

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. O. Rieß
Abteilung Medizinische Genetik
Abteilungsleiter: Professor Dr. O. Rieß

Mutationsanalyse des PRKCG- (SCA14) und
FGF14-Genes (SCA27) mittels dHPLC
bei Ataxie-Patienten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Alexander Rentschler

aus
Reutlingen

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. med. O. Rieß

2. Berichtstatter: Professor Dr. med. L. Schöls

Widmung

Meinen Eltern und meinem Bruder Marcel

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Tabellenverzeichnis	5
II. Abbildungsverzeichnis	6
III. Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	13
1.1 Einteilung und Symptomatik der Ataxien	13
1.2 Historie	13
1.3 Autosomal-dominant vererbte Ataxien	16
1.4 Spinozerebelläre Ataxie Typ 14 (SCA 14)	19
1.4.1 Genotyp/Phänotyp-Analysen	21
1.4.2 Normalvarianten der Allele	22
1.4.3 Pathologische Varianten der Allele	22
1.4.4 Normales Gen-Produkt	24
1.4.5 Abnormale Genprodukte	25
1.5 Spinozerebelläre Ataxie FGF 14 (SCA 27)	26
1.5.1 Normalvarianten der Allele	29
1.5.2 Pathologische Varianten der Allele	30
1.6 Zielsetzung der Arbeit	32
2 Material	33
2.1 Chemikalien	33
2.2 Puffer und Lösungen	33
2.3 Puffer und Enzyme	34
2.3.1 Allgemeine Puffer	34
2.3.2 dHPLC-spezifische Lösungen	34
2.4 DNA	35
2.5 Referenzsequenz	35

Inhaltsverzeichnis

2.5.1 SCA 14 (Protein Kinase C gamma, PRKCG)	35
2.5.2 SCA 27 (Fibroblast growth factor 14, FGF 14)	35
2.6 Oligonukleotide (Primer)	36
2.7 Größenstandard	36
2.8 Enzyme	36
2.9 Kits	36
2.10 Geräte und Hilfsmittel	37
2.10.1 Fotodokumentation	37
2.10.2 Elektrophoresezubehör	37
2.10.3 Thermocycler	37
2.10.4 Sequenzierer/dHPLC	37
2.10.5 Zentrifugen	37
2.10.6 Sonstiges	38
2.11 Verbrauchsmaterialien	38
3 Methoden	39
3.1 Klinische Untersuchung und Zusammenstellung von Patienten- und Kontrollgruppen	39
3.2 DNA-Isolierung	39
3.3 Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction - PCR)	39
3.4 Primerdesign	41
3.5 Etablierung der PCR-Bedingungen	41
3.6 Agarosegelelektrophorese	42
3.7 Bildung von Heteroduplices	43
3.8 Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dHPLC)	43
3.9 dHPLC Methodenoptimierung	46
3.10 Auswertung eines Chromatogramms	47
3.11 Aufreinigung der PCR-Produkte	48
3.12 Zyklische Sequenzierungsreaktion	48
3.13 Sequenzierreaktion	50
3.13.1 Abstoppen der Sequenzierreaktion und Fällung der DNA	51
3.14 <i>in-silico</i> Abschätzung	53

4	Ergebnisse	54
4.1	Klinische Untersuchung und Zusammenstellung der Patienten- und Kontrollproben	54
4.2	Qualitätsüberprüfung der DNA	54
4.3	Mutationsanalyse des PRKCG- und des FGF14-Gens bei SCA-Patienten mittels dHPLC	54
4.4	Optimierung der PCR-Bedingungen	55
4.5	Optimierung der dHPLC-Analyse	56
4.6	dHPLC-Analyse und anschließende Sequenzierung	58
4.7	Ergebnisse der Mutationsanalysen im PRKCG Gen (SCA14)	60
4.7.1	Exon 1	61
4.7.2	Exon 2	64
4.7.3	Exon 3	65
4.7.4	Exon 4	66
4.7.5	Exon 6	68
4.7.6	Zusammenfassung der Ergebnisse des PRKCG-Gens	69
4.8	Ergebnisse der Mutationsanalysen im FGF14- Gen (SCA27)	71
4.8.1	Exon 5	72
4.8.2	Zusammenfassung der Ergebnisse des FGF14-Gens	74
5	Diskussion	75
5.1	Diskussion der denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dHPLC)	75
5.2	Diskussion Spinozerebelläre Ataxie 14 (PRKCG)	77
5.2.1	Mutationen im Exon 1	81
5.2.2	Mutationen im Exon 2	82
5.2.3	Mutationen im Exon 4	83
5.3	Diskussion Spinozerebelläre Ataxie 27 (FGF14)	86
5.4	Schlussfolgerungen	88

Inhaltsverzeichnis

6	Zusammenfassung	91
7	Literaturverzeichnis	94
8	Anhang	116
IV	Danksagung	122
V	Lebenslauf	123

I Tabellenverzeichnis	Seite
1 Genetik der autosomal-dominant vererbten spinozerebellären Ataxien	17
2 Lokalisation der SCA14 Mutationen im PRKCG-Gen	24
3 Lokalisation der bislang beschriebenen SCA27 Mutationen im FGF14 Gen	31
4 Verwendete Chemikalien	33
5 Allgemeine Puffer	34
6 dHPLC-spezifische Lösungen	34
7 OMIM Einträge für Spinozerebelläre Ataxie Typ 14	35
8 OMIM Einträge für Spinozerebelläre Ataxie Typ 27	35
9 Größenstandard	36
10 DNA-Polymerase	36
11 Kits	36
12 Fotodokumentation	37
13 Elektrophoresezubehör	37
14 Thermocycler	37
15 Sequenzierer / dHPLC	37
16 Zentrifugen	37
17 Sonstiges Zubehör	38
18 Verbrauchsmaterialien	38
19 PCR -Standard-Ansatz für die Amplifikation aller Exone	39
20 Standard-PCR-Programm, 40 Zyklen	40
21 PCR -Standard-Ansatz für die Amplifikation von cDNA	40
22 Touchdown-PCR mit cDNA	40
23 Ansatz für die Sequenzierreaktion (10 µl Endvolumen)	50
24 Thermocycler-Programm für die Sequenzierreaktion	51
25 Stopplösung für Sequenzierungsreaktion	51
26 Einstellungen der Sequenzierungsreaktion	52
27 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dHPLC-Analyse und direkter Sequenzierung des PRKCG-Gens	70

28	Klinische Charakteristik der SCA14-Patienten	71
29	Zusammenfassung der Ergebnisse aus dHPLC-Analyse und direkter Sequenzierung des FGF14-Gens	74
30	Detektionsraten der dHPLC	76
31	Intronische Primer zur Amplifikation der Exone des PRKCG-Gens	116
32	Intronische Primer zur Amplifikation der Exone des FGF14 Gens	117
33	PCR-Bedingungen für die Amplifikation der 18 Exone des PRKCG-Gens	118
34	PCR-Bedingungen für die Amplifikation der 5 Exone des FGF14-Gens	119
35	dHPLC-Analysebedingungen für SCA14 (PRKCG) im High-Throughput-Modus	120
36	dHPLC-Analysebedingungen für SCA27 (FGF14) im High-Throughput-Modus	121
II Abbildungsverzeichnis		Seite
1	Weltweite Prävalenz von SCA Subtypen	16
2	MRT des Gehirns und Oberflächen-Elektromyographie	20
3	Proteinstruktur der PRKCG	23
4	Hetero- und Homoduplexbildung (nach Transgenomic)	46
5	Qualitätsüberprüfung der DNA	54
6	Flussdiagramm des Mutationsscreenings	55
7	Gradienten PCR Gelbild	56
8	Doppelbanden nach PCR	56
9	Helikale Fraktion gegen Temperatur (am Beispiel PRKCG, Exon 4)	57
10	Schmelzprofile zur Ermittlung der Analysetemperaturen (am Beispiel PRKCG, Exon 3)	58
11	dHPLC-Elutionsprofile gepoolter Proben unauffälliger PCR-Fragmente der PRKCG	59

12	Auffälliges Elutionsprofil einer gepoolten Probe und der Einzelproben	60
13	dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 1 (PRKCG) Patient 010208 und Wildprobe Ceph2805	61
14	dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 1 (PRKCG) Patient 040885 und Wildprobe Ceph2805	62
15	Fragment eines multiplen Alignments um Aminosäureposition 21 der PRKCG einer <i>in-silico</i> Abschätzung mittels Polyphen	62
16	dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 2 (PRKCG) Patient 040912, Wildprobe Ceph136209	64
17	Fragment eines multiplen Alignments um Aminosäureposition 66 der PRKCG einer <i>in-silico</i> Abschätzung mittels Polyphen	65
18	dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 3 (PRKCG) Patient 031619 und 040808, Wildprobe Ceph136209	66
19	dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 4 (PRKCG) Patient 021353, Wildprobe Ceph136209	67
20	Fragment eines multiplen Alignments um Aminosäureposition 116 der PRKCG einer <i>in-silico</i> Abschätzung mittels Polyphen	67
21	dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 6 (PRKCG) Patient SCA0277 und 040808, Wildprobe Ceph136209	68
22	Funktionelle Domänen und Aufbau der konservierten (C1–C4) und der variablen Regionen der Protein Kinase C Gamma (PRKCG)	69

23	dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 5 (FGF14) Patient 021352, 030253 und SCA0005, Wildprobe Ceph2805	73
----	---	----

III Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
Abb.	Abbildung
ADCA	Autosomal-dominant vererbte zerebelläre Ataxien
ADSA	Autosomal-dominant vererbte spastische Ataxien
AFG3L2	ATPase family gene 3-like 2
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATXN	Ataxin
B/Bp	Basenpaar(e)
β	Beta
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	centi (hundertstel)
ca.	circa
CACNA1a	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
CACNB4	Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit [
CCT	craniale Computer-Tomographie
CEPH	Centre d'Études des Polymorphims Humaines
cPRKC	classical (klassische) Proteinkinase C
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtri-phosphat
dGTP	Desoxyguanintri-phosphat
d.h.	das heisst
dHPLC	denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleidacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRPLA	dentato-rubrale pallido-luysiane Atrophie
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTCS	Dye Terminator Cycle Sequenzing
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EA	Episodische Ataxien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten-Wachstums-Faktor)
FHF	fibroblast growth factor homologous factor
FRDA	Friedreich Ataxie
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GC	Guanin/Cytosin
ggf.	gegebenenfalls
h	hora (Stunde)
HCl	Salzsäure
HT	high throughput = hoher Durchsatz
ITPR1	Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptor 1
K	Kilo
Kb	Kilobasenpaare
KCNA1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1
L	light = leicht
l	Liter
μ	mikro
m	milli
M	Molar
m	Meter
Mb	Megabasenpaare

Abkürzungsverzeichnis

min	Minute
MJD	Machado-Joseph-Disease
mRNA	messenger Ribonucleinacid (Boten-Ribonukleinsäure)
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
n	Nano
Na	Natrium
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid H
NaAcetat	Natriumacetat
OD	optische Dichte
Ω	Ohm
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OPCA	olivo-ponto-zerebelläre Atrophie
p	piko
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-chain-reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pH	potentia Hydrogenii
PKC	Protein Kinase
PLEKHG4	pleckstrin homology domain containing, family G member 4
PPP2R2B	Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B, Beta isoform
PRKCG	Protein Kinase C Gamma
PRKCγ	Protein Kinase C Gamma
RLS	Restless-legs-Syndrom
Rpm	Rotationen pro Minute
s	Sekunde
SAX1	Spastische Ataxie 1
SCA	Spinocerebellar Ataxia (spinozerebelläre Ataxie)
ssDNA	singel stranded DNA (Einzelstrang-DNA)
SNP	Singel (Einzel) Nukleotid Polymorphismus

Abkürzungsverzeichnis

SPTBN2	Spectrin, beta, non-erythrocytic 2
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	Tata-Binding-Protein
TE	Tris-EDTA
TEAA	Triethylammoniumacetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBK2	Tau Tubulin Kinase 2
U	Unit (Einheit)
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent, ml/100 ml Lösung
w/v	Gewichtsprozent, g/100 ml Lösung
X	Chi
ZNS	Zentrales Nervensystem

Purin-/Pyrimidinbasen:

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

Aminosäuren:

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

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einteilung und Symptomatik der Ataxien

Das griechische Wort „ataxia“ (αταξία) bedeutet im Deutschen „Unordnung“, „Durcheinander“ oder „Verwirrung“. In der Medizin werden mit dem Begriff der Ataxie eine mangelnde Koordination respektive Störungen des geordneten Zusammenwirkens verschiedener Muskelgruppen verbunden, wodurch das Zustandekommen einer zielgerichteten Bewegung beeinträchtigt oder gar aufgehoben ist. Nosologien sind oft ähnlich kompliziert wie der klinische Phänotyp. Aus klinischer, pathoanatomischer und genetischer Sicht stellen Ataxien eine sehr heterogene Erkrankungsgruppe dar, deren Leitsymptom eine progrediente Gangunsicherheit (Gangataxie) ist, die durch Degeneration zerebellärer oder spinaler Systeme (Tractus spinocerebellaris, Hinterstrang) verursacht wird. Neben Gangataxien treten häufig weitere zerebelläre Symptome wie Extremitätenataxie und Dysarthrie sowie okulomotorische Störungen (pathologischer Nystagmus, langsame Blicksakkaden, externe Ophthalmoplegie, und Pseudoexophthalmus) auf. Ferner zeigen sich bulbäre Symptome (Dysphagie, Fazialisparese, faziolinguale Myokymien), extrapyramidale Symptome (Rigor, Akinese, Myoklonus, Chorea, Halte- und Aktionstremor, Dystonie, Hypomimie), pyramidale Störungen (Spastik, Hyperreflexie, Pyramidenbahnzeichen), periphere Störungen (Hyporeflexie, Atrophien, Faszikulationen, Pallhypästhesie, axonale Polyneuropathie, Dysästhesien) sowie Demenz, Schlafstörungen, Urge-Inkontinenz bzw. imperativer Harndrang und orthostatische Dysregulation.

1.2 Historie

Die Nomenklatur und Einteilung hereditärer Ataxien ist schon lange ein umstrittenes Problem. Im 19. Jahrhundert wurden zunächst Krankheitsbilder und Krankheitserscheinungen phänomenologisch in Anlehnung an den Erstbeschreiber benannt. Hierzu gehörten zum Beispiel Nikolaus Friedreich (1863),

Strümpell, Menzel (1891), Nonne, Pierre Marie und andere, deren Namen zum Teil auch heute noch als Krankheitsbezeichnung verwendet werden. Die so entstandene historische Einordnung der Ataxien ließ jedoch erhebliche Überlappungen zwischen den einzelnen Krankheiten und Symptomen erkennen, die Einteilungen erschienen unzureichend. In Folge dessen wurde von Holmes (1907) und Greenfield (1954) eine Klassifikation auf pathoanatomischer Grundlage erarbeitet, welche Ataxien in vorwiegend spinale bzw. spinozerebelläre Degenerationen, „rein“ zerebelläre (kortikale) Atrophien (CA), olivoponto-zerebelläre Atrophien (OPCA) sowie dentato-rubrale Atrophien (DRPLA) einteilte. Diese Klassifikation erwies sich allerdings für die klinische Diagnostik als unbefriedigend, da exakte Diagnosen erst post mortem gestellt werden konnten und weder die Ätiologie, das klinische Krankheitsbild noch die Prognose bei diesen Einteilungen berücksichtigt waren. Aus diesem Grund wurde eine derartige Gliederung wegen des geringen Nutzens zugunsten einer Klassifikation nach klinischen und genetischen Gesichtspunkten wieder verlassen [Harding 1983].

Anita Harding teilte die Ataxien in früh-beginnende, d.h. in der Regel vor dem 25. Lebensjahr einsetzende, und spät-beginnende, also jenseits des 25. Lebensjahres beginnende Formen ein. Ersteren (z.B. Friedreich-Ataxie) wurden die idiopathischen zerebellären Atrophien (IDCA), letzteren die autosomal dominant erblichen zerebellären Ataxien (ADCA) mit 3 Subtypen zugeordnet: ADCA I ist eine klinisch und genetisch sehr heterogene Unterform, der ca. 75% der Patienten zuzuordnen sind. Klinisch stehen eine progressive Ataxie, kombiniert mit zahlreichen Symptomen wie Sakkadenverlangsamung, unterschiedlich ausgeprägter supranukleärer Ophthalmoplegie, Pyramidenbahnzeichen, Muskelatrophien, Basalganglien-Symptomen und Sensibilitätsstörungen im Vordergrund, seltener kommen extrapyramidalmotorische Zeichen, Inkontinenz und Entwicklung einer Demenz vor. Während ADCA II Ataxien mit begleitender pigmentärer Retinadegeneration umfasst, wird der ADCA Typ III durch eine Ataxie mit reiner Kleinhirnsymptomatik ohne systemübergreifende Symptome abgegrenzt. Die von der Neurologin Anita Harding vorgenommene Einteilung hat sich mit der Zeit ebenfalls als unbefriedigend erwiesen, unter

anderem weil bezüglich des klinisch manifesten Erkrankungsbeginns bei den autosomal-dominanten Ataxien eine hohe Varianz nachweisbar ist [Klockgether et al. 1995]. Hinsichtlich der Symptomatik besteht gleichwohl eine große Variabilität, so dass neben einer rein zerebellären Symptomatik auch Mischformen verifizierbar sind, die eine exakte Zuordnung unmöglich machen. Gegenwärtig erfolgt eine grundsätzliche Klassifizierung degenerativer Ataxien in hereditäre (erbliche) und nichterbliche Erkrankungen. Die hereditären Formen werden entsprechend ihrem formalgenetischen Erbgang in autosomal-rezessiv, autosomal-dominant und die sehr seltenen X-chromosomal vererbten Ataxien differenziert. Die nichterblichen Ataxien unterliegen einer Einteilung in idiopathische Erkrankungen ohne fassbare Ursache und symptomatische Ataxien (sekundäre Ataxien) mit bekannter Genese, wie zum Beispiel entzündlicher, toxischer (z.B. Alkohol), autoimmuner (Gliadin-Antikörper, vaskuläre Erkrankungen), metabolischer (Vitamin B₁₂-Mangel), paraneoplastischer (gynäkologische Tumoren, Bronchialkarzinom, Morbus Hodgkin) oder physikalischer Ursache. Als Ataxien werden nicht-fokale Erkrankungen des Kleinhirns und seiner Verbindungen bezeichnet, deren Leitsymptom chronische Ataxie ist. Fokale oder multifokale Erkrankungen des Kleinhirns und Polyneuropathien sind nicht zur Krankheitsgruppe der Ataxien zu zählen, auch wenn die Ataxie das Hauptsymptom darstellt.

Zum Ausschluss einer fokalen Erkrankung des Kleinhirns und einer Polyneuropathie sind eine Magnetresonanztomographie des Schädels, Liquor-Untersuchungen und elektrophysiologische Untersuchungen (Neurographie, ggf. Elektromyographie) notwendig (siehe Abbildung 2). Zur weiteren Abklärung und Unterscheidung der einzelnen Formen der Ataxien ist ein nach Erkrankungsalter und Familienanamnese differenziertes Vorgehen erforderlich, in dem Labordiagnostik mit molekulargenetischen Tests eine wesentliche Rolle spielt.

Der wissenschaftliche Fortschritt auf molekulargenetischem Gebiet und die Identifikation neuer Genloci sowie die Entdeckung von zu Grunde liegenden Mutationen bzw. Pathomechanismen der autosomal-dominant vererbten Ataxien machen immer wieder eine Neuordnung an Hand der genetischen Grundlagen erforderlich.

1.3 Autosomal-dominant vererbte Ataxien

Autosomal-dominant vererbte zerebelläre Ataxien (ADCA) stellen eine sehr heterogene Gruppe von Bewegungsstörungen dar, die durch eine progressive Ataxie charakterisiert wird und mit den unterschiedlichsten neurologischen Symptomen einhergehen kann [Schols et al. 2004]. Die Prävalenz (siehe Abbildung 1) der dominanten Ataxien liegt schätzungsweise bei mindestens 2,8-3,8 : 100000 (van Warrenburg et al. 2002). In der Vergangenheit gelang es bislang 32 Genorte zu finden und davon 16 ursächliche Gene zu identifizieren (Tabelle 1). Dabei werden ADCA mit progredientem Krankheitsverlauf von genetischer Seite unter der Gruppenbezeichnung spinocerebelläre Ataxien (SCA) und die Genorte in der Reihenfolge ihrer Beschreibung als spinocerebelläre Ataxie Typ 1 bis 8 und Typ 10 bis Typ 29 (SCA 1-8; SCA 10-29) durchnummeriert. Hinzu kommen die dentatorubrale pallido-luysiane Atrophie (DRPLA), die autosomal dominant spastische Ataxie (ADSA) sowie die Episodischen Ataxien Typ 1 bis 4 (EA).

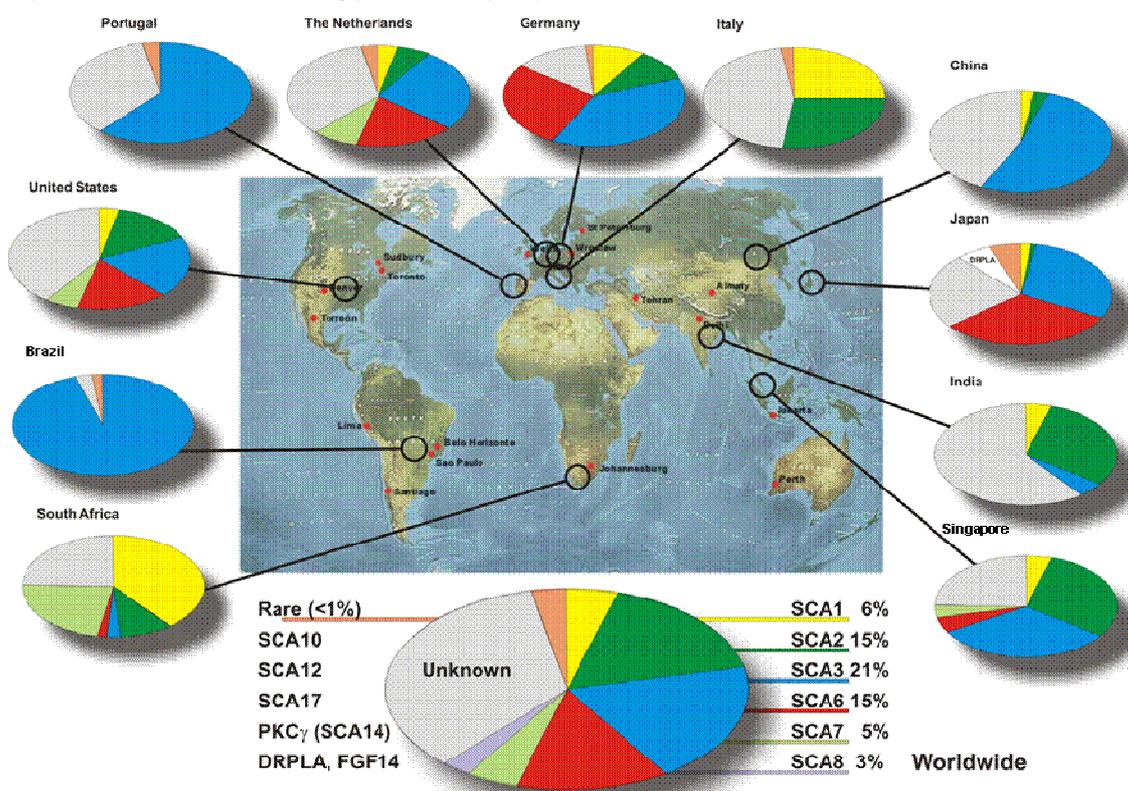


Abbildung 1: Weltweite Prävalenz von SCA Subtypen (Schöls et al. 1997; Moseley et al. 1998; Saleem et al. 2000; Tang et al. 2000; Maruyama et al. 2002, Silveira et al. 2002; van de Warrenburg et al. 2002; Dryer et al. 2003; Brusco et al. 2004; Schöls et al. 2004; Shimizu et al. 2004, Zortea et al. 2004). (Grafik von P. Bauer)

1 Einleitung und Fragestellung

Tabelle 1: Genetik der autosomal-dominant vererbten spinocerebellären Ataxien				
Erkrankung	Genname	Chromosomale Lokalisation	Mutationstyp	Referenz
SCA1	ATXN1	6p23	CAG-Expansion	Orr et al. 1993
SCA2	ATXN2	12q24.1	CAG-Expansion	Imbert et al. 1996
SCA3	ATXN3/MJD-1	14q24.3-q31	CAG-Expansion	Kawaguchi et al. 1994
SCA4	PLEKHG4?	16q22.1	Punktmutation	Ishikawa et al. 2005
SCA5	SPTBN2	11p13	Punktmutation	Ranum et al. 1994
SCA6	CACNA1A	19p13	CAG-Expansion	Zhuchenko et al. 1997
SCA7	ATXN7	3p21.1-p12	CAG-Expansion	David et al. 1997
SCA8	ATXN80S	13q21	CAG.CTG	Koob et al. 1999
SCA10	ATXN10	22q13	ATTCT Intron 9	Matsuura et al. 2000 Matsuura et al. 2002
SCA11	TTBK2	15q15.2	Insertion/Deletion	Worth et al. 1999, Houlden et al. 2007
SCA12	PPP2R2B	5q31-33	CAG, 5'UTR	Holmes et al. 1999
SCA13	KCNC3	19q13.3-q13.4	Punktmutationen	Herman-Bert et al. 2000 Waters et al. 2006
SCA14	PRKCG	19q13.4	Punktmutationen	Yamashita et al. 2000; Brkanac et al. 2002; Yabe et al. 2003; Chen et al. 2005
SCA15	ITPR1 (früher SCA16)	3p26.1-p25.3	Deletion	Knight et al. 2001; Storey et al. 2001; Knight et al. 2003; Garner et al. 2005
SCA16	SCA16	8q22.1-24.1	Punktmutationen	Miyoshi et al. 2001
SCA17	TBP	6q27	CAA/CAG-Expansion	Koide et al. 1999; Nakamura et al. 2001

1 Einleitung und Fragestellung

SCA18	Unbekannt	7q22-q32		Brkanac et al. 2002
SCA19	Unbekannt	1p21-q21		Verbeek et al. 2002; Schelhaas et al. 2003; Schelhaas et al. 2004
SCA20	Unbekannt	11q12.2-11q12.3		Knight et al. 2004a; Storey et al. 2005
SCA21	Unbekannt	7p21-15.1		Devos et al. 2001; Vuillaume et al. 2002
SCA22	Unbekannt	1p21-q23		Chung et al. 2003; Chung und Soong 2004; Schelhaas et al. 2004
SCA23	Unbekannt	20p13-12.3		Verbeek et al. 2004
SCA25	Unbekannt	2p21-p15		Stevanin et al. 2004; Stevanin et al. 2005
SCA26	Unbekannt	19p13.3		Yu et al. 2005
SCA27	FGF14	13q34	Punktmutationen	van Swieten et al. 2003 Brusse et al. 2005
SCA28	AFG3L2	18p11.22		Cagnoli et al. 2006
SCA29	Unbekannt	3p26		
DRPLA	ATN	12p13.31	CAG	Smith 1958; Naito und Oyanagi 1982; Koide et al. 1994
EA1	KCNA1	12p13	Punktmutationen	Browne et al. 1994
EA2	CACNA1A	19p13	Punktmutationen	Ophoff et al. 1996
EA3	Unbekannt	1q42		Steckley et al. 2001
EA4	Unbekannt			Damji et al. 2006

Zwischen den SCA-Subtypen gibt es bezüglich des Symptomenspektrums eine breite Überlappung, so dass es zwar Befundkonstellationen gibt, die für einen bestimmten Subtyp charakteristisch, jedoch nicht spezifisch sind. In Ermangelung von Anzeichen, klinischen Symptomen (z.B. Makuladegeneration) und Familienkonstellationen, die auf eine spezifische SCA hinweisen würden, ist die pragmatischste und kostengünstigste Strategie zunächst die Mutationen zu screenen, welche den überwiegenden Anteil der autosomal dominanten SCAs verursachen (SCA 1, 2, 3, 6, 8, 12 und 17). Bei fehlendem Nachweis kann mit einer Mutationsanalyse seltener vorkommender SCA wie beispielsweise der SCA14 (PRKCG) bzw. der SCA27 (FGF14) fortgefahren werden.

1.4 Spinozerebelläre Ataxie Typ 14 (SCA 14)

Die spinozerebelläre Ataxie Typ 14 stellt eine „rein“ zerebelläre, nur langsam progrediente Ataxie (ADCA III) dar und konnte durch verschiedene Forschungsgruppen auf Chromosom 19q13.4-qter kartiert [Yamashita et al. 2000; van de Warrenburg et al. 2003; Stevanin et al. 2004] und die Protein Kinase C Gamma (PRKCG (OMIM 179680); PKC γ) als ursächliches Gen (OMIM 605361) identifiziert werden [Chen, Brkanac et al. 2003; Yabe et al. 2003].

Die ersten Symptome der Erkrankung äußern sich oft durch eine schwache Gangataxie, die im Laufe mehrerer Jahre progredient werden kann. Das genaue Alter des Erkrankungsbeginns ist daher oft nicht exakt feststellbar, im Normalfall liegt es im frühen Erwachsenenalter (durchschnittlich bei 28 Jahren) zwischen dem 12. und 42. Lebensjahr [Yamashita et al. 2000; Brkanac et al. 2002; Brkanac et al. 2003, Chen et al. 2003, Yabe et al. 2003, Stevanin et al. 2004]. Die Betroffenen leiden im Allgemeinen unter einer mäßigen Dysarthrie, mehr als die Hälfte der Patienten zeigen einen horizontalen Blickrichtungsnystagmus oder eine sakkadierte Blickfolge. Sehnenreflexe variieren stark und können in ihrer Ausprägung individuell unterschiedlich teils abgeschwächt, gesteigert oder auch unauffällig sein. Darüber hinaus zeigen sich klinisch jedoch auch extrapyramidale Syndrome wie Myokloni, Dystonien oder Parkinsonsyndrome, was eine breite Überlappung im Symptomspektrum sowie die Heterogenität der Erkrankung verdeutlicht und eine exakte klinische Zuordnung als ADCA III erschwert.

Fünf Patienten einer japanischen Familie mit frühem Erkrankungsbeginn zeigten einen episodisch über Minuten bis zu mehreren Stunden dauernden axialen Myoklonus, der mit einem Tremor des Kopfes und des Rumpfes einherging [Yamashita et al. 2000]. In einer französischen SCA14-Familie konnten bei einem Betroffenen durch Oberflächen-Elektromyographie Myokloni der Extremitäten festgestellt sowie bei mehreren Familienmitgliedern Faszikulationen des Gesichts und/oder Myokymien beobachtet werden [Stevanin et al. 2004]. Das Auftreten von Parkinsonsymptomen mit Rigor und Tremor wurde bei zwei SCA14-Familien beschrieben [Stevanin et al. 2004; van de Warrenburg et al. 2004], ebenso kann ein kognitives Defizit Teil der Erkrankung sein [Stevanin et al. 2004; Chen et al. 2005]. Bei 13 von 18 Mitgliedern einer betroffenen französischen Familie [Stevanin et al. 2004] wurden intellektuelle Beeinträchtigungen sowie Aufmerksamkeitsdefizite beschrieben. Ein jenseits des 70. Lebensjahres bei einigen Betroffenen zu beobachtender Gedächtnisverlust könnte allerdings mit dem von der Ataxie selbst unabhängigen Auftreten einer altersbedingten Demenz übereinstimmen.

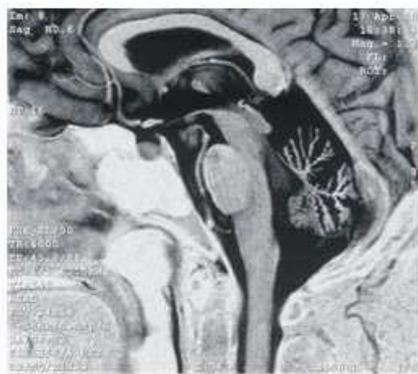


Abb. A

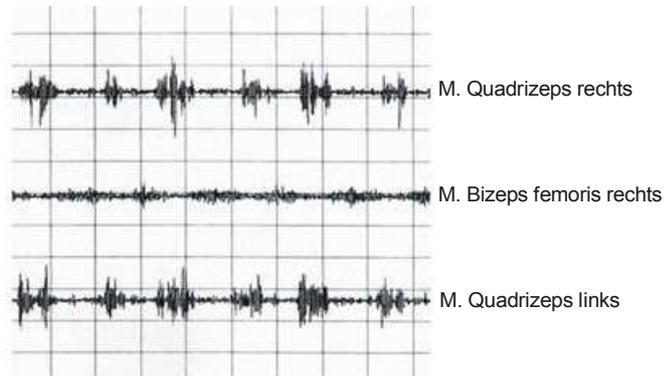


Abb. B

400 ms

Abbildung 2: kraniales MRT sowie Oberflächen-Elektromyographie eines unter SCA14 leidenden Patienten (Träger einer G123E Mutation). Linke Abbildung (Abb. A): T1-gewichtete, sagittale Aufnahme, eine Atrophie der Vermis cerebelli und Versmälerung der Pons zeigend.

Rechte Abbildung (Abb. B): EMG der Extensoren und Flexoren des rechten Beines. Hierbei konnten abnormale Muskelaktivitäten mit einer Frequenz zwischen 3 und 4 Hz, segmentalen Myorhythmien oder Myokloni der Extremitäten ähnelnd, beobachtet werden. (Abbildung von Klebe et al. 2007: New mutations in protein kinase C gamma associated with spinocerebellar ataxia type 14.)

Die Mehrzahl der Ataxiepatienten kann ambulant behandelt werden, stürzt jedoch aufgrund der Gebrechen vermehrt und benötigt technische und medizinische Unterstützungen in Form von Treppenliften oder Gehhilfen, einige Patienten sind im fortgeschrittenen Alter auf einen Rollstuhl angewiesen. Die Lebenserwartung scheint bei Patienten mit SCA14 nicht eingeschränkt, viele Betroffene haben bereits die 7. Lebensdekade erreicht. MRT-Untersuchungen des Gehirns zeigten bei allen SCA14-Patienten eine leichte bis mittelschwere Atrophie des Zerebellums. Eine Atrophie der Großhirnrinde war hingegen radiologisch nicht zu belegen.

1.4.1 Genotyp/Phänotyp-Analysen

Momentan ist eine exakte und spezifische Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp nur unzureichend möglich, da viele bislang beschriebene Symptome und Eigenschaften der betroffenen Patienten nicht ausreichend bewertet worden sind. Einige Individuen mit SCA14, besonders diejenigen mit frühem Erkrankungs-Beginn, wiesen einen axialen Myoklonus [Yamashita et al. 2000, Yabe et al. 2003], einen multifokalen Myoklonus [Vlak et al. 2006] oder Myokymien [Stevanin et al. 2004] auf, sodass der klinische Phänotyp dieser unterschiedlichen SCA14-Familien nicht identisch ist; zumal die zugehörigen Mutationen in unterschiedlichen Regionen des Gens lokalisiert sind.

Kognitive Defizite konnten in einer französischen Familie nachgewiesen werden bei der eine Mutation auf Exon 18 (F643L) vorlag, welche die C4-Domäne der PRKCG betrifft [Stevanin et al. 2004], sowie bei verschiedenen französischen und einer japanischen Familie mit unterschiedlichen Mutationen in Exon 4 die C1-Domäne betreffend. Bei einer amerikanischen Familie, deren Mutationen in der Cys2-Region der C1-Domäne liegt, hatten zwei SCA14 Familienmitglieder in neuropsychologischen Tests gänzlich unauffällige Befunde, jedoch entwickelten zwei Betroffene im fortgeschrittenen Alter eine Demenz [Chen et al. 2003]. Allerdings wurden die meisten SCA14-Patienten keinen detaillierten kognitiven Tests und klinischen Untersuchungen unterzogen, folglich können zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine profunden Aussagen bezüglich der Wechsel-Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp getroffen werden. Da bisher nur

Daten über eine kleine Anzahl an untersuchten Familien vorliegen, kann sehr wenig über die Penetranz begründet werden. Eine Aussage, ob eine Verminderung der Penetranz in Relation zu spezifischen Mutationen steht, kann derzeit nicht getroffen werden [Yabe et al. 2003; Chen 2003 et al.], jedoch sind klinisch unauffällige Träger von Mutationen der PRKCG bereits älter als 60 Jahre und in wenigstens 3 Familien beschrieben worden. Ein vermeintlich früherer Erkrankungsbeginn könnte bei nachfolgenden Generationen entweder durch höheres Bewusstsein, Träger der spinocerebellären Ataxie zu sein, ausgelöst werden oder es könnten stochastische Einflüsse vorliegen, da bezüglich des Erkrankungsbeginns eine hohe Varianz vorliegt [Brkanac et al 2002, van de Warrenburg et al. 2004]. Über die Prävalenz ist auszusagen, dass lediglich weniger als 1% der nicht zugeordneten Fälle von dominant vererbter spinocerebellärer Ataxie der SCA 14 zuzuschreiben sind.

1.4.2 Normalvarianten der Allele

Das PRKCG-Gen besitzt 18 Exons und umfasst 25 Kb genomischer DNA, die 3-Kb umfassende mRNA kodiert 697 Aminosäuren. Mehrere stumme bzw. apathogene Polymorphismen konnten identifiziert werden (Exon 1 (c.72C>T, p.A24A, rs2547362) und Exon 6 (c.567T>C, p.N189N, rs3745406)). Ein Nukleinsäureaustausch (p.R659S) wurde in Familien mit Retinitis Pigmentosa 11 [Al-Magthteh et al. 1998] gefunden und stellt höchstwahrscheinlich einen nichtpathogenen Polymorphismus dar, da die in einem anderen Gen (PRPF31) gefundene Mutation eher als Ursache der Retinitis in Frage kommt [Vithana et al. 2001].

1.4.3 Pathologische Varianten der Allele

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnten einundzwanzig unterschiedliche Missense-Mutationen (R41P, G63V, C77S, H101Q, H101Y, C114Y, G118D, S119F, S119P, G123E, G123R, Q127R, G128D, C131R, C131Y, V138E, C150F, G360S, S361G, F643L, V692G) sowie eine *in-frame* Deletion (del100K-101H) identifiziert werden (Tabelle 2). Ferner wurde bei 2 Familien eine mutmaßliche Splice-site Mutation (D95D) beobachtet, obwohl aktuell nicht sicher

1 Einleitung und Fragestellung

ist, ob es sich dabei um eine pathogene Veränderung oder einen seltenen Polymorphismus handelt [Chen et al. 2005]. Es gelang den Großteil der bislang beschriebenen Mutationen auf Exon 4 zu lokalisieren (15/25 Mutationen, bzw. 60,0%), so dass Exon 4 einem relativen Hotspot zu entsprechen scheint [Chen et al. 2003, van de Warrenburg et al. 2003, Yabe et al. 2003, Chen et al. 2005, Alonso et al. 2005, Klebe et al 2005, Dalski et al. 2006, Hiramoto et al 2006]. Jedoch konnten durch umfassendere Mutationsanalysen, die weitere exonische Abschnitte der PRKCG einschlossen, auch Mutationen in Exon 1, 2, 3, 5, 10, und 18 nachgewiesen werden [Stevanin et al. 2004, Chen et al. 2005, Fahey et al. 2005, Klebe et al. 2005, Vlcek et al. 2006, Nolte et al. 2007, Wieczorek et al. 2007]. Das entspricht einer Anzahl von 10 der bislang beschriebenen 25 Mutationen oder 40,0%. 20 der insgesamt 25 Mutationen (80%) liegen in der C1 Region der PRKCG (Abbildung 3).

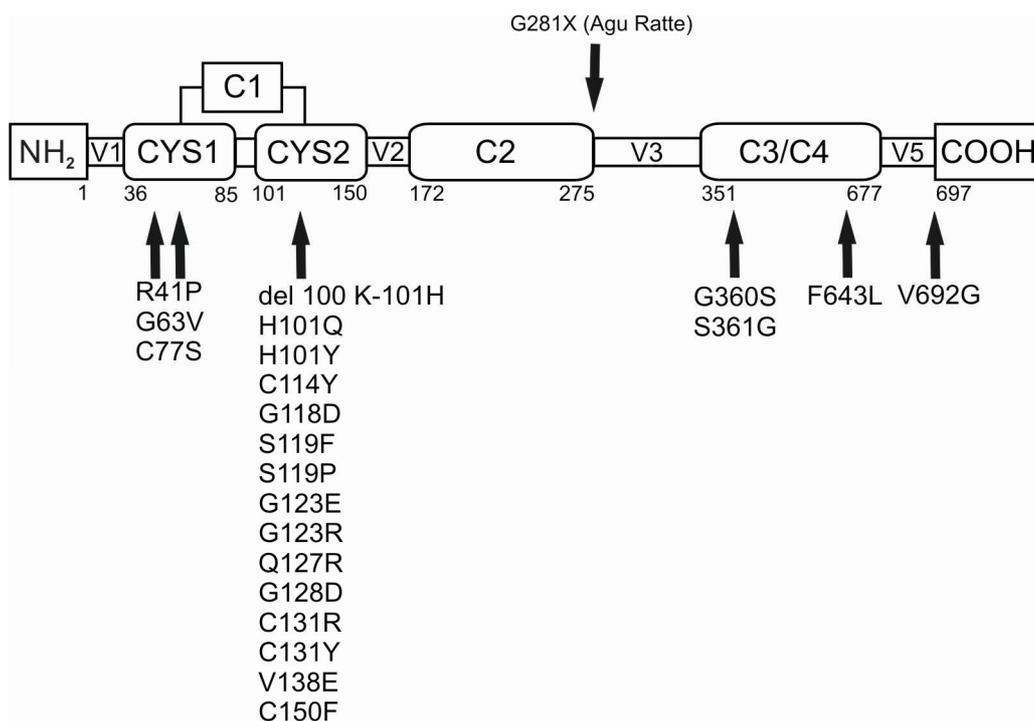


Abbildung 3: Proteinstruktur der PRKCG

Funktionelle Domänen und Anordnung der konservierten (C₁ bis C₄) und variablen (V₁ bis V₅) Regionen der SCA 14 verursachenden Protein Kinase C Gamma (PRKCG). Die bislang beschriebenen Missense-Mutationen, die *in-frame* Deletion und die Mutation der Agu-Ratte wurden abgebildet. Die Zahlen und Buchstaben repräsentieren die Position der Mutation und den entsprechenden Aminosäureaustausch.

1 Einleitung und Fragestellung

Tabelle 2: Lokalisation der SCA14 Mutationen im PRKCG-Gen				
Exon	Aminosäure-Austausch	Nukleotid-austausch	Domäne	Referenz
1	R41P	c.122G>C	Cys1, C1	Chen et al. 2005
2	G63V	c.128G>T	Cys1, C1	Nolte et al. 2007
3	C77S	c.229T>A	Cys1, C1	Wieczorek et al. 2007
4	H101Y	c.301C>T	Cys2, C1	Chen et al. 2003
	H101Q	c.303C>G	Cys2, C1	Alonso et al. 2005
	del100K-101H	del296-301acaaac	Cys2, C1	Chen et al. 2005
	C114Y	c.341G>A	Cys2, C1	Klebe et al. 2005
	G118D	c.353G>A	Cys2, C1	Van de Warrenburg et al. 2003
	G118D	c.353G>A	Cys2, C1	Verbeek et al. 2005
	S119P	c.355T>C	Cys2, C1	Chen et al. 2003
	S119F	c.356C>T	Cys2, C1	Hiramoto et al. 2006
	G123R	c.367G>A	Cys2, C1	Klebe et al. 2005
	G123E	c.368G>A	Cys2, C1	Klebe et al. 2005
	Q127R	c.380A>G	Cys2, C1	Yabe et al. 2003
	G128D	c.383G>A	Cys2, C1	Chen et al. 2003
	G128D	c.383G>A	Cys2, C1	Morita et al. 2006
	C131R	c.391T>C	Cys2, C1	Dalski et al. 2006
C131Y	c.392G>A	Cys2, C1	Klebe et al. 2007	
5	V138E	c.413T>A	Cys2, C1	Vlak et al. 2006
	C150F	c.449, 450gc>tt	Cys2, C1	Fahey et al. 2005
10	G360S	c.1078G>A	C3/C4	Klebe et al. 2005
	S361G	c.1081A>G	C3/C4	Chen et al. 2005
18	F643L	c.1928T>C	C3/C4	Stevanin et al. 2004
	F643L	c.1928T>C	C3/C4	Klebe et al. 2005
	V692G	c.2075T>G	Variable Region 5	Klebe et al. 2005

1.4.4 Normales Gen-Produkt

Der Subtyp der klassischen Protein Kinase (cPRKC), die Proteinkinase C gamma, bezeichnet eine Unterform, die durch Kalzium (Ca^{2+}) und Diacylglycerol in Anwesenheit von Phosphatidylserin aktiviert wird. Physiologisch wird die PRKCG durch einen Mechanismus mit einem rezeptor-vermittelten Abbau (breakdown) des Inositol-Phospholipids aktiviert. Sie schließt eine N-terminale (aminoternale) regulierte Domäne ein, die die calciumbindende Region nebst zwei cysteinreichen Regionen enthält, und eine C-terminale (carboxyl-terminale)

katalytische Domäne, die die ATP-bindende Region sowie eine Substraterkennungsregion beinhaltet [Hug et al. 1993; Newton 2001]. Die PRKCG wird in hohem Maße im Gehirn und im Rückenmark exprimiert, insbesondere in Purkinje-Zellen des zerebellären Kortex während der Entwicklung der Dendriten [Saito et al. 1988]. Pharmakologische und elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass einige neuronale Funktionen einschließlich Veränderung der Langzeitpotenzierung (longterm potentiation / LTP) und Langzeitdepression (longterm depression / LTD) die spezifische PRKCG gamma erfordert [Daniel et al. 1998]. Eine Generierung PRKCG-gamma-defizienter Mäuse ergab eine Veränderung der Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus. Derartige Mäuse zeigten gewisse Einschränkungen beim Lernen von Zusammenhängen und von räumlichen Gegebenheiten. Außerdem war eine Herabsetzung der motorischen Koordination auf Grund einer Veränderung von Innervationen der Kletterfasern von Purkinje-Zellen zu beobachten, die Mäuse zeigten eine Abnahme der Aktivität von Opioidrezeptoren und einen verminderten Effekt von Ethanol auf den Typ A der Gammaaminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren. Es wird vermutet, dass die PRKCG als negativer Regulator des dendritischen Wachstums sowie der Verzweigung der Dendriten fungiert [Schrenk et al 2002]. Weitere Lokalisationen der PRKCG sind der Hippocampus und die Amygdala, Regionen des Gehirns, die mit Angst und Gedächtnis assoziiert sind [Mori et al. 1990, Malmberg et al. 1997], sowie bovine Linsenepithelzellen [Gonzalez et al 1993].

1.4.5 Abnormale Genprodukte

Die bis dato identifizierten Mutationen hatten entweder einen Austausch von einer einzelnen Aminosäure oder in einem Einzelfall einen Abbruch der Aminosäurekette zur Folge. Auswirkungen dieser Mutationen auf die Funktion der Proteine sind bislang noch nicht hinlänglich bekannt, jedoch legen computersimulierte Untersuchungen bei drei Missense-Mutationen [Chen, Brkanac et al. 2003] und in vitro Experimente bei Missense-Mutationen [Verbeek et al. 2005] nahe, dass diesen Mutationen unterworfenen Genprodukte weniger stabil als die normalen Proteine sind und ein abnormes Aktivitäts-Muster besitzen

können, was ein verändertes Membran-targeting und eine Erhöhung der Enzymaktivität zur Folge hat. Es wird spekuliert, dass der SCA14-Phänotyp eher durch eine Zunahme der Funktion („gain-of-function“) zu erklären ist als durch Haploinsuffizienz, was sich darauf begründet, dass keine Mutation gefunden werden konnte, die einen Kettenabbruch zur Folge hat [Abeliovich et al. 1993]. Ein „dominant-negativer“ Mechanismus kann gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden. Tiermodelle der SCA 14 sind bislang nicht verfügbar, jedoch hatten PRKCG-knock-out Mäuse Symptome, die denen von SCA 14 Patienten ähneln und als leichte Gangataxie und moderate Defizite im Bereich des räumlichen Lernens und beim Lernen von Zusammenhängen in Erscheinung treten [Abeliovich et al. 1993; Chen et al. 1995]. AGU-Ratten, die eine homozygote nonsense-Mutation im PRKCG kodierenden Gen besitzen, entwickelten einen Ganzkörpertremor, Rigidität, hatten Schwierigkeiten Bewegungen zu initiieren und zeigten ein unbeholfenes Gangbild [Craig et al. 2001].

1.5 Spinozerebelläre Ataxie 27 (SCA 27)

Die Spinozerebelläre Ataxie 27 (SCA27) ist ein erst jüngst beschriebener Subtyp der SCAs, welche durch herabgesetzte kognitive Fähigkeiten und eine langsam progrediente Ataxie charakterisiert ist (MIM #609307). Die SCA27 wird durch Mutationen im Fibroblasten-Wachstumsfaktor 14 (FGF14) verursacht. Sie unterscheidet sich von anderen Ataxien hauptsächlich durch ihre extrem langsame Progression. In einer tierexperimentellen Studie [Wozniak et al. 2006] konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem Mangel an FGF14 (*Fgf14*^{-/-} Mäuse) über herabgesetzte sensomotorische Funktionen verfügen und eine Ataxie mit paroxysmalen Dyskinesien aufweisen, ein Phänotyp, der zur Entdeckung der menschlichen Mutation führte. Das Erkrankungsalter bzw. der Beginn der Ataxie liegt im frühen Erwachsenenalter durchschnittlich bei 31,5 Jahren zwischen dem 13. und 50. Lebensjahr [van Swieten et al. 2003, Dalski et al. 2005, Brusse et al. 2006]. Das Auftreten von ersten klinischen Symptomen (z.B. Tremor) vor Manifestation einer Ataxie lag deutlich früher bei durchschnittlich 11 Jahren (6-20).

Zur Gruppe der Wachstumsfaktoren zählt auch die Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF), welche als Zytokine zu betrachten sind und zur Familie der heparinbindenden Polypeptide gehören. Die Familie der Fibroblastenwachstums-Faktoren besteht aus mindestens 21 Mitgliedern. Es sind strukturell ähnliche Polypeptide (Molekulargewicht 16-32 kDa), die eine hohe Homologie innerhalb der Familie aufzeigen. Fibroblastenwachstumsfaktoren besitzen außerdem Übereinstimmungen mit Onkogenen (z.B. FGF5) und Interleukin 1 (1 α und 1 β).

Zugehörig sind die Fibroblastwachstumsfaktoren (FGF) 11-14 (ehemals FHF1-4) einer Subfamilie von FGF mit schlecht definierter biologischer Funktion. Der FGF14 wird durch zwei Isoformen (FGF14-1a und FGF14-1b) beschrieben, die sich durch unterschiedliche Definitionen von Exon 1 unterscheiden. Wang et al. 2000 zeigten, dass diese Isoformen unterschiedliche Lokalisationen auf subzellulärer Ebene aufweisen und in verschiedenen Geweben Erwachsener exprimiert werden. Durch in situ-Hybridisierung gelang es zu veranschaulichen, dass der FGF14 in der frühembryonalen Phase der Entwicklung von Mäusen in großen Teilen des Gehirns, im Rückenmark, in großen Arterien und im Thymus zwischen dem 12 $\frac{1}{2}$. und 14 $\frac{1}{2}$. Tag exprimiert wird. Wang et al. zeigten des Weiteren, dass der FGF14 während der Entwicklung des Kleinhirns primär am ersten postnatalen Tag in postmitotischen Körnerzellen und später in der Entwicklung in migratorischen und postmigratorischen Körnerzellen beobachtet werden konnte. Das Expressions- und Ausprägungsmuster von FGF14 im Kleinhirn ist als komplementär zu dem von Math1 zu sehen, einem Marker für proliferierende Granulosazellen in der äußeren Keimbahnschicht.

Für den SCA27 Ataxietyyp sind unterschiedliche Familien identifiziert, die Mutationen im Fibroblasten-Wachstumsfaktor 14 (FGF14) aufweisen. FGF14 konnte auf Chromosom 13q34 lokalisiert werden und besteht aus 5 Exonen [van Swieten et al. 2002; Dalski et al. 2005]. Durch van Swieten et al. 2002 wurde erstmals von einer großen drei Generationen umfassenden kaukasischen Familie niederländischer Abstammung berichtet, die durch einen frühen Erkrankungs-

beginn mit Symptomen wie Tremor, Dyskinesie und langsam progredienter Ataxie aufgefallen war und bei der keine Assoziationen zu anderen bisher bekannten Ataxieformen hergestellt werden konnten. Das Erkrankungsalter lag bei durchschnittlich 34 Jahren (18. bis 50. Lebensjahr). Von 21 neurologisch untersuchten Familienmitgliedern konnte bei 14 Patienten (7 Männer und 7 Frauen) eine dominant vererbte Ataxie verifiziert und ein Tremor diagnostiziert werden. Außerdem wiesen alle betroffenen Patienten einen seit der Kindheit (6. bis 20. Lebensjahr) bestehenden Tremor der Hände auf, welcher sich durch emotionalen Stress und körperliche Anstrengung verstärkte. Die Patienten bemerkten im Alter zwischen 15 bis 20 Jahren zunächst eine schwache Gangunsicherheit sowie eine Ataxie der oberen Extremitäten. Von 14 Betroffenen konnten sechs ihre Grundschulausbildung nicht zu Ende bringen und nur vier besuchten eine weiterführende Schule. Bei den Patienten wurden symptomatisch Aggressionsausbrüche und Depressionen beobachtet, ferner zeigten sich okulomotorische Störungen wie sakkadierte Blickfolgen, Blickrichtungsnystagmus, zerebelläre Dysarthrie und ein hochfrequenter, feinschlägiger Tremor beider Hände. Sechs Patienten wiesen einen Tremor des Kopfes auf, orofaziale Dyskinesien wurde bei acht Patienten beobachtet, zudem konnten bei mehreren Patienten gesteigerte Patellarsehnenreflexe und ein vermindertes Vibrationsempfinden (9/14) diagnostiziert werden. Neuropsychologische Untersuchungen bestätigten bei einigen Betroffenen einen erniedrigten IQ, eine Beeinträchtigungen der Gedächtnisleistung (3 Patienten), des abstrakten Denkens (3 Patienten) sowie des Wortflusses (1 Patient). Bei 2 älteren Patienten (69 und 71 Jahre) wurde mittels bildgebender Verfahren eine mäßiggradige zerebelläre Atrophie festgestellt, wohingegen bei sieben jüngeren Patienten (24-64 Jahre) MR-tomographisch keine pathologischen Veränderungen aufzuzeigen waren. Bei einem Betroffenen wurde durch 123-Jodbenzamid Single-Photon-Emissions-Computertomographie (Jod-123-IBZM-SPECT) eine Reduktion der Dopamin-D2-Rezeptor-Bindung im linken Striatum detektiert, normale Parameter jedoch bei der 123J-2beta-carbomethoxy-3beta-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)-nortropane) (FP-CIT) SPECT bestätigt.

Dalski et al. 2005 wies eine Mutation bei einem 18 jährigen männlichen Patienten nach, der initial durch geistige Retardierung (IQ 70), einen angeborenen Strabismus und eine Rot-Grün-Blindheit auffiel. Angeborene metabolische Störungen konnten durch klinische Untersuchungen ausgeschlossen werden. Die motorische Entwicklung des Patienten war bis zum 12. Lebensjahr unauffällig, dann ergaben sich langsam progrediente Gangschwierigkeiten, Gedächtnisverlust und depressive Stimmungslagen. Klinische Untersuchungen dokumentierten eine Stamm- und Gangataxie, einen feinschlägigen Tremor beider Hände, Blickrichtungsnystagmus und einen Pes cavus (Hohlfuß), durch Überprüfungen der Nervenleitungsgeschwindigkeiten ergab sich eine leichte sensorische Neuropathie. Untersuchungen von Blutwerten und des Liquors nebst einem kranialen MRT erbrachten keine pathologischen Befunde. Des Weiteren wurde der Patient zytologisch und molekulargenetisch analysiert, es ergaben sich keine Hinweise auf häufige Mutationen (FXTAS, FRDA, SCA 1, 2, 3, 6, 7, 10, 12 und 17), der Karyotyp war normal. Der Vater des Patienten zeigte ebenfalls Gangschwierigkeiten, einen Gedächtnisverlust sowie einen Pes cavus, starb aber aufgrund eines anaplastischen Astrozytoms Jahre zuvor. Es lagen zur weiteren Verifizierung weder detaillierte klinische Informationen noch verwertbare DNA vor.

1.5.1 Normalvarianten der Allele

Das FGF14 Gen (Synonym: FHF-4, fibroblast growth factor homologous factor 4, homologer Fibroblastenwachstumsfaktor 4) besitzt 5 Exons und umfasst 679 Kb genomischer DNA. Die 890bp umfassende mRNA (Transkriptionsvariante 1) (NM_004115) kodiert 247 Aminosäuren, Variante 2 (NM_175929) umfasst 1001bp und kodiert 252 Aminosäuren. Variante 2 (Isoform 1b kodierend) hat im Gegensatz zu Variante 1 eine abweichende 5'-Sequenz einschließlich der 5'-untranslatierten (5'-UTR) nebst der kodierenden Region und besitzt einen veränderten und längeren N-Terminus als Isoform 1a. Die unterschiedlichen Varianten von Exon 1 scheinen dominante Proteinsignalwege zu kodieren, die dafür verantwortlich sind, dass die Proteine verschiedene Wege zu subzellulären Kompartimenten nehmen [Smallwood et al. 1996; Munoz-Sanjuan et al. 2000;

Wang et al. 2000]; FGF14a ist hauptsächlich im Nucleus lokalisiert, wohingegen FGF14b im Zytoplasma von transfizierten NIH3T3-Zellen zu belegen war [Wang et al. 2000].

1.5.2 Pathologische Varianten der Allele

Molekulargenetische Analysen im FGF14-Gen ergaben bislang verschiedene Mutationen und Polymorphismen (Tabelle 3). Van Swieten et al. 2003 konnten bei insgesamt 14 Mitgliedern einer Familie einen Basenaustausch im Exon 4 identifizieren (c.434C>T), der einen Aminosäureaustausch von Phenylalanin nach Serin an Position 145 (p.F145S) zur Folge hatte.

Dalski et al. 2005 detektierten sechs unterschiedliche DNA-Variationen bei 22 von 416 Proben (Patienten und Kontrollproben). Insgesamt zwei der sechs Variationen hatten einen Aminosäureaustausch zur Folge. Dalski et al. konnten bei einem von 208 bislang keiner Ataxie zuzuordnenden Ataxiepatienten eine Deletion in Exon 4 detektieren (c.487delA), die zu einer Verschiebung des Ableserasters (p.D163fsX12) führte (Frameshift-Mutation), zusätzlich konnten in Exon 1a, 4 und 5 Polymorphismen gefunden werden. Eine Mutation auf Exon 1a (c.124G>T), die einen Aminosäureaustausch an Position 42 (p.G42C) zur Folge hatte, welche sowohl bei einem gesunden Familienmitglied als auch einem Betroffenen nachgewiesen werden konnte, stellt eher einen seltenen Proteinpolyorphismus als eine pathogene Mutation dar. Ferner wurde ein einzelner Polymorphismus in der 3'-untranslatierten Region von Exon 5 detektiert.

1 Einleitung und Fragestellung

Tabelle 3: Lokalisation der bislang beschriebenen SCA27 Mutationen im FGF14 Gen						
Exon	DNA Variation	Mutation	cSNP	SNP	Anzahl Patienten	Referenz
1a	c.123C>T		p.N41		1	Dalski et al. 2005
	c.124G>T		p.G42C		3	Dalski et al. 2005
4	c.434T>C	p.F145S			14	Van Swieten et al. 2003, Brusse et al. 2005
	c487delA	p.D163fsX12			1	Dalski et al. 2005
	c.543T>C		p.A181		2	Dalski et al. 2005
5	c.693G>T		p.A231		2	Dalski et al. 2005
	c.775G>A			3'-UTR	8	Dalski et al. 2005

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wird eine Mutationsanalyse des PRKCG-Gens und des FGF14-Gens bei Indexpatienten deutscher Familien mit dominanter spinocerebellärer Ataxie (ADCA) durchgeführt. Dabei soll geklärt werden, inwieweit die benannten Gene eine Bedeutung für mitteleuropäische Ataxie-Patienten gewinnen können.

Methodisch soll insbesondere geklärt werden, ob die Untersuchung jeweils des gesamten offenen Leserahmens beider Gene erforderlich ist oder aber besonders bevorzugte Mutationsorte („*hot spots*“) gefunden werden können.

2 Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 4: verwendete Chemikalien	
Substanz	Hersteller
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Agarose, Nu Sieve 3:1	Biowhittaker Molecular Applications, Taufkirchen
Ampuwa injection water	Fresenius, Kabi GmbH, Bad Homburg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CEQ Separation Puffer	Beckmann Coulter, Unterschleißheim Lohhof
dNTPs	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidumbromid 1%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure, Na ₂ -Salz (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ficoll Typ 400 20%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Beckmann Coulter, Unterschleißheim Lohhof
Q Solution	QIAGEN GmbH, Hilden
Sample Loading Solution (SLS)	Beckmann Coulter, Unterschleißheim Lohhof
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomic, Crewe (UK)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.2 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem vollentsalzten Wasser angesetzt (18.2 MΩ).

2.3 Puffer und Enzyme

2.3.1 Allgemeine Puffer

Tabelle 5: Allgemeine Puffer	
Blaumarker für Agarosegele	
0,01% (w/v) Bromphenolblau	
8% (v/v) Ficoll (Typ 400)	
1 x TBE	

10 x Tris-Borat-EDTA (TBE), pH 8,0	
890 mM Tris	
890 mM Borsäure	
20mM EDTA (pH 8,0)	

2.3.2 dHPLC-spezifische Lösungen

Tabelle 6: dHPLC-spezifische Lösungen	
Puffer A (Wave), pH 7,0	
2M TEAA	50ml
ACN	250µl
H ₂ O	ad 1l

Puffer B (Wave), pH 7,0	
2M TEAA	50ml
ACN	250ml
H ₂ O	ad 1l

Puffer C (Waschpuffer für Wave-Säule)	
ACN	750ml
H ₂ O	ad 1l
Puffer D (Waschpuffer für Wave-Injektionsnadel)	
ACN	80ml
H ₂ O	ad 1l

2.4 DNA

Untersucht wurde DNA von deutschen Ataxiepatienten (Indexpatienten) und gesunden Kontrollpersonen. Die DNA wurde auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l eingestellt.

2.5 Referenzsequenz

Die Referenzsequenz für die Proteinkinase C Gamma (PRKCG) und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 14 (FGF14) wurde von NCBI unter der Internetadresse www.ncbi.nlm.nih.gov bezogen.

2.5.1 SCA 14 (Protein Kinase C gamma, PRKCG)

Chromosom 19q13.4

Genomische DNA-Sequenz: NC_000019

mRNA: NM_002739

Tabelle 7: OMIM Einträge für die Spinozerebelläre Ataxie Typ 14	
176980	Protein Kinase C gamma; PRKCG
605361	Spinocerebellar ataxia 14; SCA14

2.5.2 SCA 27 (Fibroblast growth factor 14, FGF 14)

Chromosom 13q34

Genomische DNA-Sequenz: NC_000013

mRNA: NM_004115 (isoform 1A)

mRNA: NM_175929 (isoform 1B)

Tabelle 8: OMIM Einträge für die Spinozerebelläre Ataxie Typ 27	
601515	Fibroblast Growth Factor 14; FGF14
609307	Spinocerebellar ataxia 27; SCA27

2.6 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide der PRKCG wurden von der Firma Metabion GmbH, Martinsried synthetisiert und mit einer Konzentration von 100 pmol/ μ l geliefert. Dabei steht F für forward, also vorwärts gerichtete Primer, R für reverse, rückwärts gerichtete Primer (siehe Anhang Tabelle 31).

Die Oligonukleotide des FGF14 wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert und auf die Konzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt (siehe Anhang Tabelle 32).

2.7 Größenstandard

Tabelle 9: Größenstandard	
Substanz	Hersteller
100 Bp DNA – Leiter 1 μ g/ μ l Fragmentlängen [bp]: 2072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.8 Enzyme

Tabelle 10: DNA-Polymerase	
Substanz	Hersteller
Bio Therm TM DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	GeneCraft, Münster

2.9 Kits

Tabelle 11: Kits	
Substanz	Hersteller
CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Gelextraktions-Kit (250) Qiaquick®	Qiagen GmbH, Hilden
PCR Purification Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden

2.10 Geräte und Hilfsmittel

2.10.1 Fotodokumentation

Tabelle 12: Fotodokumentation	
Gerät	Hersteller
Fotodokumentationsanlage Transilluminator	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Digitalkamera Camedia C-5050	Olympus, Hamburg

2.10.2 Elektrophoresezubehör

Tabelle 13: Elektrophoresezubehör	
Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammer 40-0708	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer 40-1214	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophorese-Spannungsgeber Consort E 835	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

2.10.3 Thermocycler

Tabelle 14: Thermocycler	
Gerät	Hersteller
Gene-Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Thermocycler MJ Research PTC 2000	Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch Oldendorf

2.10.4 Sequenzierer/dHPLC

Tabelle 15: Sequenzierer / dHPLC	
Gerät	Hersteller
Ceq 8000 Zyklussequenzierer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
WAVE® DNA-Fragment Analysis System	Transgenomic, Crewe (UK)

2.10.5 Zentrifugen

Tabelle 16: Zentrifugen	
Gerät	Hersteller
Eppendorf Zentrifuge 5415D	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5415R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5417 C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5804	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Concentrator 5301	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
-------------------	---------------------------------------

2.10.6 Sonstiges

Tabelle 17: sonstiges Zubehör	
Gerät	Hersteller
Accu-Jet Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Autoklav ELV 5075	Systec, Wetztenberg
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Heat Sealer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Magnetrührer IKAMAG REO	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Milli-Q	Millipore GmbH, Eschborn
Parafilm	American National Can, Chicago, IL
Pipetten	Eppendorf-Netherler-Hinz GmbH, Hamburg
PH-Meter MP 230	Metler, Toledo GmbH, Giessen
UV-Tisch	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Vakuumentrifuge Eppendorf	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Vortexer REAX control	Heidolph Instruments GmbH + Co, Schwabach
Waage Precisa XT 6200c_FR	PESA Waagen GmbH, Bissingen Steinhof

2.11 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 18: Verbrauchsmaterialien	
Gerät	Hersteller
Beckmann 96-well Platten	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Easy Peel Klebefolie	PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen
Easy Pierce Strong Klebefolie	PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Mircowell 96 U-Platten	Nunc GmbH + Co KG, Wiesbaden
Multi '96 well PCR-Platten	PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR Softstrips	Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Thermo-Fast 24 PCR-Platten	PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen

3 Methoden

3.1 Klinische Untersuchung sowie Zusammenstellung von Patienten- und Kontrollgruppen

Die 48 Indexpatienten wurden an Hand einer vorliegenden autosomal dominant vererbten, langsam progredienten spinocerebellären Ataxie ausgewählt und im Vorfeld CAG-Repatexpansionen der bekannten und häufigen SCA-Gene ausgeschlossen (SCA 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 und 17). Bei Eintritt der Erkrankung hatten die Indexpatienten ein durchschnittliches Alter von 35,9 Jahren (3 bis 75 Jahre).

3.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte nach der Voll-Salzmethode [Miller et al. 1988] mit standardisierten Protokollen. Die DNA-Konzentration der ausgewählten Patientenproben wurde mit Hilfe eines Photometers gemessen und auf die gewünschte Endkonzentration von 50 ng/μl eingestellt [Sambrook et al. 1989].

3.3 Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction - PCR)

Tabelle 19: PCR-Standard-Ansatz für die Amplifikation aller Exone (25 μl Endvolumen)		
Der Einsatz von Q-Solution ist optional und wurde nur bei Doppelbanden im Agarosegel eingesetzt		
Komponente	Menge oder Endkonzentration	Stammlösung
DNA-Matrize	250 ng	500 ng/μl
Primer 1	0,4 μM	100 μM
Primer 2	0,4 μM	100 μM
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 0,2 mM	je 10 mM
DNA-Polymerase (Taq)	1 U	5 U/μl
Reaktionspuffer	1 x	10 x
MgCl ₂ (in Reaktionspuffer enthalten)	1,5 mM	15 mM
Q-Solution (optional)	1 x	5 x

3 Methoden

Tabelle 20: Standard-PCR-Programm, 40 Zyklen

Modifikationen für die einzelnen Exone werden im Ergebnisteil präsentiert

Schritt	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	initiale Denaturierung	95°C	5
2	Denaturierung	95°C	1
3	Primer-Annealing	Optional	1
4	Polymerisation	72	1
	Wiederholung der Schritte 2 – 4: 39 mal		
5	Polymerisation	72	10
6	Abkühlen	4	Unendlich

Tabelle 21: PCR-Standard-Ansatz für die Amplifikation von cDNA

Komponente	Menge oder Endkonzentration	Stammlösung
DNA-Matrize	250 ng	500 ng/µl
Primer 1	0,4 µM	100 µM
Primer 2	0,4 µM	100 µM
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 0,2 mM	je 10 mM
DNA-Polymerase (Taq)	1 U	5 U/µl
Reaktionspuffer	1 x	10 x
MgCl ₂ (in Reaktionspuffer enthalten)	1,5 mM	15 mM
Q-Solution (optional)	1 x	5 x

Tabelle 22: Touchdown-PCR mit cDNA

Schritt	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	initiale Denaturierung	95°C	5
2	Denaturierung	94°C	0,5
3	Primer-Annealing	65-1	0,5
4	Polymerisation	72	0,5
	Wiederholung der Schritte 2 – 4: 10 mal		
5	Denaturierung	94°C	0,5
6	Primer-Annealing	55	0,5
7	Polymerisation	72	0,5
	Wiederholung der Schritte 5-7: 35 mal		
8	Polymerisation	72	7
9	Abkühlen	4	Unendlich

3.4 Primer

Die Auswahl der einzelnen Primerpaare erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms Primer3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) dahingehend, dass die jeweiligen Primer mindestens 10 bp außerhalb des Exons im Intronbereich liegen. Zusätzlich galt es darauf zu achten, dass die Länge der Primer zwischen 20 und 30 Nukleotide beträgt und die Schmelztemperaturen der vorwärts- und rückwärtsgerichteten Primer nicht zu weit auseinander liegen, da dann die Spezifität am größten ist (siehe Anhang Tabelle 31 und 32). Ein hoher GC-Gehalt von 50–80% verstärkt die Bindung nach Anlagerung an die DNA-Matrize auf Grund der physikalischen Tatsache, dass Guanin- und Cytosinpaare mit 3 Wasserstoffbrückenbindungen im Unterschied zu Adenin- und Thyminpaaren (2 Wasserstoffbrückenbindungen) eine stärkere molekulare Verbindung besitzen, ebenso wie ein GC-Clamp am 3'Ende der Primer. Die Auswahl der Sequenz hatte außerdem so zu erfolgen, dass die Primer untereinander keine Dimere bilden und innerhalb des Primers keine Repeats (Wiederholungen) vorkommen um ein falsches Anlagern an die Matrizen-DNA zu verhindern.

3.5 Etablierung der PCR-Bedingungen

Zu Beginn der Versuchsreihen war es notwendig, die geeignete Annealing-Temperatur für jedes einzelne Exon der beiden Gene zu bestimmen. Dazu erfolgte an einem PCR Cycler (PTC-200 DNA Engine; MJ Research, Inc; Waltham; Mass) eine Gradienten-PCR im Temperaturbereich zwischen 50°C und 70°C mit 1:10 verdünnter Ceph-DNA (Referenz-DNA), Probennummern 136209 und 2805. Sie sind die DNA eines Familienmitglieds einer Gruppe von Referenzfamilien, die in Zusammenarbeit von über 100 Labors im Rahmen des CEPH [Centre d'Études des Polymorphisms Humaines; Dausset et al. 1990] als Bezugs-DNA etabliert wurde. Im Anschluss daran erfolgte eine Qualitätsüberprüfung der entstandenen PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese mit Festlegung der jeweiligen optimalen Annealing-Temperatur, bei der das resultierende PCR-Produkt quantitativ am größten ist und unspezifische PCR-

Produkte oder Doppelbanden ausgeschlossen werden konnten. Erzeugten die Produkte der Gradienten-PCR in der Gelelektrophorese über das ganze Temperaturspektrum Doppelbanden, wurde 1 x Q-Solution eingesetzt. Diese Lösung kann bei besonders GC-reichen DNA-Matrizen oder bei Sekundärstrukturbildung verwendet werden, da sie das Schmelzverhalten der DNA modifiziert und zu einer besseren Amplifizierung und somit zu klareren Banden im Agarosegel führt.

Die zu amplifizierende Patienten-DNA lag in 96-well Masterplatten vor. Auf jeder der Masterplatten befanden sich zusätzlich noch eine Negativkontrolle, die anstelle von DNA destilliertes Wasser (Ampuwa) enthielt, sowie eine Positivkontrolle mit Ceph-DNA. Die Amplifikation für jedes einzelne Exon erfolgte nach dem Standard PCR-Ansatz und bei der jeweils ermittelten Annealing-Temperatur. Alle gewonnenen PCR-Produkte wurden mittels einer Gelelektrophorese qualitativ überprüft.

3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Durchführung der Agarosegelelektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. 1989. Ein 1,0 bis 2,0%iges Agarosegel wurde durch Aufkochen eines entsprechenden Volumens 1 x TBE-Puffer, dem zuvor die jeweilige prozentuale Menge der abgewogenen Agarose zugegeben war, in einem Mikrowellengerät hergestellt. Vor Gießen des Gels war der flüssigen, auf ca. 50°C abgekühlten Agaroselösung 3 µl Ethidiumbromid für ein Mini-Gel bzw. 6 µl für ein Midi-Gel in einer Endkonzentration von 30 ng/ml beizumengen. Ein Mini-Gel hat eine Breite von ca. 8 cm und dient zur Auftrennung von maximal 12 nebeneinander liegenden Proben, ein Midi-Gel ist ca. 20 cm breit mit maximal 25 nebeneinander liegenden Proben. Das Agarose-Puffer-Gemisch ist luftblasenfrei in eine Gelkammer zu gießen und ein Kamm so einzusetzen, dass Geltaschen (Slots) entstehen, die die zu analysierenden PCR-Produkte aufnehmen können. Je höher die Konzentration des Agaroseanteils im Gel gewählt wird, umso schärfer und genauer werden die sichtbar gemachten Banden.

Bevor die Slots mit der zu analysierenden DNA beschickt werden konnten, war es notwendig der DNA noch ein Gemisch aus Blau- und Ladepuffer zuzugeben. Der Ladepuffer erhöht die Dichte der DNA und hilft dadurch ein Herausdiffundieren aus den Slots zu vermeiden. Der Blaupuffer enthält einen im Tageslicht sichtbaren Farbstoff, der negativ geladen ist und gemeinsam mit der DNA im elektrischen Feld wandert und einen optischen Anhaltspunkt für die Wanderung der für das Auge unsichtbaren DNA bietet. In den Versuchsreihen wurden die Slots mit einer Lösung von jeweils 3 µl DNA mit 3 µl Puffer beschickt. Um später eine Aussage über die Anzahl der Basenpaare der jeweiligen DNA, also die ungefähre Länge des DNA-Fragments, treffen zu können, wurde ein Standardlängenmarker mit auf das Gel aufgetragen. Sind Marker und DNA-Puffergemisch appliziert, kann die elektrische Spannung angelegt werden. Für ein Mini-Gel liegt die notwendige Spannung bei 85 V mit einer Laufzeit von 30 bis 60 Minuten, für ein Midi-Gel bei 115 V und 30 Minuten bis 1,5 h Laufzeit. Nach Ablauf der jeweils notwendigen Zeit konnten die entstandenen Banden auf einem UV-Transilluminator visualisiert und photodokumentiert werden.

3.7 Bildung von Heteroduplices

Vorbereitend für die Mutationsanalyse durch die dHPLC-Technik sind jeweils die PCR-Produkte zweier Patientenproben zu gleichen Teilen gemischt und die gepoolten Proben in einem Thermocycler (Gene Amp PCR System 9700) zunächst bei 94°C für 2 min denaturiert worden, anschließend folgte eine langsame Abkühlung der gepoolten Proben und damit eine Renaturierung über einen Zeitraum von 30 min auf 10°C (siehe Abbildung 4).

3.8 Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dHPLC)

Die dHPLC-Technik (denaturating high-pressure liquid chromatography, denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie) ist eine schnelle und kostengünstige Vorscreening-Methode, die in den letzten Jahren stark an Bedeutung für die Mutationsdetektion gewonnen hat. Aufbau und Prinzip dieser

3 Methoden

Methode werden im Folgenden am Beispiel des „Wave Systems“ der Firma Transgenomics dargestellt. Das Wave System besteht aus einer Hochdruckpumpe, welche die mobile Phase des Systems, bestehend aus zwei Puffern A und B, im gewünschten Verhältnis über eine Chromatographiesäule pumpt. Die zu analysierenden Proben werden in einer Autosampler-Einheit im Microtiterplatten Format (8 x 12 Reaktionsgefäße) vorgelegt. Durch das darin enthaltene Kühlaggregat ist gewährleistet, dass die Proben die gewünschte Temperatur haben. Die Injektion der Proben erfolgt automatisch, Reihenfolge und Analysebedingungen der Injektionen werden in einem Programm (d-7000 HSM) festgelegt. Die Chromatographiesäule selbst befindet sich in einer Ofeneinheit, mit der die Proben in einer der Säule vorgeschalteten Temperierungs-Spirale auf die gewünschte Analysetemperatur erhitzt werden können. Die von der Säule eluierten DNA-Fragmente werden über einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert.

Das Trennprinzip der dHPLC besteht aus zwei unterschiedlichen Komponenten. Zunächst kann über die „ion pair reversed-phase“-Chromatographie (Ionenpaar-Austausch-Chromatographie) die Trennung doppelsträngiger DNA-Moleküle (dsDNA) zwischen 50 und 2000 Basenpaaren in Abhängigkeit ihrer Länge erzielt werden [Hecker et al. 2000]. Kernstück des chromatographischen Verfahrens ist eine Säule (DNASep® Cartridge), deren Matrix aus 2,1 +/- 0,12 µm großen, mit Divinylbenzol vernetzten Polystyrol-Partikeln besteht. Diese stationäre Phase ist elektrisch neutral, jedoch hydrophob. Die flüssige Phase des Systems wird aus zwei Puffern A und B gebildet, die unterschiedliche Konzentrationen eines amphiphilen Ions (Triethylammoniumacetat, TEAA) und eines hydrophilen Gegenions (Acetonitril) besitzen. TEAA dient dabei als Brückenmolekül zwischen dem hydrophoben Säulenmaterial und den negativ geladenen DNA Fragmenten. Über die positiv geladenen Ammoniumionen bindet TEAA an das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA Moleküle, über die Alkylketten findet eine hydrophobe Interaktion und damit eine Bindung der DNA an die Säulenmatrix statt. Die Ladungsdichte an der Oberfläche der dsDNA (Oberflächenpotential) ist konstant. Mit zunehmender Länge der dsDNA nimmt jedoch die Größe der Kontaktfläche zu, d.h. die Bindung an die Säule wird fester. Mit steigender

3 Methoden

Konzentration von Acetonitril im Elutionspuffer werden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen TEAA und der Säulenmatrix reduziert und die DNA wird eluiert. Die Retentionszeit steigt dabei linear zur Größe des DNA Fragments. Ein zweites Trennprinzip von doppelsträngigen DNA-Molekülen kann über die Kontrolle der Ofentemperatur erzielt werden. Bei Temperaturen über 50°C ist es möglich, auf diese Weise eine sequenzabhängige Trennung zu erreichen. In Abhängigkeit von der Basensequenz ändert sich bei steigender Temperatur das Schmelzverhalten verschiedener DNA-Fragmente. Auf Grund der erhöhten Flexibilität des Einzelstranganteils (ssDNA) kommt es zur Reduktion der Interaktion zwischen DNA und Säulenmatrix und zu einer vorzeitigen Elution. Mit der bereits beschriebenen kontrollierten De- und langsamen Renaturierung von PCR-Produkten mit einer heterozygoten Mutation werden bis zu vier mögliche DNA-Duplices generiert (Wildtyp/Wildtyp, Wildtyp/Mutante_(sense), Mutante_(antisense)/Wildtyp, Mutante/Mutante), die sich während der dHPLC-Analyse im Bereich ihrer spezifischen Schmelztemperatur aufgrund minimaler struktureller Unterschiede in ihren Migrationsgeschwindigkeiten unterscheiden. Dadurch entsteht ein Elutionsprofil mit bis zu vier Elutionspeaks. Je größer die Migrationsunterschiede zwischen den vier möglichen DNA-Duplices sind, umso größer ist der Abstand zwischen den einzelnen Elutionspeaks. Liegen die Migrationsgeschwindigkeiten jedoch aufgrund struktureller Besonderheiten der Hetero- und Homoduplices beieinander, so können die einzelnen Peakflächen miteinander verschmelzen, so dass weniger als vier Peaks im Elutionsprofil auftreten. Eine Mutation kann im ungünstigsten Fall nur einen einzelnen Peak mit einer „Schulter“ zeigen. In Einzelfällen ist sie überhaupt nicht von der Wildsequenz zu unterscheiden. Wird die Säulentemperatur über die Schmelztemperatur der DNA-Duplices angehoben, denaturieren diese vollständig und ihre Einzelstränge werden ebenfalls mit nur einem Elutionspeak angezeigt. Ein Einzelpeak entsteht auch dann, wenn nur Homoduplices vorliegen, z.B. bei einer homozygoten Wildtyp-Sequenz bzw. einer homozygoten Mutation.

Die Detektion der zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluierten Heteroduplex-DNA erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm und wird von der WAVE-Software

in ein Chromatogramm umgesetzt. Eine genauere Beschreibung des Verfahrens findet sich bei Huber et al. 1993, Kuklin et al. 1997-98 sowie Kuklin et al. 1999.

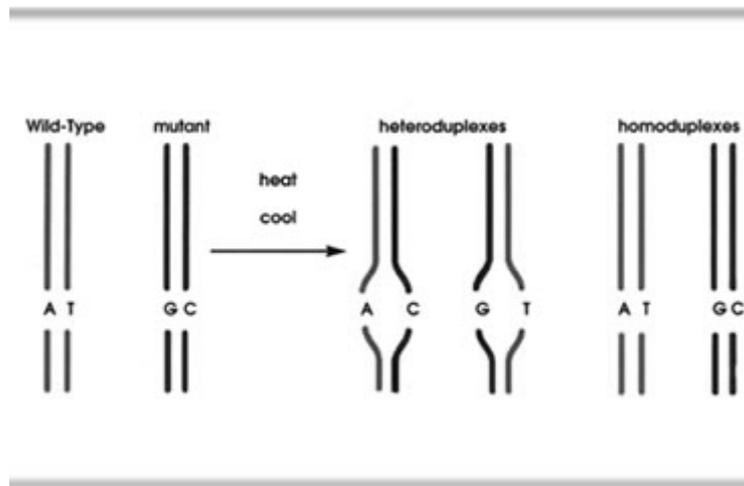


Abbildung 4: Hetero- und Homoduplexbildung (nach Transgenomic)

3.9 dHPLC Methodenoptimierung

Die bestmögliche Auftrennung von Homo und Heteroduplexen ist stark abhängig von der Säulentemperatur und dem Acetonitrilgradienten. Die optimale Analysetemperatur für die Mutationsanalyse mittels dHPLC-Methode wurde nach Eingabe der jeweiligen amplifizierten DNA-Sequenz für jedes einzelne Exon mit der WAVEMAKER Software Version 4.1 ermittelt. Das damit berechnete

Schmelzprofil der DNA-Fragmente basiert auf der Implementierung des Poland Algorithmus nach Fixman und Freire 1977. Aus den unterschiedlichen Schmelzkurven wurde die jeweilige Temperatur ausgewählt, bei der ca. 99% der Basen nicht-denaturiert vorliegen.

Der gesamte Ablauf einer Messung durch die dHPLC lässt sich in vier Phasen einteilen, die sich durch unterschiedliche Kombinationen der Puffer A und B in der mobilen Phase voneinander unterscheiden. Die Puffer werden mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min im HT (High Throughput)-Modus über die Säule gepumpt. Im ersten Abschnitt („Loading“) erfolgt zunächst die Injektion von 5 µl DNA-Probe. Dieser Abschnitt dauert 0,1 min, wobei der Anteil des Puffers B um 3% (+0,75% Acetonitril/min.) erhöht wird. Im nächsten Abschnitt („Gradient“)

wird ein linearer Gradient aufgebaut, in dessen Verlauf die Elution und somit Analyse des DNA-Fragments von der Säule stattfindet. Die Konzentration des B Puffers wird dabei innerhalb von 2 min konstant um 10% pro Minute. (+2,5% Acetonitril/min.) erhöht. Der Anteil an B Puffer wurde zu Beginn des 2. Abschnittes so gewählt, dass der Elutionspeak bei ungefähr 1,7 min. auftritt. Um die beste Auflösung der Elutionspeaks im HT-Modus zu erhalten ist eine Retentionszeit von 1,7 bis 1,8 Minuten anzustreben. Deshalb wird eine gepoolte Probe (CEPH 120384 und CEPH 2801) mehrmals mit unterschiedlichen Startgradienten (Mischungsverhältnis von Puffer A /Puffer B) gemessen, bis sich die optimale Retentionszeit eingestellt hat. Danach wird die Säule für 0,2 s mit dem während des Loadings gewählten Gradienten gewaschen, also der Ausgangskonzentration, letztlich folgt die Äquilibrationsphase (Equilibrate) mit einer Dauer von 0,2s.

3.10 Auswertung eines Chromatogramms

Im Idealfall ließe sich eine Probe, die eine Sequenzvariation enthält, durch das Auftreten von vier Peaks im Elutionsprofil von dem Wildtyp, der nur einen Peak aufweist, leicht unterscheiden. Allerdings ist die Auflösung eines Peaks stark von der Schmelztemperatur der umgebenden Basen und dem Nukleotid-Mismatch abhängig, so dass es sich in der Praxis häufig zeigt, dass man im Falle einer Sequenzvariation im Elutionsprofil nur drei oder zwei Peaks erhält oder die Variation durch einen Peak mit 2 Spitzen oder einer sogenannten Schulter, d.h. einer verbreiterten Erhöhung des Signals vor dem eigentlichen Peak, auffällt. Aus diesem Grunde ist es sehr wichtig, dass alle Chromatogramme eines Exons, die mit derselben Temperatur erzeugt wurden, untereinander verglichen werden um aussagen zu können, ob es sich um einen in nur einer einzigen oder nur in wenigen Proben vorkommenden Heteroduplex-Peak oder um Verunreinigung (Primer-Dimere, PCR-Artefakte, Polymerase-Fehler) handelt, die dann in allen Elutionsprofilen gleichermaßen zu sehen ist. Gepoolte Proben, die ein suspektes Chromatogramm aufweisen, werden erneut als Einzelproben im dHPLC-Gerät analysiert, um zu klären, welche der Proben der Auffälligkeit zu Grunde liegen. Ist

das Elutionsprofil einer einzelnen Probe markant, so kann eine heterozygote Mutation angenommen werden. Falls beide Proben Einzelpeaks aufweisen, ist darauf zu achten, ob sich die Retentionszeiten der Peaks beider Proben unterscheiden, was ein Hinweis auf eine homozygote Mutation in einer der Proben sein kann. Nach dHPLC-Analyse sämtlicher Patienten-Proben wurden alle auffälligen Einzelproben durch Sequenzierung weitergehend untersucht.

3.11 Aufreinigung der PCR-Produkte

Für eine anschließende Sequenzierung sind in der dHPLC-Analyse suspekt PCR-Produkte mit dem QIAquickTM PCR Purification Kit aufgereinigt worden. Bei dieser Methode werden Amplifikate bei hoher Salzkonzentration an die Silika-Membran einer Spinsäule gebunden (Anionenaustauscher), während Verunreinigungen wie Salze, PCR-Primer oder PCR-Pufferzusätze, die die Sequenzierreaktion stören würden, die Säulenmatrix passieren und auf diese Weise entfernt werden. Daraufhin wurde die an der Säule haftende DNA mit TE-Puffer eluiert und in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Die Aufreinigung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Qiagen GmbH, Hilden).

Amplifikate, die bei einer Kontrollgelelektrophorese zusätzlich schwache unspezifische Banden zeigten, welche möglicherweise die Sequenzierreaktion beeinträchtigen können, wurden über ein 2,0%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel aufgereinigt. Hierfür wurden die Ethidiumbromid gefärbten spezifischen PCR-Banden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, während unspezifische Produkte im Gel verblieben. Die DNA konnte nun mit Hilfe des QIAquickTM Gel Extraction Kit aus den Gelstücken extrahiert und in TE Puffer gelöst werden. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, unspezifische PCR-Produkte zu eliminieren.

3.12 Zyklische Sequenzierungsreaktion

Die direkte DNA-Sequenzierung gilt als der „Goldstandard“ in der Mutationsanalyse. Mit einer Sensitivität von über 98% gilt sie als die sicherste

3 Methoden

Untersuchung zum Nachweis von Mutationen. Die Sequenzierung ist die einzige Methode, die eine Charakterisierung der Mutation bezüglich ihrer Art und Position zulässt. Es können alle bekannten Mutationen (Punkt-, Frameshift- und Nonsensemutationen) sowohl homo- als auch heterozygot nachgewiesen werden. Die zyklische Sequenzierung ist eine Technik, welche die bereits beschriebene PCR-Amplifikation [Mullis et al. 1986, Mullis, Faloona 1987] sowie die Sequenzierung nach Sanger et al. 1977 kombiniert und eine gleichzeitige Amplifikation und DNA-Sequenzierung erlaubt. Bei diesem Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren wird die zu untersuchende und im Wave-Gerät auffällige und nachfolgend aufgereinigte DNA zuerst in eine einzelsträngige Form, die sogenannte Matrize, überführt und anschließend mit dem entsprechenden Forward- oder Reverse Primer hybridisiert. Die Sequenzierreaktion enthält zudem 10 x Reaktionspuffer, DNA-Polymerase, die vier Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) dTTP, dCTP, dGTP, dATP sowie die vier Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) ddTTP, ddCTP, ddGTP und ddATP. Die ddNTPs sind jeweils mit einem bestimmten Fluorochrom markiert und, weil ihnen eine essentielle Gruppe (3'OH) fehlt, kann, sobald ein ddNTP anstatt eines dNTPs in eine DNA-Kette eingebaut ist, kein weiteres Nukleotid an dieses angeknüpft werden – die DNA-Synthese bricht in diesem DNA-Molekül ab. Da in einem Reaktionsgefäß viele solcher DNA-Synthesen ablaufen, die ddNTPs zufällig eingebaut werden und mit den dNTPs um den Einbau in das DNA-Fragment konkurrieren, endet jeder neue DNA-Strang zufällig an einem A, C, T oder G und es entstehen unterschiedlich lange Fragmente.

Die derart gebildeten DNA-Fragmente können anschließend durch eine denaturierende hochauflösende Kapillargelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Kapillaren enthalten ein Polyacrylamid-Gel, das nach jeder Messung aus einem Vorratsbehälter erneuert wird. Als Zusatz ist dem Gel noch Harnstoff beigegeben, welcher einen denaturierenden Effekt auf die DNA-Fragmente bewirkt. Im Sequenziergerät treffen die fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente je nach Länge mit unterschiedlicher Laufzeit auf einen Laserstrahl, der das Fluoreszenz-Molekül anregt, das daraufhin Licht emittiert welches dann von Photodetektoren erfasst wird. Mit Hilfe der CEQ DNA Analysesoftware

(Beckman Coulter) kann dieses emittierte Licht als farbstoffspezifisches und damit basenspezifisches Intensitätsprofil dargestellt werden.

3.13 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktionen bedurfte es je 2,5 – 5,0 µl der aufgereinigten DNA, die benötigte Menge wurde dabei anhand einer Gelelektrophorese mit einem 2%-igen Agarosegel bestimmt. Beim Auftreten schwacher Banden wurden 5 µl, bei mittleren Banden 4 µl und bei starken Banden 2,5 bis 3 µl des aufgereinigten PCR-Produkts eingesetzt. Für den ersten Teil der Sequenzierreaktion kam das CEQ Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Kit von Beckman zum Einsatz, welches die für die Reaktion notwendige DNA-Polymerase, 10x Reaktionspuffer, ddNTPs und dNTPs enthält. Als Sequenzierprimer fanden die in der PCR bereits angewandten Primer Verwendung, wurden dem Kit hinzupipettiert und anschließend das Reaktionsgemisch mit destilliertem Wasser (Ampuwa) auf 10 µl aufgefüllt. Im Unterschied zu den gewöhnlichen PCR-Reaktionen wurden die forward und reverse Primer in jeweils getrennten Reaktionen eingesetzt.

Tabelle 23: Ansatz für die Sequenzierreaktion (10 µl Endvolumen)		
Für die Sequenzierung wurden die gleichen Primer wie für die PCR verwendet		
Komponente	Menge oder Endkonzentration	Stammlösung
aufgereinigtes PCR-Produkt	2,5 – 4,0 µl	
Primer 1 oder 2 (Forward oder Reverse)	1,0 µl (10 µM)	100 µM
DTCS Quick Start Mastemix	2,0 µl	
H ₂ O (Ampuwa)	ad 10,0 µl	

3 Methoden

Die Reaktion fand in PCR-Softstrips (Biozym) im Gene Amp PCR System 9700 unter folgenden Bedingungen statt:

Schritt	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	initiale Denaturierung	94	90
2	Denaturierung	96	20
3	Primer-Annealing	57	20
4	Polymerisation	60	60
	Wiederholung der Schritte 2 - 4: 29 mal		
5	Abkühlen	4	Unendlich

3.13.1 Abstoppen der Sequenzierreaktion und Fällung der DNA

Nachdem das Thermocycler-Programm der Sequenzierreaktion beendet ist, muss die Reaktion abgestoppt und das Produkt durch Ethanolpräzipitation aufgereinigt werden. 15 µl der Stopp-Lösung werden dazu in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und die 10 µl Sequenzierlösung dazugegeben. Durch den Einsatz von Natriumacetat und EDTA können alle nicht inkorporierte ddNTPs und sonstige Reaktionsbestandteile entfernt werden, die die nachfolgenden Schritte störend beeinflussen würden.

Komponente	Menge oder Endkonzentration
NaAcetat, pH 5,2	2,0 µl (3 M)
Na ₂ EDTA pH 8,0	2,0 µl (100 mM)
Glycogen (Beckman Coulter)	1,0 µl
dH ₂ O	10,0 µl

3 Methoden

Anschließend wurde die mit der Stopplösung versetzte DNA mit 60 µl eiskaltem 100%-igen Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation bei 4°C für mindestens 15 Minuten mit 13500 rpm wurde der Überstand verworfen und eventuell übrig gebliebene Salze durch zwei weitere Waschschriffe entfernt. Dafür kam jeweils 100µl 70%-iges Ethanol zum Einsatz. Nach dem letzten Waschschriff konnte der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) im Dunkeln für 15 Minuten bei 30°C getrocknet und anschließend in 40 µl Ladepuffer (sample loading solution (SLS), Beckman Coulter) resuspendiert werden. Das in der SLS vorhandene denaturierende Detergenz Formamid verhindert das Entstehen von DNA-Basenpaaren, da es selbst Wasserstoffbrücken mit den DNA-Basen bildet. Die Probe wurde vor weiterer Verwendung kurz vorgetext und dann für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert, bevor der Auftrag auf die Sequenzierplatte erfolgte. Um die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden sowie einen Schutz vor Verdunstung zu gewährleisten war es erforderlich, jedes „well“ mit einem Tropfen Mineralöl (Beckman Coulter) zu überschichten und letztendlich noch die Reihen der Platte mit Puffer (separation puffer, Beckman Coulter) zu füllen, die den Reihen der Sequenzierplatte entsprechen. Die auffälligen Proben wurden jeweils mit dem „forward“ und „reverse“ Primer (siehe Tabelle 26) sequenziert. Die sich ergebenden Sequenzen konnten anschließend mit der CEQ DNA Analysesoftware Version 5 (Beckman Coulter) untereinander sowie mit der Referenzsequenz verglichen werden um eine Aussage über eine mögliche Sequenzvariation machen zu können.

Komponente	Einstellungswerte
Kapillartemperatur	50 °C
Denaturierung	120 s bei 90°C
Injektionszeit	15 s bei 2,0 kV
Separierung	60 min bei 4,2 kV

3.14 *in-silico* Abschätzung

Anschließende *in-silico* Abschätzungen der detektierten Auffälligkeiten zur Klassifizierung der Pathogenität von Mutationen erfolgten mittels des Programms Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>). Diese internetbasierte Software stellt ein Werkzeug dar, welches mögliche Auswirkungen einer Aminosäuresubstitution unter Betrachtung von physikalischen und strukturellen Gegebenheiten prognostiziert. Unter der Verwendung von Informationen über die Konserviertheit von Aminosäuren, der räumlichen Struktur des Proteins und Informationen aus bereits vorhandenen Untersuchungen ordnet das Programm die Aminosäureaustausche in Varianten ein, die wahrscheinlich die Funktion des Proteins nicht, kaum oder stark beeinflussen.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Untersuchung und Zusammenstellung der Patienten- und Kontrollproben

Für die Mutationsanalysen stand isolierte DNA von 48 Ataxie-Patienten sowie 264 Kontrollpersonen (old people) zur Verfügung. Außerdem kam CEPH-DNA als Referenz-DNA zum Einsatz. Die optische Dichte der DNA-Konzentration aller Patientenproben, deren PCR-Produkte später mittels dHPLC analysiert worden sind, musste im Vorfeld durch photometrische Messung bestimmt werden.

4.2 Qualitätsüberprüfung der DNA

Zunächst wurden alle photometrisch gemessenen und auf 50µg/ml verdünnten DNA-Proben mittels PCR amplifiziert und durch eine anschließende Gelelektrophorese auf ihre Qualität hin überprüft. DNA-Proben, die klare und kräftige Banden auf dem Gel zeigten, konnten anschließend für alle weiteren Versuche eingesetzt werden (siehe Abbildung 5).

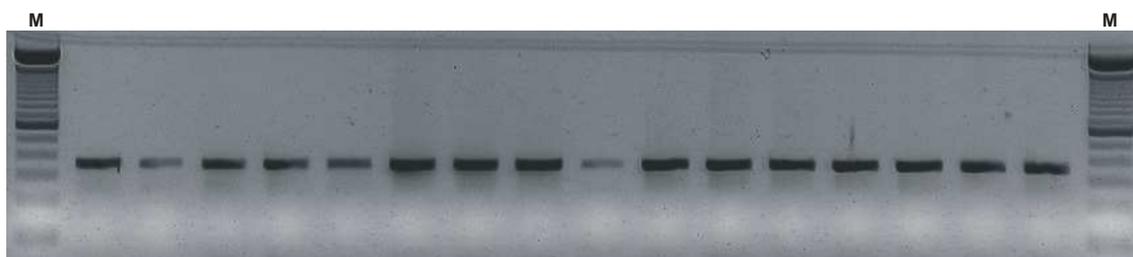


Abbildung 5: Qualitätsüberprüfung der DNA

PCR-Amplifikate verschiedener Patienten- und Ceph-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 2%igen Agarosegel. Abkürzungen: M: 100 bp Längenstandard.

4.3 Mutationsanalyse des PRKCG- und des FGF14-Gens bei SCA-Patienten mittels dHPLC

Das folgende Flussdiagramm dient zur graphischen Veranschaulichung der Vorgehensweise, wie sie zum Mutationsscreening der beiden Gene bei Ataxiepatienten angewandt wurde (siehe Abbildung 6).

4 Ergebnisse

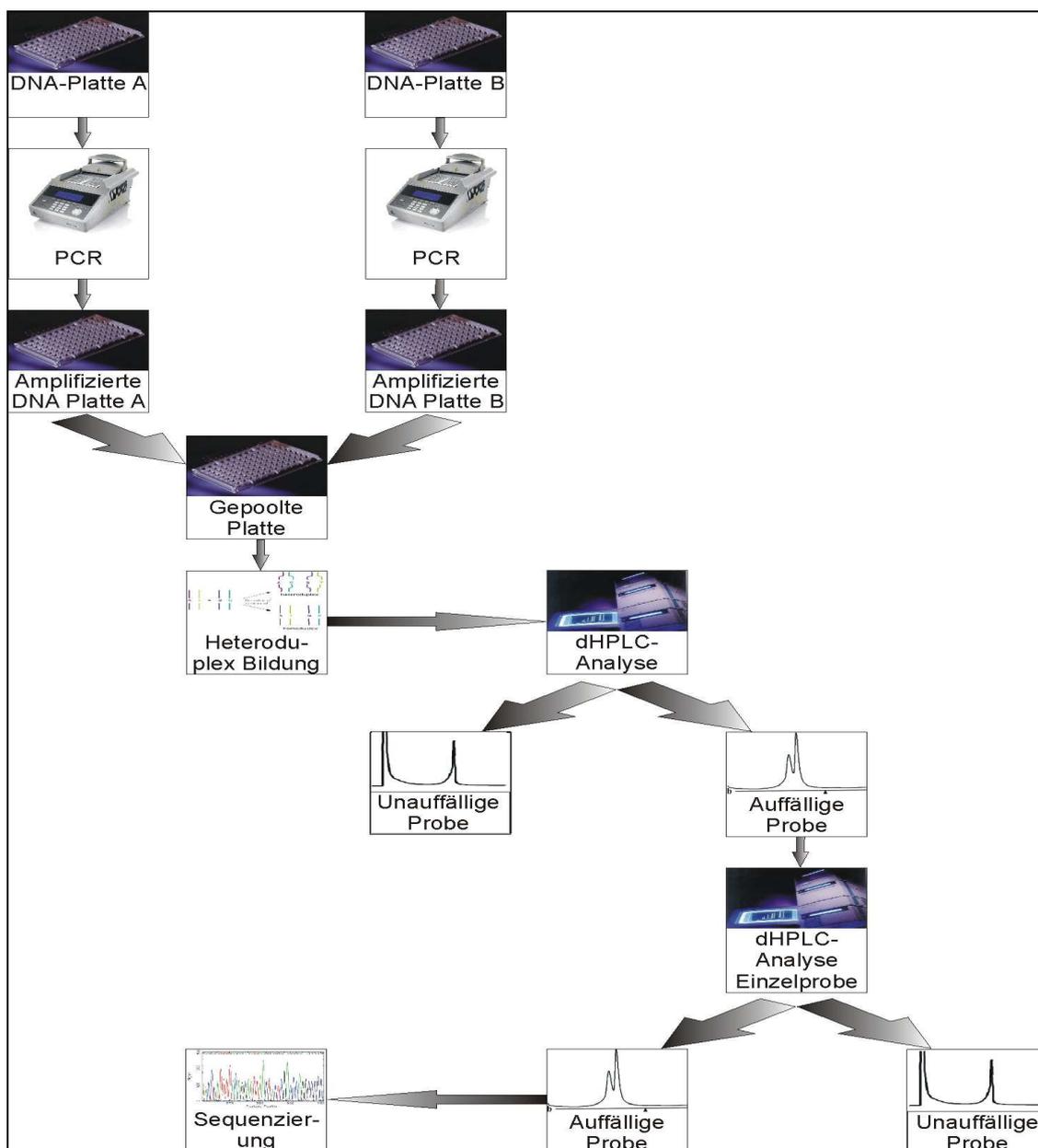


Abbildung 6: Flussdiagramm des Mutationsscreenings

DNA-Proben zweier Platten (Platte A und B) werden mittels PCR amplifiziert, die resultierenden PCR-Produkte zweier Proben werden jeweils zu gleichen Teilen gemischt (gepoolt), zur Heteroduplexbildung angeregt und anschließend durch die dHPLC analysiert. Bei der Detektion von Heteroduplexen werden die Proben, aus denen sich diese auffällige Probe zusammensetzt, einzeln erneut mittels dHPLC analysiert. Die jeweils auffälligen Einzelproben werden daraufhin zur Bestätigung und zur exakten Lokalisation der Mutation sequenziert.

4.4 Optimierung der PCR-Bedingungen

Für die 18 Exone des PRKCG-Gens und die 5 Exone des FGF14-Gens war es zunächst erforderlich, die PCR-Bedingungen mit Hilfe der Temperatur-

4 Ergebnisse

Gradienten-PCR zu ermitteln. Die PCR wurde unter Verwendung von CEPH-DNA und einer Patientenprobe nach einem Standard-PCR-Ansatz und einem Standard-PCR-Protokoll durchgeführt (siehe Anhang Tabelle 33 und 34). Bei zu niedriger Annealing-Temperatur entstehen durch unspezifische Primerbindung Doppelbanden (siehe Abbildung 8). Ist die Annealing-Temperatur zu niedrig oder zu hoch, kommt es zu einem unvollständigen Annealing, damit zu weniger PCR-Produkt und schwächeren Banden im Gel. Die Wirkung verschiedener Annealing-Temperaturen auf eine PCR-Reaktion soll an Hand einer Gelelektrophorese von Exon 14 der PRKCG veranschaulicht werden (siehe Abbildung 7).

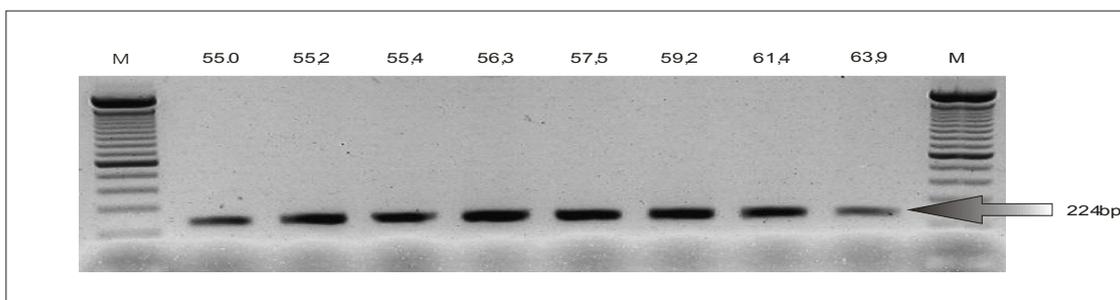


Abbildung 7: Gradienten PCR Gelbild

Aufgetrennte PCR-Amplifikate (Ceph-DNA) von Exon 14 (224bp) der Protein Kinase C gamma für verschiedene Annealing-Temperaturen. Die jeweilige Annealing-Temperatur in °C ist über jeder Gelspur angegeben. Als optimale Annealing-Temperatur wurde für dieses Exon eine Temperatur von 56,3°C gewählt. Abkürzungen: M 100 bp Längenstandard.

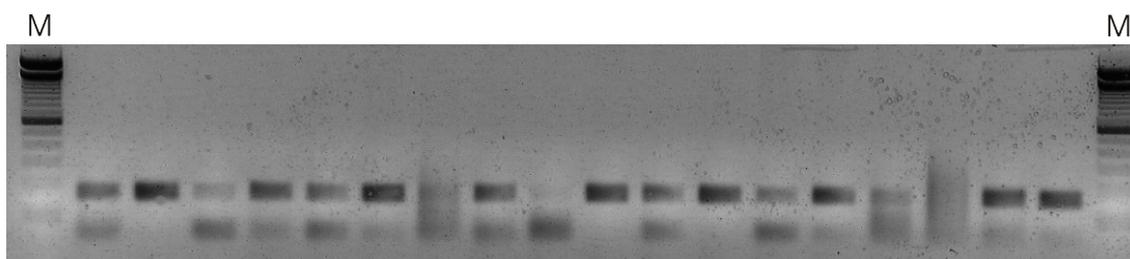


Abbildung 8: Doppelbanden nach PCR

PCR-Amplifikate verschiedener Patienten- und Ceph-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 2%igen Agarosegel. Abkürzungen: M:100 bp Längenstandard. Hierbei kommen unspezifische Banden und Doppelbanden im selben Temperaturbereich zur Darstellung.

4.5 Optimierung der dHPLC-Analyse

Die Auftrennung der DNA-Fragmente bei der dHPLC-Analyse ist stark von dem jeweiligen Acetonitrilgradienten und der Temperatur abhängig. Die Elution der

4 Ergebnisse

DNA erfolgt, wie im Methodenteil schon beschrieben, bei steigendem Gradienten. Deshalb war es notwendig, die zu verwendenden Pufferkonzentrationen in den verschiedenen Phasen sowie die Säulentemperaturen der Analyse für jedes einzelne Exon bzw. Primerpaar anzugeben (siehe Tabellen 35/36 im Anhang). Um die optimalen Bedingungen für eine Mutationsanalyse der beiden Gene von SCA14 (PRKCG) und FGF14 zu ermitteln, wurden die Schmelzkurven der zu untersuchenden PCR-Fragmente mit Hilfe der Wavemaker Software berechnet. Schmelzkurven sind als Anteil der helikalen (doppelsträngigen) Fraktion gegen die Temperatur und entlang einer vorgegebenen Nukleotidsequenz (Basen Position) darstellbar.

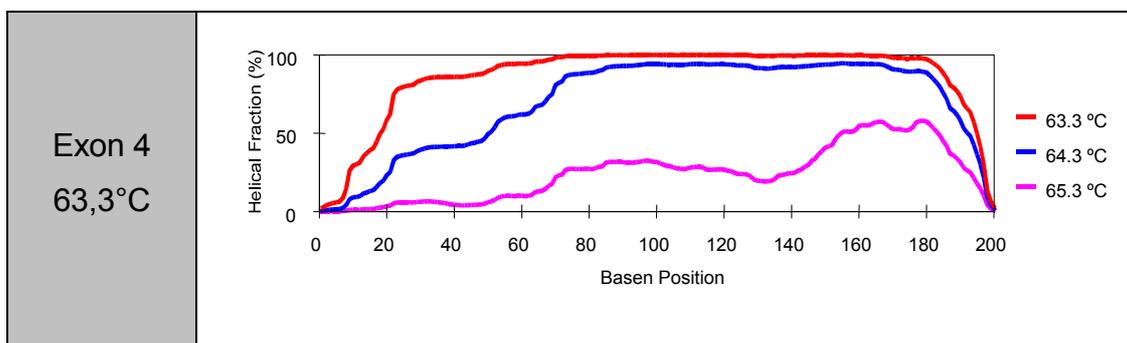


Abbildung 9: Helikale Fraktion gegen Temperatur (am Beispiel PRKCG, Exon 4)

Dargestellt ist der Anteil der helikalen (doppelsträngigen) Fraktion einer DNA-Probe des angegebenen Exons (Exon 4) gegen die Temperatur aufgetragen. Der senkrechte Balken bezeichnet jeweils die Ofentemperaturen, bei denen anschließend die Analysen durchgeführt wurden. Eine optimale Analysetemperatur liegt theoretisch im Bereich des Wendepunktes einer solchen Schmelzkurve, wenn es sich um eine ideale Schmelzkurve mit nur einem Wendepunkt handelt.

4 Ergebnisse

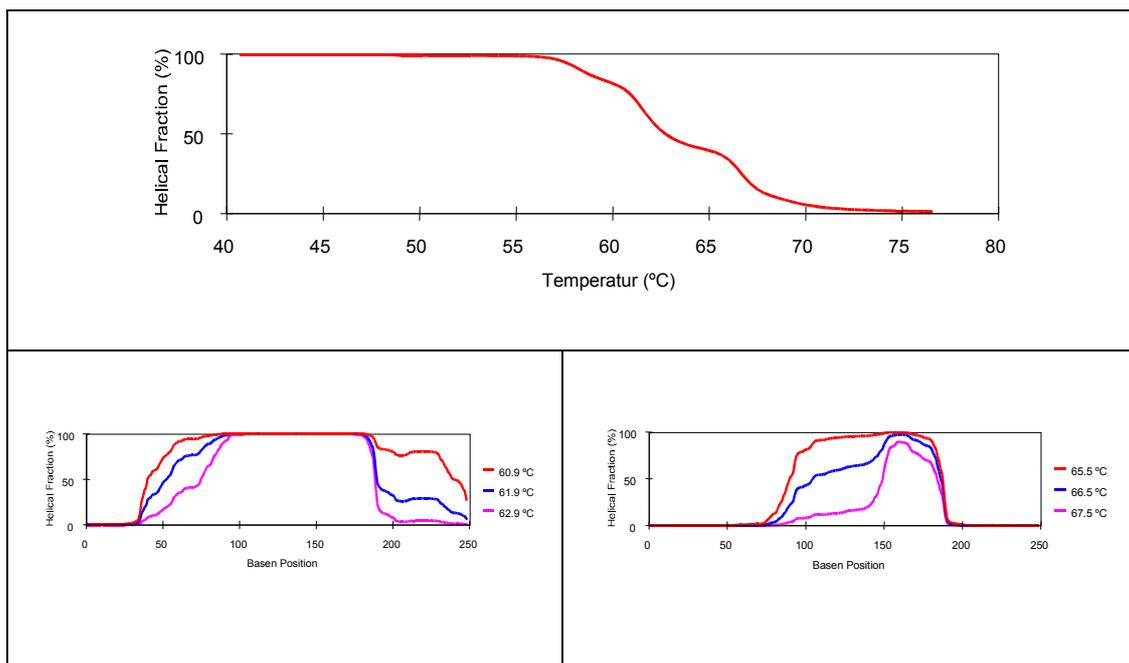


Abbildung 10: Schmelzprofile zur Ermittlung der Analysetemperaturen (am Beispiel PRKCG, Exon 3)

Der obere Teil der Abbildung zeigt das von der Wavemaker-Software berechnete zugehörige Schmelzprofil der helikalen Fraktion (%) gegen die Temperatur (°C). Die unteren zwei Grafiken veranschaulichen das Schmelzverhalten des Fragments der helikalen Fraktion (in %) bei unterschiedlichen Temperaturen (°C). Anhand dieser wurde die Analyse bei zwei Temperaturen festgelegt. Für die jeweils außen liegenden Exonabschnitte wurde eine Temperatur von 60,9 °C, für den mittig gelegenen Abschnitt eine Ofentemperatur von 65,5°C gewählt.

4.6 dHPLC-Analyse und anschließende Sequenzierung

Nach der Optimierung der dHPLC-Analysebedingungen wurden die PCR-Reaktionen der Ataxiepatientenproben aller 18 Exons des PRKCG-Gens und aller 5 Exons des FGF14-Gens durchgeführt (Tabellen 33/34 im Anhang). Die Amplifikation erfolgte nach dem Standard-PCR-Ansatz und dem Standard-PCR-Protokoll. Nach Überprüfung der Qualität der PCR mittels Gelelektrophorese wurden beide Platten zur Heteroduplexbildung gepoolt. Anschließend erfolgte die dHPLC-Analyse nach den Bedingungen aus Tabelle 35 und 36 (siehe Anhang). Für die Auswertung der dHPLC-Ergebnisse wurden Gruppen mit ähnlichen Elutionsprofilen eingeteilt. Zur Darstellung werden in der vorliegenden Arbeit jeweils bis zu vier einzelne Chromatogramme gepoolter Proben übereinander gelegt. In der Legende sind die DNA-Nummern der Patienten angezeigt, die beispielhaft für ihre Gruppe stehen. Anschließend ist die Anzahl der sequenzierten Proben pro einzeln gemessene Probe aufgeführt. Als Beispiel, wie

4 Ergebnisse

sich ein Chromatogramm gepoolter Proben aus Chromatogrammen einzeln gemessener Proben zusammensetzt, wird in Abbildung 11 aufgezeigt:

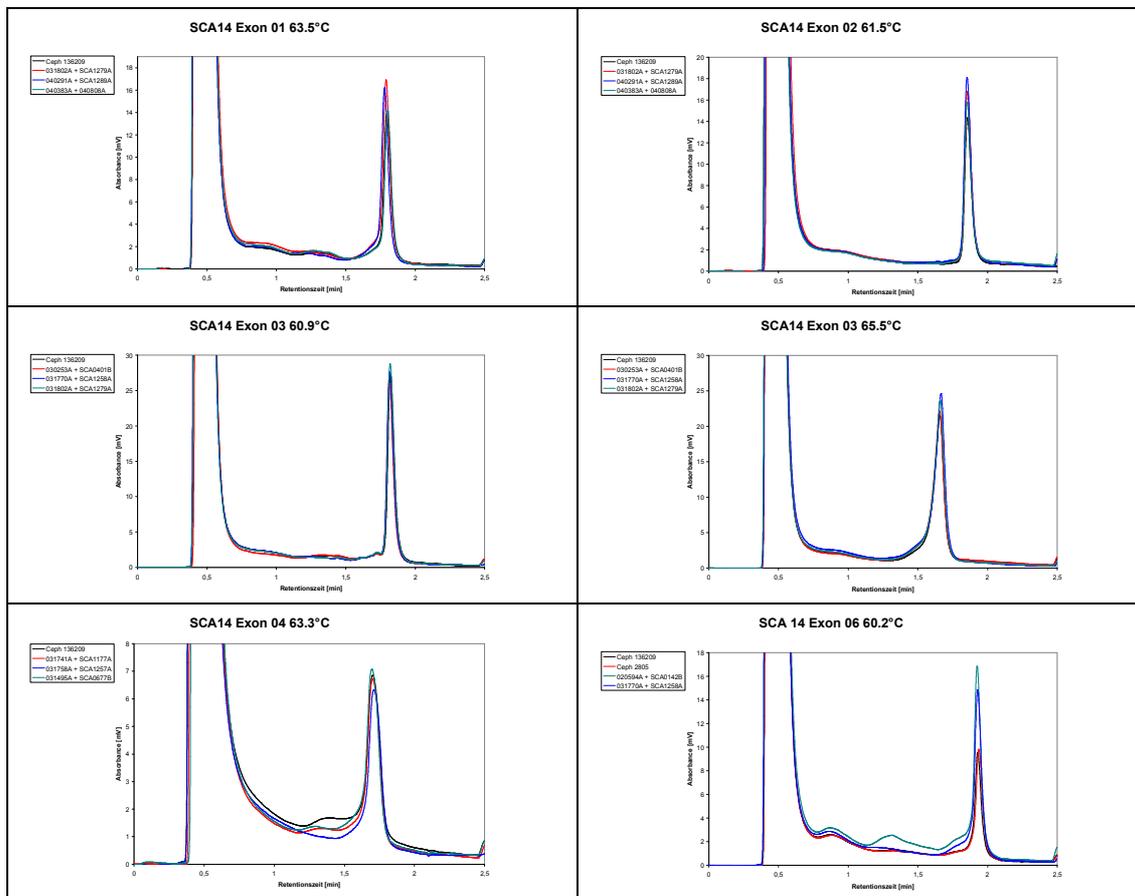


Abbildung 11: dHPLC-Elutionsprofile gepoolter Proben unauffälliger PCR-Fragmente der PRKCG

Übereinander gelegte unauffällige dHPLC-Elutionsprofile von jeweils vier gepoolten Proben für jedes PCR-Fragment bei einer Analysetemperatur. Die Höhe der Peaks ist auf unterschiedliche DNA-Konzentrationen der gepoolten Proben zurückzuführen. In der Legende sind die Patientenproben dokumentiert, aus deren DNA die PCR-Fragmente amplifiziert und für die dHPLC-Analyse gepoolt wurden.

Bei einigen PCR-Fragmenten fanden sich gepoolte Proben mit einem suspekten bzw. von der Norm abweichenden dHPLC-Elutionsprofil bei einer oder mehreren der angewandten Analysetemperaturen. Um diese Proben weitergehend zu untersuchen, wurden die jeweiligen Einzelproben aller auffälligen gepoolten Proben untersucht, wobei die Einzelproben ebenfalls der Heteroduplexbildung unterzogen wurden. Die Gegenüberstellung einer auffälligen gepoolten Probe und der beiden Einzelproben soll beispielhaft in der nächsten Abbildung veranschaulicht werden (Abbildung 12).

4 Ergebnisse

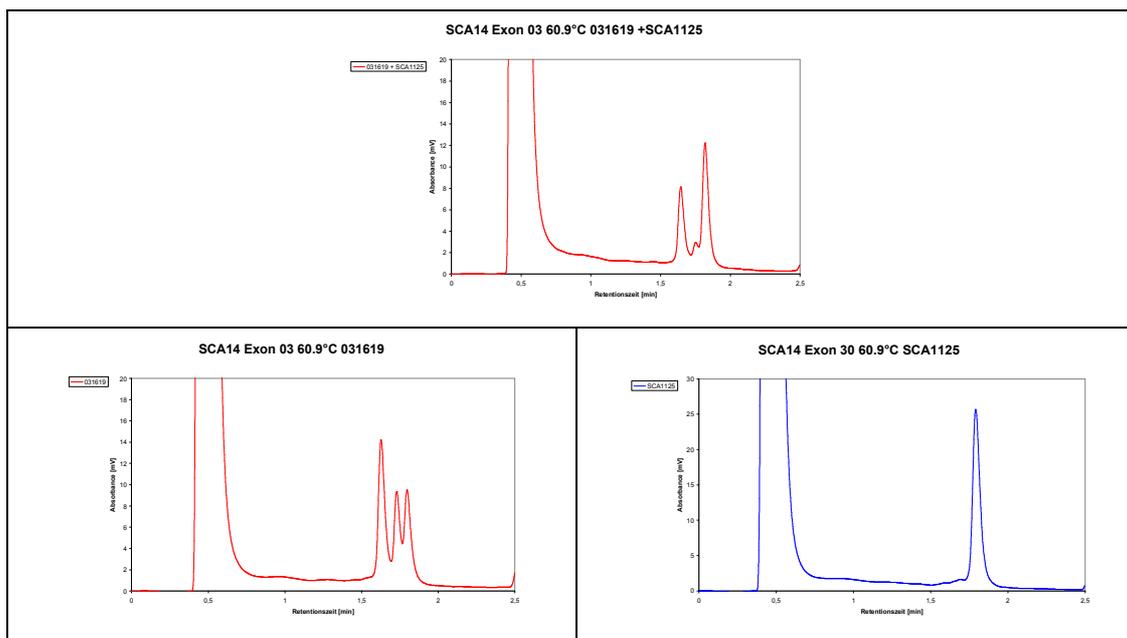


Abbildung 12: Auffälliges Elutionsprofil einer gepoolten Probe und der Einzelproben

Auffälliges Elutionsprofil einer gepoolten Probe (I) und die gegenübergestellten Elutionsprofile der Einzelproben in (II) für Exon 03 der PRKCG deuten auf eine Sequenzvariation bei der Einzelprobe 031619 hin. Die Analysetemperatur betrug 60.9°C, das Mischungsverhältnis der beiden Puffer zum Start des linearen Gradienten war 44% A und 56% B.

Zur Kontrolle wurden zudem Einzelproben von als unauffällig gewerteten gepoolten Proben analysiert, um damit einen direkten Vergleich dieser dHPLC-Elutionsprofile mit den auffälligen Einzelproben zu ermöglichen. Die suspekten Einzelproben wurden anschließend sequenziert.

4.7 Mutationsanalysen im PRKCG Gen (SCA14)

Nach erfolgreicher PCR der Patienten-DNA beider Platten für jedes Exon der PRKCG wurden jeweils zwei amplifizierte PCR-Produkte von je einer Platte in einer neuen 96-well Platte gepoolt und anschließend der Heteroduplexbildung unterzogen. Die Analyse der gepoolten PCR-Fragmente im dHPLC-Gerät erfolgte nach den Bedingungen in Tabelle 35 (siehe Anhang). Insgesamt wurden 48 Patientenproben untersucht.

4.7.1 Exon 1

Die Analyse der DNA-Proben im Exon 1 der PRKCG ergab bei den gepoolten Patientenproben 010208/SCA0005 eine geringgradige Abweichung des Elutionsprofils mit einer diskreten Schulter (verbreiterte Erhöhung des Signals vor dem eigentlichen Peak) verglichen mit anderen Chromatogrammen desselben Exons, sodass im Anschluss die jeweiligen Einzelproben mittels der dHPLC-Analyse erneut untersucht wurden. Hierbei zeigte sich ein suspektes Chromatogramm der Patientenprobe 010208 bei unauffälliger Probe SCA0005. Die Gegenüberstellung der Elutionsprofile der Wildtypprobe Ceph 2805 und der suspekten Einzelproben sowie dem zugehörigen Sequenzierchromatogramm wird in Abbildung 13 veranschaulicht. Eine anschließende Sequenzierung ergab verglichen mit der Referenzsequenz in Probe 010208 einen Basenaustausch c.72C>T. Es handelt sich dabei jedoch um eine stumme Mutation ohne Austausch der Aminosäure an der betreffenden Position (p.A24A).

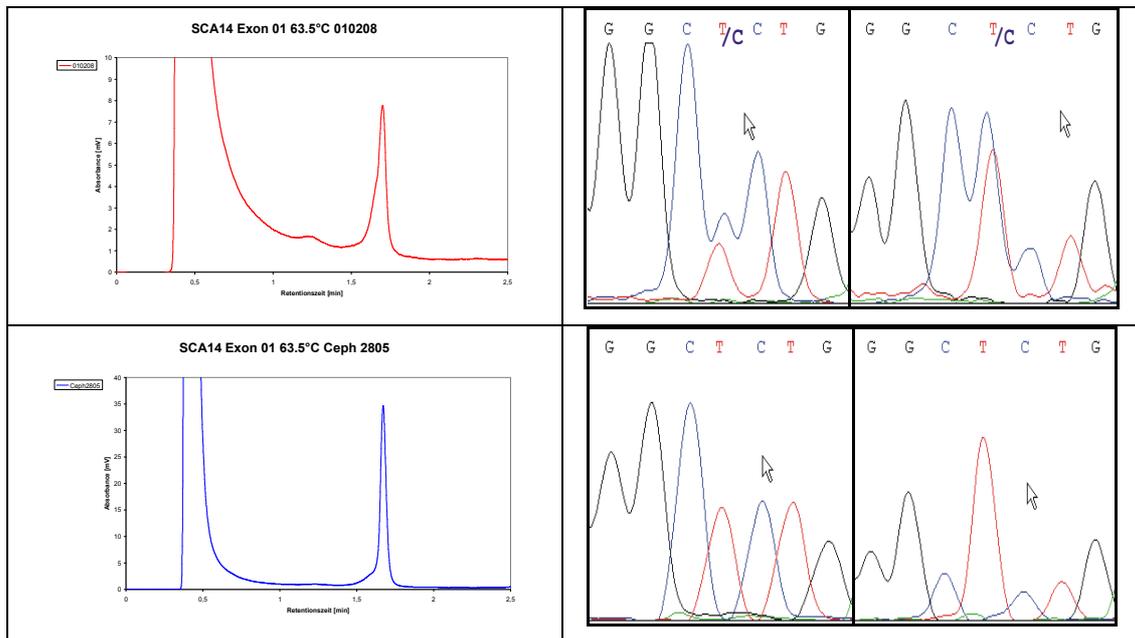


Abbildung 13: dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 1 (PRKCG) Patient 010208 und Wildprobe Ceph2805

dHPLC-Elutionsprofile mit Sequenzierchromatogramm Forward und Reverse

Die Analyse der gepoolten DNA-Proben 040885/041092 ergab ein deutlich suspektes Chromatogramm mit signifikanter Abweichung im Vergleich mit den restlichen Elutionsprofilen. Eine Untersuchung der Einzelproben erbrachte ein

4 Ergebnisse

auffälliges Elutionsprofil der Patientenprobe 040885 mit 2 Peaks (siehe Abbildung 14). Die zyklische Sequenzierung der Probe 040885 dokumentiert einen Basenaustausch c.62C>T der zu einem Aminosäureaustausch p.R21K führt, wobei Argin durch Lysin ersetzt wird (jeweils basische Aminosäuren). Eine in-silico Abschätzung mittels Polyphen klassifiziert die Veränderung als „möglicherweise pathogen (multiples Alignment siehe Abbildung 15).

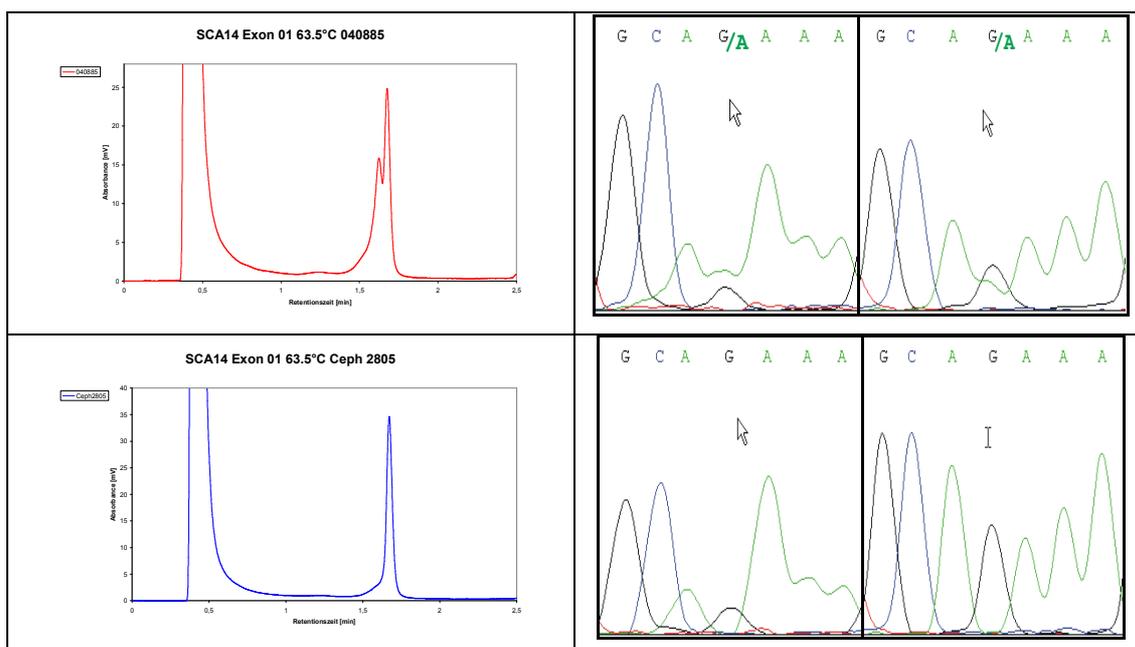


Abbildung 14: dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 1 (PRKCG) Patient 040885 und Wildprobe Ceph2805

dHPLC-Elutionsprofile links mit jeweiligem Sequenzierchromatogramm Forward und Reverse rechts

Ref NP_002730.1	Protein Kinase C gamma (Homo sapiens)	..MAGLPGVGDSEGGPRP LFC	R KGALRQKVVHEV KSHKFTARFFKQP . . .
1 Gb AAI11808.1	Protein Kinase C [Mus musculus]	..MAGLPGGGDSEGGPRP LFC	R KGALRQKVVHEV KSHKFTARFFKQP . . .
2 Ref XP_001116804.1	Protein Kinase C gamma isoform 1 [Macaca mulatta]	..MAGLPGGGDSEGGPRP LFC	R KGALRQKVVHEV KSHKFTARFFKQP . . .
3 Ref XP_541432.2	Protein Kinase C gamma [Canis familiaris]	..MAGLPGGGDSEGGPRP LFC	R KGALRQKVVHEV KSHKFTARFFKQP . . .
4 Gb AAI36750.1	Protein Kinase C alpha [synthetic construct]	..-----FA	R KGALRQKVVHEV KDKHFIARFFKQP . . .
5 Ref NP_001012822.1	Protein Kinase C alpha [Gallus gallus]	..MADVFPG---SEPGAAPRFA	R KGALRQKVVHEV KEHKFIARFFKQP . . .
6 Ref XP_001096093.1	Protein Kinase C beta 1 isoform [Macaca mulatta]	..MADPAAGPPPSEGEESTVFA	R KGALRQKVVHEV KNHKFIARFFKQP . . .
7 Ref NP_001072752.1	Hypothetical Protein LOC780209 [Xenopus tropicalis]	..-----FA	R KGALRQKVVHEV KNHKFIARFFKQP . . .
8 emb CAD30698.1	Protein Kinase C alpha [Takifugu rubripes]	..-----FA	R KGALRQKVVHEV KNHKFIARFFKQP . . .
9 Gb AAH78065.1	Protein Kinase A [Xenopus laevis]	..-----NDSTSSSSPLFA	R KGALRQKVVHEV KNHKFIARFFKQP . . .
10 Ref NP_957272.1	Protein Kinase C beta [Danio rerio]	..MAEPANSDGEERSAPMRGFA	R QGALRQKVVHEV KNHKFIARFFKQP . . .

Abbildung 15: Fragment eines multiplen Alignments um Aminosäureposition 21 der PRKCG einer in-silico Abschätzung mittels Polyphen

In den Spalten angegeben ist die jeweilige Zeilennummer (Spalte 1), die Sequenzversion der *UniProt* Datenbank (Spalte 2), das betreffende Gen, sowie die zugehörigen Spezies in eckigen Klammern (Spalte 3) und das Alignment in Spalte 4. Grau hervorgehoben ist die Aminosäureposition 21.

4 Ergebnisse

Der zum Zeitpunkt der Untersuchung 15-jährige Patient 040885 befand sich bei Auftreten von ersten Erkrankungssymptomen erst im Alter von fünf Jahren. Weitergehende neurologische Untersuchungen und eine Bildgebung waren aber bislang noch nicht durchgeführt worden. Exakte klinische Daten liegen derzeit nicht vor.

Eine weitere Mutation im Exon 1 (c.146G>T, p.C49Y) wurde durch das molekulargenetische Labor der Medizinischen Genetik in Tübingen im Rahmen einer späteren DNA-Analyse vor Abschluss dieser Arbeit identifiziert. Es handelt sich hierbei um einen 48-jährigen Patienten mit dem klinischen Bild einer spinocerebelläre Ataxie und mit MR-tomographisch nachgewiesener zerebellärer Atrophie. Die PCR-Amplifikate von Exon 1 bis 18 wurden direkt sequenziert (Beckman Coulter CEQ8000) und mit den Wildtypproben verglichen. Die DNA-Analyse ergab einen Basenaustausch c.146G>T im Exon 1 mit einer Aminosäuresubstitution von Cystein nach Tyrosin (p.C49Y). Klinisch und neurologisch auffällig waren eine progrediente Stand- und Gangataxie mit einem breitbeinigen ataktischen Gangbild sowie einer erheblichen Alkoholunverträglichkeit. Der Patient wies überdies einen auffälligen Tremor des Kopfes auf, der insbesondere bei Müdigkeit oder erhöhter Konzentration auftritt. Bei der Elektronystagmographie fand sich ein dissoziierter Nystagmus als Ausdruck der zerebellären Störung. Neurographisch ergaben sich pathologische Medianus- und Tibialis-F-Wellen. Der Patient war bei Einsetzen der ersten Symptome (Gleichgewichtsstörungen) 30 Jahre alt. Eine Intelligenzminderung oder Sprachbeeinträchtigung besteht nicht. Die weiterführende molekulargenetische Untersuchung der Familienmitglieder ergab zwei weitere Mutationsträger: Beim sechs Jahre älteren Bruder, dessen Erkrankungsbeginn ebenfalls in der 3. Lebensdekade lag, war eine gleichartige, aber insgesamt schwerere Symptomatik erkennbar. Bei der ebenfalls betroffenen Mutter wurden bislang Gangauffälligkeiten als Folge einer Hüftfraktur und nicht als neurodegenerative Erkrankung gedeutet.

4.7.2 Exon 2

Die Analyse der gepoolten DNA-Probe 040912/Ceph-DNA im Exon 2 der PRKCG ergab ein deutlich suspektes Chromatogramm mit signifikanter Abweichung im Vergleich mit den restlichen Elutionsprofilen. Eine Untersuchung der Einzelproben erbrachte ein auffälliges Elutionsprofil der Patientenprobe 040912 mit 3 Peaks (siehe Abbildung 16). Die zyklische Sequenzierung der Probe 040885 dokumentiert eine heterozygote Mutation mit einem Basenaustausch c.197G>A der zu einer Aminosäuresubstitution p.C66Y führt wobei Cystein durch Tyrosin ersetzt wird. Eine Sequenzierung mit einem reversen Primer war durch das kurze Intervall zwischen Primer und Mutationsstelle technisch bedingt nicht möglich gewesen.

Der betroffene Patient war zum Zeitpunkt dieser Arbeit 69 Jahre alt. Weitere klinische Daten bzw. neurologische oder bildgebende Untersuchungen liegen gegenwärtig nicht vor.

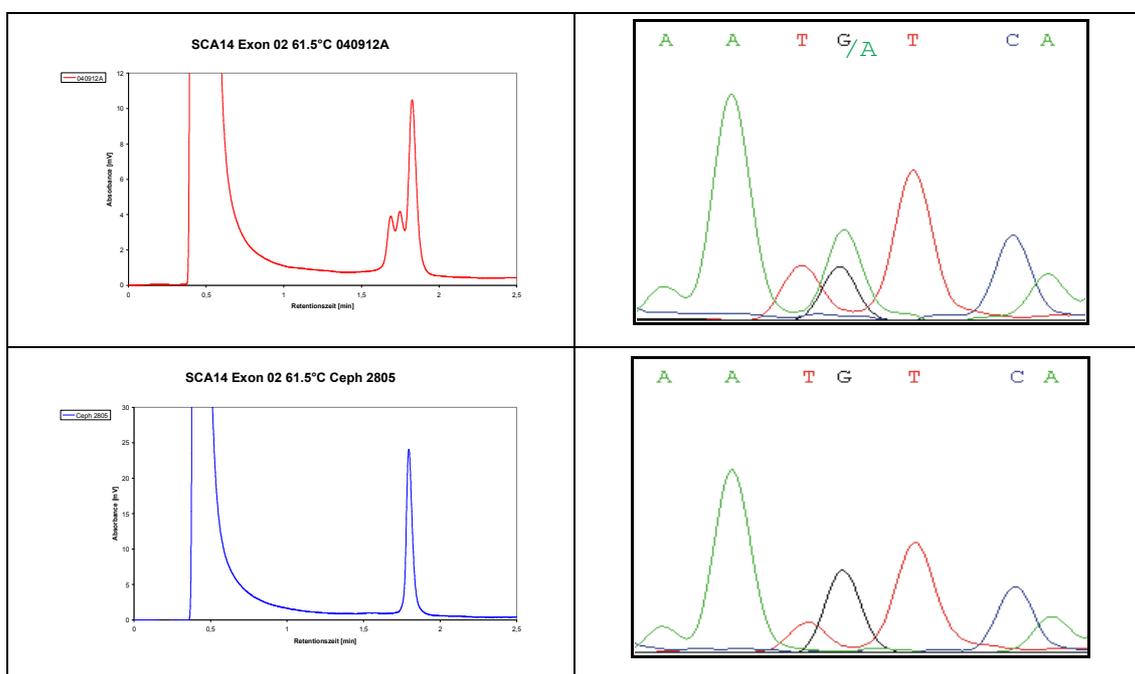


Abbildung 16: dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 2 (PRKCG) Patient 040912, Wildprobe Ceph136209

(dHPLC-Elutionsprofile links mit jeweiligem Sequenzierchromatogramm Forward rechts, Reverse war technisch bedingt nicht möglich gewesen)

4 Ergebnisse

	Ref NP_002730.1	Protein Kinase C gamma (Homo sapiens)	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGIGKQGLQ	C	QVCSFVHRRCHEFVTFECPGAGKG...
1	Gb AAI11808.1	Protein Kinase C [Mus musculus]	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGIGKQGLQ	C	QVCSFVHRRCHEFVTFECPGAGKG...
2	Ref XP_001116804.1	Protein Kinase C, gamma isoform 1 [Macaca mulatta]	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGIGKQGLQ	C	QVCSFVHRRCHEFVTFECPGAGKG...
3	Ref XP_541432.2	Protein Kinase C, gamma type [Canis familiaris]	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGIGKQGLQ	C	QVCSFVHRRCHEFVTFECPGAGKG...
4	Gb AAX36750.1	Protein Kinase C alpha [synthetic construct]	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGFGKQGFQ	C	QVCCFVHKRCHEFVTFSCPGADKG...
5	Ref NP_001012822.1	Protein Kinase C alpha [Gallus gallus]	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGFGKQGFQ	C	QVCCFVHKRCHEFVTFSCPGADKG...
6	Ref XP_001096093.1	Protein Kinase C beta 1 isoform [Macaca mulatta]	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGFGKQGFQ	C	QVCCFVHKRCHEFVTFSCPGADKG...
7	Ref NP_001072752.1	Hypothetical Protein LOC780209 [Xenopus tropicalis]	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGFGKQGFQ	C	QVCCFVHKRCHEFVTFSCPGADKG...
8	emb CAD30698.1	Protein Kinase C, alpha type [Takifugu rubripes]	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGFGKQGFQ	C	QVCCFVHKRCHEFVTFSCPGADKG...
9	Gb AAH78065.1	Protein Kinase A [Xenopus laevis]	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGFGKQGFQ	C	QVCCFVHKRCHEFVTFSCPGADKG...
10	Ref NP_957272.1	Protein Kinase C, beta [Danio rerio]	...RFFKQPTFCSHCTDFIWGFGKQGFQ	C	QVCCFVHKRCHEFVTFSCPGADKG...

Abbildung 17: Fragment eines multiplen Alignments um Aminosäureposition 66 der PRKCG einer *in-silico* Abschätzung mittels Polyphen

In den Spalten angegeben ist die jeweilige Zeilennummer (Spalte 1), die Sequenzversion der *UniProt* Datenbank (Spalte 2), das betreffende Gen sowie die zugehörigen Spezies in eckigen Klammern (Spalte 3) und das Alignment in Spalte 4. Grau hervorgehoben ist die Aminosäureposition 66.

Die detektierte Mutation betrifft eine hochkonservierte Domäne der PRKCG, es findet sich übereinstimmend bei 41 Spezies Cystein an dieser Stelle. Eine *in-silico* Abschätzung durch Polyphen klassifiziert diese Veränderung als „wahrscheinlich pathogen“. Ein Fragment eines multiplen Alignments um Aminosäureposition 66 der PRKCG ist in Abbildung 17 dargestellt.

4.7.3 Exon 3

Die molekulargenetischen Untersuchungen im Exon 3 ergaben bei 2 gepoolten Patientenproben 031619/SCA1125 sowie 040383/040808 auffällige Elutionsprofile mit insgesamt 3 Peaks. Als jeweils zugehörige suspektete Einzelproben kamen die Patientenproben 031619 und 040808 zur Darstellung (Abbildung 18). Die anschließende Sequenzierung ergab bei beiden Proben einen Basenaustausch c.207C>T der jedoch nicht in einem Aminosäureaustausch resultierte (p.C69C). Zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen an cDNA aus Leukozyten zum Nachweis oder Ausschluss einer möglichen splice-site Mutation blieben inkonklusiv.

4 Ergebnisse

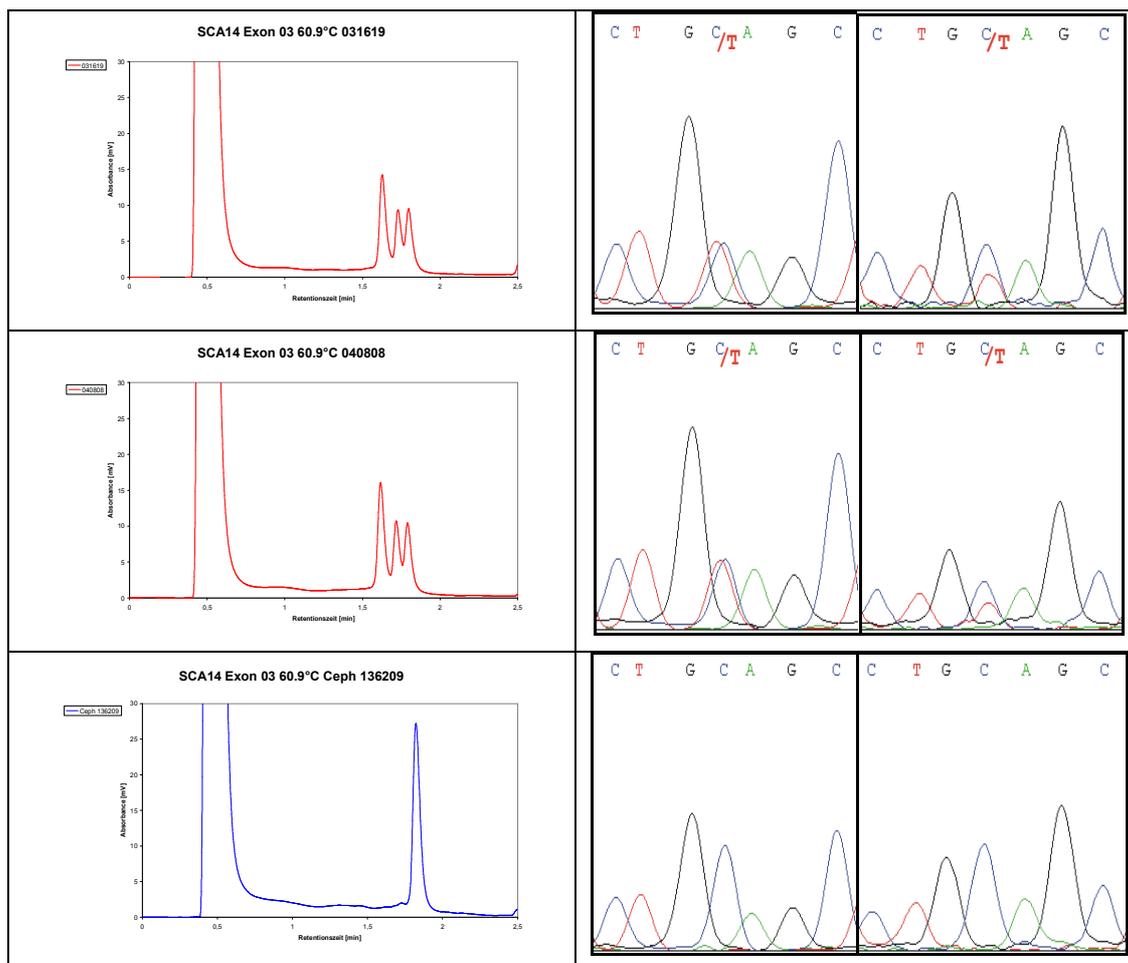


Abbildung 18: dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 3 (PRKCG) Patient 031619 und 040808, Wildprobe Ceph136209
dHPLC-Elutionsprofile links mit jeweiligem Sequenzierchromatogramm Forward und Reverse rechts

4.7.4 Exon 4

Das Mutationsscreening im Exon 4 zeigte ein auffälliges Chromatogramm bei der gepoolten Patientenprobe 021353/SCA0339. Eine Untersuchung der Einzelproben erbrachte ein auffälliges Elutionsprofil der Patientenprobe 021353 mit 2 Peaks (siehe Abbildung 19). In der Cys2-Region der PRKCG konnte durch die folgende Sequenzierung eine Mutation heterozygot nachgewiesen werden. (c. 374A>C, p. H116P), welche einen Aminosäureaustausch im Kodon 116 von Histidin nach Prolin zur Folge hat. Der betroffene Patient war bei Eintritt der Erkrankung 32 Jahre alt. Klinisch auffällig zeigte sich lediglich eine Dysarthrie bei sonst fehlenden weiteren neurologischen Symptomen. In der Schädel-MRT konnte eine zerebelläre Atrophie nachgewiesen werden.

4 Ergebnisse

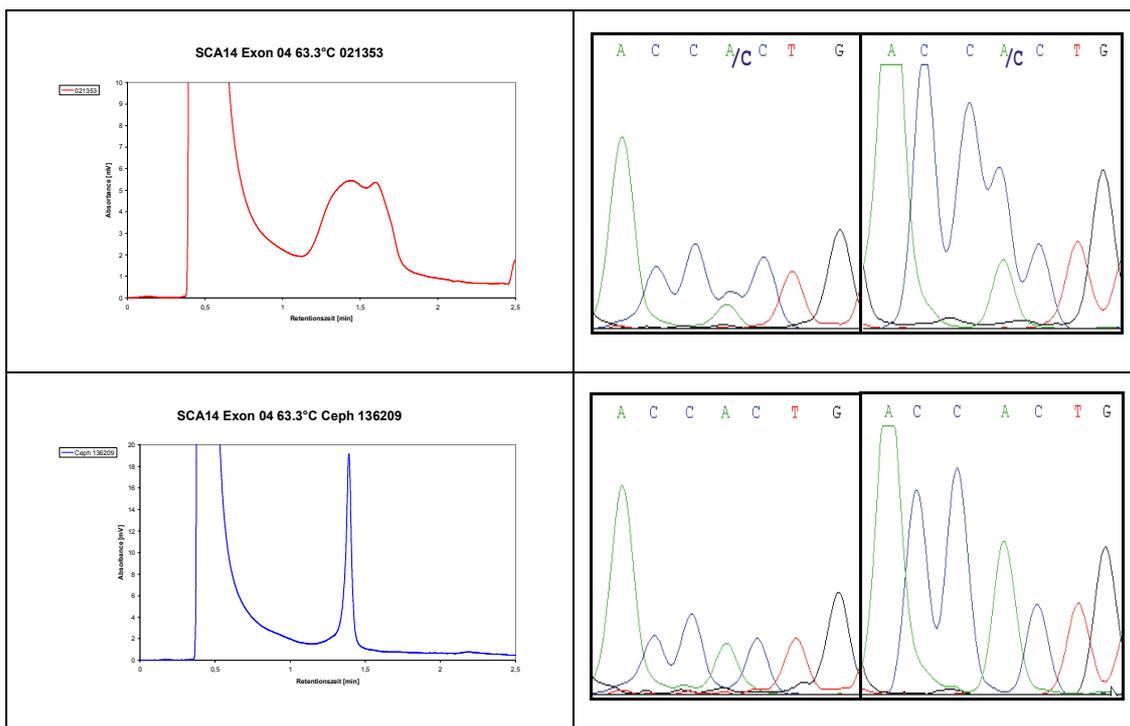


Abbildung 19: dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 4 (PRKCG) Patient 021353, Wildprobe Ceph136209

dHPLC-Elutionsprofile links mit jeweiligem Sequenzierchromatogramm Forward und Reverse rechts

Diese Veränderung betrifft eine hochkonservierte Domäne der PRKCG, es findet sich übereinstimmend bei 50 Spezies Histidin an dieser Stelle. Eine *in-silico* Abschätzung durch PolyPhen klassifiziert diese Veränderung als “wahrscheinlich pathogen” (Abbildung 20).

	Ref NP_002730.1	Protein Kinase C gamma (Homo sapiens)	.DPRNKHKFRLHSYSSPTFC	H	CGSLLYGLVHQGMKSCCEMNVHRR..
1	Gb AAI11808.1	Protein Kinase C [Mus musculus]	.DPRNKHKFRLHSYSSPTFC	H	CGSLLYGLVHQGMKSCCEMNVHRR..
2	Ref XP_001116804.1	Protein Kinase C gamma isoform 1 [Macaca mulatta]	.DEMLRRHPGKSHSTLAHTCVP	H	CKLRLPGLRHSPSPITGCEMNVHRR..
3	Ref XP_541432.2	Protein Kinase C gamma [Canis familiaris]	.DPRNKHKFRLHSYSSPTFC	H	CGSLLYGLVHQGMKSCCEMNVHRR..
4	Gb AAAX36750.1	Protein Kinase C alpha [synthetic construct]	.DPRSKHKFKIHTYGSPTFC	H	CGSLLYGLIHQGMKCDTCDMNVHQ..
5	Ref NP_001012822.1	Protein Kinase C alpha [Gallus gallus]	.DPRSKHKFKIHTYGSPTFC	H	CGSLLYGLIHQGMKCDTCDMNVHQ..
6	Ref XP_001096093.1	Protein Kinase C beta 1 isoform [Macaca mulatta]	.DPRSKHKFKIHTYSSPTFC	H	CGSLLYGLIHQGMKCDTCMNVHKR..
7	Ref NP_001072752.1	hHypothetical Protein LOC780209 [Xenopus tropicalis]	.DPRSKHKFKIHTYGSPTFC	H	CGSLLYGLIHQGMKCEMNVHVKV..
8	emb CAD30698.1	Protein Kinase C alpha [Takifugu rubripes]	.DPRSKHKFKIHTYGSPTFC	H	CGSLLYGLIHQGMKCDTYDMNVHQ..
9	Gb AAH78065.1	Protein Kinase A [Xenopus laevis]	.DPRSKHKFKIHTYGSPTFC	H	CGSLLYGLIHQGMKCEMNVHVKV..
10	Ref NP_957272.1	Protein Kinase C beta [Danio rerio]	.DPRSKHKFKVHTYSSPTFC	H	CGSLLYGLIHQGMKCDHCCMNIHKR..

Abbildung 20: Fragment eines multiplen Alignments um Aminosäureposition 116 der PRKCG einer *in-silico* Abschätzung mittels PolyPhen

In den Spalten angegeben ist die jeweilige Zeilennummer (Spalte 1), die Sequenzversion der *UniProt* Datenbank (Spalte 2), das betreffende Gen sowie die zugehörigen Spezies in eckigen Klammern (Spalte 3) und das Alignment in Spalte 4. Grau hervorgehoben ist die Aminosäureposition 116.

4.7.5 Exon 6

Mutationsanalysen der gepoolten DNA-Proben im Exon 6 der PRKCG ergaben bei insgesamt 26 der 48 Patientenproben eine Abweichung des Chromatogramms mit einer Verbreiterung und gleichzeitig deutlicher Abflachung des Elutionsprofils und mehreren weniger deutlich ausgeprägten Peaks (siehe Abbildung 21). Die Sequenzierung der jeweiligen Einzelproben erbrachte einen Basenaustausch c.576T>C jedoch ohne Austausch der jeweiligen Aminosäure (p.D189D).

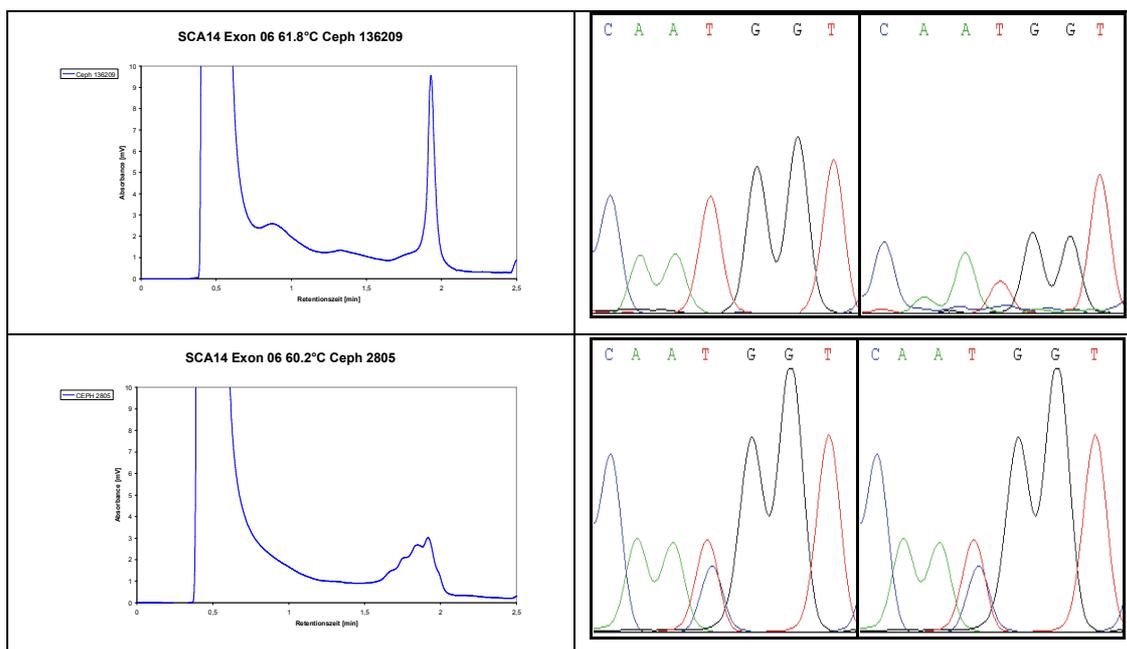


Abbildung 21: dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 6 (PRKCG) Ceph136209 und 2805

dHPLC-Elutionsprofile links mit jeweiligem Sequenzierchromatogramm Forward und Reverse rechts

4.7.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Mutationsanalysen des PRKCG-Gens (SCA14)

Als Resultat konnten durch die Mutationsanalysen mittels dHPLC im Exon 1, 2, und 4 der Protein Kinase C Gamma insgesamt 3 unterschiedliche Mutationen mit Aminosäureaustausch identifiziert werden. Dies entspricht einer Prävalenz von 6,3% in diesem Patientenkollektiv (3 von 48 Patienten). Die bislang veröffentlichten Veränderungen und die Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit detektiert werden konnten, sind zusammenfassend in Abbildung 22 dargestellt.

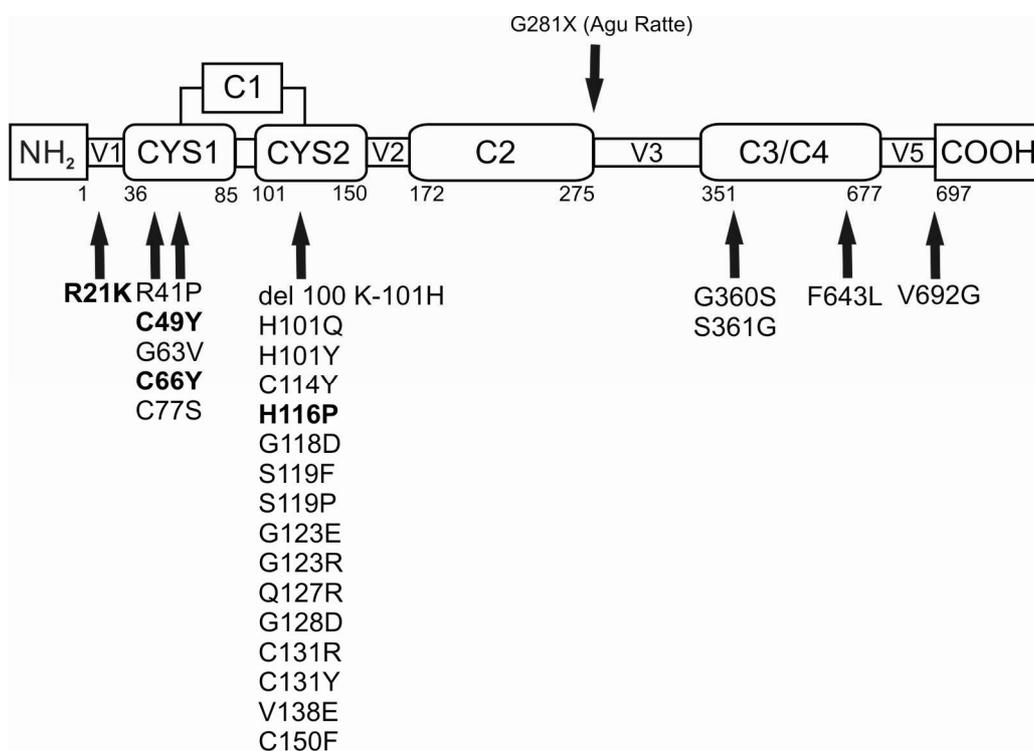


Abbildung 22: Funktionelle Domänen und Aufbau der konservierten (C1–C4) und der variablen Regionen der Protein Kinase C Gamma (PRKCG).

Die Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten sind fettgedruckt, die bislang veröffentlichten Missense-Mutationen, eine Deletion und die Mutation der Agu-Ratte sind ebenfalls mit der entsprechenden Position innerhalb der Proteinstruktur und dem Aminosäureaustausch abgebildet. Mutation C49Y wurde durch das molekulargenetische Labor der Medizinischen Genetik Tübingen im Rahmen einer späteren DNA-Analyse identifiziert.

Eine Zusammenfassung sämtlicher Ergebnisse aus dHPLC-Analyse und direkter Sequenzierung des PRKCG-Gens sowie der Vorhersagen der *in-silico* Abschätzungen mittels Polyphen sind in Tabelle 27 aufgeführt.

4 Ergebnisse

Tabelle 27: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dHPLC-Analyse und direkter Sequenzierung des PRKCG-Gens

Alle gefundenen Sequenzvariationen und ihre genotypische Verteilung im Patientenkollektiv sowie die Anzahl sequenzierter Proben eines Genotyps. Bei der Gesamtanzahl wurden nur die Patienten berücksichtigt, nicht jedoch die ebenfalls überprüften Kontrollpersonen

Mutation		Patienten			
Genomische Position	AS-Position	PolyPhen	Patienten	Kontrollen	Gesamt
Ex 01 c.62 G>A Patient 040885	p.R21K	Möglicherweise pathogen	1/48 (2,08%)	Kein Nachweis	1/48
Ex 01 c.72 C>T Patient 010208	p.A24A	-	1/48 (2,08%)	Kein Nachweis	1/48
Ex 01* c.146 G>T Patient 031014	p.C49Y	Wahrscheinlich pathogen			
Ex 02 c.197 G>A Patient 040912	p.C66Y	Wahrscheinlich pathogen	1/48 (2,08%)	Kein Nachweis	1/48
Ex 03 c.207 C>T Patient 031619 Patient 040808	p.C69C	-	2/48 (4,17%)	Kein Nachweis	2/48
Ex 04 c.374 A>C Patient 021353	p.H116P	Wahrscheinlich pathogen	1/48 (2,08%)	Kein Nachweis	1/48
Ex 06 c.567 T>C	p.D189D	-	26/48 (54,17%)	Nicht untersucht	26/48

*Mutation p. C49Y wurde durch das molekulargenetische Labor der Medizinischen Genetik Tübingen im Rahmen einer späteren DNA-Analyse identifiziert und geht nicht in die statistische Berechnung und Prävalenz ein.

Die Ergebnisse der klinischen und neurologischen Untersuchungen sowie der Bildgebung der Mutationsträger der PRKCG sind in Tabelle 28 als Übersicht aufgeführt. Das Durchschnittsalter der Mutationsträger liegt bei 42,25 Jahren. Das Eintrittsalter der Erkrankung lag zwischen 5 und 32 Jahren. Soweit durchgeführt dokumentierte die MRT des Schädels eine zerebelläre Atrophie.

4 Ergebnisse

Tabelle 28: Klinische Charakteristik der detektierten SCA14-Patienten																
Exon	Patient	Alter	AoO	MRT: ZA	DA	DE	EP	OA	SV	PEO	SP	PA	DY	CH	PNP	IN
01*	Tü031014	48	30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
01	Tü040885	15	5	keine weiteren klinischen Angaben vorhanden												
02	Tü040912	69	keine weiteren klinischen Angaben vorhanden													
04	Tü021353	37	32	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AoO	Age of Onset
MRT: ZA	MRT: Zerebelläre Atrophie
DA	Dysarthrie
DE	Demenz
EP	Epilepsie
OA	Optikusatrophie
SV	Sakkadenverlangsamung
PEO	Progressive externale Ophthalmoplegie
SP	Spastik
PA	Parkinsonsymptome
DY	Dystonien
CH	Chorea
PNP	Periphere Polyneuropathien
IN	Inkontinenz

4.8 Mutationsanalysen im FGF14- Gen (SCA27)

Nach erfolgreicher PCR der Patienten-DNA beider Platten für jedes Exon des Fibroblastenwachstumsfaktor 14 wurden ebenfalls zwei PCR-Produkte von je einer Platte in einer neuen 96-well Platte gepoolt und anschließend der Heteroduplexbildung unterzogen. Die Analyse der gepoolten PCR-Fragmente im dHPLC-Gerät erfolgte nach den Bedingungen in Tabelle 36. Insgesamt wurden 48 Patientenproben untersucht. Die Mutationsanalyse mittels dHPLC im Fibroblastenwachstumsfaktor ergab bei keinem der gescreenten Indexpatienten eine pathogene Mutation.

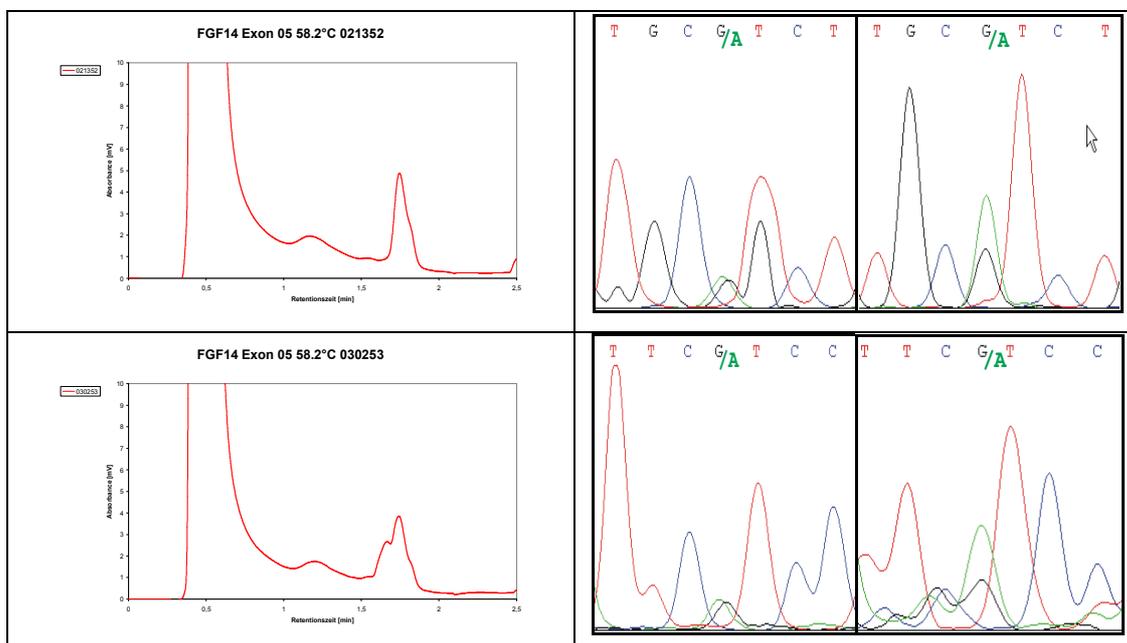
Im Institut für Medizinische Genetik des Universitätsklinikums Tübingen ist bei einer später durchgeführten molekulargenetischen Untersuchung eines 58 jährigen Indexpatienten einer Familie mit spinozerebellärer Ataxie und bestehender Ophtalmoplegie vor Abschluss dieser Arbeit eine Mutation im Exon 1a (c.124G>T, p.G42C) aufgefallen, die einen Aminosäureaustausch von Glycin nach Cystein zur Folge hat. Weitere bislang nicht untersuchte Verwandte (3

4 Ergebnisse

Geschwister) bieten eine ähnliche klinische Ausprägung. Die zerebelläre Symptomatik hatte zum Zeitpunkt der molekulargenetischen Untersuchung erst 6 Monate bestanden. Eine *in-silico* Abschätzung mittels Polyphen klassifiziert diese Veränderung als möglicherweise pathogen. Die Aminosäureposition 42 ist laut Polyphen evolutionär nicht hochkonserviert.

4.8.1 Exon 5

Das Mutationsscreening im Exon 5 des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 14 mit 2 unterschiedlichen Säulentemperaturen ergab insgesamt 3 auffällige Chromatogramme bei den gepoolten Patientproben. Eine Untersuchung der jeweiligen Einzelproben erbrachte ein auffälliges Elutionsprofil der Patientenproben 021352, 030253 sowie SCA0005. Die zyklische Sequenzierung dieser suspekten Proben ergab einen identischen Basenaustausch in der 3'untranslatierten Region des FGF14-Gens (c.775 G>A).



4 Ergebnisse

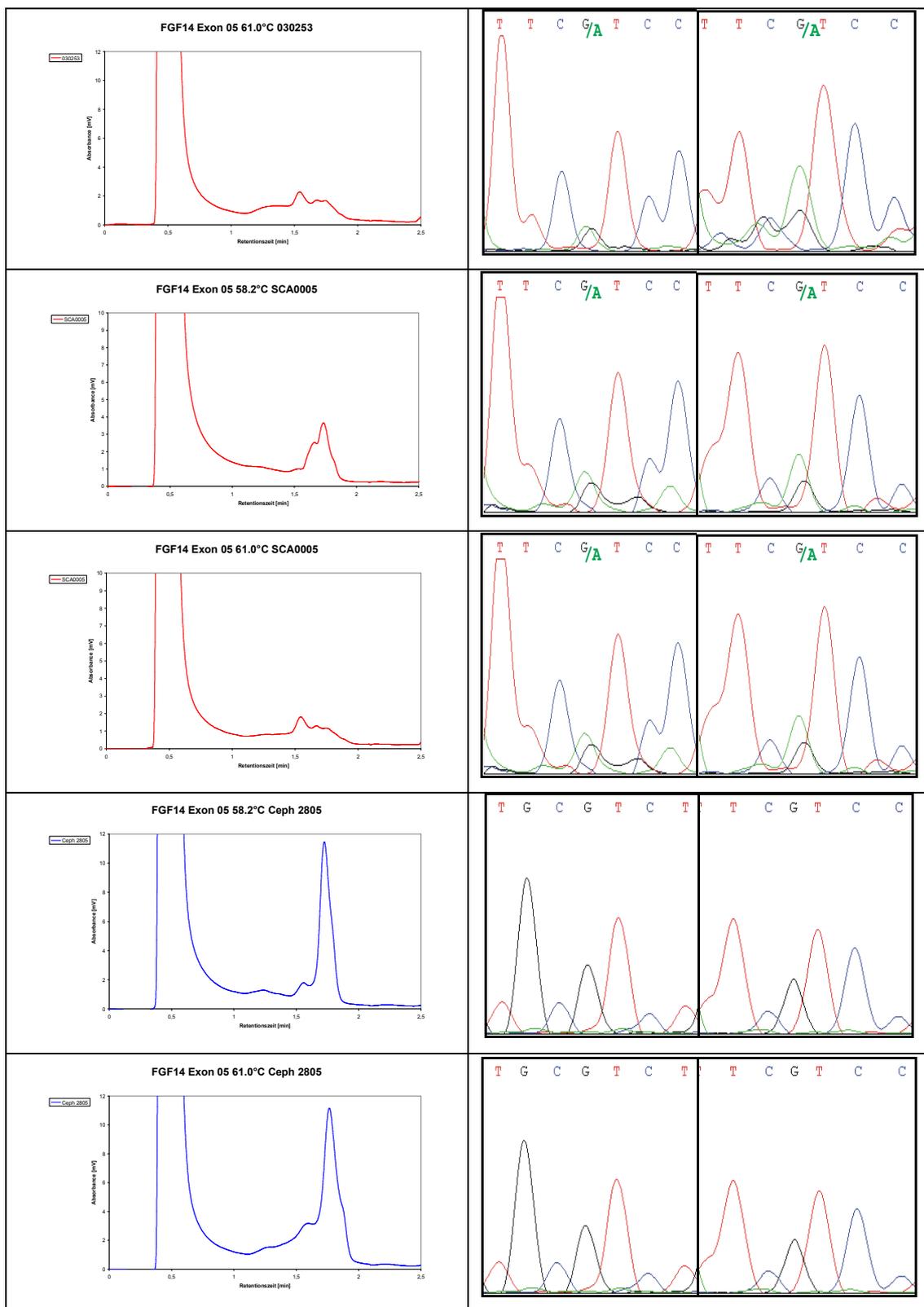


Abbildung 23: dHPLC-Elutionsprofile von Einzelproben auffälliger gepoolter Proben Exon 5 (FGF14) Patient 021352, 030253 und SCA0005, Wildprobe Ceph2805

dHPLC-Elutionsprofile links mit jeweiligem Sequenzierchromatogramm Forward und Reverse rechts

4.8.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Mutationsanalysen des FGF14-Gens

Eine Zusammenfassung sämtlicher Ergebnisse aus dHPLC-Analyse und direkter Sequenzierung des FGF14-Gens sowie der Vorhersagen der *in-silico* Abschätzungen mittels PolyPhen sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dHPLC-Analyse und direkter Sequenzierung des FGF14-Gens

Alle gefundenen Sequenzvariationen und ihre genotypische Verteilung im Patientenkollektiv sowie die Anzahl sequenzierter Proben eines Genotyps. Bei der Gesamtanzahl wurden nur die Patienten berücksichtigt, nicht jedoch die ebenfalls überprüften Kontrollpersonen

Mutation		Patienten			
Genomische Position	AS-Position	PolyPhen	Patienten	Kontrollen	Gesamt
Ex 01a* c.124G>T Patient 051209	p.G42C	Möglicherweise pathogen		Kein Nachweis	
3'UTR c.775 G>A			3/48 (6,25%)	Keine Kontrolle	3/48

*Mutation wurde durch das molekulargenetische Labor der Medizinischen Genetik Tübingen im Rahmen einer späteren DNA-Analyse identifiziert.

Die klinischen und neurologischen Untersuchungen des nachträglich detektierten Mutationsträgers des FGF14 sind bislang noch nicht hinreichend abgeschlossen. Eine kraniale Bildgebung existiert derzeit nicht. Das Alter des Patienten liegt bei 57 Jahren. Das Eintrittsalter der Erkrankung lag bei 56 Jahren.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine Mutationsanalyse des PRKCG- und des FGF14-Gens bei Indexpatienten deutscher Familien mit autosomal dominanter spinocerebellärer Ataxie (ADCA) durchgeführt. Dabei sollte molekulargenetisch geklärt werden, inwieweit die benannten Genorte eine Bedeutung für mitteleuropäische Ataxie-Patienten haben. Weiterhin stand in Frage, ob eine Untersuchung des gesamten offenen Leserahmens beider Gene erforderlich ist oder aber besonders bevorzugte Mutationsorte („*hot spots*“) gefunden werden können.

Zusätzlich sollte eine zügig durchzuführende und gleichzeitig relativ kostengünstige Screeningmethode für Mutationen des PRKCG- und des FGF14-Gens etabliert werden. Bis zum Ende dieser Studie wurde DNA von insgesamt 48 Indexpatienten mit Verdacht auf spinocerebelläre Ataxie unter Zuhilfenahme der denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie untersucht. Bei suspekten Chromatogrammen wurde daran anschließend eine Sequenzierung durchgeführt um mögliche Mutationen zu beweisen oder auszuschließen.

5.1 Diskussion der denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dHPLC)

Die denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dHPLC) bietet die Möglichkeit, schnell und im großen Maßstab bekannte und unbekannte Mutationen detektieren zu können. Die Sensitivität und Spezifität der dHPLC übertrifft 96% [O'Donovan et al. 1998; Arnold et al. 1999; Gross et al. 1999; Xiao & Oefner 2001] und bietet damit einen deutlichen Vorteil gegenüber anderen Detektionsmethoden wie SSCA (single nucleotide conformation analysis), SCGE (conformation-sensitive gradient gel electrophoresis), TDGS (two-dimensional gene scanning). Beispiele für vergleichende Untersuchungen zur

Mutationsdetektion mittels verschiedener Verfahren finden sich bei Liu et al. 1997-98; Jones et al. 1999 und Gross et al. 1999.

Autoren	Gen	Patienten	Alternative Methode	dHPLC
Bennett et al. 2001	DMD	8	65% (PCR)	92%
Klein et al. 2001	VHL	79	Sequenzierung	67% ¹ / 93% ²
Colosimo et a. 2002	Hämoglobin	70	Sequenzierung	100%
Orlow et al. 2001	INK 4A	142	Sequenzierung	100%
Bunn et al. 2002	LDLR	35	64% (SSCP)	100%
Eng et al. 2001 Multi Center Studie	BRCA I	52	72% (SSCP), 76% (CSGE), 91% (TDGS)	100%

Abkürzungen: DMD: Duchenne Muscle Dystrophy Gene, VHL: von-Hippel-Lindau Tumorsuppressor Gen, INK 4A: Tumorsuppressor Gen, LDLR: Low Density Lipid Receptor, BRCA: Breast Cancer Gene, SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism, CSGE: Conformation Sensitive Gel Electrophoresis, TDGS: Two Dimensional Gene Scanning, ¹: Varian Helix System, ²: Wave Transgenomic

Auf Grund dieser Genauigkeit, der Automatisierbarkeit und der im Vergleich zu Sequenzierung oder Resequenzierung mit Hilfe von DNA-Chips geringen Kosten [Wagner et al. 1999] erweist sich das Verfahren der dHPLC insgesamt als sehr geeignet, um Sequenzvariationen wie Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), krankheitsverursachende Mutationen oder kleine Insertionen sowie Deletionen aufzuspüren. Das erste Kandidatengen, das mit Hilfe der dHPLC analysiert wurde, war das Gen für einen Calciumkanal (*CACNA1A*) bei Patienten mit familiärer halbseitiger Migräne (FHM) und episodischer Ataxie Typ 2 (EA2). Die Untersuchung ergab vier missense-Mutationen im Fall der FHM bzw. zwei nonsense-Mutationen bei EA2 [Ophoff et al. 1996]. Seitdem wurde eine Reihe von Genen analysiert, die für eine Vielzahl von Krankheiten verantwortlich gemacht werden, darunter tumorassoziierte Gene wie *BRCA1*, *BRCA2* (Breast Cancer Gene), *ATM* und *p53* (Tumorsuppressorgene), des weiteren *UBE3A* bei Patienten mit Angelman-Syndrom, *CFTR* bei Zystischer Fibrose und *F8C* (Faktor VIII) bei Hämophilie A. Einen umfassenderen Überblick über bereits untersuchte Gene und die entsprechenden Referenzen liefern Xiao & Oefner, 2001.

Auch für die Mutationsanalyse des *PRKCG*- und des *FGF14*-Gens wurde auf Grund der aufgeführten Vorteile die dHPLC zum Screening ausgewählt.

Probleme können jedoch bei relativ langen Amplifikaten und Abschnitten mit unterschiedlich hohem GC-Anteil auftreten, da hierbei abweichende Säulentemperaturen für verschiedene Abschnitte des Amplifikats nötig werden können, damit in den diversen Bereichen vorhandene Mutationen nicht übersehen werden. Notwendig waren unterschiedliche Temperaturen im PRKCG-Gen bei Exon 3, 8, 10, 11, 12/13, 14, 16 und 18. Die Regionen erhöhten Interesses und dem häufigsten Auftreten von Mutationen konnten jedoch mit einer einzigen Ofentemperatur abgedeckt werden (Exon 1, 2 und insbesondere 4). Unterschiedliche Temperaturen waren auch im FGF14-Gen bei Exon 1a, 1b, 2 und 5 notwendig. Pathogene Mutationen des FGF14-Gens lagen bislang aber lediglich im Exon 4 [van Swieten et al. 2003, Dalski et al. 2005].

5.2 Diskussion Spinozerebelläre Ataxie 14 (PRKCG)

Eine SCA14 wurde bislang bei 25 untereinander unverwandten englisch-niederländischen, holländischen, japanischen, australischen, französischen und deutschen Familien bzw. einzelnen Patienten beschrieben [Chen et al. 2003, van de Warrenburg et al. 2003, Yabe et al. 2003, Stevanin et al. 2004, Alonso et al. 2005, Chen et al. 2005, Fahey et al. 2005, Klebe et al. 2005, Verbeek et al. 2005, Dalski et al. 2006, Hiramoto et al. 2006, Morita et al. 2006, Vlak et al. 2006, Klebe et al. 2007, Nolte et al. 2007, Wieczorek et al. 2007], insgesamt fünfzehn Mutationen davon akkumulieren in Exon 04 der PRKCG. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 48 deutsche Familien (mit Ausnahme einer portugiesischen Familie) mit bislang molekulargenetisch nicht zuzuordnender autosomal-dominant vererbter spinozerebellärer Ataxie auf mögliche Mutationen hin im PRKCG-Gen gescreent. Bei diesen Indexpatienten wurden bereits im Vorfeld häufig vorkommende SCA-Formen wie SCA 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 und 17 ausgeschlossen. Davon konnte bei drei Indexpatienten eine mutmaßlich pathogene Mutation nachgewiesen werden, so dass bei insgesamt 3 von 48 gescreenten Patienten eine pathogene Mutation der PRKCG vorliegt, das entspricht 6,3%. Im Institut für Medizinische Genetik des Universitätsklinikums Tübingen ist in einer molekulargenetischen Routineuntersuchung vor Abschluss

dieser Arbeit zusätzlich bei einer Familie mit spinozerebellärer Ataxie eine weitere bislang nicht beschriebene Mutation im Exon 1 detektiert worden. Die Häufigkeit einer Detektion in Relation zu den untersuchten SCA-Indexpatienten lag damit etwas niedriger als die zuvor von Chen et al. 2003 berichteten 7,5% (3/40) und deutlich höher als bei Arbeitsgruppen, die sich nur auf einzelne exonische Abschnitte beschränkten. Im Unterschied zu den meisten bislang vorliegenden Arbeiten untersuchten wir alle 18 Exone des PRKCG-Gens auf mögliche Mutationen hin. In der Literatur bilden Chen et al. 2003 sowie Nolte et al. 2007 eine Ausnahme, sie screeneten bzw. sequenzierten ebenfalls im gesamten in Frage kommenden Genbereich. Bei allen anderen Studien wurden teilweise nur als „hot spot“ in Frage kommende exonische Abschnitte auf Mutationen hin untersucht. Alonso et al. 2005 (1/366 Indexpatienten), Morita et al. 2006 (1/148 Indexpatienten) und Hiramoto et al. 2006 (2/882 Indexpatienten) untersuchten lediglich Exon 04. Mutationen mit Aminosäureaustausch konnten aber bislang in Exon 1, 2, 3, 4, 5, 10 und 18 gefunden werden, so dass in einigen Fällen bei zu starker Vorselektion Mutationen bislang möglicherweise unentdeckt geblieben sein könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier neue bis dato nicht beschriebene Mutationen in Exon 1, 2 und 4 identifiziert werden. Keine dieser Mutationen konnte bei einer großen Anzahl von Kontrollchromosomen (>200) entdeckt werden. Damit befinden sich gegenwärtig 16 von 29 Mutationen in Exon 4 (55,2%) und 24 von 29 Mutationen in der C1-Region der PRKCG (82,8%). Insgesamt fünf der gefundenen Mutationen liegen in der Cys1-Region (17,2%), 18 der Mutationen liegen in der Cys2-Region (62,1%). In den variablen Regionen V1 und V5 lag jeweils eine der gefundenen Mutation (2/29 oder 6,9%), in der C3/4-Region insgesamt 4 von 29 Mutationen (13,8%). Bei genereller Selektion im Exon 4 wären somit 13 Mutationen (44,8%) der PRKCG, bei einer Selektion auf die C1 Region wären 5 Mutationen bzw. 17,2% unentdeckt geblieben, sodass an Hand dieser Datenlage insgesamt ein Screening des gesamten offenen Leserahmens der PRKCG zu empfehlen ist.

Ein Basenaustausch in Exon 3 (D95D), der in dieser Arbeit bei 2 Familien sowie Angehörigen entdeckt wurde und bereits zuvor bei 2 algerischen ADCA-Familien beschrieben wurde, konnte jedoch bei 18 Chromosomen von 70 nordafrikanischen Kontrollproben [Chen et al. 2005, Klebe et al. 2005] ebenfalls nachgewiesen werden, so dass diese Variante wahrscheinlich eher einem Polymorphismus als einer splice-site Mutation zu entsprechen scheint. Zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen an cDNA aus Leukozyten blieben inkonklusiv, weil offenbar keine Expression in Leukozyten stattfindet. Somit war diese seltene Variante für uns nicht weiter untersuchbar. Die detektierten Veränderung in Exon 1 c.72 C>T, p.A24A und Exon 6 c.567 T>C, p.D189D entsprechen vorbekannten Polymorphismen (rs2547362, rs3745406), die nach gegenwärtigem Kenntnisstand keine phänotypischen Auswirkungen haben.

Die Protein Kinase C Gamma ist eine Serin/Threonin-Kinase die eine zentrale Rolle bei der Signalübermittlung, dem Zellwachstum und der synaptischen Reizübertragung spielt. Es wird eine Rolle bei der zerebellären Plastizität und als negativer Regulator des dendritischen Wachstums angenommen [Metzger et Kapfhammer 2003]. Bemerkenswerte Anhaltspunkte für die Beteiligung eines mutierten PRKCG-Gens an ataktischen Bewegungserkrankungen kommen aus dem Tiermodell, welches die Entwicklung von abnormalem Gang und mangelnder Koordinationsfähigkeit bei Knockout-Mäusen zeigt [Abeliovich et al. 1993, Chen et al 1995], extrapyramidale Syndrome bei der AGU-Ratte [Craig et al. 2001] und die Downregulation der Protein Kinase C Gamma bei einem Mausmodell der SCA1 [Skinner et al. 2001].

Die Aminosäuresequenz der Protein Kinase C gamma ist hochkonserviert bei den Mitgliedern der Protein Kinase Familie und bei Orthologen der Protein Kinase C Gamma bei entfernt verwandten Spezies. Bis auf die Mutation R21K, die sich in der variablen Region V1 befindet, lagen die in dieser Arbeit gefundenen Mutationen in den konservierten Regionen von C1. Dies deutet den erheblichen Einfluss an, den das mutierte Genprodukt auf die zerebelläre Degeneration hat. Die Mutation im Exon 4 (H116P) ist in der cysteinreichen

Region Cys 2 der regulatorischen Domäne lokalisiert. Es kann vermutet werden, dass alle Mutationen in dieser Region zwischen Aminosäure 101 und 150 denselben pathologischen Effekt haben [van de Warrenburg et al. 2003, Yabe et al. 2003]. Die Cys2-Region enthält die Diacylglycerol- (DAG) und Phorbol ester-Binding-Site. DAG und Phorbol ester sind notwendig für die Aktivierung und Rekrutierung der PRKCG an der Membran, was die Affinität zur Membran [Nishizuka Y 1992, Hug et Sarre 1993] und die katalytische Effizienz steigert [Newton 1995]. In vitro Experimente zeigten, dass etliche Missensemutationen die Aktivität und Membranaffinität des Enzyms steigern und sich zytoplasmatische Aggregate bilden [Verbeek et al. 2005, Seki et al. 2005]. Vier weitere Mutationen (G360S, S361G, F643L, V692G) sind in der katalytischen Domäne des Enzyms lokalisiert. Der Aminosäureaustausch in Exon 10 (G360S) liegt in der C3-Region der katalytischen Domäne, innerhalb der ATP-bindenden Region der PRKCG und könnte mit der ATP-Bindung interferieren.

Der Phänotyp der SCA14 zeigt eine milde, sehr langsam voranschreitende zerebelläre Ataxie. Im Vergleich mit anderen SCAs, die durch Polyglutaminexpansionen verursacht werden, zeigen die Symptome auch bei Erkrankungsdauern von mehr als 40 Jahren eine deutlich langsamere Progredienz, wobei die Ataxie selbst insgesamt sehr mild und auch ohne Auftreten von Dysarthrien verlaufen kann. Der Erkrankungsbeginn selbst ist äußerst variabel und reicht in unserer Untersuchung zwischen dem 5. und dem 50. Lebensjahr. Diese Daten decken sich mit den Erkenntnissen anderer Studien, die zeigten, dass die hohe Varianz des Erkrankungsalters ein charakteristisches klinisches Merkmal darzustellen scheint. Ein früher Erkrankungsbeginn korreliert nicht zwingend mit einem schwereren Verlauf. Vergleichbar den Polyglutamin-SCAs ist der Schweregrad der Kleinhirnatrophie äußerst variabel. Eine diesbezügliche Aussage kann in dieser Serie jedoch auf Grund fehlender neurologischer, neuropathologischer oder apparativer Untersuchungen nicht getroffen werden. Die Existenz von symptomlosen Trägern einer Mutation bzw. betroffenen Verwandten untermauert die Vorstellung, dass die klinische Manifestation von SCA14 auch durch andere genetische Einflüsse oder Umweltfaktoren beeinflusst werden könnte. Obwohl verschiedene Mutationsorte gefunden wurden, die eine

SCA14 bedingen, ist es durchaus möglich, dass ein gemeinsamer multifaktorieller Mechanismus zu Grunde liegt, der eine zerebelläre Degeneration bzw. letztlich eine Ataxie verursacht.

5.2.1 Mutationen im Exon 1

Bei Patient 040885 wurde im Exon 1 des PRKCG(SCA14)-Gens eine bisher nicht beschriebene Mutation heterozygot nachgewiesen (c.62 G>A, p.R21K). Sie bewirkt einen Aminosäureaustausch von der basischen Aminosäure Arginin nach Lysin (ebenfalls basisch). Diese Mutation ist die bislang erste, die in der variablen Region (V1) der PRKCG detektiert wurde. Mehrere Ergebnisse sind jedoch mit einer ursächlich pathologischen Mutation vereinbar: Die Veränderung betrifft einerseits eine hochkonservierte Domäne der PRKCG und es findet sich übereinstimmend bei 36 Spezies Arginin an dieser Stelle. Eine *in-silico* Abschätzung durch „Polyphen“ klassifiziert diese Veränderung als „möglicherweise pathogen“. Darüber hinaus konnte diese Mutation bei Kontrollchromosomen ausgeschlossen werden. Bemerkenswert ist, dass eine vor der regulatorischen Subdomäne C1 der PRKCG gelegene Pseudosubstratsequenz (Aminosäureposition 19 bis 31) vermutlich das aktive Zentrum der katalytischen Domäne im Ruhezustand im Sinne einer Autoinhibition blockiert. Anstelle eines phosphorylierbaren Serinrestes ist hier ein Alaninrest vorhanden [Newton, 1997]. Nach der Bindung an Diacylglycerin oder Phorbolster werden Konformationsänderungen in der C1-Region angenommen, die das Pseudosubstrat von der aktiven Seite freigeben und damit den enzymatischen Zugriff auf Substrate erlauben [Srinivasan et al. 1996; Owens et al. 1998]. Eine SCA-Mutationen sowie eine Exposition mit DAG- oder Phorbolestern kann eine Änderung der Proteinkonformation innerhalb der n-terminalen-regulatorischen Domäne durch Unterbrechung einer Interaktion zwischen der C1 und C2 Domäne der PRKCG bewirken. Hierbei werden zukünftig weitere Strukturanalysen notwendig werden.

Der zum Zeitpunkt der Untersuchung 15 jährige Patient bemerkte schon im Alter von fünf Jahren erste Krankheitssymptome. Weitergehende neurologische

Untersuchungen und eine Bildgebung des Schädels waren aber bislang noch nicht erfolgt, so dass exakte klinische Daten derzeit nicht vorliegen. Sehr auffällig ist aber das sehr frühe Eintrittsalter der Erkrankung. Weitere symptomatische Familienangehörige zur Segregationsanalyse sind nicht bekannt.

Im Rahmen einer später durchgeführten DNA-Analyse bei einem neuen Indexpatienten mit Verdacht auf eine spinocerebelläre Ataxie gelang der Nachweis einer weiteren pathologischen heterozygoten SCA14-Mutation im Exon 1 (c.146G>A, p.C49Y). PCR-Amplifikate von Exon 1 bis 18 wurden direkt sequenziert (Beckman Coulter CEQ8000) und mit den Wildtypproben verglichen. Hierbei erfolgte durch Austausch einer Base G nach A im Kodon 49 eine Substituierung der Aminosäure Cystein durch Tyrosin. Diese Veränderung betrifft ebenfalls die hochkonservierte Domäne C1 der PRKCG (Cys1), es findet sich übereinstimmend bei 39 Spezies ein Cystein an dieser Stelle. Eine *in-silico* Abschätzung durch PolyPhen klassifiziert diese Veränderung als „wahrscheinlich pathogen“. Bei dieser Mutation könnte ebenfalls eine Konformationsänderung der C1-Subdomäne zu einer herabgesetzten Wirkung des Pseudosubstrates auf die regulatorische Domäne und damit zu einer Veränderung der PRKCG-Kinaseaktivität führen.

In der Literatur ist von Chen et al. 2005 bislang eine Mutation im Exon 1 in der Cys 1 Region (c.122G>C, p.R41P) beschrieben worden. Mutationsträger litten unter einer Gangataxie, einer Dysarthrie sowie einer MR-tomographisch gesicherten zerebellären Atrophie. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei 46 Jahren (29-58).

5.2.2 Mutationen im Exon 2

Bei Patient 040912 wurde im Exon 2 des PRKCG(SCA14)-Gens eine bisher nicht beschriebene Mutation heterozygot nachgewiesen (c.197G>A, p.C66Y). Diese bewirkt einen Aminosäureaustausch im Kodon 66 von Cystein nach Tyrosin.

Die Mutation p.C66Y ist bislang die insgesamt zweite im Exon 2 detektierte Mutation. Nolte et al. beschrieben 2007 eine drei Generationen umfassende deutsche Familie (c.188G>T, p.G63V) mit langsam progredienter Gangataxie, Dysarthrie sowie einem Nystagmus. Über den Pathomechanismus und die physiologischen Auswirkungen der Mutation kann nur spekuliert werden. Es wird eine Aminosäure mit polarer, ungeladener Seitenkette gegen eine Aminosäure mit aromatischer Seitenkette ausgetauscht. Infolge der Polarität ihrer Seitenketten ist Cystein hydrophiler als Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten. Cystein kann jedoch auch mit anderen Cysteinmolekülen unpolare Disulfidbrücken bilden (S-S). Damit bedingt möglicherweise ein Austausch der Aminosäure Cystein nach Tyrosin eine Konformitätsänderung der Sekundär- oder gar Tertiärstruktur was wiederum zu einer Veränderung oder zum Verlust der enzymatischen Funktion der PRKCG führen kann. Die Mutation betrifft eine hochkonservierte Domäne der PRKCG, es findet sich übereinstimmend bei 41 Spezies Cystein an dieser Stelle. Eine *in-silico* Abschätzung durch Polyphen klassifiziert diese Veränderung als „wahrscheinlich pathogen“.

5.2.3 Mutationen im Exon 4

In der Cys2-Region der PRKCG im Bereich des Hotspots Exon 4 konnte eine weitere bislang noch nicht beschriebene Mutation heterozygot nachgewiesen werden (c.374A>C, p.H116P), welche einen Aminosäureaustausch im Kodon 116 von Histidin nach Prolin zur Folge hat. Diese Veränderung betrifft gleichfalls eine hochkonservierte Domäne der PRKCG, es findet sich übereinstimmend bei 50 Spezies Histidin an dieser Stelle. Eine *in-silico* Abschätzung durch Polyphen klassifiziert diese Veränderung als „wahrscheinlich pathogen“. Bemerkenswert ist, dass sich der Großteil der bis dato gefundenen Mutationen in der C1 Domäne befindet, die Diacylglycerol bindet und für die Translokation und Regulation der PRKCG-Aktivität notwendig ist. Die Mutation im Exon 4 (H116P) ist in der cysteinreichen Region Cys 2 der regulatorischen Domäne lokalisiert. Es kann vermutet werden, dass alle Mutationen in dieser Region zwischen Aminosäure 101 und 150 denselben pathologischen Effekt haben [van de Warrenburg et al.

2003, Yabe et al. 2003]. Die Cys2-Region enthält die Diacylglycerol (DAG)- und Phorbol ester Binding-Site. DAG und Phorbol ester sind notwendig für die Aktivierung und Rekrutierung der PRKCG an der Membran, was die Affinität zur Membran [Nishizuka Y 1992, Hug et Sarre 1993] und die katalytische Effizienz steigert [Newton 1995]. In vitro Experimente zeigten, dass etliche Missensemutationen die Aktivität und Membranaffinität des Enzyms steigern und sich zytoplasmatische Aggregate bilden [Verbeek et al. 2005, Seki et al. 2005]. Um die Auswirkungen und den Pathomechanismus, den solche Mutationen bewirken, noch näher zu betrachten, wurden die veränderten enzymatischen Eigenschaften durch Adachi et al. 2008 weitergehend untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Wildtyp der PRKCG, nicht jedoch die mutanten Proteine der C1-Domäne, den Ca^{2+} -Einstrom als Antwort auf eine Muscarinrezeptor-Stimulation hemmt. Ein dadurch prolongierter Ca^{2+} -Einstrom bei der Bindung mit dem Muskarinrezeptor verursacht eine verlängerte Lokalisation der mutierten PRKCG an der Membran. Pharmakologische Untersuchungen ergaben, dass TRPC-Kanäle (canonical transient receptor potential) verantwortlich für den Ca^{2+} -Einstrom sind und durch die PRKCG reguliert werden. Obwohl in vitro Kinaseassays deutlich machten, dass die meisten Mutanten im Grunde genommen aktive Proteine sind, vermochten sie in vivo jedoch nicht die TRPC3-Kanäle zu phosphorylieren. Untersuchungen auf molekularer Ebene durch die totale interne Reflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM) ergaben, dass die Membranaufenthaltszeit der mutierten PRKCG erheblich kürzer als die der Wildtypen war. Diese Tatsache erklärt, dass, obwohl die Assoziation zur Membran bei Mutanten offenbar verlängert ist, die veränderte PRKCG eine reduzierte Fähigkeit hat Diacylglycerol zu binden und an der Plasmamembran verbleibt. Demzufolge werden als Folge des fortgesetzten Ca^{2+} -Einstroms TRPC-Kanäle nicht phosphoryliert. Eine derartige Änderung der Ca^{2+} -Homöostase und der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion in Purkinjezellen vermag möglicherweise zu den beobachtbaren neurodegenerativen Veränderungen und zum Phänotyp der SCA14 beitragen [Adachi et al. 2008].

Durch Verbeek et al. 2008 wurden die Auswirkungen von 3 Mutationen der regulatorischen Subdomäne C1b der PRKCG auf die intrazelluläre Kinetik, die

Proteinkonformation und die Aktivität der Kinase bei vitalen Zellen untersucht. Die Proteine der mutanten PRKCG zeigten eine verstärkte Phorbolster-induzierte Kinetik im Vergleich zu den Wildtypen. Die Mutationen führten zu einer Abnahme des intramolekularen FRET (Fluorescence resonance energy transfer) der PRKCG, hindeutend auf eine Öffnung der Proteinkonformation, was resultierend zu einer Demaskierung der Phorbolsterbindungsstelle der C1-Domäne führt. Interessanterweise zeigte die mutante Form der PRKCG eine reduzierte Kinase-Aktivität, gemessen an Hand der Phosphorylierung des Protein-Kinase-C-Reporters MyrPalm-CKAR sowie nachgeschalteten Komponenten des mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK)-Signalweges. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse erkennen, dass SCA14-Mutationen der C1B-Subdomäne Cys2 die Proteinkonformation der PRKCG „öffnen“ und zu einer Steigerung der Zugänglichkeit der C1-Domäne führen, aber zu einer ineffektiven Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege beitragen.

5.3 Diskussion Spinozerebelläre Ataxie 27 (FGF14)

Molekulargenetische Analysen im FGF14-Gen ergaben bislang zwei verschiedene Mutationen und mehrere Polymorphismen. Van Swieten et al. 2003 konnten bei insgesamt 14 Mitgliedern einer Familie einen Basenaustausch im Exon 4 identifizieren (c.434C>T), der einen Aminosäureaustausch von Phenylalanin nach Serin an Position 145 (p.F145S) zur Folge hatte. Dalski et al. 2005 detektierten sechs unterschiedliche DNA-Variationen bei 22 von 416 Proben (Patienten und Kontrollproben). Zwei der sechs Variationen hatten einen Aminosäureaustausch zur Folge. Dalski et al. konnten bei einem von 208 (0,04%) bislang keiner Ataxie zuzuordnenden Ataxiepatienten eine Deletion in Exon 4 detektieren (c.487delA), welche zu einer Verschiebung des Leserasters (p.D163fsX12) führte. Neben 3 Polymorphismen im Exon 1a, 4 sowie 5 konnte eine Mutation im Exon 1a (c.124G>T) dargestellt werden, die einen Aminosäureaustausch an Position 42 (p.G42C) zur Folge hatte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 48 deutsche Familien (mit Ausnahme einer portugiesischen Familie) mit bislang ungeklärter spinozerebellärer Ataxie auf mögliche Mutationen hin im gesamten Leseraster des FGF14-Gen gescreent. Bei diesen Indexpatienten wurden ebenfalls im Vorfeld häufig vorkommende SCA-Formen wie SCA 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 und 17 ausgeschlossen. Es konnte jedoch bei keinem der Indexpatienten eine pathogene Mutation nachgewiesen werden.

Im Institut für Medizinische Genetik des Universitätsklinikums Tübingen ist bei einer später durchgeführten molekulargenetischen Untersuchung eines 58-jährigen Indexpatienten einer Familie mit spinozerebellärer Ataxie und bestehender Ophthalmoplegie vor Abschluss dieser Arbeit ebenfalls die Mutation im Exon 1a (c.124G>T, p.G42C) aufgefallen, die einen Aminosäureaustausch von Glycin nach Cystein zur Folge hat. Weitere bislang neurologisch nicht untersuchte Verwandte (3 Geschwister) bieten eine ähnliche klinische Ausprägung. Die zerebelläre Symptomatik hatte zum Zeitpunkt der Untersuchung erst 6 Monate bestanden. Eine *in-silico* Abschätzung mittels Polyphen klassifiziert diese Veränderung als möglicherweise pathogen. Die Aminosäureposition 42 ist evolutionär nicht hochkonserviert, jedoch könnte durch den markanten Austausch eine erhebliche Funktionsbeeinträchtigung des FGF14 entstehen. Alle bisher

untersuchten Kontrollchromosomen (>200) waren an Position c.124 Wildtyp „G“. Bis zum Beweis der Pathogenität mittels molekulargenetischer Familienuntersuchungen oder funktionellen Studien gilt die Veränderung als unklassifizierte Variante. Bemerkenswerterweise fanden Dalski et al. 2005 bei der Analyse der c.124G>T Mutation bei einer Familie mit betroffenen Zwillingen diese genetische Veränderung auch bei einem gesunden Erwachsenen und nur bei einem der betroffenen Zwillinge, so dass der vorhergesagte Aminosäureaustausch bei Position 42 möglicherweise nur einen seltenen Proteinpolyorphismus darstellt.

Gegenwärtig liegen 3 von 3 (100%) der pathogenen Mutationen im Exon 4 des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 14. Insgesamt kann an Hand der nur wenigen bekannten Fälle keine hinreichende Aussage bezüglich einer Selektion innerhalb des offenen Leserahmens gemacht werden. Derzeit ist ein Mutationsscreening im gesamten Leserahmen des FGF14-Gens zu empfehlen.

Um die Funktion des Fibroblasten-Wachstumsfaktor 14 (FGF14) auf die ZNS-Entwicklung weitergehend untersuchen zu können [Wang et al. 2002], wurden Mäuse mit fehlerhaftem FGF14 (FGF14-defiziente Mäuse) generiert, die an Stelle des normalen FGF14 ein Protein exprimierten, welches zusätzlich zur Proteinstruktur des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 14 eine β -Galaktosidase gekoppelt hatte (FGF14N-beta-gal). Die FGF14 defizienten Mäuse waren lebensfähig, fruchtbar und anatomisch unauffällig, entwickelten aber eine Ataxie und paroxysmale hyperkinetische Bewegungsstörungen. Es wurde festgestellt, dass die bei den veränderten Mäusen beobachtbaren motorischen Defizite mit Funktionsstörungen im Basalgangliensystem und im Zerebellum zusammenhängen und menschlichen Dystonien ähneln. Unter Einbeziehung neuropharmakologischer Studien von Wang et al. 2000 konnte gezeigt werden, dass die FGF14-defizienten Mäuse verringert auf Dopaminagonisten ansprechen. Damit ist für FGF14 eine Funktion bei der neuronalen Signalübermittlung, der axonalen Reizüberleitung sowie bei synaptischen Funktionen anzunehmen. Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 14 (FGF14) gehört

zur intrazellulären FGF Unterfamilie der FGF-Proteine (iFGFs), welcher selbst nicht sezerniert wird und keine Tyrosin-Kinase-Rezeptoren aktiviert. Von Laezza et al. wurde 2007 dargestellt, dass die iFGF mit den porenbildenden (α) Untereinheiten der spannungsgesteuerten Na^+ -Kanäle (Na_v) interagieren. Die neurologischen Phänotypen, die bei $\text{FGF14}^{-/-}$ -Mäusen beobachtet werden konnten, sowie die Identifizierung einer Missense-Mutation im FGF14-Gen (F145S) einer niederländischen Familie (van Swieten et al. 2003) mit kognitiven Beeinträchtigungen deuten auf eine Verbindung zwischen dem FGF14 und neuronalen Funktionen hin. Laezza et al. fanden heraus, dass die Expression von $\text{FGF14}^{\text{F145S}}$ die Expression der $\text{Na}_v(\alpha)$ Untereinheit im Axonhügel (Colliculus axonis) reduziert, die Na_v -Kanalströme vermindert und die Erregbarkeit von Neuronen im Hippocampus herabsetzt. Darüber hinaus und im Gegensatz zum Wildtyp-FGF14 interagiert $\text{FGF14}^{\text{F145S}}$ nicht unmittelbar mit den Na_v -Kanaluntereinheiten. Vielmehr assoziiert der veränderte $\text{FGF14}^{\text{F145S}}$ mit dem Wildtyp-FGF14 und unterbricht respektive stört die Interaktion zwischen dem Wildtyp-FGF14 und der Na_v -Untereinheit, was darauf hindeutet, dass mutierte $\text{FGF14}^{\text{F145S}}$ -Proteine eine dominant negative Rolle einnehmen, die Wechselwirkung zwischen dem Wildtyp des FGF14 und der Na_v -Kanal-Untereinheit störend beeinflussen und damit insgesamt zu einer Änderung der neuronalen Erregbarkeit führen.

5.4 Schlussfolgerungen

Es wurde eine schnell und zuverlässig durchzuführende Screening-Methode zum relativ kostengünstigen Nachweis von Mutationen im PRKCG- und FGF14-Gen etabliert. Es kam hierbei die denaturierende Hochdruck-flüssigkeitschromatographie (dHPLC) zum Einsatz. Nach Optimierung und Validierung des Verfahrens mit Referenz-DNA (Ceph-DNA) wurden damit insgesamt 48 Indexpatienten mit bislang nicht identifizierter autosomal-dominant vererbter spinocerebellärer Ataxie (ADCA) untersucht, bei denen häufig vorkommende SCA-Formen zuvor ausgeschlossen wurden. Bei Eintritt der

Erkrankung hatten die Indexpatienten ein durchschnittliches Alter von 35,9 Jahren (3 bis 75 Jahre).

Protein Kinase C gamma (SCA14)

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei neue pathogene Mutationen der PRKCG im Exon 1, 2 sowie 4 identifiziert werden, was einer Prävalenz von 6,3% in diesem Patientenkollektiv entspricht. Die Häufigkeit lag damit leicht niedriger als die zuvor von Chen et al. 2003 berichteten 7,5% (3/40) und deutlich höher als bei vielen Arbeitsgruppen, die sich nur auf einzelne als „hot spot“ in Frage kommende exonische Abschnitte beschränkten.

Die Erkrankung zeichnet sich durch eine langsame Progredienz mit insgesamt milden Verläufen und sehr variablem Erkrankungsbeginn zwischen dem 5. und 50. Lebensjahr als charakteristisches klinisches Merkmal aus.

Mutationen mit Aminosäureaustausch konnten bis dato in Exon 1, 2, 3, 4, 5, 10 und 18 gefunden werden. Bei genereller Selektion im Exon 4 wären 13 Mutationen (44,8%) der PRKCG, bei einer Selektion auf die C1 Region wären 5 Mutationen bzw. 17,2% unentdeckt geblieben, sodass vor diesem Hintergrund ein Screening des gesamten offenen Leserahmens der PRKCG zu empfehlen ist.

Der genaue Pathomechanismus der SCA14 wird durch weitere Arbeiten und Analysen auf subzellulärer und molekulargenetischer Ebene erforscht werden müssen. Obwohl bislang unterschiedliche Mutationsorte detektiert wurden, die eine SCA14 bedingen, ist es durchaus möglich, dass multifaktorielle Mechanismen zu Grunde liegen, welche eine zerebelläre Degeneration bzw. letztlich eine Ataxie verursachen.

Fibroblasten-Wachstumsfaktor 14 (SCA27)

Molekulargenetische Untersuchungen des FGF14-Gen ergaben eine Variante im Exon 1a (c.124G>T, p.G42C). Es scheint jedoch, dass die Mutation nicht mit der

Erkrankung segregiert, da die Veränderung in vorangegangenen Analysen sowohl bei einem gesunden Familienmitglied als auch bei einer Kontrollprobe nachgewiesen werden konnte.

Gegenwärtig liegen alle pathogenen Mutationen im Exon 4 des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 14. Insgesamt kann aufgrund der wenigen bekannten Fälle und Seltenheit der Erkrankung keine hinreichende Aussage bezüglich einer Selektion innerhalb des offenen Leserahmens gemacht werden. Eine Mutationssuche ist deshalb im gesamten Leserahmen des FGF14-Gens zu empfehlen.

Vermutlich nehmen mutierte FGF14-Proteine eine dominant negative Rolle ein, welche die Wechselwirkung zwischen dem Wildtyp des FGF14 und der Na_v-Kanal-Untereinheit störend beeinflussen und damit insgesamt zu einer Änderung der neuronalen Erregbarkeit führen. Auch bei der SCA27 werden zukünftig weitere Analysen notwendig sein um den Pathomechanismus zu ergründen.

6 Zusammenfassung

Autosomal-dominante zerebelläre Ataxien (ADCA) bezeichnen eine heterogene Gruppe von neurologischen Erkrankungen. Punktmutationen im Gen der Protein Kinase C gamma (PRKCG) und des Fibroblastenwachstumsfaktors 14 (FGF14) sind für die Spinozerebelläre Ataxie 14 (SCA14) respektive 27 (SCA27) verantwortlich. Wir untersuchten mittels denaturierender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dHPLC) Mutationen im *PRKCG*- sowie *FGF14*-Gen bei 48 deutschen Indexpatienten, bei denen häufig vorkommende CAG-Repatexpansionen (1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 und 17) bereits im Vorfeld ausgeschlossen wurden. Molekulargenetische Untersuchungen des FGF14-Gen ergaben eine Variante im Exon 1a (c.124G>T, p.G42C). Es scheint jedoch, dass die Mutation nicht mit der Erkrankung segregiert, da die Veränderung in vorangegangenen Analysen sowohl bei einem gesunden Familienmitglied als auch bei einer Kontrollprobe nachgewiesen werden konnte. Demzufolge entspricht der vorhergesagte Aminosäureaustausch eher einem seltenen Protein-Polymorphismus als einer pathogenen Mutation.

Vier bislang nicht beschriebene Mutationen konnten im PRKCG-Gen identifiziert und bei keinem der 528 Kontrollchromosomen nachgewiesen werden. Die Missense-Mutationen befanden sich in Exon 1 (R21K, C49Y), Exon 2 (C66Y) sowie Exon 4 (H116P) und befinden sich mit Ausnahme der Mutation R21K, die in der variablen Region V1 lokalisiert ist, in der hochkonservierten cysteinreichen C1-Region der regulatorischen Domäne der PRKCG. Der Phänotyp der Patienten äußert sich in einer langsam progressiven zerebellären Ataxie mit einem mittleren Alter bei Einsetzen der Erkrankung von 22,3 Jahren (Intervall: 5. – 32. Lebensjahr) mitunter vergesellschaftet mit einer peripheren Polyneuropathie, einer Alkoholunverträglichkeit oder einer Dysarthrie. Die SCA14 repräsentiert lediglich 1,26% (4/318) der deutschen ADCA-Familien. Gegenwärtig liegen 16 von 29 Mutationen im Exon 4 (55,2%) und 24 von 29 Mutationen in der

C1-Region der PRKCG (82,8%), sodass bei zu starker Vorselektion auf einzelne Exons viele der Mutationen der PRKCG unentdeckt geblieben wären. Demzufolge ist eine Untersuchung des gesamten offenen Leserahmens der PRKCG bei Patienten mit langsam progressiver ADCA empfehlenswert.

Abstract:

Autosomal dominant cerebellar ataxias (ADCA) are a heterogeneous group of neurological disorders. Point mutations in the gene encoding protein kinase C gamma (PRKCG) and Fibroblast growth factor 14 (FGF14) are responsible for spinocerebellar ataxia 14 (SCA14) and 27 (SCA27) respectively. Using denaturing High Pressure Liquid Chromatography (dHPLC) we screened for mutations in the PRKCG and FGF14 gene, in a series of 48 ADCA index cases in whom CAG repeat expansions (1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 and 17) were previously excluded. Molecular analysis revealed for the FGF14 a mutation previously reported in exon 1a (c.124G>T, p.G42C). But it appears that this mutation does not segregate and was found further both in a healthy family member and a control individual. Accordingly, the predicted amino-acid change will represent a rare protein polymorphism rather than a pathogenic mutation.

Four new mutations were found in the PRKCG gene and were not detected on 528 control chromosomes. The missense mutations were identified in exon 1 (R21K, C49Y), 2 (C66Y) and 4 (H116P). All but one (R21K) were located in the evolutionarily highly conserved cystein-rich region C1 regions of the regulatory domain of the protein. The patients presented with a very slowly progressive cerebellar ataxia with a mean age at onset of 22,3 years (range 5 to 32 years), occasionally associated with peripheral polyneuropathy, alcohol intolerance or dysarthria. SCA14 represented only 1.26% (4/318) of Germany ADCA families. At present 16 from 29 mutations (55,2%) are localized in exon 4 and 24 of 29 mutations (82,8%) in the C1 region of the PRKCG, so that a strict preselection to several exons a lot of mutations would be undetected. Therefore, screening of

6 Zusammenfassung

the whole open reading frame is recommended in patients with a slow progressive ADCA, for which repeat expansions have been excluded.

7 Literaturverzeichnis

Abele M, Burk K, Schols L, Schwartz S, Besenthal I, Dichgans J, Zuhlke C, Riess O, Klockgether T (2002)

The aetiology of sporadic adult-onset ataxia.
Brain 125:961-8

Abeliovich A, Paylor R, Chen C, Kim JJ, Wehner JM, Tonegawa S (1993)

PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning.
Cell 75:1263-71

Adachi N, Kobayashi T, Takahashi H, Kawasaki T, Shirai Y, Ueyama T, Matsuda T, Seki T, Sakai N, Saito N (2008)

Enzymological analysis of mutant protein kinase Cgamma causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca²⁺ homeostasis.
J Biol Chem 283(28):19854-63

Akai J, Storey K (2003)

Brain or brawn: how FGF signaling gives us both.
Cell 115(5):510-2

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J.D. (1994)

Chapter 16: The Cytoskeleton and Chapter 19:
Cell Adhesion and Junctions. Molecular biology of the cell, 3rd edition (New York, New York: Garland Publishing).

Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM (1999)

Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A).
Hum Mol Genet 8:743-9

Al-Magthteh M, Vithana EN, Inglehearn CF, Moore T, Bird AC, Bhattacharya SS (1998)

Segregation of a PRKCG mutation in two RP11 families.
Am J Hum Genet 62:1248-52

Alonso I, Costa C, Coutinho P, Silveira I, Sequeiros J (2004)

Molecular analysis of the PRKCG gene in Portuguese patients with spinocerebellar ataxia.
Am J Hum Genet 75 Suppl:2425

Alonso I, Costa C, Gomes A, Ferro A, Seixas AI, Silva S, Cruz VT, Coutinho P, Sequeiros J, Silveira I (2005)

A novel H101Q mutation causes PCGgamma loss in spinocerebellar ataxia type 14.

J Hum Genet 50:523-29

Apak S, Yuksel M, Ozmen M, Saka N, Darendeliler F, Neuhauser G (1989)

Heterogeneity of X-linked recessive (spino)cerebellar ataxia with or without spastic diplegia.

Am J Med Genet 34:155-8

Arts WF, Loonen MC, Sengers RC, Slooff JL (1993)

X-linked ataxia, weakness, deafness, and loss of vision in early childhood with a fatal course.

Ann Neurol 33:535-9

Bang OY, Huh K, Lee PH, Kim HJ (2003)

Clinical and neuroradiological features of patients with spinocerebellar ataxias from Korean kindreds.

Arch Neurol 60:1566-74

Bekri S, Kispal G, Lange H, Fitzsimons E, Tolmie J, Lill R, Bishop DF (2000)

Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation.

Blood 96:3256-64

Bennett RR, den Dunnen J, O'Brien KF, Darras BT, Kunkel LM (2001)

Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing.

BMC Genet 2(1):17

Bertini E, Cusmai R, de Saint Basile G, Le Deist F, Di Capua M, Gaggero DR, Dionisi-Vici C, Santillo C, Caniglia M (1992)

Congenital X-linked ataxia, progressive myoclonic encephalopathy, macular degeneration and recurrent infections.

Am J Med Genet 43:443-51

Brkanac Z, Fernandez M, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Bird TD, Raskind WH (2002)

Autosomal dominant sensory/motor neuropathy with Ataxia (SMNA): Linkage to chromosome 7q22-q32.

Am J Med Genet 114(4):450-7

Brkanac Z, Bylenok L, Fernandez M, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Nochlin D, Raskind WH, Bird TD (2002)

A new dominant spinocerebellar ataxia linked to chromosome 19q13.4-qter.

Arch Neurol 59:1291-5

Browne DL, Gancher ST, Nutt JG, Brunt ER, Smith EA, Kramer P, Litt M (1994) Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene.
KCNA1. *Nat Genet* 8:136-40

Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, Fetoni V, Mariotti C, Migone N, Di Donato S, Taroni F (2004)
Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families.
Arch Neurol 61:727-33

Brusse E, de Koning I, Maat-Kievit A, Oostra BA, Heutink P, van Swieten JC (2006)
Spinocerebellar ataxia associated with a mutation in the fibroblast growth factor 14 gene (SCA27): A new phenotype.
Mov Disord 21(3):396-401

Bunn CF, Lintott CJ, Scott RS, George PM (2002)
Comparison of SSCP and DHPLC for the detection of LDLR mutations in a New Zealand cohort.
Hum Mutat 19(3):311

Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, et al. (1996)
Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion.
Science 271(5254):1423-7

Cavalier L, Ouahchi K, Kayden HJ, Di Donato S, Reutenauer L, Mandel JL, Koenig M (1998)
Ataxia with isolated vitamin E deficiency: heterogeneity of mutations and phenotypic variability in a large number of families.
Am J Hum Genet 62:301-10

Chamberlain S, Shaw J, Rowland A, Wallis J, South S, Nakamura Y, von Gabain A, Farrall M, Williamson R (1988)
Mapping of the mutation causing Friedreich ataxia to human chromosome 9.
Nature 334(6179):248-50

Chen C, Kano M, Abeliovich A, Chen L, Bao S, Kim JJ, Hashimoto K, Thompson RF, Tonegawa S (1995)
Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC gamma mutant mice.
Cell 83:1233-42

Chen DH, Brkanac Z, Verlinde CL, Tan XJ, Bylenok L, Nochlin D, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Fernandez M, Cimino PJ, Bird TD, Raskind WH (2003)

Missense mutations in the regulatory domain of PKC gamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia.

Am J Hum Genet 72:839-49

Chen DH, Cirnino PJ, Ranum LPW, Zoghbi H, Yabe I, Schut L, Margolis RL, Lipe HP, Feleke A, Matsushita M, Wolff J, Morgan C, Lau D, Fernandez M, Sasaki H, Raskind WH, Bird TD (2005)

The clinical and genetic spectrum of spinocerebellar ataxia 14 (SCA14).
Neurology 64:1258-60

Chung MY, Lu YC, Cheng NC, Soong BW (2003)

A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA22) linked to chromosome 1p21-q23.

Brain 126:1293-9

Chung MY, Soong BW (2004)

Reply to: SCA-19 and SCA-22: evidence for one locus with a worldwide distribution.

Brain 127:E7

Colosimo A, Guida V, De Luca A, Cappabianca MP, Bianco I, Palka G, Dallapiccola B (2002)

Reliability of DHPLC in mutational screening of beta-globin (HBB) alleles.

Hum Mutat 19(3):287-95

Craig NJ, Duran Alonso MB, Hawker KL, Shiels P, Glencorse TA, Campbell JM, Bennett NK, Canham M, Donald D, Gardiner M, Gilmore DP, MacDonald RJ, Maitland K, McCallion AS, Russell D, Payne AP, Sutcliffe RG, Davies RW (2001)

A candidate gene for human neurodegenerative disorders: a rat PKC gamma mutation causes a Parkinsonian syndrome.

Nat Neurosci 4:1061-2

Dalski A, Atici J, Kreuz FR, Hellenbroich Y, Schwinger E, Zühlke C (2005)

Mutation analysis in the fibroblast growth factor 14 gene: frameshift mutation and polymorphisms in patients with inherited ataxias.

Eur J Hum Genet 13(1):118-20

Dalski A, Mitulla B, Bürk K, Schattenfroh C, Schwinger E, Zühlke C (2006)

Mutation of the highly conserved cysteine residue 131 of the SCA14 associated PRKCG gene in a family with slow progressive cerebellar ataxia.

J Neurol 253(8):1111-2

Damji KF, Allingham RR, Pollock SC, Small K, Lewis KE, Stajich JM, Yamaoka LH, Vance JM, Pericak-Vance MA (1996)

Periodic vestibulocerebellar ataxia, an autosomal dominant ataxia with defective smooth pursuit, is genetically distinct from other autosomal dominant ataxias. Arch Neurol 53:338-44

Daniel H, Levenes C, Crepel F (1998)

Cellular mechanisms of cerebellar LTD. Trends Neurosci 21(9):401-7

David G, Abbas N, Stevanin G, Durr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, Benomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel JL, Brice A (1997)

Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. Nat Genet. 17(1):65-70

Dausset J, Cann H, Cohen D, Lathrop M, Lalouel JM, White R (1990)

Centre d'etude du polymorphisme humain (CEPH): collaborative genetic mapping of the human genome. Genomics 6(3):575-7

Day JW, Schut LJ, Moseley ML, Durand AC, Ranum LP (2000)

Spinocerebellar ataxia type 8: clinical features in a large family. Neurology 55:649-57

Dekker LV, Parker PJ (1994)

Protein kinase C--a question of specificity. Trends Biochem Sci 19(2):73-7

Devos D, Schraen-Maschke S, Vuillaume I, Dujardin K, Naze P, Willoteaux C, Destee A, Sablonniere B (2001)

Clinical features and genetic analysis of a new form of spinocerebellar ataxia. Neurology 56:234-8

Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, Brice A, Koenig M (1996)

Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. N Engl J Med 335:1169-75

Durr A, Herman A, Stevanin G, et al (2000)

Autosomal dominant cerebellar ataxia with mental retardation is linked to chromosome 19q13. Neurology 54(S3):A465-6

Eng C, Hampel H, de la Chapelle A (2001)

Genetic testing for cancer predisposition. Annu Rev Med 52:371-400

Escayg A, De Waard M, Lee DD, Bichet D, Wolf P, Mayer T, Johnston J, Baloh R, Sander T, Meisler MH (2000)

Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia.

Am J Hum Genet 66:1531-9

Fahey MC, Knight MA, Shaw JH, Gardner RJ, du Sart D, Lockhart PJ, Delatycki MB, Gates PC, Storey E (2005)

Spinocerebellar ataxia type 14: study of a family with an exon 5 mutation in the PRKCG gene.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 76(12):1720-2.

Farlow MR, DeMyer W, Dlouhy SR, Hodes ME (1987)

X-linked recessive inheritance of ataxia and adult-onset dementia: clinical features and preliminary linkage analysis.

Neurology 37:602-7

Farmer TW and Mustian VM (1963)

Vestibulo-cerebellar ataxia: a newly defined hereditary syndrome with periodic manifestations.

Arch Neurol 8:471-80

Fixman M, Freire JJ (1977)

Theory of DNA melting curves.

Biopolymers 16(12):2693-704

Flanigan K, Gardner K, Alderson K, Galster B, Otterud B, Leppert MF, Kaplan C, Ptacek LJ (1996)

Autosomal dominant spinocerebellar ataxia with sensory axonal neuropathy (SCA4): clinical description and genetic localization to chromosome 16q22.1.

Am J Hum Genet. 59(2):392-9

Freeze H, Brock TD (1970)

Thermostable Aldolase from *Thermus aquaticus*

J Bacteriol 101(2): 541-550

Friedreich N (1863)

Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge.

Archive of Pathology and Anatomy 26:391-419

Fujigasaki H, Martin J-J, De Deyn PP, Camuzat A, Deffond D, Stevanin G, Dermaut B, Van Broeckhoven C, Durr A, Brice A (2001)

CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia.

Brain 124:1939-47

Fujigasaki H, Tardieu S, Camuzat A, Stevanin G, LeGuern E, Matsuura T, Ashizawa T, Durr A, Brice A (2002)

Spinocerebellar ataxia type 10 in the French population.
Ann Neurol 51:408-9

Gancher ST and Nutt JG (1986)

Autosomal dominant episodic ataxia: a heterogeneous syndrome.
Mov Disord 1:239-53

Gardner RJ, Knight MA, Hara K, Tsuji S, Forrest SM, Storey E (2005)

Spinocerebellar ataxia type 15.
Cerebellum 4(1):47-50

Gonzalez K, Udovichenko I, Cunnick J, Takemoto DJ (1993)

Protein kinase C in galactosemic and tolrestat-treated lens epithelial cells.
Curr Eye Res 12:373-7

Gross E, Arnold N, Pfeifer K, Bandick K, Kiechle M (2000)

Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC.
Hum Mutat 16(4):345-53 [

Guo SW, Thompson EA (1992)

Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles.
Biometrics 48(2):361-72

Hanson PA, Martinez LB, Cassidy R (1977)

Contractures, continuous muscle discharges, and titubation.
Ann Neurol 1:120-4

Harding AE (1981)

Early onset cerebellar ataxia with retained tendon reflexes: a clinical and genetic study of a disorder distinct from Friedreich's ataxia.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 44: 503-508

Harding AE (1983)

Classification of the hereditary ataxias and paraplegias.
Lancet. 1(8334):1151-5.

Harding AE (1984)

The hereditary ataxias and related disorders.
Edinburgh

Harding AE (1993)

Clinical features and classification of inherited ataxias.
In: Harding AE, Deufel T (eds): Advances in Neurology. Advances in Neurology 61: 1-14; 1993; 61: 1-14

Hecker KH, Green SM, Kobayashi K (2000)

Analysis and purification of nucleic acids by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography.
J Biochem Biophys Methods 46(1-2):83-93

Herman-Bert A, Stevanin G, Netter JC, Rascol O, Brassat D, Calvas P, Camuzat A, Yuan Q, Schalling M, Durr A, Brice A (2000)

Mapping of spinocerebellar ataxia 13 to chromosome 19q13.3-q13.4 in a family with autosomal dominant cerebellar ataxia and mental retardation.
Am J Hum Genet 67:229-35

Hiramoto K, Kawakami H, Inoue K, Seki T, Maruyama H, Morino H, Matsumoto M, Kurisu K, Sakai N (2006)

Identification of a new family of spinocerebellar ataxia type 14 in the Japanese spinocerebellar ataxia population by the screening of PRKCG exon 4.
Mov Disord 21(9):1355-60.

Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth RG, Sherr M, Sumner AJ, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Vieria-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA, Margolis RL (1999)

Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12.
Nat Genet 23:391-2

Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe C, Lashley T, Hernandez D, Worth P, Singleton AB, Hilton DA, Holton J, Revesz T, Davis MB, Giunti P, Wood NW (2007)

Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11.
Nat Genet 39:1434-6.

Huber CG, Oefner PJ, Preuss E, Bonn GK (1993)

High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles.
Nucleic Acids Res 21(5):1061-6

Huber CG, Oefner PJ, Bonn GK 1993

High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers.
Anal Biochem 212(2):351-8

Hug H and Sarre TF (1993)

Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?
Biochem J 291 (Pt 2):329-43

Hurley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y (1997)

Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains.
Protein Sci 6:477-80

Ikeuchi T, Koide R, Tanaka H, Onodera O, Igarashi S, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Tomoda A, Miike T, et al. (1995)

Dentatorubral-pallidoluysian atrophy: clinical features are closely related to unstable expansions of trinucleotide (CAG) repeat.
Ann Neurol 37:769-75

Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier JM, Weber C, Mandel JL, Cancel G, Abbas N, Durr A, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y, Brice A (1996)

Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats.
Nat Genet 14(3):285-291

Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, Kobayashi K, Yokota T, Amino T, Owada K, Fujigasaki H, Sakamoto M, Tomimitsu H, Takashima M, Kumagai J, Noguchi Y, Kawashima Y, Ohkoshi N, Ishida G, Gomyoda M, Yoshida M, Hashizume Y, Saito Y, Murayama S, Yamanouchi H, Mizutani T, Kondo I, Toda T, Mizusawa H (2005)

An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a singlenucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains.
Am J Hum Genet 77(2):280-296.

Jobsis GJ, Weber JW, Barth PG, Keizers H, Baas F, van Schooneveld MJ, van Hilten JJ, Troost D, Geesink HH, Bolhuis PA (1997)

Autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration (ADCA II): clinical and neuropathological findings in two pedigrees and genetic linkage to 3p12-p21.1.
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 62(4):367-71

Juvonen V, Hietala M, Paivarinta M, Rantamaki M, Hakamies L, Kaakkola S, Vierimaa O, Penttinen M, Savontaus ML (2000)

Clinical and genetic findings in Finnish ataxia patients with the spinocerebellar ataxia 8 repeat expansion.
Ann Neurol 48:354-61

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, et al (1994)

CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1.
Nat Genet 8(3):221-228

Kim JY, Park SS, Joo SI, Kim JM, Jeon BS (2001)

Molecular analysis of Spinocerebellar ataxias in Koreans: frequencies and reference ranges of SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, and SCA7.
Mol Cells 12:336-41

Klebe S, Durr A, Rentschler A, Hahn-Barma V, Abele M, Bouslam N, Schöls L, Jedynak P, Forlani S, Denis E, Dussert C, Agid Y, Bauer P, Globas C, Wüllner U, Brice A, Riess O, Stevanin G (2005)

New mutations in protein kinase Cgamma associated with spinocerebellar ataxia type 14.
Ann Neurol 58(5):720-9

Klebe S, Faivre L, Forlani S, Dussert C, Tourbah A, Brice A, Stevanin G, Durr A (2007)

Another mutation in cysteine 131 in protein kinase C gamma as a cause of spinocerebellar ataxia type 14.
Arch Neurol 64(6):913-4.

Klein B, Weirich G, Brauch H (2001)

DHPLC-based germline mutation screening in the analysis of the VHL tumor suppressor gene: usefulness and limitations.
Hum Genet 108(5):376-84

Klockgether T, Burk K, Auburger G, Dichgans J (1995)

Classification and diagnosis of degenerative ataxias
Nervenarzt 66(8):571-81

Klockgether T, Ludtke R, Kramer B, Abele M, Burk K, Schols L, Riess O, Laccone F, Boesch S, Lopes-Cendes I, Brice A, Inzelberg R, Zilber N, Dichgans J (1998)

The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients.
Brain 121 (Pt 4):589-600

Klockgether T (2000)

Handbook of ataxia disorders.
New York: Dekker, M

Knight MA, Kennerson M, Nicholson GA, Gardner RJM, Storey E, Thomas PQ, Forrest SM (2001)

A new spinocerebellar ataxia, SCA15.
Am J Hum Genet 69:509.

Knight MA, Kennerson ML, Anney RJ, Matsuura T, Nicholson GA, Salimi-Tari P, Gardner RJ, Storey E, Forrest SM (2003)

Spinocerebellar ataxia type 15 (sca15) maps to 3p24.2-3pter: exclusion of the ITPR1 gene, the human orthologue of an ataxic mouse mutant.
Neurobiol Dis 13:147-57

Knight MA, Gardner RJ, Bahlo M, Matsuura T, Dixon JA, Forrest SM, Storey E (2004)

Dominantly inherited ataxia and dysphonia with dentate calcification: spinocerebellar ataxia type 20.

Brain 127:1172-81

Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, et al. (1994)

Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA).

Nat Genet 6(1):9-13.

Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S (1999)

A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease?

Hum Mol Genet 8:2047-53

Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW, Ranum LP (1999)

An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8).

Nat Genet 21:379-84

Kuklin A, Munson K, Gjerde D, Haefele R, Taylor P (1997-1998)

Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system.

Genet Test 1(3):201-6

Kuklin A, Munson K, Taylor P, Gjerde D (1999)

Isolation and analysis of amplified cDNA fragments during detection of unknown polymorphisms with temperature modulated heteroduplex chromatography.

Mol Biotechnol 11(3):257-61

La Spada AR (1997)

Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms.

Brain Pathol 7:943-63

Laezza F, Gerber BR, Lou JY, Kozel MA, Hartman H, Craig AM, Ornitz DM, Nerbonne JM (2007)

The FGF14(F145S) mutation disrupts the interaction of FGF14 with voltage-gated Na⁺ channels and impairs neuronal excitability.

J Neurosci 27(44):12033-4

Litt M, Kramer P, Browne D, Gancher S, Brunt ER, Root D, Phromchotikul T, Dubay CJ, Nutt J (1994)

A gene for episodic ataxia/myokymia maps to chromosome 12p13.

Am J Hum Genet 55:702-9

Lubbers WJ, Brunt ER, Scheffer H, Litt M, Stulp R, Browne DL, van Weerden TW (1995)

Hereditary myokymia and paroxysmal ataxia linked to chromosome 12 is responsive to acetazolamide.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 59:400-5

Maguire A, Hellier K, Hammans S, May A (2001)

X-linked cerebellar ataxia and sideroblastic anaemia associated with a missense mutation in the ABC7 gene predicting V411L.

Br J Haematol 115:910-7

Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI (1997)

Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ .

Science 278:279-83

Mariotti C, Brusco A, Di Bella D, Cagnoli C, Seri M, Gellera C, Di Donato S, Taroni F (2008)

Spinocerebellar ataxia type 28: A novel autosomal dominant cerebellar ataxia characterized by slow progression and ophthalmoparesis.

Cerebellum 7(2):184-8.

Matsumura R, Futamura N, Ando N, Ueno S (2003)

Frequency of spinocerebellar ataxia mutations in the Kinki district of Japan.

Acta Neurol Scand 107:38-41

Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, Rasmussen A, Grewal RP, Watase K, Khajavi M, McCall AE, Davis CF, Zu L, Achari M, Pulst SM, Alonso E, Noebels JL, Nelson DL, Zoghbi HY, Ashizawa T (2000)

Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10.

Nat Genet 26:191-4

Matsuura T, Ranum LP, Volpini V, Pandolfo M, Sasaki H, Tashiro K, Watase K, Zoghbi HY, Ashizawa T (2002)

Spinocerebellar ataxia type 10 is rare in populations other than Mexicans.

Neurology 58:983-4

Meijer IA, Hand CK, Grewal KK, Stefanelli MG, Ives EJ, Rouleau GA (2002)

A locus for autosomal dominant hereditary spastic ataxia, SAX1, maps to chromosome 12p13.

Am J Hum Genet 70:763-9

Metzger F, Kapfhammer JP (2003)

Protein kinase C: its role in activity-dependent Purkinje cell dendritic development and plasticity

Cerebellum 2:206-14

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988)

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucleic Acids Res 16(3):1215

Miyoshi Y, Yamada T, Tanimura M, Taniwaki T, Arakawa K, Ohyagi Y, Furuya H, Yamamoto K, Sakai K, Sasazuki T, Kira J (2001)

A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA16) linked to chromosome 8q22.1-24.1.
Neurology 57:96-100

Mori M, Kose A, Tsujino T, Tanaka C (1990)

Immunocytochemical localization of protein kinase C subspecies in the rat spinal cord: light and electron microscopic study.
J Comp Neurol 299:167-77

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986)

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1:263-73

Mullis KB, Faloona FA (1987)

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. 1987;155:335-50

Munoz-Sanjuan I, Smallwood PM, Nathans J (2000)

Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing.
J Biol Chem 275:2589-2597

Nagaoka U, Takashima M, Ishikawa K, Yoshizawa K, Yoshizawa T, Ishikawa M, Yamawaki T, Shoji S, Mizusawa H (2000)

A gene on SCA4 locus causes dominantly inherited pure cerebellar ataxia.
Neurology 54:1971-5

Naito H, Oyanagi S (1982)

Familial myoclonus epilepsy and choreoathetosis: hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy.
Neurology 32(8):798-807

Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I (2001)

SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein.
Hum Mol Genet 10:1441-8

Newton AC (1995)

Protein kinase C: structure, function, and regulation.
J Biol Chem. 270(48):28495-8

Newton AC (2001)

Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions.
Chem Rev 101:2353-64

Nishizuka Y (1992)

Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C.
Science 258(5082):607-14

O'Hearn E, Holmes SE, Calvert PC, Ross CA, Margolis RL (2001)

SCA-12: Tremor with cerebellar and cortical atrophy is associated with a CAG repeat expansion.
Neurology. 56(3):299-303

Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR (1996)

Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4.
Cell 87:543-52

Orlow I, Roy P, Barz A, Canchola R, Song Y, Berwick M (2001)

Validation of denaturing high performance liquid chromatography as a rapid detection method for the identification of human INK4A gene mutations.
J Mol Diagn 3(4):158-63

Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Jr., Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP, Zoghbi HY (1993)

Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1.
Nat Genet 4(3):221-226

Owens JM, Kretsinger RH, Sando JJ, Chertihin OI (1998)

Two-dimensional crystals of protein kinase C.
J Struct Biol 121: 61-7

Pagon RA, Bird TD, Detter JC, Pierce I (1985)

Hereditary sideroblastic anaemia and ataxia: an X linked recessive disorder.
J Med Genet 22:267-73

Paulson HL and Fischbeck KH (1996)

Trinucleotide repeats in neurogenetic disorders.
Annu Rev Neurosci 19:79-107

Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau GA, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C, Sahba S. (1996)

Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2.

Nat Genet. 14(3):269-76

Ramensky V, Bork P, Sunyaev S (2002)

Human non-synonymous SNPs: server and survey.

Nucleic Acids Res 30(17):3894-900

Ranum LP, Schut LJ, Lundgren JK, Orr HT, Livingston DM (1994)

Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11.

Nat Genet. 8(3):280-4

Ranum LPW, Moseley ML, Leppet MF, et al (1999)

Massive CTG expansions and deletions may reduce penetrance of spinocerebellar ataxia type 8.

Am J Hum Genet 65:A466 (2648)

Raskind WH, Wijsman E, Pagon RA, Cox TC, Bawden MJ, May BK, Bird TD (1991)

X-linked sideroblastic anemia and ataxia: linkage to phosphoglycerate kinase at Xq13.

Am J Hum Genet 48:335-41

Rasmussen A, Matsuura T, Ruano L, Yescas P, Ochoa A, Ashizawa T, Alonso E (2001)

Clinical and genetic analysis of four Mexican families with spinocerebellar ataxia type 10.

Ann Neurol. 50(2):234-9

Ravnik-Glavac M, Atkinson A, Glavac D, Dean M (2002)

DHPLC screening of cystic fibrosis gene mutations.

Hum Mutat 19(4):374-83

Riess O, Laccione FA, Gispert S, Schols L, Zuhlke C, Vieira-Saecker AM, Herit S, Wessel K, Epplen JT, Weber BH, Kreuz F, Chahrokh-Zadeh S, Meindl A, Lunkes A, Aguiar J, Macek M Jr, Krebsova A, Macek M Sr, Burk K, Tinschert S, Schreyer I, Pulst SM, Auburger G. (1997)

SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients.

Neurogenetics. 1(1):59-64

Rousseau-Merck, M. F.; Pizon, V.; Tavitian, A.; Berger, R (1990)

Chromosome mapping of the human RAS-related RAP1A, RAP1B, and RAP2 genes to chromosomes 1p12-p13, 12q14, and 13q34, respectively.

Cytogenet. Cell Genet. 53: 2-4

Rudolph JG, White S, Sokolsky C, Bozak D, Mazzanti C, Lipsky RH, Goldman D (2002)

Determination of melting temperature for variant detection using dHPLC: a comparison between an empirical approach and DNA melting prediction software.

Genet Test 6(3):169-76

Saito N, Kikkawa U, Nishizuka Y, Tanaka C (1988)

Distribution of protein kinase C-like immunoreactive neurons in rat brain.

J Neurosci 8:369-82

Saito N, Shirai Y (2002)

Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype.

J Biochem (Tokyo) 132(5):683-7

Sambrook J., Fritsch, EF, Maniatis T (1989)

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition.

Cold Spring Harbor Laboratory

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science 239(4839):487-91

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci U S A 74(12):5463-7

Schelhaas HJ, van de Warrenburg BP, Hageman G, Ippel EE, van Hout M, Kremer B (2003)

Cognitive impairment in SCA-19.

Acta Neurol Belg 103(4):199-205.

Schelhaas HJ, Verbeek DS, Van de Warrenburg BP, Sinke RJ (2004)

SCA19 and SCA22: evidence for one locus with a worldwide distribution.

Brain 127:E6

Schöls L, Vieira-Saecker AM, Schols S, Przuntek H, Epplen JT, Riess O (1995)

Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients.

Hum Mol Genet. 4(6):1001-5

Schols L, Amoiridis G, Buttner T, Przuntek H, Epplen JT, Riess O (1997)

Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes?

Ann Neurol 42:924-32

Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O (2004)

Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis.

Lancet Neurol 3:291-304

Schrenk K, Kapfhammer JP, Metzger F (2002)

Altered dendritic development of cerebellar Purkinje cells in slice cultures from protein kinase C gamma-deficient mice.

Neuroscience 110:675-89

Seki T, Adachi N, Ono Y, Mochizuki H, Hiramoto K, Amano T, Matsubayashi H, Matsumoto M, Kawakami H, Saito N, Sakai N (2005)

Mutant protein kinase C gamma found in spinocerebellar ataxia type 14 is susceptible to aggregation and causes cell death.

J Biol Chem. 280(32):29096-106

Silveira I, Miranda C, Guimaraes L, Moreira MC, Alonso I, Mendonca P, Ferro A, Pinto-Basto J, Coelho J, Ferreirinha F, Poirier J, Parreira E, Vale J, Januario C, Barbot C, Tuna A, Barros J, Koide R, Tsuji S, Holmes SE, Margolis RL, Jardim L, Pandolfo M, Coutinho P, Sequeiros J (2002)

Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG)_n allele at the SCA17 locus.

Arch Neurol 59:623-9

Skinner PJ, Vierra-Green CA, Clark HB, Zoghbi HY, Orr HT (2001)

Altered trafficking of membrane proteins in purkinje cells of SCA1 transgenic mice.

Am J Pathol. 159(3):905-13.

Smallwood PM, Munoz-Sanjuan I, Tong P, Macke JP, Hendry SH, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J (1996)

Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development.

Proc Natl Acad Sci U S A 93(18):9850-7

Smith JK, Gonda V.E. and Malamud N (1958)

Unusual form of cerebellar ataxia: combined dentato-rubral and pallido-lysonian degeneration.

Neurology 8:205 – 209

Srinivasan N, Bax B, Blundell TL, Parker PJ (1996)

Structural aspects of the functional modules in human protein kinase-C alpha deduced from comparative analyses.

Proteins 26: 217–35

Steckley JL, Ebers GC, Cader MZ, McLachlan RS (2001)

An autosomal dominant disorder with episodic ataxia, vertigo, and tinnitus.

Neurology 57:1499-502

Stevanin G, Bouslam N, Ravaux L, Boland A, Durr A, Brice A (2003)

Autosomal dominant cerebellar ataxia with sensory neuropathy maps to the spinocerebellar ataxia 25 (SCA25) locus on chromosome 2p15-p21.
Am J Hum Genet 73(Suppl 1):2236

Stevanin G, Hahn V, Lohmann E, Bouslam N, Gouttard M, Soumphonphakdy C, Welter ML, Ollagnon-Roman E, Lemainque A, Ruberg M, Brice A, Durr A (2004)

Mutation in the catalytic domain of protein kinase C gamma and extension of the phenotype associated with spinocerebellar ataxia type 14.
Arch Neurol 61:1242-8

Stevanin G, Broussolle E, Streichenberger N, Kopp N, Brice A, Durr A (2005)

Spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (SCA25).
Cerebellum 4(1):58-61.

Storey E, Gardner RJ, Knight MA, Kennerson ML, Tuck RR, Forrest SM, Nicholson GA (2001)

A new autosomal dominant pure cerebellar ataxia.
Neurology 57:1913-5

Storey E, Knight MA, Forrest SM, Gardner RJ (2005)

Spinocerebellar ataxia type 20.
Cerebellum 4(1):55-57

Tanaka C and Nishizuka Y (1994)

The protein kinase C family for neuronal signaling.
Annu Rev Neurosci 17:551-67

Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ (1997)

Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography.
Genome Res 7(10):996-1005

van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, Maat-Kievit JA, Dooijes D, Notermans NC, Lindhout D, Knoers NV, Kremer HP (2002)

Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis.
Neurology 58:702-8

van de Warrenburg BP, Notermans NC, Schelhaas HJ, van Alfen N, Sinke RJ, Knoers NV, Zwarts MJ, Kremer BP (2004)

Peripheral nerve involvement in spinocerebellar ataxias.
Arch Neurol 61:257-61

van de Warrenburg BP, Verbeek DS, Piersma SJ, Hennekam FA, Pearson PL, Knoers NV, Kremer HP, Sinke RJ (2003)

Identification of a novel SCA14 mutation in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family.

Neurology 61:1760-5

van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, Krieger E, van de Graaf R, de Koning I, Maat-Kievit A, Leegwater P, Dooijes D, Oostra BA, Heutink P (2003)

A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebral ataxia.

Am J Hum Genet 72:191-9

Vance JM, Pericak-Vance MA, Payne CS, et al (1984)

Linkage and genetic analysis in adult onset periodic vestibulo-cerebellar ataxia: report of a new family.

Am J Hum Genet 36:78S

VanDyke DH, Griggs RC, Murphy MJ, Goldstein MN (1975)

Hereditary myokymia and periodic ataxia.

J Neurol Sci 25:109-18

Verbeek DS, Schelhaas JH, Ippel EF, Beemer FA, Pearson PL, Sinke RJ (2002) Identification of a novel SCA locus (SCA19) in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family on chromosome region 1p21-q21.

Hum Genet 111:388-93

Verbeek DS, van de Warrenburg BP, Wesseling P, Pearson PL, Kremer HP, Sinke RJ (2004)

Mapping of the SCA23 locus involved in autosomal dominant cerebellar ataxia to chromosome region 20p13-12.3.

Brain 127(Pt 11):2551-2557

Verbeek DS, Knight MA, Harmison GG, Fischbeck KH, Howell BW (2005)

Protein kinase C gamma mutations in spinocerebellar ataxia 14 increase kinase activity and alter membrane targeting.

Brain 128(Pt 2):436-42. Epub 2004 Dec 23

Verbeek DS, Goedhart J, Bruinsma L, Sinke RJ, Reits EA (2008)

PKC gamma mutations in spinocerebellar ataxia type 14 affect C1 domain accessibility and kinase activity leading to aberrant MAPK signaling.

J Cell Sci 121(Pt 14):2339-49

Violin JD, Zhang J, Tsien RY, Newton AC (2003)

A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C.

J Cell Biol 161(5):899-909

Vithana EN, Abu-Safieh L, Allen MJ, Carey A, Papaioannou M, Chakarova C, Al-Magthteh M, Ebenezer ND, Willis C, Moore AT, Bird AC, Hunt DM, Bhattacharya SS (2001)

A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal-dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11).
Mol Cell 8:375-81

Vlak MH, Sinke RJ, Rabelink GM, Kremer BP, van de Warrenburg BP (2006)

Novel PRKCG/SCA14 mutation in a Dutch spinocerebellar ataxia family: expanding the phenotype.
Mov Disord 21(7):1025-8

Vuillaume I, Devos D, Schraen-Maschke S, Dina C, Lemainque A, Vasseur F, Bocquillon G, Devos P, Kocinski C, Marzys C, Destee A, Sablonniere B (2002)

A new locus for spinocerebellar ataxia (SCA21) maps to chromosome 7p21.3-p15.1.
Ann Neurol 52:666-70

Wang Q, McEwen DG, Ornitz DM (2000)

Subcellular and developmental expression of alternatively spliced forms of fibroblast growth factor 14.
Mech Dev 90(2):283-7

Wang Q, Bardgett ME, Wong M, Wozniak DF, Lou J, McNeil BD, Chen C, Nardi A, Reid DC, Yamada K, Ornitz DM (2002)

Ataxia and paroxysmal dyskinesia in mice lacking axonally transported FGF14.
Neuron 2002 Jul 3;35(1):25-38

Watanabe H, Tanaka F, Matsumoto M, Doyu M, Ando T, Mitsuma T, Sobue G (1998)

Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Japanese patients and clinical characterization of spinocerebellar ataxia type 6.
Clin Genet 53:13-9

Waters MF, Minassian NA, Stevanin G, Figueroa KP, Bannister JP, Nolte D, Mock AF, Evidente VG, Fee DB, Müller U, Dürr A, Brice A, Papazian DM, Pulst SM (2006)

Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes.
Nat Genet 38(4):447-51

Wieczorek S, Arning L, Gizewski ER, Alheite I, Timmann D (2007)

Benign SCA14 phenotype in a German patient associated with a missense mutation in exon 3 of the PRKCG gene.
Mov Disord 22(14):2135-6

Worth PF, Giunti P, Gardner-Thorpe C, Dixon PH, Davis MB, Wood NW (1999)

Autosomal dominant cerebellar ataxia type III: linkage in a large British family to a 7.6-cM region on chromosome 15q14-21.3.
Am J Hum Genet 65:420-6

Xiao W, Oefner PJ (2001)

Denaturing high-performance liquid chromatography: A review.
Hum Mutat 17(6):439-74

Yabe I, Sasaki H, Chen DH, Raskind WH, Bird TD, Yamashita I, Tsuji S, Kikuchi S, Tashiro K (2003)

Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a mutation in protein kinase C gamma.
Arch Neurol 60:1749-51

Yakura H, Wakisaka A, Fujimoto S, Itakura K (1974)

Hereditary ataxia and HLA genotypes.
N Engl J Med 291: 154-155

Yamashita I, Sasaki H, Yabe I, Fukazawa T, Nogoshi S, Komeichi K, Takada A, Shiraishi K, Takiyama Y, Nishizawa M, Kaneko J, Tanaka H, Tsuji S, Tashiro K (2000)

A novel locus for dominant cerebellar ataxia (SCA14) maps to a 10.2-cM interval flanked by D19S206 and D19S605 on chromosome 19q13.4-qter.
Ann Neurol 48:156-63

Yokota T, Shiojiri T, Gotoda T, Arita M, Arai H, Ohga T, Kanda T, Suzuki J, Imai T, Matsumoto H, Harino S, Kiyosawa M, Mizusawa H, Inoue K (1997)

Friedreich-like ataxia with retinitis pigmentosa caused by the His101Gln mutation of the alpha-tocopherol transfer protein gene.
Ann Neurol 41:826-32

Yu GY, Howell MJ, Roller MJ, Xie TD, Gomez CM (2005)

Spinocerebellar ataxia type 26 maps to chromosome 19p13.3 adjacent to SCA6.
Ann Neurol 57(3):349-354

Zeidman R, Pettersson L, Sailaja PR, Truedsson E, Fagerstrom S, Pahlman S, Larsson C (1999)

Novel and classical protein kinase C isoforms have different functions in proliferation, survival and differentiation of neuroblastoma cells.
Int J Cancer 81:494-501

Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC (1997)

Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel.
Nat Genet 15(1):62-9

Zu L, Figueroa KP, Grewal R, Pulst SM (1999)

Mapping of a new autosomal dominant spinocerebellar ataxia to chromosome 22.
Am J Hum Genet 64:594-9

Zuhlke C, Hellenbroich Y, Dalski A, Kononowa N, Hagenah J, Vieregge P, Riess O, Klein C, Schwinger E (2001)

Different types of repeat expansion in the TATA-binding protein gene are associated with a new form of inherited ataxia.
Eur J Hum Genet 9(3):160-4

Zuhlke C, Gehlken U, Hellenbroich Y, Schwinger E, Burk K (2003)

Phenotypical variability of expanded alleles in the TATA-binding protein gene. Reduced penetrance in SCA17?
J Neurol ;250(2):161-3

8 Anhang

Tabelle 31: Intronsche Primer zur Amplifikation der Exone des PRKCG-Gens			
Bezeichnung	Sequenz 5' 3'	GC-Gehalt [%]	Schmelztemperatur Tm [°C]
2756_SCA14_Ex01_F	TGG TCC CTG CTA CGT TTC TG	55,0	59,4
2757_SCA14_Ex01_R	GGA GTC TGC ACC CCT AGT CC	65,0	63,4
2758_SCA14_Ex02_F	TAC CCC TTT CTG CAC TGA CC	55,0	59,4
2759_SCA14_Ex02_R	AGA GAA CAC GTG TGT CAA GCA	47,6	57,9
2760_SCA14_Ex03_F	TGC CTC CGT CTG TGT CTC TA	55,0	59,4
2761_SCA14_Ex03_R	AGC TCC CCC TAT CTC TCC AG	60,0	61,4
2762_SCA14_Ex04_F	CCC CCT AAG CCA GTC TTC TC	60,0	61,4
2763_SCA14_Ex04_R	ATT TCC CGG AAC CCA GAC	55,6	56,0
2764_SCA14_Ex05_F	GTG CTA CCC GCA GCT TTC	61,1	58,2
2765_SCA14_Ex05_R	CAC AAG TGC CTT GGG TCA G	57,9	58,8
2766_SCA14_Ex06_F	CCT GGA TCT CTA ACC CGT CA	55,0	59,4
2767_SCA14_Ex06_R	TGT CAG CTG TCA TTG CCT TC	50,0	57,3
2768_SCA14_Ex07_F	ATG AGC TCG GCT CTG CAC	61,1	58,2
2769_SCA14_Ex07_R	CCA CAC ACA GAT GGA GAT GG	55,0	59,4
2770_SCA14_Ex08_F	GCC TCT GGT CTC CGT CTG TA	60,0	61,4
2771_SCA14_Ex08_R	ACT CAG GGG TGG AAG GAA AG	55,0	59,4
2772_SCA14_Ex09_F	CCA CAC ACA GAT GGA GAT GG	50,0	57,3
2773_SCA14_Ex09_R	AAA ACT GCC TCC ATT CAA CG	45,0	55,3
2774_SCA14_Ex10_F	TGC CTC TGG CTC TTT CTT TC	50,0	57,3
2775_SCA14_Ex10_R	CAC AGA CAT CCT CCC TTT CC	55,0	59,4
2776_SCA14_Ex11_F	ACT GGC CCT TTT GGA ACT GT	50,0	57,3
2777_SCA14_Ex11_R	CGC CCC CTC CAT CCT TAC	66,7	60,5
2778_SCA14_Ex12.13_F	CTA AGC CCA TGC ACT TCT CC	55,0	59,4
2779_SCA14_Ex12.13_R	ATT CAA ATC CCT TCC CTT CC	45,0	55,3
2780_SCA14_Ex14_F	TCA ACA CTT CTT GCA ATT CCT G	40,9	56,5
2781_SCA14_Ex14_R	GGA TCT CAA AGC GTG ACC AG	55,0	59,4
2782_SCA14_Ex15_F	CAT CAT GAT TCC CTG CCT TC	50,0	57,3
2783_SCA14_Ex15_R	CA ACC TTC TGG GCT CCT TT	50,0	57,3
2784_SCA14_Ex16_F	GAG GAG GGT GTG GAA GGT TT	55,0	59,4
2785_SCA14_Ex16_R	CTG GAG AAG CTG GGA GTC AG	60,0	61,4
2786_SCA14_Ex17_F	CTA CCT GTC CGG CAC TCT GT	60,0	61,4
2787_SCA14_Ex17_R	CCT TCA GGG ACC AGG TTT TT	50,0	57,3
2788_SCA14_Ex18_F	CTT TCC CTC CCC CAC GTC	66,7	60,5
2789_SCA14_Ex18_R	ACG TTG GGG ACA CCT AGT GG	60,0	61,4

8 Anhang

Tabelle 32: Introniche Primer zur Amplifikation der Exone des FGF14 Gens			
Bezeichnung	Sequenz 5' 3'	GC-Gehalt	Schmelztemperatur
		[%]	Tm [°C]
2766_FGF14_Ex01a_F	AGG GCG AGC CAC GGT CTG	72,2	62,8
2767_FGF14_Ex01a_R	GAG GGA AGG AGC CTG GAG AA	60,0	61,4
2756_FGF14_Ex01b_F	AAT CAC TGA GAA GTC TCA AAG	38,1	54,0
2757_FGF14_Ex01b_R	CTG CAG ATC TAG CTC GAT GA	50,0	57,3
2758_FGF14_Ex02_F	GCC TGT TTC TGT GGC TTA CT	50,0	57,3
2759_FGF14_Ex02_R	AAC TAT GTA ACT GGT GGC CTG A	45,5	58,4
2760_FGF14_Ex03_F	TAT TGT CGC ATC AGC CCT TC	50,0	57,3
2761_FGF14_Ex03_R	TTG TTG TTG CTG CCA TTG TT	40,0	53,2
2762_FGF14_Ex04_F	GTA TAT CCG GTC CTC CAT GC	55,0	59,4
2763_FGF14_Ex04_R	TCC AGC ACT TTG TGA AGG TT	45,0	55,3
2764_FGF14_Ex05_F	CTC TGT GGG CTG GAA ATG A	52,6	56,7
2765_FGF14_Ex05_R	AGC AGG AAT GTC TGG TGA GG	55,0	59,4

8 Anhang

Tab. 33: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der 18 Exone des PRKCG-Gens

Neben den PCR-Bedingungen für die 18 PCR-Fragmente, sind die jeweiligen Fragmentgrößen sowie die Exongrößen angegeben. Die hier präsentierten PCR-Bedingungen basieren auf Optimierungstests ausgehend von einem PCR-Standardprotokoll.

Exon	Exon-Größe [bp]	Primerpaar	optimale Annealing-temperatur [°C]	Denaturierungstemperatur [°C]	Zeiten für Annealings- und Extensions-Phase [s]	Größe des PCR-Fragments [bp]
1	170	2756_Ex01F 2757_Ex01R	61,8	95	60	250
2	32	2758_Ex02F 2759_Ex02R	61,8	95	60	162
3	83	2760_Ex03F 2761_Ex03R	61,8	95	60	249
3b	83	4950_Ex03F 4951_Ex03R		95	60	
4	112	2762_Ex04F 2763_Ex04R	61,8	95	60	201
5	132	2764_Ex05F 2765_Ex05R	61,8	95	60	231
6	157	2766_Ex06F 2767_Ex06R	61,8	95	60	239
7	135	2768_Ex07F 2769_Ex07R	61,8	95	60	239
8	88	2770_Ex08F 2771_Ex08R	61,8	95	60	195
9	30	2772_Ex09F 2773_Ex09R	61,8	95	60	196
10	153	2774_Ex10F 2775_Ex10R	56,3	95	60	227
11	189	2776_Ex11F 2777_Ex11R	61,8	95	60	235
12/13	92/63	2778_Ex12/13F 2779_Ex12/13R	56,3	95	60	335
14	139	2780_Ex14F 2781_Ex14R	56,3	95	60	224
15	81	2782_Ex15F 2783_Ex15R	61,8	95	60	211
16	108	2784_Ex16F 2785_Ex16R	61,8	95	60	212
17	141	2786_Ex17F 2787_Ex17R	61,8	95	60	239
18	189	2788_Ex18F 2789_Ex18R	61,8	95	60	247

8 Anhang

Tab. 34: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der 5 Exone des FGF14-Gens

Neben den PCR-Bedingungen für die 6 PCR-Fragmente sind die jeweiligen Fragmentgrößen sowie die Exongrößen angegeben. Die hier präsentierten PCR-Bedingungen basieren auf Optimierungstests ausgehend von einem PCR-Standardprotokoll.

Exon	Exon-Größe [bp]	Primerpaar	optimale Annealing-temperatur [°C]	Denaturierungstemperatur [°C]	Zeiten für Anealings- und Extensionsphase	Größe des PCR-Fragments [bp]
1a	193	3020_Ex01aF 3021_Ex01aR	58,4	95	60	373
1b	193	3022_Ex01bF 3023_Ex01bR	52,5	95	60	362
2	111	3024_Ex02F 3025_Ex02R	55,0	95	60	162
3	104	3026_Ex03F 3027_Ex03R	55,0	95	60	423
4	199	3028_Ex03F 3029_Ex04R	55	95	60	428
5	283	3030_Ex05F 3031_Ex05R	58,4	95	60	388

8 Anhang

Tab. 35: dHPLC-Analysebedingungen für SCA 14 (PRKCG) im High-Throughput-Modus											
Exon	Analyse- temperatur [°C]	Laden		Gradient				Waschen		Equilibrieren	
		0,0 min		Start 0,1 min		Stopp 2,1 min		2,2 min		2,4 min	
	A%	B%	A%	B%	A%	B%	A%	B%	A%	B%	
1	63,5	46	54	43	57	33	67	46	54	46	54
2	61,5	51	49	48	52	38	62	51	49	51	49
3	60,9	47	53	44	56	34	66	47	53	47	53
	65,5	51	49	48	52	38	62	51	49	51	49
4	63,3	48	52	45	55	35	65	48	52	48	52
5	66,1	47	53	44	56	34	66	47	53	47	53
6	60,2	47	53	44	56	34	66	47	53	47	53
7	64,6	47	53	44	56	34	66	47	53	47	53
8	60,0	48	52	45	55	35	65	48	52	48	52
	63,0	51	49	48	52	38	62	38	62	38	62
9	59,8	50	50	47	53	37	63	50	50	50	50
10	59,7	46	54	43	57	33	67	46	54	46	54
	63,9	52	48	49	51	39	61	52	48	52	48
11	62,6	46	54	43	57	33	67	46	54	46	54
	67,0	53	47	50	50	40	60	53	47	53	47
12,13	60,9	43	57	40	60	30	70	43	57	43	57
	62,8	45	55	42	58	32	68	45	55	45	55
14	61,5	47	53	44	56	34	66	47	53	47	53
	63,8	50	50	47	53	37	63	50	50	50	50
15	60,4	49	51	46	54	36	64	49	51	49	51
16	61,7	49	51	46	54	36	64	49	51	49	51
	63,2	51	49	48	52	38	62	38	62	38	62
17	63,0	48	52	45	55	35	65	48	52	48	52
18	63,6	46	54	43	57	33	67	46	54	46	54
	64,9	48	52	45	55	35	65	48	52	48	52

Dargestellt sind die Anteile an Puffer A und B für den gesamten Analysezeitraum von 2,5 Minuten sowie die dabei verwendeten Analysetemperaturen für jedes PCR-Fragment. Der Analysezeitraum kann in vier verschiedene Intervalle eingeteilt werden (Laden, Gradient, Waschen und Equilibrieren), wobei das Mischungsverhältnis aus den beiden Puffern A und B vom gewählten Startgradienten, 0,1 min. nach Analysebeginn, abhängt.

8 Anhang

Tab. 36: dHPLC-Analysebedingungen für FGF 14 im High-Throughput-Modus											
Exon	Analyse- temperatur [°C]	Laden		Gradient				Waschen		Equilibrieren	
		0,0 min		Start 0,1 min		Stopp 2,1 min		2,2 min		2,4 min	
		A%	B%	A%	B%	A%	B%	A%	B%	A%	B%
1a	64,1	42	58	39	61	29	71	42	58	42	58
	66,9	44	56	41	59	31	69	44	56	44	56
1b	56,4	42	58	39	61	29	71	42	58	42	58
	57,5	43	57	40	60	30	70	43	57	43	57
2	57,8	48	52	45	55	35	65	48	52	48	52
	59,0	49	51	46	54	36	64	49	51	49	51
3	57,4	45	55	42	58	32	68	45	55	45	55
4	55,6	42	58	39	61	29	71	42	58	42	58
5	58,2	42	58	39	61	29	71	42	58	42	58
	61,0	46	54	43	57	33	67	46	54	46	54

Dargestellt sind die Anteile an Puffer A und B für den gesamten Analysezeitraum von 2,5 Minuten sowie die dabei verwendeten Analysetemperaturen für jedes PCR-Fragment. Der Analysezeitraum kann in vier verschiedene Intervalle eingeteilt werden (Laden, Gradient, Waschen und Equilibrieren), wobei das Mischungsverhältnis aus den beiden Puffern A und B vom gewählten Startgradienten, 0,1 min. nach Analysebeginn, abhängt.

IV Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die hervorragenden und beispielhaften Arbeitsbedingungen möchte ich ganz besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß und meinem Betreuer Dr. Peter Bauer danken. Herrn Prof. Dr. Ludger Schöls möchte ich als Gutachter sowie für die wertvolle Hilfestellung bei neurologischen Aspekten herzlich danken.

Großer Dank gebührt des Weiteren allen Mitarbeitern des molekular-genetischen Labors der Medizinischen Genetik Tübingen für die jederzeit kompetente technische Unterstützung und die äußerst angenehme und herzliche Zusammenarbeit.

Meinen Eltern und Freunden (insbesondere Marion Gabur, Markus Grasse und Dominik Skauradszun), die mich mit ihrer moralischen Unterstützung immer wieder ermutigt haben die Dissertation fertig zu stellen, bin ich aus tiefstem Herzen dankbar.

V Lebenslauf

Name Alexander Rentschler
Geburtsdatum 05.12.1974
Geburtsort Reutlingen
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbesuch

1981-1985 Hermann-Kurz-Schule (Grundschule), Reutlingen
1985-1995 Johannes-Kepler-Gymnasium, Reutlingen
1995 Abitur

Studium

1996-2004 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
1999 Ärztliche Vorprüfung
2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05.05.2004 Abschluss der Ärztlichen Prüfung

seit 10/2005 Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Urologie des
Universitätsklinikums Dresden (Direktor Prof. Dr. Dr. h.c. M. Wirth)