Identifizierung und funktionelle Analysen X-chromosomaler neuronaler Erkrankungsgene

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Claus Lenski
am 8. Juli 2008

Erstgutachten: Prof. Dr. Thomas Cremer

Zweitgutachten: Prof. Dr. Ruth Brack-Werner

Betreuung: Prof. Dr. Alfons Meindl

Eingereicht am 8.7.2008

Mündliche Prüfung am 17.2.2009

Inhalt

1 Einleitung 1

1.1 Identifizierung menschlicher Krankheitsgene und Kopplungsanalyse 1

1.2 Genexpression, alternatives Spleißen und pathologische Mutationen 3

1.3 X-chromosomal gekoppelte mentale Retardierung (XLMR) 6

1.4 X-chromosomal gekoppelte infantile spinale Muskelatrophie (XL-SMA) 10

1.5 Ziel dieser Arbeit 10

2 Material und Methoden 12

2.1 Material 12

2.1.1 Chemikalien und sonstige Materialien 12

2.1.2 Enzyme, Antikörper und Assays für RealTime-PCR 13

2.1.3 Kits 13

2.1.4 Puffer 14

2.1.5 Primer (Oligonukleotide) 15

2.1.6 Verwendetes genetisches Material 15

2.1.7 Geräte 15

2.2 Methoden 16

2.2.1 Präparation genomischer DNA 16

2.2.2 Präparation von mRNA (Gewinnung von cDNA) 17

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 18

a) Standard-PCR (nach Saiki) 18

b) Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) 18

c) Echtzeit-PCR (RealTime-PCR, Taqman-PCR) 18

2.2.4 Sequenzierung (nach Sanger) 20

2.2.5 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) 22

2.2.6 Bisulfit-Behandlung der DNA 22

2.2.7 Northern-Blot 23

2.2.8 Protein- oder Immuno-Blot *(Western-blotting)* 23

2.2.9 Klonierung 25

2.2.10 *In vitro*-Expression (-Transkription, -Spleißen) 26

2.2.11 Sequenzdatenbanken und Computeranalyseprogramme 27

3 Ergebnisse 28

3.1 MRX9: Das Gen *FTSJ1* ist an einer Spleißakzeptorstelle mutiert 28

3.2 Mutationen in dem Gen *PQBP1* in der *Renpenning*-Familie (MRXS8) sowie in einer weiteren MRX-Familie 32

3.3 MRXS10: Eine stille Mutation verursacht eine reduzierte Expression des Gens *HADH2* 35

3.3.1 Auffälligkeiten des MRXS10-Patienten bei der Analyse des Gens *HADH2* und die stille Mutation c.574C>A 36

3.3.2 Quantitative Analyse der *HADH2*-Transkripte (RealTime-PCR) 38

3.3.3 Die stille Mutation c.574C>A als Ursache für das unvollständige Spleissen von *HADH2* 39

3.3.4 Reduktion der Expression des HADH2-Proteins *(Western-blotting)* 42

3.4 X-chromosomal gekoppelte infantile spinale Muskelatrophie (XL-SMA): Verursacht durch Mutationen in dem Gen *UBE1*? 43

3.4.1 Segregationsanalyse der Mutationen in *UBE1* 46

3.4.2 Untersuchung der Häufigkeit der Mutationen in *UBE1* mittels DHPLC 47

3.4.3 Funktionelle Analysen der Mutationen in *UBE1* 47

a) Die Mutationen c.1617G>T und c.1639A>G in den Patienten AR6 bzw. XS022 47

b) Die stille Mutation c.1731C>T in vier verschiedenen XL-SMA-Familien 48

3.4.3.1 Überprüfung der Expression von *UBE1* mittels RealTime-PCR 49

3.4.3.2 *In silico*-Analyse der Sequenz von *UBE1* bezüglich regulatorischer Gen-Bereiche 52

3.4.3.3 Untersuchung der Methylierung im Bereich der C>T-Transition 52

4 Diskussion **54**

4.1 *FTSJ1* und nicht-syndromische mentale Retardierung 54

4.2 *PQBP1* und das *Renpenning*-Syndrom 56

4.3 Die Expression von *HADH2* und syndromische mentale Retardierung 58

4.4 Die Assoziation von *UBE1* mit X-chromosomal gekoppelter infantiler spinaler Muskelatrophie (XL-SMA) 63

5 Zusammenfassung **68**

6 Literaturverzeichnis **71**

7 Anhang **77**

7.1 Auflistung analysierter Gene 77

7.2 Verwendete Oligonukleotide (angegeben in 5´-3´-Richtung) 78

7.3 Aufbau der Vektoren pGADT7, pGBKT7 und pTarget 79

7.4 Chromatogramme der DHPLC-Analysen zu dem Gen *UBE1* 81

7.5 Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen 82

8 Persönliches **84**

8.1 Lebenslauf 84

8.2 Publikationen 85

8.3 Danksagung 86

9 Erklärung **87**

1 Einleitung

Nach der kompletten Sequenzierung des menschlichen Genoms geht man von 20000-30000 funktionellen Genen aus (*The International Human Genome Sequenzing Consortium*, 2004). Vor dieser Entschlüsselung sind von verschiedenen Seiten bis zu 100000 menschliche Gene postuliert worden, die in Proteine umgesetzt werden. Diese Differenz ist u. a. auch darin begründet, dass nicht jedes Protein von einem eigenen Gen kodiert ist, sondern ein einzelnes Gen auf mehrere, unterschiedliche Arten abgelesen werden kann und somit verschiedene Proteine erzeugen kann (Isoforme). Der hier zugrunde liegende Mechanismus ist das alternative Spleißen, ein Prozess, der ein Bestandteil der Expression eines Gens in ein funktionelles Protein ist. Gegenwärtig wird angenommen, dass mehr als die Hälfte der humanen Gentranskripte alternativ gespleißt sind. In der vorliegenden Arbeit, die sich mit X-chromosomal vererbten, neuronalen Krankheiten auseinandersetzt, werden zwei Gene vorgestellt, bei denen krankheitsassoziierte Mutationen zu veränderten Spleißprodukten führen.
Nachdem die Sequenzierung des gesamten humanen Genoms, also die Entschlüsselung des menschlichen Erbguts, im Rahmen des *Human Genome Project* bereits 2002 fast abgeschlossen worden ist, ist neben der fortschreitenden Analyse auf DNA- bzw. RNA-Ebene zur Identifizierung von Genen die Aufklärung der Funktionen der Proteine Gegenstand molekularbiologischer Forschung. Hierbei werden die biochemischen Eigenschaften eines Proteins sowie Protein-Protein-Interaktionen untersucht. So lassen sich Funktionen, Stoffkreisläufe und Krankheiten des menschlichen Lebens aufklären und auch therapeutische Strategien entwickeln.

1.1 Identifizierung menschlicher Krankheitsgene und Kopplungsanalyse

Grundsätzlich gibt es zwei unterschiedliche Strategien zur Identifizierung menschlicher Gene bzw. Krankheitsgene: Die funktionelle Charakterisierung und die Positionsklonierung. Bei der funktionellen Methode wird das (Krankheits-)Gen beruhend auf seiner (gestörten) biochemischen Funktion identifiziert, während bei der Positionsklonierung ein bestimmter chromosomaler Bereich ermittelt wird, in

dem das jeweilige Gen gesucht wird. In dieser Arbeit wurde die positionelle Analyse angewandt, um (Krankheits-)Gene zu identifizieren.

Der chromosomale Bereich, dann genetisches Krankheitsintervall genannt, wird mittels Kopplungsanalysen bestimmt. Grundprinzip einer Kopplungsanalyse ist, dass vererbte, phänotypische Merkmale (pathogene ebenso wie unpathogene) an eine bestimmte genetische Region gekoppelt sind und in der betroffenen Familie segregieren. Notwendig für eine aussagekräftige Kopplungsanalyse ist eine gut dokumentierte Familie mit Erkrankten und Gesunden in mehreren Generationen. Im Falle einer X-chromosomal vererbten Krankheit lässt sich die Segregation des mutierten Chromosomenabschnitts über die männlichen Erkrankten gut verfolgen, und es lassen sich meist eindeutig obligate Überträgerinnen bestimmen. Bei autosomalen Erbkrankheiten ist dies aufwendiger, da hier auch männliche Individuen Überträger mit unauffälligem Phänotyp sein können.

Nach der sorgfältigen Aufstellung des Stammbaums werden sog. genetische Marker analysiert. Diese Marker sind wie ein genetischer Fingerabdruck und repräsentieren Stellen im Genom, die von Individuum zu Individuum variabel (polymorph) sein können. Marker können *single nucleotide polymorphisms (SNPs)*, also Variabilitäten an nur einer Basenposition sein, oder sog. *tandem repeats*, Wiederholungen von zwei- oder mehrbasigen Sequenzmotiven, z.B. cacacaca. Entscheidend für die Aussagekraft einer Kopplungsanalyse ist, dass die Marker möglichst polymorph sind. Polymorph meint eine hohe Variabilität des Markers in der Population, der dann als informativ gilt. Uninformativ ist ein Marker, an dem sich die Probanden, z.B. ein Erkrankter und Gesunder, nicht unterscheiden. Nach Analyse verschiedener Marker, die im Falle einer X-chromosomal vererbten Krankheit über das X-Chromosom verteilt ausgesucht werden, lässt sich feststellen, welcher Bereich auf dem Chromosom allen Erkrankten und heterozygot den Überträgerinnen gemeinsam ist und welcher Bereich den gesunden Familienmitgliedern eigen ist. Man sagt, dieser Chromosomenbereich bzw. die diesen repräsentierenden Marker segregieren in einer Familie mit dem (pathologischen) Phänotyp. Als statistisches Maß wird der LOD-„Score“, *Log of Odds*, verwendet. Dieser gibt als dekadischer Logarithmus den Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit eines genetischen Ereignisses basierend auf einer Kopplung zu einem genetischen Bereich und der Wahrscheinlichkeit eines genetischen Ereignisses ohne Kopplung an. Ein LOD-„Score“ von 3 heisst, dass die Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung 1000-fach

höher ist als für ein nicht-gekoppeltes Ereignis. Bei einem LOD-„Score“ von 0 und kleiner dagegen darf nicht von einer Kopplung ausgegangen werden.
Für das ermittelte Krankheitsintervall wird mit Hilfe von internationalen Datenbanken (wie z.B. *http://genome.ucsc.edu*) ein Genkatalog erstellt. Sämtliche Gene in diesem Bereich werden durch systematische, direkte Sequenzierung analysiert. Die Sequenzierung findet auf DNA- und RNA- (bzw. cDNA-)Ebene statt, um möglichst alle Mutationstypen detektieren zu können. Beispielsweise lassen sich Mutationen mit Einfluss auf die Expression des Gens oft nur durch Analyse auf RNA-Ebene feststellen. Auf die zugrunde liegenden Mechanismen der verschiedenen Mutationstypen sowie ihre Pathogenität wird im nächsten Punkt eingangen.

1.2 Genexpression, alternatives Spleißen und pathologische Mutationen

Der Begriff Genexpression beschreibt die Umsetzung der DNA über die RNA in ein funktionelles Protein. Dieser Prozess lässt sich folgendermaßen unterteilen (nach „Molekulare Humangenetik“, Strachan T. und Read A. P.):

- Aktivierung der Umschreibung der DNA in mRNA *(messenger RNA)*, der Transkription
- Transkription der DNA in eine Prä-mRNA, eine Vorstufe der mRNA
- Prozessierung der Prä-mRNA in die mRNA: Die intronischen Sequenzen, Introne, werden herausgeschnitten und die Exone zusammengefügt. Dieser Vorgang heisst Spleißen *(engl. splicing)*.
- Außerdem wird an das 5´-Ende eine sog. *cap*-Struktur, an das 3´-Ende ein poly-Adenin-Stück angehängt. Beides dient u.a. der Stabilisierung der RNA und dem Schutz vor RNA-Abbau.
- Transport der RNA aus dem Zellkern in das Cytoplasma
- Übersetzung der mRNA, Translation, in eine Polypeptidkette aus Aminosäuren, die dann zum funktionellen Protein gefaltet wird.

Der gesamte Prozess der Genexpression ist hinsichtlich des Orts, der Stärke und des Zeitpunkts reguliert. Eine Reihe von Genen sind in (fast) allen Organen exprimiert, man spricht von ubiquitärer Expression. Die Expression anderer Gene hingegen ist auf einzelne Organe beschränkt. Ein weiterer Unterschied besteht in

der Expressionsstärke: Es gibt schwach, mittel und stark exprimierte Gene. Auch zeitlich unterscheiden sich die Genaktivitäten: Während zahlreiche Gene fast über die ganze Lebenszeit des Organismus aktiv sind, sog. *housekeeping genes,* werden manche Entwicklungsgene beispielsweise nur in bestimmten Embryonalphasen exprimiert. Speziell im Falle der funktionellen Methode, (Krankheits-)Gene zu identifizieren, spielt das Expressionsverhalten bei der Auswahl der Gene, dann auch Kandidatengene genannt, eine wichtige Rolle.

Während der Genprozessierung findet, wie oben erwähnt, das Spleißen statt, ein Vorgang, der in zwei in dieser Arbeit vorgestellten Genen durch Mutationen gestört ist. In diesem Spleißprozess werden die Exone eines Gens zusammengefügt (gespleißt), die nicht für ein Protein kodierenden Introne fallen weg. Das so von der Prä-mRNA (auch *heterogeneous nuclear* RNA, hn-RNA genannt) zur mRNA prozessierte Transkript dient dann als Matrize zur "Übersetzung" in eine Aminosäurenkette. Während des Spleißprozesses kommt es zum alternativen Spleißen (Abb. 1). Dabei wird nicht nur ein Transkript pro Gen gebildet, sondern es werden mehrere verschiedene Transkriptvarianten eines Gens gespleißt. Neben dem Haupttranskript mit allen Exonen kommen Varianten vor, in denen ein oder mehrere Exone ganz oder teilweise fehlen. Dies wird als alternatives Spleißen bezeichnet. Im Menschen sind über die Hälfte aller Gene alternativ gespleißt, ebenso mindestens 74% der Gene, die aus mehreren Exonen bestehen (Johnson et al., 2003). So können durch ein Gen auf effiziente Weise verschiedene Proteine gebildet werden. Auf die Mechanismen wird im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit vorgestellten Mutationen eingegangen.

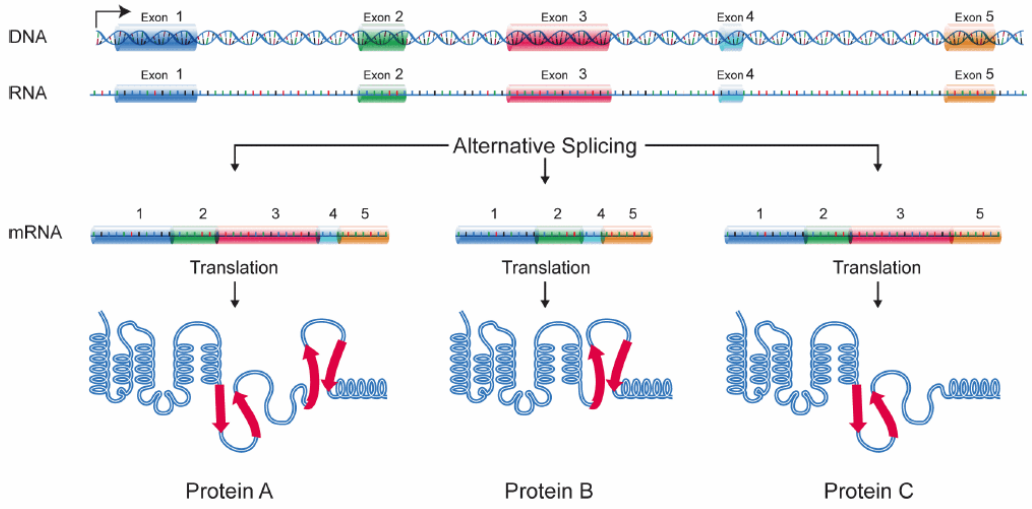


Abb. 1 Modell zum Vorgang des alternativen Spleißens: Aus einem Gen werden durch Prozessierung aller oder nur einzelner Exone mehrere Proteine erzeugt (nach *http://www.genome.gov/Images/EdKit/bio2j_large.gif*).

Mutationen, Veränderungen im Erbgut, lassen sich folgendermaßen unterteilen:
- auf chromosomaler Ebene in numerische und strukturelle Aberrationen
- auf DNA-Ebene in Deletionen, Insertionen und Substitutionen von Basenpaaren

Zu den numerischen chromosomalen Aberrationen, bei denen es zu einer Verminderung oder Zunahme der Chromosomenanzahl kommt, zählen die Trisomien 13, 18 und 21. In diesen Fällen liegt das jeweilige Chromosom (zumindest partiell) dreimal vor. Weitere durch numerische Chromosomenaberrationen bedingte Krankheiten entstehen beim Ullrich-Turner- (X0) und Klinefelter-Syndrom (XXY) sowie beim Diplo-Y- (XYY) oder Triplo-X-Chromosomensatz (XXX). Ursache für diese Anomalien sind meist fehlerhafte Prozesse während der elterlichen Keimzellreifung, der Meiose. Nach der Replikation werden die in doppelter Dosis vorliegenden Chromosomen (Diploidie, diploid) normalerweise getrennt und auf verschiedene Gameten aufgeteilt, die dann den halben Chromosomensatz beinhalten (Haploidie, haploid). Hierbei kann es zu dem Phänomen des *non-disjunction* kommen, d.h. die zu trennenden Chromosomen bleiben aneinander haften und es entsteht eine Gamete mit doppelter Chromosomenanzahl. Die Fehlerhaftigkeit dieses Prozess nimmt u.a. mit dem Lebensalter zu.
Zu den strukturellen Chromosomenaberrationen zählt das Ringchromosom, das aufgrund einer aberranten Verbindung der Chromosomenenden, der Telomere, einen Ring bildet und dadurch defekt ist, sowie Insertionen, Inversionen, Deletionen und Translokationen von Chromosomenbereichen. Hierbei sind, ebenfalls meist entstanden während der Meiose, einzelne Abschnitte eines Chromosoms zusätzlich oder verkehrt herum eingebaut, deletiert oder in einem anderen Chromosom eingebaut.
Mutationen auf DNA-Ebene können das Wegfallen (Deletion), der zusätzliche Einbau (Insertion) oder der Austausch (Substitution) von einem oder mehreren Basenpaar(en) sein. Deletionen und Insertionen in einem kodierenden Bereich eines Gens haben immer eine veränderte Aminosäuresequenz des Proteins zur Folge. Substitutionen hingegen können sowohl die Aminosäuresequenz verändern (*missense*-Mutationen) als auch stille Mutationen *(engl. silent mutations)* verursachen, die die Aminosäuresequenz nicht verändern. Dies ist möglich, da die Kodierung für die Aminosäuren, der Gen-*Code*, redundant ist, und die verschiedenen DNA-Tripletts für lediglich 20 anstatt 61 mögliche Aminosäuren kodieren, wobei die dritte Triplettposition meist unmaßgeblich ist (*Wobble*-

Hypothese). Jedoch können auch stille Mutationen die Genprozessierung und die Effizienz der Genexpression beeinflussen und somit pathogen sein. Sie können in Bereichen regulatorischer Sequenzen liegen, die für das korrekte und effiziente Spleißen der Exone des Gens entscheidend sind. Hierbei können die Intron-/Exonübergänge *(splice sites)*, die Erkennungssequenz für die Verknüpfung zur sog. Lassobildung *(branch site)* oder fein-regulatorische Sequenzen wie die eines *exonic/intronic splice enhancer* oder *silencer* (*ESE, ISE* oder *ESS, ISS*) gestört sein.

Auch Mutationen, die nicht im Intron-/Exonbereich eines Gens liegen, können eine (pathogene) Veränderung hervorrufen. Beispielsweise kann ein vor einem Gen liegender Promotor beeinflusst werden, der für die Aktivierung der Transkription des Gens verantwortlich ist.

Auf DNA-Ebene entstehen Mutationen durch exogene Faktoren wie UV-Strahlung und Einfluss von Chemikalien oder endogen aufgrund von Fehlern in der DNA-Replikation. Solche Fehler werden in der Regel vom DNA-Reparaturmechanismus korrigiert. Dieser Mechanimus tauscht z. B. nach der Replikation der DNA eine falsch in die DNA eingebaute Base gegen die korrekte Base aus. Beide Fehler, die Entstehung einer „falschen“ Base und das Nichterkennen durch den Reparaturmechanismus, passieren auch in der gesunden Zelle mit einer gewissen Häufigkeit.

Darüberhinaus lassen sich Mutationen in Keimbahnmutationen und somatische Mutationen unterteilen. Keimbahnmutationen, also Mutationen in den Keimzellen, werden vererbt, während somatische Mutationen lediglich das jeweilige Individuum betreffen (Beispiel Hautkrebs).

Es gibt noch weitere Mutationsmechanismen, die hier nicht alle vorgestellt werden können. Der gegebene Überblick soll jedoch verdeutlichen, dass die Regulation der Genexpression vielschichtig ist und jede Mutation diese in den verschiedenen Expressionschritten beeinflussen und pathogen sein kann.

1.3 X-chromosomal gekoppelte mentale Retardierung (XLMR)

Die Prävalenz X-chromosomal gekoppelter mentaler Retardierung *(X-linked mental retardation, XLMR)* in der männlichen Bevölkerung beträgt 1:500. Es handelt sich um geistige Behinderung, die gemäß der *ICD (International*

Classification of Disease) als verzögerte oder unvollständige Entwicklung geistiger Fähigkeiten definiert ist.

XLMR wird X-chromosomal rezessiv vererbt und betrifft daher in der Regel nur männliche Familienmitglieder, deren weibliche Verwandten phänotypisch unauffällig und Überträgerinnen sind.

Man unterscheidet zwei grundsätzliche Formen: die nicht-syndromische und die syndromische mentale Retardierung (MR). Während die nicht-syndromische Form nur geistige Behinderung aufweist, ist die syndromische Form von zusätzlichen Krankheitsbildern begleitet wie metabolischen Störungen, Wachstumsstörungen und Dysmorphien sowie Verhaltensabnormalitäten. Dementsprechend werden für die MR-Familien die Bezeichnungen MRX und MRXS verwendet und numeriert. Die Einteilung in syndromische und nicht-syndromische MR ist nicht immer unproblematisch, da die neuronale Fehlfunktion als Ursache für die geistige Behinderung beispielsweise Verhaltensstörungen bedingen kann, die dann als syndromische Ausprägungen bewertet werden. Als Beispiel hierfür sei das Gen *ATP6AP2* genannt, das für den Reninrezeptor kodiert (Ramser et al., 2005). Der Patient leidet außer an mentaler Retardierung an progressiven epileptischen Anfällen *(XMRE = X-chromosomal vererbte mentale Retardierung mit Epilepsie)*. Diese MR-Form ist wegen der Ausprägung von Epilepsie als syndromisch eingestuft, obwohl Letztere in direktem Zusammenhang mit der neuronalen Fehlfunktion/-entwicklung steht. Ausgelöst wird diese MR-Form durch eine stille Mutation in Exon 4 des *ATP6AP2*-Gens. Diese Mutation, die keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat, beeinflusst die konservierte Sequenz eines Spleißregulators und verursacht so die Zunahme einer Transkriptvariante, in der Exon 4 fehlt, bei gleichzeitiger Reduzierung der Haupttranskriptvariante mit allen Exons.

Der Schweregrad mentaler Retardierung wird anhand des jeweiligen Intelligenzquotienten (IQ) des Patienten in leicht, moderat, schwer und sehr schwer eingeteilt. Zur Bestimmung des IQ werden zwei verschiedene Intelligenztests durchgeführt. In dem einen, dem *Raven*-Test, werden die Fähigkeiten zum abstrakten Denken geprüft, in dem anderen, dem *Hamburg-Wechsler*-Test, die Fähigkeit, logisch auf Gegebenheiten zu reagieren. Der Mittelwert aus beiden Tests bildet den effektiven IQ-Wert. Ab IQ-Werten unter 70 spricht man von geistiger Behinderung.

Außer durch genetische Ursachen mit einem Verursachungsanteil von 25-35% kann mentale Retardierung durch Vergiftungen, Traumata, ungünstige Umwelteinflüsse und Ernährung sowie prä-/postnatale Infektionen hervorgerufen werden (Anderson et al., 1996, Yeargin-Allsopp et al., 1997).

Bisher sind 83 Gene identifiziert, die mit XLMR assoziiert und funktionell charakterisiert sind (gemäß *XLMR Web site* auf *http://www.rm.unicatt.it/xlmr/*). Einen Überblick gibt auszugsweise Abbildung 2 (Abb. 2, nach Raymond, 2006).

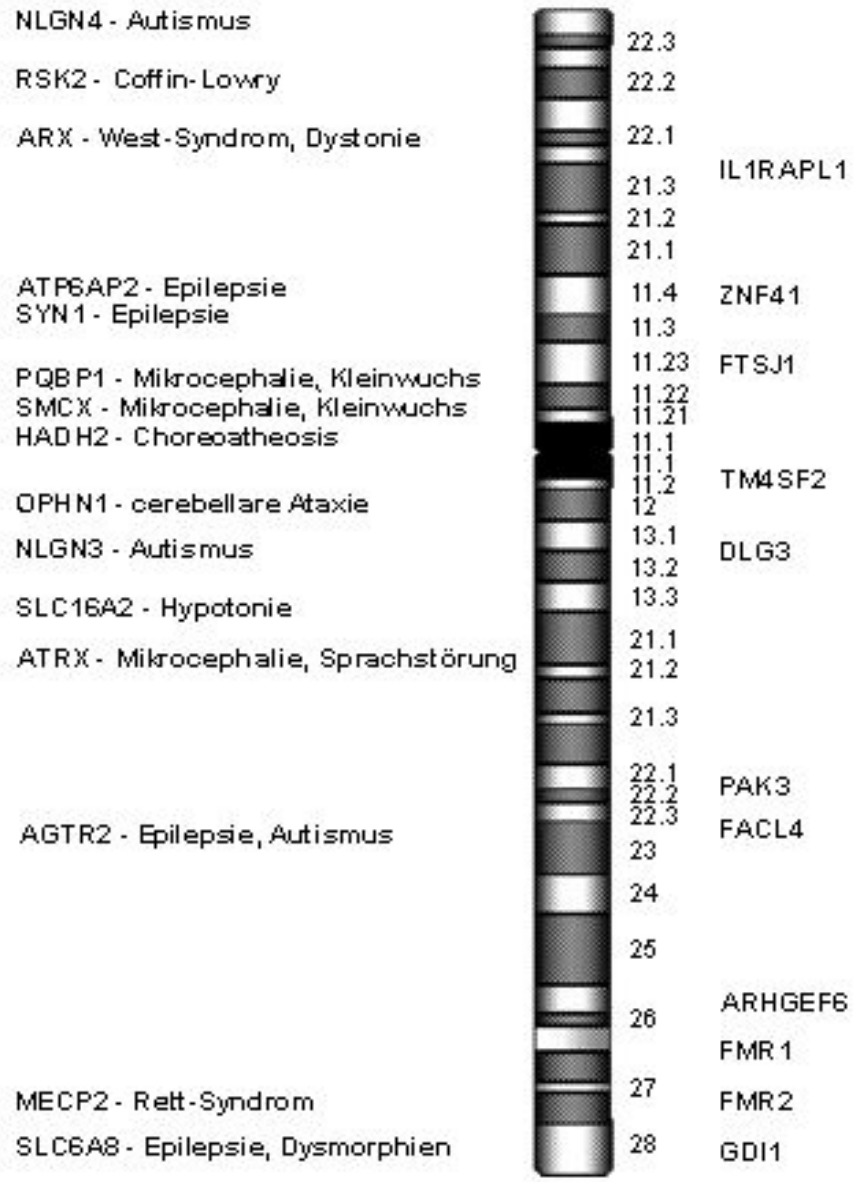


Abb. 2 Auszug X-chromosomaler MR-Gene

Links: Gene, die mit syndromischen XLMR-Formen assoziiert sind

Rechts: Gene, die in Zusammenhang mit nicht-syndromischer XLMR stehen

Auffällig ist die Heterogenität der betroffenen Gen-/Proteinfunktionen, was die Komplexität der neuronalen Entwicklung verdeutlicht. Beispielsweise entsteht das fragile X-Syndrom (Fra-X), auch Martin-Bell-Syndrom genannt und häufigste Ursache für XLMR (Turner et al., 1996), durch die Verlängerung eines Sequenzbereichs, der aus Wiederholungen des Nukleotid-Tripletts Cytosin-Guanin-Guanin (CGG) im untranslatierten 5'-Bereich des *FMR1*-Gens besteht. Während beim Gesunden eine Triplett-Wiederholung von bis zu 80 vorliegt, weist der Fra-X-Erkrankte mehr als 200 CGG-Tripletts auf. Im Bereich von 80-200 Triplett-Wiederholungen spricht man von einer Prädisposition. Durch die erhöhte Anzahl des CGG-Tripletts wird der Promotorbereich des *FMR1*-Gens hypermethyliert und somit inaktiviert. Das Fra-X-Syndrom gehört zu den syndromischen MR-Formen. Es kommt neben MR zu morphologischen Auffälligkeiten v.a. im Gesicht, Makroorchidie, Überstreckbarkeit der Gelenke sowie zu Verhaltensabnormalitäten wie Hyperaktivität und ausgeprägter Konzentrationsschwäche (Turner et al., 1996).

Desweiteren können verschiedene Mutationen in demselben Gen sowohl syndromische als auch nicht-syndromische MR verursachen. Beispiele hierfür sind die Gene *MECP2* und *RSK2*. *MECP2*, lokalisiert auf Xq28, kodiert für das Methyl-CpG Bindeprotein 2. Durch Mutationen in diesem Gen kommt es zum *Rett*-Syndrom, das neben einer schweren, progressiven neuronalen Degeneration auch verlangsamten Schädelwachstum und motorische Störungen aufweisen kann (Couvert et al., 2001; Hagberg et al., 2002). Mutationen im Gen *RSK2* führen zum *Coffin-Lowry*-Syndrom, das neben der geistigen Behinderung auch Skelettabnormalitäten aufweist (Coffin et al., 1966, Temtamy et al., 1975). Eine nicht-syndromische Form geistiger Behinderung, die durch Mutationen im Gen *RSK2* ausgelöst werden, sind von Merienne et al. (1999) beschrieben worden.

Anscheinend ist die Ausprägung syndromischer oder nicht-syndromischer MR-Formen u.a. von der Position der Mutation im Gen abhängig. Sehr viele Gene sind für mehrere Wirkungsmechanismen verantwortlich, ihre Genprodukte interagieren mit mehreren Proteinen und haben verschiedene Funktionen - man sagt, ein Gen wirkt polytrop. Da diese Interaktionen über verschiedene funktionelle Bereiche eines Gens bzw. Proteins, über die sog. Domänen, funktionieren, kann die Art und Lage von Mutationen das Ausmaß der pathogenen Wirkung auf den Phänotyp beeinflussen.

1.4 X-chromosomal gekoppelte infantile spinale Muskelatrophie (XL-SMA)

Eine weitere neuronale Erkrankung, deren genetische Ursache im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden ist, ist die X-chromosomal gekoppelte infantile spinale Muskelatrophie (XL-SMA).

Während für die autosomal-rezessiv vererbte Form von SMA (Typ I, II und II) bereits ein verantwortliches Gen gefunden werden konnte, ist die molekulargenetische Ursache für die XL-SMA bisher unklar.

Beide SMA-Erkrankungen verursachen eine fortschreitende Muskelschwäche und Atrophie mit Degeneration der motorischen Neuronen. Die Sterblichkeit im Falle der XL-SMA-Patienten in jüngstem Kindesalter ist hoch. Außerdem kommt es in den betroffenen Familien zu Fehlgeburten sowie zu spontanen Aborten.

Autosomal vererbte SMA wird entsprechend des Schweregrads in Typ I-III eingeteilt. Die bekannteste autosomal vererbte Form von SMA wird durch Mutationen in dem Gen *Survival Motor Neuron SMN1*, lokalisiert auf 5q11.2-13.2, verursacht. Erwähnenswert hierbei ist, dass es von *SMN1* eine Kopie, *SMN2*, gibt. *SMN1* und *SMN2* unterscheiden sich lediglich in fünf Nukleotiden. Trotz dieser hohen Identität kann ein Defekt von *SMN1* nicht durch ein intaktes *SMN2* kompensiert werden. Der Grund hierfür liegt in einem der fünf unterschiedlichen Nukleotiden: Ein C-T-Unterschied in Exon 7 von *SMN2* verursacht das Überspringen von Exon 7 während des Spleißprozesses und führt somit zur Fehlfunktion dieser Version des *SMN*-Gens, so dass eine Kompensation unmöglich ist (Lorson et al., 1999). Im Falle des in dieser Arbeit vorgestellten XL-SMA-Gens *UBE1* wird ein sehr ähnlicher Mechanismus gestörter Genexpression aufgrund eines veränderten Spleißverhaltens besprochen.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Die Identifizierung von Genen, die an der mentalen Entwicklung des Menschen beteiligt sind, sowie die grundsätzliche Aufklärung der pathogenen Mutationsmechanismen mittels funktioneller Analysen sind das Ziel der vorliegenden Arbeit gewesen. Für drei gut dokumentierte Familien mit unterschiedlichen Formen X-chromosomal gekoppelter mentaler Retardierung

(XLMR) und teils überlappenden Kopplungsintervallen auf Xp11.21-p11.4 können die Krankheits-verursachenden Gene vorgestellt werden:

- *FTSJ1* in den Betroffenen aus einer belgischen Familie, die an nicht-syndromischer geistiger Behinderung leiden (MRX9)
- *PQBP1* in einer syndromischen XLMR-Form, die erstmals 1962 von *H.J. Renpenning* beschrieben worden ist (MRXS8)
- *HADH2* in einer weiteren syndromischen XLMR-Form,die neben leichter mentaler Retardierung abnormale Verhaltensweisen und Choreoathetosis, gekennzeichnet von irregulären unwillkürlichen Bewegungen, aufweist (MRXS10).

Für alle drei Familien wurde basierend auf dem jeweiligen Kopplungsintervall mit Hilfe von Gendatenbanken und Genvorhersageprogrammen ein vollständiger Genkatalog erstellt. Die systematische Sequenzanalyse dieser Gene erfolgte nach Möglichkeit auf DNA- und auf RNA-Ebene (bzw. cDNA-Ebene), um auch ein eventuell verändertes Expressions- oder Spleißverhalten feststellen zu können.
In der MRXS10-Familie wurden umfangreiche funktionelle Analysen des betroffenen Gens sowohl auf DNA-/RNA-Ebene, in Form von quantitativen PCR-Analysen (RealTime-PCR) sowie eines *in vitro*-Spleiß-Experiments, als auch auf Proteinebene durchgeführt.

Im Falle der X-chromosomal gekoppelten infantilen spinalen Muskelatrophie (XL-SMA) wurde für zwei Familien, deren Kopplungsintervall auf Xp11.3-Xq11.1 liegt, ebenfalls ein Genkatalog aufgestellt. Die diesen umfassenden Gene wurden nahezu komplett mittels direkter Sequenzierung analysiert. Dabei konnten Mutationen in dem Gen *Ubiquitin-Activating Enzyme E1 (UBE1)* gefunden werden, die in den Patientenfamilien streng segregieren und als bedeutungslose Polymorphismen in über 3550 Kontrollchromosomen ausgeschlossen werden konnten. Analysen auf Expressionsebene sowie funktionelle Untersuchungen sollten Aufschluss auf die Wirkungsweise dieses ubiquitär exprimierten Gens bringen, dessen kompletter Ausfall höchstwahrscheinlich lethal ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Acetonitril	Transgenomic
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
Borsäure	Fluka
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
Chloroform	Merck
Dextransulfat	Pharmacia
DMSO	Sigma
DNA-Polymerisationsmix (dNTPs)	Pharmacia
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll 400	Pharmacia
Formamid	Sigma
Glycerin	Merck
HCl (5 N)	Klinik-Apotheke
IPTG	Roth
Isopropanol	Merck
Kanamycin	Sigma
Längenstandard V (8 – 587 bp)	Boehringer
Längenstandard 1kb (0.075 – 12.216 kbp)	Gibco
Li Chrosolv H_2O	Merck
Long Ranger (gel solution)	BMA
2-Mercaptoethanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Orange G	Sigma

PBS	Gibco
Pepton from Casein, tryptic digest	Fluka
Probenpuffer, 2x	Serva
SDS (Lauryl Sulfat)	Sigma
SOC Medium	Ampliqon
RPMI Medium	Gibco
TEMED	Merck
Titriplex (EDTA)	Merck
TRIS	USB
Triton X-100	Sigma
TRIZOL	Gibco
Ultroser HY	Gibco
X-Gal	Sigma
Yeast Extract	Fluka

Alle Chemikalien entsprechen dem Reinheitsstandard *pro analysi.*

2.1.2 Enzyme, Antikörper und Assays für RealTime-PCR

Ampli-Taq Gold (im PCR Kit)	Applied Biosystems
Antikörper HADH2 (polyclonal)	Imgenex
Pronase	Sigma
Reverse Transkriptase (cDNA Synthese Kit)	Amersham
T4-DNA Ligase	Promega
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
18S-rRNA Endogenous Control Assay HS_99999901_s1	Applied Biosystems
h-HPRT Endogenous Control Assay 4333768T	Applied Biosystems
UBE1 Gene Expression Assay HS_00243277_m1	Applied Biosystems

2.1.3 Kits

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
cDNA Synthese Kit	Amersham
HeLaScribe in vitro Transcription System	Promega

pTARGET Mammalian Expression System	Promega
QUIAquick Gel Extraktion/Purification Kit	Qiagen
EZ DNA Methylation Kit	Zymo Research

2.1.4 Puffer

A Puffer/B Puffer (ad 2 l Li Chrosolv H_2O)	100 ml TEAA
	500 µl Acetonitril
C Puffer (ad 1 l Li Chrosolv H_2O)	750 ml Acetonitril
Erythrozyten-Lysepuffer (pH 7.4)	155 mM NH_4Cl
	10 mM $KHCO_3$
	0.1 mM Na_2EDTA
PCR-Puffer (10x)	*Ready-to-use*-Puffer
	von Applied Biosystems
PCR-Puffer für RealTime PCR	*Ready-to-use* (s. Enzyme)
Probenauftragspuffer	25% (w/v) Ficoll 400
	0.25% (w/v) Orange G
	1.5 ml NaCl (5 M)
	100 µl EDTA (0.5 M)
	5 ml Glycerin
	500 µl Triton X 100
	0.223 g $Na_4P_2O_7$
Sammelgel-Puffer (ad 1000 ml)	121.2 g TRIS
	pH-Wert auf 6.9 mit 2 N HCL
Trenngel-Puffer (ad 1000 ml)	181.8 g TRIS
	pH-Wert auf 8.8 mit 2 N NaOH
SDS-PAGE-Puffer (10x, ad 1000 ml)	30.3 g TRIS
	144.2 g Glycin
	10 g SDS
SDS-PAGE-Auftragspuffer	von SERVA, zugesetzt:
	5% ß-Mercaptoethanol
SE-Puffer (pH 8)	75 mM NaCl
	25 mM Na_2EDTA

Syringe (wash solution, ad 2 l Li Chrosolv H_2O)	80 ml Acetonitril
TBE-Puffer (10x, pH 8):	900 mM TRIS
	900 mM Borsäure
	20 mM EDTA
TE-Puffer (pH 7.4):	10 mM TRIS
	1 mM EDTA

2.1.5 Primer (Oligonukleotide)

Die für die PCR, die RealTime-PCR und die Sequenzierung notwendigen Primer sind von der Metabion GmbH und TibMolbiol angefertigt worden.
Die normale Liefermenge betrug 40 nmol, diese sind entsprechend dem beigelegten Synthesereport in TE gelöst worden. Die Konzentration der Gebrauchslösung beträgt 20 pmol/µl.

2.1.6 Verwendetes Untersuchungsmaterial

Als Vergleichskontrollen sind anonymisierte DNAs/cDNAs von früheren (wegen anderer Krankheiten untersuchten) Patienten der Abteilung Medizinische Genetik der LMU verwendet worden.
Die zur DNA-/RNA-Gewinnung nötigen Zelllinien der Patienten sind von der Abteilung Medizinische Genetik der Universität Antwerpen und vom *Genetic Center* in Greenwood bereitgestellt worden.

2.1.7 Geräte

Autoklav	Bachofer
DNA Photometer	Gene Quant, Pharmacia
Heizblock	Thermoboy, Libisch
Mikrowelle	M638EC, Miele
PCR-Maschine	PTC 200, MJ Research

Pipetten (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson
RealTime Cycler ABI 7000	Applied Biosystems
Sequenzer ABI 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Spannungsgeräte (power supply)	Consort
Spectrophotometer NanoDrop	Peqlab
UV-Transilluminator (λ = 300 nm)	UVT-20 S/M, Herolab
Vortex	REAX2.000, Heidolph
Waagen	Mettler
Wave Omha	Transgenomic
Wasserbad	MAG Lauda
Zentrifugen	Heraeus

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation genomischer DNA

5-10 ml EDTA-Blut werden mit 40 ml Erythrozyten-Lysepuffer gemischt, bis zur vollständigen Lysierung inkubiert und anschließend zentrifugiert (1000 U/min, 10 min, 7°C). Der Überstand, in dem sich nun die zellkernlosen Erythrozyten befinden, wird verworfen, das Sediment mit den zellkernhaltigen Leukozyten in 25ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert, lysiert und zentrifugiert (1000 U/min, 10min, 7°C). Das Pellet wird dann in 5 ml SE-Puffer aufgenommen, mit 250 µl SDS (20%) und 20 µl Pronase (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nach dieser Proteolyse werden zur Proteinfällung 2 ml NaCl (5 M) dazugegeben; es folgen intensives Mischen (Vortex-Gerät), Zentrifugation (3000 U/min, 10 min, RT) und Filtration des klaren, DNA-haltigen Überstandes mittels steriler, mit H_2O_{dest} befeuchteter Gaze. Durch Zugabe des 2.5-fachen Volumens an Ethanol absolut (-20°C) wird die DNA ausgefällt; der „DNA-Faden“ wird zum Waschen in Ethanol 70% aufgenommen, getrocknet und schließlich in TE-Puffer (0.1 - 1 ml) resuspendiert. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wird eine photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm durchgeführt (1 OD_{260} = 50 µg/ml).

2.2.2 Präparation von RNA (Gewinnung von cDNA)

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die RNA aus in Lymphoblasten-Zelllinien vermehrten B-Zellen gewonnen (EBV-transformiert, Zellwachstum in RPMI-Medium mit 0.5 ml Penicillin/Streptomycin und 2 ml Ultroser im 37°C-Brutschrank mit 5% CO_2).

Bei den folgenden Schritten muss unbedingt mit Handschuhen und an den Zellkultur- bzw. RNA-Sterilbänken gearbeitet werden, um den Abbau der RNA durch RNasen zu verhindern!

10 ml Medium werden zentrifugiert (1200 U/min, 10 min, RT), das Zellpellet in 10 ml PBS aufgenommen, wieder zentrifugiert (1200 U/min, 10 min, RT), in 8 ml PBS aufgenommen und in 1 ml-Portionen auf Eppendorfgefässe (2ml) verteilt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (Tischzentrifuge, max. speed, 2 min) wird das Pellet in 1 ml TRIZOL-Reagenz resuspendiert und 4 min stehengelassen, die Zellstrukturen werden hierbei aufgebrochen.

Nach Zugabe von 1 ml Chloroform, intensivem Mischen und Zentrifugation (Tischzentrifuge, max. speed, 15 min, 4°C), bilden sich drei Phasen aus: In der unteren befindet sich hauptsächlich das organische Lösungsmittel, in der mittleren, der Interphase, lysiertes Proteinmaterial und in der oberen wässrigen Phase RNA mit geringen DNA-Anteilen; diese wird abpipettiert, in neue Eppendorfgefässe (2 ml) überführt, zum Ausfällen der RNA mit 500 µl Isopropanol gemischt sowie nach 15-20 min Inkubation zentrifugiert (Tischzentrifuge, max. speed, 15 min, 4°C). Es folgt ein Reinigungsschritt mit Ethanol 70%, erneuter Zentrifugation und abschließendem Trocknen der RNA im Exsikkator, die dann in 21 µl DEPC-H_2O aufgenommen wird.

Die Qualität der isolierten RNA wird mittels Messung am NanoDrop-Spectrophotometer sowie durch Auftragen auf einem Agarosegel (2%) beurteilt, auf dem man drei Banden Gesamt-RNA (28 S, 18 S, 5 S) sieht.

Die RNA wird mit Hilfe eines cDNA-Synthese-Kits in cDNA umgeschrieben und dadurch stabilisiert.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

a) Standard-PCR (nach Saiki)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ein durch synthetische Oligonukleotid-Primer bestimmtes DNA- oder cDNA-Fragment *in vitro* amplifiziert und dadurch in ausreichenden Mengen analytischen Methoden wie z.B. der Sequenzierung zugänglich gemacht.

Die PCR läuft in drei Grundschritten ab, die bis zu 45mal wiederholt werden:

1. Denaturierung der Doppelstrangstruktur der DNA bzw. cDNA bei 94°C
2. Anlagerung (annealing) der Primer bei 50 – 68°C an die Einzelstränge
3. Elongation bei 72°C (Synthese mit Hilfe des hitzestabilen Enzyms Taq-Polymerase, die aus *Thermus aquaticus* gewonnen wird), die Einzelstränge werden wieder zu Doppelsträngen synthetisiert, das Ausgangsmaterial an DNA bzw. cDNA ist nach jedem Zyklus verdoppelt worden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer und PCR-Programme sind im Anhang aufgelistet. Gearbeitet ist mit dem *AmpliTaqGold*-PCR-Kit von *Applied Biosystems* worden.

b) Reverse Transkriptase PCR *(RT-PCR)*

Für Analysen auf Transkriptionsebene muss die frisch isolierte RNA in die zu ihr komplementäre DNA, cDNA, umgeschrieben werden. Diesen Vorgang katalysiert die *Reverse Transkriptase*. In den vorliegenden Versuchen ist zur Umschreibung in cDNA der cDNA Synthese Kit von *Amersham* verwendet worden; die eigentliche RT-PCR auf Basis der cDNA ist mit dem *AmplitaqGold*-PCR-Kit von *Applied Biosystems* durchgeführt worden.

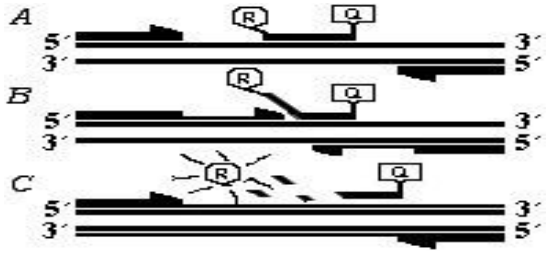
c) Echtzeit-PCR *(RealTime PCR, Taqman-PCR)*

Bei der Echtzeit-PCR handelt es sich um eine quantitative PCR mit Fluoreszenzmarkierung mittels eines Oligonukleotids als Sonde, die zusätzlich zu den normalen PCR-Primern dazugegeben wird. Auf diese Weise nimmt das Fluoreszenzsignal mit der Amplifikation des eingesetzten Templates zu, so dass sich die für die PCR charakteristische Amplifikationskurve mit *lag*-Phase, linearer Zunahme und Sättigungsphase aufzeichnen lässt. Entscheidend ist nun der Zeitpunkt, zu dem sich das fluoreszierende PCR-Signal aus dem Grundrauschen

erhebt; daraus bzw. aus der entsprechenden Zykluszahl c_t kann auf die Anfangskonzentration der DNA oder cDNA geschlossen werden. Sollte z.B. das Gen eines Mutanten stärker exprimiert sein, ist ein früherer c_t-Wert im Vergleich zum normal exprimierten Gen zu erwarten.

Es gibt zwei verschiedene Ansatzmöglichkeiten:

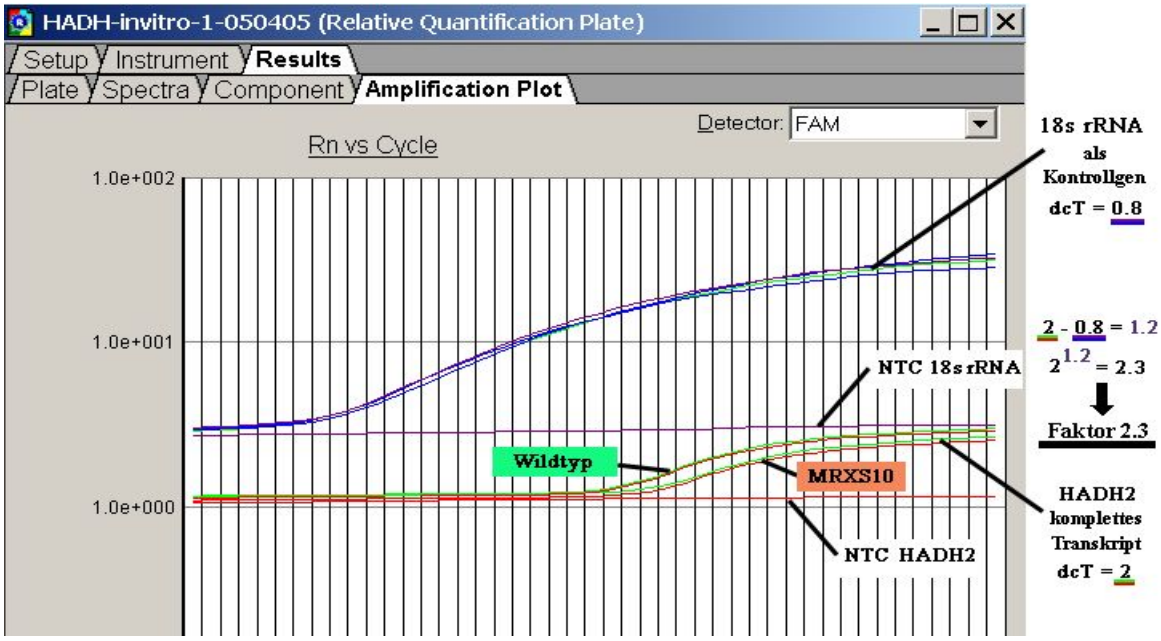
- absolut durch Mitführen einer Standardkurve (Eichgerade) und Bestimmung eines absoluten Konzentrationswertes oder
- relativ, indem z.B. ein *housekeeping*-Gen, das überall gleich stark exprimiert sein muss, als Referenz mitgeführt wird und somit das Expressionsverhalten des zu untersuchenden Gens relativ zu einem anderen bestimmt wird.



Prinzip der Quantifikation in der RealTime-PCR: In den vorliegenden Experimenten sind *Taqman*-Sonden von Applied Biosystems verwendet worden. ***A*** Die Sonden, Oligonucleotide bis zu 30 Basenpaaren lang, haben auf der 3´-Seite einen Fluoreszenzsuppressor (Q = Quencher), am 5´-Ende einen Reporter-Farbstoff (R), so dass die Sonde durch die unterdrückende Wirkung von Q nicht fluoresziert; die Sonde bindet spezifisch an die DNA/cDNA. ***B*** An einer Soll-Knickstelle wird die Sonde durch die Bildung des neuen Stranges genickt, ***C*** gebrochen und von der DNA/cDNA abgelöst. Diese Reaktion wird durch die Polymerase- und 5´-3´-Nuklease-Aktivität der *AmpliTaqGold* ermöglicht. So kann sich der Reporter von Fluoreszenzsuppressor Q entfernen und fluoreszieren (nach Applied Biosystems).

Beispiel zur Auswertung einer RealTime-PCR:

Der *Screenshot* auf der nächsten Seite zeigt das Resultat einer RealTime-PCR zur Analyse der Expression des Gens *HADH2* (siehe Seite 35ff). Die oberen Kurven stellen die Expression der als Kontrollgen verwendeten 18S rRNA dar, die unteren Kurven die Expression des Gens *HADH2* bzw. des *in vitro* expremierten *HADH2*-Transkripts.



In beiden Fällen werden die cDNAs des/der Patienten (hier: MRXS10) sowie mehrerer Wildtyp-Kontrollen amplifiziert und dann miteinander verrechnet. Dies geschieht in drei Schritten:

1. Vergleich Wildtyp-Kontrollen/Patient(en) bezüglich Kontrollgen (hier. 18s rRNA, Resultat: 0.8 dcT)
2. Vergleich Wildtyp-Kontrollen/Patient(en) bezüglich des zu untersuchenden Gens (hier: *HADH2*, Resultat: 2 dcT)
3. Verrechnung (Normalisierung) der Patientenwerte mit den Werten der Wildtyp-Kontrollen (hier: 2 - 0.8 = 1.2 ddcT) sowie anschließende Errechnung des Faktors auf Basis von 2^{xddcT} (hier: $2^{1.2}$ = Faktor 2.3)

In diesem Fall wurde festgestellt, dass das komplette *HADH2*-Transkript mit allen Exonen im Wildtyp um das 2.3-fache stärker exprimiert wird als in den MRXS10-Patienten.

2.2.4 Sequenzierung (nach Sanger)

Die Sequenziermethode nach Sanger (1977) beruht auf dem Prinzip des durch Didesoxynukleotide verursachten Syntheseabbruchs während der sog. Sequenzier-Cycle-Reaktion, einem PCR-ähnlichen Prozess, an dem als Enzym die Sequinase, als Template in der Regel ein PCR-Produkt, neben

Desoxynukleotiden (dNTPs) zusätzlich Didesoxynukleotide (ddNTPs) und entweder ein Vorwärts- oder Rückwärts-Primer beteiligt sind. Als Kit ist der *Big-Dye Sequence Cycle Mix* von *Applied Biosystems* verwendet worden.

Für die Sequenzier-Cycle-Reaktion selbst werden 50-100 ng PCR-Produkt benötigt, das zuvor mit dem PCR-Reinigungs-Kit von *Quiagen* von überschüssigen Nukleotiden und störenden Primerresten der PCR-Reaktion gereinigt worden ist.

Nach Abschluss der Sequenzier-Cycle-Reaktion wird das entstandene Sequenzprodukt analog zur unter Punkt 1 beschriebenen DNA-Fällung (allerdings mit 1 µl 3 M NaAc und 25 µl 100% EtOH) ausgefällt und getrocknet.

Für den zweiten Hauptschritt, die Sequenz-Detektion, wird das getrocknete Sequenzprodukt in formamidhaltigem Auftragspuffer aufgenommen, auf das Polyacrylamidgel im Sequenziergerät aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Reaktionsansatz:	BigDye	2 µl
	DNA (PCR-Produkt)	x µl
	Primer	0.2 µl
	H_2O	auf 10 µl auffüllen

Sequenzier-Programm	96°C	30 s
	50°C	15 s
	60°C	4 min
	25 Zyklen	

Der Sequenzierungsvorgang selbst erfolgt grundsätzlich in zwei Hauptschritten:

- Sequenzier-Cycle-Reaktion: Hier enstehen durch die Wirkung der Didesoxynukleotide Fragmente von Nukleinsäuren, die sich in ihrer Länge unterscheiden, da der Einbau eines solchen "Abbruch-Nukleotids" zufällig erfolgt, so dass statistisch gesehen an jeder Position des zu sequenzierenden Templates mindestens einmal die Synthese abgebrochen worden ist. Diese Fragmente stimmen also in ihrem 5´-Ende, das der Primer festlegt, überein, besitzen aber variable 3´-Enden mit einem der vier unterschiedlich fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden *(Big Dye)*.
- Sequenz-Detektion (automatisch) und Analyse: Die Proben werden auf einem automatischen Sequenziergerät (ABI377) in einem Polyacrylamidgel (4-5%) elektrophoretisch aufgetrennt; ein Laser detektiert die vier ddNTPs über ihre fluoreszierende Gruppe. Mit dem Computerprogramm *ABI PRISM* von *Applied Biosystems* werden die

Sequenzrohdaten berechnet und als Elektropherogramme dargestellt. Zum Vergleich mehrerer Sequenzen miteinander (sequence alignment) wird das Programm *Sequence Navigator* verwendet.

2.2.5 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Mit dem Verfahren der DHPLC lassen sich mit hoher Sensitivität (>95%) Deletionen, Punktmutationen und Insertionen sowie Polymorphismen nachweisen.

Dabei wird zunächst das zu untersuchende DNA-Fragment in einer PCR amplifiziert, anschließend auf 95°C erhitzt und langsam wieder abgekühlt: Die Doppelstränge der beiden heterozygoten Allele werden so erst denaturiert und können während des Abkühlvorgangs sowohl Homoduplex- als auch Heteroduplex-Kombinationen bilden. Im Fall von homozygoten Mutationen muss zur Detektion vor der Denaturierung Wildtyp-DNA dazugemischt werden (Schwarzer, 2000). Diese renaturierten Proben werden im DHPLC-Gerät bei denaturierenden Temperaturen (55–68°C) über eine hochauflösende Polymermatrix voneinander getrennt, wobei sich die instabilere Heteroduplex-Kombination eher von der auftrennenden Säule ablöst und nach der Messung bei λ=260 nm und Computerverarbeitung grafisch als *„peak“* vor der Homoduplex-Kombination erscheint und damit ein *„double peak“* sichtbar wird. Man macht sich ähnlich wie beim SSCP-Verfahren die unterschiedlichen Laufeigenschaften von mutierter DNA und Wildtyp-DNA zunutze.

2.2.6 Bisulfit-Behandlung der DNA

Eine Möglichkeit, um den Methylierungszustand der DNA zu untersuchen, ist die Bisulfit-Methode. Dabei wird die DNA mit Bisulfit behandelt und jedes unmethylierte Cytosin gegen Thymin ausgetauscht. Anschließend erfolgt die PCR-Amplifikation mit an die konvertierte Sequenz angepaßten Primern und Analyse des Methylierungszustand der DNA mittels direkter Sequenzierung.

In dieser Arbeit wurde hierzu das *EZ DNA Methylation Kit* der Firma Zymo Research verwendet. Es wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen.

2.2.7 Northern-Blot

Mittels der Northern-Blot-Technik wird RNA aus dem gewünschten Gewebe oder auch aus mehreren Geweben isoliert, auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen. Gegen diese transferierte RNA werden RNA- bzw. cDNA-Abschnitte hybridisiert, die radioaktiv markiert sind, spezifisch für das jeweilige Gen hergestellt werden und so als Sonden dienen. Auf diese Art kann die Expression und die Expressionsstärke von Genen untersucht werden. Die Membranen sind auch käuflich erhältlich mit RNA aus unterschiedlichen Geweben. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Membran handelt es sich um einen Northern-Blot mit RNA aus acht Geweben der Firma Clontech. 20-50 ng cDNA-Amplifikate werden als Sonden auf die Membran hybridisiert. Die radioaktive Markierung dieser cDNA-Amplifikate erfolgt durch Einbau von α^{32}-P-dCTPs während einer Inkubation bei 37°C von 30 min mit Hilfe des Klenow-Enzyms (6 U/µl) nach Herstellerprotokoll. Nicht-eingebaute Nukleotide werden über eine sog. Sephadex-G50-Säule durch Zentrifugation bei 2000 U/min für 10 min abgetrennt. Um repetitive Sequenzen zu blocken, werden 100µl denaturierter Lachsspermien-DNA (SS-DNA) zugegeben. Die eigentliche Hybridisierung erfolgt in einer Hybridisierungsröhre bei 65°C über Nacht unter gleichmäßigem Rotieren. Danach wird die Membran in 2x-SSC-Lösung und in den Waschlösungen 1, 2 und 3 gewaschen (unter zunehmender Stringenz). Mit einem Geigerzähler wird die Radioaktivität der Membran kontrolliert. Die Autoradiographie erfolgt auf RX-Filmen von Fuji und CAWO-SE6-Verstärkerfolien bei -70°C. Die Expositionsdauer hängt von der zu erwartenden Expressionsstärke des Gens ab (Angaben hierzu befinden sich im Ergebnisteil).
Zum Abgleich wird auf derselben Membran β-Aktin hybridisiert.

2.2.8 Protein- oder Immuno-Blot *(Western-blotting)*

1. Isolierung der Proteine

Zur Lyse der Zellen werden 20-40 ml aus einer lymphoblastoiden Zelllinie entnommen, die für drei Tage bei 37°C inkubiert wurde (mangels Mikroskop

war eine genaue Zellzahlbestimmung nicht möglich). Es erfolgt Zentrifugation (1000 U/min, 5 min) und dann zweimaliges Reinigen mit PBS.

Das gereinigte Zellpellet wurde in 50-200 µl eiskaltem RIPA-Puffer aufgenommen und über Nacht unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (10000 U/min, 2 min) und der Überstand, in dem sich die Proteine befinden, abgenommen.

2. **Proteinauftrennung auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)**

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer Grösse aufgetrennt. Durch Inkubation der Proteine mit SDS, einem anionischen Detergenz, zusammen mit dem Reduktionsmittel ß-Mercapto-ethanol werden die Proteine denaturiert und durch die Einwirkung von SDS negativ geladen. Durch die Bindung an das SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung. Die Proben werden mit 6 µl SDS-PAGE-Auftragspuffer gut gemischt und 3 min bei 95°C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte auf einer Mini-PROTEAN-Apparatur der Firma BioRad bei 30 mA und 200 V für ca. 1.5 h (Prüfung des Laufs der Proben auf Sicht).

Das SDS-PAGE-Gel besteht aus einem Trenngel (12%) und einem überschichteten Sammelgel (4%), in das die Proben aufgetragen werden.

3. ***Western-Blotting*** **und Detektion**

Im *Western-blotting*-Verfahren werden Proteine, die auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt wurden, auf eine PVDF-Membran (Polyvinylindendifluorid) transferiert und auf dieser mit Protein-spezifischen Antikörpern detektiert. So können je nach Fragestellung Proteine nachgewiesen oder auch bezüglich ihrer Mengenverhältnisse untersucht werden.

Das SDS-PAGE-Gel wird nach dem Lauf in 1x-Blotting-Puffer unter Schwenken für 10min gewaschen, ebenso die auf Gelgrösse zugeschnittenen Membranen und *Whatman*-Papiere.

Das *Blotting* selbst erfolgte bei 30 V für 45 min in einer *Semi-dry-TansferCell* der Firma Biorad mit folgendem Aufbau: 3x *Whatman*-Papier, Gel, Membran, 3x *Whatman*-Papier.

Weiteres Vorgehen:

- Inkubation der Membran in PBST mit 5% Milchpulver für 1 h (Blocken)

- Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper in PBST mit 1% BSA über Nacht bei 4°C
- Waschen der Membran 3x für 10 min mit PBST
- Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (1h bei RT)
- erneutes Waschen der Membran 3x für 10 min mit PBST
- Detektion mittels selbst angefertigtem Chemilumineszenz-Reagenz durch Inkubation der Membran für 2 min
- anschließende Belichtung auf Film (Belichtungszeiten von 1 s - 1 h) sowie Filmentwicklung

Schließlich wurden die Proteinbanden quantitativ und bezüglich Ihrer Grösse ausgewertet.

2.2.9 Klonierung

1. Vorbereitung der zu klonierenden Genfragmente

   Zuerst wird mittels PCR spezifisch das DNA-Fragment amplifiziert, das kloniert werden soll. An die hierzu verwendeten Primer wird an deren 3'-Ende die Sequenz der jeweiligen Restriktionsenzym-Sequenz angehängt. Mit dem Restriktionsenzym wird dann auch der Vektor geschnitten und so schließlich die Ligierung des PCR-Fragments in den Vektor ermöglicht. Das PCR-Fragment wird standardmäßig gereinigt und mittels Sequenzierung auf mögliche Fehler geprüft.

2. Ligierung

   Während der Ligierung wird das gewünschte, zuvor gereinigte PCR-Fragment in den Vektor eingebracht. Hierzu werden Vektor und PCR-Fragment mit demselben Restriktionsenzym geschnitten und anschließend gereinigt. In dem folgenden Ligierungsschritt wird das PCR-Fragment durch die Enzymaktivität der Ligase (T4-DNA-Ligase) in einer Inkubation über Nacht bei 4°C in den Vektor eingebaut.

   Folgender Ligierungsansatz wurde gemäß Herstellerprotokoll von Promega verwendet:

   0.5 µl Vektor

1 µl	10x Ligationspuffer
X µl	PCR-Produkt (50 ng)
1 µl	T4-DNA-Ligase
X µl	Nuklease-freies H_2O ad 10 µl Gesamtvolumen

3. Transformation

Nun erfolgt die Transformation kompetenter Zellen mit dem Vektor, der das zu klonierende PCR-Fragment enthält. Hierzu werden tiefgekühlte Zellen mit dem Ligationsansatz auf Eis gemischt und für 20 min inkubiert. Dann wird diese Mixtur für 30-50 s auf 42°C erhitzt, wodurch die Vektoren in die kompetenten Zellen gelangen. Direkt danach erfolgt eine Inkubation auf Eis für 2 min und dann eine Zugabe von 400 µl SOC-Medium. In diesem Bakteriennährmedium werden die nun mit dem Vektor transformierten Zellen für zwei Stunden bei 37°C unter Schütteln bei 150 U/min inkubiert, dann auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Selektion der gewünschten Zellen mit Vektor und dem eingebauten PCR-Fragment wird einerseits ein Antibiotikum (Ampicillin, dazugegeben im Verhältnis 1:1000), andererseits das Lac-Z-Gen zur üblichen Weiß-/Blau-Selektion verwendet. Die das PCR-Fragment enthaltenden weissen Kolonien werden in Flüssig-Agar vermehrt (37°C, über Nacht, ca. 200 U/min).

In einer sog. 'Mini-Präparation' (nach Qiagen) wird die klonierte DNA isoliert. Mittels Sequenzierung wird die richtige Orientierung der PCR-Fragmente im Vektor und die Richtigkeit der Basenabfolge überprüft.

2.2.10 *In vitro*-Expression (-Transkription, -Spleißen)

Die genomischen Bereiche eines Gens, das *in vitro* exprimiert werden soll, werden zunächst in den pTarget-Vektor der Firma Promega kloniert.

Die klonierten und mittels Sequenzierung überprüften Genfragmente werden im *HeLaScribe Nuclear Extract in vitro Transcription System* der Firma Promega durch die Polymerase II transkribiert und durch die in dem HeLa-Extrakt enthaltenen Proteine in mRNA prozessiert. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen.

Die so gewonnene mRNA wird dann wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben isoliert.

2.2.11 Sequenzdatenbanken und Computeranalyseprogramme

Bei der Suche nach neuen Genen sind Computerhilfsprogramme von grossem Nutzen: Dabei werden für den zu untersuchenden Sequenzabschnitt aufgrund von Gen-Charakteristika wie Leserahmen, Spleißstellen bzw. konservierten Exon-/Intronübergängen, GC-Gehalt und CpG-Inseln etc. Gene vorhergesagt. Hinzu kommen immer mehr ESTs, also ansequenzierte Gene, die ebenfalls bei der Genvorhersage berücksichtigt werden.

Der für diese Arbeit interessante Abschnitt Xp11.23–p21.1 ist vorwiegend mit den Analyseprogrammen des *UK HGMP Resource Centre (www.hgmp.mrc.ac.uk)*, von *NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)* und *UCSC Genome Bioinformatics (genome.ucsc.edu)* auf Gene oder auch z.B. auf *Repeat*-Bereiche, um die Lage von PCR-Primern zu optimieren, untersucht worden. In diesem Zusammenhang sei noch die BLAST-Funktion von *NCBI* und *UCSC Genome Bioinformatics* erwähnt, mit deren Hilfe Homologien zwischen Sequenzen festgestellt werden können.

Zur *in silico*-Analyse von Spleiß-regulatorischen Sequenzabschnitten wurde der *ESE-finder 2.0* von Cartegni et al. verwendet (*http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/*).

3 Ergebnisse

3.1 MRX9: Das Gen *FTSJ1* ist an einer Spleißakzeptorstelle mutiert[1]

Die als MRX9 klassifizierte XLMR-Familie stammt aus Belgien und besteht aus vier Generationen mit sieben betroffenen Männern, ihren fünf nicht-betroffenen Brüdern sowie fünf Überträgerinnen (Abb. 3). Diese Familie ist 1993 erstmals von Willems beschrieben worden (Willems et al., 1993). Es handelt sich hier um nicht-syndromische mentale Retardierung. Die Betroffenen leiden an milder bis starker geistiger Behinderung ohne weitere klinische Auffälligkeiten (Winnepenninckx et al., 2002).

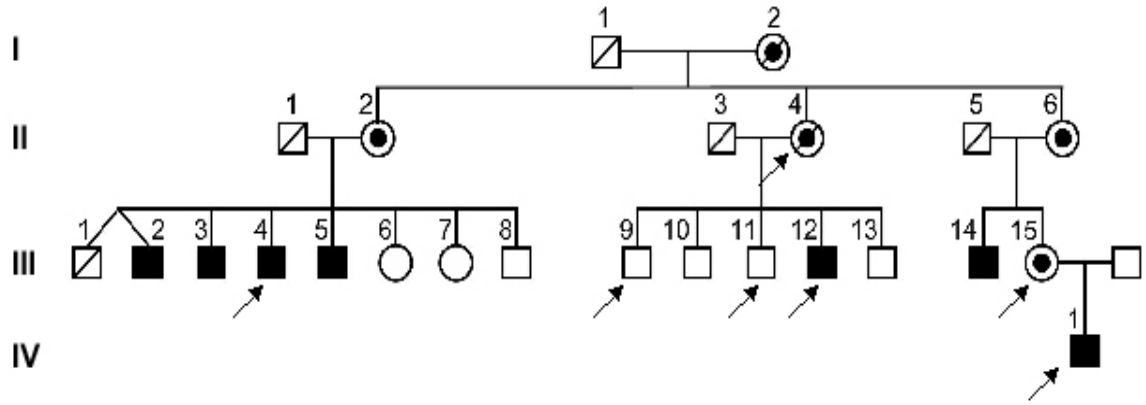


Abb. 3 Stammbaum der Familie MRX9. Pfeile markieren die untersuchten Individuen. Familienmitglieder markiert durch Kreis (weiblich), Quadrat (männlich), Kreis mit Punkt (obligate Überträgerin), Quadrat (männlich), schwarzes Quadrat (Mutationsträger), durchgestrichen meint verstorben.

Für die MRX9-Familie wurde ein Kopplungsintervall von 11.3 Mb auf Xp11.22-p11.4 zwischen den Markern DXS228 und DXS1204 ermittelt (Winnepenninckx et al., 2002). Für diesen Chromosomenbereich wurde ein Genkatalog mit 23 Genen aufgestellt. All diese Gene wurden anschließend mittels direkter Sequenzierung auf DNA- und cDNA-Ebene auf Mutationen untersucht.

[1] Die Ergebnisse dieses Kapitels sind veröffentlicht in Ramser et al., 2004.

In dem Gen *FTSJ1* auf Xp11.23, das humane Homolog der bakteriellen 23S-rRNA Methyltransferase, konnte ein G>A Basenaustausch in der Spleißakzeptorstelle vor Exon 4 gefunden werden (IVS-2G>A, Abb. 4). Diese Mutation konnte sowohl in den Betroffenen III-4, III-12, IV-1 als auch heterozygot in den obligaten Überträgerinnen II-4 und III-15 nachgewiesen werden, aber nicht in den gesunden männlichen Individuen III-9 und III-11.
Mittels DHPLC-Analyse wurden 200 Kontrollpersonen (je 100 gesunde Frauen und Männer) untersucht. Die Mutation IVS-2G>A war in all diesen Personen nicht nachweisbar. Auch die Analyse von insgesamt 64 weiteren XLMR-Patienten, die für *FTSJ1* ohne Befund blieb, zeigte, dass die gefundene Spleißstellen-Mutation spezifisch für die MRX9-Familie ist.

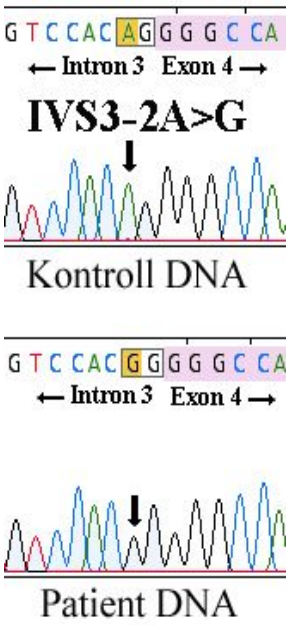


Abb. 4 Die Mutation IVS3-2A>G in *FTSJ1* an der Spleißakzeptorstelle in Intron 3 im MRX9-Patienten

Um nachzuweisen, dass dieser G>A-Austausch die konservierte Spleißakzeptorstelle AG vor Exon 4 verändert und die Prozessierung eines Transkripts ohne Exon 4 begünstigt, wurde eine PCR auf cDNA-Ebene (RT-Amplifikation) durchgeführt. Diese RT-Amplifikation (Abb. 5A) und die anschliessende Sequenzierung des *FTSJ1*-Fragments bestätigte den Wegfall des

kompletten vierten Exons. Durch diesen Wegfall entsteht ein vorzeitiges Stop-Codon an Aminosäureposition 335 in Exon 5 (Abb. 5B).

Das Gen *FTSJ1* besteht aus insgesamt 13 Exonen, davon 11 Protein-kodierend. Es weist eine funktionell bisher nicht genau charakterisierte Domäne auf, die von den Exonen 2-9 kodiert wird und hochkonserviert ist. Mit dem durch den Wegfall von Exon 4 verursachten vorzeitigen Stop-Codon wird das FTSJ1-Protein sowie seine Domäne stark verkürzt. Hierauf wird im Diskussionsteil näher eingegangen.

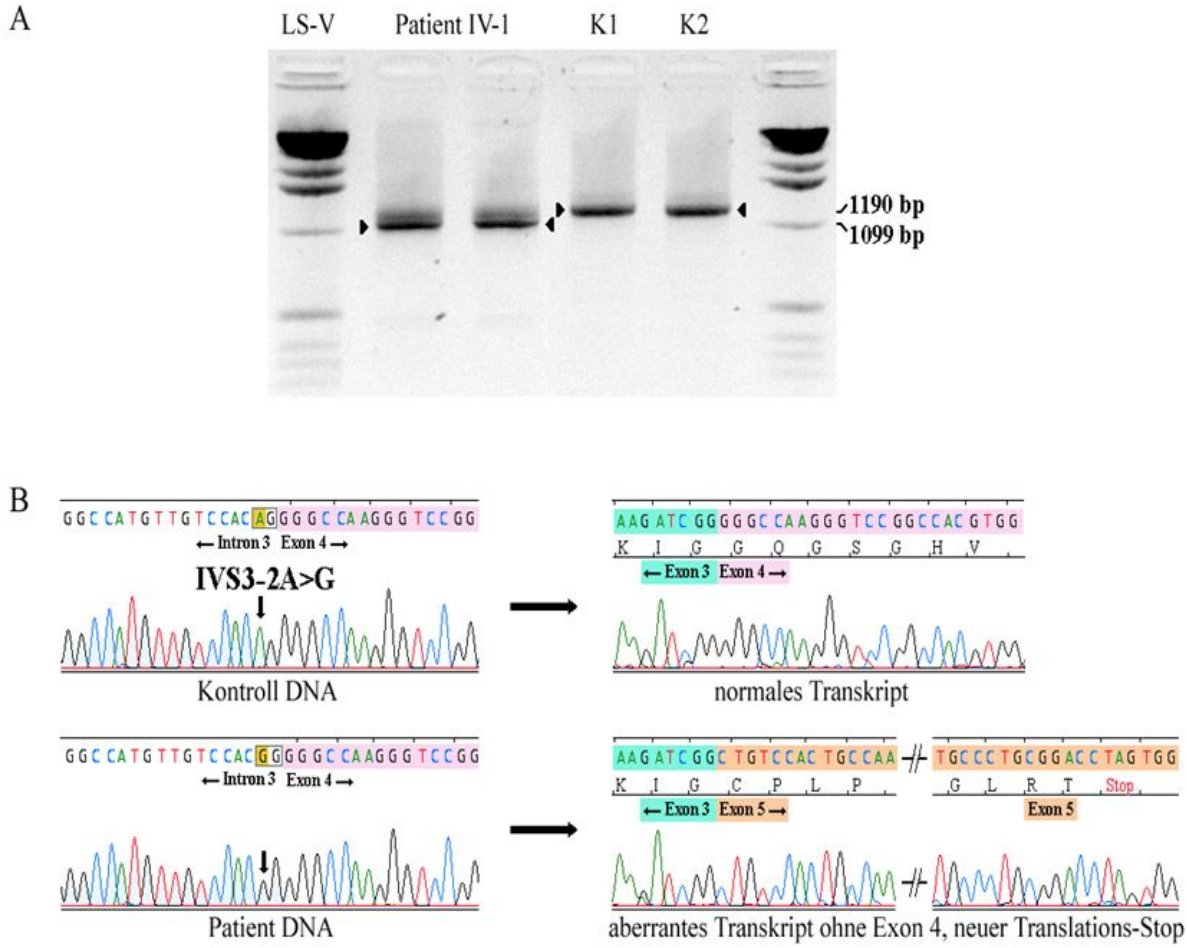


Abb. 5 **A** RT-Amplifikation der 11 kodierenden Exone von *FTSJ1* zeigt das 1190 bp-grosse Wildtyp-Transkript und im Falle zweier Proben des Patienten IV-1 zusätzlich ein kleineres Transkript von 1099 bp.

B Isolierung und Sequenzierung beider RT-PCR-Banden bestätigte den Wegfall von Exon 4 im Patienten. Es ensteht ein neuer Translationsstop in Exon 5.

Eine Expressions-Analyse mittels *Northern-blotting* und Abgleich mit ß-Aktin-Detektion ergab, dass *FTSJ1* anscheinend ubiquitär exprimiert wird, am stärksten

im Herzen und in der Lunge. Eine längere Expositionsdauer des Blots von knapp drei Wochen zeigte auch eine Genaktivität von *FTSJ1* im Gehirn und weiteren Geweben (Abb. 6).

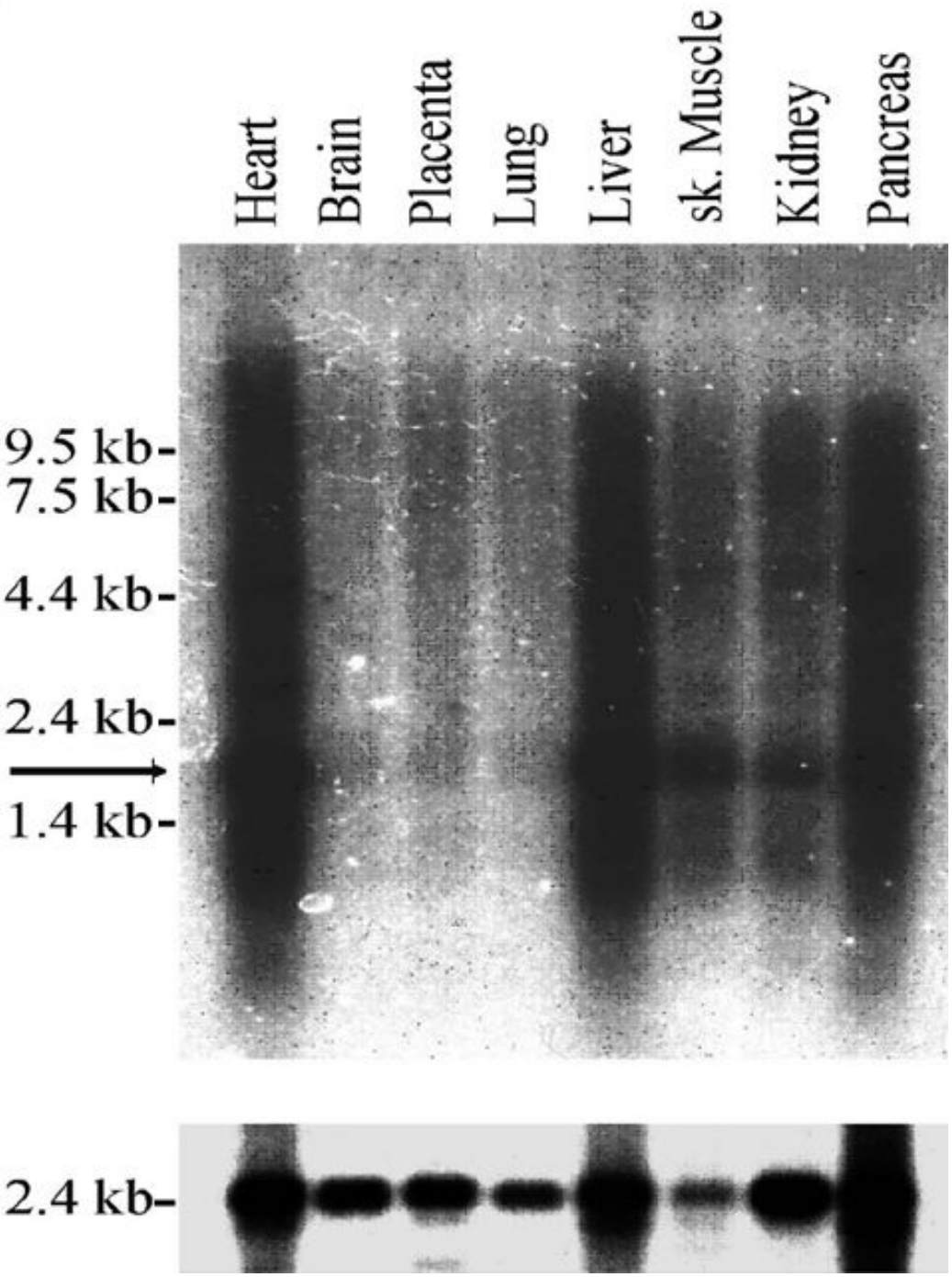


Abb. 6 Oben: Nachweis der Expression von *FTSJ1* in unterschiedlichen Geweben mittels *Northern-blotting*. Die Expositionszeit betrug drei Wochen. Der Pfeil markiert bei ca. 1.9 kb das *FTSJ1*-Transkript.
Unten: Abgleich mittels ß-Aktin-Detektion (ca. 2.4 kb)

3.2 Mutationen in dem Gen *PQBP1* in der *Renpenning*-Familie (MRXS8) sowie einer weiteren MRX-Familie[2]

Die *Renpenning*-Familie, bezeichnet als MRXS8 oder früher als K8110, ist eine Mennonitische Familie mit 20 geistig behinderten Männern in drei Generationen (Abb. 7) und wurde erstmals 1962 von *H.J. Renpenning* beschrieben. Es handelt sich um eine Form syndromischer mentaler Retardierung. Außer an ausgeprägter geistiger Behinderung, die IQ-Werte liegen gemittelt bei 30, leiden die Betroffenen an Kleinwüchsigkeit, Mikrocephalie und kleinen Hoden, während die obligaten Überträgerinnen unauffällig sind (Renpenning et al., 1962).

Das für die *Renpenning*-Familie ermittelte Kopplungsintervall liegt im Bereich Xp11.2-p11.4 zwischen den Markern DXS1126-DXS1068 (Stevenson et al., 1998). Dieses Intervall überlappt weitgehend mit dem der zuvor beschriebenen MRX9-Familie, die Genanalysen konnten parallel durchgeführt werden. Die Gene in diesem Intervall wurden mittels direkter Sequenzierung auf DNA- sowie auf cDNA-Ebene analysiert.

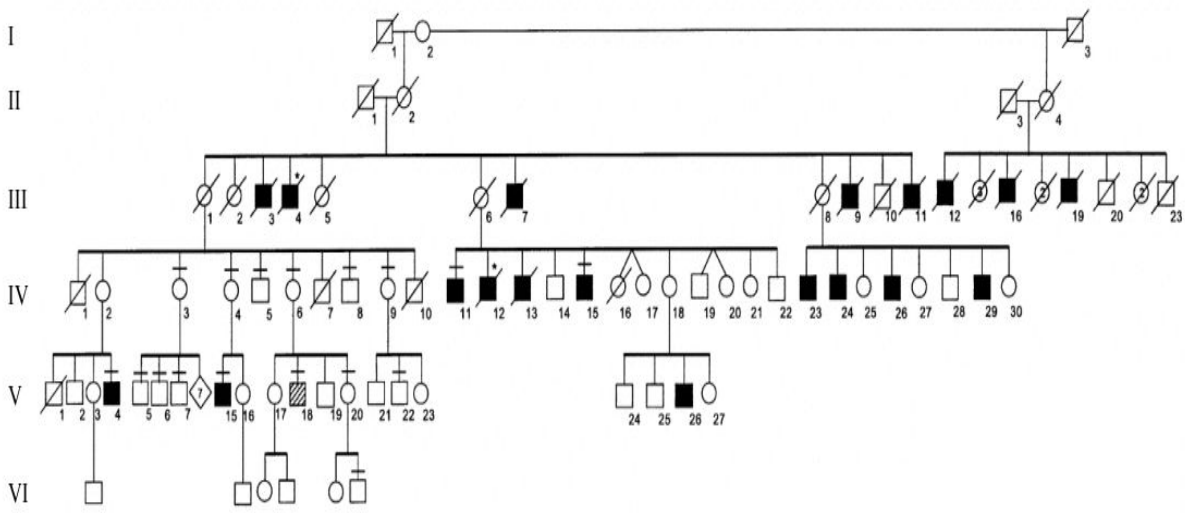


Abb. 7 Stammbaum der *Renpenning*-Familie. Familienmitglieder markiert durch Kreis (weiblich), Quadrat (männlich), Kreis mit Punkt (obligate Überträgerin), Quadrat (männlich), schwarzes Quadrat (Mutationsträger), durchgestrichen meint verstorben, Raute Geschlecht nicht bekannt.

[2] Die Ergebnisse dieses Kapitels sind veröffentlicht in Lenski et al., 2004.

Die pathogene Mutation, eine Cytosin-Insertion, konnte in dem Gen *PQBP1*, das für das Polyglutamine Tract Binding Protein 1 kodiert, gefunden werden. Dieses Gen ist auf Xp11.2 lokalisiert und besteht aus sechs Exonen, die für 265 Aminosäuren kodieren.

Das von *PQBP1* kodierte Protein weist vier Domänen auf:

- eine WW-Domäne, kodiert von den Aminosäuren 47-78, die eine bedeutende Rolle bei der Transkriptionsaktivität spielt
- eine Polyglutamin-bindende Region (PRD), die vom mittleren Bereich von Exon 4 kodiert wird und ebenfalls die Transkription beeinflusst
- ein *Nuclear Localization Signal (NLS)*, dessen Zerstörung zu einer Delokalisation des betroffenen Proteins aus dem Zellkern ins Zytoplasma führt
- eine C2-Domäne, die mit U515 kD interagiert

Bisher sind eine Reihe von Mutationen in *PQBP1* beschrieben, die alle in dem für die PRD- bzw. DR/ER-Region kodierenden Bereich von Exon 4 liegen (siehe auch Abb. 10, S.34). Die bisherigen Mutationen wurden in Patienten gefunden, die am *Sutherland-Haan*- oder am *Hamel*-Syndrom leiden, sowie in MRX55 und zwei weiteren XLMR-Familien (Kalscheuer et al., 2003).

Die in der *Renpenning*-Familie beobachtete Mutation ist eine Insertion eines Cytosins in Exon 5, c.641insC. Diese Mutation verursacht ab dieser Nukleotidposition in Exon 5 eine Veränderung der Abfolge der Aminosäuren sowie einen alternativen Translationsstop bei Aminosäureposition 226 (Abb. 8).

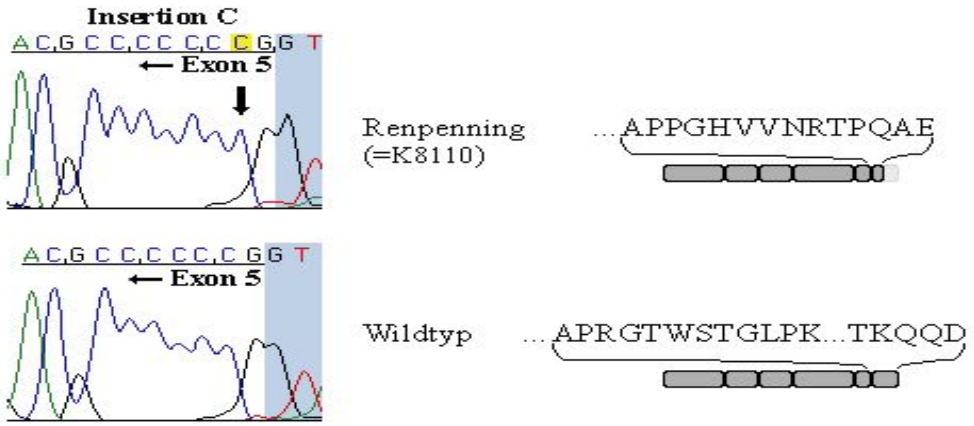


Abb. 8 Die Mutation c.641insC in der *Renpenning*-Familie: Die Insertion eines Cytosins in Exon 5, verändert die Aminosäuresequenz und verursacht ein alternatives Stop-Codon.

In einer weiteren XLMR-Familie, in der die Betroffenen neben mentaler Retardierung ebenfalls Mikrocephalie und Kleinwüchsigkeit aufweisen, K9008, wurde eine bisher nicht beschriebene Dinukleotid-Deletion am Ende von Exon 4 festgestellt (Abb. 9). Diese Mutation, c.575-576delAG, verursacht ebenso wie die Cytosin-Insertion in der *Renpenning*-Familie eine Verschiebung des Leserahmens und somit eine veränderte Aminosäurensequenz. Beim K9008-Patienten wird ein vorzeitiger Translationsstop an Aminosäureposition 198 wirksam.

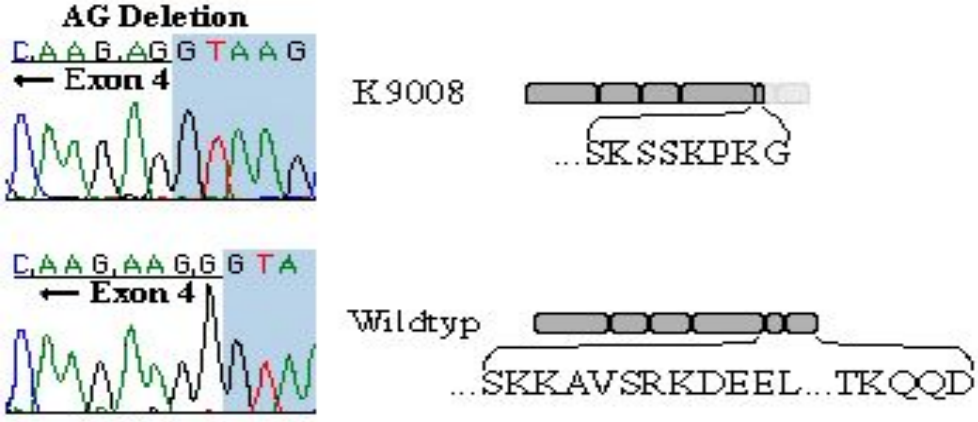


Abb. 9 Die Mutation im Patienten K9008: Eine Deletion c.575-576delAG in Exon 4 verursacht eine Leserahmenverschiebung sowie einen vorzeitigen Translationsstop.

In 200 von mir zur Kontrolle sequenzierten gesunden Männern konnte keine dieser Protein-verändernden Mutationen, weder c.641insC noch c.575-576delAG, gefunden werden.

In Abbildung 10 (auf folgender Seite) wird ein Überblick über die Positionen der Mutationen in *PQBP1* gegeben. Dabei wird deutlich, dass die hier beschriebenen Mutationen c.641insC und c.575-576delAG andere Bereiche von *PQBP1* betreffen als die bisher publizierten Mutationen. Die daraus resultierenden Auswirkungen auf die unterschiedlichen Domänen von *PQBP1* stelle ich in der Diskussion vor.

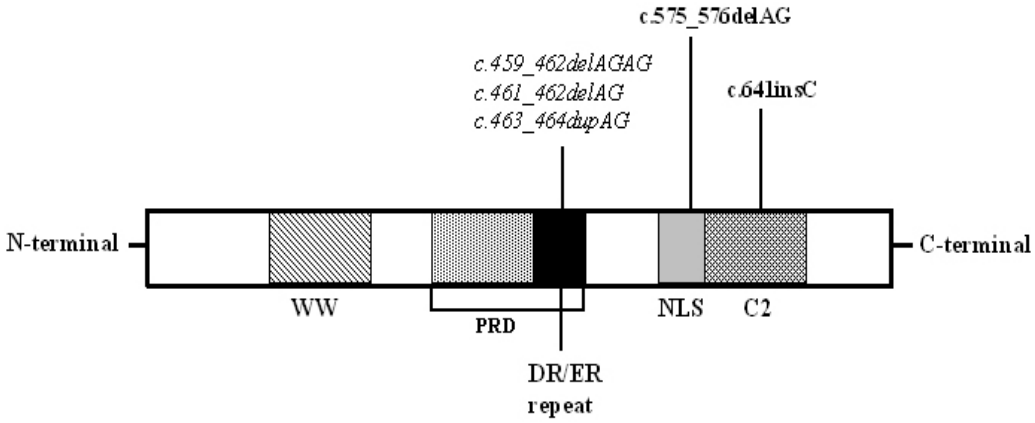


Abb. 10 Das 265 Aminosäuren lange PQBP1–Protein weist vier Domänen auf: Eine nach zwei charakteristisch liegenden Trytophanen benannte WW-Domäne, eine PRD-Domäne mit einem sog. DR/ER-*stretch*, eine *Nuclear Localization Signal*-Domäne (NLS) sowie eine C2-Domäne. Die hier vorgestellten Mutationen c.641insC und c.575-576delAG sind in Fettdruck dargestellt. Es wird deutlich, dass die bisher gefundenen Mutationen (Schrägdruck) in anderen, weiter N-terminal liegenden Domänen liegen.

3.3 MRXS10: Eine stille Mutation verursacht eine reduzierte Expression des Gens *HADH2*[3]

Die als MRXS10 beschriebene Familie besteht aus vier Generationen (Abb. 11, Seite 35). Es handelt sich um eine syndromische Form von XLMR. Die männlichen Patienten weisen milde mentale Retardierung auf und zeigen zusätzlich Symptome, abnormes Verhalten sowie Choreoathetosis, eine Verhaltensstörung, die durch unwillkürliche, irreguläre und meist ruckartige Bewegungen charakterisiert ist (Reyniers et al., 1999).

Das Kopplungsintervall für MRXS10 umfasst 13.4 Mb, liegt teilweise überlappend mit den Intervallen der anderen hier beschriebenen XLMR-Formen auf Xp11.4-p11.21 und umfasst 135 annotierte Gene. Diese wurden auf DNA- und cDNA-Ebene durch direkte Sequenzierung untersucht.

[3] Die Ergebnisse dieses Kapitels sind veröffentlicht in Lenski et al., 2007.

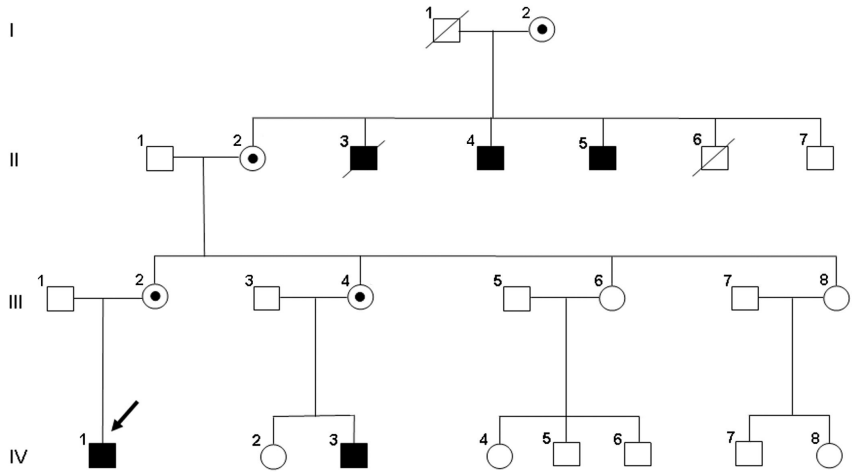


Abb. 11 Stammbaum der MRXS10-Familie. Pfeil markiert den Indexpatienten. Familienmitglieder markiert durch Kreis (weiblich), Quadrat (männlich), Kreis mit Punkt (obligate Überträgerin), Quadrat (männlich), schwarzes Quadrat (Mutationsträger), durchgestrichen meint verstorben.

3.3.1 Auffälligkeiten des MRXS10-Patienten bei der Analyse des Gens *HADH2* und die stille Mutation c.574C>A

Während der Analyse der RT-Amplifikation (= cDNA-PCR) des Gens *HADH2*, das auf Xp11.2 liegt und für die L3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase codiert, fiel beim MRXS10-Patienten eine deutliche Reduzierung des RT-PCR-Fragments auf, das den kompletten *HADH2*-Bereich von Exon 4 bis 6 repräsentiert und 515 bp groß ist. Zugleich erschien ein kleineres RT-PCR-Fragment von 406 bp (Abb. 12).

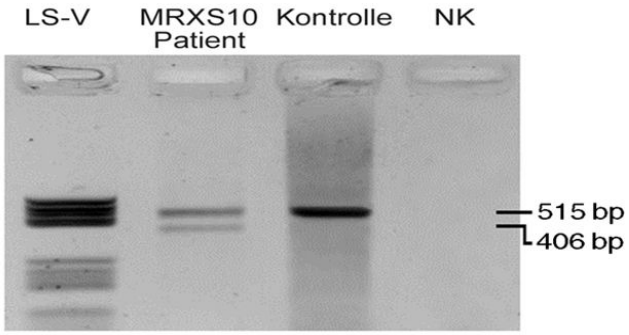


Abb.12 Ergebnis der RT-Amplifikation des *HADH2*-Bereichs von Exon 4 bis Exon 6. Auffällig sind die Reduzierung des 515 bp-grossen Hauptfragments sowie das Auftreten eines 406 bp-grossen Fragments.

Die Isolierung dieser beiden RT-PCR-Fragmente und Sequenzanalyse ergab:
- die größere Bande mit 515 bp entspricht dem (erwarteten) kompletten *HADH2*-Fragment mit den Exonen 4, 5 und 6
- die kleinere Bande mit 406bp repräsentiert ein alternatives *HADH2*-Transkript, in welchem das komplette Exon 5 fehlt
- in Exon 5 war eine stille Mutation festzustellen: c.574C>A (Abb. 13)

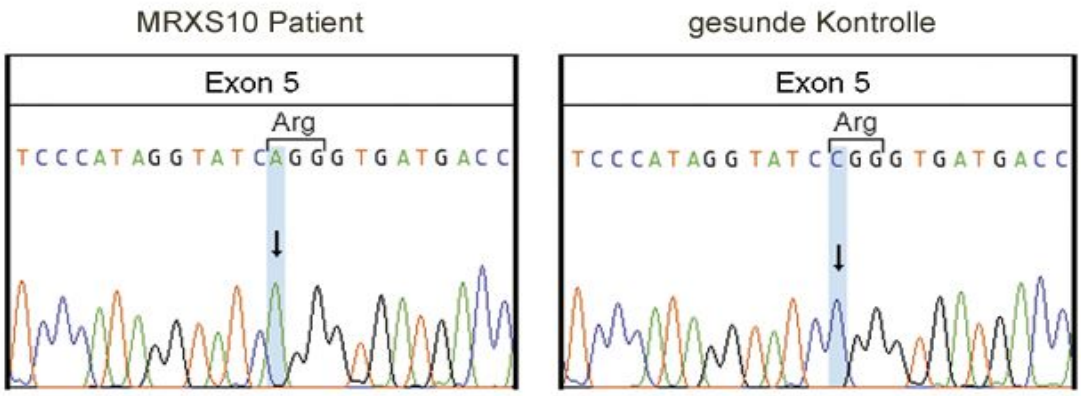


Abb. 13 Die stille Mutation in der MRXS10-Familie: die Transition c.574C>A in Exon 5. Die Aminosäuresequenz wird durch sie nicht verändert.

Der Wegfall von Exon 5 verursacht eine Leserahmenverschiebung, dadurch eine Veränderung der Aminosäuresequenz und so einen vorzeitigen Translationsstop in Exon 6 (Abb. 14).

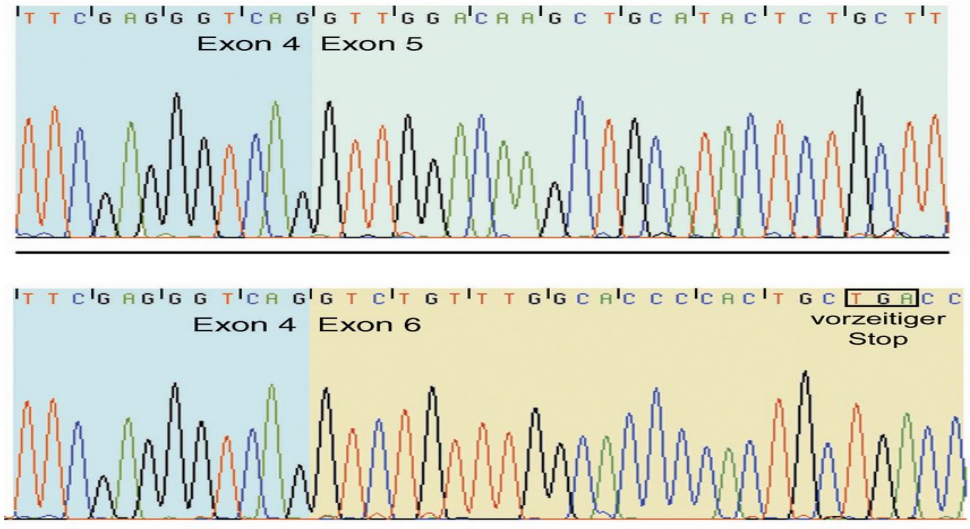


Abb. 14 Oben: Normaler Übergang der Exone 4 und 5 beim Haupttranskript von *HADH2*
Unten: Wegfall von Exon 5 verursacht den vorzeitigen Translationsstop in Exon 6.

Im Weiteren wurden die Transkriptvarianten kloniert und anschliessend sequenziert. Hierbei wurde eine dritte Variante detektiert, die aufgrund einer alternativen Spleißstelle entsteht und in der am Ende von Exon 5 27 Basen fehlen. Alle drei Transkriptvarianten von *HADH2* waren in MRXS10-Patient und gesunden Kontrollen nachweisbar. Der Unterschied zwischen Patient und Kontrollen liegt in den verschobenen Mengenverhältnissen der einzelnen Transkripte zueinander.
In Abbildung 15 ist eine Übersicht dargestellt, die die genomische Struktur von *HADH2* und dessen konservierte Domäne *short-chain-dehydrogenase*, die Lage der verwendeten Primer, die Position der Mutation c.574C>A sowie die Auswirkung des Wegfalls von Exon 5 schematisch veranschaulicht. Es sei nochmal erwähnt, dass der Basenaustausch C>A an dieser Stelle keinen Aminosäureaustausch bewirkt.

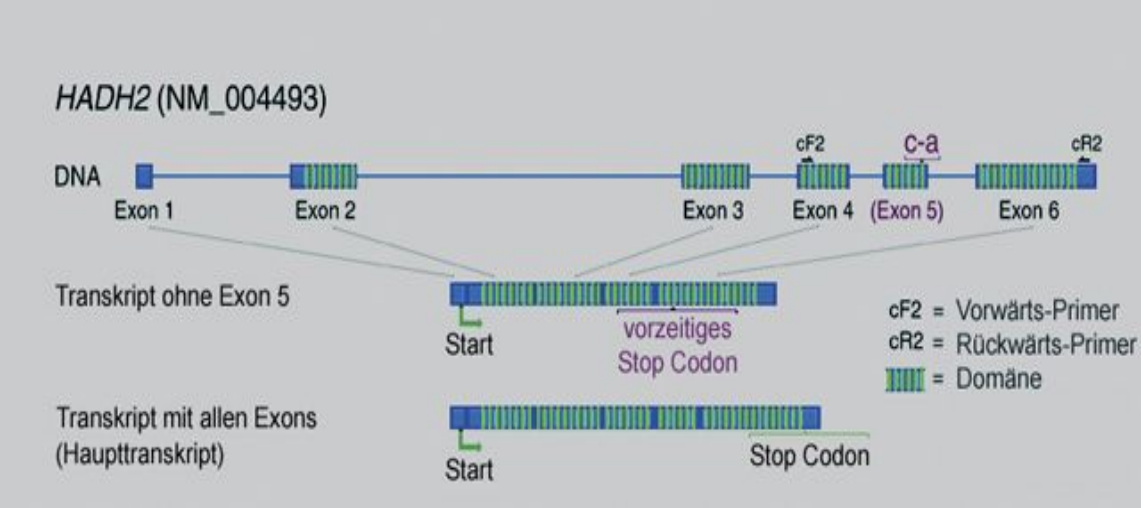


Abb. 15 Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *HADH2*: *HADH2* besteht aus sechs kodierenden Exonen und weist eine konservierte Domäne auf, die sich von Bereichen von Exon 2 bis 6 bzw. von Aminosäurepostion 28-257 erstreckt (grün liniert). Für die RT-Amplifikation wurden die Primer cF2 und cR2 verwendet. In Exon 5 liegt die Mutation c.574C>A. Der Wegfall von Exon 5 hat einen vorzeitiges Stop-Codon in Exon 6 zur Folge.

3.3.2 Quantitative Analyse der *HADH2*-Transkripte (RealTime-PCR)

Zur genauen Einschätzung der quantitativen Verhältnisse der *HADH2*-Transkripte in MRXS10-Patient und Wildtyp wurde eine Analyse mittels RealTime-PCR durchgeführt. Hierzu wurden Primer und Fluoreszenzproben spezifisch für jede

der drei Transkriptvarianten von *HADH2* gewählt, so dass jeweils nur eine Variante amplifiziert werden konnte. Es wurden die RNAs aus lymphoblastoiden Zelllinien der MRXS10-Patienten IV-1 und IV-3 sowie von sieben gesunden männlichen Kontrollen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Normalisierung wurden die Gene *h-HPRT* und *18S-rRNA* (Goidin et al., 2001) verwendet.
Tabelle 1 veranschaulicht das Resultat der RealTime-PCR. Es hat sich gezeigt, dass die Haupttranskriptvariante mit allen Exonen beim MRXS10-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen durchschnittlich auf 1/3 reduziert ist. Demgegenüber ist die Variante ohne Exon 5 im Patienten um den Faktor 3.5 erhöht, die Variante Exon 5del27bp um den Faktor 14. Zu beachten bei diesen Werten ist, dass der (gestiegene) Anteil der beiden verkürzten Varianten an der Expression von *HADH2* unter 6% bleibt, worauf im Diskussionsteil näher eingegangen wird.

Transkripte von *HADH2*	**Veränderung in den MRXS10-Patienten bezogen auf die Kontrollen**
Haupttranskriptvariante	auf 1/3 gesunken
Variante ohne Exon 5	auf das 3.5-fache gestiegen
Variante Exon 5-27bp	auf das 14-fache gestiegen

Tab. 1 Resultat der RealTime-PCR mit aus lymphoblastoiden Zelllinien isolierter RNA der MRXS10-Patienten und sieben Kontrollen

3.3.3 Die stille Mutation c.574C>A als Ursache für das unvollständige Spleißen von *HADH2*

Um zu beweisen, dass die gefundene stille Mutation c.574C>A tatsächlich die Ursache für das stark veränderte Spleißverhalten von *HADH2* im MRXS10-Parienten ist, wurden folgende Analysen durchgeführt:
- Zusätzlich zu den kodierenden Abschnitten wurden in *HADH2* die vorhergesagte Promotorregion sowie die Introne 4, 5 und 6 sequenziert. Hierbei zeigten sich beim MRXS10-Patienten keine Auffälligkeiten. Der Basenaustausch c.574C>A ist in *HADH2* die einzige Mutation im MRXS10-Patienten.

- Mittels DHPLC-Analyse wurden 1000 gesunde Frauen und 500 gesunde Männer auf die c.574C>A-Mutation hin untersucht. In keiner der Kontrollen war dieser Basenaustausch auffindbar. Er darf somit als sehr seltener Polymorphismus und als dem MRXS10-Patienten eigen gelten.
- In einem *in vitro*-Experiment wurde der *HADH2*-Abschnitt von Exon 4 bis 6 inklusive der Introne 4 und 5 in einen Expressionsvektor kloniert und dann in einem HeLa-Extrakt *in vitro* exprimiert - als Wildtyp-Sequenz und mit der c.574C>A-Mutation. Durch Sequenzierung wurde sichergestellt, dass die beiden Klone sich tatsächlich einzig in dem C>A-Basenaustausch unterscheiden. Während der Expressionsvektor pTarget u.a. einen eukaryotischen Promotor enthält (siehe Anhang, S. 78), sind im HeLa-Extrakt Proteine enthalten, die für die RNA-Prozessierung (einschließlich Spleißen) notwendig sind. In unserem Fall wurde nach der *in vitro*-Transkription die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels RealTime-PCR quantitativ bezüglich der nun *in vitro* entstandenen Transkripte von *HADH2* untersucht. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der RealTime-PCR-Analysen dieser *in vitro*-Transkripte dargestellt. Ein Kurvendiagramm dieses RealTime-Resultats befindet sich als Beispiel für die Auswertungsmethode einer RealTime-PCR im Anhang. Der gesamte Versuch wurde zweimal durchgeführt.

Transkripte von *HADH2 (in vitro)*	**Veränderung in den MRXS10-Patienten bezogen auf die Kontrolle**
Haupttranskriptvariante	auf ca. 1/2 gesunken
Variante ohne Exon 5	auf das 2-fache gestiegen
Variante Exon 5-27bp	auf das 4-fache gestiegen

Tab. 2 Resultat der RealTime-PCR mit aus *in vitro* exprimierter und anschließend isolierter RNA des MRXS10-Patienten verglichen mit dem Wildtyp

In vitro zeigte die Expression des *HADH2*-Fragments mit der c.574C>A-Mutation eine Reduzierung des Haupttranskripts mit allen Exonen auf ungefähr die Hälfte (bezogen auf die Kontrollen). Die Mengen der beiden anderen Transkripte, delEx5 und Ex5del27bp, waren auf ungefähr das 2-fache bzw. 4-fache erhöht. Zur Normalisierung wurden erneut die Gene *h-HPRT* und *18S-rRNA* (Goidin et al., 2001) verwendet.

Einen Überblick der gesamten Resultate der RealTime-PCR und einen Vergleich zwischen den *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten gibt Abbildung 16.

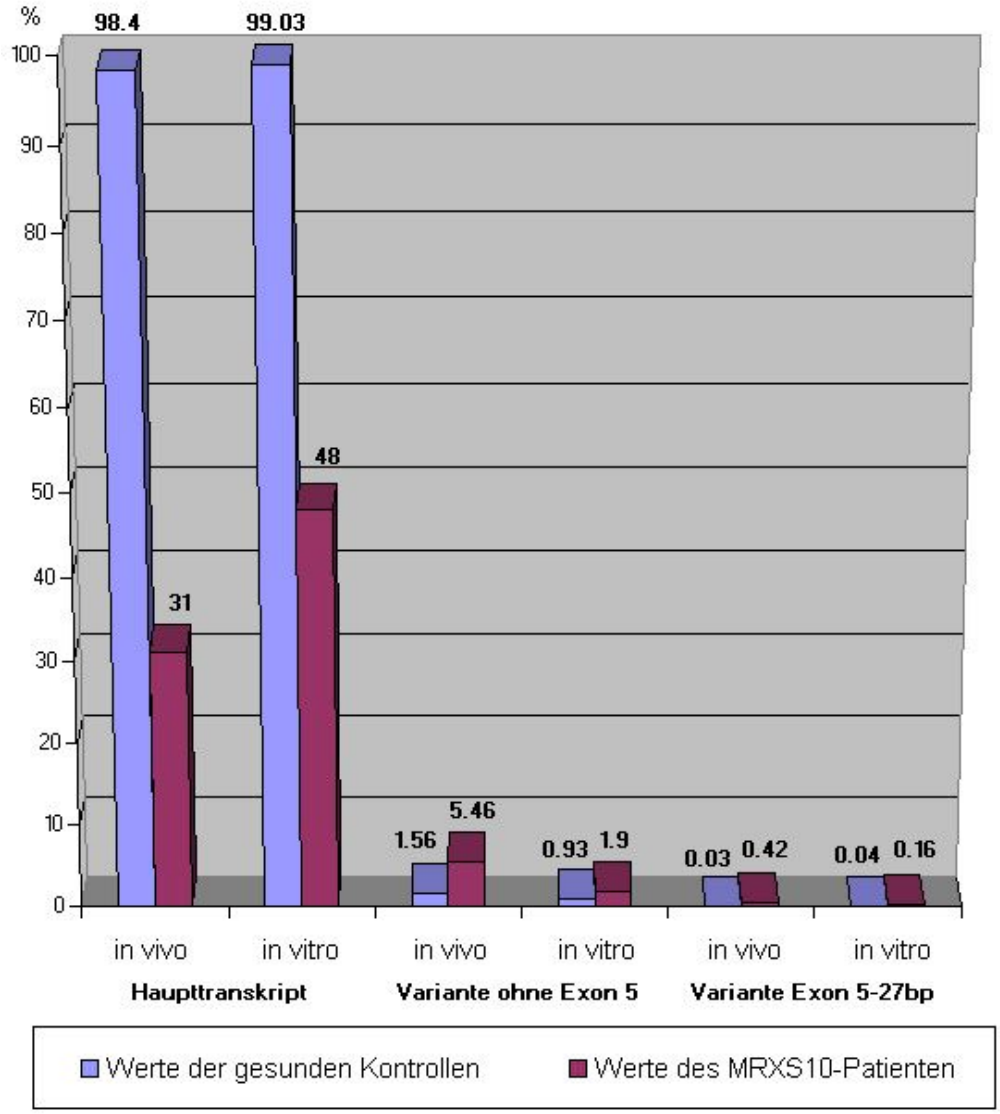


Abb. 16 Vergleich der RealTime-PCR-Ergebnisse bezüglich der drei *HADH2*-Transkripte aus lymphoblastoiden Zelllinien gewonnenem Material (= in vivo) sowie aus in HeLa-Zellextrakt exprimiertem und isoliertem Material (= in vitro): Die stark reduzierte Expression des Haupttranskripts als auch die angestiegene Expression beide Transkriptvarianten ist *in vivo* und *in vitro* nachweisbar.

Die Unterschiede der *in vivo*- und *in vitro*-Messwerte (vergleiche hierzu Tab. 1 und Tab. 2) lassen sich darauf zurückführen, dass die Effizienz der Expression im HeLa-Extrakt nicht mit der Effizienz *in vivo* identisch sein kann, weil der HeLa-Extrakt auf möglichst hohe Expressionseffizienz ohne weitere Regulation der

Genexpression ausgelegt ist. Da die in den MRXS10-Patienten veränderte Expression von *HADH2*, charakterisiert durch die stark reduzierte Menge des Haupttranskripts und die gesteigerte Menge der Transkriptvarianten, in diesem *in vitro*-Experiment bestätigt werden konnte, und kein anderer Unterschied zwischen Patienten und Wildtyp außer der C>A-Mutation vorlag, ist davon auszugehen, dass diese Mutation die Regulation des Spleißens und somit die Expression von *HADH2* beeinflusst. So konnte ausgeschlossen werden, dass beispielsweise ein regulatorisches trans-Element außerhalb von *HADH2* betroffen ist.
Im Diskussionsteil wird darauf eingegangen, welche Art von Spleißregulator durch den C>A-Austausch betroffen sein könnte.

3.3.4 Reduktion der Expression des HADH2-Proteins *(Western-blotting)*

Die bisherigen Ergebnisse basierten auf Analysen, die auf transkriptioneller Ebene, also auf mRNA-Ebene, durchgeführt wurden. Um zu untersuchen, ob sich die im MRXS10-Patienten auf 1/2 bis 1/3 reduzierte Menge *HADH2*-Haupttranskript auch noch nach der Translation, also auf Proteinebene, feststellen lässt, wurde ein Analyse mittels *Western-blotting* durchgeführt.
Hierzu wurden die Proteine aus lymphoblastoiden Zelllinien des MRXS10-Patienten und zwei gesunden männlichen Kontrollen isoliert, in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert *(blotting)* und anschließend mit einem HADH2-Antikörper detektiert. Durch zusätzliche Detektion mit einem beta-Aktin-Antikörper wurden die verschiedenen Proben normalisiert.

Abbildung 17 zeigt einen *Scan* der Filme der Proteinblots. Während die Expression von beta-Aktin für alle Proben auf gleichem Niveau liegt, ist die HADH2-Expression, die durch die 27 kDa-Bande repräsentiert wird, im MRXS10-Patienten schwächer als in den beiden Kontrollen. Dieser Eindruck konnte durch densiometrische Auswertung der Fluoreszenzsignale bestätigt werden: die Menge an HADH2-Protein ist im MRXS10-Patienten um ca. 60% reduziert (verglichen mit den gemittelten Werten der beiden Kontrollen nach Normalisierung mit ß-Aktin).

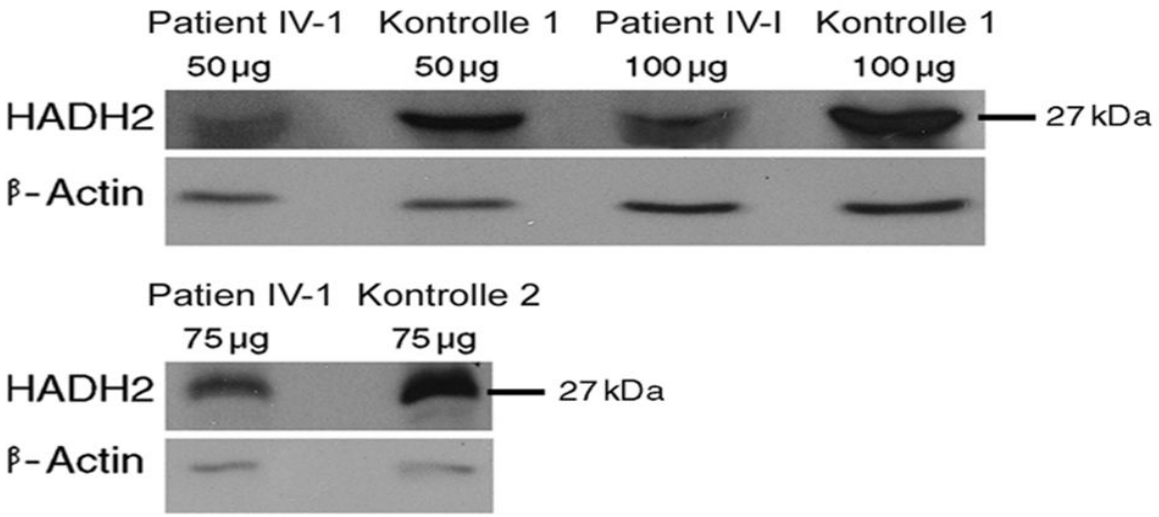


Abb. 17 Analyse der Expression von HADH2 mittels *Western-blotting*. Der MRXS10-Patient IV-1 (jeweils links) weist im Vergeich zu den gesunden Kontrollen 1 und 2 (jeweils rechts) eine deutlich reduzierte Menge an HADH2-Protein (27 kDa-Bande) auf. Zur Normalisierung wurde ß-Aktin detektiert. Das Experiment wurde mit 50 µg und 100 µg eingesetzter Gesamtproteinmenge durchgeführt und mit 75 µg eingesetzter Gesamtproteinmenge wiederholt.

3.4 X-chromosomal gekoppelte infantile spinale Muskelatrophie (XL-SMA): Verursacht durch Mutationen in dem Gen *UBE1*?[4]

X-chromosomal gekoppelte infantile spinale Muskelatrophie (XL-SMA), die rezessiv vererbt wird, ist gekennzeichnet durch kongenitale Hypotonie sowie neuronale und morphologische Fehlfunktionen/-bildungen (u.a. Verlust der vorderen Hornzellen, Arthrogryposis, myopathische Gesichtsformung, akute Atemnot). Es kommt zu Muskelverkürzungen und infolgedessen zu Gelenksfehlstellungen sowie Knochenbrüchen. In den betroffenen Familien treten außerdem vermehrt Fehlgeburten und spontane Aborte auf.

Es lagen DNA- bzw. RNA-Proben von fünf Familien mit XL-SMA-Erkrankten vor, bezeichnet als Familien #2, #4, #5, #7 und #15. Für die Patienten von zwei dieser Familien, im Folgenden AR6 (Familie #5) und XS037 (Familie #2) genannt, wurde aufgrund von Kopplungsanalysen ein Genkatalog erstellt.

[4] Die Ergebnisse dieses Kapitels sind veröffentlicht in Ramser et al., 2008.

Der für diese beiden XL-SMA-Familien erstellte Genkatalog ist der umfangreichste in dieser Arbeit (siehe auch Anhang Seite 77). Die Analyse der insgesamt 123 Gene erfolgte wie bei den XLMR-Familien durch direktes Sequenzieren, meist auf DNA- und cDNA-Ebene.
Das 20.4 Mb grosse Kopplungsintervall beider Familien liegt überlappend zwischen den Markern DXS8080 und DXS7132 auf Xp11.3-Xq11.1 (Dressman et al. 2007).

Die AR6-Familie (#5) ist als eine Familie mit vier Generationen dokumentiert, es sind sechs Männer betroffen und fünf Frauen obligate Überträgerinnen (Abb. 18).

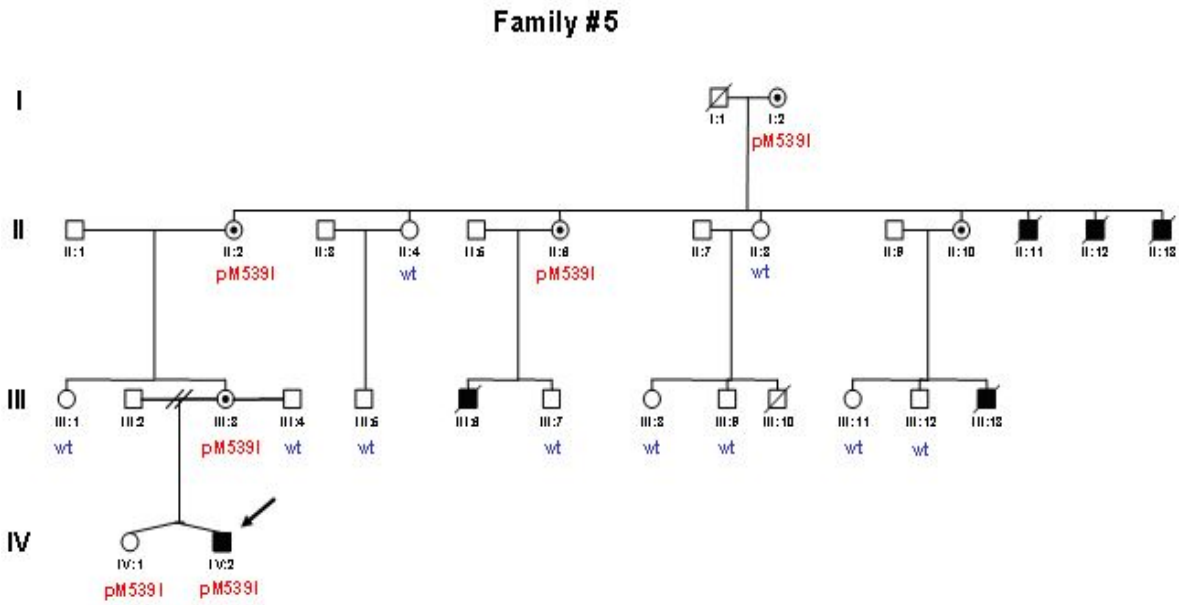


Abb. 18 Stammbaum der Familie #5 mit dem Patienten AR6 (Pfeil, IV2). Die Segregation der Mutation p.539Met>Ile (rot) in *UBE1* sowie der Wildtypstatus (blau) weiterer Familienmitglieder ist mittels direkter Sequenzierung bestimmt worden. Familienmitglieder markiert durch Kreis (weiblich), Quadrat (männlich), Kreis mit Punkt (obligate Überträgerin), Quadrat (männlich), schwarzes Quadrat (Mutationsträger), durchgestrichen meint verstorben.

Die XS037-Familie (#2) ist eine Familie über vier Generationen. In dieser Familie sind vier betroffene männliche Mitglieder und neun Überträgerinnen beschrieben (Abb. 19, Seite 44).

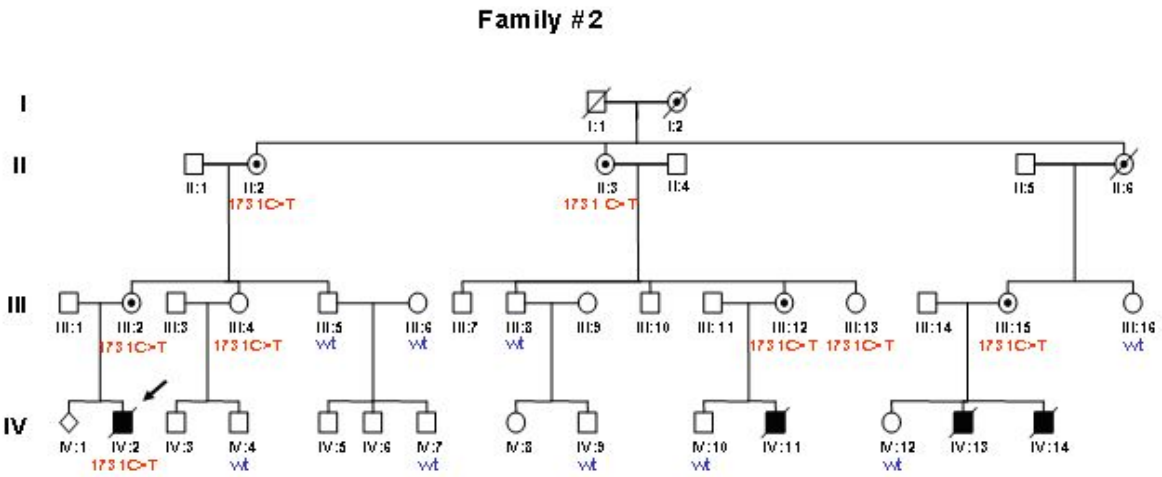


Abb. 19 Stammbaum der XS037-Familie (#2). Mittels Sequenzierung sind für das Gen *UBE1* die Wildtyp-Sequenz (wt, blau) und die Segregation der Mutation c.1731C>T (rot, siehe S.45) bestätigt worden. Beschreibung der Markierung siehe obiger Stammbaum Abb. 18.

Neben einer Reihe von Polymorphismen, die jedoch entweder auch bei gesunden Kontrollen nachgewiesen werden konnten und/oder bereits in den Datenbanken als Variationen eingetragen waren, fanden sich verschiedene Auffälligkeiten in Exon 15 des Gens *Ubiquitin-activating enzyme E1*, *UBE1*:

- im AR6-Patienten (Familie #5) ein G>T-Austausch, der zu dem Aminosäureaustausch Methionin zu Isoleucin führt, c.1617G>T bzw. p.539Met>Ile (Abb. 18)
- im Patienten XS022 (Familie #7) ein A>G-Austausch, der einen Aminosäureaustausch von Serin zu Glycin verursacht, c.1639A>G bzw. p.547Ser>Gly
- im Patienten XS037 (Familie #2) eine stille Mutation, c.1731C>T, ebenfalls in Exon 15 (Abb. 19) ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz

Nun wurden die DNAs weiterer männlicher Patienten aus anderen XL-SMA-Familien auf Mutationen in *UBE1* untersucht: Die stille c.1731C>T-Mutation war außer im XS037-Patienten (Familie #2) auch in den Patienten der Familien #4 und #15 sowie in einem zusätzlichen, männlichen Patienten mit der DNA-Nr.13977 und seiner Mutter heterozygot (obligate Überträgerin) nachweisbar.

Einen Überblick über die XL-SMA-Familien und die verschiedenen Mutationen in *UBE1* gibt Tabelle 3 (Seite 45).

betroffene XL-SMA-Familien	vorliegende Mutationen in *UBE1*
#5	c.1617G>T führt zu p.539Met>Ile
#7	c.1639A>G führt zu p.547Ser>Gly
#2, #4, #15 und DNA-Nr.13977	c.1731C>T, stille Mutation

Tab. 3 Die in den verschiedenen XL-SMA-Familien nachgewiesenen Mutationen in Exon 15 von *UBE1.* Zwei *missense*-Mutationen in zwei Familien sowie eine stille Mutation in vier Familien.

3.4.1 Segregationsanalyse der Mutationen in *UBE1*

Sowohl für die AR6-Familie (#5) als auch für die XS037-Familie (#2) wurde die Segregation der Mutation c.1617G>T (p.M539I) bzw. c.1731C>T mittels Sequenzierung untersucht. Beide Mutationen segregieren eindeutig: Sämtliche betroffenen Männer tragen die jeweilige Mutation hemizygot, die obligaten Überträgerinnen jeweils heterozygot (siehe hierzu auch die Stammbäume in den Abbildungen 18 und 19).

In der Familie #15 standen nur DNAs der Mutter des Patienten und ihrer Cousine zur Verfügung: Für beide konnte der Überträgerstatus bezüglich der stillen c.1731C>T-Mutation bestätigt werden (Abb. 20).

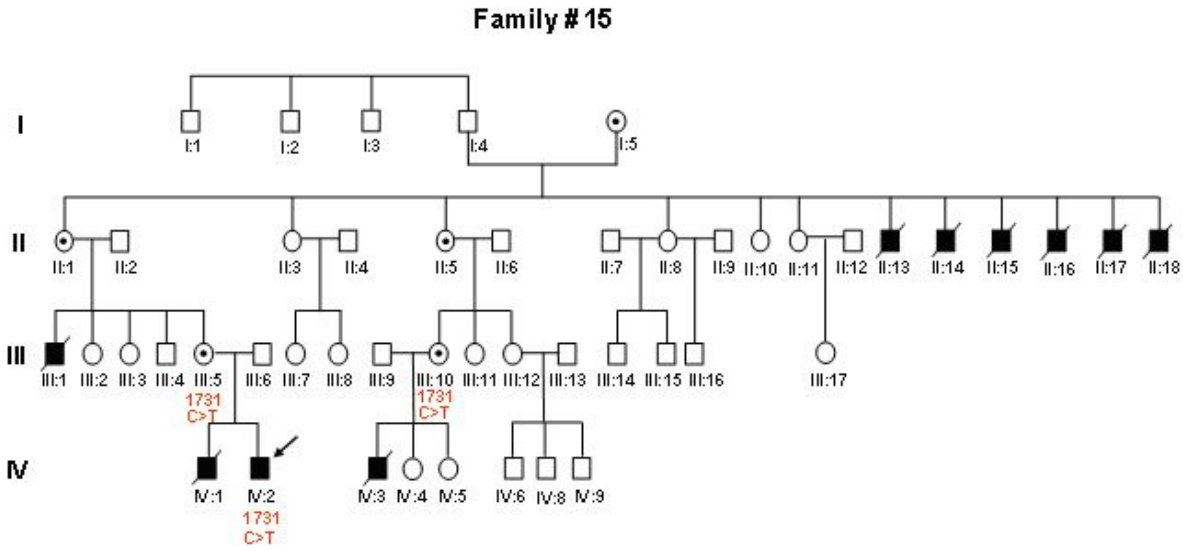


Abb. 20 Stammbaum der XL-SMA-Familie #15. Die stille Mutation c.1731C>T (rot) ist im Patienten IV2 (Pfeil) sowie heterozygot in dessen Mutter (III5) und ihrer Cousine (III10) nachgewiesen worden. Beschreibung der Markierung siehe Stammbaum Abb. 18.

3.4.2 Untersuchung der Häufigkeit der Mutationen in *UBE1* mittels DHPLC

Um beurteilen zu können, ob die Mutationen c.1617G>T, c.1731C>T und c.1639A>G in der Bevölkerung als seltene Varianten vorkommen oder spezifisch für die XL-SMA-Patienten und somit für die Entwicklung der Krankheit ursächlich sind, wurde eine Analyse von insgesamt 3550 Chromosomen gesunder Frauen mittels DHPLC durchgeführt. In sämtlichen Chromosomen kam keine der drei Mutationen vor (siehe Anhang Seite 81ff). Bezüglich der Mutation c.1731C>T wurden in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz Zentrum München weitere 4364 Chromosomen mit der *MaldiTof*-Massenspektroskopie analysiert, in denen die C>T-Mutation ebenfalls nicht nachweisbar war.

3.4.3 Funktionelle Analysen der Mutationen in *UBE1*

Bevor ich auf die durchgeführten Untersuchungen eingehe, möchte ich die Mutationen näher charakterisieren, da sich der Nachweis ihrer Pathogenität im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten XLMR-Mutationen als aufwendig herausstellte.

a) Die Mutationen c.1639A>G und c.1617G>T in den Patienten XS022 bzw. AR6

Die Mutation im Patienten XS022 (Familie #7), c.1639A>G, bewirkt den Aminosäureaustausch p.547Ser>Gly. Durch diese Aminosäureveränderungen wird möglicherweise neben der Struktur auch die räumliche Faltung und somit die Funktion des UBE1-Proteins beeinträchtigt. Diese Mutation befindet sich in Exon 15, einem Genabschnitt von *UBE1*, der hochkonserviert ist und für eine Domäne kodiert. Allen et al. zeigten, dass diese Domäne mit der sog. BTB-Domäne des Proteins Gigaxonin interagiert (Allen et al., 2005). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Mutation in der BTB-Domäne von Gigaxonin die Wechselwirkung mit UBE1 aufhebt. Daher begann ich noch gegen Ende dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz Zentrum München einen *Yeast-two-Hybrid*-Versuch, in dem wir diese Interaktion der UBE1-Domäne mit Gigaxonin in

Patient und Wildtyp untersuchten. Dieser Versuch konnte aber noch nicht befriedigend zu Ende geführt werden.

Die Substitution c.1617G>T im Patienten AR6 (Familie #5, Abb. 21) liegt ebenfalls in Exon 15 von *UBE1* und verursacht bei der Translation einen Aminosäureaustausch von Methionin zu Isoleucin, p.539Met>Ile.

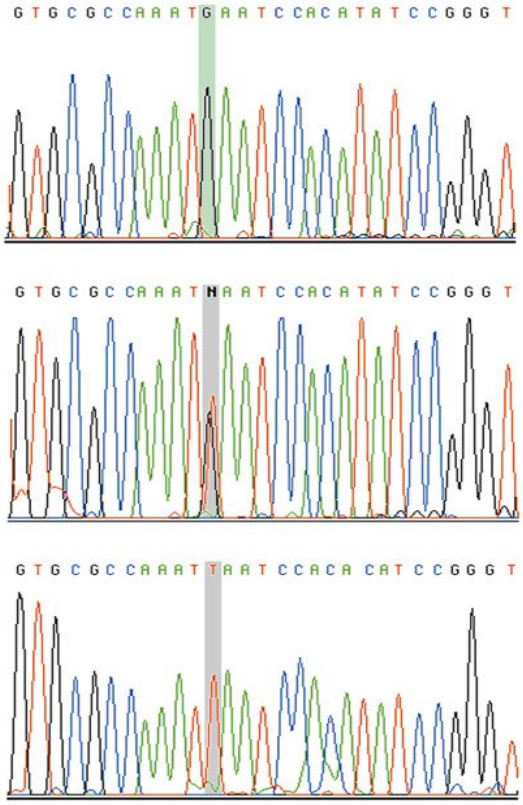


Abb. 21 Die Mutation c.1617G>T (p.539Met>Ile) in der XL-SMA-Familie #5.
Oben: Wildtyp-Sequenz
Mitte: heterozygoter Status der Überträgerinnen
Unten: mutierte Sequenz im Patienten der Familie #5

b) Die stille Mutation c.1731C>T in vier verschiedenen XL-SMA-Familien

Die stille Mutation c.1731C>T liegt ebenfalls in Exon 15 von *UBE1* (Abb. 22). Der untersuchte männliche Indexpatient der Familie XS037 (#2) trägt sie, in den dazugehörigen Überträgerinnen war diese Transition heterozygot nachweisbar. Diese Mutation konnte ich auch in den Familien #4 und #15 nachweisen sowie in dem männlichen XL-SMA-Patienten DNA-Nr.13977.

Da diese Mutation nicht weit von der nächsten Exon-/Introngrenze entfernt ist und damit eventuell in einem Genbereich liegt, der das Spleißen reguliert, analysierte ich die Expression mittels RealTime-PCR. Wie im XLMR-Gen *HADH*2 gezeigt, kann eine Mutation durch Einflußnahme auf den Spleißprozess zu einer deutlichen Veränderung der Expression führen.
Diese C>T-Transition findet in einer CpG-Insel statt. Daher wurde außerdem untersucht, ob an dieser Stelle duch die Mutation eine CpG-Methylierung wegfällt.
In der Datenbank ist diese Mutation nicht eingetragen.
Auffälligkeiten wie beispielsweise das Auftreten zusätzlicher Fragmente bzw. Transkriptvarianten in der PCR auf cDNA-Ebene waren nicht feststellbar.

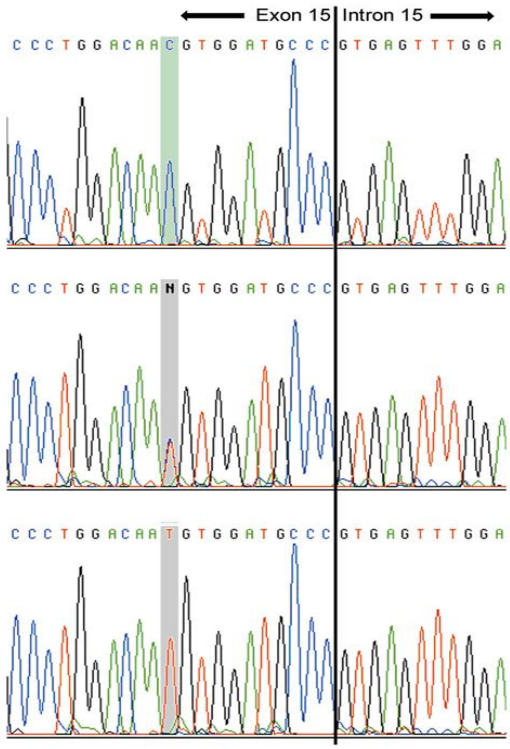


Abb. 22 Die stille Mutation c.1731C>T am Ende von Exon 15 im Gen *UBE1.*
Oben: Wildtyp-Sequenz
Mitte: heterozygoter Status der Überträgerinnen
Unten: mutierte Sequenz in den Patienten der Familien #2, #4 und #15

3.4.3.1 Überprüfung der Expression von *UBE1* mittels RealTime-PCR

Um einen möglichen Einfluss der Mutationen auf die Expression festzustellen, wurde eine *UBE1*-spezifische Analyse mittels RealTime-PCR durchgeführt. Hierzu

wurden die Gesamt-mRNAs gesunder männlicher Kontrollen und der Patienten AR6 (Familie #5) und XS037 (Familie #2) sowie des Patienten der Familie #4 aus lymphoblastoiden Zelllinien isoliert und in cDNAs umgeschrieben.
Die Fluoreszenzdetektion während der RealTime-PCR erfolgte mit dem für *UBE1* spezifischen Primer-/Sondensystem von ABI, als Referenzgene wurden die *18S-rRNA* und *hHPRT* zur Normalisierung verwendet.
Auch nach zweimaliger Wiederholung war jedoch kein Unterschied in der Expression zwischen Patienten und Wildtyp messbar. Dies gilt jedenfalls für mRNA-Material, das aus lymphoblastoiden Zelllinien gewonnen wurde (siehe folgender Abschnitt).

Von dem Patienten der Familie #15, der die stille c.1731C>T-Mutation trägt, stand uns nicht nur aus Zelllinien, sondern auch aus Blut isolierte mRNA zur Verfügung. Die Expression von *UBE1* wurde in dieser mRNA ebenfalls mittels RealTime-PCR analysiert. In diesem aus Blut isolierten mRNA-Material war nun eine Reduktion der *UBE1*-Expression auf fast die Hälfte im Patienten (Familie #15) messbar, verglichen mit vier ebenfalls aus Blut isolierten mRNAs gesunder männlicher Kontrollen.
Da das Primer-/Sondensystem von ABI *UBE1* im Bereich von Exon 5 detektiert, die vorliegende Mutation c.1731C>T jedoch in Exon 15 liegt, entwarf ich mit der Firma TibMolbiol ein weiteres Primer-/Sondensystem, das spezifisch nur das Wildtyptranskript mit Exon 15 erkennt. Denn die C>T-Mutation am Ende von Exon 15 beeinflusst eventuell das Spleißen in diesem Bereich dahingehend, dass Varianten ohne Exon 15 entstehen und somit das Wildtyptranskript mit allen Exonen reduziert exprimiert wird. Tatsächlich war nun eine noch stärkere Reduktion der *UBE1*-Expression auf sogar 1/5 im Patienten messbar, wiederum verglichen mit der Expression von vier gesunden männlichen Kontrollen.
Als Referenzgene zur Normalisierung wurden in allen Experimenten die *18S-rRNA* und *hHPRT* verwendet.

<u>Zusammenfassend liess sich feststellen (Tab. 4 und Abb. 23):</u>

- die Expression von *UBE1* in Blut und lymphoblastoiden Zelllinien ist unterschiedlich und scheint gewebe- bzw. zeitabhängig reguliert zu sein

- die stille Mutation c.1731C>T steht offensichtlich in Zusammenhang mit einer reduzierten Expression von *UBE1* im Patienten der Familie #15 auf 1/5, gemessen Exon 15-spezifisch in aus Blut isoliertem mRNA-Material
- von den anderen Patienten, die dieselbe stille C>T-Mutation tragen, sowie von dem Patienten AR6 (Familie #5) mit der c.1617G>T-Mutation (p.539Met>Ile) stehen leider nur lymphoblastoide Zelllinien zur Verfügung (in Letzterem erwarten wir aufgrund des entstehenden Aminosäureaustauschs ohnehin keine Veränderung der Expressionsstärke)

Expression von *UBE1*	**Veränderung der *UBE1*-Expression im Patienten der Familie #15**
in aus Zelllinien isolierter mRNA	keine Veränderung messbar
in aus Blut isolierter mRNA, *UBE1*-**Exon 5**-spezifische Taqman-Proben	auf ca. 1/2 gesunken
in aus Blut isolierter mRNA, *UBE1*-**Exon 15**-spezifische Taqman-Proben	auf ca. 1/5 gesunken

Tab. 4 RealTime-PCR-Analyse der Expression von *UBE1* im Patienten der Familie #15, der Träger der stillen Mutation c.1731C>T in Exon 15, jeweils verglichen mit vier gesunden männlichen Kontrollen.

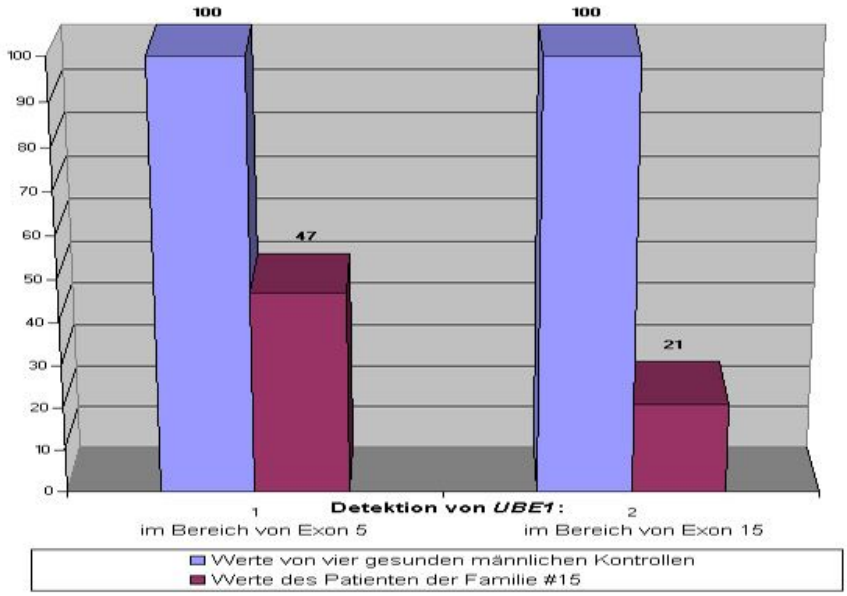


Abb. 23 RealTime-PCR-Analyse der Expression von *UBE1* im Träger der stillen Mutation c.1731C>T in Exon 15: Spezifische Detektion in Exon 5 als auch in Exon 15 zeigt im Vergleich zu den vier gesunden männlichen Kontrollen eine Reduktion auf ca. 47% bzw. 21%.

3.4.3.2 *In silico*-Analyse der Sequenz von *UBE1* bezüglich regulatorischer Gen-Bereiche

Bei der Mutation c.1731C>T handelt es sich um eine stille Mutation. Auch verändert dieser C>T-Austausch keine Spleißakzeptor- oder -donorstelle. Gleichwohl war eine Reduktion der Expression von *UBE1* auf 1/5 in Blutproben des Patienten messbar. Eine Erklärung wäre, wie bereits für den MRXS10-Patienten in dem Gen *HADH2* nachgewiesen, dass auch in *UBE1* ein für das Spleißen wichtiges regulatorisches Element durch die stille Mutation beeinflusst wird. Dies führt möglicherweise zu einer erhöhten Expression einer (oder mehrerer) Transkriptvariante(n) und somit zu einer uneffizienten Expression des Haupttranskripts von *UBE1*. Um dies zu überprüfen, wurde die Sequenz von Exon 15 von *UBE1*, als Wildtypsequenz und mit der c.1731C>T-Mutation, mit dem *ESE-finder 2.0* (entwickelt von Cartegni et al., 2003) *in silico* analysiert.
Dieses *ESE*-Vorhersageprogramm zeigt für die Wildtypsequenz im Bereich der Mutation am Ende von Exon 15 eine Erkennungssequenz für einen *ESE*, 'GGACAACG'. Im Falle der Sequenz mit der Mutation wird eine zusätzliche potentielle *ESE*-Sequenz vorhergesagt, 'TGTGGA'. Letztere wird vom SR-Protein SRp55 erkannt, das beim Binden an die Erkennungssequenz mit dem im Wildtyp normalerweise alleine bindenden SR-Protein SC35 möglicherweise konkurrieren muss. Es käme also zu einer Art kompetitiver, sterischer Hemmung und somit zu einer reduzierten Wirksamkeit des im Wildtyp alleine aktiven *ESE*, wodurch die Prozessierung des *UBE*-Transkripts mit Exon 15 beeinträchtigt würde. Gleichzeitig würde vermehrt eine Transkriptvariante ohne Exon 15 produziert, die dann möglicherweise aber vom *Nonsense Mediated Decay (NMD)* abgebaut werden würde. Die Expressionsreduzierung des kompletten Haupttranskripts, die im Blut des Patienten ca. 80% beträgt, wäre so erklärbar.

3.4.3.3 Untersuchung der Methylierung im Bereich der C>T-Transition

Die stille Mutation c.1731C>T beeinflusst die Expression von *UBE1*, wie die Analyse mittels RealTime-PCR zeigen konnte, deutlich. Eine mögliche Erklärung dafür ist die im letzten Punkt ausgeführte reduzierte Wirksamkeit beispielsweise

eines *ESE*s im Falle der mutierten Sequenz. Jedoch liegt dieser C>T-Austausch interessanter Weise in einem CpG in einer von fünf für *UBE1 in silico* vorhergesagten CpG-Inseln (*http://www.urogene.org/methprimer/*). Diese 223bp-lange CpG-Insel beginnt in Exon 15 und geht bis in Intron 15 hinein.

CpG-Stellen sind funktionell an der Genexpression beteiligt, indem sie methyliert werden und in diesem Zustand zu der Suppression der Genaktivität beitragen. Bisher sind diese regulativen Eigenschaften von CpG-Inseln im 5'-Bereich eines Gens im Promotorbereich nachgewiesen.

Da nicht jedes CpG methyliert ist, musste gezeigt werden, dass die CpG-Stelle, in der die c.1731C>T-Transition in *UBE1* liegt, beim Gesunden auch wirklich methyliert ist. Dazu wurden die DNAs von fünf gesunden Kontrollen sowie des XS037-Patienten (Familie #2) mit Bisulfit behandelt (Yang et al., 2004). In diesem Verfahren werden alle nicht-methylierten Cytosine gegen Thymin ausgetauscht, nur methylierte Cytosine bleiben Cytosine. Durch Sequenzierung erfolgt dann der Nachweis der Methylierung.

Es stellte sich tatsächlich heraus, dass die CpG-Stelle, in der der Austausch c.1731C>T stattfindet, sowie 12 weitere CpG-Stellen im Wildtyp methyliert sind. Aufgrund der C>T-Transition entfällt somit die Methylierung im Patienten an dieser CpG-Insel in Exon 15 von *UBE1*.

Mögliche funktionelle Konsequenzen auf einen Mechanismus zur Regulation der Genaktivität durch exonische CpGs werden im Diskussionsteil vorgestellt.

4 Diskussion

4.1 *FTSJ1* und nicht-syndromische mentale Retardierung

Das Gen *FTSJ1* ist das humane Homolog der bakteriellen 23S-rRNA Methyltransferase. Es gilt als evolutionär hoch konserviert und weist mit der Variante in E.coli eine Identität von 34% auf. *FTSJ1* beinhaltet 13 Exone, davon 11 Protein-kodierende Exone, und eine hoch konservierte FtsJ-Domäne, die von Genbereichen in etwa der Mitte des zweiten Exon bis knapp vor Ende des neunten Exon kodiert wird und 179 Aminosäuren lang ist (Abb. 24).

In den Patienten der MRX9-Familie führt die Mutation IVS3-2A>G in *FTSJ1* zum Wegfall von Exon 4 im Transkript, da durch diesen A>G-Austausch eine Spleißakzeptorstelle beeinflusst wird. Dadurch kommt es auch zu einer Leserasterverschiebung und 17 veränderten Aminosäuren sowie zu einem vorzeitigen Translationsstop in Exon 5. In Abbildung 24 sind die Struktur von *FTSJ1*, dessen Domäne und die Beeinflussung durch die Mutation dargestellt.

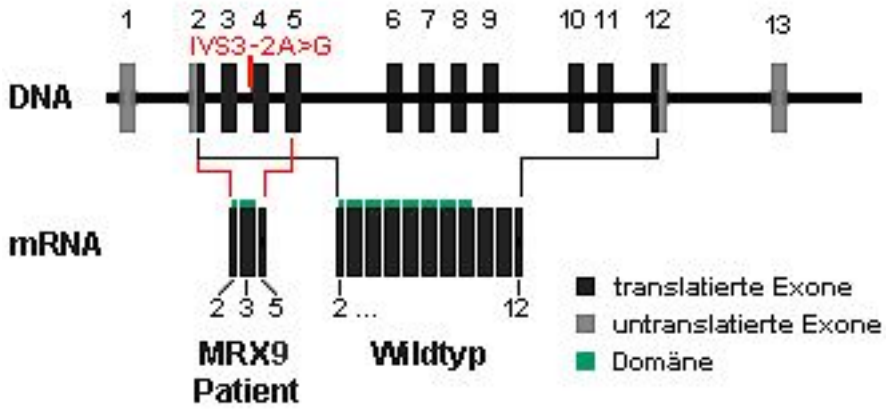


Abb. 24 Das Gen *FTSJ1*: Es besteht aus 13 Exonen, davon sind 11 Exone kodierend. Durch die Mutation IVS3-2A>G im MRX9-Patienten (rot) wird Exon 4 beim Spleißen übersprungen. Daher kommt es aufgrund einer Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Translationsstop in Exon 5 und einer starken Verkürzung des Proteins und seiner FTSJ1-Domäne (grün).

Das in den MRX9-Patienten veränderte Protein ist nicht nur stark verkürzt, sondern besitzt nur noch einen geringen Teil der funktionellen Domäne, während

das komplette Wildtyptranskript nur noch in stark reduzierter Form produziert wird. Derartig trunkierte RNAs werden in vielen Fällen vom *Nonsens Mediated Decay (NMD)* erkannt und dann abgebaut. Dies ist ein gezielter Abbau von aberranten Transkripten zum Selbstschutz der Zelle, um die Aktivität und nicht vorgesehenen Reaktionen von stark veränderten Proteinen, die neue und ungünstige Eigenschaften haben können, zu unterbinden. Wenn die mutierte, kürzere *FTSJ1*-RNA des Patienten nicht abgebaut wird, da sie beispielsweise immer noch gewisse Funktionen des kompletten Proteins ausführen kann, fehlt jedoch aufgrund der starken Verkürzung der Ftsj1-Domäne ein wichtiger funktioneller Bereich, was einen Wegfall oder eine Einschränkung seiner Eigenschaften wahrscheinlich macht. Sollte die verkürzte *FTSJ1*-RNA nicht gezielt abgebaut werden, sind außerdem negative Effekte durch dieses dann im Patienten veränderte FTSJ1-Protein nicht auszuschliessen.

Das Protein FTSJ1 komplexiert mit dem Co-Faktor S-Adenosylmethionin (SAM). In E.coli "benützt" FTSJ1 dieses SAM als Methylgruppen-Donor, um die 23S-rRNA an Position U2552 zu methylieren. Dies ist für den Zusammenbau und die Funktion der Ribosomen während der Proteinsynthese von Bedeutung (Bügl et al., 2000). Trotz der erwähnten hohen Identität mit dieser bakteriellen Variante sind die Funktionen des humanen FTSJ1-Proteins bisher unklar. Es ist daher derzeit spekulativ, ob beispielsweise ein Zusammenhang zwischen der Eigenschaft von FTSJ1, SAM zu binden, und mentaler Retardierung besteht. Niedrige Level von SAM in cerebrospinaler Flüssigkeit stehen in Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen wie Depression und Demenz (Bügl et al., 2000). Da FTSJ1, wie ich in einem *Northern*-Blot zeigen konnte, ubiquitär exprimiert wird, in den MRX9-Patienten jedoch nur in Zusammenhang mit mentaler Retardierung ohne weitere Symptome steht, stellt sich die Frage nach weiteren Funktionen und Interaktionspartnern. Denn bei einem Ausfall oder einer Beeinträchtigung der bisher mit FTSJ1 assoziierten Eigenschaft, am Ribosomenaufbau während der Proteinsynthese beteiligt zu sein, würde man ein deutlich gravierenderes Krankheitsbild, möglicherweise sogar Lethalität, erwarten.

4.2 *PQBP1* und das *Renpenning*-Syndrom

PQBP1, bestehend aus sechs Exonen, kodiert für das 265 Aminosäuren lange Polyglutamine Tract Binding Protein 1. Es weist vier unterschiedliche Domänen auf. Diese Domänen von *PQBP1* möchte ich nun unter Einbeziehung einer möglichen Beeinflussung durch die Mutationen in der *Renpenning*-Familie bzw. in dem Patienten der Familie K9008 besprechen.

N-terminal am nächsten liegt die sog. WW-Domäne zwischen den Aminosäuren 47-78. WW-Domänen weisen ein Länge von 30-40 Aminosäuren auf und sind durch das Auftreten von zwei Tryptophanen charakterisiert. Sie binden an Aminosäuresequenzen vom Typ PPXY. Es konnte gezeigt werden, dass WW-Domänen mit der RNA-Polymerase II interagieren und so die Transkriptionsaktivität regulieren (Waragai et al., 1999). Diese Domäne ist durch keine der hier beschriebenen *PQBP1*-Mutationen direkt betroffen. Freilich kann eine indirekte Beeinträchtigung der Funktionalität der WW-Domäne in *PQBP1* dadurch, dass die Konformation des Proteins auch durch außerhalb der Domäne liegende Mutationen verändert werden kann, nicht ausgeschlossen werden.

Die zweite Domäne von *PQBP1* ist die Polyglutamin-bindende Region *PRD (polar-amino-acid-rich domain)*. Diese Domäne wird von Bereichen des vierten Exons kodiert. Durch Interaktion mit der polyQ-Region des supprimierenden Transkriptionsfaktors BRN2 ist auch die PRD-Domäne an der Regulation der Transkription beteiligt (Waragai et al., 1999). *Missense*-Mutationen in dieser Domäne sind von Kalscheuer et al. (2003) beschrieben. Beide in der vorliegenden Arbeit präsentierten *PQBP1*-Mutationen, c.575-576delAG und c.641insC, liegen jedoch außerhalb dieser PRD-Domäne.

Die nächste C-terminal gelegene Domäne von *PQBP1* ist der Bereich des Kernlokalisationssignals *(Nuclear Localization Signal, NLS)*. Die *NLS*-Domäne wird durch die Mutation c.575-576delAG beeinträchtigt. Diese Mutation, die ich im Patienten der Familie K9008, der an mentaler Retardierung und Mikrocephalie leidet, gefunden habe, liegt am Ende von Exon 4 und damit am Ende der Sequenz, die für die *NLS*-Domäne kodiert. Durch das Fehlen der zwei Basen wird der Leserahmen und somit die Aminosäuresequenz derart verändert, so dass es zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation an Aminosäureposition 198 kommt. Die *NLS*-Domäne ist für die Lokalisation des Proteins im Zellkern zuständig. Eine

Fehlfunktion dieses Kernlokalisationssignals führt möglicherweise zu einer irregulären Zunahme der Proteinmenge im Zytoplasma. Da PQBP1 für die Regulation der Transkription wichtig ist, kann es durch eine Dosisverschiebung des delokalisierten PQBP1-Proteins zu einem veränderten Transkriptions- bzw. Translationsverhalten kommen.

Der vierte funktionelle Abschnitt von PQBP1 ist die C2-Domäne. Diese Domäne wird von beiden unter Punkt 3 vorgestellten Mutationen beeinflusst. Sowohl die c.575-576delAG-Mutation, die auch die dritte, eben beschriebene PQBP1-Domäne *NLS* beeinträchtigt, als auch die in der *Renpenning*-Familie gefundene c.641insC-Mutation verändern die Sequenz, die für die C2-Domäne kodiert (siehe auch Abbildung 10 auf Seite 34). Waragai et al. (2000) haben beschrieben, dass die C2-Domäne mit $U5_{15\ kDa}$, einer Komponente, die am Spleißprozess beteiligt ist, interagiert.

Nach diesem Überblick über die verschiedenen Domänen von PQBP1 und die Lage der Mutationen c.575-576delAG und c.641insC lässt sich Folgendes zusammenfassen:

- die einzige Domäne, die in beiden hier beschriebenen Mutationsfällen direkt betroffen ist, ist die C2-Domäne
- die Mutation c.575-576delAG beeinträchtigt zusätzlich die Domäne des Kernlokalisationsbereichs *NLS*
- trotz dieser unterschiedlichen Auswirkung zweier verschiedener Mutationen auf die Prozessierung von PQBP1 kommt es zur Ausprägung desselben Krankheitsbilds mit mentaler Retardierung, Kleinwüchsigkeit und Mikrocephalie

Die Aussage des letzten Gesichtspunkts wird noch unterstützt durch Untersuchungen von Kalscheuer et al. (2003). Hier sind verschiedene Mutationen in *PQBP1* beschrieben, die weiter N-terminal im DR/ER-Repeat in der *PRD*-Domäne liegen und ebenfalls zu mentaler Retardierung in Kombination mit Mikrocephalie und Kleinwüchsigkeit führen. Diese Mutationen beeinflussen drei der PQBP1-Domänen. Eine weitere Mutation, eine *missense*-Mutation, die auch die N-terminal gelegene WW-Domäne betrifft, wurde 2006 von Lubs H. et al. veröffentlicht (Lubs et al., 2006). Auch in diesem Fall leidet der Patient an mentaler Retardierung, Mikrocephalie sowie Wachstumsstörungen. Im Falle *PQBP1* gibt es nach Kalscheuer et al. (2003) jedoch nicht nur Mutationen, die zu syndromischer MR mit Ausprägung von Mikrocephalie und Kleinwüchsigkeit

führen, sondern auch Mutationen, die non-syndromische MR verursachen. Zur Aufklärung der hier zugrunde liegenden pathogenen Mechanismen müssen die Proteinstruktur bzw. -faltung und die Wechselwirkungen mit den interagierenden Proteinen eingehend untersucht werden.
PQBP1 wirkt regulierend auf die Transkription und ist nicht gewebespezifisch exprimiert. Möglicherweise hat *PQBP1*, das zu den häufig betroffenen XLMR-Genen zählt, noch weitere Funktionen und Interaktionspartner. Auch ist zu berücksichtigen, dass die Aktivität von *PQBP1* zeitlich reguliert und variabel sein kann - in Abhängigkeit nicht nur vom jeweiligen Gewebe, sondern auch vom Entwicklungsstadium des Organismus.

4.3 Die Expression von *HADH2* und syndromische mentale Retardierung

Die stille Mutation c.574C>A in Exon 5 des Gens *HADH2*, gefunden in der MRXS10-Familie, verursacht syndromische mentale Retardierung. Begleitende Symptome sind Choreoathetosis und abnormes Verhalten.
Es handelt sich hierbei um ein gutes Beispiel für die Regulation der Genexpression auf Basis des Spleißprozesses. Während schon lange bekannt ist, dass beispielsweise *enhancer/silencer*, relativ zum Gen sowohl *trans*- als auch *cis*-gelegen, die Aktivität eines Gens regulieren, ist die Erkenntnis, dass auch der Spleißprozess auf die Expressionstärke Einfluss nimmt, relativ jung. Hinzugekommen ist das Wissen, dass für das korrekte Spleißen der kodierenden Exone nicht nur die konservierten Exon-/Intronerkennungsstellen GU/AG *(splice sites)*, die *branch site* und die Pyrimidin-Folge nötig sind, sondern dass zusätzliche regulierende Sequenzen auf das Spleißen Exon-spezifisch verstärkend oder hemmend wirken (siehe auch Abb. 25, Seite 59). Das quantitative Gleichgewicht zwischen den einzelnen Transkriptvarianten eines Gens wird u.a. mittels dieser *splice enhancer* und *splice silencer* sichergestellt. Dies geschieht durch regulatorisch wirksame Sequenzabschnitte, die sowohl in Intronen als auch in Exonen liegen können.
Bevor ich auf den pathogenen Mechanismus in den MRXS10-Patienten und *HADH2* eingehe, möchte ich kurz zwei Beispiele für diese Art der Genregulation vorstellen:

- im Falle des von dem Gen *MAPT* kodierten Mikrotubuli-assozierten tau-Protein, dessen Fehlfunktion in Zusammenhang mit der autosomal-dominanten neuronalen Erkrankung *frontotemporal dementia and parkinsonism 17 (FTDP17)* und Alzheimer steht, liegt beim gesunden Menschen eine quantitative Balance u.a. zwischen zwei alternativen Transkriptvarianten vor. Die eine Variante beinhaltet alle Exone, in der anderen fehlt Exon 10. Dieses quantitative Gleichgewicht wird durch das Zusammenwirken mehrerer Spleiß-Regulatoren sichergestellt, die das Prozessieren von Exon 10 so kontrollieren, dass beide Varianten in gewissen Mengen in der gesunden Zelle vorkommen. Wird nun beispielsweise durch eine Mutation die Bildung des Spleiß-inhibierenden *stem loop* am Ende von Exon 10 verhindert, wird anteilsmässig zuviel der Variante mit Exon 10 produziert. Exon 10 kodiert für einen der Proteinbereiche, die Mikrotubuli-bindende Motive bilden. Liegen diese in zu grossen Mengen vor, kommt es zu Mißbildungen und Fehlfunktionen der neuronalen Zellen (Cartegni et al., 2002).
- im *SMN1*-Gen, das unter Punkt 1.4 schon erwähnt worden ist, ist auch die Funktion eines *exonic splice enhancer (ESE)* wichtig, um das korrekte und effektive Spleißen - in diesem Fall - aller Exone zu gewährleisten (Cartegni and Krainer, 2002). Von *SMN1* liegt eine bis auf fünf Nukleotide identische Kopie vor, die eine Fehlfunktion von *SMN1* jedoch nicht ausgleichen kann. Grund hierfür ist ein Nukleotid-Unterschied in Exon 7 (Lorson et al., 1999). Dieser Sequenzbereich gehört in *SMN1* höchstwahrscheinlich zu einem *ESE*, der in der Genkopie *SMN2* außer Kraft gesetzt ist. Die Folge ist, dass zu wenig Transkripte mit Exon 7 von der Kopie *SMN2* prozessiert werden.

An diesem Beispiel sieht man deutlich, dass die Spleißstellen an den Exon-/Introngrenzen nicht immer gleich stark wirken und daher mit unterschiedlicher Effizienz vom Spleißapparat erkannt werden. Diese Unterschiede werden durch Regulatoren wie den erwähnten *ESE* ausgeglichen (Abb. 25): *ESEs* bestehen aus variablen kurzen Sequenzabschnitten von 6-8 Nukleotiden. An die Sequenz des *ESEs* binden sog. Serin-/Arginin-reiche RNA-bindende Proteine (SR-Proteine), die ihrerseits Komponenten des Spleißosoms, die snRNPs (*small nuclear* RNPs), an die jeweilige Spleißdonor-/-akzeptorstelle verstärkt rekrutieren. Umgekehrt kann eine stark wirkende Spleißstelle durch einen *Exonic Splice Silencer (ESS)* oder die Bildung einer 'Schlaufe', im Englischen *stem loop*, im Bereich des Exon-/Intronübergangs supprimiert werden.

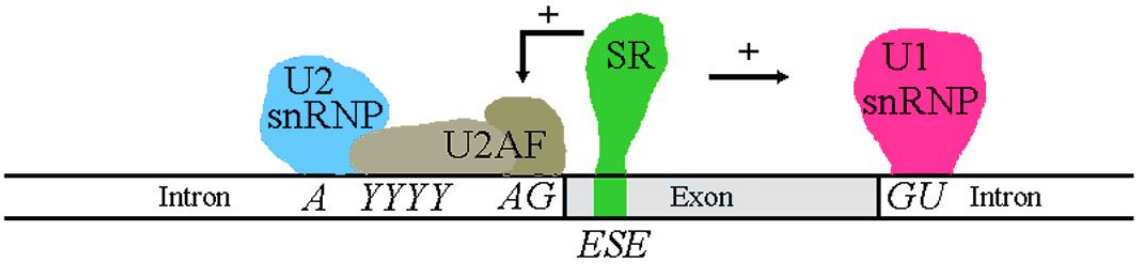


Abb. 25 Wirkungsweise eines *ESE*: Nach Bindung eines SR-Proteins an die *ESE*-Sequenz wird die Bindung der Spleißfaktoren *U1snRNP* und *U2AF* an die *GU*- bzw. die *AG*-Spleißstelle und somit die korrekte Erkennung des Exon unterstützt.

Die Mutation c.574C>A in Exon 5 von *HADH2*, die ich in den Betroffenen und den Überträgerinnen der MRXS10-Familie nachgewiesen habe, beeinflusst aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls einen Spleiß-Regulator. Dadurch wird Exon 5 vom Spleißapparat nicht mehr so effizient erkannt, und es kommt so zu einer quantitativen Verschiebung der Transkriptvarianten von *HADH2* (Abb. 26).

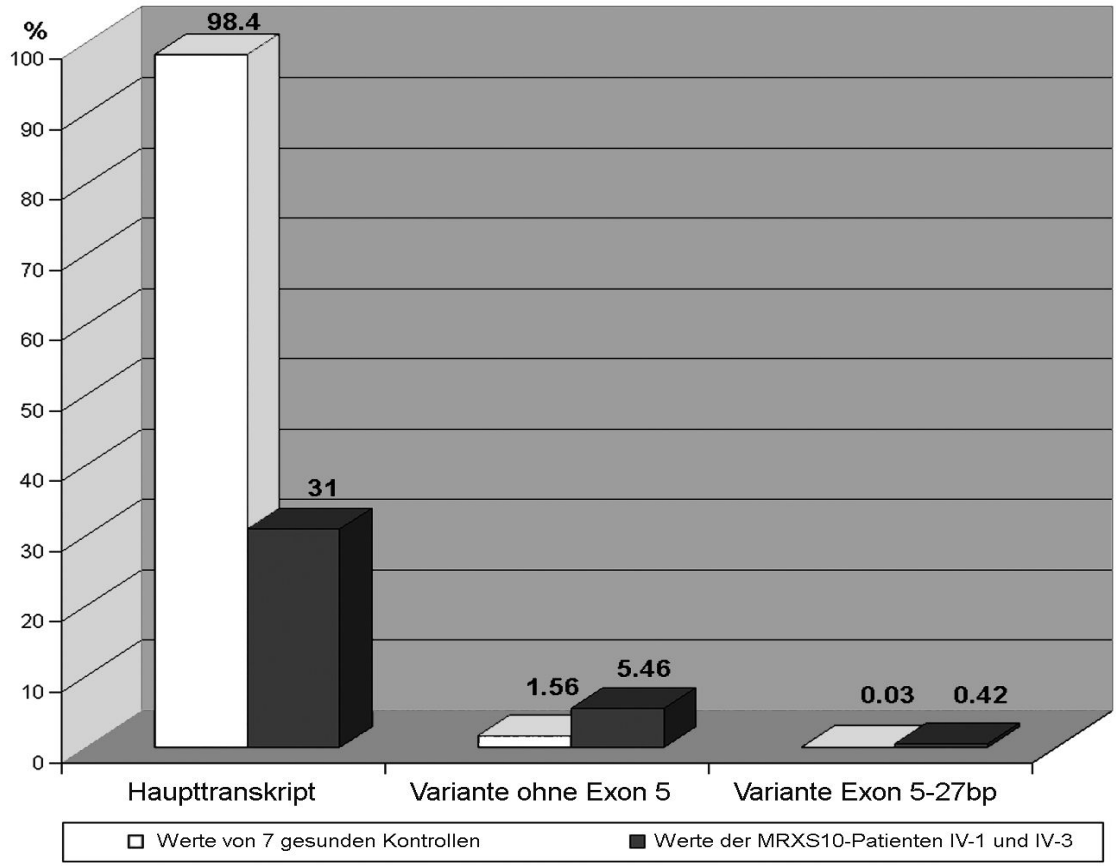


Abb. 26 Die durch RealTime-PCR ermittelten quantitativen Verhältnisse der Transkriptvarianten von *HADH2*. Die Reduzierung des Haupttanskripts im MRXS10-Patienten (Werte in % bezogen auf die Kontrollen) geht einher mit einer Erhöhung der Transkriptvariante ohne Exon 5 und der um 27 bp verkürzten Variante.

Normalerweise wird im Wildtyp zu einem Anteil von 98.4% ein Transkript, das alle sechs Exone von *HADH2* enthält, prozessiert. Die Transkriptvarianten, in denen Exon 5 fehlt bzw. am Ende von Exon 5 27 bp fehlen, sind im Wildtyp zwar nachweisbar, haben jedoch quantitativ zusammen nur einen Anteil von ca. 1.6% an den Transkripten von *HADH2*. Bei den Betroffenen der MRXS10-Familie, die die Mutation c.574C>A tragen, sinkt der Anteil des Haupttranskripts auf nur noch ca. 31%. Gleichzeitig steigt die Variante ohne Exon 5 um das 3.5-fache und die Variante Exon 5-27bp um das 14-fache. Beide Varianten zusammen bleiben aber anteilsmässig unter 6%. Die Expression von *HADH2* ist also insgesamt stark reduziert (Abb. 26).

Die Reduzierung der Expression des Haupttranskripts von *HADH2* im MRXS10-Patienten konnte ich auch auf Proteinebene mittels *Western-blotting* und spezifischer Detektion durch einen HADH2-Antikörper bestätigen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die zwischen MRXS10-Patient und Wildtyp auf mRNA-Ebene nachgewiesenen Expressionsunterschiede auf der Proteinebene quantitativ keine Rolle spielen. Die im Patienten produzierte Menge an HADH2-Protein ist im Vergleich zum Gesunden auf etwa 1/3 reduziert.

Zu klären bleibt die Frage, ob die Abnahme der Menge an Haupttranskript oder die gesteigerte Produktion der Transkriptvarianten ohne Exon 5 bzw. Exon 5-27bp im MRXS10-Patienten pathogen wirksam ist. Wir gehen davon aus, dass die Reduktion des Haupttranskripts Ursache der Krankheit ist. Rein quantitativ ist diese Reduktion die größere Beeinflussung in der Zelle, während die Transkriptvarianten zusammen auch nach der Zunahme lediglich 6% ausmachen. Es müsste sich um eine starke dominant-negative Wirkung einer oder beider Transkriptvarianten handeln. Nicht ganz auszuschliessen bleibt, dass beide Effekte zusammen pathogen wirken. So könnte die gestörte Entwicklung durch die Reduktion des Haupttranskripts noch verstärkt werden, indem die Transkriptvarianten entweder kompetitiv stören durch ihren gesteigerten Anteil oder sogar aktiv irgendwelche Prozesse inhibieren. Hier sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

HADH2, das auf Xp11.2 lokalisiert ist, und für das auch die Akronyme ERAB (endoplasmatic reticulum-associated amyloid-beta-binding protein), ABAD (amyloid-beta-peptide-binding alcohol dehydrogenase type II), SCHAD und

neuerdings HSD17B10 verwendet werden, kodiert für ein homotetrameres Protein von 108kDa. Es wird in vielen Geweben exprimiert und besitzt einen multifunktionellen Charakter. Bisher wurden *missense*-Mutationen in *HADH2* mit einem Defekt im Isoleucin-Abbau assoziiert (Ofman et al., 2003). Dieser Defekt heisst 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase Defizienz (MHBD). Der Erkrankte leidet an schweren neuronalen Fehlentwicklungen wie zunehmendem Verlust mentaler und motorischer Fähigkeiten sowie einer ausgeprägten Tendenz zu Epilepsie, Choreoathetosis und Blindheit. Das Enzym MHBD katalysiert die Reaktion von 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA zu 2-Methyl-Acetoacetyl-CoA und im Weiteren die Spaltung in Acetyl-CoA und Propionyl-CoA. Patienten mit MHBD-Defizienz besitzen nur noch eine sehr geringe MHBD-Aktivität, während der MRXS10-Patient eine MHBD-Aktivität von ca. 85% aufweist (diese Untersuchung wurde in Kooperation extern von der Arbeitsgruppe Ronald J. A. Wanders durchgeführt). Diese Aktivität ist im noch normalen Bereich, so dass die beim MRXS10-Patienten vorliegende Krankheit, trotz teilweise ähnlicher Symptome, von MHBD zu unterscheiden ist.

Welche Art von Spleißregulator ist in Exon 5 von *HADH2* gestört?

Die Mutation c.574C>A im MRXS10-Patienten beeinflusst nachweislich eine für den Spleißprozess wirksame regulatorische Sequenz. Bisher habe ich die Möglichkeit erwähnt, dass hier ein *ESE* (Abb. 25, S.59) gestört sein kann, der die Erkennung von dem betroffenen Exon 5 durch den Spleißapparat verstärkt. Der *ESE* ist derzeit noch der am besten erforschte Spleißregulator, der das Spleißen verstärkt oder reprimiert. Es sind jedoch andere Möglichkeiten denkbar. Neben *ESEs* gibt es *ESSs (exonic splice silencer)*. Durch die Mutation kann ein *ESS*, der die Exonerkennung verringert, entstanden sein und dann auch für die beim MRXS10-Patienten vorliegenden quantitativen Transkriptverhältnisse verantwortlich sein. Über die Sequenzen von *ESSs* ist (noch) zu wenig bekannt, um eine Aussage für die betroffene Sequenz in *HADH2* zu machen. Als weitere Möglichkeit ist die Bildung eines *stem loop* denkbar, eine Schleifenbildung der DNA bzw. mRNA (Cartegni et al., 2002). Diese räumliche Anordnung der mRNA ist von der Sequenz abhängig, indem sich aufeinanderfolgende komplementäre

Sequenzabschnitte miteinander verbinden und so eine Schleife ausbilden. Durch diese Schleifenbildung wird die Zugänglichkeit der mRNA für mit ihr interagierende Proteine sterisch verändert. Im Fall des Endes von Exon 5 von *HADH2* lässt sich ein *stem loop* aufgrund der Sequenz konstruieren. Für das Spleißen wichtige Proteine würden so zunehmend abgeblockt. Die 5'-gelegene Exon-/Introngrenze von Exon 5 würde nicht richtig erkannt werden, und somit würde die Menge an Transkripten ohne Exon 5 ansteigen und gleichzeitig die Menge des Haupttranskripts mit allen Exonen abnehmen (wie im Patienten beobachtet). Die Möglichkeit, dass durch die Mutation im MRXS10-Patienten ein derartiger *stem loop* entsteht, der Spleiß-inhibierend wirkt, ist nach gegenwärtigem Wissensstand aus folgendem Grund die wahrscheinlichste: In dem unter Punkt 3.3.3 beschriebenen *in vitro*-Experiment wurde der betroffene genomische Bereich von *HADH2* sowohl mit der c.574C>A-Mutation als auch als Wildtypsequenz *in vitro* transkripiert und gespleißt. So konnte bestätigt werden, dass die vorliegende Mutation tatsächlich Ursache für das veränderte Spleißverhalten in *HADH2* ist. In dem dazu verwendeten HeLa-Extrakt sind die dazu nötigen Proteine, auch für die Translation. Jedoch SR-Proteine, die an der Funktion von *ESEs* unabdingbar beteiligt sind, sind laut extra eingeholter Auskunft des Herstellers Promega nicht berücksichtigt. Es handle sich um einen „Universalmix“ von Proteinen für eine möglichste effektive und stabile Expression. Die Ausbildung eines *stem loop* ist vornehmlich Sequenz-bedingt und dann sterisch wirksam, deshalb also unabhängiger von den zusätzlichen Proteinen wie SR-Proteinen. Daher ist dieser Mechanismus am ehesten denkbar, da sein Funktionieren in diesem *in vitro*-Experiment sichergestellt ist, während die Nachweisbarkeit von *ESEs* o.ä. in diesem Experiment unmöglich scheint. Um dies zu beweisen, sind noch weitere Experimente nötig, auch sind andere, derzeit noch unbekannte Mechanismen und Interaktionen nicht auszuschliessen.

4.4 Die Assoziation von *UBE1* mit X-chromosomal gekoppelter infantiler spinaler Muskelatrophie (XL-SMA)

X-chromosomal gekoppelte spinale infantile Muskelatrophie (XL-SMA) ist eine schwere neuronale Erkrankung mit allgemeiner Körperschwäche, die sich meist

lethal auswirkt und gekennzeichnet ist von kongenitaler Hypotonie, Areflexie, morphologischen Fehlbildungen, multipler Arthrogryposis mit Verlust der vorderen Hornzellen sowie Lähmungserscheinungen, daraus resultierend akuten Atembeschwerden und eintretendem Tod in der Kindheit. Es liegt ein rezessiver Erbgang vor. Autosomal vererbte Formen von SMA sind bereits beschrieben, z.B. die autosomal-rezessive proximale spinale Muskelatrophie (PSMA), die durch Mutationen in dem Gen *Survival Motor Neuron SMN1* auf Chromosom 5 ausgelöst wird.

In der vorliegenden Arbeit sind in zwei XL-SMA-Familien (#2 und #5) 123 Gene in dem 20.4 MB grossen Intervall zwischen den Markern DXS8080 und DXS7132 auf Xp11.3-Xq11.1 genomisch und meist auch auf cDNA-Ebene sequenziert worden. Hierbei sind Mutationen in dem Gen *Ubiquitin-Activating Enzyme E1 (UBE1)* gefunden worden, woraufhin weitere XL-SMA-Familien (#4, #7, #15) auf Mutationen in *UBE1* untersucht worden sind.

Die in Exon 15 des Gens *UBE1* gefundenen Mutationen:

- c.1731C>T, eine stille Mutation am Ende von Exon 15 (in den Familien #2, #4, #15, DNA-Nr.13977)
- c.1617G>T, auch in Exon 15, verursacht den Aminosäureaustausch p.539Met>Ile (in Familie #5)
- c.1639A>G, auch in Exon 15, verursacht den Aminosäureaustausch p.547Ser>Gly (in Familie #7)

Für jede gefundene Mutation wurde die Segregation in der jeweiligen Familie durch direkte Sequenzierung untersucht und bestätigt. Mittels DHPLC-Analyse konnten alle drei Mutationen in 3550 X-Chromosomen als Polymorphismus ausgeschlossen werden. Im Falle der stillen Mutation c.1731C>T wurden mittels *MaldiTof*-Massenspektroskopie noch weitere 4364 X-Chromosomen untersucht, in denen diese C>T-Transition auch nicht auftrat. Somit sind diese Mutationen, die in den Patienten und heterozygot in den Überträgerinnen der jeweiligen XL-SMA-Familien nachweisbar sind und in Exon 15 von *UBE1* liegen, mit XL-SMA assoziiert.

Alle drei Mutationen liegen in dem Bereich von *UBE1*, der für eine Domäne kodiert, die nachgewiesenermaßen mit der BTB-Domäne von Gigaxonin interagiert. Diese Interaktion ist für die Umsetzung von MAP1B, dessen

Anhäufung mit neuronalen Fehlfunktionen und dem Absterben von Neuronalzellen assoziiert ist, entscheidend (Allen et al., 2005). Die Missensemutationen c.1617G>T (p.539Met>Ile) und c.1639A>G (p.547Ser>Gly) dürften diese Interaktion zwischen UBE1 und Gigaxonin stören. Eindeutig beweisen hat sich dies in einem am Ende der Promotionsarbeit durchgeführten *yeast-two-hybrid*-Versuch jedoch nicht lassen. Zwar ist die Stringenz während dieses Versuchs durch Verwendung eines Mangelmediums, auf dem drei Aminosäuren fehlen, bereits hoch gewesen, um auch leichtere Störungen der Proteininteraktion feststellen zu können, aber wahrscheinlich ist entweder der Aminosäureaustausch Methionin>Isoleucin in UBE1 zu unerheblich, um in einem *yeast-two-hybrid*-Versuch die Interaktion der Proteindomänen zu beeinflussen, oder Hefe-eigene Proteine korrigieren den Defekt in der UBE1-Domäne.

Dagegen konnte gezeigt werden, dass die stille Mutation c.1731C>T, die in drei unabhängigen Familien (#2, #4, #15) nachgewiesen wurde, Ursache für eine deutliche Reduzierung der Expression von *UBE1* ist. Quantitative Analyse durch Exon 15-spezifische RealTime-PCR mit aus Blut isolierter mRNA bzw. cDNA des Patienten der Familie #15 ergab eine Reduktion der *UBE1*-Expression auf 1/5 (verglichen mit gesunden, männlichen Kontrollen).

Für eine derartige Reduzierung der Expression von *UBE1* durch die stille Mutation c.1731C>T am Ende von Exon 15 gibt es bisher zwei mögliche Erklärungen:

1. Eine für das korrekte Spleißen relevante regulatorische Sequenz, beispielsweise ein *exonic splice enhancer (ESE)*, wird durch die Mutation beeinflusst (siehe Abb. 25, S.59).
2. Die C>T-Transition hebt eine Methylierungsstelle eines CpG auf, die Teil einer CpG-Insel und wichtig für die Regulation der Expression von *UBE1* ist.

ad 1) *In silico* wird durch den *ESE-finder 2.0 (by Cartegni)* im Sequenzbereich der Mutation c.1731C>T eine Bindungsstelle für ein SR-Protein *(Serin rich protein)*, welches an eine *ESE*-Sequenz bindet, vorhergesagt. Im Falle der mutierten Sequenz entsteht eine benachbarte zweite SR-Proteinbindungstelle für einen anderen SR-Protein-Typ. Daher ist es denkbar, dass sich durch die Mutation zwei verschiedene SR-Proteine in diesem Sequenzbereich sterisch behindern und es zu dem Effekt der kompetitiven Hemmung kommt. Die Folge wäre, dass keines der beiden SR-Proteine richtig binden kann, die *ESE*-Funktion dadurch beeinträchtigt wird und das betroffene Exon vom Spleißapparat nicht richtig

erkannt wird. Die erhöhte Expression einer nicht stabilen Transkriptvariante geht dann mit einer erniedrigten Expression des Haupttranskripts einher, wie mittels RealTimePCR für den XL-SMA-Patienten (Familie #15) mit der Mutation c.1731C>T gezeigt.

ad 2) Die Mutation c.1731C>T hebt, wie in Bisulfit-behandelter DNA mehrerer Kontrollen nachgewiesen werden konnte, eine Methylierung eines CpGs auf, das in einer *in silico* vorhergesagten CpG-Insel liegt. Bisher war bekannt, dass Methylierung auf DNA-Ebene v.a. in Promotorbereichen die Aktivität eines Gens unterdrückt. Methylierungen innerhalb von Genen und ihre Funktionen werden derzeit gerade erst untersucht. Einen möglichen Funktionsmechanismus intragenischer Methylierung stellen Jones et al. (2001) vor (Abb. 27, nach Ramser et al., 2008): Durch die methylierten CpGs einer CpG-Insel innerhalb eines Gens kann beim Wildtyp ein Transkriptionsregulator, ein sog. Insulator, nicht aktiv werden, der seinerseits im Falle einer Aktivierung inhibierend auf einen weiter 3´-gelegenen *transcription-enhancer* wirken würde. Bei den XL-SMA-Patienten mit der C>T-Transition fällt ein methyliertes CpG weg, so dass dann ein Insulator wirksam werden könnte. Dieser reduziert die Expression von *UBE1*, indem er die normale Stimulation der Transkription unterbindet.

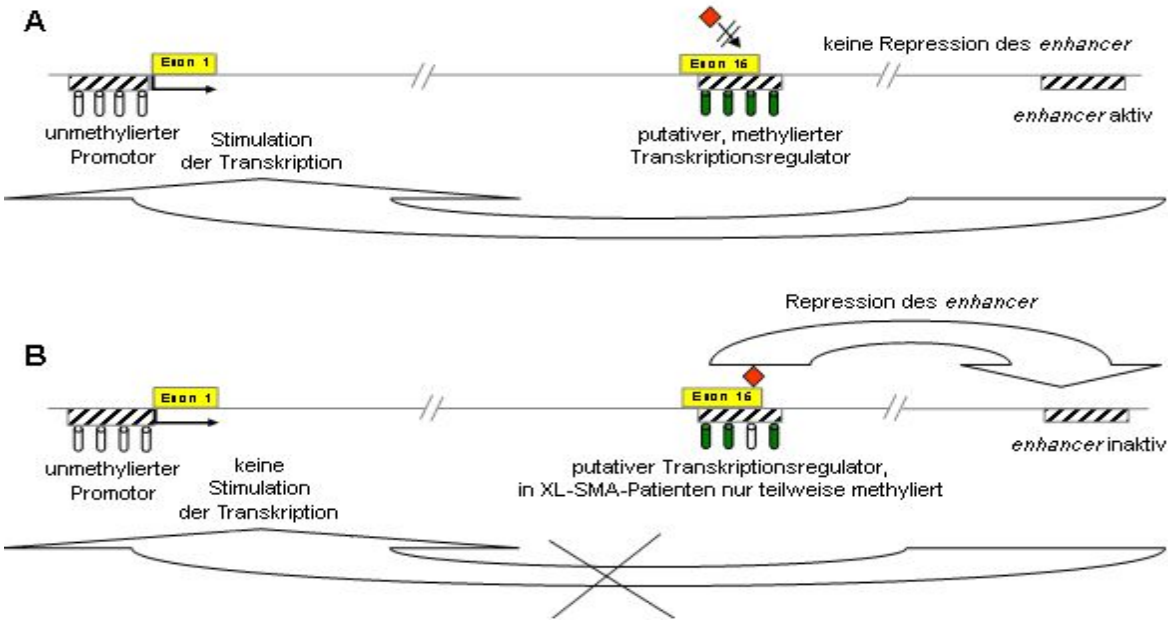


Abb. 27 Modell zur Expressionskontrolle durch methylierte CpGs in einem Exon: An die voll-methylierte Wildtypsequenz kann ein Expressionsrepressor (rot) nicht binden, so dass die auf den Promotor wirksame Stimulation der Transkription erhalten bleibt (A). Fällt eine Methylierung in der regulatorischen Sequenz weg, wird der Repressor aktiv und unterbindet die Stimulation der Transkription (B).

Neben diesen zwei interessanten Erklärungsmöglichkeiten für die Reduktion der Expression von *UBE1* sind noch weitere Mechanismen mit der gleichen Konsequenz vorstellbar. Andere, das Spleißen regulierende Sequenzen könnten eine Rolle spielen. So kann durch die Mutation c.1731C>T ein *exonic splice silencer (ESS)* entstanden sein, der inhibierend auf die Prozessierung der Haupttranskriptvariante mit Exon 5 wirkt. Auf diese Möglichkeit wurde auch im Falle des XLMR-Gens *HADH2* eingegangen. Welcher Mechanismus tatsächlich vorliegt, lässt sich erst nach weiterer funktioneller Analyse zeigen, indem beispielsweise die betroffene *UBE1*-Sequenz in ein anderes Gen eingebaut wird, um dort in der Funktion eines *ESE* oder *ESS* bestätigt zu werden. Alternativ sollte man die mögliche Aktivität des oben erwähnten Insulators, der die Transkription von *UBE1* im Patienten unterdrückt, *in vitro* untersuchen, evtl. ebenfalls durch Einbringung der *UBE1*-Sequenz mit dem betroffenen CpG in ein anderes Gen und anschliessender Überprüfung der Auswirkungen auf die Transkriptionseffizienz.

UBE1 kodiert für ein Protein, das ein Domäne aufweist, für die Allen et al. (2005) eine Interaktion mit der BTB-Domäne von Gigaxonin nachgewiesen haben. Diese Interaktion ist entscheidend für die Umsetzung von MAP1B, dessen Anreicherung zum Absterben von Neuronalzellen führt (Allen et al., 2005).
UBE1 ist zudem ein funktionell wichtiger Bestandteil im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist. In diesem Proteolyse-System, das einen elementaren zellulären Mechanismus zur Regelung der Proteinaktivität darstellt, katalysiert das UBE1-Protein den ersten Schritt der Ubiquitin-Konjugation von Proteinen für ihren Abbau. Auswirkungen von Fehlfunktionen in der Ubiquitinierung sind mit Parkinson und einer Form von syndromischer X-gekoppelter mentaler Retardierung (XLMR), die u.a. durch Tremor und Epilepsie gekennzeichnet ist, assoziiert (Ross et al., 2004 bzw. Tarpey et al., 2007). Diese Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung von UBE1 für die neuronale Entwicklung und runden die in der vorliegenden Dissertation dargestellten Ergebnisse bezüglich *UBE1* als am UPS beteiligtes Gen ab.

Zusammenfassung

Die Identifizierung neuer Gene, die an der neuronalen Entwicklung des Menschen beteiligt sind, sowie die Aufklärung ihrer Funktionen sind Gegenstand dieser Dissertation gewesen. Für zwei unterschiedliche Neuronalerkrankungen, X-chromosomal gekoppelte mentale Retardierung (XLMR) und X-chromosomal gekoppelte infantile spinale Muskelatrophie (XL-SMA), konnten die molekular-biologischen Ursachen aufgeklärt werden, die sowohl diagnostisch als auch therapeutisch relevant sein können.

X-chromosomal gekoppelte mentale Retardierung (XLMR) und die Gene *FTSJ1, PQBP1* und *HADH2*

XLMR ist mit einer geschätzten Prävalenz von 1 : 500 betroffenen Männern eine der häufigsten Erbkrankheiten. Sie zeigt allerdings eine starke Heterogenität und es wird zwischen syndromischer und non-syndromischer mentaler Retardierung unterschieden. Bisher sind 83 Gene gefunden, die in direktem Zusammenhang mit beiden Formen von XLMR stehen (gemäß *XLMR Web site* auf *http://www.rm.unicatt.it/xlmr/*). Hierbei ist festzustellen, dass es sich um sehr unterschiedliche Mutationsmechanismen der betroffenen Gene handelt. Diese Komplexität neuronaler Entwicklung bzw. ihrer genetischen Defekte wird durch die Resultate der vorliegenden Dissertation bestätigt.

Der Patient aus der Familie MRX9, der an non-syndromischer XLMR erkrankt ist, trägt einen Nukleotidaustausch an der Spleißakzeptorstelle vor Exon 4 des Gens *FTSJ1*, das für das humane Homolog der bakteriellen 23S-rRNA Methyltransferase kodiert. Dies führt zu einem aberranten *FTSJ1*-Transkript, in dem der Wegfall von Exon 4 Ursache für ein trunkiertes FTSJ1-Protein im Patienten ist (siehe Publikation: Ramser et al., 2004).

Das *Renpenning*-Syndrom, eine syndromische Form von XLMR, das neben geistiger Behinderung Kleinwüchsigkeit und Mikrocephalie aufweist und erstmals 1962 von *H.J. Renpenning* beschrieben worden ist, wird durch eine Cytosin-Insertion in *PQBP1*, dem Gen, das für das Polyglutamine Tract Binding Protein kodiert, verursacht. Eine zweite hier vorgestellte Mutation in *PQBP1*, eine zweibasige Deletion, sowie vier weitere in der Literatur beschriebene Mutationen (Kalscheuer et al., 2003 und Lubs et al., 2006), die in verschiedenen Domänen

von *PQBP1* lokalisiert sind, führen ebenfalls zu dem oben erwähnten Krankheitsbild (siehe Publikation: Lenski et al., 2004).
Einen komplexeren Mutationsmechanismus, der in Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung des Spleißprozess steht, konnte ich im Patienten MRXS10 nachweisen, der an geistiger Behinderung sowie Choreoathetosis leidet. In diesem Fall ist eine für die Exon-Erkennung wichtige, regulatorische Sequenz in Exon 5 des Gens *HADH2* durch eine stille Mutation beeinträchtigt. Das Wildtyp-Transkript mit allen Exonen wird in verringerten Mengen prozessiert. Es kommt zu einer auf ca. 1/3 reduzierten Expression des HADH2-Proteins und zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von Transkriptvarianten von *HADH2*. Dieses Beispiel zeigt, dass der Prozess des (alternativen) Spleißens nicht nur auf die Exonabfolge in den Gentranskripten, sondern auch auf die Expression des Gens bezüglich seiner Effizienz Einfluss nimmt (siehe Publikation: Lenski et al., 2007).
Zur Aufklärung der genauen Funktionen der in den MR-Patienten gestörten Gene *FTSJ1, PQBP1* und *HADH2* sind weitere Untersuchungen bezüglich der Proteininteraktionen notwendig.

X-chromosomal gekoppelte infantile spinale Muskelatrophie (XL-SMA) ist assoziiert mit *UBE1*, Bestandteil des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (UPS)

Die rezessiv vererbte X-chromosomal gekoppelte infantile spinale Muskelatrophie (XL-SMA), deren Krankheitsbild dem schweren Typ der autosomal-vererbten spinalen Muskelatrophie - verursacht durch Mutationen in dem Gen *SMN1* - gleicht, ist eine schwere Neuronalerkrankung zumeist mit Todesfolge schon in der frühen Kindheit. Neben einer Reihe verschiedener Symptome macht dem Erkrankten eine allgemeine Körperschwäche und akute Atemnot infolge der Muskelatrophie zu schaffen. In dem 20.4 Mb grossen XL-SMA-Kopplungsintervall auf Xp11.3-Xq11.1 konnten in insgesamt sechs XL-SMA-Familien drei unterschiedliche Mutationen in dem Gen *Ubiquitin-activating Enzym E1 (UBE1)* gefunden werden. Als seltene, unpathogene Polymorphismen konnten diese Mutationen ausgeschlossen werden.
Alle drei Mutationen, von den zwei einen Aminosäureaustausch verursachen, liegen in *UBE1* in Exon 15, das im für eine Domäne kodierenden Bereich von *UBE1* liegt. Für diese Domäne wurde eine Interaktion mit Gigaxonin nachgewiesen, die u.a. für die Umsetzung von MAP1B und für die Erhaltung von

Neuronalzellen von Bedeutung ist. (Allen et al., 2005). Während die *missense*-Mutationen entweder diese oder eine andere, bisher nicht bekannte Interaktion von UBE1 stören, konnte für die stille Mutation c.1731C>T eine starke Reduktion der Expression nachgewiesen werden. Im Träger dieser C>T-Transition wurde mittels RealTime-PCR eine Reduktion der Expression auf 1/5 gemessen. Die molekularbiologische Ursache für diese Expressionsreduktion muss, beispielsweise mittels eines *in vitro minigene*-Versuchs, noch spezifiziert werden. Neben der Störung eines für den Spleißvorgang wichtigen regulatorischen Elements kommt auch eine durch das veränderte Methylierungsmuster beeinträchtigte Expression in Frage, da die C>T-Transition in einem CpG liegt (siehe Publikation: Ramser et al., 2008).

Das UBE1-Protein ist, außer an seiner Interaktion mit Gigaxonin, zudem an dem für die Proteinaktivität wichtigen Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) beteiligt, indem es den ersten Schritt der Ubiquitin-Konjugation von Proteinen für ihren Abbau katalysiert. Fehlfunktionen in diesem System sind ebenfalls mit neuronalen Symptomen assoziiert (Tarpey et al., 2007) und bestätigen somit die wichtige Stellung von *UBE1* in der komplexen neuronalen Entwicklung und Funktion.

6 Literaturverzeichnis

Allen E, Ding J, Wang W, Pramanik S, Chou J, Yau V, Yang Y. *Gigaxonin-controlled degradation of MAP1B light chain is critical to neuronal survival*. Nature 10: 224-8 (2005).

Anderson G, Schroer RJ, Stevenson RE. *Mental Retardation in South Carolina II. Causation*. Proc. Greenwood Center 15: 32-38 (1996).

Bienvenu T, Poirier K, Friocourt G, Bahi N, Beaumont D, Fauchereau F, Jeema LB, Vient M-C, Francis F, Couvert P, Gomot M, Moraine C, van Bokhoven H, Kalscheuer V, Frints S, Gecz J, Ohzaki K, Chaabouni H, Fryns J-P, des Portes V, Beldjord C, Chelly J. *ARX, a noval Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation*. Hum. Mol. Genet. 11: 981-991 (2002).

Bügl H, Fauman EB, Staker BL, Zheng F, Kushner SR, Saper MA, Bardwell JC, Jakob U. *RNA methylation under heat shock control.* Mol. Cell. 6: 349-60 (2000).

Cartegni L, Chew S, Krainer AR. *Listening To Silence And Understanding Nonsense: Exonic Mutations That Affect Splicing*. Genetics 3: 285-296 (2002).

Cartegni L and Krainer AR. *Disruption of an SF2/ASF dependent exonic splice enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1*. Nat. Genet. 30: 377-84 (2002).

Chelly J and Mandel J-L. *Monogenic Causes of X-Linked Mental Retardation*. Nat. Rev. Genet. 2: 669-680 (2001).

Coffin GS, Siris E, Calif E and Wegienka LC. *Mental retardation with osteocartilaginous anomalies*. Am. J. Dis. Child. 112: 205–213 (1966).

Couvert P, Bienvenu T, Aquaviva C, Poirier K, Moraine C, Gendrot C, Verloes A, Andrès C, Le Fevre AC, Souville I, Steffann J, des Portes V, Ropers H-H, Yntema HG, Fryns J-P, Briault S, Chelly J, Beldjord C. *MECP2 is highly mutated in X-linked mental retardation*. Hum. Mol. Genet. 10/9: 941-946 (2001).

Fairbrother GW, Yeh R, Sharp P, Burge C. *Predictive Identification of Exonic Splicing Enhancers in Human Genes*. Science 297: 1007-1013 (2002).

Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. *Ribosomal 18s RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations*. Anal. Biochem. 295: 17-21 (2001).

Hagberg B, Kyllerman M. *Epidemiology of mental retardation - a swedish study*. Brain Dev. 5: 441-449 (1983).

Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O. *An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome*. Eur. J. Paediatr. Neurol. (2002).

Hedera P, Alvarado D, Beydoun A, Fink J. *Novel Mental Retardation-Epilepsy Syndrom Linked to Xp21.1-p11.4*. Ann. Neurol. 51: 45-50 (2002).
Jones PA, Takai D. *The role of methylation in mammalian epigenetics*. Science 293:1068-1070 (2001).

Kalscheuer VM, Freude K, Musante J, Jensen LJ, Yntema HG, Gécz J, Sefiani A. *Mutations in the polyglutamine-binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation*. Nat. Genet. 35: 313-315 (2003).

Lenski C, Abidi F, Meindl, A, Gibson A, Platzer M, Kooy F, Lubs H, Stevenson R, Ramser J, Schwartz CE. *Novel Truncating Mutations in the Polyglutamine Tract Binding Protein 1 Gene (PQBP1) Cause Renpenning Syndrome and X-Linked Mental Retardation in Another Family with Microcephaly*. Am. J. Med. Genet. 74: 777-80 (2004).

Lenski C, Kooy F, Reyniers E, Loessner D, Wanders R, Winnepenninckx B, Hellebrand H, Engert S, Schwartz CE, Meindl A, Ramser J. *The Reduced Expression of the HADH2 Protein Causes X-Linked Mental Retardation, Choreoathetosis, and Abnormal Behavior.* Am. J. Hum. Genet. 80: 372–377 (2007).

Liu H, Zhang M, Krainer A. *Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins*. Genes Dev. 12: 1998-2012 (1998).

Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. *A single nucleotid in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 6307-6311 (1999).

Lorson CL, Androphy EJ. *An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN*. Hum. Mol. Genet. 22: 259-65 (2000).

Lubs H, Abidi FE, Echeverri R, Holloway L, Meindl A, Stevenson RE, Schwartz CE. *Golabi-Ito-Hall syndrome results from a missense mutation in the WW domain of the PQBP1 gene.* J. Med. Genet. 43: e30 (2006).

Maniatis T and Tasic B. *Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans*. Nature 418: 236-243 (2002).

Maquat LE. *The power of point mutations*. Nat. Genet. 27: 5-6 (2001).

Merienne K, Jacquot S, Pannetier S, Zeniou M, Bankier A, Gecz J, Mandel JL, Mulley J, Sassone-Corsi P, Hanauer A. *A missense mutation in RPS6KA3 responsible for non-specific mental retardation*. Nat. Genet. 22: 13-14 (1999).

Morton NE, Rao DC, Lang-Brown H, Maclean CJ, Bart RD, Lew R. *Colchester revisited: a genetic study of mental defect*. J. Mol. Genet. 14: 1-9 (1977).

Ofman R, Ruiter JPN, Feenstra M, Duran M, Poll-The BT, Zschocke J, Ensenauer R, Lehnert W, Sass JO, Sperl W, Wanders JA. *2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase Deficiency Is Caused by Mutations in the HADH2 Gene*. Am. J. Hum. Genet. 72, 1300–1307 (2003).

Ramser J, Winnepenninckx B, Lenski C, Errijgers V, Platzer M, Schwartz CE, Meindl A, Kooy RF. *A splice site mutation in the methyltransferase gene FTSJ1 in Xp11.23 is associated with non-syndromic mental retardation in a large Belgian family (MRX9).* J. Med. Genet. 41: 679-83 (2004).

Ramser J, Abidi FE, Burckle CA, Lenski C, Toriello H, Wen G, Lubs, Engert S, Stevenson RE, Meindl A, Schwartz CE, Nguyen G. *A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor*. Hum. Mol. Genet. 14: 1019-1027 (2005).

Ramser J, Ahearn ME, Lenski C, Yariz KO, Hellebrand H, Rhein M, Schmutzler RK, Lichtner P, Hoffman EP, Meindl A, Baumbach-Reardon L. *Rare Missense and Synonymous Variants in UBE1, Playing a Key Role in the Ubiquitin-Proteasome System, are Associated with X-linked Infantile Spinal Muscular Atrophy.* Am. J. Hum. Genet. 82: 188-93 (2008).

Raymond FL. *X linked mental retardation: a clinical guide.* J. Med. Genet. 43: 193-200 (2006).

Reyniers E, Van Bogaert P, Peeters N, Vits L, Pauly F, Fransen E, Van Regemorter, Kooy RF. *A new neurological syndrome with mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behaviour maps to chromosome Xp11*. Am. J. Hum. Genet. 65: 1406-1412 (1999).

Ross CA, Pickart CM. *The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases*. Trends Cell. Biol. 14: 703-711 (2004).

Schwarzer S. *DHPLC spürt DNA-Mutationen auf*. Laborpraxis 10: 28-31 (2000).

Stevenson R, Arena F, Ouzts E, Gibson A, Shokeir MHK, Vnencak-Jones C, Lubs H, May M, Schwartz C. *Renpenning Syndrome Maps to Xp11*. Am. J. Hum. Genet. 62: 1092-1101 (1998).

Strachan T und Read A P. *Molekulare Humangenetik*, Elsevier/Spektrum- Verlag, 3. Auflage (2005).

Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, Bork P. *Characterization of a novel protein-binding module - the WW domain*. FEBS Lett. 369: 67-71 (1995).

Tarpey P, Fryer A, Gecz J, Goodship JA, Partington M, Price S, Schwartz C, Stevenson R, Tolmie JL, Turner G. *Prevalence of mutations in X-linked mental retardation genes in familial mental retardation.* In 12th International Workshop on Fragile X and X-linked Mental Retardation; Williamsburg, USA (2005).

Tarpey PS, Raymond FL, O'Meara S, Edkins S, Teague J, Butler A, Dicks E, Stevens C, Tofts C, Avis T et al. *Mutations in CUL4B, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor.* Am. J. Hum. Genet. 80: 345-352 (2007).

Temtamy SA, Miller JD, Hussels-Maumenee I. *The Coffin-Lowry syndrome: an inherited facio-digital mental retardation syndrome*. J. Pediat. 86: 724-731 (1975).

Toniolo D. *In Search of MRX Genes*. Am. J. Med. Genet. 97: 221-227 (2000).

Turner G, Webb T, Wake S, Robinson. *Prevalence of fragile X syndrome.* Am. J. Med. Genet. 64: 196-197 (1996).

Vervoort SV, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X, Clarkson K, DuPont B, Schwartz CE, Stevenson R, Boyd E, Srivastava. *AGTR2 Mutations in X-linked Mental Retardation*. Science 296: 2401-2403 (2002).

Vervoort R, Lennon A, Bird AC, Tulloch B, Axton R, Miano MG, Meindl A, Meitinger T, Ciccodicola A, Wright AF*. Mutational hot spot with a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa*. Nat. Genet. 25: 462 466 (2000).

Waragai M, Lammers CH, Takeuchi S, Imafuku I, Udagawa Y, Kanazawa I, Kawabata M, Mouradian MM, Okazawa H. *PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival.* Hum. Mol. Genet. 8: 977–987 (1999).

Willems P et al. *Localization of a gene responsible for nonspecific mental retardation (MRX9) to the pericentromeric region of the X chromosome*. Genomics 18: 290-294 (1993).

Winnepenninckx B, Errijgers V, Reyniers E, Deyn P, Abidi FE, Schwartz CE, Kooy RF. *Family MRX9 revisited: further evidence for locus heterogeneity in MRX*. Am. J. Med. Genet. 112: 17-22 (2002).

Yang AS, Estécio MRH, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa J-PJ. *A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements.* Nucleic Acids Res. Feb 18; 32: e38 (2004).

Yeargin-Allsopp M. *Pre- and perinatal conditions contributing to mental retardation*. Curr. Op. Psych. 10: 354-359 (1997).

7 Anhang

7.1 Auflistung analysierter Gene auf Xp

PPP1R2P9	HDAC6	RIBC1
EFHC2	PCSK1N	HSD17B10
FUNDC1	TIMM17B	HUWE1
DUSP21	PQBP1	PHF8
UTX	SLC35A2	FAM120C
LOC392453	PIM2	WNK3
CXorf36	OTUD5	TSR2
ZNF673	KCND1	FGD1
PHF16	GRIPAP1	GNL3L
RGN	TFE3	LOC392473
NDUFB11	CCDC120	ITIH5L
RBM10	PRAF2	MAGED2
UBE1	WDR45	TRO
INE1	GPKOW	PFKFB1
PP3895	MAGIX	APEX2
PCTK1	PLP2	ALAS2
USP11	LMO6	GAGEE2
ZNF157	SYP	FAM104B
ZNF41	CCDC22	USP51
ARAF	FOXP3	FOXR2
SYN1	PPP1R3F	RAGB
TIMP1	PAGE4	KLF8
CFP	CLCN5	UBQLN2
ELK1	AKAP4	DKFZp686L07201
UXT	CCNB3	SPIN2A
ZNF81	DGKK	FAAH2
ZN182	SHROOM4	ZXDB
SPACA5B	BMP15	ZXDA
ZNF630	NUDT10	LOC139886
SSX1	LOC340602	ARHGEF9
SLC38A5	NUDT11	FAM123B
FTSJ1	GSPT2	ASB12
PORCN	FLJ39060	MTMR8
EBP	LOC286512	KIAA1166
TBC1D25	SPANXN5	LOC389863
FLJ26048	TMEM29	ZC3H12B
RBM3	GPR173	LAS1L
WDR13	TSPYL2	FKSG43
SUV39H1	JARID1C	LOC442456
LOC392465	IQSEC2	MSN
GATA1	SMC1A	VSIG4

7.2 Verwendete Oligonukleotide (angegeben in 5´-3´-Richtung)

a) Primer der Standard-PCR für das Gen *UBE1*

Primer	vorwärts	rückwärts
Genomic exon 1a	CCTGTTTTCGTTGTTACTGCC	AGATAAAGGGCCTATGGACC
Genomic exon 1b	CATCTGTGGTACATCCCAG	CCGCCTTGACTTTAGTAACC
Genomic exons 2-5	AACGGTACCCATGTGCTCC	AAAACCTGACATTCAGGCCG
Genomic exons 6-8	TTTGTGAAAGAGGCTGACCC	GATGTGTCTTCCCAACTCTG
Genomic exons 9-12	GAATGGGTAGACTGACAGC	CCCAGAAATGTCCCCAATG
Genomic exons 12-14	TTGCTCTCTGTCTGTGTCAG	GGAAAGTGAGACGACAAAGC
Genomic exons 15-16	TAAGTGAGCTTTGTTCCCC	CAGATGCCTGGCCTCTTTC
Genomic exons 17-18	AATAATGCCTGCGGAAACCC	TTCAGGGAAACACATTCTGCC
Genomic exons 19-20	TGAAGATTGTCAGAGAGGCC	AAGGTGTGGGTAAACCTCAG
Genomic exons 21-23	TTAGCCTGGGATCTAAAGGG	ATCAGAACCAGATCTACACAG
Genomic exons 24-26	GACTAAACACGTCTGCATGG	CTGAGTTATCATCTGAACCAG
cDNA 1a	TTCGGCTCCTTGAGGAGTTG	ACTAAGGAAGTCCTCAACGAG
cDNA 1b	AGCTCATCTTTGGCAGGAAG	ACTAAGGAAGTCCTCAACGAG
cDNA 2	AAAAACCGGGCCGAGGTATC	GTACTTTGACCTGACTGACG
cDNA 3	CCATGGAGATCAAAGTCCTG	TGCCCGTCATAACGGTTCTG
cDNA 4	ATACTTTGATGCCCTTGAGTG	ATCACCACCTGCACATTGCC
cDNA 5	AATGCCCTGGACAACGTGG	TGTTGACATCAAAGGTGAGCG
cDNA 6	TGCTGCACAACTTCCCTCC	AGACACACAAGGCCAACCAC
cDNA 7	AGCAAGCTGATTGCAGGGAAG	TGCCAGAAGCCAAATGGGAAC

b) Primer/Sonden für die RealTime-PCR für die Gene *HADH2* und *UBE1*

HADH2, komplettes Transkript:

Primer, vorwärts: GCCTTCGAGGGTCAGGTTG

Primer, rückwärts: GGGAGGCTGGTCAGCAGT

Sonde (TAMRA): FAM-CCAAACAGACCTGGGGCAATGGTCA-TMR

HADH2, Variante ohne Exon 5:

Primer, vorwärts: CCTTCGAGGGTCAGGTCTGTT

Primer, rückwärts: GTGAGCATACTCAGCAGGGTCAC

Sonde (TAMRA): FAM-TGACCAGCCTCCCAGAGAAAGTGTGC-TMR

HADH2, Variante Exon 5-27bp:

Primer, vorwärts: GGTCATCATCAACACTGCCAGTGTG

Primer, rückwärts: CCAAACAGACCTATGGGAGCCAGAT

Sonde (TAMRA): FAM-CCCCTTGGAAGCAGAGTATGCAGCTTGTC-TMR

UBE1, detektiert in Exon 5: Applied Biosystems, Hs00243277_m1

UBE1, detektiert spezifisch in Exon 15:

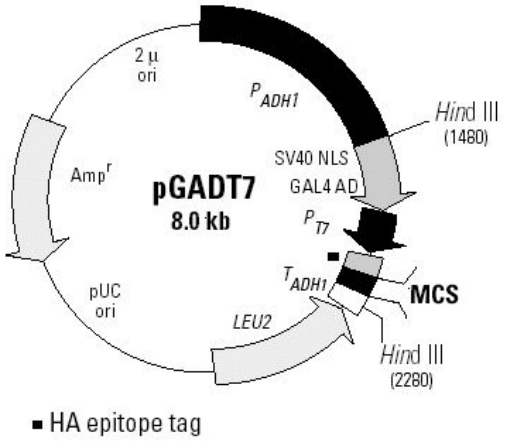
Primer, vorwärts: CCCTGGGATGTCACGAAGTT

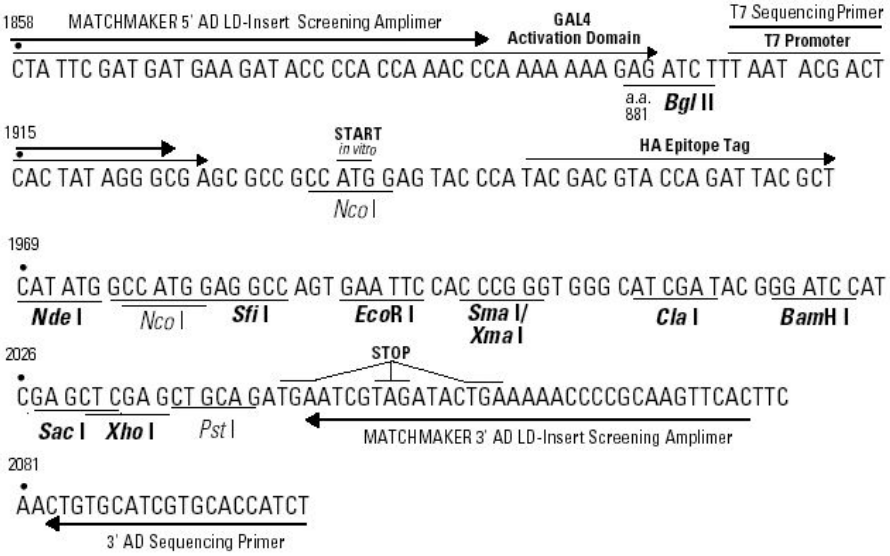
Primer, rückwärts: ATGCGGGCATCCACGTT

Sonde (TAMRA): FAM-TCCGGGTGACAAGCCACCAGA-TMR

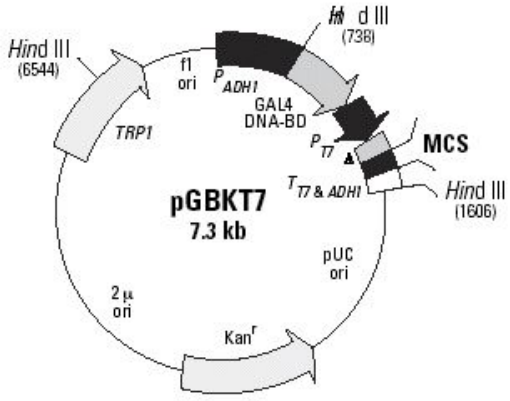
7.3 Aufbau der Vektoren pGADT7, pGBKT7 und pTarget

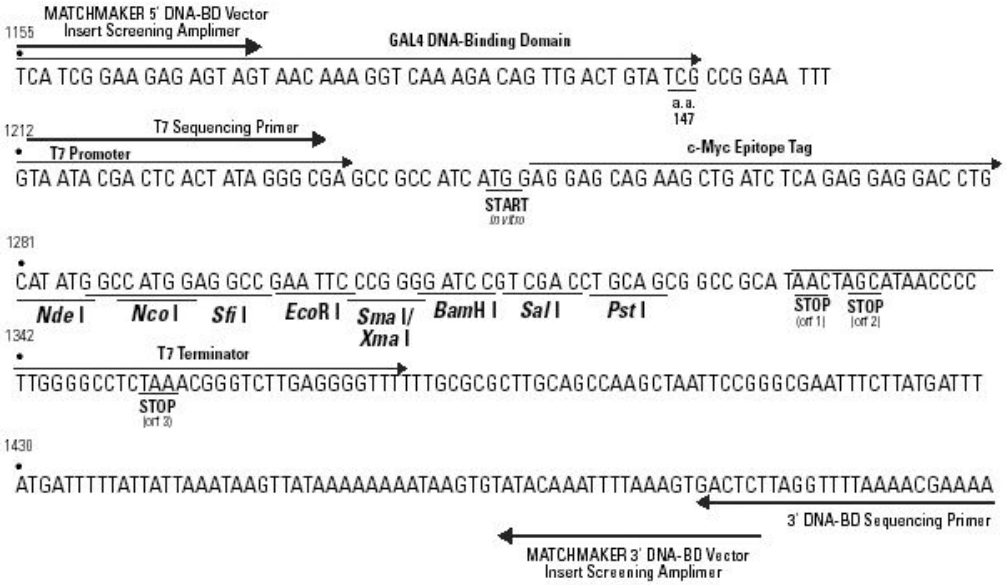
a) Der Vektor pGADT7 *(by Clontech)*:



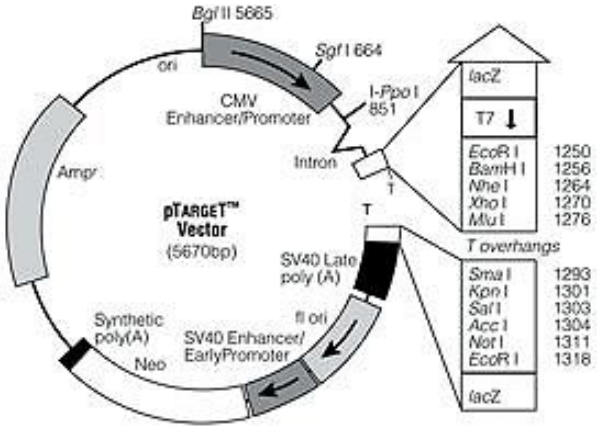


b) Der Vektor pGBKT7 *(by Clontech)*:



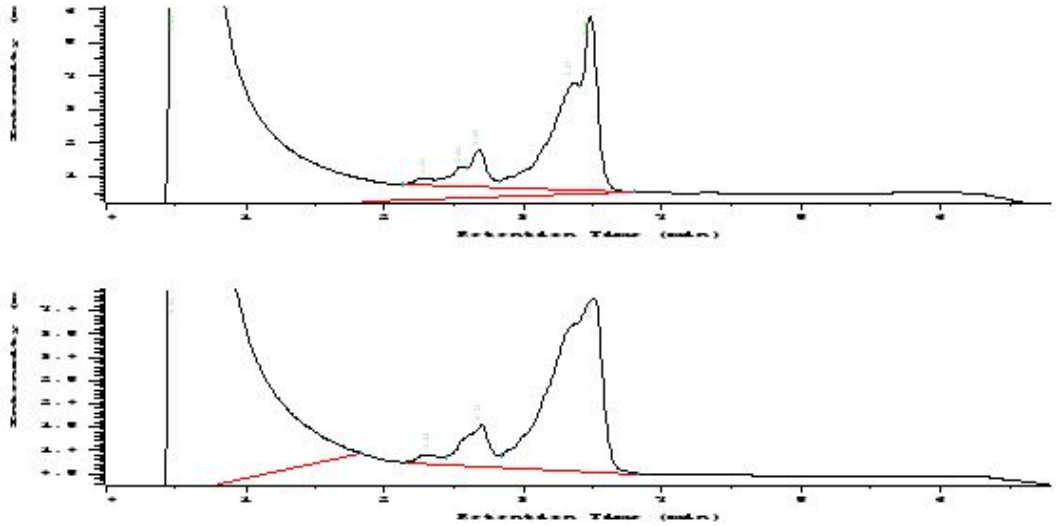


c) Der Expressionsvektor pTarget *(by Promega)*



7.4 Chromatogramme der DHPLC-Analysen zu dem Gen *UBE1*

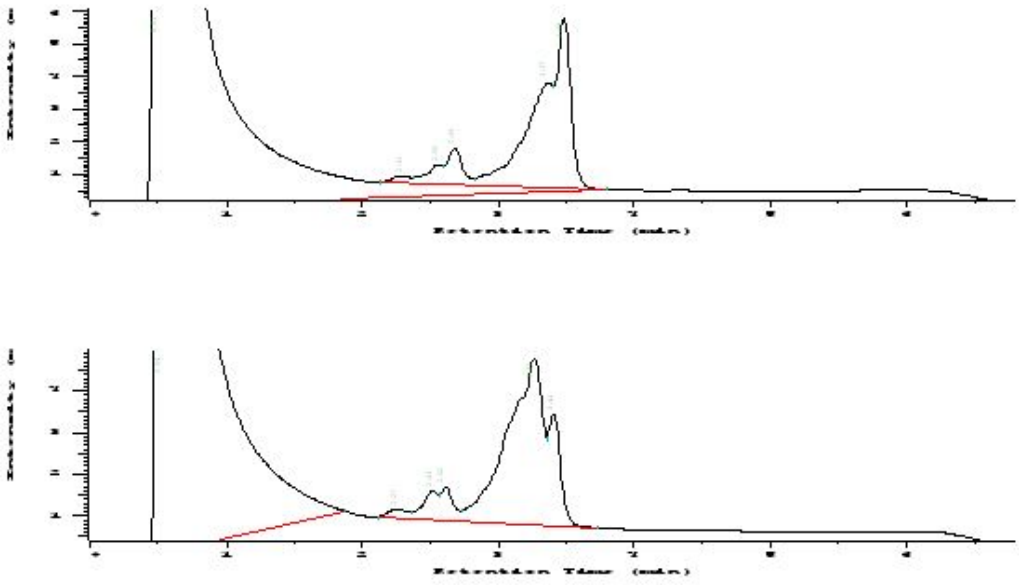
a) Die Mutation c.1731C>T in Exon 15 von *UBE1* in Familie #15



Oben: Chromatogramm des Wildtyp-PCR-Produkts von Exon 15

Unten: Chromatogramm des PCR-Produkts mit der Mutation c.1731C>T in Exon 15

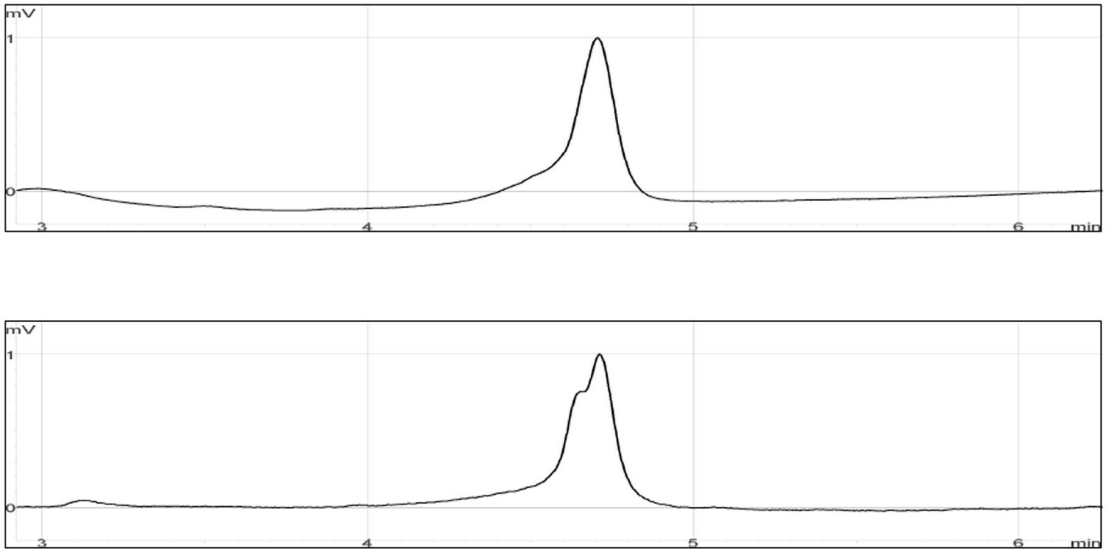
b) Die Mutation c.1617G>T in Exon 15 von *UBE1* in Familie #5



Oben: Chromatogramm des Wildtyp-PCR-Produkts von Exon 15

Unten: Chromatogramm des PCR-Produkts mit der Mutation c.1617G>T in Exon 15

c) Die Mutation c.1639A>G in Exon 15 von *UBE1* in Familie #7



Oben: Chromatogramm des Wildtyp-PCR-Produkts von Exon 15

Unten: Chromatogramm des PCR-Produkts mit der Mutation c.1639A>G in Exon 15

7.5 Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
°C	Grad Celsius
ca.	circa, ungefähr
cDNA	komplementäre *(complemtary)* DNA
cm	Zentimeter
DNA	*deoxyribonucleic acid*
dNTP	2´-Desoxyribonukleosid-5´-triphosphat
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure *(-acid)*
EST	*expressed sequence tag*
Ex.	Exon
h	Stunde *(hour)*
H_2O	Wasser, deionisiertes und destilliertes (bidest)
kb	Kilobasen(paare)
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
µg	Mikrogramm

min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mmol	Millimol
mRNA	*messenger ribonucleic acid*
NaAc	Natriumacetat
NCBI	*National Center for biotechnology information*
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
o.ä.	oder Ähnliche(s)
p	kurzer Arm des Chromosoms *(petit)*
PBS	*phosphate-buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
q	langer Arm des Chromosoms
RNA	*ribonucleic acid*
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunden
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
SSCP	*single-strand conformation polymorphism*
t	Tag(e)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter Anderem
U/min	Umdrehung pro Minute
Vol.	Volumen
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

8 Persönliches

8.1 Lebenslauf

Claus Lenski
*20.11.72 in München
wohnhaft in: Angerfeldstr. 8e in 82205 Gilching/Geisenbrunn
Familienstand: ledig

Herbst 1979: Grundschule an der Grandlstrasse in München-Obermenzing
Herbst 1983: Elsa-Brändström-Gymnasium (neusprachlich) in München
Herbst 1985: Wechsel zum Karlsgymnasium (humanistisch) in München
Frühjahr 1992: Abitur (Fächer: Altgriechisch, Latein, Erdkunde, Biologie)

Herbst 1992: Beginn des Maschinenbau-Studiums an der TU-München, dabei Tätigkeiten als Werkstudent in den Bereichen Messtechnik, Metallverarbeitung und Montage beim TÜV Süddeutschland und Dornier
Frühjahr 1996: Ende des Maschinenbau-Studiums

Herbst 1996: Zivildienst an der Poliklinik der LMU, Abteilung Medizinische Genetik: Grundausbildung in molekularbiologischen Analysen und humangenetischer Diagnostik

Herbst 1997: Studium der Biologie an der LMU-München, Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik
März - Dezember 2002: Diplomarbeit in der Abteilung Medizinische Genetik der LMU unter der Betreuung von Prof. J. Murken und Prof. A. Meindl (Erstgutachten: Prof. T. Cremer) mit dem Thema: "Evaluierung von Kandidatengenen für X-chromosomal vererbte Formen syndromischer und nicht-syndromischer mentaler Retardierung"
März 2003: Ablegung der Diplomhauptprüfung (Dipl. Biologe Univ.)

Juli 2003 – März 2008: Promotionsarbeit unter Prof. A. Meindl zu dem Thema: "Identifizierung und funktionelle Analyse X-chromosomaler neuronaler Erkrankungsgene"

8.2 Publikationen

Juliane Ramser, Mary Ellen Ahearn, Claus Lenski, Kemal O. Yariz, Heide Hellebrand, Michael von Rhein, Rita K. Schmutzler, Peter Lichtner, Eric P. Hoffman, Alfons Meindl, and Lisa Baumbach-Reardon.
Rare Missense and Synonymous Variants in UBE1, Playing a Key Role in the Ubiquitin-Proteasome System, are Associated with X-linked Infantile Spinal Muscular Atrophy. Am J Hum Genet. Jan, 2008.

Lenski C, Kooy RF, Reyniers E, Loessner D, Wanders RJ, Winnepenninckx B, Hellebrand H, Engert S, Schwartz CE, Meindl A, Ramser J.
The reduced expression of the HADH2 protein causes X-linked mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior.
Am J Hum Genet. 2007 Feb;80(2):372-7. Epub 2006 Dec 28.

Ramser J, Abidi FE, Burckle CA, Lenski C, Toriello H, Wen G, Lubs HA, Engert S, Stevenson RE, Meindl A, Schwartz CE, Nguyen G.
A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor.
Hum Mol Genet. 2005 Apr 15;14(8):1019-27. Epub 2005 Mar 3.

Ramser J, Winnepenninckx B, Lenski C, Errijgers V, Platzer M, Schwartz CE, Meindl A, Kooy RF.
A splice site mutation in the methyltransferase gene FTSJ1 in Xp11.23 is associated with non-syndromic mental retardation in a large Belgian family (MRX9).
J Med Genet. 2004 Sep;41(9):679-83.

Lenski C, Abidi F, Meindl A, Gibson A, Platzer M, Frank Kooy R, Lubs HA, Stevenson RE, Ramser J, Schwartz CE.
Novel truncating mutations in the polyglutamine tract binding protein 1 gene (PQBP1) cause Renpenning syndrome and X-linked mental retardation in another family with microcephaly.
Am J Hum Genet. 2004 Apr;74(4):777-80.

Holinski-Feder E, Chahrockh-Zadeh S, Rittinger O, Jedele KB, Gasteiger M, Lenski C, Murken J, Golla A.

Nonsyndromic X-linked mental retardation: mapping of MRX58 to the pericentromeric region.

Am J Med Genet. 1999 Sep 10;86(2):102-6.

8.3 Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Alfons Meindl danken:
Die konsequente Weiterführung des zur Diplomarbeit begonnenen sehr interessanten Themas, die sehr gute Betreuung und Unterstützung, die Anregungen und die Geduld während der gesamten Arbeit sowie die Durchsicht des Manuskripts haben nicht nur mein Interesse für das Gebiet der Humangenetik verstärkt, sondern auch die Freude an der Forschung generell sichergestellt.

Besonders dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer für die Betreuung und Vertretung dieser Arbeit an der Biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Frau Prof. Dr. Kiechle danke ich sehr dafür, daß ich meine Dissertation an der Abteilung Tumorgenetik der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar durchführen durfte.

Der FAZIT-Stiftung in Frankfurt bin ich überaus dankbar für Ihre wertvolle Unterstützung, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Frau Dr. Juliane Ramser möchte ich ebenfalls für die sehr geduldige Betreuung und Unterstützung danken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern Tina Petermann, Stefanie Engert, Juliane Volkmann, Marco König, Marko Bertone möchte ich für die Unterstützung und das Arbeitsklima in einem Labor danken, in dem man sich sehr wohl fühlt.

Mein "Extra"-Dank gilt Frau Heide Hellebrand, die mir immer verständnisvoll und mit dem rechten Rat im Laborleben zur Seite gestanden ist.

Ein ganz lieber Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Daniela Scheibler, die mir in allen Lebenslagen den nötigen Rückhalt gegeben und mich so bei dieser Arbeit unterstützt haben.

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Claus Lenski, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Mittel und Quellen erstellt zu haben.

Sämtliche Experimente (DNA-/RNA-Präparation, Zellkultur, PCR, RealTime-PCR, Klonierung, *in vitro*-Expression, Bisulfit-Behandlung der DNA, *Blotting*) wurden selbstständig durchgeführt. Bei der Aufstellung der Genkataloge und der Sequenzierung der über 120 Gene, der DHPLC-Analyse, des MaldiTofs-Experiments sowie des begonnenen *Yeast-two-hybrid*-Versuchs war ich auf die Unterstützung von Kollegen der Abteilung der Tumorgenetik des Klinikums r. d. Isar der TU-München und des Helmholtz Zentrums in München-Neuherberg angewiesen.

Desweiteren versichere ich, die vorliegende Arbeit zum ersten Mal und an keiner anderen Hochschule eingereicht zu haben,

03.07.2008, Gilching/Geisenbrunn

Claus Lenski

Digital unterschrieben von Claus Lenski
DN: cn=Claus Lenski, o, ou, email=claus.lenski@genion.de, c=DE
Datum: 2009.02.25 18:18:54 +01'00'

Claus Lenski