Criscuolo C, Chessa L, Di Giandomenico S, Mancini P, Sacca F, Grieco GS, *et al.* Ataxia with oculomotor apraxia type 2: a clinical, pathologic, and genetic study. *Neurology.* 2006; **66**: 1207-10.
- 8 Duquette A, Roddier K, McNabb-Baltar J, Gosselin I, St-Denis A, Dicaire MJ, *et al.* Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. *Ann Neurol.* 2005; **57**: 408-14.
- 9 Tazir M, Ali-Pacha L, M'Zahem A, Delaunoy JP, Fritsch M, Nouioua S, *et al.* Ataxia with oculomotor apraxia type 2: a clinical and genetic study of 19 patients. *J Neurol Sci.* 2009; **278**: 77-81.

- 10 Anheim M, Monga B, Fleury M, Charles P, Barbot C, Salih M, *et al.* Ataxia with oculomotor apraxia type 2: clinical, biological and genotype/phenotype correlation study of a cohort of 90 patients. *Brain*. 2009; **132**: 2688-98.
- 11 Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, *et al.* DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet*. 2004; **74**: 1128-35.
- 12 Asaka T, Yokoji H, Ito J, Yamaguchi K, Matsushima A. Autosomal recessive ataxia with peripheral neuropathy and elevated AFP: novel mutations in SETX. *Neurology*. 2006; **66**: 1580-1.
- 13 Fogel BL, Perlman S. Novel mutations in the senataxin DNA/RNA helicase domain in ataxia with oculomotor apraxia 2. *Neurology*. 2006; **67**: 2083-4.
- 14 Lynch DR, Braastad CD, Nagan N. Ovarian failure in ataxia with oculomotor apraxia type 2. *Am J Med Genet A*. 2007; **143A**: 1775-7.
- 15 Anheim M, Fleury MC, Franques J, Moreira MC, Delaunoy JP, Stoppa-Lyonnet D, *et al.* Clinical and molecular findings of ataxia with oculomotor apraxia type 2 in 4 families. *Arch Neurol*. 2008; **65**: 958-62.
- 16 Arning L, Schols L, Cin H, Souquet M, Epplen JT, Timmann D. Identification and characterisation of a large senataxin (SETX) gene duplication in ataxia with ocular apraxia type 2 (AOA2). *Neurogenetics*. 2008; **9**: 295-9.
- 17 Nicolaou P, Georghiou A, Votsi C, Middleton LT, Zamba-Papanicolaou E, Christodoulou K. A novel c.5308_5311delGAGA mutation in Senataxin in a Cypriot family with an autosomal recessive cerebellar ataxia. *BMC Med Genet*. 2008; **9**: 28.
- 18 Schols L, Arning L, Schule R, Epplen JT, Timmann D. "Pseudodominant inheritance" of ataxia with ocular apraxia type 2 (AOA2). *J Neurol*. 2008; **255**: 495-501.

- 19 Airoldi G, Guidarelli A, Cantoni O, Panzeri C, Vantaggiato C, Bonato S, *et al.* Characterization of two novel SETX mutations in AOA2 patients reveals aspects of the pathophysiological role of senataxin. *Neurogenetics*. 2009.
- 20 Fogel BL, Lee JY, Perlman S. Aberrant Splicing of the Senataxin Gene in a Patient with Ataxia with Oculomotor Apraxia Type 2. *Cerebellum*. 2009.
- 21 Haack T, Friday D, Bender A, Rolfs A, Klopstock T. Ataxia oculomotor apraxia type 2: course over 27 years and a novel stop mutation in the senataxin gene. *J Neurol*. 2009; **256**: 1555-7.
- 22 Nakamura K, Yoshida K, Makishita H, Kitamura E, Hashimoto S, Ikeda S. A novel nonsense mutation in a Japanese family with ataxia with oculomotor apraxia type 2 (AOA2). *J Hum Genet*. 2009; **54**: 746-8.
- 23 Zhao ZH, Chen WZ, Wu ZY, Wang N, Zhao GX, Chen WJ, *et al.* A novel mutation in the senataxin gene identified in a Chinese patient with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009; **10**: 118-22.
- 24 Ursic D, Himmel KL, Gurley KA, Webb F, Culbertson MR. The yeast SEN1 gene is required for the processing of diverse RNA classes. *Nucleic Acids Res*. 1997; **25**: 4778-85.
- 25 Chen YZ, Hashemi SH, Anderson SK, Huang Y, Moreira MC, Lynch DR, *et al.* Senataxin, the yeast Sen1p orthologue: characterization of a unique protein in which recessive mutations cause ataxia and dominant mutations cause motor neuron disease. *Neurobiol Dis*. 2006; **23**: 97-108.
- 26 Gorbalenya AE, Koonin EV. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology*. 1993; **3**: 419-29.
- 27 Wang W, Czaplinski K, Rao Y, Peltz SW. The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts. *EMBO J*. 2001; **20**: 880-90.

- 28 Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, *et al.* Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet.* 2001; **29**: 75-7.
- 29 Suraweera A, Becherel OJ, Chen P, Rundle N, Woods R, Nakamura J, *et al.* Senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, is involved in the defense against oxidative DNA damage. *J Cell Biol.* 2007; **177**: 969-79.
- 30 Nahas SA, Duquette A, Roddier K, Gatti RA, Brais B. Ataxia-oculomotor apraxia 2 patients show no increased sensitivity to ionizing radiation. *Neuromuscul Disord.* 2007; **17**: 968-9.
- 31 Steinmetz EJ, Warren CL, Kuehner JN, Panbehi B, Ansari AZ, Brow DA. Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Mol Cell.* 2006; **24**: 735-46.
- 32 Suraweera A, Lim Y, Woods R, Birrell GW, Nasim T, Becherel OJ, *et al.* Functional role for senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, in transcriptional regulation. *Hum Mol Genet.* 2009; **18**: 3384-96.
- 33 den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 2001; **109**: 121-4.
- 34 Maquat LE. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA.* 1995; **1**: 453-65.
- 35 Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; **409**: 860-921.
- 36 Kazazian HH, Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science.* 2004; **303**: 1626-32.
- 37 Chen JM, Stenson PD, Cooper DN, Ferec C. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Hum Genet.* 2005; **117**: 411-27.

- 38 Holmes SE, Dombroski BA, Krebs CM, Boehm CD, Kazazian HH, Jr. A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. *Nat Genet.* 1994; **7**: 143-8.
- 39 Kazazian HH, Jr., Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature.* 1988; **332**: 164-6.
- 40 Luan DD, Korman MH, Jakubczak JL, Eickbush TH. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell.* 1993; **72**: 595-605.
- 41 Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet.* 2001; **35**: 501-38.
- 42 Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res.* 2001; **11**: 2059-65.
- 43 Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, *et al.* Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet.* 2006; **38**: 184-90.
- 44 Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis.* 2000; **15**: 289-302.
- 45 Abeysinghe SS, Chuzhanova N, Krawczak M, Ball EV, Cooper DN. Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: Nucleotide composition and recombination-associated motifs. *Hum Mutat.* 2003; **22**: 229-44.
- 46 Rudiger NS, Gregersen N, Kielland-Brandt MC. One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic chi. *Nucleic Acids Res.* 1995; **23**: 256-60.
- 47 Abeysinghe SS, Chuzhanova N, Cooper DN. Gross deletions and translocations in human genetic disease. *Genome Dyn.* 2006; **1**: 17-34.

- 48 Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 1986; **261**: 13114-20.
- 49 Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet.* 1990; **24**: 133-70.
- 50 Nicholls RD, Fischel-Ghodsian N, Higgs DR. Recombination at the human alpha-globin gene cluster: sequence features and topological constraints. *Cell.* 1987; **49**: 369-78.
- 51 Chuzhanova N, Abeysinghe SS, Krawczak M, Cooper DN. Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer II: Potential involvement of repetitive sequence elements in secondary structure formation between DNA ends. *Hum Mutat.* 2003; **22**: 245-51.
- 52 Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab.* 1999; **67**: 183-93.
- 53 Lehrman MA, Goldstein JL, Russell DW, Brown MS. Duplication of seven exons in LDL receptor gene caused by Alu-Alu recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. *Cell.* 1987; **48**: 827-35.
- 54 van Zelm MC, Geertsema C, Nieuwenhuis N, de Ridder D, Conley ME, Schiff C, *et al.* Gross deletions involving IGHM, BTK, or Artemis: a model for genomic lesions mediated by transposable elements. *Am J Hum Genet.* 2008; **82**: 320-32.
- 55 Bernard V, Stricker S, Kreuz F, Minnerop M, Gillessen-Kaesbach G, Zuhlke C. Ataxia with oculomotor apraxia type 2: novel mutations in six patients with juvenile age of onset and elevated serum alpha-fetoprotein. *Neuropediatrics.* 2008; **39**: 347-50.
- 56 Bernard V, Minnerop M, Burk K, Kreuz F, Gillessen-Kaesbach G, Zuhlke C. Exon deletions and intragenic insertions are not rare in ataxia with oculomotor apraxia 2. *BMC Med Genet.* 2009; **10**: 87.

- 57 Cooper DN, Youssoufian H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet.* 1988; **78**: 151-5.
- 58 Le Ber I, Moreira MC, Rivaud-Pechoux S, Chamayou C, Ochsner F, Kuntzer T, *et al.* Cerebellar ataxia with oculomotor apraxia type 1: clinical and genetic studies. *Brain.* 2003; **126**: 2761-72.
- 59 Chun HH, Gatti RA. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst).* 2004; **3**: 1187-96.
- 60 Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, *et al.* Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med.* 1996; **335**: 1169-75.
- 61 Stray-Pedersen A, Borresen-Dale AL, Paus E, Lindman CR, Burgers T, Abrahamsen TG. Alpha fetoprotein is increasing with age in ataxia-telangiectasia. *Eur J Paediatr Neurol.* 2007; **11**: 375-80.
- 62 Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* **7**: 248-9.
- 63 Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, Rio Deiros D, Chen DC, Nazareth L, *et al.* Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med.* **362**: 1181-91.
- 64 Hakonen AH, Heiskanen S, Juvonen V, Lappalainen I, Luoma PT, Rantamaki M, *et al.* Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet.* 2005; **77**: 430-41.
- 65 Van Goethem G, Lofgren A, Dermaut B, Ceuterick C, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Digenic progressive external ophthalmoplegia in a sporadic patient: recessive mutations in POLG and C10orf2/Twinkle. *Hum Mutat.* 2003; **22**: 175-6.

7. Anhang

7.1 Bekannte Mutationen im *SETX*-Gen

Tabelle 19 a: Bekannte Mutationen im *SETX*-Gen

Exon	Variation auf cDNA-Ebene	Variation auf Protein-Ebene	Mutationsart	Referenz
4	c.193G>A	p.E65K	Missense-Mutation	Duquette 2005
4	c.340_342delCTT	p.L114del	Deletion („in frame“)	Airoldi 2009
	Deletion Exon 7	p.G240_D279del	umfangreiche Deletion	Tazir 2009
7	c.822G>?	p.M274I	Missense-Mutation	Asaka 2006
8-10	Deletion Exon 8, 9 und Teil von 10	fs nach D279	umfangreiche Deletion	Anheim 2009
8	c.879del T	fs nach C 292	Frameshift-Mutation	Moreira 2004
8	c.915G>T	p.W305C	Missense-Mutation	Moreira 2004 Tazir 2009 Anheim 2009
8	c.932C>T	p.P311L	Missense-Mutation	Bernard 2008
8	c.971A>G	p.Y324C	Missense-Mutation	Zühlke
8	c.994C>T	p.R332W	Missense-Mutation	Moreira 2004 Anheim 2009
9	c.1027G>T	p.E343X	Nonsense-Mutation	Anheim 2008
10	c.1153G>C	p.E385X	Nonsense-Mutation	Nakamura 2009
10	c.1238C>T	p.P413L	Missense-Mutation	Moreira 2004
10	c.1304A>G	p.H435R	Missense-Mutation	Fogel 2006
10	c.1406A>G	p.H469R	Missense-Mutation	Criscuolo 2006
10	c.1669C>T	p.R557X	Nonsense-Mutation	Airoldi 2009
10	c.2332C>T	p.R778X	Nonsense-Mutation	Moreira 2004
10	c.2378delA	p.H793LfsX1	Frameshift-Mutation	Arning 2008
10	c.2387_2390delAGAA	fs nach K796	Frameshift-Mutation	Anheim 2009
10	c.2602C>T	p.Q868X	Nonsense-Mutation	Moreira 2004 Tazir 2009
10	c.2622_2625 del AGTT	fs nach L 874	Frameshift-Mutation	Moreira 2004
10	c.2659C>T	p.Q887X	Nonsense-Mutation	Anheim 2009
10	c.2755_2756 delGT	p.V919TfsX2	Frameshift-Mutation	Gazulla 2009
10	c.2835delC	p.D945EfsX8	Frameshift-Mutation	Schöls 2008
10	c.2966_2970 delGGAAA	fs nach Q988	Frameshift-Mutation	Moreira 2004 Anheim 2009
10	c.3070_3073delGATG	fs nach D1023	Frameshift-Mutation	Anheim 2009
10	c.3466delG	fs nach I155	Frameshift-Mutation	Criscuolo 2006
10	c.3604delG	fs nach I1201	Frameshift-Mutation	Anheim 2009
10	c.3880C>T	p.R1294C	Missense-Mutation	Asaka 2006
10	c.4036C>T	p.Q1346X	Nonsense-Mutation	Anheim 2009
10	c.4087C>T	p.R1363X	Nonsense-Mutation	Moreira 2004 Duquette 2005
10	c.4095_4096delTT	p.S1366X	Frameshift-Mutation	Bernard 2008
10	c.4321C>T	p.Q1441X	Nonsense-Mutation	Moreira 2004
10	c.4633_4636delAGTG	p.S1545AfsX26	Frameshift-Mutation	Bernard 2009

Tabelle 19 b: Bekannte Mutationen im *SETX*-Gen

Exon	Variation auf cDNA-Ebene	Variation auf Protein-Ebene	Mutationsart	Referenz
10	c.4816C>T	p.R1606X	Nonsense-Mutation	Bernard 2009
10	c.5070insT	fs nach I 1690	Frameshift-Mutation	Moreira 2004 Duquette 2005 Anheim 2009
10	c.5249insT	fs nach L 1750	Frameshift-Mutation	Moreira 2004
10	c.5264delC	fs nach N 1754	Frameshift-Mutation	Moreira 2004 Fogel 2006 Anheim 2008
10	c.5267T>C	p.F1756S	Missense-Mutation	Moreira 2004
10	Duplication Exon 7-10	fs nach T 1758	umfangreiche Duplikation	Arning 2008
10/11	c.5274+13396_6107-3547del20729bp	p.V1759EfsX6	umfangreiche Deletion	Bernard 2009
11	c.5308_5311delGAGA	p.E1770IfsX15	Frameshift-Mutation	Nicolaou 2008 Anheim 2009 Zühlke
11	c.5332C>T	p.R1778X	Nonsense-Mutation	Haack 2009
12-14	c.5374+9369_5950-254del6107bp	p.V1792EfsX31, p.V1792_L2035del	umfangreiche Deletion	Bernard 2009
12-15	Deletion Exon 11-15	p.V1792_L2035del	umfangreiche Deletion	Anheim 2009
12	c.5401_5402ins1280bp	p.V1792_L1813del, p.V1792_M1850delinsV	L1-Insertion	Bernard 2009
12	c.5413C>T	p.P1805S	Missense-Mutation	Anheim 2009
13	c.5645C>A	p.S1882Y	Missense-Mutation	Zühlke
14	c.5833G>C	p.A1945P	Missense-Mutation	Fogel 2006
14	c.5927T>G	p.L1976R	Missense-Mutation	Duquette 2005 Fogel 2006
14	c.5929C>T	p.L1977F	Missense-Mutation	Fogel 2006 Anheim 2009
15	c.6017G>A	p.C2006Y	Missense-Mutation	Anheim 2009
15	c.6029A>G	p.N2010S	Missense-Mutation	Anheim 2009
15	c.6106G>A	Skipping von Exon 15	Spleißmutation	Schöls 2008
15/16	c.6106+3393-c.7101-22del120648bp/ins25bp	Deletion Exon 16-23	umfangreiche Deletion	Criscuolo 2006
16/17	c.6208+2_3insT	Skipping von Exon 16	Spleißmutation	Fogel 2009
17	c.6292C>T	p.R2098X	Nonsense-Mutation	Lynch 2007
18-26	ab Position c.6325-361del26797bpinsAG	Deletion Exon 18-26	umfangreiche Deletion	Zühlke
18	c.6340_6341delGA	fs nach D2113	Frameshift-Mutation	Anheim 2009
	Deletion Exon 19-20		umfangreiche Mutation	Tazir 2009
19	c.6464T>G	p.L2155W	Missense-Mutation	Bernard 2008
19/20	c.6546+5G>T	Skipping von Exon 19	Spleißmutation	Tazir 2009
20	c.6590A>G	p.H2197R	Missense-Mutation	Fogel 2006 Anheim 2009

Tabelle 19 c: Bekannte Mutationen im *SETX*-Gen

Exon	Variation auf cDNA-Ebene	Variation auf Protein-Ebene	Mutationsart	Referenz
20	c.6620A>T	p.D2207V	Missense-Mutation	Bernard 2008
20	c.6625A>T	p.K2209X	Nonsense-Mutation	Anheim 2008
20	c.6638C>T	p.P2213L	Missense-Mutation	Moreira 2004
21	c.6792A>G	p.I2264M	Missense-Mutation	Anheim 2009
21	c.6831_6836 delAAAAAC	p.K2278_T2279del	Deletion („in frame“)	Anheim 2009
22	c.6847_6850delACAG, c.6848_6851delCAGA	p.T2283KfsX32	Spleißmutation	Bernard 2008, Tazir 2009
23	c.7000_7012del13insT	p.R2334_S2338insC	Deletion („in frame“)	Anheim 2009
23	c.7089C>G	p.F2363L	Missense-Mutation	Anheim 2009
24	c.7103C>G	p.P2368R	Missense-Mutation	Chen 2006
24	c.7117A>C	p.T2373P	Missense-Mutation	Bernard 2008
24	c.7138C>G	p.R2380G	Missense-Mutation	Anheim 2009
24	c.7139G>A	p.R2380Q	Missense-Mutation	Anheim 2009
24	c.7144A>G	p.K2382E	Missense-Mutation	Bernard 2008
24	c.7157T>C	p.I2386T	Missense-Mutation	Anheim 2009
25	c.7240C>T	p.R2414X	Nonsense-Mutation	Anheim 2009
25	c.7241G>A	p.R2414Q	Missense-Mutation	Bernard 2008
25/26	c.7287 +5G>A	Skipping von Exon 25	Spleißmutation	Criscuolo 2006
26	c.7330C>T	p.R2444C	Missense-Mutation	Bernard 2008
26	c.7331G>A	p.R2444H	Missense-Mutation	Anheim 2008 Bernard 2008

7.2 Aminosäure-Codes

Tabelle 20: Aminosäure-Codes

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

7.3 Abkürzungen

A	Adenin
a.d.	Aqua dest.
ALS4	amyotrophe Lateralsklerose mit juvenilem Beginn
AOA1	Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 1
AOA2	Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARCA	autosomal-rezessiv vererbte cerebelläre Ataxien
AS	Aminosäure
AT	Ataxia Teleangiectatica
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FRDA	Friedreich-Ataxie
G	Guanin
h	Stunde
min	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
NMD	„nonsense-mediated mRNA decay“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
<i>SETX</i>	Senataxin-Gen
T	Thymin
TPRT	„target primed reverse transcription“
XGal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid

8. Danksagung

Frau Prof. Dr. med. G. Gillessen-Kaesbach danke ich für das Bereitstellen des Arbeitsplatzes im Labor und die Ermöglichung der Durchführung meiner Dissertation.

Frau Prof. Dr. rer. nat. C. Zühlke danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die stets freundliche und intensive persönliche Betreuung während des praktischen und schriftlichen Teils meiner Dissertation ... auch dafür, dass sie meine Chefin war.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. E. Hartmann danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation als 1. Berichtserstatter und Vertreter der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Lübeck.

Herrn Dr. rer. nat. A. Dalski und Herrn M.Sc. U. Edener danke ich für die hilfreichen, netten und lustigen Gespräche im gemeinsamen „Büro“ des Instituts für Humangenetik der Universität zu Lübeck.

Dem ganzen „Anbau“ des Instituts für Humangenetik der Universität zu Lübeck, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. F. Kaiser, danke ich für die fröhliche Arbeitsatmosphäre und die stets bereitwillige Hilfe bei schwierigen Aufgabestellungen.

Der ganzen „Molekulargenetik“ des Instituts für Humangenetik der Universität zu Lübeck danke ich für die lebenswürdige und hilfreiche Einarbeitung in die Methoden meiner Arbeit, für die Hilfe bei Problemen und für die geduldige Beantwortung meiner Fragen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Universität Lübeck danke ich für ihr Entgegenkommen und die Ermöglichung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Frau Dr. med. J. Hiltcher, danke ich für die liebevolle Unterstützung, für ihre Ratschläge und ihre Geduld während meiner Dissertation.

9. Lebenslauf

Veröffentlichungen

Bernard V, Minnerop M, Bürk K, Kreuz F, Gillessen-Kaesbach G, Zühlke C. (2009) Exon deletions and intragenic insertions are not rare in ataxia with oculomotor apraxia 2. *BMC Medical Genetics* 10:87

Bernard V, Stricker S, Kreuz F, Minnerop M, Gillessen-Kaesbach G, Zühlke C. (2008) Ataxia with oculomotor apraxia type 2: Novel mutations in six patients with juvenile age of onset and elevated serum α -fetoprotein. *Neuropediatrics* 39:347-350

Edener U, Kurth I, Meiner A, Hoffmann F, Hübner CA, **Bernard V**, Gillessen-Kaesbach G, Zühlke C. (2009) Missense exchanges in the TTBK2 gene mutated in SCA11. *Journal of Neurology* 256(11):1856-9

Edener U, Wöllner J, Hehr U, Kohl Z, Schilling S, Kreuz F, Bauer P, **Bernard V**, Gillessen-Kaesbach G, Zühlke C. (2010) Early onset and slow progression of SCA28, a rare dominant ataxia in a large four-generation family with a novel AFG3L2 mutation. *Eur J Hum Genet*. [Epub ahead of print]

Hellenbroich Y, **Bernard V**, Zühlke C. (2008) Spinocerebellar ataxia type 4 and 16q22.1-linked Japanese ataxia are not allelic. *Journal of Neurology* 255(4):612-3

Zühlke C, **Bernard V**, Gillessen-Kaesbach G. (2007a) Investigation of recessive ataxia loci in patients with young age of onset. *Neuropediatrics* 38:207-209

Zühlke C, **Bernard V**, Dalski A, Lorenz P, Mitulla B, Gillessen-Kaesbach G, Bürk K. (2007b) Screening of the SPTBN2 (SCA5) gene in German SCA patients. *Journal of Neurology* 254(12):1649-1652