

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

**Mutationssuche im α -Spectrin-Gen
bei Patienten mit einer autosomal-dominanten Ataxie**

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

Vorgelegt von
Stephanie Rammé
aus Hamburg

Lübeck 2010

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.07.2012

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Spinocerebelläre Ataxien	1
1.1.1	Spinocerebelläre Ataxie Typ 5 (SCA5)	3
1.2	α -Spektrin	4
1.3	Aufgabenstellung	6
2	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.1.1	Chemikalien	8
2.1.2	Primer	9
2.1.3	Geräte und Gebrauchsartikel	11
2.1.4	Stammlösungen	13
2.2	Methoden	15
2.2.1	Probenauswahl	15
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
2.2.3	Agarose-Gel-Elektrophorese	18
2.2.4	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	19
2.2.5	Restriktion von DNA	21
2.2.6	ExoSAP-Aufreinigung	23
2.2.7	Sephadexaufreinigung	23
2.2.8	DNA-Sequenzierung mit der Didesoxymethode nach Sanger	25
2.2.9	Analyse der Sequenzierung	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Untersuchung der Exons 2 bis 57 des SPTAN1-Gens	26
3.2	Exons mit einer Länge bis 261 Basenpaare	26
3.3	Exons mit einer Länge von 260 bis 500 Basenpaaren	27
3.3.1	Exon 15	28
3.3.2	Exon 42	28

3.3.3	Weitere Exons.....	28
3.4	Exons mit einer Länge von 400 bis 500 Basenpaaren	29
3.5	DNA-Restriktion von PCR-Produkten.....	29
3.6	Sequenzierung auffälliger Exons.....	30
4	Diskussion	32
5	Zusammenfassung	40
6	Abkürzungsverzeichnis.....	41
7	Literaturverzeichnis	43
7.1	Bücher und Zeitschriften	43
7.2	Elektronische Datenbanken	47
8	Danksagung.....	48
9	Lebenslauf	49

1 Einleitung

Die Ataxie-Erkrankungen sind eine sehr heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen. Bewegungsstörungen sind das Leitsymptom, es kann aber auch eine Vielzahl weiterer Symptome (z. B. Pyramidenbahnzeichen etc.) auftreten.

Die Einteilung der Ataxie-Formen erfolgt zunächst danach, ob sie genetisch oder nicht-genetisch (z. B. durch Intoxikation mit Pestiziden) bedingt sind. Den hereditären Formen liegen Mutationen zugrunde, die zu einer Degeneration des Kleinhirns oder des Rückenmarks führen. Sie können durch die Art ihrer Vererbung weiter unterschieden werden in autosomal-dominante, autosomal-rezessive sowie X-chromosomale oder mitochondriale Erbgänge. Klinisch sind die verschiedenen Formen oft schwer unterscheidbar, da sie sehr ähnliche Symptomkomplexe aufweisen können.

Die größte Untergruppe der autosomal-dominant vererbten cerebellären Ataxien (ADCA) sind die spinocerebellären Ataxien (SCA) {Brusse et al 2007}.

1.1 Spinocerebelläre Ataxien

Die spinocerebellären Ataxien (SCA) werden autosomal-dominant vererbt, das heißt, dass Kinder von Betroffenen mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% die krankheitsverursachende Mutation tragen. Die Prävalenz liegt durchschnittlich bei 1-4/100.000 {Manto et al 2005}. Es sind heute 28 verschiedene Genorte bekannt. Weltweit machen SCA 1, 2, 3, 6 und 7 50-65% aller autosomal dominanten Ataxien aus. Andere bekannte Subtypen sind selten und machen jeweils weniger als 1% aus. Bei 35-50% der Familien mit SCA ist der Genotyp noch unbekannt {Brusse et al 2007}.

Das Alter bei Erstmanifestation der SCAs ist bei den verschiedenen Formen unterschiedlich und liegt zwischen der ersten und der 7. Lebensdekade. Am häufigsten manifestieren sich SCAs allerdings zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr. Die cerebelläre Ataxie zeigt sich durch Stand- und Gangunsicherheit, Schwierigkeiten bei der Koordination von Extremitätenbewegungen, sowie Augenbewegungs- und Sprechstörungen. Zum Teil sind auch Symptome einer spinalen Ataxie zu finden: z. B.

Vibrationsempfindungsstörungen, Hyperreflexie, Pyramidenbahnzeichen, Spastik oder Polyneuropathie {Brusse et al 2007}. Im MRT zeigen alle Patienten im Verlauf der Krankheit eine progrediente Atrophie des Kleinhirns, die zum Teil kombiniert mit einer Atrophie weiterer Regionen des Nervensystems wie Hirnstamm, Basalganglien, cerebralem Kortex, Rückenmark, peripheren Nerven, der Retina und dem N. opticus auftritt. Man unterscheidet die rein cerebelläre Atrophie von der olivopontocerebellären und der globalen Atrophie {Manto et al 2005}.

Viele der bisher bekannten SCAs werden durch Trinukleotid-Repeat-Expansionen hervorgerufen (z. B. SCA1, SCA2, SCA3, SCA6). Das menschliche Genom enthält repetitive DNA-Sequenzen, die aus Di- oder Trinukleotid-Wiederholungen bestehen. Trinukleotid-Repeat-Expansionen sind ein Mutationstyp, bei dem der spezifische Schwellenwert für die Anzahl an Wiederholungen einer aus drei Basenpaaren bestehenden repetitiven Sequenz überschritten wird. Das Erkrankungsalter und der Krankheitsverlauf können dabei mit der Anzahl der Wiederholungen korrelieren. Es kommt außerdem zu einer Instabilität der Trinukleotid-Anzahl bei der Vererbung, so dass es über die Generationen zu einer Zunahme der Wiederholungen und zur Antizipation kommen kann. Bei den Nachkommen führt dies zu früherem Auftreten und schwereren Verläufen der Erkrankung.

Einige SCAs werden aber auch durch Punktmutationen oder Deletionen verursacht (siehe *Tabelle 1-1*) {Brusse et al 2007}. Man spricht von einer Punktmutation, wenn eine Substitution, Deletion oder Insertion eines einzelnen Nukleotids vorliegt. Sie können zu Verschiebungen des Leserasters sowie Missense- oder Nonsense-Mutationen führen, aber auch ohne Folge auf die codierte Aminosäure bleiben (stille Mutationen). Deletionen führen zu einem Verlust von Aminosäuren im Protein. Geht eine durch drei teilbare Anzahl an Basen verloren, so spricht man von einer „in-frame“-Deletion. Kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters, liegt eine „frame-shift“-Mutation vor {Löffler 2003, S.341; Murken 2006, S.50ff.}.

Name	Mutationstyp	Genlocus	Referenz
SCA1	CAG Repeat-Expansion	6p23	{Orr et al 1993}
SCA2	CAG Repeat-Expansion	12q24	{Pulst et al 1996}

SCA3	CAG Repeat-Expansion	14q24.3-q31	{Kawaguchi et al 1994}
SCA5	In-frame-Deletion Missense-Mutation	11q13	{Ikeda et al 2006}
SCA6	CAG Repeat-Expansion	19p13	{Zhuchenko et al 1997 }
SCA7	CAG Repeat-Expansion	3p21.1-p12	{David et al 1997}
SCA8	CTG Repeat-Expansion	13q21	{Izumi et al 2003} {Moseley et al 2000}
SCA10	ATTCT Repeat Expansion	22q13	{Matsuura et al 2000}
SCA12	CAG Repeat-Expansion	5q31-q33	{Holmes et al 1999}
SCA14	Missense-Mutation	19q13.4	{Chen et al 2005}
SCA17	CAG Repeat-Expansion	6q27	{Nakamura et al 2001}
SCA27	Missense –Mutation	13q34	{Dalski et al 2005}

Tabelle 1-1: SCAs mit bekannten Mutationen (Repeat-Expansionen, Punktmutationen und Deletionen)

Eine der spinocerebellären Ataxien, die SCA5, wird im Weiteren näher beschrieben.

1.1.1 Spinocerebelläre Ataxie Typ 5 (SCA5)

Die spinocerebelläre Ataxie Typ 5 wird durch Mutationen im *SPTBN2*-Gen auf Chromosom 11q13 verursacht, das für das β_3 -Spektrin kodiert. Das *SPTBN2*-Gen besteht aus 37 Exons (GenBank Accession-Number: NM_006946) und weist Homologien zu vier anderen menschlichen β -Spektrinproteinen auf {Ikeda et al 2006}. Zwei β - und zwei α -Spektrin-Untereinheiten bilden als nicht kovalent gebundener Tetramerkomplex die funktionelle Einheit des Spektrins. Die Expression ist im Gehirn besonders hoch, β_3 -Spektrin wird aber auch in anderen Organen wie z. B. der Niere exprimiert {Stankewich et al 1998}. Das β_3 -Spektrin wirkt stabilisierend auf Membranproteine wie den Purkinjenzell-spezifischen Glutamattransporter EAAT4. Außerdem hat es möglicherweise eine Funktion bei Transportmechanismen, da es mit Golgi- und Vesikelmembranen assoziiert ist und die Dynactin-Untereinheit Centractin (ARP-1) bindet {Ikeda et al 2006}.

Es wurden bisher bei drei Familien mit SCA5 drei verschiedene Mutationen im β_3 -Spektrin-Gen beschrieben (siehe *Abbildung 1-1*). Dabei handelt es sich in zwei Fällen

um „in-frame“-Deletionen und in einer Familie um eine Missense-Mutation. In einer dieser Familien, die von Präsident Abraham Lincoln abstammt, wurde in Exon 12 eine 39 bp-Deletion gefunden. Eine 15 bp-Deletion wurde in einer französischen Familie entdeckt, sie liegt in Exon 14. Auf Proteinebene befinden sich beide Deletionen im dritten von 17 Spektrin-Repeats. Die Missense-Mutation c.758T→C, die bei einer deutschen Familie gefunden wurde, befindet sich in Exon 7. Hierdurch kommt es in einer Calponin-homologen Domäne, die die Aktin/ARP1-bindende Stelle enthält, zu einem Austausch von Leucin gegen Prolin {Ikeda et al 2006}.

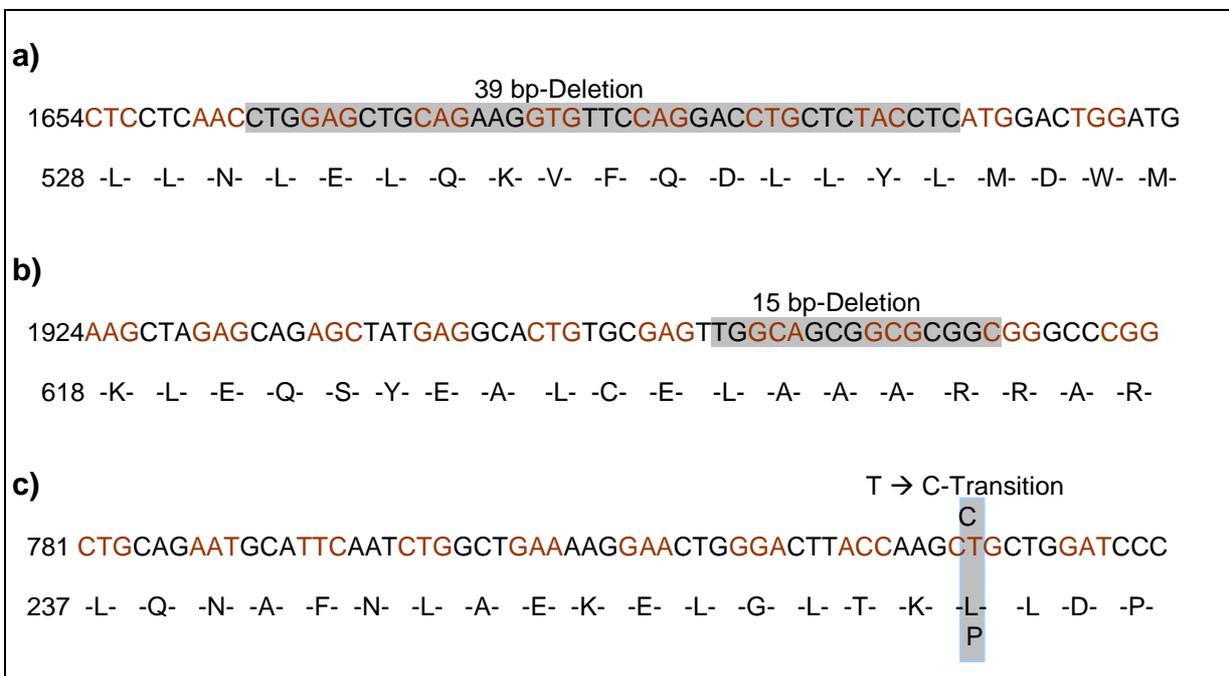


Abbildung 1-1: DNA-Sequenzen und Mutationen der drei SCA5 Familien

- a) 39bp-Deletion in Exon 12, amerikanische Familie
- b) 15bp-Deletion in Exon 14, französische Familie
- c) Missense-Mutation in Exon 7, deutsche Familie

1.2 α-Spektrin

Das menschliche Genom codiert für zwei verschiedene α-Spektrine sowie fünf verschiedene β-Spektrine. Jeweils zwei α- und zwei β-Spektrin-Untereinheiten bilden zusammen einen nicht-kovalent verbundenen Tetramerkomplex.

Das α_1 -Spektrin existiert nur bei Säugetieren. Es wird hauptsächlich in Erythrozyten produziert und interagiert mit β_1 -Spektrin {Meary et al 2007}. Das α_2 -Spektrin kann die anderen β -Spektrine binden und wird ubiquitär in allen anderen Zellen des Körpers in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert {Goodman 2007, 85f.; Levine et al 1981}. Die Expression im Gehirn ist im Vergleich zu anderen Geweben besonders ausgeprägt {BioGPS SPTAN1}.

α_2 -Spektrin kann bei allen Wirbeltieren und auch bei vielen Vertebraten gefunden werden {Salomao et al 2006}. Das Gen ist evolutionär stark konserviert. Es gibt unter den Spezies nur geringe Veränderungen in der Basenabfolge. Auf Proteinebene besteht zwischen Mensch und Ratte eine 97%ige Homologie. Zwischen Mensch und Huhn liegt sie bei 95% {Leto et al 1988}.

Das Gen für das „non-erythrocytic“ α -Spektrin (α_2 -Spektrin, *SPTAN1*: {Ensembl-Datenbank ENST00000372739}) ist auf Chromosom 9q33-34 lokalisiert. Das Gen besteht aus 57 Exons, von denen Exon 1 nicht translatiert wird. Insgesamt besteht die cDNA aus 7872 Basenpaaren. Das Protein ist aus 2477 Aminosäuren aufgebaut, die hauptsächlich 20 jeweils etwa 106 Aminosäuren lange Spektrin-Repeats bilden {Pantazatos et al 1997}. Von dieser Tripel-Helix-Struktur weichen nur wenige Regionen des Proteins ab. N-terminal befindet sich eine der Bindungsstellen mit β -Spektrin {Sumandea et al 2005}. Eine weitere ist am C-terminalen Ende zwischen zwei Ca^{2+} -bindenden EF-Hand-Domänen lokalisiert {Travé et al 1995}.

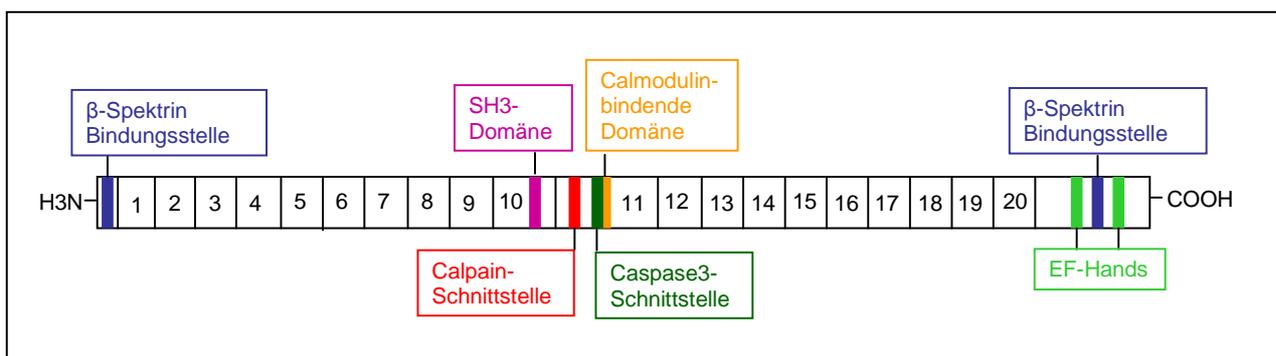


Abbildung 1.2: Proteindomänen im α_2 -Spektrin

Das elfte Spektrin-Repeat ist länger und beinhaltet einige funktionell wichtige Domänen (siehe *Abbildung 1-2*). In diesem Bereich finden sich die Schnittstellen mehrerer Proteasen, wobei μ -Calpain und Caspase3 die größte Bedeutung zukommen. Caspase3

spaltet sowohl α_2 -Spektrin als auch β_2 -Spektrin während der Zellapoptose z. B. in Neuronen. Calpain spielt vermutlich insbesondere eine Rolle für die physiologische Zellplastizität z.B. von Neuronen und Synapsen, kann bei unregulierter Aktivierung aber auch zur Apoptose führen {Wang et al 1998}. N-terminal befindet sich eine SH3-Domäne, über die die Tyrosinkinase c-Src im angrenzenden zehnten Repeat bindet und Tyr¹¹⁷⁶ phosphoryliert {Nedrelow et al 2003}. Am C-terminalen Ende ist eine Calmodulin-bindende Domäne lokalisiert. Beide Domänen nehmen Einfluss auf die Proteolyse von α_2 -Spektrin durch μ -Calpain und Caspase3. Das Ca²⁺-abhängige Binden von Calmodulin führt zu einer vermehrten Spaltung durch μ -Calpain und zu einer Resistenz gegenüber der Proteolyse durch Caspase3. Die Phosphorylierung mindert die Calpain-Aktivität {Simonovic et al 2006}.

Spektrine spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Zytoskeletts. Es ist bekannt, dass die Affinität zwischen α_2 -Spektrin und β -Spektrinen sehr viel größer ist als zwischen α_1 -Spektrin und β_1 -Spektrin in Erythrozyten. Dies führt zu einer höheren mechanischen Stabilität der Zellen {Salomao et al 2006}.

Mutationen im α_1 -Spektrin können durch Verminderung der Zytoskelettstabilität zu Sphärozytose und Elliptozytose führen {OMIM #182860 SPTA1}.

Bis jetzt ist keine Assoziation einer Mutation im α_2 -Spektrin zu einer Erkrankung bekannt. Da Mutationen im β_3 -Spektrin zur spinocerebellären Ataxie Typ 5 führen, ist die Frage zu stellen, ob auch Mutationen des im Gehirn mit β_3 -Spektrin bindenden α_2 -Spektrins zu ähnlichen Störungen der Purkinjezellen führen können.

1.3 Aufgabenstellung

Es wurden bis jetzt noch keine Untersuchungen im α_2 -Spektrin-Gen bei Patienten mit einer autosomal-dominant vererbten Ataxie durchgeführt. Diese Arbeit soll einen ersten Einblick geben, ob eine Assoziation zwischen Mutationen im α_2 -Spektrin und SCAs besteht.

Dazu wurden bei 25 Patienten mit Verdacht auf eine SCA ohne bekannte Mutation die 56 codierenden Exons und die flankierenden Introns des Gens auf Veränderungen in der Basenzahl untersucht. Somit wäre es möglich, sowohl Expansionen als auch größere Deletionen, wie sie auch bei zwei der drei bekannten SCA5-Familien ursächlich

sind, festzustellen. Die angewendeten Methoden erlauben es jedoch nicht, möglicherweise existierende Punktmutationen zu detektieren.

Festgestellte Längenveränderungen sollten im Folgenden auf ihre Ursache weiter untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

50bp DNA Ladder	invitrogen
100bp DNA Ladder	invitrogen
10x Puffer mit MgCl	Q-BIOgene
10x Puffer ohne MgCl	Q-BIOgene
5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck
BamH1 Enzym	Q-BIOgene
Bgl1 Enzym	Q-BIOgene
Bgl2 Enzym	Q-BIOgene
Big Dye® Terminator-Mix 1.1	Applied Biosystems
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
dNTPs	Q-BIOgene
EcoR1 Enzym	Biolabs
EcoR1 Puffer	Biolabs
EDTA	Merck
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol 100%	Merck
Ethanol 70%	Merck
Ethidiumbromid 10mg/ml	Merck
ExoSAP-IT®	USB
Ficoll 400	Pharmacia Biotech
Formaldehyd 37%	Sigma
HiDi™-Formamid	Applied Biosystems

HPLC Wasser	Merck
Illustra™ Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade	GE Healthcare
Magnesiumchlorid 25mM	Q-BIOgene
Msp1 Enzym	Q-BIOgene
NuSieve3:1 Agarose	Biozym Scientific GmbH
One for all buffer 10x Puffer	Q-BIOgene
pBR322 DNA-Msp 1 digest	Biolabs
Pst1 Enzym	Applied Biosystems
Ratiophorese Gel 30 (37,5 : 1)	Roth
Salpetersäure 65%	Merck
Silbernitrat	Caelo
Standard-Agarose (Star Pure Agarose)	Starlab
Taq1 Enzym	Q-BIOgene
Taq-DNA-Polymerase	Q-BIOgene
Temed	Sigma
Tris (Ultra Pure)	MP Biomedicals
Xylencyanol	Serva

2.1.2 Primer

Alle Primer wurden von der Firma „biomers“ synthetisiert.

Exon	Vorwärts-Primer-Sequenz	Rückwärts-Primer-Sequenz
2	cctattggtacttatctagc	cttgtccaatctctcaaggctc
3	ggacaaaatgctgatgctgtg	tgggaacccaaactgacatg
4	tgggaacccaaactgacatg	ctacagatcacagaggagtc
5	catggctccgtccctaattgtgtc	ctcactcagaaattaggggac
6	gagtggtgattgctgagatg	gctcaccagcacatgccctg
7+8	ccatgggggtgttcttagttc	cacagaacacagaacagaccc
9	cagagcttagggaggccat	cgactataggcctcacccaac
10	gtcatagctggcttataatg	tcatggtgaatgcgttctctgg
11	ggcctgaagattagcactagg	gaactaacatggtactgatg

12	ccaaaatacccttgcttcac	caaactgtttggaatccttcc
13+14	gtcatcaccaacctttgggtg	gctgtgtttagcttactaatcgag
15	gaaggtagtgcaagggaaactg	gtcatccacctcacctttcttg
16	gatactactgttcatgggacg	gcagcacagagcgatctaag
17	gaaagaatcctctcaggaatgg	gcacagcctttccaagtg
18	ctggaacctaggtggtagc	cagagcctggtttgtgatgc
19	gaaagtgccgtgaacacacag	tccttctcagtacaagccctg
20	ctgagaaaggctgttgaggca	ctgctgacagtatctgagtc
21	gtacttagatgactcagcgcg	gagcatacgtggaggtgccagcg
22	gtatacacgtgacctccttgg	gcccatgtggaacagagtatg
23	caccatcatggcaccagtc	cctcccaccacctcatcttc
24	caaactcgtagcctggaatcc	cagctgagcctgaagactgc
25	ggtaggcctctgtagaagaat	gctgcatccttacagcaacag
26	gaagctctgctggacatttgg	gcatctgaggttcaggaacag
27	ggaaactagagtcattcgctg	gcccacaagaagtcagaaatg
28	cacagggacctaataatgac	ccggttgacaagaacaagagc
29	gcgaggaaggttgaaacag	gtaagagccagcagttgctct
30+31	gtgtcctgtaatacaggcagt	gtgtgagccattgtaccctg
32	ctgggcagaagatctccttac	ccctgcagagcagccacgtc
33+34	ctagaggcctcattcccac	cttagacaacgcaggtattcc
35+36	ccaccagctagtctcagtc	cataaggctacatcaagacc
37	gcacctatgggaagtcagtgag	ggatggatgaagagacaccag
38	ctttatgtttgctgccactccc	cagtgacgggtggtcatcttc
39	gagagggacgattcttcatag	gatggaccactgtgccaaatg
40	caactgtccaagcaaggccc	cttaggagtcaggcagagc
41	gccagaggtccacataacag	gccactattacaggcgtaag
42	gtctgtgaggtccacagttg	gggacctcagtgaaataagcg
43	gagacagaagcaccagaagag	gggtgctggccttccacttg
44	ccatgccagcttttgact	cagggccctctaacaaccca
45	gtaatgtgtgcatggacaggg	ggtgaacatcccaggaagtg
46	gtttagagcctttccaggag	gcatgccacaattgatcag

47	ggttctgaggctgtagttagg	gacgccaccagtcacatctcacag
48	gacagtttgcttgggcatctg	gagctcacagcttctcaag
49	ctctgattcccaggaaccac	cagttaagtgtggctctgagc
50	tgagcccatctgtgaaggag	gcttaagtacagcagggacatg
51	cttggtcttctctctgccc	catcccgggatcctccacaagc
52	ggccagttgcagttaggttg	ggttctgactttaagccag
53+54	gctggtgactgagctgagg	gtccttgtaaagtgtctgagc
55+56	gtgagttcagccttactcg	gaataccagcgcagggcctg
57	ctgcttgtagaagcagctcc	cggaagcgggtagtgaagc

Tabelle 2-1: Für die PCR genutzte Primer. Exon 1 des Gens wird nicht translatiert.

2.1.3 Geräte und Gebrauchsartikel

Abstandshalter („spacer“)	Li-COR Spacer, 2mm stark
	Li-COR Spacer, 0,4mm stark
	Life Technologies Gibco BRL Spacer Model S2, mylar 0,35mm stark
Agarosegelkammer	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership BM 100
	Amersham Biosciences HE 99x submariene electrophoresis unit
	PEQLAB Biotechnologie GmbH Model 40-2314
Agarosegelträger	Serva BlueMarine 100
Computerprogramme	Biometra BioDocAnalyze V2.0
	SeqWorks! V1.01 beta (Sven Opitz, Humangenetik, Universität zu Lübeck)
	SeqScape V2.5 (Applied Biosystems)
Eismaschine	Ziegra ZBE 30-10
Filterpapier	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, MN 615 ¼,
Kämme	Labtech International GmbH Haifischzahn 0,2 mm stark
	Serva 12er/14er Kämme, 1,0mm stark
	PEQLAB 50Well 1,5mm stark
Magnetrührer	Heidolph MR 2002

	Ika-Combimag RCT
Mikrowelle	Hitachi Micro 700
MultiScreen 45µl Column Loader	Millipore
MultiScreen-HV-Platte	Millipore
MultiScreen-MT-Platte-Zentrifugenrahmen	Millipore
Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Kammer	Life Technologies Gibco BRL Sequencing System Model S2
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt Tubes (0,5ml/1,5ml) Sarstedt 96er Mikrotiterplatte und Deckelkette
Pipetten	Eppendorf Pipetten 0,5-10µl, 50-250µl, 200-500µl Gilson Pipetman Pipetten P2, P20, P200, P1000 Thermo Labystems Multikanalpipette 4510 (0,5-10µl)
Pipettenspitzen	Finntip Micro 0,2-10µl Fischer #3510 0,1-10µl Fischer #3520 0,5-20µl Sarstedt blaue Spitzen Sarstedt gelbe Spitzen
Sequenziergerät	3130x/ Genetic Analyzer Applied Biosystems
Slab Gel Dryer 2000	Savant
Spannungsgeber	Pharmacia, Gene Power Supply GPS 200/400 Electrophoresis Powersupply PS 3003 Gibco
System zur Agarosegel-Auswertung	Biometra BioDoc Analyze System Vetter GmbH UV-Kontaktlampe Chroma 43
Thermocycler	Biometra TGradient Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler Verity 96 Well ThermalCycler Eppendorf Mastercycler gradient
Universal Vacuum System Plus 400	Savant
Vortexer	Top-Mix 11118 Fisher Bioblock Scientific
Waage	Satorius laboratory

Wasserbad	GFL 1083
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5804
	Eppendorf Centrifuge 5415C
	Multifuge RF Heraeus Sepatech

2.1.4 Stammlösungen

50bp DNA Ladder (K = 50ng/μl)	8,0% (w/v) 50bp DNA Ladder 58,0% (v/v) 6x-Ficoll Lösung
100bp DNA Ladder (K = 50ng/μl)	5,0% (w/v) 100bp DNA Ladder 33,0% (v/v) 6x-Ficoll Lösung
3x Ficoll Lösung	150 μM Bromphenolblau 190 μM Xylencyanol 7,5% (w/v) Ficoll 400
6x Ficoll Lösung	290 μM Bromphenolblau 370 μM Xylencyanol 15,0% (w/v) Ficoll 400
1x TBE	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
5x TBE Puffer	445 mM Tris 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
Agarosegel-Lösung	0,63 μM Ethidiumbromid 2 mM EDTA 89 mM Tris

	89 mM Borsäure
	1,0% bzw. 2,0% (w/v) Standard-Agarose
pBR322 DNA-Msp I Digest (K = 50 ng/μl)	5,0% (w/v) pBR322 DNA-Msp I Digest
	33,0% (v/v) 6x-Ficoll-Lösung
Polyacrylamidgel (8%ig, ohne Zusätze)	8,0% (v/v) Acrylamid
	89 mM Tris
	89 mM Borsäure
	2 mM EDTA
	0,035% (v/v) Temed
	0,07% (v/v) APS
Reducer	279 mM wasserfreies Na ₂ CO ₃
	0,01259% (v/v) Formaldehyd
Silbernitrat-Lösung	12 mM AgNO ₃

2.2 Methoden

2.2.1 Probenauswahl

Für diese Arbeit wurden Proben von 25 Personen untersucht, die an einer dominant vererbten Bewegungsstörung mit dem Verdacht einer SCA leiden. Bei allen Personen sind Mutationen in bekannten SCA-Genen im Vorfeld ausgeschlossen worden. Die Proben stammen aus der DNA-Bank des Instituts für Humangenetik der Universität zu Lübeck. Die aus EDTA-Blutproben extrahierte DNA lag in einer Konzentration von 50ng/µl vor.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) dient der Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts für weitere Analyseverfahren. Ein „forward“ und ein „reverse“ Oligonukleotid-Primer definieren den Abschnitt. Zunächst wird die doppelsträngige DNA thermisch denaturiert (bei 94°C). Durch die anschließende Temperatursenkung kommt es zur Anlagerung der Primer an die zu ihnen komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge („annealing“ bei Primerspezifischer Temperatur). Eine thermostabile DNA-Polymerase (z. B. „Taq“-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) synthetisiert dann in 5'-3'-Richtung eine zum Einzelstrang komplementäre DNA-Sequenz aus einzelnen Nukleotiden („extension“ bei 72°C). Der Zyklus von Denaturierung, Anlagerung und Extension wird mehrfach wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen millionenfachen Vervielfältigung des DNA-Abschnittes kommt.

Durchführung

PCR-Ansatz: Die Reaktion wurde jeweils mit einem Gesamtvolumen von 25µl pro Ansatz durchgeführt. Die Ansätze enthielten 1µl DNA (50ng/µl), 0,5µl 10mM DNA-Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5µl 10xPuffer, 0,05µl „Taq“-Polymerase (5U/µl) sowie je 1µl des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Primers (10pmol/µl).

PCR-Ansatz für Sequenzierungen: Ausgangsmaterial für diesen PCR-Ansatz ist keine DNA in bekannter Konzentration, sondern PCR-Produkt. Anders als bei der normalen Polymerase-Kettenreaktion werden dem Ansatz für Sequenzierungen auch mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxyribonukleotide aller vier Nukleotide zugefügt (ddNTPs). Werden diese in einen neu synthetisierten DNA-Strang zufällig eingebaut, kommt es an dieser Stelle zum Syntheseabbruch, da ddNTPs keine 3'-OH-Gruppe besitzen. Statistisch kommt es so an jeder Stelle der Sequenz zu einem Abbruch. Des Weiteren enthält jeder Ansatz nur den Vorwärts- oder den Rückwärts-Primer.

PCR für Polyacrylamid-Gele, NuSieve-Agarose-Gele und Enzym-Verdaue: Eine Auflistung der verwendeten Primer findet sich im Abschnitt 2.1.2. Es wurden unterschiedliche Thermocycler genutzt, die das folgende Programm durchführten: fünf Minuten Prädenaturierung bei 94°C, anschließend je Zyklus eine Minute Denaturierung bei 94°C, 30 Sekunden Anlagerung bei der in *Tabelle 2-2* angegebenen Temperatur und Extension bei 72°C für die in *Tabelle 2-2* angeführte Zeit. Nach 30 Zyklen folgten sieben Minuten „post-Extension“ bei 72°C und die anschließende Abkühlung auf 4°C.

Exon	Anlagerungs-Temperatur	Extensionszeit	PCR-Produkt Länge
2	50°C	30 sec	388bp
3	55°C	30 sec	270bp
4	55°C	30 sec	282bp
5	60°C	1 min	347bp
6	55°C	30 sec	317bp
7+8	55°C	30 sec	538bp
9	50°C	30 sec	297bp
10	50°C	30 sec	307bp
11	55°C	30 sec	355bp
12	50°C	30 sec	276bp
13+14	55°C	1 min	568bp
15	50°C	30 sec	383bp
16	50°C	30 sec	394bp
17	55°C	30 sec	395bp

18	50°C	30 sec	310bp
19	55°C	30 sec	377bp
20	50°C	30 sec	258bp
21	55°C	30 sec	254bp
22	50°C	30 sec	289bp
23	55°C	30 sec	268bp
24	55°C	30 sec	340bp
25	50°C	30 sec	267bp
26	55°C	30 sec	281bp
27	50°C	30 sec	249bp
28	50°C	30 sec	232bp
29	55°C	30 sec	331bp
30+31	60°C	1 min	612bp
32	55°C	30 sec	212bp
33+34	50°C	1 min	632bp
35+36	50°C	1 min	566bp
37	55°C	30 sec	408bp
38	50°C	30 sec	286bp
39	55°C	30 sec	261bp
40	55°C	30 sec	274bp
41	50°C	30 sec	391bp
42	50°C	30 sec	303bp
43	55°C	30 sec	230bp
44	55°C	30 sec	323bp
45	55°C	30 sec	311bp
46	55°C	30 sec	354bp
47	55°C	30 sec	278bp
48	55°C	30 sec	426bp
49	60°C	1 min	474bp
50	50°C	30 sec	241bp
51	60°C	1 min	195bp

52	50°C	30 sec	284bp
53+54	55°C	1 min	517bp
55+56	55°C	30 sec	573bp
57	55°C	30 sec	388bp

Tabelle 2-2: PRC-Bedingungen und PCR-Produktgrößen

PCR für Sequenzierung: Mit den Didesoxyribonukleotide enthaltenden Ansätzen wurde das oben beschriebene PRC-Programm mit einer Anlagerungstemperatur von 50°C und einer Extensionszeit von 30 Sekunden durch geführt.

2.2.3 Agarose-Gel-Elektrophorese

Prinzip

Bei diesem Verfahren werden DNA-Fragmente in die Vertiefungen (Slots) eines Agarosegels pipettiert. Das Gel befindet sich dabei in einer Pufferlösung. Wird Spannung angelegt, bewegt sich die DNA wegen ihrer negativen Ladung in Richtung der Kathode. Die Agarose stellt dabei ein Hindernis dar, welches lange DNA-Fragmente stärker behindert als kurze. Das führt dazu, dass die Fragmente nach ihrer Länge getrennt werden, wobei die kürzeren das Gel schneller durchwandern. Die Sichtbarmachung der DNA-Fragmente erfolgt durch Ethidiumbromid, das zwischen die Basenpaare interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert.

Die Agarosekonzentration kann variiert werden. Kleine Fragmente werden auf höherprozentigem Gel aufgetrennt große besser bei niedriger Konzentration.

Standard-Agarosegel

Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurden Gele mit 2% Agarose-Gehalt verwendet. Zur Detektion von Längenabweichungen bei DNA-Fragmenten mit einer Größe zwischen 400-500bp (siehe *Tabelle 2-2*) wurden 1%ige Agarosegele genutzt. Die jeweilige Gellösung wurde aufgekocht und dann unter Rühren für etwa eine Minute im Eisbad abgekühlt. Danach wurde das Gel auf einen Gelträger gegossen. In das noch flüssige Gel wurden Käbme mit einer Dicke von 1mm eingehängt, um die Slots zu formen. Nach dem Erstarren des Gels wurde in die Geltaschen ein Gemisch aus 3µl

3x μ l FicolI-Lösung und 3 μ l PCR-Produkt pipettiert. Zusätzlich wurden 5 μ l eines 100bp-Längenstandards aufgetragen, um die Länge der DNA-Fragmente abschätzen zu können.

Anschließend wurde in einer mit 1xTBE-Puffer gefüllten Kammer bei einer Spannung von 100V die Gelelektrophorese durchgeführt. Danach wurden unter einer UV-Lampe die fluoreszierenden Fragmente sichtbar gemacht und mit einer Kamera aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mithilfe des Computerprogramms „BioDocAnalyse1.0“ ausgewertet.

NuSieveAgarose-Gel-Elektrophorese

3%ige NuSieveAgarose-Gele wurden genutzt, um Längenveränderungen bei DNA-Fragmenten mit einer Größe bis zu 260bp (siehe *Tabelle 2-2*) zu finden. Für jedes Gel wurden zunächst 200ml 1xTBE durch ein Papier gefiltert und danach im Eisbad 6g NuSieve3:1Agarose eingerührt. Dann wurde die Gellösung aufgeköcht und im Wasserbad bei 60°C für 15 Minuten abgekühlt. Nach dem Unterrühren des Ethidiumbromids wurde das Gel auf einen Gelträger gegossen und mit Kämmen zur Bildung der Geltaschen versehen. In die Slots des erstarrten Gels wurde jeweils eine Mischung aus 5 μ l 6x μ l FicolI-Lösung und 7 μ l PRC-Produkt pipettiert. Zusätzlich wurden 5 μ l eines 50bp-Längenstandards aufgetragen, um die Länge der DNA-Fragmente abschätzen zu können.

Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese in einer mit 1xTBE gefüllten Kammer bei einer Spannung von 100V für 40min.

2.2.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Prinzip

Bei der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese werden Polyacrylamidgele ohne Zusätze zur Elektrophorese genutzt. Wie bei Agarosegelen werden die DNA-Fragmente in „Taschen“ pipettiert. Die beiden Enden des Gels befinden sich in einer Pufferlösung. Wird eine Spannung angelegt, wandern die Fragmente durch das Gel in Richtung der Kathode. Die Geschwindigkeit hängt dabei von der Größe ab, je kleiner das Fragment ist, desto schneller durchwandert es das Gel. Der Polyacrylamid-Anteil kann zwischen

6% und 12% variiert werden. Durch die längere Laufzeit, können bei diesem Verfahren auch bei größeren Fragmenten Längenunterschiede von wenigen Basenpaaren detektiert werden. Die Sichtbarmachung der Fragmente erfolgt durch eine Silberfärbung.

Durchführung

8%ige Polyacrylamidgele wurden zur Analyse von DNA-Fragmenten mit einer Länge zwischen 260 und 500bp (siehe *Tabelle 2-2*) genutzt.

Elektrophorese: Jeweils 75ml der 8%igen Gellösung wurden mit 500 μ l 10%iger-APS-Lösung zur Polymerisation des Gels versetzt. Diese Mischung wurde zwischen zwei Glasplatten von 39 und 42cm Länge und 33cm Breite gegossen, die durch Abstandhalter („spacer“) an beiden Längsseiten einen Abstand von 0,35mm voneinander hatten. An einer Seite stand die längere Platte über, hier wurden in das noch flüssige Gel zwei Haifischzahnkämme von 0,35mm Dicke mit der geraden Seite etwa einen Zentimeter ins Gel zwischen die Platten eingebracht. Über Nacht polymerisierte das Gel bei Zimmertemperatur. Danach wurden die Kämmen entfernt und dann zur Bildung von Slots mit ihrer gezackten Seite wieder soweit zwischen die Platten vorgeschoben, bis die Spitzen leicht ins Gel einstachen.

Die Glasplatten wurden in die Halterung der Elektrophorese-Kammer eingespannt und beide Pufferkammern mit 1xTBE gefüllt. In jede Geltasche wurde je nach DNA-Menge im PCR-Produkt zumeist eine Mischung aus 1 μ l PCR-Produkt und 5 μ l 3xFicoll-Lösung pipettiert (Ausnahmen siehe *Tabelle 2-3*). Zusätzlich wurden 3 μ l pBR322 DNA-Msp 1 und 5 μ l 50bp-Ladder als Längenstandard aufgetragen.

Exon	PRC-Produkt	3xFicoll-Lösung
16	0,5 bzw. 0,3 μ l	5,5 bzw. 5,7 μ l
37	0,5 μ l	5,5 μ l
41	0,5 μ l	5,5 μ l
48	0,5 μ l	5,5 μ l
49	0,3 μ l	5,7 μ l

Tabelle 2-3: Aufgetragene Menge an PCR-Produkt und 3xFicoll-Lösung, wenn sie nicht dem Standard entsprechen

Die Elektrophorese wurde bei einer Leistung von 60W durchgeführt. Die Xylencyanol-Farbstoffbande diente dabei als Anhaltspunkt für die Laufstrecke der DNA-Fragmente. Die Gelelektrophorese längerer Fragmente wurde gestoppt, wenn die Bande das Gel vollständig durchlaufen hatte, bei kürzeren Fragmenten bereits vier Zentimeter vor den Plattenenden. Danach wurden die Platten voneinander getrennt, wobei das Gel auf der größeren silanisierten Platte haften blieb.

Silberfärbung: Auf das Gel wurde ein Holzrahmen geklemmt (Maße 33 x 38cm) und zunächst mit 10%igem Ethanol und anschließend mit 1%iger Salpetersäure fixiert. Danach wurde das Gel dreimal mit destilliertem Wasser gespült und dann für mindestens 20 Minuten mit Silbernitratlösung gefärbt. Dabei lagerten sich Ag^+ -Ionen an die DNA an. Durch zweimaliges Spülen mit destilliertem Wasser wurden die freien Silberionen entfernt. Anschließend wurden mit einer Reduktionslösung („Reducer“) die angelagerten Silberionen reduziert. Wenn das Silber ausreichend sichtbar war, wurde der Färbeprozess durch 10%ige Essiglösung gestoppt. Nachdem das Gel für fünf Minuten mit destilliertem Wasser gereinigt wurde, konnte es auf ein Papier übertragen und mithilfe einer Vakuumpumpe für eine Stunde bei 50°C getrocknet werden.

2.2.5 Restriktion von DNA

Prinzip

Die Restriktionsenzyme stammen aus Bakterien. Sie spalten dort artfremde DNA z. B. von Viren, wobei die DNA der Zelle nicht angegriffen wird, da die enzymespezifische Sequenz durch Methylierung geschützt ist. Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA sequenzspezifisch. Die Durchtrennung durch die Enzyme erfolgt hydrolytisch.

Um Mutationen mithilfe von Restriktionsenzymen detektieren zu können, muss der Verdau komplett sein. Dabei entspricht ein U der Menge an DNA, die bei 37°C in einer Stunde verdaut wird.

Die geschnittenen DNA-Fragmente können auf einem Agarosegel aufgetrennt und beurteilt werden.

Durchführung

Restriktionsenzyme wurden für DNA-Fragmente von einer Länge über 500bp (siehe *Tabelle 2-4*) genutzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass es für das ausgewählte Enzym nur eine Schnittstelle in der Sequenz gab, die so lokalisiert war, dass zwei unterschiedlich lange Stücke entstanden (siehe *Tabelle 2-4*).

Exon	Länge	Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Fragmentlängen
7+8	538bp	Bgl II	A!GATCT	188/ 350
13+14	568bp	Msp I	C!CGG	165/ 403
30+31	612bp	Taq I	T!CGA	174/ 441
33+34	632bp	Bgl I	GCCNNNN!NGGC	214/ 418
35+36	566bp	Pst I	CTGCA!G	135/ 395
53+54	517bp	EcoR I	G!AATTC	122/ 395
55+56	573bp	BamH I	G!GATCC	223/ 350

Tabelle 2-4: Exons mit ihrer bp-Länge und die genutzten Enzyme mit ihrer spezifischen Schnittstelle sowie die bp-Länge der entstandenen DNA-Fragmente

Die Reaktion wurde jeweils in einem Gesamtvolumen von 15µl durchgeführt. Die Ansätze enthielten je 5µl des PCR-Produktes, 10U des jeweiligen Enzyms sowie 1,5µl des entsprechenden Puffers (siehe *Tabelle 2-5*)

Restriktionsenzym	Konzentration U/µl	Puffer
BamH I	20U/µl	One for all 10x buffer
Bgl I	12U/µl	One for all 10x buffer
Bgl II	15U/µl	One for all 10x buffer
EcoR I	20U/µl	EcoR1 10x buffer
Msp I	11U/µl	One for all 10x buffer
Pst I	15U/µl	One for all 10x buffer
Taq I	7,5U/µl	One for all 10x buffer

Tabelle 2-5: Restriktionsenzyme und ihre Konzentration und die genutzten Puffer

Die Ansätze wurden dann bei 37° für drei Stunden in einem Thermocycler inkubiert. Zur Auswertung wurden jeweils 3µl des Verdau-Produktes mit 3µl 3x-Ficoll-Lösung auf ein

2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei einer Spannung von 100V statt. Um sowohl das kurze als auch das lange Fragment ausreichend bewerten zu können, wurden nach 25 min, 45 min und nach 55 min unter der UV-Lampe mit einer Kamera Aufnahmen gemacht. Diese wurden anschließend mit dem Computerprogramm „BioDocAnalyse1.0“ ausgewertet.

2.2.6 ExoSAP-Aufreinigung

Prinzip

ExoSAP-IT® besteht aus einem Puffer und zwei hydrolytischen Enzymen: der Exonuklease I und der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). Die SAP wird aus Eismeergarnelen gewonnen und katalysiert den Abbau von Phosphatgruppen sowohl an 5'- wie auch 3'-Enden von DNA, RNA und Nukleotiden sowie von Phosphaten in Proteinen. Es dient dem Abbau überschüssiger dNTPs im Sequenzprodukt. Die Exonuklease spaltet einzelne Nukleinsäuren von DNA und RNA ab und reinigt so das Produkt von nicht verwendeten Primern.

Nach der Aufreinigung werden die Enzyme bei hoher Temperatur durch Hitzedenaturierung inaktiviert. Das doppelsträngige PCR-Produkt bleibt dabei unverändert.

Durchführung

5µl des PCR-Produkt wurden zunächst mit 2µl ExoSAP-IT® für 15 Minuten in einem Thermocycler bei 37°C inkubiert. Danach folgte ein Zyklus bei 80°C für 15 Minuten zur Inaktivierung der Enzyme. Daran schließt sich die Abkühlung auf 4°C an.

2.2.7 Sephadexaufreinigung

Prinzip

Mit der Sephadexaufreinigung werden Sequenz-PCR-Produkte zur Sequenzanalyse auf dem Kapillar-Sequenzierer 3130x/ Genetic Analyser der Firma Applied Biosystems vor dem Auftragen auf das Gerät von überschüssigen Primern und Nukleotiden befreit.

Sephadex ist ein poröses Dextrangel. Es hat einen hohen Gehalt an Hydroxylgruppen in den Polysaccharidgruppen. Daher ist das Polymer stark hydrophil und quillt in wässriger Lösung zu einem Gel.

Sephadex wird durch Quervernetzungen unterschiedlicher Dextranfunktionen mit Epichlorhydrin hergestellt. Der Vernetzungsgrad bestimmt die Ausschlussgrenze und somit für welche Substanzen es genutzt werden kann. G-50 ist so aufgebaut, dass es Nukleinsäuren von weniger als 20bp zurückhält und größere DNA-Fragmente nahezu vollständig passieren lässt. Dadurch werden die Sequenzprodukte von den dNTPs, ddNTPs und einem Großteil der überschüssigen Primer getrennt.

Durchführung

Das G-50 Sephadex wurde auf den MultiScreen 45 Column Loader aufgetragen und überschüssiges Puder entfernt. Die MultiScreen-HV-Platte wurde umgedreht auf dem „Column Loader“ platziert. Danach wurde beides zusammen umgedreht und durch leichtes Ausklopfen das Sephadex in die HV-Platte überführt.

Zum Quellen wurden je 300µl HPLC-Wasser in die mit Sephadex geladenen Vertiefungen gegeben. Nach drei Stunden bei Raumtemperatur wurde der MultiScreen-MT-Platten-Zentrifugenrahmen auf einer Standardmikrotiterplatte platziert und anschließend die HV-Platte auf den Rahmen gestellt.

Die Konstruktion wurde zum Verdichten der Sephadex-Matrix für fünf Minuten bei 910xg zentrifugiert. Danach wurde in die Mitte der Vertiefung der Sephadex-Matrix vorsichtig ohne direkten Kontakt 15µl der verdünnten Probe (10µl des Sequenz-PCR-Produktes + 5µl H₂O) aufgetragen.

Zusammen mit dem Zentrifugenrahmen wurde die HV-Platte auf eine Mikrotiterplatte montiert und dann für fünf Minuten bei 910xg zentrifugiert. Das Filtrat enthielt das aufgereinigte Sequenz-PCR-Produkt.

Im Anschluss wurden 4µl des aufgereinigten Sequenzproduktes mit 10µl HiDi™-Formamid verdünnt.

2.2.8 DNA-Sequenzierung mit der Didesoxymethode nach Sanger

Das Verfahren wird auch Kettenabbruch-Methode genannt. Mit ihrer Hilfe können die Basenabfolge eines DNA-Fragmentes bestimmt und so Variationen nachgewiesen werden.

Prinzip

Das PCR-Produkt (siehe 2.2.2) wird zunächst aufgereinigt (siehe 2.2.7), um Störfaktoren zu eliminieren. Danach werden die Fragmente durch Kapillarelektrophorese anhand ihrer Länge aufgetrennt. Ein Laser regt die DNA-Fragmente zur Fluoreszenz an. Da jedes Didesoxyribonukleotid mit einer anderen Farbe markiert ist, können die Farben mit einem Detektor festgestellt werden. Das Chromatogramm ermöglicht dann das Feststellen der Basenabfolge des sequenzierten DNA-Abschnittes.

Durchführung

Es wurden Exons mithilfe der Sequenzierung im 3130x/ Genetic Analyser der Firma Applied Biosystems genauer untersucht, die in den Elektrophoreseverfahren Auffälligkeiten zeigten.

2.2.9 Analyse der Sequenzierung

Mithilfe des Computerprogramms SeqScape V2.5 der Firma Applied Biosystems wurde das ermittelte Ergebnis analysiert. Die erhaltene DNA-Sequenz wurde dann mit den entsprechenden Datenbank-Sequenzen verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Exons 2 bis 57 des SPTAN1-Gens

Die 56 kodierenden Exons des *SPTAN1*-Gens wurden einzeln oder paarweise mittels PCR amplifiziert. Da Exon 1 nicht kodierend ist, wurde es in dieser Arbeit nicht aufgenommen. Nach der Kontrolle der PCR-Produkte auf 2%igen Agarosegelen, konnten Mutationen und Polymorphismen durch weitere Untersuchungen sichtbar gemacht werden. Exons mit einer Größe bis zu 261 Basenpaaren wurden auf 3%iger NuSieveAgarose genauer untersucht. Exons mit einer Länge zwischen 260 und 500 bp wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Exons mit einer Größe zwischen 400 und 500 Basenpaaren wurden zusätzlich auf einem 1%igen Agarosegel untersucht. Exons mit einer Länge über 500 (517 bis 632) bp wurden mit Hilfe von Restriktionsenzymen in zwei unterschiedlich lange Fragmente geschnitten und dann auf 2%igen Agarosegelen aufgetrennt.

Von den auffälligen Proben wurde die Nukleotid-Sequenz bestimmt und anschließend durch Vergleich mit der Referenz-Sequenz auf Veränderungen untersucht.

3.2 Exons mit einer Länge bis 261 Basenpaare

Auf NuSieveAgarose-Gelen werden DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt, wobei kleinere DNA-Fragmente das Gel schneller passieren können als größere. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid sind die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar.

Es wurden Produkte der Exons 20, 21, 27, 28, 39, 43, 50 und 51 (Länge 195 bis 261 Basenpaare) der 25 Patienten zur Bestimmung der Produktgröße auf NuSieve3:1Agarose-Gele aufgetragen. Die 50bp DNA Ladder, die parallel aufgetrennt wurde, diente als Längenstandard.

Die NuSieveAgarose-Gele zeigten in allen Fällen DNA-Fragmente, die in ihrer Länge Normalallelen entsprechen. Es konnte in keiner der Proben ein Längenunterschied

detektiert werden. Beispielhaft ist in *Abbildung 3-1* ein 3%iges NuSieve3:1Agarose-Gel gezeigt, auf dem das PCR-Produkt für Exon 21 des *SPTAN1*-Gens aufgetragen wurde. Die Patientenproben 1-4 (2898, 2908, 2952, 5128) weisen alle das 254 bp-Fragment auf, das dem Wildtyp entspricht.

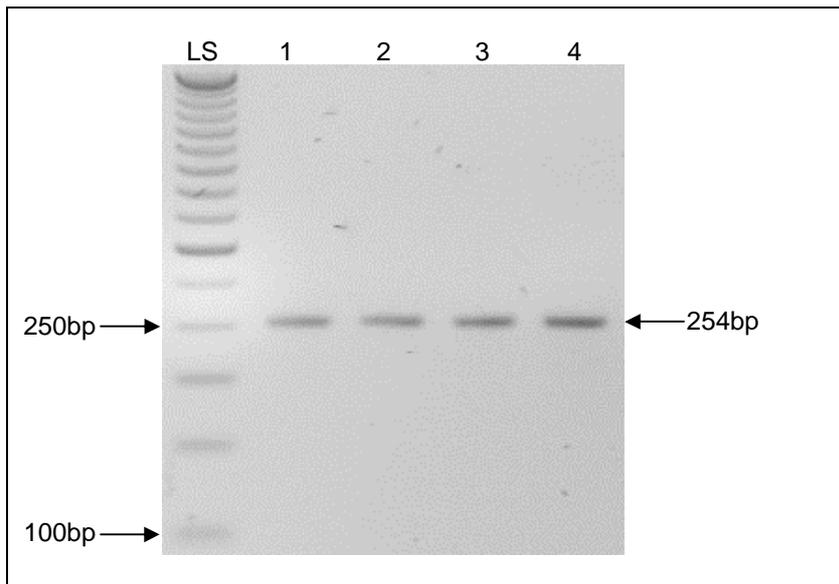


Abbildung 3-1: 3%iges NuSieve3:1Agarose-Gel, PCR-Produkt für Exon 21
LS: 50 bp-Längenstandard, 1-4: Patientenproben

3.3 Exons mit einer Länge von 260 bis 500 Basenpaaren

Auf Polyacrylamid-Gelen werden DNA-Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt und durch anschließende Silberfärbung sichtbar gemacht. Kürzere Fragmente können das Gel schneller durchwandern als längere.

Es wurden die Exons 2-6, 9-12, 15-19, 22-26, 29, 37-42, 44-49, 52 und 57 (Längen 261 bis 474 Basenpaare) der 25 Patienten auf Polyacrylamid-Gele aufgetragen, um potentielle Unterschiede zwischen den Patienten zu detektieren. Ein 50 bp-Längenstandard sowie der pBR322 DNA-Msp-1-Längenstandard dienten dabei als Vergleich für die Größenbestimmung.

3.3.1 Exon 15

In Exon 15 zeigte eine der 25 Proben eine Abweichung im Bandenmuster gegenüber dem Wildtyp. Die Probe D834/07 (22) zeigte eine Auffälligkeit in ihrem Laufverhalten (siehe *Abbildung 3-2*). Alle anderen Proben zeigen eine Bande bei einer Länge von etwa 394 bp, was dem Wildtyp-Allel entspricht.

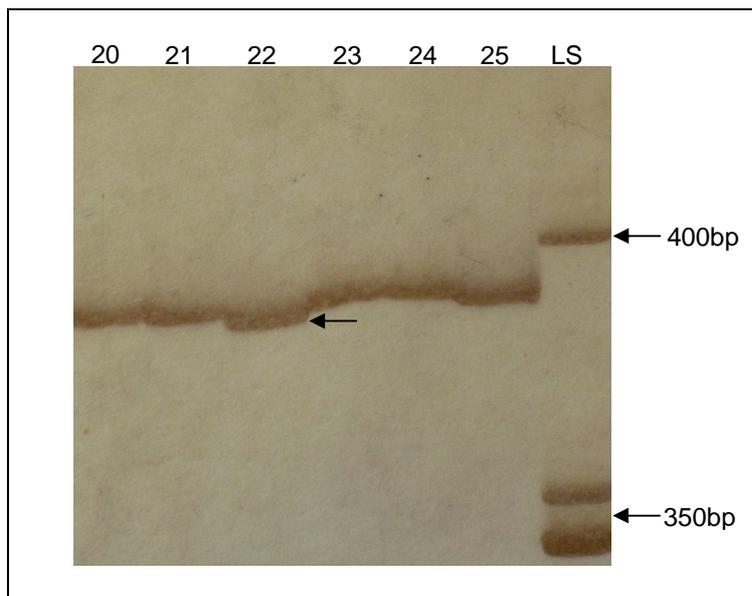


Abbildung 3-2: 8%iges Polyacrylamid-Gel, PCR-Produkt für Exon 15
LS: 50 bp-Längenstandard, 20-25: Patientenproben

3.3.2 Exon 42

In Exon 42 war in zwei der 25 Proben eine identische Abweichung des Bandenmusters vom Wildtyp sichtbar: Proben 12936 (12) und D834/07 (22). Sie zeigen eine Veränderung im Sinne einer schwachen Doppelbande (siehe *Abbildung 3-3*).

3.3.3 Weitere Exons

Für allen weiteren oben genannten Exons konnte in allen untersuchten Proben lediglich die Fragmentlänge des Wildtyps festgestellt werden.

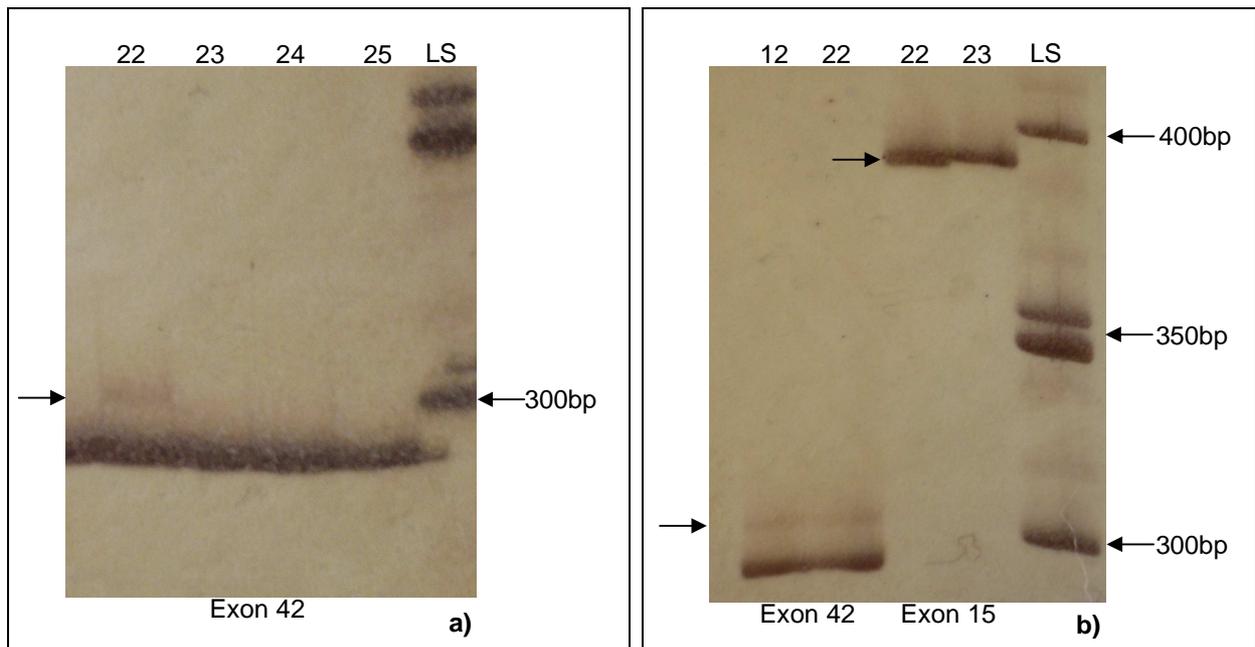


Abbildung 3-3: 8%ige Polyacrylamid-Gele; LS: 50bp-Längenstandard

a) PCR-Produkte für Exon 42; 22-25: Patientenproben

b) PCR-Produkte für Exon 42 und 15; 12, 22, 23: Patientenproben

3.4 Exons mit einer Länge von 400 bis 500 Basenpaaren

DNA-Fragmente durchwandern 1%ige Agarosegele abhängig von ihrer Größe und sind nach Ethidiumbromid-Anfärbung unter UV-Licht sichtbar.

Die PCR-Produkte der Exons 37, 48 und 49 (Längen von 408 bis 474 Basenpaaren) wurden auf 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Ein 100 bp-Längenstandard wurde zur Größenkontrolle der DNA-Fragmente ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Alle untersuchten Proben zeigten eine Länge, die den Normalallelen entspricht.

3.5 DNA-Restriktion von PCR-Produkten

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen wurden die Exonpaare 7+8, 13+14, 30+31, 33+34, 35+36, 53+54 und 55+56 jeweils in zwei unterschiedlich lange Anteile geschnitten. Die verdauten PCR-Produkte wurden anschließend zur Bestimmung der Größe auf 2%ige Agarosegele aufgetragen. Als Maßstab zur Größenbestimmung wurden ein 100 bp- sowie ein 50 bp-Längenstandard auf das Gel aufgetragen.

Die Proben zeigten für alle untersuchten Exons unauffällige Bandenmuster ohne Abweichungen vom Wildtyp. Beispielhaft ist in *Abbildung 3-4* ein 2%iges Agarosegel gezeigt, auf dem das Restriktionsprodukt der Exons 55+56 aufgetragen wurde. Die Proben 22-25 (D834/07, D842/07, D26/08, D179/08) weisen Banden sowohl bei 350 bp als auch bei 223 bp auf.

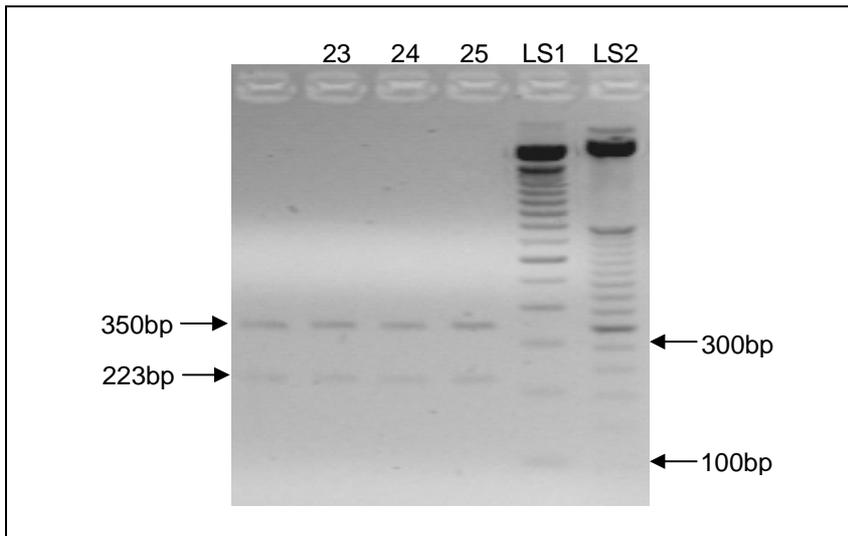


Abbildung 3-4: 2%iges Agarosegel, Restriktionsprodukte für Exons 55+56
LS1: 100 bp-Längenstandard, LS2: 50 bp-Längenstandard, 22-25: Patientenproben

3.6 Sequenzierung auffälliger Exons

Die PCR-Produkte von drei Proben (Exon 15: Probe D834/07; Exon 42: Proben 12936 und D834/07), die in der Polyacrylamidgel-Analyse ein auffälliges Bandenmuster zeigten, wurden aufgereinigt und sequenziert. Außerdem wurde Exon 15 von drei unauffälligen Proben (2898, D819/07, D179/08) und Exon 42 bei einer unauffälligen Probe (D179/08) untersucht. Für diese Proben wurde die Wildtyp-Sequenz postuliert, d.h. sie wurden dementsprechend als Kontrollen genutzt.

Die Sequenzen wurden mit der Software SeqScape v2.5 ausgewertet.

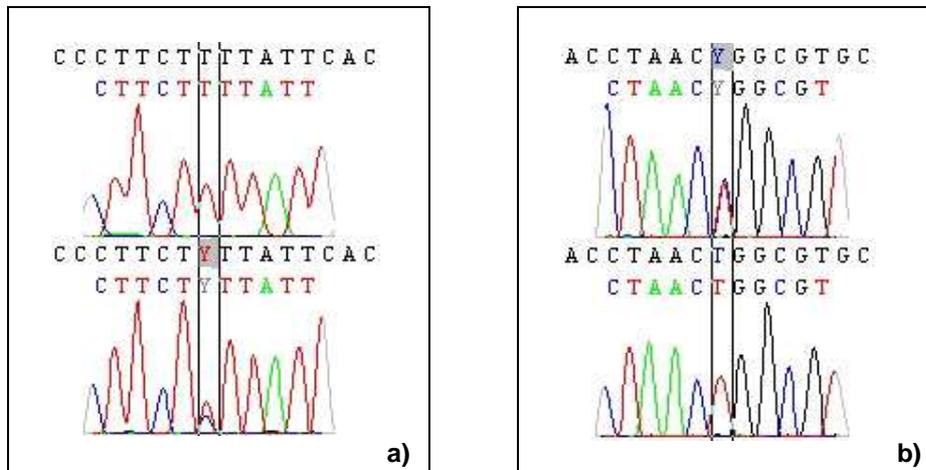


Abbildung 3-5: Sequenzausschnitte

a) Intron 14: oben: Probe D819/07 (Wildtyp), unten Probe D834/07 (IVS14-11T>C)

b) Exon 42: oben: Probe 12936 (c.5516C→T heterozygot),
unten Probe D179/08 (c.5516C→T homozygot)

Probe D834/07 zeigt die im Intron 14 liegende heterozygote Mutation IVS14-11T>C (siehe *Abbildung 3-5 a*). Die Kontrollproben weisen diese Sequenzvariante nicht auf.

In drei Proben konnte in Exon 42 der Polymorphismus c.5516C→T {Ensembl-Datenbank rs2227862} gefunden werden: Probe 12936 und D834/07 sind heterozygot, Probe D179/08 ist hingegen homozygot für den Polymorphismus (siehe *Abbildung 3-5 b*). Durch den Basenpaaraustausch kommt es zu keiner Veränderung der kodierten Aminosäure (p.T1802T).

Zusammenfassend sind die Sequenzvarianten in *Tabelle 3-1* aufgeführt.

Sequenzvariante auf cDNA-Ebene	Sequenzvariante auf Proteinebene	Bemerkung
IVS14-11T>C	-	Sequenzvariante im Intron
c.5406C>T	p.T1802T	Polymorphismus (rs2227862)

Tabelle 3-1: Sequenzvarianten

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war eine erste Stufe der Suche nach α -Spektrin-Mutationen bei Patienten mit dominant vererbter ataktischer Bewegungsstörung.

Beim Menschen werden zwei verschiedene α -Spektrine sowie fünf verschiedene β -Spektrine exprimiert. Jeweils zwei α - und zwei β -Spektrin-Untereinheiten bilden zusammen einen nicht-kovalent verbundenen Tetramerkomplex (siehe *Abbildung 4-1*). Es existiert eine laterale Bindungsstelle im Bereich des N-terminalen Ende des β -Spektrins und im Bereich des C-terminalen Ende des α -Spektrins und eine Kopf-zu-Schwanz Bindung zwischen dem C-terminalen Ende des β -Spektrin und dem N-terminalen Ende des α -Spektrin {Bennett et al 2001}.

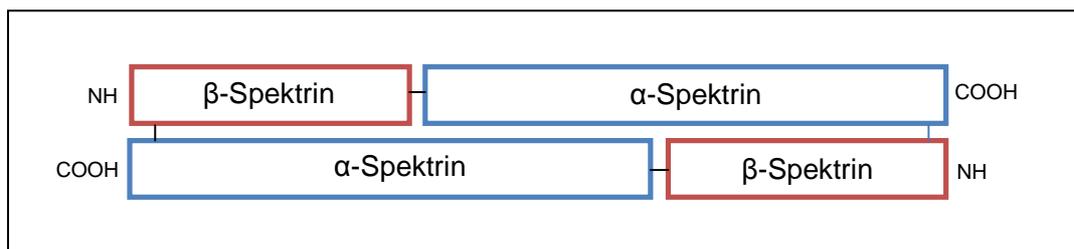


Abbildung 4-1: Bindungen zwischen α - und β -Spektrin

Im Jahr 2005 wurden erstmals bei drei Familien mit dominant vererbter Ataxie krankheitsauslösende Mutationen im β_3 -Spektrin beschrieben {Ikeda et al 2006}. Daher stellte sich die Frage, ob auch Mutationen im α -Spektrin ursächlich für SCAs sein können. Von besonderem Interesse ist das α_2 -Spektrin, das ubiquitär in allen Zellen des Körpers exprimiert wird, dabei hohe Expressionslevel im Gehirn zeigt {BioGPS SPTAN1}.

Bei der SCA5 sind zwei der drei Mutationen Deletionen im β_3 -Spektrin {Ikeda et al 2006}, die auf DNA-Ebene durch Längenvariationen der entsprechenden Fragmente erkennbar sind.

Das Gen für α_2 -Spektrin, bezeichnet als *SPTAN1*, das in dieser Arbeit untersucht wurde, ist mit 57 Exons vergleichsweise groß. Das Protein mit 2477 Aminosäuren trägt 20 etwa 106 Aminosäuren umfassende Spektrin-Repeats (also 2120 von 2477 Aminosäuren in repetitiven Strukturen). Wir untersuchten in dieser Pilotstudie 25 SCA-Patienten, bei

denen eine bekannte Mutation als Ursache ihrer SCA bereits ausgeschlossen wurde. Dabei konzentrierten wir uns auf die Suche nach fragmentlängenverändernden Mutationen.

Für keines der 56 kodierenden Exons konnten Deletionen, Insertionen oder Duplikationen mit den angewendeten Verfahren nachgewiesen werden. Dennoch gab es in 2 Fragmenten Hinweise auf Sequenzvariationen.

In Exon 42 (siehe *Abbildung 3-3*) beobachteten wir bei zwei Proben Doppelbanden im Acrylamidgel. Die anschließend durchgeführte Sequenzanalyse zeigte für diese Proben jedoch lediglich einen heterozygoten Austausch von Cytosin gegen Thymin an Position 5406 der cDNA (c.5406C>T). Dabei handelt es sich um einen bekannten Polymorphismus, der keine Veränderung auf Proteinebene zur Folge hat (p.T1802T) {Ensembl-Datenbank rs2227862}. Diese Veränderung konnte in drei Proben gefunden werden. Zwei von ihnen sind heterozygot (12936, D834/07), eine ist homozygot (D179/08) für den Polymorphismus. Als Polymorphismus wird eine Veränderung der Basenabfolge bezeichnet, die mit einer Häufigkeit von mindestens 1% in der Bevölkerung auftritt {Murken 2006, S.197}. Eine andere Definition bezeichnet alle Abweichungen in der DNA-Sequenz als Polymorphismus, die keine Veränderung auf Proteinebene verursachen oder trotz Veränderung der Aminosäureabfolge kein Krankheitsauslöser sind („non-disease-causing change“) {Knight 2009, S.24}.

Die zwei heterozygoten Proben wiesen auf dem Polyacrylamid-Gel ein auffälliges Bandenmuster im Sinne einer Doppelbande auf. Die homozygote Probe hingegen entsprach in ihrem Bandenmuster den 22 anderen parallel untersuchten Proben. Dementsprechend lässt sich nicht klären, ob die nicht sequenzierten Proben homozygot für die Variante C oder T sind. Die Häufigkeit des heterozygoten Auftretens liegt mit zwei von 25 Proben bei 8,0%.

Die Frequenz dieses gut bekannten Polymorphismus ist in verschiedenen Populationen untersucht worden. Die Häufigkeit des C-Genotyps liegt bei 0,125 (dementsprechend die des Allels T also des untersuchten Polymorphismus bei 0,875) für Nord- und West-Europa, dagegen bei 0,489 für Proben japanischen Ursprungs (T bei 0,511). Hier zeigen sich also recht unterschiedliche populationsspezifische Allelfrequenzen {Ensembl-Datenbank rs2227862}, wobei in beiden Populationen der Polymorphismus häufiger ist

als der C-Genotyp. Daher überrascht es nicht, dass auch bei den von uns untersuchten Patienten der Austausch von Cytosin gegen Thymin an dieser Stelle zu finden ist.

Bei der Untersuchung des Exons 15 der Probe D834/07 zeigte sich eine gegenüber dem Wildtyp etwas verlängerte Laufstrecke im Polyacrylamid-Gel, was einem kürzeren DNA-Fragment entspricht. Bei der Analyse des Exon 15 wurden gleichzeitig die letzten 69 Basenpaare des Introns 14 untersucht. Die Sequenzierung zeigte als Erklärung für das veränderte Bandenmuster die homozygote Sequenzvariante IVS14-11T>C (Austausch von Thymin gegen Cytosin in Intron 14). Dies ist vermutlich nur eine aus einer größeren Anzahl an DNA-Variationen in den Introns des *SPTAN1*-Gens der untersuchten Patienten. In der Ensemble-Datenbank sind momentan bereits viele bekannte Intronvariationen gelistet {Ensembl-Datenbank}. Die Untersuchung intronischer Sequenzen war nicht Ziel dieser Arbeit. Das Finden einer DNA-Variation im Intronbereich ist darauf zurückzuführen, dass Exon-überspannende Oligonukleotid-Primer benutzt wurden und somit an die Exons angrenzende Intronbereiche ebenfalls amplifiziert und ggf. sequenziert wurden.

In dieser Arbeit wurden die DNA-Proben von nur 25 SCA-Patienten auf Mutationen im *SPTAN 1*-Gen untersucht. Bei allen Patienten waren bekannte genetische Ursachen im Vorfeld ausgeschlossen worden.

Weltweit machen SCA 1, 2, 3, 6 und 7 etwa 50-65% aller SCA-Fälle aus {Brusse et al 2007}. Alle anderen bisher bekannten Subtypen sind hingegen sehr selten und jeweils Ursache bei unter einem Prozent der SCA-Patienten. Im Falle der SCA5 sind beispielsweise weltweit bisher nur drei betroffene Familien beschrieben {Ikeda et al 2006}.

Es lässt sich also zum jetzigen Zeitpunkt nicht beurteilen, ob möglicherweise auch Mutationen im *SPTAN1*-Gen mit einer niedrigen Frequenz auftreten und eine Bewegungsstörung verursachen können. Eine Stichprobengröße von 25 ist nicht ausreichend, um eine Mutation im α -Spektrin-Gen als möglichen Auslöser einer spinocerebellären Ataxie mit ausreichender Sicherheit auszuschließen. Eine größere Studie müsste durchgeführt und dabei Techniken wie „Next Generation Sequencing“ eingesetzt werden. Die neuen Sequenziermethoden ermöglichen die gleichzeitige

Sequenzierung mehrerer Fragmente, so dass Zeit und Kosten gespart werden und dementsprechend eine größere Anzahl an Patienten eingeschlossen werden können {Zhang et al 2011}.

Im weiteren ist zu bedenken, dass bei der Mutationssuche in dieser Arbeit nur die kodierenden Abschnitte des Gens (Exon 2 - 57) auf Längenvariationen untersucht wurden. Das nicht kodierende Exon 1 sowie die Promotorregion und der größte Anteil der Introns wurden nicht geprüft. Veränderungen in diesen Genbereichen könnten sich aber ebenfalls auf die Genexpression sowie die Funktion des kodierten Proteins auswirken.

Im Rahmen dieser Arbeit war eine vollständige Sequenzierung des Gens nicht möglich. Mit den gewählten Methoden gelingt eine Detektion von Punktmutationen in der Regel nicht, da sie zumeist keine Veränderung des Laufverhaltens auf den Gelen verursachen. Ebenso können Duplikationen oder Deletionen eines ganzen Exons oder des gesamten Gens nicht sichtbar gemacht werden.

Nicht-kodierende Regionen eines Genes können für die Transkription wichtige Abschnitte enthalten {Simon et al 2010}. Mutationen im Exon 1 könnten also z. B. Auswirkungen auf die Transkriptionsrate des α -Spektrins haben.

Die Funktion der Introns für ein Gen ist noch nicht vollständig erforscht. Es gibt aber Beispiele dafür, dass auch Mutationen in Introns Erkrankungen auslösen. Ein Beispiel hierfür ist die β -Thalassämie, bei der eine Sequenz-Veränderung im Intron zum Einbau einer neuen Splice-Akzeptor-Stelle mit der Konsequenz eines vorzeitigen STOP-Codons führt. Dadurch entsteht ein verkürztes und funktionsloses Hämoglobin {Chin et al 2008}.

In dieser Arbeit wurden nur DNA-Abschnitte mittels Sequenzierung genauer untersucht, die in der vorangegangenen Auftrennung auf dem jeweiligen Gel Auffälligkeiten zeigten. Auf Polyacrylamidgelen können schon Längenveränderungen von ein bis zwei Basenpaaren gesehen werden. Auf den anderen für diese Arbeit genutzten Gelen sind nur Fragmentlängen-Veränderungen von mehreren Basenpaaren sicher zu erkennen. Die Genauigkeit von Agarosegelen ist von der Agarosekonzentration, der gewählten Laufzeit und der Länge des aufgetragenen Fragmentes abhängig. Bei den von uns benutzten NuSieve3:1 Agarose-Gelen wären Veränderung etwa ab einer Länge von vier Basenpaaren sicher zu erkennen gewesen. Die 2%-igen Agarosegele, die wir für die Untersuchung der Fragmente nach Restriktion verwendeten, untersuchten wir zu

verschiedenen Zeiträumen, wodurch die Detektion eines Längenunterschieds von etwa zehn Basenpaaren sicher möglich war. Das Vorliegen kleinerer Deletionen oder Insertionen bei den untersuchten Patienten ist daher nicht auszuschließen.

Es konnte bei keinem der 25 Patienten eine krankheitsverursachende Genveränderung im *SPTAN1*-Gen nachgewiesen werden. Mutationen im α_2 -Spektrin als Ursache für eine spinocerebelläre Ataxie sind damit allerdings nicht ausgeschlossen, da in diesem Pilotprojekt nur eine sehr geringe Anzahl an Patienten auf Deletionen oder Insertionen/Duplikationen untersucht wurde. Ziel dieser Arbeit war auch nur ein erster Einblick in eine möglicherweise bestehende Assoziation zwischen Mutationen im α_2 -Spektrin und SCAs. Bei der Größe des Gens kam die vollständige Sequenzierung oder eine weitaus größere Anzahl an untersuchten Proben im Rahmen einer Doktorarbeit nicht in Frage, dementsprechend wurden bewusst weniger detaillierte Methoden und eine kleine Anzahl an Patienten gewählt.

Die Ergebnisse geben weder einen Hinweis auf eine Assoziation, noch schließen sie diese aus. Um hierüber eine klarere Aussage treffen zu können, müssten weitere Untersuchungen angeschlossen werden. Interessant wäre hierbei insbesondere die Sequenzierung der funktionell wichtigen Domänen (siehe *Abbildung 2-1*).

α_2 -Spektrin ist hauptsächlich aus 20 jeweils etwa 106 Aminosäuren lange Spektrin-Repeats aufgebaut {Pantazatos et al 1997}. Von dieser Tripel-Helix-Struktur weichen nur wenige Regionen des Proteins ab. N-terminal befindet sich eine der Bindungsstellen mit β -Spektrin {Sumandea et al 2005}. Eine weitere ist am C-terminalen Ende zwischen zwei Ca^{2+} -bindenden EF-Hand-Domänen lokalisiert {Travé et al 1995}. Diese Bindungsstellen sind für die Bildung der Tetramerstruktur wichtig. Es ist bekannt, dass die Affinität zwischen α_2 -Spektrin und β -Spektrinen sehr viel größer ist als zwischen α_1 -Spektrin und β_1 -Spektrin in Erythrozyten. Dies führt zu einer höheren mechanischen Stabilität der Zellen {Salomao et al 2006}.

Das elfte Spektrin-Repeat ist länger und beinhaltet einige funktionell wichtige Domänen. In diesem Bereich finden sich die Schnittstellen für die Proteasen μ -Calpain und Caspase3. Caspase3 spaltet sowohl α_2 -Spektrin als auch β_2 -Spektrin während der Zellapoptose z.B. in Neuronen. Calpain spielt vermutlich insbesondere eine Rolle für die physiologische Zellplastizität z.B. von Neuronen und Synapsen, kann bei unregulierter Aktivierung aber auch zur Apoptose führen {Wang et al 1998}. N-terminal befindet sich

eine SH3-Domäne, über die die Tyrosinkinase c-Src im angrenzenden zehnten Repeat bindet und Tyr¹¹⁷⁶ phosphoryliert {Nedrelow et al 2003}. Am C-terminalen Ende ist eine Calmodulin-bindende Domäne lokalisiert. Beide Domänen nehmen Einfluss auf die Proteolyse von α_2 -Spektrin durch μ -Calpain und Caspase3. Das Ca²⁺-abhängige Binden von Calmodulin führt zu einer vermehrten Spaltung durch μ -Calpain und zu einer Resistenz gegenüber der Proteolyse durch Caspase3. Die Phosphorylierung mindert die Calpain-Aktivität {Simonovic et al 2006}.

In den Zellen von Patienten mit Fanconi Anämie besteht ein Mangel an α_2 -Spektrin, die Menge des Proteins und die eingeschränkte Fähigkeit der betroffenen Zellen „DNA interstand cross-links“ zu reparieren korrelieren dabei. Im α_2 -Spektrin knockdown Modell zeigten sich eine chromosomale Instabilität und eine größere Sensitivität für DNA-schädigende Substanzen. Es wird deshalb angenommen, dass α_2 -Spektrin eine Rolle bei der Rekrutierung von DNA-Reperaturproteinen spielt {McMahon et al 2009}.

In den betroffenen Zellen ist die Aktivität von μ -Calpain erhöht. Im μ -Calpain knockdown Model von Fanconi-Zellen kam es zu einer normalen α_2 -Spektrin-Konzentration und konsekutiv trat kein DNA-Reperaturdefekt oder chromosomale Instabilität auf {Zhang et al 2010}. Es ist also davon auszugehen, dass die Proteolyse durch μ -Calpain in vivo stattfindet und eine Überfunktion Folgen hat. Allerdings zeigten Mäuse, denen die Schnittstellen für Caspase3 und μ -Calpain fehlten keine Erkrankungszeichen {Meary et al 2007}, was die Frage aufwirft, ob die Spaltung auch tatsächlich eine Funktion für die Zelle besitzt.

Zum Zeitpunkt unserer Versuche war noch keine Assoziation einer Mutation im α_2 -Spektrin zu einer Erkrankung bekannt. Da Mutationen im β_3 -Spektrin zur spinocerebellären Ataxie Typ 5 führen, stellten wir uns die Frage, ob auch Mutationen des im Gehirn mit β_3 -Spektrin bindenden α_2 -Spektrins zu ähnlichen Störungen der Purkinjezellen führen können.

Durch Lee und Mitarbeiter konnte gezeigt werden, dass Mutationen im α -Spektrin-Gen in *Drosophila melanogaster* Larven tödlich sein können {Lee et al 1993}. Bei Zebrafischen kam es zu tödlichen Abnormitäten in der Entwicklung. An den myelinisierten Axons des zentralen und peripheren Nervensystems fand sich eine geringere Zahl an nodalen Natrium-Kanälen und die Ranvier'schen Schnürringe waren

länger als normal {Voas et al 2007}. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von α -Spektrin für das Gehirn.

Wie β -Spektrine und α_1 -Spektrin, wo Mutationen durch Verminderung der Zytoskelettstabilität zu Sphärozytose und Elliptozytose führen {OMIM #182860 SPTA1}, spielt α_2 -Spektrin eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Zytoskeletts. Ein Mangel an α_2 -Spektrin bewirkte in Versuchen eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts mit einem Verlust an Fibrillenbündeln, Veränderung der Zelladhäsion und der Expression einiger Integrine. Zudem konnte festgestellt werden, dass α_2 -Spektrin Einfluss auf den Zellzyklus nimmt. Ein Mangel führte zu einer Arretierung in der G₁-Phase {Metral et al 2009}.

Bei Menschen konnte 2010 durch Saitu und Mitarbeiter die erste Erkrankung gefunden werden, die durch eine α_2 -Spektrin-Mutation ausgelöst wird. Bei drei Fällen von frühkindlichem West-Syndrom mit cerebraler Demyelinisierung konnten Mutationen in *SPTAN-1* festgestellt werden. Bei zwei Patienten fanden sich in-frame Mutationen, eine Deletion von drei Basenpaaren in Exon 50 zwischen den letzten beiden Spektrin-Repeats bzw. eine Duplikation von 6 Basenpaaren in Exon 53 innerhalb des letzten Repeats.

Im MRT zeigten sich diffuse Hypomyelinisierung und Atrophie von Cortex, Hirnstamm, Kleinhirn und Corpus callosum. Klinisch kam es neben epileptischen Anfällen beginnend im Alter von 3 Monaten zu mentaler Retardierung, fehlender Sprachentwicklung, geringe visuelle Aufmerksamkeitsleistungen und spastischer Quadriplegie. Das defekte Protein ist in der Lage mit β_2 -Spektrin zu binden, allerdings war diese Bindung instabil. Zudem kam es zur Akkumulation von α_2/β_2 - bzw. α_2/β_3 -Heterodimeren in den Zellkörpern und in Axons. Diese Aggregate beeinflussen die Funktion von Ankyrin-G und Natriumkanälen im Bereich des AIS (axon initial segment), zudem kam es zu einer erhöhten Schwelle des Aktionspotentials. Die im dritten Fall vorliegende Deletion betrifft das gesamte Gen sowie das benachbarte Gen (*STXBT-1*). Erstaunlicherweise führt dies zu einer leichteren Krankheitsausprägung. Mit vier Jahren zeigte sich im MRT eine vollständige Myelinisierung und nur noch eine geringe Reduktion der weißen Substanz im Vergleich zur Normalpopulation {Saitu et al 2010}. Der vollständige Funktionsverlust scheint für den Phänotyp also nicht das entscheidendste zu sein, sondern die Akkumulation der Heterodimere. Aber auch diese zeigt ihre Wirkung im Gehirn.

Diese erste Verbindung einer Mutation im *SPTAN1*-Gen mit einer neuronalen Erkrankung beim Menschen, ist eine weitere Bestärkung in der Annahme, dass α_2 -Spektrin insbesondere für die Funktion des Nervensystems von Bedeutung ist. Fehlfunktionen würden ihren Effekt voraussichtlich insbesondere im Gehirn manifestieren und könnten möglicherweise ein Auslöser für eine spinocerebelläre Ataxie sein. Darauf weist die durch Mutationen im Partnerprotein (β_3 -Spektrin) ausgelöste SCA5 hin. Um eine Assoziation bei der niedrigen Prävalenz der meisten SCAs zu zeigen oder auszuschließen wird eine größere Studie notwendig sein.

5 Zusammenfassung

Die Gruppe der Ataxie-Erkrankungen ist klinisch und genetisch sehr heterogen. Das Leitsymptom sind Bewegungsstörungen, es können zudem aber auch weitere Symptome wie z. B. Pyramidenbahnzeichen auftreten. Ätiologisch gibt es nicht-genetische Ataxien sowie hereditäre, bei denen Mutationen zur Degeneration des Kleinhirns oder des Rückenmarks führen. Die Art der Vererbung ist dabei sehr unterschiedlich (autosomal-dominant, autosomal-rezessiv, X-chromosomal, mitochondrial). Die größte Untergruppe der autosomal-dominant vererbten cerebellären Ataxien sind die spinocerebellären Ataxien (SCA), die etwa 1-4 von 100.000 Personen betreffen. Es sind bereits 28 Genorte bekannt, die mit den SCAs im Zusammenhang stehen, allerdings ist weiterhin bei vielen Patienten die zu Grunde liegende Mutation unbekannt. Eines der bekannten Gene ist das *SPTBN2*-Gen, das für das β_3 -Spektrin kodiert. Spektrine sind Membranproteine, die insbesondere für die Zellstabilität verantwortlich sind. Zwei β - und zwei α -Untereinheiten bilden zusammen einen nicht-kovalent gebundenen Tetramerkomplex. Im Gehirn finden sich insbesondere Komplexe aus β_3 und α_2 -Spektrin. Das *SPTAN1*-Gen, das für das α_2 -Spektrin kodiert, befindet sich auf Chromosom 9q33-34 und besteht aus 57 Exons.

In dieser Arbeit wurden 25 SCA-Patienten ohne bekannte Mutation auf Veränderungen im *SPTAN1*-Gen untersucht. Alle kodierenden Exons wurden zunächst mittels Polymerasenkettenreaktion amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf NuSieve3:1 Agarose-Gelen, 1%igen Agarosegelen oder Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch untersucht. Einige lange Fragmente wurden zunächst mit Hilfe von Restriktionsenzymen in zwei Anteile zerteilt und anschließend auf 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Auffällige Proben wurden in den entsprechenden Exons sequenziert.

Es wurden ein bekannter Polymorphismus (c.5406C>T) sowie eine Mutation im Intron 14 (IVS14-11T>C) gefunden. Beide Auffälligkeiten sind nicht krankheitsverursachend.

Die erhobenen Ergebnisse geben weder einen Hinweis auf eine Assoziation zwischen Mutationen im α_2 -Spektrin und SCA, noch schließen sie diese aus. Um hierüber eine definitive Aussage treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen angeschlossen werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
a.d.	Aqua dest.
ADCA	autosomal-dominant vererbte cerebelläre Ataxie
APS	Amoniumperoxidsulfat
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleotidtriphosphat
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
G	Guanin
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
M	Molarität (Einheit mol/l)
MRT	Magnetresonanztomographie
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
RNA	Ribonukleinsäure
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SCA	spinocerebelläre Ataxie
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit(s) (Einheit der Enzymaktivitäten)
UV	Ultraviolett

V	Volt
(v/v)	Verhältnis Volumen zu Volumen
W	Watt
(w/v)	Verhältnis Gewicht zu Volumen

Abkürzungen der Aminosäuren

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

Tabelle 6-1 1: Abkürzungen der Aminosäuren mit Ein- und Dreibuchstabencode

7 Literaturverzeichnis

7.1 Bücher und Zeitschriften

- 1 Bennett V, Baines AJ. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol. Rev* 2001; 81: 1353–1392.
- 2 Brusse E, Maat-Kievit JA, van Swieten JC. Diagnosis and management of early- and late-onset cerebellar ataxia. *Clin. Genet.* 2007; 71: 12–24.
- 3 Chen D, Cimino PJ, Ranum LPW, Zoghbi HY, Yabe I, Schut L, et al. The clinical and genetic spectrum of spinocerebellar ataxia 14. *Neurology* 2005; 64: 1258–1260.
- 4 Chin JY, Kuan JY, Lonkar PS, Krause DS, Seidman MM, Peterson KR, et al. Correction of a splice-site mutation in the beta-globin gene stimulated by triplex-forming peptide nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105: 13514–13519.
- 5 Dalski A, Atici J, Kreuz FR, Hellenbroich Y, Schwinger E, Zühlke C. Mutation analysis in the fibroblast growth factor 14 gene: frameshift mutation and polymorphisms in patients with inherited ataxias. *Eur. J. Hum. Genet.* 2005; 13: 118–120.
- 6 David G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, et al. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat. Genet.* 1997; 17: 65–70.
- 7 Goodman SR. *Medical cell biology*. Amsterdam: Acad. Press; 2007.
- 8 Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, et al. Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat. Genet.* 1999; 23: 391–392.
- 9 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: 184–190.

- 10 Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, Kobayashi K, Yokota T, et al. An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am. J. Hum. Genet.* 2005; 77: 280–296.
- 11 Izumi Y, Maruyama H, Oda M, Morino H, Okada T, Ito H, et al. SCA8 repeat expansion: large CTA/CTG repeat alleles are more common in ataxic patients, including those with SCA6. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72: 704–709.
- 12 Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat. Genet.* 1994; 8: 221–228.
- 13 Knight JC. Human genetic diversity. Functional consequences for health and disease. Oxford, New York: Oxford University Press; 2009.
- 14 Lee JK, Coyne RS, Dubreuil RR, Goldstein LS, Branton D. Cell shape and interaction defects in alpha-spectrin mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol* 1993; 123: 1797–1809.
- 15 Leto TL, Fortugno-Erikson D, Barton D, Yang-Feng TL, Francke U, Harris AS, et al. Comparison of nonerythroid alpha-spectrin genes reveals strict homology among diverse species. *Mol. Cell. Biol.* 1988; 8: 1–9.
- 16 Leto TL, Pleasic S, Forget BG, Benz EJ, Marchesi VT. Characterization of the calmodulin-binding site of nonerythroid alpha-spectrin. Recombinant protein and model peptide studies. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 5826–5830.
- 17 Levine J, Willard M. Fodrin: axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells. *J. Cell Biol.* 1981; 90: 631–642.
- 18 Löffler G, Petrides PE, Löffler-Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie. Mit 218 Tabellen*; [mit Poster]. Berlin: Springer; 2003.
- 19 Manto M. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum* 2005; 4: 2–6.
- 20 Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, Rasmussen A, Grewal RP, Watase K, et al. Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat. Genet.* 2000; 26: 191–194.

- 21 McMahon LW, Zhang P, Sridharan DM, Lefferts JA, Lambert MW. Knockdown of alphaII spectrin in normal human cells by siRNA leads to chromosomal instability and decreased DNA interstrand cross-link repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2009; 381: 288–293.
- 22 Meary F, Metral S, Ferreira C, Eladari D, Colin Y, Lecomte M, et al. A mutant alphaII-spectrin designed to resist calpain and caspase cleavage questions the functional importance of this process in vivo. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 14226–14237.
- 23 Metral S, Machnicka B, Bigot S, Colin Y, Dhermy D, Lecomte M. AlphaII-spectrin is critical for cell adhesion and cell cycle. *J. Biol. Chem* 2009; 284: 2409–2418.
- 24 Moon RT, McMahon AP. Generation of diversity in nonerythroid spectrins. Multiple polypeptides are predicted by sequence analysis of cDNAs encompassing the coding region of human nonerythroid alpha-spectrin. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 4427–4433.
- 25 Moseley ML, Schut LJ, Bird TD, Koob MD, Day JW, Ranum LP. SCA8 CTG repeat: en masse contractions in sperm and intergenerational sequence changes may play a role in reduced penetrance. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 2125–2130.
- 26 Murken J. Taschenlehrbuch Humangenetik. 96 Tabellen. Stuttgart: Thieme; 2006.
- 27 Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, et al. SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 1441–1448.
- 28 Nedrelow JH, Cianci CD, Morrow JS. c-Src binds alpha II spectrin's Src homology 3 (SH3) domain and blocks calpain susceptibility by phosphorylating Tyr1176. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 7735–7741.
- 29 Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Servadio A, Beaudet AL, et al. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat. Genet.* 1993; 4: 221–226.
- 30 Pantazatos DP, MacDonald RI. Site-directed mutagenesis of either the highly conserved Trp-22 or the moderately conserved Trp-95 to a large, hydrophobic residue reduces the thermodynamic stability of a spectrin repeating unit. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 21052–21059.

- 31 Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, et al. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat. Genet.* 1996; 14: 269–276.
- 32 Rotter B, Kroviarski Y, Nicolas G, Dherny D, Lecomte M. Alphaspectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding. *Biochem. J.* 2004; 378: 161–168.
- 33 Saito H, Tohyama J, Kumada T, Egawa K, Hamada K, Okada I, et al. Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am. J. Hum. Genet.* 2010; 86: 881–891.
- 34 Salomao M, An X, Guo X, Gratzner WB, Mohandas N, Baines AJ. Mammalian alpha I-spectrin is a neofunctionalized polypeptide adapted to small highly deformable erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 643–648.
- 35 Simon D, Laloo B, Barillot M, Barnette T, Blanchard C, Rooryck C, et al. A mutation in the 3'-UTR of the HDAC6 gene abolishing the post-transcriptional regulation mediated by hsa-miR-433 is linked to a new form of dominant X-linked chondrodysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19: 2015–2027.
- 36 Simonovic M, Zhang Z, Cianci CD, Steitz TA, Morrow JS. Structure of the calmodulin alpha-spectrin complex provides insight into the regulation of cell plasticity. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 34333–34340.
- 37 Stankewich MC, Tse WT, Peters LL, Ch'ng Y, John KM, Stabach PR, et al. A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95: 14158–14163.
- 38 Sumandea CA, Fung LW. Mutational effects at the tetramerization site of nonerythroid alpha spectrin. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005; 136: 81–90.
- 39 Travé G, Lacombe PJ, Pfuhl M, Saraste M, Pastore A. Molecular mechanism of the calcium-induced conformational change in the spectrin EF-hands. *EMBO J.* 1995; 14: 4922–4931.
- 40 Voas MG, Lyons DA, Naylor SG, Arana N, Rasband MN, Talbot WS. Alphaspectrin is essential for assembly of the nodes of Ranvier in myelinated axons. *Curr. Biol.* 2007; 17: 562–568.

- 41 Wang KK, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, et al. Simultaneous degradation of alpha- and beta-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 22490–22497.
- 42 Wasenius VM, Saraste M, Salvén P, Erämaa M, Holm L, Lehto VP. Primary structure of the brain alpha-spectrin. *J. Cell Biol.* 1989; 108: 79–93.
- 43 Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics* 2011; 38: 95–109.
- 44 Zhang P, Sridharan D, Lambert MW. Knockdown of mu-calpain in Fanconi anemia, FA-A, cells by siRNA restores alpha spectrin levels and corrects chromosomal instability and defective DNA interstrand cross-link repair. *Biochemistry* 2010; 49: 5570–5581.
- 45 Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat. Genet.* 1997; 15: 62–69.

7.2 Elektronische Datenbanken

- 1 BioGPS: The Gene Portal Hub. Genomics Institute of the Novartis Research Foundation. World Wide Web URL: <http://biogps.gnf.org>. Last accessed: 03/24/2010
 - a Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101: 6062–6067.
- 2 Ensembl Genome Browser, The Wellcome Trust Sanger Institute. World Wide Web URL: <http://www.ensembl.org/>. Last accessed: 01/02/2012
- 3 Online Mendelian Inheritance of Man, OMIM™. Johns Hopkins University, Baltimore, MD, MIM Number: #182860. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Last accessed: 03/24/2010

8 Danksagung

Zur Durchführung und zum Gelingen dieser Dissertation haben viele Menschen beigetragen.

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

Ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke, die mir in jeder Phase der Erstellung dieser Arbeit mit einem offenen Ohr und gutem Rat zur Seite gestanden hat. Ihre hervorragende Betreuung und das sorgfältige Lesen des Manuskripts haben mir sehr geholfen.

Frau Heike Pawlack verdanke ich die intensive Einarbeitung in die Methoden der Arbeit, die mich vor vielen Fehlern bewahrt hat. Ihr sowie Veronika Bernard, Ulrike Gehlken, Sabine Purmann, Dr. Andreas Dalski, Juliane Eckhold, Jassemien Atici und Frank Kaiser verdanke ich die Beantwortung vieler Fragen sowie die Rettung einiger verloren geglaubter Gele. Zudem haben die moralische Unterstützung aller Mitarbeiter des Instituts und das hervorragende Arbeitsklima erheblich dazu beigetragen, dass ich mich immer sehr wohl gefühlt habe.

Mein Dank gilt meinem Bruder, der diese Arbeit trotz des für ihn fachfremden Themas aufmerksam Korrektur gelesen hat.

Ich danke meinen Eltern, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht und immer helfend zur Seite gestanden haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stephanie Rammé
Geburtsdatum: 28.01.1985
Geburtsort: Hamburg



Schullaufbahn

08/1991 – 07/1995 Grundsschule Marmstorf, Hamburg
08/1995 – 07/2004 Heisenberg-Gymnasium, Hamburg
08/2001 – 01/2002 Wilber-Clatonia High School, Nebraska, USA

Universitäre Laufbahn

10/2004 – 06/2011 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
08/2006 Physikum
08/2009 – 07/2010 praktisches Jahr
04/2007 – 10/2008 experimenteller Teil der Doktorarbeit am Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck
06/2011 Examen

Berufliche Laufbahn

Seit 07/2011 Assistenzärztin im Park Klinikum Bad Krozingen,
Schwarzwaldklinik Neurologie