

Aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums
Hamburg-Eppendorf
Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

Dissertation

„Identifizierung eines neuen Polyneuropathiegens
im Rahmen einer genetischen Familienanalyse“

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg zur Erlangung des Dokortitels
vorgelegt von

Désirée Pao Ling Na Soehendra,
geboren am 14. November 1982

Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.01.2010

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Christian Hübner

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Gal

Prüfungsausschuss, 3. Gutachterin: Prof. Dr. Kerstin Kutsche

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis.....	5
2	Fragestellung.....	7
3	Einleitung.....	8
3.1	Periphere Neuropathien.....	9
3.1.1	Hereditäre periphere Neuropathien.....	10
3.1.2	Hereditäre sensible und autonome Neuropathien.....	11
4	Material und Methoden.....	16
4.1	DNA-Proben.....	17
4.1.1	Gewinnung von cDNA aus EDTA-Blut.....	17
4.1.2	Amplifikation genomischer DNA.....	19
4.2	PCR.....	19
4.2.1	PCR-Ansätze und Programm.....	20
4.3	Gelelektrophorese.....	21
4.4	SSCP.....	22
4.4.1	SSCP-Gel-Ansatz.....	22
4.4.2	SSCP-Probenansatz.....	23
4.4.3	Färben des SSCP-Geles.....	23
4.5	Sequenzierung.....	24
4.5.1	Aufbereitung der PCR-Produkte.....	25
4.5.2	Sequenzier-Programm.....	26
4.6	Restriktion mit Tsp509 I.....	26
5	Ergebnisse.....	27
5.1	Symptome und Befunde.....	28
5.2	Kopplungsanalyse.....	29
5.3	Gene der Kopplungsregion.....	31
5.4	Datenbankanalyse der Kandidatengene.....	32
5.5	Mutationssuche.....	34
5.5.1	Stop-Mutation.....	35

5.5.2 Genotypisierung der Familie F1.....	36
5.5.3 Weitere FAM134B Mutationen in einem HSAN-Patienten- kollektiv.....	37
5.6 Weitere Ergebnisse der Sequenzanalysen.....	40
6 Diskussion.....	41
7 Zusammenfassung.....	46
8 Anhang.....	48
9 Literaturverzeichnis.....	49

1 Abkürzungsverzeichnis

APS.....	Ammoniumpersulfat
bp.....	Basenpaare
cGMP.....	zyklisches Guanosinmonophosphat
CMT.....	Charcot-Marie-Tooth Krankheit
ddNTP.....	Didesoxynukleosidtriphosphate
dH ₂ O.....	destilliertes Wasser
DNA.....	Desoxyribonucleic acid
DNS.....	Desoxyribonukleinsäure
dNTP.....	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA.....	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FAM134B.....	Family with sequence similarity 134, member B
GTP.....	Guanosintriphosphat
IKBKAP.....	Inhibitor of kappa light polypeptide enhancer in B cells kinase complex associated protein
HMSN.....	Hereditäre motorisch und sensible Neuropathie
HSAN.....	Hereditäre sensible und autonome Neuropathie
HSN.....	Hereditäre sensible Neuropathie
HPLC.....	High Performance Liquid Chromatography
H ₂ O.....	Wasser
kb.....	Kilobasen
Lsg.....	Lösung
M.....	molar
ml.....	Milliliter
mM.....	Millimol
NCBI.....	National Center for Biotechnology Information
NGF.....	nerve growth factor
NTP.....	Nukleosidtriphosphat
ORF.....	Open Reading Frame

PAA.....	Polyacrylamid
PCR.....	Polymerase-chain-reaction
rpm.....	revolutions per minute; Umdrehung pro Minute
RTQ-PCR.....	Real-Time-Quantitative-PCR
SDR.....	kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen
SMA.....	Spinale Muskelatrophie
SPTLC 1.....	Serine Palmitoyltransferase, long chain base subunit 1
SSCP.....	Single Strand Conformation Polymorphism
TBE.....	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED.....	Tetramethylethyldiamin
TRKA.....	Tyrosinkinase A Rezeptor
U.....	Units
UV.....	ultraviolett
µl.....	Mikroliter

2 Fragestellung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war eine konsanguine arabische Familie (im Weiteren Familie F1 genannt), die sich mit Verdacht auf eine erbliche Neuropathie am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vorstellte. Die betroffenen vier Geschwister litten unter schweren Osteolysen und Nekrosen an Händen und Füßen, sowie einem seit dem Kindesalter bestehenden Sensibilitätsverlust der distalen Extremitäten. Die Motorik war nicht beeinträchtigt. Durchgeführte elektrophysiologische Untersuchungen bestätigten eine Schädigung der sensorischen Axone. Dieses Krankheitsbild läßt sich klinisch einer hereditären sensorisch-autonomen Neuropathie (HSAN) zuordnen.

Die bekannten HSAN Gen-Loci wurden für Familie F1 bereits in vorangegangenen Untersuchungen ausgeschlossen. Mittels SNP-Chip-Analyse konnte eine 44 Gene umfassende Kandidatenregion auf Chromosom 5 lokalisiert werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte systematische molekulargenetische Untersuchung dieser Region hatte zum Ziel, die krankheitsursächliche Mutation zu identifizieren.

3 Einleitung

Zum peripheren Nervensystem zählen alle außerhalb des Schädels oder der Wirbelsäule liegenden Anteile des Nervensystems: die motorischen, autonomen und sensiblen Nerven mit ihren Gliazellen, bindegewebigen Hüllen, sowie den versorgenden Blut- und Lymphgefäßen. Während sensible Nerven die Informationen peripherer Rezeptoren an das zentrale Nervensystem weiterleiten, laufen Impulse des Hirns an die Skelettmuskulatur über motorische Nerven in die Peripherie. Autonome Nerven sind teils sensibel, teils motorisch/sekretorisch und innervieren die glatte Muskulatur, Herzmuskulatur und Drüsen.

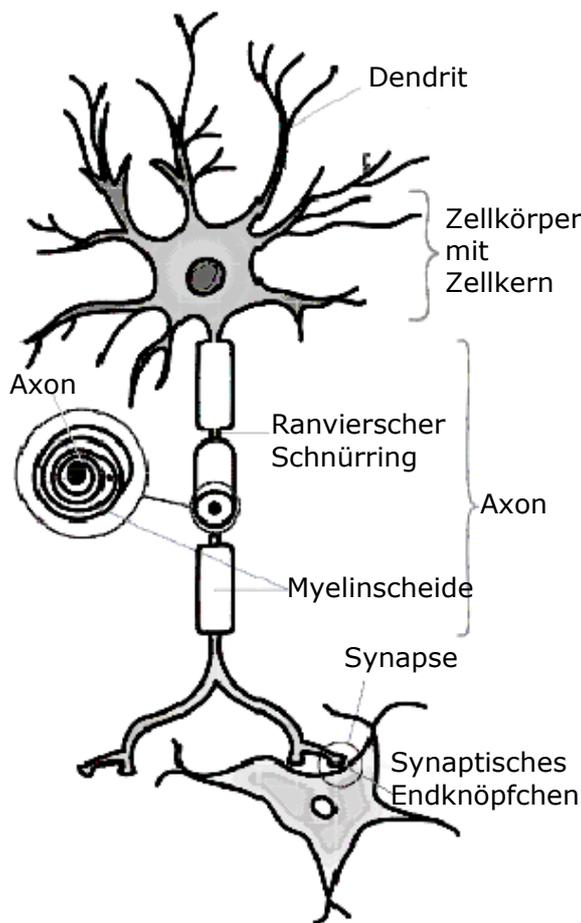


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer multipolaren Nervenzelle

Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, besteht ein peripheres Neuron aus einem Zellkörper (Soma) und Zellfortsätzen [1]. Es ist in der Lage, elektrische Erregungen zu generieren und gibt so Informationen weiter. Bei den Zellfortsätzen werden erregungsempfangende Dendriten von dem erregungweiterleitenden Axon unterschieden.

Das Axon ist umgeben von einer Myelinscheide, die von Gliazellen, sog. Schwannzellen, gebildet wird. Diese isolierende Hülle ermöglicht eine schnelle saltatorische Erregungsfortleitung. Saltatorisch meint hier, dass die Erregung von einem Ranvierschen Schnürring zum nächsten springt.

Am Ende des Axons findet sich eine terminale Aufzweigung mit knötchenförmigen Auftreibungen, den synaptischen Endknöpfchen. Sie bilden den proximalen Teil der Synapse, wo die Übertragung der Erregung auf das Erfolgsorgan, beziehungsweise eine nachgeschaltete Nervenzelle stattfindet. Die Rezeptoraxone sensibler Nerven sind eine Besonderheit; sie sind auf die Umwandlung von Umweltreizen in elektrische Erregung spezialisierte Nervenendigungen. Auf Grund von strukturellen Ähnlichkeiten werden diese sensiblen Fortsätze trotz ihrer dendritischen Funktion als Axone bezeichnet.

Ein peripherer Nerv ist ein Bündel der beschriebenen Zellfortsätze [2].

3.1 Periphere Neuropathien

Bei den peripheren Neuropathien kann man zwischen Schädigungen der Myelinscheiden und Schädigungen des Axons an sich unterscheiden. Außerdem klassifiziert man nach dem vorwiegend betroffenen System, also motorisch, sensibel oder autonom, sowie nach zeitlichem Verlauf (akut/subakut/chronisch) und einer symmetrischen oder asymmetrischen Verteilung der Symptome.

Unter einer Polyneuropathie versteht man eine Erkrankung mehrerer peripherer Nerven mit systemischer Ursache und meist distal betonter, symmetrisch ausgeprägter und langsam progredienter Symptomatik [3].

Ca. 2% der Deutschen leiden an einer peripheren Polyneuropathie, die Inzidenz nimmt mit steigendem Alter zu. Häufigste Ursache ist der Diabetes mellitus mit 34% [4].

Tabelle 1 gibt einen Überblick über Ursachen peripherer Neuropathien.

Metabolisch	Diabetes mellitus, nutritiv-toxisch
Infektiös	Borreliose, HIV
Entzündlich / immunologisch	Vaskulitiden, monoklonale Gammopathien, akute und chronische Polyradikulitis, (Guillain-Barre-Syndrom bzw. CIDP)
Genetisch	Hereditäre motorische und sensible Neuropathien (HMNS) Hereditäre sensorische und autonome Neuropathien (HSAN) Hereditäre distal motorische Neuropathie (distale HMN)

Tabelle 1: Ursachen peripherer Neuropathien - eine Auswahl

Häufige Symptome der Neuropathie sind Sensibilitätsstörungen wie Kribbeln, Stechen, Temperaturmissempfindungen und fehlendes Schmerzempfinden. Bei Beteiligung des motorischen Systems kommt es zu Muskelatrophie, Schwäche und Krämpfen. Eine Erkrankung des autonomen Nervensystems äußert sich zum Beispiel durch Pupillenstörungen, Hypo- oder Hyperhidrosis oder trophische Störungen, die zu Ulzerationen und Osteoarthropathien führen können. Verdauungsstörungen und Blasenentleerungsstörungen können ebenfalls auftreten.

3.1.1 Hereditäre periphere Neuropathien

Die Inzidenz hereditärer peripherer Neuropathien liegt in Deutschland bei ca. 1:2.500.

Die häufigste Form ist die hereditäre motorisch und sensible Neuropathie (HSMN), auch bekannt als Charcot-Marie-Tooth Syndrom (CMT). Kennzeichnend für CMT sind motorische Defizite bei neurogener Muskelatrophie mit verminderter Nervenleitgeschwindigkeit; die Sensibilität ist nur geringfügig gestört.

Unter hereditären sensiblen und autonomen Neuropathien (HSAN) fasst man erbliche Neuropathien mit vorwiegend sensibler Symptomatik und einem variablen Grad an motorischer und autonomer Beeinträchtigung zusammen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Unterform der HSAN.

3.1.2 Hereditäre sensible und autonome Neuropathien

Bei den HSAN handelt es sich um eine klinisch und genetisch sehr heterogene Krankheitsgruppe. Bisher wurden die HSAN nach Dyck klinisch in fünf Typen unterteilt, basierend auf Vererbungsmodus, Erkrankungsalter und Symptomen [5]. Das zunehmende Wissen um zu Grunde liegende genetische Defekte führt derzeit zu einer fortschreitenden Subtypisierung. Bis dato wurden sechs krankheitsursächliche Gene und

acht Loci beschrieben. Im Folgenden sollen die fünf Haupttypen sowie vier Subtypen (wie in Verhoeven et al. 2006 [6]) mit Klinik und, soweit bekannt, genetischem Defekt und molekularer Pathogenese vorgestellt werden.

HSAN I Der Erbgang der HSAN I ist autosomal dominant. Die Betroffenen erkranken meist in der zweiten oder dritten Dekade. Ein Sensibilitätsverlust der distalen Extremitäten wird begleitet von stechenden Schmerzen, Taubheit im Bereich der Extremitäten und distaler Muskelatrophie. Die autonome Beteiligung ist minimal. Histologisch ergibt sich der Befund einer axonalen motorischen und sensiblen Neuropathie. In einigen Familien wurde eine Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit beschrieben, was an eine begleitende Demyelinisierung denken lässt [7]. Das betroffene Gen *SPTLC1* liegt auf Chromosom 9q22.1-q22.3. Bisher konnten vier *SPTLC1*-Mutationen in 20 Familien nachgewiesen werden [8]. *SPTLC1* kodiert für ein Enzym, das mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist und den ersten Schritt der *de novo* Sphingolipidsynthese katalysiert [9]. Sphingolipide sind wichtig für die Struktur von Membranen und somit auch für die Funktion von Membranproteinen, die an Signaltransduktion und Membranumsatz beteiligt sind. Nakamura et al. konnten für zytotoxische T-Lymphozyten der Maus nachweisen, dass eine abnorme intrazelluläre Konzentration von Sphingolipiden, sei es eine stark erhöhte oder erniedrigte, die Apoptose induziert [10]. Transgene *SPTLC1*-Mäuse zeigen eine verminderte *SPTLC1* Aktivität und entwickeln zunächst milde motorische und sensible Störungen. Später kommt es zu Strukturveränderungen der Myelinscheiden und große myelinisierte Axone der vorderen Rückenmarkswurzel gehen zu Grunde [11].

HSAN IB klassifiziert eine Untergruppe der HSAN I mit hoher Inzidenz von paroxysmalem Husten und gastroesophagealem Reflux [12].

CMT 2B wird wie die HSAN I autosomal dominant vererbt und wurde auf Grund der gemischten sensiblen wie motorischen Beteiligung auch zum Formenkreis der CMT gezählt. Der Erkrankungsbeginn liegt zwischen der zweiten und dritten Dekade und tritt

mit sensiblen und zum Teil auch motorischen Ausfällen der distalen Extremitäten in Erscheinung. Als Komplikationen kann es zu Ulzera und Amputationen kommen. Das *RAB7* Gen wurde von Verhoeven et al. als krankheitsursächlich identifiziert [13].

Es liegt auf Chromosom 3q13-q22 und kodiert für eine kleine ubiquitär exprimierte GTPase der späten Endosomen. Sie reguliert eine Reihe von Membranfusions- und Endozytoseprozessen, zum Beispiel dem endosomalen Transport von Proteinen zu Lysosomen und den Glykosphingolipid-Transport von der Plasmamembran zum Golgiapparat. *RAB7* reguliert den endosomalen Transport des NTRK1 (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1) nach dessen Internalisierung und könnte so die Signalkaskade über diesen Wachstumsfaktor-Rezeptor beeinflussen [14]. Mutationen des *NTRK1* Gens rufen die HSAN IV hervor.

HSAN II (Morvan Syndrom, Akrodystrophische Neuropathie) wird autosomal-rezessiv vererbt. Die Erkrankung beginnt in der frühen Kindheit mit einem handschuh- bzw. sockenförmigen Sensibilitätsverlust. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Beeinträchtigung der Schmerz- und Temperaturwahrnehmung. Ulzera der Finger und Zehen, spontane Amputationen und Hyporeflexie sind typische Merkmale der Erkrankung. Eine Muskelschwäche besteht in der Regel nicht. Im Gegensatz zur HSAN III und IV ist die mentale Entwicklung nicht eingeschränkt und das autonome Nervensystem allenfalls minimal beeinträchtigt. Nervenbiopsien zeigten vor allem einen Verlust an myelinisierten Fasern. Der Verlust sensibler Neurone bestätigt sich auch elektromyographisch [7].

Ein krankheitsursächliches Gen, *HSN2*, bestehend aus einem Exon, wurde im Exon 8 der *WNK1* (Lysine deficient protein kinase 1) auf Chromosom 12p13.33 gefunden [15]. Bisher sind zehn Mutationen bekannt, die meist zu einer Trunkation des Proteins führen. Die Funktion von *HSN2* ist bis dato ungeklärt.

HSAN mit spastischer Paraplegie

Hierbei handelt es sich um eine seltene, autosomal-rezessive Unterform, die neben der spastischen Paraplegie durch ulzerative Mutilationen gekennzeichnet ist. Das zugehörige Gen wird in der Region 5p15.31-p14.1 vermutet [16].

HSAN IIB wird ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt. Typisch sind der kongenitale Beginn sowie das fehlende Fortschreiten der Erkrankung. Außerdem werden eine schwere Hypotonie und ein Sensibilitätsverlust des ganzen Körpers beobachtet. Ein Krankheitsgen konnte noch nicht identifiziert werden [17].

HSAN III (Riley Day Syndrom, Familiäre Dysautonomie) beginnt kongenital und geht mit schweren Störungen des sensiblen wie autonomen Nervensystems einher. Diese äußern sich in einer verminderten Schmerz- und Temperaturwahrnehmung, gastrointestinalen Dysfunktionen, rezidivierenden Pneumonien und kardiovaskulärer Instabilität. Milde motorische Symptome kommen ebenfalls vor.

Die Patienten weisen eine verminderte Anzahl von Neuronen in Hinterwurzel und sympathischen Ganglien auf. Ein Hauptkriterium für die Diagnose ist die Ashkenazi-jüdische Abstammung. HSAN III wird autosomal-rezessiv vererbt.

Das Gen liegt auf Chromosom 9q31 und kodiert für das IKBKAP (Inhibitor of kappa light polypeptide enhancer in B-cells kinase complex associated protein) [18]. IKAP ist Teil des Elongationskomplexes und soll an dem NFκB und dem c-Jun N-terminal (JNK) Kinase Signalweg beteiligt sein. Auch eine Funktion im Rahmen der neuronalen Exozytose wird diskutiert [19].

Die Mutation führt bei den meisten dieser Patienten zu einem veränderten Spleißverhalten mit teilweiseem Verlust des Exons 20. Interessanterweise wird auch von homozygot Betroffenen noch Wildtyp-*IKBKAP* exprimiert. Das Verhältnis von WT:MU ist gewebe-spezifisch; die Konzentration von Wildtyp-*IKBAP* ist am niedrigsten im Nervensystem [20]. Für die Erkrankung besteht Hoffnung auf neue therapeutische Ansätze: Das Spleißen in diesem Gen wird von externen Faktoren beeinflusst und es wurden schon einige Wirkstoffe gefunden, die für eine Therapie infrage kämen. Tocotrienole und Epigallocatechin-Gallate erhöhen die Transkription des *IKBKAP* Gens; Kinetin, was schon bei der Behandlung von SMA erste Erfolge gezeigt hat, erhöht die Expression des Wildtyp-Transkripts [21].

HSAN IV (Congenital insensitivity to pain with anhidrosis, CIPA) wird autosomal-rezessiv vererbt und zeigt bereits kurz nach Geburt erste Symptome. Bedingt durch die namensgebende Schmerzunempfindlichkeit kommt es zu Verletzungen der Hände und Füße mit teils selbstzerstörerischem Verhalten. Die verminderte Schweißproduktion führt zu einem auffälligen Phänotyp mit Fieberperioden, Lichifikationen der Haut, Hypotrichinose und dystrophischen Nägeln. Betroffene Kinder sind oft milde mental retardiert. Muskelkraft und Reflexe sind in der Regel erhalten. Histologisch fallen der Verlust von unmyelinisierten und die Reduktion von myelinisierten peripheren Nervenfasern auf [22].

Das Krankheitsgen *NTRK1* wurde auf Chromosom 1q21-q22 kartiert. *NTRK1* (oder *TRKA*) kodiert für den Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors (NGF) β [23].

Der Rezeptor gehört zur Familie der Tyrosinkinase und stimuliert axonales Wachstum. Er wird bereits embryonal während der Migration der Neuralleisten-Zellen exprimiert und reguliert dort Überleben und Entwicklung der sensiblen und sympathischen Neurone [24]. Loss-of-function Mutationen führen zum klinischen Erscheinungsbild einer HSAN IV, gain-of-function Mutationen dagegen wurden mit neoplastischem Wachstum assoziiert.

HSAN V wird durch Mutationen im *NGFB* Gen auf Chromosom 1p13.2-p11.2 verursacht und führt zu einem Verlust der Schmerz Wahrnehmung, die mentale Entwicklung ist jedoch im Gegensatz zu Patienten mit HSAN IV unauffällig [25].

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der besprochenen Krankheitsbilder.

Krankheit	Erbgang	Phänotyp	Lokus	Gen
HSAN I/HSN I	AD	Beginn im Erwachsenenalter Sensibilitätsverlust in dist.unteren Extr. stechende Schmerzen, Taubheit distale Muskelatrophie minimale autonome Beteiligung	9q22.2	<i>SPTLC1</i>
HSAN IB	AD	Beginn im Erwachsenenalter distaler Sensibilitätsverlust paroxysmaler Husten gastro-oesophagealer Reflux	3p22-p24	?
CMT 2B	AD	frühes Erwachsenenalter schwerer Sensibilitätsverlust Amputationen motorische Symptome	3q13-q22	<i>RAB7</i>
HSAN II	AR	Beginn in der Kindheit schwerer Sensibilitätsverlust der unteren u. oberen Extr. häufig Amputationen	12p13.3	<i>HSN2</i>
HSAN II mit spastischer Paraplegie	AR	sensorische Neuropathie spastische Paraplegie	5p15.31- p14.1	?
HSAN IIB	AR	kongenital, nicht-progressiv Sensibilitätsverlust des ges. Körpers schwere Hypotonie	?	?
HSAN III/ Riley DaySyndrom	AR	kongenital schwere autonome Symptome Ashkenazi-jüdischer Herkunft	9q31	<i>IKBAP</i>
HSAN IV/CIPA	AR	kongenital Analgesie und Thermanästhesie Anhidrose oft mental retardiert	1q21-q22	<i>NTRK1</i>
HSAN V	AR	Beginn in Kindheit Analgesie andere neurol.Systeme intakt	1p13.1	<i>NGFB</i>

Tabelle 2: HSANs: Eine Übersicht basierend auf Verhoeven et al. [6]

? = unbekannt, AD = autosomal-dominant, AR = autosomal-rezessiv

Wie die folgende Patientenvorstellung zeigt, lässt sich die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Familie am ehesten der HSAN II zuordnen. Eine Mutation des bekannten *HSN2* Gens konnte bereits ausgeschlossen werden, es handelt sich also um eine neue Form der HSAN II.

4 Material und Methoden

In Tabelle 3 finden sich in alphabetischer Reihenfolge die verwendeten Substanzen nebst der Hersteller.

Substanz	Hersteller
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
APS (10%ig)	Serva Feinbiochemica GmbH & CoKG
Big Dye	Applied Biosystems
Borsäure	MERCK, E. Merck
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Buffer 1	New England Biolabs, Ipswich, USA
DNTP (10 mM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
DTT (0,1 mM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
EDTA 10 mM	MERCK, E. Merck
EDTA 2 mM (pH 8,0)	MERCK, E. Merck
Enhancer Lösung (PCRx)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Essigsäure (100%ig)	MERCK, E. Merck
Ethanol (100%ig, unvergällt)	MERCK, E. Merck
Ethidiumbromid	MERCK, E. Merck
ExoSAP-IT Enzym von USB	USB
First Strand Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Formaldehyd (36%ig)	Fluka Chemika, Fluka Chemie AG
Formamid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Genomi Phi Kit	Amersham Biosciences Piscataway, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Glyzerin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
HPLC-H ₂ O	MERCK, E. Merck
Magnesium Sulfat (50 mM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumacetat (3 M, pH 5,2)	MERCK, E. Merck
Natriumcarbonat	J. T. Baker
PAA (30%ig)	Carl Roth GmbH&Co
PAXgene™ Blood RNA Kit	PreAnalytiX-Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PCR Puffer (10x mit MgCl ₂ 15 mM)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PCRx Puffer (10x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Platinum® Taq Polymerase (5 U/μl)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Random Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Salpetersäure (65%ig)	MERCK, E. Merck
Silbernitrat	MERCK, E. Merck
Standard 100 bp	Invitrogen, Carlsbad, USA
SYBR® Green JumpStart™ Taq Ready Mix™	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
TrisBase (89 mM)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<i>Tsp509 I</i> Enzym	New England Biolabs, Ipswich, USA
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Tabelle 3: Materialien

4.1 DNA-Proben

Die DNA-Proben der betroffenen Familie mit klinischen Symptomen einer HSAN, ein 45 Proben umfassendes HSAN-Patientenkollektiv und 200 Kontrollen standen zur Verfügung.

4.1.1 Gewinnung von cDNA aus EDTA-Blut

Für die quantitative PCR (RT-PCR), die unter 4.2.3 erläutert wird, wurde cDNA aus Blutproben von sechs gesunden Probanden und eine zeitgleich erhaltene Blutprobe von der Indexpatientin gewonnen. Hierzu wurde zunächst die RNA mit dem PAXgene™ Blood RNA Kit isoliert:

1. Vollblut wurde in RNA-Röhrchen für mind. 2 h bei Raumtemperatur lysiert
2. Danach wurde 10 min zentrifugiert (4000 rpm)
3. Der Überstand wurde abgossen, die Röhrchen abgetropft, 5 ml RNase-freies Wasser wurde zugegeben, das Pellet wurde suspendiert
4. Dann wurde 10 min zentrifugiert (4000 rpm)
5. Das Pellet wurde in 360 µl Puffer BR 1 suspendiert
6. Die Suspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 300 µl Puffer BR2 und 40 µl Proteinase K hinzugefügt
7. Danach wurde 10 min bei 55° C auf einem Schüttelinkubator inkubiert (max. Geschwindigkeit)
8. 3 min lang wurde zentrifugiert (14000 rpm)
9. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 350 µl Ethanol (100%) zugefügt, danach wurde gevortext
10. Die Säule wurde auf ein Auffangtube gestellt und 700 µl des RNA-Ethanol-Gemisches pipettiert
11. 1 min lang wurde zentrifugiert (14000 rpm)

12. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule auf ein neues Auffangtube gestellt, die restliche Lösung auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert, s. 11.
13. Ein neues Auffangtube wurde verwendet und 700 µl Puffer BR 3 auf die Säule gegeben
14. 1 min wurde zentrifugiert (14000 rpm), der Durchfluss verworfen und 500 µl Puffer BR 4 auf die Säule gegeben
15. 1 min wurde zentrifugiert (14000 rpm), anschließend wurde ein neues Auffangtube verwendet
16. 500 µl Puffer BR 4 wurde auf die Säule gegeben und für 3 min zentrifugiert (14000 rpm)
17. Die Säule wurde auf ein Reaktionsgefäß gesetzt, 1 min zentrifugiert (14000 rpm) und auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt
18. 40 µl Puffer BR 5 wurde zur Elution auf die Membran gegeben, dann wurde 2 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min zentrifugiert (14000 rpm)
19. 18. und 19. wurde wiederholt
20. 80 µl RNA-Lösung wurde bei 65° C denaturiert und sofort auf Eis gestellt
Die Lagerung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers

Mittels einer ReversenTranskription wurde im zweiten Schritt aus der RNA nach dem folgenden Verfahren die cDNA hergestellt:

1. 10 µl RNA, 1 µl Random Primer (Hexamere) und 1 µl dNTP wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben
2. Das wurde 5 min bei 65° C inkubiert, dann auf Eis gestellt
3. 4 µl 5x First Strand Puffer, 2 µl DTT (0,1M) und 1µl Rnase Inhibitor wurden hinzugefügt
4. Das Gemisch wurde 10 min bei 25° C dann 2 min bei 42° C inkubiert
5. 1 µl Superscript RT wurde hinzugefügt
6. Es wurde erneut inkubiert, 50 min bei 42° C und 15 min bei 70° C
7. Nach der Konzentrationsmessung wurde die cDNA bei -20° C gelagert

Die gewonne cDNA konnte dann für die quantitative-PCR verwendet werden.

4.1.2 Amplifikation genomischer DNA

Die Proben der Geschwister der Indexpatientin aus Familie F2 enthielten zu geringe Mengen an DNA für den direkten Einsatz in einer PCR. Vor der weiteren Analyse wurde deshalb die gesamte genomische DNA mit dem Genomi Phi Kit von Amersham Biosciences nach folgendem Verfahren amplifiziert:

1. 1 µl genomische DNA wurde in 9 µl Sample-Puffer bei 95° C 3 min lang denaturiert, danach auf Eis gestellt
2. 1 µl Enzym-Mix wurde in 9 µl Reaktionspuffer gegeben (auf Eis)
3. Ansatz 1. und 2. wurden zusammen in ein Reaktionsgefäß pipettiert und in einem Thermocycler für 16 h bei 30° C inkubiert
4. Die Reaktion wurde mittels Hitze-Inaktivierung bei 65° C gestoppt
5. Die Konzentration wurde photometrisch gemessen, anschließend wurde auf 200 ng DNA/µl verdünnt
6. Die Lagerung erfolgte bei 4° C

4.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), entwickelt von Mullis et al. 1987, ist ein Verfahren zur in-vitro Vervielfältigung von DNA. Die PCR verläuft in einem Zyklus von drei Schritten:

1. Denaturieren: Die DNA (template) wird in ihre beiden Einzelstränge getrennt und kann so als Vorlage (Matrize) dienen.
2. Annealing: Die gewünschten DNA-Abschnitt flankierende Oligonucleotidsequenzen (Primer) binden gegenläufig an die Einzelstränge.
3. Elongation: Hitzestabile Polymerasen verlängern die Primer entlang der Matrizen und synthetisieren so die gewünschte DNA-Sequenz. Als Bausteine werden hierfür 5' Nucleosid-Trisphosphate (dNTPs) hinzugefügt.

Da sich mit jedem Zyklus die Anzahl der Matrizen verdoppelt, nimmt die Menge des gewünschten DNA-Abschnitts exponentiell zu. Die einzelnen Reaktionsschritte erfordern spezifische Temperaturen und Zeitintervalle, die seit der Einführung der hitzestabilen Polymerasen automatisch in einem Thermocycler erzeugt werden können. Die entstehenden PCR-Produkte bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation von Exons und der flankierenden Intronabschnitte der Gene eingesetzt, die aus der Kopplungsanalyse der Familie F1 und nachfolgender Literaturrecherche als Kandidaten für krankheitsursächliche Mutationen hervorgegangen waren.

4.2.1 PCR-Ansätze und Programm

Verschiedene PCR-Ansätze wurden erprobt. Als optimal zur Amplifikation des *FAM134B* Gens haben sich die in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellten Ansätze herausgestellt.

PCR Ansatz 1 <i>FAM134B</i> Exon 1 50 µl
1 µl template DNA
1 µl Primer F
1 µl Primer R
1 µl dNTP
5 µl 10x PCRx Puffer
5 µl PCRx Enhancer Lösung
1,5 µl Magnesium Sulfat (50 mM)
34,1 µl dH ₂ O
0,4 µl Platinum® Taq DNA Polymerase (5 U/µl)

Tabelle 4: PCR Ansatz für *FAM134B* Exon 1

PCR Ansatz 2 <i>FAM134B</i> Exon 2-9 50 µl
1 µl template DNA
1 µl Primer F
1 µl Primer R
1 µl dNTP
5 µl 10x Puffer
34,1 µl dH ₂ O
0,4 µl <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)

Tabelle 5: PCR Ansatz für *FAM134B* Exon 2-9

Die Sequenzen der für Screening und SSCP's verwendeten Primer sind im Anhang in der Tabelle 11 gelistet. Tabelle 6 führt die verwendeten PCR-Programme auf.

PCR-Programm Exon 1			PCR-Programm Exon 2-9		
Temp./° C	Zeit/Min.:Sec.		Temp./° C	Zeit/Min.:Sec.	
95	2:00		94	5:00	
95	0:50		94	0:10	
61	0:40	4 Zyklen	61	0:10	3 Zyklen
68	1:30		72	0:45	
95	0:50		94	0:10	
58	0:40	4 Zyklen	58	0:10	3 Zyklen
68	1:30		72	0:45	
95	0:50		94	0:10	
55	0:40	30 Zyklen	55	0:10	30 Zyklen
68	1:30		72	0:45	
68	10:00		72	10:00	
10	∞		10	∞	

Tabelle 6: PCR Programme für *FAM134B*

4.3 Gelelektrophorese

Unter Anlegen einer Spannung wandern unterschiedlich große DNA-Fragmente in einem Agarose Gel unterschiedlich weit. Ein Standard ermöglicht die Größenzuordnung des PCR-Produkts.

Zur Herstellung des Gels wurde Agarose in 1xTBE unter Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (2,5 µl/50 ml) versetzt. Die Taschen des Gels wurden mit 5 µl PCR-Produkt plus 1 µl 6x Ladepuffer beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt in 1xTBE-Laufpuffer. Durch Ethidiumbromid wurden die entstehenden PCR-Produkte durch Interkalation in die DNA unter UV-Licht sichtbar, eine Negativkontrolle ohne Zusatz von DNA zeigte eine mögliche Verunreinigung des Ansatzes an.

4.4 SSCP

Die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) untersucht das Laufverhalten von DNA-Einzelstrangfragmenten im gelelektrophoretischen Feld. Da das Laufverhalten abhängig von der Konformation ist, die wiederum von der Basenabfolge bestimmt wird; kann schon eine Punktmutation zu einem veränderten Laufverhalten eines Fragmentes führen. Die SSCP wurde zur Identifizierung von Mutationen im *FAM134B* Gen von HSAN-Familien eingesetzt. Dazu wurden maximal 500 bp lange Exon-umfassende PCR-Produkte des Gens denaturiert und unter Anlegen einer Spannung in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die in der SSCP auffälligen Proben wurden später zur genaueren Analyse sequenziert.

4.4.1 SSCP-Gel-Ansatz

Das SSCP-Screening der Familie F1 und der 45 Patienten erfolgte im ersten Durchgang auf 8%igen SSCP-Gelen, in einem zweiten Durchgang wurden die Proben auf ein glycerinhaltiges SSCP-Gel aufgetragen, um so die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Die Ansätze entsprachen der Tabelle 7.

SSCP-Gel	Glycerinhaltiges SSCP-Gel
12.5 ml 10xTBE	12.5 ml 10xTBE
1,0 ml APS (10%ig)	1,0 ml APS (10%ig)
24,0 µl TEMED	24,0 µl TEMED
33,0 ml PAA (30%ig)	33,0 ml PAA (30%ig)
80 ml H ₂ O	15 ml Glycerin
	65 ml H ₂ O

Tabelle 7: SSCP-Gel-Ansätze

Der Reaktionsansatz wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Plastikschienen voneinander getrennt waren. Das Gel polymerisierte in ein bis zwei Stunden aus. Danach wurde es in eine SSCP-Gel-Elektrophoresekammer eingespannt, die Proben aufgetragen und eine Spannung angelegt. Als Laufpuffer diente 1xTBE. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur.

4.4.2 SSCP-Probenansatz

Zur Fertigstellung des Probenansatzes wurden 5 µl PCR-Produkt mit 5 µl Formamid-Ladepuffer versetzt. Der Ladepuffer setzte sich wie folgt zusammen: 95% Formamid, 4,5% EDTA (10 mM), 0,25% Bromphenol-Blau und 0,25% Xylencyanol. Der Formamidpuffer verhindert die Renaturierung der DNA, so dass man Einzelstrang-DNA erhält. Das Gemisch wurde 10 Minuten lang bei 95° C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Der fertige Ansatz wurde in die Taschen des SSCP-Geles pipettiert und bei 5 Watt aufgetrennt. Die Gelelektrophoresen liefen über Nacht. Als Laufpuffer diente 1xTBE.

4.4.3 Färben des SSCP-Geles

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele nach folgendem Protokoll gefärbt:

1. Das Gel wurde in eine Glaswanne mit 10%igen Ethanol überführt und 5 min in einem Schüttler inkubiert
2. Das Ethanol wurde abgesaugt
3. Das Gel wurde für 3 min in 1%iger Salpetersäure inkubiert
4. Die Salpetersäure wurde abgesaugt, es wurde zweimal mit Aqua bidest. gespült (jeweils 1 min) und abgesaugt

5. Danach wurde das Gel 20 min in Silbernitrat (0,1%ig) inkubiert, anschließend wurde abgesaugt
6. Zweimal wurde mit Aqua bidest. gespült (jeweils 1 min) und abgesaugt
7. Danach erfolgte die Entwicklung mittels eines Reducers (26,9 g Natriumcarbonat, 540 µl Formaldehyd, 36%ig auf 1 l dH₂O) nach Sicht, die Lösung wurde einmal gewechselt
8. Die Reaktion wurde mit 10%iger Essigsäure gestoppt (2 min)
9. Zum Abschluss wurde mit Aqua bidest. 5 min gespült
10. Das Gel wurde in eine Folie überführt und verschweißt

Die gefärbten Gele wurden fotografiert, das Bandenmuster der Proben verglichen und Fragmente mit abweichenden Laufmustern sequenziert.

4.5 Sequenzierung

PCR-Produkte mit auffälligem Bandenmuster wurden zur Identifizierung möglicher Mutationen unter Verwendung der Didesoxymethode nach Sanger sequenziert.

Hierfür wird das PCR-Produkt aufgereinigt und eine Sequenzierungs-PCR durchgeführt. Das Besondere an einer Sequenzierungs-PCR ist, dass zusätzlich zu einem Primer, DNA-Polymerase und Nucleotiden auch Fluoreszenz-markierte Didesoxynucleotide (ddNTPs) hinzugefügt werden. Diesen fehlt die freie 3'OH-Gruppe, so dass ihr Einbau zum Kettenabbruch führt. Das verwendete Big Dye von ABI enthält alle vier Basen als ddNTP mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Im Laufe der Reaktion wird statistisch an jeder Stelle der Basenabfolge ein ddNTP eingebaut, so dass unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen, die auf das jeweilige ddNTP enden. Diese Fragmente werden mittels Elektrophorese der Länge nach aufgetrennt und die ddNTPs am Fragment-Ende durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Ihre Farbsignale werden von einem Detektor erkannt und ihrer Abfolge entsprechend als sog. Chromatogramm dargestellt.

Am Chromatogramm kann man schließlich die Basenabfolge des sequenzierten DNA-Stranges ablesen. Die folgende Abbildung 2 zeigt ein Beispiel eines fertigen Chromatogramms.

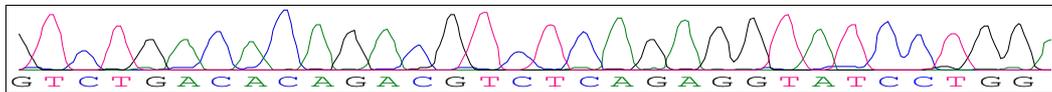


Abbildung 2: Chromatogramm *FAM134B* (Ausschnitt): Exon 8, Wildtyp

4.5.1 Aufbereitung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung und Sequenzierung des PCR-Produktes erfolgte mit ExoSAP-IT von USB nach folgendem Protokoll:

1. 5 µl PCR-Produkt, 0,2 µl ExoSAP-IT Enzym und 1,8 µl wurden in ein PCR-Tube pipettiert
2. Der Ansatz wurde 15 min bei 37° C, dann 15 min bei 80° C inkubiert
3. 2 µl Big Dye, 2 µl HPCL-H₂O und 1 µl Primer des zu sequenzierenden Exons wurden hinzugefügt

Dann wurde eine Sequenzier-PCR mit dem in Tabelle 8 dargestelltem Programm durchgeführt.

Sequenzier-PCR-Programm		
Temp./° C	Zeit/Min.:Sec.	
96	1:00	
96	0:20	
50	0:05	25 Zyklen
60	4:00	
4	∞	

Tabelle 8: PCR-Programm zur Sequenzierung

Zur Fällung der Sequenzier-PCR-Produkte wurde zu jedem Reaktionsgefäß 30 µl HPLC-H₂O, 5 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 100 µl Ethanol (100%ig, unvergällt) hinzugefügt.

Der Ansatz wurde in 1,5 ml Tubes überführt und 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Hierbei bildete sich ein DNA-Pellet am Boden des Tubes. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde wiederum abpipettiert, erneut für 10 min zentrifugiert und abschließend das Pellet bei 37° C getrocknet.

4.5.2 Sequenzier-Programm

Als Sequenzierprogramm wurde „Abiprism 377XL Collection“ von Applied Biosystems genutzt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „Abiprism Sequencing Analysis“, ebenfalls von Applied Biosystems.

4.6 Restriktion mit *Tsp509 I*

Zur Untersuchung einer fraglichen Kopplung im Gen *LOC646012* sollte geklärt werden, welche Variante eines T/C-Polymorphismus die Familienmitglieder der arabischen Familie trugen. Zusätzlich zu einer entsprechenden Sequenzierung gab es hier die Möglichkeit, Restriktionsendonukleasen zu verwenden. Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die an durch eine bestimmte Sequenz definierten Stellen schneiden. Der zu untersuchende Polymorphismus fiel in die Erkennungssequenz des *Tsp509 I* Restriktionsenzym: 5'/ATT 3'. Nach Amplifikation eines diese Schnittstelle umfassenden PCR-Produkts und Inkubation des Restriktionsansatzes (15 µl DNA mit 1 µl *Tsp509 I* Enzym, 2 µl Buffer 1 und 2 µl HPLC-H₂O) für drei Stunden bei 65° C konnten die entstandenen Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt und das Bandenmuster interpretiert werden.

5 Ergebnisse

Die zu untersuchende Familie, hier Familie F1, mit klinischen Zeichen einer HSAN II stammt aus Saudi-Arabien. Die 35-jährige Betroffene kam initial zur chirurgischen Versorgung einer Osteomyelitis des linken Unterschenkels nach Deutschland und wurde im Verlauf mit Verdacht auf Lepra am Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg vorstellig. Nachdem eine Lepra ausgeschlossen werden konnte, wurde sie zur Abklärung einer erblichen Neuropathie an unser Institut überwiesen.

Anamnestisch wurde der in Abbildung 3 dargestellte Stammbaum erhoben.

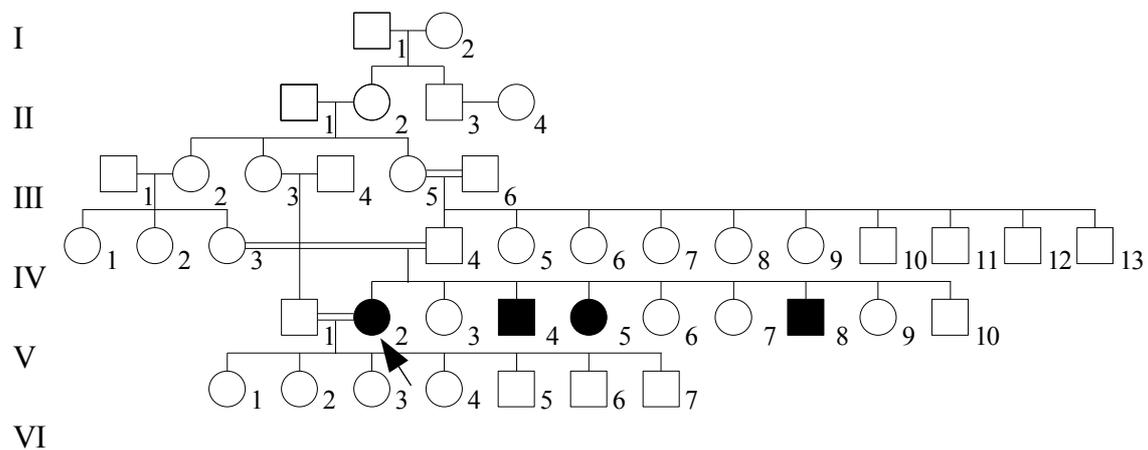


Abbildung 3: Stammbaum der Familie F1

Aus der konsanguinen Verbindung ihrer Eltern gingen neun Kinder hervor, von denen vier Symptome einer peripheren Polyneuropathie zeigen. Die Kinder der Indexpatientin im Alter von 18 Monaten bis 13 Jahren stammen ebenfalls aus einer konsanguinen Verbindung, sind jedoch bisher nicht erkrankt.

5.1 Symptome und Befunde

Die Index-Patientin weist schwere Mutilationen der Hände und Füße auf. Ihre Hände sind beidseitig von Nekrosen betroffen, die Fingergelenke sind aufgetrieben. Die Füße sind stark destruktiv verändert, insbesondere die Fußwurzelknochen und das obere Sprunggelenk. Am Unterschenkel links bestand zum Zeitpunkt der genetischen Beratung eine akute Osteomyelitis, die postoperativ mit einem Fixateur Externe versorgt worden war. Abbildungen 4-6 zeigen Aufnahmen der Indexpatientin



Abbildung 4



Abbildung 5



Abbildung 6

Abbildung 4 zeigt die Akrosteolysen und aufgetriebenen Fingergelenke der Hände, auch die Füße sind von Akrosteolysen betroffen, wie Abbildung 5 verdeutlicht. Das Röntgenbild in Abbildung 6 offenbart die Osteolysen des rechten Fußes.

Anamnestisch zeigten sich bei der Ratsuchenden erste Symptome der Erkrankung mit dem 5. Lebensjahr. An Finger- und Zehenspitzen wurde eine Hypalgie und im Bereich der Beine eine strumpfförmige Hyposensibilität festgestellt. Neurophysiologisch besteht eine Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit im Sinne eines axonalen Schädigungsmusters.

Drei Geschwister der Indexpatientin zeigen ähnliche Symptome, ebenfalls mit einem Beginn der Symptomatik im Kindesalter. Der 30-jährige Bruder leidet unter knöchernen Deformationen der Füße, z.T. mit offenen Wunden und seit dem 12. Lebensjahr bestehenden Hitzegefühlen. Auch bei der 29-jährigen Schwester bestehen milde Hitzegefühle, ein Fuß zeigt knöcherne Veränderungen. Der 16-jährige Bruder ist von Mutilationen an beiden Füßen betroffen.

5.2 Kopplungsanalyse

Eine Kopplungsanalyse der Familie F1 war bereits im Rahmen von Vorarbeiten erfolgt. Da die daraus gewonnenen Erkenntnisse die Grundlage für die Mutationssuche dieser Arbeit bilden, sollen die Ergebnisse hier zusammenfassend dargestellt werden. Abbildung 7 zeigt die LOD-Wert-Verteilung. Der höchste Peak steht für eine ca. 4 cM große Region auf Chromosom 5; dort wurde mit einem LOD-Wert von 3,63 eine Kopplung identifiziert.

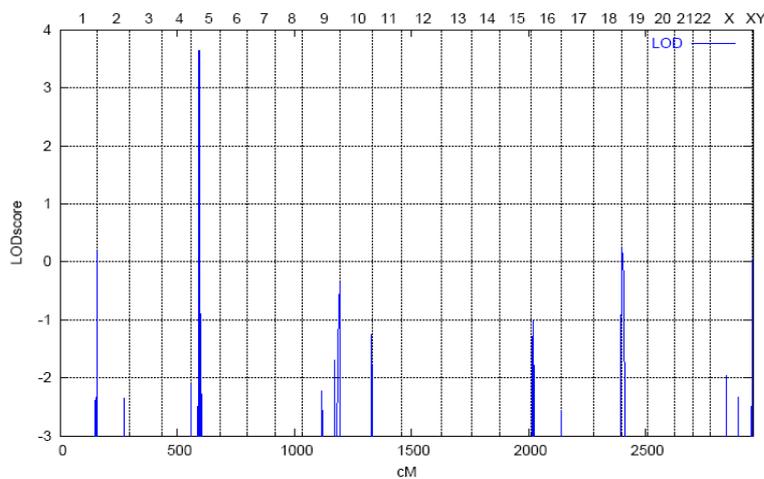


Abbildung 7: LOD-Werte

Schlüsselt man den Bereich auf Chromosom 5 genauer auf, so ergibt sich für Familie F1 die in Abbildung 8 dargestellte Allelverteilung. In rot markiert das mit hoher Wahrscheinlichkeit krankheitsverursachende Allel. In diesem Bereich zeigte sich eine Heterozygotie der Eltern sowie eine Homozygotie aller Betroffenen für die entsprechenden Marker. Die physikalische Position der Marker, bei denen eine Kopplung vorliegt, umfasst die Region von 14,849-17,688 Kbp auf Chromosom 5. In dieser Region sind 44 Gene beschrieben (NCBI-Datenbank, Homosapiens, Built 36.1).
Abbildung Fehler: Referenz nicht gefunden zeigt eine Übersicht.

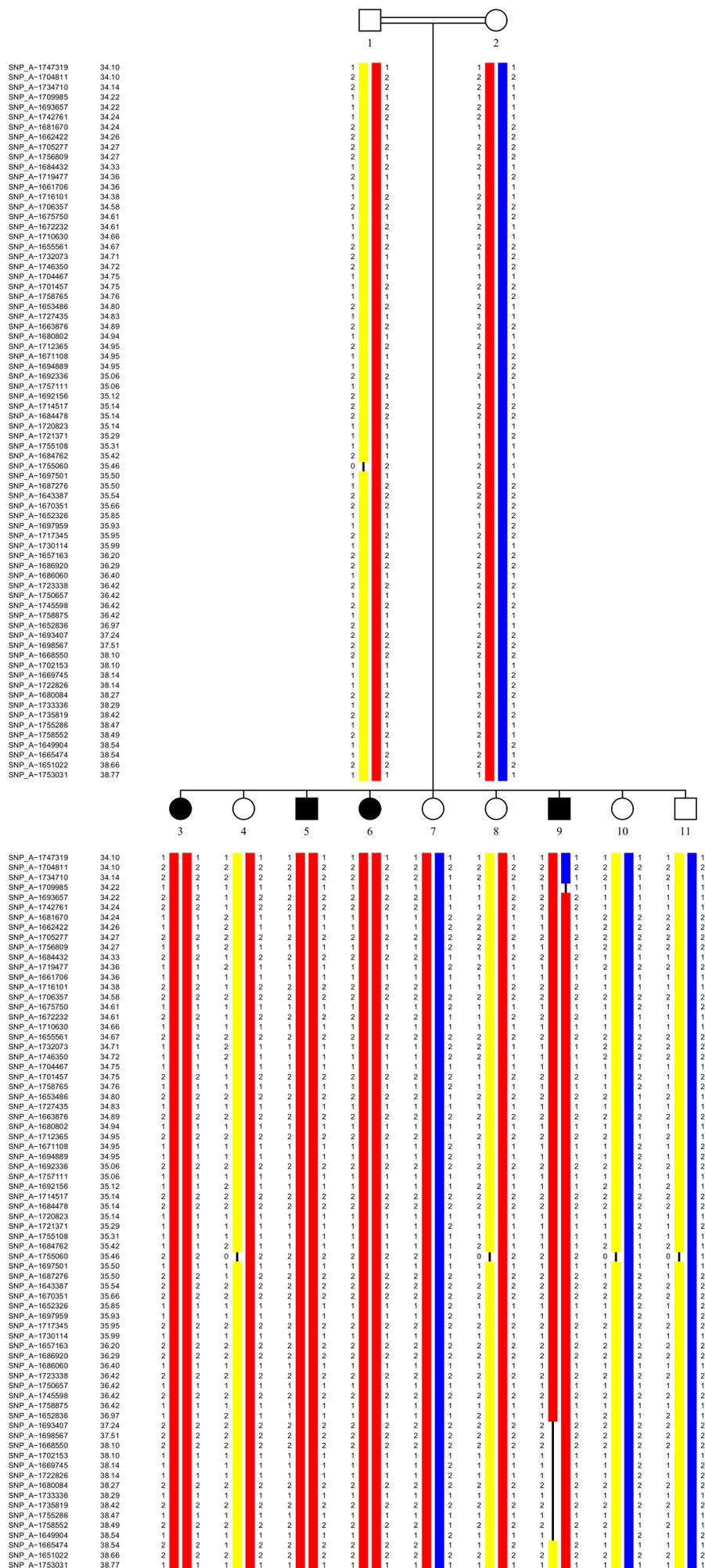


Abbildung 8: Kopplungsanalyse

5.3 Gene der Kopplungsregion

Gen	Beschreibung
<i>LOC642954</i>	similar to retinoblastoma binding protein 4
<i>LOC402198</i>	similar to Selenide,water dikinase 2 (Selenophosphate synthetase 2)
<i>LOC391741</i>	similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)
<i>FBXL7</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 7
<i>LOC441061</i>	similar to membrane-associated ring finger (C3HC4) 4
<i>ZNF622</i>	zinc finger protein 622
<i>FAM134B</i>	hypothetical protein FAM134B
<i>MYO10</i>	myosin X
<i>LOC643003</i>	similar to 40S ribosomal protein S26
<i>FLJ34047</i>	hypothetical protein FLJ34047
<i>BASP1</i>	brain abundant, membrane attached signal protein 1
<i>LOC646012</i>	similar to Aurora kinase A-interacting protein (AURKA-interacting protein)
<i>FTHL10</i>	ferritin, heavy polypeptide-like 10
<i>LOC285697</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC340096</i>	similar to Histone family member (his-72)
<i>LOC391742</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11(TAFII-28)
<i>LOC391744</i>	similar to ENSANGP00000014197
<i>LOC646103</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC391746</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC646066</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC391747</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC402199</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC391749</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC285563</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729694</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729695</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729698</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729700</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729703</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729706</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729711</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC402207</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729719</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729724</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729731</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC391761</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC729735</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC391763</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII-28)
<i>LOC391764</i>	similar to TAF11 RNA polymerase II
<i>LOC391765</i>	similar to H3 Histone, family 3B
<i>LOC 39176</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII28)
<i>LOC391767</i>	similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII28)
<i>LOC391768</i>	similar to TAF11 RNA polymerase II
<i>LOC391766</i>	similar to Histone family member

Abbildung 9: Gene der Region

5.4 Datenbankanalyse der Kandidatengene

Um für die Mutationssuche geeignete Kandidatengene aus der Kopplungsregion zu identifizieren, erfolgte zunächst eine Datenbankrecherche zur Funktion der Gene dieser Region, die hier zusammenfassend dargestellt werden soll.

FBXL7 ist ein Gen, das für das F-Box and leucine-reich repeat protein 7 kodiert. Dieses Protein ist an der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse beteiligt und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen [26]. Neben vielen anderen Geweben wird das Gen auch in Nerven exprimiert.

Über das Gen *LOC441061* ist bisher nur bekannt, dass es in Hirn, Knochen und Bindegewebe exprimiert wird und sein Genprodukt Ähnlichkeiten mit einem hypothetischen Protein zeigt.

Ein weiteres Gen, *ZNF622*, gehört zur Familie der Zinkfinger Proteine und zeigt eine hohe Expression in Lunge, Hirn und Milz. Seong et al. fanden, dass das Protein mit Melk 38 (Murin Proteinkinase 38) interagiert, eine Kinase die an der frühen T-Zell-Aktivierung beteiligt sein soll [27]. Weiterhin beschreiben sie, dass *ZNF622* die Aktivität des Transkriptionsfaktors BMYB erhöht. Eine Koexpression der beiden in mit Retinoid Säure behandelten Neuroblastom-Zellen inhibiere die Apoptose [28].

Myo10 kodiert für Myosin 10, ein Protein aus der Gruppe der Myosine und wie diese Calcium-abhängiger Bindungspartner für Calmodulin-ähnliche Proteine [29]. Cox et al. vermuten, dass Myosin 10 ein Effektorprotein der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und wie diese am Prozess der Phagozytose beteiligt sei. Sie fanden eine PI3K abhängige Rekrutierung von Myosin 10 in Phagozytosevesikel. In Zellversuchen fehlte Makrophagen mit einem trunkierten *Myo10* Konstrukt die Fähigkeit zur Ausbildung von Pseudopodien während der Phagozytose [30]. Myosin 10 spielt zudem eine kritische Rolle bei der Interaktion von Mikrotubuli und F-Aktin beim Aufbau des meiotischen Spindelapparates [31]. Bohil et al. postulieren außerdem, dass Myosin 10 als molekularer Motor für die Ausbildung von Filopodien verantwortlich sei [32].

Von dem Protein *FAM134B* wurde kürzlich berichtet, dass es an der Pathogenese von ösophagealem Plattenepithelcarcinom beteiligt sein könnte. In ösophagealem Plattenepithel-Zelllinien von Patienten wiesen Tang et al. eine Überexpression von

FAM134B nach [33]. In einer Studie von Ramilo et al., die die Expressionsprofile von Leukozyten bei Infektionen durch verschiedene Erreger untersuchte, fand sich eine Überexpression von *FAM134B* unter Staphylokokkus aureus Infektionen [34]. Yau et al. untersuchten die Expressionsprofile von Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs in einer jungen (Alter <45 Jahre) im Vergleich zu einer alten (Alter >70 Jahre) Patientenkohorte und fanden 75 Gene, darunter auch *FAM134B*, die abhängig vom Alter unterschiedlich stark exprimiert wurden [35]. Auch hoch- und niedrigdifferenzierte duktales Carcinoma in situ der Mamma zeigen laut Hanneman et al. Unterschiede in der Expression einer Reihe von Genen, unter ihnen *FAM134B* [36].

BASPI (Brain Acid Soluble Protein 1) wird vor allem an axonalen Membranen exprimiert und kodiert für ein Aktin-Zytoskelett assoziiertes Protein. Es zählt zu den Wachstumskegel-Genen, deren Expression zur Regeneration von verletzten Axonen führen. *BASPI*-Knockout Mäusen fehlte so z. B. die Fähigkeit, Stimulus-induziert Nervensprossen an der neuromuskulären Endplatte zu bilden [37].

Das Gen *LOC646012* wird auch Similar to Aurora Kinase A interacting Protein genannt, es ähnelt also dem Aurora Kinase A interacting Protein, kurz AIP. Von AIP ist bekannt, dass es ein ubiquitär exprimiertes nukleäres Protein ist, das über einen Proteasom-abhängigen Prozess Aurora Kinasen abbaut [38]. Die Aurora Kinase A wiederum ist Teil des MAP Kinase Signalweges und steuert in der Mitose den Übergang vom G2 ins M-Stadium. Cao et al. berichten, dass sie außerdem über Phosphorylierung des CPEB (Cytoplasmatic Polyadenylation Element Binding Factor) die Polyadenylierung induzierte Translation in Stammzellen und an post-synaptischen Membranen katalysiert und so die neuronale Plastizität ermöglichen soll [39].

Mit diesen Genen begann die Mutationssuche. Die anderen Gene der Kopplungsregion waren entweder als Pseudogen gelistet, Teil des 22 Gene umfassenden Similar to Transcription Factor Blocks oder aber es waren keine Informationen zur möglichen Funktion oder Expression verfügbar, so dass sie zunächst zurückgestellt wurden.

5.5 Mutationssuche

Entsprechend der Datenbankanalyse wurde damit begonnen, die kodierenden Exons der oben genannten Kandidatengene einer betroffenen Person der arabischen Familie zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren.

Dabei fiel im Gen *LOC646012* (similar to Aurora kinase A-interacting protein) bei der Indexpatientin ein T zu C Austausch im Exon 2 auf, der Vater zeigt an entsprechender Position eine Heterozygotie, T/C. Dieser Basenaustausch führt zu einer Änderung der Aminosäuresequenz, von Phenylalanin zu Serin (p.P32S). Bei dieser Veränderung handelt es sich allerdings um einen bekannten Polymorphismus, aufgeführt in der Entrez-Datenbank unter der Referenznummer rs298512.

Bei vorhandensein des T-Allels liegt eine *Tsp509 I* Schnittstelle vor, die bei Vorliegen eines C entfällt. So konnten alle Familienmitglieder mittels Restriktionsverdau auf die Veränderung getestet werden. Gleichzeitig erfolgte die Sequenzierung des Amplikons. Es ergab sich eine Heterozygotie bei zwei betroffenen Geschwistern. Damit war eine Homozygotie aller Betroffenen in diesem Bereich nicht mehr gegeben.

Das Gen *LOC646012* liegt zusammen mit weiteren, distal von *LOC646012* gelegenen Kandidatengenen in einem Bereich, wo die Kopplungsanalyse keine sichere Aussage erlaubte. Durch den mittels *Tsp509 I*-Verdau erbrachten Ausschluss der Kopplung mit dem Locus *LOC646012* konnte eine Kopplung zu den distal benachbarten Genen als unwahrscheinlich angesehen werden. Tabelle 9 zeigt die verbliebenen Kandidatengene und die Analyseergebnisse.

Position	Gen	Beschreibung	Ergebnis der Mutationssuche
14851594	<i>LOC642954</i>	similar to retinoblastoma binding protein 4	viele homologe Gene, aus Mangel an <i>LOC642954</i> spezifischen Primern zunächst zurückgestellt
15014565	<i>LOC402198</i>	similar to Selenide, water dikinase 2	Pseudogen
15504943	<i>LOC391741</i>	similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	Pseudogen
15992900	<i>FBXL7</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 7	ORF ohne pathologische Veränderung
16240962	<i>LOC441061</i>	similar to membrane-associated ring finger (C3HC4) 4	ORF ohne pathologische Veränderung
16518894	<i>ZNF622</i>	zinc finger protein 622	ORF ohne pathologische Veränderung
16670118	<i>FAM134B</i>	hypothetical protein FAM134B	
16989139	<i>MYO10</i>	myosin 10	ORF ohne pathologische Veränderung
16955783	<i>LOC643003</i>	similar to 40S ribosomal protein S26	viele homologe Gene, aus Mangel an <i>LOC643003</i> spezifischen Primern zunächst zurückgestellt
17270598	<i>FLJ34047</i>	hypothetical protein FLJ34047	ORF ohne pathologische Veränderung
17329943	<i>BASPI</i>	brain abundant, membrane attached signal protein 1	ORF ohne pathologische Veränderung
17359932	<i>LOC646012</i>	similar to Aurora kinase A-interacting protein (AURKA-interacting protein)	Grenze der Kopplungsregion (T/C-Polymorphismus)

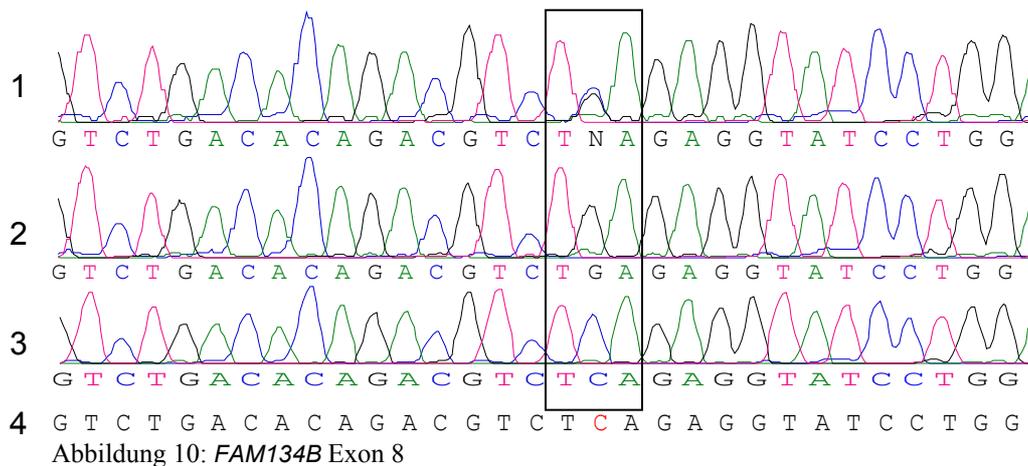
Tabelle 9: Kandidatengene, ORF=open reading frame

Nachdem pathologische Veränderungen in der kodierenden Region der Gene *BASPI* und *Myo10* aber auch *FBXL7*, *LOC441062*, und *ZNF622* ausgeschlossen waren, blieb *FAM134B* als Kandidatengen übrig.

5.5.1 Stop-Mutation

Im *FAM134B* Gen der Indexpatientin konnte eine homozygote Sequenzveränderung nachgewiesen werden, die zu einem vorzeitigen Stop-Kodon in Exon 8 führt: eine Punktmutation mit der Bezeichnung c.926C>G; p.S309X. Abbildung 10 stellt vergleichend die DNA Sequenzen eines heterozygoten Elternteils, einer Betroffenen und eines gesunden Geschwisters an entsprechender Position in Exon 8 dar.

Unten in der Abbildung die Wildtypsequenz, die auch in der Ensemble-Datenbank unter ENST00000306320 zu finden ist.



- 1: Heterozygotes Elternteil
- 2: Pat.V2, homozygot für TGA-STOP
- 3: Gesundes Geschwister, homozygot
- 4: Wildtypsequenz

5.5.2 Genotypisierung der Familie F1

Die anderen Familienmitglieder wurden daraufhin bezüglich der identifizierten Mutation typisiert. Im Stammbaum in Abbildung 5 sind die Familienmitglieder gezeigt, deren DNA weiter analysiert wurde.

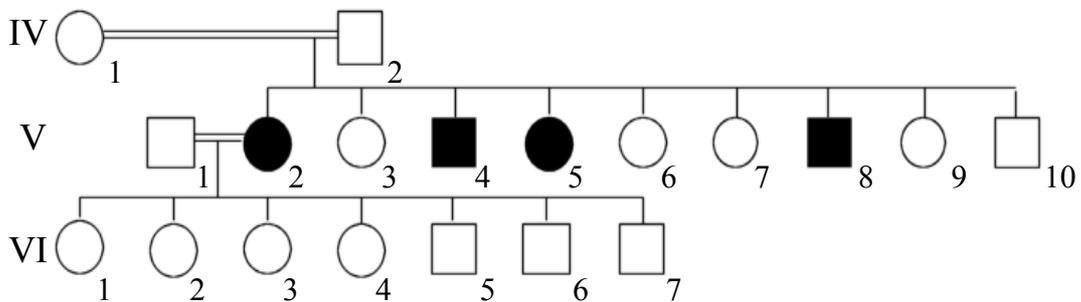


Abbildung 11: Untersuchte Familienmitglieder

Die Eltern, IV 1 und IV 2, zeigen beide eine Heterozygotie für die Stop-Mutation in Exon 8. Von ihren Kindern sind vier erkrankt und tragen die Stop-Mutation in homozygoter Form. Von den fünf gesunden Geschwistern sind drei ebenso wie die Eltern heterozygot und zwei homozygot für das Wildtypallel. Die ratsuchende Patientin V 2 trägt die Mutation homozygot. Da alle sieben Kinder heterozygot sind, ist davon auszugehen, dass der nicht untersuchte Vater zwei Wildtyp-Allele trägt. Tabelle 10 korreliert zur Übersicht den Genotyp mit dem Phänotyp der Familienmitglieder.

Patient	Genotyp	Phänotyp
IV 1	G/C	Gesund
IV 2	G/C	Gesund
V 1	Nicht untersucht	Gesund
V 2	C/C	Erkrankt
V 3	G/C	Gesund
V 4	C/C	Erkrankt
V 5	C/C	Erkrankt
V 6	G/C	Gesund
V 7	G/C	Gesund
V 8	C/C	Erkrankt
V 9	G/G	Gesund
V 10	G/G	Gesund
VI 1	G/C	Gesund
VI 2	G/C	Gesund
VI 3	G/C	Gesund
VI 4	G/C	Gesund
VI 5	G/C	Gesund
VI 6	G/C	Gesund
VI 7	G/C	Gesund

Tabelle 10: Familie F1 - Ergebnis der Sequenzanalyse

5.5.3 Weitere *FAM134B* Mutationen in einem HSAN-Patientenkollektiv

Um zu bestätigen, dass *FAM134B* ein Gen ist, dessen Mutation zu einer HSAN II führen kann, wurden noch 45 weitere unabhängige Patienten mit HSAN auf Veränderungen im *FAM134B* Gen untersucht. Hierzu wurden aus genomischer DNA der Erkrankten die Exons des *FAM134B* Gens amplifiziert und diese mittels SSCP auf ein verändertes Laufverhalten untersucht. Proben mit auffälligem Laufverhalten wurden sequenziert.

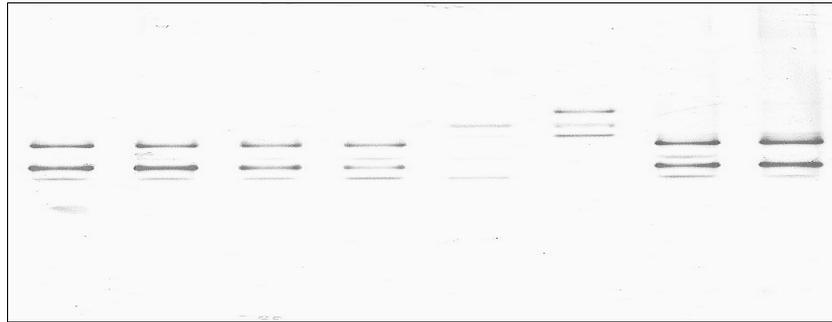


Abbildung 12: SSCP Gel mit Proben unterschiedlichen Laufverhaltens

Bei den Sequenzanalysen fand sich eine HSAN II-Patientin, die ebenfalls im *FAM134B* Gen eine homozygote Nonsense-Mutation trägt: Eine C zu T Basenaustauschmutation an Position 433 führt auf Proteinebene zu einem vorzeitigen Stop-Kodon (c.433C>T; p.Q145X). Die Patientin stammt aus der Türkei, ihre Eltern sind blutsverwandt. Abbildung 13 zeigt einen Ausschnitt der Sequenz-Analyse mit der erwähnten Veränderung. In Abbildung 14 ist der Stammbaum ihrer Familie, hier Familie F2 genannt, dargestellt.

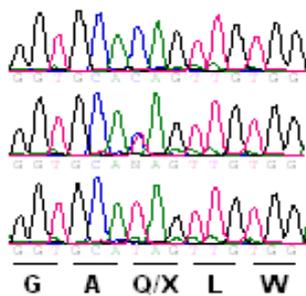


Abbildung 13: Exon 3-Sequenzen:
obere Wildtyp, mittlere heterozygot C/T,
untere p.Q145X

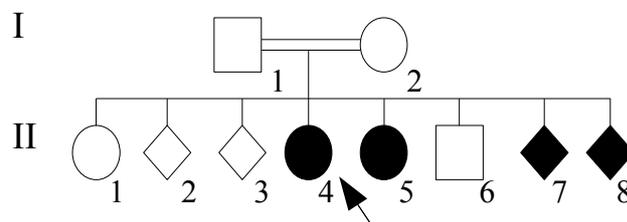


Abbildung 14: Stammbaum Familie F2

Die Indexpatientin entwickelte im Alter von acht Jahren erste Symptome einer HSAN II: eine verminderte Schmerz- und Temperaturwahrnehmung, Ulzera und Mutilationen der Füße und eine chronische Osteomyelitis, die im weiteren Verlauf zur Amputation beider Unterschenkel führte. Elektrophysiologische Untersuchungen bestätigten Veränderungen vorwiegend sensorischer Fasern.

Die älteste Schwester ist klinisch gesund, sie ist heterozygot für die Veränderung. Die zwei folgenden Geschwister unbekanntes Geschlechts tragen homozygot Wildtyp-Allele, sie sind ebenfalls klinisch gesund. Die jüngere Schwester der Indexpatientin trägt dieselbe homozygote Mutation wie die Indexpatientin und leidet unter Mutilationen der Finger und Metatarsalen. Ein jüngerer Bruder leidet seit seinem zweiten Lebensjahr unter beidseitigem Katarakt, ist aber ansonsten klinisch unauffällig. Seine DNA, die der Eltern, sowie die von zwei weiteren, klinisch gesunden Geschwistern standen nicht für eine Genotypisierung zur Verfügung.

Eine dritte pathogene *FAM134B*-Mutation fand sich in einer kanadischen Familie italienischen Ursprungs: Die Patientin trägt im Exon 1 eine homozygote frameshift-Mutation, verursacht durch eine 2 bp-Deletion. Die Frameshiftmutation führt bereits nach sechs Aminosäuren zu einem Protein, welches nicht mehr der Sequenz des *FAM134B* Proteins entspricht; nach 134 Aminosäuren kommt es zu einem vorzeitigen Stopkodon. Die Bezeichnung der Mutation lautet c.18_19delTC; p.P6fsX134.

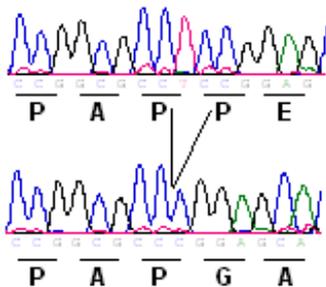


Abbildung 15: Exon 1: c.18_19delTC

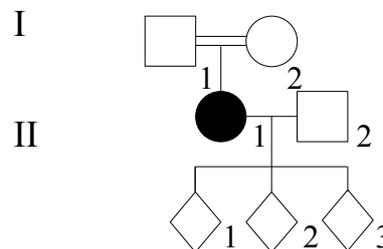


Abbildung 16: Stammbaum Familie F3

Der Stammbaum der Familie, hier Familie F3, ist in Abbildung 16 dargestellt.

Die Eltern sind beide heterozygote Anlageträger.

Die Patientin lernte im Alter von einem Jahr Laufen, entwickelte aber eine zunehmende Beinsteifigkeit. Im Alter von 14 Jahren erfolgten aufgrund von progressiven Gangschwierigkeiten und Druckulzera der Füße die ersten medizinischen Untersuchungen.

Die Sensibilität der Hände und Unterschenkel ist in allen Modalitäten gestört. Osteomyelitiden machten Amputationen der Zehen und Metatarsalen nötig, die erste im Alter von 20 Jahren. Im weiteren Verlauf nahmen die sensomotorischen Ausfälle insbesondere der unteren Extremität weiter zu, sodass die Patientin seit der dritten Lebensdekade auf einen Rollstuhl angewiesen ist.

Das autonome Nervensystem ist mit Symptomen einer Harninkontinenz und einer intermittierende Hyperhidrose ebenfalls betroffen.

Eine Nervenbiopsie des Nervus suralis zeigt eine axonale Neuropathie, mit einem bevorzugten Befall der kleinen myelinisierten Fasern. Eine Muskelbiopsie weist eine Typ II Muskelfaser Atrophie nach. Elektrophysiologische Untersuchungen bestätigen mit verminderten motorischen Nervenleitgeschwindigkeiten und Antwortpotentialen und nicht auslösbaren sensiblen Antwortpotentialen im Bereich der unteren Extremität sowie reduzierten sensiblen Nervenleitgeschwindigkeiten im Bereich der oberen Extremität den klinischen Befund.

Die Patientin hat drei Kinder im jungen Erwachsenenalter, die klinisch bisher keine Symptome zeigen.

5.6 Weitere Ergebnisse der Sequenzanalysen

Im Rahmen der Mutationssuche in Familie F1 fiel neben einigen in den Datenbanken beschriebenen Polymorphismen eine Sequenzvariation im *Myo10* Gen auf. Ein G zu A Austausch im Exon 40 an cDNA Position 5.944 führt dazu, dass an dieser Stelle ein Isoleucin statt eines Valin kodiert wird. Diese bislang nicht beschriebene Veränderung wurde in 39 von 81 Kontrollen in heterozygoter Ausprägung gefunden. Diese hohe Prävalenz zeigt, dass es sich bei der Veränderung um einen Polymorphismus handelt.

6 Diskussion

Wie die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, ist *FAM134B* das siebte identifizierte Gen, dessen Mutationen krankheitsursächlich für eine HSAN sein können. Die sechs bisher bekannten Gene sind in ihrer Funktion sehr unterschiedlich. Bei HSAN I Patienten ist zum Beispiel ein Enzym der Sphingolipidsynthese betroffen [9]. Das Transkript des *HSN2* Gens soll an axonalen Transportprozessen beteiligt sein, Mutationen führen zum Krankheitsbild einer HSAN II [15]. Das *IKBAKP* Gen ist bei Betroffenen mit HSAN III verändert, es kodiert für eine Komponente des Elongationskomplexes [18]. Bei der HSAN V ist hingegen die Funktion des Nervenwachstumsfaktor NGF β [25] und bei Patienten mit HSAN IV dessen Rezeptor NTRK1 verändert [23]. Das Genprodukt des *RAB7* Gens ist für den endosomalen Transport des NTRK1 Rezeptors zuständig, Mutationen resultieren in einer CMT 2B [13]

Das Gen *FAM134B* (family with sequence similarity 134, member B), auch bekannt als *FLJ20152*, wird in der Entrez-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter GeneID 54463 gelistet. Die Ensembl Human Gene View Datenbank führt es unter der Identifikationsnummer ENSG00000154153. Dort finden sich auch die DNA- und mRNA-Sequenzen [40].

FAM134B liegt auf Chromosom 5p15.1, Position 16,670,118- 16,526,148 und umfaßt eine ca. 144 kbp große genomische Region. Abbildung 17 zeigt seine genomische Lokalisation [41].

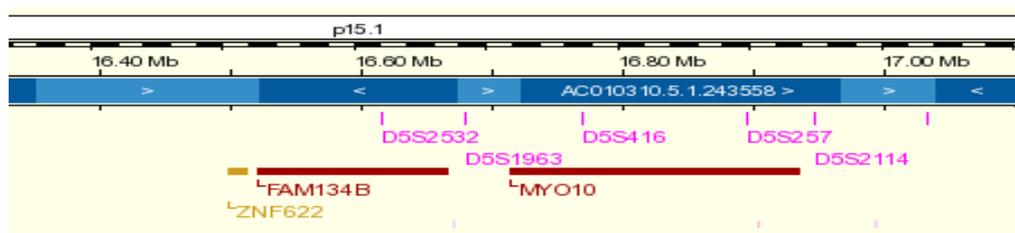


Abbildung 17: Genomische Lokalisation von *FAM134B*, in rosa bekannte Marker der Region

Durch alternatives Spleißen entstehen zwei verschiedene Transkripte. Die lange Isoform 1 umfaßt neun Exons. Eine 5' verkürzte Isoform 2 nutzt ein alternatives Exon zwischen Exon 3 und 4 (Exon 3b). Abbildung 18 stellt die beiden Isoformen schematisch dar.

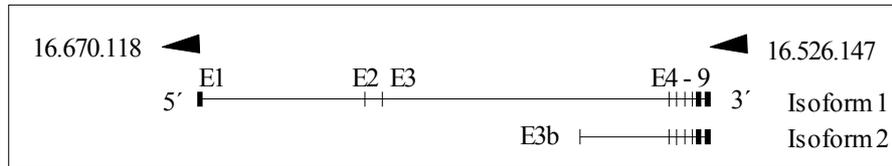


Abbildung 18: FAM134B - Isoformen

Erste Hybridisierungsstudien zeigen eine hohe Expression der Isoform 1 in sensorischen und vegetativen Ganglien sowie im Zentralnervensystem, wohingegen Isoform 2 hauptsächlich im Hoden zu finden ist. Die genaue Funktion von *FAM134B* ist bis dato unbekannt. Sequenz-Vergleiche mit anderen Spezies belegen, dass das Gen evolutionär hoch konserviert ist. Homologien zu charakterisierten Proteinen bestehen nicht.

FAM134B verfügt laut Strukturvorhersagen über eine Coiled-Coil- sowie zwei Transmembrandomänen, wie in Abbildung 19 für Isoform 1 dargestellt.

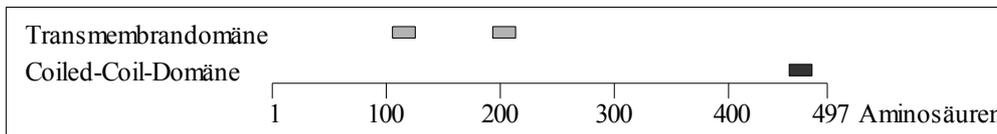


Abbildung 19: Proteindomänen - Isoform 1

Die Stop-Mutation (c.433C>T, p.Q145X) im Exon 3 der Familie F2 liegt vor der Sequenz für die zweite Transmembrandomäne. Falls das verkürzte mRNA Produkt dem Abbau durch Nonsense-mediated mRNA decay entgeht, ist davon auszugehen, dass die Verankerung und Lokalisation des trunkierten Proteins gestört ist.

Die TC-Deletion in Familie F3 (c.18_19delTC, p.P6fsX134) bedingt hingegen eine Leserasterverschiebung, die bereits nach sechs Aminosäuren auftritt. Somit ist von einem kompletten Funktionsverlust des Proteins auszugehen.

Auch das vorzeitige Stop-Kodon durch die Basenaustauschmutation in Exon 8 der Familie F1 (c.926C>G; p.S309X) beendet die Translation des *FAM134B* Gens verfrüht. Zudem fehlt die vorausgesagte Coiled-Coil-Domäne, wodurch mögliche Protein-Protein Interaktionsstrukturen verloren gehen. Keine der drei hier besprochenen Veränderungen wurde bisher in den Datenbanken beschrieben.

Die Funktionsfähigkeit des gekürzten Proteins ist zweifelhaft, möglicherweise wird es im Rahmen eines Nonsense-mediated mRNA decays abgebaut. Nonsense-mediated mRNA decay bezeichnet einen Kontrollmechanismus eukaryoter Zellen zum Abbau fehlerhafter mRNA. Erkannt werden hierbei Transkripte mit vorzeitigen Stopkodons. Durch den Abbau dieser mRNA wird eine Translation von carboxy-terminal verkürzten Proteinen verhindert. Das vorzeitige Stopkodon in Familie F1 könnte also die Elimination des fehlerhaften *FAM134B* Transkripts bedingen und auf Grund eines Mangels an FAM134B Protein symptomatisch werden. Andererseits greift der Nonsense-mediated mRNA decay nicht immer, wie beispielsweise Hall et al. für eine autosomal-dominant erbliche Form der β -Thalassämie nachwiesen. Sie fanden bei Vorliegen einer Stopmutationen im letzten Exon statt erniedrigter mRNA-Level trunkierte β -Globinketten [42]. Ein verkürztes FAM134B Protein könnte über einen dominant-negativen Effekt die Funktion anderer Proteine stören und so zu Krankheitssymptomen führen.

Da sich Mutationen im *FAM134B* Gen phänotypisch in einem Verlust an Nervenfasern des peripheren Nervensystems äußern, liegt die Vermutung nahe, *FAM134B* könnte an der Entwicklung beziehungsweise dem Erhalt von peripheren Neuronen oder deren Gliazellen beteiligt sein. Denkbar wäre eine Rolle in der Signalkaskade des Nervenwachstumsfaktors NGF β , wie sie bereits für die Krankheitsgene bei der HSN IV und V beschrieben ist. Über den NGF β Rezeptor NTRK1 ist bekannt, dass er axonales Wachstum stimuliert und Überleben und Wachstum von nozizeptiven und sympathischen Neuronen reguliert [43]. Eine ähnliche Funktion in der Vermittlung von neuronalen Wachstumsstimuli könnte auch das Genprodukt von *FAM134B* haben, zum Beispiel als membranständiger Interaktionspartner des NGF β -Rezeptors.

Alternativ wäre auch eine Beteiligung des FAM134B Proteins an intra-zellulären Transportmechanismen möglich, wie sie für das *HSN2* Gen diskutiert wird.

In Expressionsstudien zu ösophagealen Plattenepithelkarzinomen, Staphylokokkus aureus Infektionen, duktalem Karzinoma in situ der Mamma, sowie Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs wird *FAM134B* als Indexgen aufgeführt. Als Indexgene wird eine Gruppe von Genen mit signifikant erhöhter Expression bezeichnet. Weiterführende Untersuchungen zur zellulären Funktion von *FAM134B* liegen von Tang und Kollegen vor. Nachdem sie eine Überexpression von *FAM134B* in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen hatten, stellten sie fest, dass mit *FAM134B* Expressionsvektor transfizierten NIH 3T3 und HEK 293 Zellen zu kontaktabhängigem aber auch kontaktunabhängigem Wachstum fähig waren. Athymische Mäuse entwickelten nach subkutaner Injektion von *FAM134B* überexprimierenden NIH 3T3 Zellen subkutane Sarkome [33]. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass das *FAM134B* Genprodukt an der Wachstumsregulation beteiligt sein könnte und sein Funktionsausfall zum beobachteten Verlust peripherer Neurone führt.

Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um die genaue Funktion des Gens sowie die Folgen seines Ausfalls aufzuklären.

Über die Lokalisation des FAM134B Proteins in der Zelle könnte man beispielsweise Hinweise auf seine Funktion erhalten. Da zwei Transmembrandomänen vorhergesagt sind, ist zu vermuten, dass das FAM134B Protein in Membranen verankert ist. Bisher ist ungeklärt, ob es sich dabei um die Zellmembran oder um intrazellulär gelegene Membranen handelt. Immunfluoreszenzstudien könnten die Koloalisation von FAM134B mit Markern für bestimmte Zellkompartimente wie der Zellmembran, dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum nachweisen. Auch Zellfraktionierungen bieten sich für Lokalisationsstudien an.

Über die Generierung spezifischer Antikörper gegen FAM134B ließe sich in immunhistochemischen Färbungen von peripheren Nerven untersuchen, ob *FAM134B* in Neuronen selbst oder in Myelinscheiden exprimiert wird.

Die Auswirkungen des Funktionsverlusts in einer Zelle können zum Beispiel mittels siRNAs konkretisiert werden. Hierzu wird in einer Zelllinie mit hoher endogener Expression die *FAM134B* mRNA mittels siRNA inhibiert und die zelluläre Folge eines solchen knockdowns beobachtet.

In der Literatur sind weitere HSAN II Fälle ähnlicher Klinik beschrieben, deren genetische Ursache unbekannt ist, zum Beispiel von Basu et al. [44], Sanvito et al. [45] und Alibhoy et al. [46]. Es bleibt zu klären, ob sie eine Mutation im *FAM134B* Gen tragen.

An einer symmetrischen, distal betonter sensiblen Neuropathie leiden auch Patienten mit diabetischer Polyneuropathie [47]. Die häufigste Ausprägung gleicht mit ihrer Hypalgie, dem handschuh- bzw. sockenförmigen Sensibilitätsverlust und den Taubheitsgefühlen dem Symptomkomplex der HSAN II-Patienten. Nervenbiopsien zeigen in beiden Patientenkollektiven eine Reduktion von myelinisierten und unmyelinisierten Nervenfasern [48].

Die diabetische Polyneuropathie ist mit 50% Inzidenz eine häufige Komplikation des Diabetes mellitus. Eine *FAM134B* basierte Therapie könnte möglicherweise den Verlauf positiv beeinflussen. Auch Patienten mit anderen Neuropathien wie der HIV- und Hepatitis C-assoziierten könnten profitieren.

Mit zunehmendem Wissen um die genetischen Grundlagen der HSAN wächst die Kenntnis ihrer Pathogenese. Darauf aufbauend ergeben sich neue Möglichkeiten der Diagnostik und Therapie von peripheren Polyneuropathien.

7 Zusammenfassung

Hereditäre sensorische und autonome Neuropathien (HSAN) sind eine klinisch wie genetisch sehr heterogene Gruppe peripherer Neuropathien. Charakteristischerweise findet man bei diesen Erkrankungen eine reduzierte Schmerz- und Temperaturwahrnehmung. Häufig kommt es, bedingt durch die sensiblen und automomen Ausfälle, zu Druckulzera, Osteomyelitiden und Mutilationen insbesondere der Hände und Füße.

Die hier untersuchte Patientin stammt aus einer konsanguinen arabischen Familie und weist schwere Osteolysen im Bereich der Hände und Füße auf. Auch drei betroffene Geschwister zeigen Osteomyelitiden und Nekrosen an Händen und Füßen. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben eine axonale sensorische Schädigung. Die Erkrankung manifestierte sich erstmals im Kindesalter mit einem Sensibilitätsverlust der distalen Extremitäten. Der anzunehmende autosomal-rezessive Erbgang, das Erkrankungsalter und die Symptome der Betroffenen entsprechen am ehesten den Kriterien einer HSAN Typ II. Eine Kopplung mit dem bislang beschriebenen HSAN Typ II Genlocus konnte für diese Familie ausgeschlossen werden.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den zugrunde liegenden Gendefekt in dieser Familie zu finden. Die DNA der Familienmitglieder wurde in Vorarbeiten mit einer SNP-Chip-Analyse typisiert und die Betroffenen auf homozygote chromosomale Regionen untersucht. Es fand sich eine 44 Gene umfassende Kandidatenregion auf Chromosom 5 mit einem LOD-Score von 3,8, die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurde.

Die Kandidatengene wurden entsprechend der Wahrscheinlichkeit ihrer Beteiligung an der Pathogenese der HSAN systematisch auf Mutationen untersucht. Nach Ausschluss der meisten Kandidatengene fand sich im Exon 8 des *FAM134B* Gens bei den Betroffenen eine homozygote Stopmutation mit der Bezeichnung c.926C>G; p.S309X.

Aus einem HSAN-Patientenkollektiv standen 45 unabhängige, zusätzliche DNA-Proben verschiedener Betroffener zur Verfügung. Tatsächlich konnten in zwei weiteren Familien Mutationen im *FAM134B* Gen der Patienten nachgewiesen werden: eine Nonsense-Mutation (c.433C>T.Q145X) im Exon 3 der einen und eine Zweibasendeletion (c.18_19delTC; p.P6fsX134) im Exon 1 der anderen Familie. Damit war die Pathogenität von *FAM134B*-Mutationen bewiesen.

Das *FAM134B* Gen umfaßt eine ca. 144 kbp große Region auf Chromosom 5p15.1 und enthält laut Strukturvorhersagen eine Coiled-Coil- und zwei Transmembrandomänen. Das Gen weist eine hohe Expression in sensorischen und vegetativen Ganglien auf. Zur genauen Funktion von *FAM134B* ist bisher noch nichts bekannt, dies wird Gegenstand weiterer Forschung sein.

8 Anhang

Screening Primer	Sequenz	Ort
<i>FAM134B</i> E1 F	5'-AGTGTCCCGCGGGCTCCCCCTGC-3'	150,664-150,686
<i>FAM134B</i> E1 R	5'-CTCGGCGGCACCCACACCCA-3'	151,135-151,154
<i>FAM134B</i> E2 F	5'-GGACTAATTGGCTAATATGCCTAC-3'	106,016-106,039
<i>FAM134B</i> E2 R	5'-GTTTCTGTGGCAGGAAGTAAACCC-3'	106,273-106,296
<i>FAM134B</i> E3 F	5'-CTTGATTTAGATTCCCTGTCAC-3'	99,760-99,781
<i>FAM134B</i> E3 R	5'-GTGTTAGAGATCTGAGCATTCCAC-3'	99,995-100,018
<i>FAM134B</i> E3b F	5'-CTATTGTTTGGCCACATTAGCC-3'	42,777-42,798
<i>FAM134B</i> E3b R	5'-CTAGCCAGTGAAACAGACTGAAG-3'	42,635-42,657
<i>FAM134B</i> E4 F	5'-TGGAGAAATCTGACAAGCTG-3'	17,363-17,382
<i>FAM134B</i> E4 R	5'-CCAGAGGGTGTGGCCAACAGTAG-3'	17,669-17,691
<i>FAM134B</i> E5 F	5'-CTCATCCCCCTCTTCAAAC-3'	15,028-15,047
<i>FAM134B</i> E5 R	5'-GTCACCTTATACCGTCACTATAG-3'	15,287-15,309
<i>FAM134B</i> E6 F	5'-CTTTGAGGGAGATTAGCTTC-3'	12,823-12,842
<i>FAM134B</i> E6 R	5'-GTGAAATACTGAAATGTACGTAGC-3'	13,145-13,168
<i>FAM134B</i> E7 F	5'-GGAGTTTATTAGGAAGATCATTACAGC-3'	12,051-12,076
<i>FAM134B</i> E7 R	5'-GAATATGAGAAATGTGGGGTAAG-3'	12,284-12,306
<i>FAM134B</i> E8 F	5'-TGGTGGTAACATGTTATTTACCC-3'	11,674-11,696
<i>FAM134B</i> E8 R	5'-CTGTCATTTTGGGGTTCATATGG-3'	11,964-11,987
<i>FAM134B</i> E9 F	5'-CCAATTAATTCAGTGCAGGAGGG-3'	8,699-8,721
<i>FAM134B</i> E9 R	5'-CCAGAGGGTTCAGATTAAAGTCAG-3'	9,419-9,442
<i>FAM134B</i> E9 seq	5'-GCTGCAGTCACTGCAGCTG-3'	9,074-9,092
Zusätzliche SSCP Primer		
<i>FAM134B</i> E1 F*	5'-CGGCACCCACACCCAGGCGCGCCC-3'	151,126-151,149
<i>FAM134B</i> E1 int F	5'-TCCCCCGCAGAGCGGCAGCAGCAGG-3'	150,961-150,985
<i>FAM134B</i> E1 int R	5'-CTCCGCCGCCCCAGCTTCCTGCGC-3'	150,929-150,952
<i>FAM134B</i> E1 R*	5'-GCACTGGGTCCCCGGGGCCCCG-3'	150,685-150,706
<i>FAM134B</i> E9 F*	5'-GATTAAAGTCAGATATCTT- TAGACAGC-3'	9,404-9,430
<i>FAM134B</i> E9 int F	5'-GCTGGTCTCACCTTCCTCTG-3'	9,145-9,165
<i>FAM134B</i> E9 int R	5'-CAGCTGTGATAACATCCCCAGCC-3'	9,087-9,109
<i>FAM134B</i> E9 R*	5'-GTGCTCTGTTGCAAGCTGATTCC-3'	8,824-8,846

Tabelle 11: *FAM134B* Primer

9 Literaturverzeichnis

- 1 Diese Abbildung basiert auf der Graphik <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Nervenzelle.png> und wurde unter der GNU-Lizenz für freie Dokumentation veröffentlicht, Author: Saman, abgerufen am 24.07.2007
- 2 Trepel M, Neuroanatomie: Struktur und Funktion, 2. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München, 1999, S. 2-3
- 3 Duale Reihe Neurologie, 5. Aufl. 2005, Hrsg. Masuhr K, Neumann M. S. 466
- 4 Deutsche Gesellschaft für Neurologie-Leitlinien-Polyneuropathie-Diagnostik <http://www.dgn.org/112.0.html> vom 08.09.2006
- 5 Dyck P, Chance P, „Hereditary motor and sensory neuropathies” in: Dyck P, Griffin J, Low P, Poduslo J, Hrsg., Peripheral neuropathy, 3rd Edition, Philadelphia, 1993, S. 1094-1136
- 6 Verhoeven K, Timmerman V, Mauko B, Pieber T, De Jonghe P, Auer-Grumbach M, „Recent advances in hereditary sensory and autonomic neuropathies”, Current Opinion in Neurology, 2006, 19:474-480
- 7 Houlden H, Blake J, Reilly M, „Hereditary sensory neuropathies”, Curr Opin Neurol., 2004, 17:569–577
- 8 Verpoorten N, De Jonghe P, Timmerman V, „Disease mechanism in hereditary sensory and autonomic neuropathies”, Neurobiology of Disease 21, 2006, S. 247-255
- 9 Hanada K, „Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism”, Biochem. Biophys. Acta 2003, S. 16-30
- 10 Nakamura S, Kozutsumi Y, Sun Y, Miyake Y, Fujita T, Kawasaki T, „Dual roles of sphingolipids in signaling of the escape from and onset of apoptosis in a mouse cytotoxic T-cell line, CTLL-2”, J. Biol. Chem. 271, 1996, S. 1255-1257
- 11 Mc Campbell A, Turong D, Broom D, „Mutant SPTLC1 dominantly inhibits serine palmitoyltransferase activity in vivo and confers an age-dependent neuropathy”, Hum. Mol. Genet., 2005, 14:3507-3521
- 12 Spring PJ, Kok C, Nichol森 GA, „Autosomal dominant hereditary sensory neuropathy with chronic cough and gastro-oesophageal reflux: clinical features in two families linked to chromosome 3p22-p24”, Brain 2005, 128:2797-2810
- 13 Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, „Mutations in the small GTPase late endosomal protein RAB 7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy”, Am J Hum Genet 2003, 72(3):722-727
- 14 Saxena S, Bucci C, Weis J, „The late endosomal GTPase RAB 7 controls the endosomal trafficking and signalling of the nerve growth factor receptor TrkA”, J Peripher Nerv Syst 2005, 10:82
- 15 Lafrenière R, MacDonald M, Dube M, „Identification of a novel gene (HSN2) causing hereditary sensory and autonomic neuropathy type II through the Study of Canadian genetic Isolates”, Am J Hum Genet 2004, 74:1064-1073
- 16 Bouhouche A, Benomar A, Bouslam N, et al, „Autosomal recessive mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia maps to chromosome 5p15.31-14.1”, Eur. J. Hum. Genet. 2006, 14:249-25

- 17 Ferrière G, Guzzetta F, Kulakowski S, Evrard P, „Nonprogressive type II sensory autonomic neuropathy: a homogeneous clinicopathologic entity”, *J Child Neurol.* 1992, Okt. 7(4):364-370
- 18 Anderson S, Coli R, Daly I et al., „Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene“, *Am. J. Hum. Genet.* 2001, 68:753-758
- 19 Rahl P, Chen C, Collins R, „Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrom protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation”, *Mol. Cell* 2005, 17:841-853
- 20 Cuajungco M, Leyne M, Mull J, Gill S, Lu W, Zagzag D, Axelrod F, Maayan C, Gusella J, Slaugenhaupt S, „Tissue-specific reduction in splicing efficiency of IkbKAP due to major mutation associated with familial dysautonomia”, *Am. J. Hum. Genet.* 2003, 72(3):749-758
- 21 Anderson S, Rubin B, „Tocotrienols reverse IKAP and monoamine oxidase deficiencies in familial dysautonomia“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 336:150-156
- 22 Rafel E, Alberca R, Bautista J et al., „Congenital insensitivity to pain with anhidrosis.”, *Muscle Nerve* 1980, 3:216-220
- 23 Indo Y, Tsuruta M, Hayashida Y et al., „Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis”, *Nat. Genet.* 1996, 13:485-488
- 24 Zhang Y, Moheban D, Conway B, Bhattacharyya A, Segal R, „Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation”, *J. Neurosci.* 2000, 20 (15):5671-56788
- 25 Einarsdottir E, Carlsson A, Minde J et al., „A mutation in the nerve growth factor beta gene (NGFB) causes loss of pain perception”, *Hum. Mol. Genet.* 2004, 13:799-805
- 26 Kipreos E, Pagano M, „The F-box Protein family“, *Genom. Biol.* 2000, 1(5), publiziert GenomeBiology.com am 10.11.2007
- 27 Seong H, Gil M, Kim K, Kim S, Ha H, „Phosphorylation of a novel zinc-finger-like protein, ZPR9, by murine protein serine/threonine kinase 38 (MPK38)“, *Biochem. J.* 2002, 361:597-604
- 28 Seong H, Kim K, Ha H, „Enhancement of B-MYB transcriptional activity by ZPR9, a novel zinc finger protein“, *J. Biol. Chem.* 2003, 278:9655-9662, PubMed ID: 12645566
- 29 Rogers M, Strehler E, „The tumor-sensitive calmodulin-like protein is a specific light chain of human unconventional myosin X.“, *J. Biol. Chem.* 2001, 276:12182-12189, PubMed ID: 11278607
- 30 Cox D, Berg J, Cammer M, Chinegwundoh J, Dale B, Cheney R, Greenberg S, „Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis“, *Nature Cell Biol.* 2002, 4:469-477, PubMed ID: 12055636
- 31 Weber K; Sokac A; Berg J; Chene R; Bement W : „A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly“, *Nature* 2004, 431: 325-329, PubMed ID : 15372037
- 32 Bohil A, Robertson B, Cheney R, „Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation“, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2006, 103:12411-12416, PubMed ID: 16894163
- 33 Tang W, Chui C, Fatima S, Kok S, Pak K, Ou T, Hui K, Wong M, Wong J, Law S, Tsao S, Lam K, Beh P, Srivastava G, Chan A, Ho K, Tang J, „Oncogenic properties of a novel gene JK-1 located in chromosome 5p and its overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma“, *Int. J. Mol. Med.* 2007, Jun, 19(6):915-23

- 34 Ramilo O, Allman W, Chung W, Mejias A, Monica Ardura M, Glaser C, Wittkowski K, Piqueras B, Banchereau J, Palucka K, Chaussabel D, „Gene expression patterns in blood leukocytes discriminating patients with acute infections”, *Blood* 2007, März 1; 109(5), S. 2066–2077
- 35 Yau C, Fedele V, Roydasgupta R, Fridyland J, Hubbard A, Gray J, Chew K, Dairkee S, Moore D, Schittulli F, Tommasi S, Paradiso A, Albertson D, Benz C, „Aging impacts transcriptomes but not genomes of hormone-dependent breast cancers”, *Breast Cancer Res.* 2007, 9(5), S. 59
- 36 Hannemann J, Velds A, Halfwerk J, Kreike B, Peterse J, van de Vijver M, „Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling”, *Breast Cancer Res.* 2006, 8(5), S. 61
- 37 Frey D, Laux T, Xu L, Schneider C, Caroni P, „Shared and unique Roles of CAP23 and GAP43 in Action Regulation, Neurite Outgrowth, and Anatomical Plasticity“, *The Journal of Cell Biology* 2000, Vol. 149, No. 7, S. 1443-1453
- 38 Kiat L, Hui K, Goplan G, „Aurora-A Kinase interacting Protein (AIP), a Novel Negative Regulator of Human Aurora-A Kinase“, *The Journal of Biological Chemistry* 2002, Vol. 277, No. 47, S. 45558-45565
- 39 Cao Q, Huang Y, Kan M, Richter J, „Amyloid Precursor Proteins Anchor CPEB to Membranes and Promote Polyadenylation-Induced Translation“, *Molecular and Cellular Biology* 2005, Vol. 25, No. 24, S. 10930-10939
- 40 http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000154153, abgerufen am 14.01.2007
- 41 http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/contigview?panel_top=on;l=5%3A16526148-16670118; abgerufen am 14.01.2007
- 42 Hall G, Thein S, „Nonsense codon mutations in the terminal exon of the beta-globulin gene are not associated with a reduction in the beta-mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant beta-thalassemia“, *Blood* 1994, April;83 (8), S.2013-7
- 43 Zhang Y, Moheban D, Conway B, Bhattacharyya A, Segal R, „Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation”, *J. Neurosci.* 2000, 20 (15):5671-56788
- 44 Basu S, Dilip Kumar P, Basu S, „Case report Four Siblings with Typ II Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy”, *Indian Pediatrics* 2002, 39: S. 870-874
- 45 Sanvito W, Cataldo B, Costa A, „Hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2: two case reports”, *Arq. Neuropsiquiatr.* 2003, Sept., 61: S. 654-658
- 46 Alibhoy A, Senanayake B, Fernando M, Ranawaka U, Wijesekera J, „A case of hereditary sensory and autonomic neuropathy (HSAN) type II”, *Ceylon Med. J.* 2000, Mar; 45(1), S. 32-33
- 47 Hilz M, Marthol H, Neundörfer B, „Diabetic somatic polyneuropathy: Pathogenesis, clinical manifestations and therapeutic concepts”, *Fortschr. Neurol. Psychiatrie* 2000, Jun, 68 (6), S. 278-88
- 48 Zorrilla Hernández E, Frati Munari A, Lozano Castaneda O, Villalpando Hernández S, Boulton A, „Diabetic neuropathy: Current concepts on etiopathogenesis, diagnosis, and treatment”, *Gac. Med. Mex.* 1994, Jan-Feb, 130(1), S. 18-25

Danksagung

Meinem Doktorvater und Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. med. Christian Hübner möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und für seine Bereitschaft, dieses Dissertationsvorhaben zu betreuen, danken. Seine hilfreiche, konstruktive Kritik und seine fortwährende Unterstützung habe ich sehr geschätzt.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Andreas Gal für die freundliche Aufnahme an sein Institut, das Bereitstellen der Räumlichkeiten wie Materialien und für die Kontaktpflege zu Herrn Prof. Dr. med. Vincent Timmermann aus der Gruppe Periphere Neuropathie, Abteilung für molekulare Genetik der Universität Antwerpen, Belgien. Im Rahmen dieser Kooperation hat mir Herr Prof. Timmermann dankenswerter Weise das HSAN-Patientenkollektiv zur Verfügung gestellt.

Den Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, ganz besonders den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Miteinander danken. An Frau Jana Schroth und Herrn Christopher Hennings geht ein extra Dank für das Erklären von Labortechniken. Frau Janine de Menezes danke ich von Herzen für die Vermittlung dieser Dissertation und die wunderbare Zeit zusammen, nicht nur im Labor.

Für ihre liebevolle Unterstützung danke ich meinen Eltern. Die Begeisterung und Energie, mit der sie sich ihren Aufgaben widmen, haben mich wie immer inspiriert. Mein Freund Christoph Hecking hat mich während dieser Zeit mit viel Interesse und Verständnis begleitet und allein dadurch sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem hat er mir mit viel Freude so manche Open Office Funktion gezeigt und mir so den Schreibprozess sehr erleichtert. Danke.

Frau Juliane Preu danke ich herzlich für die Durchsicht meiner Arbeit.

Ganz besonders gilt mein Dank meinem Betreuer Herrn Dr. med. Ingo Kurth. Eine bessere Betreuung, fachlich wie menschlich, hätte ich mir nicht wünschen können. Danke, dass Du stets ansprechbar und hilfsbereit warst, für Deinen vielen Erklärungen zwischendurch, für die geduldige Einführung in die humangenetische Laborwelt.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

■ Name	Désirée Pao Ling Na Soehendra
■ Geburtsdatum/-ort	14.11.1982 in Hamburg
■ Anschrift	Ohlsdorfer Straße 89, 22297 Hamburg

Schulischer Werdegang

■ 1989-1993	Grundschule Moorflagen, Hamburg
■ 1993-2002	Gymnasium im Schulzentrum, Henstedt-Ulzburg
■ 1999/2000	Auslandsjahr Point Pleasant High School, Point Pleasant, USA
■ 07.06.2002	Abitur

Universitärer Werdegang

■ 08/2002-03/2003	Studium der chinesischen Sprache und Kultur Peking Universität, Beijing, V. R. China
■ 04/2003-07/2003	Studium der Sprachen-, Wirtschafts-, und Kulturraumstudien Universität Passau
■ seit 10/2003	Studium der Humanmedizin Universität Hamburg
■ 22.08.2005	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
■ 08/2008-07/2009	Praktisches Jahr

Eidesstattliche Versicherung

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

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

A handwritten signature in purple ink that reads "D. Soehendra". The signature is written in a cursive style and is centered within a light green rectangular box.

Hamburg, den 08.08.2008