

Aus dem Institut für Humangenetik
Universitäts-Klinikum Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. A. Gal

**CHARAKTERISIERUNG VON 13 NEUEN MUTATIONEN
IM α -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE-GEN BEI
PATIENTEN MIT MUCOPOLYSACCHARIDOSE
TYP IIIB (M. SANFILIPPO B)**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von
Astrid Knigge
aus Marburg

Hamburg 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 12. Dezember 2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. A. Gal

Koreferent: —

**DAS SCHÖNSTE GLÜCK DES DENKENDEN
MENSCHEN IST, DAS ERFORSCHLICHE
ERFORSCHT ZU HABEN UND DAS
UNERFORSCHLICHE RUHIG ZU VEREHREN.**

(JOHANN WOLFGANG VON GOETHE)

FÜR ELMAR–MARIUS

INHALTSÜBERSICHT

Seite

1 Einleitung.....	1
1.1 Das Krankheitsbild der Mucopolysaccharidosen	1
1.1.1 Geschichte der Mucopolysaccharidosen	1
1.1.2 Biochemie der Mucopolysaccharidosen	1
1.1.3 Nomenklatur	3
1.1.4 Klinik der Mucopolysaccharidose IIIB	6
1.1.5 Diagnostische Abklärung	7
1.1.6 Therapiemöglichkeiten	8
1.2 Genetik der Mucopolysaccharidosen	9
1.3 Ziel der Arbeit	10
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	11
2.1.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel	11
2.1.1.2 Puffer und Lösungen.....	12
2.1.1.3 Nucleotide und Nucleinsäuren	12
2.1.1.4 Enzyme	13
2.1.1.5 Kits	13
2.1.1.6 Geräte/ Sonstiges	13
2.1.2 PCR- und Sequenzierungsprimer	14
2.1.3 Patientenkollektiv	15
2.2 Methoden	15
2.2.1 DNA-Extraktion aus Frischblut mittels "Aussalzmethode"	15
2.2.2 Sequenzspezifische Amplifikation genomischer DNA unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
2.2.2.1 Prinzip der PCR	16

2.2.2.2 Praktische Durchführung	17
2.2.2.2.1 PCR-Thermocycler-Bedingungen	17
2.2.2.2.2 Drei-Stufen-PCR	18
2.2.3 Kontrolle des PCR-Amplifikations-Produktes auf	
Agarose-Gel	19
2.2.3.1 Prinzip	19
2.2.3.2 Durchführung	20
2.2.3.2.1 Agarose-Gel-Herstellung	20
2.2.3.2.2 Elektrophorese	20
2.2.3.3 Auswertung	21
2.2.4 Single Strand Conformation Polymorphism-Analyse	
(SSCP)	21
2.2.4.1 Prinzip der SSCP-Analyse	21
2.2.4.2 Durchführung	21
2.2.4.2.1 Gelherstellung	22
2.2.4.2.2 Probenbeschickung	23
2.2.4.2.3 Silberfärbung	23
2.2.4.3 Auswertung der SSCP-Analyse	24
2.2.5 Sequenzierung	25
2.2.5.1 Prinzip der Sequenzierung	25
2.2.5.2 Durchführung	26
2.2.5.2.1 Aufreinigung der PCR-Proben	26
2.2.5.2.2 Sequenzierung	26
2.2.5.2.3 Ausfällung des Sequenzierungsprodukts	27
2.2.5.3 Auswertung	27
2.2.6 Restriktionsverdau	27
2.2.6.1 Prinzip	27
2.2.6.2 Durchführung	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Untersuchungsparameter	29
3.2 Untersuchungsergebnisse	29
3.2.1 Untersuchung in Exon I	29
3.2.1.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse	29
3.2.1.2 Sequenzierung	31
3.2.2 Untersuchung in Exon II	33
3.2.2.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse	33

3.2.2.2 Sequenzierung.....	35
3.2.3 Untersuchung in Exon III	36
3.2.3.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse	36
3.2.3.2 Sequenzierung.....	37
3.2.4 Untersuchung in Exon IV	37
3.2.4.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse	38
3.2.5 Untersuchung in Exon V	38
3.2.5.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse	38
3.2.5.2 Sequenzierung.....	39
3.2.6 Untersuchung in Exon VI	41
3.2.6.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse	41
3.2.6.2 Sequenzierung.....	44
3.2.6.3 Restriktionsverdau	47
3.2.6.4 Mutationsspektrum	47
3.2.6.5 Patientenliste	49
3.2.6.6 Lokalisation der Mutationen	50
4 Diskussion	51
5 Zusammenfassung	56
6 Literaturverzeichnis	58
7 Anhang.....	66
7.1 Klinisches Beispiel für MPS IIIB.....	66
7.1.1 Allgemeine Anamnese.....	66
7.1.1.1 Phase 1	66
7.1.1.2 Phase 2	67
7.1.1.3 Phase 3	67
7.1.1.4 Phase 4	67
7.1.2 Klinische Anamnese	68
8 Lebenslauf.....	69
9 Danksagung	70
10 Erklärung	71

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Mucopolysaccharidosen

1.1.1 Geschichte der Mucopolysaccharidosen

Der Begriff Mucopolysaccharidosen (MPS) umfasst eine Gruppe von Speicherkrankheiten. Allen Erkrankungserscheinungen gemeinsam ist die pathologische Speicherung von nicht (vollständig) abgebauten Glycosaminoglycanen in bestimmten Organellen (Lysosomen) der Zellen und die vermehrte Ausscheidung der aus Aminosuktern und Uronsäuren aufgebauten Kohlenhydrate über die Nieren. Die Glycosaminoglycane fungieren als Gerüstsubstanzen des Bindegewebes oder als Schleimstoffe des Körpers (Literatur bei Beck und Fang-Kircher, 1993).

Eine ältere Bezeichnung für Glycosaminoglycane ist Mucopolysaccharide, wovon der Name der Stoffwechselerkrankungen abgeleitet wurde. Für den Abbau der Glycosaminoglycane sind eine Reihe von Enzymen notwendig, die einen reibungslosen Katabolismus der Kohlenhydratketten in kleine Zuckermoleküle ermöglichen (Neufeld und Muenzer, 1995). Ist eines dieser Enzyme funktionsgestört, so kommt es an dieser Stelle in der Stoffwechselkette zur Akkumulation eines Stoffwechselzwischenprodukts, was als Ursache für diese Speicherkrankheit angesehen wird.

Als Krankheitsbild sind die Mucopolysaccharidosen schon länger bekannt. Erstmals wurde 1835 ein Patient in literarischer Form beschrieben, der einer Sippe mit an M. Hunter (MPS II) erkrankten Mitgliedern entstammte. Ungefähr 120 Jahre später, im Jahre 1954, wurde über diese Sippe in einer wissenschaftlichen Publikation berichtet. Ein chemischer Nachweis der vermehrten Speicherung von Mucopolysacchariden im Organismus konnte Anfang der 50er Jahre erfolgen. Ende der 50er erfolgte der erste Nachweis der vermehrten Mucopolysaccharid-Ausscheidung im Urin eines Hurler-Patienten. Dem nach einem amerikanischen Kinderarzt benannten Subtyp III (M. Sanfilippo) konnten in den Jahren 1971 und 1972 erstmals biochemisch Enzymdefekte zugeordnet werden (Literatur bei Beck und Fang-Kircher, 1993). 1972 wurde das Krankheitsbild der MPS von Spranger an 68 Fällen klinisch ausführlich beschrieben (Spranger, 1972).

1.1.2 Biochemie der Mucopolysaccharidosen

Glycosaminoglycane bestehen aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten, die aus einer Hexuronsäure, einem Aminosucker (dem N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalactosamin) und einer wechselnden Anzahl von Sulfatgruppen an den verschiedenen Positionen der Zuckerringe zusammengesetzt sind. Die Glycosaminoglycane liegen als Ketten von bis zu hundert Disaccharid-Einheiten vor, die an ein zentrales Protein, das "Core-Protein" gebunden sind. Die Kombination von

Protein und Glycosaminoglycan nennt man Proteoglycan. Proteoglycane befinden sich im Extrazellularraum und sind Teil der extrazellulären Matrix, welche die feste Substanz zwischen den Zellen bildet. Sie kommen somit überall im Organismus vor, wie z.B. an der Zelloberfläche, im Bindegewebe, Knorpel, Knochen u.v.m.

Man unterscheidet 7 verschiedene physiologischerweise vorkommende Glycosaminoglycane: Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatan-sulfat, Keratan-sulfat, Hyaluronsäuren, Heparin und Heparan-sulfat. Bei der Mucopolysaccharidose ist das Heparan-sulfat von besonderer Bedeutung. Heparan-sulfat befindet sich in Form kleiner Proteoglycanmoleküle an den Zellmembranen, vor allem an Nervenzellen. Diese Proteoglycane scheinen eine wichtige Funktion für die Interaktion der Zellen untereinander und der sie umgebenden Matrix zu haben (Neufeld und Muenzer, 1995; Beck und Fang-Kircher, 1993).

Der Abbau der Proteoglycane geschieht innerhalb der Zellen in den Lysosomen. In diesen kleinen Vesikeln befinden sich spezifische Enzyme, die den Abbau in einer vorgegebenen Reihenfolge katalysieren. Die Proteoglycane werden hierfür aus dem Extrazellularraum in die Zellen aufgenommen, gelangen in die Lysosomen, werden dort verstoffwechselt und anschließend anderen Stoffwechselwegen zugeführt.

Ist ein Enzym der Stoffwechselkette defekt, wie die N-Acetylglucosaminidase (Figura et al., 1984; Sasaki et al., 1991) bei der MPS IIIB, so kann das Heparan-sulfat nicht vollständig abgebaut werden. Der Abbauweg des Heparan-sulfats ist in der Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. Bei Blockierung dieses Abbaus kommt es zur Akkumulation großer Glycosaminoglycan-Bruchstücke. Die Bruchstücke bleiben in den Lysosomen liegen, werden gespeichert und führen zu einer Anschwellung dieser Organellen, was zu Funktionseinschränkungen der gesamten Zelle führt. Die vergrößerten Lysosomen sind lichtmikroskopisch in manchen Zelltypen sichtbar, gespeichertes Material wird freigesetzt und ist im Urin nachweisbar.

Da Heparan-sulfat eine wichtige Komponente von Nervenzellen darstellt, resultieren die Symptome beim M. Sanfilippo vorwiegend von Seiten des Zentralnervensystems (Beck und Fang-Kircher, 1993).

Neben dem Abbau des Heparan-sulfats hat die α -N-Acetylglucosaminidase womöglich noch andere Aufgaben, was die Migration von Mesenchymzellen während der Embryogenese betrifft (Oliveira, 1994).

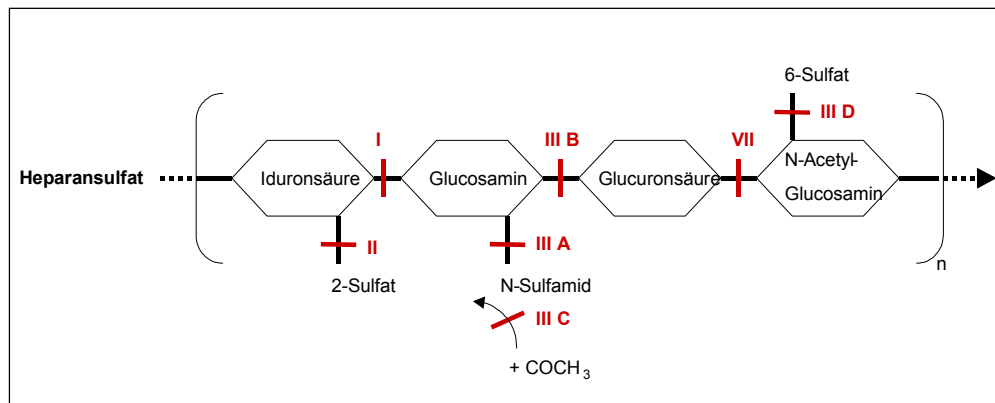


Abb. 1.1: Enzymatischer Abbau von Heparansulfat. Die roten Balken symbolisieren den Ort der Abbaustörung, die römischen Zahlen beziffern den MPS-Typ. Bei der MPS IIIB ist die Spaltung des Glucosamins von der Glucuronsäure gestört.

1.1.3 Nomenklatur

Es lassen sich 7 Formen der Mucopolysaccharidosen unterscheiden, wovon die MPS IX erstmals 1996 klinisch beschrieben wurde (Natowicz et al., 1996) und 1999 molekulargenetisch gesichert werden konnte. Bei dieser neuen Form der Mucopolysaccharidose liegt der Enzymdefekt bei einer von drei Hyaluronidasen vor, welche für den Abbau der Hyaluronsäure (Laurent und Fraser, 1992) verantwortlich sind (Triggs-Raine et al., 1999).

Die Mucopolysaccharidosen werden nach klinischen und biochemischen Merkmalen eingeteilt, wobei diese wiederum in verschiedene Subtypen gegliedert werden. Jedem Typ entsprechen die betroffenen Glycosaminoglycane, und jedem Subtyp wird das entsprechend defekte Enzym zugeordnet. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Formen der Mucopolysaccharidosen. Charakteristisch sind die klinischen Ausprägungen, die für die jeweilige Form typisch sind (Neufeld und Muenzer, 1995).

Tabelle 1.1: Übersicht über die verschiedenen MPS-Formen

MPS-Typ	Synonyme*	Enzymdefekt	betroffene Glycosamino-glycane	Klinische Ausprägung
MPS IH	Hurler	α -L-Iduronidase	Dermatansulfat, Heparansulfat	Hornhauttrübung, Dysostosis multiplex, Organomegalie, Herzerkrankungen, mentale Retardierung, Tod im Kindesalter
MPS IS	Scheie	α -L-Iduronidase	Dermatansulfat, Heparansulfat	Hornhauttrübung, Gelenkversteifungen, normale Intelligenz und Lebenserwartung, reproduktionsfähig
MPS IH/S	Hurler-Scheie	α -L-Iduronidase	Dermatansulfat, Heparansulfat	Mischform zwischen IH und IS
MPS II (schwer)	Hunter (schwer)	Iduronat-Sulfatase	Dermatansulfat, Heparansulfat	Dysostosis multiplex, Organomegalie, keine Hornhauttrübung, mentale Retardierung, Tod im frühen Jugendalter
MPS II (mild)	Hunter (mild)	Iduronat-Sulfatase	Dermatansulfat, Heparansulfat	normale Intelligenz, Kleinwuchs, erreichen Lebensalter von 20-60 Jahren
MPS IIIA	Sanfilippo A	Heparan N-Sulfatase	Heparansulfat	Befall des Nervensystems mit zunehmender mentaler Retardierung ohne wesentliche körperliche Auffälligkeiten, Hyperaktivität
MPS IIIB	Sanfilippo B	α -N-Acetyl-glucosaminidase	Heparansulfat	Phänotyp ähnlich wie IIIA
MPS IIIC	Sanfilippo C	Acetyl-CoA: α -Glucosaminid-Acetyl-Transferase	Heparansulfat	Phänotyp ähnlich wie IIIA
MPS IIID	Sanfilippo D	N-Acetylglucosamin-6-Sulfatase	Heparansulfat	Phänotyp ähnlich wie IIIA
MPS IVA	Morquio A	Galactose-6-Sulfatase	Keratansulfat, Chondroitinsulfat	Dysostosis multiplex, Hornhauttrübung, hypoplastische Zähne, normale Intelligenz
MPS IVB	Morquio B	β -Galactosidase	Keratansulfat, Chondroitinsulfat	Phänotyp ähnlich wie IVA, mildere Ausprägung
MPS V	nicht mehr verwendet			

MPS VI	Maroteaux-Lamy	N-Acetylgalactosamin-4-Sulfatase (Arylsulfatase B)	Dermatansulfat	Dysostosis multiplex, Hornhauttrübung, normale Intelligenz
MPS VII	Sly	β -Glucuronidase	Dermatansulfat, Heparansulfat, Chondroitinsulfat	Dysostosis multiplex, Hepatosplenomegalie, breites Ausprägungsspektrum, von milder bis letaler Form (Hydrops fetalis)
MPS VIII	nicht mehr verwendet			
MPS IX	–	Hyaluronidase	Hyaluronsäure	Kleinwuchs, faziale Dysmorphie, multiple periartikuläre Weichteilaufreibungen, generalisierte Hautschwellungen

* Benennung nach dem klinischen Erstbeschreiber. Die Tabelle gibt einen Überblick über die verschiedenen Formen der Mucopolysaccharidosen, die betroffenen Enzyme, die Glycosaminoglycane und die klinischen Ausprägungen, die für die jeweilige Form typisch sind.

1.1.4 Klinik der Mucopolysaccharidose IIIB

Die Untergruppen A-D der Mucopolysaccharidosen vom Typ III unterscheiden sich hauptsächlich auf Ebene des Enzymdefekts, wobei jeder Untergruppe ein anderes Enzym zuzuordnen ist. Phänotypisch sind die Untergruppen nicht zu differenzieren, da sie alle ähnliche Ausprägungen aufweisen (Kamp et al., 1981).

Beim M. Sanfilippo ist in erster Linie das Nervensystem schwer betroffen, während keine oder nur geringe körperliche Anzeichen für eine Erkrankung sprechen. Die zerebrale Beteiligung in Form von Hirnatrophiezeichen kann mittels Magnetresonanz-Untersuchungen nachgewiesen werden (Murata et al., 1989).

Der Typ IIIB tritt klinisch sehr vielfältig auf. In einigen Fällen liegt eine Hepatosplenomegalie vor (Resnick et al., 1994). Vereinzelt wird über Herzfehler, wie beispielsweise die Mitralinsuffizienz berichtet (Muenzer et al., 1993; Wippermann et al., 1995).

Der Beginn der Erkrankung manifestiert sich meist schon im Kleinkindalter, selten erst im Schulalter oder im Erwachsenenalter. Es sind sowohl milde, als auch schwere Formen beschrieben worden (Andria et al., 1979; Schrojenstein-de Valk und Kamp, 1987). Die Kinder lernen sehr spät laufen und sprechen, sie leiden zunächst an motorischen Koordinationsproblemen und fallen häufig hin. Sie erkranken an rezidivierenden Mittelohrentzündungen, die im Verlauf zu Hörstörungen führen (Cleary und Wraith, 1993). Später verlernen die Kinder die bereits erlernten Fähigkeiten, wie in ganzen Sätzen zu sprechen oder deutlich zu sprechen. Sie stottern, wiederholen Worte, benennen Gegenstände falsch. Sie fangen an, sich wieder einzunässen oder einzukoten. Die Patienten wirken sehr aktiv, unruhig, zeigen wenig Konzentration und Gehorsam.

Die folgende Phase ist geprägt von zunehmender Unruhe bis zur Rastlosigkeit, Ziellosigkeit der Handlungen. Sie zupfen, ziehen und zerren an allem herum, was in ihrer Reichweite liegt, stecken alles in den Mund, zerbeißen und zerstören Gegenstände. Sie leiden an Schlaflosigkeit, streifen nachts ziellos umher, kauen am Bettzeug oder bekommen Lach- oder Schrei-Anfälle. Zwischendurch gibt es Phasen eines stationären Zustandes mit einer scheinbaren Verbesserung, woran sich aktive Phasen anschließen. Nicht selten treten epileptische Krampfanfälle als Zeichen schwerer Gehirnstörungen auf. In der Computer-Tomographie des Schädels lässt sich bereits früh eine Verschmälerung der Hirnrinde nachweisen, mit zunehmendem Verlauf kommt es zu einer schweren Hirnatrophie.

In der letzten Phase der Erkrankung werden die Kinder ruhiger, der Verlust körperlicher Fähigkeiten kommt nun hinzu. Die Kinder haben Schwierigkeiten, sich aus dem Sitzen zu erheben, zu gehen und dabei das Gleichgewicht zu halten. Sie müssen in allen Lebenslagen gepflegt und versorgt werden. Sie beschäftigen sich fast ausschließlich nur noch mit sich selbst, kauen an Fingern und Beiß-Spielzeug und verlieren immer mehr den Kontakt zur Umwelt. Sie hören auf zu sprechen und

schauen meist ins Leere. Letztlich verlieren sie die Fähigkeit, die Muskulatur zu steuern. Sie können nicht mehr kauen, schlucken oder aushusten. Um den Patienten in diesem Stadium am Leben zu erhalten, muss eine künstliche Ernährung mittels Nasen- oder Magensonde vorgenommen werden. Der Schleim aus den Bronchien muss zur Prävention einer Aspiration abgesaugt werden. Dieser Zustand kann sich über einige Jahre erstrecken.

Die ersten Symptome eines M. Sanfilippo zeigen sich mit etwa zwei bis sechs Jahren. Die Patienten erreichen ein Alter von der Pubertät bis maximal ins vierte Lebensjahrzehnt. Viele der Patienten zeigen besonders im Frühstadium der Erkrankung ein unauffälliges Äußeres. Im Verlauf der Erkrankung werden die Haare gröber, dunkeln nach, die Gesichtszüge werden durch den fortschreitenden geistigen Abbau gröber und schlaff. Vom Körperbau her sind die Patienten zunächst meist normalwüchsig. Im Verlauf kann sich eine schwere Skoliose wegen der auftretenden Spastik einstellen (Beck und Fang-Kircher, 1993; Neufeld und Muenzer, 1995).

1.1.5 Diagnostische Abklärung

Zu den einfachsten Methoden, auf das Vorliegen einer Mucopolysaccharidose hin zu testen, zählen die quantitative und qualitative Bestimmung von Glycosaminoglykanen im 24 Stunden-Urin (Teller et al., 1962). Dies geschieht entweder über die Bestimmung des Hexuronsäure-Gehalts oder durch Koppelung an verschiedene Farbstoffe, wie Alzianblau und Dimethylmethylenblau. Bei schweren Formen einer Mucopolysaccharidose kann die Glycosaminoglycan-Ausscheidung 5-10fach erhöht sein gegenüber einem gesunden Kind gleichen Alters. Bei Kindern mit M. Sanfilippo ist die Ausscheidung etwa 2-3fach erhöht, sie kann jedoch auch unauffällig sein, insbesondere bei älteren Kindern. Mittels bakterieller Enzyme als ein neues Instrument der Urinauswertung soll eine Differentialdiagnose der Mucopolysaccharidosen möglich sein (Toma, 1996).

Zur quantitativen Messung werden die Glycosaminoglycane in ihre Einzelfractionen mittels ein- oder zweidimensionaler Elektrophorese oder mit Hilfe einer Dünnschicht-Chromatographie (Kimura et al., 1984) aufgetrennt. Dabei werden die einzelnen für die jeweilige MPS typischen Glycosaminoglycane aufgetrennt, und nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht, ihrem Verhalten im elektrischen Feld oder aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit in verschiedenen Laufmitteln charakterisiert.

Leider besitzt diese Methode nur eine begrenzte Sensitivität (Piraud et al., 1993) und Spezifität, da auch bei anderen Krankheitsbildern der Glycosaminoglycan-Gehalt im Urin vermehrt sein kann, wie z.B. beim Hirnabbau im allgemeinen, bei chronisch entzündlichen Prozessen, bei Hautkrankheiten, beispielsweise bei der Epidermolysis bullosa hereditaria, der Ichthyosis congenita und ektodermaler Dysplasie (Laszlo und Havass, 1985), Erkrankungen der Niere etc. Die Diagnose einer

Mucopolysaccharidose kann daher nur durch den Nachweis des entsprechenden Enzymdefekts definitiv gestellt werden. Die Enzymmessung kann an Serum, Leukozyten oder gezüchteten Hautfibroblasten (Hopwood und Elliott, 1982; Marsh und Fensom, 1985) durchgeführt werden.

Der Enzymnachweis aus dem Serum (Figura et al., 1973, 1975; Whiteman und Young, 1976; Young et al., 1986) ist für Angehörige von Betroffenen womöglich nicht als Ausschlusskriterium einer Genträgerschaft geeignet. Aufgrund der Annahme, es existiere neben dem normalen und dem defekten Allel noch ein hyperaktives Allel, soll es bei Heterozygoten mit einem hyperaktiven Allel zu irreführend normalen α -N-Acetylglucosaminidase-Werten im Serum kommen können (Vance et al. 1980, 1981; Pericak-Vance et al., 1985; Pande et al., 1992).

Bei ungeborenen Kindern kann eine Untersuchung der Plazenta (Kohler, 1988) mittels Chorionzottenbiopsie in der 10. oder 11. Schwangerschaftswoche erfolgen. In der 17. oder 18. Schwangerschaftswoche wird das Fruchtwasser mittels der Amniozentese untersucht. Das gewonnene Material kann sowohl enzymatisch als auch molekulargenetisch untersucht werden, wobei der Enzymdefekt aus Amnion-Zell-Kulturen nachgewiesen wird (Kleijer et al., 1984).

Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden kann auf DNA-Ebene die Genmutation bestimmt werden. Dies hat den Vorteil, Eltern oder Verwandte als Träger zu identifizieren und in einer humangenetischen Einrichtung hinsichtlich ihres Kinderwunsches zu beraten.

1.1.6 Therapiemöglichkeiten

Eine Heilung lysosomaler Speicherkrankheiten ist bisher nicht möglich. Therapeutisch kommen daher in erster Linie symptomatische Maßnahmen in Frage, wie zum Beispiel die operative Behandlung der Komplikationen an der Halswirbelsäule beim M. Morquio (MPS IV) und M. Maroteaux-Lamy (MPS VI) oder das Einsetzen von zerebrospinalen Shunts bei schwerer Unruhe beim M. Sanfilippo (Robertson et al., 1998).

Eine Möglichkeit, die Mucopolysaccharidosen im Verlauf zu mildern, besteht in der Knochenmarks-Transplantation (Vellodi et al., 1992; Gungor und Tuncbilek, 1995). Hierbei werden Spender-Knochenmarkzellen mit möglichst identischen Gewebeeigenschaften (HLA-Antigenen) des Empfängers transfundiert. Diese Zellen wandern in die verschiedenen Gewebe ein und übernehmen den beim Empfänger gestörten Abbau der Mucopolysaccharide.

Diese Methode birgt viele Risiken in sich und hat beim M. Sanfilippo nur in geringem Maße zu einem Rückgang der Hepatosplenomegalie geführt (Resnick et al., 1992). Der Rückschritt der mentalen Entwicklung konnte nur wenig aufgehalten werden. An Risiken seien genannt: Zytostatika-Nebenwirkungen, Graft-versus-host-

Reaktionen (Ippen und Nagel, 1984), Abwehrschwäche gegen bakterielle und virale Infektionen.

Erste klinische Erfolge konnten mit der Enzyersatz-Therapie, bei MPS I verzeichnet werden. Die Enzyersatz-Therapie stellt eine Therapieform dar, bei der das defekte Enzym in Form intravenöser Enzymsubstitution ersetzt wird. Nach ersten Erfolgen der Anwendung dieser Methode bei Hunden (Kakkis et al., 1996), wurden bisher 10 Patienten behandelt, bei denen es zu einer Reduktion der Mucopolysaccharid-Ausscheidung, Rückgang der Größe von Leber und Milz, Verbesserung der Gelenk-Beweglichkeit und deutlicher Verbesserung des Allgemeinzustandes kam (Kakkis, 1999).

Eine der zukunftssträchtesten, jedoch noch nicht ausgereiften Methoden, die auf eine Heilung hoffen lassen, stellt die Gen-Therapie dar. Das Prinzip dieser Behandlung besteht darin, das defekte Gen zu ersetzen und über hämatopoetische Stammzellen in den Organismus einzubringen. Hierfür werden dem Patienten Knochenmarkzellen entnommen, in einer Nährlösung mit einem das entsprechende Gen tragenden Vektor beimpft, und anschließend als genetisch veränderte Zellen dem Empfänger wieder zugeführt (Vieweg, 1996).

Risiken bestehen u.a. in der Verwendung von Viren als Vektoren. Es kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass diese Viren onkogene Wirkung entfalten, wobei der Patient an den onkogenen Folgen versterben könnte (Muul et al., 1997). Aus diesem Grund sind für die Anwendung des gen-therapeutischen Verfahrens am Menschen gründliche Analysen zur Wirksamkeit und zu Nebenwirkungen am Tiermodell Voraussetzung (Neufeld, 1999). Tiermodelle stehen bereits zur Verfügung so auch ein "knock-out"-Mausmodell für die Mucopolysaccharidose Typ IIIB.

1.2 Genetik der Mucopolysaccharidosen

Bei der Mucopolysaccharidose IIIB handelt es sich um einen autosomal-rezessiven Erbgang. Das bedeutet, dass beide Elternteile als heterozygote Träger die Mutationen an ihre Nachkommen weitergeben können, die dann erkranken, wenn sie beide defekten Genkopien ererbt haben.

Der M. Sanfilippo ist mit einer Häufigkeit von ca. 1:53000 in der Bevölkerung vertreten (Poorthuis et al., 1999). Für die Untergruppen A-D gibt es spezifische Häufigkeiten, die regional verschieden sind. So ist der Typ IIIB am häufigsten in Griechenland und der Typ IIIA eher in Nordeuropa zu finden (Beratis et al., 1986; Michelakakis et al., 1995).

Das α -N-Acetylglucosaminidase-Gen wurde 1996 auf dem Chromosom 17q21.1 kartiert und die zugehörige cDNA-Sequenz veröffentlicht (Zhao et al., 1995; Weber et al., 1996; Zhao et al., 1996). Daher waren seit 1996 erstmals Mutations-Untersuchungen im α -N-Acetylglucosaminidase Gen möglich, und es wurden sieben

Mutationen veröffentlicht (Aronovich et al., 1996; Zhao et al., 1996). 1998 wurden 10 weitere Mutationen beschrieben (Schmidtchen et al., 1998), im selben Jahr kamen noch 19 Mutationen von Zhao (Zhao et al., 1998) sowie 12 Mutationen von Beesley (Beesley et al., 1998) hinzu. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit konnten 1997 15 Mutationen und zwei Polymorphismen gefunden werden, 13 davon waren neu (Bunge et al., 1999).

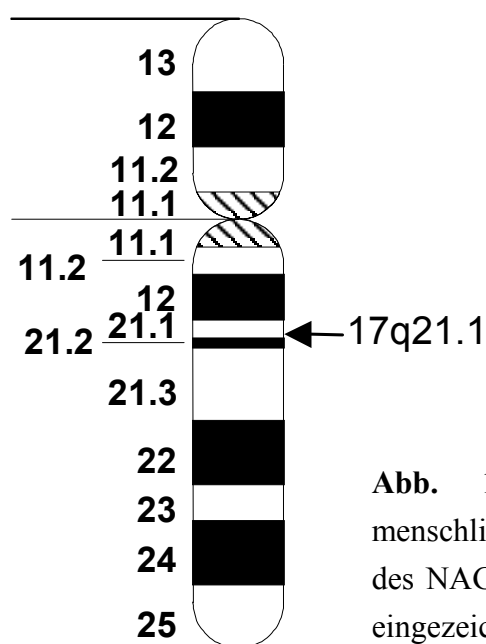


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des menschlichen Chromosoms 17. Die Lokalisation des NAG-Gens im Bereich der Bande 17q21.1 ist eingezeichnet.

1.3 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte in einem Patientenkollektiv von 22 Personen mit autosomal-rezessiv vererbter Mucopolysaccharidose Typ IIIB auf molekular-genetischer Ebene nach Sequenzabweichungen im α -N-Acetylglucosaminidase-Gen gesucht werden. Abweichungen in der genomischen DNA-Sequenz sollten charakterisiert und das Mutationsspektrum aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck wurden die Polymerasekettenreaktion (PCR), "Single-Strand-Conformation-Polymorphism"-Elektrophorese (SSCP), Heteroduplexanalyse, Sequenzierung und Restriktionsenzymverdau eingesetzt. Als Ausgangsmaterial dienten Fibroblasten oder Vollblut, aus dem die genomische DNA zur Untersuchung gewonnen wurde.

Neben dem Schwerpunkt auf dem Gebiet der Molekulargenetik wird im Anhang als Beispiel für einen typischen klinischen Verlauf der MPS IIIB ein Mädchen aus dem Kollektiv vorgestellt.

Mutationsuntersuchungen haben eine große Bedeutung bezüglich der Identifizierung von Patienten als Mutationsträger, um die gezielte Beratung von Verwandten der Anlageträger bezüglich ihrer Nachkommenschaft zu ermöglichen. Hierzu soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten. Außerdem können sich aus der

Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Genotyp und Phänotyp Hinweise auf den zu erwartenden Verlauf der Erkrankung ergeben. Dies ist auch wichtig für die Auswahl der Anwendung neuer Therapiemöglichkeiten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

2.1.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid	Serva, Darmstadt
Agarose, ultra pur	Stratagene, La Jolla, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Essigsäure, 100%	Merck
Ethidiumbromid, 1%	Merck, Darmstadt
Ethylalkohol, 96%	Apotheke, UKE
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd, 37%	Merck
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck
KCl	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
N, N'-Methylenbisacrylamid (Bis)	Serva
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat	Merck
Paraffin flüssig	Merck, Darmstadt
Perfect Match Polymerase Enhancer	Stratagene, La Jolla, USA
Phenol	Gibco/ BRL, Eggenstein
Polyacrylamid (PAA)	Serva, Heidelberg
Restriktionspuffer	Boehringer, Mannheim; Biolabs, Beverly; Gibco/ BRL, Eggenstein
Rotiphenol (TE-gesättigt)	Roth, Karlsruhe

Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid 30%, Bisacrylamid 0,8%)	Roth, Karlsruhe
Salpetersäure, 65%	Merck
Silbernitrat	Merck
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck
Xylencyanol FF	Serva

2.1.1.2 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Thermostabile Lösungen und Kunststoffartikel wurden für 20 Minuten bei 121°C und 1,2 bar im Dampfdruckautoklaven sterilisiert. Thermolabile Lösungen wurden sterilfiltriert und Glasgeräte hitzesterilisiert (4 h, 180°C).

Salpetersäure, 1%	15.4 ml Salpetersäure (65%)/l
10x PCR-Reaktionspuffer	100 mM Tris (pH 8.3) 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ Lagerung bei –20°C
10x TBE	1000 mM Tris 1000 mM Borsäure 20 mM EDTA (pH 8.0)
BRL-Puffer	1000 µl PCR-Puffer 300 µl MgCl ₂
Developer (1l für Silberfärbung)	29.6 g Na ₂ CO ₃ 540 µl Formaldehyd (37%)
Formamid-Probenpuffer (für SSCP)	95% Formamid, deionisiert 20 mM EDTA (pH 8.0) 0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylencyanol FF
Ladepuffer (für PCR-Kontrollen)	0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylencyanol FF 30% Glycerin
TE-Puffer	10 mM Tris (pH 8.0) 1 mM EDTA (pH 8.0)

2.1.1.3 Nucleotide und Nucleinsäuren

Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)
Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP)

Desoxyguanidin-5'-triphosphat (dGTP)	
Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP)	Pharmacia, Freiburg
PBR322, <i>Msp</i> I – Digest	Boehringer, Mannheim
φX174 DNA- <i>Hae</i> III-Digest	Boehringer, Mannheim
 <i>2.1.1.4 Enzyme</i>	
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonuclease: <i>Nci</i> I	New England Biolabs, Inc.
Taq-DNA-Polymerase	Gibco/BRL, Eggenstein
 <i>2.1.1.5 Kits</i>	
<u>PCR-Aufreinigung:</u>	
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
 <u>ABI-Sequencing Kit:</u>	
PRISM™ Ready Reaction Dye	Inhalt:
Terminator Cycle Sequencing Kit	AmpliTaq®
	DNA Polymerase FS
	dNTPs
	dITP
	fluoreszenzmarkierte ddNTPs
	Puffer
	Kontroll-DNA
	Kontroll-Primer
 <i>2.1.1.6 Geräte/ Sonstiges</i>	
0.2 ml Mini Tubes für Sequenzierung	Perkin Elmer, Norwalk, U.S.
0.5 ml-PCR-Tubes	Biozym
1.5 ml-Tubes	Eppendorf
Cycler: GeneAmp™ PCR System 2400	Perkin Elmer, Norwalk, U.S.
DNA Thermocycler „Hybaid“ Omnigene	MWG-Biotech
Elektrophoresekammern für	Gibco BRL, Life Technologies,
Polyacrylamidgele „Model S2“,	Inc.
incl. Glasplatten, Kämme, Spacer	
Elektrophoresekammern für Agarosegele,	Sigma, Aldrich/Techware
incl. Gelschlitten, Kämme	
Feinwaage BP 410	Sartorius AG, Göttingen
Foldback-Klemmer	Guilbert
Folienschweißgerät Vacupack 2 Plus	Krupps, Solingen

Frishhaltefolie	
Glasschalen (35cm x 45.7cm x 2.5cm, feuerfest)	Schott
Kühlzentrifuge EBA 12R	Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer Combimag RCT	IKA, Stauffen
Mikrowellengerät MIKROMAT	AEG
Plastikfolie zum Einschweißen der Polyacrylamidgele	
Schüttelapparat Reax 2000	Heidolph, Germany
Scotch Electrical Tape	3 M
Spannungsgeräte:	
- für Agarosegel-Elektrophoresen: PS 250-2	Sigma Techware
- für SSCP: PS 300-2	Gibco BRL
Thermostat 5436	Eppendorf, Hamburg; Liebisch
UV-Kontaktlampe 320 nm (Mittelwelle)	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Vakuumzentrifuge Speed Vac® Plus SC 110 A	Savant Instruments Inc., Farmingdale, USA
Zellkulturflaschen Falcon	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 PCR- und Sequenzierungsprimer

Primer sind in vitro-synthetisierte Oligonucleotide, deren Sequenz komplementär zur gewünschten genomischen DNA gewählt wird, um spezifisch an diesen Stellen binden zu können. Mit dieser Methode werden selektiv Genabschnitte lokalisiert und anschließend mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden auf der Basis veröffentlichter DNA-Sequenzen (Weber et al., 1996) vom Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie am UKE in Hamburg synthetisiert. Die Sequenzen der PCR-Primer, sowie ihre Größe und Position im NAG-Gen sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Alle Primer wurden in einer Gebrauchslösung von 20 pmol/μl für die Doppelstrang-PCR und 2 pmol/μl für die Sequenzierung angesetzt.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Primer

Primer	Exon	Fragment- größe (bp)	Primer- lokalisation*	Sequenz
NAG 1.1F NAG 1.1R	1.1	367	-194 to -175 274 to 255	5' GGAGCCGGGGTCACACGCTC 3' 5' GCAGCCAGAGCGCGCTCCAC 3'
NAG 1.2F NAG 1.2R	1.2	326	255 to 274 +96 to +77	5' GTGGAGCGCGCTCTGGCTGC 3' 5' GCCAGCGCTCCCCGCTCAGC 3'
NAG 2F NAG 2R	2	320	-82 to -66 +91 to +72	5' TAGGTGGGGGATGGGGGAT 3' 5' GAGACACTGCGCCCATGCTG 3'
NAG 3F NAG 3R	3	377	-80 to -61 +150 to +130	5' CAATGAGTGAATGGTTGTTG 3' 5' CACTGCTGTCCTATGAGAAG 3'
NAG 4F NAG 4R	4	247	-70 to -51 +91 to +72	5' CCTGGGAGATGAGGGCCTTC 3' 5' CCCGGCCCAGAGCTTAAGTT 3'
NAG 5F NAG 5R	5	393	-52 to -33 +84 to +65	5' GTGAACACTATGGCGGCTTC 3' 5' CCCTCTGCCTACCCCTACTG 3'
NAG 6.1F NAG 6.1R	6.1	389	-32 to -13 1479 to 1460	5' TCTTCTCTGTTCCCCCTACC 3' 5' CAGCCATGAGGGAATAGACC 3'
NAG 6.2F NAG 6.2R	6.2	336	1412 to 1431 1747 to 1728	5' CATGGTAGGCACGGGCATGG 3' 5' GAGGGAGCAGATGTGAGCAG 3'
NAG 6.3F NAG 6.3R	6.3	390	1660 to 1679 2049 to 2030	5' GGCCGTCCCTACAGATGAAT 3' 5' CCCACAAGGTCAGCTGGTAG 3'
NAG 6.4F NAG 6.4R	6.4	271	1978 to 1997 2248 to 2229	5' GAGCAGCGGCAGTCAGTGAG 3' 5' GGGTACCTCTGCTTGCTGAG 3'
NAG 6.5F NAG 6.5R	6.5	319	2170 to 2189 2488 to 2469	5' TCCCTTTCCAACAGCACCAG 3' 5' AGGTCATTTCCTCCAATCC 3'

*Primer, die in Exon-Regionen liegen, wurden gemäß Weber (Weber et al.,1996) entsprechend der cDNA bezeichnet. Solche, die in Intron-Regionen liegen, wurden jeweils von der Intron-/ Exon-Grenze aus nummeriert.

2.1.3 Patientenkollektiv

Untersucht wurden DNA-Proben von 22 nicht blutsverwandten Patienten mit autosomal-rezessiv erblicher Mucopolysaccharidose Typ IIIB aus Deutschland, der Türkei, dem Iran, Tschechien, Italien, Polen und Bulgarien. Die Proben der Patienten wurden in Form von Hautfibroblasten-Kulturen, EDTA-Blut oder bereits isolierter DNA von der European Human Cell Bank in Rotterdam oder aus der Universitäts-Kinderklinik in Mainz bezogen. Die klinische Diagnose konnte vor Versand der Proben enzymatisch gesichert werden. Die DNA-Isolierung aus Fibroblasten wurde maßgeblich von Mitarbeitern des Humangenetischen Instituts vorgenommen. Die Isolierung aus EDTA-Blut wurde nach der "Aussalzmethode" durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion aus Frischblut mittels "Aussalzmethode"

Um DNA aus Frischblut zu gewinnen, wurde die 1988 von Miller et al. beschriebene Methode in leicht modifizierter Form angewendet.

Dabei wird zuerst das Frischblut in Falcon-Röhrchen gegossen, mit Leidener-Lösung aufgefüllt und nach guter Durchmischung für 20 min bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Anschließend werden die Proben in der Kühlzentrifuge für 15 min bei 4°C und 6000 rpm zentrifugiert. Nach diesem Vorgang wird der Überstand vorsichtig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, und die Röhrchen erneut mit Leidener-Lösung aufgefüllt. Dieser Vorgang muss dreimal wiederholt werden, bis schließlich ein sauberes, weißes Pellet zurückbleibt. Es folgt die Resuspension des Pellets in 3 ml Lysepuffer, die Zugabe von 300 µl Proteinase K (1 mg Proteinase K pro ml gelöst in 10x TE) und 150 µl 20% SDS. Anschließend wird alles gut durchmischt und im Wasserbad bei 55°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die Proteine ausgefällt mit 1 ml gesättigter 6 M NaCl-Lösung unter kräftigtem Schütteln für 15 sec. Die Röhrchen werden zentrifugiert bei 13000 rpm und Raumtemperatur. Der Überstand wird in frische Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wiederholt sich solange, bis der Überstand vollkommen klar ist, und keine Proteine mehr gefällt werden können.

Die anschließende DNA-Fällung erfolgt nach Zugabe von zwei Volumen 96%igem Ethanol unter leichtem Schwenken des Röhrchens. Die sichtbare DNA-Flocke wird mit einer Pasteur-Pipette extrahiert, in 70%igem Ethanol gewaschen und in 1,9 ml aqua dest. gelöst. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgt bei 4°C im Kühlschrank.

2.2.2 Sequenzspezifische Amplifikation genomischer DNA unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.2.1 Prinzip der PCR

Um die DNA-Fragmente des α -N-Acetylglucosaminidase-Gens untersuchen zu können, bedient man sich der PCR-Methode (Saiki et al., 1988), welche eine gezielte Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte ermöglicht.

Als Polymerasekettenreaktion (PCR) bezeichnet man die identische Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten (z.B. Exone). Dabei bedient man sich eines Elongationsenzym, der thermostabilen DNA-abhängigen Taq-Polymerase, welches aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Thiele, 1991) isoliert wurde. Dieses Enzym hat sein Temperaturoptimum bei 72°C.

Ziel ist es, geringste Mengen an DNA innerhalb kurzer Zeit in großer Kopienzahl zu amplifizieren. Dieser Vorgang ist notwendig zur Untersuchung bestimmter Gen-Abschnitte und zur Detektion von Mutationen im Gen, denn hierzu wird eine ausreichende Menge des entsprechenden DNA-Fragments benötigt.

Die PCR läuft in drei Teilschritten ab:

1. *Denaturierung*: Aufspaltung des DNA-Doppelstranges mittels Hitzedenaturierung bei 94°C.
2. *Annealing*: Herabsenkung der Temperatur auf 50-60°C zur komplementären Anlagerung ("Annealing") der sequenzspezifischen Primer.
3. *Elongation*: DNA-Neusynthese mittels einer Taq-Polymerase, die an die 3'-OH-Gruppen der Primer entsprechend der DNA-Matrize bei 72°C dNTPs anheftet, und ab dort den zu amplifizierenden DNA-Strang neu synthetisiert. Temperaturen von 94-95°C können von diesem Enzym ohne größeren Wirkungsverlust überstanden werden, so daß es bei einmaliger Zugabe mehrere Zyklen übersteht.

Diese drei Schritte werden zyklisch wiederholt, bis schließlich das gewünschte Fragment der Matrix-DNA spezifisch um den Faktor 10^6 - 10^{12} amplifiziert worden ist (Thiele, 1991).

2.2.2.2 Praktische Durchführung

Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden benötigt:

- 100 ng genomische DNA
- 5 µl 10x PCR Reaktionspuffer
- 1 µl eines Gemisches aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP (200 µM pro dNTP)
- 20 pmol der jeweiligen 3'-und 5'-Primer
- 1 U DNA-Taq-Polymerase
- 42 µl a.d.
- 1 Volumen flüssiges Paraffin (Versiegelung zur Verdunstungsprävention)

2.2.2.2.1 PCR-Thermocycler-Bedingungen

Für die PCR-Reaktion befinden sich die bestückten PCR-Tubes in einem programmierbaren DNA-Thermocycler. Dieser wird mit den für jedes Exon spezifischen Bedingungen programmiert (siehe Exon-PCR-Bedingungen, Tab. 2.2), da aufgrund der für jedes Exon variierenden spezifischen Primersequenz auch die PCR-Bedingungs-

Optima in unterschiedlichen Bereichen liegen. Dieses erklärt sich dadurch, dass GC-reiche Primer durch Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen stabiler sind als AT-Bindungen mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen. Deshalb haben GC-reiche Primer einen höheren Schmelzpunkt als AT-reiche, weshalb für GC-reiche Primer eine höhere Annealingtemperatur gewählt werden muss. Das Temperaturoptimum muss experimentell ermittelt werden.

Für alle Exons ist die Anzahl der Zyklen, sowie die Zeitdauer der jeweiligen Zyklen gleich. Es wurde dafür eine sog. Drei-Stufen-PCR mit 35 Zyklen durchgeführt:

2.2.2.2.2 Drei-Stufen-PCR

Zyklusaufbau:

1. Denaturierung bei 94°C für 3 Minuten,
2. Annealing bei einer für jedes Exon spezifischen Temperatur (z.B. Exon I.1 bei 58°C) für 1 Minute,
3. Extension bei 72°C für 1 min 30 sec plus 1 sec für jeden folgenden Zyklus, um einen Leistungsverlust der Polymerase zeitlich auszugleichen. Im letzten Zyklus wird die Extensionszeit auf 5 Minuten ausgedehnt.

Um eine höhere Spezifität der Enzym-Reaktion und den Aktivitätsverlust der Taq-Polymerase zu minimieren, wird ein sog. "hot start" durchgeführt. Dabei wird die Taq-Polymerase erst nach Erwärmung des Reaktionsansatzes auf 94°C (Denaturierung im ersten Zyklus) zum Reaktionsansatz pipettiert.

Tabelle 2.2: PCR-Bedingungen für die verschiedenen DNA-Fragmente

<u>Exon I.1</u> Temp.: 58°C H ₂ O 33 BRL 6,5 dNTP 1,5 DMSO 5 Perf. Match 0,5 Nag 1.1R 1 Nag 1.1F 1	<u>Exon I.2</u> Temp.: 58°C, hot start H ₂ O 33 BRL 6,5 dNTP 1,5 DMSO 5 Perf. Match 0,5 Nag 1.2R 1 Nag 1.2F 1	<u>Exon II</u> Temp.: 62°C H ₂ O 38,5 BRL 6,5 dNTP 1 Perf. Match 0,5 Nag 2R 1 Nag 2F 1	<u>Exon III</u> Temp.: 50°C H ₂ O 39 BRL 6,5 dNTP 1 Nag 3R 1 Nag 3F 1
<u>Exon IV</u> Temp.: 58°C H ₂ O 39 BRL 6,5 dNTP 1 Nag 4R 1 Nag 4F 1	<u>Exon V</u> Temp.: 58°C H ₂ O 39 BRL 6,5 dNTP 1 Nag 5R 1 Nag 5F 1	<u>Exon VI.1</u> Temp.: 58°C H ₂ O 39 BRL 6,5 dNTP 1 Nag 6.1R 1 Nag 6.1F 1	<u>Exon VI.2</u> Temp.: 54°C H ₂ O 39 BRL 6,5 dNTP 1 Nag 6.2R 1 Nag 6.2F 1
<u>Exon VI.3</u> Temp.: 58°C H ₂ O 39 BRL 6,5 dNTP 1 Nag 6.3R 1 Nag 6.3F 1	<u>Exon VI.4</u> Temp.: 58°C H ₂ O 39 BRL 6,5 dNTP 1 Nag 6.4R 1 Nag 6.4F 1	<u>Exon VI.5</u> Temp.: 58°C H ₂ O 39 BRL 6,5 dNTP 1 Nag 6.5R 1 Nag 6.5F 1	

Exon-PCR-Bedingungen: Zahlenangaben in [µl]; Temp.: Annealing-Temperatur, BRL: PCR-Reaktionspuffer, Perf. Match: Perfect Match der Fa. Stratagene (erhöht die Spezifität der PCR)

2.2.3 Kontrolle des PCR-Amplifikations-Produktes auf Agarose-Gel

2.2.3.1 Prinzip

Bevor das PCR-Produkt für die SSCP-Analyse verwendet wird, sollte sichergestellt sein, dass eine ausreichende Menge spezifischen Produkts amplifiziert wurde. Dafür werden 5 µl des erhaltenen PCR-Produkts mit Probenpuffer versetzt, und auf einem 1,5%igen Agarose-Gel bei 100 V und einer Laufzeit von 30 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wird anhand eines aufgetragenen Markers bestimmt (Bunge et al., 1996).

2.2.3.2 Durchführung

2.2.3.2.1 Agarose-Gel-Herstellung

Zur Gelherstellung werden 3 g Agarose mit 200 ml 1x TBE in der Mikrowelle aufgekocht, dann im Wasserbad gekühlt und dabei mit dem Magnetrührer umgerührt.

Bei ca. 60°C werden 20 µl Ethidiumbromid dazugegeben. Bei ca. 50°C wird das Gel auf den Gelschlitten einer Hoefer-Kammer gegossen. Slots werden durch Einsetzen von Kämme erzeugt. Nach Erkalten ist das Gel gebrauchsfertig.

2.2.3.2.2 Elektrophorese

Anschließend wird das Gel mit dem Schlitten in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Als Elektrophoresepuffer wird 1x TBE verwendet. Sodann werden die PCR-Proben (5 µl) mit 2 µl Ladebuffer vermischt und in die Slots pipettiert. Bei 100 V werden die Proben über 30 min aufgetrennt. Die Auswertung geschieht mittels einer UV-Kontaktlampe, in deren Licht die Doppelstrang-DNA-Banden sichtbar werden. Das Ethidiumbromid lagert sich in Doppelstrang-DNA ein und leuchtet unter UV-Licht rot auf. Nach Intensität und Lokalisation der Banden konnte ausgewertet werden, ob quantitativ ausreichend und qualitativ das richtige Exon amplifiziert wurden, oder ob es sich um ein unspezifisches Produkt handelte. Die Fragmentgröße kann anhand des mitgelaufenen Markers ermittelt werden. Zur Dokumentation wird das Gel anschließend unter der UV-Lampe abfotografiert.

Chemikalien-Rezepte:

10x TBE (Vorratslösung, pro l):

- 121,14 g Tris (1 M)
- 61,8 g Borsäure (1 M)
- 7,44 g EDTA (20 mM)
- a.d. ad 1 l

Auf Magnetrührer vollständig lösen und anschließend filtrieren.

1x TBE:

1x TBE wurde aus 10x TBE durch Verdünnung mit aqua dest. hergestellt.

Ladebuffer für Agarosegele:

- 0,25% Bromphenol-Blau
- 0,25% Xylene cyanol FF
- 30% Glycerin (30 g auf 100 ml)

-
- 69,5% a.d.

2.2.3.3 Auswertung

Die Intensität der Banden gibt Aufschluss über die Menge des Produkts. Dabei ist die Intensität proportional zur Konzentration. Für die weitere Verarbeitung der PCR-Proben ist es ausreichend, wenn die Banden sichtbar sind.

2.2.4 Single Strand Conformation Polymorphism-Analyse (SSCP)

2.2.4.1 Prinzip der SSCP-Analyse

Die Single Strand Conformation Polymorphism-Analyse (SSCP) als Screening-Methode zur Entdeckung von Mutationen im menschlichen Genom basiert auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von Einzelstrang-Nucleinsäure-Fragmenten in nichtdenaturierenden Polyacrylamid (PAA)-Gelen. Durch Bindungskräfte intramolekularer Basenpaarungen (Wasserstoffbrückenbindungen) nimmt jeder Einzelstrang entsprechend seiner Basenabfolge und seiner Fragmentgröße eine spezifische Sekundärstruktur (Konformation) ein, die seine Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld bestimmt.

Zur Mutationsdetektion lassen sich selbst kleinste Veränderungen der Basenabfolge über eine Änderung der Sekundärstruktur und damit über eine Änderung der Mobilität (Mobility Shift) des Fragments als Veränderung des Bandenmusters auf dem PAA-Gel in der SSCP-Analyse erkennen (Orita et al., 1989).

Neben der Basensequenz gibt es auch physikalisch-chemische Einflussgrößen auf das Laufverhalten der Fragmente, welche bei der Auswertung bedacht werden müssen. Dazu zählen: Temperatur, Elektrophoresespannung und -stromstärke (beeinflusst Laufgeschwindigkeit, Wärmebildung), Glycerol (wirkt denaturierend), Ionenstärke (wird beeinflusst durch Konzentration von TBE im Gel), Polyacrylamid, Mischungsverhältnis von Acrylamid/ N, N'-Bisacrylamid (beeinflusst die Porengröße des Gels) (Hayashi, 1991).

2.2.4.2 Durchführung

Zunächst wurde ein PAA-Gel hergestellt:

Dafür werden zwei ethanolgereinigte Glasplatten aufeinander gelegt, wobei die eine Glasplatte an einer Seite mit einem Überstand von 2 cm übersteht. Mit zwei Abstandhaltern (Spacer) der Dicke 0.8 mm werden die Platten am Rand auseinander gehalten und mittels Scotch Electrical Tape seitlich abgedichtet. Zur Fixation der Platten werden diese mit Foldback-Klemmern gehalten.

2.2.4.2.1 Gelherstellung

Für optimale SSCP-Ergebnisse wurden für jedes Exon PAA-Gele mit unterschiedlichen Glycerin-Konzentrationen hergestellt, da die Exons, abhängig von ihrer Länge und Basenzusammensetzung, verschiedene Optima aufweisen.

150 ml PAA-Gel 10% Glycerin:

- 15 ml Glycerin (~10%)
- 15 ml 10x TBE
- 40 ml 30%ig PAA (~8%)
- 79 ml a.d.
- 1 ml APS (10%ig)
- 35 µl Temed

150 ml PAA-Gel ohne Glycerin:

- 7,5 ml 10x TBE
- 40 ml 30%ig PAA
- 101,5 ml a.d.
- 1 ml APS (10%ig)
- 35 µl Temed

150 ml PAA-Gel 5% Glycerin:

- 7,5 ml Glycerin
- 15 ml 10x TBE
- 40 ml 30%ig PAA
- 86,5 ml a.d.
- 1 ml APS (10%ig)
- 35 µl Temed

Chemikalien-Rezept:

APS (Ammoniumpersulfat) 10%ig:

9 ml aqua dest. auf 1 g Ammoniumpersulfat (APS), Haltbarkeit von ca. 2 Wochen.

Die Gelbestandteile wurden bis auf APS und Temed auf dem Magnetrührer gemischt. Mit der Zugabe von APS und Temed wurde die Polymerisation des Gels gestartet. Für das Gießen zwischen die Glasplatten blieben ca. 5 Minuten Zeit.

Für den Gießvorgang wurden die Platten etwas angehoben und das Gel an der offenen Seite vorsichtig unter leichtem Schütteln und Senkrechtstellen der Platten unter Verhinderung von Lufteinschlüssen hineingegossen. Anschließend wurde das Gel horizontal gelagert und an der offenen Seite etwas angehört. Zur Fertigung von

Geltaschen für die spätere Probenplatzierung wurde an der offenen Stelle als Abschluss eine Kammleiste mit 32 Zähnen eingesetzt.

Nach ca. 2 Stunden war die Polymerisation abgeschlossen, das Gel konnte mitsamt der Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt werden. Zur Abdichtung wurde Agarose-Gel erhitzt und mit einer Pipette an den undichten Randstellen platziert. Diese Abdichtung sollte das Auslaufen des Elektrophoresepuffers verhindern.

Als Elektrophoresepuffer sind für ein Gel mit 10% Glycerin 1x TBE, für PAA-Gele ohne Glycerin und mit 5% Glycerin 0,5x TBE verwendet worden. Der Puffer wurde nach zuvoriger Freispülung der Geltaschen in die obere Pufferkammer eingefüllt. Anschließend erfolgte die Probenbeschickung.

2.2.4.2.2 Probenbeschickung

Chemikalien-Rezept:

10 ml Formamid-Probenpuffer:

- 9,5 ml 95% Formamid
- 0,4 ml 20 mmol EDTA
- 0,05% Bromphenolblau
- 0,05% Xylenzanol
- 0,1 ml a.d.

Je Probe wurden 8 µl PCR-Produkt mit 8 µl Formamid-Probenpuffer in Tubes gegeben. Diese wurden für 10 Minuten bei 95°C denaturiert, anschließend für 5 Minuten auf Eis gekühlt, kurz anzentrifugiert und sofort in die Geltaschen pipettiert. Als DNA-Längenstandard wurde pBR 322/ *MspI* eingesetzt.

Die Gelelektrophorese erfolgte bei ca. 16-25 W für 12-14 h über Nacht. Nach Ablauf der Zeit wurde das PAA-Gel von den Glasscheiben getrennt und in eine mit 10% ETOH gefüllte flache Glasschale überführt.

2.2.4.2.3 Silberfärbung

Das Prinzip der Silberfärbung besteht in der Anlagerung von Silbernitrat an die im Gel enthaltene DNA. Durch Reduzierung zu elementarem Silber werden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Für sämtliche Lösungen in der SSCP-Analyse und der Färbung wurde aqua dest. verwendet, da sich das Silbernitrat während der Färbung sowohl an DNA als auch an Ionen in nichtdestilliertem Wasser anlagert. Somit wurde die Hintergrundfärbung des Gels niedrig gehalten. Die Färbung wurde gemäß den Angaben von Budowle et al. (1991) geringfügig modifiziert nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Gel in flache Schale mit 10% ETOH geben
- 10 Minuten unter dem Abzug schwenken (Fixierung der DNA)

-
- ETOH vorsichtig absaugen
 - Zugabe von 1%iger Salpetersäure (Oxidierung)
 - 3 Minuten schwenken lassen
 - Absaugen der Salpetersäure
 - aqua dest. hinzugeben, für 1 Minute schwenken, absaugen, (1x wiederholen)
 - 0,012 M Silbernitrat zugeben
 - 20 Minuten schwenken (Silberfärbung)
 - 2x mit a.d. für je 1 Minute nachspülen
 - Entwickler hinzugeben, erst wenig, dann absaugen
 - Gel vollständig mit Entwickler bedecken
 - Entwickeln lassen (Reduzierung)
 - Absaugen
 - Fixierung mit 10%iger Essigsäure für 5 Minuten

Anschließend wurde das Gel in Plastikfolie eingeschweißt und so, vor Austrocknung geschützt, lagerungsfähig gemacht. Im Fotolabor wurde das Gel fotografisch festgehalten.

Chemikalien-Rezepte:

1%ige Salpetersäure:

15,4 ml Salpetersäure auf 1 l a.d.

Silbernitrat:

4,04 g Silbernitrat auf 2 l a.d.

Entwickler:

59,2 ml Na_2CO_3 + 1080 μl Formaldehyd auf 2 l a.d.

2.2.4.3 Auswertung der SSCP-Analyse

Vor der Elektrophorese wurde das PCR-Produkt mittels Hitzedenaturierung in zwei komplementäre Einzelstränge aufgetrennt. Jeder Einzelstrang kann während der Elektrophorese eine stabile Konformation einnehmen, weshalb auf dem Gel mindestens zwei Einzelstrangbanden zu sehen sind. Neben dem Denaturierungs-Produkt existiert auch immer ein Teil des PCR-Produkts in einer Doppelstrang-Form, so dass neben den zwei Einzelstrangbanden auch immer eine etwas dickere Doppelstrangbande zu sehen ist, welche aufgrund der höheren Laufgeschwindigkeit unterhalb der Einzelstrangbanden liegt.

Auffälligkeiten zeigen sich in der Anzahl der Banden, z.B. beim Auftreten zusätzlicher Banden, wenn aufgrund einer DNA-Veränderung mehrere Konformationen möglich werden. Auch das Erscheinen zweier Doppelstrangbanden (Heteroduplex) kann ebenfalls

auf eine Mutation hinweisen (Michaud et al., 1992; Ravnik-Glavac et al., 1994). Jene Proben, bei denen sich Auffälligkeiten im Vergleich zu anderen Proben desselben Exons zeigten, wurden mit 50 PCR-Proben eines zufällig ausgewählten Personen-Kollektivs einer erneuten SSCP-Analyse unterzogen. Dadurch konnten die Auffälligkeiten als Mutationen bestätigt werden, falls diese sich in den Kontrollen nicht zeigten. Traten diese jedoch auch im Kontroll-Kollektiv auf, so konnte von einem Polymorphismus ausgegangen werden. Zur genaueren Spezifizierung der Mutationen wurden die auffälligen Proben anschließend sequenziert.

2.2.5 Sequenzierung

2.2.5.1 Prinzip der Sequenzierung

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung ist es möglich, die Basensequenz in DNA-Fragmenten zu bestimmen. Sie arbeitet nach dem Prinzip des Kettenabbruchs in einer enzymatisch vermittelten DNA-Synthesereaktion (Sanger et al., 1977; Smith, 1980). Die dabei entstehenden unterschiedlich großen DNA-Fragmente spiegeln durch ihre Größe und ihr Laufverhalten in der Elektrophorese die Position der jeweiligen Nucleotidbase wieder. Die Basensequenz des untersuchten DNA-Abschnittes kann so ermittelt werden. Die Aufreinigung der PCR-Proben, die Sequenzierung und die Ausfällung des Sequenz-Produkts bis zur Trocknung wurden selbst vorgenommen. Die Auftragung des Sequenz-Produkts auf ein Polyacrylamid-Gel und die Anfertigung des Sequenz ausdrucks wurden im Institut für Zell- und Neurobiologie (Prof. Richter), Universitäts-Klinikum Eppendorf, durchgeführt.

Dabei möchte ich an dieser Stelle kurz auf den Sequenzierungsvorgang eingehen:

Bei der Sequenzierungsreaktion wird ein sequenzspezifischer Primer eingesetzt, der eine Extension durch DNA-Polymerase ermöglicht. Bei dieser Extension erreicht man durch Zugabe von 2',3'-Didesoxynucleotiden (ddNTPs), die sich von normalen 2'-Desoxynucleotiden (dNTPs) durch das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe unterscheiden, einen basenspezifischen Kettenabbruch. Mischt man sequenzspezifischen Primer, DNA-Matrize und ein ddNTP eines der vier Nucleotide mit allen vier NTPs zusammen, so resultiert eine Mischung aus Fragmenten unterschiedlicher Länge, die jeweils am 3'-Ende ein ddNTP der jeweiligen Base aufweisen (entweder ddA, ddC, ddT oder ddG).

Es wird eine "Cycle"-Sequenzierung unter Verwendung eines Kits durchgeführt, das die Didesoxynucleotide enthält, die mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (sog. "Dye"-Terminatoren). Die Analyse der Sequenzierungsprodukte erfolgt durch Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamidgel und automatischer lasergestützter Detektion der verschiedenen Fragmente (ABI-Prism™-Sequencer, Modell 377, PE Applied Biosystems). Nach Computerauswertung wird die Sequenz ausgedruckt.

2.2.5.2 Durchführung

2.2.5.2.1 Aufreinigung der PCR-Proben

Für den Sequenzierungsvorgang müssen die PCR-Proben zunächst gereinigt werden, wobei die Primer entfernt werden.

Zuerst werden 50 bis 80 µl Chloroform auf das PCR-Produkt in das PCR-Tube pipettiert, kurz gemischt, und anschließend bei 7000 U/min für 2 min zentrifugiert. Das PCR-Produkt schwimmt als Blase auf dem Paraffin. Für den nächsten Schritt bereitet man ein 1,5 ml Tube mit aufgesetztem "Microcan"-Filter vor, in den zunächst 400 µl TE-Puffer (1x) hineingegeben werden. Die Blase aus dem PCR-Tube wird mit einer 100 µl-Pipette vorsichtig abpipettiert und auf den Filter gegeben. Der Filter wird mit einer Kappe verschlossen und bei 2500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Im nächsten Schritt wird das Filtrat verworfen. Es werden erneut 400 µl TE (1x) in den Filter pipettiert und bei 2500 U/min für 12 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wird anschließend wieder verworfen. Dann werden 400 µl aqua dest. in den Filter gegeben, für 10 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert, und das Filtrat entfernt. Der Filter wird abgenommen und auf ein Neues 1,5 ml-Tube umgedreht aufgesetzt. Dieses wird für 2 Minuten zentrifugiert. Am Boden des Tubes befindet sich nun das gereinigte PCR-Produkt. Dieses wird vorsichtig in kleine Tubes pipettiert, und für die Sequenzierung entweder sofort weiterverarbeitet oder zunächst eingefroren.

Chemikalien-Rezept:

10x TE-Puffer:

100 mmol Tris + 10 mmol EDTA

2.2.5.2.2 Sequenzierung

Für die Sequenzierung werden die Primer auf 2 pmol/µl verdünnt.

Reaktionsansatz:

7,5 µl a.d.

1,6 µl Primer (2 pmol/µl)

5 µl PCR-Produkt, gereinigt

6 µl Sequenzierungs-Mix (Terminator Ready RXN-Mix, Perkin Elmer)

20 µl

Anschließend werden die Proben im Sequencer nach folgendem Programm sequenziert:

1. Schnelle Erhitzung auf 95°C, Temperatur halten bei 95°C für 10 sec, schnelle Abkühlung auf 50°C, Temperatur halten bei 50°C für 5 sec, schnelle Erhitzung auf 60°C, Temperatur halten auf 60°C für 4 min.
2. Wiederholung von Schritt 1 für 25 Zyklen

3. Abkühlung auf 4°C und diese Temperatur halten.

Die Proben werden weiterverarbeitet wie unter Schritt 2.2.5.2.3 beschrieben oder zunächst im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.5.2.3 Ausfällung des Sequenzierungsprodukts

Um das Sequenzierungsprodukt zu gewinnen, muss es zunächst mittels der Ethanol-Ausfällmethode extrahiert werden. Dafür wird für jede Probe ein 1,5 ml-Tube mit 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 50 µl 95% Ethanol vorbereitet, anschließend die 20 µl Sequenzierungsprodukt hinzupipettiert, auf dem Schüttelapparat geschüttelt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Die Proben werden sodann bei 14.000 U/min für 15-30 Minuten zentrifugiert. Um an das Pellet heranzukommen, wird der Ethanol-Überstand mit einer Micropipette vorsichtig abgenommen. Dann wird das Pellet nochmals mit 250 µl 70% Ethanol gespült. Das Ethanol wird sofort wieder abpipettiert, wobei das Pellet nicht beschädigt werden darf. Abschließend wird das kaum sichtbare Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.2.5.3 Auswertung

Die getrockneten Proben wurden im Institut für Zell- und Neurobiologie, Universitäts-Klinikum Eppendorf, einer automatischen Fragmentanalyse mit Hilfe eines ABI-Prism™-Sequencers (Model 377, PE Applied Biosystems) unterzogen, und die Basensequenzen mit Hilfe des Computers ausgedruckt. Als Nächstes mussten die erhaltenen Sequenzen mit der Nucleotid-Sequenz der cDNA (Weber et al., 1996) des α -N-Acetylglucosaminidase-Gens verglichen und Sequenzabweichungen festgestellt werden.

2.2.6 Restriktionsverdau

2.2.6.1 Prinzip

Mit Hilfe des Programms DNasis wurden die veränderten DNA-Sequenzen auf Änderungen von Restriktionsenzym-Schnittstellen überprüft. Das Programm DNasis hat sämtliche Erkennungssequenzen von Restriktionsendonucleasen abgespeichert, und gibt in der cDNA enthaltene Schnittstellen an. Im Falle einer gefundenen Mutation wurden die normale Sequenz und die Sequenz mit der Mutation durch das Programm darauf überprüft, ob mutationsbedingt Schnittstellen an dieser Stelle entstanden sind oder auch wegfielen. Im Falle einer Schnittstellenveränderung wurde das PCR-Fragment mit entsprechenden Restriktionsenzymen im Restriktionsverdau verdaut. Nach Gelelektrophorese ergab sich ein vom Wildtyp zu unterscheidendes Bandenmuster, so daß hiermit die Mutation zusätzlich mit dieser Methode bestätigt werden konnte.

Anmerkung: Restriktionsenzyme (Restriktionsendonucleasen) sind endolytische DNasen prokaryontischen Ursprungs. Die Namen der Enzyme sind vom jeweiligen Bakterium abgeleitet, in dem sie vorkommen. Die Enzyme schneiden doppel-

strängige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Somit liefert jedes DNA-Fragment ein spezifisches Restriktionsmuster gemäß der vorhandenen Erkennungssequenzen in diesem Fragment (Smith und Birnstiel, 1976).

2.2.6.2 Durchführung

Für die Durchführung hält man sich an die vom Hersteller für das betreffende Restriktionsenzym geltenden Angaben. Beispiel-Ansatz für das Enzym *NciI*, mit dem Exon VI.5 enzymatisch gespalten werden konnte:

- 10-20 µl PCR-Produkt von Exon VI.5
- 5 µl 10x Reaktionspuffer (vom Hersteller "New England Biolabs, Inc." mitgeliefert), enth.: 20 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l Mg(CH₃COO)₂, 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l Dithioerythritol (DTE).
- 2 U Restriktionsendonuclease *NciI*
- a.d. ad 50µl.

Der Ansatz wurde in 1,5 ml-Tubes pipettiert, anschließend in einen auf 37°C vorgeheizten Laborthermostaten gestellt und die darin enthaltene DNA für zwei Stunden verdaut. Nach einer Stunde wurde in den Ansatz noch 1 Unit des Restriktionsenzym zwecks erhöhter Verdauwirkung nachpipettiert. Nach Ende des Verdaus konnte das Produkt entweder bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden, oder es wurde direkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Resultat konnte dann mittels Gelelektrophorese und anschließender Ansicht unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden. Fotografisch wurde das Ergebnis dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungsparameter

Als Untersuchungsmaterial diente isolierte genomische DNA von 22 nicht blutsverwandten Patienten mit MPS IIIB (durchnummeriert von IIIB1 bis IIIB22) (2.1.3). Mit Hilfe der in Tab. 2.1 (2.1.2) aufgelisteten Primer war es möglich, die Exons des α -N-Acetylglucosaminidase-Gens für jeden Patienten spezifisch aus der genomischen DNA zu amplifizieren.

Als Grundlage zur Untersuchung dieses Gens auf mögliche Mutationen bediente man sich der Methoden der PCR (2.2.2) und der SSCP-Analyse (2.2.4). Im Folgenden wurden die in der SSCP-Analyse auffälligen Proben sequenziert (2.2.5). Bei Entstehung von Restriktionsstellen-Veränderungen wurden diese mittels des Restriktionsverdaus (2.2.6) überprüft.

3.2 Untersuchungsergebnisse

3.2.1 Untersuchung in Exon I

Exon I wurde wegen seiner Größe von 484 bp in zwei überlappende DNA-Abschnitte unterteilt. Exon I.1 ist ein 367 bp großes Fragment, Exon I.2 umfasst 326 bp.

Aus der DNA-Probe IIIB3 ließen sich auch nach Austestung sämtlicher PCR-Bedingungen die Exons I.1 und I.2 nicht amplifizieren und konnten somit in der SSCP-Analyse nicht untersucht werden. Möglicherweise war die Qualität der DNA nicht ausreichend für die Amplifikation dieses Exons. Eine andere DNA-Probe dieses Patienten war nicht verfügbar.

Die beste Bandendarstellung von Exon I.1 und I.2 gelang mittels eines 8%igen Polyacrylamidgels (PAA-Gel) ohne Glycerinzusatz.

3.2.1.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse

Bei den Wildtyp-Proben findet sich ein einheitliches Muster von zwei schwächeren Banden im Einzelstrangbereich und einer starken Bande ohne Heteroduplexes im Doppelstrangbereich (Abb. 3.2). Die DNA-Probe IIIB9 weist in Exon I.1 eine Verdoppelung der Doppelstrangbande (Heteroduplex) auf (Abb. 3.2). Probe IIIB13 zeigt in Exon I.2 zwei Doppelstrangbanden und zwei Heteroduplexbanden (Abb. 3.1). Bei Probe IIIB18 ist ein verzögertes Laufverhalten der Doppelstrangbande auffällig (nicht abgebildet).



Abb. 3.1: SSCP-Analyse in Exon I.2. Spur 11 entspricht Probe IIIB13. Heteroduplices sind mit Pfeilen markiert, * kennzeichnet eine zusätzliche Doppelstrangbande.

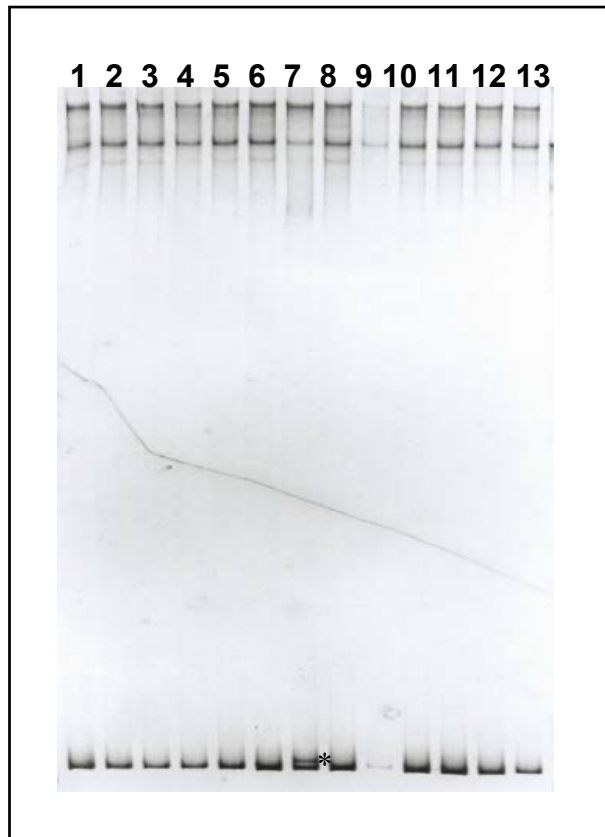


Abb. 3.2: SSCP-Analyse in Exon I.1 des α -N-Acetylglucosaminidase-Gens. Spur 7 repräsentiert Probe IIIB9 und weist einen Heteroduplex auf (*). Die anderen Spuren zeigen das Wildtyp-Muster.

3.2.1.2 Sequenzierung

M1L: Die Sequenzierung von Probe IIIB9 zeigt im Vergleich mit der veröffentlichten cDNA-Sequenz (Weber et al., 1996) eine Punktmutation im Codon 1 des α -N-Acetylglucosaminidase-Gens (ATG $\rightarrow$ TTG) in heterozygoter Form (Abb. 3.3). Der Basenaustausch soll zu einem Austausch von Methionin zu Leucin führen.

338ins24: Die Sequenzierung von Probe IIIB13 ergibt eine Duplikation von 24 Nucleotiden in heterozygoter Form an Stelle 315-338 bp abwärts (cDNA). Das entspricht einer Duplikation von 8 Aminosäuren an der Stelle 72-79. Probe IIIB18 zeigt dieselbe Duplikation, allerdings liegt diese in homozygoter Form vor. Abb. 3.4 zeigt die Sequenzierung der Probe IIIB18.

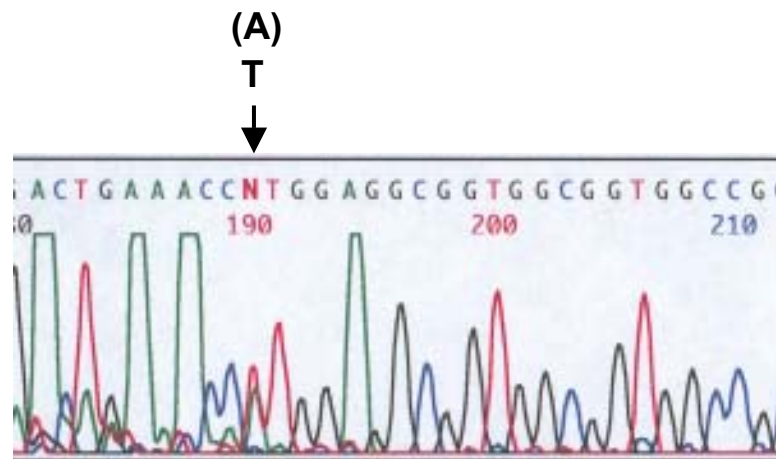


Abb. 3.3: Sequenzierung der Probe IIIB9, Exon I: M1L in heterozygoter Form, Nucleotidveränderung: ATG → TTG, (Wildtyp in Klammern)

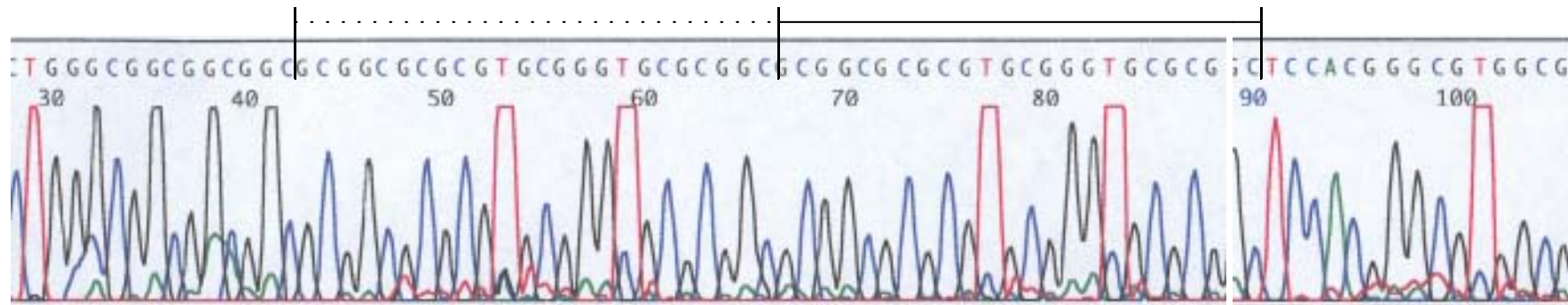


Abb.3.4: Sequenzierung der Probe IIIB18, Exon I: 338ins24 in homozygoter Form, Duplikation von 24 Nucleotiden, durchgezogene Linie markiert die duplizierte Sequenz.

3.2.2 Untersuchung in Exon II

Exon II wurde als 320 bp großes Fragment amplifiziert. Eine optimale Bandendarstellung konnte mittels eines 8%igen PAA-Gels mit einer Glycerinkonzentration von 10% erreicht werden.

3.2.2.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse

Die Amplifikate von Wildtyp-DNA ergeben ein uneinheitliches Muster der Einzelstränge. Neben einer relativ einheitlichen Einzelstrangbande gibt es zwei oder eine von zwei unterschiedlichen Banden (Abb. 3.5). In solchen Spuren mit den zwei Einzelstrangbanden findet sich im Doppelstrangbereich eine zarte Heteroduplexbande (nicht abgebildet).

Das uneinheitliche Muster der Einzelstränge kann durch einen im Intronbereich lokalisierten Polymorphismus (IVS2+50g→c) erklärt werden. Von 50 Kontrollproben sind 5 Proben (10%) homozygot entsprechend dem Wildtyp (g), 20 Proben (40%) heterozygot (g/c) und 25 Proben (50%) homozygot entsprechend dem Polymorphismus (c). Von den Patienten entsprechen 6 (27%) dem Wildtyp, 3 (14%) sind heterozygot und 13 (59%) entsprechen dem Polymorphismus. Die Allelhäufigkeit beträgt 0.66 (c) und 0.34 (g) (Abb. 3.5).

Die DNA-Proben IIIB1, IIIB5 und IIIB11 weisen neben dem Muster des hier beschriebenen Polymorphismus noch eine andere, etwas tiefer stehende Bande im Einzelstrangbereich auf. Im Doppelstrang ist eine minimale Verbreiterung der Bande zu erkennen. Probe IIIB2 trägt homozygot den Polymorphismus und eine weitere Einzelstrangbande, welche im Laufverhalten etwas schneller ist. Die Doppelstrangbande erscheint schwach in Form eines Heteroduplex (Abb. 3.6).

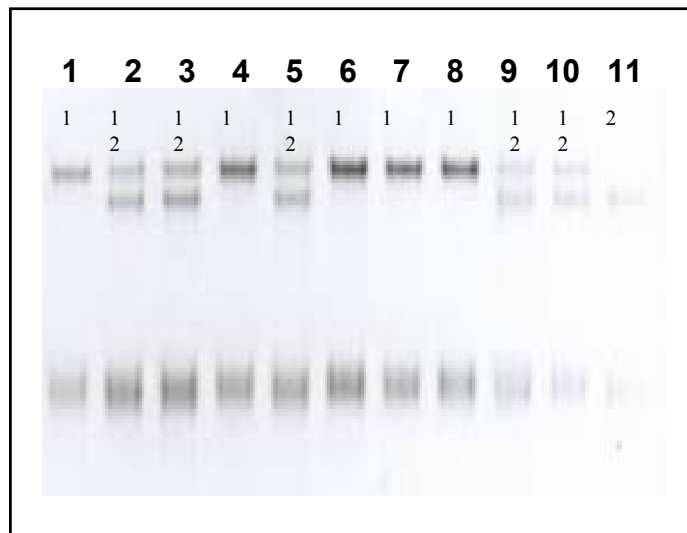


Abb. 3.5: SSCP-Analyse in Exon II von Kontroll-DNAs. IVS2+50g→c, Spuren 1, 4, 6, 7 und 8 repräsentieren die Sequenzvariante "c" in homozygoter Form (1), Spuren 2, 3, 5, 9 und 10 zeigen das Muster der heterozygoten Form (1/2), Spur 11 das "g"-Allel in homozygoter Form (2). 1=c, 2=g

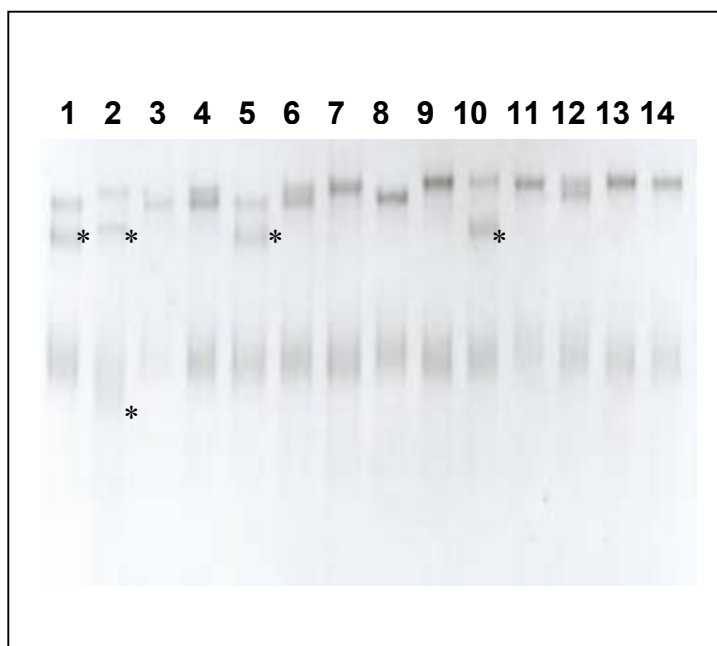


Abb. 3.6: SSCP-Analyse in Exon II des α -N-Acetylglucosaminidase-Gens bei Patienten mit MPS IIIB. Einzelstrangbanden, die in ihrem Laufverhalten von Kontrollproben abweichen, sind mit * gekennzeichnet. Spuren 1 (IIIB1), 5 (IIIB5) und 10 (IIIB11) weisen eine ähnliche zusätzliche Einzelstrangbande auf, Spur 2 (IIIB2) hat ebenfalls eine zusätzliche Einzelstrangbande mit einer etwas verkürzten Laufstrecke gegenüber der Extrabande.

3.2.2.2 Sequenzierung

IVS2+50g→c: Die Sequenzierung von Probe IIIB6 (Abb. 3.7) zeigt an der Stelle IVS2+50 ein heterozygotes Vorliegen der Basen Guanin und Cytosin. Da diese Abweichung vom Wildtyp in einem Bereich des Introns liegt, sollte sie keinen Einfluss auf die Bildung des Enzymproteins haben und ist somit als Polymorphismus anzusehen.

Y140C: Die Proben IIIB1, IIIB5 und IIIB11 weisen alle dieselbe Punktmutation im Codon 140 des α -N-Acetylglucosaminidase-Gens (TAC → TGC) in heterozygoter Form auf (Abb. 3.8). Der Basenaustausch soll auf Proteinebene zu einem Austausch von Tyrosin zu Cystein führen.

delF142: Probe IIIB2 weist eine Deletion im Codon 142 in heterozygoter Form auf, wobei die drei Basen TTC fehlen. Dabei soll es auf Proteinebene an dieser Stelle zum Verlust der Aminosäure Phenylalanin kommen (Abb. 3.9).

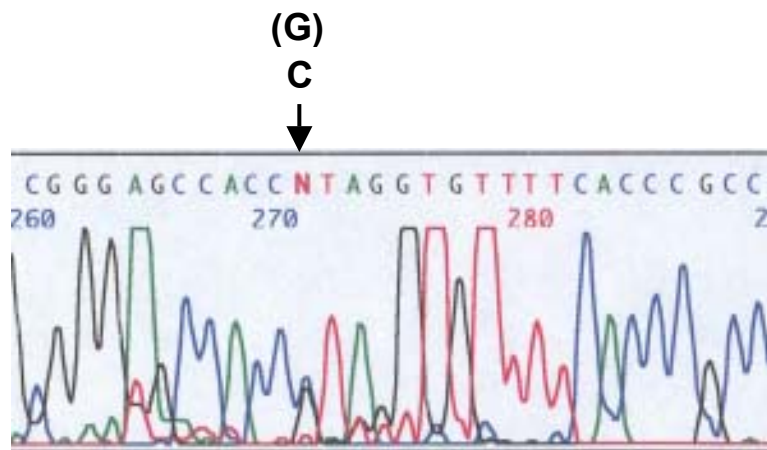


Abb. 3.7: Patient IIIB6 mit Polymorphismus IVS2+50g→c, (Wildtyp in Klammern)

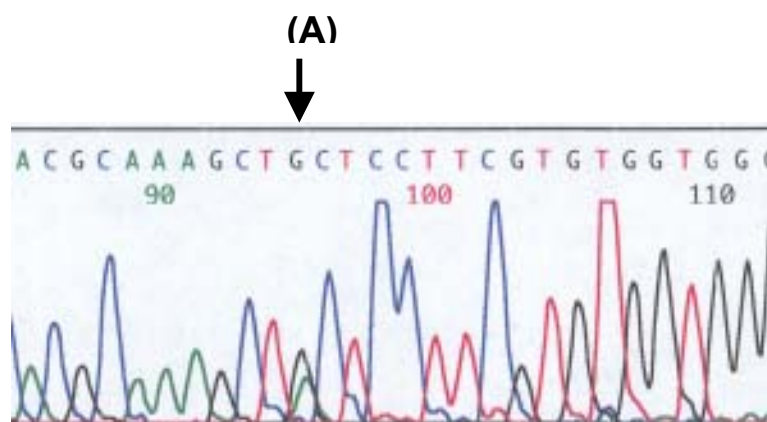


Abb. 3.8: Patient IIIB1 mit heterozygoter Mutation Y140C, TAC → TGC, (Wildtyp in Klammern)

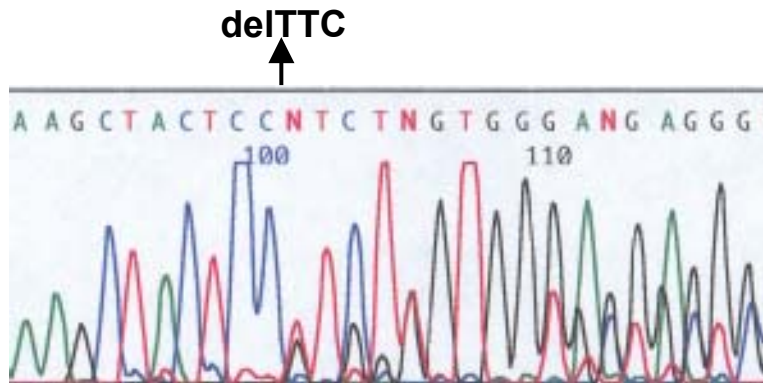


Abb. 3.9: Patient IIIB2 mit delF142, TTC → —, Wildtypsequenz: ...TACTCC(TTC)GTGTGGTGGG..., (dele-
tiertes Triplett in Klammern). Da die analysierte DNA
heterozygot für die Deletion ist, überlagern sich stromab-
wärts normale und deletierte Sequenz.

3.2.3 Untersuchung in Exon III

Exon III wurde als 377 bp großes Fragment amplifiziert. Die beste Darstellung konnte mittels eines 8%igen PAA-Gels mit einem Glycerinanteil von 10% erzielt werden.

3.2.3.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse

Bei den Wildtyp-Proben findet sich ein einheitliches Muster von zwei schwächeren Banden im Einzelstrangbereich und einer starken Bande ohne Heteroduplices im Doppelstrangbereich.

Die DNA-Probe IIIB10 weist eine Verdoppelung der oberen Einzelstrangbande auf (Abb. 3.10). Die Doppelstrangbande zeigt sich unauffällig (ohne Abbildung).

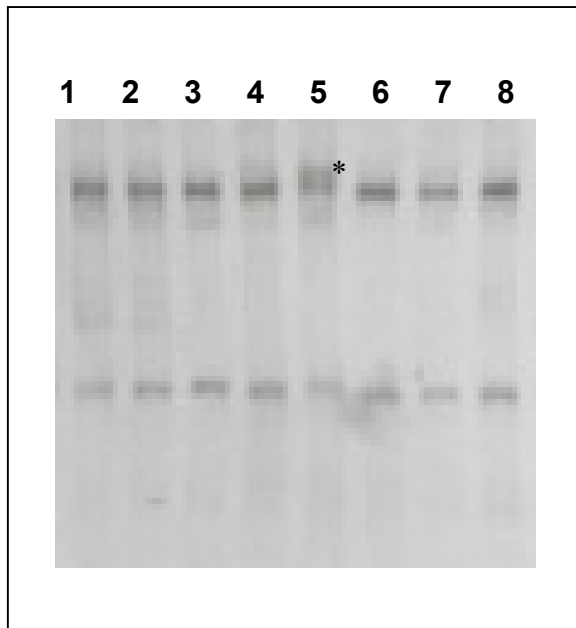


Abb. 3.10: SSCP-Analyse in Exon III. Spur 5 (IIIB10) weist als Auffälligkeit eine Verdoppelung der oberen Einzelstrangbande auf (*).

3.2.3.2 Sequenzierung

R203X: Die Probe IIIB10 weist im Codon 203 eine Punktmutation (CGA → TGA) in heterozygoter Form auf. Der Basenaustausch soll auf Proteinebene zum Kettenabbruch führen, da das Triplet TGA ein Stop-Codon kodiert (Abb. 3.11).

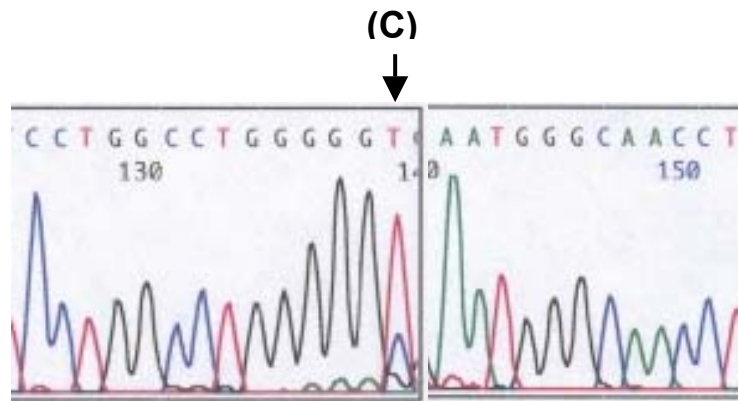


Abb. 3.11: Patient IIIB10 mit R203X in heterozygotem Zustand, CGA → TGA, (Wildtyp in Klammern)

3.2.4 Untersuchung in Exon IV

Exon IV wurde als 247 bp großes Fragment amplifiziert. Das beste Laufverhalten konnte mittels eines 8%igen PAA-Gels mit einer Glycerinkonzentration von 10 % erzielt werden.

3.3.4.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse

Die Wildtyp-Proben zeigen ein einheitliches Bild von zwei schwachen, schmalen Einzelstrangbanden mit einer darunter liegenden starken Einzelstrangbande. Der Doppelstrang stellt sich als eine starke Bande ohne Heteroduplices dar (ohne Abbildung). Auffälligkeiten wurden in Exon IV bei keiner der untersuchten DNA-Proben gefunden.

3.2.5 Untersuchung in Exon V

Exon V wurde als 393 bp großes Fragment amplifiziert. Optimale Darstellung der Banden konnte mittels eines 8%igen PAA Gels mit einer Glycerinkonzentration von 10% erreicht werden.

3.2.5.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse

Die Wildtyp-Proben ergeben ein einheitliches Bild von zwei Einzelstrang-Banden und einer einzelnen breiten Doppelstrangbande.

Probe IIIB9 zeigt zwei Einzelstränge, wobei die obere Bande ein schnelleres Laufverhalten aufweist als der entsprechende Einzelstrang beim Wildtyp. Der Doppelstrang ist unauffällig (Abb. 3.12). Bei der Probe IIIB6 fällt eine Verbreiterung der oberen Einzelstrangbande auf. Der Doppelstrang verhält sich unauffällig (nicht abgebildet). Bei Probe IIIB14 zeigt sich ein Verlust des oberen Einzelstranges, wobei eine andere Einzelstrangbande unterhalb der Zweiten läuft. Der Doppelstrang ist unauffällig.

Die Einzelstränge von Probe IIIB4 laufen unauffällig. Die Doppelstränge weisen zwei Heteroduplices auf. Probe IIIB12 erscheint auf dem Gel auffällig mit drei Einzelstrangbanden (Abb. 3.12).

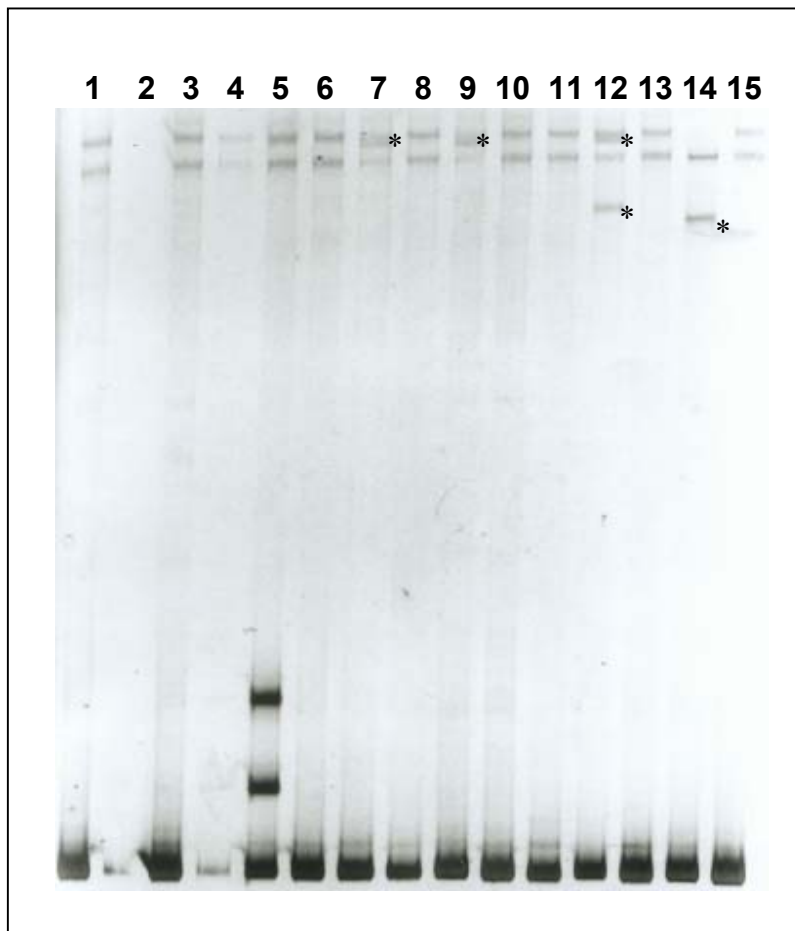


Abb. 3.12: SSCP-Analyse in Exon V. Spur 5 (IIIB4) zeigt zwei deutliche Heteroduplexbanden, die Spuren 7 (IIIB6), 9 (IIIB9), 12 (IIIB12) und 14 (IIIB14) weisen Auffälligkeiten im Einzelstrangbereich auf (*).

3.2.5.2 Sequenzierung

C277F: Die Sequenzierung der Probe IIIB9 ergibt eine Punktmutation im Codon 277 von TGC zu TTC in heterozygoter Form. Der Basenaustausch soll auf Proteinebene zu einem Austausch von Cystein zu Phenylalanin führen (Abb. 3.13).

L280P: Probe IIIB6 zeigt eine heterozygote Punktmutation im Codon 280 mit einem Basenaustausch von Thymin zu Cytosin (CTT → CCT). Auf Proteinebene soll diese Veränderung zu einem Austausch von Leucin zu Prolin führen (Abb. 3.14).

G292R: Im Codon 292 ergibt sich für Probe IIIB14 eine homozygote Punktmutation mit einem Basenaustausch von Guanin zu Adenin (GGG → AGG). Auf Proteinebene soll es zu einem Ersatz von Glycin mit Arginin kommen (Abb. 3.15).

1006delAG: In der Sequenzierung der Probe IIIB4 ergibt sich eine Deletion zweier Basen, Adenin und Guanin, im Codon 1006 (GAG → G—) in heterozygoter Form. Durch Verschiebung des Ableserahmens soll es 14 Aminosäuren weiter zu einem Kettenabbruch über Ablesung eines Stop-Codons kommen (Abb. 3.16).

D312N: Die Sequenzierung der Probe IIIB12 zeigt eine Punktmutation im Codon 312 von GAC → AAC in heterozygoter Form. Auf Proteinebene soll diese Veränderung zu einem Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin führen (ohne Abbildung).

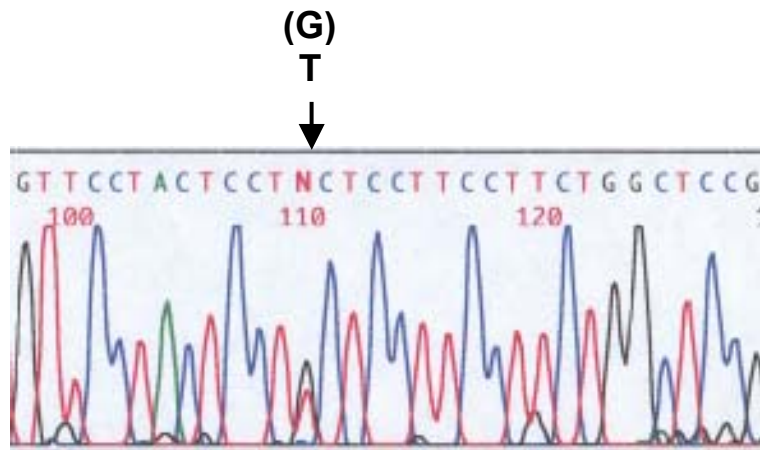


Abb. 3.13: Patient IIIB9, Heterozygotie für C277F, TGC → TTC, (Wildtyp in Klammern)

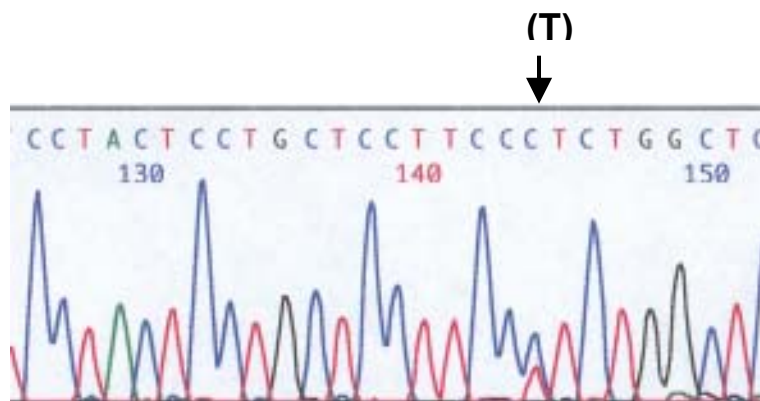


Abb. 3.14: Patient IIIB6, Heterozygotie für L280P, CTT → CCT, (Wildtyp in Klammern)

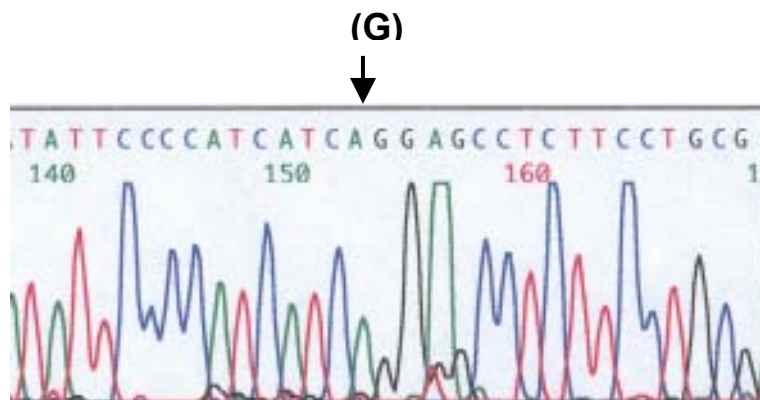


Abb. 3.15: Patient IIIB14, Homozygotie für G292R, GGG → AGG, (Wildtyp in Klammern)

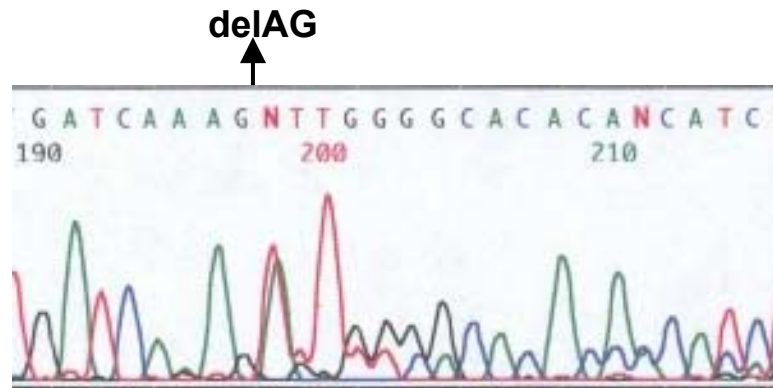


Abb. 3.16: Patient IIIB4, Heterozygotie für 1006delAG, GAG → G—, (Wildtyp in Klammern)

3.2.6 Untersuchung in Exon VI

Exon VI wurde aufgrund seiner Größe von 1452 bp in fünf kleinere Fragmente unterteilt, die in ihren Größen zwischen 271 und 390 bp lagen. Die beste Bandendarstellung der Exons VI.1, VI.2, VI.4 und VI.5 gelang mittels eines 8%igen PAA-Gels mit einer Glycerinkonzentration von 10%, Exon VI.3 ließ sich am besten darstellen mit einer Glycerinkonzentration von 5%.

3.2.6.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse

Exon VI.1: Für den Wildtyp ergibt sich eine Bandenkonfiguration von einer oberen breiten Einzelstrangbande mit einer schmalen Bande darunter. Die Doppelstrangbande erscheint als breite Einzelbande.

Auffällig zeigt sich in Exon VI.1 Probe IIIB5 im Doppelstrangbereich. Hier ist ein Heteroduplex sichtbar. Der Einzelstrangbereich ist unauffällig (Abb. 3.17).

Exon VI.2: Der Wildtyp zeigt sich in Form zweier etwas unscharf erscheinender Einzelstrangbanden, sowie einer einzelnen Doppelstrangbande.

Auffällig in Exon VI.2 ist Probe IIIB7. Diese zeigt im Einzelstrangbereich ein langsames Laufverhalten beider Banden, wobei der Abstand zueinander dem des Wildtyps entspricht. Im Doppelstrangbereich gibt es keine Auffälligkeiten (Abb. 3.18).

Exon VI.3: Die Wildtyp-Konfiguration erscheint als breite obere Einzelstrangbande mit einer darunter liegenden schmalen Bande. Die Doppelstrangbande ist einfach und intensiv gefärbt.

Auffällig in Exon VI.3 zeigen sich die Proben IIIB3 (nicht abgebildet) und IIIB13 (Abb. 3.19). Beide haben eine Duplikation des unteren Einzelstranges. Der

Doppelstrang erscheint breiter als beim Wildtyp. Als weitere Auffälligkeit zeigt sich Probe IIIB17, bei der die Einzelstränge mit demselben Abstand zueinander minimal schneller laufen als beim Wildtyp. Der Doppelstrang ist unauffällig (nicht abgebildet).

Exon VI.4: Für den Wildtyp ergeben sich zwei scharfe Banden der Einzelstränge, sowie eine scharfe breite Bande des Doppelstranges.

Auffällig ist in Exon VI.4 die Probe IIIB8. Bei dieser zeigt sich eine Duplikation der oberen Einzelstrangbande (Abb. 3.20). Der Doppelstrang ist unauffällig (nicht abgebildet).

Exon VI.5: Der Wildtyp zeigt zwei unterschiedliche Ausprägungen der Bandenmuster. Bei 96% (49 Proben) der Kontrollen ergibt sich ein Muster von zwei Einzelstrangbanden und einem Doppelstrang. Bei 4% (2 Proben) der Kontrollen liegt eine Duplikation sowohl beider Einzelstrangbanden, als auch des Doppelstranges vor (Abb. 3.21). Entsprechend dieser Auffälligkeit verhalten sich die Proben IIIB1, IIIB3 und IIIB13. Bei diesen kann dieselbe Duplikation aller Banden sichtbar gemacht werden (nicht abgebildet).

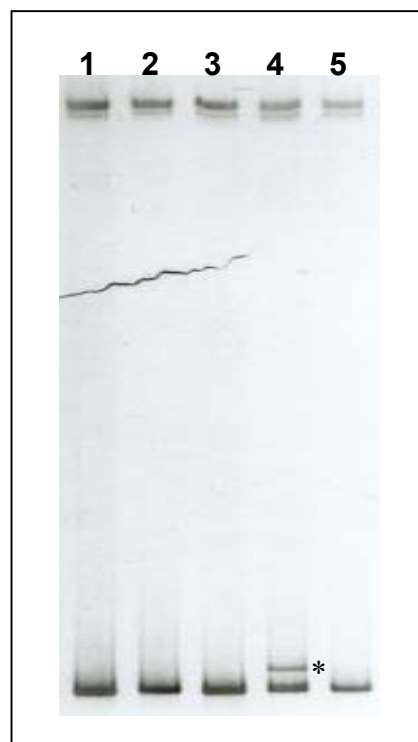


Abb. 3.17: SSCP-Analyse in Exon VI.1. Spur 4 (IIIB5) zeigt einen Heteroduplex (*), die Einzelstränge sind unauffällig.

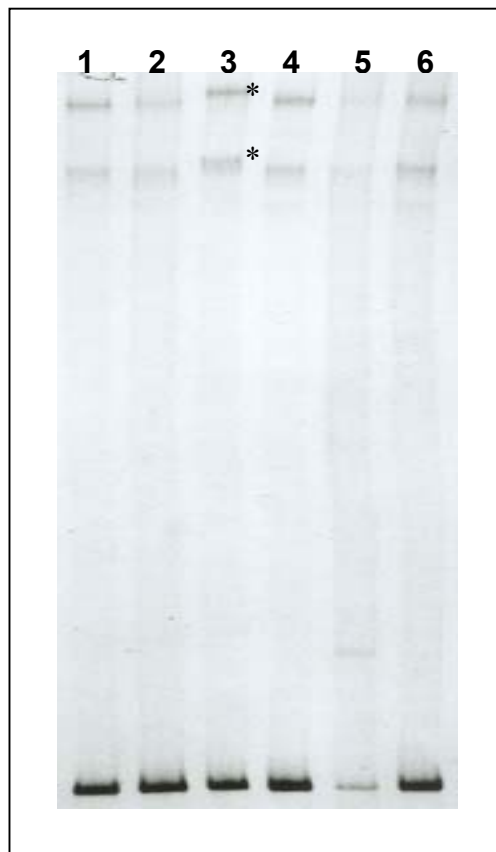


Abb. 3.18: SSCP-Analyse in Exon VI.2: Spur 3 (IIIB7) zeigt ein langsames Laufverhalten der Einzelstrangbanden auf (*), im Doppelstrangbereich sind keine Auffälligkeiten zu sehen.



Abb. 3.19: SSCP-Analyse in Exon VI.3. Spur 5 (IIIB13) besitzt an Auffälligkeiten eine Duplikation des unteren Einzelstranges (*) sowie eine Verbreiterung des Doppelstranges (unten).

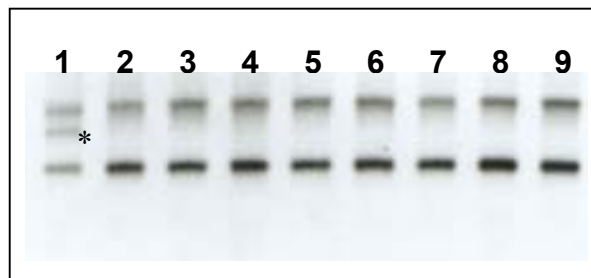


Abb. 3.20: SSCP-Analyse in Exon VI.4. Spur 1 (IIIB8): Auftreten einer zusätzlichen Einzelstrangbande (*).

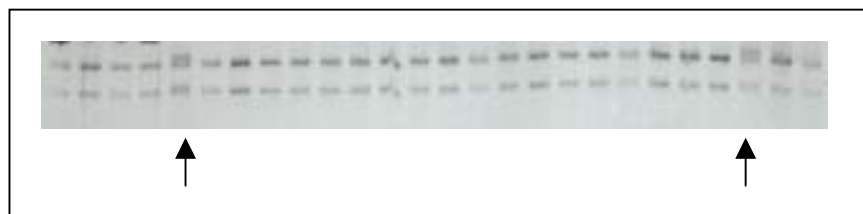


Abb. 3.21: SSCP-Analyse in Exon VI.5. Die Pfeile markieren Duplikationen der Einzelbanden zweier Proben in einem Gel mit PCR-Produkten von Kontroll-DNAs.

3.2.6.2 Sequenzierung

Exon VI.1

W404X: Die Sequenzierung der Probe IIIB5 ergibt im Codon 404 eine Punktmutation (TGG → TAG), bei der es infolge des für einen "Stop" codierenden Triplets TAG auf Proteinebene zum Kettenabbruch kommen soll (Abb. 3.22).

Exon VI.2

E452L: Die Probe IIIB7 zeigt eine Punktmutation im Codon 452 mit einem Basenaustausch von Guanin zu Adenin (GAA → AAA). Auf Proteinebene soll es zu einem Ersatz von Glutamat zu Leucin kommen (Abb. 3.23).

Exon VI.3

R565Q: Zwei Proben (IIIB3 (Abb. 3.24) und IIIB13) zeigen in der Sequenzierung dieselben Punktmutationen im Codon 565. Dabei kommt es zu einem Basenaustausch von Guanin zu Adenin (CGG → CAG) mit einem möglichen Ersatz von Arginin zu Glutamin auf Proteinebene.

L561R: Die Sequenzierung der Probe IIIB17 ergibt eine Punktmutation im Codon 561 mit dem Austausch von Thymin zu Guanin (CTG → CGG). Auf Proteinebene soll es zum Austausch von Leucin zu Arginin kommen (Abb. 3.25).

Exon VI.4

E705L: Auf DNA-Ebene kann für die Probe IIIB8 eine Punktmutation im Codon 705 (GAG → AAG) gefunden werden. Auf Proteinebene soll es zum Einbau von Leucin statt Glutamat kommen (Abb. 3.26).

Exon VI.5

G737R: Der bereits mittels SSCP-Analyse vermutete Polymorphismus kann auf DNA-Ebene als Punktmutation im Codon 737 der Proben IIIB1 (Abb. 3.27), IIIB3, IIIB13 sowie in der Kontroll-Probe H157 bestätigt werden. Dabei kommt es zum Basenaustausch von Guanin zu Cytosin (GGC → CGC) mit der möglichen Folge eines Aminosäure-Austauschs von Glycin zu Arginin.

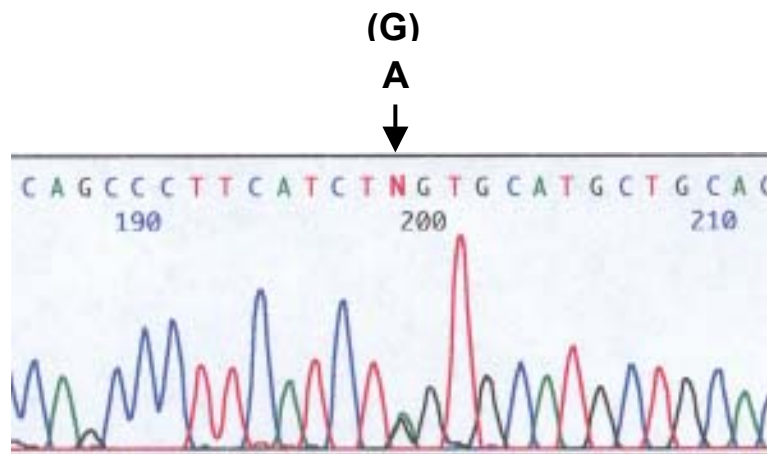


Abb. 3.22: Patient IIIB5, heterozygot für die Mutation W404X, TGG → TAG, (Wildtyp in Klammern)

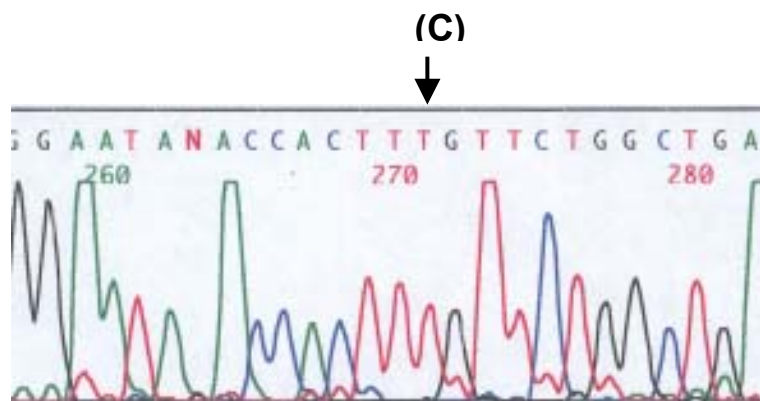


Abb. 3.23: Patient IIIB7, homozygot für die Mutation E452L, mit CTT → TTT, GAA → AAA entspricht der Basenabfolge vorwärts; (Wildtyp in Klammern)

(G)

A

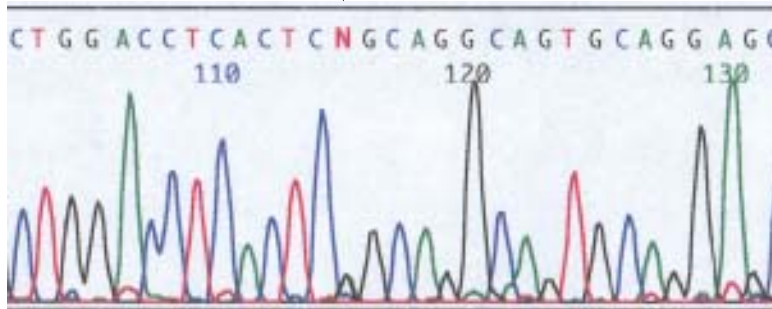


Abb.3.24: Patient IIIB3, Heterozygotie für R565Q, CGG → CAG, (Wildtyp in Klammern)

(T)

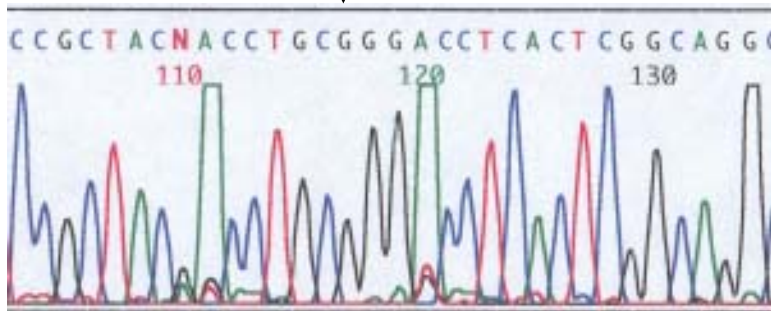


Abb. 3.25: Patient IIIB17, homozygot für die Mutation L561R, CTG → CGG, (Wildtyp in Klammern)

(G)

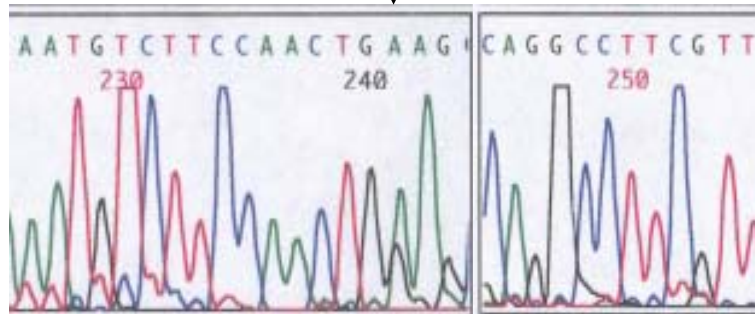


Abb. 3.26: Patient IIIB8, heterozygot für die Mutation E705L, GAG → AAG, (Wildtyp in Klammern)

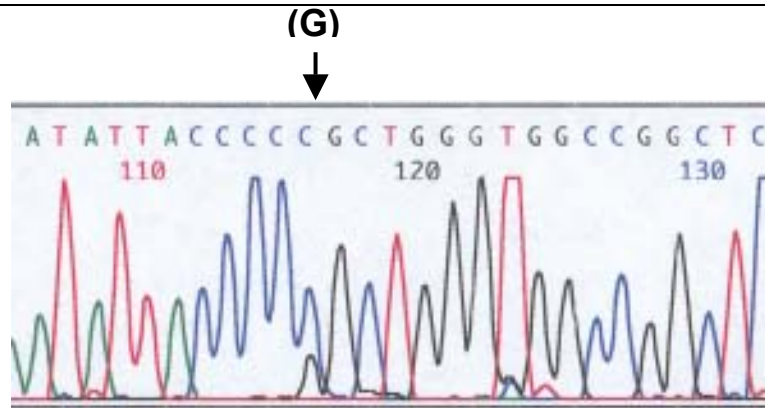


Abb. 3.27: Patient IIIB1, Heterozygotie für G737R, GGC → CGC, (Wildtyp in Klammern)

3.2.6.3 Restriktionsverdau

polG737R:

Der im 319 bp umfassenden Exon VI.5 gefundene Polymorphismus G737R (GGC → CGC) führt zum Verlust einer der im Wildtyp-Amplikon vorhandenen Schnittstelle des Enzyms *NciI* (Erkennungssequenz 5'...CC[~]C(G)GG...3'). Auf dem Agarose-Gel (Abb. 3.28) ist neben den Banden des geschnittenen PCR-Produkts der Proben IIIB1, IIIB3 und IIIB13 auch eine Einzelbande sichtbar, die das nichtverdaute PCR-Produkt darstellt. Die geschnittenen Fragmente entsprechen den Größen von 140 und 179 bp, welche beim Wildtyp ebenfalls vorhanden sind. Bei den drei Proben (IIIB1, 3 und 13) existieren sowohl die zwei unteren Banden, als auch eine obere Einzelbande, da hier der Polymorphismus in heterozygoter Form vorliegt. Bei den Proben IIIB3 und IIIB1 (Spuren 1 und 2) sind diese Banden auf der Abbildung nur zu erahnen, da weniger DNA auf das Gel aufgetragen wurde.

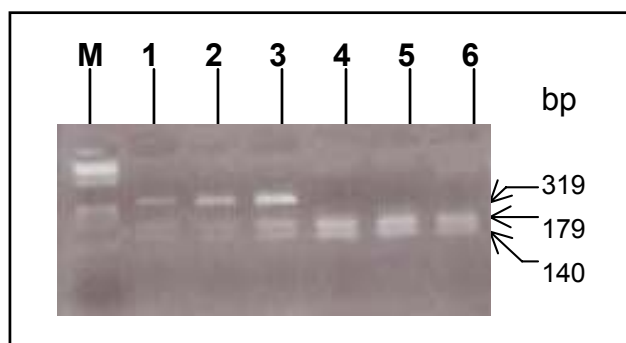


Abb. 3.28: Amplifikate des Exons VI.5 wurden mit *NciI* verdaut und auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. M: Längenstandard (ϕ X 174/ *HaeIII*); 1, 2, 3: Amplifikate der Patienten IIIB3, IIIB1, IIIB13; 4, 5, 6: Amplifikate dreier unterschiedlicher Kontroll-DNAs. Rechts ist die Größe der relevanten DNA-Fragmente vermerkt.

Die Größe der relevanten DNA-Fragmente vermerkt.

3.2.6.4 Mutationsspektrum

Die Tabelle 3.1 gibt ein Überblick über das Mutationsspektrum/ Sequenzabweichungen im Patientengut mit MPS IIIB.

Tabelle 3.1:

Exon	Exonfragment		Mut.-Nr.	Mutation/ Sequenzabweichung	Nucleotidabweichung	Proteinabweichung	Patienten/ Herkunft† (zweites Allel in Klammern)			
	SS*	HD**								
ex 1	–	+	1	M1L	ATG→TTG	Met→Leu	B9	DE	het	(C277F)
	+	+	2	338ins24	dupl 315-338	dupl aa 72-79	B13 B18	TR IR	het hom	(R565Q) –
ex 2	+	+	3	Y140C	TAC→TGC	Tyr→Cys	B1 B5 B11	DE CZ IT	het het het	(n.i.) (W404X) (n.i.)
	+	+	4	delF142	TTC→---	Deletion einer aa	B2	DE	het	(n.i.)
intron 2	+	(+)	5	pol: IVS2+50g→c	g→c	keine	Häufigkeit: g: 0.34, c: 0.66			
ex 3	+	–	6	R203X	CGA→TGA	term	B10	DE	het	(n.i.)
ex 4	–	–	–	–	–	–	–			
ex 5	+	–	7	C277F	TGC→TTC	Cys→Phe	B9	DE	het	(M1L)
	+	–	8	L280P	CTT→CCT	Leu→Pro	B6	PL	het	(n.i.)
	+	–(n.e.)	9	G292R	GGG→AGG	Gly→Arg	B14	IR	hom	–
	–	+	10	1006delAG	GAG→G--	fs, 14 veränderte aa, term	B4	DE	het	(n.i.)
	+	–	11	D312N	GAC→AAC	Asp→Asn	B12	TR	het	(n.i.)
ex 6	–	+	12	W404X	TGG→TAG	term	B5	CZ	het	(Y140C)
	+	–(n.e.)	13	E452L	GAA→AAA	Glu→Leu	B7	TR	hom	–
	+	–(n.e.)	14	L561R	CTG→CGG	Leu→Arg	B17	BG	hom	–
	+	+	15	R565Q	CGG→CAG	Arg→Gln	B3 B13	DE TR	het het	(n.i.) (338ins24)
	+	–	16	E705L	GAG→AAG	Glu→Leu	B8	PL	het	(n.i.)
	+	+	17	pol: G737R	GGC→CGC	Gly→Arg	B1 B3 B13	DE DE TR	het het het	

SS*: Einzelstrang-Auffälligkeiten, HD**: Heteroduplexformation, +: sichtbar, –: nicht sichtbar, n.e.: nicht erwartet (Patient homozygot); †BG: Bulgarien, CZ: Czechische Republik, DE: Deutschland, IT: Italien, IR: Iran, PL: Polen, TR: Türkei; aa: Aminosäure, del: Deletion, dupl: dupliziert, fs: Frameshift, het: heterozygot, hom: homozygot, ins: Insertion, n.i.: nicht identifiziert, pol: Polymorphismus, term: Termination. Die Nummerierung der Aminosäuren und Nucleotide erfolgte nach Weber et al., 1996.

3.2.6.5 Patientenliste

Die folgende Tabelle ist nach Patienten geordnet und gibt die zugehörigen Mutationen/ Polymorphismen mit einer Kurzbeschreibung über Besonderheiten wieder.

Tabelle 3.2:

Patient	Mutation (Exon) Allel I	Allel II	Polymorphismus IVS2+50g→c; c=1, g=2	Polymorphismus G737R	Bemerkungen
III B1	Y140C (Ex 2)	n.i.	2/2	G737R (Ex 6)	
III B2	delF142 (Ex 2)	n.i.	1/1		Deletion einer Aminosäure
III B3	R565Q (Ex 6)	n.i.	2/2	G737R (Ex 6)	
III B4	1006delAG (Ex 5)	n.i.	1/2		Leserasterverschiebung, Stopcodon nach 14 Codons
III B5	Y140C (Ex 2)	W404X (Ex 6)	2/2		Termination
III B6	L280P (Ex 5)	n.i.	1/2		
III B7	E452L (Ex 6)	E452L (Ex 6)	1/1		Konsanguinität der Eltern
III B8	E705L (Ex 6)	n.i.	1/1		
III B9	C277F (Ex 5)	M1L (Ex 1)	2/2		Initiations-Codon (Allel II)
III B10	R203X (Ex 3)	n.i.	1/1		Termination
III B11	Y140C (Ex 2)	n.i.	1/1		
III B12	D312N (Ex 5)	n.i.	1/1		
III B13	R565Q (Ex 6)	338ins24 (Ex 1)	1/2	G737R (Ex 6)	Duplikation von 24 Nucleotiden
III B14	G292R (Ex 5)	G292R (Ex 5)	1/1		
III B15	n.i.	n.i.	1/1		
III B16	n.i.	n.i.	1/1		
III B17	L561R (Ex 6)	L561R (Ex 6)	1/1		
III B18	338ins24 (Ex 1)	338ins24 (Ex 1)	1/1		Duplikation von 24 Nucleotiden, Konsanguinität der Eltern
III B19	n.i.	n.i.	1/1		Konsanguinität der Eltern
III B20	n.i.	n.i.	1/1		
III B21	n.i.	n.i.	2/2		
III B22	n.i.	n.i.	2/2		

n.i.: nicht identifiziert

3.2.6.6 Lokalisation der Mutationen

Die Abbildung 3.29 stellt das α -N-Acetylglucosaminidase-Gen schematisch dar. Man erkennt, dass die 15 hier identifizierten, höchstwahrscheinlich pathogenen Sequenzveränderungen, sowie die beiden Polymorphismen relativ gleichmäßig über das Gen verteilt vorliegen.

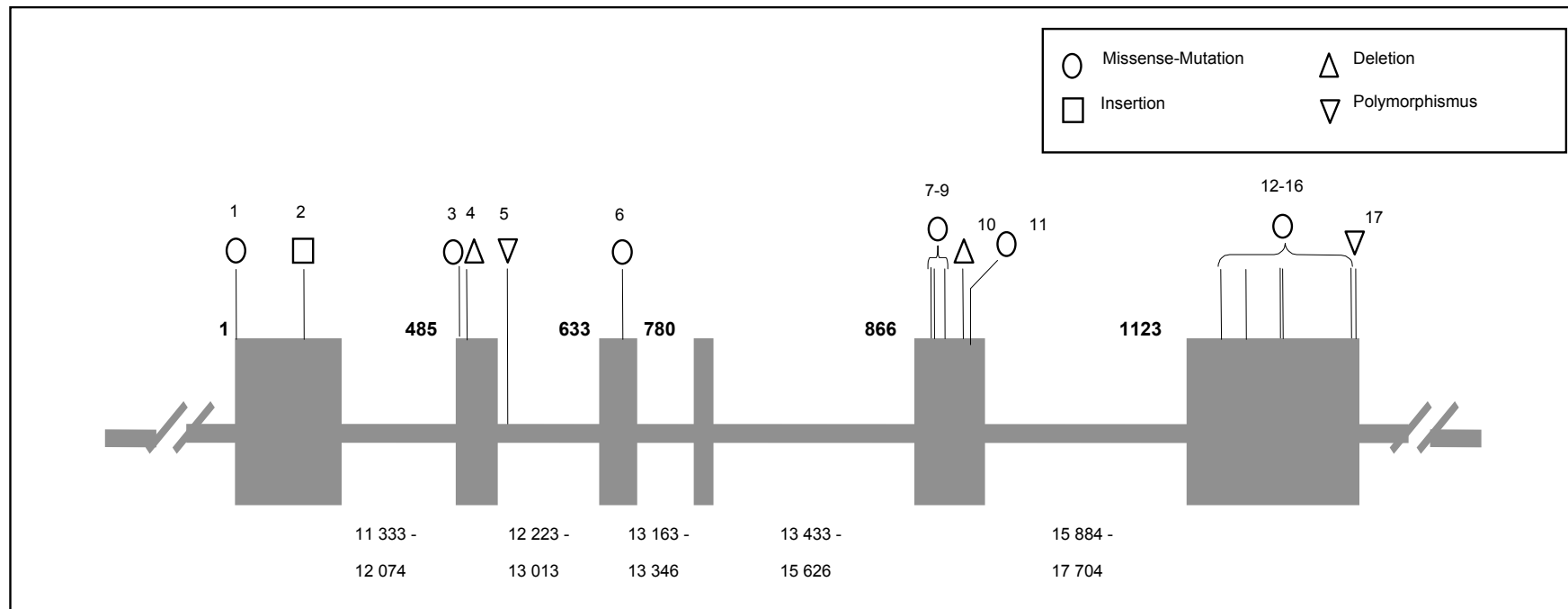


Abb. 3.29: Lokalisation der im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Mutationen und Polymorphismen im NAG-Gen. Die Blockbalken stellen die Exons I-VI dar, die durchgezogene Linie soll die Introns widerspiegeln. Als schmale Linien mit Symbolbezeichnung sind die verschiedenen Mutations-Typen eingezeichnet. Die fett gedruckten Zahlen beziffern das jeweils erste Nucleotid (der kodierenden Sequenz) des jeweiligen Exons, die Zahlen unterhalb benennen das je erste und letzte Nucleotid des jeweiligen Introns, die Zahlen oberhalb der Symbole beziffern die Mutationen (Nummerierung vgl. Tabelle 3.1).

4 Diskussion

In meiner Untersuchung kamen die Methoden der PCR, SSCP-Heteroduplexanalyse, Sequenzierung sowie des Restriktionsverdau in Exon VI.5 zur Anwendung. Als Untersuchungsmaterial diente genomische DNA von Patienten, die klinisch auffällig geworden waren, und bei denen die Erkrankung der Mucopolysaccharidose Typ IIIB bereits enzymatisch gesichert worden war.

Untersucht wurden 22 Patienten-DNA-Proben auf Mutationen in den 6 Exons des NAG-Gens. Gefunden werden konnten 12 Missense-Punktmutationen, die den Austausch einer Aminosäure hervorrufen sollten. Eine Punktmutation, M1L, betrifft das Initiations-Codon. Zwei Nonsense-Mutationen (R203X, W404X) führen zum Abbruch der Proteinsynthese. Zum Mutationsspektrum zählen außerdem eine Insertion von 24 Nucleotiden (338ins24) und zwei Deletionen (delF142, 1006delAG). Bei letzterer kommt es infolge der Deletion zweier Basen zu einer Leserasterverschiebung und nach Einbau weiterer 14 Aminosäuren zum Kettenabbruch. Ursächlich hierfür ist ein an dieser Stelle entstandenes Stop-Codon. Es konnten zwei Polymorphismen identifiziert werden: IVS2+50g→c im Intron 2 und G737R in Exon VI.

Es sind bereits 61 Mutationen aus Veröffentlichungen bekannt (Aronovich et al. 1996; Zhao et al. 1996; Schmidtchen et al. 1998; Zhao et al., 1998; Beesley et al., 1998, Bunge et al., 1999), die dem Sanfilippo B-Syndrom zugrundeliegen. Bei einem Vergleich zwischen den in dieser Arbeit charakterisierten Mutationen mit den zuvor veröffentlichten lässt sich für die Punktmutation Y140C eine Häufung finden. Beesley et al. (1998) beschreiben Y140C bei mehr als einem Patienten von 14 untersuchten und im Rahmen dieser Arbeit konnte Y140C auf 3 Allelen von 22 Patienten (6,8%) nachgewiesen werden. Schmidtchen et al. (1998) fanden dieselbe Mutation bei 3 Allelen von 9 Patienten (16,7%). Die Familien zweier der von Schmidtchen und Mitarbeitern beschriebenen Patienten sind US-Amerikaner mit ursprünglicher Abstammung aus dem italienischen Raum. Die Herkunft der Familie des dritten Patienten ist unbekannt. Die in meiner Arbeit untersuchten Patienten mit Y140C stammen aus Deutschland, Italien und der Czechischen Republik, wobei ein Verwandtschaftsgrad eher unwahrscheinlich ist. Nicht auszuschließen ist, dass die Mutationen der beiden US-Amerikaner italienischer Herkunft aus Schmidtchen et al. (1998) auf eine familiäre Verwandtschaft dieser zueinander oder zu dem europäisch-italienischen Patienten aus meiner Untersuchung deuten.

Neben den bereits erwähnten Mutationen treten zwei weitere (R565Q, 338ins24) bei mehreren Patienten gleichzeitig auf. R565Q kommt in heterozygoter Form bei einem deutschen und einem türkischen Patienten vor, wobei eine Verwandtschaft unwahrscheinlich ist. Die Insertions-Mutation 338ins24 betrifft einen türkischen (heterozygot) und einen iranischen (homozygot) Patienten. Alle anderen Mutationen, insgesamt 12, wurden bei nur je einem Patienten nachgewiesen.

Die Mutation R203X ist eine von zwei Nonsense-Mutationen (R203X und W404X), die aufgrund der vorzeitigen Stop-Codierung womöglich zu einer Instabilität der mRNA führen kann. Sie wurde bei einem Patienten aus Deutschland gefunden. Es gibt einen weiteren Patienten mit derselben Mutation, ebenfalls in heterozygoter Form, aus der Untersuchung von Schmidtchen et al. (1998). Der Ursprung dieses Patienten ist ethiopisch-jüdisch, so daß eine Verwandtschaft zu unserem Patienten unwahrscheinlich erscheint.

Wie aus der Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, wurde für die meisten Mutationen bereits auf SSCP-Ebene eine klare Abweichung vom Laufverhalten der Einzelstränge beobachtet, die zudem häufig mit auffälligen Heteroduplices kombiniert auftraten. Bei einigen Mutationen lag lediglich ein auffälliger Heteroduplex vor, ohne daß die Einzelstränge sich vom Wildtyp-Muster unter den gegebenen experimentellen Bedingungen unterschieden. Besonders auffällig und unerwartet war dies bei der Deletion 1006delAG, bei der zwei sehr deutliche Heteroduplexbanden sichtbar waren, bei gleichzeitigem Vorhandensein zweier "normaler" Einzelbanden (Abb. 3.12, Spur 5). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass bei dieser Mutation das deletierte DNA-Fragment eine große Vielfalt von Konformationen einnahm, so daß es unter den verwendeten Elektrophoresebedingungen keine definierte Einzelstrangbande ausbilden konnte. Die sichtbaren Einzelstränge stellten in diesem Fall die Wildtyp-Fragmente des normalen Allels dar.

Die Zahl der gefundenen Mutationen im Patientengut von 22 Patienten (44 Allele) ist mit einer Trefferquote von 0,52 verhältnismäßig klein. Eine Ursache für dieses Ergebnis kann die in dieser Arbeit verwendete molekulargenetische Screening-Methode, die SSCP-Gelelektrophorese, sein. Die Sensitivität dieser Methode ist wahrscheinlich nicht hoch genug (White et al., 1992; Hayashi und Yandell, 1993) und/ oder die untersuchten Fragmentgrößen waren zu groß und entsprachen nicht der optimalen Größe von ca. 150 bp (Sheffield et al., 1993). Mit der Methode der cDNA-Sequenzierung konnte die Trefferquote von 0,52 auf 0,82 für die 22 Patienten erhöht werden (Bunge et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit musste von einem Mutationsscreening mittels cDNA-Sequenzierung abgesehen werden, weil zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten noch keine mRNA der Patienten zur Verfügung stand. Eine wichtige Ursache für die mangelnde Effizienz der von mir verwendeten Methoden kann sein, dass einige Genveränderungen in Introns oder in regulatorischen Bereichen liegen. Bei alleiniger Untersuchung der Exons können solche Mutationen nicht erfasst werden.

Von den 12 Punktmutationen betrafen vier (R203X, G292R, E452L, R565Q) CpG-Dinucleotide, welche für Mutationen als anfällig gelten. Als mögliche Erklärung könnte eine durch Methylierung vermittelte Deaminierung von 5-Methylcytosin dienen, wobei die ursprüngliche Base Cytosin in Thymin überführt wurde.

Die zwei Mutationen 338ins24 und 1006delAG liegen in sehr enger Nachbarschaft zu zwei bereits zuvor veröffentlichten Mutationen, so dass auf einen mutationsanfälligen Bereich im Gen geschlossen werden könnte. Die Insertion 338ins24 liegt nur vier Nucleotide stromabwärts der Insertion 233ins24 (Zhao et al., 1998), wobei für 233ins24 die Nummerierung von Zhao (Zhao et al., 1996) verwendet wurde. Als Erklärung für eine "hot spot"-Region für Mutationen kann hier ein GC-reicher Bereich mit vier vollständigen GGC- und drei unvollständigen GCG-Repeats dienen, welcher besonders für Replikationsfehler anfällig zu sein scheint (Cooper und Krawczak, 1991), zumal dieselbe Mutation bei zwei wahrscheinlich nicht miteinander verwandten Patienten (IIIB13, IIIB18) identifiziert wurde.

Die Deletion 1006delAG befindet sich vier Nucleotide hinter der bereits veröffentlichten Deletion 901delAA (Schmidtchen et al., 1998), welche anhand der Nummerierung von Zhao (Zhao et al., 1996) benannt wurde. In beiden Fällen dürften die Mutationen ähnliche molekulare Konsequenzen haben.

Konsanguinität ist in drei Fällen bekannt. Dazu zählen die Patienten IIIB7 (452L hom.) aus der Türkei, IIIB18 (338ins24 hom.) und IIIB19 (R100H hom., Bunge et al., 1999) aus dem Iran. In allen Fällen konnten die Mutationen in homozygoter Form nachgewiesen werden. Dabei ist nicht auszuschließen, dass auch noch weitere Patienten, insbesondere jene aus dem Iran, Bulgarien und der Türkei konsanguin sein könnten, da es in diesen Kulturkreisen auch heute noch üblich sein kann, intrafamiliäre Ehen einzugehen. Beispiele für Homozygotie zweier Mutationen bei Patienten mit unbekannter familiärer Verwandtschaft sind IIIB14 (G292R hom.) und IIIB17 (L561R hom.).

Mutationen in homozygoter Form wurden im Rahmen dieser Arbeit bei insgesamt vier Patienten gefunden. Hierbei ist zu beachten, dass diese Patienten nur scheinbar homozygot sein können, aber in Wirklichkeit noch eine weitere Mutation in heterozygoter Form tragen, welche in der PCR-Amplifikation nicht erfasst werden konnte, beispielsweise eine größere Deletion. Scheinbare Homozygotie kann also vorliegen, wenn nur das Allel mit der nachgewiesenen Mutation amplifizierbar ist und das zweite Allel eine größere Deletion trägt, die die Amplifikation großer Teile oder des gesamten Gens verhindert.

Zur Auswirkung der Mutationen auf die Proteinebene gibt es verschiedene Überlegungen. Die Transkripte der Frameshift-Mutation 1006delAG und die beiden Nonsense-Mutationen R203X und W404X tragen alle ein vorzeitiges Stop-Codon. Sie terminieren somit die Translation vorzeitig, so daß das entstehende Enzymprotein stark verkürzt und wahrscheinlich ohne Funktion wäre.

Die Duplikation von acht Aminosäuren bei 338ins24, sowie die Deletion einer Aminosäure bei delF142 könnten ebenfalls bereits einen erheblichen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins haben und somit zu einem Funktionsverlust der α -N-

Acetylglucosaminidase führen, insbesondere dann, wenn das aktive Zentrum betroffen ist.

Neben den beschriebenen Stopmutationen gibt es eine Punktmutation im ersten Codon in Exon I, die das Startsignal (ATG) für die Translation verändert hat (M1L: ATG → TTG). Durch diese Mutation soll statt der Aminosäure Methionin Leucin eingebaut werden. Es wurde bereits darüber berichtet, dass Initiations-Codon-Mutationen die Initiation, und somit die Translation verhindern (Cooper, 1994): z.B. die Met → Leu Initiations-Codon-Mutation im Gen für das Sphingolipid-Activator-Protein. Bei Translation dieses mutierten Gens konnte kein Proteinprodukt nachgewiesen werden (Schnabel et al., 1992). Da in unmittelbarer Nachbarschaft zum Ersten Codon des α -N-Acetylglucosaminidase-Gens kein anderes ATG-Codon als mögliche Start-Sequenz vorliegt, ist es eher unwahrscheinlich, dass eine Initiation an dieser Stelle stattfinden kann.

Für jede der Punktmutationen wurden 100 Kontrollchromosomen mittels SSCP-Analyse untersucht. Dabei wurde die Punktmutation G737R in zwei von 100 Chromosomen im Kontrollgut gefunden, und zwar in heterozygoter Form. Bei G737R kommt es auf Peptidebene zum Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin. Es ist bekannt, dass bei der Maus, die bezüglich des NAG-Gens auf Aminosäure-Basis eine 82%ige Übereinstimmung mit dem menschlichen NAG-Gen besitzt, an der Stelle 737 nicht Glycin, sondern Glutamin vorkommt. Da zwei Chromosomen der 100 Kontrollen die Aminosäure Arginin statt Glycin an dieser Stelle tragen, ist es wahrscheinlich, dass es sich hierbei um einen Polymorphismus handelt, der auf Proteinebene womöglich keinen Einfluss auf die Funktion des Enzyms hat, obwohl die drei Aminosäuren Glycin, Arginin und Glutamin vollkommen unterschiedliche Seitenketten besitzen. Die Seitenketten der Aminosäuren können durch ihren chemischen Aufbau Einfluss auf die räumliche Struktur eines Proteins nehmen. Hiervon bleibt das aktive Zentrum der α -N-Acetylglucosaminidase aber wahrscheinlich in diesem Fall verschont. Häufig dienen einzelne Aminosäuren als "Platzhalter", um zum Beispiel die Interaktion von Seitenketten des Proteins zu ermöglichen. Ein Austausch einer solchen Aminosäure geht nicht zwangsläufig mit einer Funktionseinschränkung des Proteins einher. Da Glycin737 im Maus-NAG-Gen durch eine andere Aminosäure ersetzt ist und ebenso im menschlichen Gen durch Arginin ersetzt sein kann, ist G737R vermutlich nicht als krankheitsrelevant anzusehen. Endgültigen Aufschluss hierüber können nur Expressionsstudien geben.

Es ist zu erwähnen, dass zwei von drei Patienten mit G737R auch die Mutation R565Q tragen. Um Aussagen darüber machen zu können, ob beide Mutationen auf einem Allel liegen, müsste eine Familienanalyse durchgeführt werden. Es ist auffällig, dass G737R häufiger vorkommt bei Patienten mit MPS IIIB (7%) als bei den Kontrollen (2%), was darauf hinweisen könnte, dass R565Q und G737R mit ein und demselben Allel vererbt wurden.

Bei der Patientin IIIB3 wurde die Mutation R565Q in Kombination mit dem Polymorphismus G737R gefunden. In diesem Fall konnte das andere Allel nicht identifiziert werden. Zu erwähnen ist, dass sich aus dieser DNA-Probe auch nach Austestung sämtlicher PCR-Bedingungen die Exons I.1 und I.2 nicht amplifizieren ließen. Eine mögliche Ursache könnte die Degradation des genomischen Materials sein. Eine weitere DNA-Probe stand nicht zur Verfügung. Da die Punktmutation G737R, wie bereits diskutiert wurde, auch bei Kontrollpersonen gefunden wurde, ist sie vermutlich nicht pathogen. Die fehlende Mutation der Patientin IIIB3 könnte sich im nicht untersuchten Exon I befinden. Um darüber Klarheit schaffen zu können, müsste intaktes genomisches Material vorliegen und eine erneute Untersuchung mittels der in dieser Arbeit verwendeten Methoden erfolgen, wobei die nicht 100%ige Sensitivität dieser Verfahren zu bedenken ist (White et al., 1992; Hayashi und Yandell, 1993).

Ein weiterer Polymorphismus (IVS2+50g→c) mit einer Transversion wurde im Intron II gefunden. Hierbei liegt eine Allelhäufigkeit von 0,66 für "c" und 0,34 für "g" vor. Das Seening von 100 Kontrollchromosomen zeigte eine ähnliche Häufigkeit: Hier lag die Häufigkeit für "c" bei 0,7 und für "g" bei 0,3. Der Grund dafür, dass der Polymorphismus keinen Einfluss auf den Phänotyp hat, liegt wohl in der Lokalisation begründet. Introns sind Regionen, die im Anschluss an die Transkription aus den vorläufigen RNAs gespleißt werden, so dass die fertige mRNA aus aneinander angrenzenden Exons besteht. Der Polymorphismus könnte dazu verwendet werden, die Segregation von Krankheitsallelen in Familien zu verfolgen, in denen die krankheitsauslösende Mutation noch nicht gefunden wurde.

Betrachtet man die Vielfältigkeit der gefundenen Mutationen im Vergleich zu Untersuchungen in anderen Untergruppen der MPS, so fiel das Ergebnis für die Variabilität der Mutationen eher unerwartet aus. Für MPS I wurden zwei häufige Mutationen im α -L-Iduronidase-Gen gefunden (Bunge et al., 1995; Scott et al., 1995) und für MPS IIIA gab es ebenfalls häufige Mutationen (Bunge et al., 1997; Weber et al., 1997). Im Gegensatz hierzu wurde bei der MPS IVA ebenfalls eine große Heterogenität der Mutationen gefunden, was sich auch bei der Untersuchung für die MPS IIIB gezeigt hat. Eine Erklärung dafür, dass im NAG-Gen keine vorherrschenden Mutationen gefunden wurden, könnte darin liegen, dass das Patientengut bezüglich ihres Herkunftslandes sehr gemischt war, und somit eine hohe genetische Variabilität vorlag. Sechs Patienten kamen aus Deutschland, sieben aus der Türkei, drei aus dem Iran, zwei aus Polen, jeweils einer aus Czechien, Italien und Bulgarien und ein Patient mit unklarer Herkunft. Somit sind die Ergebnisse am ehesten als eine ausgeprägte allelische Heterogenität der autosomal-rezessiv vererbten Mucopolysaccharidose IIIB zu interpretieren.

Unter klinischen Gesichtspunkten konnte festgestellt werden, dass fast alle Patienten eine schwere Ausprägung der Erkrankung zeigten. Das Manifestationsalter lag

bereits bei 2-4 Jahren. Ein Enzymdefekt wurde in den meisten Fällen zwischen 2-8 Jahren diagnostiziert. Nur eine einzige Patientin (B3, R565Q, das andere Allel wurde nicht identifiziert) zeigte eine abgeschwächte Form der MPS IIIB. Mit einem Alter von 15 Jahren war sie noch in der Lage zu sprechen. Ein anderer Patient aus Deutschland (B9, C277F/ M1L) hatte eine sehr schwere Ausprägung der Erkrankung mit Manifestation bei Geburt. Eine Ursache für die unterschiedlichen Schweregrade des Krankheitsbildes der MPS IIIB konnte bisher noch nicht gefunden werden (Andria et al., 1979; Vance et al., 1980; Natale, 1991).

Die Exprimierung mutierter Allele in in-vitro-Expressionssystemen könnte Aufschluss über die Funktion einzelner Bereiche des NAG-Proteins geben. Erst dann könnte man Aussagen über die Restfunktion des Enzyms machen, woraus Unterschiede im Phänotyp besser erklärbar würden.

5 Zusammenfassung

Die Mucopolysaccharidose Typ IIIB (M. Sanfilippo B) ist eine autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit. Dieser Erkrankung liegt ein Defekt der α -N-Acetylglucosaminidase (NAG) zugrunde, die als Schlüsselenzym der Stoffwechselkette für den vollständigen Abbau von Heparansulfat, einem Glycosaminoglycan, nötig ist. Beim Ausfall der NAG kommt es zur Akkumulation von partiell degradiertem Substrat in vielen Geweben und Organen. Die klinischen Ausprägungen resultieren u.a. aus dem Untergang von Nervenzellen, da das Heparansulfat besonders im Zentralnervensystem eine wichtige Rolle spielt.

Erste Symptome manifestieren sich nach zunächst oft normaler Entwicklung des Kindes im Alter zwischen 2 und 6 Jahren, wobei es zu einem progredienten Verlust bereits erlernter Fähigkeiten kommt. Das Verhalten ist geprägt von Hyperaktivität, Unruhe und Aggressivität. Neben mentaler Retardierung tritt im Spätstadium eine generalisierte motorische Schwäche hinzu. Der Tod tritt meist im zweiten oder dritten Lebensjahrzehnt ein.

Für die Mucopolysaccharidose Typ III (alle Formen zusammen) wird in der Literatur eine Häufigkeit von 1:53000 angegeben, wobei MPS IIIB in Griechenland dominiert. In Deutschland ist sie eher selten.

In dieser Arbeit wurde in einem Kollektiv von 22 Patienten nach Sequenzabweichungen im Gen der α -N-Acetylglucosaminidase (NAG) gesucht. Es kamen in der Molekulargenetik etablierte Methoden wie die Polymerase-kettenreaktion (PCR), "Single-Strand-Conformation-Polymorphism"-Analyse (SSCP), Restriktionsverdau und direkte Sequenzierung zur Anwendung. DNA-Proben, die in der SSCP-Analyse ein auffälliges Muster zeigten, wurden sequenziert und, soweit Restriktionsstellen

existierten, die gefundenen Sequenzierungen per Restriktionsverdau als Mutation bestätigt.

15 unterschiedliche Mutationen wurden identifiziert, 13 von ihnen waren in der Literatur noch nicht beschrieben. Das Mutationsspektrum setzte sich zusammen aus zwei Deletionen (delF142; 1006delAG), einer Insertion (338ins24) und 12 unterschiedlichen Punktmutationen. Eine der 12 "Missense"-Punktmutationen, M1L, betrifft das Initiations-Codon. Zwei Nonsense-Mutationen (R203X, W404X) führen zu einem frühzeitigen Kettenabbruch bei der Proteinsynthese.

Ferner wurden zwei Polymorphismen gefunden: In Exon VI konnte G737R identifiziert werden. Ein weiterer Polymorphismus befand sich im Intron-Bereich zwischen Exon II und III (IVS2+50g→c).

Die Insertion (338ins24) umfasst einen Einschub von 24 Nucleotiden in Exon I, wobei es bei der Translation zu einer Duplikation von 8 Aminosäuren kommen sollte. Bei der Deletion 1006delAG kommt es aufgrund der Leserasterverschiebung 14 Aminosäuren abwärts zu einem Kettenabbruch nach Ablesung eines an dieser Stelle entstandenen Stop-Codons.

Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen den gemessenen Enzymaktivitäten in Zellen von Patienten mit MPS IIIB und dem klinischen Verlauf hergestellt werden. Auch wenn es bisher keine biologischen Marker oder Assays (z.B. Restenzymaktivität oder Glycosaminoglycanlevel) gibt, mit denen man den voraussichtlichen Verlauf messen kann, ist es von Bedeutung Mutationen zu finden. Hierzu leistet die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag. Die Identifikation der primären genetischen Defekte sollte in jedem Fall durchgeführt werden, bevor neue Therapieformen (z.B. Enzymersatz-Therapie, Gen-Therapie), die derzeit entwickelt werden, bei den einzelnen Patienten angewendet werden.

Wichtige Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Journal of Medical Genetics publiziert: Bunge S, Knigge A, Steglich C, Kleijer WJ, Diggelen OP v, Beck M, Gal A: Mucopolysaccharidosis type IIIB (Sanfilippo B): identification of 18 novel α -N-acetylglucosaminidase gene mutations. J Med Genet 36: 28-31 (1999).

6 Literaturverzeichnis

Andria G, Natale P di, Gindice E del, Striscinglio P, Murino P: Sanfilippo B syndrome (MPS III B): mild and severe forms within the same sibship. *Clin Genet* 15: 500-504 (1979)

Aronovich EL, Zhao HG, Neufeld EF, Whitley CB: Mutation analysis in Sanfilippo syndrome type B by automated sequencing of the NAGLU coding region. *Am J Hum Genet* 59 (suppl): A 246 (1996)

Beck M, Fang-Kircher S: Die Mukopolysaccharidosen: ein Leitfaden für Eltern und Ärzte. G. Fischer; Stuttgart; Jena: ISBN 3-437-00719-X (1993)

Beesley CE, Young EP, Vellodi A, Winchester BG: Identification of 12 novel mutations in the alpha-N-acetylglucosaminidase gene in 14 patients with Sanfilippo syndrome type B (mucopolysaccharidosis type IIIB). *J Med Genet* 35: 910-914 (1998)

Beratis NG, Sklower SL, Wilbur L, Matalon R: Sanfilippo disease in Greece. *Clin Genet* 29: 129-132 (1986)

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC: Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48: 137-144 (1991)

Bunge S, Fuchs S, Gal A: Simple and Noisotopic Methods to detect unknown Gene Mutations in Nucleic Acids. *Methods in Molecular Genetics*, Vol 8, Academic Press, Inc., pp. 26-39, ISBN 0-12-044310-4 (1996)

Bunge S, Ince H, Steglich C, Kleijer WJ, Beck M, Zaremba J, Diggelen OP v, Weber B, Hopwood JJ, Gal A: Identification of 16 sulfaminidase gene mutations including the common R74C in patients with mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo A). *Hum Mutat* 10: 479-485 (1997)

Bunge S, Kleijer WJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A: Mucopolysaccharidosis type I: identification of 13 novel mutations of the α -L-iduronidase gene. *Hum Mutat* 6: 91-94 (1995)

Bunge S, Knigge A, Steglich C, Kleijer WJ, Diggelen OP v, Beck M, Gal A: Mucopolysaccharidosis type III B (Sanfilippo B): identification of 18 novel α -N-acetylglucosaminidase gene mutations. *J Med Genet* 36: 28-31 (1999)

Cleary MA, Wraith JE: Management of mucopolysaccharidosis type III. Arch Dis Child 69: 403-406 (1993)

Cooper DN, Krawczak M. Human gene mutation. Oxford: BIOS Scientific Publishers: 285-287 (1994)

Cooper DN, Krawczak M: Mechanisms of insertional mutagenesis in human genes causing genetic disease. Hum Genet 87: 409-415 (1991)

Figura K v, Hasilik A, Steckel F, Kamp J van de: Biosynthesis and maturation of alpha-N-acetylglucosaminidase in normal and Sanfilippo B-fibroblasts. Am J Hum Genet 36: 93-100 (1984)

Figura K v, Lögering M, Kresse H: Serum α -N-acetylglucosaminidase: Determination, characterization and corrective activity in Sanfilippo B fibroblasts. Z Klin Chem Klin Biochem 13, 285-289 (1975)

Figura K v, Lögering M, Mersmann G, Kresse H: Sanfilippo B disease: Serum assays for detection of homozygous and heterozygous individuals in three families. J Pediatr 83, 607-611 (1973)

Gungor N, Tuncbilek E: Sanfilippo disease type B. A case report and review of the literature on recent advances in bone marrow transplantation. Turk J Pediatr 37: 157-163 (1995)

Hayashi K, Yandell DW: How sensitive is PCR-SSCP? Hum Mut 2: 338-346 (1993)

Hayashi K: PCR-SSCP: A simple and sensitive method für detection of mutations in the genomic DNA. PCR Meth Appl 1: 34-38 (1991)

Hopwood JJ, Elliott H: Detection of the Sanfilippo type B syndrome using radiolabelled oligosaccharides as substrates for the estimation of α -N-acetylglucosaminidase. Clinica Chimica Acta 120: 77-86 (1982)

Ippen H, Nagel G: Chronic graft-versus-host reaction following bone marrow transplantation. Hautarzt 35: 182-187 (1984)

Kakkis E: Enzyersatz bei MPS I. 5. Internationales Symposium über Mukopolysaccharidosen und andere Speicherkrankheiten in Wien, 18.-21. März 1999. Online im Internet: URL: <http://mps.muc.dtag.de/rb299.htm#Kongreßbericht>: (Stand: 1999)

Kakkis ED, McEntee MF, Schmidtchen A, Neufeld EF, Ward DA, Gompf RE, Kania S, Bedolla C, Chien SL, Shull RM: Long-term and high-dose trials of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I. *Biochem Mol Med* 58: 156-167 (1996)

Kamp JJP v d, Niermeijer MF, Figura K v, Giesberts MAH: Genetic heterogeneity and clinical variability in the Sanfilippo syndrome (types A, B, and C). *Clin Genet* 20: 152-160 (1981)

Kimura A, Hayashi S, Koseki M, Kochi H, Tsurumi K: Fractionation and characterization of urinary heparan sulfate excreted by patients with Sanfilippo syndrome. *Tohoku J Exp Med* 144: 227-236 (1984)

Kleijer WJ, Huijmans JG, Blom W, Gorska D, Kubalska J, Walasek M, Zaremba J: Prenatal diagnosis of Sanfilippo disease type B. *Hum Genet* 66: 287-288 (1984)

Kohler A: Cytogenetic aspects of chorionic villi biopsy. *Gynäkologe* 21: 99-103 (1988)

Laszlo A, Havass Z: Mucopolysacchariduria in genetic dermatoses: hereditary epidermolysis bullosa, congenital ichthyosis and ectodermal dysplasia. *Z Hautkr* 60: 254-256 (1985)

Laurent TC, Fraser JRE: Hyaluronan. *FASEB J* 6: 2397-2404 (1992)

Marsh J, Fensom AH: 4-Methylumbelliferyl alpha-N-acetylglucosaminidase activity for diagnosis of Sanfilippo B disease. *Clin Genet* 27: 258-262 (1985)

Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin DV, Mitchell G: Strand-separating conformational polymorphism analysis: Efficacy of detection of point mutations in the human ornithine delta-aminotransferase gene. *Genomics* 13: 389-394 (1992)

Michelakakis H, Dimitriou E, Tsagaraki S, Giouroukos S, Schulpis K, Bartsocas CS: Lysosomal storage diseases in Greece. *Genet Couns* 6: 43-47 (1995)

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 16: 1215 (1988)

Muenzer J, Beekmann RH, Profera LM, Bove EL: Severe mitral insufficiency in mucopolysaccharidosis type III B (Sanfilippo syndrome). *Pediatr Cardiol* 14: 130-132 (1993)

Murata R, Nakajima S, Tanaka A, Miyagi N, Matsuoka O, Kogame S, Inone Y: MR imaging of the brain in patients with mucopolysaccharidosis. *Am J Neuroradiol* 10: 1165-1170 (1989)

Muul LM, Soenen SL, Walker R, Ram Z, Oldfield EH, Blaese RM: Studies of the immune response in patients receiving gene therapy. In: Blau HM, Wilson JM (eds) *Molecular and cellular biology of gene therapy*. Keystone Symposia, Snowbird, UT, pp52 (1997)

Natale P di: Sanfilippo B disease: a re-examination of a particular sibship after 12 years. *J Inher Metab Dis* 14: 23-28 (1991)

Natowicz MR, Short MP, Wang Y, Dickersin GR, Gebhardt MC, Rosenthal DI, Sims KB, Rosenberg AE: Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. *New Eng J Med* 335: 1029-1033 (1996)

Neufeld E, Muenzer J: The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th ed. New York: Mc Graw-Hill: 2465-2494 (1995)

Neufeld E: Auf dem Weg zur Therapie. 5. Internationales Symposium über Mukopolysaccharidosen und andere Speicherkrankheiten in Wien, 18.-21. März 1999. Online im Internet: URL: <http://mps.muc.dtag.de/rb299.htm#Kongreßbericht>: (Stand: 1999)

Oliveira FW, Chavante SF, Santos EA, Dietrich CP, Nader HB: Appearance and fate of a beta-galactanase, alpha, beta-galactosidases, heparan sulfate and chondroitin sulfate degrading enzymes during embryonic development of the mollusc *Pomacea* sp. *Biochim Biophys Acta* 1200: 241-246 (1994)

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770 (1989)

Pande H, Chester A, Lie H, Thorsby E, Stormorken H: Concomitant occurrence of mucopolysaccharidosis III B and Glanzmann's thrombasthenia. Further evidence of a hyperactive alpha-N-acetylglucosaminidase-producing allele. *Clin Genet* 41: 243-247 (1992)

Pericak-Vance MA, Vance JM, Elston RC, Namboodiri KK, Fogle TA: Segregation and linkage analysis of α -N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG) levels in a black family. *Am J Med Genet* 20: 295-306 (1985)

Piraud M, Boyer S, Mathieu M, Maire I: Diagnosis of mucopolysaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis: a study of 2.000 urine samples. *Clin Chim Acta* 221: 171-181 (1993)

Poorthuis BJHM, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JEM, Jong de JGN, Weely van S, Niezen-Koning KE, Diggelen van OP: The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 105: 151-156 (1999)

Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M: Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method für mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet* 3: 801-807 (1994)

Resnick JM, Krivit W, Snover DC, Kersey JH, Ramsay NK, Blazar BR, Whitley CB: Pathology of the liver in mucopolysaccharidosis: light and electron microscopic assessment before and after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 10: 273-280 (1992)

Resnick JM, Whitley CB, Leonard AS, Krivit W, Snover DC: Light and electron microscopic features of the liver in mucopolysaccharidosis. *Hum Pathol* 25: 276-286 (1994)

Robertson SP, Klug GL, Rogers JG: Cerebrospinal fluid shunts in the management of behavioural problems in Sanfilippo syndrome (MPS III). *Eur J Pediatr* 157: 653-655 (1998)

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491 (1988)

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467 (1977)

Sasaki T, Sukegawa K, Masue M, Fukuda S, Tomatsu S, Orii T: Purification and partial characterization of alpha-N-acetylglucosaminidase from human liver. *J Biochem Tokyo* 110: 842-246 (1991)

Schmidtchen A, Greenberg D, Zhao HG, Li HH, Huang Y, Tieu P, Zhao HZ, Cheng S, Zhao Z, Whitley CB, Natale PD, Neufeld EF: NAGLU mutations underlying Sanfilippo syndrome type B. *Am J Hum Genet* 62: 64-69 (1998)

Schnabel D, Schröder M, Fürst W, et al.: Simultaneous deficiency of sphingolipid activator proteins 1 and 2 is caused by a mutation in the initiation codon of their common gene. *J Biol Chem* 267: 3312-3315 (1992)

Schrojenstein-de Valk HMJ van, Kamp JJP v d: Follow-up on seven adult Patients with mild Sanfilippo B-disease. *Am J Hum Genet* 28: 125-129 (1987)

Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris CP, Hopwood JJ: Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical and biological implications. *Hum Mutat* 6: 288-302 (1995)

Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM: The sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions. *Genomics* 16, 325-332 (1993)

Smith AJH: DNA sequence analysis by primed synthesis. *Methods in Enzymology* 65: 560-580 (1980)

Smith HO, Birnstiel ML: A simple method für DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res* 3: 2387-2398 (1976)

Spranger J: The systemic mucopolysaccharidoses. *Ergebn Inn Med Kinderheilk* 32: 165-265 (1972)

Teller WM, Burke EC, Rosewear JW, McKenzie BF: Urinary excretion of acid mucopolysaccharides in normal children and patients with gargoylism. J Lab Clin Med 59: 95-101 (1962)

Thiele D: Die "Polymerase Chain Reaction" (PCR) und ihre Anwendungsmöglichkeiten. Immun Infekt 19: 138-141 (1991)

Toma L, Dietrich CP, Nader HB: Differences in the nonreducing ends of heparan sulfates excreted by patients with mucopolysaccharidoses revealed by bacterial heparitinases: a new tool for structural studies and differential diagnosis of Sanfilippo's and Hunter's syndromes. Lab Invest 75: 771-781 (1996)

Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow GA, Natowicz MR: Mutations in HYAL 1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. Proc Nat Acad Sci 96: 6296-6300 (1999)

Vance JM, Conneally PM, Wappner RS, Yu PL, Brandt IK, Pericak-Vance MA: Carrier detection in Sanfilippo syndrome type B: report of six families. Clin Genet 20: 135-140 (1981)

Vance JM, Pericak-Vance MA, Elston RC, Conneally PM, Namboodiri KK, Wappner RS, Yu PL: Evidence of genetic variation for alpha-N-acetyl-D-glucosaminidase in black and white populations: a new polymorphism. Am J Med Genet 7: 131-140 (1980)

Vance JM, Pericak-Vance MA, Elston RC, Conneally PM, Namboodiri KK, Wappner RS, Yu PL: Evidence of genetic variation für α -N-acetyl-glucosaminidase in both Black and White populations: A new polymorphism. Am J Med Genet 7: 131-140 (1980)

Vellodi A, Young E, New M, Pot-Mees C, Hugh-Jones K: Bone marrow transplantation for Sanfilippo disease type B. J Inherit Metab Dis 15: 911-918 (1992)

Vieweg J: Grundlagen der Gentherapie. Urologe-A 35: 378-389 (1996)

Weber B, Blanch L, Clements PR, Scott HS, Hopwood JJ: Cloning and expression of the gene involved in Sanfilippo B Syndrome (mucopolysaccharidosis III B). Hum Mol Genet, 5: 771-777 (1996)

Weber B, Guo XH, Wraith JE, et al.: Novel mutations in Sanfilippo A syndrome: implications for enzyme function. *Hum Mol Genet* 6: 1573-1579 (1997)

White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M: Detecting Single Base Substitutions as Heteroduplex Polymorphisms. *Genomics* 12: 301-306 (1992)

Whiteman P, Young E: The laboratory diagnosis of Sanfilippo disease. *Pediatr Res* 10: 735-736 (1976)

Wippermann CF, Beck M, Schranz D, Huth R, Michel-Behnke I, Jungst BK: Mitral and aortic regurgitation in 84 patients with mucopolysaccharidoses. *Eur J Pediatr* 154: 98-101 (1995)

Zhao HG, Aronovich EL, Whitley CB: Genotype-phenotype correspondence in Sanfilippo syndrome type B. *Am J Hum Genet* 62: 53-63 (1998)

Zhao HG, Li HH, Bach G, Schmidtchen A, Neufeld EF: The molecular basis of Sanfilippo syndrome type B. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6101-6105 (1996)

Zhao HG, Li HH, Schmidtchen A, Bach G, Neufeld EF: The gene encoding α -N-acetylglucosaminidase and mutations underlying Sanfilippo B syndrome. *Am J Hum Genet Suppl* 57: A185 (1995)

7 Anhang

7.1 Klinisches Beispiel für MPS IIIB

7.1.1 Allgemeine Anamnese

Klinisches Beispiel der an Mucopolysaccharidose IIIB erkrankten Patientin (Pat. IIIB2) anhand einer im Dezember 1998 erhobenen allgemeinen und klinischen Anamnese. Zur Gliederung des Krankheitsverlaufs wurde dieser in Phasen von 1-4 eingeteilt (Beck und Fang-Kircher, 1993). Zum Zeitpunkt der Anamnese war die Patientin 11,5 Jahre alt, hatte eine Körpergröße von 1,51 m erreicht und befand sich im Anfangsstadium der Phase 4 (7.1.1.4).

Die Schwangerschaft der Mutter der Patientin wird als schwer beschrieben. Es wurden vermehrt aktive Kindsbewegungen wahrgenommen, die Mutter litt unter einem Gestations-Hypertonus mit Werten um 220-260 mmHg. Bei der Geburt in der 40. SSW fiel ein hohes Geburtsgewicht von 6330 g bei einer Größe von 58 cm auf, wobei das Kind von wenig Fruchtwasser umgeben war. Als Säugling zeigte das Mädchen zunächst eine Trinkschwäche, was sich nach 2,5 Monaten ins Gegenteil wendete. Von der Muttermilch allein konnte der Säugling nicht mehr gesättigt werden, so dass Breikost zugefüttert wurde. Am Verhalten fiel den Eltern auf, dass das Kind oft unruhig war, insbesondere nachts, was mit vermehrter Schreiaktion verbunden war. Von ärztlicher Seite her konnte damals die Diagnose einer Erbkrankheit noch nicht gestellt werden. Die Eltern wurden lediglich darauf hingewiesen, dass mit dem Kind "irgendetwas nicht stimmen sollte". Bei der U4 im 4. Lebensmonat wurde eine Hüftdysplasie diagnostiziert, welche mit einem Spreizbrett bis zum 13. Lebensmonat therapiert wurde. Klinisch auffällig waren die ab dem 15. Monat im Schnitt alle 3 Monate auftretenden Mittelohrentzündungen, welche sich mit Erkältungsinfekten, Tonsillitiden und Bronchitiden abwechselten. Das Körperwachstum war beschleunigt. Für ihr Alter sei die Patientin sehr groß gewesen. Die Sprache entwickelte sich bis zum 3. Lebensjahr zunächst normal. Sie sprach nasal betont, konnte ganze Sätze sprechen und besuchte einen Kindergarten.

7.1.1.1 Phase 1

Mit 3 Jahren litt die Patientin unter Brechdurchfällen und musste für 2 Monate dem Kindergarten fernbleiben. Ein halbes Jahr später wurde eine Milchallergie diagnostiziert. Seitdem wurden Milchprodukte gemieden, woraufhin sich der Durchfall besserte. Zu diesem Zeitpunkt war das Kind bereits sauber.

Mit 3,5 Jahren fiel ein Agrammatismus auf, wobei die Patientin 5-8-Wort-Sätze bildete, dabei jedoch den bereits erlernten Satzbau durcheinander brachte. Sie fing an, Sätze mehrmals zu wiederholen, wie beispielsweise "Meine Mama ist lieb" (bis zu 5x). Gegenstände konnten zu diesem Zeitpunkt richtig benannt werden. Im Kindergarten wurden die Eltern auf Hörstörungen des Kindes aufmerksam gemacht.

Mit 4 Jahren wurden die Tonsillen entfernt, wegen zunehmender Nasenatmungsbehinderung, die sich u.a. durch Mundatmung und nächtliches Schnarchen bemerkbar machte. Wegen vermehrter Sekretion im Mittelohr wurde eine Paracentese des Trommelfells vorgenommen. Es trat eine Hörverbesserung ein. Kurz darauf konnte das Kind nicht mehr den normalen Kindergarten besuchen. Sie besuchte seitdem einen Förderkindergarten für geistig und körperlich behinderte Kinder. Hier machte sie erste Fortschritte unter logopädischer Betreuung. Sie konnte alle Wörter verstehen und jedes Wort nachsprechen. Ferner liebte sie Musik.

7.1.1.2 Phase 2

Ab einem Alter von 4,5 Jahren konnte eine zunehmende Rastlosigkeit beobachtet werden. Es kam zu Schlafstörungen, die Patientin konnte nachts nicht durchschlafen und war alle 2 Stunden wach. Auffallend war ihre zunehmende Ziellosigkeit, insbesondere bei Trennung von ihren Bezugspersonen, wobei es des Öfteren zu plötzlichem Losschreien oder Lachattacken kam. Die Sprache reduzierte sich auf Ein- bis Zweiwortsätze wie "D. lieb", "Essen", "Papa" verbunden mit Stereotypien. Wegen starker Unruhe wurde sie erst in einem Alter von 7 Jahren eingeschult. Sie zeigte Konzentrationsschwäche, hat im Übermut Bücher zerrissen, Schränke geöffnet und diese dann ausgeräumt. Sie zeigte keinerlei böartige Aggressionen gegenüber ihren Mitmenschen. Die Eltern beschreiben ein anhängliches Wesen gegenüber Bezugspersonen. Mit 7,5 Jahren begann die Patientin mit erneutem Einnässen, später mit Einkoten bei zeitweilig aufgetretenen Durchfällen.

7.1.1.3 Phase 3

In einem Alter von 9 Jahren erkrankte das Kind an einer Meningitis, welche therapiert wurde. Seitdem wurden keine Infekte mehr beobachtet. Es konnte eine scheinbare Verbesserung wahrgenommen werden, indem die Patientin ruhiger wurde und auch nachts wieder durchschlafen konnte.

7.1.1.4 Phase 4

Mit 11,5 Jahren läuft die Patientin noch allein und mit Hilfe, Treppensteigen ist möglich. Ein ataktischer Gang mit Gleichgewichtsproblemen wird beobachtet, mit der Tendenz Gegenstände zu streifen. Beim Essen muss die Patientin mit einem Gurt am Stuhl fixiert werden. Die Feinmotorik ist vermindert, ein Pinzettengriff ist nicht mehr möglich. Nahrung muss zerkleinert werden, da das Kauen erschwert ist. Ein häufiges Verschlucken wird beobachtet, insbesondere bei flüssiger Nahrung. Das Sprachvermögen hat weiter abgenommen. Wörter verlieren ihren Sinn. Gegenstände werden falsch benannt oder verwechselt.

7.1.2 Klinische Anamnese

Die klinische Anamnese wurde erhoben, als die Patientin 11,5 Jahre alt war.

<u>Körperbau:</u>	Brustkorb ist vorgestreckt, "stolzer" Gang bei nach hinten oben gezogenen Schultern
<u>Abdomen:</u>	Nabelhernie, keine Milzvergrößerung, Lebervergrößerung, kelchförmige Nieren
<u>Extremitäten:</u>	leichte Valgus-Stellung, Beinlängendifferenz re. > li., Bissspuren an den Händen mit verkrusteten Wunden, kalte Akren, oft zyanotisch
<u>Herz:</u>	keine Erkrankung bekannt
<u>Lunge:</u>	Apnoephasen im Schlaf, Dyspnoe bei Erkältungsinfekten
<u>Nervensystem:</u>	herabgesetzte Sensibilität mit verminderter Schmerzwahrnehmung, Beispiel: Eine offene, klaffende Kopfwunde wurde nicht bemerkt oder die Patientin hatte sich die Hand am Ofen schwer verbrannt.
<u>Urin:</u>	Heparansulfat-Ausscheidung erhöht
<u>Medikamente:</u>	Neurocil® 25mg ½-1-1, Sap-Simplex® nach dem Essen, Buscupan® bei Bedarf, Paracetamol® 500 mg bei Bedarf, Mukosolvan® bei Bedarf



Abb. 7.1: MPS IIIB-Patientin: 11,5 Jahre alt.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Astrid Knigge
Geburt	14.09.1973 in Marburg
Eltern	Dr.med.dent. Wilfried Knigge, Zahnarzt Gitta Reppmann, geb. Ortmann, Zahnärztin

Schulische Ausbildung

08/79 – 07/83	Grundschule Friedrich-Wilhelm-Compe in Schwarzenbek
08/83 – 07/90	Gymnasiale Mittelstufe am Gymnasium Schwarzenbek
08/90 – 06/93	Gymnasiale Oberstufe am Luisengymnasium in Hamburg-Bergedorf

Beruflicher Werdegang

10/93 – 03/00	Vorklinische und Klinische Ausbildung der Medizin an der Universität Hamburg
02/97 – 07/97	Beginn und Abschluss der experimentellen Arbeiten für die Promotionsschrift am Institut für Humangenetik am Universitäts-Klinikum Eppendorf, Hamburg
Praktisches Jahr	
04/99 – 06/99	Chirurgie im Kantonalen Spital Heiden, Heiden (Schweiz)
06/99 – 08/99	Chirurgie im Allgemeinen Krankenhaus St. Georg, Hamburg
08/99 – 12/99	Innere Medizin im Allgemeinen Krankenhaus Barmbek (I. Med. Abt.), Hamburg
12/99 – 04/00	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde im Universitäts-Klinikum Eppendorf, Hamburg

Examina

09/95	Ärztliche Vorprüfung in Hamburg
08/96	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Hamburg
03/99	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Hamburg
05/00	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Hamburg

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Gal, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation an seinem Institut anzufertigen und mich zu jeder Zeit in meiner Arbeit unterstützt hat. Ebenso bedanke ich mich für die großzügige Bereitstellung aller erforderlichen Geräte und Materialien.

Für die Überlassung des interessanten Themas meiner Doktorarbeit, für die Betreuung und das menschliche Engagement, sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen danke ich Frau Dr. rer. nat. S. Bunge.

Herzlich danke ich Frau Cordula Steglich für die geduldige und stets kompetente Einweisung in die verschiedenen Labortechniken und für die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Frau Ute Meyer danke ich für ihre fototechnische Hilfe bei der Anfertigung und Entwicklung der vorliegenden Fotografien.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. M. Beck, Universitäts-Kinderklinik Mainz, und Herrn Prof. Dr. med. W.J. Kleijer, European Human Cell Bank Rotterdam, danke ich für die freundliche Überlassung eines großen Teils der Patienten-Proben.

Den Eltern einiger PatientInnen danke ich für die freundliche Bereitstellung von Blutproben ihrer Kinder für Forschungszwecke im Rahmen dieser Arbeit.

Dem Institut für Zell- und Neurobiologie, Universitäts-Klinikum Eppendorf danke ich für die Unterstützung bei den im Rahmen meiner Dissertation notwendigen Sequenzierungen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Medizinischen Universität Hamburg-Eppendorf danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die freundliche, stets hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

10 Erklärung

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 entnommenen 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.
