

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Humangenetik

Direktor: Prof. Dr. med. A. Gal

Mutationsspektrum der spätinfantilen und juvenilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Kirstin Poweleit
aus
Hamburg

Hamburg, 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 23.01.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Andreas Gal

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. C. Mühlhausen

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. A. Kohlschütter

*Für meine Eltern Gudrun und Reinhold
und meine Schwester Julia*

*Wenn du willst, dass Menschen ein Schiff bauen,
gib ihnen nicht einen Plan oder Hammer und
Nägel, sondern entzünde in Ihnen die Sehnsucht
nach dem weiten offenen Meer.*

~ Antoine de Saint-Exupéry ~

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	01
1.1	Einführung.....	01
1.2	Spätinfantile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL2).....	04
1.3	Juvenile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL3).....	05
1.4	Diagnostik.....	06
1.5	Therapie.....	09
1.6	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Patientenkollektiv.....	12
2.2	Materialien.....	12
2.2.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	12
2.2.2	Nucleotide und Nukleinsäuren.....	14
2.2.3	Enzyme.....	14
2.2.4	Primer.....	14
2.2.4.1	Primer <i>CLN2</i>	14
2.2.4.2	Primer <i>CLN3</i>	15
2.2.5	Puffer und Lösungen.....	17
2.2.6	Gele.....	19
2.2.7	Arbeitsgeräte.....	20
2.3	Methoden.....	21
2.3.1	Polymerase-Ketten Reaktion (PCR).....	21
2.3.1.1	Prinzip.....	21
2.3.1.2	Durchführung.....	22
2.3.2	Agarosegelelektrophorese.....	24
2.3.3	Single strand conformation polymorphism Analyse (SSCP).....	24
2.3.3.1	Prinzip	24
2.3.3.2	Durchführung.....	25
2.3.4	Silberfärbung.....	26
2.3.4.1	Prinzip.....	26
2.3.4.2	Durchführung.....	26
2.3.5	Sequenzierung.....	27

2.3.5.1	Prinzip.....	27
2.3.5.2	Durchführung.....	28
2.3.6	Restriktionsenzymverdau.....	30
2.3.6.1	Prinzip.....	30
2.3.6.2	Durchführung.....	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Ergebnisse für <i>CLN2</i>	32
3.1.1	5'UTR/ Exon 01.....	32
3.1.1.1	Polymorphismus c.1-203T>C.....	32
3.1.1.2	Polymorphismus c.1-231G>A.....	33
3.1.2	Exon 02.....	33
3.1.3	Exon 03.....	33
3.1.3.1	Pathogene Mutation c.225A>G (p.=).....	34
3.1.4	Exon 04.....	34
3.1.4.1	Pathogene Mutation c.237C>G (p.Tyr79X).....	35
3.1.5	Exon 05.....	35
3.1.6	Intron 05/ Exon 06.....	35
3.1.6.1	Pathogene Mutation c.509-1G>C.....	37
3.1.6.2	Pathogene Mutation c.586delC.....	38
3.1.6.3	Pathogene Mutation c.622C>T (p.Arg208X).....	39
3.1.6.4	Polymorphismus c.508+26G>T.....	40
3.1.7	Intron 06/ Exon 07.....	40
3.1.7.1	Pathogene Mutation c.833A>G (p.Gln278Arg).....	40
3.1.7.2	Pathogene Mutation c.845G>A (p.Ser282Asn).....	41
3.1.7.3	Polymorphismus c.687+32T>C.....	43
3.1.8	Exon 08.....	43
3.1.9	Exon 09.....	43
3.1.10	Exon 10.....	44
3.1.11	Exon 11.....	44
3.1.12	Exon 12.....	44
3.1.12.1	Pathogene Mutation c.1476dupAT.....	45
3.1.12.2	Polymorphismus c.1542A>T (p.=).....	46
3.1.13	Exon 13.....	46
3.2	Ergebnisse für <i>CLN3</i>	47

3.2.1	Exon 01.....	47
3.2.2	Exon 02.....	47
3.2.3	Exon 03.....	47
3.2.4	Exon 04.....	48
3.2.5	Exon 05.....	48
3.2.6	Exon 06.....	48
3.2.7	Exon 07.....	48
3.2.8	Exon 08.....	48
3.2.8.1	Pathogene Mutation c.597C>A (p.Tyr199X).....	49
3.2.8.2	Polymorphismus c.582G>T (p.=).....	49
3.2.9	Exon 09.....	50
3.2.10	Exon 10.....	50
3.2.11	Exon 11.....	50
3.2.12	Exon 12.....	50
3.2.13	Exon 13.....	51
3.2.13.1	Pathogene Mutation c.992delTT.....	51
3.2.13.2	Pathogene Mutation c.1000C>T (p.Arg334Cys).....	52
3.2.14	Exon 14.....	53
3.2.15	Exon 15.....	53
3.2.15.1	Pathogene Mutation c.1247A>G (p.Asp416Gly).....	53
3.2.15.2	Polymorphismus c.1211A>G (p.His404Arg).....	55
4	Diskussion	56
4.1	Single strand conformation polymorphism Analyse.....	57
4.2	Spätinfantile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL2).....	58
4.3	Juvenile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL3).....	65
4.4	Diskussion der Zielsetzung.....	68
5	Zusammenfassung	70
6	Anhang	71
6.1	Pathogene Mutationen/ Polymorphismen <i>CLN2</i>	71
6.1.1	Gefundene pathogene Mutationen <i>CLN2</i>	71
6.1.2	Beschriebene pathogene Mutationen <i>CLN2</i>	71
6.1.3	Gefundene Polymorphismen <i>CLN2</i>	73
6.1.4	Beschriebene Polymorphismen <i>CLN2</i>	74
6.2	Pathogene Mutationen/ Polymorphismen <i>CLN3</i>	74

6.2.1	Gefundene pathogene Mutationen <i>CLN3</i>	74
6.2.2	Beschriebene pathogene Mutationen <i>CLN3</i>	75
6.2.3	Gefundene Polymorphismen <i>CLN3</i>	76
6.2.4	Beschriebene Polymorphismen <i>CLN3</i>	76
7	Abkürzungsverzeichnis	77
8	Literaturverzeichnis	81
9	Lebenslauf	93
10	Danksagung	94
11	Erklärung	95

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL) stellen eine Gruppe der am weitesten verbreiteten und bislang noch unheilbaren neurodegenerativen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter dar. Sie werden mit einer weltweiten Inzidenz von 1:100.000 zum größten Teil autosomal - rezessiv vererbt und einzelne gehören zur Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten. Zu denen zählen über 40 genetisch bedingte Stoffwechselerkrankungen, die durch eine Funktionsstörung in den Lysosomen der Zellen ausgelöst werden. Die Aufgabe der Lysosomen ist der Abbau von körpereigenen und körperfremden Substanzen.

Erstmalig erfolgten klinischen Beschreibungen 1826 durch den deutsch-norwegischen Landarzt Dr. Otto - Christian Stengel (1794-1890), der die juvenile Form dieser Erkrankung bei vier betroffenen Kindern eines gesunden Elternpaares in einer mittelnorwegischen Bergarbeiterstadt beschrieb [Stengel, 1826]. Zunächst wurden die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen zusammen mit den Gangliosidosen als „amaurotische familiäre Idiotie“ bezeichnet [Sachs, 1896]. Weitere Beschreibungen der Erkrankung erfolgten 1903 von dem britischen Neuropädiater Frederick E. Batten (1865-1918) [Batten, 1903] sowie den Neurologen Heinrich Vogt (1875-1957) 1905 [Vogt, 1905] und Walther Spielmeyer (1879-1935) 1908 [Spielmeyer, 1908]. Durch Ernst Klenk wurde 1939 publiziert, dass es sich bei der Erkrankung um eine Stoffwechselerkrankung handelt, bei der sich Substanzen im Gehirn und in den Körperzellen ansammeln [Klenk, 1939]. 1969 schlugen Zeman und Dyken die Bezeichnung neuronale Ceroid-Lipofuszinose vor. Sie fanden heraus, dass das Speichermaterial hinsichtlich seiner Färbereigenschaften und seiner Autofluoreszenz den Lipopigmenten Ceroid und Lipofuscin ähnelt [Zeman et Dyken, 1969].

Klinisch zeigen sich bei den Unterformen der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen eine oder mehrere der charakteristischen Hauptsymptome wie Verlust der Sehkraft, fortschreitenden geistigen Abbau, epileptischen Anfällen, motorischen Bewegungsstörungen, Gehirnatrophie sowie einer reduzierten Lebenserwartung. Außerdem ist ihnen gemeinsam die intrazelluläre Speicherung von Ceroidlipofuszin [Boustany, 1992]. Die Speicherung erfolgt in sämtlichen Geweben des Körpers [Williams, 2006], doch es kommt nur im Nervensystem und an der Retina zu wesentlichen Schäden [Hoffmann, 2004]

Zunächst wurden die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen nach ihrem Manifestationsalter in die infantile, spätinfantile, juvenile oder adulte Form eingeteilt. Durch die fortschreitende genetische Analyse, wurde jedoch im Jahre 2000 eine neue Klassifikation entsprechend des Genortes eingeführt [Gardiner et al., 2000]. Aktuell sind 10 Unterformen der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen beschrieben, denen bisher 8 Gene zugeordnet werden konnten. Die genaue Funktion der Proteine der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen sowie die speziellen Krankheitsmechanismen sind bis heute noch weitgehend unbekannt [Jalanko et Braulke, 2009].

Eine Auflistung der verschiedenen Unterformen mit ihren Leitsymptomen, biochemischen Funktionen, dem charakteristischen Speichermaterial sowie dem Vererbungsmodus findet sich in Tabelle 1.01. Im Rahmen dieser Dissertation wird im Folgenden genauer auf die Unterformen der spätinfantilen und der juvenilen Ceroid-Lipofuszinose eingegangen.

Genetische Bezeichnung	Name	Alternative Bezeichnung	Leitsymptome	Lebenserwartung	Biochemie	Genlokus	Speichermaterial	Vererbung
CLN1	Infantile NCL (INCL)	Morbus Hagberg-Santavuori- Haltia	6 – 18 Monate Microcephalie • früher kognitiver Abbau • früher Sehverlust • späte Epilepsie	< 14 Jahre	lysosomale Palmitoyl-Protein- Thioesterase (PPT1)	1p32	LM: keine Lymphozytenvakuolen EM: granuläre Zelleinschlüsse (GROD)	autosomal rezessiv
CLN2	Spätfamiliäre NCL (LINCL)	Morbus Jansky-Bielschowsky	2 – 8 Jahre • früher kognitiver Abbau • später Sehverlust • frühe, schwere Epilepsie	10 – 15 Jahre	lysosomale Tripeptidyl-Peptidase (TPP1)	11p15	LM: keine Lymphozytenvakuolen EM: curvilineäre Zelleinschlüsse	autosomal rezessiv
CLN3	Juvenile NCL (JNCL)	Morbus Spielmeier- Vogt Batten disease	4 – 9 Jahre • später kognitiver Abbau • variabler Sehverlust • späte Epilepsie	20 – 40 Jahre	Battenin (Transmembranprotein) Lysosom	16p12	LM: Lymphozytenvakuolen EM: Fingerabdruck	autosomal rezessiv
CLN4	Adulte NCL	Morbus Kufs Morbus Parry	etwa ab 20. Lebensjahr • früher kognitiver Abbau • kein Sehverlust • frühe/ keine Epilepsie				LM: keine Lymphozytenvakuolen EM: granuläre Zelleinschlüsse (GROD), Fingerabdruck	autosomal rezessiv autosomal dominant
CLN5	Finnische Variante der Spätfamiliären NCL (vLINCL)		4 – 7 Jahre • früher kognitiver Abbau • früher Sehverlust • späte Epilepsie	10 – 30 Jahre	Transmembranprotein Lysosom	13q22	LM: keine Lymphozytenvakuolen EM: curvilineäre Zelleinschlüsse, Fingerabdruck	autosomal rezessiv
CLN6	Indische/ iberische Variante der spätfamiliären NCL		2 – 8 Jahre • früher kognitiver Abbau • früher Sehverlust • späte Epilepsie		Transmembranprotein/ Endoplasmatisches Reticulum	15q21-q23	LM: keine Lymphozytenvakuolen EM: curvilineäre Zelleinschlüsse, Fingerabdruck	autosomal rezessiv
CLN7	Türkische NCL		2. - 4. Lebensjahr • früher kognitiver Abbau • variabler Sehverlust • variable Epilepsie		MFSD8 Membranprotein	4q28.1-q28.2	LM: keine Lymphozytenvakuolen EM: curvilineäre Zelleinschlüsse, Fingerabdruck	
CLN8	Nordische Epilepsie (vJINCL)		3 – 10 Jahre • später kognitiver Abbau • kein Sehverlust • frühe Epilepsie	Normal	Transmembranprotein / Endoplasmatisches Reticulum	8p23	LM: keine Lymphozytenvakuolen EM: curvilineäre Zelleinschlüsse, granuläre Zelleinschlüsse (GROD)	autosomal rezessiv
CLN9			Schulalter				LM: keine Lymphozytenvakuolen EM: granuläre - (GROD), curvilineäre Zelleinschlüsse, Fingerabdruck	
CLN10	Kongenitale NCL		Intrauterin - erste Lebensstage Microcephalie • cerebrale Krampfanfälle	Kurz	Cathepsin D Lysosomales Enzym	11p15	LM: keine Lymphozytenvakuolen EM: granuläre Zelleinschlüsse (GROD)	autosomal rezessiv

Tabelle 1.01: Übersicht der NCL – Formen, modifiziert nach Kohlschütter [Kohlschütter, 1997]

1.2 Spätinfantile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL2)

Die spätinfantile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL2) kommt weltweit vor und ist in Deutschland, nach der juvenilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (NCL3), die zweithäufigste Form. Die erste Beschreibung der Erkrankung erfolgte 1914 von dem Neuropathologen Max Bielschowsky (1869-1940) [Bielschowsky et al., 1914]. Nach ihm wird die Erkrankung synonym auch als Morbus Jansky- Bielschowsky bezeichnet.

Die betroffenen Kinder zeigen klinisch zunächst eine unauffällige Entwicklung. Die ersten Symptome der Erkrankung äußern sich zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr in Form von schwersten myoklonalen Anfällen, die sich nur schwer medikamentös einstellen lassen und teilweise sogar völlig therapieresistent sind [Kohlschütter et al., 1997]. Zwischen dem 4. und 6. Lebensjahr macht sich eine progrediente Visusstörung bemerkbar, die schließlich zur Erblindung führt. Im Elektroencephalogramm (EEG) zeigen sich nach Photostimulation occipitale Spikes und Polyspikes [Kurlemann et al., 1994]. Im Elektroretinogramm (ERG) sind ebenfalls pathologische Veränderungen ersichtlich und im Augenhintergrund ist eine starke Maculadegeneration erkennbar. Trotz dieser

Veränderungen erscheinen die Kinder lange Zeit nicht blind [Steinfeld et al., 2002]. Während des gesamten Krankheitsverlaufs zeigt sich eine progrediente Hirnatrophie. In Abbildung 1.01 ist das kraniale MRT eines 10jährigen Patienten mit spätinfantiler NCL dargestellt. Bei den weißen Pfeilen sind Zeichen einer kortikalen Atrophie, beim roten Pfeil die charakteristische Kleinhirnatrophie zu erkennen [Steinfeld, 2010]. Die Kinder verlieren im weiteren Krankheitsverlauf



Abb. 1.01: Kranielles MRT Bild
[entnommen aus Steinfeld, 2010]

sowohl ihre motorischen als auch kognitiven Fähigkeiten und werden meist nicht älter als 10-15 Jahre [Kohlschütter et al., 2005].

Die spätinfantile neuronale Ceroid-Lipofuszinose wird autosomal - rezessiv vererbt. Das Gen ist auf Chromosom 11p15 lokalisiert [Sharp et al., 1997] und umfasst 13 Exons. Das fertige Protein besteht aus 563 Aminosäuren und kodiert ein lösliches, lysosomales Enzym, die Tripeptidyl-Peptidase I (TPPI) [Vines et al., 1999; Ezaki et al., 2000], deren physiologische Funktion bisher unklar ist. Biochemisch enthält das in den Lysosomen gespeicherte Material der Nervenzellen bei den betroffenen Patienten eine große Menge der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase [Hagopian et al., 1995; Ezaki et al., 1996]. Es sind bisher eine Reihe von pathologischen Mutationen für die spätinfantile neuronale Ceroid-Lipofuszinose beschrieben worden, die zu einer Aktivitätsminderung bzw. zu einem Aktivitätsverlust des Enzyms führen. Eine Auflistung der bisher veröffentlichten Auffälligkeiten findet sich im Anhang. Die zwei häufigsten Mutationen sind c.509-1G>C und p.Arg208X [Zhong et al., 1998; Sleat et al., 1999]. Der Krankheitsverlauf zeigt sich bei den unterschiedlichen Mutationen sehr variabel, teilweise auch verzögert, da bei den verschiedenen Mutationen eine unterschiedlich hohe enzymatische Restaktivität vorhanden ist [Steinfeld et al., 2010].

1.3 Juvenile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL3)

Die juvenile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL3) ist in Deutschland die häufigste Form [Claussen et al., 1992]. Sie wird synonym auch als Morbus Spielmeyer-Voigt oder Batten disease bezeichnet. Die ersten Symptome der Erkrankung treten klassischer Weise im frühen Schulalter auf, zuvor ist die Entwicklung komplett unauffällig. Charakteristisch fällt zunächst ein Visusverlust auf, der sich im weiteren Verlauf progredient verschlechtert und schließlich zur Erblindung führt [Kohlschütter et al., 1988]. In der Fundoskopie zeigt sich eine Retinopathie und das pathologisch veränderte Elektroretinogramm erlischt zunehmend. Die betroffenen Kinder erblinden meist innerhalb von 1 bis 2 Jahren. Außerdem kommt es zu einer Abnahme der Konzentrations- und Denkfähigkeit sowie einer zunehmenden dementiellen Entwicklung. Des Weiteren zeigen sich cerebrale Krampfanfälle und zunehmende parkinsonartige Bewegungsstörungen [Kohlschütter et al., 2005]. Durch den späteren Beginn

der Erkrankung mit den einzelnen Symptomen, erleben die Patienten die Erkrankung und den Verlust ihrer Fähigkeiten bewusst mit, was nicht selten mit einer Angstsymptomatik, Halluzinationen und/oder depressiven Symptomen einhergeht. Außerdem können aggressive Tendenzen und Schlafprobleme bei den Betroffenen auftreten [Williams et al., 2006]. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu einem Verlust aller mentalen sowie motorischen Fähigkeiten und schließlich zum Tode im jungen Erwachsenenalter [Kohlschütter et al., 1997].

Das *CLN3*-Gen ist auf Chromosom 16p12 [International Batten disease consortium, 1995] lokalisiert, umfasst 15 Exons und kodiert Battenin, ein lysosomales Membranprotein, welches sich aus 438 Aminosäuren zusammensetzt [Järvelä et al., 1998]. Die Funktion des Proteins ist bisher nicht im einzelnen geklärt, es ist aber u.a. für die Aufrechterhaltung des pH-Werts in den Lysosomen, den Aminosäuretransport in die Zelle, den intrazellulären vesikulären Transport und Membranfusionen zuständig [Jalanko et al., 2009]. Die Erkrankung wird autosomal - rezessiv vererbt. Auch hier sind zahlreiche pathogene Mutationen und Polymorphismen beschrieben, wobei die bisher veröffentlichten im Anhang beschrieben sind. Die häufigste krankheitsassoziierte Mutationen, die 90 % der Allele ausmacht, ist eine 1,02-kb-Deletion [Järvelä et al., 1998], wobei es zur Deletion von zwei Exons kommt.

1.4 Diagnostik

Für die Diagnostik der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen stehen heute mehrere Methoden zur Verfügung. Bei einem gemeinsamen Auftreten von Epilepsie, Entwicklungsverzögerung, Bewegungs- sowie Sehstörungen sollte immer an eine neuronale Ceroid-Lipofuszinose gedacht werden. Zu Beginn der Erkrankung liegen jedoch nicht alle Symptome gleichzeitig vor [Steinfeld, 2010]. Daher ist ein Vorgehen anhand des Erkrankungsalters und der charakteristischen Leitsymptome sinnvoll. Die Abbildung 1.02 zeigt eine Übersicht zum möglichen diagnostischen Vorgehen [Schulz, www.ncl-netz.de].

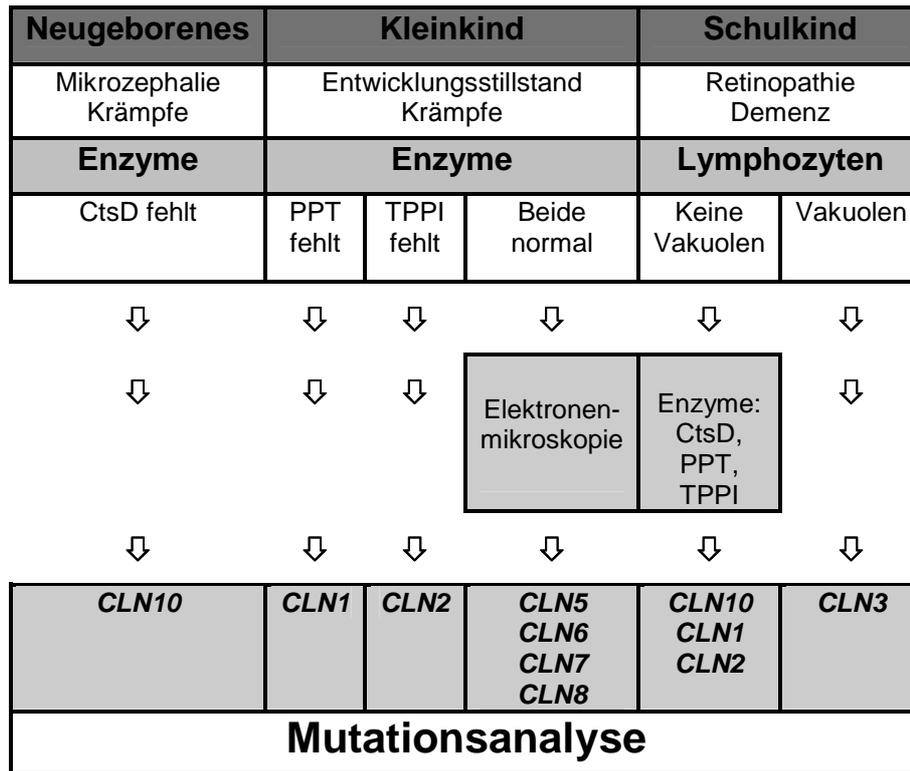


Abb. 1.02: Diagnostisches Vorgehen bei NCL [Schulz: www.ncl-netz.de]

Treten die ersten Symptome, wie Mikrozephalie und zerebrale Krampfanfälle, bereits in den ersten Lebenstagen auf, so handelt es sich vermutlich um eine kongenitale neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL10). Es erfolgt die Messung der Cathepsin D Aktivität, die bei den betroffenen Kindern deutlich vermindert ist. Zur weiterführenden Diagnostik empfiehlt sich eine Mutationsanalyse des *CLN10*-Gens.

Bei den ersten klinischen Symptomen im Kleinkindalter erfolgt zunächst die enzymatische Messung der Aktivität der Palmitoyl-Protein-Thioesterase (PPT) und der Tripeptidyl-Peptidase I (TPPI). Die Messung der Aktivität der Enzyme kann anhand von Trockenblutproben erfolgen [Lukacs et al., 2003]. Dabei werden Blutropfen auf einen Filterpapierstreifen gegeben, wie er auch beim Neugeborenen-Screening verwendet wird, und dann in ein spezialisiertes Labor versendet. Ist die entsprechende Enzymaktivität stark vermindert oder gar nicht vorhanden, spricht dies für die Diagnose einer infantilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (*CLN1*) bzw. einer spätinfantilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (*CLN2*). Zusätzlich sollte eine Mutationanalyse des entsprechenden Gens erfolgen.

Sollten die Enzymaktivitäten jedoch normal sein, empfiehlt sich die Untersuchung von Blutlymphozyten oder Hautfibroblasten mittels der Elektronenmikroskopie. Allen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose gemeinsam ist die Speicherung von Ceroidlipofuszin in den Geweben, wobei elektronenmikroskopisch drei verschiedene Erscheinungsmuster des Speichermaterials vorliegen können [Kohlschütter et al., 2005]. Dabei finden sich bei der infantilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose typischerweise granuläre Zeileinschlüsse (GROD), auf Abbildung 1.03 dargestellt, und bei der spätinfantilen NCL curvilineare Einschlusskörperchen [Abbildung 1.04]. Sollte sich bei normalem Enzymtest in der Elektronenmikroskopie typisches Speichermaterial finden lassen, so handelt es sich um eine Variante der klassischen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose. Hierzu zählen die NCL5, NCL6, NCL7 und NCL8. Welches

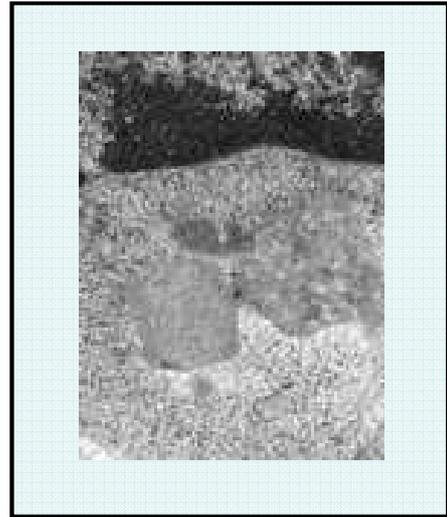


Abb. 1.03: Granuläre Einschlüsse [Kohlschütter, 1997]

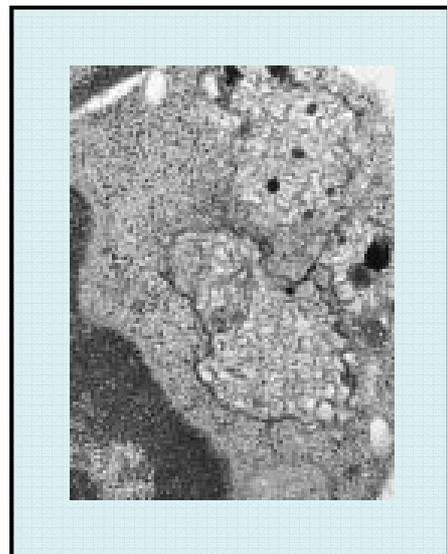


Abb. 1.04: Curvilineare Einschlüsse [Kohlschütter, 1997]

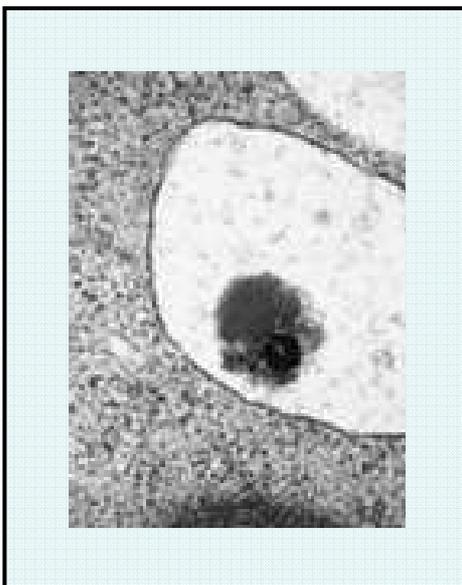


Abb. 1.05: Vakuolen mit Fingerabdruckprofilen [Kohlschütter, 1997]

Speichermaterial hier typischerweise vorliegt, ist aus Tabelle 1.01 zu entnehmen. Als weiterführende Diagnostik erfolgt auch hier eine Mutationsanalyse. Sind die ersten klinischen Symptome im Schulalter zu bemerken, sollte zunächst ein Blutaussstrich durchgeführt werden. Falls sich hier membranbegrenzte Lymphozytenvakuolen mit Fingerabdruckprofilen nachweisen las-

sen [Abbildung 1.05], ist die Diagnose einer juvenilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (NCL3) gesichert. Ergänzend sollte jedoch zusätzlich eine molekulargenetische Diagnostik erfolgen. Des Weiteren ist bei betroffenen Familien eine pränatale Diagnostik möglich. Dabei sind sowohl eine elektronenmikroskopische Untersuchung aus Chorionzotten oder Amnionzellen, als auch eine molekulargenetische Diagnostik möglich. Insgesamt ist für die Patienten und ihre Familien eine rasche Diagnose wichtig, da palliative Behandlungsmöglichkeiten bestehen und für die weitere Familienplanung eine genetische Beratung erfolgen kann.

1.5 Therapie

Für sämtliche Formen der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen gibt es aktuell keine Heilmethode. Es ist aber in den letzten Jahren gelungen, einzelne Symptome in den verschiedenen Krankheitsabschnitten palliativ zu behandeln und damit ein schweres Leiden der Betroffenen zu verhindern. Für die Betroffenen und ihre Familien ist es wichtig, dass sie durch die komplexen Symptome sowohl bei medizinischen, psychischen, pädagogischen als auch sozialen Problemen optimal unterstützt werden.

Inzwischen konnten Erfahrungen zur Wirkung von einzelnen Medikamenten bei betroffenen Patienten gesammelt werden. Hierbei hat sich zum Beispiel bei der Behandlung der Epilepsie eine Kombinationstherapie von Valproinsäure und Lamotrigin sowie Topiramaten und Levetiracetam bewährt. Bei Myoklonien wurden Piracetam und Zonisamid erfolgreich eingesetzt. Die parkinson-ähnlichen Bewegungsabläufe, die bei der juvenilen Form auftreten, können mit den Antiparkinsonmedikamenten Levodopa/ Carbidopa günstig beeinflusst werden. Bei depressiven Symptomen werden zum Beispiel Citalopram und Sertralin eingesetzt, sowie Baclofen und Tetrazepam bei muskulärer Spastik und Kontrakturen. [Steinfeld, 2010] Auch eine spezielle Schmerztherapie bis zur Behandlung mit Opiaten kann notwendig werden. Während des gesamten Krankheitsverlaufs ist eine psychotherapeutische Mitbehandlung sowohl der Patienten, als auch der Angehörigen wünschenswert. Bei Schluckstörungen ist in späteren Stadien meistens die

Anlage einer perkutanen endoskopischen Gastrostomie (PEG)-Sonde sinnvoll, damit unter anderem Aspirationspneumonien verhindert werden können. Im Endstadium ist dann eine Sterbebegleitung mit palliativmedizinischer Betreuung hilfreich.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Therapieansätze bei den neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen untersucht. Die Untersuchungen erfolgten bisher sowohl in Tiermodellen, als auch schon in kleineren Patientengruppen. Eine Möglichkeit ist eine Enzymersatztherapie, die bei den Formen mit Enzymdefekten (*CLN1*, *CLN2*) in Frage kommt und sich in der Entwicklungsphase befindet. Beim Morbus Gaucher, den Mukopolysaccharidosen I, II, VI, Morbus Fabry und Morbus Pompe hat sich diese Therapie bereits bewährt [Beck, 2007].

In Genthapiestudien von Passini und Mitarbeitern wurden einem *CLN2* Mausmodell Adeno-assoziierte Viren, die das intakte *CLN2*-Gen enthielten, an verschiedenen Stellen des Gehirns injiziert. Es zeigte sich bei den so behandelten Mäusen in den injizierten und angrenzenden Arealen eine Aktivität des TPPI Enzyms sowie eine deutliche Reduktion des elektronenmikroskopisch nachweisbaren Speichermaterials [Passini et al., 2006]. Durch weitere Forschungen mit verschiedenen Viren konnte schließlich eine Verbesserung der neurologischen Symptomatik, wie das Gangbild und epileptische Anfälle, erreicht werden. Des Weiteren zeigte sich eine höhere Lebenserwartung [Sondhi et al., 2007]. Daraufhin erfolgten die ersten Studien an 10 betroffenen Patienten, denen das Virus an 12 verschiedenen Stellen ins Gehirn injiziert wurde. Ein Proband starb 49 Tage nach der Injektion nach einem Status epilepticus, bei den anderen wurde ein milderer Verlauf der Erkrankung beobachtet [Worgall et al., 2008]. Weitere Studien hierzu werden aktuell von der Weill Medical College der Cornell University in New York durchgeführt.

Ein weiterer Forschungsansatz ist die Therapie mit dem Medikament Mycophenolate mofetil (Cellcept[®]). Dies führt zur Immunsuppression und wird bisher zur Prophylaxe bei Transplantationsabstoßungsreaktionen erfolgreich, auch bei Kindern, eingesetzt. Zurzeit läuft eine Phase 2 Studie an der University of Rochester, New York, welche von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen ist.

Flupirtin ist ein Medikament aus der Gruppe der zentral wirkenden, nicht-opioiden Analgetika. Dhar et al. beschrieben 2002, dass es auch eine Apoptose- hemmende Wirkung besitzt, so dass es in der Behandlung der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen evt. ein verlangsamtes Fortschreiten der Erkrankung bewirken kann [Dhar et al., 2002].

Des Weiteren erfolgten erste klinische Studien im Bereich der Stammzelltherapie. 2006 genehmigte die Food and Drug Administration (FDA) eine Phase I Studie mit HuCNS-SC[®], welches von dem Unternehmen StemCells, Inc entwickelt wurde. Dabei handelt es sich um menschliche neurale Stammzellen, die bei Patienten mit infantiler und spätinfantiler Ceroid-Lipofuszinose eingesetzt wurden. Eine weitere Beobachtungsstudie dazu läuft noch.

1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit ist es, mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR), der single strand conformation polymorphism Analyse (SSCP) sowie der DNA-Sequenzierung eine Mutationsanalyse bei Patienten, bei denen klinisch die Diagnose einer neuronalen Ceroid-Lipofuszinose gestellt wurde, durchzuführen. Durch den Vergleich der bekannten Sequenz des *CLN2*- [Liu, 1998] und *CLN3*-Gens [Mitchison, 1997] können so einzelnen Mutationen nachgewiesen werden. Des Weiteren ist es Ziel, die Diagnostik zu erleichtern und eine bessere Zuordnung der Patienten zu einem bestimmten Subtyp der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen zu gewährleisten. Außerdem sollen die Ergebnisse dazu beitragen, dass bei betroffenen Familien schon pränatal eine entsprechende molekulargenetische Mutationsanalyse durchgeführt werden kann. Eine Früherkennung ermöglicht es den Familien für die weitere Familienplanung eine mögliche Weitervererbung zu bedenken oder sich bei möglicher Diagnosefindung auf den tödlichen Krankheitsverlauf vorzubereiten.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurde die genomische DNA von 38 nicht miteinander verwandten Patienten untersucht. Das Patientenblut oder die bereits isolierte DNA wurde dem Institut für Humangenetik von den behandelnden Ärzten zur Verfügung gestellt, nachdem diese klinisch die Diagnose einer neuronalen Ceroid-Lipofuszinose gestellt hatten. Abhängig von den Ergebnissen des Mutationsscreenings wurden im Anschluss noch die DNA-Proben von weiteren Familienmitgliedern untersucht. Als Kontrollpersonen wurden gesunde Personen oder Patienten gewählt, die nicht an einer neuronalen Ceroid-Lipofuszinose erkrankt sind.

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

- | | |
|--|-------------------------------|
| • Acrylamid 30 % (C_3H_5NO),
(PAA) (mit 0,8 % Bisacrylamid) | Roth, Karlsruhe |
| • Agarose (Ultra pure Agarose), ($C_{12}H_{18}O_9$) | Gibco BRL, Eggenstein |
| • Ammoniumacetat ($C_2H_7NO_2$) | Merck, Darmstadt |
| • Ammoniumpersulfat (APS), ($(NH_4)_2S_2O_8$) | Serva, Heidelberg |
| • BDT (Big Dye Terminator Cycle
Sequencing Ready Reaction) | PE Biosystems,
Weiterstadt |
| • Borsäure (H_3BO_3) | Merck, Darmstadt |
| • Bromphenolblau (BPB), ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) | Merck, Darmstadt |
| • Dextranblau | Sigma, Deisenhofen |
| • Dinatriumcarbonat (Na_2CO_3) | Merck, Darmstadt |
| • Dimethylsulfoxid (DMSO), (C_2H_6OS) | Merck, Darmstadt |
| • Dithiotreitol (DTT), ($C_4H_{10}O_2S_2$) | Sigma, Deisenhofen |
| • DNA Längenstandard, 100 bp Leiter | Gibco BRL, Eggenstein |
| • EDTA Titriplex ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_6 \cdot 2H_2O$) | Merck, Darmstadt |

-
- Essigsäure (CH₃COOH), 100 % Merck, Darmstadt
 - Ethanol (C₂H₅OH), 96 % Merck, Darmstadt
 - Ethidiumbromid (C₂₁H₂₀BrN₃), 1 % Merck, Darmstadt
 - Formamid (HCONH₂) Merck, Darmstadt
 - Formaldehyd (HCHO), 37 %, stabilisiert mit 10 % Methanol Merck, Darmstadt
 - Glycerin (C₃H₈O₃) Merck, Darmstadt
 - Harnstoff (Urea), (CH₄N₂O) Merck, Darmstadt
 - HPLC-Wasser Merck, Darmstadt
 - Magnesiumchlorid (MgCl₂) Gibco BRL, Eggenstein
 - Magnesiumsulfat (MgSO₄) Merck, Darmstadt
 - Natriumacetat (CH₃COONa) Merck, Darmstadt
 - Natriumcarbonat (Na₂CO₃), wasserfrei Merck, Darmstadt
 - Natriumchlorid (NaCl) Merck, Darmstadt
 - N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) Serva, Heidelberg
 - N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) ((CH₃)₂NCH₂CH₂N(CH₃)₂) Sigma, Deisenhofen
 - Orange G Sigma, Deisenhofen
 - Paraffin flüssig Merck, Darmstadt
 - PBS (Phosphate buffered saline) Gibco BRL, Eggenstein
 - PCR-Puffer:
 - 10 x Puffer und Q-Puffer Qiagen, Hilden
 - 10 x Puffer mit MgCl₂ Gibco BRL, Eggenstein
 - Primer MWG Biotech, Ebersberg
Sigma, Deisenhofen
 - Salpetersäure (HNO₃), 65 % Merck, Darmstadt
 - Sequenzier-Gel-Lösung Biorad, Richmond, U.S.A.
 - Silbernitrat (AgNO₃) Merck, Darmstadt
 - Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), (C₄H₁₁NO₃ClH) Merck, Darmstadt
 - Xylencyanol FF Fluka, Neu-Ulm

2.2.2 Nucleoide und Nucleinsäuren

- Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP) Gibco BRL, Eggenstein
- Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP)
- Desoxyguanidin-5'-triphosphat (dGTP)
- Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP)

2.2.3 Enzyme

- *BsmI* BioLabs, USA
- *EcoRV* BioLabs, USA
- *StuI* Boehringer, Mannheim
- *Taq*-Polymerase (5 U/μL) Gibco BRL, Eggenstein
 Qiagen, Hilden

2.2.4 Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer mit ihren jeweiligen Sequenzen, die Fragmentgrößen sowie ihre Annealing Temperaturen sind in *Tabelle 2.01* für NCL2 und in *Tabelle 2.02* für NCL3 zusammengestellt.

2.2.4.1 Primer CLN2

Exon	Name	Sequenz (5'-3')	Fragment-Größe	Annealing Temp.
1	E01 F	ACC AGG CTC AGG ACG CAG GT	322 bp	53°C
	E01 R	GCT ACG TTG TCC TTG TGT TCC		
2	E02 F	CGT CAC ATG ACA GCA GAT CC	350 bp	53°C
	E02 R	GCT ATG GAG TGC GTA CTA GG		
3	E03 F	CCT AAT CTG GAA CCT TCC ATG ACC	312 bp	55°C
	E03 R	GGC AGG CTC TGA CAT GAT CG		
4	E04 F	GGA AGT CCT GAT GTC TCA TAG	319 bp	55°C
	E04 R	GCA AGC TCT CAA CTC CC		
5	E05 F	GGA GAC AGT GAC TGA CTG CC	282 bp	55°C
	E05 R	GCA TCT AAA CTT CCT CAG CC		

Exon	Name	Sequenz (5'-3')	Fragment-Größe	Annealing Temp.
6	E06 F	GGC TGA GGA AGT TTA GAT GC	338 bp	55°C
	E06 R	GGA ATT GAG GAC ACT GTG G		
7	E07 F	CCA CAG TGT CCT CAA TTC C	364 bp	53°C
	E07 R	CTC TCC AGC TTA TAG CAT TCC		
8	E08 F	GGA GAG AGA TCC TGA CAA CC	342 bp	55°C
	E08 R	GGC TCA GGG ATC ACT GTG G		
9	E09 F	CCA CTG ACC TGA CCT CTA CA	306 bp	55°C
	E09 R	GGC AAA GCT TAA GGC TGA ACC		
10	E10 F	GTT CCT CCA GCA AGA CCT GG	316 bp	54°C
	E10 R	GAG TGA GTA TTG GCA TGT GG		
11	E11 F	GGA TCC TCA GTT CAG CTG AC	306 bp	50°C
	E11 R	GGT TCT AGG TGC AAG GTG TTC		
12	E12 F	CCT TAG AGA TGT CTG ATA CT	313 bp	55°C
	E12 R	CAA AGG CTA TTC CAC ACC		
13	E13 F	GGT GTG GAA TAG CCT TTG	298 bp	55°C
	E13 R	GGA CTG AAC TGC CAG CTT CAG		

Tabelle 2.01: Übersicht der verwendeten NCL2 Primer

2.2.4.2 Primer CLN3

Die Primer 8F, 8R und 15F wurden der Publikation von Munroe [Munroe et al., 1997] entnommen.

Exon	Name	Sequenz (5'-3')	Fragmentgröße	Annealing Temp.
1	01 F	CCA GCT TCC TTG ATG GAT CG	293 bp	55°C
	01 R	CCG AGT CAG CTC TCA TTC CC		
2	02 F	GGG AAT GAG AGC TGA CTC GG	307 bp	55°C
	02 R	GGC AAA CCA GTG GAT TCA GT		

Exon	Name	Sequenz (5'-3')	Fragment- größe	Annealing Temp.
3	03 F	ACA GGT AAG GGA AGG TTT GG	273 bp	55°C
	03 R	CCA GCC AGA GAC TGG AAA CT		
4	04 F	AGC CAT CCT TCA AGT GAA GG	292 bp	58°C
	04 R	CCA GCC CAG GTC TCA ACT GT		
5	05 F	GAG CCT GTG TTT GTA GCA GG	279 bp	57°C
	05 R	CGG TCT CTA CTC TCA GCA TC		
6	06 F	CCC TAC AGG TCT GGG TGA GG	325 bp	55°C
	06 R	AAG GGT GAC AGA ATG AAT CC		
7	07 F	GGT GCC ACT CTC CAT GAA GG	314 bp	60°C
	07 R	TAG GCT GAC CAT GGG ACA GC		
8	08 F	TGT CCC ATG GTC AGC CTA G	241 bp	X:59°C Y:57°C Z:55°C
	08 R	TTC TCT CCT TGG ACC CCT CT		
9	09 F	AAG TGT TCA AAG GTA GAG GT	296 bp	55°C
	09 R	CTT TGC CTA TTG CAG AGA GG		
10	10 F	CCA CTG TTG CGT GGT CTG GT	307 bp	53°C
	10 R	CCT CAC TTA CAA GTC CCT GG		
11	11 F	CAA GGT TCG GAT GAT GGC TGG	304 bp	58°C
	11 R	CCA GCG GTA TTG CTG AGC GT		
12	12 F	CCA GGG ACT TGT AAG TGA GG	299 bp	X:60°C Y:58°C Z:56°C
	12 R	GCA TCT GGT ACC TGA GGT TA		
13	13 F2	TGA GTC ACG CTC AGC AAT ACC	388 bp	X:62°C Y:60°C Z:58°C
	13 R3	ACG ACA GAG CGA GAC TCT GTC TCC		
14	14 F	CCT TCA CCA GTA ACT CCT AA	325 bp	X:59°C Y:57°C Z:55°C
	14 R	GGT GAG GCT TCA GTC CCA GA		
15	15 F2	AGG GAT GTC TGG GAC TGA AG	481 bp	X:61°C Y:59°C Z:57°C
	15 R1	GTC TAT ATA TAG GAA AGT GG		

Tabelle 2.02: Übersicht der verwendeten NCL3 Primer

2.2.5 Puffer und Lösungen

- Ammoniumpersulfat-Lösung

	1 g	APS
ad	10 mL	Aqua dest.
		Lagerung bei 4 °C

- 100-Basenpaarleiter

	5 µL	100 Basenpaar-Stocklsg.
	30 µL	PCR-Ladepuffer
	40 µL	TE-Lösung

- Developer-Lösung

	29,6 g	Natriumcarbonat
	540,0 µL	Formaldehyd 37 %
ad	1,0 L	bidest. Wasser

- Formamid-Probenpuffer (SSCP)

	98 %	deionisiertes Formamid
	10 mM	EDTA, pH 8.0
	0,025 %	Bromphenolblau
	0,025 %	Xylencyanol
		Lagerung bei -20 °C

- Ladepuffer für PCR

	25 mL	Glycerin 100 %
	25 mL	1 x TBE
	20 mg	Orange G

- Nucleotid-Mix (dNTPs), 10 mM

	10 µL	dATP 100 mM
	10 µL	dCTP 100 mM
	10 µL	dGTP 100 mM
	10 µL	dTTP 100 mM
ad	60 µL	Aqua dest.

-
- 10 x PCR-Reaktionspuffer
200 mM Tris-HCl (pH 8.4)
500 mM KCl
Lagerung bei -20°C

 - Salpetersäure 1 %
15,4 mL Salpetersäure 65 %
ad 984,6 mL bidest. Wasser

 - Silbernitrat-Lösung
2,02 g Silbernitrat
ad 1,00 L bidest. Wasser

 - 10 x TBE
1 M Trisaminomethan
1 M Borsäure
20 mM EDTA
ad 1 L bidest. Wasser

 - TE-Puffer
12,11 g Trisaminomethan (pH 8.0)
3,72 g EDTA (pH 8.0)
ad 1,00 L bidest. Wasser

2.2.6 Gele

- Agarose-Gel
 - 2 g Agarose
 - 150 mL 1 x TBE
 - 3 µL Ethidiumbromid

- Sequenzier-Gele:
 - 48 cm, 1200 Volt
 - 7,1 mL Sequenzier-Gel-Lösung
 - 6,0 mL 10 x TBE
 - 21,0 g Harnstoff
 - 21,0 mL HPLC-Wasser
 - 0,3 mL APS-Lösung
 - 20,0 µL TEMED

 - 36 cm, 2400 Volt (2 Gele)
 - 7,5 mL Sequenzier-Gel-Lösung
 - 6,0 mL 10 x TBE
 - 18,0 g Harnstoff
 - 23,0 mL HPLC-Wasser
 - 0,3 mL APS-Lösung
 - 20,0 µL TEMED

 - 36 cm, 1200 Volt (2 Gele)
 - 8,4 mL Sequenzier-Gel-Lösung
 - 6,0 mL 10 x TBE
 - 21,0 g Harnstoff
 - 20,0 mL HPLC-Wasser
 - 0,3 mL APS-Lösung
 - 20,0 µL TEMED

- SSCP-Gele:
 - 8 % PAA
 - 13,0 mL 10 x TBE
 - 35,0 mL Acrylamid, 30 %
 - 82,0 mL bidest. Wasser
 - 1,2 mL APS-Lösung
 - 24,0 µL TEMED
 - 8 % PAA , 10 % Glycerin
 - 13,0 mL 10 x TBE
 - 35,0 mL Acrylamid, 30 %
 - 69,0 mL bidest. Wasser
 - 13,0 mL Glycerin
 - 1,2 mL APS-Lösung
 - 24,0 µL TEMED

2.2.7 Arbeitsgeräte

- DNA Sequenzer ABI-Prism™ PE Applied Biosystems, Weiterstadt
- Eismaschine FM-120 DE Hoshizaki, Nagya, Japan
- Elektrophoresekammern
 - für SSCP „Model S2“ Gibco BRL, Eggenstein
incl. Glasplatten, Kämme, Spacer
 - für Agarosegele Sigma, Deisenhofen
incl. Gelschlitten, Kämme
- Folienschweißgerät Vacupack 2 Plus Krups, Solingen
- Kamera E.A.S.Y. 429 K Herolab, Wiesloch
- Magnetrührer Typ Ret Basic Janke/ Kunkel GmbH, Stauffen
- Mikrowellengerät AEG, Frankfurt
- Pipetten Pipetman 20 µL/ 200 µL/ 1000 µL Abimed, Langenfeld
- Schüttler REAX 2000 Heidolph, Schwabach

- Spannungsgeräte
 - für Elektrophoresen:

Electrophoresis Power Supply	Gibco BRL, Eggenstein
PS 3002 ST305	
 - für SSCP: ST 3002

	Gibco BRL Eggenstein
--	----------------------
- Thermoblock

	Liebisch, Bielefeld
--	---------------------
- Thermocycler MJ Research PTC 200

	Biozym, Massachusetts, USA
--	----------------------------
- Tubes 0,5 mL / 1,5 mL

	Eppendorf, Hannover
--	---------------------
- UV-Transilluminator UVT-28 M

	Herolab, Wiesloch
--	-------------------
- Vakuum Zentrifuge Speed Vac Plus SC 110

	Savant, Farmingdale, U.S.A.
--	-----------------------------
- Video-Printer Video Copy Processor

	Mitsubishi
--	------------
- Vortex REAX 2000

	Heidolph, Schwabach
--	---------------------
- Waage PT 310

	Sartorius, Göttingen
--	----------------------
- Zentrifuge: Biofuge pico

	Heraeus Instruments, Osterode
--	-------------------------------

2.3 Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

2.3.1.1 Prinzip

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Saiki et al., 1985; Mullis et Faloona, 1987] handelte es sich um ein Verfahren, mit dem ausgewählte DNA-Abschnitte gezielt innerhalb kurzer Zeit in großer Kopienanzahl amplifiziert werden konnten. Dadurch war die Untersuchung bestimmter Genabschnitte möglich. Für die Reaktion benötigte man genomische DNA, zwei Primer, Nukleotide sowie eine hitzestabile Polymerase. Bei den Primern handelte es sich um kurze, in vitro- synthetisierte Oligonukleotide (20-25 Nukleotide) mit vorgegebener Sequenz, die sich komplementär an die DNA-Einzelstränge anlagerten und so den Startpunkt für die Neusynthese bildeten. Des Weiteren war eine thermostabile Polymerase notwendig. Diese wurde aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert, hatte ein Temperaturoptimum von 72°C und überstand auch Temperaturen von 94°C ohne größeren Wirkungsverlust [Saiki et al., 1988].

Die Reaktion lief in drei Teilschritten ab:

Zunächst wurde der DNA-Doppelstrang bei 94°C in zwei Einzelstränge (Sense und Antisense) aufgespalten (**Denaturierung**). Beim anschließenden Herabsenken der Temperatur auf 50-60°C kam es zur komplementären Anlagerung der sequenzspezifischen Primer (**Annealing**) an den Sense und Antisense Strang. Im dritten Abschnitt, der **Elongation**, wurde die Temperatur auf 72°C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase, angehoben. Die *Taq*-Polymerase verlängerte den DNA Strang, an den Primern beginnend, und synthetisierte so zwei komplementäre DNA-Stränge aus den ebenfalls im Ansatz vorhandenen Nukleotiden. Diese drei Schritte wurden zyklisch 30-40 mal wiederholt, so dass der gewünschte DNA-Abschnitt um den Faktor 10^6 - 10^{12} vervielfältigt wurde [Saiki et al., 1988].

2.3.1.2 Durchführung

Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Zusätze benötigt:

- 1,0 µL genomische DNA (100 ng)
 - 0,5 µL Forward (F) Primer (10 pmol/ µL)
 - 0,5 µL Reverse (R) Primer (10 pmol/ µL)
 - 2,5 µL 10 x PCR Puffer
 - 0,5 µL dNTPs
 - 18,8 µL H₂O
 - 0,2 µL *Taq*-Polymerase
- 25,0 µL Reaktionsansatz

Der Reaktionsansatz wurde in sterile PCR-Tubes pipettiert und diese in einen programmierbaren Thermocycler gegeben. Um das gewünschte Produkt in ausreichender Menge zu erhalten, mussten optimale Bedingungen für das jeweilige Primerpaar gewählt werden. Als Denaturierungstemperatur wurde 95°C gewählt. Die günstigste Annealing Temperatur wurde experimentell für das jeweilige Exon ermittelt und ist in *Tabelle 2.01* und *Tabelle 2.02* aufgelistet. Die Elongations-Temperatur wurde nach dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase bei 72°C gewählt.

Einige Reaktionen wurden zur Erhöhung der Spezifität als sogenannte „Touch Down PCR“ durchgeführt. Hierbei wurde die Annealing Temperatur anfangs hoch gewählt und dann nach drei Zyklen um jeweils 2°C gesenkt.

Des Weiteren wurden dem Reaktionsansatz zur Steigerung der Spezifität 1 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Formamid [Sarkar et al., 1990] zugesetzt.

Einstellung des Thermocyclers:

Denaturierung:

01. 1 Minute bei 95°C
02. 30 Sekunden bei 95°C

Annealing:

03. 30 Sekunden zwischen 50-61°C

Elongation:

04. 30 Sekunden bei 72°C
05. 34 Zyklen ab Punkt 2
06. 5 Minuten bei 72°C
07. 5 Minuten bei 4°C

Einstellung bei Touch down PCR:

01. 1 Minute bei 95°C
02. 15 Sekunden bei 95°C
03. 10 Sekunden bei X°C
04. 30 Sekunden bei 72°C
05. 3 Zyklen ab Punkt 2
06. 15 Sekunden bei 95°C
07. 10 Sekunden bei Y°C
08. 30 Sekunden bei 72°C
09. 3 Zyklen ab Punkt 6
10. 15 Sekunden bei 95°C
11. 10 Sekunden bei Z°C
12. 30 Sekunden bei 72°C
13. 35 Zyklen ab Punkt 1
14. 2 Minuten bei 72°C
15. 5 Minuten bei 4°C

2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese [Meyers et al., 1976; Southern, 1979] handelte es sich um eine effektive Methode um sicherzustellen, dass sich bei der Polymerasekettenreaktion eine ausreichende Menge des spezifischen Produktes amplifiziert wurde.

Zur Herstellung eines Gels wurden 2 g Agarose in 150 mL Elektrophoresepuffer (1 x TBE) gegeben und anschließend in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig auflöste. Während des Abkühlvorgangs, im Wasserbad auf dem Magnetrührer, erfolgte bei ca. 60°C die Zugabe von 3 µL Ethidiumbromid. Danach wurde die Flüssigkeit auf einen vorbereiteten Gelschlitten mit eingesetzten Kämmen gegossen, so dass ein Gel mit Taschen entstand. Nachdem die Agarose erstarrt war, wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingelegt und mit Elektrophoresepuffer bedeckt. Anschließend wurden 5 µL des PCR-Amplifikats mit 5 µL Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und eine max. Spannung von 120 Volt angelegt. Bei einer Laufzeit von 30 Minuten wurden die DNA Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die vorherige Zugabe des Ethidiumbromids konnten die Fragmente unter UV Licht (302 nm) betrachtet werden, da sich das Ethidiumbromid mit der DNA verbindet und unter UV Licht fluoresziert. Die Größe der DNA Fragmente konnten anhand eines aufgetragenen Markers (100 bp-Leiter) bestimmt werden. Das Elektrophoreseergebnis wurde anschließend photographisch dokumentiert.

2.3.3 Single strand conformation polymorphism Analyse (SSCP)

2.3.3.1 Prinzip

Bei der single strand conformation polymorphism Analyse (SSCP) [Orita et al., 1989a/b] handelte es sich um eine Screening Methode, mit der man innerhalb kurzer Zeit eine größere Anzahl DNA Proben auf eventuell vorhandene Mutationen untersuchen konnte. Dabei machte man es sich zu nutzen, dass einzelsträngige DNA Moleküle in Polyacrylamidgelen ein unterschiedliches Laufverhalten zeigten. Jeder Einzelstrang nahm aufgrund seiner Basenabfolge sowie seiner Fragmentgröße und -länge eine spezifische Konformation ein,

wobei schon die kleinsten Veränderungen, zum Beispiel die Mutation einer einzelnen Base, zu einer Konformationsänderung und somit zu einer Änderung der Wandergeschwindigkeit im Polyacrylamidgel führten [Grompe, 1993]. Daher konnten Sequenzabweichungen, bei gleichzeitigem Auftragen eines Wildtyps, durch ein unterschiedliches Bandenmuster sichtbar gemacht werden. Das Auftrennungsverhalten wurde allerdings auch durch verschiedene Einflüsse mitbestimmt. Die Ionenkonzentration in der verwendeten Pufferlösung (TBE), die Acrylamidkonzentration, die Umgebungstemperatur beziehungsweise die Temperatur, die durch die angelegte Spannung und Strömstärke entstand, sowie eventuelle Zusätze wie Glycerin beeinflussten das Laufverhalten der aufgetragenen Proben mit [Glavac et Dean, 1993]. Die unterschiedlichen Bandenmuster wurden anschließend mit einer Silberfärbung [Ainsworth, 1991; Chaubert, 1993] sichtbar gemacht.

2.3.3.2 Durchführung

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Des Weiteren wurde jede DNA-Probe auf einem 8 %igen Polyacrylamidgel mit und ohne 10 %iger Glycerinzugabe untersucht. Die zu untersuchenden Proben wurden auf das Gel aufgetragen und unter Anlegen einer konstanten Spannung elektrophoretisch aufgetrennt.

Zunächst wurden zwei unterschiedlich große, ethanolgereinigte Glasplatten vorbereitet. Diese wurden übereinandergelegt und mit Hilfe von zwei seitlich eingelegten Spacern konnte ein Abstand von 0,8 mm erreicht werden. Die Glasplatten wurden anschließend mit seitlich angelegten Klemmen fixiert. Bei der Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurden 82 mL bzw. 69 mL bidestilliertes Wasser, 13 mL Elektrophoresepuffer (10x TBE) und 35 mL 30%iges Acrylamid in ein Gefäß gegeben und auf dem Magnetrührer miteinander verrührt. Je nachdem, welche Bedingung gewählt wurde, erfolgte dann noch die Zugabe von 13 mL Glycerin. Die Polymerisation der Lösungen wird durch Zugabe von 24 µL N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) und 1,2 mL Ammoniumpersulfat (APS) gestartet. Nach gründlicher Durchmischung wurde die jeweilige Lösung zwischen die zwei präparierten Glasplatten gegossen. Anschließend wurde am oberen Abschnitt eine

Kammleiste eingesetzt, damit sich Geltaschen ausbilden konnten. Für die vollständige Polymerisation des Gels wurden mindestens 45 Minuten veranschlagt. Die Glasplatten wurden mitsamt dem Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit Elektrophoresepuffer (1 x TBE) befüllt. Die zu untersuchenden DNA Fragmente wurden mittels der vorbeschriebenen Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Für die Auftrennung wurden 5 µL des PCR Produktes mit 5 µL Ladepuffer (Formamidpuffer) versetzt, 10 Minuten bei 95°C denaturiert, danach sofort auf Eis gekühlt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Neben den zu untersuchenden Proben wurde auch jeweils die DNA eines gesunden Patienten (Wildtyp DNA) sowie ein DNA Längenstandard aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei Raumtemperatur über Nacht bei 15 W, je nachdem ob Glycerin zugesetzt wurde, für 10-17 Stunden durchgeführt. Nach Beendigung der Auftrennung wurden die Glasplatten entfernt und das Gel in eine vorbereitete Glasschale überführt, die dann mit 10 %igem Ethanol befüllt wurde.

2.3.4 Silberfärbung

2.3.4.1 Prinzip

Um die bei der SSCP-Analyse entstandenen Bandenmuster sichtbar zu machen, wurde eine Silberfärbung durchgeführt [Budowle et al., 1991]. Bei dieser Methode machte man es sich zu nutzen, dass Silberionen (Ag^+) mit DNA Komplexe bildeten, wobei das Silber im darauf folgenden Schritt mit alkalischem Formaldehyd reduziert wurde und dabei ausfiel.

2.3.4.2 Durchführung

Das Gel wurde bereits in eine Glasschale überführt, in der es für mindestens 5 Minuten verblieb, damit die DNA durch das Ethanol fixiert werden konnte. Anschließend wurde das zugesetzte Ethanol abgesaugt. Danach erfolgte zur Oxidierung die Zugabe von 1 %iger Salpetersäure, die für 3 Minuten zugegeben und dann wieder abgesaugt wurde. Als nächstes wurde das Gel zweimalig mit bidestilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Zugabe von Silbernitrat-Lösung, in der das Gel 20 Minuten geschwenkt wurde. Nach einer erneuten zweimaligen Spülung mit bidestilliertem Wasser wurde zur

Reduzierung vorsichtig Entwicklerlösung hinzugegeben, die so lange belassen wurde, bis sich die Banden in einer ausreichenden Intensität darstellten. Die Reaktion wurde durch 10 %ige Essigsäure beendet und das Gel zum Abschluss noch einmal mit bidestilliertem Wasser gespült. Das Gel wurde nun auf eine Plastikfolie überführt und darin eingeschweißt. Danach erfolgte eine photographische Dokumentation.

2.3.5 Sequenzierung

Bei Proben, die bei der durchgeführten SSCP-Untersuchung auffällige Bandenmuster zeigten, wurde zur genaueren Differenzierung eine Sequenzierung durchgeführt. Mit Hilfe der Sequenzierung war es möglich, die genaue Basensequenz der einzelnen Proben zu bestimmen, um damit festzustellen, ob es sich bei der Auffälligkeit um eine Mutation, einen Polymorphismus oder ein Artefakt handelte.

2.3.5.1 Prinzip

Die bei dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden auf Grundlage der Arbeiten von Sanger [Sanger et al., 1977] sowie Maxam und Gilbert [Maxam et Gilbert, 1980] durchgeführt und modifiziert. Die zu untersuchende DNA wurde ähnlich wie bei der Polymerasenkettenreaktion zunächst denaturiert, mit einem Primer hybridisiert und es wurde mit Hilfe einer DNA-Polymerase ein komplementärer DNA Strang synthetisiert. Allerdings wurden hierbei neben den vier üblichen Desoxynukleotiden (dNTPs) fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt [Ansorge et al., 1987], welche mit den Desoxynukleotiden um den Einbau konkurrierten. Die Didesoxynukleotide unterschieden sich von den normalen Desoxynukleotiden dadurch, dass ihnen am 3'-Ende eine Hydroxylgruppe fehlte, an die normalerweise das nächste Nukleotid geknüpft wurde. Wurde nun ein Didesoxynukleotid eingebaut, so konnte der Strang nicht verlängert werden und es kam zum Kettenabbruch. In einer Reaktion entstanden dabei DNA Fragmente unterschiedlicher Größe, die an ihrem 5'-Ende übereinstimmten und ein variables 3'-Ende hatten, je nachdem, welches Didesoxynukleotid eingebaut wurde. Die vier verschiedenen Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP,

ddGTP, ddTTP) wurden jeweils basenspezifisch mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, was es möglich machte, dass die Reaktion in einem Ansatz durchgeführt werden konnte. Im nächsten Schritt wurden die entstandenen Fragmente in einem denaturierten Acrylamidgel entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Bei der vorliegenden Arbeit wurde das Sequenziergerät ABI-Prism™ 377 verwendet, das die Fragmente mittels eines Lasers während der elektrophoretischen Auftrennung automatisch detektiert. Anhand der Größe der einzelnen PCR Produkte und deren Fluoreszenzfarbe konnte die Sequenz der Probe durch Computerverarbeitung der Signale ermittelt werden.

2.3.5.2 Durchführung

Die bereits amplifizierten PCR Proben mußten zunächst für den Sequenzvorgang von möglichen Störfaktoren, zum Beispiel den überschüssigen Nukleinsäuren, aufgereinigt werden. Dafür wurde als erstes eine **Ammoniumacetatfällung** durchgeführt, wobei 20 µL 4 M Ammoniumacetat mit 125 µL 96 %igem Ethanol in ein Tube vorgelegt und dann 20 µL des bereits gefertigten PCR Produktes hinzugefügt wurden. Die Mischung wurde kurz vortekutiert und anschließend 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und es erfolgte die Zugabe von 200 µL 70 %igem Ethanol, wobei die Mischung erneut vortekutiert, 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und im Anschluss dekantiert wurde. Als nächstes wurde die Mischung nochmals 30 Sekunden zentrifugiert, das restliche Ethanol quantitativ abgezogen und der Tube mit dem Pellet für 5 Minuten bei 37°C auf einem Heizblock getrocknet. Das Pellet wurde dann in 30 µL Wasser gelöst. Für den nächsten Schritt, die **Sequenzierungs-PCR**, wurden 3 µL des aufgereinigten PCR Produktes zusammen mit 0,4 µL des jeweiligen Primers, 4,6 µL Wasser sowie 2 µL der fertigen BDT-Reaktionslösung (enthält u.a. dNTPs, ddNTPs und *Taq*-Polymerase) in ein Tube pipettiert und dieser unter folgenden Reaktionsbedingungen in einen Thermocycler gegeben:

01. 96°C für 1 Minute
02. 96°C für 10 Sekunden
03. 50°C für 5 Sekunden
04. 60°C für 4 Minuten
05. 25 Zyklen ab Punkt 2
06. 10°C für mindestens 10 Minuten

Nach der Sequenzierungs-PCR wurde eine **Natriumacetatfällung** durchgeführt, damit auch hier der Überschuss an nicht verarbeiteten Reagenzien entfernt wurde. Dafür wurden die 10 µL des Sequenzieransatzes mit 90 µL Wasser versetzt und diese in ein vorbereitetes Cap mit 10 µL 3M Natriumacetat sowie 250 µL 96 %igem Ethanol gegeben. Der Ansatz wurde kurz vortekutiert, für 20 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und das Ethanol anschließend abpipettiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 250 µL 70 %igem Ethanol, wobei die Mischung erneut vortekutiert, für 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und das Ethanol abpipettiert wurde. Das Cap wurde dann in einen 37°C vorgeheizten Heizblock gestellt, indem das noch verbliebene Ethanol verdampfte. Das getrocknete Pellet wurde in dem Cap bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei -20°C gelagert und erst kurz vor der Auftrennung in 3 µL Ladepuffer gelöst, für 10 Minuten bei 80°C denaturiert und anschließend sofort auf -20°C abgekühlt und damit dauerhaft denaturiert. Für die folgende elektrophoretische Auftrennung wurde das automatische Sequenziergerät ABI-Prism™ verwendet, wobei die Größe des Gels davon abhing, wie viele Basen das zu untersuchende Produkt hatte. Es wurden zwei unterschiedlich grosse Sequenziergele verwendet, wobei das 36 cm lange Gel für Sequenzierprodukte <400 bp und das 48 cm lange Gel für Sequenzierprodukte > 400 bp verwendet wurde.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die erhaltenen Sequenzen mit der Nukletid Sequenz der cDNA des *CLN* Gens verglichen und dementsprechend Sequenzabweichungen festgestellt.

2.3.6 Restriktionsenzymverdau [Smith et Birnstiel, 1976]

2.3.6.1 Prinzip

Bei der Verdauung wurden Restriktionsenzyme verwendet, wobei es sich dabei um Endonucleasen prokaryontischen Ursprungs handelte. Diese waren in der Lage, spezifische Sequenzabschnitte von vier bis acht Basenpaaren in einer doppelsträngigen DNA zu erkennen und diese präzise zu schneiden. Bei den Erkennungssequenzen handelte es sich meistens um Palindrome. Die Namen der Restriktionsenzyme wurden von dem entsprechenden Bakterium abgeleitet. Es gab für jeden Bereich der DNA eine Reihe von Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, wobei sich deren Schnittstellen durch eine veränderte Basensequenz änderten, indem neue Schnittstellen hinzukamen und andere wegfielen. Mit Hilfe eines Computerprogramms, hier „tacg V2 – Analysis“, konnte für eine bestimmte DNA Sequenz ermittelt werden, zu welchen Veränderungen es in der Erkennungssequenz durch die Mutation gekommen war und wie sich diese auf einen Restriktionsenzymverdau auswirken werden. Vergleich man nun den Verdau einer Wildtyp Sequenz mit dem der zu untersuchenden DNA, so konnte mit einem veränderten Bandenmuster in der elektrophoretischen Auftrennung, die entsprechend vermutete Mutation bestätigt oder ausgeschlossen werden.

2.3.6.2 Durchführung

Bei der vorliegenden Arbeit wurde der Restriktionsenzymverdau zur Spaltung von PCR Produkten [Turbett et Sellner 1996] und damit zum Nachweis von Sequenzveränderungen durchgeführt. Hierbei wurden 5 µL des bereits vorliegenden PCR Produkts mit 0,5 µL des jeweiligen Enzyms in einen Tube pipettiert und dieser in einem vorgewärmten Heizblock gestellt. Die Inkubation wurde bei einer für das Restriktionsenzym spezifischen Temperatur, welche vom Hersteller angegeben wurde, über 1½ Stunden durchgeführt. Anschließend wurde der Verdau mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Resultat durch Ansicht unter UV Licht sichtbar gemacht, sowie photographisch dokumentiert.

3 Ergebnisse

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Exons 1-13 des für *CLN2* codierenden Gens sowie die Exons 1-15 des für *CLN3* codierenden Gens untersucht. Es erfolgte die Untersuchung mit denen im Material und Methoden-Teil beschriebenen Methoden. Bei der SSCP-Analyse wurden die Patientenproben zusammen mit einer Kontrollprobe gemeinsam auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, wobei jede Probe für jedes Exon unter zwei verschiedenen Gelbedingungen, mit und ohne Glycerin, untersucht wurde. Dabei wurden Proben als auffällig eingestuft, die im Vergleich zur Kontrollprobe, beziehungsweise zu den anderen Proben, nicht das entsprechende Bandenmuster aufwiesen. Es zeigten sich bei den Untersuchungen sowohl eindeutige als auch diskrete Veränderungen. Bei fraglicher Bedeutung erfolgte zur weiterführenden Untersuchung die Sequenzierung. Es wurde zur Kontrolle sowohl der Forward als auch der Reverse Strang sequenziert. Zu einem späteren Zeitpunkt der experimentellen Arbeit kamen noch die Patientenproben 31.0-38.0 zur Untersuchung hinzu. Bei diesen Proben erfolgte die sofortige Sequenzierung der einzelnen Exons. Die durchgeführten Untersuchungen erbrachten für das *CLN2*-Gen den Nachweis von insgesamt elf pathogenen Mutationen sowie 20 Polymorphismen. Für das *CLN3*-Gen zeigten sich sechs pathogene Mutationen und sechs Polymorphismen. Die einzelnen Ergebnisse sind nachfolgend näher beschrieben. Eine tabellarische Zusammenstellung der bei der vorliegenden Arbeit gefundenen pathogenen Mutationen und Polymorphismen, sowie der bisher veröffentlichten, findet sich im Anhang.

3.1 Ergebnisse für *CLN2*

3.1.1 5'UTR/ Exon 1

Das Exon 1 hat eine Länge von 49 bp. In der SSCP-Analyse zeigten sich im Polyacrylamidgel ohne Glycerin bei den Patienten 21.0 und 22.0 jeweils unterschiedliche, zusätzliche Banden [Abb. 3.01]. Des Weiteren zeigten sich bei den Patienten 7.0, 9.0 und 30.0 diskrete Veränderungen, so dass bei diesen Patienten die weitere Untersuchung mittels Sequenzierung erfolgte.

Bei den drei letzteren Patienten ergab die anschließende Sequenzierung keine Auffälligkeiten.

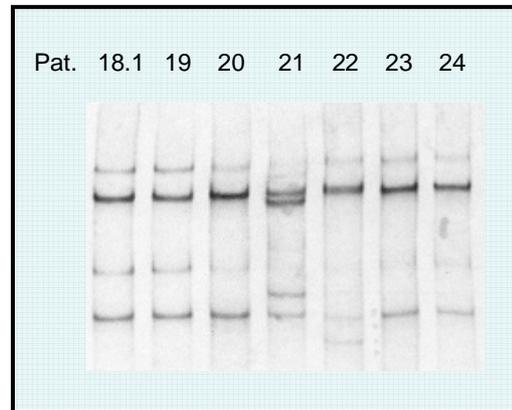


Abb. 3.01: SSCP Exon 1

3.1.1.1 Polymorphismus c.1-203T>C

Sowohl bei Patientin 21.0 als auch bei Patienten 22.0 zeigte sich in der

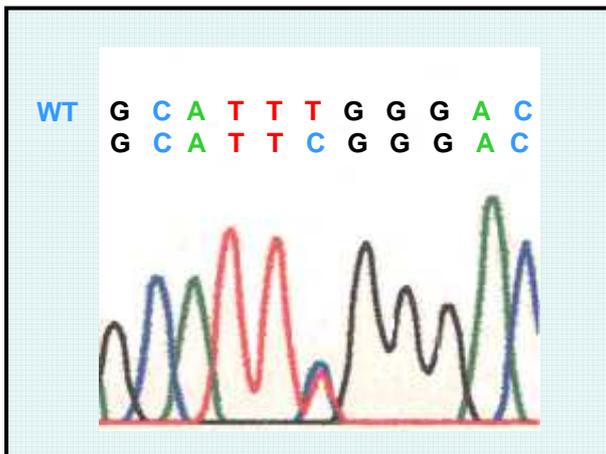


Abb. 3.02: Pat. 21, c.1-203T>C, Polymorphismus

Sequenzierung an Position 1205 der genomischen DNA im Bereich der 5'UTR ein heterozygoter Basenaustausch von Thymin zu Cytosin [Abb. 3.02]. Diese Veränderung ist in der Publikation von Sleat et al. 1999 [Sleat, 1999] bereits als Polymorphismus beschrieben und somit klinisch ohne weitere Relevanz.

3.1.1.2 Polymorphismus c.1-231G>A

Bei Patientin 21.0 zeigte sich an Position 1177 der genomischen DNA, ebenfalls in der 5'UTR Region, ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin [Abb. 3.03], wobei es sich hierbei ebenfalls um einen von Sleat et al, 1999 [Sleat, 1999] beschriebenen Polymorphismus handelt.

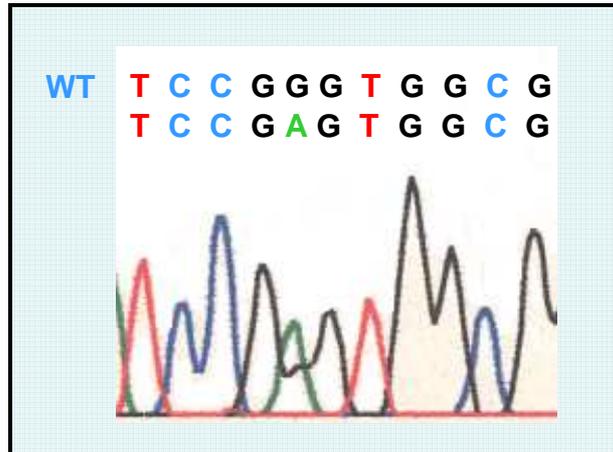


Abb. 3.03: Pat. 21, c.1-231G>A, Polymorphismus

3.1.2 Exon 2

Das Exon 2 hat eine Länge von 72 bp. In der SSCP-Analyse zeigten sich bei den Patienten 15.0 und 25.1 diskrete Veränderungen, wobei sich in der anschließenden Sequenzierung kein Hinweis für eine Mutation finden liess. In den Sequenzierungen der Patienten 31.0 – 38.0 zeigten sich ebenfalls keine Auffälligkeiten.

3.1.3 Exon 3

Das Exon 3 hat eine Länge von 140 bp. Bei den SSCP-Untersuchungen zeigten sich bei den Patienten 9.0 und 30.0 auffällige Bandenveränderungen, so dass eine anschließende Sequenzierung erfolgte.

3.1.3.1 Pathogene Mutation c.225A>G (p.=)

Bei Patienten 9.0 zeigte sich in der Sequenzierung (Reverse-Strang) [Abb. 3.04] an Position 225 der codierenden DNA ein heterozygoter Basenaustausch von Adenin zu Guanin, wobei diese an der dritten Position eines codierenden Triplets steht und sowohl „CAA“ als auch „CAG“ für die Aminosäure Glutamin codieren. Dementspre-

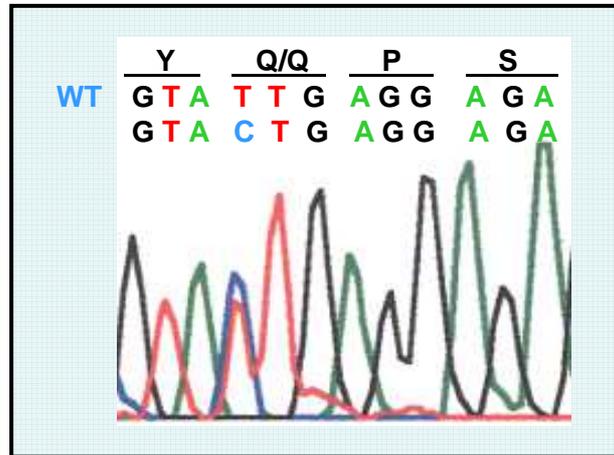


Abb. 3.04: Pat. 9.0, Reverse, c.225A>G, pathogene Mutation

chend kommt es hierbei zwar nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz, aber es wird eine potentielle Spleißstelle erzeugt [Sleat, 1999]. Diese Mutation wurde bereits von Sleat et al. 1999 veröffentlicht. In den weiteren Untersuchungen konnte keine weitere heterozygote Mutation gefunden werden und es lagen keine Proben weiterer Familienmitglieder vor.

3.1.4 Exon 4

Das Exon 4 hat eine Länge von 151 bp. Bei den Patienten 4.0, 6.0, 8.0, 9.0, 13.0 sowie 30.0 fielen diskrete Veränderungen im Vergleich zu der Kontrolle auf, so dass hier eine Sequenzierung durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich hier kein weiterführender Befund.

Im Gegensatz dazu, zeigte sich in der SSCP-Analyse der Patientin 14.0 im Bereich der Einzelstränge eine auffällige Doppelbande [Abb. 3.05].

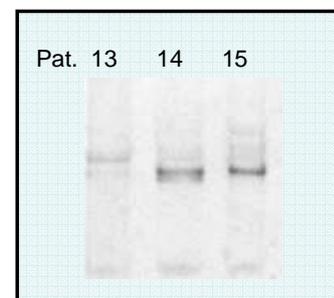
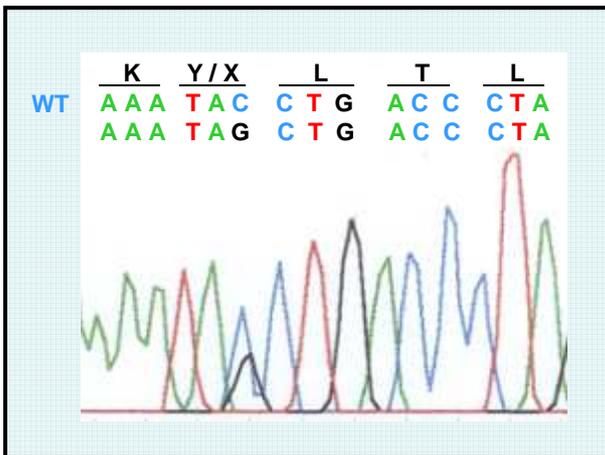


Abb. 3.05: SSCP Exon 4

3.1.4.1 Pathogene Mutation c.237C>G (p.Tyr79X)

Bei Patientin 14.0 zeigte sich in der Sequenzierung [Abb. 3.06] an Position 237 der codierenden DNA ein heterozygoter Basenaustausch von Cytosin zu Guanin an der dritten Stelle des codierenden Triplets. Daraus ergibt sich ein Austausch von Tyrosin zu einem Stopp-Codon, woraus eine frühzeitige



Termination resultiert. Diese pathogene Mutation wurde 2012 von Kousi et al. [Kousi, 2012] beschrieben. Die weiteren Untersuchungen dieser Patientin zeigten ebenfalls einen heterozygoten Basenaustausch in Intron 5, welcher dort näher beschrieben ist.

Abb. 3.06: Pat. 14, c.237C>G, pathogene Mutation

3.1.5 Exon 5

Die Länge von Exon 5 beträgt 128 bp. In der SSCP-Analyse zeigten sich nur wenige, diskrete Veränderungen im Vergleich zur Kontrollprobe. Bei der anschließenden Sequenzierung der auffälligen Patientenproben sowie der Proben 31.0 – 38.0 konnte bei keiner Probe ein pathologischer Befund festgestellt werden.

3.1.6 Intron 5/ Exon 6

Das Exon 6 hat eine Länge von 179 bp. In den beiden SSCP-Untersuchungen mit und ohne Glycerin zeigten sich mehrere Auffälligkeiten. Bei den Patienten 3.0, 9.0, 13.0, 22.0 und 27.0 zeigte sich im Bereich der Einzelstränge die gleiche, auffällige Doppelbande. Bei den Patienten 7.0, 12.0, 15.0, 18.1 und 30.0 ließen sich lediglich diskrete Auffälligkeiten feststellen.

In der Abbildung 3.07 und 3.08 sieht man in der SSCP-Analyse das unterschiedliche Laufverhalten der gleichen Patientenproben mit einem 8%igen PAA Gel, einmal mit und einmal ohne 10%iges Glycerin. In der Abbildung 3.07 ist ein 8%iges PAA Gel mit 10%igem Glycerin dargestellt. Man sieht

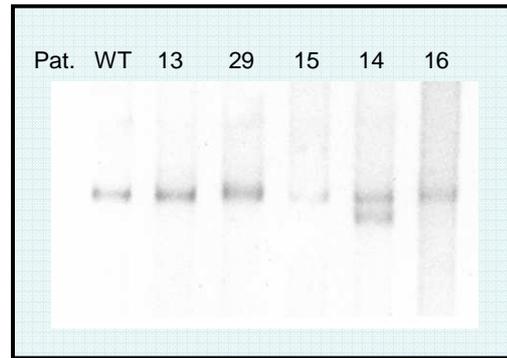


Abb. 3.07: SSCP, PAA/ Glycerin, Exon

bei den Patienten 14.0 und 29.0 im Bereich der Einzelstränge jeweils andere, auffällige Doppelbanden, im Vergleich zur Kontrollprobe.

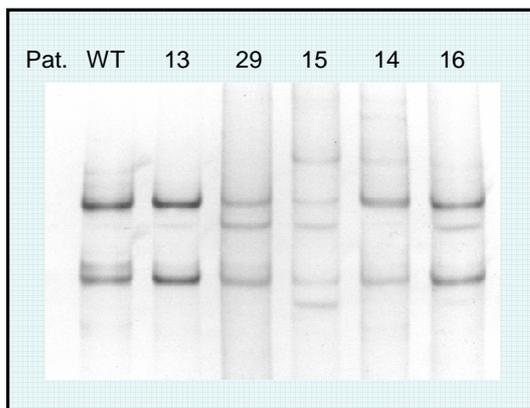


Abb. 3.08: SSCP, PAA, Exon 6

Im Gegensatz dazu sieht man in der Abbildung 3.08, bei dem 8%igen PAA Gel, in dem Laufverhalten der Patientenprobe 14.0 im Bereich der Einzelstränge kaum einen Unterschied im Vergleich zur Kontrollprobe.

Zur weiterführenden Diagnostik wurde bei allen diesen auffälligen Patientenproben sowie bei den Patientenproben 31.0-38.0 die Sequenzierung durchgeführt. Bei den Patientenproben 7.0, 12.0, 15.0, 18.1 und 30.0 ergab sich dabei kein wegweisender Befund.

3.1.6.1 Pathogene Mutation c.509-1G>C

Sowohl bei der Patientenprobe 14.0 [Abb. 3.09], als auch bei Probe 36.0 [Abb. 3.10] zeigte sich bei der Sequenzierung an Position 3556 der genomischen DNA ein heterozygoter Basenaustausch von Guanin zu Cytosin, welcher zu einer Veränderung der Splice-site führt. Diese pathogene Mutation ist bereits in der Publikation von Sleat et al. 1999 [Sleat, 1999] beschrieben.

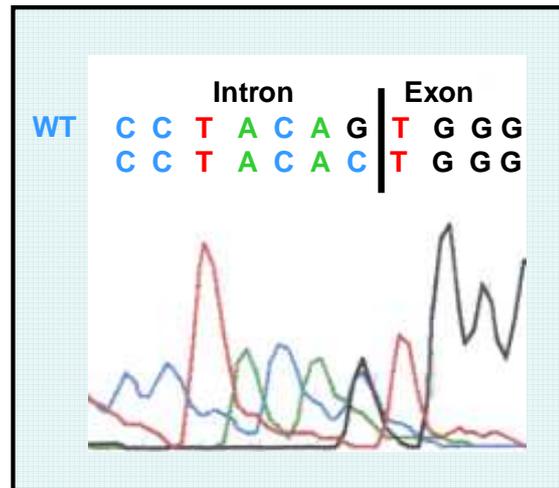


Abb. 3.09: Pat. 14, c.509-1G>C, pathogene Mutation

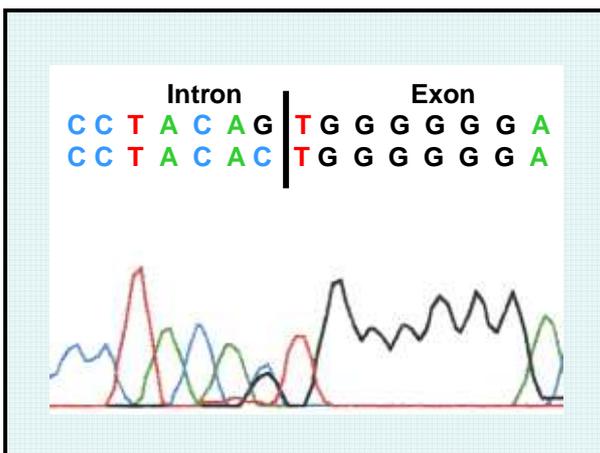


Abb. 3.10: Pat. 36, c.509-1G>C, pathogene Mutation

Zur weiteren Untersuchung erfolgte daher die Analyse der Familie der Patientin 14.0 mittels Sequenzierung. In der Abbildung 3.11 ist der Stammbaum der Familie dargestellt. Die Träger der Mutation p.Tyr79X sind schwarz, die Träger der Mutation c.509-1G>C grau markiert.

Für Patientin 14.0 ergibt sich hier zusammen mit der bereits beschriebenen heterozygoten Mutation, dem Aminosäureabbruch in Exon 4 eine zweite heterozygote Mutation.

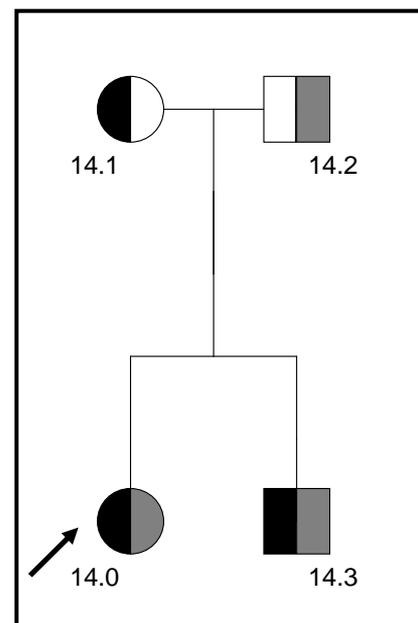


Abb. 3.11: Stammbaum Familie 14

In der Sequenzierung zeigte sich, dass die Eltern der Patientin jeweils heterozygote Träger einer pathogenen Mutation sind und diese jeweils an ihre beiden Kinder vererbt haben. Dementsprechend sind beide Kinder, auch der Bruder der Indexpatientin, Compound-Heterozygot.

3.1.6.2 Pathogene Mutation c.586delC

Bei Patientin 29.0 zeigte sich in der Sequenzierung [Abb. 3.12], an der Position 586 der codierenden DNA, die heterozygote Deletion von einer Base, dem Cytosin. Hierbei kommt es zu einer Verschiebung der Basensequenz und

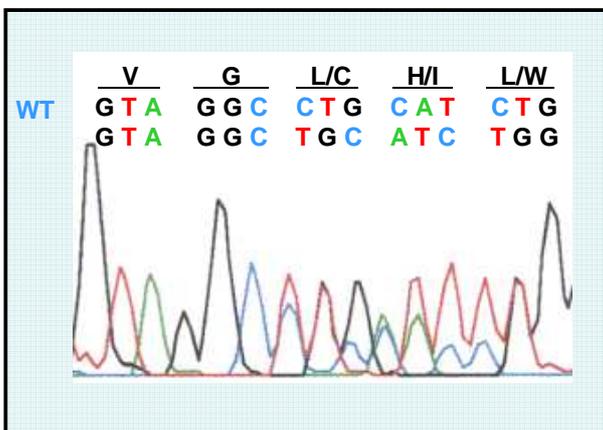


Abb. 3.12: Pat. 29, c.586delC, pathogene Mutation

dementsprechend zu einer Veränderung der Aminosäure-abfolge. Statt der Basensequenz „CTG“, die die Aminosäure Leucin codiert, kommt es zur Sequenz „TGC“, die die Aminosäure Cystein codiert. Durch die Verschiebung kommt es bereits drei Triplets später zu einem Stopp-Codon und damit zu einer

frühzeitigen Termination. Diese pathogene Mutation wurde bisher in der Literatur nicht veröffentlicht. Bei der Patientin 29.0 zeigte sich in Exon 7 eine weitere heterozygote Mutation, die dort näher beschrieben ist.

Zur weiteren Untersuchung wurde ein Restriktionsenzymverdau der DNA der Patientin 29.0 und ihrer Familie im Exon 6 durchgeführt. Das gesamte PCR-Produkt hat eine Länge von 338 bp. Das Restriktionsenzym *StuI* schneidet die Basensequenz des Wildtyps mit der Reihenfolge - AGG[▽]CCT - in zwei Fragmente, wobei das eine 178 bp und das andere 160 bp lang ist. Tritt bei einem Patienten die oben genannte Mutation auf, so fällt die Enzymschnittstelle von *StuI* weg, so dass sich in der Gelelektrophorese lediglich das ungeschnittene PCR Produkt mit 338 bp zeigt.

Da die Mutation bei der Indexpatientin heterozygot auftritt, zeigten sich in der Gelelektrophorese (Ergebnisse nicht gezeigt) sowohl Anteile der geschnittenen Fragmente, als auch die Anteile des Wildtyps. Bei der Mutter der Indexpatientin zeigte sich im Restriktionsenzymverdau ebenfalls heterozygot die Fragmentanteile des Wildtyps und der Mutation. Vater und Schwester der Indexpatientin zeigen in diesem Exon das Bandenmuster des Wildtyps. Zur Kontrolle erfolgte noch die Sequenzierung der Familienmitglieder, welche die oben genannte Mutation bei der Mutter der Indexpatientin heterozygot nachweisen lies. Vater und Schwester der Indexpatientin zeigten in der Sequenzierung von Exon 6 eine unauffällige Basensequenz.

3.1.6.3 Pathogene Mutation c.622C>T (p.Arg208X)

Sowohl bei der Sequenzierung der Patientenproben 35.0, 36.0 als auch bei 38.0 zeigte sich ein heterozygoter Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an der Position 622 der codierenden DNA. In der Abbildung 3.13 ist als Beispiel die

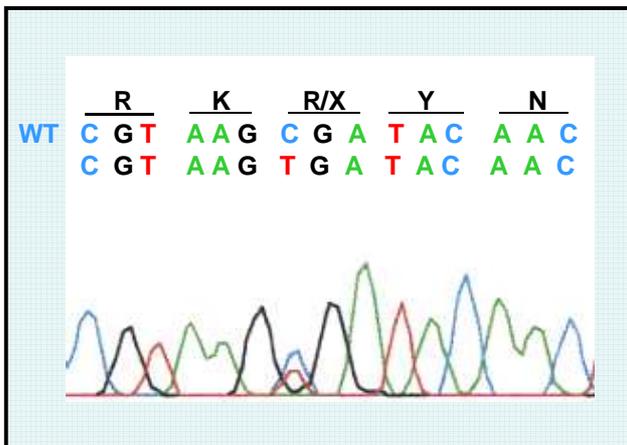


Abb. 3.13: Pat. 36, c.622C>T, pathogene Mutation

Sequenzierung der Patientenprobe 36.0 abgebildet. Der Austausch erfolgt an der ersten Stelle eines codierenden Triplets, wobei sich der Code „CGA“, der für die Aminosäure Arginin codiert, in den Code „TGA“ ändert, der ein Stopp-Codon darstellt.

Dementsprechend kommt es hier zu einer Termination. Diese pathogene Mutation ist bereits in der Publikation von Sleat et al. 1997 [Sleat, 1997] beschrieben worden. In den weiteren Untersuchungen der Patientenprobe 35.0 konnte keine weitere heterozygote Mutation gefunden werden. Anders bei der Patientenprobe 38.0, wo sich eine weitere heterozygote Mutation in Exon 7 zeigte, die dort näher beschrieben ist. Bei der Patientenprobe 36.0 zeigte sich bereits im Intron 5, an der Splice-site, eine heterozygote Mutation. Für diese Patientenprobe lagen leider keine Proben weiterer Familienmitglieder vor.

3.1.6.4 Polymorphismus c.508+26A>T

An der Position 3436 der genomischen DNA liess sich jeweils bei den Patientenproben 3.0, 9.0, 22.0 und 34.0 ein homozygoter [Abb. 3.14] und bei den Patientenproben 13.0, 27.0, 33.0 und 38.0 ein heterozygoter Basenaustausch von Adenin zu Thymin nachweisen. Dieser Austausch wurde bereits in der Publikation von Sleat et al. 1999 [Sleat, 1999] als Polymorphismus veröffentlicht.

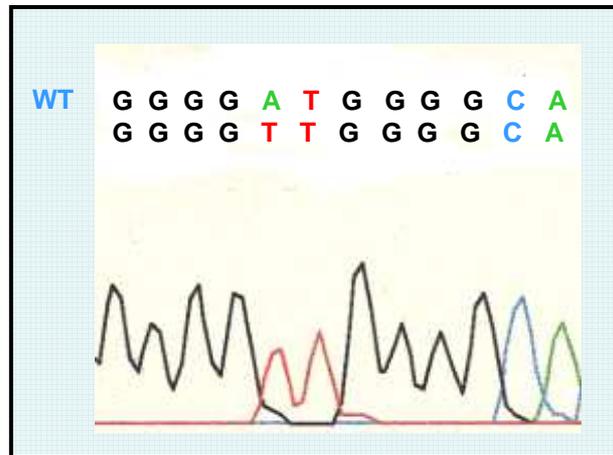


Abb. 3.14: Pat. 9, c.508+26A>T, Polymorphismus

3.1.7 Intron 6/ Exon 7

Das Exon 7 hat eine Länge von 199 bp. In der SSCP-Analyse fielen bei den Patienten 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 12.0, 15.0, 16.0 und 29.0 Veränderungen im Vergleich zur Kontrollprobe auf. Es erfolgte die weiterführende Sequenzierung, wobei sich bei den Patienten 4.0, 5.0, 6.0, 15.0 und 16.0 kein pathologischer Befund ergab.

3.1.7.1 Pathogene Mutation c.833A>G (p.Gln278Arg)

An der Position 833 der codierenden DNA zeigte sich bei Patient 38.0 ein heterozygoter Basenaustausch von Adenin zu Guanin in der Sequenzierung [Abb. 3.15]. Der Basenaustausch erfolgte an der zweiten Stelle eines codierenden Triplets, wobei sich die Sequenz „CAG“, die für die Aminosäure Glutamin codiert, in den Code

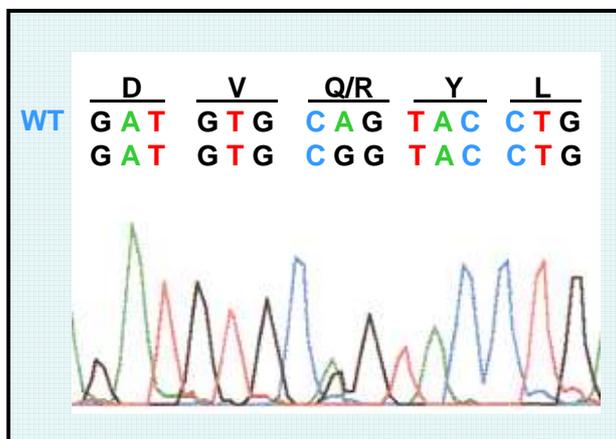


Abb. 3.15: Pat. 38, c.833A>G, pathogene Mutation

„CGG“, die Arginin codiert,

ändert. Diese pathogene Mutation ist bisher nicht in der Literatur veröffentlicht. Für dieses Exon wurden bereits Kontrollproben sequenziert und diese Mutation konnte ebenfalls bei keiner Kontrollprobe nachgewiesen werden.

Für den Patienten 38.0 wurde bereits in Exon 6 die heterozygote Mutation c.622C>T gefunden. Es erfolgte die Analyse der Familienmitglieder mittels Sequenzierung. Die Ergebnisse sind im Stammbaum in Abbildung 3.16 dargestellt. Schwarz dargestellt ist die pathogene Mutation c.833A>G in Exon 7, grau die pathogene Mutation c.622C>T in Exon 6. Der Indexpatient [38.0] hat die beiden Mutationen jeweils heterozygot von seinen Eltern [38.1 und 38.2] geerbt und ist dementsprechend Compound-Heterozygot. Seine Schwestern [38.4 und 38.5] haben jeweils die Mutation c.833A>G in Exon 7, sein Bruder [38.3] heterozygot die Mutation c.622C>T geerbt.

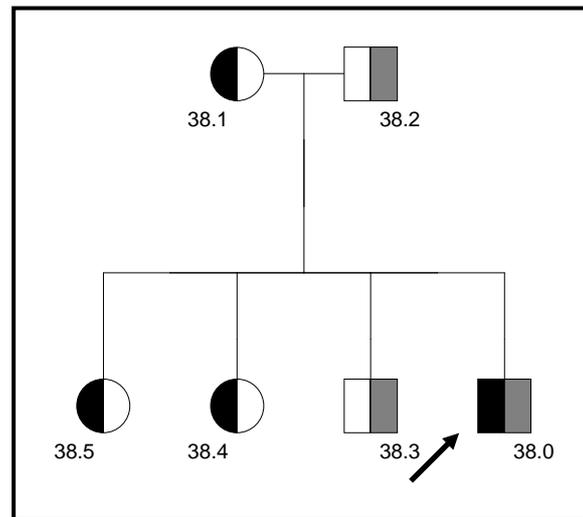


Abb. 3.16: Stammbaum Familie 38

3.1.7.2 Pathogene Mutation c.845G>A (p.Ser282Asn)

Bei der Patientenprobe 29.0 zeigte sich an der Position 845 der codierenden DNA ein heterozygoter Basenaustausch von Guanin zu Adenin [Abb. 3.17].

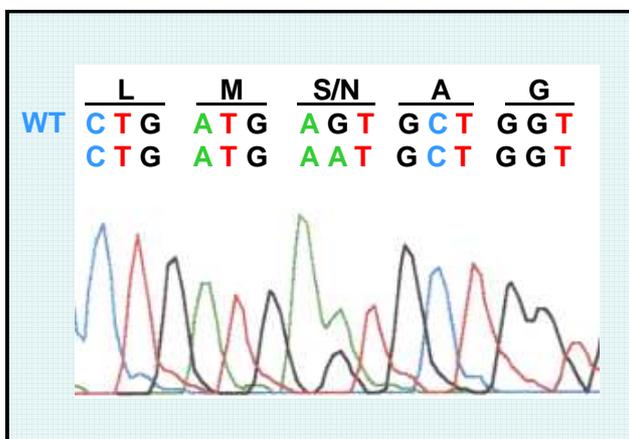


Abb. 3.17: Pat. 29, c.845G>A, pathogene Mutation

Diese Veränderung befindet sich an der zweiten Stelle eines codierenden Triplets. Anstelle des Basencodes „AGT“, der für die Aminosäure Serin codiert, kommt es zum Code „AAT“, welcher für die Aminosäure Asparagin codiert. Dieser Aminosäureaustausch wurde

bisher nicht in der Literatur veröffentlicht. In der anschließenden Untersuchung von 50 Kontrollproben, die nicht an einer neuronalen Ceroid-Lipofuszinose erkrankt sind, konnte in keiner Probe dieser Basenaustausch nachgewiesen werden.

Es erfolgte die Durchführung eines Restriktionsenzymverdaus im Exon 7 der Familie. Das PCR – Produkt hat eine Länge von 384 bp. Das Restriktionsenzym *BsmI* schneidet den Wildtyp an der Erkennungssequenz - GAATGCN[∇]- in zwei Fragmente, die eine Länge von 32 bp und 352 bp haben. Durch die Mutation ergibt sich eine neue Schnittstelle, so dass sich drei Fragmente mit einer Länge von 32 bp, 113 bp und 239 bp zeigten. Die

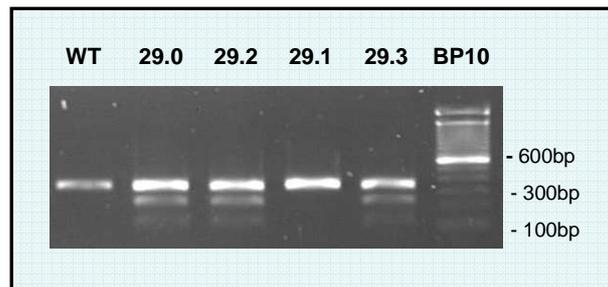


Abb. 3.18: Enzymverdaug *BsmI*

Gelelektrophorese des Restriktionsenzymverdaus ist in Abbildung 3.18 zu sehen. Die Indexpatientin 29.0 zeigt heterozygot sowohl die Wildtypanteile als auch die Fragmente der pathogenen Mutation. Diese zeigen sich auch beim Vater [29.2] und bei der Schwester [29.3] der Patientin. Die Mutter [29.1] zeigt dagegen lediglich die Wildtypfragmente. Zur Kontrolle erfolgte noch die Sequenzierung, die die Befunde bestätigte.

Bei der Patientenprobe 29.0 hat sich bereits im Exon 6 eine heterozygote 1-bp-Deletion gezeigt. Die Ergebnisse der Familie 29 sind in dem Stammbaum der Abbildung 3.19 dargestellt. Zusammen mit den Ergebnissen des Exon 7 kommt es hier zu einer Compound-Heterozygotie. Sowohl Vater [29.2], als auch die Mutter [29.1] sind jeweils heterozygote Überträger. Schwarz ist die Mutation c.586delC dargestellt, grau die Mutation c.845G>A. Die Indexpatientin [29.0], trägt jeweils beide Mutationen heterozygot. Ihre

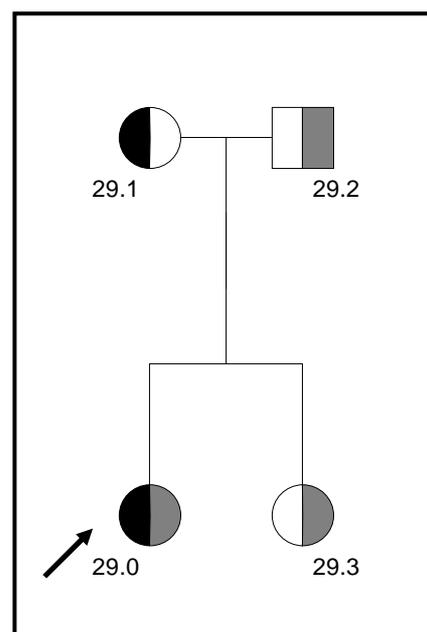


Abb. 3.19: Stammbaum Familie 29

gesunde Schwester [29.3] ist lediglich heterozygote Trägerin der Mutation c.845G>A.

3.1.7.3 Polymorphismus c.687+32T>C

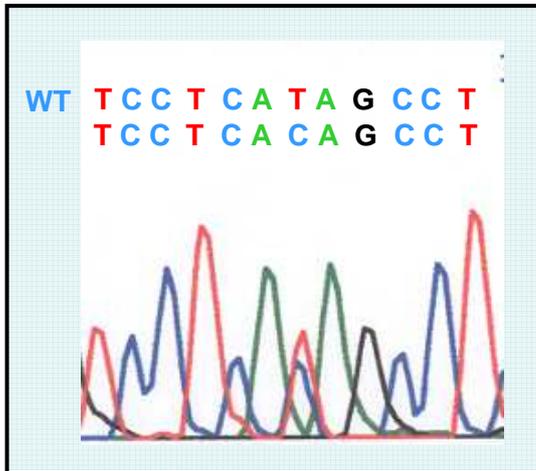


Abb. 3.20: Pat. 31, c.687+32T>C, Polymorphismus

Bei den Patienten 7.0, 12.0, 31.0, 33.0 und 36.0 zeigte sich bei der Sequenzierung [Abb. 3.20] in der genomischen DNA an Stelle 3767 heterozygot ein Basenaustausch von Thymin zu Cytosin im Intron 6. Diese Veränderung ist bereits bei Sleat et al. 1999 [Sleat, 1999] als Polymorphismus beschrieben.

3.1.8 Exon 8

Das Exon 8 hat eine Länge von 189 bp. In der SSCP - Analyse zeigte sich lediglich bei Patient 4.0 eine diskrete Veränderung, wobei sich in der anschließenden Sequenzierung kein pathologischer Befund ergab.

3.1.9 Exon 9

In der SSCP-Analyse des Exons 9, welches eine Länge von 70 bp hat, zeigten sich diskrete Veränderungen bei den Patientenproben 6.0 und 30.0. Alle anderen Patientenproben zeigten ein identisches, unauffälliges Bandenmuster. Die Sequenzierungen der beiden Patientenproben sowie der Patientenproben 31.0-38.0 ergaben keinen auffälligen Befund.

3.1.10 Exon 10

Das Exon 10 hat eine Länge von 121 bp. In der SSCP-Analyse zeigten sich bei den Patientenproben 6.0 und 7.0 im Vergleich zur Kontrollprobe Auffälligkeiten. Bei der weiterführenden Sequenzierung wurde jedoch bei keiner Probe ein pathologischer Befund gefunden.

3.1.11 Exon 11

Das Exon 11 hat eine Länge von 159 bp. In der SSCP-Analyse zeigten sich bei den Patientenproben 4.0, 5.0, 8.0, 13.0 und 15.0 Auffälligkeiten im Vergleich zur Kontrollprobe. Die Sequenzierung ergab jedoch keinen Hinweis auf eine Veränderung der Basensequenz.

3.1.12 Exon 12

Dieses Exon 12 hat eine Länge von 126 bp. In der SSCP-Analyse zeigten sich mehrere Auffälligkeiten in den Patientenproben, so dass die Sequenzierung erfolgte. Bei der Patientenprobe 30.0 zeigte sich im SSCP-Gel [Abb. 3.21] zum Beispiel eine Verschiebung der Banden im Bereich der Einzelstränge im Vergleich zur Kontrollprobe.

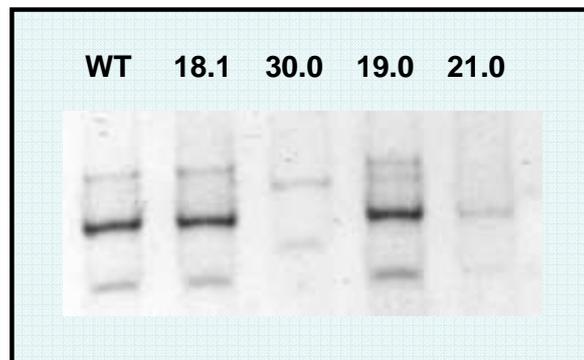


Abb. 3.21: SSCP, PAA/ Glycerin, Exon 12

3.1.12.1 Pathogene Mutation c.1476dupAT

Bei der Patientenprobe 30.0 zeigte sich in der Sequenzierung [Abb. 3.22] an der Stelle 1476 der codierenden DNA eine homozygote Duplikation der Basen

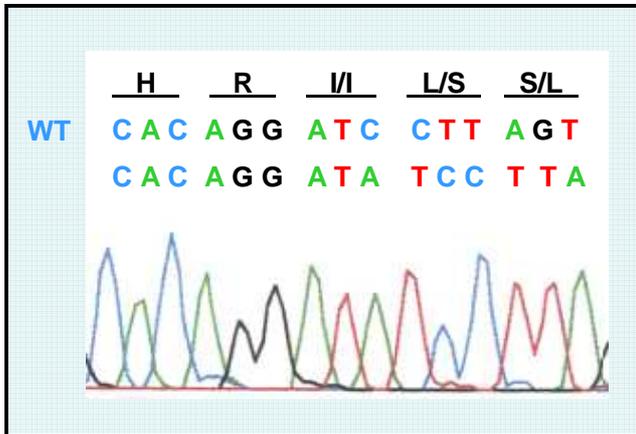


Abb. 3.22: Pat. 30, c.1476dupAT, pathogene Mutation

Adenin und Thymin, die zu einer Verschiebung des Leserasters führt und damit zu einer anderen Aminosäureabfolge. Diese pathogene Mutation wurde bisher in der Literatur nicht veröffentlicht.

Bei dem Patienten 30.0 und dessen Familie wurde zur weiteren Untersuchung ein Restriktionsenzymverdau im Exon 12 durchgeführt. Das PCR-Produkt von Exon 12 hat eine Länge von 315 bp. Das Restriktionsenzym *EcoRV* schneidet die Basensequenz der Mutation an der Stelle - GAT[∇]ATC - in zwei Fragmente, die eine Länge von 144 bp und 171 bp haben. Der Wildtyp hat diese Schnittstelle nicht, so dass sich in der Gelelektrophorese ein ungeschnittenes PCR Produkt mit 315 bp zeigte. In Abbildung 3.23 ist die Gelelektrophorese abgebildet. Der Indexpatient 30.0 zeigte homozygot die Mutation. Vater [30.2] und Mutter [30.1] zeigen sowohl die Fragmente der Mutation, als auch die Fragmente des Wildtyps. Sie sind dementsprechend heterozygot für diese Mutation. Zur weiterführenden Untersuchung erfolgte noch die Kontrolle mittels Sequenzierung, die die oben genannten Befunde bestätigte.

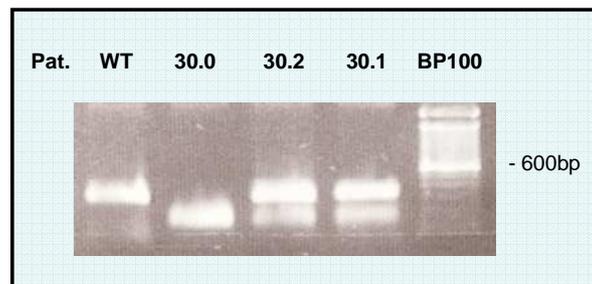


Abb. 3.23: Enzymverdau *EcoRV*

In Abbildung 3.24 ist der Stammbaum der Familie 30 dargestellt. Die Mutter [30.1] und der Vater [30.2] sind jeweils heterozygot für die Mutation c.1476dupAT und vererben diese jeweils an ihren Sohn [30.0], so dass dieser homozygoter Träger ist.

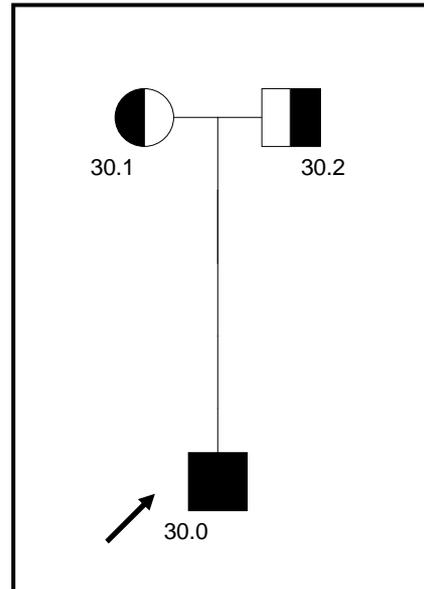
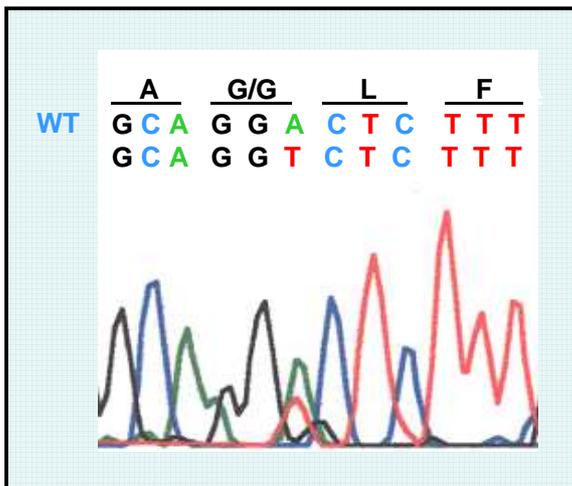


Abb. 3.24: Stammbaum Familie 30

3.1.12.2 Polymorphismus c.1542A>T (p.=)

Bei den durchgeführten Sequenzierungen zeigte sich bei den Patientenproben 1.0, 3.0, 9.0 und 33.0 an Stelle 1542 der codierenden DNA ein Basenaustausch



von Adenin zu Thymin an der dritten Stelle des codierenden Triplets [Abb. 3.25]. Sowohl der Code „GGA“, als auch „GGT“, codieren die Aminosäure Glycin. Dieser Polymorphismus ist bereits bei Sleat et al. 1999 [Sleat, 1999] beschrieben.

Abb. 3.25: Pat. 1, c.1542A>T, Polymorphismus

3.1.13 Exon 13

Das Exon 13 hat eine Länge von 141 bp. In der SSCP-Analyse, unter beiden Untersuchungsbedingungen mit und ohne Glycerin, zeigte sich bei allen untersuchten Patienten ein identisches, unauffälliges Bandenmuster. Die Sequenzierungen der Patientenproben 31.0-38.0 ergaben ebenfalls keinen pathologischen Befund.

3.2 Ergebnisse für *CLN3*

Die Untersuchung auf die 1,02-kb-Deletion wurde schon vor Beginn der Arbeit von MitarbeiterInnen im Institut durchgeführt. Bei den Patientenproben 18.0, 19.0, 20.0, 21.0, 22.0, 23.0 und 25.0 wurde diese pathogene Mutation bereits heterozygot nachgewiesen. Daher erfolgte bei diesen Proben die Sequenzierung für jedes Exon.

3.2.1 Exon 1

Das Exon 1 hat eine Länge von 46 bp. In der durchgeführten SSCP-Analyse zeigten sich bei den Patientenproben 10.0, 20.0, 21.0, 23.0, 27.0 diskrete Auffälligkeiten. In der anschließenden Sequenzierung zeigten sich jedoch keine pathologischen Veränderungen.

3.2.2 Exon 2

Die Länge des Exons 2 beträgt 79 bp. Die SSCP-Analyse ergab diskrete Auffälligkeiten bei den Patientenproben 10.0, 18.0 und 23.0. Auch hier ergab sich bei der Sequenzierung kein Hinweis auf einen auffälligen Befund.

3.2.3 Exon 3

Das Exon 3 hat eine Länge von 97 bp. Die Patientenproben 10.0, 18.0, 20.0 und 24.0 zeigten diskrete Veränderungen in der SSCP-Analyse, so dass die anschließende Sequenzierung erfolgte, die jedoch keine auffälligen Befunde ergab.

3.2.4 Exon 4

Die Patientenproben 10.0, 19.0 und 28.0 zeigten in der SSCP-Analyse des 72 bp langen Exons diskrete Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp. Die Sequenzierung der Proben ergab keinen Hinweis auf einen pathologischen Befund.

3.2.5 Exon 5

Das Exon 5 hat eine Länge von 79 bp. In der SSCP-Analyse zeigten sich diskrete Auffälligkeiten bei den Patientenproben 10.0, 18.0, 21.0 und 23.0, die in der anschließenden Sequenzierung jedoch keine pathologischen Veränderungen zeigten.

3.2.6 Exon 6

Die Patientenproben 10.0, 18.0, 23.0 und 27.0 zeigten in der SSCP-Analyse des 87 bp langen Exons 6 im Vergleich zur Kontrollprobe diskrete Veränderungen. In der Sequenzierung ergab sich allerdings kein pathologischer Befund.

3.2.7 Exon 7

Bei der SSCP-Untersuchung des Exons 7, welches 73 bp lang ist, fielen bei den Patientenproben 10.0 und 27.0 ebenfalls nur diskrete Veränderungen auf, wobei in den weiterführenden Untersuchungen keine Auffälligkeiten festgestellt werden konnten.

3.2.8 Exon 8

Das Exon 8 hat eine Länge von 144 bp. In der SSCP-Analyse zeigten sich die Patientenproben 10.0 und 21.0 auffällig, so dass die Sequenzierung erfolgte. Diese ergab bei diesen beiden Proben keinen pathologischen Befund. Die Patientenproben 31.0-38.0 kamen erst zu einem späteren Zeitpunkt der experimentellen Arbeit zur Untersuchung hinzu.

Bei diesen Proben erfolgte die sofortige Sequenzierung der einzelnen Exons, wobei sich bei Patientenprobe 37.0 die im Folgenden genannten Befunde ergaben.

3.2.8.1 Pathogene Mutation c.597C>A (p.Tyr199X)

Bei dem Patienten 37.0 zeigte sich in der durchgeführten Sequenzierung [Abb. 3.26] an Position 597 der codierenden DNA ein homozygoter Basenaustausch von Cytosin zu Adenin an der dritten Stelle des codierenden Triplets. Daraus resultiert ein Austausch von Tyrosin zu einem Stopp-Codon, woraus eine Termination resultiert. Diese pathogene Mutation wurde 2009 von Sarpong et al. [Sarpong, 2009] beschrieben. Weitere Familienangehörige vom Patienten 37.0 standen zur Mituntersuchung leider nicht zur Verfügung.

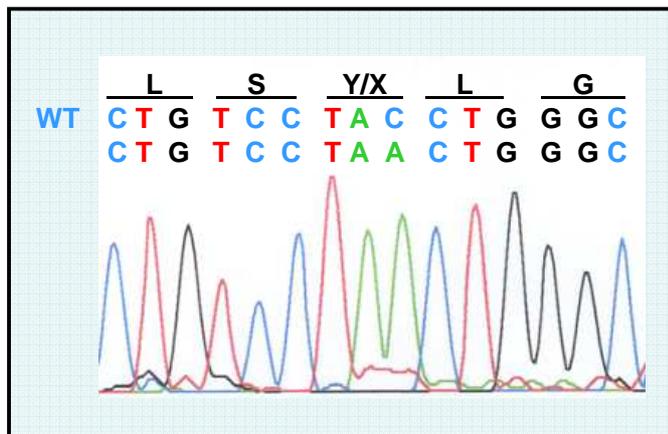


Abb. 3.26: Pat. 37, c.597C>A, pathogene Mutation

3.2.8.2 Polymorphismus c.582G>T (p.=)

Bei Patient 37.0 zeigte sich in der Sequenzierung [Abb. 3.27] ebenfalls im Exon 8 an der Position 582 der codierenden DNA ein homozygoter Basenaustausch von Guanin zu Thymin. Dieser Austausch steht an der dritten Stelle eines codierenden Triplets und sowohl „CTG“ als auch „CTT“ codieren für die Aminosäure Leucin.

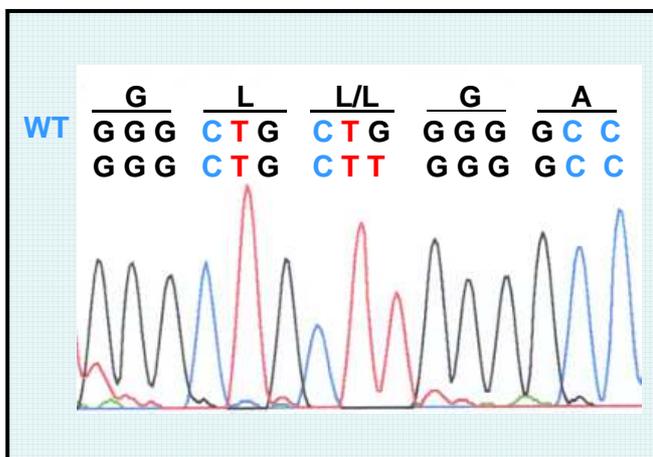


Abb. 3.27: Pat. 37, c.582G>T, Polymorphismus

Hierbei kommt es dementsprechend zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz. Dieser Polymorphismus wurde 2009 von Sarpong et al. [Sarpong, 2009] veröffentlicht.

3.2.9 Exon 9

Das Exon 9 hat eine Länge von 113 bp. In der SSCP-Analyse waren die Patientenproben 10.0, 17.0, 18.1, 19.0, 20.0, 21.0, 22.0, 23.0 und 25.0 auffällig und wurden sequenziert. Bei den Proben zeigte sich jedoch kein Befund.

3.2.10 Exon 10

Das Exon 10 hat eine Länge von 47 bp. In der SSCP-Analyse zeigten sich die Patientenproben 10.0, 18.0, 18.1, 19.0, 22.0, 24.0, 25.0, 29.0 und 30.0 diskret auffällig, so dass die Sequenzierung erfolgte, die jedoch keine Auffälligkeiten zeigte.

3.2.11 Exon 11

In der SSCP-Untersuchung des Exons 11, welches 69 bp hat, zeigten sich bei den Patientenproben 10.0, 17.0, 18.0, 24.0, 26.0 und 27.0 diskrete Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp. In der darauf durchgeführten Sequenzierung zeigte sich auch hier kein pathologischer Befund.

3.2.12 Exon 12

Das Exon 12 hat eine Länge von 56 bp. Hier zeigten sich bei den Patientenproben 10.0, 25.1 und 30.0 in der SSCP-Analyse fragliche Veränderungen, so dass die Sequenzierung erfolgte, die jedoch keine auffälligen Befunde ergab.

3.2.13 Exon 13

Das Exon 13 hat eine Länge von 94 bp. In der SSCP-Analyse [Abb. 3.28] zeigten sich in dem Polyacrylamidgel mit Glycerin bei den Patientenproben 22.0 und 24.0 jeweils unterschiedliche, zusätzliche Banden im Bereich der Einzelstränge. Die Sequenzierung zeigte dann pathologische Befunde, die unten näher beschrieben

sind. Des Weiteren zeigten sich bei den Patientenproben 10.0, 17.0, 19.0, 20.0, 21.0, 23.0, 25.0, 25.1, 26.0, 27.0 und 28.0 diskrete Veränderungen, so dass

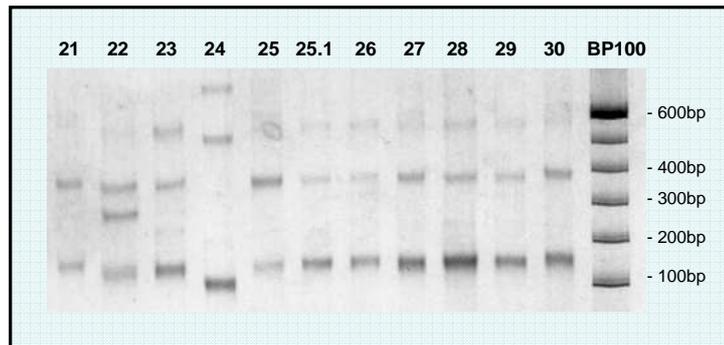


Abb. 3.28: SSCP Exon 13

auch hier die weitere Untersuchung mittels Sequenzierung erfolgte. Bei diesen Proben ergab sich jedoch kein auffälliger Befund.

3.2.13.1 Pathogene Mutation c.992delTT

Bei Patient 22.0 zeigte sich in der Sequenzierung [Abb. 3.29], an der Position 992 der codierenden DNA, die heterozygote Deletion von zwei Basen, dem Thymin. Durch diese Deletion kommt es zu einer Verschiebung der

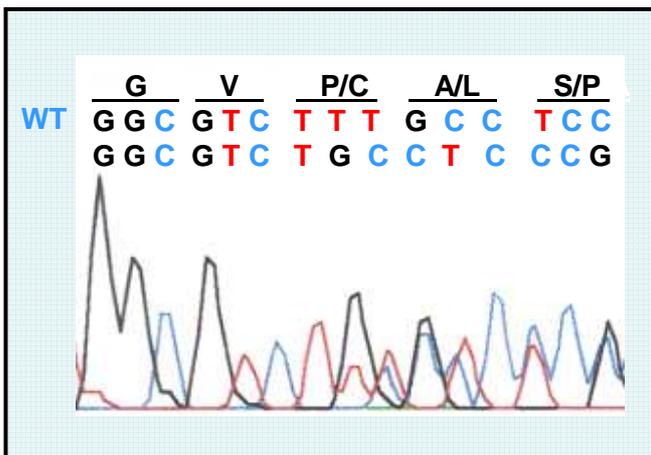


Abb. 3.29: Pat. 22, c.992delTT, pathogene Mutation

Basensequenz und dementsprechend zu einer Veränderung der Aminosäureabfolge. Statt der Basensequenz „TTT“, die die Aminosäure Prolin codiert, kommt es zur Sequenz „TGC“, die die Aminosäure Cystein codiert.

Durch die Verschiebung kommt es nach 49 Triplets zur Codierung eines Stopp-Codons und damit nicht nur zur veränderten Aminosäurezusammensetzung, sondern auch zur frühzeitigen Termination. Diese Mutation wurde bisher in der Literatur nicht veröffentlicht. Bei dem Patienten 22.0 konnte bereits heterozygot die 1,02-kb-Deletion nachgewiesen werden. Es wurde noch eine Familienanalyse mittels Sequenzierung durchgeführt. In Abbildung 3.30 ist der Stammbaum der Familie dargestellt. Die Träger der 1,02-kb-Deletion sind schwarz, die Träger der pathogenen Mutation c.992delTT grau markiert. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass die Eltern [22.1 und 22.2] des Patienten jeweils heterozygote Träger einer pathogenen Mutation sind und diese jeweils an ihr Kind [22.0] vererbt haben, so dass sich eine Compound-Heterozygotie ergibt.

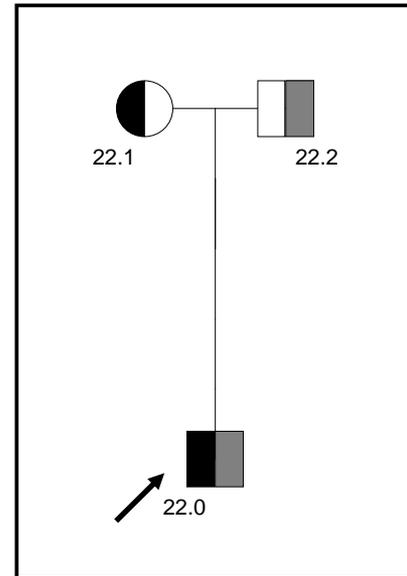


Abb. 3.30: Stammbaum Familie 22

3.2.13.2 Pathogene Mutation c.1000C>T (p.Arg334Cys)

Bei der Sequenzierung [Abb. 3.31] der Patientenprobe 24.0 zeigte sich ein homozygoter Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an der Position 1000 der codierenden DNA. Der Basenaustausch erfolgt an der ersten Stelle eines codierenden Triplets, wobei sich der Code „CGC“, der für die Aminosäure

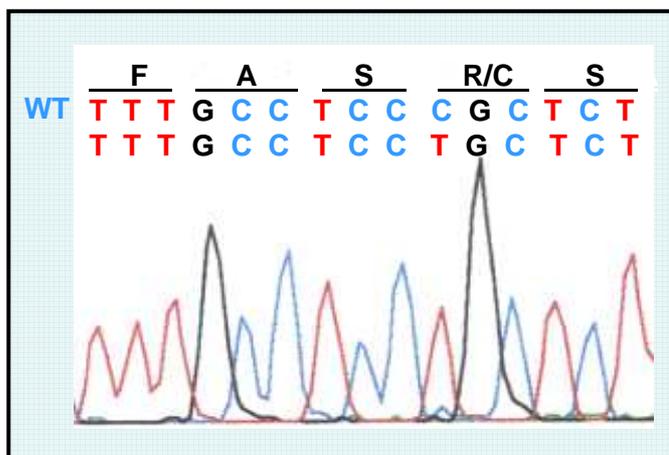


Abb. 3.31: Pat. 24, c.1000C>T, pathogene Mutation

Arginin codiert, in den Code „TGC“ ändert, der für die Aminosäure Cystein codiert. Diese pathogene Mutation ist in der Literatur bereits von Munroe et al. 1997 [Munroe, 1997] beschrieben worden.

Zur weiteren Untersuchung erfolgte noch die Untersuchung der Familienmitglieder der Patientin 24 mittels Sequenzierung. Der Stammbaum der Familie ist in Abbildung 3.32 dargestellt. Der Vater [24.2] ist heterozygoter Träger der pathogenen Mutation. Die Kinder [24.0 und 24.3] sind beide homozygote Träger dieser Mutation. Bei der Mutter [24.1] konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden. In einer Kontrolluntersuchung bestätigte sich dieses Ergebnis.

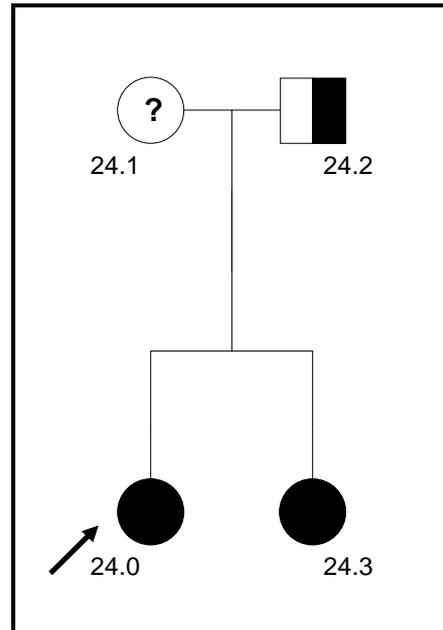


Abb. 3.32: Stammbaum Familie 24

3.2.14 Exon 14

Das Exon 14 hat eine Länge von 141 bp. In der SSCP-Analyse zeigten alle Patienten ein identisches, unauffälliges Bandenmuster. In den Patientenproben 31.0-38.0, bei denen die Sequenzierung durchgeführt wurde, zeigten sich ebenfalls keine pathologischen Befunde.

3.2.15 Exon 15

Das Exon 15 hat eine Länge von 120 bp. In der SSCP-Untersuchung fielen bei einigen Patienten diskrete Veränderungen auf, so dass die weiterführende Untersuchung mittels Sequenzierung erfolgte.

3.2.15.1 Pathogene Mutation c.1247A>G (p.Asp416Gly)

Bei der Patientenprobe 18.0 zeigte sich in der Sequenzierung [Abb. 3.33] an Position 1247 der codierenden DNA ein heterozygoter Basenaustausch von Adenin zu Guanin an der zweiten Stelle des codierenden Triplets.

Statt der Basensequenz „GAC“, die die Aminosäure Asparaginsäure codiert, ergibt sich die Sequenz „GGC“, die die Aminosäure Glycin codiert. Bei der Patientenprobe 18.0 konnte bereits heterozygot die 1,02-kb-Deletion nachgewiesen werden. Dieser Aminosäureaustausch wurde 2012 von Kousi et al. [Kousi, 2012] veröffentlicht. Als Kontrolle wurde die DNA von 56 randomisierten, nicht an Ceroid-Lipofuszinose erkrankten Personen, auf diesem Exon untersucht. Keiner dieser Personen zeigte diese Mutation, so dass nicht von einem häufigen Polymorphismus auszugehen ist. Allerdings konnte bei vier dieser Kontrollproben der Polymorphismus c.1211A>G, der im Folgenden näher beschrieben ist, nachgewiesen werden. Zur weiteren Untersuchung erfolgte eine Familienuntersuchung der Patientin 18.0. Der Stammbaum der Familie ist in Abbildung 3.34 zu sehen. Schwarz ist die pathogene Mutation p.Asp416Gly dargestellt, grau die 1,02-kb-Deletion.

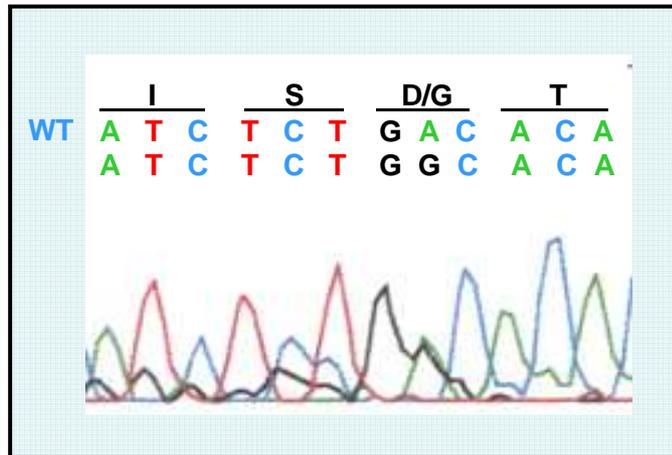


Abb. 3.33: Pat. 18, c.1247A>G, pathogene Mutation

nachgewiesen werden. Zur weiteren Untersuchung erfolgte eine Familienuntersuchung der Patientin 18.0. Der Stammbaum der Familie ist in Abbildung 3.34 zu sehen. Schwarz ist die pathogene Mutation p.Asp416Gly dargestellt, grau die 1,02-kb-Deletion. Sowohl Vater [18.2] als auch Mutter

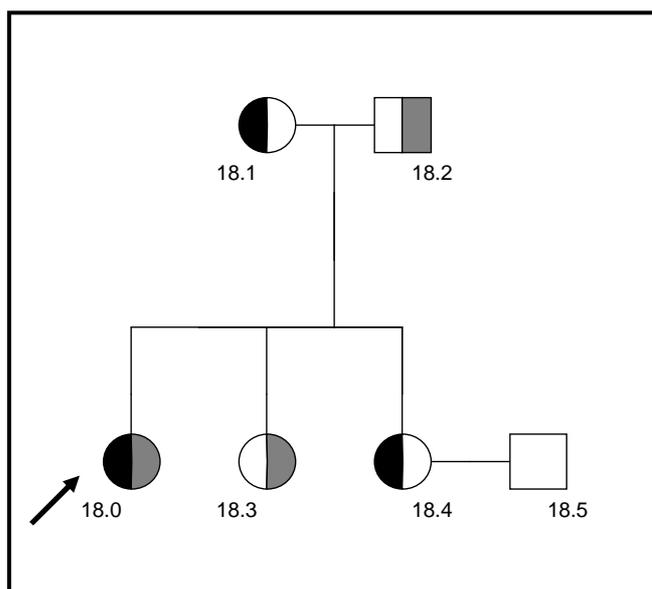
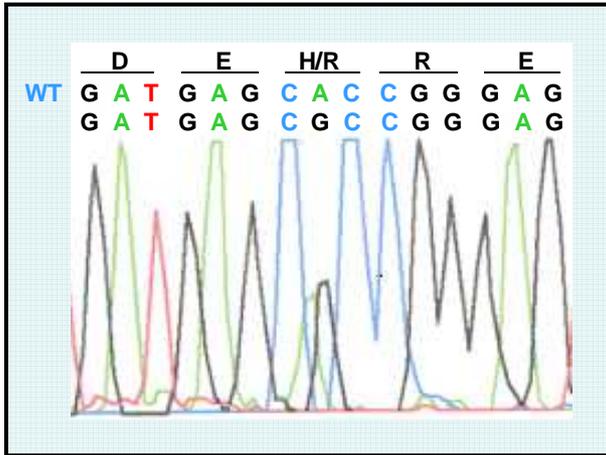


Abb. 3.34: Stammbaum Familie 18

[18.1] tragen jeweils eine pathogene Mutation heterozygot. Die Indexpatientin [18.0] hat beide pathogenen Mutationen jeweils heterozygot vererbt bekommen. Ihre Schwestern [18.3 und 18.4] sind jeweils heterozygote Trägerinnen einer der Mutationen. Dementsprechend ist hier von einer Compound-Heterozygotie auszugehen.

3.2.15.2 Polymorphismus c.1211A>G (p.His404Arg)

Bei der Patientenprobe 17.0 [Abb. 3.35] und den Kontrollpatienten C30, C34, C39 und C68 zeigte sich bei der Sequenzierung an der Position 1211 der codierenden DNA ein heterozygoter Basenaustausch von Adenin zu Guanin.



Dieser Basenaustausch zeigt sich an der zweiten Stelle eines codierenden Triplets und codiert statt der Aminosäure Histidin die Aminosäure Arginin. Diese Veränderung ist von Eksandh et al. 2000 [Eksandh, 2000] bereits als Polymorphismus beschrieben.

Abb. 3.35: Pat. 17, c.1211A>G, Polymorphismus

4 Diskussion

Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen zählen zu den neurodegenerativen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter, die bisher nicht heilbar sind. Das klinische Spektrum ist vielfältig und umfasst unter anderem den Verlust der Sehkraft, fortschreitender geistiger Abbau, epileptische Anfälle, motorische Bewegungsstörungen, Gehirnatrophie und eine deutlich reduzierte Lebenserwartung.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden 38 Patientenproben untersucht, bei denen klinisch eine neuronalen Ceroid-Lipofuszinose diagnostiziert wurde. Das Ziel der Arbeit war es eine Mutationsanalyse durchzuführen und eine eindeutige Zuordnung der Patienten zu einem bestimmten Subtyp der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen zu erhalten.

Es erfolgte eine molekulargenetische Untersuchung in den *CLN2*- und *CLN3*-Genen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR), der single strand conformation polymorphism Analyse (SSCP) sowie der DNA- Sequenzierung. Dabei wurden 11 pathogene Mutationen und 20 Polymorphismen im *CLN2*-Gen, sowie sechs pathogene Mutationen und sechs Polymorphismen im *CLN3*-Gen gefunden. Davon sind vier Mutationen im *CLN2*-Gen und eine im *CLN3*-Gen bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Sara Mole erstellte auf der Webseite des University College London (UCL) eine Datenbank [www.ucl.ac.uk/ncl] über die bereits publizierten und ihr persönlich mitgeteilten pathogenen Mutationen und Polymorphismen der einzelnen Untergruppen der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen. Bis Februar 2013 wurden für das *CLN2*-Gen dort 97 pathogene Mutationen und 23 Polymorphismen [www.ucl.ac.uk/ncl/cln2.shtml] beschrieben, wobei die zwei häufigsten Mutationen die Spleiß-Mutation c.509-1G>C und die Nonsense-Mutation p.Arg208X [Zhong et al., 1998; Sleat et al., 1999] sind.

Für das *CLN3*-Gen wurden bisher 58 pathogene Mutationen sowie neun Polymorphismen veröffentlicht [www.ucl.ac.uk/ncl/cln3.shtml]. Hier kommt es am häufigsten zur 1,02-kb-Deletion [Järvelä et al., 1998]. Eine tabellarische Auflistung sowohl der gefundenen als auch veröffentlichten pathogenen Mutationen und Polymorphismen des *CLN2*- bzw. *CLN3*-Gens auf dem Stand von Februar 2013 findet sich im Anhang.

4.1 Single strand conformation polymorphism Analyse

In der vorliegende Dissertationsarbeit wurde als Screeningmethode im *CLN2*- bzw. *CLN3*-Gen die single strand conformation polymorphism Analyse (SSCP) gewählt. Damit lässt sich ein größeres Gen effizient mit hoher Sensitivität und Spezifität auf vorhandene Mutationen untersuchen [Ravnik-Glavac, 1994; Michaud, 1992].

Einzelsträngige DNA Moleküle zeigen in Polyacrylamidgelen ein unterschiedliches Laufverhalten je nach Basenabfolge, Fragmentgröße und -länge. Durch eine Veränderung der Basensequenz kommt es zu einer Konformationsänderung, zu einer veränderten Laufgeschwindigkeit und damit zu einem unterschiedlichen Bandenmuster im Vergleich mit dem Wildtyp. Das Auftrennungsverhalten wird durch verschiedene Einflüsse, wie die Ionenkonzentration, die Acrylamidkonzentration, die Umgebungstemperatur und eventuelle Zusätze wie Glycerin beeinflusst [Glavac et Dean, 1993; Spinardi, 1991]. In der vorliegenden Arbeit wurde die SSCP-Analyse unter Raumtemperatur mit einem 8%igen Polyacrylamidgel unter zwei verschiedenen Bedingungen, entweder mit 10%igen Glycerin- oder ohne Zusatz, durchgeführt um unter verschiedenen Bedingungen die Empfindlichkeit des Verfahrens zu erhöhen.

In verschiedenen publizierten Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die Position, als auch die Art der Mutation wichtig ist, um in der SSCP-Analyse nachgewiesen zu werden [Glavac et Dean, 1993; Sheffield, 1993]. Allerdings variiert die Sensitivität mit der Größe des untersuchten PCR-Fragments, wobei optimale Größen in der Literatur zwischen 150 bp und 200 bp angegeben werden [Sheffield, 1993, Orita, 1989].

Für Fragmentgrößen unter 300 bp ist eine Sensitivität von über 80% in der Literatur beschrieben [Sheffield, 1993; Hayashi, 1993]. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden für das *CLN2*-Gen PCR-Fragmentgrößen von 282 bp bis 364 bp verwendet. Für das *CLN3*-Gen erfolgten die Untersuchungen in Anlehnung der Vorerfahrungen von Munroe et al. mit PCR-Fragmentgrößen zwischen 241 bp und 481 bp [Munroe et al., 1997]. Insgesamt ist davon auszugehen, dass bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv mit dieser Screeningmethode nicht alle Mutationen restlos gefunden werden konnten.

Aus diesem Grunde wurde bereits bei minimalen Veränderungen bzw. Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse eine anschließende Sequenzierung durchgeführt. Des Weiteren wurden die Patientenproben, bei denen lediglich eine heterozygote Mutation gefunden wurde, auch in allen anderen Exons auf eine mögliche weitere heterozygote pathogene Mutationen untersucht.

Die Sequenzierung hat zwar eine größere Sensitivität als die SSCP-Analyse, aber es werden auch mit diesem Verfahren nicht alle Mutationen erfasst.

4.2 Spätinfantile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL2)

Im *CLN2*-Gen sind die bisher beschriebenen pathogenen Mutationen nicht gleichmäßig über das Gen verteilt. In Tabelle 4.01. ist die Anzahl der pathogenen Mutationen im *CLN2*-Gen pro 100 bp für jedes Exon absteigend dargestellt. Die Anzahl der Mutationen wurde der Webseite von Sara Mole entnommen [www.ucl.ac.uk/ncl]. Es zeigt sich eine Häufung der pathogenen Mutationen im Exon 12, Exon 7,

<i>Exon</i>	<i>Anzahl der Mutationen pro 100 bp</i>
12	9,56
7	7,18
8	6,53
11	5,92
4	4,97
6	4,23
3	4,00
13	3,97
10	3,82
2	3,66
1	3,39
5	2,89
9	2,50

Tabelle 4.01: *CLN2*: Anzahl der Mutationen pro 100 bp

Exon 8 und Exon 11 und es ist möglich, dass es sich dabei um Bereiche mit wichtigen Aminosäuren und Funktionen innerhalb eines Proteins handelt [Walker, 1999].

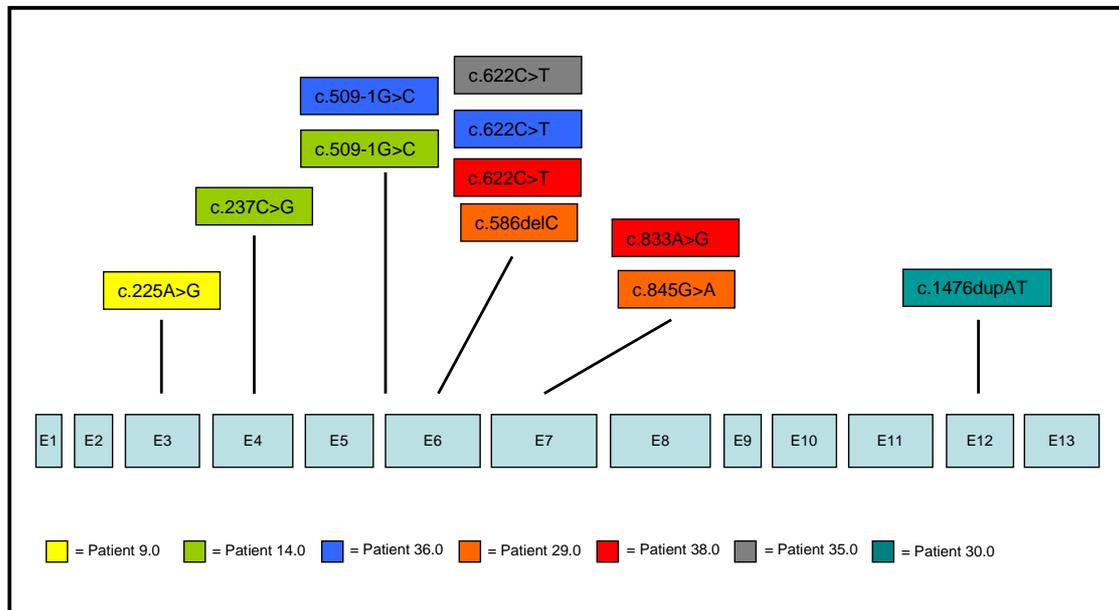


Abb. 4.01: Gefundene pathogene Mutationen im *CLN2*-Gen

In Abbildung 4.01 sind die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit gefundenen pathogenen Mutationen des *CLN2*-Gens bezogen zum Exon graphisch dargestellt. Es wurden in dieser Arbeit im *CLN2*-Gen 11 pathogene Mutationen gefunden, wovon lediglich eine homozygot war, die restlichen waren heterozygot. Bei vier der Indexpatienten ließen sich jeweils zwei heterozygote, pathogene Mutationen nachweisen, bei zwei Patienten lediglich eine heterozygote. Auf die einzelnen pathogenen Mutationen wird im Folgenden näher eingegangen.

Bei der pathogenen Mutation **c.225A>G (p.=)** in Exon 3 zeigte sich ein heterozygoter Basenaustausch von Adenin zu Guanin. Dieser steht an der dritten Stelle eines codierenden Triplets und aus „CAA“ wird „CAG“, wobei beide Triplets die Aminosäure Glutamin codieren. Diese Veränderung befindet sich innerhalb des Exons 3 kurz vor der Spleißstelle. In Abbildung 4.02 ist die Basensequenz am Exon/ Intron Übergang dargestellt. Die vorletzte Base eines Exons ist in 14%

Cytosin und zu 59% Adenin. An der letzten Position ist es zu 81% Guanin und zu 8% Adenin. Das bedeutet, dass es sich hierbei bereits im Wildtyp um eine

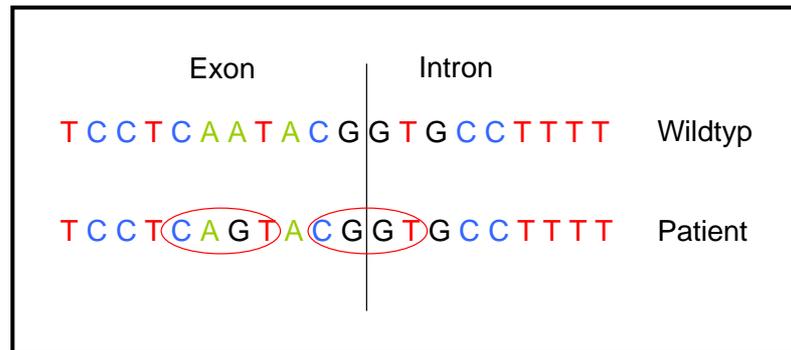


Abb. 4.02: Basensequenz Übergang Exon 3/ Intron 3

„schwache“ Spleißstelle handelt. Bei dem vorliegenden Basenaustausch ist es daher möglich, dass durch Spleißverstärker eine neue potentielle Spleißstelle generiert wird. Unter dieser Annahme führt dies häufig zum Exon-Skipping. In der Publikation von Sleat et al. wurde 1999 bereits diskutiert, ob es sich hierbei wirklich um eine potentielle Spleißstelle oder nicht doch um einen Polymorphismus handelt, da dazu experimentelle Beweise fehlen. Sie merkten jedoch an, dass bei ihren Untersuchungen in keiner der Kontrollproben von Personen ohne Erkrankung diese Veränderung festgestellt wurde. Außerdem ließ sich diese Veränderung bei keiner Patientenprobe nachweisen, bei denen eindeutig pathogene Mutationen identifiziert wurden [Sleat, 1999].

Im Exon 4 liegt die pathogene Mutation **c.237C>G (p.Tyr79X)**. Hier erfolgt ein Austausch von Tyrosin zu einem Stopp-Codon, wodurch es zu einem vorzeitigen Abbruch und damit höchstwahrscheinlich zu einem enzymatisch unwirksamen Protein kommt. Diese pathogene Nonsense-Mutation wurde 2012 von Kousi et al. [Kousi, 2012] publiziert.

Bei der pathogenen Mutation **c.509-1G>C** handelt es sich um eine der beiden bisher am häufigsten gefundenen Mutationen im *CLN2*-Gen. Sie wurde erstmalig 1997 von Sleat et al. beschrieben und konnte in diesem Patientengut bei zwei Patienten nachgewiesen werden. Hier kommt es zu einem Basenaustausch am Übergang des Introns 5 zu Exon 6 und damit zu einer falschen Spleißstelle (Spleiß-Mutation). Dadurch wird das Intron 5 beim Spleißen nicht herausgeschnitten sondern mitcodiert. Nach 146 bp wird dann ein Stopp-Codon generiert und es entsteht ein verkürztes, enzymatisch fehlerhaftes Protein.

Bei der pathogenen Mutation **c.586delC** im Exon 6 kommt es zur Deletion einer Base und dadurch zu einer Verschiebung des Leserasters. Diese Verschiebung resultiert in einer veränderten Nukleotidsequenz und schließlich in einem vorzeitigen Stopp-Codon. Diese Nonsense-Mutation konnte bei einem Patienten nachgewiesen werden und wurde bisher nicht veröffentlicht. Zur Bestätigung der vorliegenden Befunde wurde eine Familienanalyse durchgeführt, die die Vermutung unterstützte, dass die vorliegende heterozygote Mutation in Kombination mit einer weiteren heterozygoten Mutation in Exon 7 zu einer Compound-Heterozygotie und damit zur Erkrankung an der spätinfantilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose führt.

In eukaryotischen Zellen gibt es für solche Nonsense-Mutationen einen Kontrollmechanismus, der als **nonsense-mediated-decay** (NMD) bezeichnet wird. Im ersten Schritt der Proteinbiosynthese, der **Transkription**, wird die genetische Information der doppelsträngigen DNA auf die einzelsträngige prä-mRNA umgeschrieben. Beim **Capping** wird der 5`Anfang der prä-mRNA durch Anheftung eines Guanosins modifiziert. Diese 5`Cap-Struktur sorgt für den richtigen Spleißvorgang, schützt die mRNA vor dem Abbau durch Exonukleasen und sorgt für eine höhere Stabilität. Des Weiteren werden am 3`Ende der prä-mRNA ca. 200 Adenosin-Moleküle addiert (**Polyadenylierung**). Dadurch wird die Stabilität der mRNA zusätzlich erhöht und vor dem Abbau durch Exonukleasen geschützt. Beim darauffolgenden **Spleißen** werden die nichtkodierenden Introns herausgeschnitten und die codierenden Exons zur fertigen mRNA zusammengefügt.

Die Grenzen der einzelnen Exons werden durch Exon-Junction-Complexe (EJC) markiert. Diese Complexe werden normalerweise in der anschließenden **Translation** vom ersten Ribosom entfernt. Durch die Nonsense-Mutation entsteht ein Stopp-Codon an dem die Translation vorzeitig beendet wird. Dahinter (in 5'-3'-Richtung betrachtet) befinden sich meist noch Exon-Junction-Complexe, woraufhin ein schnellerer Abbau der mRNA durch Exonukleasen initiiert wird. Diesen Vorgang bezeichnet man als nonsense-mediated-decay, der in Abbildung 4.03 graphisch dargestellt ist.

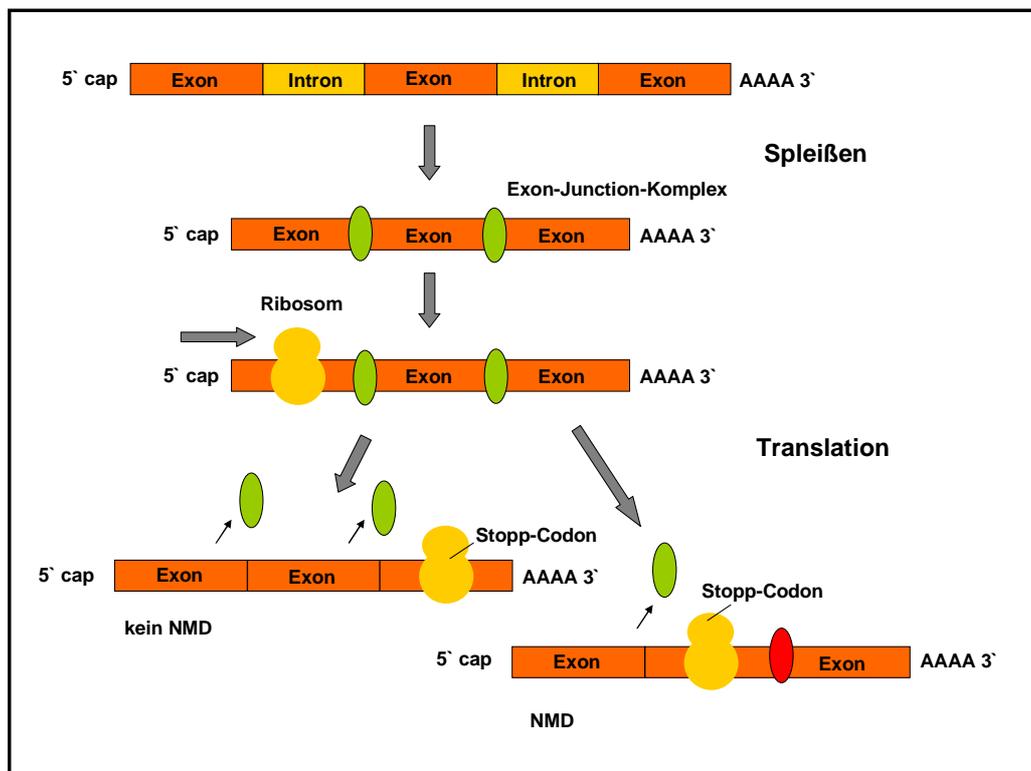


Abb. 4.03: Darstellung des nonsense-mediated-decay im Menschen, modifiziert nach Neu-Yilik [Neu-Yilik et al., 2008]

Durch diesen Kontrollmechanismus werden mRNA-Transkripte eliminiert, die sonst zur Synthese verkürzter Proteine führen würden, was ggf. für die Zelle schädigende Auswirkungen hat. Allerdings wird hiermit auch diejenige mRNA eliminiert, die ein teilfunktionelles Protein generiert hätte [Hentze et Kulozik, 1999; Neu-Yilik et al., 2008].

Die pathogene Mutation **c.622C>T (p.Arg208X)** im Exon 6 wurde bei drei Patienten nachgewiesen. Es kommt hier zu einer veränderten Basensequenz, durch den Austausch von Cytosin zu Thymin, wobei diese Veränderung ein Stopp-Codon generiert und auch hier der NMD aktiviert wird. Diese pathogene Nonsense-Mutation wurde bereits 1997 von Sleat et al. [Sleat, 1997] veröffentlicht und zählt zu den häufigsten Mutationen im *CLN2*- Gen [Hartikainen, 1999].

Im Exon 7 konnte die pathogene Mutation **c.833A>G (p.Gln278Arg)** nachgewiesen werden. Es kommt zu einem Basenaustausch von Adenin zu Guanin, wobei sich die Aminosäuresequenz von Glutamin zu Arginin ändert. Das bedeutet, dass das Protein in seiner kompletten Länge erhalten bleibt und es nicht zwingend zu einer Funktionsänderung des Proteins kommen muss. Dabei unterscheidet man, ob es sich bei dem Austausch einer Aminosäure durch eine andere Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften handelt (konservativer Aminosäureaustausch) oder nicht (nicht konservativer Aminosäureaustausch). Bezüglich der chemischen Eigenschaften ist Glutamin pH-neutral, dagegen Arginin stark basisch, d.h. man spricht von einem nicht konservativen Aminosäureaustausch, der sich meist auf die Struktur eines Proteins auswirkt und zu einer Funktionseinschränkung bzw. -verlust des Proteins führt. Diese Mutation wurde bisher nicht veröffentlicht. Zur weiteren Bestätigung, dass es sich um eine pathogene Mutation handelt, erfolgte die Untersuchung von Kontrollproben von Personen, die nicht an einer neuronalen Ceroid-Lipofuszinose erkrankt sind. Hier wurde diese Veränderung in keiner Probe nachgewiesen. Des Weiteren erfolgte eine Familienanalyse, die die Annahme der Pathogenität unterstützte. In der Familienanalyse wurde in Exon 6 bereits die pathogene Mutation c.622C>T (p.Arg208X) gefunden. Zusammen mit dieser Mutation ergibt sich hier eine Compound-Heterozygotie, wobei der erkrankte Indexpatient beide pathogenen Mutationen heterozygot von seinen gesunden Eltern vererbt bekommen hat und seine drei gesunden Geschwister jeweils nur eine der pathogenen Mutationen übertragen bekommen haben.

Bei einer Patientenprobe wurde die Mutation **c.845G>A (p.Ser282Asn)** im Exon 7 nachgewiesen, die in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde. Hier kommt es heterozygot zu einem Basenaustausch und damit zu einer veränderten Aminosäuresequenz, da die Aminosäure Serin durch Asparagin ersetzt wird. Hierbei handelt es sich um einen konservativen Aminosäureaustausch (beides neutrale Aminosäuren), d.h. es muss nicht unbedingt zu einer Funktionsänderung des Proteins kommen. Es erfolgte daher die Untersuchung von Kontrollproben, in denen diese Abweichung nicht festgestellt werden konnte. Zur weiteren Untersuchung der Pathogenität der Mutation wurde eine Familienanalyse durchgeführt. Hier zeigte sich bei der Indexpatientin eine weitere heterozygote Mutation im Exon 6, wobei es durch beide zu einer Compound-Heterozygotie kommt. Bei den Eltern konnte jeweils eine der vererbten pathogenen Mutationen heterozygot festgestellt werden. Die gesunde Schwester der Indexpatientin hat nur die pathogene Mutation c.845G>A heterozygot geerbt. Insofern erscheint eine Pathogenität dieser Mutation wahrscheinlich, kann aber nicht endgültig bewiesen werden.

Im Exon 12 wurde bei einem Patienten die pathogene Mutation **c.1476dupAT** gefunden. Hier zeigte sich homozygot eine Duplikation von Adenin und Thymin, wodurch es zu einer Verschiebung des Leserasters kommt, dementsprechend zu einer veränderten Aminosäuresequenz und damit auch zu einer veränderten Proteinstruktur. Diese pathogene Mutation wurde bisher nicht publiziert. Auch hier wurde zur Überprüfung der Pathogenität der Mutation eine Familienanalyse vorgenommen, wobei sowohl beim Vater als auch der Mutter des Indexpatienten die Mutation heterozygot nachgewiesen werden konnte.

Bei zwei Patienten konnte jeweils nur eine heterozygote, pathogene Mutation nachgewiesen werden, obwohl die Untersuchung der Patientenproben auf alle anderen Exons des *CLN2*-Gens ausgedehnt wurde. Hier könnte zum Beispiel als zweite pathogene Mutation eine größere Deletion vorliegen, die mit den hier verwendeten Untersuchungsmethoden nicht erfasst wurde.

Bei den in diesem Patientenkollektiv gefundenen Polymorphismen im *CLN2*-Gen zeigten sich zwei verschiedene Arten. Bei der ersten kam es zu einem Basenaustausch, der jedoch nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führte und damit das Protein in seiner Struktur nicht veränderte. Bei der zweiten Art befanden sich die Veränderungen soweit im nichtcodierenden Bereich des Introns, das sie ebenfalls keine Relevanz haben.

4.3 Juvenile neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL3)

Das *CLN3*-Gen ist von der Hefe bis zum Mensch hoch konserviert [Taschner, 1997] und das am weitesten konservierte NCL-Gen, was darauf hindeutet, dass es grundlegende Funktionen einer eukaryonten Zelle hat [Kitzmüller, 2008]. Bei 85% der Patienten lässt sich die pathogene 1,02-kb-Deletion homo- oder heterozygot nachweisen [Munroe, 1997; Kitzmüller, 2008]. Bei Betrachtung der bisher publizierten pathogenen Mutationen im *CLN3*-Gen sieht man, dass, genau wie im *CLN2*-Gen, keine gleichmäßige Verteilung der pathogenen Mutationen über das Gen nachzuweisen ist. In Tabelle 4.02. ist die Anzahl der Mutationen pro 100 bp dargestellt. Die Mutationsanzahl wurde der Webseite von Sara Mole entnommen [www.ucl.ac.uk/ncl]. Hier zeigt sich eine deutliche Häufung im Bereich der Exons 6, 7, 8 und 13. Die häufigsten pathogene Mutation, die 1,02-kb-Deletion, führt ebenfalls zu einem Verlust in diesem Bereich. Diese Region scheint im *CLN3*-Gen eine besonders prädisponierte Region zu sein. Das Patientenkollektiv dieser Dissertationsarbeit wurde bereits im Vorfeld auf die 1,02-kb-Deletion untersucht.

Exon	Anzahl der Mutationen pro 100 bp
6	8,25
13	7,69
7	7,23
8	5,84
11	5,06
12	4,55
2	4,49
3	2,80
4	2,44
15	2,31
5	2,25
1	1,78
14	1,32
9	0,00
10	0,00

Tabelle 4.02: *CLN3*: Anzahl der Mutationen pro 100 bp

Bei sieben Patienten des Kollektivs war diese bereits heterozygot bekannt. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen ließ sich bei zweien dieser Patienten jeweils eine weitere heterozygote pathogene Mutation nachweisen. In Abbildung 4.04 sind die gefundenen pathogenen Mutationen im *CLN3*-Gen dargestellt, die im Folgenden näher beschrieben werden.

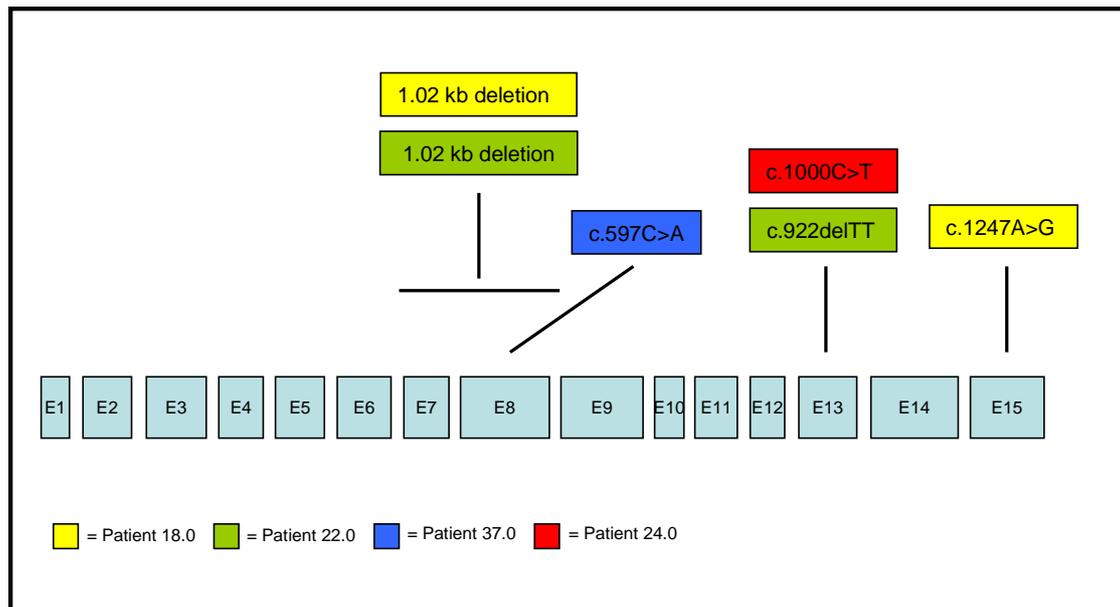


Abb. 4.04: Gefundene pathogene Mutationen im *CLN3*-Gen

Im Exon 8 zeigte sich die pathogene Mutation **c.597C>A (p.Tyr199X)**. Hier zeigte sich homozygot ein Austausch von Tyrosin zu einem Stopp-Codon. Von daher kommt es an Stelle 199 zu einem Abbruch der Aminosäuresequenz und zur Aktivierung des NMD-Kontrollmechanismus. Diese pathogene Mutation wurde bereits von Sarpong et al. 2009 publiziert.

Bei einem Patienten konnte die pathogene Mutation **c.992delTT** in Exon 13 nachgewiesen werden. Es zeigte sich heterozygot eine Deletion von zwei Basen Thymin, wodurch es zu einer Verschiebung des Leserasters kommt, schließlich zu einem vorzeitigen Abbruch der Aminosäuresequenz, zur Aktivierung des NMD und damit zu einer veränderten Proteinstruktur. Diese Mutation wurde bisher nicht veröffentlicht. Bei dem Indexpatienten kommt es zusammen mit der 1,02-kb- Deletion zu einer Compound-Heterozygotie, wobei zur Bestätigung der Befunde eine Familienanalyse erfolgte.

Hier zeigten sich die gesunden Eltern jeweils heterozygot für eine der beiden pathogenen Mutationen.

Die pathogene Mutation **c.1000C>T (p.Arg334Cys)** in Exon 13 wurde bei einer Patientin homozygot nachgewiesen. Hier kommt es zu einem Basenaustausch, der zu einer veränderten Aminosäuresequenz führt. Die Aminosäuresequenz wird von Arginin zu Cystein verändert. Arginin ist basisch und Cystein eine neutrale Aminosäure, so dass man hier von einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch spricht. Die Aminosäure Cystein ist schwefelhaltig und zwei Cysteine können durch Oxidation der Sulfhydrylgruppen miteinander eine Disulfidbrücke bilden. Diese Brückenbildung ist für die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen verantwortlich. D.h. der Aminosäureaustausch bewirkt vermutlich eine Funktionseinschränkung bzw. einen Funktionsverlust des Proteins. Diese Mutation wurde bereits von Munroe et al. 1997 als pathogen beschrieben. In der durchgeführten Familienanalyse zeigte sich bei der Schwester der Indexpatientin die pathogene Mutation ebenfalls homozygot, beim Vater heterozygot. Bei der Mutter konnte diese Mutation nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Familienanalyse ist davon auszugehen, dass die pathogene Mutation bei den Kindern nicht homozygot, sondern heterozygot vorliegt und das andere Allel mittels der hier durchgeführten Untersuchungsmethoden nicht miterfasst wurde. In diesem Bereich sind zwei grosse Deletionen publiziert, eine 2,8-kb-Deletion und eine 6,0-kb-Deletion, die diesen Bereich miterfassen. Es lässt sich daher vermuten, dass in der Familie eine dieser grossen Deletionen vorliegt.

Im Exon 15 ließ sich die pathogene Mutation **c.1247A>G (p.Asp416Gly)** heterozygot bei einem Patienten nachweisen. Hier kommt es zu einer veränderten Basensequenz, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hat. Bei dem Aminosäureaustausch wird Asparaginsäure (saure Aminosäure) durch Glycin (neutrale Aminosäure) ersetzt, so dass man hier von einem nicht konservativen Aminosäureaustausch spricht. Diese pathogene Mutation wurde bereits 2012 von Kousi et al. veröffentlicht. Bei dem Indexpatienten konnte als weitere heterozygote, pathogene Mutation die 1,02-kb-Deletion nachgewiesen werden, so dass sich hier eine Compound- Heterozygotie ergibt.

Diese ließ sich durch die Durchführung einer Familienanalyse bestätigen, in der sich die Eltern jeweils heterozygot für eine der pathogenen Mutationen zeigten und die gesunden Geschwister ebenfalls nur Überträger einer heterozygoten Mutation sind.

Im *CLN3*-Gen ließen sich in diesem Patientenkollektiv zwei verschiedene Arten von Polymorphismen nachweisen. Bei der ersten kommt es zwar zu einem Basenaustausch, aber nicht zur Veränderung der Aminosäuresequenz, bei der zweiten zeigte sich zwar ein Aminosäureaustausch in Exon 15, dieser wurde aber auch bei mehreren Patienten in der Kontrollgruppe, die nicht an einer neuronalen Ceroid-Lipofuszinose erkrankt sind, gefunden.

Bei den sieben Patienten, bei denen bereits heterozygot die 1,02-kb-Deletion festgestellt wurde, konnte lediglich bei zwei Patienten eine weitere heterozygote Mutation nachgewiesen werden. Es erfolgte eine Sequenzierung der fünf Patientenproben für jedes einzelne Exon, wobei sich keine Auffälligkeiten finden ließen. Hier wäre eine weitere größere Deletion über mehrere Exons denkbar, da diese mit den hier genutzten Untersuchungsmethoden nicht erfasst wurde.

4.4 Diskussion der Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war es eine Mutationsanalyse bei einem Patientenkollektiv durchzuführen, bei dem klinisch die Diagnose einer neuronalen Ceroid-Lipofuszinose gestellt wurde. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurden mehrere Mutationen, teilweise noch unveröffentlicht, im *CLN2*- und *CLN3*-Gen nachgewiesen. Bei den neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen besteht in einigen Untergruppen zwar eine klinische Homogenität, aber eine genetische Heterogenität, was zu einer erschwerten Genidentifikation führt [Siintola, 2006]. Daher konnte bei einem Teil des untersuchten Patientenkollektivs eine klare Zuordnung zu einer bestimmten Untergruppe der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen getroffen werden.

Diese molekulargenetischen Untersuchungen sorgen dafür, dass in den Familien betroffener Kinder eine verbesserte humangenetische Beratung erfolgen kann. Da die ersten Symptome meist im Kindesalter auftreten und es oft Zeit in Anspruch nimmt, bis eine endgültige Diagnose gefunden wird, kann mit diesen Ergebnissen den Eltern eine definitive Diagnose und damit auch Prognose vermittelt werden. Für die weitere Familienplanung, auch bei Geschwistern, können diese Erkenntnisse genutzt werden, den Genträgerstatus zu vermitteln und eine genetische Beratung, bzw. eine pränatale Diagnostik, durchzuführen.

Bis heute ist die genaue Funktion der einzelnen Proteine der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen noch ungeklärt und wird weiterhin erforscht [Kyttälä, 2006; Jalanko et Braulke, 2009]. Insgesamt konnten in den letzten Jahren u.a. durch molekulargenetische Untersuchungen mehr Zusammenhänge analysiert werden und zu einer besseren Transparenz der Erkrankung beitragen. Auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse und durch weitergehende Untersuchungen könnte in Zukunft vielleicht ein therapeutischer Ansatz für die Behandlung der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen entwickelt werden.

5 Zusammenfassung

Bei den neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen handelt es sich um die häufigste Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen im Kindesalter, die bis heute nicht heilbar sind. Aktuell sind 10 Unterformen der NCL beschrieben, wobei im Rahmen dieser Dissertationsarbeit eine Mutationsanalyse im Gen der spätinfantilen (*CLN2*-Gen) und der juvenilen (*CLN3*-Gen) Ceroid-Lipofuszinosen durchgeführt wurde. Es erfolgte eine Analyse der DNA von 38 nicht miteinander verwandten Patienten mit dem klinischen Bild einer NCL. Insgesamt wurden dabei 11 pathogene Mutationen und 20 Polymorphismen im *CLN2*-Gen sowie sechs pathogene Mutationen und sechs Polymorphismen im *CLN3*-Gen nachgewiesen. Im *CLN2*-Gen wurden bisher 97 verschiedene pathogene Mutationen und 23 Polymorphismen, im *CLN3*-Gen 58 pathogene Mutationen sowie neun Polymorphismen beschrieben. In dieser Arbeit wurden für das *CLN2*-Gen folgende pathogene Mutationen nachgewiesen: Bei einer Patientenprobe wird das Spleißen beeinflusst, bei vier Patienten zeigte sich ein Aminosäureaustausch, der ein Stopp-Codon generierte und bei zwei Patientenproben ließ sich eine intronisch veränderte Spleißstelle nachweisen. Diese pathogenen Mutationen wurden bereits in der Literatur beschrieben. Es ließ sich zusätzlich bei einem Patienten eine 1-bp-Deletion nachweisen, bei zwei DNA-Proben zeigte sich ein Aminosäureaustausch und bei einer Patientenprobe eine 2-bp-Duplikation. Diese pathogenen Mutationen wurden bisher nicht publiziert. Im *CLN3*-Gen fand sich bei zwei Patientenproben die häufigste, die 1,02-kb-Deletion, bei zwei Patienten zeigte sich ein Aminosäureaustausch und bei einer DNA-Probe konnte ein Aminosäureaustausch der zu einem Stopp-Codon führt nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte auch hier eine bisher nicht veröffentlichte pathogene Mutation, eine 2-bp-Deletion, gefunden werden. Anhand der Mutationsanalyse konnte bei diesen Patienten nun eindeutig eine Zuordnung zu einer NCL2 oder NCL3 gemacht werden und die Familien über eine definitive Diagnose und damit auch Prognose informiert werden. Dadurch kann den Familienmitgliedern auch eine genauere humangenetische Beratung und ggf. pränatale Diagnostik angeboten werden.

6 Anhang

6.1 Pathogene Mutationen/ Polymorphismen *CLN2*

6.1.1 Gefundene pathogene Mutationen *CLN2*

Pat.	Lokalisation	Homo-/Heterozygot	Nukleotidveränderung	Mutation	Aminosäureaustausch/Konsequenz	Erstbeschreiber
09.0	Exon 3	Hetero.	c.225A>G	Splice defect	p.=	Sleat et al. 1999
14.0	Exon 4	Hetero.	c.237C>G	Nonsense	p.Tyr79X	Kousi et al. 2012
14.0	Intron 5	Hetero.	c.509-1G>C	Intron change	Aberrant splicing Frameshift nach Phe169	Sleat et al. 1999
29.0	Exon 6	Hetero.	c.586delC	1-bp deletion	Frameshift nach Gly195	-
29.0	Exon 7	Hetero.	c.845G>A	Missense	p.Ser282Asn	-
30.0	Exon 12	Homo.	c.1476dupAT	2-bp duplication	Frameshift nach Arg492	-
35.0	Exon 6	Hetero.	c.622C>T	Nonsense	p.Arg208X	Sleat et al. 1997
36.0	Intron 5	Hetero.	c.509-1G>C	Intron change	Aberrant splicing Frameshift nach Phe169	Sleat et al. 1999
36.0	Exon 6	Hetero.	c.622C>T	Nonsense	p.Arg208X	Sleat et al. 1997
38.0	Exon 6	Hetero.	c.622C>T	Nonsense	p.Arg208X	Sleat et al. 1997
38.0	Exon 7	Hetero.	c.833A>G	Missense	p.Gln278Arg	-

Tabelle 6.01: Gefundene pathogene Mutationen *CLN2*

6.1.2 Beschriebene pathogene Mutationen *CLN2*

Lokalisation	Nukleotidveränderung	Mutation	Aminosäureaustausch/Konsequenz	Erstbeschreiber
Intron 1	c.17+1G>C	splice defect	Splicing defect	Kousi et al. 2009
Intron 1	c.18-3C>G	splice defect		Kousi et al. 2012
Exon 2	c.37dupC	1-bp insertion	p.Leu13ProfsX3	Kousi et al. 2012
Intron 2	c.89+4A>G	splice defect	Aberrant splicing	Kohan et al. 2009
Intron 2	c.89+5G>C	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
	c.177-180delAAGA	4-bp deletion	p.Glu59AspfsX20	Chang et al. 2012
Exon 3	c.184T>A	Missense	p.Ser62Thr	Kousi et al. 2012
Exon 3	c.184_185delTC	2-bp deletion	p.Ser62GlyfsX25	Lam et al. 2001
Exon 3	c.196C>T	Nonsense	p.Gln66X	Sleat et al. 1999
Exon 3	c.225A>G	splice defect	Aberrant splicing Frameshift nach Pro74	Sleat et al. 1999
Exon 3	c.229G>A	Missense	p.Gly77Arg	Sleat et al. 1999
Exon 3	c.229G>T	Nonsense	p.Gly77X	Chang et al. 2012
Exon 4	c.237C>G	Nonsense	p.Tyr79X	Kousi et al. 2012
Exon 4	c.311T>A	Nonsense	p.Leu104X	Kohan et al. 2008
Exon 4	c.357dupT	1-bp insertion	p.Leu120SerfsX18	Zhong et al. 2000
Exon 4	c.377_387delTCC GACAAGCA	11-bp deletion	p.Ile126ArgfsX8	Sleat et al. 1999
Exon 4	c.379C>T	Nonsense	p.Arg127X	Sleat et al. 1999
Exon 4	c.380G>A	Missense	p.Arg127Gln	Zhong et al. 2000
Intron 4	c.381-1G>C	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012

Lokalisation	Nukleotid- veränderung	Mutation	Aminosäureaustausch/ Konsequenz	Erstbeschreiber
Intron 4	c.381-2A>G	splice defect	Aberrant splicing	Zhong et al. 2000
	c.409-410insGCTG	4-bp insertion	p.Glu139GlyfsX1	Chang et al. 2012
Exon 5	c.457T>C	Missense	p.Ser153Pro	Caillaud et al. 1999
Exon 5	c.497dupA	1-bp insertion	p.His166GlyfsX22	Kousi et al. 2012
Intron 5	c.509-1G>C	Intron change	Aberrant splicing Frameshift nach Phe169	Sleat et al. 1999
Intron 5	c.509-1G>A	Intron change	p.Gly171ThrfsX5	Sleat et al. 1999
Exon 6	c.605C>T	Missense	p.Pro202Leu	Mole et al. 2001
Exon 6	c.616C>T	Missense	p.Arg206Cys	Berry-Kravis et al. 2000
Exon 6	c.617G>A	Missense	p.Arg206His	Kousi et al. 2012
Exon 6	c.622C>T	Nonsense	p.Arg208X	Sleat et al. 1997
Exon 6	c.625T>C	Missense	p.Tyr209His	Kousi et al. 2012
Exon 6	c.640C>T	Nonsense	p.Gln214X	Kousi et al. 2012
Exon 6	c.646G>A	Missense	p.Val216Met	Kousi et al. 2009
	c.650G>T	Missense	p.Gly217Asp	Chang et al. 2012
Exon 7	c.713C>G	Nonsense	p.Ser238X	Kousi et al. 2012
Exon 7	c.775delC	1-bp deletion	p.Arg259ValfsX17	Goldberg-Stern et al. 2009
Exon 7	c.790C>T	Nonsense	p.Gln264X	Kousi et al. 2012
Exon 7	c.797G>A	Missense	p.Arg266Gln	Kousi et al. 2012
Exon 7	c.822_837del	Nonsense	p.Leu275X	Kousi et al. 2012
Exon 7	c.827A>T	Missense	p.Asp276Val	Kohan et al. 2009
Exon 7	c.829G>A	Missense	p.Val277Met	Ju et al. 2002
Exon 7	c.833A>C	Missense	p.Gln278Pro	Ju et al. 2002
Exon 7	c.843G>T	Missense	p.Met281Ile	Kousi et al. 2012
Exon 7	c.851G>T	Missense	p.Gly284Val	Zhong et al. 2000
Exon 7	c.857A>G	Missense	p.Asn286Ser	Steinfeld et al. 2002
Exon 7	c.860T>A	Missense	p.Ile287Asn	Sleat et al. 1999
Exon 7		1-bp deletion		Ju et al. 2002
Intron 7	c.887-18A>G	Intron change	p.Gly296delinsGlyLysLysLysAsnProGly	Sleat et al. 1999
Intron 7	c.887-10A>G	Intron change	p.Gly296delinsGluAsnProGly	Noher de Halac et al. 2005
Exon 8	c.888-1066del	179-bp deletion	p.His298LeufsX3	Kousi et al. 2012
Exon 8	c.972_979delCTATTGGAG	8-bp deletion	p.Ser324ArgfsX2	Sleat et al. 1999
Exon 8	c.984_986delTGA	3-bp deletion	p.Asp328del	Kousi et al. 2012
Exon 8	c.987_989delGGA insCTC	3-bp del/ins	p.Glu329_Asp330delinsAspSer	Kousi et al. 2012
Exon 8	c.1015C>T	Missense	p.Arg339Trp	Kousi et al. 2012
Exon 8	c.1016G>A	Missense	p.Arg339Gln	Kousi et al. 2012
Exon 8	c.1027G>A	Missense	p.Glu343Lys	Sleat et al. 1999
Exon 8	c.1057A>C	Missense	p.Thr353Pro	Steinfeld et al. 2002
Exon 8	c.1062delG	1-bp deletion	p.Leu355SerfsX72	Kousi et al. 2012
Exon 8	c.1064T>C	Missense	p.Leu355Pro	Kousi et al. 2012
Intron 8	c.1075+2T>G	splice defect	Aberrant splicing	Sleat et al. 1999
Intron 8	c.1076-2A>G	splice defect	Aberrant splicing	Caillaud et al. 1999
Intron 8	c.1075+2T>C	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Exon 9	c.1093T>C	Missense	p.Cys365Arg	Sleat et al. 1997
Exon 9	c.1094G>A	Missense	p.Cys365Tyr	Sleat et al. 1997
Exon 10	c.1146C>G	Missense	p.Ser382Arg	Kousi et al. 2012
Exon 10	c.1154T>A	Missense	p.Val385Asp	Sleat et al. 1999
Exon 10	c.1166G>A	Missense	p.Gly389Glu	Sleat et al. 1999
Exon 10	c.1204G>T	Nonsense	p.Gly402X	Kousi et al. 2009
Exon 10	c.1266G>C	Missense	p.Gln422His	Sleat et al. 1999
Exon 11	c.1284G>T	Missense	p.Lys428Asn	Ju et al. 2002
Exon 11	c.1340G>A	Missense	p.Arg447His	Sleat et al. 1999
Exon 11	c.1343C>T	Missense	p.Ala448Val	Kousi et al. 2012
Exon 11	c.1358C>T	Missense	p.Ala453Val	Kohan et al. 2009
Exon 11	c.1361C>A	Missense	p.Ala454Glu	Sleat et al. 1999
Exon 11	c.1379G>A	Nonsense	p.Trp460X	Zhong et al. 2000
Exon 11	c.1417G>A	Missense	p.Gly473Arg	Zhong et al. 2000

Lokalisation	Nukleotid- veränderung	Mutation	Aminosäureaustausch/ Konsequenz	Erstbeschreiber
Exon 11	c.1424C>T	Missense	p.Ser475Leu	Sleat et al.1999
Exon 11	c.1424delC	1-bp deletion	p.Ser475TrpfsX13	Moore et al. 2008
Intron 11	c.1425+1G>C	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Exon 12	c.1439T>G	Missense	p.Val480Gly	Elleder et al. 2008
Exon 12	c.1442T>G	Missense	p.Phe481Cys	Ju et al. 2002
Exon 12	c.1444G>C	Missense	p.Gly482Arg	Kousi et al. 2009
Exon 12	c.1497delT	1-bp deletion	p.Gly501AlafsX18	Kousi et al. 2012
Exon 12	c.1501G>T	Missense	p.Gly501Cys	Kousi et al. 2012
Exon 12	c.1501A>T	Missense	p.Asn504Tyr	Kousi et al. 2012
Exon 12	c.1525C>T	Nonsense	p.Gln509X	Caillaud et al. 1999
Exon 12	c.1546- 1547insTTCA	4-bp insertion	p.Asp517HisfsX1	Chang et al. 2012
Exon 12	c.1547_1548del TT	Nonsense	p.Phe516X	Kousi et al. 2012
Exon 12	c.1551T>A	Missense	p.Asp517Glu	Sleat et al. 1999
Intron 12	c.1552-1G>C	splice defect	Aberrant splicing	Sleat et al. 1999
Intron 12	c.1551+1G>A	splice defect	Aberrant splicing	Wang et al. 2011
Intron 12	c.1551+ 5_1551+6delGT insTA	2-bp delins	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Exon 13	c.1611_1621del CTCTGGTCCT G	11-bp deletion	p.Cys537TrpfsX67	Caillaud et al. 1999
Exon 13	c.1595dupA	1-bp insertion	p.Gln534ProfsX74	Sleat et al. 1999
Exon 13	c.1630C>T	Missense	p.Pro544Ser	Zhong et al. 2000
Exon 13	c.1642T>C	Missense	p.Trp548Arg	Kousi et al. 2012
Exon 13	c.1644G>A	Nonsense	p.Trp548X	Kousi et al. 2012
Exon 13	c.1678_1679 delCT	2-bp deletion	p.Leu560ThrfsX47	Sleat et al. 1999

Tabelle 6.02: Beschriebene pathogene Mutationen CLN2, modifiziert nach Mole [www.ucl.ac.uk/hcl]

6.1.3 Gefundene Polymorphismen CLN2

Pat.	Lokalisation	Homozygot/ Heterozygot	Nukleotid- veränderung	Aminosäureaustausch/ Konsequenz	Erstbeschreiber
21.0	5'UTR	Heterozygot	c.1-203T>C		Sleat et al. 1999
22.0	5'UTR	Heterozygot	c.1-203T>C		Sleat et al. 1999
21.0	5'UTR	Heterozygot	c.1-231G>A		Sleat et al. 1999
03.0	Intron 5	Homozygot	c.508+26A>T		Sleat et al. 1999
09.0	Intron 5	Homozygot	c.508+26A>T		Sleat et al. 1999
22.0	Intron 5	Homozygot	c.508+26A>T		Sleat et al. 1999
34.0	Intron 5	Homozygot	c.508+26A>T		Sleat et al. 1999
13.0	Intron 5	Heterozygot	c.508+26A>T		Sleat et al. 1999
27.0	Intron 5	Heterozygot	c.508+26A>T		Sleat et al. 1999
33.0	Intron 5	Heterozygot	c.508+26A>T		Sleat et al. 1999
38.0	Intron 5	Heterozygot	c.508+26A>T		Sleat et al. 1999
07.0	Intron 6	Heterozygot	c.687+32T>C		Sleat et al. 1999
12.0	Intron 6	Heterozygot	c.687+32T>C		Sleat et al. 1999
31.0	Intron 6	Heterozygot	c.687+32T>C		Sleat et al. 1999
33.0	Intron 6	Heterozygot	c.687+32T>C		Sleat et al. 1999
36.0	Intron 6	Heterozygot	c.687+32T>C		Sleat et al. 1999
01.0	Exon 12	Heterozygot	c.1542A>T	Kein Aminosäureaustausch	Sleat et al. 1999
03.0	Exon 12	Heterozygot	c.1542A>T	Kein Aminosäureaustausch	Sleat et al. 1999
09.0	Exon 12	Heterozygot	c.1542A>T	Kein Aminosäureaustausch	Sleat et al. 1999
33.0	Exon 12	Heterozygot	c.1542A>T	Kein Aminosäureaustausch	Sleat et al. 1999

Tabelle 6.03: Gefundene Polymorphismen CLN2

6.1.4 Beschriebene Polymorphismen *CLN2*

Lokalisation	Nukleotidveränderung	Aminosäureaustausch/ Konsequenz	Erstbeschreiber
5'UTR	c.1-319T>C		Sleat et al. 1999
5'UTR	c.1-231G>A		Sleat et al. 1999
5'UTR	c.1-203T>C		Sleat et al. 1999
5'UTR	c.1-184G>A		Sleat et al. 1999
Intron 2	c.90-44C>T		Sleat et al. 1999
Intron 4	c.380+55G>A		Mole et al. 2001
Intron 4	c.381-6C>T		Kousi et al. 2012
Exon 4	c.299A>G	p.Gln100Arg	Sleat et al. 1999
Intron 5	c.508+26T>A		Sleat et al. 1999
Exon 6	c.524A>G	p.Arg175His	Steinfeld et al. 2002
Intron 6	c.687+32T>C		Sleat et al. 1999
Intron 6	c.688-10C>T		Ju et al. 2002
Intron 7	c.866+17T>C		Ju et al. 2002
Intron 7	c.866+41G>C		Ju et al. 2002
Intron 8	c.1076-18A>G		Kousi et al. 2012
Intron 9	c.1146-127C>G		Sleat et al. 1999
Intron 10	c.1266+5G>A		Sleat et al. 1999
Exon 11	p.Val426Val	Kein Aminosäureaustausch	Noher de Halac et al. 2005
Intron 11	c.1425+102T>C		Kousi et al. 2012
Intron 11	c.1425+122T>C		Sleat et al. 1999
Intron 11	c.1425+136A>G		Sleat et al. 1999
Exon 12	c.1542A>T	Kein Aminosäureaustausch	Sleat et al. 1999
Exon 13	c.2810G>C	3'UTR	Liu et al. 1998

Tabelle 6.04: Beschriebene Polymorphismen *CLN2*, modifiziert nach Mole [www.ucl.ac.uk/ncl]

6.2 Pathogene Mutationen/ Polymorphismen *CLN3*

6.2.1 Gefundene pathogene Mutationen *CLN3*

Pat.	Lokalisation	Homo-/Heterozygot	Nukleotidveränderung	Mutation	Aminosäureaustausch/ Konsequenz	Erstbeschreiber
18.0	Intron 6-8	Hetero.	c.461-280_677+382del966	1.02 kb deletion	p.Gly154_Ser438delinsGluGlyArgLeuGlyTrpLeuArgCys	The int. Batten disease cons. 1995
18.0	Exon 15	Hetero.	c.1247A>G	Missense	p.Asp416Gly	Kousi et al. 2012
22.0	Intron 6-8	Hetero.	c.461-280_677+382del966	1.02 kb deletion	p.Gly154_Ser438delinsGluGlyArgLeuGlyTrpLeuArgCys	The int. Batten disease cons. 1995
22.0	Exon 13	Hetero.	c.992delTT	2-bp deletion	Frameshift nach Val379	-
24.0	Exon 13	Homo.	c.1000C>T	Missense	p.Arg334Cys	Munroe et al. 1997
37.0	Exon 8	Homo.	c.597C>A	Nonsense	p.Tyr199X	Sarpong et al. 2009

Tabelle 6.05: Gefundene pathogene Mutationen *CLN3*

6.2.2 Beschriebene pathogene Mutationen *CLN3*

Lokalisation	Nukleotid- veränderung	Mutation	Aminosäureaustausch/ Konsequenz	Erstbeschreiber
Intron 6 -8	c.461-280_677+382del966	1.02 kb deletion	p.Gly154_Ser438delinsGlyArgLeuGlyTrpLeuArgCys	The int. batten disease cons. 1995
Intron 9-13	c.791-802_1056+1445del2815	2.8 kb deletion	p.Gly264_Gln352delinsValfsX29	The int. batten disease cons. 1995
Intron 5-15	c.461-1413del	6.0 kb deletion	Truncated protein	Mitchison et al. 1995
Exon 1	c.1A>C	Missense	p.Met1Leu	Kousi et al. 2012
Exon 2	c.49G>T	Nonsense	p.Glu17X	Kwon et a. 2005
Exon 2	c.105G>A	Nonsense	p.Trp35X	Kousi et al. 2012
Intron 2	c.125+5G>A	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Intron 2	c.126-1G>A	splice defect	Aberrant splicing	Mole et al. 2001
Exon 3	c.214C>T	Nonsense	p.Gln72X	Kousi et al. 2012
Intron 3	c.222+2T>G	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Intron 3	c.222+5G>C	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Exon 4	c.233_234insG	1-bp insertion	p.Thr80AsnfsX12	Kousi et al. 2012
Exon 4	c.265C>T	Nonsense	p.Arg89X	Pérez-Poyato et al. 2011
Exon 5	c.302T>C	Missense	p.Leu101Pro	Munroe et al. 1997
Exon 5	c.370dupT	1-bp insertion	p.Tyr124LeufsX36	Pérez-Poyato et al. 2011
Exon 6	c.374G>C	splice defect	p.Ser125Asn	Pérez-Poyato et al. 2011
Exon 6	c.379_380dupC	2-bp insertion	p.Arg128ProfsX68	Munroe et al. 1997
Exon 6	c.379delC	1-bp deletion	p.Arg127GlyfsX54	Kousi et al. 2012
Exon 6	c.400T>C	Missense	p.Cys134Arg	Kousi et al. 2012
Exon 6	c.424delG	1-bp deletion	p.Val142LeufsX53	Munroe et al. 1997
Intron 6	c.461-13G>C	Intron change	p.Gly154fsX2	Munroe et al. 1997
Intron 6	c.461-1G>C	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Intron 6	c.461-1G>A	Intron change	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Exon 7	c.472G>C	Missense	p.Ala158Pro	Kousi et al. 2012
Exon 7	c.482C>G	Nonsense	p.Ser161X	Munroe et al. 1997
Exon 7	c.485C>G	Nonsense	p.Ser162X	Munroe et al. 1997
Exon 7	c.509T>C	Missense	p.Leu170Pro	Munroe et al. 1997
Intron 7	c.533+1G>C	splice defect	Aberrant splicing	The int. batten disease cons. 1995
Intron 7	c.533+1G>A	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Exon 8	c.558_559delAG	2-bp deletion	p.Gly187AspfsX48	Munroe et al. 1997
Exon 8	c.560G>C	Missense	p.Gly187Ala	Mole et al. 2001
Exon 8	c.565G>C	Missense	p.Gly189Arg	Kousi et al. 2012
Exon 8	c.569delG	1-bp deletion	p.Gly190GlufsX65	Teixeira et al. 2003
Exon 8	c.575G>A	Missense	p.Gly192Glu	Pérez-Poyato et al. 2011
Exon 8	c.586dupG	1-bp insertion	p.Ala196GlyfsX40	Munroe et al. 1997
Exon 8	c.597C>A	Nonsense	p.Tyr199X	Sarpong et al. 2009
Exon 8	c.622dupT	1-bp insertion	p.Ser208PhefsX28	Pérez-Poyato et al. 2011
Exon 8	c.631C>T	Nonsense	p.Gln211X	Munroe et al. 1997
Exon 11	c.883G>A	Missense	p.Glu295Lys	Munroe et al. 1997
Exon 11	c.883G>T	Nonsense	p.Glu295X	Kousi et al. 2012
Intron 11	c.906+49del	34-bp deletion	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Intron 11	c.906+5G>A	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Exon 12	c.944dupA	1-bp insertion	p.His315GlnfsX67	Munroe et al. 1997
Exon 12	c.954_962+18del27			Mole et al. 2001
Intron 12	c.963-1G>T	splice defect	Aberrant splicing	Kousi et al. 2012
Exon 13	c.979C>T	Nonsense	p.Gln327X	Munroe et al. 1997
Exon 13	c.988G>T	Missense	p.Val330Phe	Munroe et al. 1997
Exon 13	c.1000C>T	Missense	p.Arg334Cys	Munroe et al. 1997
Exon 13	c.1001G>A	Missense	p.Arg334His	Munroe et al. 1997

Lokalisation	Nukleotidveränderung	Mutation	Aminosäureaustausch/ Konsequenz	Erstbeschreiber
Exon 13	c.1048delC	1-bp deletion	p.Leu350CysfsX27	Kousi et al. 2012
Exon 13	c.1054C>T	Nonsense	p.Gln352X	Munroe et al. 1997
Exon 13	c.1056G>C	Missense	p.Gln352His	Leman et al. 2005
Intron 13	c.1056+3A>C	splice defect	Aberrant splicing	Koui et al. 2012
Exon 14	c.1195G>T	27-bp deletion	p.Glu399X	Kousi et al. 2012
Intron 14	c.1198-1G>T	splice defect	Aberrant splicing	Munroe et al. 1997
Exon 15	c.1247A>G	Missense	p.Asp416Gly	Kousi et al. 2012
Exon 15	c.1268C>A	Nonsense	p.Ser423X	Kousi et al. 2012
Exon 15	c.1272delG	1-bp deletion	p.Leu425SerfsX87	Munroe et al. 1997

Tabelle 6.06: Beschriebene pathogene Mutationen *CLN3*, modifiziert nach Mole [www.ucl.ac.uk/ncl]

6.2.3 Gefundene Polymorphismen *CLN3*

Pat.	Lokalisation	Homozygot/ Heterozygot	Nukleotidveränderung	Aminosäureaustausch/ Konsequenz	Erstbeschreiber
37.0	Exon 8	Homozygot	c. 582G>T	p.Leu194Leu	Sarpong et al. 2009
17.0	Exon 15	Heterozygot	c.1211A>G	p.His404Arg	Eksandh et al. 2000
C30	Exon 15	Heterozygot	c.1211A>G	p.His404Arg	Eksandh et al. 2000
C34	Exon 15	Heterozygot	c.1211A>G	p.His404Arg	Eksandh et al. 2000
C39	Exon 15	Heterozygot	c.1211A>G	p.His404Arg	Eksandh et al. 2000
C68	Exon 15	Heterozygot	c.1211A>G	p.His404Arg	Eksandh et al. 2000

Tabelle 6.07: Gefundene Polymorphismen *CLN3*

6.2.4 Beschriebene Polymorphismen *CLN3*

Lokalisation	Nukleotidveränderung	Aminosäureaustausch/ Konsequenz	Erstbeschreiber
Promoter	c.1-1101C>T		Kousi et al. 2012
Promoter	c.1-676_1-675delTGAAGC		Kousi et al. 2012
Intron 4	c.294-58G>A		Mole et al. 2001
Intron 4	c.294-80G>A		Mole et al. 2001
Exon 8	c.582G>T	p.Leu194Leu	Sarpong et al. 2009
Intron 9	c.760+3A>C		Kousi et al. 2012
Exon 10	c.831A>G	p.Val277Val	Mitchison et al. 1997
Intron 13		D16S298 microsatellite marker	Thompson et al. 1992
Exon 15	c.1211A>G	p.His404Arg	Eksandh et al. 2000

Tabelle 6.08: Beschriebene Polymorphismen *CLN3*, modifiziert nach Mole [www.ucl.ac.uk/ncl]

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin Triphosphat
BDT	Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction
BPB	Bromphenolblau
Bp	Basenpaar(e)
bidest.	zweifach destilliert
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
°C	Temperatur in Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
<i>CLN</i>	Ceroidlipofuszinose
cm	Zentimeter
D.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EJC	Exon-Junction-Complexe
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERG	Elektroretinogramm
et. al.	et altera (lat.: und andere)
FP	fingerprint profiles
G	Guanin

g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GRODS	granuläre osmiophile Einlagerungen
h	Stunden
HPLC	Chromatographieverfahren
INCL	infantile NCL
JNCL	juvenile NCL
kb	Kilobasen
L	Liter
LINCL	late-infantile NCL
LM	Lichtmikroskop
M	Molar
mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	milimolar
mmol	Milimol
mol	Mol
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NCL	neuronale Ceroidlipofuszinose
Ng	Nanogramm
NMD	nonsense-mediated-decay
NTP	Nucleosidtriphosphat
PAA	Polyacrylamid
PAAG	Polyacrylamid plus Glycerin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
prä-mRNA	präkursor-mRNA
RNA	Ribonucleid acid

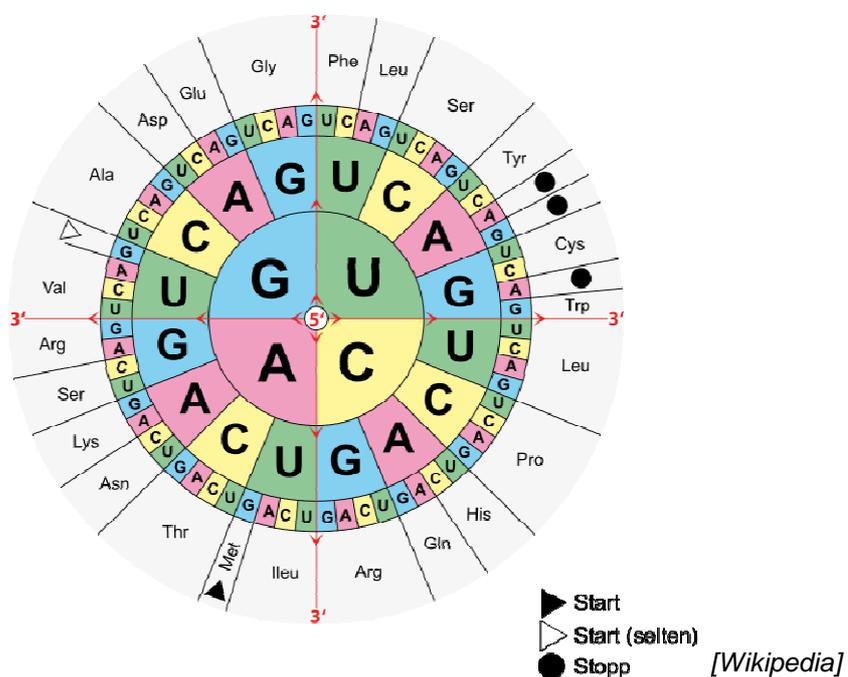
rpm	rounds per minute (engl.: Umdrehungen pro Minute)
sec.	Sekunden
SSCP	Single strand conformation polymorphism
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/ Borsäure/EDTA Puffer
TBS	Tri- gepufferte Salzlösung
TE	Tris - EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethyldiamin
Tris	Tris- (hydroxymethyl-) aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
UKE	Universitäts-Klinikum Hamburg Eppendorf
UPM	Umdrehungen pro Minute
Urea	Harnstoff
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEP	visuell evozierte Potentiale
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNA	Zentrales Nervensystem
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar

Ein- und Drei- Buchstabencode der 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
X		Stoppcodon

Codesonne



8 Literaturverzeichnis

- [001] **Anonymous:** Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. The international Batten disease consortium. *Cell* 82, 1995: 949-957
- [002] **Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Mackie MB:** Diagnostic single strand conformational polymorphism (SSCP): A simplified non – radiosotopic method as applied to a Tay- Sachs B1 variant. *Nucleic Acids Research* 19, 1991: 405-406
- [003] **Ansorge W, Sproat B, Stegemann J, Schwager C, Zenke M:** Automated DNA sequencing: Ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 15, 1987: 4593-4602
- [004] **Batten FE:** Cerebral degeneration with symmetrical changes in the maculae in two members of a family. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom* 23, 1903: 386-390
- [005] **Beck M:** New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. *Human Genetic* 121, 2007: 1-22
- [006] **Berry-Kravis E, Sleat DE, Sohar I, Meyer P, Donnelly R, Lobel P:** Prenatal testing for late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Annals of Neurology* 47, 2000: 254-257
- [007] **Bessa C, Teixeira CA, Dias A, Alves M, Rocha S, Lacerda L, Loureiro L, Guimarães A, Ribeiro MG.** CLN2/TPP1 deficiency: the novel mutation IVS7-10A>G causes intron retention and is associated with a mild disease phenotype. *Molecular Genetics and Metabolism* 93, 2008: 66-73
- [008] **Bessa C, Teixeira CA, Mangas M, Dias A, Sá Miranda MC, Guimarães A, Ferreira JC, Canas N, Cabral P, Ribeiro MG.** Two novel CLN5 mutations in a Portuguese patient with vLINCL: insights into molecular mechanisms of CLN5 deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 89, 2006: 245-253

-
- [009] **Bielschowsky M**: Uber spät-infantile familiäre amaurotische Idiotie mit Kleinhirnsymptomen. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde 50, 1914: 7-29
- [010] **Boustany RM, Alroy J, Kolodny EH**: Clinical classification of neuronal ceroid-lipofuscinosis subtypes. American Journal of Medical Genetics Suppl 5, 1988: 47-58
- [011] **Boustany RM**: Neurology of the neuronal ceroid-lipofuscinoses: late infantile and juvenile types. American Journal of Medical Genetics 42, 1992: 533-535
- [012] **Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC**: Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. American Journal of Human Genetics 48, 1991: 137-144
- [013] **Buselmaier W, Tariverdian G**: Humangenetik, 4. Auflage. Heidelberg: Springer, 2007
- [014] **Caillaud C, Manicom J, Puech JP, Lobel P, Poenaru L**: Enzymatic and molecular pre and postnatal diagnosis of ceroid lipofuscinoses in France. American Journal of Human Genetics 65, 1999: A232
- [015] **Chang X, Huang Y, Meng H, Jiang Y, Wu Y, Xiong H, Wang S, Qin J**: Clinical study in Chinese patients with late-infantile form neuronal ceroid lipofuscinoses. Brain & Development 34, 2012: 739-745
- [016] **Chaubert P, Bautista D, Benhattar J**: An Improved method for rapid screening of DNA mutations by nonradioactive single strand conformations polymorphism procedure. Biotechniques 15, 1993: 586
- [017] **Claussen M, Heim P, Knispel J, Goebel HH, Kohlschütter A**: Incidence of neuronal ceroid-lipofuscinoses in West Germany: Variation of a method for studying autosomal recessive disorders. American Journal of Medical Genetics 42, 1992: 536-538
- [018] **Dhar S, Bitting RL, Rylova SN, Jansen PJ, Lockhart E, Koeberl DD, Amalfitano A, Boustany RM**: Flupirtine blocks apoptosis in batten patient lymphoblasts and in human postmitotic CLN3- and CLN2-deficient neurons. Ann Neurol. 51, 2002: 448-466

-
- [019] **Eksandh** LB, Ponjavic V, Munroe PB, Eiberg H, Uvebrant P, Ehinger B, Mole SE, Andreasson S: Full- field ERG in patients with Batten/ Spielmeier Vogt disease caused by mutations in the CLN3 gene. *Ophthalmic Genetics* 21, 2000: 69-77
- [020] **Elleder** M, Dvoráková L, Stolnaja L, Vlášková H, Hůlková H, Druga R, Poupetová H, Kostálová E, Mikulástík J: Atypical CLN2 with later onset and prolonged course: a neuropathologic study showing different sensitivity of neuronal subpopulations to TPP1 deficiency. *Acta Neuropathologica* 116, 2008:119-24
- [021] **Ezaki** J, Takeda-Ezaki M, Kominami E: Tripeptidyl peptidase I, the late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene product, initiates the lysosomal degradation of subunit c of ATP synthase. *The Journal of Biochemistry* 128, 2000: 509-516
- [022] **Ezaki** J, Wolfe LS, Kominami E: Specific delay in the degradation of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis is derived from cellular proteolytic dysfunction rather than structural alteration of subunit c. *Journal of Neurochemistry* 67, 1996: 1677-1687
- [023] **Gardiner** RM: The molecular genetic basis of the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurological Sciences* 21, 2000: S15-S19
- [024] **Glavac** D, Dean M: optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human Mutations* 2, 1993: 404-414
- [025] **Goebell** HH, Kominami E, Neuen-Jacob E, Wheeler RB: Morphological studies on CLN2. *European Journal of Paediatric Neurology* 5, 2001: Suppl A 203-207
- [026] **Goldberg- Stern** H, Halevi A, Marom D, Straussberg R, Mimouni-Bloch A: Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: a new mutation in Arabs. *Pediatric Neurology* 41, 2009: 297- 300
- [027] **Grompe** M: The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics* 5, 1993: 111-117

-
- [028] **Hagopian** K, Lake BD, Winchester BG, Clark JB: Late-infantile Batten disease: purification of the subunit c of the mitochondrial ATP synthase from storage material. *American Journal of Medical Genetics* 57, 1995: 272-278
- [029] **Hartikainen** JM, Ju W, Wisniewski KE, Moroziewicz DN, Kaczmarek AL, McLendon L, Zhong D, Suarez CT, Brown WT, Zhong N: Late infantile neuronal ceroid Lipofuscinosis is due to splicing Mutations in the CLN2 Gene. *Molecular Genetics* 67, 1999, 162-168
- [030] **Hayashi** K: PCR- SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications* 1, 1991: 34-38
- [031] **Hayashi** K, Yandell DW: How sensitive is PCR – SSCP? *Human Mutation* 2, 1993: 338-346
- [032] **Hentze** MW, Kulozik AE: A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96, 1999: 307-310
- [033] **Hoffmann** GF, Grau AJ: Stoffwechselerkrankungen in der Neurologie. Referenz Reihe Neurologie, 1. Auflage, Thieme Verlag 2004
- [034] **Järvelä** I, Sainio M, Rantamäki T, Olkkonen VM, Carpén O, Peltonen L, Jalanko A. Biosynthesis and in-tracellular targeting of the CLN3 protein defective in Batten disease. *Human Molecular Genetics* 7, 1998: 85
- [035] **Jalanko** A, Braulke T: Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793, 2009: 697-709
- [036] **Ju** W, Zhong R, Moore S, Moroziewicz D, Currie JR, Parfrey P, Brown WT, Zhong N: Identification of novel CLN2 mutations shows Canadian specific NCL2 alleles. *Journal of Medical Genetics* 39, 2002: 822-825
- [037] **Kitzmüller** C, Haines RL, Codlin S, Cutler DF, Mole SE. A function retained by the common mutant CLN3 protein is responsible for the late onset of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Human Molecular Genetics* 17, 2008: 303-312
- [038] **Klenk** E: Beiträge zur Chemie der Lipidosen, Niemann- Pickschen Krankheit und amaurotischen Idiotie. *Hoppe Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie* 262, 1939: 128-143

-
- [039] **Kohan R**, Cismondi IA, Kremer RD, Muller VJ, Guelbert N, Anzolini VT, Fietz MJ, Ramirez AM, Halac IN: An integrated strategy for the diagnosis of neuronal ceroid lipofuscinosis types 1 (CLN1) and 2 (CLN2) in eleven Latin American patients. *Clinical Genetics* 76, 2009: 372-382
- [040] **Kohan R**, Muller VJ, Fietz MJ, Cismondi AI, Oller Ramirez AM, Halac IN: Gene symbol: TPP1. Disease: Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, late infantile. *Human Genetics* 123, 2008: 553
- [041] **Kohlschütter A**, Goebel HH: Die Neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen. *Deutsches Ärzteblatt* 94, 1997: A-3183-3188
- [042] **Kohlschütter A**, Goebel HH, Schulz A, Lukacs Z: Die neuronalen Ceroid- Lipofuszinosen. *Deutsches Ärzteblatt* 102, 2005: A284-A288
- [043] **Kohlschütter A**, Laabs R, Albani M. Juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (JNCL): quantitative description of its clinical variability. *Acta Paediatrica* 77, 1988: 867-872
- [044] **Kollmann A**: Biologie - Einführung in die Genetik, Frankfurt: Diesterweg, 1984
- [045] **Kousi M**, Lehesjoki AE, Mole SE: Update of the mutation spectrum and clinical correlations of over 360 mutations in eight genes that underlie the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Human Mutation* 33, 2012: 42-63
- [046] **Kousi M**, Siintola E, Dvorakova L, Vlaskova H, Turnbull J, Topcu M, Yuksel D, Gokben S, Minassian BA, Elleder M, Mole SE, Lehesjoki AE: Mutations in CLN7/MFSD8 are a common cause of variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain* 132, 2009: 810- 819
- [047] **Krohne TU**, Herrmann P, Kopitz J, Rütger K, Holz FG: Juvenile neuronale Ceroidlipofuszinose. *Ophthalmologie* 107, 2010: 606-611
- [048] **Kurlemann G**, Schuierer G: EEG in diagnosis of other disease pictures than epilepsy. *Klinische Pädiatrie* 206, 1994: 100-107
- [049] **Kwon JM**, Rothberg PG, Leman AR, Weimer JM, Mink JW, Pearce DA: Novel CLN3 mutation predicted to cause complete loss of protein function does not modify the classical JNCL phenotype. *Neuroscience Letters* 387, 2005: 111-114

-
- [050] **Kyttälä A**, Lahtinen U, Braulke T, Hofmann SL: Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762, 2006: 920-33.
- [051] **Lam CW**, Ko CH: Two novel CLN2 mutations in a chinese patient with classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *American Journal of Medical Genetics* 99, 2001: 161 – 163
- [052] **Leman AR**, Pearce DA, Rothberg PG. Gene symbol: CLN3. Disease: juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease). *Human Genetics* 116, 2005: 236
- [053] **Liu CG**, Sleat DE, Donnelly RJ, Lobel P: Structural Organisation and Sequence of CLN2, the defective gene in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genomics* 50, 1998: 206-212
- [054] **Lukacs Z**, Santavuori P, Keil A, Steinfeld R, Kohlschutter A: Rapid and simple assay for the determination of tripeptidyl peptidase and palmitoyl protein thioesterase activities in dried blood spots. *Clinical Chemistry* 49, 2003: 509-511
- [055] **Maxam AM**, Gilbert W: Sequencing end - labeled DNA with base - specific chemical cleavages. *Methods in Enzymology* 65, 1980: 498-559
- [056] **Meyers JA**, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S: Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* 127, 1976:1529-1537
- [057] **Michaud J**, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin DV, Mitchell G: Strand- separating conformational polymorphism analysis: Efficacy of detection of point mutations in the human ornithine delta-aminotransferase gene. *Genomics* 13, 1992: 389-394
- [058] **Mitchison HM**, Munroe PB, O’Rawe AM, Taschner PEM, De Vos N, Kremmidiotis G, Lensink I, Munk AC, D’Argo KL, Anderson JW, Lerner TJ, Moytis RK, Callen DF, Breuning MH, Doggett NA, Gardiner RM, Mole SE: Genomic structure and complete nucleotide sequence of the Batten Disease gene, CLN3. *Genomics* 40, 1997: 346-350

-
- [059] **Mitchison** HM, O'Rawe AM, Taschner PE, Sandkuijl LA, Santavouri P, de Vos N, Breuning MH, Mole SE, Gardiner RM, Järvelä IE: Batten disease gene, CLN3: linkage disequilibrium mapping in the Finnish population, and analysis of European haplotypes. *American Journal of Human Genetics* 56, 1995: 654-662
- [060] **Mole** SE, Williams RE, Goebel HH: Correlations between genotype, Ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurogenetics* 6, 2005: 107-126
- [061] **Mole** SE, Williams RE, Goebel HH: The neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). Second Edition, Oxford university press, 2011
- [062] **Mole** SE, Zhong NA, Sarpong A, Logan WP, Hofmann S, Yi W, Franken PF, van Diggelen OP, Breuning MH, Moroziewicz D, Ju W, Salonen T, Holmberg V, Järvelä I, Taschner PE: New mutations in the neuronal ceroid Lipofuscinosis genes. *European Journal of Paediatric Neurology* 5 Suppl A, 2001: 7-10
- [063] **Moore** SJ, Buckley DJ, MacMillan A, Marshall HD, Steele L, Ray PN, Nawaz Z, Baskin B, Frecker M, Carr SM, Ives E, Parfrey PS: The clinical and genetic epidemiology of neuronal ceroid lipofuscinosis in Newfoundland. *Clinical Genetics* 74, 2008: 213-222
- [064] **Mülhardt** C: *Der Experimentator: Molekularbiologie*. Berlin: Spektrum, 2002
- [065] **Mullis** KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 1987: 335-350
- [066] **Munroe** PB, Mitchison HM, O'Rawe AM, Anderson JW, Boustany RM, Lerner TJ, Taschner PEM, De Vos N, Breuning MH, Gardiner RM, Mole SE: Spectrum of mutations in the Batten Disease Gene, CLN3. *Human Genetics* 61, 1997: 310-316
- [067] **Munroe** PB, O'Rawe AM, Mitchison HM, Järvelä IE, Santavuori P, Lerner TJ, Taschner PE, Gardiner RM, Mole SE: Strategy for mutation detection in CLN3: characterisation of two Finnish mutations. *Neuropediatrics* 28, 1997: 15-17
- [068] **Neu-Yilik** G, Gehring NH, Kulozik AE, Hentze MW: NMD: mehr als nur Qualitätskontrolle. *Biospektrum* 1, 2008: 12-17

-
- [069] **Murken** J, Grimm T, Holinski-Feder E: Taschenlehrbuch Humangenetik. Georg-Thieme Verlag Stuttgart, 8. Auflage, 2011
- [070] **Noher de Halac** N, Dodelson de Kremer R, Kohan R: Clinical, morphological, biochemical and molecular study of atypical forms of neuronal ceroidlipofuscinoses in Argentina. Cordoba publicaciones universitarias, 2005: 103-116
- [071] **Orita** M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 86, 1989a: 2766- 2770
- [072] **Orita** M, Suzuki Y, Sekiya T; Hyashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5, 1989: 874-879
- [073] **Passarge** E: Taschenatlas der Genetik. Stuttgart: Thieme, 1994
- [074] **Passini** MA, Dodge JC, Bu J, Yang W, Zhao Q, Sondhi D, Hackett NR, Kaminsky SM, Mao Q, Shihabuddin LS, Cheng SH, Sleat DE, Stewart GR, Davidson BL, Lobel P, Crystal RG: Intracranial delivery of CLN2 reduces brain pathology in a mouse model of classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. The Journal of Neuroscience 26, 2006: 1334-1342
- [075] **Pérez-Poyato** MS, Milà Recansens M, Ferrer Abizanda I, Montero Sánchez R, Rodríguez-Revenga L, Cusí Sánchez V, García González MM, Domingo Jiménez R, Camino León R, Velázquez Fragua R, Martínez-Bermejo A, Pineda Marfà M: Juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis: clinical course and genetic studies in Spanish patients. Journal of Inherited Metabolic Disease 34, 2011:1083-1093
- [076] **Preising** MN, Lorenz B: Genetik der neuronalen Zeroidlipofuszinosen. Ophthalmologe 107, 2010: 612-615
- [077] **Ravnik-Glavac** M, Glavac D, Dean M: Sensitivity of single Strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. Human Molecular Genetics 3, 1994: 801-807
- [078] **Read** A, Donnai D: Angewandte Humangenetik. de Gryter, Berlin 1. Auflage, 2008

-
- [079] **Rüther** K: Neuronale Zeroidlipofuszinosen (NCL) im Tiermodell. *Ophthalmologie* 107, 2010: 621-627
- [080] **Sachs** B: A family form of idiocy, generally fatal and associated with early blindness (amaurotic family idiocy). *New York Medical Journal* 63, 1896: 697-703
- [081] **Saiki** RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 1988: 487-491
- [082] **Saiki** RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1985: 1350-1354
- [083] **Sanger** F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 74, 1977: 5463-5467
- [084] **Sarkar** G, Kapelner S, Sommer SS: Foramide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Research* 18, 1990: 7465
- [085] **Sarpong** A, Schottmann G, Rüther K, Stoltenburg G, Kohlschütter A, Hübner C, Schuelke M: Protracted course of juvenile ceroid Lipofuscinosis associated with a novel CLN3 mutation (p.Y199X). *Clinical Genetics* 76, 2009: 38-45
- [086] **Schaaf** CP, Zschoke J: *Basiswissen Humangenetik*. Springer, Berlin, 2013
- [087] **Sharp** JD, Wheeler RB, Lake BD, Savukoski M, Jarvela IE, Peltonen L, Gardiner RM, Williams RE: Loci for classical and a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis map to chromosomes 11p15 and 15q21-23. *Human Molecular Genetics* 6, 1997: 591-595
- [088] **Sheffield** VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstorm DW, Stone EM: The sensitivity of Single- Strand Conformation Polymorphism Analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16, 1993: 325-332
- [089] **Siintola** E, Lehesjoki AE, Mole SE: Molecular genetics of the NCLs -- status and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762, 2006: 857-864

-
- [090] **Sleat** DE, Donnelly RJ, Lackland H, Liu CG, Istvan S, Pullarkat RK, Lobel P: Association of mutations in a lysosomal protein with classical Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Science* 277, 1997: 1802-1805
- [091] **Sleat** DE, Gin RM, Sohar I, Wisniewski K, Sklower-Brooks S, Pullarkat RK, Palmer DN, Lerner TJ, Boustany RM, Uldall P, Siakotos AN, Donnelly RJ, Lobel P: Mutational analysis of the defective protease in Classic Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, a neurodegenerative lysosomal storage disorder. *American Journal of Human Genetics* 64, 1999: 1511-1523
- [092] **Smith** HO, Birnstiel ML: A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Research* 3, 1976: 2387-2398
- [093] **Sondhi** D, Hackett NR, Peterson DA, Stratton J, Baad M, Travis KM, Wilson JM, Crystal RG: Enhanced survival of the LINCL mouse following CLN2 gene transfer using the rh.10 rhesus macaque-derived adeno-associated virus vector. *Molecular Therapy* 15, 2007: 481-491
- [094] **Southern** E: Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods in Enzymology* 68, 1979: 152-176
- [095] **Spielmeyer** W: Klinische und amaurotische Untersuchungen über eine besondere Form von familiärer amaurotischer Idiotie. *Histology and Histopathology* 2, 1908: 193-251
- [096] **Spinardi** L, Mazars R, Theillet C: Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Research* 19. 14, 1991: 4009
- [097] **Steinfeld** R, Heim P, von Gregory H, Meyer K, Ullrich K, Goebel HH, Kohlschütter A: Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: quantitative description of the clinical course in patients with CLN2 mutations. *American Journal of Medical Genetics* 112, 2002: 347-354
- [098] **Steinfeld** R: Diagnostik und Therapie der neuronalen Zeroidlipofuszinosen aus Sicht des Neuropädiaters. *Ophthalmologie* 107, 2010: 616-620

-
- [099] **Stengel C**: Account of a singular illness among four siblings in the vicinity of Roraas. In: Armstrong D, Koppang N, Rider JA (eds), Ceroid-lipofuscinosis (Batten's Disease). Elsevier Biomedical Press 1982 17-19. Translated from: Beretning om et maerkeligt Sygdomstilfoelde hos fire Sodskende i Naerheden af Roraas, Eyr et medicinsk Tidsskrift 1, 1826: 347-352
- [100] **Taschner PE**, Franken PF, van Berkel L, Breuning MH: Genetic heterogeneity of neuronal ceroid lipofuscinosis in The Netherlands. *Molecular Genetics and Metabolism* 66, 1999: 339-343
- [101] **Teixeira C**, Guimarães A, Bessa C, Ferreira MJ, Lopes L, Pinto E, Pinto R, Boustany RM, Sá Miranda MC, Ribeiro MG: Clinicopathological and molecular characterization of neuronal ceroid lipofuscinosis in the Portuguese population. *Journal of Neurology* 250, 2003: 661-667
- [102] **Thompson AD**, Shen Y, Holman K, Sutherland GR, Callen DF, Richards RI: Isolation and characterisation of (AC)_n micro satellite genetic markers from human chromosome 16. *Genomics* 13, 1992: 402-408
- [103] **Turbett GR**, Sellner LN: Digestion of PCR and RT-PCR products with restriction endonuclease without prior purification or precipitation. *Promega notes Magazine* 60, 1996: 23
- [104] **Vines D**, Warburton MJ. Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase. *FEBS Letters* 443, 1999: 131
- [105] **Vogt H**: Über familiäre amaurotische Idiotie und verwandte Krankheitsbilder. *Monatsschrift für Psychiatrie und Neurologie* 18, 1905: 161-171
- [106] **Walker DR**, Bond JP, Tarone RE, Harris CE, Makalowski W, Boguski MS, Greenblatt MS: Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Onogene* 18, 1999: 211-218
- [107] **Wang YL**, Zeng ZY, Song XW, Hao ZF, Shi YW, Tang B, Chen SQ, Gao MM, Di W, Long YS, Yi YH, Liao WP: A novel CLN2/TPP1 mutation in a Chinese patient with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurogenetics* 12, 2011: 93-95

-
- [108] **Williams** RE, Aberg L, Autti T, Goebel HH, Kohlschütter A, Lönnqvist T: Diagnosis of the neuronal ceroid lipofuscinoses: an update. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762, 2006: 865-872
- [109] **Worgall** S, Sondhi D, Hackett NR, Kosofsky B, Kekatpure MV, Neyzi N, Dyke JP, Ballon D, Heier L, Greenwald BM, Christos P, Mazumdar M, Souweidane MM, Kaplitt MG, Crystal RG: Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Human Gene Therapy* 19, 2008: 463-474
- [110] **Zeman** W, Dyken P: Neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten's Disease): Relationship to amaurotic family idiocy?, *Pediatrics* 44, 1969: 570-583
- [111] **Zhong** N, Moroziewicz DN, Ju W, Jurkiewicz A, Johnston L, Wisniewski KE, Brown WT: Heterogeneity of late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genetics in Medicine* 2, 2000: 312-318
- [112] **Zhong** N, Wisniewski KE, Hartikainen J, Ju W, Moroziewicz DN, McLendon L, Sklower Brooks SS, Brown WT: two common mutations in the CLN2 gene underlie late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Clinical Genetics* 54, 1998: 234-238
- [113] **Zhong** N, Wisniewski KE, Kaczmarek AL, Ju W, Xu WM, Xu WW, McLendon L, Liu B, Kaczmarek W, Sklower Brooks SS, Brown WT: Molecular screening of Batten disease: identification of a missense mutation (E295K) in the CLN3 gene. *Human Genetics* 102, 1998: 57-62

9 Lebenslauf

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. med. A. Gal für die Ermöglichung dieser Dissertation und die intensive Betreuung bei der Fertigstellung bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik, besonders Frau Ulrike Orth, danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die freundliche Unterstützung.

Ein riesiges Dankeschön an das Team von „*pleasegetontomynerve*“ aus Münster mit Stefan und Tinka sowie der Dependance in Neumarkt mit Antje. Ihr habt mich über die Zeit des Erstellens der Arbeit ständig unterstützt und vielfältig motiviert - ohne Euch hätte ich es nicht geschafft!

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Bettina, Andreas, Birgit, Matthias, Stefan, Jan, Claudia, Fatima und Farida bedanken - ihr alle habt mich auf ganz unterschiedliche Art angespornt.

Abschließend ein riesengroßes Dankeschön an meine tolle Familie, die immer für mich da sind und mich ständig unterstützen - daher ist Euch diese Arbeit gewidmet.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: