

Aus der Klinik und Poliklinik
für Kinder- und Jugendmedizin
des Zentrums für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE)
Martinistraße 52 D 20246 Hamburg

Direktor: Prof. Dr. K. Ullrich

**Mutationen im *CLN 2 Gen* bei Patienten mit
spätinfantiler und atypischer neuronaler
Ceroid-Lipofuszinose in Deutschland**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kerstin Meyer
aus Bremervörde

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

Veröffentlichung mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2.Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3.Gutachter/in:

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite	1
1.1	Klinik der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen	Seite	2
1.2	Die verschiedenen Formen der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen	Seite	2
1.3	Genetik der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen	Seite	4
1.4	Diagnostik der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen	Seite	10
1.4.1	Diagnostik von NCL mittels Hautbiopsie	Seite	10
1.4.2	Pränatale Diagnostik	Seite	12
1.5	Problemstellung	Seite	13
1.6	Zielsetzung der Arbeit	Seite	13
2.	Material und Methoden	Seite	15
2.1	Untersuchungsmaterial	Seite	15
2.2	DNA-Präparation aus EDTA-Vollblut	Seite	15
2.2.1	Reagenzien für die DNA-Präparation aus EDTA-Vollblut	Seite	17
2.3	Isolierung von Gesamt-RNA und chromosomaler DNA aus Zellen über die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation nach Chirgwin	Seite	19
2.3.1	Quantifizierung der RNA	Seite	23
2.3.2	Reagenzien für die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	Seite	23
2.4	Protokoll für die Polymerasekettenreaktion	Seite	24
2.4.1	Reagenzien für den PCR-Ansatz	Seite	26
2.5	Quantifizierung des PCR-Produktes über den 1-Kb-Ladder	Seite	28
2.5.1	Reagenzien für die Quantifizierung des PCR-Produktes über den 1-Kb-Ladder	Seite	29

2.6	Aufreinigung des PCR-Produktes mittels des Qia-Quick PCR-Purifikation-Kit	Seite	29
2.7	Cycle-Sequenzierung mit Big-Dye ^R	Seite	31
2.7.1	Reagenzien für die Sequenzierung mit Big Dye ^R	Seite	32
2.8	Im Rahmen der Dissertation verwendete Geräte und Arbeitsmaterialien	Seite	33
3.	Ergebnisse	Seite	35
3.1	Übersicht der Mutationen im von mir untersuchten Patientengut	Seite	37
3.2	Häufigkeit der einzelnen Mutationen im Patientenkollektiv	Seite	39
3.3	Darstellung der Mutationen mittels fluoreszenzmarkierter DNA-Sequenzen	Seite	41
3.4	Struktur des <i>CLN-2-Gens</i> und Lokalisation der Mutationen im <i>CLN-2-Gen</i>	Seite	45
4.	Diskussion	Seite	47
4.1	Mutationen im untersuchten Patientengut	Seite	47
4.2	Klinische Symptome in den einzelnen Patientengruppen im Vergleich	Seite	51
4.3	Ausblick	Seite	52
5.	Zusammenfassung	Seite	57
6.	Abkürzungen	Seite	59
7.	Literaturverzeichnis	Seite	60
8.	Danksagung	Seite	64
9.	Lebenslauf	Seite	65
	Erklärung		

1. Einleitung

Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL) stellen die wahrscheinlich häufigste progredient verlaufende neurodegenerative Krankheit des Kindesalters dar. Sie gehören zur Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten. Erstmals bekannt wurden sie 1826 durch den Landarzt Christian Stengel, der in einer mittelnorwegischen Bergarbeiterstadt die juvenile Form dieser Krankheit bei vier betroffenen Kindern eines gesunden Elternpaares beschrieb.

Vor ungefähr 30 Jahren gelang der Nachweis der Autofluoreszenz ubiquitär gespeicherter Lipopigmente (Ceroid lipofuszin). Daraus resultierte die Abgrenzung von anderen Formen der amaurotischen Idiotie, wie zum Beispiel der GM₂-Gangliosidose (der Tay-Sachsschen Krankheit). Vorher wurde die NCL jahrzehntelang unter dem Oberbegriff der amaurotischen Idiotie geführt.

Seitdem ist diese Gruppe von neurodegenerativen Krankheiten unter der Bezeichnung neuronale Ceroid-Lipofuszinose bekannt, und schliesst auch die seltene adulte Form, den sogenannten Morbus Kufs mit ein.

Besonders im englischen Sprachraum wird auch die Bezeichnung Morbus Batten verwendet.

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte auf dem Gebiet der Genetik der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen gemacht. Trotzdem wird die Diagnose der NCL bis heute noch fast ausschliesslich durch den Nachweis von Lipopigmenten mittels morphologisch-elektronenmikroskopischer Untersuchungen gestellt.

Es findet eine ubiquitäre Bildung und Ablagerung von großen Mengen von Lipopigmenten mit spezifischer Ultrastruktur statt.

Besonders geeignete Gewebe für den Nachweis dieser spezifischen Speicherkörperchen sind Blutlymphozyten und Hautbiopsien [Kohlschütter A. et al 1997].

1.1 Klinik der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen

Die verschiedenen Formen der NCL sind durch eine fortschreitende Neurodegeneration mit Verlust von zerebrokortikalen und retinalen Nervenzellen gekennzeichnet.

Es treten motorische Störungen von einer Ataxie bis hin zur Spastik auf.

Weiterhin bestehen progrediente Sehstörungen durch Retinopathie oder Optikusatrophie, die bis hin zur Erblindung führen können.

Außerdem leiden die Patienten unter Epilepsie, die sich bei zunehmender Krankheitsdauer in schweren und schlecht therapierbaren Krämpfen äussert.

Häufig treten die Charakteristika der NCL, wie zum Beispiel Erblindung, geistiger Abbau, Demenz, Epilepsie und Bewegungsstörungen bei den verschiedenen Formen dieser Krankheit in einem für den einzelnen Subtyp bestimmten zeitlichen Ablauf auf. Zurzeit gib es keinen effektiven Therapieansatz für die Behandlung der NCL. Die Krankheit geht meistens mit erheblich verkürzter Lebenserwartung einher [Steinfeld R. et al 2002].

1.2 Die verschiedenen Formen der NCL

Traditionell werden die verschiedenen Formen der NCL auf der Basis des Erkrankungsalters, des klinischen Verlaufs sowie des elektronenmikroskopischen Bildes klassifiziert [Liu C.G. et al 1998].

Tabelle 1 (siehe Seite 7 und 8) zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Formen der NCL [Kohlschütter A. et al 1993].

Bei der **infantilen („finnische“) NCL** kommt es bereits im zweiten Lebensjahr bei den Patienten zum dramatischen Verlust der bis dahin bereits erworbenen Fähigkeiten. Sehr charakteristisch ist die Abflachung der Hirnaktivitätspotentiale im Elektroenzephalogramm (EEG); es kommt rasch zu einem „Null-Linien-EEG“. Außerdem lassen bildgebende Verfahren wie z.B. kraniale Computertomographien eine deutliche Hirnatrophie erkennen.

Auch bei der **spätinfantilen NCL CLN 2** (Morbus Jansky-Bielschowsky) sind die Kinder zunächst meist vollkommen unauffällig. Klinisch zeigen sich zu Beginn der Krankheit eine Rückentwicklung der bis dahin erworbenen sprachlichen Fähigkeiten sowie motorische Veränderungen wie zum Beispiel Ataxien. Später kommen Veränderungen wie Visusverlust hinzu. Hervorstechend bei dieser Form sind die myoklonischen epileptischen Anfälle, die im Alter von ca. zwei bis vier Jahren beginnen, und kaum zu beherrschen sind. Im Frühstadium können im EEG sog. Polyspikes nach langsamer photischer Stimulation auftreten. Der Verlauf ist ähnlich wie bei der juvenilen Form, jedoch führt er rascher zum meist noch vor der Pubertät eintretenden Tod.

Die **finnische Variante der spätinfantilen NCL (CLN 5, vLINCL)** gleicht der klassischen CLN2 in vielen Punkten; jedoch treten die Symptome im Durchschnitt ca. 1 bis 2 Jahre später auf. Die Lebenserwartung beträgt 10 bis 30 Jahre.

Die **indische Variante der spätinfantilen NCL (CLN 6)** und die **türkische Variante der spätinfantilen NCL (CLN7)** ähneln in ihren Befunden der CLN2 bzw. der CLN5, weisen jedoch einen anderen Genort auf [Wheeler R.B. et al 1999].

Die **juvenile NCL (CLN 3, Morbus Spielmeyer-Vogt)** ist die häufigste Form in Deutschland; die Inzidenz beträgt 0,7 pro 100 000 Lebendgeborene.

Als erstes Symptom wird meist eine Sehschwäche ungefähr im sechsten Lebensjahr der betroffenen Patienten bemerkt. Die Kinder sind im Übrigen gesund und auch psychomotorisch unauffällig. Der Visus nimmt jedoch weiterhin schnell ab, und es tritt im Alter von ca. 11 Jahren die Erblindung ein. Am Augenhintergrund finden sich schwerwiegende Veränderungen mit atrophischer Retina und Pigmentverschiebungen. Mit steigendem Alter nimmt die Lernfähigkeit des Kindes stetig ab, ebenso gehen die geistigen Fähigkeiten zurück. Im Alter von 8-16 Jahren treten epileptische Anfälle auf. Schließlich kommt es zum Verlust von allen mentalen und motorischen Fähigkeiten, bis es im jungen Erwachsenenalter zum Tod kommt.

Des Weiteren wird eine **variante juvenile NCL mit GRODS (vJNCL/GROD, CLN 1)** beschrieben. Der zeitliche Ablauf der Leitsymptome ist in etwa mit dem Verlauf der klassischen juvenilen NCL zu vergleichen.

Ein weiterer Subtyp ist die sog. **Northern epilepsie (CLN 8)**, die mit einer progressiven Epilepsie, die zwischen dem fünften und zehnten Lebensjahr beginnt, einhergeht. Die Lebenserwartung ist jedoch nahezu normal [Ranta S. et al 1999].

1.3 Genetik der NCL

Die verschiedenen Formen der NCL unterscheiden sich nicht nur klinisch, sondern auch genetisch; sie stellen eine Gruppe von heterogenen Krankheitsbildern dar.

Dies wurde in der Vergangenheit dadurch bestätigt, dass sich unterschiedliche Befunde in der Ultrastruktur der gespeicherten Lipopigmente fanden.

Die Vererbung der NCL ist bis auf eine Ausnahme autosomal rezessiv (bei der adulten NCL finden sich sowohl autosomal rezessive als auch autosomal dominante Erbgänge). Bisher sind mindestens sechs Gene mit unterschiedlichen Typen der NCL assoziiert worden.

Bei der **CLN 1** liegt der Genlocus auf Chromosom 1p32. Das *CLN-1-Gen* wurde als erstes kloniert und das Allel kodiert physiologisch für die Palmitoyl-Protein-Thioesterase; ein lysosomales Enzym, dessen physiologisches Substrat bisher unbekannt ist [Das A.K. et al 1998]. Bei Patienten mit INCL zeigt dieses Enzym je nach Mutation keinerlei oder verminderte Aktivität.

Bei finnischen Patienten mit INCL zeigt sich bei der Mehrzahl von Patienten als sogenannte „common mutation“ ein Aminosäureaustausch von Arginin durch Tryptophan (R122W). Diese Mutation ist assoziiert mit einem totalen Funktionsverlust der Palmitoyl-Protein-Thioesterase. Im amerikanischen und kanadischen Patientengut wurden zwei andere Mutationen häufig detektiert: Zum einen eine Nonsense-Mutation (R151X), die bei 40% der Patienten gefunden

wurde, und die meist mit einem schweren infantilen Verlauf assoziiert ist. Zum anderen eine Missense-Mutation (T75P), die bei 13% der Patienten vorhanden war, und die mit einem verspäteten klinischen Erscheinen (late onset) und einem milderem Verlauf assoziiert ist [Das A.K. et al 1998]. Durch die genauen Kenntnisse über dieses Gen ist eine pränatale Diagnostik möglich; sowie die Erkennung von Überträgern. Mutationen im *CLN-1-Gen* können typische infantile, atypische spätinfantile und variant juvenile Verläufe nach sich ziehen.

Das ***CLN2-Gen*** befindet sich auf dem Genlokus 11p15 [Liu C.G. et al 1998]. Dieser Genort konnte bisher nur für einzelne Familien nachgewiesen werden. Das Gen umfasst 13 Exons und ist ca. 6,5 Kilobasen groß. Das Protein besteht aus 563 Aminosäuren; die 194 N-terminalen Aminosäuren fehlen im reifen Protein. Es handelt sich bei diesem Protein um eine lysosomale pepstatin-insensitive Peptidase [Hofmann et al 2002], auch als Pepinase bezeichnet. Diese Pepinase ist eine Tripeptidylpeptidase, die keine strenge Spezifität zu einer bestimmten Aminosäuresequenz zeigt. Allerdings besteht eine gewisse Präferenz, nach einer hydrophoben Aminosäure (zum Beispiel Phenylalanin) vom N-Terminus kleiner Proteine abzuspalten. Andere Autoren beschrieben das CLN2-Genprodukt auch als eine Carboxy-Peptidase.

Für einige Fälle von Patienten mit atypischer LINCL konnte ein Gen auf Chromosom 15 identifiziert werden. Bei der klassischen LINCL ist es nicht möglich, Heterozygote morphologisch (elektronenmikroskopisch) zu erkennen; eine pränatale Diagnostik kann aber mittels Elektronenmikroskop an unkultivierten Amnionzellen durchgeführt werden.

Der Genort für die **juvenile NCL (CLN 3)** wurde auf Chromosom 16p11.2 lokalisiert. Dadurch ist es kürzlich gelungen, dieses Gen genauer zu charakterisieren. Es enthält 15 Kilobasenpaare mit 15 Exons, und kodiert für ein in seiner Funktion unbekanntes, ubiquitär vorkommendes Membranprotein [Järvelä I. et al 1998].

Bisher wurden für das *CLN-3-Gen* 14 Mutationen beschrieben. Dabei ist die häufigste eine 1,02-kb-Deletion, die in etwa zu 75% in homozygoter und in ca. 22% in heterozygoter Ausprägung beschrieben wird [Järvelä I. et al 1998].

Durch die Identifizierung des *CLN-3-Gens* sind Erkennung von Überträgern und pränatale Diagnostik auf genetischer Grundlage möglich.

Die **variante juvenile NCL (vJNCL)** zeigt wie die infantile Form elektronenmikroskopisch sogenannte GRODS (granular osmophilic bodies). Sie wird hervorgerufen durch Mutationen im *CLN-1-Gen*. Der Genort wurde auf Chromosom 1p32 lokalisiert. Das fehlende Protein ist eine lysosomale Palmitoyl-Protein-Thioesterase.

Der Genort für die **adulte NCL (CLN 4)** ist noch nicht bekannt. Es wurden bisher autosomal dominante und auch autosomal rezessive Erbgänge beschrieben.

Die **finnische Variante der spätinfantilen NCL (NCL 5)** ist auf Chromosom 13q21.1-32 lokalisiert. Bei dem zugehörigen Genprodukt handelt es sich um ein Membranprotein mit unbekannter Funktion [Kohlschütter A. et al 1999].

Die **CLN 6** ist die sog. **indische Variante der spätinfantilen NCL**. Hier wurde kürzlich das Gen gefunden (15 q21-23) [Sharp J.D. et al 1999] und Mutationen identifiziert [Gao H. et al 2002]. Das Genprodukt ist ein Transmembranprotein.

Der Genort der **türkische Variante der NCL (CLN7)** wurde, wie für die CLN 8, auf Chromosom 8p23 lokalisiert. Nicht auszuschließen ist daher, dass diese Form eine Variante der Northern Epilepsy (CLN 8) ist [Mitchell W.A. et al 2001].

Auf Chromosom 8p23 befindet sich der Genort für die sog. Northern Epilepsy (**CLN 8**). Der Erbgang ist autosomal-rezessiv. Das Gen codiert vermutlich für ein Transmembranprotein [Ranta S. et al 1999].

In den letzten Jahren haben sich weitere klinische NCL-Varianten herausgestellt. Hierzu gehört auch die durch osmophile Granula gekennzeichnete Variante, die

klinisch der klassischen juvenilen NCL entspricht. Diese Formen sind bisher nicht vollständig genetisch analysiert worden [Kohlschütter A. et al 1997].

Tabelle 1.1: Synoptische Darstellung der verschiedenen NCL-Formen (Kohlschütter A. et al 1993)

Krankheit	Infantile NCL	Klassische Spätinfantile NCL	Finnische Variante der spätinfantilen NCL	Indische Variante der spätinfantilen NCL
Alternative Bezeichnung	M. Santavuori-Haltia INCL	M. Jansky-Biel-Schowski LINCL	vLINCL	
Genetische Bezeichnung	CLN 1	CLN 2	CLN 5	CLN 6
Inzidenz in Deutschland	Einzelfälle	0,5/100 000		
Beginn der Leitsymptome				
Visusverlust	12-22 Monate	2-3 Jahre, langsamer Progress	4-5 Jahre	wie bei LINCL oder vLINCL
Epilepsie	14-24 Monate	2-3 Jahre	5-6 Jahre	
Demenz	6-18 Monate	2-3 Jahre	5-9 Jahre	
Unfähigkeit zu gehen	12-18 Monate	3-6 Jahre	10-20 Jahre	
Bewegungsstörungen	Stereotypien Choreaathetose	Myoklonien	Myoklonien	
Lebenserwartung	< 14 Jahre	10-15 Jahre	10-30 Jahre	
Retinabefunde				
Maculadegeneration	vorhanden	vorhanden	vorhanden	
Pigmentaggregation	nicht vorhanden	vorhanden	vorhanden	
ERG ausgelöscht	12 Monate	3-4 Jahre	4-5 Jahre	
Neurophysiologie				
EEG	Flach, 18-24 Monate isoelektrisch 3-4 Jahre (keine photische Reaktion) erniedrigt;	Polyspikes nach Einzelblitzen im Frühstadium		Polyspikes nach Einzelblitzen (spät)
Visuell evozierte Potentiale	erniedrigt;	erhöht	erhöht	
Somatosensorisch evozierte Potentiale	fehlend < 12 Monate erniedrigt; fehlend < 12 Monate	erhöht	erhöht	
Neuroradiologie				
Hirnatrophie	stark vorhanden	vorhanden	vorhanden	
Morphologie des Speichermaterials				
Lymphozytenvakuolen (LM)	fehlend	fehlend	fehlend	fehlend
Dominierende Einschlüsse (EM)	GROD	CB	CB, FP	CB,FP
Geeignetes Gewebe	Haut,Rektum, Lymphozyten	Haut,Rektum, Lymphozyten	Haut,Rektum, Lymphozyten	Haut, Rektum, Lymphozyten
Biochemie				
Dominierendes Speichermaterial	Sphingolipid-Aktivatorproteine, Glycosphingolipide	Subunit c der mit. ATP-Synthase	Subunit c, Glycosphingolipide	
Fehlendes Protein	lys. Palmitoyl-Protein-Thioesterase	Pepstatin-insensitive lys. Peptidase	Presumable novel membrane protein	
Genetik				
Vererbung	autosom. rezessiv	autosom. rezessiv	autosom. rezessiv	autosom. rezessiv
Genlokus	1p32	11p15	13q22	15q21-23
Pränatale Diagnostik	meistens möglich	möglich (EM)		
Heterozygotentest	meistens möglich			

Tabelle 1.1: Synoptische Darstellung der verschiedenen NCL-Formen (Kohlschütter A. et al 1993)

Krankheit	Juvenile NCL	Variante Juvenile NCL mit GRODS	Northern Epilepsy	Adulte NCL
Alternative Bezeichnung	M. Spielmeyer-Vogt, Batten JNCL	vJINCL/GROD	vJINCL	M. Kufs/Parry
Genetische Bezeichnung	CLN 3	CLN 1	CLN 8	CLN 4
Inzidenz in Deutschland	0,7/100 000	Schottland, Niederlande	Einzelfälle in Finnland	
Beginn der Leitsymptome				
Visusverlust	4-9 Jahre, blind mit 6-14 Jahren	wie bei Juveniler NCL	fraglich	
Epilepsie	8-16 Jahre		5-10 Jahre	30 Jahre
Demenz	6-9 Jahre		nach ersten Epilepsien	
Unfähigkeit zu gehen	10-20 Jahre		schleichender Verlauf	
Bewegungsstörungen	Rigidität Myoklonien			Myoklonien
Lebenserwartung	20-40Jahre		normal	
Retinabefunde				
Maculadegeneration	vorhanden	vorhanden		nicht vorhanden
Pigmentaggregation	vorhanden	fehlend		nicht vorhanden
ERG ausgelöscht	5-7 Jahre	variabel		
Neurophysiologie				
EEG				
Visuell evozierte Potentiale	erniedrigt	erniedrigt		erniedrigt
Somatosensorisch evozierte Potentiale	erniedrigt	erniedrigt		erniedrigt
Neuroradiologie				
Hirnatrophie	vorhanden			vorhanden
Morphologie des Speichermaterials				
Lymphozytenvakuolen (LM)	vorhanden FP,CB	fehlend GROD	CB, GROD	fehlend GROD, FP
Dominierende Einschlüsse (EM)	Haut,Rektum, Lymphozyten	Haut,Rektum, Lymphozyten		Haut, Rektum, Muskel, Gehirn
Geeignetes Gewebe				
Biochemie				
Dominierendes Speichermaterial	Subunit c		Subunit c, Aktivatorprotein A und D	
Fehlendes Protein	438 AS- Membranprotein	lys. Palmitoyl-Protein- Thioesterase		
Genetik				
Vererbung	autosom. rezessiv	autosom. rezessiv	autosom. rezessiv	autosom. rezessiv
Genlokus	16p11.2-12.1	1p32	8p23	autosom. dominant
Pränatale Diagnostik	meistens möglich			
Heterozygotentest	meistens möglich			

1.4 Diagnostik der NCL

Die wichtigsten Standbeine in der Diagnostik der verschiedenen NCL-Formen sind bisher die klinischen Befunde sowie das Alter der Patienten, in dem die Symptome auftreten, und die Elektronenmikroskopie (EM).

In Deutschland sind die juvenile Form und die spätinfantile Form am häufigsten. Leitsymptome dieser beiden Formen sind initiale Retinopathie (juvenile NCL) bzw. die im Kindesalter auftretende schwere Epilepsie ohne erkennbare Ursache (spätinfantile NCL).

Die Diagnose einer NCL im Kindesalter wird auch heute noch häufig morphologisch mit Hilfe des Elektronenmikroskops gestellt.

Der Verlust von Nervenzellen der Großhirnrinde ist für die Klinik und für die elektrophysiologischen Charakteristika verantwortlich.

Für die EM-Diagnostik sind die zerebral und extrazerebral vermehrt gebildeten und gespeicherten Lipopigmente bedeutsam.

Ungeklärt ist weiterhin, ob die Lipopigmente für den fortschreitenden Verlust von Nervenzellen verantwortlich sind.

Fraglich ist auch, inwieweit die Bildung pathologischer Lipopigmente in extrazerebralen Organen zu einer Schädigung bzw. einem Verlust der entsprechenden Zellen führt. So wurden zum Beispiel Funktionsstörungen bei Herzmuskelzellen beschrieben. Weiterhin zu berücksichtigen ist, ob die Schädigung überhaupt rechtzeitig nachweisbar ist, bzw. nicht offensichtlich wird, weil die Kinder schon vorher versterben.

1.4.1 Diagnostik von NCL mittels Hautbiopsie

Durch die Biopsie verschiedener Organe kann die ubiquitäre Bildung von NCL-spezifischen Lipopigmentablagerungen nachgewiesen werden. Nachdem früher Hirnbiopsien und Rektumbiopsien entnommen wurden, steht jetzt die Hautbiopsie im Vordergrund [Kohlschütter A. et al 1997].

Die Lipopigmente lassen sich dabei in Schweißdrüsenepithelien, in glatten Haarbalgmuskeln und in Gefäßwandzellen nachweisen.

Eine Korrelation zwischen Morphologie und klinischem Subtyp besteht aber dabei nicht immer [Wisniewski et al 2000, Wisniewski et al 2001]. Ergänzend zur Hautbiopsie kann die Untersuchung von zirkulierenden Lymphozyten sein. Die Lymphozyten werden dazu aus EDTA-Blut isoliert, fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht.

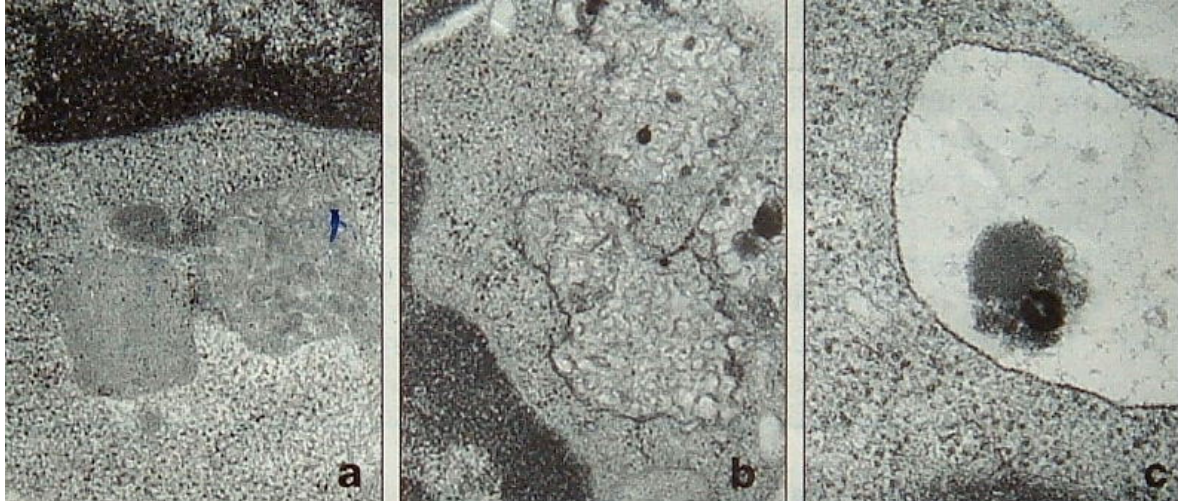
Dabei finden sich (**siehe Abbildung 1.1**, Seite 11[Kohlschütter A. et al, 1997]) für die infantile sowie für die variante juvenile Form der NCL granuläre kompakte Lipopigmente, die sogenannten GRODS (granular osmophilic deposits).

Diese können auch ein Hinweis auf CLN 4 sein (adulte NCL). Bei der spätinfantilen Form zeigen sich kompakte curviliniäre Einschlusskörperchen (curvilinear bodies), die auch bei der finnischen und indischen Variante der spätinfantilen NCL sowie bei der CLN 8 vorkommen. Bei der juvenilen Form (CLN 3) finden sich membranbegrenzte Vakuolen mit Fingerabdruckprofilen (fingerprint profiles).

Für die frühjuvenile NCL korrelieren kompakte avakuoläre Lipopigmente, ebenfalls mit Fingerabdruckprofilen.

Neben Haut und Lymphozyten werden zum Teil auch Konjunktiva und quergestreifte Muskulatur zur Biopsie herangezogen. Selten werden auch Leber, Niere, Lymphknoten, Tonsillen und Appendix verwendet [Kohlschütter A. et al 1997].

Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopie von zirkulierenden Lymphozyten bei Patienten mit neuronaler Ceroid-Lipofuszinose [Kohlschütter A. et al 1997]



- a: Granuläre Einschlüsse: Bei infantiler und variant juveniler NCL.
- b: Curviliäre Einschlüsse: Spätinfantile Form (auch bei finnischer und indischer Variante).
- c: Vakuolen mit Fingerabdruckprofilen: Bei der juvenilen Form.

1.4.2 Pränatale Diagnostik

In den Gefäßwandzellen des Chorionstromas finden sich bereits ab der neunten Schwangerschaftswoche NCL-spezifische Lipopigmente.

Dadurch lässt sich eine infantile NCL nachweisen. Epitheliale Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten weisen keine Lipopigmente auf.

Bei der spätinfantilen Form zeigen sich curviliäre Einschlüsse in unkultivierten Amnionzellen ab der sechzehnten Schwangerschaftswoche. Diese Form der NCL ist bisher nicht in Chorionzellen nachweisbar.

Vor kurzem sind auch spezifische Lipopigmente für die juvenile Form der NCL in Gefäßwandzellen des Chorionstromas in der fünfzehnten Schwangerschaftswoche gefunden worden.

Wichtig bei der pränatalen elektronenmikroskopischen Untersuchung ist, daß auch tatsächlich Choriongewebe vorliegt bzw. dass Amnionzellen unkultiviert bleiben.

Kultivierte Zellen exprimieren keine NCL-typischen Lipopigmente.

Weiterhin sollte auf die Hofbauer-Zellen des Chorionstromas geachtet werden.

Diese stellen Makrophagen dar und können unspezifische lysosomale Residualkörperchen in sich tragen [Kohlschütter A. et al 1997].

1.5 Problemstellung

Die diagnostischen Möglichkeiten der NCL beschränkten sich bisher wie bereits oben erwähnt, auf die Klinik der Patienten und die Elektronenmikroskopie.

Bei der elektronenmikroskopischen Diagnostik bedarf es einiger Erfahrung, zum einen in der Präparation und zum anderen in der Interpretation.

Diese Untersuchungen sind personalaufwendig und kosten viel Zeit.

Weiterhin bestehen Schwierigkeiten, allein durch die Klinik und die Elektronenmikroskopie eine eindeutige Zuordnung zu einem Subtyp der NCL zu treffen. Bei einigen Patienten liefert die elektronenmikroskopische Untersuchung kein eindeutiges Ergebnis [Goebell et al 2001].

Es sind zum Beispiel Mutationen im *CLN-1-Gen* möglich, die einen infantilen, atypisch spätinfantilen oder juvenilen Verlauf nach sich ziehen können.

Ebenso sind Variationen bei der spätinfantilen NCL bekannt. Sie verläuft überwiegend typisch spätinfantil, kann aber auch atypisch juvenil verlaufen. Insgesamt ist die spätinfantile Form der NCL ein klinisch inhomogenes Krankheitsbild [Zhong et al 2000].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Um die aufwendige Analytik durch die Elektronenmikroskopie zu erleichtern, wird nach molekularbiologischen Testverfahren gesucht.

Im Rahmen dieser Dissertation soll mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion

(PCR) und der Sequenzierung die Detektion von Mutationen realisiert werden.

Da es besonders im Bereich der spätinfantilen NCL (CLN-2) schwierig ist, durch die Elektronenmikroskopie alleine eine eindeutige Einordnung zu treffen, und weil es auch im klinischen Verlauf viele Überlappungen gibt, bin ich zur genetischen Mutationsanalyse des *CLN-2-Gens* übergegangen.

Konkretes Ziel dieser Arbeit ist eine Mutationsanalyse bei Patienten mit spätinfantiler neuronaler Ceroid-Lipofuszinose im deutschsprachigen Raum.

Für Deutschland gibt es zurzeit noch kein Mutationsscreening und keine Ergebnisse über mögliche Mutationen in diesem Gen.

Des Weiteren soll ein Vergleich zwischen Mutationen in Deutschland und den bisher beschriebenen Mutationen in Amerika hergestellt werden.

Für die klassische spätinfantile NCL werden Mutationen im *CLN-2-Gen* assoziiert, welches vor kurzem auf dem Genlokus 11p15 lokalisiert wurde [Liu C.G. et al 1998].

Im Rahmen dieser Dissertation wurde genetisches Material aufgearbeitet, DNA-Abschnitte nach der Etablierung von Primerpaaren amplifiziert und anschließend der Sequenzanalyse unterzogen.

Durch den Vergleich mit der jetzt bekannten Sequenz des *CLN-2-Gens* können so Mutationen nachgewiesen werden.

Ein weiteres Ziel ist es, die PCR und die Sequenzierung des *CLN-2-Gens* als eigenständige Methode zu etablieren und so die Diagnostik zu erleichtern und eine bessere Zuordnung der Patienten zu einem bestimmten Subtyp der NCL zu gewährleisten.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Von 1998 bis 2002 wurden Blutproben von insgesamt 26 in Deutschland und der Schweiz lebenden Familien gewonnen. Dabei kamen 26 Proben von Patienten, und 31 Proben von Geschwistern und Elternteilen (Gesamtprobenanzahl: 57). Einschlusskriterium für Patienten ist die Kombination von klinischen Symptomen einer neurodegenerativen Erkrankung in der frühen Kindheit und dem elektronenmikroskopischen Bild von sog. curvilinear bodies.

Bei den Proben handelt es sich um 5 – 10 ml EDTA-Blut, das Idealerweise nach der Entnahme sofort bei 4 °C gekühlt wurde bzw. gleich aufgearbeitet wurde.

Für die überwiegende Anzahl von Patienten wurde eine DNA-Präparation aus EDTA-Vollblut durchgeführt. Bei einigen Patienten wurde durch die etwas aufwendigere Dichtegradientenzentrifugation nach Chirgwin gleichzeitig auch die RNA mit aus der Blutprobe isoliert, um später eine Umschreibung in cDNA durchführen zu können.

Sollte eine Untersuchung auf cDNA-Ebene auch bei den Patienten nötig sein, bei denen ursprünglich nur die DNA isoliert wurde, kann eine RNA-Isolierung aus Fibroblastenkulturen nachträglich herangezogen werden.

2.2 DNA-Präparation aus EDTA-Vollblut

Zunächst mußte die DNA aus dem EDTA-Blut der Patienten isoliert werden. Dazu wurde nach folgender Arbeitsanleitung vorgegangen:

(Anmerkung: Alle Angaben beziehen sich auf 10 ml (bzw. 5 ml) EDTA-Vollblut.)

Erster Tag:

1. Vorkühlen der Zentrifuge auf 4 °C.
2. Einstellen des Wasserbades auf 55 °C.

3. Das EDTA-Vollblut wird in ein autoklaviertes Falcon-Röhrchen (50 ml-Röhrchen) überführt.
4. Auffüllen mit gekühltem Lysispuffer (4 °C) auf 50 ml (25 ml).
5. Die Probe für 15 Minuten auf Eis stellen, dabei 3-mal schwenken.
6. Währenddessen die RNase A und die Proteinase K auf Eis auftauen.
7. Das Gemisch 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, 4 °C).
8. Überstand abgießen; mit kaltem Lysispuffer (4 °C) auf 30 ml (15 ml) auffüllen.
9. Pellet durch schütteln vom Boden lösen.
10. Das Gemisch 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, 4 °C).
11. Überstand abgießen; mit kaltem Lysispuffer (4 °C) auf 15 ml (10 ml) auffüllen.
12. Pellet durch schütteln vom Boden lösen.
13. Das Gemisch 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, 4 °C).
14. Überstand abgießen.
15. Zum Pellet in angegebener Reihenfolge folgendes hinzupipettieren:
 - 250 µl (125 µl) SDS-Puffer (Pellet lösen),
 - 10 µl (5 µl) RNase A,
 - 25 µl (12,5 µl) Proteinase K,
 - 5 ml (2,5 ml) SE-Puffer.
16. Mischen und über Nacht bei 55 °C im Wasserbad inkubieren.
17. !! Falls nach der Proteinase-K-Behandlung noch rötlich-braune Partikel in der Lösung schwimmen, war die Lyse der Zellen nicht vollständig und die Prozedur des ersten Tages muß komplett wiederholt werden!!

Zweiter Tag:

1. Zentrifuge auf Raumtemperatur einstellen.
2. Brutschrank auf 37 °C vorwärmen.
3. Dem Gemisch 1,5 ml NaCl (5 M) zugeben und vortexen.
4. Das Gemisch 10 min. zentrifugieren (3500 rpm, Raumtemperatur).
5. Überstand in ein autoklaviertes Falcon-Röhrchen (50 ml-Röhrchen) abkippen.
Der Überstand enthält die DNA!
6. Zugabe von zwei Volumen (entspricht ca. 13 ml bei 10 ml EDTA-Blut) kaltem Ethanol (- 20 °C).
7. Probe vorsichtig schwenken; die DNA sollte als weißer Faden ausfallen.

8. In ein autoklaviertes Screw-Cup 1 ml 70%igen Alkohol vorlegen.
9. DNA mit abgeflammter Pasteur-Pipette (oder einem ähnlichen spitzen sterilen Instrument) fischen und in den Screw-Cup überführen.
10. Die Probe 10 min. zentrifugieren (1400 rpm, Raumtemperatur).
11. Danach den Alkohol grob abgießen, den Rest vorsichtig vollständig abpipettieren.
12. DNA im Brutschrank für ca. 3 Stunden bei 37 °C antrocknen lassen (nicht durchtrocknen lassen).
13. DNA anschließend in 500 µl TE-Puffer lösen, 5 min. vortexen.
14. DNA für 2 Stunden bei 37 °C quellen lassen.
15. DNA über Nacht bei 4 °C lagern.

Dritter Tag:

Am dritten Tag erfolgt die Messung der OD (260 / 280).

Dazu wird die DNA im Verhältnis 1:20 verdünnt:

950 µl TE-Puffer plus 50 µl DNA-Stocklösung.

Der Leerwert wird mit 50 µl TE-Puffer festgelegt.

Die Lagerung der DNA erfolgt bei 4 °C.

2.2.1 Reagenzien für die DNA-Präparation aus EDTA-Vollblut:

Grundsätzlich wurde für das Ansetzen der Lösungen nur steriles Aqua dest verwendet.

Lysis-Puffer:

Ammoniumchlorid, NH₄Cl (Firma Sigma, Produkt-Nr: A 9434): 155 mmol
(= 8,29g).

Kaliumhydrogencarbonat, KHCO₃ (Firma Merk, Best.-Nr.: 1.04854): 10 mmol
(= 1,00 g).

Natrium-EDTA, Na₂EDTA (Firma Merk, Best.-Nr.: 1.08418) 0,1 mmol
(= 0,034g).

Mit Aqua dest (Aqua ad iniectionabilia, Firma Baxter, Best.-Nr.: SN-881514) auf 1000 ml auffüllen.

Mit HCl (Firma Merk, Best.-Nr.: 1.09911) bzw. NaOH (Firma Merk, Best.-Nr.: 1.06329) einen pH-Wert von 7,4 einstellen.

Nach dem Filtrieren bzw. Autoklavieren bei 4 °C im Kühlschrank lagern.

SE-Puffer:

Natriumchlorid, NaCl (Firma Merk, Best.-Nr.: 1.06404): 75 mmol (= 0,438 g).

Natrium-EDTA, Na₂-EDTA (Firma Merk, Best.-Nr.: 1.08418): 25 mmol
(= 0,931 g).

Mit Aqua dest auf 100 ml auffüllen.

Mit HCl bzw. NaOH einen pH-Wert von 8,0 einstellen.

Nach dem filtrieren bzw. autoklavieren bei Raumtemperatur lagern.

SDS-Puffer (20%ig):

Lauryl-Sulfate (Firma Sigma Produkt-N.: L 9781): 20 g auf 100 ml Aqua dest.

Nach dem filtrieren bzw. autoklavieren bei Raumtemperatur lagern.

Proteinase K (Firma Sigma, Produkt-Nr.: P 2308):

100 mg Lyophilisat mit 10 ml Aqua dest lösen (=> 10 mg / ml).

In 50 µl-Portionen einfrieren (bei – 20 °C).

NaCl (5 M = gesättigt):

Natriumchlorid, NaCl (Firma Merk, Best.-Nr.: 1.06404): 146,1 g.

Mit Aqua dest auf 500 ml auffüllen.

RNAse A (Firma Sigma, Produkt-Nr.: R 6513):

Nur DNase freie RNAse (Ribonuklease A, Firma Sigma, Art.-Nr: R6513).
verwenden!

10 mg in 0,5 ml Aqua dest lösen (=> 20 mg / ml).

TE-Puffer (pH 7,4):

1 M Tris (pH 7,4) (Firma Sigma, Art.-Nr.: T 9285): 10mmol (1 : 100) = 1,0 ml.

0,5 M EDTA (pH 8) (Firma Merk, Best.-Nr.: 1.08418): 1 mmol (1 : 500) = 0,2 ml

Mit Aqua dest auf 100 ml auffüllen. Nicht autoklavieren! Bei RT aufbewahren.

2.3 Isolierung von Gesamt-RNA und chromosomaler DNA aus Zellen über die Cs-Cl-Dichtegradientenzentrifugation nach Chirgwin

Diese Methode kann vor allem dann genutzt werden, wenn neben der DNA auch die RNA eines Patienten gewonnen werden soll.

Für alle Arbeitsgänge gilt: Immer mit autoklavierten Pipettenspitzen und Röhrchen arbeiten. Nur filtrierte Lösungen benutzen.

Erster Tag:

Brutschrank auf 37 °C einstellen.

Material: 5×10^6 / ml Zellen oder Fibroblasten.

1. Fibroblasten 2 x mit 10 ml PBS oder NaCl waschen.
2. Zugabe von 3 ml Trypsin.
3. Die Probe für 5 min. bei 37 °C in den Brutschrank (dabei den Deckel der Kulturflaschen nicht ganz zu drehen).
4. Zellen abklopfen, dabei vom Boden der Kulturflasche lösen.
5. Zugabe von 6 ml RPMI.
6. Die Probe in ein autoklaviertes Falcon-Tube (50ml-Tube) überführen.
7. Für 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, Raumtemperatur).
8. Überstand abgießen.
9. Zugabe von 5 ml PBS.
10. Für 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, Raumtemperatur).
11. Überstand abgießen.
12. Zugabe von 5 ml PBS.
13. Für 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, Raumtemperatur).
14. Überstand abgießen.
15. Zugabe von 2,5 ml GITC für Zellen.
16. Lysieren der Zellen durch schwenken.
17. Ultrazentrifugation durchführen (an dieser Stelle kann die Probe auch bei 20 °C zwischengefroren werden, für längstens eine Woche).

18. Ultrazentrifugation (UZ): Die UZ kann über Nacht durchgeführt werden:
18 Stunden, 18 °C, 32000 rpm.
19. Dazu das eventuell zwischengefrorene Lysat auf Eis auftauen.
20. 2,5 ml CsCl in die Zentrifugenröhrchen vorlegen.
21. Mit 2,5 ml Lysat (Zellen) vorsichtig überschichten.
22. Gegenröhrchen genau austarieren (CsCl + GITC).

Zweiter Tag:

1. DNA- und RNA-Gewinnung:

2. Isolierung der DNA:

3. Pro Probe werden drei Greinerröhrchen benötigt.
4. In das erste Röhrchen werden die Proteine überführt (oberstes Drittel aus den Zentrifugenröhrchen).
5. In das zweite Röhrchen wird die gelartige DNA überführt (zweites Drittel aus den Zentrifugenröhrchen).
6. In das dritte Röhrchen wird das CsCl überführt (unteres Drittel aus den Zentrifugenröhrchen).

7. Für RNA-Gewinnung: Rest dekantieren, abtropfen lassen, obere 2/3 des Zentrifugenröhrchens abschneiden => **Weiter siehe Protokoll RNA.**

8. Für die DNA-Gewinnung:

Lösung 1 = gelb (25 Teile Phenol + 24 Teile Chloroform + 1 Teil Isoamylalkohol).

Lösung 2 = farblos (24 Teile Chloroform + 1 Teil Isoamylalkohol).

9. Die gelartige DNA wird in Falcon-Röhrchen (15ml-Röhrchen) überführt.
10. Mit Aqua dest auf 5 ml auffüllen, DNA gut lösen.
11. Zugabe von 5 ml von **Lösung 1**, kräftig schütteln.
12. Für 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, Raumtemperatur).
13. Gelbe Phase mit Pasteur-Pipette abziehen, im Falcon-Tube aufbewahren.
14. Zur anderen Phase 5 ml von **Lösung 1** zugeben, kräftig schütteln.
15. Für 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, Raumtemperatur).
16. Gelbe Phase mit Pasteur-Pipette abziehen, im Falcon-Tube aufbewahren.
17. Zur anderen Phase 5 ml von **Lösung 2** zugeben, kräftig schütteln.
18. Für 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, Raumtemperatur).

19. Untere bzw. obere Phase mit Pasteur-Pipette abziehen. !! Falls die gelbe Phase in den ersten beiden Schritten oben war, muß ab jetzt die obere Phase abgezogen werden (Phasenumkehr)!!!
20. Zur anderen Phase 5 ml von **Lösung 2** zugeben, kräftig schütteln.
21. Für 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, Raumtemperatur).
22. Untere bzw. obere Phase mit Pasteur-Pipette abziehen.
23. Zur anderen Phase 5 ml von **Lösung 2** zugeben, kräftig schütteln.
24. Für 10 min. zentrifugieren (1000 rpm, Raumtemperatur).
25. Falcon-Tubes auf Eis vorkühlen.
26. 500 µl 3 M Na-Acetat (pH 6,0) vorlegen.
27. Farblose Phase mit Pasteur-Pipette ins kalte Falcon überführen (keine Interphase überführen).
28. Zugabe von 11 ml kaltem Ethanol (- 20 °C).
29. Über Nacht bei – 20 °C einfrieren.

Dritter Tag:

1. Die Probe für 60 min. zentrifugieren (voll speed, 0 °C).
2. Überstand abgießen.
3. Zugabe von 4 ml 70%igem kaltem Ethanol.
4. Für 10 min. zentrifugieren (voll speed, 0 °C).
5. Überstand abgießen.
6. Zugabe von 4 ml 70%igem kaltem Ethanol.
7. Für 10 min. zentrifugieren (voll speed, 0 °C).
8. Überstand abgießen.
9. Zugabe von 400 µl Aqua dest.
10. Die Probe schnell ins Eppendorff-Cup überführen (mit abgeschnittener blauer Pipettenspitze).
11. Zugabe von 40 µl 3 M Na-Acetat (pH 6,0).
12. Zugabe von 880 µl kaltem Ethanol.
13. Über Nacht bei – 20 °C einfrieren.

Vierter Tag:

1. Die Probe für 10 min. zentrifugieren (1500 – 2000 rpm, 0 °C).

2. Überstand abgießen (vorsichtshalber in einem extra Eppendorff-Cup aufbewahren).
3. Zugabe von 400 µl 70%igem Ethanol.
4. Die Probe für 10 min. zentrifugieren (1500 – 2000 rpm, 0 °C).
5. Überstand abgießen (vorsichtshalber in einem extra Eppendorff-Cup aufbewahren).
6. Zugabe von 400 µl 70%igem Ethanol.
7. Die Probe für 10 min. zentrifugieren (1500 rpm, 0 °C).
8. Überstand abgießen und den Rest ganz fein abpipettieren.
9. DNA bei 37 °C für ca. 1 – 2 Stunden im Brutschrank antrocknen (nicht durchtrocknen).
10. DNA in 500 µl TE-Puffer lösen (5 min. vortexen).
11. Die DNA für ca. 2 Stunden bei 37 °C im Wärmeblock quellen lassen.
12. Lagerung der DNA über Nacht bei 4 °C.

Fünfter Tag:

Messung der OD (260 / 280).

Dazu wird die DNA im Verhältnis 1:20 verdünnt:

950 µl TE-Puffer + 50 µl DNA-Stocklösung.

Der Leerwert wird mit 50 µl TE-Puffer gemessen.

Die Lagerung der DNA erfolgt bei 4 °C.

RNA-Gewinnung:

Nachdem der Rest des Zentrifugenröhrchens dekantiert wurde und die oberen zwei Drittel des Röhrchens abgeschnitten wurden (siehe oben) geht es folgendermaßen weiter:

Zweiter Tag:

1. Mit 250 µl UF H₂O resuspendieren.
2. Überführung in ein autoklaviertes Screw-Cup.
3. Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2).
4. Zugabe von 2,5 Volumen 96%igem Ethanol.
5. Die Probe bei – 70 °C über Nacht einfrieren.

Dritter Tag:

1. Die Probe für 20 min. zentrifugieren (13000 rpm, 4 °C).
2. Dekantieren.
3. Für 3 min. die Probe in der Speed-Vac gefriertrocknen (Probe antrocknen, nicht durchtrocknen). Dafür den Deckel des Screw-Cups durchlöchern.
4. Zugabe von 250 µl UF H₂O.
5. Probe für 10 min. auf den Schüttler stellen.
6. Messung der OD (260 / 280): Dafür wird die RNA im Verhältnis 1:10 verdünnt: 45 µl UF H₂O + 5 µl RNA-Stocklösung. Der Leerwert wird mit 50 µl UF H₂O gemessen.
7. Der Rest der RNA-Stocklösung hat ein Volumen von 245 µl (250 µl – 5 µl).
8. Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2).
9. Zugabe von 2,5 Volumen 96%igem Ethanol.
10. Einfrieren der Probe über Nacht bei – 70 °C.

Vierter Tag:

2.3.1 Quantifizierung der RNA:

1. Die Probe für 20 min. zentrifugieren (13000 rpm, 4 °C).
2. Dekantieren.
3. Für 3 Minuten die Probe in der Speed-Vac gefriertrocknen (Probe antrocknen, nicht durchtrocknen). Dafür den Deckel des Screw-Cups löchern.
4. Zugabe der errechneten Menge von UF H₂O, so daß die RNA in einer Konzentration von 0,1 µg / µl vorliegt.
5. Die Lagerung der RNA erfolgt bei – 80 °C.

2.3.2 Reagenzien für die Isolierung von RNA und DNA aus Zellen über die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation nach Chirgwin:

PBS-Dublecco1x (Firma Biochrom KG, Cat. No. L1825).

RPMI1640-Medium 1x (Firma Gibco BRL Life technologies, Cat. No.21875-042).

GITC (Guanidine-Isothiocyanat 4 M) für Zellen:

100g GITC werden in 100 ml UF-H₂O (Temperatur 65 °C) gelöst.

Zugabe von:

10,6 ml 1 M **Tris-HCl** (pH 7,6) (Firma Sigma, Produkt-Nr.: T 2788),

4,2 ml 0,5 M **EDTA** pH 8,0 (Ethylenediaminetetraacetic acid, Firma Sigma, Cat. No. E-5134)

21,2 ml 20%iges **Sarkosyl** (sodium lauryl sarkosinate),

2,1 ml **β -Mercaptoethanol** (Firma Sigma, Produkt-Nr.: M 3148).

Mit 212 ml UF-H₂O auf 350 ml Endvolumen auffüllen.

Nach dem filtrieren bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt lagern.

CsCl (pH 7):

191,9 g **CsCl** (DNase frei, Firma Paesel und Lorei, Cat. No. 40J219) und

7,44 g **EDTA** werden in 200 ml Aqua dest gelöst. Es wird ein pH von 7 eingestellt, danach wird die Lösung filtriert.

2.4 Protokoll für die Polymerasekettenreaktion (PCR):

Die PCR ist eine Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte vervielfältigen kann. Um DNA mit Hilfe einer PCR amplifizieren zu können, benötigt man als Starthilfe synthetisierte Oligonukleotide, sogenannte Primer. Diese sind ungefähr 30 Basenpaare lang und sind komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize. Eine DNA-Polymerase verlängert in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist.

Die PCR-Reaktion besteht im Wesentlichen aus drei Schritten: DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung (Annealing) und Primer-Extension.

Um die Methode zu optimieren und die Primer auszuprobieren wurden zunächst PCRs mit Negativkontrollen, das heißt mit Proben von nicht erkrankten Personen durchgeführt.

Nach der Isolierung der DNA aus den Blutproben wurde diese in die PCR eingesetzt. Die Stocklösungen der DNA-Proben der einzelnen Patienten enthielten dabei im Durchschnitt 0,11 bis 0,65 μg pro μl . Bei weniger als 0,11 μg pro μl ist ein

gutes PCR-Ergebnis bzw. die Möglichkeit zur weiteren Verwendung der Probe bis zur Sequenzierung nicht sicher gewährleistet.

Für die PCR wurde folgender Ansatz pipettiert:

PCR-Ansatz:

Probe-Nr. 1	Patient (z.B. SE)	/	Primer (z.B. H)
Probe-Nr. 2	Patient (z.B. NK = Negativkontrolle)	/	Primer (z.B. H)

Ansatz für:	1 x	2,5 x	Final concentration
1. 10 x Puffer (500 mM KCL) (100 mM Tris-HCL)	5 µl	12,5 µl	(50 mM KCL) (10 mM Tris-HCL)
2. MgCL ₂ (25 mM)	5 µl	12,5 µl	(2,5 mM)
3. d-NTP's (100 mM) (je 10 µl + 760 µl H ₂ O) (= je 1,25 mM)	5 µl	12,5 µl	(0,125 mM)
4. Primer 3' (10 µM)	1 µl	2,5 µl	(0,20 µM)
5. Primer 5' (10 µM)	1 µl	2,5 µl	(0,20 µM)
6. TAQ (5U/µl)	0,5 µl	1,25 µl	(0,05 U/µl)
7. UF-H ₂ O	12,5 µl	31,25 µl	
8. Mix-Volumen:	30 µl	75 µl	

Patient:	SE	NK
G-DNS:	8 µl	0 µl
UF-H ₂ O:	12 µl	20 µl
Summe:		
DNS und H₂O:	20 µl	20 µl
Totalvolumen:	50 µl	50 µl
(Totalvolumen = DNA plus H ₂ O plus Mix-Volumen)		

Dabei ist zu beachten, daß zunächst der 10x-Puffer, das $MgCl_2$, die d-NTP's sowie die beiden Primer zusammenpipettiert werden, bevor die TAQ zugegeben wird, und der Mix dann auf die einzelnen Patientenproben verteilt wird.

Nach dem folgenden Programm werden die Proben im Thermocycler der PCR unterzogen:

<u>Preheat:</u>	94 °C	5 min.
<u>Denaturation:</u>	94 °C	1 min.
<u>Annealing:</u>	62 °C	1 min.
<u>Extension:</u>	72 °C	1 min.
<u>Termination:</u>	72 °C	10 min.
<u>Hold:</u>	4 °C	
<u>Anzahl der Zyklen:</u>	45	

2.4.1 Reagenzien für den PCR-Ansatz:

Thermophilic DNA-Polymerase-10x Buffer (Firma Promega, Cat. No. M 190A).

$MgCl_2$ 25 mM (Firma Promega, Cat. No. A 351B).

Desoxynukleosidtriphosphate:

dTTP 100 mM (Firma Promega, Cat. No. U 123A),

dCTP 100 mM (Firma Promega Cat. No. U 122A),

dATP 100 mM (Firma Promega Cat. No. U 120A),

dGTP 100 mM (Firma Promega Cat. No. U 121A).

Je 10 μ l der dNTPs werden in 760 μ l H_2O gelöst, so daß die Konzentration je 1,25 mM beträgt.

Taq DNA-Polymerase in Storage Buffer B (Firma Promega Cat. No. M 166A).

Aqua ad iniectionem (Firma Braun, Art.-Nr.: 02351544).

Primer:

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Gibco BRL Life Technologies bezogen. Entsprechend der enthaltenen nmoles der Stocklösung der Primer

wurden die Primer so aufgelöst, daß sie in einer Konzentration von 100 µM vorlagen. Für die Pipettierung des PCR-Protokolls wurden die Primer nochmals 1:10 verdünnt, d.h. in einer Konzentration von 10 µM verwendet.

Übersicht der verwendeten Primer [Liu C.G. et al 1998] :

1. **A-386-F**: (5´zu 3´): GGG TGA GGA GAT ATA CTC TT, Primer Nr: B3594G11.
2. **A-386-R**: (5´zu 3´): GCA TTT CAG GGT TAG GGA GA, Primer Nr: B3571F11.
3. **B-405-F**: (5´zu 3´): ACT TTA AAG CAT CAC TCC CA, Primer Nr: B3571F12.
4. **B-405-R**: (5´zu 3´): AGG CTG GCA TCA GAT CTG GG, Primer Nr: B3571G01.
5. **C-415-F**: (5´zu 3´): ATC CTC AGT TCA GCT GAC TG, Primer Nr: B3571G02.
6. **C-415-R**: (5´zu 3´): AGG TCA GGG GTT CTG AGT GA, Primer Nr: B3571G03.
7. **D-471-F**: (5´zu 3´): AGT GTG CAC AGT CAC CTC AG, Primer Nr: B3571G04.
8. **D-471-R**: (5´zu 3´): AAC TTC GTT ACA GCT TCC TC, Primer Nr: B3571G05.
9. **E-440-F**: (5´zu 3´): CAG ACC TCC CAG TAG GGA CC, Primer Nr: B3571G06.
10. **E-440-R**: (5´zu 3´): CTG TAT CCC ACA CAA GAG AT, Primer Nr: B3571G07.
11. **F-395-F**: (5´zu 3´): ACT ATC TTT GTG CCC ATC CC, Primer Nr: B3571G08.
12. **F-395-R**: (5´zu 3´): GGT CCC TAC TGG AAG GTC TG, Primer Nr: B3571G09.
13. **G-446-F**: (5´zu 3´): GCC TCC CCA CAG TGT CCT CA, Primer Nr: B3571G10.
14. **G-446-R**: (5´zu 3´): GGG ATG GGC ACA AAG ATA GT,Primer Nr: B3571G11.
15. **H-442-F**: (5´zu 3´): TAG ATG CCA TTG GGG ACT GG, Primer Nr: B3571G12.
16. **H-442-R**: (5´zu 3´): GTC ATG GAA ATA CTG CTC CA, Primer Nr: B3571H01.
17. **I-425-F**: (5´zu 3´): GAT GGG AGG GAG TTG AGA GC, Primer Nr: B3571H02.
18. **I-425-R**: (5´zu 3´): CTT ATA GAC TGT AAT GCC CA, Primer Nr: B3571H03.
19. **J-398-F**: (5´zu 3´): GAG GTC CAA AAG GGG GAG TT, Primer Nr: B3571H04.
20. **J-398-R**: (5´zu 3´): CCT CTG AGC ATC CCT GGG CA, Primer Nr: B3571H05.
21. **K-475-F**: (5´zu 3´): CCG TGC CAG CTC CTA GTA CG, Primer Nr: B3571H06.
22. **K-475-R**: (5´zu 3´): GAC ATG ATC GCC CAT CCA TG, Primer Nr: B3571H07.
23. **L-404-F**: (5´zu 3´): GAG AGG GCT CGG GAG AAA GG, Primer Nr: B3571H08.
24. **L-404-R**: (5´zu 3´): TTG GGG AGG ATC CTA GGA GC, Primer Nr: B3571B08.
25. **M-489-F**: (5´zu 3´): GCA ATC TTT CGA GGC AGA TC, Primer Nr: B3571H09.
26. **M-489-R**: (5´zu 3´): TCC CAA TGT GTG CTG CCT CC, Primer Nr: B3571H10.

2.5 Quantifizierung des PCR-Produktes über den 1 Kb-Ladder:

Nach der PCR werden die Proben mittels Gel-Elektrophorese und anhand des 1-Kb-Ladders quantifiziert. Dazu wird folgendes Gel (2%ig) verwendet:

2 g Agarose werden mit 10xTBE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt, in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend werden 10 µl Ethidiumbromid zur Anfärbung der DNA im Gel zugegeben. Dabei ist es wichtig, daß aufgeköchte noch flüssige Gel nach der Zugabe des Ethidiumbromids gut zu schütteln, damit dieses im später ausgehärteten Gel gut verteilt vorliegt. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA interkaliert. Nach dem Abkühlen wird das Gel auf dem Träger ausgegossen, ein entsprechender Kamm gesteckt und nach dem Aushärten kann das Gel verwendet werden.

Die einzelnen Taschen werden folgendermaßen bestückt:

Lane 1: 123-Bp-Ladder (15 µl),

Lane 2: 1-Kb-Ladder (15 µl),

Lane 3-8: Patientenproben (8 µl Probe + 7 µl Bromphenolblau).

Die Quantifizierung erfolgt über folgenden Rechenweg:

Der 1-Kb-Ladder liegt in einer Konzentration von 1 µg/µl (= 1000 ng/µl) vor.

Die Verdünnung des Markers erfolgt folgendermaßen:

20 µl Marker auf 200 µl Endvolumen ($1 : 10 = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$).

Zu den 20 µl Marker werden 60 µl Bromphenolblau und 120 µl H₂O gegeben.

Auf das Gel werden 15 µl Marker aufgetragen; d.h. $1,5 \mu\text{g} / 15 \mu\text{l} (= 1500 \text{ ng} / 15 \mu\text{l})$. Die 1636 Bp-Bande des 1-Kb-Ladders entspricht 10 % der eingesetzten Stoffmenge. 10 % von 1500 ng entsprechen 150 ng.

Die 1636er Bande und die Banden der einzelnen Proben werden mittels der UV-Bestrahlung des Photodokumentationsgerätes sichtbar gemacht und durch das Computerprogramm „Easy“ (Easy Image plus, Enhanced Analysis System, Herolab, D-69168 Wiesloch) in Zahlen erfasst.

Anhand der Werte kann nun bestimmt werden, wieviel μl der einzelnen Proben ca. 150 ng PCR-Produkt entspricht, die für die Sequenzierung notwendig sind. Maximal können 12,5 μl PCR-Produkt in die Sequenzierung eingesetzt werden. Bei dieser ersten Quantifizierung sollte darauf geachtet werden, daß durch die nachfolgende Aufreinigung der Proben ein eventuell nicht unerheblicher Verlust entsteht, so daß 12,5 μl der einzelnen Probe ca. 300 ng entsprechen sollten (maximaler Verlust bis 50 % durch Aufreinigungsschritte möglich).

2.5.1: Reagenzien für die Quantifizierung des PCR-Produktes über den 1-Kb-Ladder:

1-Kb-Ladder, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Firma Gibco BRL Life Technologies, Cat. No. 15615-016).

123-bp-Ladder, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Firma Gibco BRL Life Technologies, Cat. No. 15613-011).

Agarose (Firma Gibco BRL Life Technologies, Cat. No. 540-5510UB).

Ethidium bromide (Firma Sigma, Cat. No. E-1510).

10x-TBE-Puffer:

216 g Tris Base (Firma Sigma, Cat. No. T8524),

110 g Boric acid (Firma Sigma Cat. No. B6768).

80 ml 0,5 M EDTA pH 8 (Firma Sigma Cat. No. E-5134).

Zugabe von 2 l Aqua dest. Danach wird ein pH von 8,3-8,4 eingestellt.

2.6 Aufreinigung des PCR-Produktes mittels des QiaQuick PCR-Purifikation-Kit:

Nach der Quantifizierung des PCR-Produktes über den 1-Kb-Ladder erfolgt eine Aufreinigung desselben nach folgender Vorschrift:

Vom ursprünglichen PCR-Ansatz (50 μl) wurden 8 μl auf das Gel aufgetragen, d.h. es besteht ein restliches Volumen von ca. 42 μl .

1. Diese 42 μl werden mit 200 μl Puffer-PB aus dem Qia-Quick PCR-Purifikation-Kit im Eppendorf-Cup gemischt.

2. Die Lösung wird in das lila Filtersystem überführt. Das lila Filter-Cup wird in ein dazugehörendes durchsichtiges Cup gesteckt, in dem das Filtrat aufgefangen wird.
3. Es folgt eine Zentrifugation mit 13000 rpm für eine Minute bei 4 °C.
4. Das Filtrat wird verworfen.
5. Zugabe von 375 µl Puffer-PE ins lila Filtersystem.
6. Erneute Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4 ° C für eine Minute.
7. Filtrat verwerfen.
8. Filter kurz trocken zentrifugieren.
9. Lila Filtersystem in ein neues Eppendorf-Cup stecken.
10. Auf die Membran werden 42 µl UF H₂O gegeben.
11. Fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.
12. Probe ein letztes mal mit 13000 rpm für eine Minute bei 4 ° C zentrifugieren.
13. Im Filtrat befindet sich nun die aufgereinigte Probe.
14. Davon werden 8 µl nun erneut auf ein 2%iges Argarosegel aufgetragen und danach wieder mittels „Easy Image plus“ quantifiziert.
15. Danach wird die entsprechende Menge PCR-Produkt in das folgende Sequenzierungsprotokoll eingesetzt.

2.7 Cycle-Sequenzierung mit Big-Dye^R

<u>Probe-Nr. 1 / Name:</u> Pat SE / GF		<u>Probe-Nr. 2 / Name:</u> Pat SE / GR		
<u>Probe-Nr. 3 / Name:</u> Pat SE / HF		<u>Probe-Nr. 4 / Name:</u> Pat SE / HR		
<u>Proben-Nr.:</u>	1	2	3	4
	Primer ´F	Primer ´R	Primer ´F	Primer ´R
Premix (Big Dye):	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Template				
(aus 50 µl-Ansatz):	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Halfterme-Mix:	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Primer 1 ´F(10 µM):GF	1,5 µl			
Primer 2 ´R(10 µM):GR		1,5 µl		
Primer 3 ´F(10 µM):HF			1,5 µl	
Primer 4 ´R(10 µM):HR				1,5 µl
UF H ₂ O:	0 µl	0 µl	0 µl	0 µl
Totalvolumen:	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Nachdem der Ansatz pipettiert wurde, werden die Proben in den Thermo-Cycler gestellt und folgendem Programm unterzogen:

Preheat: 96°C 1 sec.

Denaturation: 96°C 10 sec.

Annealing: 50°C 5 sec.

Extension: 60°C 4 min.

Termination

Hold: 4°C

Anzahl der Zyklen: 30

Danach erfolgt eine Aufreinigung der Proben:

1. Zugabe von 50 µl Ethanol; Überführung in ein Eppendorf-Cup.

2. Zugabe von 2 µl 3M NaAc (pH 4,6), vortexen.
3. Proben für 15 min. bei Raumtemperatur stehenlassen.
4. Zentrifugation: 30 min., 13000 rpm, 4 °C.
5. Überstand abpipettieren und verwerfen.
6. Zugabe von 150 µl 70%igem Ethanol.
7. Proben für 1 min. bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugieren.
8. Überstand abpipettieren und verwerfen.
9. Pellet bei 56 °C für ca. 5 – 15 min. trocknen.
10. Danach können die Proben bei -80°C zwischengelagert werden.

Die Proben wurden zur Sequenzierung in das Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Dr. Friedrich Buck) des Universitätskrankenhauses Eppendorf gegeben. Dort wurde die Sequenzierung mit dem ABI-Sequenator durchgeführt. Die Basenfolge der Amplikons kann mit der Didesoxymethode bestimmt werden, bei der eine DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) die Primer mit den vorhandenen vier dNTP-Molekülen (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) entlang einer einzelsträngigen Matrize verlängert. DNA-Doppelstränge müssen hierfür vorher durch Hitzedenaturierung voneinander getrennt werden.

Die Daten wurden mit Hilfe der Programme „Edit view“ und „Megalign“ ausgewertet. Dabei wird die Referenz-DNA-Sequenz (nach EMBL/Gene bank, Accession No. AF039704) des betreffenden Abschnittes des Exons mit der Sequenz des entsprechenden Exons der Patientenprobe verglichen und so die Abweichungen von der normalen Abfolge der Basenpaare sichtbar.

2.7.1 Reagenzien für die Sequenzierung mit Big Dye:

Big Dye Premix (Firma Perkin Elmer Applied Biosystems; gehört zu ABI Prism™ Ready Reaktion Terminator Cycle Sequencing Kit),

Half-Term-Mix, Firma GENPAK

UF H2O bzw. Aqua ad iniectabilia, Firma Braun, Art.-Nr.: 02351544

Ethanol, Firma Merk, Darmstadt

NaAc 3 M, (pH 4,6), Firma Merk, Darmstadt

2.8 Im Rahmen der Dissertation verwendete Geräte und Arbeitsmaterialien:

Geräte:

Zentrifugen: Firma: Heraeus instruments, Labofuge 400R
Firma: Sorvall, RC 50 Plus

Wasserbad: Firma: Gössner, GFL,

Brutschrank: Firma : Heraeus, Typ T 12 P

Vortexer: Firma: B.Braun Biotech International, Certomat MV

Schüttler: Firma: Heidolph,

Photometer: Firma: ATI Unicam, Unicam 5625, UV/VIS Spectrometer,

Wärmeblock: Firma: Eppendorf, Thermostat 5320,

PCR-Gerät: Firma: Hybaid, Touchdown

Photodokumentationsgerät: Firma: Herolab, UVT-20MIW,

Elektrophoresekammer: Firma: MWG Biotech,

PH-Meter: Firma: WTW, Multical pH 526,

Ultrazentrifuge: Firma: Sorvall, Ultraspeed centrifuge,

Mikrowelle: Firma: AEG, Mikromat,

Speed-Vac: Firma: Savant, Speed Vac Concentrator,

Computer: Apple Macintosh, PC,

Computerprogramme: Word, Exel

Powersupplie: Firma: Bio-Rad, Power-Pac 200,

Arbeitsmaterialien:

Falkon-Röhrchen: Firma: Falcon, Best.-Nr.: 352070,

Filtersysteme für Lösungen: Firma: Corning, Best.-Nr.: 430281 / 430770 / 430516

Falkon-Röhrchen: Firma: Falcon, Nr.: 352096,

Screw-Cup: Firma: Sarstedt, Lot-Nr.: 71146550,

„Eppendorf“-Cup: Firma: Sarstedt, Lot-Nr.: 72690,

Kleine „Eppendorf“-Cups: Firma: Hybaid, Cat.-No.: HB-TC-3372 N,

Pipette: Firma: Eppendorf Reference-Pipetten,

Pipettenspitzen: Firma: Greiner, Easy Load, Art.-Nr.: 741015 / 741000 / 741035,

Zellkulturflaschen: Firma: Greiner, No 658175,

Greinerröhrchen: Firma: Greiner, Art.-Nr.: 115261,

Glasbehältnisse: Firma: Schott Duran,

Serologische Pipetten: Firma: Falkon, Best.-Nr.: 356507, 356543, 356551, 356525,

3. Ergebnisse

Für die Mutationsanalyse wurden Blutproben aus insgesamt 26 Familien herangezogen. Diese Patienten zeigten den charakteristischen klinischen Verlauf für eine klassische spätinfantile NCL mit zunächst auftretendem Verlust der Sehkraft, Retardierung der bereits erworbenen motorischen und sprachlichen Fähigkeiten sowie myoklonischen Anfällen. Bei einigen dieser Patienten gab es zusätzlich auch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Lymphozyten bzw. einer Hautbiopsie, die die typischen curviliären Einschlusskörperchen zeigten.

Bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung schon verstorben waren, wurden Blutproben von beiden Elternteilen einer Mutationsanalyse unterzogen, um so auf die beim Kind vorliegende Mutation Rückschlüsse ziehen zu können.

Zunächst wurden die Reaktionsbedingungen für die Polymerasekettenreaktion und die individuelle Schmelztemperatur für die einzusetzenden Primer optimiert. Dies erfolgte mittels Kontrollproben, d.h. mit Hilfe von Proben von nicht erkrankten Personen. Die Abbildungen 3.1 a bis e zeigen exemplarisch die PCR-Amplifikate des Primers A bis M aus genomischer DNS.

Abbildung 3.1: PCR-Amplifikate der Primer A bis M aus genomischer DNS:

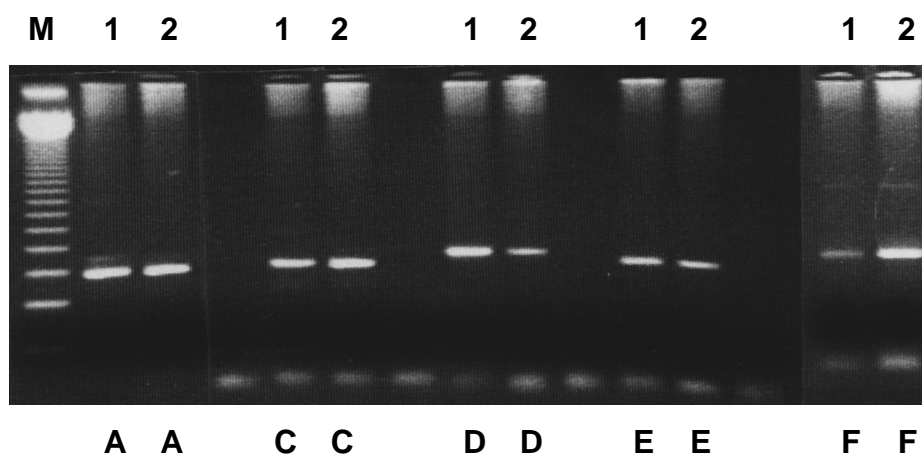


Abbildung 3.1 a: PCR-Amplifikate der Primer A, C, D, E und F

(M = 123 bp-Marker; 1 = Probe 1, 2 = Probe 2)

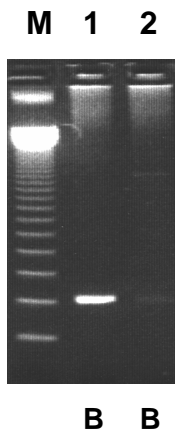


Abbildung 3.1 b

Abb. 3.1 b:PCR-Amplifikat des Primers B (M = 123 bp-Marker, 1 = Probe 1, 2 = Negativkontrolle)

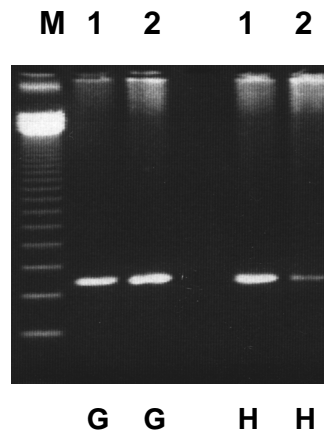


Abbildung 3.1 c

Abbildung 3.1 c:PCR-Amplifikat der Primer G und H (M = 123 bp-Marker, 1 = Probe 1, 2 = Probe 2)

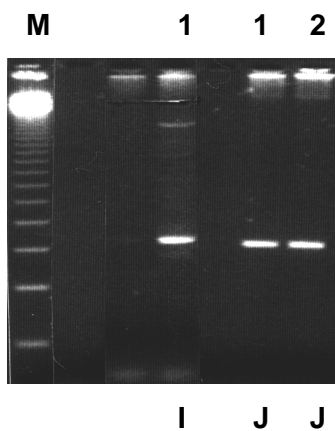


Abbildung 3.1 d

Abbildung 3.1 d:PCR-Amplifikate der Primer I und J (M = 123 bp-Marker, 1 = Probe 1, 2 = Probe 2)

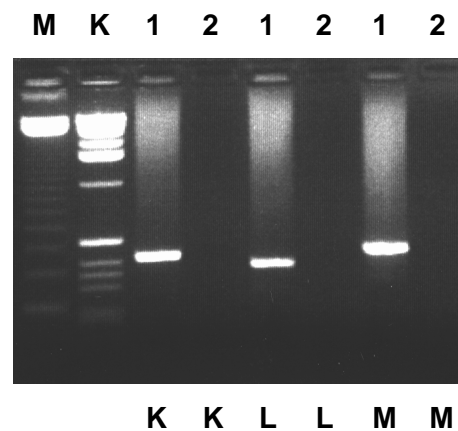


Abbildung 3.1 e

Abbildung 3.1 e:PCR-Amplifikate der Primer K, L und M (M = 123 bp-Marker, K = 1 Kb-Marker, 1 = Probe 1, 2 = Negativkontrolle)

Bei den Patientenproben wurde immer zuerst der Bereich sequenziert, in dem die beiden bis jetzt am häufigsten beschriebenen Mutationen liegen. Danach wurde Mutationsanalyse auf angrenzende Bereiche ausgeweitet.

Bei einigen Patienten wurden die kompletten 13 Exons durchsequenziert.

3.1 Übersicht der Mutationen im von mir untersuchten Patientengut

Bei den Patienten aus insgesamt 26 Familien wurde in vier Fällen keine Mutation in *CLN-2-Gen* gefunden. Bei 18 Patienten konnten Mutationen direkt nachgewiesen werden, bei 4 Patienten wurde aus der Untersuchung der DNA beider Elternteile auf die vorliegende Mutation Rückschluss gezogen.

In 16 Fällen wurde eine der beiden am häufigsten vorkommenden Mutationen [Sleat D.E. et al,1999] bzw. eine Kombination der beiden am häufigsten vorkommenden Mutationen gefunden (R208X heterozygot bei 10 Patienten, R208X homozygot bei 6 Patienten, IVS5 –1G>C heterozygot bei 12 Patienten, IVS5 –1G>C homozygot bei einem Patient, Kombination aus R208X heterozygot und IVS5 –1G>C bei 9 Patienten).

Nur bei einem Patienten konnte eine heterozygote Missense-Mutation (Q422H) festgemacht werden, die zusammen mit der IVS5 –1G>C-Mutation auftrat.

Außerdem wurden drei verschiedene Missense-Mutationen identifiziert, die bisher noch nicht beschrieben wurden (T353P, N286S, R127Q).

Dabei kam in diesem Kollektiv die Mutation T353P 2 Mal vor, und zwar jeweils in Kombination mit der schon bekannten IVS5 –1G>C-Mutation.

Die Missense-Mutation N286S wurde bei zwei der untersuchten Patienten in homozygoter Ausprägung detektiert. Bei nur einem Patienten wurde die Mutation R127Q bestimmt, die hier in Kombination mit der häufigen R208X Nonsense-Mutation auftrat.

Bei allen Patienten bis auf einen konnte ein Polymorphismus nachgewiesen werden (c.524 A>G / H175R), der allerdings auch bei den oben erwähnten Kontrollproben, d.h. nicht erkrankten Personen auftrat.

Die nachfolgende **Tabelle 3.1** gibt eine Übersicht über die Mutationen im *CLN-2-Gen* bei den von mir untersuchten Patienten.

Der Abschnitt 3.2 sowie die **Abbildung 3.2** geben einen Überblick über die Häufigkeit der einzelnen Mutationen im Kollektiv.

Tabelle 3.1: Übersicht der Mutationen im CLN-2-Gen bei Patienten mit spätinfantiler neuronaler Ceroid-Lipofuscinose:

Patient	Mutation	Nucleotide change	Lokalisation	Aminoacid change/ Predicted consequence
BB (m)	Nonsense	c.622 C->T, het.	Exon 6	R208X
	Intron change	IVS5 -1G->C,het.	Intron 5	Aberr. Spleissen
DB (m)	Nonsense	c.622 C->T, hom.	Exon 6	R208X
IB (f)	Nonsense	c.622 C->T,hom.	Exon 6	R208X
JB (m)	Nonsense	c.622 C->T,hom.	Exon 6	R208X
RH (f)	Intron change	IVS5 -1G->C,hom.	Intron 5	Aberr. Spleissen
CK (m)	Nonsense	c.622 C->T,hom.	Exon 6	R208X
MK (m)	Nonsense	c.622 C->T,het.	Exon 6	R208X
	Intron change	IVS5 -1G->C,het.	Intron 5	Aberr. Spleissen
PK (m)	Nonsense	c.622 C->T,het.	Exon 6	R208X
	Intron change	IVS5 -1G->C,het.	Intron 5	Aberr. Spleissen
EL (m)	Nonsense	c.622 C->T,het.	Exon 6	R208X
	Intron change	IVS5 -1G->C,het.	Intron 5	Aberr. Spleissen
LL (f)	Nonsense	c.622 C->T,het.	Exon 6	R208X
	Intron change	IVS5 -1G->C,het.	Intron5	Aberr. Spleissen
NL (m)	Nonsense	c.622 C->T,het.	Exon 6	R208X
	Intron change	IVS5 -1G->C,het.	Intron5	Aberr. Spleissen
MK (m)	Nonsense	c.622 C->T,het.	Exon 6	R208X
	Intron change	IVS5 -1G->C,het.	Intron5	Aberr. Spleissen
PKE (m)	Nonsense	c.622 C->T,hom.	Exon 6	R208X
DR (m)	Nonsense	c.622 C->T,hom.	Exon 6	R208X
FS (m)	Nonsense	c.622 C->T,het.	Exon 6	R208X
	Intron change	IVS5 -1G->C,het.	Intron5	Aberr. Spleissen
JT (m)	Nonsense	c.622 C->T,het.	Exon 6	R208X
	Intron change	IVS5 -1G->C,het.	Intron5	Aberr. Spleissen
PS (m)	Missense	c.1057 A->C,het.	Exon 8	T353P

	Intron change	IVS5 –1G->C,h _{et} .	Intron 5	Aberr. Spleissen
SS (f)	Missense	c.1057 A->C,h_{et}.	Exon 8	T353P
	Intron change	IVS5 –1G->C,h _{et} .	Intron 5	Aberr. Spleissen
JK (m)	Missense	c.1266 G->C,h _{et} .	Exon 10	Q422H(Ab. spl.?)
	Intron change	IVS5 –1G->C,h _{et} .	Intron 5	Aberr. Spleissen
GM (f)	Missense	c.857 A->G,h_{om}.	Exon 7	N286S
KN (f)	Missense	c.857 A->G,h_{om}.	Exon 7	N286S
SE (m)	Missense	c.380 G->A,h_{et}.	Exon 4	R127Q (Aberr. Spleissen)
	Nonsense	c.622 C->T,h _{et} .	Exon 6	R208X

3.1 Häufigkeit der einzelnen Mutationen im Patientenkollektiv

Mutation	Häufigkeit absolut	Häufigkeit in %
c.622 C->T (R208X) heterozygot	10 n	45,45
c.622 C->T (R208X) homozygot	6 n	27,27
IVS5 –1G->C heterozygot)	12 n	54,54
IVS5 –1G->C homozygot	1 n	4,5
c.1057 A->C (T353P) heterozygot	2 n	9,0
c.1057 A->C (T353P) homozygot	-	-
c.1266 G->C (Q422H) heterozygot	1 n	4,5
c.1266 G->C (Q422H) homozygot	-	-
c.857 A->G (N286S) heterozygot	-	-
c.857 A->G (N286S) homozygot	2 n	9,0
c.380 G->A (R127Q) heterozygot	1 n	4,5
c.380 G->A (R127Q) homozygot	-	-

Kombinierte heterozygote Mutationen Häufigkeit absolut Häufigkeit in %

c.622 C->T (R208X) heterozygot **plus**

IVS5 -1G->C (Aberr. Spleissen) heterozygot 9 n 40,90

c.1057 A ->C (T353P) heterozygot **plus**

IVS5 -1G->C (Aberr. Spleissen) heterozygot 2 n 9,09

c.1266 G->C (Q422H) heterozygot **plus**

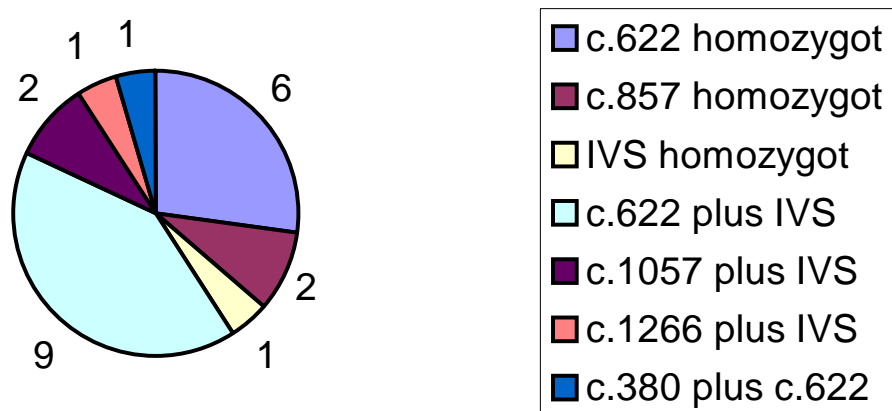
IVS5 -1G->C (Aberr. Spleissen) heterozygot 1 n 4,5

c.380 G->A (R127Q) heterozygot **plus**

c.622 C->T (R208X) heterozygot 1 n 4,5

(100 % = 22 Patienten (22 n)).

Abbildung 3.2: Graphische Darstellung der Häufigkeit der einzelnen Mutationen (absolute Werte, 22 n = 100 %):



3.3 Darstellung der Mutationen mittels fluoreszenzmarkierter DNA-Sequenzen

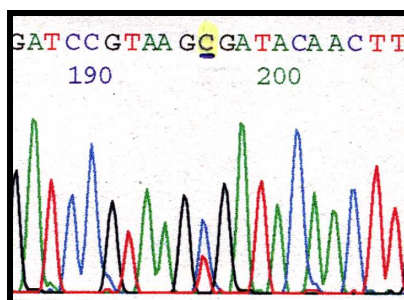
Nachdem die Proben mittels des ABI-Sequencers 377 im Institut für Zellbiochemie der Universität Hamburg sequenziert wurden, erhielten wir das Ergebnis sowohl als Text-Datei als auch in graphischer Darstellung der fluoreszenzmarkierten DNA-Sequenzen. Die Text-Datei wurde dazu verwendet, die Sequenz mittels der oben bereits erwähnten Computerprogramme direkt mit der Referenz-Sequenz vergleichen zu können, und die Mutationen zügig bestimmen zu können. Die graphische Darstellung veranschaulicht die einzelnen Mutationen zusätzlich.

Folgende Graphiken zeigen exemplarisch die sequenzierten DNA-Proben einiger Patienten mit den in meinem Patientengut vorkommenden und markierten Mutationen. Dargestellt sind jeweils – soweit möglich – der Forward- und der Reverse-Primer.

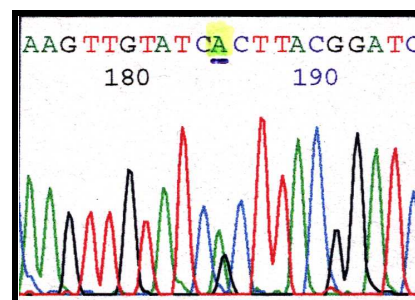
Die ersten vier Abbildungen zeigen die häufig vorkommende Nonsense-Mutation c.622 C->T (R208X), die bei zehn Patienten in heterozygoter, und bei sechs Patienten in homozygoter Ausprägung vorkam.

Die Mutation ist in Exon 6 lokalisiert, welches durch den Primer H abgedeckt wurde.

Nonsense-Mutation c.622 C->T heterozygot (Exon 6, Primer H):

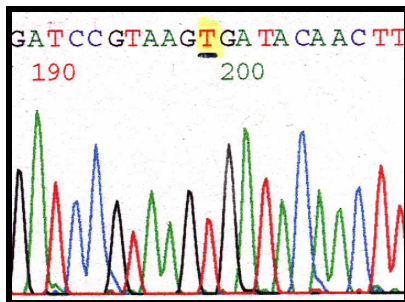


Primer H forward

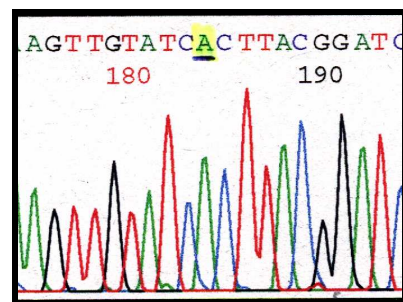


Primer H reverse

Nonsense-Mutation c.622 C->T homozygot (Exon 6, Primer H):



Primer H forward

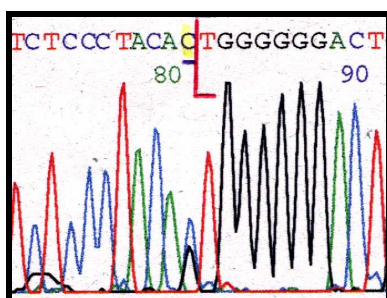


Primer H reverse

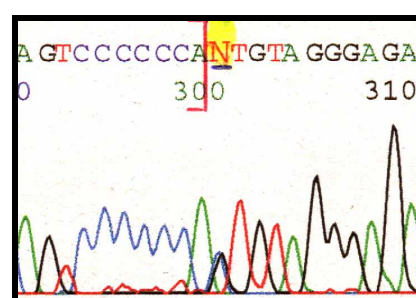
Die nächsten beiden Abbildungen zeigen die Intron-change-Mutation IVS5-1G->C, die sich bei 12 Patienten zeigte. Diese Patienten trugen die Mutation alle in heterozygoter Form. Bei einem Patienten lag diese Mutation vermutlich in homozygoter Form vor, da beide Elternteile für diese Mutation heterozygot sind. In diesem Falle hatten wir jedoch nicht die Möglichkeit, eine Blutprobe des Patienten analysieren zu können.

Die Mutation liegt genau an der Stelle der letzten Base im Bereich von Intron 5, welches ebenfalls durch den Primer H abgedeckt wird.

Intron-change-Mutation IVS5 –1G->C heterozygot (Intron 5, Primer H):



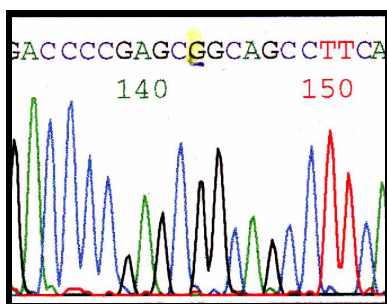
Primer H forward



Primer H reverse

Die Missense-Mutation c.1057 A->C (T353P) kam bei einem Geschwisterpaar aus einer von mir untersuchten Familie vor. Die nachfolgende Abbildung zeigt diese im Bereich des F-Reverse-Primers. Da sich bei der Sequenzierung im Bereich des F-Forward-Primers, vermutlich durch eine Poly-A-Sequenz direkt vor dem Exon 8, einige Schwierigkeiten einstellten, erfolgt hier nur die Abbildung des Reverse-Primers.

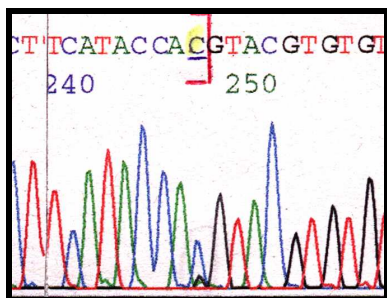
Missense-Mutation c.1057 A->C heterozygot (Exon 8, Primer F):



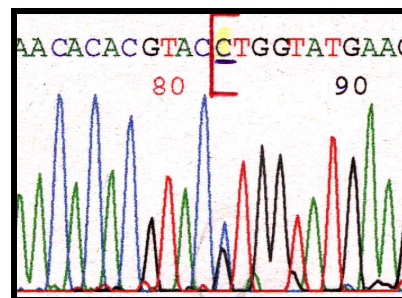
Primer F reverse

Die nachfolgend dargestellte Missense-Mutation c.1266 G->C (Q422H) wurde in heterozygoter Form bei einem einzigen Patienten aus dem Kollektiv entdeckt. Diese Mutation befindet sich im Exon 10, und betrifft die letzte Base des 10. Exons.

Missense-Mutation c. 1266 G->C heterozygot (Exon 10, Primer D):



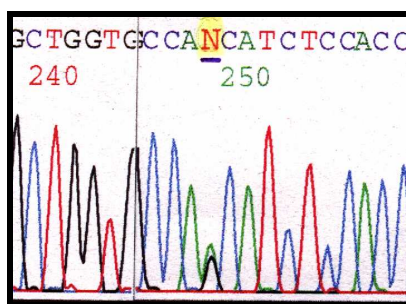
Primer D forward



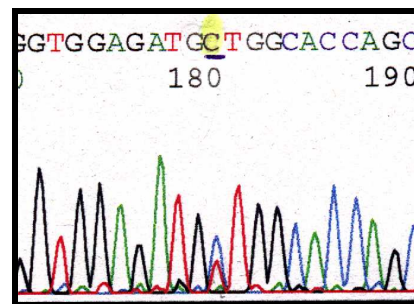
Primer D reverse

In den nächsten drei Abbildungen wird die Missense-Mutation c.857 A->G (N286S) dargestellt, welche sich in heterozygoter Form bei beiden Elternteilen in einer der von mir untersuchten Familien zeigte. Eines der Kinder dieser Familie wies diese Mutation in homozygoter Form, eines in heterozygoter Form auf. Ein Patient aus einer anderen Familie zeigte die Mutation ebenfalls in homozygoter Form.

Missense-Mutation c. 857 A->G heterozygot (Exon 7, Primer G):

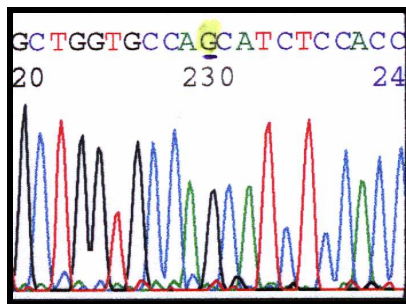


Primer G forward



Primer G reverse

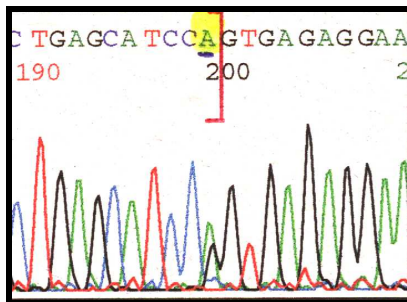
Missense-Mutation c. 857 A->G homozygot (Exon 7, Primer G):



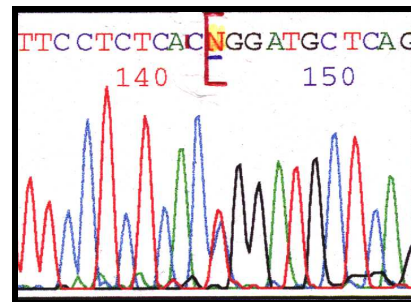
Primer G forward

Die in der nachfolgenden Abbildung dargestellten Mutation c.380 G->A (R127Q) wurde bei einem Patienten mit einem atypischen klinischen Verlauf entdeckt. Sie befindet sich in Exon 4 (letzte Base des 4. Exons), welches mittels des Primers J sequenziert wurde.

Missense-Mutation c. 380 G->A heterozygot (Exon 4, Primer J):



Primer J forward



Primer J reverse

3.4 Struktur des *CLN-2-Gens* und Lokalisation der Mutationen im *CLN-2-Gen*:

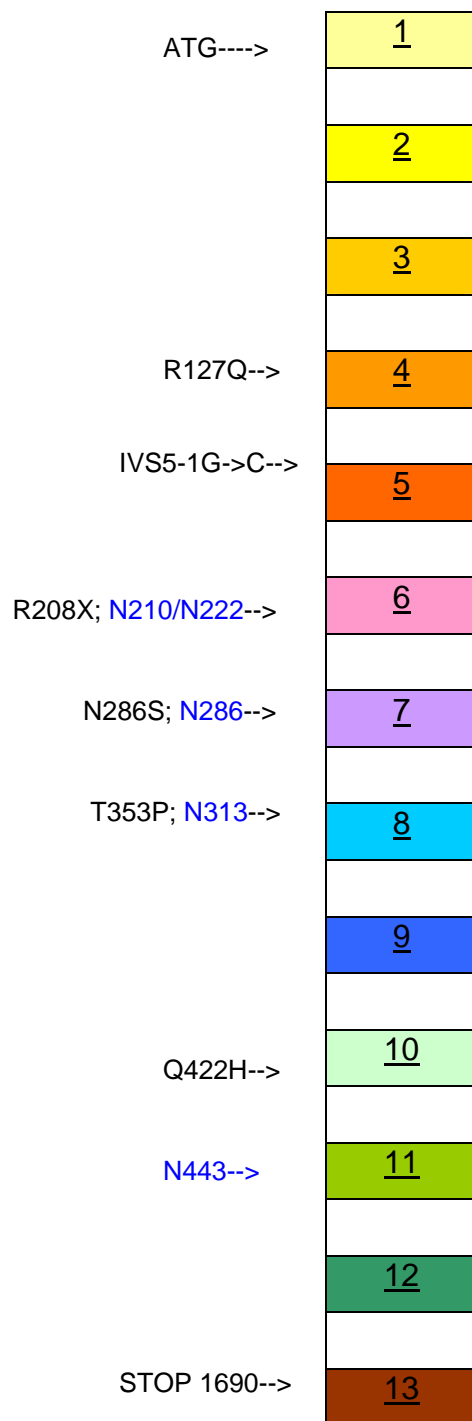
Das nachfolgende Schema auf der nächsten Seite zeigt die Struktur des *CLN-2-Gens* mit seinen 13 hier farblich markierten Exons. Die weiß unterlegten Bereiche stellen die Introns dar. Dargestellt sind ebenfalls die Mutationen, die im untersuchten Patientengut gefunden wurden. ATG stellt das Start-Codon dar. STOP steht für das STOP-Codon. Der Pfeil markiert die Stelle, an der der Endterminus vom Proprotein abgespalten wird (proteolytische Spaltungsstelle des Proenzym).

Die blauen Striche markieren die fünf Asparagin-Glykosilierungsbereiche (N 210, N 222, N 313, N 443 und N 286).

Die Bezeichnung H 175 R steht für den Polymorphismus c.524 A-G, der bei fast allen untersuchten Patienten auftrat.

Abbildung 3.4: Struktur des CLN-2-Gens:

(Erläuterung siehe oben im Text)



4. Diskussion

4.1 Mutationen im untersuchten Patientengut

Die Aminosäure-Sequenz des *CLN-2-Gens*, das sich auf Chromosom 11p15 befindet, wurde erstmals 1997 von David E. Sleat et al. veröffentlicht [Sleat D.E. et al 1997].

Für die vorliegende Arbeit wurden DNA-Proben von insgesamt 26 Patienten mit CLN-2 mittels PCR und Sequenzierung analysiert. In meinem Patientengut konnte in vier Fällen keine Mutation nachgewiesen werden. Die übrigen Patienten lassen sich zur besseren Übersicht am besten in vier verschiedene Gruppen einteilen:

Die **erste Patientengruppe** umfasst alle diejenigen, bei denen eine der beiden bis jetzt am häufigsten beschriebenen Mutationen im *CLN-2-Gen* [Hartikainen J.M. et al 1999] besteht.

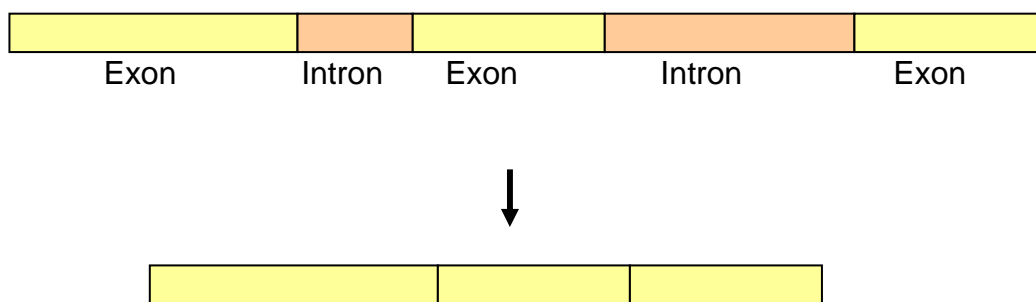
Dabei handelt es sich zum einen um die **Nonsense-Mutation R208X (C ->T)**, die bereits erstmals 1997 von Sleat et. al beschrieben wurde. Diese Mutation befindet sich im Exon sechs. Hier kommt es zu einem Basenaustausch von C gegen T, wodurch nicht das Codon CGA für Arginin entsteht, sondern ein Stopcodon (TGA). Dadurch kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation, der genau bei Aminosäure 208 lokalisiert ist, und somit zu einem verkürzten Protein. Der Stop befindet sich im CLN-2-Gen kurz hinter der Stelle, an der der Endterminus vom Proprotein abgespalten wird, also aus dem unreifen Protein das reife Protein entsteht.

Bei Patienten mit dieser Mutation entsteht also nicht nur ein verkürztes, sondern auch ein enzymatisch unwirksames Protein. Diese Mutation kam im Patientengut in homozygoter Ausprägung 6 Mal vor, in heterozygoter Ausprägung 10 Mal. Bei 9 von diesen 10 Patienten bestand eine Kombination mit der zweiten am häufigsten vorkommenden Mutation **IVS5 -1G->C**.

Diese Mutation ist eine sogenannte Spleiß-Mutation. Dazu sei zunächst ein kleiner Exkurs in die Biochemie vorangestellt:

Die Transkription (Übertragung der genetischen Information der doppelsträngigen DNA auf die einzelsträngige RNA) stellt den ersten Schritt der Proteinbiosynthese dar. Das Transkriptionsprodukt, die sog. m-RNA, wird durch verschiedene Vorgänge verändert. Beim sog. Spleissen werden die nicht-codierenden Introns herausgeschnitten, und die codierenden Exons aneinandergesetzt, so dass eine reife m-RNA mit fortlaufender Information entsteht.

Abbildung 4.1. [Stryer L. 1994]: Spleissen.



Das Spleissen wird von Speissosomen ausgeführt. Diese erkennen Signale im RNA-Primärtranskript, die Spleiß-Stellen (konservierte Bereiche) markieren. Nahezu alle Introns beginnen mit GU und enden mit AG [Stryer L. 1994]. Die erste und letzte Intronbase ist dabei jeweils zu 100 % konserviert; die erste Base im Exon zu 40 % und die letzte Base im Exon zu 80 %. Mutationen am Beginn eines Introns bzw. am Ende eines Introns führen zu falschen Spleiß-Produkten.

Bei der oben schon angesprochenen Spleiß-Mutation **IVS5 -1G->C**, die an der letzten Stelle von Intron 5 (zu 100% konservierter Bereich !) lokalisiert ist, handelt es sich um eine Intron-change Mutation, die ein verändertes Spleissen zur Folge hat. Dabei verändert sich durch die defekte Spleiß-Stelle der Leserahmen. Intron fünf wird nicht herausgeschnitten.

Es kommt zu einer 146-BP-Insertion aus intronischer Sequenz (der Stop erfolgt erst nach 146 Basen im Intron). Es entsteht ähnlich wie bei der Nonsense-Mutation R208X ein verkürztes und enzymatisch nicht aktives Protein.

Diese Mutation ließ sich insgesamt 12 Mal in heterozygoter Form nachweisen, davon wie oben erwähnt 9 Mal in Kombination mit der Nonsense-Mutation R208X. Diese Mutation wurde erstmals 1998 von Zhong et. al beschrieben.

Bei einem meiner Patienten, bei dem leider nur die DNA beider Elternteile und nicht die des Patienten selbst zur Verfügung stand, dürfte diese Mutation in homozygoter Ausprägung vorhanden sein (beide Elternteile sind heterozygot für diese Mutation).

Diese Intron-change-Mutation und die Stop-Mutation R208X sind zwar an verschiedenen Stellen im Gen lokalisiert, erbringen aber schließlich in der Konsequenz keinen Unterschied.

Im Vergleich mit einer amerikanischen Studie [Hartikainen et al 1999] lassen sich im Hinblick auf diese beiden Mutationen folgende Unterschiede zwischen deutschen und amerikanischen Patienten feststellen:

Wenn man zum einen das Verhältnis von Intron-Mutation zur Stop-Mutation betrachtet, lässt sich sagen, dass in der amerikanischen Studie die Intron-Mutation häufiger vorkam, als die Stop-Mutation R208X. 33% der Allele gegenüber 28 % der Allele; 78 % der untersuchten Patienten trugen eine dieser beiden Mutationen. Auf der anderen Seite war in meinem Patientengut die Stop-Mutation häufiger als die Intron-Mutation.

Bei fast allen Patienten, auch bei den Kontrollproben von nicht erkrankten Personen, trat zusätzlich im Bereich des Exon 6 ein Polymorphismus auf (c. 524 A->G / H175R), der in der amerikanischen Studie nicht beschrieben wurde. Lediglich ein kurdischer Patient zeigte diesen Polymorphismus nicht.

Die **zweite Patientengruppe** ist die der Patienten mit kurdischer Abstammung. Hier zeigte sich bei beiden Patienten eine bisher noch nicht beschriebene **Missense-Mutation**, die sich im Exon 7 befindet (**c. 857 A->G / N286S**). Sie trat bei beiden Patienten in homozygoter Ausprägung auf. Diese Mutation bewirkt einen Austausch von Asparagin gegen Serin, und betrifft einen der fünf n-Glykosylierungs-Bereiche. Die Gesamtlänge des Proteins bleibt erhalten. Diese Mutation im n-Glykosylierungsbereich an Position 286 kann nicht durch einen der anderen vier (N210, N222, N313, N443) kompensiert werden. Wie Tsiakas et al 2004 zeigen konnten, führen Mutationen des glykosylierten Asparagin-Residuums zum Verlust der enzymatischen Aktivität der lysosomalen Tripeptidyl-Peptidase I, für die das CLN2-Gen kodiert. Zusätzlich wird der Transport der Tripeptidyl-Peptidase I zum Lysosomen unterbrochen [Steinfeld et al 2004].

Bei diesen Patienten ist der klinische Verlauf im Vergleich mit den Patienten, die Träger von „klassischen“ Mutationen (s.o.) sind, milder. Im Vergleich zu Patienten mit einer weiteren neuen Mutation (R127Q, s.u.) besteht ein deutlich ungünstigerer Verlauf.

Die **dritte Patientengruppe** ist eine Gruppe von Patienten mit verschiedenen **Missense-Mutationen:**

Bei einem Patienten trat eine schon vorherbeschriebene [Sleat D.E. et al 1999] heterozygote Missense-Mutation (**c.1266 G->C**) in Exon 10 auf. Durch diese Mutation entsteht ein Austausch von Glutamin gegen Histidin (**Q422H**).

Diese Mutation betrifft die letzte Base in Exon 10 (zu 40% konservierter Bereich). Als Konsequenz hieraus ist durchaus eine Veränderung im Spleissen denkbar. Bei diesem Patienten bestand zusätzlich die oben beschriebene häufige Intron-change-Mutation IVS5 -1G->C in heterozygoter Ausprägung.

Zwei Patienten dieser Gruppe wiesen eine bisher noch nicht beschriebene **Missense-Mutation** in heterozygoter Form im Exon 8 auf (**c.1057 A->C**). Durch diese Mutation kommt es zu einem Austausch von Threonin gegen Prolin (**T353P**). Dabei gilt zu berücksichtigen, dass die Struktur eines Proteins durch einen Austausch von Aminosäuren aus verschiedenen Gruppen stärker beeinflusst wird, als wenn z.B. eine saure gegen eine saure oder eine basische gegen eine basische Aminosäure ausgetauscht werden würde. Zudem ist Prolin häufig an den Knicken von gefalteten Proteinen zu finden. Bei diesen beiden Patienten bestand eine Kombination mit der Intron-change-Mutation IVS5 -1G->C.

Die **vierte Gruppe** schließlich wird von einem einzigen, besonderen Patienten gebildet: Es handelt sich hier um einen 21 Jahre alt gewordenen Patienten mit atypischer NCL. Bei ihm setzten die klinischen Symptome wie motorische Fähigkeiten, sprachliche Fähigkeiten und epileptische Anfälle im Vergleich mit Patienten, die die häufig vorkommenden Mutationen tragen, später als gewöhnlich ein [Steinfeld R. et al 2002].

Bei diesem Patienten zeigte sich zunächst eine der beiden am häufigsten vorkommenden Mutationen, nämlich die heterozygote Stop-Mutation in Exon 6 (c.622 C->T).

Zusätzlich besteht hier eine ebenfalls noch nicht beschriebene Missense-Mutation im Exon 4 (**c.380 G->A / R127Q**). Diese Mutation betrifft die letzte Base des vierten Exons. Diese ist in ähnlicher Ausprägung wie die erste und letzte Base eines Introns konserviert (80 % gegenüber 100 %). Durch diese Mutation entsteht hier eine Störung des Spleissens durch ein Stopcodon im Leserahmen von Intron 4. Der verzögerte klinische Verlauf bei diesem Patienten lässt sich eventuell dadurch erklären, dass sich die Stop-Mutation in N-terminalen Bereich des unreifen CLN-2-Proteins befindet. Nach dem Processing werden die 194 N-terminalen Aminosäuren abgespalten, so dass die Mutation im reifen Protein nicht mehr vorhanden ist.

4.2 Klinische Symptome in den einzelnen Patientengruppen im Vergleich

Parallel zu dieser Dissertation wurde an der Universitätskinderklinik in Hamburg Eppendorf eine weitere Dissertation angefertigt, die sich mit dem klinischen Verlauf der verschiedenen von mir genetisch untersuchten Patienten beschäftigt hat [Steinfeld R. et al 2002].

Dabei wurden verschiedene clinical scores für motorische, visuelle und sprachliche Fähigkeiten sowie für die Inzidenz von cerebralen Krampfanfällen entwickelt. Es wurden Null bis drei Punkte vergeben, je nachdem wie schwer der Verlauf war. Daraus wurde schließlich ein Gesamt-score abgeleitet.

Dabei wurden die 16 Patienten, die eine der beiden am häufigsten vorkommenden Mutationen tragen, als Standard definiert. Dabei war der Verlauf der sprachlichen und motorischen Fähigkeiten bei diesen Patienten sehr ähnlich. Die Verlaufskurven der beiden Patienten mit der neu beschriebenen Mutation N286S wichen leicht von der 95. Percentile ab. Bei diesen Patienten war der klinische Verlauf weniger progredient als bei den Patienten, die „klassische“ Mutationen tragen. Der Ort der Mutation bei diesen beiden Patienten liegt auf dem Gen in einem weniger stark konserviertem Bereich als bei den Patienten der 16 Standardpatienten, die z.B. die IVS5 -1G-Spleiss-Mutation tragen; hier ist die

Mutation an der letzte Base des 5. Introns zu finden. Diese Base ist zu 100 % konserviert. Es ist anzunehmen, dass ein klinisch ungünstigerer Verlauf auf eine Mutation in einem stärker konservierten Bereich des Gens zurückzuführen ist. Welche Regionen funktionell wichtig sind, wird deutlicher, wenn man die humane CLN-2-Protease mit Proteasen von anderen Eukaryoten oder Prokaryoten vergleicht (**siehe Abbildung 4.2**). Es finden sich zwei Regionen (blau markiert) mit großer Übereinstimmung (entsprechend den Aminosäuren Ala 347 – Gly 362 und Pro 379 – Thr 391).

Am auffälligsten war die klinische Verlaufskurve des Patienten SE mit atypischer spätinfantiler neuronaler Ceroid-Lipofuscinose. Er trägt neben der häufigen Nonsense-Mutation R208X eine bisher noch nicht beschriebene Missense-Mutation R127Q. Diese Mutation betrifft die letzte Base des vierten Exons (zu 80% konservierter Bereich). Allerdings ist die Mutation im reifen Protein nicht mehr vorhanden, da sie sich im N-terminalen Bereich befindet.

Bei diesem Patienten lagen die Scores für motorische Fähigkeiten, sprachliche Fähigkeiten, Progredienz der epileptischen Anfälle sowie der Gesamt-score deutlich außerhalb der 95. Percentile. Dieser Patient hatte eine deutlich längere Lebensdauer und verstarb erst mit 21 Jahren.

4.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurden 26 Patienten mit spätinfantiler neuronaler Ceroid-Lipofuscinose zum einen genetisch mittels PCR und Sequenzierung untersucht. Zum anderen wurde eine Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp mittels einer parallel verlaufenden Dissertation versucht herzustellen.

Bei meinen Patienten zeigten sich neben den beiden am häufigsten vorkommenden Mutationen R208X (16/35, 46%) und IVS5 –1G->C (13/35, 37%) fünf weitere Missense-Mutationen, von denen drei bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurden (R127Q, N286S und T353P). Neben der genetischen Untersuchung wurden die Patienten soweit wie möglich auch klinisch beurteilt.

Abschließend lässt sich sagen, daß der Großteil der Patienten mittels einer genetischen Untersuchung zur Diagnosestellung geführt werden kann. Mit einer

einzigem PCR und Sequenzierung konnte bei 16 Patienten die Diagnose LINCL gesichert werden. Bei den anderen Patienten, die keine der häufig vorkommenden Mutationen tragen, kann ebenfalls, wenn eine sinnvolle Reihenfolge der weitergehenden Sequenzierung der 13 Exons des *CLN-2-Gens* eingehalten wird, mittels der molekulargenetischen Untersuchung eine Zuordnung zur spätinfantilen NCL getroffen oder eben verneint werden.

Zusätzlich kann eine Überprüfung an Hand der klinischen Scores, die über einen Zeitraum von mehreren Jahren erhoben wurden, im Vergleich zu einem Standard-Patientengut getroffen werden.

Abbildung 4.2.: Sequenzvergleich der humanen CLN-2-Protease mit der CLN-2-Protease anderer Spezies [Sleat D.E. et al 1999]

Human115...ITQDFLTCWLSIRQAELLPLGAEFHHYVGGPTEETHVVRSPHPYQLPQALAPHVDFVGGLLHFPPTSSLRQRPEPQV

Xanthomonas159.....DGTAGAATNGFRFSIKRFSANGREFFANDAPA

Pseudomonas147.....DGSAGAVKAAFNTPLVRYQLNGKAGYANTAPAQVPQDLGEIVGS

Sulfolobus136.....SGTVGNIEKAFNTYINVYYYPFKNLYWFGLLGKINIGPFYYSNNVTPSLPFNIG

Dictyostelium117.....RVKNVGQNCIAQNCQDQNESDLVDQYNTAIGNNITTLFLSSNGEWIIDWATAIQYNPPIKIASISYGWAEVEQ

Epicloe115...FPLPLKVDYIEPDQEATTSARVVQKNAPWGLARISHRRRGSNEYVVDNSGGKACVYVIDTGVDDRAPVRNTLLVP

Physarum115...GDGWEVETALDLQIAHAVAPAAKLILCTAKSASDTNLNACIKTLTNLHVNKISVSYGGSEGDTSSDSYFQQAQEAG

Maus¹115...TTQDFLTCWLSVRQAELLPLGAEFHRYVGGPTKTHVIRSPHPYOLPQALAPHVDFVGGLLHRFPSSPRQRPEPQQV

Ratte²115...TTQDFLTCWLSVRQAELLPLGAEFHRYVGGPAKTHIIRSPHPYQLPQALAPHVDIVAGLHRFPPLSSPRQRPEPQG

Rhesusaffe³115...TTQDFLTCWLSVRGAELLPLGAEFHHYVGGPTEETHVVRSPRPYQLPQALAPHVDFVGGLLHREPP TSSLRQRPEPQV

Hund⁴115...TTQDFLTCWLSVRQAELLPLGAEFHRYVGGPTEIHVIRSLRPYQLPKALAPHVDFVGGLLHREPP TSSLRQRPEPQV

Human191TGTVGLHLGVTPSVIRKRYNLTSQDVGSGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLAQFMRLFGGNFAHQASVARVVGQQGRGRAG

Xanthomonas191LVPASLGDSVNAVGLQLNVSVKHTLHHVYHPEDVTVPGPNVGTQAAAAVAHHHPQDFAAIYGGSSLPAAINTAVGIITWG

Pseudomonas191VLGLQNVTRAHPNLKVGERSAAKTLAAGTAKGRNPTEFPPTIYDASSAPTAANTTVGIITIGGVSQTLQDLQQFTSANGLA

Sulfolobus191KYVLGVVGGIDSLDPKVVNVVTQTNHLPVMKAQSGLVSKAIIISPITIEQYFNFTLAYERGYTGGSNIAIEGVPESFVNVS

Dictyostelium191CEITNSCSTLGIDSVVYVARSNVELQKVGLRGVSVFVSSGDDGAPSFGAASGNCPIDGTXYQCPLGGCNHKSSQCPMITI

Epicloe191FFPQLTRPGSPERGTNSIQEFEGRAHQIQSYVAGSNVDDNGHGTHVAGTIGSRITYGVAKRVTIFGVKVLPARGTSPNSVI

Physarum191ISLFAAGDSGAEAEYPAASQYVVAVGGTTLHTNSDGSFNSETAWSGGGCSKYTKVIPEQNADPGYASLGCKGKKALP

Maus¹191GTVSLHLGVTPSVLRQR**YN**LTAKDVGSGT**TN**NSQACAQ**F**LEQYFHNSDL**T**EFMRLF**GGS****F**THQASVAKV**V**GKQ
GRGRAGI

Ratte²191VGPVGLHLGVTPSVLRQ**R**YNLTARDVGSGT**TN**NSQACAQ**F**LEQYFHNSDL**T**EFMRLF**GGS****S**FAHQASVAR**V**GK
QGRGRAG

Rhesusaffe³191TGTVGLHLGVTPSVIRK**R**RNLTSQDVGSGT**SN**NSQACAQ**F**LEQYFHSD**L**AQFMRLF**G**GN**F**AHQASVT
RVVGGQGRGRAG

Hund⁴191SGTVGLHLGVTPSVIRQ**R**YNLTAQDVGSGT**TN**NSQACAQ**F**LEQYFHASDL**L**AEFMRLF**G**GN**F**AHQASVAR**V**GK
QGRGRAG

Human271IEASLDVQY**L**MSAGAN**I**STWVYSSPQRHEG**Q**EPFLQWL**L**LSNESALPHVHTVSYG**D**ED**S**LS**S**AYIQRVN**T**
ELMK**AAAR**

Xanthomoas271SITQTVTD**L**NSFTSG**A**GLATVNSTITKVGSGTFANDPDS**N**GEWSLDSQ**D**IVGIAGGVK**Q**LIFYTSANG
DSSSSGITD**AGI**

Pseudomonas271SVNTQTIQ**T**GSSNGD**Y**SDDQ**Q**QGEWDLDS**Q**SIVGSAGG**A**FQQLLFYNAD**Q**SASGNTGL**T**QAF**N**QA
FSDNVAKVIN**V**SLG

Sulfolobus271DIYSFWQ**L**YGI**P**RT**G**H**L**NV**I**YFGNV**T**T**G**Q**S**GENELDAEW**S**GAFAPAAN**F**TIVFSNGY**V**GG**P**QLVGN**L**L
NYYYYYY**N**V**N**

Dictyostelium271KESNGT**Q**CF**F**PNG**S**E**S**NT**C**Q**S**MLQ**N**Q**N**IV**N**GINETVSS**S**XC**Q**V**A**LE**Q**D**T**Q**Q**NY**H**IY**S**S**C**T**C**DK**L**K**P**
YSDSDAGFK**I**V**G**Y

Epichloe271IKGNDFV**H**AMP**S**GV**N**A**P**TD**V**V**M**MS**L**GG**G**Y**S**KAT**N**Q**A**A**R**L**V**R**A**K**Y**F**V**A**V**AS**G**N**N**R**D**AR**N**Y**S**P**A**S**E**P**S**V**C**
TVGGTD**K**F**D**

Physarum271**D**L**A**L**A**L**A**D**P**NS**G**I**T**I**I****F**H**G**Q**E**L**E**G**I**G**G**T**S**L**A**A**P**L**T**A**G**R**A**A**I**R**G**D**Q**V**T**P**A**Y**V**Y**T**G**G**I**Q**F**R**D**I**T**Q**G**S**N**G**H**S**A**K**
AGLDL**V**T**G**E**G**

Maus¹271IEASLDVEY**L**MSAGAN**I**STWVYSSPGRHEA**Q**EPFLQWL**L**LS**N**ESS**L**PHVHTVSYG**D**ED**S**LS**S**IYIQRVN**T**EF
MK**AAARG**

Ratte²271IEASLDVEY**L**MSAGAN**I**STWVYSSPGRHEA**Q**EPFLQWL**L**LS**N**ESS**L**PHVHTVSYG**D**ED**S**LS**S**VYIQRVN**T**E
FMK**AAAR**

Rhesusaffe³271IEASLDVQY**L**MSAGAN**I**STWVYSSPGRHEG**Q**EPFLQWL**L**LSNESALPHVHTVSYG**D**E**D**SLS**S**AYIQ
RVN**T**ELMK**AAAR**

Hund⁴271IEASLDVEY**I**MSAGAN**I**STWVYSSPGRHE**S**QEPFLQWL**L**LSNESALPHVHTVSYG**D**E**D**SLS**S**AYIQRVN**T**E
FMK**AAAR**

Human⁵351GLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPTFPASSPYVTTVGGTSFQKPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPRPSYQ
EEAFTKFL

Xanthomonas351TASYNRAVSDNIAKLINVSLGEDETAQQSGTQAADDAlFQQAVAQQQTFsIASGDAGVYQWSTDPT
SGSPGYVANSAGT

Pseudomonas351WCEADANADGTLQAEDRIFATAAAQQQTFsvSSGDEGVYECNNRGYPDGSTYSVSWPASSPNVIAV
GGTTLYTTSAGAYS

Sulfolobus351YLNPNVISISVTVPEsFLAAAYPAMLDNIHNIMLQAAAQGISVLAASGDWGYESDHPPPnFHIGTYNTI
WYPESDPYVTS

Dictyostelium351SYDQDAGTLFQPDYPASSPFITSVGATQITDVTKPEIVCSVATGAIITGGGGVAITQAQPSYQADAV
ATYIKSGTLPPSY

Epichloe351SVYNSNWGPAVDINGPGVDVLSLTPNRRTVCFFFLIKIPAWRAEKLTCMMQGRITGTSMAtpHIAGLGAYL
AAKNGRRAG

Physarum351 AWIGSE

Maus¹351LTLLFASGDTGAGCWSVSGRHKFRPSFPASSPYVTTVGGTSFKNPFLITDEVVDYISGGGFSNVFPRPRYQEE
AVAQFLK

Ratte²351GLTLLFASGDTGAGCWSVSGRHKFRPSFPASSPYVTTVGGTSFKNPFLVTNEVVDYISGGGFSNVFPQPSYQE
EAVAQFL

Rhesusaffe³351GLTLLFASGDSGAGCWSVSGRHQFRPTFPASSPYVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGGGFSNVFPR
PSYQEEVVAKFL

Hund⁴351GLTLLFASGDSGAGCWSVSRRHQFRPSFPASSPYVTTVGGTSFQNPFRVtTEIVDYISGGGFSNVFPQPSYQE
EAVVQFL

¹ Accession-No. NM 009906

² Accession-No. NM 031357

³ Accession-No. AB 083308

⁴ Accession-No. AF 114167

⁵ Accession-No. NM 000391

5. Zusammenfassung

Das *CLN-2-Gen*, das sich auf dem Chromosom 11p15 befindet, ist erst seit kurzem entschlüsselt [Sleat D.E. et al 1997]. Dieses Gen kodiert für eine lysosomale pepstatininsensitive Tripeptidylpeptidase (386 Aminosäuren). Mutationen, die sich in diesem Gen befinden, verursachen die klassische, spätinfantile neuronale Ceroid-Lipofiscinose. Diese äußert sich klinisch z.B. durch epileptische Anfälle sowie den Verlust bereits erworbener motorischer, sprachlicher und visueller Fähigkeiten.

Ich untersuchte 26 in Deutschland lebende Patienten mit elektronenmikroskopischen und klinischen Anhaltspunkten für CLN2. Bei 16 Patienten zeigte sich eine der beiden häufigsten bisher bekannten Mutationen (IVS5 –1G->C und R208X) bzw. eine Kombination aus beiden.

Zusätzlich entdeckten ich drei neue, bis jetzt noch nicht beschriebene Missense-Mutationen: Erstens: N286S oder c.857 A->G bei zwei Patienten. Diese Mutation betrifft einen der fünf n-Glykosylierungsbereiche. Entgegen der Erwartung, hier könne ein Ausgleich durch einen der vier anderen Glykosylierungsbereiche stattfinden, zeigten die Patienten einen klinischen Verlauf, der dieser Annahme entgegensteht. Die Klinik verlief zwar etwas milder als bei den 16 Patienten, die eine der beiden Standardmutationen zeigten. Es bestand jedoch immer noch ein großer Unterschied zu dem Patienten SE, der eine atypische NCL-Form mit später Klinik, bzw. mildem Verlauf zeigte und erst im Alter von 21 Jahren verstarb. Bei ihm lag neben der Nonsense-Mutation R208X eine weitere neu detektierte heterozygote Missense-Mutation in Exon 4 vor (R127Q).

Da diese Missense-Mutation das letzte Nukleotid von Exon 4 betrifft, suchten wir nach möglichen Veränderungen im Intron-Spleißen.

Wir haben zeigen können, dass R127Q eine Spleiß-Mutation ist. Intron 4 wird hier nicht gespleißt. Im Leserahmen von Intron 4 kommt gleich zu Beginn ein Stop-Codon, so dass ein stark verkürztes Protein daraus resultiert.

Da wir nur die cDNA der Mutter des Patienten sequenzieren konnten, und diese nicht verändert war, müssen wir darauf schließen, dass die RNA des Vaters des Patienten verändert ist.

Die dritte neue Missense-Mutation T353P oder c.1057 A->C konnten wir bei zwei Patienten identifizieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutationsanalyse nicht nur im Rahmen der genetischen Beratung und der pränatalen Diagnostik wichtig ist, sondern auch für die Aufklärung von sogenannten atypischen NCL-Formen.

Zusätzlich wurde ein clinical score entwickelt, um eine Genotyp/Phänotyp-Korrelation herzustellen [Steinfeld R. et al 2002] und eine quantitative Beschreibung der Krankheit über einen Zeitraum von mehreren Jahren zu gewährleisten.

6. Abkürzungen

Abber.	Abberrant
Bp	Basenpaare
CB	Curvilinear bodies
CsCl	Cäsiumchlorid
DNA	Desoxyribonucleid acid
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
FP	Fingerprint profiles
GITC	Guanidinisoithiocyanat
GRODS	Granular osmophilic deposits
KB	Kilobasen
NaCl	Natriumchlorid
NCL	Neuronale Ceroid Lipofuscinose
PCR	Polymerase chain reaktion
RNA	Ribonucleid acid
SDS	Sodiumdodecylsulfat

7. Literaturverzeichnis

- 1.** Das AK., Becerra C., Yi W., Lu JY., Siakotos AN., Wisniewski KE. (1998). Molekular genetics of Palmitoyl-Protein Thioesterase deficiency in the U.S. J Clin Invest 102: 361-370.

- 2.** Ezaki J., Takeda-Ezaki M., Oda K., Kominami E. (2000). Characterization of endopeptidase activity of Tripeptidyl-Peptidase-I / CLN2-Protein which is deficient in classical late infantil Neuronal-Ceroid-Lipofuscinosis. Biochem and Biophys Res Comm 268: 904-908.

- 3.** Goa H., Boustany RM., Espinada JA., Cotman SL., Srinidhi L., Antoneus KA., Gillis T., Qin X., Liu S., Donahue LR., Broson RT., Faust JR., Stout D., Haines JL., Lerner TJ., Mac Donald ME. (2002). Mutations in a novel CLN6-encoded transmembrane protein cause variant neuronal ceroid lipofuscinosis in man and mouse. Am J Hum Genet 70: 324-35.

- 4.** Goebell HH., Kominami E., Neuen-Jacob E., Wheeler RB. Morphological studies on CLN2. Eur J Paediatr Neurol. 2001; 5 Suppl A:203-7.

- 5.** Hartikainen JM., Ju W., Wisniewski KE., Moroziewicz DN., Kaczmarek AL., McLendon L., Zhong D., Suarez CT., Brown WT., Zhong N. (1999). Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis is due to splicing mutations in the CLN-2-gene. Mol Genet Metab 67: 162-168.

- 6.** Hofmann SL., Atashband A., Cho SK., Das AK., Gupta P., Lu JY. (2002). Neuronal ceroid lipofuscinoses caused by defects in soluble lysosomal enzymes (LLN1 and CLN2). Curr Mol Med 2(5):423-37.

- 7.** Järvelä I., Sainio M., Rantamäki T., Olkkonen VM., Carpen O., Peltonen L., Jalenko A. (1998). Biosynthesis and intracellular targeting of the CLN3-Protein defective in Batten disease. Hum Mol Genet 7: 85-90.

- 8.** Kohlschütter A., Gardiner RM., Goebel HH. (1993). Human forms of neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten disease): Consensus on diagnostic criteria, Hamburg 1992. *J Inher Metab Dis* 16: 241-244.
- 9.** Kohlschütter A., Goebel HH. (1997). Die neuronalen Ceroid-Lipofuscinosen. *Deutsches Ärzteblatt* 94; A-3183-3188 (Heft 47).
- 10.** Liu CG., Sleat DE., Donnelly RJ., Lobel P. (1998). Structural organization and sequence of CLN2, the defective gene in classical late infantile Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis. *Genomics* 50: 206-212.
- 11.** Mitchell WA., Wheeler RB., Sharp JD., Bate SL., Gardiner RM., Ranta US., Lonka L., Williams RE., Lehesjoki AE., Mode SE. (2001). Turkish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN7) may be allelic to CLN 8. *Europ J Paediatr Neurol* 5 Suppl A: 21-7.
- 12.** Munroe PB., Mitchinson HM., O'Rave AM., Anderson JW., Boustany RM., Lerner TJ., Taschner PEM., de Vos N., Breuning MH., Gardiner RM., Mole SE. (1997). Spectrum of Mutations in the Batten Disease Gene, CLN 3. *Am J Hum Genet* 61: 310-316.
- 13.** Ranta S., Zhang Y., Ross B., Lonka L., Takkunen E., Messer A., Sharp J., Wheeler R., Kusumi K., Mole S., Liu W., Soares MB., de Fatima Bonaldo M., Hierwasniemi A., de la Chapelle A., Gilliam TC., Lehesjoki AE. (1999). The neuronal ceroid lipofuscinosis in human EPMR and *mnd* mutant mice are associated with mutations in CLN 8. *Nat Genet* 23: 233-236.
- 14.** Savukoski M., Klockars T., Holmberg V., Santavuori P., Lander ES., Peltonen L (1998). CLN5, a novel gene encoding a putative transmembrane protein mutated in Finnish variant late infantile Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis. *Nat Genet* 19: 286-288.

15. Sleat DE., Donnelly RJ., Lackland H., Liu CG., Sohar I., Pullarkat RK., Lobel P. (1997). Association of Mutations in a lysosomal Protein with classical late-infantile Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis. *Science* 277: 1802-1806.

16. 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. (1999). Mutational analysis of the defective Protease in classic late infantile Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis, a neurodegenerative lysosomal storage disorder. *Am J Hum Genet* 64: 1511-1523.

17. Steinfeld R., Heim P., v.Gregory H., Meyer K., Gal A., Ullrich K., Goebel H., Kohlschütter A. (2002). Late infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: Quantitative description of the clinical course in patients with CLN2 mutations. *Am J Med Genet* 112: 347-354.

18. Steinfeld R., Steinke HB., Isbrndt D., Kohlschütter A., Gartner J. Mutations in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis disrupt transport of tripeptidyl-peptidase I to lysosomas. *Hum Mol Genet* 2004 Oct 15; 13(20):2483-91.

19. Stryer, Lubert (1994). *Biochemie*. 4. Auflage, Spektrum, Heidelberg Berlin Oxford.

20. Tsiakas K., Steinfeld R., Storch S., Ezaki J., Lukasc Z., Kominami E., Kohlschütter A., Ullrich K., Braulke T. Mutation of the glycosylated asparagine residue 286 in human CLN2 protein results in loss of enzymatic activity. *Glycobiology* 2004 Apr; 14(4):1C-5C.

21. Vesa J., Hellsten E., Verkruyse LA., Camp LA., Rapola J., SantavuorieP., Hofmann SL. et al (1995). Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis. *Nature* 376: 584-587.

- 22.** Wheeler RB., Sharp JD., Mitchell WA., Bate SL., Williams RE., Lake BD., Gardiner RM. (1999). A new locus for variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis-CLN7. *Mol Genet Metab* 66:337-8.
- 23.** Wisniewski KE., Kida E., Connell F., Zhong N. Neuronal ceroid lipofuscinosis: research update. *Neurol Sci* 2000; 21 (3 Suppl):S49-56.
- 24.** Wisniewski KE., Kida E., Golabek AA., Kaczmarek W., Connell F., Zhong N. (2001). Neuronal ceroid lipofuscinosis: Classification and diagnosis. *Adv Genet* 45: 1-34.
- 25.** Wisniewski KE., Zhong N., Philippart M. Pheno/genotypic correlations of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurology*. 2001 Aug 28;57(4):576-81.
- 26.** Zhong N., Moroziewicz DN., Ju W., Jurkiewicz A., Johnston A., Johnston C., Wisniewski KE., Brown WT. (2000). Heterogeneity of late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genet Med* 2(6):312-8.
- 27.** Zhong N., Wisniewski KE., Hartkainen J., Ju W., Moroziewicz DN., McLendon L., Sklower-Brooks SS., Brown WT (1998). Two common mutations in the CLN-2-gene underlie late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Clin Genet* 54(3):234-238

8. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. K. Ullrich (Kinderklinik der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf) danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie seine Gesprächsbereitschaft und seine Unterstützung.

Herrn Dr. med. R. Steinfeld möchte ich für seine hervorragende Betreuung und für seine persönliche Unterstützung danken.

Herrn Professor Dr. med. A. Kohlschütter möchte ich für seine Hilfestellung, seine kritischen Anregungen und seine Diskussionsbereitschaft danken.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Frau A. Knoke für die Hilfe bei der technischen Durchführung dieser Arbeit und die stets nette Zusammenarbeit bedanken.

Abschliessend möchte ich ein grosses Dankeschön an meine Eltern aussprechen, die mich wirklich immer in Allem unterstützt haben.

9. Lebenslauf:

<u>Persönliche Daten:</u>	Name:	Meyer
	Vorname:	Kerstin
	Geburtsdatum:	6. Dezember 1974
	Geburtsort:	Bremervörde
	Anschrift:	Alte Wöhr 7A, 22 307 Hamburg
	Telefon / mail:	040 / 542 524, kmeyer@uke.uni-hamburg.de
	Familienstand:	ledig
<u>Schulbildung:</u>	1991 – 1994	Fachgymnasium Wirtschaft in Zeven
	1994	Abitur
	1994 – 1995	MTA-Ausbildung bis Studienbeginn
<u>Studium:</u>	1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin
		9/1997 Physikum
		8/1998 Erstes Staatsexamen
		9/2000 Zweites Staatsexamen
		11/2001 Drittes Staatsexamen
<u>Ärztliche Tätigkeit</u>	Ab Januar 2002 als ÄIP im Zentrum für Bildgebende Diagnostik und Intervention;	
	Ab August 2003 als Assistentärztin im Zentrum für Bildgebende Diagnostik und Intervention	
<u>Dissertation:</u>	Mutationen im CLN-2-Gen bei Patienten mit spätinfantiler und atypischer neuronaler Ceroid-Lipofuszinose in Deutschland	
<u>Nebentätigkeiten:</u>	Seit 1998: Mitglied als Kollegiatin im Graduiertenkolleg für Molekulare Endokrinologie und Molekularen Stoffwechsel	
	Seit 1998: Mitarbeit als studentische Hilfskraft im Schattauer Verlag	
	1999-2000: Studentische Hilfskraft, Isotopenlabor, Kinderklinik der Uniklinik Eppendorf	

ERKLÄRUNG:

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 übernommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
