

**Aus dem Institut für Humangenetik  
Abteilung für Medizinische Genetik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. O. Rieß**

**“FXTAS – Fragile-X-Tremor/Ataxia Syndrom:  
Signifikanz und Prävalenz in einem großen Patientenkollektiv  
mit zerebellärer Ataxie“**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Jens Florian Schittenhelm  
aus Stuttgart**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C. Claussen

1. Berichtserstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichtserstatter: Professor Dr. T. Gasser

# **Widmung**

Meiner Familie

## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas und den beispielhaften Arbeitsbedingungen danke ich Herrn Prof. Dr. O. Rieß und Dr. P. Bauer.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Molekulargenetiklabors für die hervorragende technische Unterstützung und die überaus angenehme Zusammenarbeit.

Und natürlich danke ich Andrea für ihre moralische Unterstützung bei unerwartet aufgetretenen Schwierigkeiten.

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Einleitung .....   | 3  |
| Historie .....   | 5  |
| Epidemiologie.....   | 7  |
| Ätiologie und Symptome.....  | 11 |
| FRAXA.....   | 11 |
| Prämutationsträger.....  | 12 |
| POF.....   | 13 |
| FXTAS .....  | 13 |
| Pathogenese / Pathophysiologie .....   | 15 |
| Aufbau des <i>FMR1</i> Gens .....  | 15 |
| Abberanter Längenpolymorphismus als Hauptursache für Erkrankungen.....   | 16 |
| Unterteilung der Trinukleotidrepeats.....  | 17 |
| Morphologisches Korrelat bei Fragiles X Tremor/Ataxie Syndrom.....   | 20 |
| Das Fragile X Mental Retardation Protein .....   | 23 |
| Expression von FMRP .....  | 23 |
| Auswirkungen der CGG-Expansion auf die Transkription.....  | 24 |
| Bedeutung von FRMP .....   | 25 |
| Das toxic-gain-of-function Modell kann eine plausible Erklärung für<br>das Zustandekommen von FXTAS geben..... | 27 |
| Diagnostik.....  | 29 |
| Genetische Beratung.....   | 32 |
| Therapie.....  | 34 |
| Fragestellung .....  | 35 |
| Material und Methoden .....  | 36 |
| Das Patientenkollektiv .....   | 36 |
| Chemikalien.....   | 36 |
| Puffer und Lösungen .....  | 37 |
| Kits .....   | 38 |
| Geräte .....   | 39 |
| DNA .....  | 39 |
| Referenzsequenzen .....  | 40 |
| Primer .....   | 40 |
| PCR.....   | 41 |
| Gelelektrophorese.....   | 42 |
| Fragmentanalyse.....   | 42 |
| Genomischer Southern Blot .....  | 43 |
| Ergebnisse und Statistische Auswertung.....  | 47 |
| Probenzusammenstellung .....   | 47 |
| Optimierung der PCR-Bedingungen .....  | 47 |
| Optimierung der Kapillarlektrophorese.....   | 54 |
| Bestimmung der Abweichung und Ermittlung eines Korrekturfaktors.....   | 56 |
| Meßergebnisse der männlichen Proben.....   | 57 |
| Meßergebnisse der weiblichen Proben.....   | 61 |
| Klinische Daten der Studienteilnehmer.....   | 65 |
| Klinische Daten der Prämutationsträger.....  | 66 |

|   |    |
|---|----|
| Altersverteilung der zu untersuchenden Kollektive ..... | 67 |
| Diskussion .....  | 69 |
| Diskussion der PCR.....                                 | 69 |
| Diskussion der Southern-Blot-Analyse .....              | 71 |
| Diskussion der Ergebnisse.....                          | 72 |
| Die Prävalenz von FXTAS .....                           | 73 |
| Schlußfolgerungen.....                                  | 74 |
| Zusammenfassung .....                                   | 76 |

## Einleitung

Die Diagnostik genetisch bedingter Erkrankungen hat in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte gemacht und erlaubt die Aufdeckung von krankheitsverursachenden Veränderungen im menschlichen Erbgut. Dabei hat die Kenntnis der molekulargenetischen Krankheitsursachen vielfach zu einer veränderten Sicht auf Krankheitsbilder und zugrundeliegende pathogenetische Prozesse geliefert. Eine neue Klasse krankheitsverursachender Mutationen – die sogenannten Repeat-Expansions-Erkrankungen – spielen insbesondere in der Neurogenetik eine grosse Rolle. Die Expansion betrifft zumeist das Trinukleotid-Repeat CAG, welches für Glutamin kodiert, so dass diese Erkrankungsgruppe auch als Polyglutaminerkrankung bezeichnet wird. Die CAG-Motive in den entsprechenden Genen weisen auch in der gesunden Allgemeinbevölkerung einen Längenpolymorphismus der Allele auf und werden in der Regel stabil oder mit minimalen Änderungen der Länge respektive der Anzahl der Repeat-Einheiten vererbt. In betroffenen Patienten wird eine massive Vermehrung der Repeat-Elemente beobachtet, zum Teil auch mit leichten Veränderungen in der Basenabfolge der entsprechenden Genabschnitte. Dies geht meistens mit einer schwereren Ausprägung des Phänotyps und einem frühzeitigeren Erkrankungsbeginn einher. Durch CAG-Expansionen bedingte Polyglutaminerkrankungen werden als Typ-1-Trinukleotiderkrankung zusammengefasst. Dazu zählen die Chorea Huntington, die dentatorubrale-pallidoluysiane Atrophie (DRPLA), die spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy (SBMA) und die spinocerebellären Ataxien (SCA) 1,2,3,6, 7 und 17. Ihnen gemeinsam ist eine progressive neuronale Degeneration, die unter anderem auch durch den toxischen Effekt der Polyglutamin-induzierten Proteinaggregation hervorgerufen wird. Typ-2-Trinukleotiderkrankungen umfassen eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Tripletrepeatexpansionen wie CGG-, GCC-, CTG-, oder GAA-Repeats, die sich nicht im offenen Leseraster befinden und ihre Wirkung somit nicht als Bestandteil eines veränderten Genproduktes, sondern über eine veränderte Genregulation bzw. Stabilität der mRNA entfalten. Hierzu zählen die myotone Dystrophie Curschmann-Steinert (MD), die Friedreich'sche Ataxie (FA), die Spinocerebellären Ataxien 8 & 12, Fragiles X Typ E und das Fragile X Syndrom

(FRAXA).<sup>1,2</sup>

Die folgendende Tabelle gibt einen schematischen Überblick.

**Tabelle 1: Übersicht der Trinukleotiderkrankungen**

| <i>Erkrankung</i> | <i>Gen</i>   | <i>Locus</i> | <i>Protein</i>              | <i>Triplett</i> | <i>Normal</i> | <i>Expandiert</i> |
|-------------------|--------------|--------------|-----------------------------|-----------------|---------------|-------------------|
| SBMA              | <i>AR</i>    | Xq13-21      | Androgenrezeptor            | CAG             | 9-36          | 38-62             |
| Chorea H.         | <i>HD</i>    | 4p16.3       | Huntingtin                  | CAG             | 6-35          | 36-121            |
| DRPLA             | <i>DRPLA</i> | 12p13.31     | Atrophin-1                  | CAG             | 6-35          | 49-88             |
| SCA1              | <i>SCA1</i>  | 6p23         | Ataxin-1                    | CAG             | 6-44          | 39-82             |
| SCA2              | <i>SCA2</i>  | 12q24.1      | Ataxin-2                    | CAG             | 15-31         | 36-63             |
| SCA3              | <i>MJD1</i>  | 14q32.1      | Ataxin-3                    | CAG             | 12-40         | 55-84             |
| SCA6              | <i>SCA6</i>  | 19p13        | $\alpha_{1a}$ -Kalziumkanal | CAG             | '4-18         | 21-33             |
| SCA7              | <i>SCA7</i>  | 13p12-13     | Ataxin-7                    | CAG             | 4-35          | 37-306            |
| SCA8              | <i>SCA8</i>  | 13q21        | -                           | CTG             | 15-37         | 110-250?          |
| SCA12             | <i>SCA12</i> | 5q31-33      | PP2A-PR55 $\beta$           | CAG             | '7-28         | 66-78             |
| SCA17             |              |              |                             |                 |               |                   |
| FXS               | <i>FMR1</i>  | Xq27.3       | FMR-Protein 1               | CGG             | 6-53          | >230              |
| FXES              | <i>FMR2</i>  | Xq28         | FMR-Protein 2               | GCC             | 6-35          | >200              |
| FA                | <i>X25</i>   | 9q13-21.1    | Frataxin                    | GAA             | 7-34          | >100              |
| MD                | <i>DMPK</i>  | 19q13        | MD-Proteinkinase            | CTG             | 5-37          | >50               |

Das zu dieser Gruppe gehörende Fragile X Syndrom ist eine der häufigsten Formen erblicher geistiger Behinderung, welches als X-chromosomal gebundene Störung mit variabler Penetranz in den beiden Geschlechtern manifestiert. Die Krankheit erhielt ihren Namen aufgrund der Beobachtung, daß bei Betroffenen am langen Arm des X Chromosoms sich eine fragile Stelle (FRAXA) befindet, die in speziellen Gewebekulturen unter bestimmten Bedingungen *in vitro* mit Chromosomenfärbung sichtbar gemacht werden kann. Nahezu zeitgleich mit dem Androgen-Rezeptor bei SBMA wurde als molekulargenetische Ursache eine Tripletterweiterung im FMR1 Gen festgestellt.<sup>3</sup> Das FMR1-Gen liegt in der Region der zytogenetischen Brüchigkeit (Xq27.3). Durch die Identifikation der CGG-Repeat-Expansion als zugrundeliegende (häufigste) Mutation ist inzwischen eine zuverlässige molekulargenetische Diagnosesicherung auch in phänotypisch unauffälligen Konduktorinnen möglich.



Die Untersuchung von Familien mit einer CGG-Repeat-Expansion im FMR1-Gen führte vor einigen Jahren zu der Entdeckung von zwei weiteren Erkrankungen, die mit Tripletterweiterungen assoziiert sind. Dazu zählen das Syndrom der vorzeitigen Menopause (Premature Ovarian Failure, POF) bei Frauen und eine charakteristische neurodegenerative Störung bei Männern, die sich erst im Alter manifestiert. Letztere, unter dem Namen Fragiles X Tremor / Ataxie Syndrom (FXTAS) beschrieben, überlappt im klinischen Bild in einigen Bereichen mit der Spinozerebellären Ataxie, für die eine routinemässige Diagnostik in humangenetischen Laboratorien etabliert ist. Ziel dieser Dissertation ist die Ermittlung der Häufigkeit von Trinukleotidexpansionen des FMR1-Gens in einer großen Gruppe von Patienten mit SCA.

## Historie

Das Fragile X-Syndrom wurde 1943 erstmalig gemeinsam durch den englischen Neurologen James Purdon Martin (1893 - 1984) und der englischen Humangenetikerin Julia Bell (1879 – 1979) anhand einer Gruppe mit elf geistig zurückgebliebenen Männern beschrieben.<sup>4</sup> Schon hier wurde ein X-chromosomaler Erbgang angenommen und die Beobachtung gemacht, dass auch phänotypisch unauffällige Männer Anlagenträger sein können. Erst 1969 konnte dies durch den amerikanischen Genetiker Herbert Lubs (Miami Pediatric Medical Center) an einer Großfamilie mit vier Erkrankten (davon zwei Brüder) und gesunden Frauen verifiziert werden und eine Abgrenzung von anderen geistigen Behinderungen mit geschlechtsgebundenem Erbgang gezogen werden.<sup>5</sup> In seinen Zellkulturen beobachtete er in der Metaphase ein Zusammenziehen des längeren Armes (q-Arm) in 12-33% der X-Chromosomen mit einem kleinen azentrischen Fragment mit dem Aussehen eines Satellitenchromosoms und nannte es Marker-X Chromosom. Die Entdeckung geriet zunächst in Vergessenheit, bis 1977 diese brüchige Stelle erneut bei vier Familien mit geschlechtsgebunden vererbter geistiger Behinderung der 20 männlichen Individuen und deren weiblichen Anlagenträgerinnen nachgewiesen wurde.<sup>6</sup> Im gleichen Jahr fand Grant Sutherland (Women's and Children's Hospital, University of Adelaide) durch Zufall heraus, dass der entsprechende Nachweis nur in einem Folsäure-freien Kulturmedium

nachvollziehbar ist: Bei seinem Umzug von Melbourne nach Adelaide, wo ein anderes Kulturmedium eingesetzt wurde, welches bessere Chromosomenfärbungen ermöglichten sollte, konnten seine Ergebnisse zunächst nicht wiederholt werden, bis er wieder das ursprüngliche Kulturmedium einsetzte.<sup>7</sup> Damit wurde deutlich, dass der zytogenetische Nachweis äusserst unzuverlässig funktioniert und bei leichten Veränderungen des Kulturmediums falsch negative Befunde produziert. Der Einsatz von molekulargenetischen Kopplungsuntersuchungen mittels zwei flankierenden polymorphen Markern durch Sonden für *St14* und *F9* (Faktor IX) ab 1986 erlaubte eine verbesserte Beobachtung der Segregation innerhalb einzelner Familien und damit eine pränatale Diagnose mit einer Reliabilität zwischen 40-98%.<sup>8</sup>

Bei der Vererbung des Fragilen X-Syndroms war lange Zeit ungeklärt, warum der Modus nicht immer mit anderen X-chromosomal gebundenen Erbgängen übereinstimmte. Insbesondere wurden auch heterozygote Überträgerinnen festgestellt, die eigentlich symptomfrei bleiben sollten. Dieses Phänomen veranlasste 1985 Stephanie Sherman und ihre Mitarbeiter zu einer genaueren Untersuchung der Stammbäume. Dabei stellten sie fest, dass Töchter eines nicht betroffenen Überträgers ein höheres Risiko besaßen, erkrankte Nachkommen zu erhalten. Daraus schlussfolgerten sie, dass die Mutation in zwei Schritten erfolgen müsste, die im ersten Schritt noch symptomfrei bleibt und im zweiten nur bei der Übertragung von Frauen auf ihre Nachkommen erfolgt. Diese Beobachtungen sind in der Medizin seitdem als Sherman Paradoxon bekannt.

Das zugrundeliegende Gen FMR1 wurde 1991 von mehreren Forschern zum gleichen Zeitpunkt entdeckt und die Erkrankung in die Gruppe der Trinukleotiderkrankungen eingeordnet.<sup>9 10 11</sup>

Der Biochemiker Paul J. Hagerman (MIND Institute, University of California) beschrieb 2001 erstmalig ein Parkinson-ähnliche Symptomatik (Maskengesicht, Rigidität und Intentionstremor, kognitive Verluste bis zur ausgeprägten Demenz) in fünf Männern mit Prämutationen des FMR1-Gens im Bereich von 78 bis 98 Repeats.<sup>12</sup> Ein Jahr später wurde von einer radiologischen Arbeitsgruppe derselben Universität über entsprechende Auffälligkeiten in Kernspintomografien solcher Patienten berichtet.<sup>13</sup> In Neuronen und Gliazellen des Kortex, Hippocampus, Substantia nigra und Cerebellum

wurde post mortem intrazellulär eosinophile Einschlusskörperchen gefunden, die bei Fragilen X Patienten mit 200 Repeats oder mehr nicht mehr auftreten.<sup>14</sup>

Passend hierzu wurde von Maureen Leehey (University of Colorado) bei zwei nicht verwandten Männern mit essentiellen Tremor und Gangataxie Prämutationen (90 bzw. 160 Repeats) des FMR1-Gens nachgewiesen.<sup>15</sup> Beide hatten erhöhte FMR1 mRNA Spiegel und wiesen im CT eine generalisierte Hirnatrophie auf.

In einem gemeinsamen Artikel wurden 2003 die progressiv voranschreitenden und mit einer multisystemischen neurologischen Systematik einhergehenden Krankheitsbilder von Jaquemont et al. unter dem Begriff *Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS)*<sup>16</sup> zusammengefasst. Alle ihre 26 vorgestellten Patienten waren Träger einer Prämutation und wiesen zerebelläre Ataxie und/oder einen Intentionstremor auf. Im selben Jahr wurde in einer englischen Kohortenstudie von Patienten, die ursprünglich auf Spinozerebelläre Ataxie getestet wurden, in 3 von 59 Fällen eine FMR1 Prämutation festgestellt.<sup>17</sup>

Von Hagerman wurde 2004 erstmalig FXTAS auch in 5 Frauen beschrieben und in einem Fall post mortem die auch bei den Männern vorkommenden Einschlusskörperchen nachgewiesen.<sup>18</sup>

## **Epidemiologie**

Das Fragile X-Syndrom tritt mit einer Häufigkeit von 1:4000 bei Männern und 1:6000 bei Frauen auf und zählt daher zur zweithäufigsten angeborenen Ursache geistiger Behinderung nach dem Down-Syndrom.<sup>19</sup> Ältere Studien mit 1:1000 für Männer basieren noch auf zytogenetischen Testergebnisse, die nach molekulargenetischer Neuuntersuchung revidiert wurden. Zwischen allen großen ethnischen Gruppen sind keine wesentlichen Unterschiede auszumachen. Ebenso musste die auf zytogenetischen

Daten basierende Penetranz von 80% bei Männern und 35% bei Frauen später korrigiert werden.<sup>20</sup> Für Männer beträgt sie praktisch 100%. Neben der Mosaikbildung, die sich für 15% der Vollmutationen verantwortlich zeigt, ist bei Frauen die Lyonisation ein weiterer zentraler Faktor für die ausgeprägtere klinische Variabilität. Inter- und intrafamiliär kann die Häufung des Auftretens sehr unterschiedlich sein. So sind nur 18% der Brüder von Konduktoren (normal transmitting males, NTM) am fragilen X-Syndrom erkrankt, während 80% der Brüder von erkrankten FRAXA-Trägern ebenfalls betroffen waren. Töchter von NTMs erkranken hingegen nicht. Diese Beobachtungen, die sich nicht ohne weiteres mit dem klassischen X-chromosomalen Erbgang in Einklang bringen lassen, sind seitdem als Sherman-Paradoxon bekannt geworden.

Eine weitere klinische Auffälligkeit ist die in 16-24% der weiblichen Prämutationsträger auftretende vorzeitige Menopause mit vorzeitigem Verlust der Ovarialfollikel, die in der Vollmutation nicht auftritt und in der angelsächsischen Literatur als Premature Ovarian Failure (POF) bezeichnet wird.<sup>21</sup> Das Durchschnittsalter der Menopause aller Prämutationsträgerinnen betrug zusammen 47,8 Jahre im Vergleich zu 53 Jahren der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse konnten in einer internationalen multizentrischen Studie mit 395 Trägerinnen bestätigt werden.<sup>22</sup>

Für FXTAS existieren keinerlei Studien auf der Basis von größeren Zahlen, sodass die Prävalenz von FXTAS in der Allgemeinbevölkerung noch nicht richtig beurteilt werden kann. Neue Schätzungen gehen davon aus, dass ein Drittel der Männer über 50 Jahre mit einer Prämutation, die durch Familienanamnese von Patienten mit Fragilem X Syndrom entdeckt werden können, neurologische Symptome im Rahmen von FXTAS entwickeln werden.<sup>23</sup> Die Wahrscheinlichkeit hierfür nimmt mit dem Alter zu (17% für 50-59 Jahre, 38% für 60-69 Jahre, 47% 70-79 Jahre und 75% über 80 Jahre).<sup>24</sup> Auf der Basis eines 95% Konfidenzintervalls für die Überträgerhäufigkeit von 1:813 für Männer in der Allgemeinbevölkerung berechnet sich daraus eine Prävalenz von ~ 1:3000 für Männer über 50 Jahre und ~1:10.000 für alle Altersgruppen. Diese Zahl entspricht der kombinierten Prävalenz aller Formen von late-onset Ataxia von ~1:2000 (National Ataxia Foundation) und ist deutlich geringer als die Prävalenz für essentiellen Tremor von 1%-5% in älteren Personen.<sup>25</sup> Eine mögliche Korrelation der FXTAS-Penetranz mit der Anzahl der CGG-Repeats ist derzeit Ziel einer laufenden Studie.

Andere Studien geben die Prävalenzen bei einer Prämutation (54 Repeats oder mehr) zwischen 1:923 und 1:113 an, mit höchsten Werten in Israel und niedrigsten Werten in Taiwan, wobei in allen Studien die Frauen signifikant höhere Prävalenzen aufwiesen.<sup>26</sup> Dies ist im Einklang mit der Hypothese einer meiotischen CGG-Expansion in maternal vererbten X-Chromosomen, bei denen die Relation weiblicher zu männlicher Prämutationsträger mit  $\sim 2,6$  angegeben wird.<sup>27</sup>

**Tabelle 2: Übersicht über die Prävalenz von Prämutationen in unterschiedlichen Studien.**

| <i>Studie</i>                          | <i>Land</i> | <i>Teilnehmer</i> | <i>Prävalenz</i>  |
|--|-------------|-------------------|---|
| Ryynänen (1999) <sup>28</sup>          | Finnland    | 1477              | 1:246 (für >60 Repeats)                                 |
| Toledano-Alhadeff (2001) <sup>29</sup> | Israel      | 14334             | 1:113 fertile Frauen                                    |
| Pesso (2000) <sup>30</sup>             | Israel      | 9459              | 1:152 schwangere Frauen                                 |
| Rousseau (1995) <sup>31</sup>          | Kanada      | 10624             | 1:259 unselektierte Frauen                              |
| Huang (2003) <sup>32</sup>             | Taiwan      | 1002              | Kein Treffer bei Schwangeren                            |
| Spence (1996) <sup>33</sup>            | USA         | 474               | 1:158 fertile Frauen                                    |
| Brown (1996) <sup>34</sup>             | USA         | 344               | 1:86 schwangere Frauen mit auffälliger Familienanamnese |
| Dombrowski (2002) <sup>35</sup>        | Kanada      | 10572             | 1:813 unselektierte Männer                              |
| Murray (1996) <sup>36</sup>            | England     | 1013              | 1:1013 selektierte Jungen                               |
| Crawford (1999) <sup>37</sup>          | USA         | 872               | 1:436 für Frauen  |
| Crawford (1999)                        | USA         | 1979              | 1:923 für Männer  |

Generelles Problem der meisten bisherigen Studien ist die Rekrutierung der Patienten mit Prämutation über Familien mit bekanntem fragilem X Syndrom oder bei Kindern aus Sonderschulen. Es ist somit eine Überrepräsentierung von Allelen mit höheren CGG-Repeatanzahlen anzunehmen, da deren Übergang zu einer Vollmutation bei der Übertragung durch die Tochter wahrscheinlicher ist. Diese Neigung (Bias) kann zu

einer überhöhten Angabe der FXTAS-Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung führen, insbesondere da die Penetranz der neurologischen Auffälligkeiten mit der Repeatanzahl und dem Alter zunehmen kann. Auf der anderen Seite sind die neurologischen Auffälligkeiten vieler über die Familienanamnese rekrutierten Patienten so subtil, dass sie bei einer klinischen Untersuchung nicht in die neurologischen Auffälligkeiten von Tremor und / oder Ataxie klassifiziert worden wären. Das derzeit kleinste Allel, welches mit den neuropathologischen Veränderungen FXTAS assoziiert ist, besitzt 70 CGG-Repeats.

In einer englischen Screening-Untersuchung von 59 Männern, die unter anderen neurologischen Auffälligkeiten auch mit Ataxie an einem Test auf SCA teilnahmen, wurden 3 Träger (5%) einer Prämutation oder eines Grauzonenallels identifiziert (87, 66 und 51 CGG-Repeats). Dieses Ergebnis ist hochsignifikant für eine Assoziation zwischen Überträgerstatus und Ataxie. Allerdings wurde bei einem der drei Patienten (mit 66 Repeats) der Beginn der Ataxie bereits in der Kindheit angegeben. Die neurologische Störung bei diesem Patienten ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit eines anderen Ursprunges und der Nachweis eines Prämutations-Allels ein Zufallsbefund. [MacPherson 2003] Eine zweite Studie aus Italien mit 28 männlichen Patienten über 50 Jahre mit sporadischer Ataxie, die ebenfalls auf SCA getestet wurden, berichtete über 2 Träger (7%) einer Prämutation mit 84 und 86 CGG-Repeats.<sup>38</sup> In derselben Studie wurden 114 ältere Männer mit essentiellen Tremor auf FMR1-Prämutationen untersucht, allerdings ohne auffällige Befunde. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend in Anbetracht der hohen Prävalenz von essentiellen Tremor in der Allgemeinbevölkerung.

Ein weiteres Problem stellen die initialen Fehldiagnosen dar, deren Klassifizierung bei der Auswahl von Patienten mit Ataxie nicht berücksichtigt wird. So wurden in einer Studie bei vier männlichen Prämutationsträgern die Diagnose Parkinson gestellt (bei einem fünften war diese gesichert), weitere Diagnosen waren unter anderem Alzheimer, Motoneuronenerkrankungen, transiente ischämische Attacken (TIA).<sup>39</sup> Eine andere Studie berichtet über die Diagnosen „atypischer Parkinson“ und „essentieller Tremor“

bei insgesamt 4 der 7 männlichen Überträger [Berry-Kravis et al. 2003].

## Ätiologie und Symptome

Die Mutationen des FMR1 Gens sind in ihrer unterschiedlichen Ausprägung an drei verschiedenen Krankheitsbildern beteiligt, die hier kurz vorgestellt werden sollen. Zu diesen werden das Fragiles X Syndrom (FRAXA), das Premature Ovarian Failure (POF) und das Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) gezählt.

### FRAXA

Klinische Leitsymptome sind die Trias aus geistiger Retardierung unterschiedlichen Ausmasses mit Verhaltensauffälligkeiten, leichter faszialer, jedoch nicht obligater Dysmorphie (insbesondere schmales Gesicht, Prognathie, abstehende Ohren) und Makroorchidismus, der schon vor der Pubertät bestehen kann<sup>40</sup>. Auch eine Beteiligung des Bindegewebes wird beschrieben und kann sich in Hyperextensibilität der Gelenke, samtigweiche Haut, Plattfüsse, Mitralklappenprolaps und Hypotonie äussern.<sup>41</sup> In diesen Zusammenhang wird eine hypothalamischen Dysfunktion mit pulsatiler GnRH-Sekretion und erhöhten Östrogenspiegeln beobachtet.<sup>42</sup>

Die Ausprägung der Intelligenzminderung kann sich bei Männern über das gesamte Spektrum von durch Aufmerksamkeitsstörungen bedingte Lernbehinderungen mit normalen Intelligenzquotienten bis zu schwerstgradiger geistiger Retardierung erstrecken.<sup>43</sup> Mit voranschreitendem Alter kann der IQ-Wert weiter abnehmen.<sup>44</sup> Schwerpunkte der Beeinträchtigung sind Rechenschwäche, räumliche Wahrnehmung und verbale Abstraktion, visuell-motorische Koordination, sowie Sprechstörungen mit oraler Dyspraxie.<sup>45</sup> Andere Patienten wiederum weisen emotionale Bindungsprobleme auf und haben zum Teil autistische Verhaltensmuster wie Stereotypen.<sup>46 47</sup> In 10-20% der Kinder mit FRAXA werden epileptische Anfälle beobachtet, davon sind über 80% fokal beschränkt.<sup>48</sup> Weibliche Patienten mit fragilem X Syndrom haben meist eine geringere Ausprägung der Intelligenzstörungen, weshalb die unterschiedliche

Inaktivierung des von der Mutation betroffenen X Chromosoms in somatischen weiblichen Nervenzellen als Hauptursache der klinischen Variabilität anzusehen ist.

Ein mögliches morphologisches Korrelat findet sich in Kernspin-Aufnahmen subkortikaler Strukturen (magnozelluläre M-Neurone) und des beteiligten Thalamus für visuell-motorische Funktionen, welche eine deutliche Volumenminderung in Kindern und jungen Erwachsenen mit Fragilem X Syndrom zeigen.<sup>49</sup> In Tierversuchen mit Mäusen mit einem *Fmr1* knockout (das Equivalent zum humanen *FMRI*) wurden dysfunktionale Synapsen mit abnormaler Länge und Form der Dendriten nachgewiesen.<sup>50</sup> Auch bei Autopsien von Gehirnen bei drei Patienten mit fragilem X Syndrom wurde eine erhöhte Dichte an unreifen Schicht III-Pyramidenzellen des parieto-okkzipitalen und visuellen Kortex gefunden. Diese weisen lange, dünne und stark gewundene postsynaptische Fortsätze auf.<sup>51</sup> Immunhistochemische Untersuchungen des Corpus Geniculatum Laterale zeigten, dass die typische sechsschichtige Struktur in Patienten mit dem fragilen X Syndrom durch eine homogene Schicht kleiner Neurone ähnlich denen von Mäusen mit visueller Deprivation, ersetzt ist [Kogan et al 2004]. Weitere Befunde waren eine Volumenreduktion des posterioren Kleinhirnwurms und vergrößerte vierte Ventrikel.<sup>52</sup>

### **Prämutationsträger**

Individuen mit Prämutation (CGG Repeats zwischen 55-200) zeigen in der Regel keinen Phänotyp. Die kognitiven Fähigkeiten weiblicher Trägerinnen einer Prämutation entsprechen denen anderer Müttern, die ebenfalls ein behindertes Kind grossziehen.<sup>53</sup> Bei einer kleinen Gruppe von weiblichen Trägerinnen einer Prämutation wurden jedoch über psychopathologische Verhaltensauffälligkeiten und leichte Lernschwächen berichtet, die einer milden Form des Fragilen X Syndromes entsprechen.<sup>54</sup> Es wird angenommen, dass die erhöhten CGG-Repeat-Zahlen die Suszeptibilität für psychologische Probleme und emotionale Labilität (soziale Phobien, Depressionen oder Ängstlichkeit) für Frauen mit Prämutationen im oberen Bereich erhöhen.<sup>55</sup> Auch bei einigen erwachsenen Männern mit Prämutation wurde über kognitive Defizite, depressive Episoden und Verhaltensauffälligkeiten wie Impulsivität,



Mißbrauchsverhalten und Alkoholismus berichtet, die auch in den unteren Prämutationsbereichen auftreten können.<sup>56 57</sup> Ursache hierfür dürften unter anderem die im oberen Bereich der Prämutationen beobachteten leicht erniedrigten FRMP-Spiegel sein, bei denen eine positive Korrelation mit dem fallenden FMRP-Spiegel und dem Auftreten von auffälligen Bindegewebsveränderungen und reduziertem Intelligenzquotienten festgestellt werden konnte.<sup>58</sup> In Einzelfällen wurde über prominente Ohrmuschelformen und flexiblere Fingergelenke berichtet – diskrete phänotypische Auffälligkeiten die der Vollmutation zugerechnet werden.<sup>59</sup> Generell weichen bei Prämutationsträger erhobene antropometrische Daten, Statur, Hodenvolumen und kognitive Leistungen von ihren als Kontrollpersonen ausgewählten Geschwistern signifikant ab.<sup>60 61 62</sup> Von den Autoren wird deswegen empfohlen, per Definition nicht von „normalen“ Überträgern sondern von „low expressing Carrier“ zu sprechen.

### **POF**

Prämutationsträgerinnen mit Premature Ovarian Failure (POF) weisen im Vergleich zu POF-negativen Trägerinnen einer Prämutation einen erhöhten FSH-Spiegel sowie erniedrigten Östrogenspiegel auf. Weitere Erkrankungsrisiken sind nicht bekannt.<sup>63</sup> Als mögliche Erklärung für die vorzeitige Menopause könnten eine initiale Abnahme des Oozyten-Pools, eine gehäufte Follikelatresie, veränderte Rekrutierungsverhalten des dominanten Follikels, eine gestörte Follikelreifung durch veränderte *FMRI* Proteinspiegel in Betracht gezogen werden. Andere genetische Ursachen für eine vorzeitige Menopause sind chromosomale Defekte, Mutationen und Bruchstellen in POF-1 und POF-2 Regionen, sowie Polymorphismen in den FSH- und Östrogen-Rezeptoren. Zusammen sind sie für 1/3 – 1/2 aller vorzeitigen Menopausen verantwortlich. Die Prävalenz einer *FMRI* Prämutation innerhalb dieser Gruppe beträgt zwischen 3 und 4,8%<sup>64</sup>

### **FXTAS**

In etwa 30% der älteren Männern mit einer Prämutation, häufig die Großväter von Kindern mit Fragilem X Syndrom, wurde über eine langsam fortschreitende neurodegenerative Entwicklung einhergehend mit Intentionstremor, Gangataxien mit

Fallneigung und Gleichgewichtsstörungen berichtet.<sup>65</sup> Diagnostische Kriterien für das Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS) sind neben dem molekulargenetischen Nachweis eines FMR1-Allels mit 55-200 CGG-Repeats das Vorhandensein der Hauptsymptome: fortschreitender Intentionstremor und Fallneigung beim Gehen mit Beginn zwischen 55. und 65. Lebensjahr. Männern sind weitaus häufiger als Frauen betroffen.

Auch Parkinsonismus, autonome Dysfunktion sowie kognitive Einschränkungen der ausführenden Gehirnfunktionen mit Gedächtnisverlust werden als Nebenfunde genannt. Bei einem Teil der Patienten wurde die Verdachtsdiagnose „atypischer Parkinson“ geäußert und entsprechende Therapieversuche eingeleitet. Bei den Parkinsonsymptomen dominieren Rigidität der oberen Extremitäten und eine leichte Bradykinesie. Der Tremor (meist als Intentionstremor, seltener als Ruhetremor mit 3-5 Hz) beginnt typischerweise ab der sechsten Lebensdekade in der dominanten Hand und wird häufig durch Schreiben ausgelöst. Mit der Zeit kommt es zu einer Verschlechterung der Feinmotorik und einem Übergreifen des Tremors auf die kontralaterale Hand. Die Penetranz (48%) und Intensität des Tremors, bestimmt anhand Kriterien der Unified Parkinson's Disease Rating Scale, ist im Vergleich zu allen altersentsprechenden Kontrollgruppen höher.<sup>66</sup> Typisch sind auch periphere Neuropathien der unteren Extremitäten, fast immer unterhalb des Knies mit Einschränkung der sensiblen Schmerzbahnen und Verlust des Vibrationsempfindens. Zu der Schwäche der Beine (insbesondere der Psoas- und Glutealmuskulatur) gesellt sich ein brennender Schmerz mit Krampfgefühlen. Kombiniert mit der Störung der Kleinhirnfunktionen sind die Patienten zunächst auf einen Stock, später auch auf einen Rollstuhl angewiesen. Operative Eingriffe in Allgemeinnarkose bedingen eine deutliche Verschlechterung der klinischen Symptomatik. Die autonome Dysfunktion resultiert in Blasen- und Darminkontinenz sowie erektiler Dysfunktion.

Von den Kleinhirnsymptomen wurden neben der Gangataxie und Haltungproblemen auch noch moderate Dysmetrie und Dysarthrie in über 80% der untersuchten Patienten diagnostiziert. Insbesondere die Gangataxie nimmt mit dem Alter rapide zu [Jaquemont

2004]. Generell beobachtet man eingeschränkte kognitive Fähigkeiten mit reduzierten IQ-Werten auf der Wechsler-Intelligenzskala für Erwachsene, Störungen des Sprachflusses, leichte Enthemmungen und vermehrte Ablenkbarkeit. Die Geschwindigkeit und Aufnahmefähigkeit der Informationsverarbeitung ist herabgesetzt.

Der Nachweis von eosinophilen intranukleären Einschlusskörperchen post mortem gilt auch als definitives Kriterium für die Diagnosestellung. Neurohistologische Untersuchungen zeigten Bergman'sche Gliose und Untergang von Purkinje-Zellen mit proximaler Schwellung der Axone.

Bislang ging man davon aus, dass weibliche Trägerinnen einer Prämutation kein FXTAS entwickeln.<sup>67</sup> In der kürzlich erschienenen Studie von [Hagerman 2004.] wurden erstmalig fünf weibliche klinisch betroffene Trägerinnen einer *FMRI* Prämutation, davon zwei Geschwister, vorgestellt. Im Gegensatz zu ihren männlichen Gegenstücken wurde bei ihnen bislang keine Demenz beobachtet, in einem Fall sogar überdurchschnittlich hohen IQ-Werte beschrieben. In einem der Fälle konnte post mortem intranukleäre und astrozytäre Einschlusskörperchen bei leichter parietaler Hirnatrophie gefunden werden. Bei einer anderen Patientin wurden in T2-gewichteten Kernspinaufnahmen gesteigerte Signalintensitäten in den mittleren Pedunkeln des Kleinhirns festgestellt, die mit den MR-Befunden bei männlichen Patienten mit FXTAS übereinstimmen.

Mit den oben beschriebenen Symptomen ist das FXTAS als Differentialdiagnose bei der Untersuchung von Patienten mit spinocerebellärer Degeneration anzusehen.

## **Pathogenese / Pathophysiologie**

### **Aufbau des *FMRI* Gens**

Das 38kb große *FMRI* Gen befindet sich in der Bande Xq27.3 des X-Chromosoms und besteht aus 17 Exons. Es kodiert sicher für vier gewebeunabhängige der zwölf

möglichen Protein-Isoformen, die durch alternatives Spleißen der Exons 12 und 14 und einer Auswahl von drei bzw. zwei Akzeptorstellen in Exons 15 und 17 entstehen können.<sup>68</sup> Das größte Protein ist die Isoform 7 in der wie in 80% aller Formen das Exon 12 fehlt und besteht aus 632 Aminosäuren. Die kleinste Isoform 6 überspringt Exon 14 und bindet an die am weitesten entfernte Akzeptorstelle in Exon 15. In der normalen Population haben die Mehrheit der FMR1 Allele (56%) in einem 5'-nichttranslatierenden Bereich 29-30 CGG Repeats, welche durch zwei AGG Triplets unterbrochen werden, die normalerweise nach jeweils 9 Repeats auftreten, deren unterschiedliche Haplotypen Ziel intensiver Studien zur Allelstabilität und dem Nachweis eines Gründereffektes waren.<sup>69 70 71 72 73 74</sup> Die Spannbreite der normalen Allele reicht von 12 bis 55 Repeats. In 80% der Fälle sind diese Allele bei Frauen aufgrund der Heterozygotenfrequenz unterschiedlich groß. Die Übertragung solcher Repeats auf die nächste Generation bleibt in der Regel stabil. Die Promotor-Region besteht aus einer CpG-reichen Insel ca. 250Kb zentromerwärts und lässt die sonst allgemein übliche TATA-Box vermissen. Die Initiationsstelle der Transkription befindet sich 134 bp stromaufwärts des ersten CGG-Repeats.<sup>75</sup> Zwei Consensus-Stellen USF1/USF2 und alpha-Pal/Nrf-1 in der Promotor Region agieren als positive cis-agierende Regulatoren der FMR1 Genexpression und führen bei einem Funktionsausfall durch Mutation zu einer bis zu fünffach reduzierten Aktivität.<sup>76</sup> Genprodukt ist das *Fragile X mental retardation protein* (FMRP), bestehend aus zwei KH-Domänen, die als RNA-Bindungsstelle dienen<sup>77</sup> sowie eine RCG-Box mit einem Arg-Gly-Gly Triplet.<sup>78</sup> Des Weiteren konnten zwei Coils, eine G-Quartett-Bindungsstruktur, ein Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie ein exportin-1 abhängiges Kernexportsignal (NES) lokalisiert werden.

### **Abberanter Längenpolymorphismus als Hauptursache für Erkrankungen**

Ursache für alle oben vorgestellten Krankheitsbilder ist eine Trinukleotidexpansion des normalerweise stabil übertragenen CGG-Polymorphismus im 5'-nichttranslatiertem Bereich des FMR1 Gens, welches bei FRAXA zusätzlich mit einer abnormaler Methylierung der Promotor-Region (eine CpG-Insel 250kb zentromerwärts) und der Repeat-Sequenz einhergeht und zu einer Suppression der Transkription des FMR1 Gens

führt.<sup>79 80 81</sup> In Einzelfällen wurde auch über *de novo* Punktmutationen<sup>82 83</sup> im FMR1 Gen berichtet, aber auch Fälle mit Teil- oder Komplettdelationen proximal und / oder den CGG Bereich flankierende Sequenzen<sup>84 85 86</sup> entsprechen phänotypisch dem fragilen X Syndrom, weisen aber keine so ausgeprägt schwere Symptomatik wie die Punktmutationen auf. Die Entwicklung einer Instabilität der CGG-Repeats ist bei normaler oder grenzwertig erhöhter CGG-Repeatanzahl für paternale Übertragung höher, dieses Bild kehrt sich jedoch bei einer Prämutation um; hier treten bei maternal übertragenen Allelen häufiger Instabilitäten auf.<sup>87</sup> Insbesondere der in Intron 2 von FMR1 lokalisierte Polymorphismus FRAXAC2 weist in Trägerinnen einer Fragilen X Prämutation parallel zur Expansion des 10kb entfernten CGG-Abschnittes eine hohe Mutationsrate von ~3,3% während der maternalen Meiose auf, ohne dass dies mit einer zufällige Verteilung der Allelfrequenzen einhergehen würde.<sup>88</sup> Eine Erklärung hierfür könnte das für Chora Huntington propagierte Modell mehrfacher mitotischer Teilungsstörungen, statt einer einmaligen Störung während der Meiose, sein.<sup>89</sup> Die meiotischen Teilungen finden bei der Frau bekanntlichermassen schon vorgeburtlich statt, während sie beim Mann erst im Laufe der Lebenszeit erfolgen. Für die Größenänderungen der CGG-Sequenzen werden *in vitro* ab einer Länge von 25 Repeats und dem Verlust der AGG-Interdispersionen neben Haarnadelschleifenbildungen<sup>90</sup> auch Tetraplexausbildungen postuliert, die für die schrittweise zunehmenden Replikationsstörungen verantwortlich gemacht werden können.

### **Unterteilung der Trinukleotidrepeats**

In der Analyse von Stammbäumen mit Fragilen X Syndrom konnte entgegen der klassischen Beobachtungen bei X-chromosomalen Erbgängen auch die Übertragung durch Männer nachgewiesen werden. Man nahm bis vor der Sequenzierung des FMR1 Gens im Jahre 1991 an, dass der eigentlichen Mutationsentstehung zum Fragilen X Syndrom eine weitere genetische Mutation vorausginge, die ausser der Prädisposition für die nachfolgende krankheitsverursachende Mutation keine weitere Bedeutung besäße und klassifizierte sie als *Prämutation*.<sup>91</sup> Heute weiss man, dass es sich hierbei um Träger mit gegenüber der Normalbevölkerung verlängerten Allelen handelte. Nach den Leitlinien des American College of Medical Genetics (ACMG) wird heute der Bereich zwischen 55-200 CGG Repeats unabhängig von der Sequenzzusammensetzung

mit Unterbrechungen durch ACG-Triplets als Prämutation definiert. Grundlage hierfür sind die Ergebnisse einer gemeinsamen Studie von 13 Labors aus acht Ländern, wo festgestellt wurde, daß das kleinste Allel einer Prämutation, die sich in der Folgegeneration zu einer kompletten Mutation ausbildete, aus 59 Repeats mit Fehlen der AGG Triplets bestand.<sup>92</sup>

Auch der grenzwertige Bereich zwischen 45 und 54 CGG-Repeats ist mit einer gewissen Instabilität bei der Vererbung verbunden, wobei die Ausbildung einer Vollmutation erst über zwei konsekutive Generationen möglich ist. Die Allele dieses Bereiches werden in Anlehnung an die ACMG-Leitlinien als *Grauzonenallel* bezeichnet.

Für die Progression des zunächst stabilen Allels zu der expandierten Vollmutation wurde ein Modell mit den vier allelischen Stadien N->S->Z->L propagiert.<sup>93</sup> Aufgrund einer Mutation des Normallallels N geht dies in das Stadium der Suszeptibilität S über, welches sich in den Nachfolgegenerationen um ein bis zwei Repeats vergrößern oder auch verkleinern kann. Dieser Zustand soll bei einer berechneten Frequenz von 0,0225 bis zu 90 Generationen erhalten bleiben können.<sup>94</sup> Durch wiederholte Expansion erreicht das Allel mit einer Rate von 1,1% pro Generation den Zustand einer Prämutation (Z) und ist somit der nur in der weiblichen Keimbahn entstehenden rapide zunehmenden Vollmutation (L) mit einer Rate von 74% ausgesetzt. Die Größe der Prämutation ist der entscheidende Faktor für den Übergang zur Vollmutation bei der Übertragung durch die weibliche Keimbahn und erklärt das Sherman-Paradoxon, warum die Penetranz in Verwandtschaften sehr unterschiedlich ausfallen kann.<sup>95</sup>

Die Expansion zur Vollmutation erfolgt ausschliesslich während der Weitergabe des Allels durch Trägerinnen einer Prämutation in Abhängigkeit von der Anzahl der CGG-Triplets und dem Geschlecht der (Groß-)Eltern. Repeats, die von Trägern einer Prämutation auf ihre Töchter übertragen werden, können hingegen auch verkleinert oder stabil bleiben [Nolin et al. 1996]. Von seltenen Ausnahmen abgesehen expandieren sie

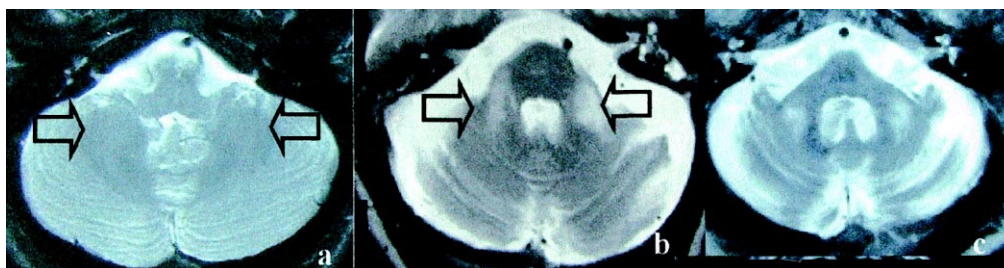
jedoch nicht zu einer Vollmutation, da eine Selektion zu Gunsten der Spermatogonien mit einer Prämutation schon während der Fetalzeit stattfindet.<sup>96</sup> Während im Hoden eines 13-Wochen alten Feten mit somatischer Vollmutation noch keine Prämutation nachgewiesen werden konnte, wurde dies in den Keimzellen eines 17-Wochen alten männlichen Feten festgestellt. Parallel dazu untersuchte Oozyten eines 16 Wochen alten weiblichen Feten wiesen nur voll expandierte Allele auf. Die starke Instabilität während der männlichen Gametogenese scheint den Zellen mit einer Prämutation, die das Genprodukt von FMR1 im Gegensatz zur Vollmutation noch exprimieren, einen selektiven Vorteil zu verschaffen. Diese Beobachtung ist konsistent mit dem Fehlen von vollmutierten Allelen in Spermienzellen von vier Patienten mit fragilen X Syndrom.<sup>97</sup> In einem Fall wurde zusätzlich eine Hodenbiopsie durchgeführt, in der sowohl eine methylierte Vollmutation als auch eine unmethylierte Prämutation festgestellt wurde. Töchter von mit fragilen X Syndrom betroffenen Männern erben somit statt der Vollmutation die in den Spermienzellen nachgewiesene Prämutation.<sup>98</sup> Verschiedene Hypothesen wie Rekombination während der Oogenese [Nussbaum 1986] oder Behinderung der Genreaktivierung während der Lyonisierung aufgrund der Methylierung [Laird 1994] konnten somit wiederlegt werden. Das väterliche Alter beeinflusst die Grösse und die Richtung der Veränderungen – so wurden bei älteren Vätern eher Expansionen als Kontraktionen gesichtet<sup>99</sup>. Das Geschlecht der Nachkommen ist hingegen nicht von Bedeutung. Von den acht bisher beschriebenen Grössenregressionen bei Prämutationen wurden alle auf Töchter übertragen, deren Phänotyp als unauffällig beschrieben wurde.<sup>100</sup> Nur in einem Fall wurden auch an den benachbarten Haplotypen Veränderungen beobachtet – ein Replikationsfehler ist somit die wahrscheinlichste Ursache, wie er auch bei vereinzelt auftretenden Regressionen bei Myotoner Dystrophie angenommen wird.<sup>101</sup> Die Stabilität dieser Allele bei ihrer Übertragung zur nächsten Generation wird sicherlich von besonderem Interesse sein, auch im Hinblick auf die fehlenden AGG-Unterbrechungen.

In der kollaborativen Studie von 13 Laboratorien aus Europa und den USA konnte die Wahrscheinlichkeit für eine stabile Übertragung im Bereich von 46-60 Repeats mit 72.8% angegeben werden. Unter den Instabilitäten befanden sich Größenzunahmen in 22,7% und Abnahmen in 4,4%. Mit zunehmender Anzahl der Repeats bei den Prämutationen nimmt die Wahrscheinlichkeit einer instabilen Übertragung auf die

Folgegeneration zu (19% für 49-54 Repeats, 30.9% für 55-59, and 80% für 60-65 Repeats).<sup>92</sup> Die Instabilität folgt eher familiären Mustern, sodass für eine genetische Beratung im Bereich von 50-60 Repeats eine PCR-Analyse anderer Familienmitglieder für eine Risikoabschätzung hilfreich sein kann.<sup>102</sup> Das Risiko im Bereich von 55-59 Repeats eine Vollmutation zu entwickeln wird derzeit mit 1,1 - 3,7% angegeben. Diese Werte müssen mit den in der gleichen Größenordnung auftretenden pränatalen Untersuchungsrisiken einer Chorionzottenbiopsie oder Amnionzentese sorgfältig abgewogen werden. Aber auch die Übertragung eines Allels mit Prämutation vor allem auf männliche Nachkommen ist in der Beratung inzwischen von großer Bedeutung.

### **Morphologisches Korrelat bei Fragiles X Tremor/Ataxie Syndrom**

In T2-gewichteten Kernspin-Aufnahmen konnten bilaterale Intensitätserhöhungen im periventrikulärem Weiß und den zerebellaren Pedunkeln dargestellt werden, die mit histologisch nachgewiesenen demyelinisierenden Befunden korrespondieren. Auch über Untergang von Purkinje-Zellen mit dystrophischen Axons, Bergmann'sche Gliosebildung und Spongiosaveränderungen der weissen Substanz mit Schwerpunkt auf das Cerebellum wurde berichtet. Des Weiteren konnten kortikale und cerebelläre Atrophien nachgewiesen werden.<sup>103</sup> Diese Ergebnisse finden ihr morphologisches Korrelat in symmetrischen Hyperintensitäten in T2-gewichteten MR-Aufnahmen der weissen Substanz in den Pedunkeln des Kleinhirns, die den Nucleus dentatus ausspart.



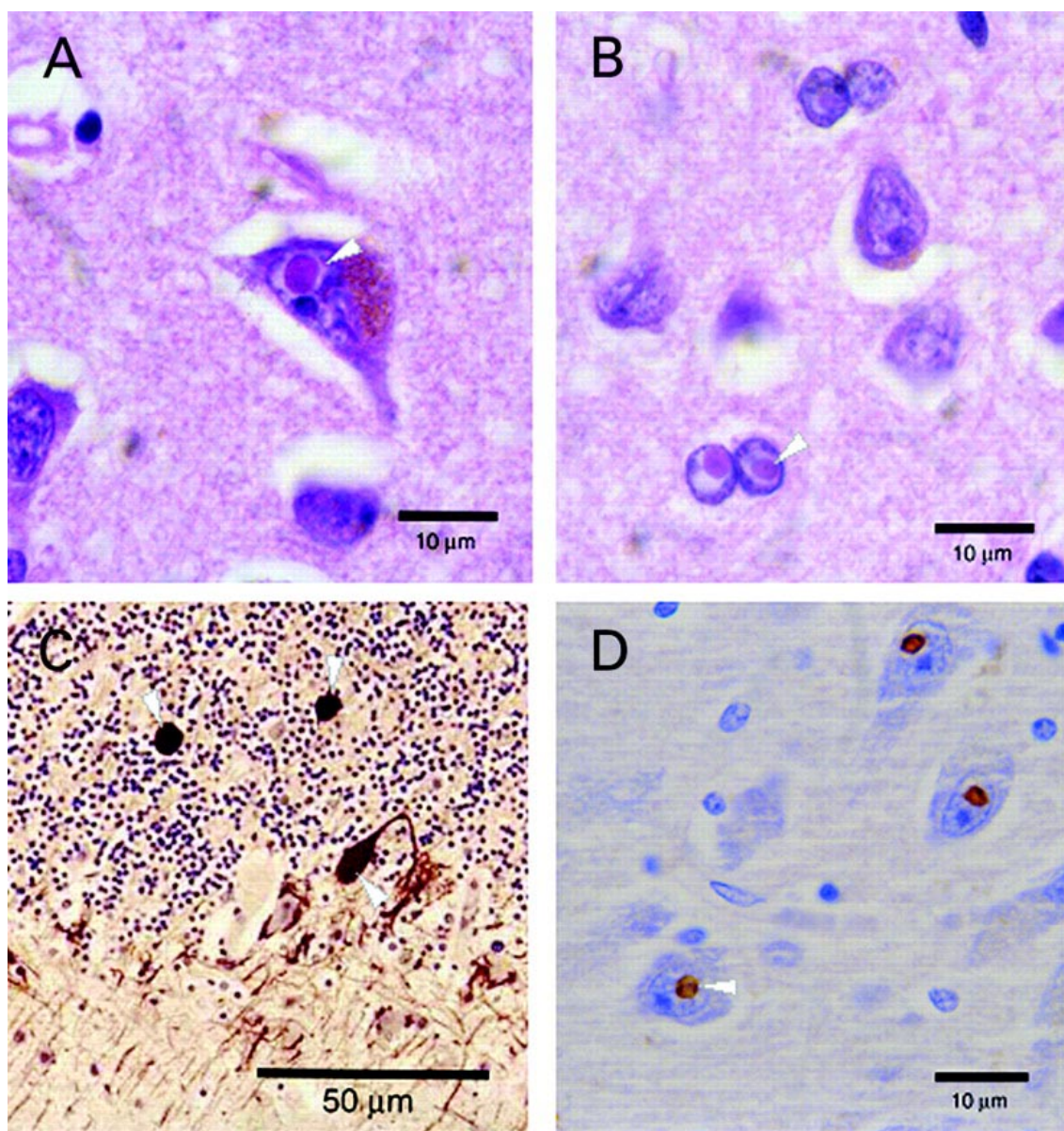
**Abbildung 1:** *a*, T2-gewichtete axiale Aufnahme eines normalen Cerebellums, mit den Pfeilen ist das Marklager der Hemisphären markiert. *b* und *c*, Symmetrische T2-Hyperintensitäten in den mittleren Pedunkel der weissen Substanz des Kleinhirns. (Bildquelle: AMJ Hum Genet 72(4):869-78 2003)



Auch die Medulla und die Olive waren nicht betroffen. Eine moderate bis ausgeprägte Hirnatrophie der zerebellären Hemisphären, des Pons, des Mesenzephalon und generelle kortikale (in einigen Fällen auch parietale und temporale) Volumenminderung wird beobachtet. Gegenüber Kontrollgruppen war der dritte Ventrikel und die Zisternen leicht vergrößert. Diese Beobachtungen gelten als charakteristisch, wenn auch eine ähnliche Beobachtung in einer finnischen Familie mit autosomal rezessiver Ataxie gemacht wurden. Diese hatten allerdings zusätzlich auf Läsionen zurückzuführende Intensitätsveränderungen im Thalamus, die bei den Trägern der Fragilen X Prämutation nicht auftreten.<sup>104</sup> Differentialdiagnostisch in Betracht kommende Olivopontocerebelläre Atrophien mit gesteigerter Signalintensität in den Pedunkeln des Kleinhirns werden auch bei Multipler System Atrophie (MSA) und autosomal-dominanten familiären Erbgängen mit spinocerebellärer Ataxie Typ 6 beobachtet.<sup>105 106</sup>

In Neuronen und Gliazellen des Kortex, Hippocampus, Substantia nigra und Cerebellum wurden in allen neun bisher untersuchten Patienten mit FXTAS intrazelluläre eosinophile Einschlusskörperchen gefunden, die bei Fragilen X Patienten mit 200 Repeats oder mehr nicht auftreten.<sup>107</sup> Die erhöhte Konzentration an abnormer FMR1 mRNA bei Trägern von Prämutationen scheint somit für den toxischen Effekt verantwortlich zu sein. Interessanterweise werden bei einem Subtyp der multiplen Systematrophie (MSA-C) über ähnliche klinische Befunde, vor allem in Oligodendrozyten berichtet.<sup>108</sup> Bei einem daraufhin durchgeführten Screening wurde bei einer signifikanten Anzahl von Patienten mit der ursprünglichen Diagnose MSA-C für das FMR1 Gen Tripletzzahlen im Prämutationsbereich gefunden.<sup>109</sup> Im Gegensatz zu den bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen vorkommenden ubiquitin-positiven Anfärbungen, sind die bei FXTAS auftretenden zentralnervösen Einschlusskörperchen polyglutamin-negativ und darüberhinaus immunhistochemisch negativ für Färbungen mit anti-tau-Antikörper und anti-alpha-Synuclein-AK [Greco et al. 2002]. Damit differenziert sich FXTAS deutlich von den Tauopathien (u.a. Morbus Pick) oder den Synucleinopathien (u.a. Morbus Parkinson) und den morphologisch ähnlichen Einschlusskörperchen der polyglutamin-positiven Gruppe der CAG-Trinukleotiderkrankungen. Diese pathognomonischen Befunde erlauben die Einteilung von FXTAS als eigenständige Gruppe innerhalb der Einschlusskörper bildenden

Erkrankungen. Der Entstehungsmechanismus der intranukleären Einschlüsse selbst ist bislang noch ungeklärt und wird das Ziel weiterer Studien sein. Es ist denkbar dass die FMR1 mRNA eine Schlüsselrolle für weitere, bislang noch nicht identifizierte Proteine darstellt.



**Abbildung 2:** A und B, typische intranukleäre Einschlusskörperchen in Neuronen und Gliazellen (H&E, 1000x), C Neuronen des Kleinhirns mit anti-Neurofilament Antikörpern markiert, D Einschlusskörperchen mit anti-Ubiquitin Antikörper markiert. (Bildquelle: Brain 125(8):1760-1771 2002)

## Das Fragile X Mental Retardation Protein

### Expression von FMRP

Die Expression des Genproduktes von FMR1, das *Fragile X mental retardation protein* (FMRP), erfolgt vor allem in Neuronen, speziell in dendritischen Zellen des Hippocampus, Nucleus basalis Meynert und Cerebellum, während in Gliazellen die niedrigsten Konzentrationen gemessen wurden.<sup>110</sup> Im Corpus geniculatum laterale (CGL) des Thalamus wird es bevorzugt in den magnozellulären Schichten exprimiert, die für zeitlich modulierte Stimuli der visuellen Bahnen, wie Objektbewegungen verantwortlich sind.<sup>111</sup> In epithelialen Gewebe finden sich die höchsten Konzentrationen in den sich aktiv teilenden Basalzellen. In Zellen mesodermalen Ursprunges, insbesondere in der Dermis und Herzmuskellzellen, Hepatozyten, Skelettmuskulatur und der glatten Muskulatur des Verdauungstraktes wurde es bisher nur unter pathologischen Bedingungen nachgewiesen. Im Hoden erfolgt eine Expression in den Spermatogonien, nicht jedoch in den Sertoli-Zellen, was für FMRP als notwendiger Faktor in der Keimzellproliferation sprechen könnte.<sup>112</sup> In Vorläuferzellen der Oligodendroglia und unreifen Oligodendrozyten wird es bevorzugt exprimiert, um dann mit seiner Konzentration in ausreifenden Zellen graduell abzusinken.<sup>113</sup> Fetales kortikales Gewebe exprimiert FMRP in fast allen Zellen, während in einem 19 Wochen alten weiblichen Fetus nur in etwa der Hälfte der Zellen FMRP ohne spezielles Verteilungsmuster beobachtet wurde. Auch im Epithel des Müller'schen Ganges wurde FMRP nur in patchworkähnlichen Abschnitten nur in ca. 50% der Zellen als Konsequenz der zufälligen Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen beobachtet, während im gesunden Feten das gesamte Epithel eine gleichmässige Verteilung aufweist.<sup>114</sup>

Männliche Träger einer Prämutation haben trotz erhöhten FMR1 mRNA-Spiegeln in Leukozyten eine normale bis leicht erniedrigte Konzentration an FMR1 Protein (FMRP). Die Höhe der mRNA Spiegel und die Abnahme der FMRP-Konzentration scheinen mit der Anzahl der CGG Repeats zu korrelieren, sodaß nicht von einer reduzierten Translationsaktivität sondern von einer reduzierten Translationseffizienz aufgrund verminderter Assoziation an Polysomen ausgegangen werden muss. Insbesondere die Verlagerung der translatierten Fraktion zu leichten Polysomen und

ribosomalen 80S-Untereinheiten legen den Verdacht nahe, dass die Initiation der beeinträchtigte Schritt innerhalb der Translation ist.<sup>115</sup> Die bei CG-reichen Sequenzen gehäuft zu beobachtenden Strukturveränderungen behindern den ribosomalen Ableseprozess, da verlangsamte 40S-Untereinheiten mit ihren 60S-Gegenstücken binden und nur eine verminderte Anzahl von ineffizient ablaufenden Translationsschritten gleichzeitig erlauben.<sup>116</sup> Im Bereich von 50-100 Repeats wurde eine durchschnittlich 2.1fache Erhöhung, für den Bereich 100-200 Repeats eine 5fache Erhöhung des mRNA Spiegels angegeben.<sup>117</sup> Diese sind als eine Folge einer kompensatorischen Steigerung der Gentranskription zu werten.<sup>118</sup>

### **Auswirkungen der CGG-Expansion auf die Transkription**

Ein weiterer Effekt der CGG-Expansion ist der Einfluß auf die Startposition der Transkription von FMR1. In einer Studie mit neuronalen und nichtneuronalen Zellkulturen konnte mit zunehmender Repeatanzahl eine Verschiebung des Startpunktes stromaufwärts festgestellt werden.<sup>119</sup> In Zellkulturen mit normaler Repeatanzahl befindet sich die hauptsächlich aktive Startseite zwischen 128 und 132 bp stromaufwärts des ersten CGG-Repeats. Zwei weitere Startpunkte zwischen 162-166 und 177-181 bp stromaufwärts werden mit zunehmender Anzahl der CGG-Repeats häufiger beansprucht. Die mRNA der Prämutationsträger unterscheidet sich somit von der Normalbevölkerung nicht nur durch die Trinukleotidexpansion sondern auch durch eine kleine Verlängerung im 5'-nichtranslatierendem Bereich.

Der quantitative Nachweis von FRMP mittels Western-Blot in kultivierten Lymphoblasten-Zelllinien erbrachte durchgängig eine korrelierende Abnahme der Spiegel bis in den untersten Bereich der Prämutationen.<sup>120</sup> Somit kann für Grauzonenallele eine beginnende Dysregulation der Proteinbiosynthese angenommen werden. Konträr hierzu erbrachte die sensitivere, immunhistochemische Nachweismethode mit spezifischen Antikörpern gegen FMRP nur signifikant erniedrigte FRMP Spiegel in Lymphozyten mit mehr als 100 CGG-Repeats.<sup>121</sup> Die Proteinsequenz des FMRP selbst ist im Gegensatz zu den Polyglutaminerkrankungen

unverändert, da sich die CGG-Expansion in dem 5'-nichttranslatierendem Bereich befindet. Ein Großteil der Autoren geht weiterhin von einem durch Konformationsänderung bedingten Schwellenwerteffekt zwischen Prämutationen und intermediären Allelen aus, da letztere im Vergleich zur Normalbevölkerung mit immunhistochemischen Methoden keine signifikant veränderten FRMP-Spiegel aufwiesen. Männer mit 100 oder mehr CGG Repeats besaßen 1,9fach höhere mRNA Spiegel, als Vergleichspersonen mit 30 CGG-Repeats. Bei Frauen waren die mRNA-Spiegel 1,5fach erhöht.

### **Bedeutung von FRMP**

FRMP wandert als mRNA-transportierendes Protein zwischen Nucleus und Zytoplasma.<sup>122</sup> Insbesondere die durch alternatives Spleißen entstehenden Isoformen ohne die Sequenzen aus Exon 14 finden sich gehäuft im Nucleus.<sup>123 124</sup> Ein derzeit akzeptiertes Modell geht davon aus, dass ~ 4% aller FMRP spezifisch mRNA im Nucleus bindet und dann als Teil eines Ribonukleinkomplexes in das Zytoplasma wandert, wo es an der Lieferung von mRNA an Ribosomen involviert ist.<sup>125</sup> Im Steady state bindet sich FMRP im Zytoplasma zu ~ 85% an freie Polysomen und an das rauhe Endoplasmatische Reticulum. An die postsynaptischen Enden der Dendriten gelangt FRMP durch aktiven Transport als Bestandteil eines mRNP-Komplexes.<sup>126 127 128</sup> Dort agiert es als negativer Regulator der Translation der elongation factor 1A mRNA.<sup>129 130 131</sup> Auch das Drosophila Homolog von MAP1B, *futsch*, wird durch das FMRP Homolog *dFxr* negativ reguliert.<sup>132</sup> Ein Ausfall führt zu strukturellen und funktionellen Störungen in dem mikrotubuli-basiertem Zytoskelett-Proteinen während der Synaptogenese und Spermatogenese.<sup>133</sup>

FRMP bindet neben anderen mRNAs über Uracil-reiche Zielsequenzen<sup>134</sup> auch selektiv seine eigene mRNA im Zentrum der aus etwa 50 Aminosäuren bestehende KH-Domäne mittels einer G-Quartett-Struktur.<sup>135 136 137</sup> Gezielte Punktmutationen der in FMRP paarweise auftretenden G-Strukturen reduziert die mRNA Bindungsfähigkeit drastisch.<sup>138</sup> Fast alle der bisher identifizierten mRNA-Bindungspartner kodieren für Proteine, die in neuronaler Entwicklung und synaptischer Funktion involviert sind.<sup>139</sup>

<sup>140</sup> <sup>141</sup> <sup>142</sup> Weiterer Bindungspartner ist der Glucocorticoidrezeptor GR  $\alpha$ , der im Zusammenhang mit erhöhten Kortikosteroidspiegeln in Fragilen X-Patienten von Interesse ist.<sup>143</sup>

Die Aktivierung von an pausierenden Ribosomen gebundenem FMRP erfolgt über eine Dephosphorylation durch Casein Kinase II zwischen N-Terminus und der RGG Box <sup>144</sup>

<sup>145</sup> Die Assoziation von FMRP mit der 60S Untereinheit der Ribosomen erfolgt hingegen mRNA-abhängig über Ribonukleopartikel (RNP), zu denen neben Nucleolin auch beiden Sequenz-Homologa FXR1P und FXR2P (fragile X related protein) zählen.<sup>146</sup> <sup>147</sup> <sup>148</sup> Die Verteilungsmuster dieser Proteine weisen insbesondere zwischen Hoden und Gehirn deutliche Unterschiede auf, was auf unterschiedliche Funktionsweisen während der Embryonalzeit und Erwachsenenalter deutet.<sup>149</sup> Daneben existiert auch ein Neurotransmitter-vermittelter Steuerungsmechanismus.<sup>150</sup> <sup>151</sup> <sup>152</sup> Die daraufhin erfolgende erhöhte postsynaptische Polyribosomenbildung in den dendritischen Fortsätzen wird allgemein während der Synaptogenese beobachtet und gilt als elementarer Bestandteil einer Proteinbiosynthese-gesteuerten Ausbildung der synaptischen Plastizität.<sup>153</sup> <sup>154</sup> In Kulturzellen des Hippocampus und Mäusegehirnen konnte eine negative Regulation der FMRP Expression durch BDNF (brain derived neurotrophic factor) beobachtet werden. Gesteuert wird dies durch eine erhöhte Signalaktivität des Tyrosinkinase-Rezeptors, der durch den FMR1 mRNA Spiegel getriggert wird.<sup>155</sup>

Über die Verbindungsproteine NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein), CYFIP1 (cytoplasmatic FMRP interacting protein) und CYFIP2, beeinflusst FMRP das zytoskeletale remodeling.<sup>156</sup> Letztere interagieren mit Rac1 welche als Mitglied der Rho-Familie von GTPasen an der Entwicklung von neuronalen Strukturen beteiligt ist. So ist Rac1 in der dynamischen Reorganisation von Aktinfilamenten des Zytoskelettes involviert, welche besonders während der Morphogenese und der Migration dendritischen Zellen ausgeprägt sind.<sup>157</sup> Ein weiteres, mit FMRP interagierendes Protein ist das intrazellulär lokalisierte 82-FIP. Wie NUFIP1, CYFIP1 und 2 bindet es direkt im N-terminale Bereich zwischen NLS und der ersten KH-Domäne.<sup>158</sup>

**Das toxic-gain-of-function Modell kann eine plausible Erklärung für das Zustandekommen von FXTAS geben**

Da die FXTAS-Symptomatik bisher ausschliesslich in Prämutationen beobachtet wurde und bislang in keiner Studie erhöhte Inzidenzen für Tremor und Ataxie in älteren Patienten mit einer Vollmutation und dem klinischen Bild des Fragilen X-Syndroms beschrieben wurden, kann das klassische Modell eines Funktionsausfall durch ein defektes Protein hierfür nicht angenommen werden. In diesem Modell interagieren im Normalzustand spezifische Proteine mit dem 5'-nichtranslatierendem Bereich der mRNA. Als Konsequenz der erhöhten Anzahl an mRNA, der Repeatverlängerungen und damit zahlreicheren Bindungsstellen, sowie einer möglichen veränderten Sekundär- oder Tertiärstruktur der mRNA erfolgt eine übermässige Bindung eines oder mehrerer Proteine. Dies führt zu einer Depletion des Proteinpools in der Zelle und damit zu einer verminderten Funktionsweise in anderen Bereichen, die durch dasselbe Protein reguliert werden. Dieser Sequestrationsprozess könnte die Akkumulation oder abnormale Verarbeitung im proteasomalen Abbauweg mit der Bildung von Einschlusskörperchen triggern. In der Vollmutation kann es aufgrund stillgelegter Genexpression und damit fehlender mRNA nicht zu der oben beschriebenen veränderten Protein-mRNA-Interaktion kommen. Davon abweichende Ausnahmen wären bei diesem Modell Vollmutationen, deren FMR1 Gene weiterhin erhöhte mRNA transkribieren – für solche Patienten bestünde weiterhin das Risiko an Tremor und Ataxie zu erkranken.<sup>159</sup>

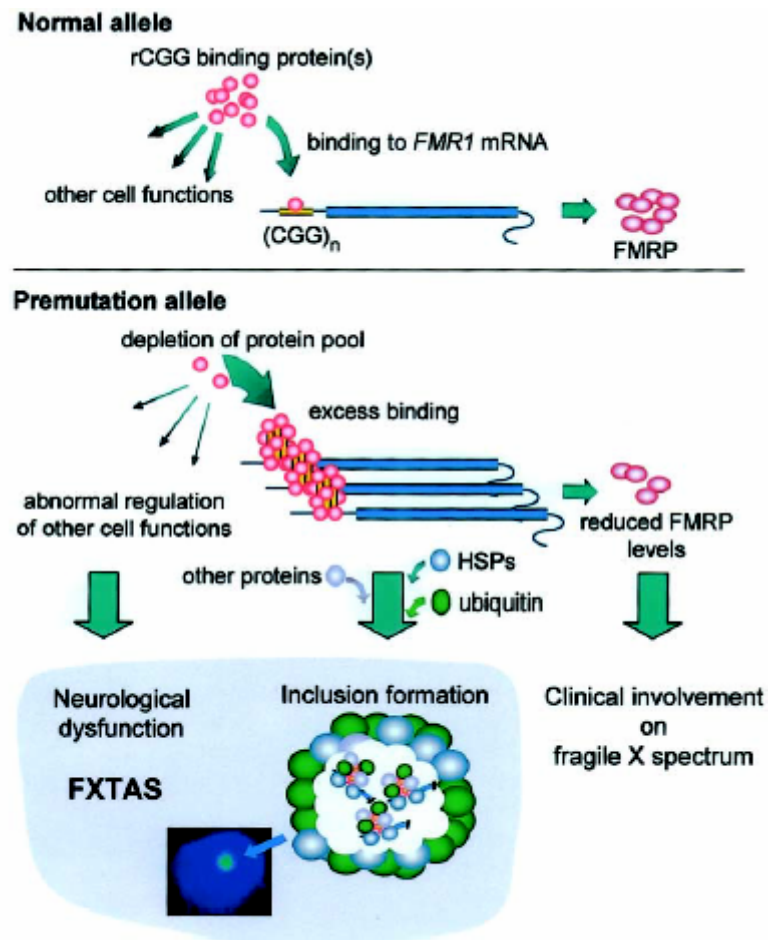


Abbildung 3: Schematische Darstellung des „toxic gain of function“ Modell. Im Normalfall liegen die rCGG-Bindungsproteine in ausreichender Menge vor, sodaß bei der Transkription der *FMR1* mRNA ausreichend FRMP erzeugt wird (Normal allele). In Prämutationsträgern (Premutation allele) kommt es zu einer exzessiven Bindung an die *FMR*-mRNA mit konsekutiv reduzierten Proteinspiegeln sowie der Triggerung eines proteasomalen Abbauweges, in dem es zur Bildung von ubiquitin-positiven Einschlusskörperchenbildung kommt (Quelle: Am J Hum Genet 74(5):805-16, 2004).

Zwei Beobachtungen stützen das propagierte Modell. Zum einen findet man sowohl bei FXTAS intranukleäre Einschlusskörperchen als auch bei myotoner Dystrophie Typ 1 und 2 nukleäre Foci.<sup>160</sup> In letzteren konnten Transkripte von *DMPK* (DM1) und *ZNF9* (DM2) in den Foci nachgewiesen werden.<sup>161</sup> Zum anderen wurden in einer Studie mit „knock-in“-Mäusen, deren endogener CGG-Abschnitt durch ~100 CGG-Repeats ersetzt wurde, ubiquitin positive intranukleäre Einschlusskörperchen gefunden.<sup>162</sup> Auch bei einem *Drosophila*-Modell, in dem ~ 90 CGG Repeats in einen dem *FMR* orthologen



Genabschnitt (*dxfr*) eingesetzt wurden, konnte eine selektive Überexpression mit Bildung von Einschlusskörperchen und neurodegenerativen Veränderungen im Auge festgestellt werden.<sup>163</sup>

Zusammenfassend spielt das bei FXTAS in einer veränderten Konzentration vorliegende FMRP wahrscheinlich eine Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport und Modulation der Translation von mRNA (einschließlich der eigenen mRNA) in Neuronen, insbesondere dendritischen Zellen des Hippocampus und Purkinje-Zellen des Kleinhirns und wirkt gleichzeitig als Inhibitor der eigenen Translation. Auf der postsynaptischen Seite wird es als Regulator für die Proteinbiosynthese infolge Aktivierung durch Neurotransmitter für eine normale Reifung der synaptischen Plastizität verantwortlich gemacht.

## Diagnostik

Die klinische Untersuchung liefert bei Auftreten der oben beschriebenen Symptome einen hinreichenden Verdacht, der durch entsprechende Diagnostik bestätigt werden muss. Mit der Identifikation des FMR1 Gens ist es heute möglich, einen zuverlässigen molekulargenetischen Nachweis des Fragilen X Tremor / Ataxie Syndrom beziehungsweise des Fragilen X Syndrom anzubieten. Bei Patienten mit geistiger Behinderung, Entwicklungsverzögerung oder Autismus unklarer Ätiologie sollte zusätzlich eine routinemässige Chromosomenanalyse erfolgen. Der zytogenetische Nachweis der fragilen Stelle im X-Chromosom wird aufgrund seiner Unzuverlässigkeit und den hohen Kosten nicht mehr durchgeführt. Stattdessen wird für die Mutationsanalyse eine Kombination aus Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Southern-Blot durchgeführt. Die PCR erlaubt mit hoher Sensivität die Trinukleotidrepeats des FMR1 Gens im normalen und unteren Prämutationsbereich zu amplifizieren, versagt jedoch bei Allelen im oberen Prämutationsbereich oder einer Vollmutation. Können in der PCR bei einer männlichen Probe ein sichtbares Allel oder bei Frauen zwei sichtbare Allele unterschiedlicher Länge nachgewiesen werden, kann durchaus auf weiteres Testen verzichtet werden. Da in seltenen Ausnahmen jedoch in

den Patienten ein zelluläres Mosaik vorliegen kann, besteht die Gefahr, dass mit einem rein auf PCR basierenden Test potentiell falsch negative Fehldiagnosen gestellt werden.<sup>164</sup> Diese komplexen Veränderungen, sowie längere Prämutationen und Vollmutationen können hingegen zuverlässig mittels Southern-Blot nachgewiesen werden.<sup>165</sup> Die Bestimmung der Allelgröße ist bei der PCR (soweit möglich) allerdings präziser. Durch den Einsatz spezifischer Restriktionsendonukleasen kann beim Southern Blot gleichzeitig der Methylierungsstatus bestimmt werden. Wird die DNA mit Bisulfit vorbehandelt und entsprechend modifizierte Primer eingesetzt, ist es durchaus möglich den Methylierungsstatus auch mit einer PCR zu bestimmen, wobei dann mindestens zwei Ansätze für beide mögliche Varianten notwendig werden.<sup>166</sup> Der hohe CG-Anteil in den Zielsequenzen machte in älteren Protokollen den Einsatz von 7-deaza-GTP anstelle von GTP notwendig. Da diese nicht wie sonst üblich mit einer Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht werden können, wurden radioaktive Sonden entwickelt, die später durch Chemilumineszenzen ersetzt werden konnten.

Eine prädiktive Vorhersage für fragiles X Syndrom basierend auf der Relation zwischen der Länge der Trinukleotidexpansion und mentalem Phänotyp von Trägern einer Prämutation ergab für den molekulargenetischen Testnachweis eine Sensitivität von 99% für Männer, 100% für Frauen und eine Spezifität von 100% für Männer und 60% für Frauen. Daraus berechnet sich ein positiver prädiktiver Wert von 100% (Männer) bzw. 82% (Frauen) und ein negativer prädiktiver Wert von 94% (Männer) bzw. 100% (Frauen).<sup>167</sup> Eine Ausnahme bildet der Grauzonenallelbereich, bei dem der Nachweis eines Überträgerstatus keine abschließende Aussage ermöglicht, insbesondere für die zukünftigen Generationen oder entfernte Verwandtschaften. Ebenfalls kann für einen pränatal diagnostizierten weiblichen Fetus mit Vollmutation keine akkurate Voraussage für den mentalen Status gemacht werden. Bei einer leichten Triplet-Vergrößerung im Prämutationsbereich ist hingegen in weniger als 1% mit einer mentalen Beeinträchtigung zu rechnen, die durch Mosaikverfälschungen zustande kommen kann.

In weniger als 1% der Fälle liegt statt der Trinukleotidexpansion eine teilweise oder vollständige Deletion oder eine Punktmutation des FMR1 Gens zugrunde. Letztere

werden durch die Routinemethoden nicht entdeckt, während Deletionen meistens durch fehlende Amplifikation bemerkt werden. Hier und bei ungewöhnlichen Phänotypen setzt ein immunozytochemischer FMR-Proteinnachweis mittels Antikörper ein, der von einigen darauf spezialisierten Laboratorien angeboten wird.<sup>168</sup> Die genaue Lokalisation der Mutation kann nur durch anschließende Sequenzierung bestimmt werden, dies wird jedoch nicht routinemäßig durchgeführt. Bekannte Punktmutationen sind Ile367Asn [Mannermä 1996] und eine A zu C Substitution an Position 879, die zu einem unvollständigen Protein führt [Shinahara 2003]. Derzeit sind keine Formen von FRMP-Mangel bekannt, die sich nicht auf das FMR1 Gen zurückführen lassen.

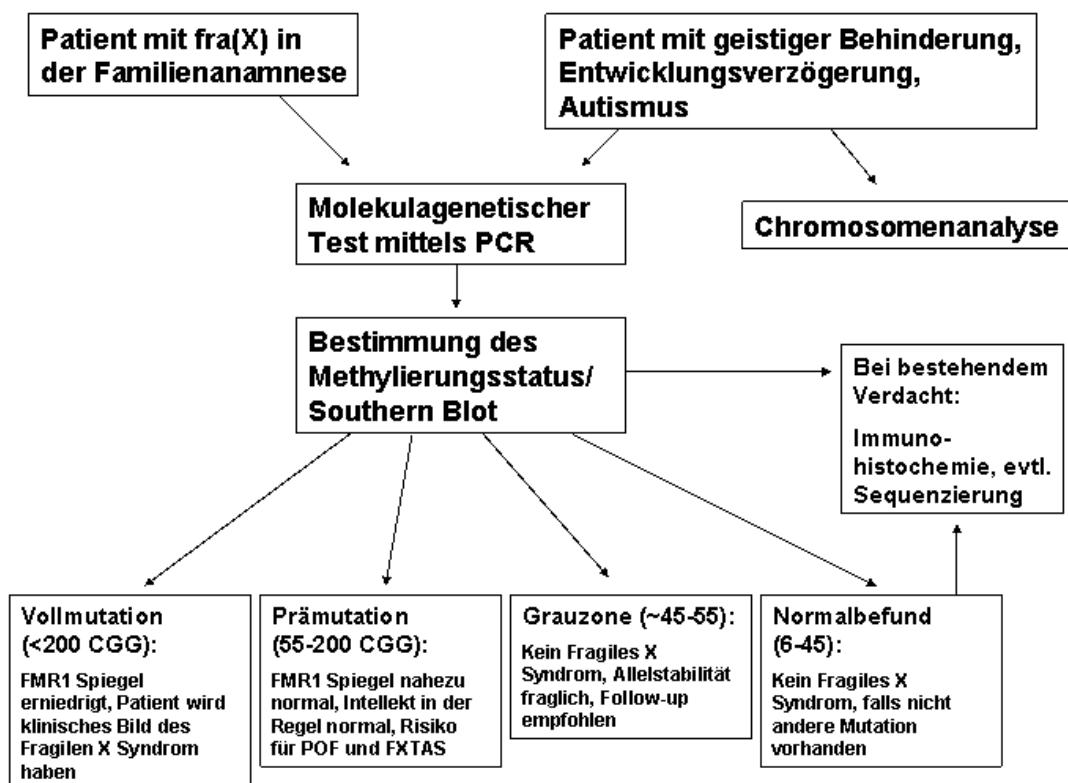


Abbildung 4 Schematische Vorgehensweise bei der Diagnostik für FMR1.

Ist eine Mutter nachgewiesene Trägerin einer Prämutation oder Vollmutation, kann eine pränatale Untersuchung zur Bestimmung, ob der Fet das normale oder das mutierte Allel geerbt hat, angeboten werden. Allerdings muss bei der Untersuchung einer Chorionzottenbiopsie in der 10.-12. Schwangerschaftswoche der inkomplette

Methylierungsstatus der Chorionzotten im Vergleich zum Feten zum Zeitpunkt der Probenentnahme berücksichtigt werden. In bestimmten Situationen ist dann die Unterscheidung zwischen großen Prämutationen oder kleinen Vollmutationen im Southern-Blot schwierig und es kann eine nachfolgende Amnionzentese (16.-18. SSW) erforderlich werden, um endgültige Klarheit über einen Befund zu erhalten. Auch ist ein Mosaik zwischen Trophoblasten und somatischen Zellen theoretisch möglich, wurde aber noch nicht beobachtet, so dass bei einer Prämutation die Empfehlung einer nachfolgenden Amnionzentese umstritten ist.<sup>169</sup>

## Genetische Beratung

Für die humangenetische Beratung ergeben sich einige Besonderheiten. Der Vererbungsmodus folgt einem X-chromosomal-dominanten Erbgang mit unterschiedlicher Penetranz, von dem beide Geschlechter betroffen sein können. Neben dem Vererbungsrisiko muss die Antizipation der Trinukleotiderkrankung bei entsprechender Disposition berücksichtigt werden. Mosaikere können sowohl als gewebespezifische Unterschiede der Tripletanzahl als auch als Mosaikere des Methylierungsmusters in einzelnen Zellen auftreten. Des Weiteren sollte für die Familienplanung auch das Risiko einer vorzeitigen Menopause bei Trägerinnen einer Prämutation einbezogen werden. Die Erstdiagnose wird meist durch ein betroffenes Kind mit FXS oder seltener durch einen von FXTAS betroffenen Familienmitglied gestellt, was Konsequenzen für weitere Schwangerschaften in der Familie haben kann.<sup>170</sup> Optimaler Beratungszeitpunkt ist somit vor Eintritt einer Schwangerschaft. Auch ist eine möglichst frühzeitige Diagnose anzustreben, da zwischen Auftreten von Entwicklungsverzögerungen und der ersten Diagnosestellung in der Hälfte der beobachteten Familien mehr als ein Jahr vergeht und schon nachfolgende Schwangerschaften begonnen wurden.<sup>171</sup>

Mütter von Individuen mit einer Vollmutation sind Träger einer Prämutation oder Vollmutation und können an FXTAS erkranken bzw. selbst betroffen sein. Trägerinnen

einer Prämutation können das entsprechende Allel entweder von ihrem Vater oder ihrer Mutter geerbt haben, die dann ihrerseits Träger einer (kürzeren) Prämutation sind; hingegen haben Träger einer Prämutation das Allel immer von ihrer Mutter erhalten.

Väter mit Vollmutation können an ihre Töchter keine Vollmutation vererben, da in ihren Spermien nur Prämutationen nachweisbar sind. Mütter mit einer Vollmutation vererben mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% das betroffene Allel an ihre Nachkommen. Das Risiko für Geschwister ist abhängig von ihrem eigenem Geschlecht, dem Geschlecht des vererbenden Elternteils, sowie der Repeatanzahl im vererbenden Elternteil.

Männer mit einer Prämutation tragen ein altersbedingt zunehmendes Risiko an FXTAS zu erkranken. Sie vererben diese Prämutation mit leichten Größenveränderungen immer an ihre Töchter, die ein erhöhtes Risiko für vorzeitige Menopause und FXTAS aufweisen und nicht an ihre Söhne. Frauen mit einer Prämutation übertragen mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% ein stark verändertes Allel in jeder Schwangerschaft an ihre Nachkommen. Das Risiko der Expansion ist abhängig von der vorhandenen Anzahl an Basentriplets (siehe Tabelle), wobei in seltenen Fällen Größenregressionen beobachtet werden, über deren Stabilität bislang keine Aussage möglich ist [Sullivan 2002].

**Tabelle 3: Risikoangaben in Abhängigkeit der maternalen Repeatanzahlen für Söhne und Töchter einer Trägerin der Prämutation (Quelle: Nolin Am J Hum Genet 59(6): 1252-61 Dez. 1996).**

| <i>Repeatanzahlen der Mutter</i> | <i>Risiko für Vollmutation bei Söhnen</i> | <i>Risiko für Vollmutation bei Töchtern</i> |
|----------------------------------|---|---|
| 56-59                            | 7%  | 3,5%  |
| 60-69                            | 10%                                       | 5%  |
| 70-79                            | 29%                                       | 15%   |
| 80-89                            | 36%                                       | 18%   |
| 90-99                            | 47%                                       | 24%   |

| <i>Repeatanzahlen der Mutter</i> | <i>Risiko für Vollmutation bei Söhnen</i> | <i>Risiko für Vollmutation bei Töchtern</i> |
|----------------------------------|---|---|
| >100                             | 50%                                       | 25%   |

## Therapie

Aufgrund der genetischen Ursache ist eine Heilung nicht möglich. Symptomatisch kann für Patienten mit einer Vollmutation nach eingehender kinderpsychiatrischer, pädiatrischer und neurologischer Untersuchung ein individuelles Förderprogramm erstellt werden, welches multidisziplinär auf die Bedürfnisse des Kindes eingeht. Bei Sprach-, und Sprechstörungen ist eine logopädische Betreuung indiziert.<sup>172</sup> Ergotherapie und gezielte Krankengymnastik dienen zur Festigung der Motorik. Bei Verhaltensauffälligkeiten kann durch psychotherapeutische Betreuung und Musiktherapie eine verbesserte Wahrnehmung erzielt werden. Eine spezielle schulische Betreuung sollte individuell auf die Fähigkeiten des Kindes eingehen, möglichst kleine Klassen beinhalten und abrupte Veränderungen vermeiden. Bei stark ausgeprägter Hyperaktivität, Aggressionen und konstanter Unaufmerksamkeit kann auch ein medikamentöses Vorgehen in Erwägung gezogen werden. Neben der genetischen Beratung durch einen Facharzt für Humangenetik ist eine Teilnahme in Selbsthilfegruppen zum Informationsaustausch der Eltern anzustreben.

Für von FXTAS betroffene Patienten existieren derzeit noch keine Therapieempfehlungen. Aus neurologischer Sicht kann man versuchen, die im Vordergrund stehenden Symptome abzumildern. So kann wie bei den spinocerebellären Ataxien ein Therapieversuch mit L-Dopa und Dopamin-Agonisten durchgeführt werden. Gegen den Tremor empfiehlt sich ein Versuch mit autogenem Training und eventuell medikamentöse Therapie mit beta-adrenergen Rezeptorenblocker oder Tranquilizer unter Beachtung der Kontraindikationen. Anticholinergika sind nicht sinnvoll, es sei denn es liegt gleichzeitig ein Parkinson-Syndrom vor. Die Patienten sollten auf Substanzen verzichten, die das Kleinhirn direkt beeinflussen (Alkohol, Narkotika). Mit Progression der Symptomatik muss auf eine adäquate Versorgung (Rollator, Rollstuhl, Haushaltshilfen, Betreuung) geachtet werden.

## **Fragestellung**

Die kürzliche Beschreibung des Fragile-X-Tremor/Ataxia Syndroms (FXTAS) in Familien mit Kindern, die an einem Fragilen X Syndrom leiden, wirft die Frage auf, wie häufig FXTAS bei Patienten mit sporadischer Ataxie ist. Insbesondere da in angloamerikanischen Kollektiven mit Ataxie die Prävalenz mit bis zu 5% angegeben wird, soll hier anhand eines großen Patientenkollektivs ermittelt werden, ob die Analyse des CGG-Repeats im FMR1-Gen mit als ein genetischer Test bei der Differentialdiagnostik von Ataxie-Patienten eingesetzt werden soll. Des weiteren ergibt sich gleichzeitig die Möglichkeit, zu prüfen, ob die dabei beobachteten Allelverteilungen denen der Literatur entsprechen und die Etablierung eines routinemäßigen Screenings für FMR1-Prämutationen sinnvoll ist.

## Material und Methoden

### Das Patientenkollektiv

Von den DNA-Proben der letzten fünf Jahre wurden alle Proben an den humangenetischen Instituten in Rostock und Tübingen im Zeitraum Januar 1999 bis Februar 2004, für die eine SCA-Untersuchung mit weiterführender Diagnostik veranlasst war, mittels einer Datenbank herausgefiltert. Weitere Proben aus dem Jahre 1999 der neurologischen Universitätsklinik Bochum wurden von Prof. Dr. Ludger Schöls beigesteuert. Die Probenliste wurde anonymisiert und nach Geschlechtern getrennt. Soweit bereits aus der Datenbank ersichtlich, wurden alle Proben mit einem positiven SCA oder FRDA-Befund entfernt. Am Schluss befanden sich auf der Liste insgesamt 416 männliche und 520 weibliche Proben, für die die Patienten einer weitergehenden molekulargenetischen Untersuchung im Rahmen von Studien ihre Einverständniserklärung abgegeben hatten.

Für jede Probe wurde das Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme, die Krankheitsdauer, neurologische Symptome (Ataxie, Tremor, Parkinsonismus), radiologische Befunde und weitere Nebenerkrankungen, so weit angegeben, tabellarisch dokumentiert.

### Chemikalien

Für diese Arbeit wurden folgende Chemikalien eingesetzt. In Klammern die jeweilige Bestellnummer.

**Tabelle 4: Verwendete Chemikalien**

| <i>Substanz</i>              | <i>Hersteller</i>               |
|------------------------------|---------------------------------|
| Agarose LE (US32802-100G)    | Amersham Biosciences, Freiburg  |
| Ampliwax PCR Gems (N8080150) | Applied Biosystems, Darmstadt   |
| Ampuwa Wasser (FRE 1080104)  | Fresenius Kabi, Bad Homburg     |
| Ammoniumsulfat (A4418)       | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |



| <i>Substanz</i>  | <i>Hersteller</i>               |
|--|---------------------------------|
| Betain, PCR-Qualität (B0300)                           | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Borsäure (100765)                                      | Merck, Darmstadt                |
| Bromphenolblau (B0126)                                 | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Ethanol (100986)                                       | Merck, Darmstadt                |
| Ethidiumbromid (E8751)                                 | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Ethylendiamidtetraessigsäure (E6758)                   | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Glycerin (3783.1)                                      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe       |
| Magnesiumsulfat (M3409)                                | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Natriumbisulfid [NaHSO <sub>3</sub> ] (24,397-3)       | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Natriumhydroxid [NaOH] (106467)                        | Merck, Darmstadt                |
| Pyrrolidinone 99+% (24,033-8)                          | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Salzsäure (109057)                                     | Merck, Darmstadt                |
| N-Tris(hydroxymethyl)ethylglycin [Tricin] (T1074)      | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan [Trizma Base] (T1503) | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Tris-Sulfat pH 9.0 (16949)                             | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Xylencyanol (110590)                                   | Merck, Darmstadt                |

### **Puffer und Lösungen**

Alle Puffer wurden, sofern nicht bereits als Fertigmischung vom Hersteller vorhanden, mit doppelt destilliertem, vollentsalztem Wasser angesetzt.

**Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen**

| <i>Bezeichnung</i> | <i>Zusammensetzung / Hersteller</i> |
|--------------------|-------------------------------------|
|--------------------|-------------------------------------|

| <i>Bezeichnung</i>                   | <i>Zusammensetzung / Hersteller</i>                                       |
|--------------------------------------|---|
| Blaumarker                           | 0,01% (w/v) Bromphenolblau<br>8% (v/v) Ficoll (Typ 400)<br>1 x TBE        |
| 100 mM dNTP Set (10297-018)          | Invitrogen, Karlsruhe   |
| Hot Star Taq- Puffer (203203)        | Quiagen GmbH, Hilden  |
| 10 x Ladepuffer                      | 0,1% (w/v) Bromphenolblau<br>0,1% (w/v) Xylencyanol<br>50% (v/v) Glycerin |
| Natriumbisulfidlösung                | 0,6 g Natriumbisulfid<br>90 µl 5M NaOH<br>915 µl dH <sub>2</sub> O        |
| 1 X Tris-EDTA (TE) pH 8,0            | 10 mM Tris-HCl<br>1 mM EDTA (pH 8,0)                                      |
| 10 x Tris-Borat-EDTA (TBE) pH 8,0    | 890 mM Tris<br>890 mM Borsäure<br>20 mM EDTA (pH 8,0)                     |
| Q-Solution (203203)                  | Quiagen GmbH, Hilden  |
| CEQ Separation Gel LPA-1 (608010)    | Beckman-Coulter, Krefeld  |
| CEQ Separation Buffer (608012)       | Beckman-Coulter, Krefeld  |
| CEQ Sample Loading Solution (608120) | Beckman-Coulter, Krefeld  |

## Kits

**Tabelle 6: Verwendete Kits**

| <i>Bezeichnung</i>                         | <i>Hersteller</i>              |
|--|--------------------------------|
| CyScribe GFX Purification Kit (27-9606-01) | Amersham Biosciences, Freiburg |
| QIA Quick Gel Extraction Kit (28704)       | Qiagen GmbH, Hilden            |

## Geräte

**Tabelle 7: Verwendete Geräte**

| <i>Bezeichnung</i>  | <i>Hersteller</i>                         |
|---|---|
| CEQ8000 Zyklussequenzierer und Software zur Auswertung von Fragmentanalysen | Beckman Coulter GmbH, Krefeld             |
| Elektrophoresekammern   | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen           |
| Consort E 835 Spannungsgeber für Elektrophoresekammern                      | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen           |
| Eppendorf BioPhotometer   | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg          |
| Eppendorf Zentrifugen 5417C & 5804  | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg          |
| Eppendorf Thermomixer Compact 114   | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg          |
| Eppendorf Vakuumzentrifuge 5301   | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg          |
| Pipetten  | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg          |
| Transilluminator  | Biostep GmbH, Jahnsdorf                   |
| UV-Tisch  | Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen |
| pH-Meter MP 230   | Mettler-Toledo GmbH, Giessen              |
| Waage Precisa XT 6200C-FR   | PESA GmbH, Bissingen-Steinhofen           |
| Vortexer REAX Control   | Heidolph Instruments, Schwabach           |
| Gene-Amp PCR System 9700  | Applied Biosystems, Darmstadt             |
| Thermocycler MJ Research PTC 200  | Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf     |

## DNA

Die DNA der Patienten aus den jeweiligen Archiv wurde bei -20°C gelagert, nach Auftauen auf Eis aus der Stocklösung im Verhältnis 1:5 aliquotiert. Die photometrisch vermessenen DNA-Konzentrationen betragen zwischen 50 und 200 ng/µl. Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgte bei +4°C in dafür zugelassenen und laufend

überwachten Kühlschränken.

### Referenzsequenzen

Die Referenzsequenzen für Fragiles X Mental Retardation 1 (OMIM: 309550) wurden vom National Center for Biotechnology Information unter der Internetadresse [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) bezogen. Sie sind in der Nukleotiddatenbank unter folgenden Nummern archiviert:

**Genomische DNA:** NT\_011681.13 (Start: 3380250 Stop: 3419352)  
**mRNA:** NM\_002024  
**Produkt:** NP\_002015

### Primer

Alle Oligonukleotide wurden auf Bestellung von der Firma Metabion GmbH, Martinsried synthetisiert und in einer Konzentration von 100pmol/μl verschickt.

**Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide**

| <i>Bezeichnung</i> | <i>Sequenz 5' -&gt; 3'</i>                                | <i>Länge</i> | <i>GC%</i> | <i>T<sub>m</sub>[°C]</i> |
|--------------------|---|--------------|------------|--------------------------|
| 2381_F_FMR1-hum    | Cy5 CGG AGG CGC CGC TGC CAG G                             | 19           | 84,21      | 77,61                    |
| 2382_R_FMR1-hum    | TGC GGG CGC TCG AGG CCC AG                                | 20           | 80,00      | 78,79                    |
| 2606_Non-Met-F     | AAA CAC TCA ACT CCA TTT CAA ATT<br>TCA CTT CCA            | 33           | 34,40      | 63,10                    |
| 2607_Non-Met-R     | GAG TTT GTT TTT GAG AGG TGG GTT<br>GTG GGT                | 30           | 46,70      | 66,80                    |
| 2608_Met-F         | CCG CCT CTA AAC GAA CGA CGA GCC<br>GAC G                  | 28           | 60,70      | 71,00                    |
| 2609_Met-R         | GGT TGC GGG CGT TCG AGG TTT AGT<br>CGT C                  | 28           | 60,70      | 71,00                    |
| 2610_mTP_F         | GCC GCT ACC AAA AAA CGT ACG<br>ACA AAC GCG                | 30           | 55,20      | 69,50                    |
| 2611_mTP_R         | TAC CGA TAC GCA TCC CAG TTT GTC<br>AGC (TCG) <sub>8</sub> | 51           | 58,80      | 80,70                    |

| <i>Bezeichnung</i> | <i>Sequenz 5' -&gt; 3'</i>             | <i>Länge</i> | <i>GC%</i> | <i>T<sub>m</sub>[°C]</i> |
|--------------------|--|--------------|------------|--------------------------|
| 2612_Tail-R        | TAC CGA TAC GCA TCC CAG TTT GTC<br>AGC | 27           | 51,90      | 66,50                    |

## Längenstandards

**Tabelle 9: Verwendete Längenstandards**

| <i>Bezeichnung</i>   | <i>Hersteller</i>         |
|--|---------------------------|
| 100bp DNA-Leiter 1 µg / µl (15628-019)<br>Fragmente [bp] 2072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100,<br>1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100  | Invitrogen, Karlsruhe     |
| 600 CEQ Size Standard (608095)<br>Fragmente [bp] 600, 580, 560, 540, 520, 500, 400, 480,<br>460, 440, 420, 400, 380, 360, 340, 320, 300, 280, 260,<br>240, 220, 200, 190, 180, 160, 140, 120, 100, 90, 80, 70,<br>60 | Beckmann-Coulter, Krefeld |

## Enzyme

**Tabelle 10: Verwendete Enzyme**

| <i>Bezeichnung</i>                   | <i>Hersteller</i>               |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| VentR (exo-) DNA Polymerase (M0257S) | New England Biolabs, Schwalbach |
| Hot-Star-Taq DNA Polymerase (203203) | Qiagen GmbH, Hilden             |

## PCR

Die von dem amerikanischen Chemiker Kary Mullis 1983 etablierte Methode ermöglicht es auf molekularbiochemischen Wege von einer DNA Sequenz aus genomischem Material eine große Anzahl von Kopien zu erstellen. Das synthetisierende Enzym, die sog. DNA-Polymerase benutzt wie bei der Replikation den Einzelstrang als Matritze zur Synthese des komplementären Stranges. Mittels der Wahl eines passenden Oligonukleotides („Primer“) wird der Startpunkt der Synthese festgelegt. Durch zyklische Wiederholung mittels automatisierten Thermocyclern der aus Denaturierung,

Annealing und Extension bestehenden Arbeitsschritte kann eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht werden.

### **Gelelektrophorese**

Aufgrund ihrer negativen Ladung der Phosphatgruppen eignen sich Desoxyribonukleinsäuren zur analytischen Auftrennung in einem elektrischen Spannungsfeld. Die gebräuchlichste Methode ist die Agarosegelelektrophorese, bei der die Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode abhängig von der Dichte der Agarosematrix und der Größe der Nucleinsäurefragmente ist. Die Längenbestimmung erfolgt durch kommerziell erhältliche Längenmarker, welche standardisierte DNA-Fragmentmischungen darstellen. Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten Fragmente wird Ethidiumbromid als interkalierender Farbstoff zugesetzt und kann unter Anregung mit UV-Licht auf einem abgeschirmten Transilluminator sichtbar photodokumentiert werden.

Durch Aufkochen von 0,8g Agarose in 40ml 1x TBE-Puffer wird eine Lösung hergestellt, die nach Zugabe von 3µl 1%igem Ethidiumbromid in entsprechende 6-8cm große Gelkammern gegossen wird. Nach ca. 30min Abkühlungszeit bildet sich eine feste Agarosematrix, auf der nach Entfernen der vorher eingebrachten Plastikämme ca. 5mm große Probenaschen freiliegen. Nach der Verdichtung der DNA-Proben durch Zugabe von 3µl 10x Blaupuffer werden die Proben in die Geltaschen pipettiert und für 30-45min in der mit 1x TBE-Puffer gefüllten Wanne eine Spannung von 85V angelegt. Anschließend wird das Gel in den Transilluminator überführt und mit einer Olympus-Digitalkamera fotografiert und das Bild mittels der Argus X Software zugeschnitten und dokumentiert.

### **Fragmentanalyse**

Durch Einsatz von mit Farbstoffen markierten Primern lässt sich mittels automatisierter

Fluoreszenzdetektion in einem DNA-Sequenzierer die Länge des Amplifikates innerhalb von 90 Minuten mit genauer Unterscheidung der verschieden langen Basentriplets darstellen. Dabei werden parallel für jeweils 8 Proben in einem Sequenziergerät der Firma Beckman Coulter automatisch eine Kapillarelektrophorese in denaturierendem Acrylamid durchgeführt. Die elektrophoretische Substanztrennung erfolgt in sehr feinen Kapillaren mit weniger als 0,1 mm Innendurchmesser unter Anlegung einer hohen Spannung mit über 1000 Volt. Die Innenwand der Kapillare ist negativ geladen und erlaubt zusätzlich einen elektroosmotischen Fluss des kationischen Puffers. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Analysates setzt sich somit für Kationen aus elektrosomatischem Fluss zuzüglich elektrophoretischem Fluss zusammen, während bei den zur Anode wandernden Anionen der Wert sich abzüglich des elektrophoretischen Flusses zusammensetzt. Die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Längensstandards und Primer der Zielsequenz werden in einem Durchfluss optometrisch gemessen und nach Auswertung mit einer entsprechenden Software anhand ihrer Signalintensität und Fragmentlänge graphisch dargestellt.

Nach entsprechender Verdünnung der PCR-Amplifikate mit 35 µl einer Sample Loading Lösung ( 690 µl Sample Loading Solution (Beckman-Coulter) und 8 µl 600 CEQ Size Standard (Beckman-Coulter)) in speziell für das Beckman CEQ8000 System erforderlichen 96-well Mikrotiterplatten vorgelegt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Vorbereitung eines Analyselaufs beinhaltet noch das Vorlegen frischen Elektrophoresepuffers, frischen Sequenziergels (LPA-1) und die Wahl adäquater Elektrophoreseparameter (Kapillartemperatur, Denaturierungszeit, Denaturierungstemperatur, Spannung und Dauer für Injektion und Separation)

### **Genomischer Southern Blot**

Eine Identifikation größerer FMR1-Abschnitte erfolgt nach der vom britischen Biochemiker Edwin Mallor Southern angegebenen Methode der direkten Genotypdiagnostik. Sie erlaubt zusätzlich die Bestimmung der Methylierungstatus des FMR1-Promotors. Zunächst wird 10 µg der zu untersuchenden genomische DNA an

spezifischen Stellen durch die Restriktionsendonukleasen HindIII und PstI in Fragmente aufgespalten. Bei Untersuchungen des Methylierungsstatus verwendet man auch noch die methylierungsensitiven Enzyme EagI, BssHIII oder SacII. Der Verdau wird durch Elektrophorese in einem 1% Agarosegel über 18 Stunden bei 3 Volt /cm nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wird das Gel unter UV-Licht fotografiert und für die weitere Bearbeitung markiert und vermessen. Anschließend erfolgen eine Depurination mit HCl und eine Denaturierung mit NaOH. Die DNA wird anschließend auf ein DNA-bindende Nylonmembran übertragen und fixiert. Diese kann mit der entsprechend markierten Hybridisierungssonde Ox0.48 durch Autoradiographie detektiert werden. Normale FMR1-Fragmente des inaktiven X-Chromosoms sind etwa 5,2kb groß, die aktive Form dagegen 2,7kb. Prämutationen sind mindestens 180bp größer, Vollmutationen mindestens 600bp und treten in der Regel als somatisches Mosaik in einem Muster verschiedener Banden auf.

Die Durchführung des Southern-Blottes erfolgte in speziell dafür zugelassenen Labors der Gregor-Mendel-Laboratorien in Ulm. Für jeden Probe wurden im Restriktionsverdau 10µg DNA mit 30 U Endonuclease (zwei Ansätze für Hind III und Pst I) und dazu passenden Puffer (bestehend aus Tris-HCl, NaCl und MgCl<sub>2</sub> in der für das jeweilige Enzym optimalen Konzentration) versetzt und nach Anzentrifugation für 5 Stunden in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert.

**Tabelle 11: Verwendete Reaktionsansätze für den Reaktionsverdau, der dem Southern-Blot vorausgeht**

| <i>Ansatz für Hind III</i> |        | <i>Ansatz für Pst I</i> |        |
|----------------------------|--------|-------------------------|--------|
| Aqua dest                  | 16 µl  | Aqua dest               | 16 µl  |
| 10x Puffer                 | 4 µl   | 10x Puffer              | 4 µl   |
| DNA (10 µg)                | 20 µl  | DNA (10 µg)             | 20 µl  |
| Hind III                   | 1,5 µl | Pst I                   | 1,5 µl |

Anschließend wurden neben einem Längenstandard (bestehend aus 30 µl Aqua dest, 2



µl BstE II (1µg) und 4 µl Blue Sucrose) und einer Kontrollprobe mit 45 CGG-Repeats die Proben mit dem Hind III Verdau auf ein 1% Agarosegel (250 ml TES + 25 g Agarose) aufgetragen und bei 120 Volt für eine Stunde vorgelaufen. Dann wurde der Pst-I Verdau auch auf das Gel aufgetragen und für weitere 15 min. Die Spannung bei 120 Volt belassen. Danach wurde die Spannung auf 45 V für einen Lauf über Nacht gesenkt. Am Folgetag wurde das Gel in einem Wasserbad mit Ethidiumromid gefärbt und unter UV-Kontrolle nach Abzeichnung und anschliessender Entfernung der Markerspur vermessen.

Die Depurination der DNA auf dem Gel erfolgte zweimal für 15 Minuten in einer 0,25 mol HCl-Lösung unter konstanter Durchmischung. Anschliessend wurden die DNA-Fragmente in Einzelstränge zerlegt. Dazu wurde das Gel zweimal für 15 Minuten in einen Denaturierungspuffer (100 g NaOH und 438 g NaCl auf 5 l Aqua dest) inkubiert.

Der Aufbau des Blots bestand aus einem halben Bogen Filterpapier der um eine vorher mit Ethanol gereinigte Glasplatte gewickelt wurde, sodaß dessen überstehende Dochte in die mit Blotpuffer (40 g NaOH ad 2,5 l Aqua dest.) gefüllte Plastikwanne tauchten. Das Filterpapier wurde zusätzlich mit dem Blotpuffer übergossen und mit einer Schablone von Unebenheiten befreit. Das für 1 Minute in den Blotpuffer getauchte Gel wurde nun aufgelegt und eine passend zugeschnittene Nylonmembran, die zuvor kurz in Aqua dest. getaucht wurde, darüber gelegt. Oben darauf kam eine dünne Schicht Filterpapier (angefeuchtet) und zwei trockene Schichten dickes Filterpapier. Die nicht von dem Gel bedeckte Auflage wurde nun mit Parafilm abgeklebt um zu verhindern, dass seitlich aufsteigende Feuchtigkeit die Saugwirkung der Filterpapiere beeinträchtigte. Zu guter Letzt wurde ein dicker Stapel Zellulosestoff auf den Blotaufbau gelegt und mit einer weiteren Glasplatte und 1 kg Gewicht beschwert.

Nach vier Stunden wurde der Blot wieder abgebaut und die Nylonmembran zur Entfernung von Agaroseresten mit 2x SSPE, pH 7,4 (20x SSPE: 175,3g NaCl, 27,6g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, 7,4 g EDTA auf 1 Liter Aqua dest) für eine Minute gespült und bei

80°C für zwei Stunden im Ofen getrocknet.

15 ml Prähybridisationsmix bestehend aus 67,5% Aqua dest, 25% 20x SSPE, 5% 100 x Denhard's Lösung und 2,5% 20 x SDS wurde bei 65°C im Wasserbad gelöst und nach Zugabe von 30 µl Lachs-Spermien-DNA mit der aufgerollten Membran über Nacht prähybridisiert.

Für die Herstellung der markierten Probe wurden 6 µl Aqua dest. mit 1µl der Sonde Ox0,48 (100µg /ml) für 5 min. gekocht und anschließend auf Eis 2 µl Hexaprimer und der dazugehörige 10x Puffer, 3µl Mix aus ATP, GTP, TTP, 5µl radioaktiv markiertes CTP\* und 2 µl Klenow-Enzym hinzugegeben und für 1 Stunde im Wasserbad inkubiert. Abschließend erfolgte die Abstopfung mit 2 µl EDTA.

Die Aufreinigung erfolgte an einer Säule bestehend aus einer 1 ml Einwegspritze, die am Ausfluß mit Glaswolle abgedichtet wurde und mit 1 ml Sephadex G-50 aufgefüllt wurde. Diese wurde über eine 1,5ml Plastikkuvette in ein 15 ml Probenröhrchen eingehängt. Nach Zentrifugation mit 1000 rpm fiel der Füllstand auf 0,8 – 0,9 ml, sodass noch einmal mit Sephadex G-50 nachgefüllt werden musste. Anschliessend wurde die Säule dreimal mit TE-Puffer gespült und bei 1000 rpm erneut zentrifugiert, bevor die markierte Probe aufgetragen wurde. Nun wurde die Säule für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und mit 500 µl TE-Puffer gepült und erneut für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Zur Kontrolle wurde die nun aufgereinigte markierte Probe am Szintillationszähler gemessen. Mit  $1,2 \times 10^6$  cpm / ml befand sie sich im optimalen Bereich.

Bei der eigentlichen Hybridisation wurde wie folgt vorgegangen: Die markierten Probe und der Prähybridisationsmix vom Vortag wurden für 7 min getrennt gekocht und dann zusammengeschüttet und für weitere 8 min gekocht, bevor die Mischung in eine Glassäule übertragen wurde. Die Nylonmembran aus dem Blot wurde auf einen Teflonstab gewickelt und so in die Glassäule hinzugegeben, dass die Membran locker in

der Lösung schwimmen konnte. Die Hybridisation erfolgte bei 65°C über Nacht im Wasserbad.

Die Nylonmembran wurde am Folgetag kurz in 2 x SSPE / 0,1% SDS bei Raumtemperatur geschwenkt und anschließend in vorerhitzter 1 x SSPE / 0,1% SDS 45 min im Wasserbad bei 65°C übertragen. Zuletzt wurde es in 0,1 x SSPE / 0,1% SDS je nach Aktivität (Kontrolle am Szintillationszähler) zwischen 10 min und 2 h im Wasserbad bei 65°C gelagert. Vor dem Einkleben in die Röntgenfilmkassette wurde die Nylonmembran in Frischhaltefolie eingepackt. Die Entwicklung erfolgte bei -70°C für 50 Stunden.

## **Ergebnisse und Statistische Auswertung**

### **Probenzusammenstellung**

Für die Analyse in dieser Arbeit stand die isolierte DNA von 936 Patienten, bestehend aus 520 weibliche Proben und 416 männliche Proben zur Verfügung. Zur Methodenetablierung wurde CEPH-DNA aus dem Referenzbestand des Centre d'Etudes Polymorphisme Humain verwendet. Die Validierung erfolgte mit 9 Referenzproben, eines externen Labors ( Gregor-Mendel-Laboratorien Neu-Ulm).

### **Optimierung der PCR-Bedingungen**

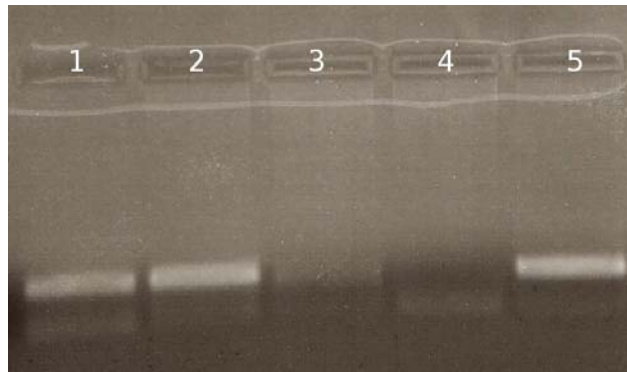
Die Amplifikation der CGG-Abschnitte innerhalb FMR1 erforderte zunächst die Ermittlung optimaler PCR-Bedingungen für die Primerpaare, da der CG-Anteil mit 88,6% eine besondere Herausforderung darstellt. Die Primer selbst wurden so gewählt, dass sie möglichst nahe an den CGG-Triplets sitzen, um die Fragmentgröße aufgrund der erwarteten Expansion der positiven Proben so klein wie möglich zu halten.



**Tabelle 12: Übersicht der ermittelten Annealingtemperaturen für eine Gradienten-PCR mit unterschiedlicher Reagenzienzusammensetzung**

| <i>PCR #</i> | <i><math>\Delta T^{\circ}\text{C}</math></i> | <i>Gradient (4min)</i> | <i>Denaturierung (20s)</i> | <i>Extension (6min)</i> | <i>Pyrrolidinone</i> | <i>MgCl<sub>2</sub></i> | <i>DNA</i> | <i>Optimum</i> |
|--------------|--|------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|------------|----------------|
| 4            | 3°C/s  | 50,3°C-59,8°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | -                       | 141806     | -              |
| 5            | 3°C/s  | 60,5°C-76,9°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | +                       | 141806     | -              |
| 5            | 3°C/s  | 60,5°C-76,9°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | -                       | 141806     | 63,2°C         |
| 7            | 3°C/s  | 50,3°C-59,8°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | +                       | 141806     | 51,7°C         |
| 8            | 3°C/s  | 60,0°C-78,5°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | -                       | 141806     | 63,2°C         |
| 16           | 3°C/s  | 50,3°C-59,9°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | +                       | 141806     | 51,7°C         |
| 17           | 3°C/s  | 50,3°C-59,9°C          | 95°C                       | 69°C                    | +                    | +                       | 141806     | -              |
| 20           | 3°C/s  | 60,3°C-69,8°C          | 95°C                       | 69°C                    | +                    | -                       | 141806     | -              |
| 20           | 3°C/s  | 60,3°C-69,8°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | -                       | 141806     | 64,3°C         |
| 23           | 3°C/s  | 55,3°C-64,8°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | -                       | 03/1325    | -              |
| 24           | 1°C/s  | 55,3°C-64,8°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | -                       | 141806     | 59,9°C         |
| 25           | 3°C/s  | 55,3°C-64,8°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | -                       | 03/0754    | -              |
| 26           | 3°C/s  | 55,3°C-64,8°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | -                       | 03/1279    | -              |
| 27           | 3°C/s  | 55,3°C-64,8°C          | 95°C                       | 69°C                    | -                    | -                       | 03/1205    | 63,5°C         |

Die optimale Annealing Temperatur wurde mit 63°C bei oben gezeigtem Protokoll ermittelt. Die Verifikation des Protokolls mit unterschiedlichen Proben (Prämutation / Vollmutation) erbrachte allerdings dieselben Fragmentgrößen, sodaß von einem „mispriming“ der HotStar Taq ausgegangen werden muss.



**Abb. 6: Bande 1: CEPH-DNA No 141806 mit 134bp entsprechend 29 Repeats, Bande 2: DNA No 03/0754a, erwartet werden zwei Fragmente ~135/~235, Bande 3: No 03/1279 ein Fragment ~173 erwartet, Bande 4: No 03/1325 Vollmutation, keine Bande erwartet, Bande 5: No 03/0754b (B-Probe). Alle Banden entsprechen einem 130bp großen Amplifikat.**

Die Modifikation der DNA mit Natriumbisulfid nach Clark, bei der Cytosin gegen Uracil ausgetauscht wird, ermöglicht den Einsatz robusterer Primer.<sup>173</sup> Ein modifiziertes Protokoll nach Zhou (2004) wurde mit einem entsprechenden Primerpaar, welches die ausgetauschten Thyminbasen berücksichtigt, erprobt.

```

13681 cagcgggccc ggggttcggc ctcagtcagg cgctcagctc cgtttcgggt tcacttcagg
      >>> >>>>>>>>> >>>>>>>>> >>>>>>>>
13741 tggagggccc cctctgagcg ggcggcgggc cgacggcgag cgcgggcggc ggcggtgacg
13801 gaggcgccgc tgccaggggg cgtgcggcag cgcgggcgcg gcggcgggcg cggcgggcggc
13861 ggaggcggcg gcggcggcgg cggcggcggc ggctgggcct cgagcgcccc cagcccacct
      < <<<<<<<<<<
13921 ctcgggggcg ggctcccggc gctagcaggg ctgaagagaa gatggaggag ctggtggtgg
      <<<<<<<<<< <<<<<
13981 aagtgcgggg ctccaatggc gctttctaca agtacttgg ctctagggca ggccccatct

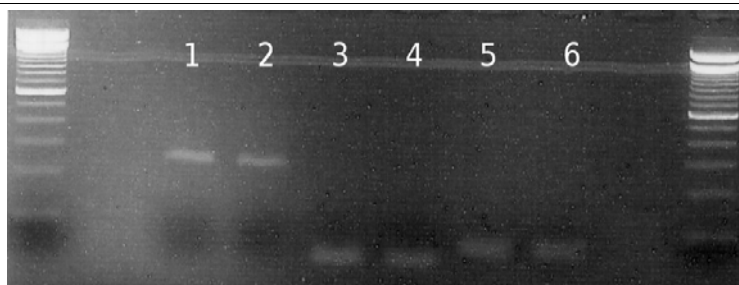
```

**Abb. 7: Position der Primer Non-Met-F-hum und Non-Met-R-hum innerhalb FMR1. Die Primer binden an den Antisense-Strand, der in Gegenwart von Natriumbisulfit aus dU umgewandelten dC-Residuen besteht. Die Uracil-Basen werden in der PCR wieder in Thymin umgewandelt. Der grau hinterlegte Bereich markiert die CGG-Triplets. Das Amplifikat besteht aus 168bp + 3n für jedes Triplet.**

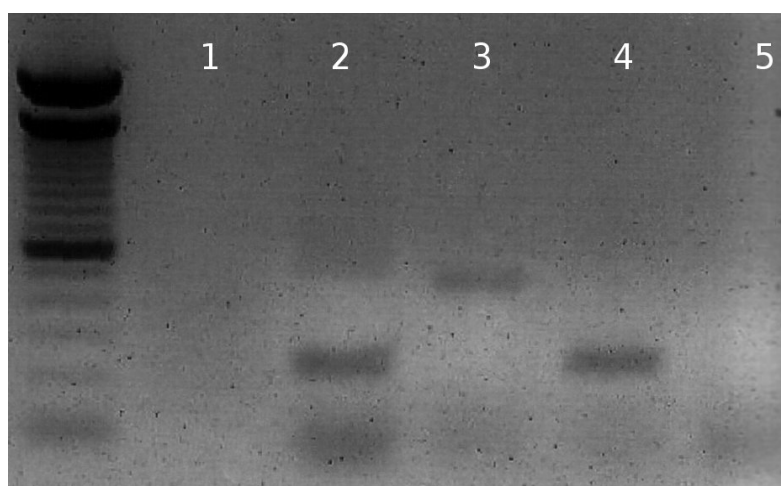
Hierzu wurde jeweils 1ng DNA in einem Endvolumen von 5µl mit NaOH in einer

Endkonzentration von 0,3 M für 15min bei 55°C denaturiert. Anschliessend wurden 75µl vorgewärmtes Natriumbisulfid (hergestellt aus 0,6g Natriumbisulfid in 45µl 10 M NaOH auf 1ml mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt) hinzugegeben und 55°C für fünf Stunden auf dem Thermomixer inkubiert. Anschliessend wurde die Mischung auf der Amersham GFX<sup>TM</sup> Säule aufgereinigt und mit 50 µl Tris-EDTA eluiert. Anschliessend erfolgte eine Desulfonierung mit 50µl 0,2 M NaOH für 15min bei 37°C. Nach Neutralisation mit 0,2 M Tricin wurde die Mischung erneut auf einer GFX-Säule aufgereinigt und mit 50 µl Tris-EDTA bei pH 8,0 eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Als besonders problematisch erwies sich der Vorbehandlung mit Natriumbisulfid nachfolgende Aufreinigungsschritt mit Amersham GFX<sup>TM</sup> Säulen. Trotz dem Einsatz verschiedenster Säulen (für genomische DNA, Plasmide etc...) konnten die Ergebnisse nicht in derselben Qualität wie in der Publikation reproduziert werden. Auch der Einsatz von 2ng DNA zu Beginn und Verdoppelung des ursprünglich von 15 µl vorgesehene PCR-Produkt pro Tasche im Ethidiumbromidgel erbrachte keine Verbesserung. Die spektrometrisch gemessene DNA-Ausbeute nach der Vorbehandlung betrug zwischen 0-15% der ursprünglich eingesetzten DNA-Menge und genügt nicht den Ansprüchen einer zuverlässig reproduzierbaren Screening-Methode, geschweige denn des geplanten Einsatzes in der Routinediagnostik.



**Abb. 8: Bande 1+2: CEPH-DNA No 141806 mit ~250bp entsprechend 27 Repeats, Bande 3+4: Erwartete Dimerbildung der Primer für methylierte DNA-Abschnitte, Bande 5+6: Erwartetes Fehlen eines Schmiere, da eine Amplifikation nur direkt aus einer methylierten DNA möglich ist. Links und rechts: 100bp Längenstandards**



**Abb. 9: Bande 2: DNA No 04/118 mit ~230bp und ~500bp entsprechend 27 und 110 Repeats und damit einer weiblichen Prämutation, Bande 3: DNA No 04/119 mit ~500bp entsprechend 110 Repeats (männliche Prämutation), Bande 4: DNA 04/120 mit ~280bp entsprechend 45 Repeats. Es fehlt das andere Allel für 150 Repeats, Bande 5: DNA 04/121: Es fehlt die Bande für eine große männliche Prämutation mit 220 Repeats. Bande 1: Negativkontrolle. Links: 100bp Längenstandard.**

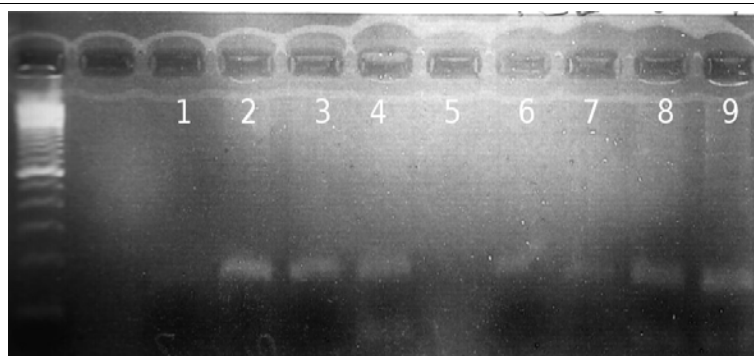
Infolgedessen fiel die Wahl auf die Vent<sub>R</sub><sup>®</sup> (exo-) DNA-Polymerase aus *Thermococcus litoralis*, bei der im Vergleich zur Taq-Polymerase die 3' → 5' proofreading-Aktivität mit gentechnischen Methoden eliminiert wurde und gleichzeitig mit einer Halbwertszeit von 6,7 Stunden bei 95°C explizit für hohe Temperaturen geeignet ist.

Die PCR erfolgt entsprechend dem Protokoll in „Hot Start“-Technik. Hierbei wird die Polymerase zusammen mit den dNTPs, dem Puffer aus 1 M Tris-Sulfat pH 9,0 und dem



Osmoprotektant Betaine als 5µl Bottom Mix mit Wachs überschichtet (Schmelzen der AmpliWax PCR Gems 3min bei 75°C und anschließende Kühlung bei 4°C bis zum weiteren Gebrauch). In 4µl TopMix sind ebenfalls 5 M Betaine, das Formamid 2-Pyrrolidinone 99%, 1 M Ammoniumsulfat und 1 M Magnesiumsulfat und jeweils 20µM der Primer 2381\_F\_FMR1-hum (markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff CY5 von Amersham) und 2382\_R\_FMR1-hum enthalten. Zum Schluss werden jeweils 2µl isolierte DNA (entsprechend ~150ng) hinzugegeben. Die Vorbereitung erfolgt auf Eis, nach kurzem Zentrifugieren bei 900 rpm werden 14 Zyklen mit 5 sec bei 98,5°C, 4min bei 56°C und 6min bei 69°C gefolgt von 15 weiteren Zyklen, bei denen die Denaturierungstemperatur bei jedem Zyklus um 0,1°C angehoben wird, ausgeführt. Das Produkt wird bei 4°C im Kühlschrank bis zur Kapillarelektrophorese oder dem Auftragen auf ein Ethidiumbromidgel aufbewahrt.

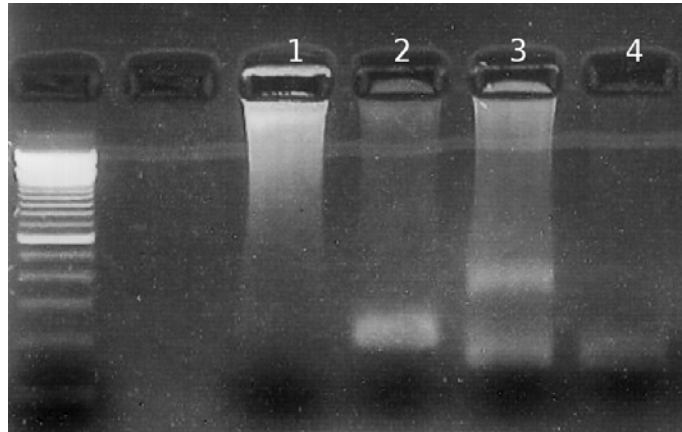
Ziel der Optimierung war auch die Ermittlung der  $\Delta T^{\circ}\text{C}$ , für die die PCR-Ausbeute am größten ist. Darunter versteht man die Temperaturänderung pro Sekunde zwischen den einzelnen Arbeitsschritten der PCR. Die Software des Gene-Amp PCR System 9700 erlaubt zwei Einstellungsmodi. Mit „Standard“ erhält man eine  $\Delta T^{\circ}\text{C}$  von 3°C/s und mit „9600“  $\Delta T^{\circ}\text{C}$  von 1°C/s.



**Abb. 10: Bande 1-4: CEPH-DNA No 141806 bei  $\Delta T^{\circ}\text{C}$  3°C/s mit ~130bp entsprechend 27 Repeats, Bande 5: Negativkontrolle, Bande 6-9: CEPH-DNA No 141806 bei  $\Delta T^{\circ}\text{C}$  1°C/s mit ~130bp entsprechend 27 Repeats Links : 100bp Längenstandard**

Anhand der Ergebnisse wurde beschlossen, in Zukunft mit der Einstellung „9600“ die

Protokolle durchzuführen. Auch die Kontrolle mit Proben bekannter Grösse verlief erfolgreich.



**Abb. 11: Bande 1: DNA 03/1325 Vollmutation mit 350 Repeats, wie erwartet nicht amplifizierbar, Bande 2: DNA 03/1279 ~180bp entsprechend 45 Repeats, Bande 3: DNA 03/1742 ~140bp + ~260bp (30+ 80 Repeats), Bande 4: CEPH-DNA 141806 ~130 bp (27 Repeats). Links : 100bp Längenstandard**

### **Optimierung der Kapillarelektrophorese**

Für die optimale Durchführung der Kapillarelektrophorese sind einige Parameter zu beachten. So muss die DNA entsprechend ihrer Konzentration verdünnt werden, um eine saubere Signalintensität in Relation zum beigemischten Größenstandard zu erhalten. Zur Verwendung kamen ein flüssiges Polyacryamidgel (CEQ Separation Gel LPA-1) und ein Größenstandard bis 600bp von Beckmann Coulter. Die Temperatur in der Kapillare betrug konstant 50°C, die DNA wurde 2min bei 90°C denaturiert, um dann mit einer Spannung von 2.0 kV für 30 sec. injiziert zu werden. Eine zufriedenstellende Diskrimination erhielten man, nachdem die Spannung von 4,8 kV auf 6.0kV und die Separationsdauer von 30min auf 60min angehoben wurde. Eine Verdünnungsreihe für das PCR-Amplifikat von 1:20, 1:40, 1:100 und 1:200 wurde unter allen möglichen Bedingungen getestet:

**Tabelle 13: Übersicht über die Messergebnisse der Kapillarelektrophorese bei den jeweiligen Verdünnungsreihen. + steht für mäßiges, ++ für gutes und +++ für optimale Ergebnisse.**

| <i>DNA</i> | <i>Separation</i> | <i>1:20</i> | <i>1:40</i> | <i>1:100</i> | <i>1:200</i> |
|------------|-------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 141806     | 60m @ 6.0kV       | +           |             |              | +++          |
| 141806     | 60m @ 4.8kV       |             |             |              | ++           |
| 03/0754    | 60m @ 6.0kV       | +/+         | +/+         |              | +++/++       |
| 03/0754    | 60m @ 4.8kV       |             | +/-         | +/-          |              |
| 03/1279    | 60m @ 6.0kV       | +           | +           | +            | +            |
| 03/1279    | 60m @ 4.8kV       |             |             |              |              |
| 03/1205    | 60m @ 6.0kV       | +/+         | +/+         | +/+          | +/+          |
| 03/1742    | 60m @ 4.8kV       |             | +/+         |              |              |
| 03/1742    | 60m @ 6.0kV       | +/+         |             | ++/+++       | ++/+++       |
| 141805     | 60m @ 6.0kV       |             |             | ++           | ++           |
| 03/1325    | 60m @ 6.0kV       |             |             |              |              |

Die besten Ergebnisse wurden bei einer Verdünnung von 1:200 bei einer Separationsspannung von 6.0kV für alle Proben erzielt. Die als Kontrolle verwendete Vollmutation 03/1325 zeigte wie erwartet keinen eindeutigen Peak.

Um die Reproduzierbarkeit der Analysewerte zu überprüfen, wurden die Meßbedingungen für bekannte Größen sieben mal unter identischen Bedingungen wiederholt und anschliessend eine deskriptive statistische Auswertung durchgeführt.

**Tabelle 14: Standardabweichung und Variationskoeffizient für die extern validierten Proben mit unterschiedlichen Repeatanzahlen nach siebenfacher Messung unter identischen Bedingungen.**

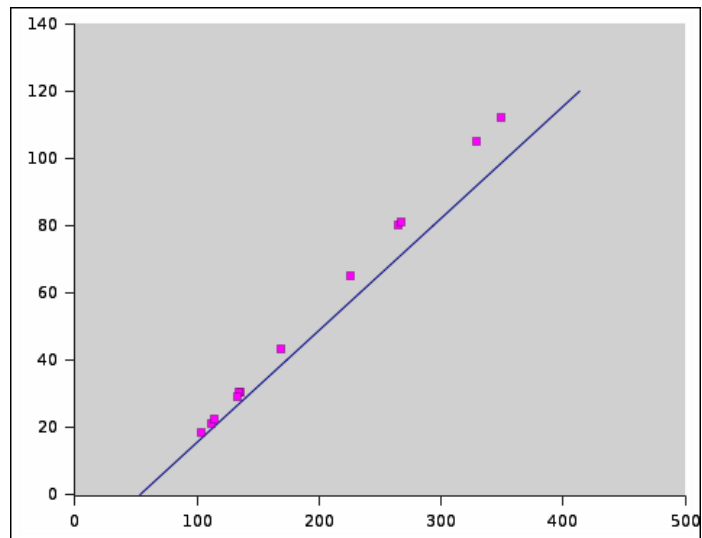
|                                      | <i>(CGG)<sub>21</sub></i> | <i>(CGG)<sub>29</sub></i> | <i>(CGG)<sub>30</sub></i> | <i>(CGG)<sub>31</sub></i> | <i>(CGG)<sub>43</sub></i> | <i>(CGG)<sub>80</sub></i> |
|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Durchschnittliche Fragmentlänge (bp) | 111,9                     | 133,6                     | 135,1                     | 137,3                     | 168,5                     | 264,6                     |
| Standardabweichung (bp)              | 0,5                       | 0,9                       | 0,5                       | 0,3                       | 1,4                       | 1,6                       |
| Variationskoeffizient (%)            | 0,48                      | 0,73                      | 0,42                      | 0,22                      | 0,88                      | 0,60                      |

### Bestimmung der Abweichung und Ermittlung eines Korrekturfaktors

Der Sequenzunterschied und der hohe CG-Anteil beeinflusst die Migration der Proben in der Kapillarelektrophorese, sodass sich gegenüber der standardisierten Längenmarker von Beckman-Coulter eine gewisse Abweichung zwischen Größenbestimmung der Messung und tatsächlicher Größe ergeben kann. Diese Abweichungen wurden gegen die tatsächlichen gemessenen Werte aufgetragen und eine entsprechend lineare ansteigende Abweichung beobachtet. Der ermittelte Migrationsfaktor beträgt 2,6bp pro CGG-Triplett und wird zukünftig bei allen Größenbestimmungen zur Anpassung verwendet. Zuletzt wurden die korrigierten Ergebnisse mit extern bestimmten Meßergebnissen verglichen.

**Tabelle 15: Vergleich der Messergebnisse mit den extern validierten Werten**

| <i>DNA</i> | <i>Geschlecht</i> | <i>Externer Wert</i> | <i>Ergebnis</i>           |
|------------|-------------------|----------------------|---------------------------|
| 04/118     | weiblich          | ~120                 | 18 (105) + 112 (350)      |
| 04/119     | männlich          | ~120                 | 105 (330)                 |
| 04/120     | weiblich          | 140-150              | Kein eindeutiger Peak     |
| 04/121     | männlich          | 200-220              | Kein eindeutiger Peak     |
| 03/754     | weiblich          | 30/70                | 29 (133,92) / 65 (227.35) |
| 03/1279    | männlich          | 44 +/-2              | 43 (170,21)               |
| 03/1325    | männlich          | 350-450              | Kein eindeutiger Peak     |
| 03/1742    | weiblich          | 30/80                | 30 (135,07) / 80 (266.46) |
| 04/672     | weiblich          | 80-90                | 22 (114,71) / 81 (268,13) |



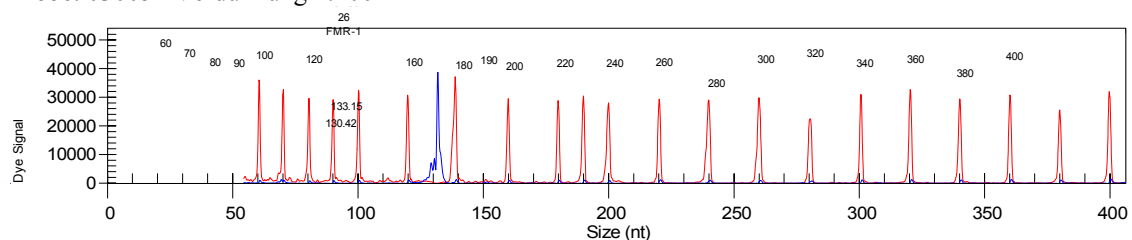
**Abb. 12:** Graphische Darstellung der Migrationsabweichung einzelner Stichproben mit bekannter Größe vom internen Standard des CEQ8000 (durchgezogene Linie). Die X-Achse ist die Fragmentgröße, auf der Y-Achse die Anzahl der CGG-Repeats. Man beobachtet eine mit zunehmender Tripletanzahl steigende Abweichung.

### Meßergebnisse der männlichen Proben

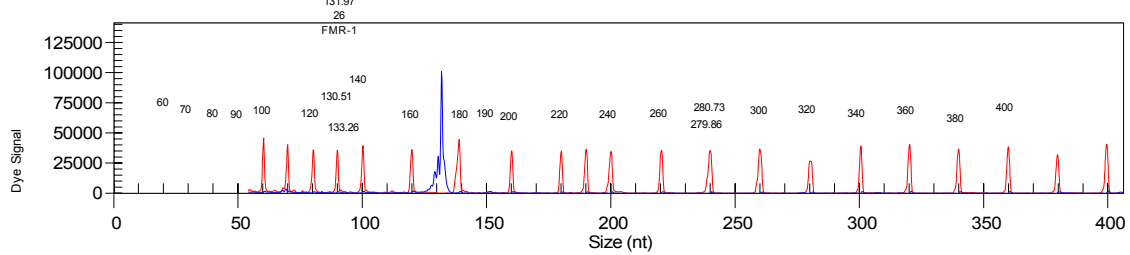
Insgesamt wurden 323 männliche Proben auf die Anzahl der CGG-Repeats analysiert. In der Regel wurden pro PCR entweder 16 oder 32 Proben untersucht und am Folgetag die Kapillarelektrophorese von jeweils zwei PCRs gleichzeitig durchgeführt. Die nun folgenden sechs Elektropherogramme einer Meßreihe vom 10.02.2004 der PCR #51 stehen exemplarisch für alle durchgeführte Messungen mit nur einem Allel:

**Abb. 13a-f:** Graphische Darstellung von exemplarisch ausgewählten Messwerten aus der Kapillarelektrophorese für ein Allel.

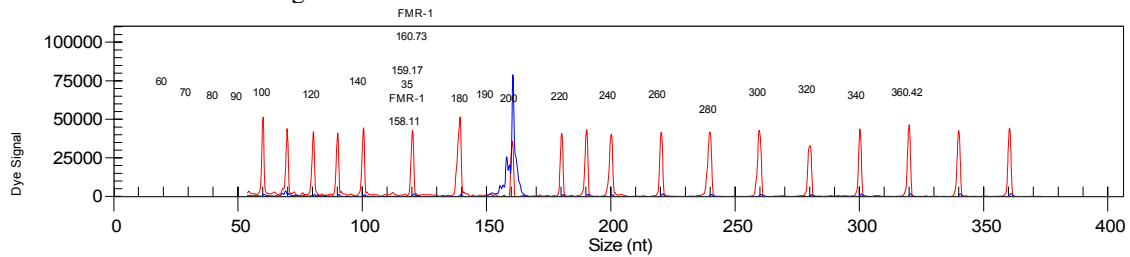
Probe: 030051 Verdünnung 1:200



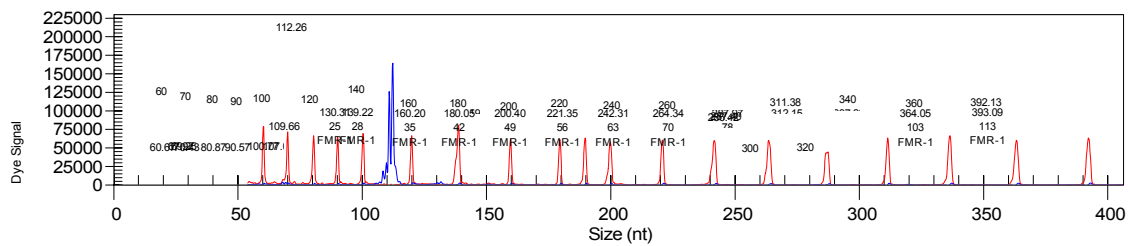
Probe: 030163 Verdünnung 1:200



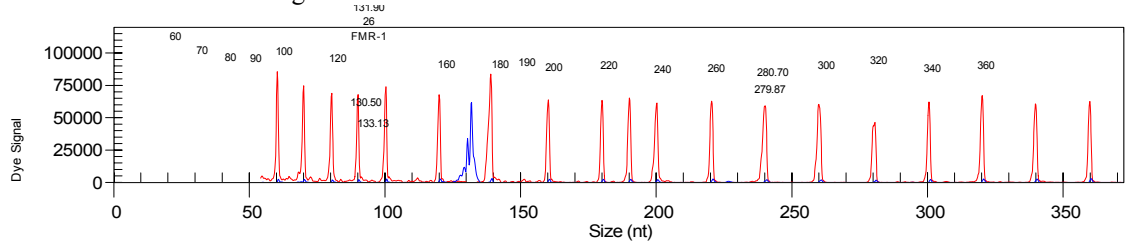
Probe: 030191 Verdünnung 1:200



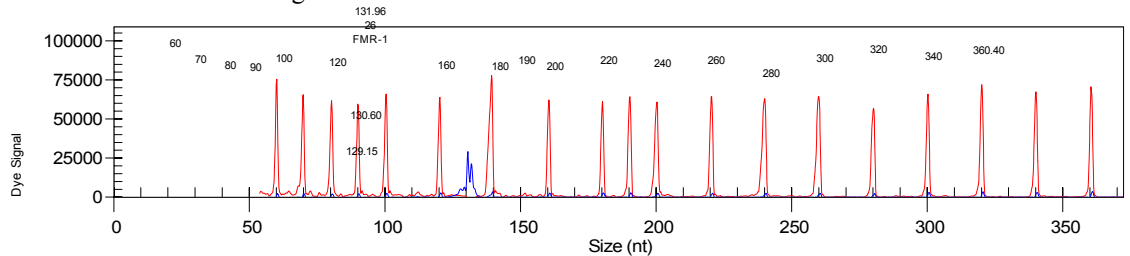
Probe: 030194 Verdünnung 1:200



Probe: 030213 Verdünnung 1:200



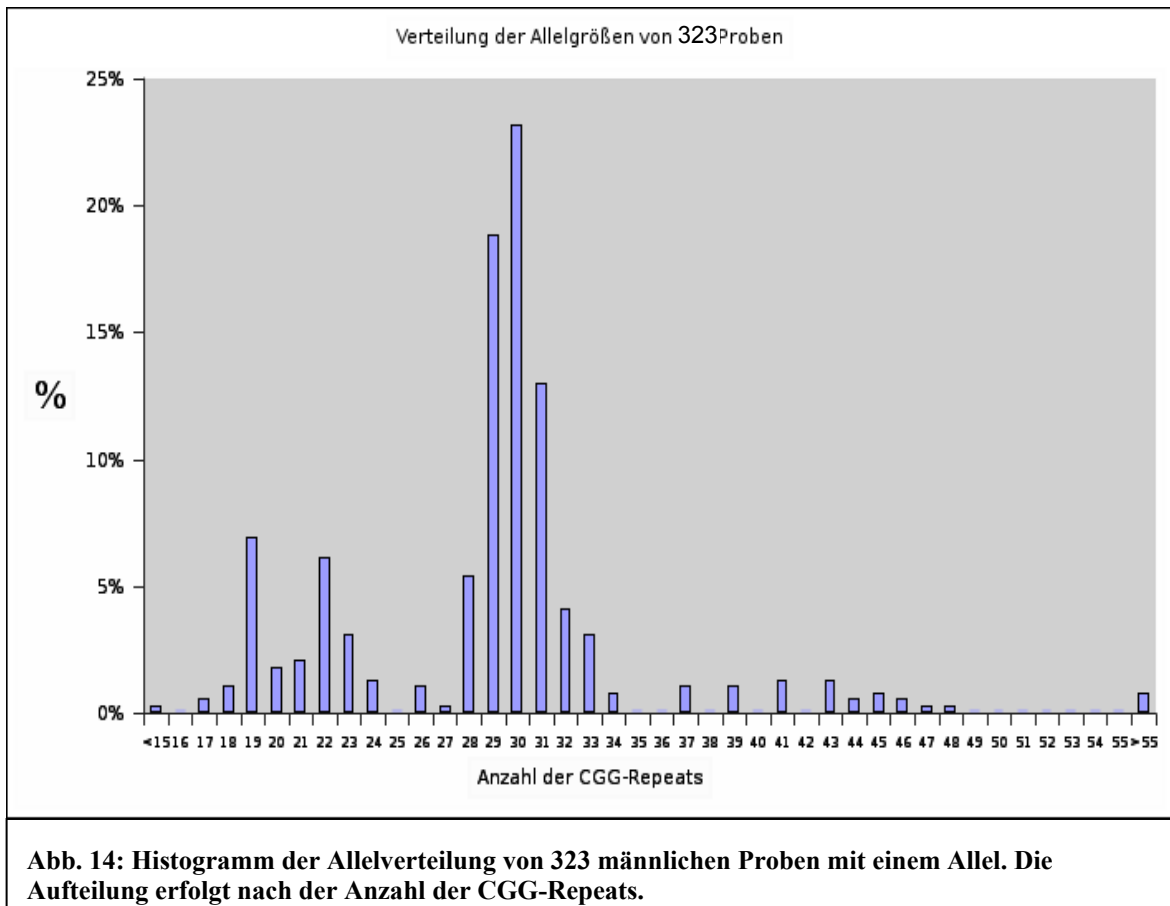
Probe: 030219 Verdünnung 1:200



In 22 Fällen (5,45%) musste sie einmalig wiederholt werden, da entweder der Peak nicht eindeutig genug angezeigt wurde, oder Artefakte die Bildbeurteilung erschwerten.

In 16 Fällen (3,97%) gelang die Amplifikation mittels PCR auch nach mehrfachen

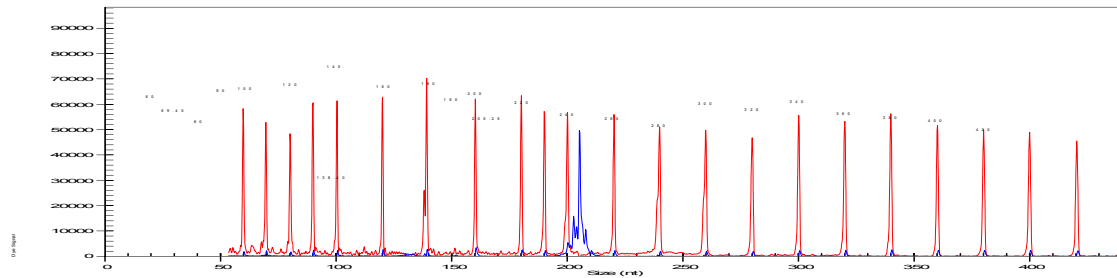
Wiederholungen nicht. Diese Proben wurden markiert und einer Southern-Blot Analyse unterzogen, die weiter unten beschrieben wird. Diese war in sechs Fällen erfolgreich. Es ergaben sich für 323 Proben eindeutige Meßergebnisse, die sich wie folgt verteilen (siehe Abb 14):



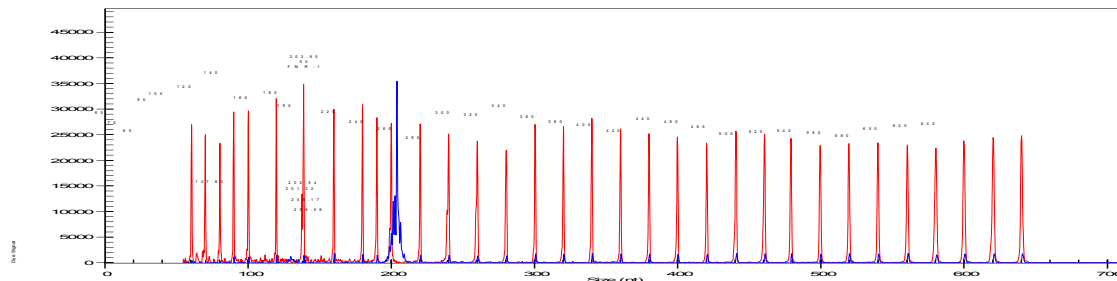
Die kleinste gemessene Fragmentgröße betrug ~91,8bp (entsprechend 13 Repeats), die größte innerhalb des Normalbereiches ~180,3bp (entsprechend 47 Repeats). Es wurden zwei Prämutationen identifiziert mit ~208bp (58 CGG) und ~300bp (93 CGG). Am häufigsten wurden die Allele für 30 Repeats (91 Proben, 23,16%) und 29 Repeats (74 Proben, 18,83%) beobachtet. Zusammen machen sie 41,84 Prozent des gesamten Probenmaterials aus. Bei der Prämutation mit einem 208bp ist der Peak noch recht deutlich zu erkennen (siehe Abb. 15 a, b).

**Abb. 15 a,b: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese für die Prämutation mit 208 bp.**

03 / 524 A-Probe:



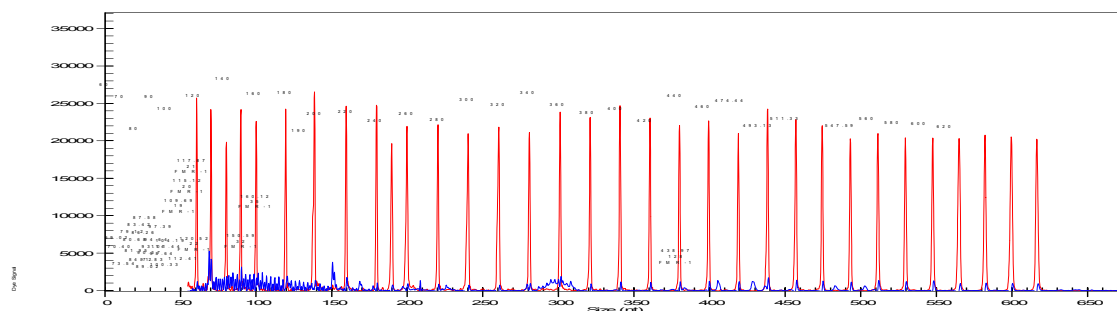
03 / 524 B-Probe



Bei der Prämutation mit 300bp hingegen, bildet sich schon das typische Stottern im Zusammenhang mit einem schwach ausgeprägten Signal, das sich aber aufgrund seiner Symmetrie deutlich von dem Grundrauschen abhebt (siehe Abb. 16 a, b).

**Abb. 16 a,b: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese für die Prämutation mit 300 bp.**

A-Probe SCA 1015



B-Probe SCA 1015

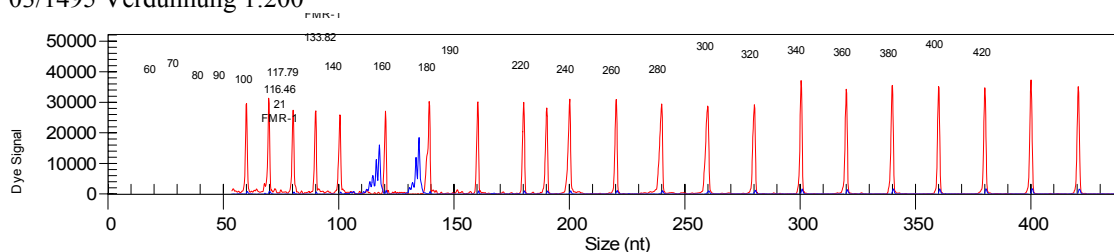


## Meßergebnisse der weiblichen Proben

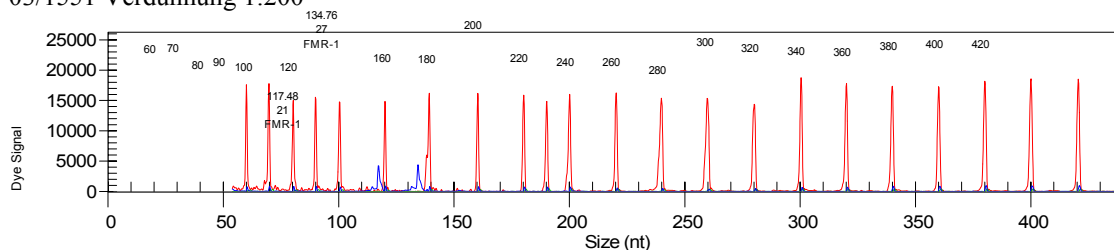
Insgesamt wurden 458 weibliche Proben auf die Anzahl der CGG-Repeats analysiert. Die Vorgehensweise unterschied sich nicht von der Untersuchung der männlichen Proben. Die folgenden sechs Elektropherogramme einer Meßreihe stehen exemplarisch für die Ergebnisse mit zwei Allelen (siehe Abb. 17 a-f).

**Abb. 17 a-f: Graphische Darstellung von exemplarisch ausgewählten Messwerten aus der Kapillarelektrophorese für ein Allel.**

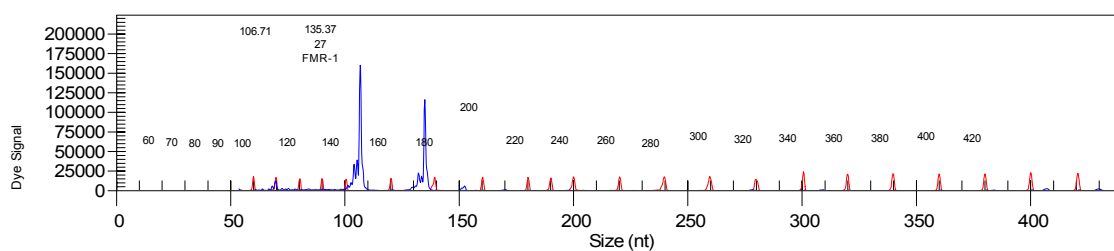
03/1495 Verdünnung 1:200



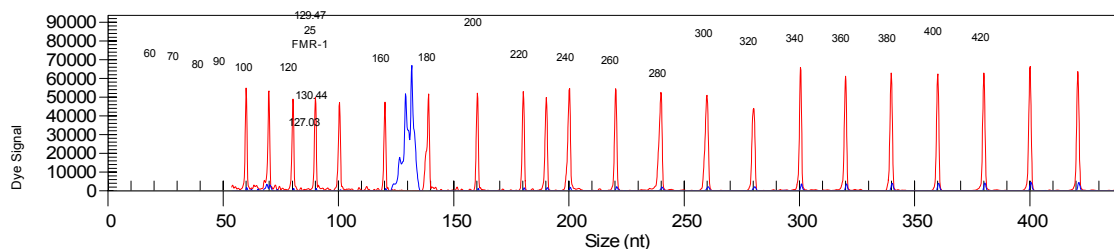
03/1551 Verdünnung 1:200



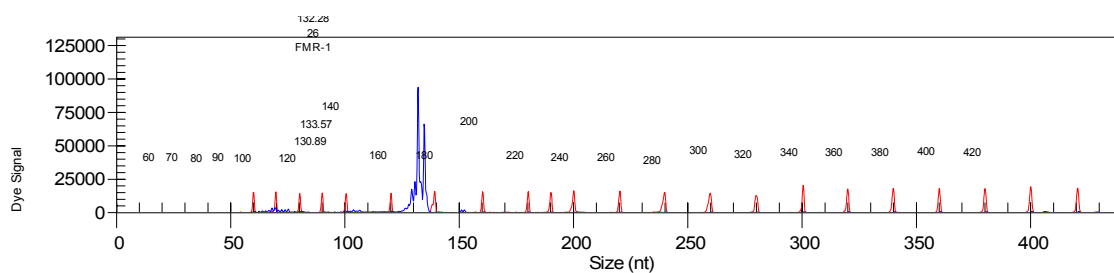
SCA721 Verdünnung 1:200



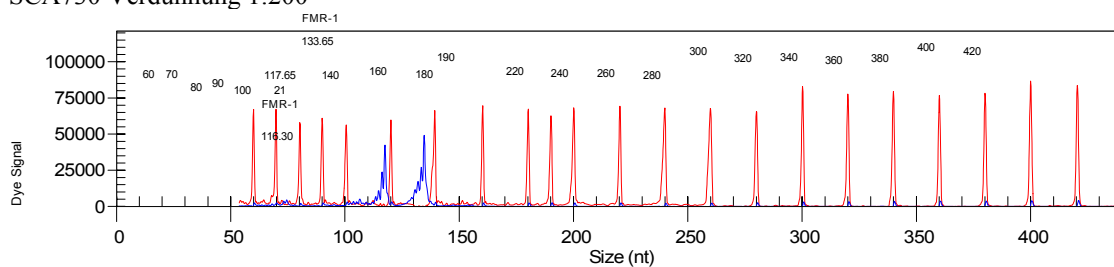
SCA714 Verdünnung 1:200



SCA719 Verdünnung 1:200

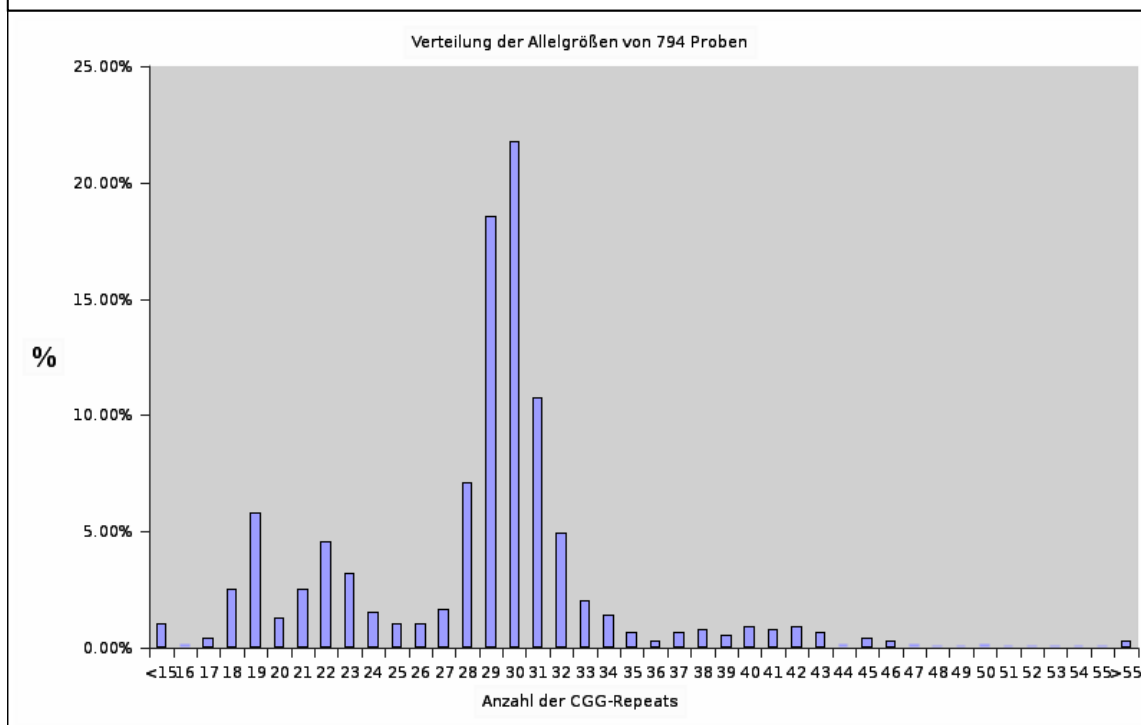


SCA730 Verdünnung 1:200



In 21 Fällen (4,21%) gelang die Amplifikation mittels PCR auch nach mehrfachen Versuchen nicht, sodaß diese Proben einem Southern-Blot unterzogen wurden, der in 10 Fällen erfolgreich verlief. In 120 Proben (24%) wurde nur eine Allelgröße beobachtet, sodaß insgesamt 794 Allele auf ihre Verteilung nach der Länge analysiert werden konnten ( siehe Abb. 18 ):

**Abb. 18: Histogramm der Allelverteilung von 458 weiblicher Proben, davon 120 mit einem Allel. Die Aufteilung der 794 Allele erfolgt nach der Anzahl der CGG-Repeats.**



Die kleinste gemessene Allelgröße betrug 8 CGG Repeats, die größten im Normalbereich 46 CGG-Repeats. Auch hier sind die Allelgrößen 30 (173, 21,8% ) und 29 (147, 18,5% ) am häufigsten vertreten und machen 40,3% aller untersuchten Allele aus. Sortiert man das jeweils kleinere Allel (bei zwei vorhandenen) in eine Gruppe und die größeren der beiden Allele in eine zweite Gruppe so beobachtet man ähnliche Werte für Median und Standardabweichung.

**Tabelle 16: Median und Standardabweichung für die weiblichen Proben (zwei Allele).**

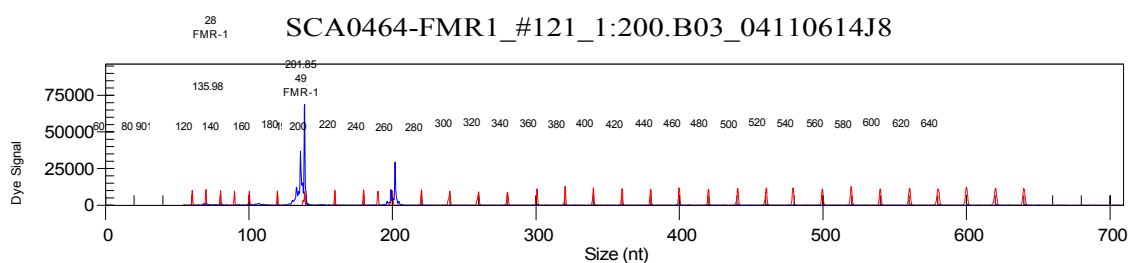
|                    | <i>Kleinere Allele</i> | <i>Größere Allele</i> |
|--------------------|------------------------|-----------------------|
| Anzahl             | 458                    | 337                   |
| Median             | 28,04                  | 29,89                 |
| Standardabweichung | 4,93                   | 6,56                  |
| Min/Max            | 8/40                   | 19/114                |

Es wurden zwei Prämutationen gefunden. Im ersteren Fall waren die Fragmentgrößen

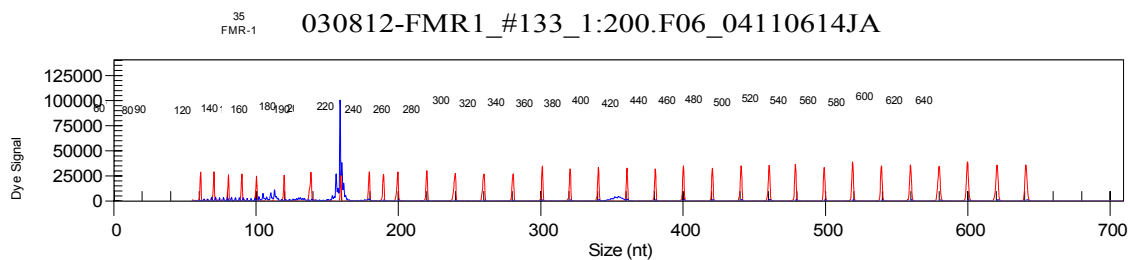
139,4 bzw. 201,8bp entsprechend 31/55 CGG-Repeats. Im zweiten Fall wurden 161,72 bzw. 355bp gemessen, entsprechend 40/114 CGG-Repeats. In beiden Fällen existiert jeweils nur eine DNA-Probe, sodaß hier der Vergleich zwischen A und B-Probe entfallen musste (siehe Abb 19 a, b).

**Abb. 19 a,b:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese für die Prämutation mit 300 bp.

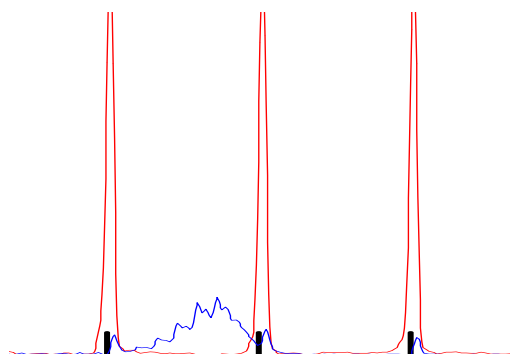
Probe SCA464 (31/55 CGG Repeats)



Probe 03/812 (40/114 CGG Repeats):

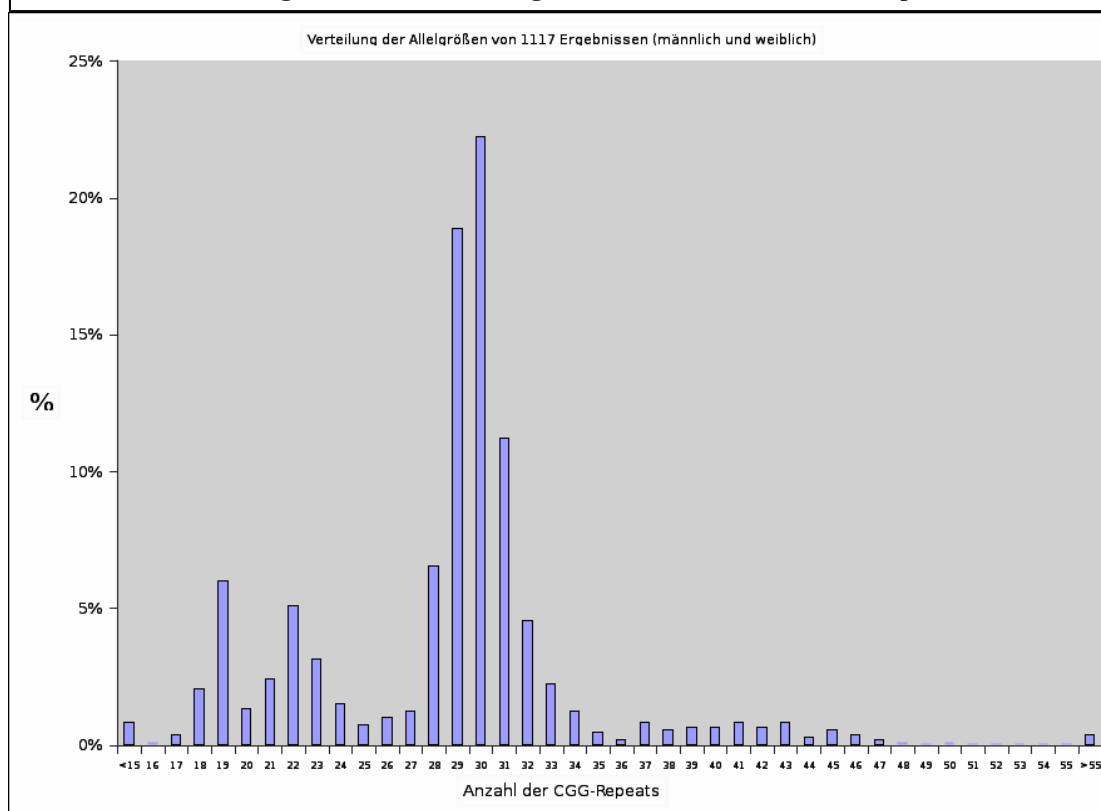


**Abb 20:** Vergrößerter Ausschnitt aus der Abbildung 19b (Fall 03/812). Man erkennt das symmetrische Stottersignal mit einem Maximum bei 355bp.



Zusammenfassend eine Übersicht der Allelverteilung aller gemessenen Proben (männlich und weiblich). Wie bereits bei der getrennten Darstellung ersichtlich, sind die Allele 29 und 30 am häufigsten vertreten mit einer Schulter bei 19 und 22 CGG-Triplets (siehe Abb 21 ).

**Abb. 21: Histogramm der kombinierten Allelverteilung von männlichen und weiblichen Proben. Die Aufteilung der 1117 Allele erfolgt nach der Anzahl der CGG-Repeats.**



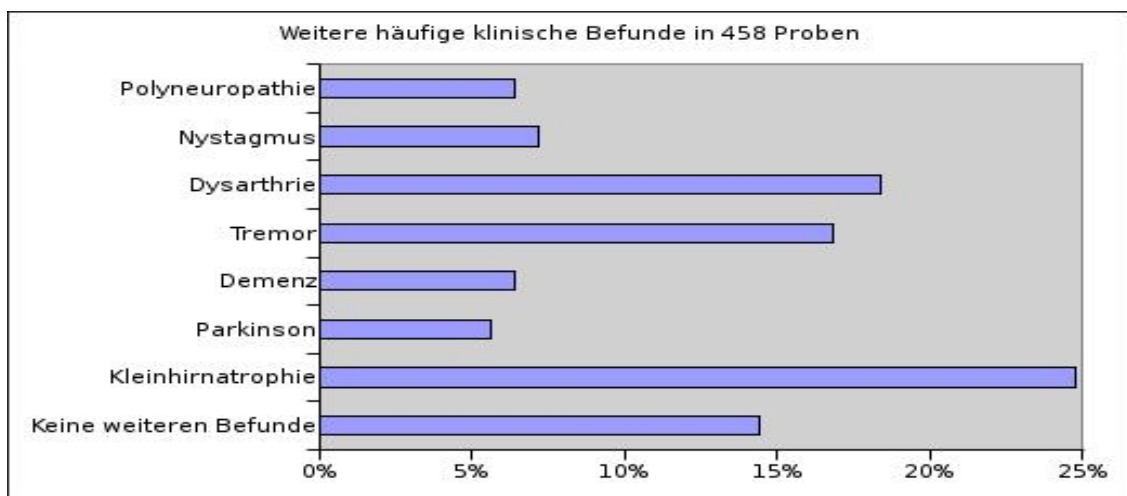
### Klinische Daten der Studienteilnehmer

Von den Proben 323 männlicher und 458 weibliche Studienteilnehmer wurden nun anhand der Krankenakten die klinischen Daten ausgewertet. Eine Aufteilung der weiteren klinischen Befunde neben Ataxie (100%) finden sich in Abb.22a und b.

**Abb. 22a: Weitere klinische Befunde 323 untersuchten männlichen Proben**



**Abb. 22b: Weitere klinische Befunde 458 untersuchten weiblichen Proben**



### **Klinische Daten der Prämutationsträger**

Patient 1 (männlich, 58 CGG Repeats) leidet seit seinem 30. Lebensjahr unter einer langsam progredienten rein cerebellären Ataxie. Kernspintomographische Aufnahmen zeigen eine milde Kleinhirnatrophie ohne T2-Hyperintensitäten in den zerebellären Pedunkeln.

Patient 2 (männlich 93 CGG Repeats) entwickelte im Alter von 45 Jahren einen

Intentionstremor gefolgt von Ataxie, die sich in den nächsten 20 Jahren weiter verschlechterten. Im einer Kernspintomografie wurde eine Kleinhiratrophy festgestellt.

Patient 3 (weiblich, 55 CGG Repeats), 32 Jahre, keine Daten bekannt, da für weitere Untersuchungen nicht mehr rekrutierbar.

Patient 4 (weiblich, 144 CGG Repeats), 53 Jahre ist seit vielen Jahren ein unklares zerebelläres Okulomotoriusyndrom bekannt, jetzt zusätzliches Auftreten einer Ataxie seit 1 Jahr. Eine Kernspintomografie wurde nicht durchgeführt.

### **Altersverteilung der zu untersuchenden Kollektive**

Von großer Bedeutung ist insbesondere das Alter der zu untersuchenden Kollektive, da für FXTAS altersbedingt unterschiedliche Prävalenzen bekannt sind. Zum Zeitpunkt der Messung betrug der Median für die Männlichen Proben 55 Jahre, 146 Patienten befanden sich innerhalb des 1. und 3. Quartils. Unterhalb der 25. Perzentile ( 44 Jahre) waren 81 Patienten; oberhalb der 75. Perzentile ( 62 Jahre ) 92 Patienten. Von der Diagnose bis zur genetischen Testung vergingen im Schnitt 7,7 Jahre, sodaß der Median für den Erkrankungsbeginn bei Männern bei 52 Jahren (Standardabweichung  $\sigma = 15,9$ ) liegt. Bei den weiblichen Proben betrug der Median zum Zeitpunkt des Testes 57 Jahre, 101 Patientinnen befanden sich innerhalb des 1. (42 Jahre) und 3. (63 Jahre) Quartils, während sich 59 Patientinnen oberhalb und 53 unterhalb des Quartilsabstandes befanden.

Auf das Gesamtkontingent bezogen, machen die Prämutationen bei den Männern 0,62% der Fälle, bei den Frauen 0,43% der Fälle aus. In der Gruppe oberhalb 50 Jahre sind dies 0,55% der Fälle (Männer), bzw. 0,52% der Fälle (Frauen).

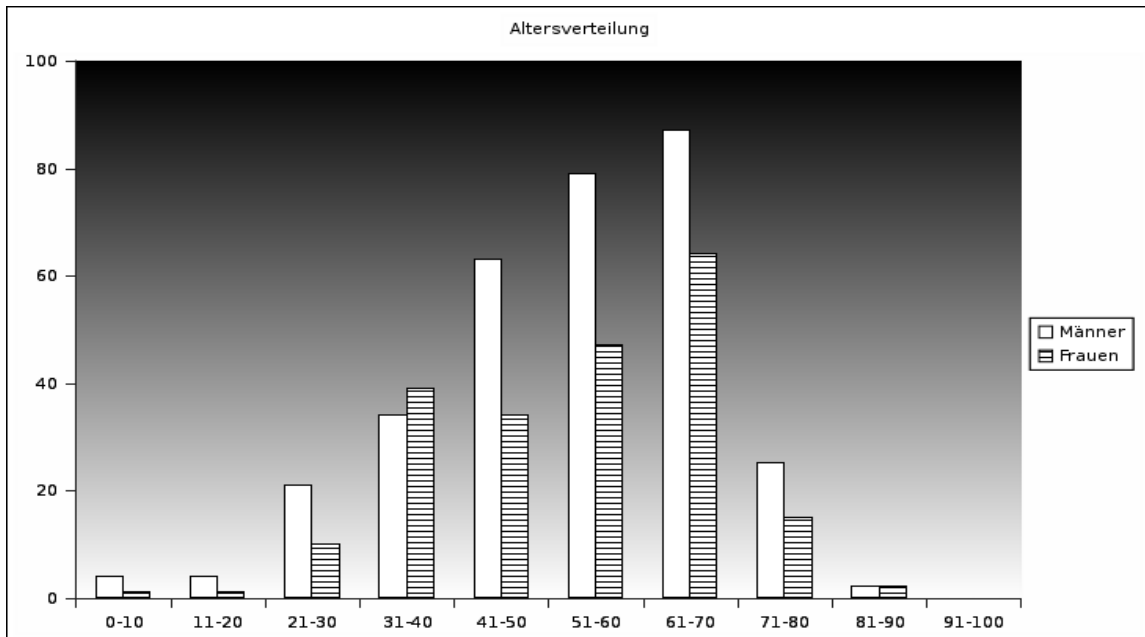


Abb. 23: Vergleich der Altersverteilungen in den Kollektiven Männer und Frauen.

Als Kontrolle wurden 50 Patienten mit spinocerebellärer Ataxie mit bekannter Mutation für SCA1 (4 Proben, 8%), SCA2 (5 Proben, 10%), SCA3 (17 Proben, 34%), SCA6 (22 Proben, 44%) und SCA17 (2 Proben, 4%) ebenfalls untersucht und hinsichtlich ihrer Verteilung der Allelgrößen mit den Fällen von sporadischer Ataxie verglichen. Es ergab sich keine signifikante Abweichung (siehe Abb. 24).

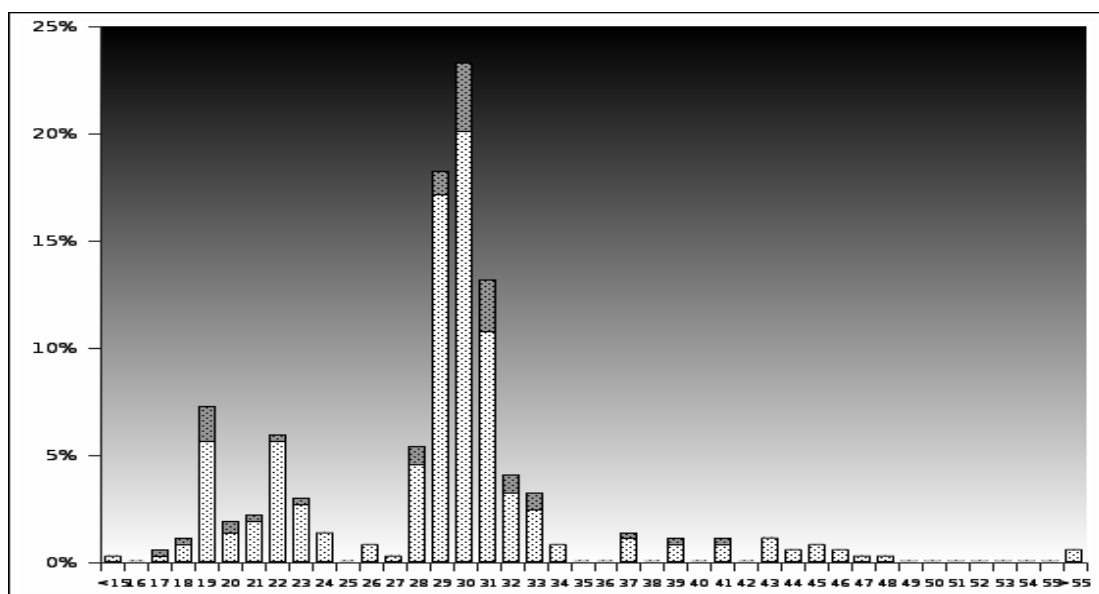


Abb. 24: Gesamtverteilung von 373 Allelgrößen (weiß: sporadische Ataxie, grau: SCA)



## **Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob eine Prämutation des FMR1 Gens innerhalb einer Gruppe kaukasischer Patienten mit sporadischer Ataxie für die klinische Symptomatik verantwortlich gemacht werden kann, dies hätte gegebenenfalls eine Reevaluation der molekulargenetischen Differentialdiagnostik zur Folge. Zusätzlich sollte eine zügig durchzuführende und gleichzeitig dennoch robuste Nachweismethode für die Anzahl der CGG-Triplets im FMR1 Gen im Labor des Institutes für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen etabliert werden. Sie sollte eine routinemässige Ausschlussdiagnostik eintreffender Proben innerhalb von zwei Tagen ermöglichen und gleichzeitig das semiautomatische Screening einer großen Probenanzahl auf das Vorhandensein einer Prämutation ermöglichen. Anhand eines großen Patientenkollektives sollte die etablierte Methode auf ihre Aussagekraft hin geprüft werden und durch Vergleich mit externen Ergebnissen und der Ermittlung eines Korrekturfaktors für den hohen CG-Anteil einen entsprechenden Qualitätsstandard sicherstellen, der den Leitlinien des Berufsverbandes Medizinische Genetik für die FRAXA-Diagnostik entspricht.

In dieser Arbeit wurde ein Testsystem entwickelt, das mit hoher Reproduzierbarkeit (1) die genaue Bestimmung der Repeatanzahl der Normalallele und Prämutationsbereiche bis ~120 CGG-Triplets ermöglicht, (2) ein hohes Diskriminationsvermögen der weiblichen Allele aufweist und (3) eine Ausschlussdiagnostik innerhalb von 24 Stunden für maximal 96 zu untersuchende Proben erlaubt.

Bis zum Ende dieser Studie wurden insgesamt 458 weibliche Proben und 323 männliche Proben mit Verdacht auf spinocerebelläre Ataxie mit einer fluoreszenzmarkierten PCR untersucht. Für 22 weibliche und 16 männliche Proben wurde anschliessend ein Southern-Blot durchgeführt.

### **Diskussion der PCR**

Für die Bestimmung der CGG-Repeatanzahl mittels PCR existieren inzwischen unterschiedliche Strategien, wie trotz dem aussergewöhnlich hohen CG-Anteil und des

damit verbundenen Potential zur Ausbildung von Sekundärstrukturen ein zufriedenstellendes Amplifikat erzielt werden kann. Die ersten veröffentlichten Protokolle verwenden alle 7-deaza-GTP anstelle von dGTP, um die Ausbildung von Hoogsteen-Bindungen zu verhindern, werden aber mit dem Nachteil erkaufte, sich im Agraosegel nicht mit Ethidiumbromid anfärben zu lassen.<sup>174 175 176</sup> Der dadurch notwendige Einsatz von Gelelektrophorese, nachfolgenden Blotten und Einsatz einer radioaktiv markierten Probe erfordert das Vorhandensein eines Isotopenlabors und aufgrund der kurzen Halbwertszeit eine regelmässige Neuanschaffung des Isotops. Der Ersatz durch Silberfärbung<sup>177</sup>, Dioxigenin-markierten<sup>178</sup> oder biotinylierten<sup>179</sup> Sonden täuscht nicht darüber hinweg, daß das Verfahren für ein Screening von einer großen Probenanzahl zu aufwendig ist. Auch alternative PCR-Ansätze mit der extrem thermostabilen *exo(-)Pfu*-Polymerase mit höheren Temperaturen, unter denen die Ausbildung von Sekundärstrukturen und damit die Entstehung von Schattenbanden durch Lesefehler der Polymerase erschwert ist, ermöglicht zwar den teilweise Einsatz von dGTP und damit die direkte Anfärbung im Gel.<sup>180</sup> Allerdings beobachtet man hier, wie bei vielen anderen Protokollen auch das Problem, dass in weiblichen Proben das normal grosse (kurze) Allel bevorzugt amplifiziert wird und somit bei Nachweis von nur einer Bande ein Southern-Blot angeschlossen werden muss. Die Kapillarelektrophorese in Kombination mit der ebenfalls thermostabilen *pwo*-DNA Polymerase oder dem Expand Long Template System (Roche) und fluoreszenzmarkierten Primern stellt eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Arbeitseffizienz dar, erfordert jedoch noch einen Aufreinigungsschritt zwischen PCR und Elektrophorese.<sup>181 182</sup> Erste Versuche mit *Taq* Polymerase mit verschiedenen Additiven ermöglichte zwar eine Amplifikation der Normalallele, führte jedoch zu Lesefehlern bei den Prämutationen. Auch der Einsatz derselben Polymerase in einem kürzlich veröffentlichten Triple-PCR Protokoll, das durch Vorbehandlung mit Natriumbisulfid gleichzeitig die Bestimmung des Methylationsstatus erlaubt, brachte in unserem Labor nicht das gewünschte Ergebnis.<sup>183</sup> Beim Aufreinigungsschritt der DNA war der Probenverlust trotz Einsatz unterschiedlicher GFX<sup>TM</sup>-Säulen zu hoch, sodass die Signalintensität der Banden im Agarosegel nicht den Ansprüchen eines zweifelsfreien Nachweises entsprach. Zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse wurden mit der ohne proofreading-Aktivität ausgestatteten *VentR* (*exo*-) DNA Polymerase

(ohne proofreading-Aktivität) unter optimierten Bedingungen erzielt. Hierzu gehört das Aminosäureanalogon Betain, welches als natürlicher Osmoprotektant, die Schmelztemperatur CG-reicher Sequenzen absenkt<sup>184</sup> und die Denaturierung der Polymerase bei hohen Temperaturen verhindert.<sup>185</sup> Das niedermolekulare Formamid 2-Pyrrolidinon, auch als zyklische GABA-Vorstufe bekannt, hat sich bei der Entwindung der DNA-Doppelhelix gut bewährt.<sup>186</sup> Als zwitterionischer Puffer wurde Tris-Sulfat in Kombination mit Ammoniumsulfat und Magnesiumsulfat zur Verbesserung der Ausbeute eingesetzt. Zusätzlich wurde eine optimale Hot-Start-Technik durch die Trennung von Polymerase, dNTPs auf der einen Seite und Primer und Additive auf der anderen Seite mittels der Zugabe von AmpliWax<sup>®</sup> erzielt. Die PCR erfolgt somit in zwei Schritten: Zuerst erfolgt die Zugabe des Bottom-Mix mit dem Trennwachs, welches nach dem Schmelzen eine Schutzschicht ausbildet, auf die der Top-Mix gegeben werden kann.

### **Diskussion der Southern-Blot-Analyse**

Die Southern-Blot-Analyse mit Hind III und Pst I Doppelverdau und radioaktiv markierter Sonde Ox0,48 gilt trotz ihres Zeitaufwandes immer noch als „Gold-Standard“ in der Labordiagnostik, da mit ihr Normalallele, Prämutationen und Vollmutationen differenziert werden können.<sup>187</sup> Dieses erprobte Verfahren wurde zur Untersuchung der Screening-Ausfälle unverändert übernommen. Ihr Nachteil ist allerdings der hohe Bedarf an DNA, der von vornherein einen Teil der zu untersuchenden Proben ausschliesst. Da bei einem Screening mittels PCR der Ausfall einer Probe entweder auf ein Allel im oberen Prämutationsbereich / Vollmutation oder einem echten Ausfall zurückzuführen ist, ist ihr Einsatz obligatorisch, um keine falschen negativen Befunde zu erhalten. Von den 38 in der PCR fehlgeschlagenen Proben (16m/22w) konnten 20 (6m/14w) untersucht werden und alle Allele dem Normalbereich zugeordnet werden. Von den verbleibenden 18 Proben war in 10 Fällen die Konzentration der DNA nicht ausreichend hoch genug, um sichtbare Banden zu erhalten. In den übrigen Fällen ist von einer nicht vollständig aufgereinigten DNA auszugehen, die sowohl für das Versagen der PCR als auch des Southern-Blots ursächlich ist.

## Diskussion der Ergebnisse

Insgesamt wurden 905 Probanden auf die Anzahl der CGG-Trinukleotide im FMR1 Gen untersucht. In 892 Fällen erhielten wir ein gültiges Meßergebnis, das sich in 393 männliche und 499 weibliche Proben unterteilen lässt. In beiden Gruppen wurde jeweils zwei Prämutationen diagnostiziert. Eine Vollmutation wurde nicht beobachtet. Innerhalb des weiblichen Kollektives wurden allerdings in 121 Proben (24%) nur ein Allel beobachtet. In diesen Fällen sind entweder beide Allele gleich groß, oder ein Allel überschreitet die maximale Fragmentgröße der PCR. Die Prävalenz der Prämutationen in den weiblichen Proben kann somit durchaus höher sein.

Das hier eingesetzte System mit fluoreszenzmarkierter PCR und anschließender Kapillarelektrophorese ermöglichte die Bestimmung der Allele bis zu einer Allelgröße von 115 Repeats bei genauem Diskriminationsvermögen der einzelnen Triplets untereinander (maximale Abweichung 1,5bp bei wiederholten Messungen). Die Verteilung der Allelgröße ist außerordentlich heterogen. In den 393 männlichen Proben wurden 27 unterschiedliche Repeatgrößen beobachtet, 30 Repeats war das häufigste Allel. Zieht man davon die 50 Proben mit positiven SCA-Testergebnissen sowie 20 Proben mit klinischen Ausschlusskriterien ab, bleiben 323 Proben mit identischem Verteilungsmuster übrig (27 unterschiedliche Repeatgrößen, häufigstes Allel: 30 CGG). Das Verteilungsmuster wies bei 19 und 22 Repeats ebenfalls erhöhte Werte aus mit einer charakteristischen Senke zwischen 24 und 27 Repeats. Bei den weiblichen Proben zeigt sich das gleiche Verteilungsmuster. Nach Abzug von 41 Ausschlusskandidaten von insgesamt 499 Proben werden bei den 458 weiblichen Proben (davon 336 mit zwei Allelen) 31 unterschiedliche Repeatgrößen beobachtet. Auch hier ist das Allel mit 30 CGG am häufigsten anzutreffen, sowie neben der Senke zwischen 24 und 27, erhöhte Werte zwischen 19 und 22 Repeats. Damit stimmen die Zahlen mit den Beobachtungen von Brown (1993)<sup>179</sup> und Larsen (1997)<sup>181</sup> überein. Insbesondere der hohe Anteil des Allels mit 20 Repeats wird fast ausschließlich in der kaukasischen Bevölkerung beobachtet.<sup>188</sup>

Heterozygotie für die CGG-Repeats ermöglichte in 76% die Differenzierung beider Allele bei den Frauen. Damit befinden sich der beobachtete Wert zwischen den Angaben von 80% Brown (1996)<sup>34</sup> und Fu (1991)<sup>189</sup> mit 63%. Hingegen weicht die Verteilung der für 14 verschiedene Allelgrößen beobachteten Werte mit nur einem Allel von anderen Publikationen ab, wenn man für jede solche Probe einen homozygoten Zustand annimmt. In dieser Arbeit verteilen sich dann 41,3% auf 30 CGG Repeats, 22,3% auf 29 Repeats und 14,8% auf 28 CGG, während in der Studie von Brown (1996)<sup>34</sup> für 30 CGG Repeats einen Anteil von 75% und für 29 Triplets 15% angegeben wurde. Diese Abweichung erklärt sich dadurch, dass in der amerikanischen Studie von Brown et al. der Gesamtanteil aller Allele mit 28 Repeats weniger als 3% ausmacht, während dieses Allel mit ~7% in der deutschen Bevölkerung stärker verbreitet zu sein scheint.

Allelgrößen zwischen ~45 und ~59 Repeats werden als Grauzonenallele oder als „Intermediate Alleles“ bezeichnet, da sie sich in der Meiose instabil verhalten können. In dieser Arbeit wurden bei den Frauen 6 solche Allele (1,3%) und bei den Männern 5 Allele (1,54%) beobachtet. Dies entspricht einer Untersuchung von 2500 Kontrollproben, bei denen Brown et al (1996)<sup>34</sup> 46 Grauzonenallele (1,84%) beobachteten. Hingegen geben Zhong et al. (1996)<sup>190</sup> für Frauen in 4% der Fälle an, mindestens ein Chromosom mit 45 Repeats oder mehr beobachtet zu haben. Um eine Aussage über die Stabilität solcher Allele zu machen können, kann bei Bedarf mittels Sequenzierung die Interdispersion der AGG-Triplets aufgeschlüsselt werden. Dies ist jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit, da routinemäßige Sequenzierung während eines Screenings mit hohem Aufwand verbunden ist.

### **Die Prävalenz von FXTAS**

Über die Anzahl der Prämutationen innerhalb eines Patientenkollektives mit spinocerebellärer Ataxie gibt es derzeit sehr unterschiedliche Aussagen. MacPherson et al. (2003) untersuchten 59 Männer (keine Altersangaben) bei denen SCA1, 2, 3, 6 und 7 ausgeschlossen war und fanden drei Prämutationsträger (~5%) mit 51, 66 und 87 Repeats. Nur letzterer mit einem Erkrankungsalter von 72 Jahren, Reflexminderungen,

distaler sensorischen Verlusten, kortikaler und zerebellärer Atrophie entspricht den diagnostischen Kriterien für FXTAS, während die anderen beiden mit ihren Erkrankungsalter von 42 und 51 Jahren und klinischen Symptomen hiervon abweichen. Tan et al. (2004)<sup>191</sup> analysierten in einer asiatischen Kohortenstudie mit 167 Patienten unter anderem auch 55 Patienten (30 Männer, 25 Frauen) mit sporadischer Ataxie (durchschnittliches Alter 50,3 Jahre), bei denen SCA1, 2, 3, 6, 7 und 17 ausgeschlossen waren. Entsprechend den niedrigen Prävalenzen von FRAXA in der asiatischen Bevölkerung, wurden in dieser Studie keine Träger mit einer Prämutation entdeckt. In 122 flämischen Patienten mit zerebellärer Ataxie und SCA1, 2, 3, 6 und 7-Ausschluß wurden fünf Patienten (4,1%) mit einer Prämutation beobachtet.<sup>192</sup> Alle fünf Patienten mit 80, 82, 84, 91, 111 CGG-Repeats berichteten im Alter von 61-70 Jahren erstmalig über klinische Symptome aus dem Spektrum von FXTAS. Bis auf einen Patienten konnten in allen entsprechenden Hyperintensitäten in den Kernspinaufnahmen der Kleinhirnschenkel nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden in 323 untersuchten männlichen Ataxie-Patienten, bei denen SCA1, 2, 3, 6, 7 und 17 ausgeschlossen worden war, zwei (0,62%) Prämutationen mit 58 und 93 Repeats nachgewiesen. In 458 weiblichen Patienten wurden ebenfalls zwei (0,43%) Prämutationen mit 55 und 144 CGG-Repeats beobachtet. Die in unserer Arbeit beobachteten Zahlen lassen die Schlußfolgerung zu, dass die Prävalenz von FXTAS-assoziierten Fällen mit Ataxie in Deutschland somit deutlich geringer als in der angloamerikanischen Bevölkerung ist.

## Schlußfolgerungen

- Es wurde eine schnell und zuverlässig durchzuführende Screening-Methode zum Nachweis von FMR1 Prämutationen etabliert. Nach Validierung des Verfahrens mit externen Proben wurden damit insgesamt 406 Männer und 499 Frauen untersucht. In 37 Fällen musste ein Southern-Blot angeschlossen werden, der in 16 Fällen erfolgreich durchgeführt werden konnte.
- Die Allelverteilung der Probanden mit Ataxie entspricht den Angaben in der Literatur. Am häufigsten sind die Allele 29 und 30 wie auch in der allgemeinen

Bevölkerung anzutreffen. In weiblichen Proben wird in 24% nur eine Allelgröße beobachtet, sodaß bei einer Einführung dieses Screening-Testes in die klinische Routinediagnostik für ungefähr ein Viertel der weiblichen Proben ein genomischer Southern-Blot erforderlich sein wird. Zwischen SCA und Non-SCA-Probanden besteht kein signifikanter Unterschied.

- Die Prävalenz der Prämutationen von 2/393 (Männer) und 2/499 (Frauen) deckt sich mit den in der Literatur häufig verwendeten Angaben von 1:813 für Männer und 1:259 für Frauen. Auch die Anteil der Allele im Grauzonenbereich 1,3% (Männer) und 1,54% (Frauen) liegt nur unwesentlich unter denen einer großen Studie.
- Der Anteil von Patienten mit FXTAS-assoziierten Prämutationen innerhalb eines Kollektives mit sporadischer Ataxie (0,55% in der Gruppe Männer über 50 Jahre, 0,52% in der Gruppe Frauen über 50 Jahre) scheint in Deutschland deutlich geringer zu sein, als die von anderen Studien prognostizierten 4-5%. Ein routinemäßiges Screening aller Ataxie-Patienten auf FMR1 erscheint vor diesem Hintergrund nicht sinnvoll. Allerdings lässt sich auch aus unseren Daten ableiten, dass nach Beachtung der speziellen klinischen Charakteristika (insbesondere Tremor **und** Ataxie, sowie eine typisch auffällige Bildgebung der Kleinhirnschenkel) – wie sie Hagerman vorgeschlagen hat – ein FXTAS durchaus klinisch wahrscheinlich gemacht und sodann molekulargenetisch gesichert werden kann.
- Die von Hagerman et al. (2004) gemachte Beobachtung, dass FXTAS auch bei Trägerinnen einer Prämutation auftritt, konnte bestätigt werden. Weitere Studien an größeren Kollektiven sind nötig um die Prävalenz von FXTAS in dieser Gruppe in Abhängigkeit vom Alter bestimmen zu können, da hierüber in der Literatur noch keine vergleichbaren Zahlen vorliegen.

## Zusammenfassung

Fragiles X Syndrom (fraX) ist eine der häufigsten genetischen Ursachen für geistige Behinderung. Ursächlich hierfür ist die Trinukleotidverlängerung eines CGG-Polymorphismus über 200 Wiederholungen hinaus im nicht-kodierenden Bereich des *fragile X mental retardation gene 1 (FMR1)*, die zu einer Hypermethylierung der Promotorregion und damit zu einer Blockade der Transkription führt. Träger einer Prämutation (55-200 CGG-Repeats) tragen nicht nur das hohe Risiko während der Meiose ihren Nachkommen eine Expansion zur Vollmutation weiter zu vererben, sondern können mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit von zwei weiteren spezifischen Krankheitsbildern betroffen sein. Neben vorzeitiger Menopause in 16-21% der Frauen, sind vor allem Männer in Abhängigkeit des Alters von einer progredient voranschreitenden neurologischen Erkrankung, dem Fragilen X-assoziierten Tremor/Ataxie Syndrom (FXTAS) betroffen. Leitsymptome sind Ataxie, Intentionstremor die in der Regel um das 70. Lebensjahr manifest werden und ihr morphologisches Korrelat in Hyperintensitäten der cerebellären Pedunkeln und den Nucleus dentatus umgebender weißer Substanz in T2-gewichteten Kernspintomographie aufweisen. Weitere, akinzidentelle Befunde sind Parkinson-Symptomatik, periphere Neuropathie und kognitiver Abbau. Post-mortem findet man in den Neuronen des gesamten Cortex eosinophile intranukleäre Einschlüsse mit Betonung auf Hippocampus und Cerebellum bei gehäuftem Purkinje-Zelluntergang. Als mögliche Ursache wird eine „gain of toxicity“ der erhöhten FMR1 mRNA-Spiegel angenommen. Die in diesem Kollektiv beobachteten Symptome überlappen sich mit den klinischen Bildern von atypischen Morbus Parkinson, spinocerebellärer Ataxie (SCA), essentiellen Tremor und Demenz, die in der älteren Bevölkerung nicht selten anzutreffen sind.

Da die Symptomatik von FXTAS erstmalig 2001 beschrieben wurde, ist es derzeit von großem Interesse, eine Reevaluation der differentialdiagnostischen Überlegungen hinsichtlich genetischer Untersuchungen durchzuführen. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob eine Prämutation des FMR1 Gens für innerhalb einer Gruppe kaukasischer Patienten mit sporadischer Ataxie verantwortlich gemacht werden kann.



Hierzu wurde in dem Labor eine zügig und kostengünstig durchzuführende Screening-Methode etabliert und es konnten insgesamt 781 Patienten (323 Männer und 458 Frauen) mit Leitsymptom Ataxie, bei denen ein positiver Mutationsnachweis für SCA1, 2, 3, 6, 7 und 17 ausgeschlossen wurde, auf ihre Anzahl der CGG-Repeats untersucht werden. Bei international vergleichbaren Werten für die Verteilung der Allelgrößen wurden insgesamt vier Prämutationen mit 55, 58, 93 und 144 CGG-Repeats detektiert. Die klinischen Symptome der männlichen Proben unterschieden sich deutlich. Während in Patient 2 mit 93 CGG-Repeats anamnestisch eine langsam progrediente Ataxie mit Intentionstremor über 20 Jahre und Kleinhirnatrophie beobachtet wurde, erfüllte Patient 1 nicht die diagnostischen Kriterien für FXTAS. Zum einen ist der Erkrankungsbeginn im 30. Lebensjahr ungewöhnlich früh, zusätzlich konnten die charakteristischen Hyperintensitäten in T2-gewichteten Kernspintomografieaufnahmen nicht nachgewiesen werden. Bei der Patientin 4 dominierte über mehrere Jahre ein zerebelläres Okulomotoriusyndrom, bevor die Ataxie zusätzlich auftrat. Die hier beobachtete Prävalenz der Prämutationen von 2:393 (Männer) und 2:458 (Frauen) entspricht denen der allgemeinen Bevölkerung, sodaß in Deutschland eine genetische Testung innerhalb der Patientengruppe mit sporadisch auftretender Ataxie nicht erfolgsversprechender ist. Vielmehr sollte ein genetischer Test gezielt bei klinischer Verdachtsymptomatik oder charakteristischen radiologischen Befunden im Rahmen einer ausführlichen humangenetischen Beratung angewendet werden.

## Literaturverzeichnis

---

- 1 Cummings CJ, Zoghbi HY (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet* 9(6): 909-916
- 2 Monckton DG, Caskey CT. (1995) Unstable triplet repeat diseases. *Circulation* 15;91(2):513-20.
- 3 Sutherland GR. (2003) Rare fragile sites. *Cytogenet Genome Res.* 100(1-4):77-84.
- 4 Martin, J. P.; Bell, J. (1943) A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J. Neurol. Psychiat.* 6: 154-157
- 5 Lubs, HA (1969) A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 21: 231-244
- 6 Harvey J, Judge C, Wiener S. (1977) Familial X-linked mental retardation with an X chromosome abnormality. *J Med Genet.* 14(1):46-50.
- 7 Sutherland GR (1977): Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science.* 197(4300):265-6.
- 8 Oberlé I, Heilig R, Moisan JP, Kloepfer C, Mattéi MG, Mattéi HF, Boué J, Froster-Iskenius U, Jacobs PA, Lathrop GM, Lalouel JM, Mandel JL (1986) Genetic analysis of the fragile-X mental retardation syndrome with two flanking polymorphic DNA markers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(4):1016-20.
- 9 Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CGG)n. *Science* 252:1711-1714
- 10 Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boué J, Bertheas MF, Mandel JL (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252:1097-1102
- 11 Verkerk A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y, Kuhl D, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria M, Zhang F, Eussen B, van Ommen G, Blonden L, Riggins G, Chastain J, Kunst C, Galjaard H, Caskey CT, Nelson D, Oostra B, Warren ST (1991) Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in Fragile X Syndrome. *Cell* 65:905-914
- 12 Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B, Hagerman PJ. (2001) Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology.* 10;57(1):127-30.
- 13 Brunberg JA, Jacquemont S, Hagerman RJ, Berry-Kravis EM, Grigsby J, Leehey MA, Tassone F, Brown WT, Greco CM, Hagerman PJ. (2002) Fragile X premutation carriers: characteristic MR imaging findings of adult male patients with progressive cerebellar and cognitive dysfunction. *AJNR Am J Neuroradiol.* 23(10):1757-66.
- 14 Greco CM, Hagerman RJ, Tassone F, Chudley AE, Del Bigio MR, Jacquemont S, Leehey M, Hagerman PJ. (2002) Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain.*125(Pt 8):1760-71.
- 15 Leehey MA, Munhoz RP, Lang AE, Brunberg JA, Grigsby J, Greco C, Jacquemont S, Tassone F, Lozano AM, Hagerman PJ, Hagerman RJ. (2003) The fragile X premutation presenting as essential tremor. *Arch Neurol.* 2003 Jan;60(1):117-21.
- 16 Jacquemont, S.; Hagerman, R. J.; Leehey, M.; Grigsby, J.; Zhang, L.; Brunberg, J. A.; Greco, C.; Des Portes, V.; Jardini, T.; Levine, R.; Berry-Kravis, E.; Brown, W. T.; Schaeffer, S.; Kissel, J.; Tassone, F.; Hagerman, P. J. : Fragile X premutation

- 
- tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 869-878, 2003.
- 17 Macpherson, J.; Waghorn, A.; Hammans, S.; Jacobs, P. (2003) Observation of an excess of fragile-X premutations in a population of males referred with spinocerebellar ataxia. (Letter) *Hum. Genet.* 112: 619-620.
  - 18 Hagerman, R. J.; Leavitt, B. R.; Farzin, F.; Jacquemont, S.; Greco, C. M.; Brunberg, J. A.; Tassone, F.; Hessler, D.; Harris, S. W.; Zhang, L.; Jardini, T.; Gane, L. W.; Ferranti, J.; Ruiz, L.; Leehey, M. A.; Grigsby, J.; Hagerman, P. J. (2004) Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 1051-1056, 2004.
  - 19 Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. (1996) Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 64(1):196-7.
  - 20 Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, Partington NW, Sutherland GR, Turner G and Watson M (1985) Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special references to transmitting males. *Hum. Genet.* 69:3289-99
  - 21 Sherman SL. (2000) Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 97(3):189-94.
  - 22 Allingham-Hawkins DJ, Babul-Jirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C et al (1999) Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study – preliminary data. *Am J Med genet* 83: 322-5
  - 23 Smits A, van der Bruggen W, Sistermans E, Kielmeney B, Renier W, B (2002) Striking neurological symptoms in normal transmitting males of the fragile X syndrome. Vorstellung des Papers auf The 8<sup>th</sup> international Fragile X Conference Chicago vom 16-21 Juli.
  - 24 Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey MA, Hall DA, Levine RA, Brunberg JA, Zhang L, Jardini T, Gane LW, Harris SW, Herman K, Grigsby J, Greco CM, Berry-Kravis E, Tassone F, Hagerman PJ. (2004) Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA.* 291(4):460-9.
  - 25 Louis ED, Marder K, Cote L, Pullman S, Ford B, Wilder D, Tang MX, Lantigua R, Gurland B, Mayeux R (1995) Differences in the prevalence of essential tremor among elderly African American, whites, and Hispanics in northern Manhattan, NY. *Arch Neurol.* 52:1201-1205
  - 26 Murray J, Cuckle H, Taylor G, Hewison J. (1997) Screening for fragile X syndrome. *Health Technol Assess.* 1(4):i-iv, 1-71.
  - 27 Morris A, Morton NE, Collins A, Macpherson J, Nelson D, Sherman S. (1995) An allele model for progressive amplification in the FMR1 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(11):4833-7.
  - 28 Ryyänen M, Heinonen S, Makkonen M, Kajanoja E, Mannermaa A, Pertti K. (1999) Feasibility and acceptance of screening for fragile X mutations in low-risk pregnancies. *Eur J Hum Genet.* 7(2):212-6.
  - 29 Toledano-Alhadeff H, Basel-Vanagaite L, Magal N, Davidov B, Ehrlich S, Drasinover V, Taub E, Halpern GJ, Ginott N, Shohat M. (2001) Fragile-X carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. *Am J Hum Genet.* 69(2):351-60.
  - 30 Pessoa R, Berkenstadt M, Cuckle H, Gak E, Peleg L, Frydman M, Barkai G. (2002)

- 
- Screening for fragile X syndrome in women of reproductive age. *Prenat Diagn.* 20(8):611-4.
- 31 Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K. (1995) Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet.* 57(5):1006-18.
- 32 Huang KF, Chen WY, Tsai YC, Lin CC, Chen SH, Tseng CY, Tzeng CC. (2003) Original article pilot screening for fragile X carrier in pregnant women of southern Taiwan. *J Chin Med Assoc.* 66(4):204-9
- 33 Spence WC, Black SH, Fallon L, Maddalena A, Cummings E, Menapace-Drew G, Bick DP, Levinson G, Schulman JD, Howard-Peebles PN. (1996) Molecular fragile X screening in normal populations. *Am J Med Genet.* 64(1):181-3.
- 34 Brown WT, Nolin S, Houck G Jr, Ding X, Glicksman A, Li SY, Stark-Houck S, Brophy P, Duncan C, Dobkin C, Jenkins E. (1996) Prenatal diagnosis and carrier screening for fragile X by PCR. *Am J Med Genet.* 64(1):191-5.
- 35 Dombrowski C, Levesque S, Morel ML, Rouillard P, Morgan K, Rousseau F. (2002) Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Hum Mol Genet.* 15;11(4):371-8.
- 36 Murray A, Youings S, Dennis N, Latsky L, Linehan P, McKechnie N, Macpherson J, Pound M, Jacobs P. (1996) Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet.* 5(6):727-35.
- 37 Crawford DC, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Pettay DL, Gold LB, Hersey SJ, Hinkle EF, Stanfield ML, Holmgreen P, Yeargin-Allsopp M, Boyle C, Sherman SL. (1999) Prevalence and phenotype consequence of FRAXA and FRAXE alleles in a large, ethnically diverse, special education-needs population. *Am J Hum Genet.* 64(2):495-507.
- 38 Di Maria E, Grasso M, Pigullo S, Faravelli F, Abbuzzese G, Barone P, Martinelli P, Ratto S, Sciolla R, Bellone E, Dagna-Bricarelli F, Ajmar F, Mandich P (2003) Further evidence that a tremor/ataxia syndrome may occur in fragile X premutation carriers. Vorstellung auf American Society of Human Genetics 53<sup>rd</sup> Annual Meeting, Los Angeles vom 4-8 November.
- 39 Rogers C, Partington MW, Turner GM. (2003) Tremor, ataxia and dementia in older men may indicate a carrier of the fragile X syndrome. *Clin Genet.* 64(1):54-6.
- 40 Prouty LA, Rogers RC, Stevenson RE, Dean JH, Palmer KK, Simensen RJ, Coston GN, Schwartz CE (1988) Fragile X syndrome: growth, development and intellectual function. *Am J Med Genet* 30:123-142
- 41 Hagerman, R. J.; Van Housen, K.; Smith, A. C. M.; McGavran, L. (1984) Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 17: 111-121.
- 42 Hessler D, Rivera SM, Reiss AL. (2004) The neuroanatomy and neuroendocrinology of fragile X syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(1):17-24.
- 43 Theobald TM, Hay DA, Judge C (1997) Individual variation and specific cognitive deficits in the fra(X) syndrome. *Am J Med Genet* 28:1-11
- 44 Wright-Talamante C, Cheema A, Riddle JE, Luckey DW, Taylor AK, Hagerman RJ. (1996) A controlled study of longitudinal IQ changes in females and males with fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 64(2):350-5.

- 
- 45 Cornish KM, Munir F, Cross G (1999) Spatial cognition in males with fragile-X syndrome: evidence for a neuropsychological phenotype. *Cortex* 35:263-71
  - 46 Cohen IL, Fisch GS, Sudhalter V, Wolf-Schein EG, Hanson D, Hagerman R, Jenkins EC, Brown WT (1988) Social gaze, social avoidance and repetitive behavior in fragile X males: a controlled study. *Am J Ment Retard* 92:436-446
  - 47 Reiss AL, Freund L (1992) The behavioral phenotype of fragile X syndrome: DSM-III-R autistic behavior in males. *Am J Med Genet* 43:35-46
  - 48 Berry-Kravis E. (2002) Epilepsy in fragile X syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 44(11):724-8.
  - 49 Eliez S, Blasey CM, Freund LS, Hastie T, Reiss AL (2001) Brain anatomy, gender and IQ in children and adolescents with fragile X syndrome. *Brain* 124:1610-8
  - 50 Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(10):5401-4.
  - 51 Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowski PB, Swain RA, Weiler IJ, Greenough WT. (2001) Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am J Med Genet.* 98(2):161-7.
  - 52 Reiss AL, Alyward E, Freund LS, Joshi PK, Bryan RN (1991) Neuroanatomy of the fragile X syndrome: the posterior fossa. *Ann Neurol* 29:26-32
  - 53 Reiss AL, Freund L, Abrams MT, Boehm C, Kazazian H (1993): Neurobehavioral effects of the fragile X premutation in adult women: a controlled study. *Am J Hum Genet* 52:884-894
  - 54 Reiss AL, Hagerman RJ, Vinogradov S, Abrams M, King RJ (1988) Psychiatric disability in female carriers of the fragile X chromosome. *Arch Gen Psychiatry* 45:25-30
  - 55 Franke P, Leboyer M, Gansicke M, Weiffenbach O, Biancalana V et al. (1998) Genotype-phenotype relationship in female carriers of the premutation and full mutation of FMR1. *Psychiatry Res* 80:113-127
  - 56 Dorn MB, Mazzocco MM, Hagerman RJ (1994) Behavioral and psychiatric disorders in adult male carriers of fragile X *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 33(2):256-64.
  - 57 Johnston C, Eliez S, Dyer-Friedmann J, Hessel D, Glaser B, Blasey C, Taylor A, Reiss A (2001) Neurobehavioral phenotype in carriers of the fragile X premutation. *Am J Med Genet* 103:314-319
  - 58 Loesch DZ, Huggins RM, Bui QM, Taylor AK, Hagerman RJ (2003) Relationship of deficits in FMR1 gene specific protein with physical phenotype of fragile X males and females in pedigrees: a new perspective. *Am J Med Genet* 118A:127-134
  - 59 Riddle JE, Cheema A, Sobesky WE, Gardner SC, Taylor AK, Pennington BF, Hagerman RJ (1998) Phenotypic involvement in females with the FMR1 gene mutation. *Am J Ment Retard* 102:590-601
  - 60 Loesch D, Hay DA, Mulley J (1994): Transmitting Males and Carrier Females in Fragile X – Revisited. *Am J Med Genet* 51:392-399
  - 61 Steyaert J, Borghgraef M, Legius E, Fryns J-P (1996) Molecular-intelligence correlations in young fragile X males with a mild CGG repeat expansion in the FMR1 gene. *Am J Med Genet* 64:274-277

- 
- 62 Aziz M, Stathopulu E, Callias M, Taylor C, Turk J, Oostra B, Willemsen R, Patton M (2003) Clinical feature of boys with fragile X premutations and intermediate alleles. *Am J Med Genet* 121B:119-127
- 63 Hundscheid RD, Braat DD, Kiemeney LA, Smits AP, Thomas CM. (2001) Increased serum FSH in female fragile X premutation carriers with either regular menstrual cycles or on oral contraceptives. *Hum Reprod.* 16(3):457-62.
- 64 Gersak K, Meden-Vrtovec H, Peterlin B. (2003) Fragile X premutation in women with sporadic premature ovarian failure in Slovenia. *Hum Reprod.* 18(8):1637-40.
- 65 Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B, Hagerman PJ. (2001) Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology.* 10;57(1):127-30.
- 66 Berry-Kravis E, Lewin F, Wu J, Leehey M, Hagerman R, Hagerman P, Goetz CG (2003) Tremor and ataxia in fragile X premutation carriers: blinded videotape study. *Ann Neurol* 53:616-623
- 67 Jaquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, Hall DA, Levine RA, Brunberg JA, Zhang L, Jardini T, Gane LW, Harris SW, Herman K, Grigsby J, Greco C, Berry-Kravis E, Tassone F, Hagerman PJ (2004) Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in a premutation carrier population: initial results from a California family-based study. *JAMA* 291:460-469
- 68 Verkerk AJ, de Graaff E, De Boule K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E, Manca A, Poustka A, Willems PJ, Nelson DL, Oostra BA (1993) Alternative splicing in fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet* 2:399-404
- 69 Snow K, Tester DJ, Kruckeberg KE, Schaid DJ, Thibodeau SN. (1994) Sequence analysis of the fragile X trinucleotide repeat: implications for the origin of the fragile X mutation. *Hum Mol Genet.* 3(9):1543-51.
- 70 Oudet C, Mornet E, Serre JL, Thomas F, Lentès-Zengerling S, Kretz C, Deluchat C, Tajeda I, Boue J, Boue A, Mandel JL (1993): Linkage disequilibrium between the fragile X mutation and two closely linked CA repeats suggest that Fragile-X chromosomes are derived from a small number of founder chromosomes. *Am J Hum. Genet.* 52, 297-304
- 71 Richards RI, Holman K, Friend K et al. (1992) Evidence of founder chromosomes in fragile X syndrome. *Nature Genet* 1:257-260
- 72 Malmgren H, Gustavson KH, Oudet C, Holmgren G, Petterson U, Dahl N (1994): Strong founder effect for the fragile X syndrome in Sweden. *Eur. J. Hum. Genet.* 2, 103-9
- 73 Gunter C, Paradee W, Crawford DC, Meadows KA, Newman J, Kunst CB, Nelson DL, Schwartz C, Murray A, Macpherson JN, Sherman SL, Warren ST. (1998) Re-examination of factors associated with expansion of CGG repeats using a single nucleotide polymorphism in FMR1. *Hum Mol Genet.* 7(12):1935-46.
- 74 Eichler EE, Macpherson JN, Murray A, Jacobs PA, Chakravarti A, Nelson DL. (1996) Haplotype and interspersed analysis of the FMR1 CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 5(3):319-30.
- 75 Drouin R, Angers M, Dallaire N, Rose TM, Khandjian W, Rousseau F (1997) Structural and functional characterization of the human FMR1 promoter reveals similarities with the hnRNP-A2 promoter region. *Hum Mol Genet* 6:2051-2060
- 76 Kumari D, Usdin K (2001) Interaction of the transcription factors USF1, USF2 and

- 
- (alpha)-PAL/Nrf-1 with the FMR1 promotor. *J Biol Chem* 276:4357-64
- 77 Brown V, Small K, Lakkis L, Feng Y, Gunter C, Wilkinson KD, Warren ST (1998) Purified recombinant FMRP exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem* 273:15521-27
- 78 Gibson TJ, Rice PM, Thompson JD, Heringa J (1993) KH domains within the FMR1 sequence suggest that fragile X syndrome stems from a defect in RNA metabolism. *Trends Biochem Sci* 18:331-333
- 79 Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST (1992) DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 70:1532-44
- 80 Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL (1991) Absence of expression of the FMR1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66:817-822
- 81 Feng Y, Zhang F, Lokey LK, Chastain JL, Lakkis L, Eberhardt D, Warren ST (1995) Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science* 268:731-4
- 82 De Boule K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ. (1993) A point mutation in the FMR1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet.* 3(1):31-5.
- 83 Shinahara K, Saijo T, Mori K, Kuroda Y. (2004) Single-strand conformation polymorphism analysis of the FMR1 gene in autistic and mentally retarded children in Japan. *J Med Invest.* 51(1-2):52-8.
- 84 Wöhrle D, Kotzot D, Hirst MC, Manca A, Korn B, Schmidt A, Barbi G, Rott HD, Poustka A, Davies KE, Steinbach P (1992) A microdeletion of less than 250kb, including the proximal part of the FMR1 gene and the fragile X site in a male with the clinical phenotype of fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* 51:299-306
- 85 Mannermaa A, Pulkkinen L, Kajanoja E, Ryyänen M, Saarikoski S (1996) Deletion in the FMR1 gene in a fragile-X male. *Am J Med Genet* 64:293-5
- 86 Gedeon AK, Baker E, Robinson H, Partington MW, Gross B, manca A, Korn B, Poustka A, Yu S, Sutherland GR, Mulley JC (1992) Fragile X syndrome without CGG amplification has an FMR1 deletion. *Nat. Genet.* 1:341-4
- 87 Sullivan AK, Crawford DC, Scott EH, Leslie ML, Sherman SL. (2002) Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range. *Am J Hum Genet.* 70(6):1532-44.
- 88 Zhong N, Dobkin C, Brown T (1993) A complex mutable polymorphism located within the fragile X gene. *Nature Genet* 5:248-253
- 89 Leeflang EP, Tavare S, Marjoram P, Neal CO, Srinidhi J, MacFarlane H, MacDonald ME, Gusella JF, de Young M, Wexler NS, Arnheim N. (1999) Analysis of germline mutation spectra at the Huntington's disease locus supports a mitotic mutation mechanism. *Hum Mol Genet.* 8(2):173-83.
- 90 Gacy A, Goellner G, Juranic N, Macura S, McMurray C (1995): Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. *Cell* 81, 533-40
- 91 Pembre ME, Winter RM, Davies KE (1985) A premutation that generates a defect at crossing over explains the inheritance of fragile X mental retardation. *Am J Med Genet* 21:709-717
- 92 Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brondum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F,

- 
- Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Vaisanen ML, von Koskull H, Sherman SL. (2003) Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet.* 72(2):454-64.
- 93 Morton NE, Macpherson JN. (1992) Population genetics of the fragile-X syndrome: multiallelic model for the FMR1 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(9):4215-7.
- 94 Chakravarti A. (1992) Fragile X founder effect? *Nat Genet.* 1(4):237-8.
- 95 Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C, Mandel JL (1992) Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J Med Genet* 29:794-801
- 96 Malter HE, Iber JC, Willemsen R, de Graaff E, Tarleton JC, Leisti J, Warren ST (1997) Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. *Nat Genet* 15:165-9
- 97 Reyniers E, Vits L, De Boulle K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, Verkerk A (1993) The full mutation in the FMR1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet* 4:143-6
- 98 Willems PJ, Van Roy B, De Boulle K, Vits L, Reyniers E, Beck O, Dumon JE, Verkerk A, Oostra B (1992) Segregation of the fragile X mutation from an affected male to his normal daughter. *Hum molec Genet* 1:511-5
- 99 Nolin SL, Lewis FA 3rd, Ye LL, Houck GE Jr, Glicksman AE, Limprasert P, Li SY, Zhong N, Ashley AE, Feingold E, Sherman SL, Brown WT. (1996) Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. *Am J Hum Genet.* 59(6):1252-61.
- 100 Vits L, De Boulle K, Reyniers E, Handig I, Darby JK, Oostra B, Willems PJ (1994) Apparent regression of the CGG repeat in FMR1 to an allele of normal size. *Hum Genet* 94:523-6
- 101 Brown WT, Houck GE, Ding X, Zhong N, Nolin S, Glicksman A, Dobkin C, Jenkins EC (1996) Reverse mutations in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 64:287-92
- 102 Saul R, Tarleton J (1998) Fragile X Syndrome, Gene Reviews, elektronische Version vom 13 September 2004, [www.genetest.org](http://www.genetest.org)
- 103 Brunberg JA, Jacquemont S, Hagerman RJ, Berry-Kravis EM, Grigsby J, Leehey MA, Tassone F, Brown WT, Greco CM, Hagerman PJ. (2002) Fragile X premutation carriers: characteristic MR imaging findings of adult male patients with progressive cerebellar and cognitive dysfunction. *AJNR Am J Neuroradiol.* 23(10):1757-66.
- 104 Rantamaki M, Krahe R, Paetau A, Cormand B, Mononen I, Udd B. (2001) Adult-onset autosomal recessive ataxia with thalamic lesions in a Finnish family. *Neurology.* 2001 Sep 25;57(6):1043-9.
- 105 Savoirdo M, Strada L, Girotti F, Zimmerman RA, Grisoli M, Testa D, Petrillo R. (1990) Olivopontocerebellar atrophy: MR diagnosis and relationship to multisystem atrophy. *Radiology.* 1990 Mar;174(3 Pt 1):693-6.
- 106 Nakagawa N, Katayama T, Makita Y, Kuroda K, Aizawa H, Kikuchi K. (1999) A case of spinocerebellar ataxia type 6 mimicking olivopontocerebellar atrophy. *Neuroradiology.* 1999 Jul;41(7):501-3.
- 107 Greco CM, Hagerman RJ, Tassone F, Chudley AE, Del Bigio MR, Jacquemont S, Leehey M, Hagerman PJ. (2002) Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain.* 125(Pt 8):1760-71.
- 108 Wenning GK, Geser F, Stampfer-Kountchev M, Tison F. (2003) Multiple system



- 
- atrophy: an update. *Mov Disord.* 18 Suppl 6:S34-42.
- 109 Leavitt B. (2003) Something lost in the translation: 'premutations' in the FMR1 gene cause Fragile X tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Clin Genet.* 64(2):106-108.
- 110 Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. (1993) The FMR1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet.* 4(4):335-40.
- 111 Kogan CS, Boutet I, Cornish K, Zangenehpur S, Mullen KT, Holden JJA, Der Kaloustian VM, Andermann E, Chaudhuri A (2004) Differential impact of the FMR1 gene on visual processing in fragile X syndrome. *Brain* 127:591-601
- 112 Bachner P, Manca A, Steinbach P, Wöhrle D, Just W, Vogel W, Hameister H, Proustka A (1993) Enhanced expression of the murine FMR1 gene during germ cell proliferation suggests a special function in both the male and female gonad. *Hum Mol Genet* 2:2043-50
- 113 Wang H, Ku L, Osterhout DJ, Li W, Ahmadian A, Liang Z, Feng Y (2004) Developmentally-programmed FMRP expression in oligodendrocytes: a potential role of FMRP in regulating translation in oligodendroglia progenitors. *Hum Mol Genet* 13:79-89
- 114 Rifé M, Nadal A, Milà M, Willemsen R (2004) Immunohistochemical FMRP studies in a full mutated female fetus. *Am J Med Genet* 124A:129-32
- 115 Primerano B, Tassone F, Hagerman RJ, Hagerman P, Amaldi F, Bagni C. (2002) Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations. *RNA.* 8(12):1482-8.
- 116 Kozak M (1996) Interpreting cDNA sequences: Some insights from studies on translation. *Mamm Genome* 7:563-574
- 117 Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ. (2000) Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet.* 66(1):6-15.
- 118 Tassone F, Hagerman PJ. (2003) Expression of the FMR1 gene. *Cytogenet Genome Res.* 100(1-4):124-8.
- 119 Beilina A, Tassone F, Schwartz PH, Sahota P, Hagerman PJ (2004) Redistribution of transcription start sites within the FMR1 promoter region with expansion of the downstream CGG element. *Hum Mol Genet* 13:543-549
- 120 Kenneson A, Zhang F, Hagedorn CH, Warren ST. (2001) Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum Mol Genet.* 10(14):1449-54.
- 121 Tassone F, Hagerman RJ, Chamberlain WD, Hagerman PJ. (2000) Transcription of the FMR1 gene in individuals with fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 97(3):195-203.
- 122 Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST, Hersch SM. (1997) Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci.* 17(5):1539-47.
- 123 Sittler A, Devys D, Weber C, Mandel JL (1996) Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of FMR1 protein isoforms. *Hum Mol Genet* 5:95-102
- 124 Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler E, Nelson DL, Warren ST (1993) Human and murine FMR1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG repeat. *Nature Genetics* 4(3):244-51

- 
- 125 Imbert G, Feng Y, Nelso DL, Warren ST, Mandel JL (1998) FMR1 and mutations in Fragile X Syndrome: Molecular Biology, Biochemistry and Genetics. Aus: Wells, Warren, Wells, Sarmiento: Genetic instabilities and hereditary neurological diseases. 1. Auflage, Academic Press San Diego, ISBN: 0127429352, Seite 27-53
- 126 De Diego Otero Y, Severijnen LA, van Cappellen G, Schrier M, Oostra B, Willemsen R. (2002) Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 22(23): 8332-41.
- 127 Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW (2002) Trapping of messenger RNA by fragile X mental retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet* 10:329-338
- 128 Jin P, Warren ST. (2003) New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. *Trends Biochem Sci.* 28(3):152-8.
- 129 Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. (2001) Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet.* 10(4):329-38.
- 130 Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y (2001) The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acid Res* 29:2276-83
- 131 Sung YJ, Dolzhanskaya N, Nolin SL, Brown T, Currie JR, Denman RB. (2003) The fragile X mental retardation protein FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation in vivo. *J Biol Chem.* 278(18):15669-78.
- 132 Zhang YQ, Bailey AM, Matthies HJ, Renden RB, Smith MA, Speese SD, Rubin GM, Broadie K (2001) Drosophila fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell* 107:591-603
- 133 Zhang YQ, Matthies HJ, Mancuso J, Andrews HK, Woodruff E III, Friedman D, Broadie K. (2004) The Drosophila fragile X-related gene regulates axoneme differentiation during spermatogenesis. *Dev Biol.* 270(2):290-307.
- 134 Chen L, Yun SW, Seto J, Liu W, Toth M (2003) The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing U-rich target sequences. *Neuroscience* 120:1005-17
- 135 Siomi MC, Choi M, Siomi H, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1994) Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* 77:33-39
- 136 Musco G, Stier G, Joseph C, Castiglione-Morelli CA, Nilges M, Gibson TJ, Pastore A (1996) Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights to the fragile X syndrome. *Cell* 107:477-487
- 137 Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C, Moine H. (2001) The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J.* 20(17):4803-13.
- 138 Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB (2001) Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* 107:489-499
- 139 Sung YJ, Conti J, Currie JR, Brown WT, Denman RB. (2000) RNAs that interact with the fragile X syndrome RNA binding protein FMRP. *Biochem Biophys Res Commun.* 275(3):973-80.
- 140 Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB, Warren ST. (2001) Microarray

- 
- identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*. 107(4):477-87.
- 141 Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, Liu L, Carbonetto S, Weiler IJ, Greenough WT, Eberwine J. (2003) RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in *Fmr1* null mice. *Neuron*. 37(3):417-31.
- 142 Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S, Oostra B, Bagni C. (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*. 112(3):317-27.
- 143 Hessler D, Glaser B, Dyer-Friedman J, Blasey C, Hastie T, Gunnar M, Reiss AL. (2002) Cortisol and behavior in fragile X syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 27(7):855-72.
- 144 Siomi MC, Hiagshijama K, Ishizuka A, Siomi H (2002) Casein kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties. *Mol Cell Biol* 22:8438-8447
- 145 Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST (2003) Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum Mol Genet* 24:3295-3305
- 146 Ceman S, Brown V, Warren ST (1999) Isolation of an FMRP-associated messenger ribonuclein particle and identification of nucleolin and the fragile X related proteins as components of the complex. *Mol Cell Biol* 19:7925-32
- 147 Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Boilard N, Labelle Y, Khandijan EW (2003) Fragile X mental retardation protein determinants required for its association with polyribosomal mRNPs. *Hum Mol Genet* 12 (23):3087-96
- 148 Tamanini F, Bontekoe C, Bakker CE, van Unen L, Anar B, Willemsen R, Yoshida M, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT. (1999) Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. *Hum Mol Genet*. 8(5):863-9.
- 149 Tamanini F, Willemsen R, van Unen L, Bontekoe C, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen R AT (1997) Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 Proteins in human brain and testis. *Hum Mol Genet* 6:1315-22
- 150 Weiler IJ, Irwin SA, Klintsova AY, Spencer CM, Brazelton AD, Miyashiro K, Comery TA, Patel B, Eberwine J, Greenough WT. (1997) Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(10):5395-400.
- 151 Todd PK, Mack KJ, Malter JS. (2003) The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD-95. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(24):14374-8
- 152 Todd PK, Malter JS, Mack KJ. (2003) Whisker stimulation-dependent translation of FMRP in the barrel cortex requires activation of type I metabotropic glutamate receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 110(2):267-78.
- 153 Steward O, Falk J (1983) Polyribosomes under developing spine synapses : growth specializations of dendrites at site of synaptogenesis. *J. Neurosci* 3, 177-188
- 154 Greenough WT, Klintsova AY, Irwin SA, Galvez R, Bates KE, Weiler IJ (2001) Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99,(13):7103-7106
- 155 Castren M, Lampinen KE, Miettinen R, Koponen E, Sipola I, Bakker CE, Oostra BA,

- 
- Castren E. (2002) BDNF regulates the expression of fragile X mental retardation protein mRNA in the hippocampus. *Neurobiol Dis.* 11(1):221-9.
- 156 Bardoni B, Schenck A, Mandel JL. (1999) A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (FMR1) protein. *Hum Mol Genet.* 8(13):2557-66.
- 157 Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279(5350):509-14.
- 158 Bardoni B, Castets M, Huot ME, Schenck A, Adinolfi S, Corbin F, Pastore A, Khandjian EW, Mandel JL (2003) 82-FIP, a novel FMRP interacting protein, shows a cell cycle-dependent intracellular localisation. *Hum Mol Genet* 12:1689-98
- 159 Hagerman PJ, Hagerman RJ (2004) The fragile-X premutation: A maturing perspective. *Am. J. Hum. Genet.* Elektronische Veröffentlichung vom 29. März 2004
- 160 Taneja KL, McCurrach M, Schalling M, Housman D, Singer RH (1995) Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* 128:995-1002
- 161 Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LP. (2001) Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9 *Science.* 3;293(5531):864-7.
- 162 Willemsen R, Hoogeeven-Westerveld M, Reis S, Holstege J, Severijnen LA, Nieuwenhuizen IM, Schrier M, Van Unen L, Tassone F, Hoogeeven AT, Hagerman PJ, Mientjes EJ, Oostra BA (2003) The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions: implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome. *Hum Mol Genet* 12:949-959
- 163 Jin P, Zarnescu DC, Zhang F, Pearson CE, Lucchesi JC, Moses K, Warren ST (2003) RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in *Drosophila*. *Neuron* 39:739-747
- 164 Schmucker B, Seidel J. (1999) Mosaicism for a full mutation and a normal size allele in two fragile X males. *Am J Med Genet.* 84(3):221-5.
- 165 Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boue C, Tommerup N, Van Der Hagen C, DeLozier Blanchet C, Croquette MF, Gilgenkrantz S, Jalbert P, Voelckel MA, Oberle I, Mandel JL (1991): Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 325:1673-1681
- 166 Das S, Kubota T, Song M, Daniel R, Berry-Kravis EM, Prior TW, Popovich B, Rosser L, Arinami T, Ledbetter DH. (1997-98) Methylation analysis of the fragile X syndrome by PCR. *Genet Test.* 1(3):151-5.
- 167 Smits A, Smeets D, Hamel B, Dreesen J, de Haan A, van Oost B (1994) Prediction of mental status in carriers of the fragile X syndrome using CGG repeat length. *Am J Med Genet* 51:491-500
- 168 Willemsen R, Mohkamsing S, de Vries B, Devys D, van den Ouweland A, Mandel JL, Galjaard H, Oostra B. (1995) Rapid antibody test for fragile X syndrome. *Lancet.* 345(8958):1147-8.
- 169 Maddalena A, Richards CS, McGinniss MJ, Brothmann A, Desnick RJ, Grier RE, Hirsch B, Jacky P, McDowell GA, Popovich B, Watson M, Wolff DJ (Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee) (2001) Technical standards and guidelines for fragile X; the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of

- 
- the American College of Medical Genetics. *Genet Med* 3:200-205
- 170 Saul RA, Tarleton JC (2004) Fragile X Syndrome. *Gene Reviews* ([www.geneclinics.org](http://www.geneclinics.org)). Elektronische Version vom 5.8.2004
- 171 Morbidity and Mortality Weekly Report (2002) Delayed diagnosis of fragile X syndrome – United States 1990-1999. *MMWR* 51:740-742
- 172 Hagerman RJ (2001) Medical follow-up and pharmacotherapy. Aus: Hagerman, Hagerman: *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research*, 3. Auflage, Johns Hopkins University Press, Baltimore, ISBN: 0801868440 Seite 287-339
- 173 Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 22(15):2990-7.
- 174 Erster SH, Brown WT, Goonewardena P, Dobkin CS, Jenkins EC, Pergolizzi RG. (1992) Polymerase chain reaction analysis of fragile X mutations. *Hum Genet.* 90(1-2):55-61.
- 175 Levinson G, Maddalena A, Palmer FT, Harton GL, Bick DP, Howard-Peebles PN, Black SH, Schulman JD. (1994) Improved sizing of fragile X CCG repeats by nested polymerase chain reaction. *Am J Med Genet.* 51(4):527-34.
- 176 Pergolizzi RG, Erster SH, Goonewardena P, Brown WT. (1992) Detection of full fragile X mutation. *Lancet.* 339(8788):271-2.
- 177 Haddad LA, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SD. (1996) A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum Genet.* 97(6):808-12.
- 178 El-Aleem AA, Bohm I, Temtamy S, el-Awady M, Awadalla M, Schmidtke J, Stuhmann M. (1995) Direct molecular analysis of the fragile X syndrome in a sample of Egyptian and German patients using non-radioactive PCR and Southern blot followed by chemiluminescent detection. *Hum Genet.* 96(5):577-84.
- 179 Brown WT, Houck GE Jr, Jeziorowska A, Levinson FN, Ding X, Dobkin C, Zhong N, Henderson J, Brooks SS, Jenkins EC. (1993) Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *JAMA.* 270(13):1569-75.
- 180 Chong SS, Eichler EE, Nelson DL, Hughes MR. (1994) Robust amplification and ethidium-visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. 1: *Am J Med Genet.* 51(4):522-6.
- 181 Larsen LA, Grønskov K, Nørgaard-Pedersen B, Brøndum-Nielsen K, Hasholt L, Vuust J. (1997) High-throughput analysis of fragile X (CGG)<sub>n</sub> alleles in the normal and premutation range by PCR amplification and automated capillary electrophoresis. *Hum Genet.* 100(5-6):564-8.
- 182 Houdayer C, Lemonnier A, Gerard M, Chauve C, Tredano M, de Villemeur TB, Aymard P, Bonnefont JP, Feldmann D. (1999) Improved fluorescent PCR-based assay for sizing CGG repeats at the FRAXA locus. *Clin Chem Lab Med.* 37(4):397-402.
- 183 Zhou Y, Law HY, Boehm CD, Yoon CS, Cutting GR, Ng IS, Chong SS. (2004) Robust fragile X (CGG)<sub>n</sub> genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. *J Med Genet.* 41(4):e45.
- 184 Rees WA, Yager TD, Korte J, von Hippel PH. (1992) Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry.* 32(1):137-44.
- 185 Santoro MM, Liu Y, Khan SM, Hou LX, Bolen DW. (1992) Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry.* 31(23):5278-83.

- 
- 186 Chakrabarti R, Schutt CE. (2001) The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Res.* 29(11):2377-81.
- 187 Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Oberle I, Mandel JL. (1992) On some technical aspects of direct DNA diagnosis of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 43(1-2):197-207.
- 188 Eichler EE, Nelson DL. (1996) Genetic variation and evolutionary stability of the FMR1 CGG repeat in six closed human populations. *Am J Med Genet.* 1996 Jul 12;64(1):220-5.
- 189 Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 1991 67(6):1047-58.
- 190 Zhong N, Ju W, Pietrofesa J, Wang D, Dobkin C, Brown WT. (1996) Fragile X "gray zone" alleles: AGG patterns, expansion risks, and associated haplotypes. *Am J Med Genet.* 64(2):261-5.
- 191 Tan EK, Zhao Y, Puong KY, Law HY, Chan LL, Yew K, Tan C, Shen H, Chandran VR, Teoh ML, Yih Y, Pavanni R, Wong MC, Ng IS. (2004) Fragile X premutation alleles in SCA, ET, and parkinsonism in an Asian cohort. *Neurology* 63(2):362-3.
- 192 Van Esch H, Dom R, Bex D, Salden I, Cackebecke J, Wibail A, Borghgraef M, fryns JP, Matthijs G (2004) Screening for FMR1 premutations in 122 older Flemish males presenting with ataxia. In publication.

## Lebenslauf

Jens Florian Schittenhelm

Geboren am 19.09.1975 in Stuttgart

Deutsche Staatsangehörigkeit

Verheiratet mit Andrea Bob-Schittenhelm, 1 Kind

1982-1995 Schulausbildung Freie Waldorfschule Tübingen, Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

1995-1996 Studium Generale am Leibniz Kolleg Tübingen. Abschluss mit der Trimesterarbeit im Fach Chemie

1996-1997 Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen

1997-2003 Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen

1999 Ärztliche Vorprüfung

2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

26.11.2003 Abschluss der Ärztlichen Prüfung

seit 2004 Assistenzarzt am Institut für Hirnforschung an der Eberhard Karls Universität Tübingen