

**Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt
Neurodegenerative Erkrankungen**

**Genetische Untersuchung zur Bedeutung des
SLC9A6 Gens beim Corticobasalen Syndrom (CBS)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Loeffler, geb. Kuhn, Lena Carolin**

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Krüger
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Neumann

Tag der Disputation: 27.04.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.2 Parkinson und atypische Parkinson-Erkrankungen	1
1.3 Corticobasales Syndrom, Corticobasale Degeneration (CBS, CBD)	2
1.3.1 Geschichtlicher Wandel der Nomenklatur	2
1.3.2 Klinik	3
1.3.3 Pathologie	5
1.3.4 Genetische Ursachen des CBS	5
1.4 Das Gen <i>SLC9A6</i> und sein Protein NHE6	6
1.5 Die Bedeutung des Gens <i>SLC9A6</i> als Kandidatengen für CBS	9
1.6 Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemikalien	12
2.1.2 Puffer	13
2.1.3 Reagenzien für PCR	14
2.1.4 Längenstandards	14
2.1.5 Enzyme	15
2.1.6 Kits	15
2.1.7 Geräte	16
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.9 DNA	19
2.1.10 Oligonukleotide	20
2.1.10.1 Oligonukleotide zur Verwendung in PCR, LightCycler und Sequenzierung	20
2.1.10.2 Oligonukleotide zur Verwendung in <i>SNaPshot</i>	22

2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	24
2.2.2 LightCycler® 480	26
2.2.2.1 Etablierung von Exon 3-14, 16 und 17.....	27
2.2.2.2 Etablierung von Exon 1+2.....	31
2.2.2.3 Etablierung von Exon 15.....	35
2.2.2.4 Auswertung.....	38
2.2.3 Sequenzierung.....	40
2.2.3.1 Aufreinigung.....	40
2.2.3.2 Sequenzier-PCR.....	41
2.2.3.3 Denaturierung.....	41
2.2.3.4 Auswertung.....	41
2.2.3.5 verwendete Oligonukleotide	42
2.2.4 Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP).....	42
2.2.4.1 Auswahl der Enzyme	43
2.2.4.2 Etablierung der Restriktion	44
2.2.5 SNaPshot.....	45
2.2.5.1 Protokoll.....	46
2.2.6 Statistische Analyse.....	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Nicht validierte Auffälligkeiten aus der Screeninguntersuchung mittels HRM.....	49
3.1.1 Analyse des Exons 3	49
3.1.2 Analyse des Exons 10	50
3.2 Nicht validierte Auffälligkeiten aus der Screeninguntersuchung mittels HRM und der Sequenzierung	51
3.2.1 Exon 17.....	52
3.2.2 Exon 17 und Intron 17.....	54

3.3 Auffällige Sequenzen in Intron 4 und 15	57
3.4 Validierte Auffälligkeiten aus der Screeninguntersuchung mittels HRM.....	59
3.4.1 Intron 4.....	59
3.4.2 Exon 10.....	63
3.4.3 Exon 11.....	67
3.4.4 Intron 11 und 12.....	70
3.4.5 Exon 16.....	74
3.5 Unabhängig gefundene Variationen durch Kooperationspartner in Florida/USA.....	78
3.5.1 Exon 1.....	78
3.5.2 Exon 14.....	80
3.6 Unabhängig gefundene Mutation.....	82
4. Diskussion	84
4.1 Diskussion von Material und Methoden	84
4.2 Diskussion der Ergebnisse	90
4.3 Schlussfolgerung	99
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literaturverzeichnis	101
7. Erklärungen zum Eigenanteil	113
Danksagung.....	114
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

4-R Tau	4-repeat Tau
°C	Grad Celcius
%	Prozent
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems Inc
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BRAF	Isoform B der Raf-Proteine (<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CBD	Corticobasale Degeneration
CBS	Corticobasales Syndrom
CHMP2B	<i>Chromatin-Modifying Protein 2B</i>
Cl ⁻	Chlorid-Ion
dest.	destilliert
dHPLC	Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>denaturing high performance liquid chromatographie</i>)
DLK	Demenz vom Lewy-Körper-Typ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ex	Exon
For, Forw	vorwärts (<i>forward</i>)
fs	<i>frameshift</i>
FTD	Frontotemporale Demenz
FTLD	Frontotemporale Lobärdegeneration
G	Guanin

GBA	<i>Glucosidase, Beta, Acid</i>
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff-Ion
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRM	<i>High-Resolution-Melting</i>
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
Ins	Insertion
K ⁺	Kalium-Ion
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
L-Dopa	Levodopa
LRRK2	<i>Leucine Rich Repeat Kinase 2</i>
m, min	Minute
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
MAF	<i>minor allelic frequency</i>
MAPT	<i>Microtubule-Associated Protein Tau</i>
MEMO-Studie	<i>Memory and Morbidity in Augsburg Elderly</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MONICA	<i>MONItoring CArdiovascular disease</i>
mRNA	Boten-RNS (<i>messenger RNA</i>)
MSA	Multisystematrophie
Na ⁺	Natriumion
ng	Nanogramm
NHE6	Natrium-Wasserstoff-Austauscher 6
OP	Kontrollgruppe (<i>Old People</i>)
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PGRN	Progranulin
pmol	picomol
PSP	progressive supranukleäre Blickparese
Rev	rückwärts (<i>reverse</i>)
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
s	Sekunde

s.	siehe
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sequ	Sequenzierung
SLC9A6	<i>solute carrier family 9, subfamily A, member 9</i>
SNAP	SNaPshot
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tm	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
U	Einheiten (<i>units</i>)
U/min	Umdrehung pro Minute
UBE3A	Ubiquitin-Protein Ligase E3A
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
usw.	und so weiter
V-ATPase	vakuoläre ATPase
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
XLMR	X-chromosomale mentale Retardierung

1. Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Viele neurodegenerative Erkrankungen sind von durch Ablagerungen fehlgefalteter Proteine bedingten Funktionsverlusten von Nervenzellen gekennzeichnet. Diese konnten zuvor nicht durch die körpereigenen Kontrollsysteme (Chaperone, Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS), Phagosomen-Lysosomen-System) eliminiert werden [1, 2]. Diese sogenannten Proteinopathien werden entsprechend des betroffenen Proteins gegliedert. So unterscheidet man beispielsweise Tauopathien, zu denen die Alzheimer-Krankheit und die Corticobasale Degeneration (CBD) gehören, Synucleinopathien (z.B. Parkinson-Krankheit), Polyglutamin- (z.B. Chorea Huntington) und Prionenerkrankungen (z.B. Creutzfeldt-Jakob-Krankheit) [3]. Da diese progredient verlaufenden Erkrankungen meist im fortgeschrittenen Lebensalter auftreten, nimmt deren Inzidenz und Prävalenz mit der immer älter werdenden Gesellschaft zu und mit ihr das Interesse der Forschung [4, 5]. Ein wichtiger Ausgangspunkt der Forschung ist die genetische Untersuchung bei familiär gehäuft auftretenden Fällen. Hier sind stetig neue Kenntnisse zu verzeichnen. Trotzdem gibt es bisher keine neuroprotektiven Therapieoptionen, die Therapie kann allenfalls symptomatisch erfolgen [6].

1.2 Parkinson und atypische Parkinson-Erkrankungen

Unter dem Begriff „Parkinson-Syndrom“ fasst man Erkrankungen mit ähnlicher klinischer Manifestation zusammen. Die dabei auftretenden Kardinalsymptome sind Akinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität [6].

Entsprechend der Ätiologie lässt sich das Parkinson-Syndrom folgendermaßen untergliedern. Am häufigsten ist das idiopathische Parkinson-Syndrom, bei dem, wie der Name schon sagt, die Krankheitsursache unbekannt ist. Liegt dagegen im Zusammenhang mit der Erkrankung eine genetische Veränderung

vor, spricht man vom genetischen Parkinson-Syndrom [6]. Nach klinischen Gesichtspunkten kann man diese wiederum in typisch und atypisch unterteilen [7]. Das symptomatische Parkinson-Syndrom kann beispielsweise durch Medikamente, einen Tumor, ein Trauma, Toxine, Entzündungen oder Anomalien des Metabolismus induziert sein. Steht das Parkinson-Syndrom dagegen mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang, spricht man vom atypischen Parkinson-Syndrom. Zu den atypischen Parkinson-Syndromen zählen die Multisystematrophie (MSA), die Demenz vom Lewy-Körper-Typ (*dementia with Lewy bodies*, DLB), die progressive supranukleäre Blickparese (*progressive supranuclear palsy*, PSP) und die im Fokus dieser Arbeit stehende Corticobasale Degeneration (CBD) [6].

1.3 Corticobasales Syndrom, Corticobasale Degeneration (CBS, CBD)

1.3.1 Geschichtlicher Wandel der Nomenklatur

Die Erstbeschreiber Rebeiz und Kollegen gaben dieser Erkrankung 1967 den Namen „*corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia*“ [8]. In den darauffolgenden Jahren wurde dieser Name auf der Grundlage neuer Erkenntnisse weiter modifiziert. So entstanden beispielsweise die Bezeichnungen „*corticobasal degeneration*“ [9] oder „*cortical-basal ganglionic degeneration*“ [10], die der Erkrankung mehr Aufmerksamkeit brachten und so deren Erforschung vorantrieben. 2003 machten Boeve und Kollegen durch die Differenzierung zwischen dem Corticobasalen Syndrom (CBS) und der Corticobasalen Degeneration (CBD) die Grundlage der jeweiligen Diagnosestellung deutlich. Als CBS bezeichneten sie die Fälle, die aufgrund der klinischen Symptomatik diagnostiziert wurden, CBD dagegen konnte nur *post mortem* pathologisch diagnostiziert werden [11]. Diese Form der Nomenklatur wird auch in dieser Arbeit angewandt.

1.3.2 Klinik

CBS/CBD zählt zu den seltenen neurodegenerativen Erkrankungen, wobei noch keine aussagekräftigen epidemiologischen Studien vorliegen [12]. Meist treten in der 6. Dekade die ersten Symptome auf. Der progrediente Krankheitsverlauf führt durchschnittlich 6 bis 7 Jahre später zum Tod [9, 13-16].

Rebeiz und Kollegen beschrieben 1967 erstmals ein Krankheitsbild dreier im Massachusetts General Hospital untersuchter Patienten, deren klinische Symptomatik zu keiner der damals bekannten Diagnosen passte. Dazu kam, dass keine der medikamentösen Therapien erfolgreich war. Zwei Patienten wurden mit Cyanocobalamin (Vitamin B12) behandelt, ein Patient mit Antiparkinson-Medikamenten. Rebeiz und Kollegen gaben nach der pathologischen Untersuchung dieser Erkrankung den Namen „corticodentatonigrale Degeneration mit neuronaler Achromasie“ [8, 17]. In den darauffolgenden Jahren wurde eine Reihe von Symptomen beschrieben. Charakteristisch ist das „schleichende Auftreten und schrittweise Voranschreiten von auffällig asymmetrischen Merkmalen, welche aus Symptomen bestehen, die auf Dysfunktionen sowohl des cerebralen Kortex als auch der Basalganglien zurückzuführen sind“ [10]. Zu den Hauptsymptomen zählt eine typischerweise zuerst an einer oberen Extremität auftretende Steifigkeit (Rigidität), die im weiteren Krankheitsverlauf zu deren Verkrampfung und Fehlhaltung führen kann (Dystonie) [11]. Das sogenannte *Alien-Limb*-Phänomen, bei dem die betroffene Extremität ohne willentliche Steuerung des Patienten unkontrollierbare Bewegungen ausführt, ist ein weiteres für CBS sehr typisches Symptom. Die willentlich ausgeführten Bewegungen sind in den meisten Fällen gestört (Apraxie) und verlangsamt (Bradykinese) [18]. Im Gegensatz zu dem bei Parkinson auftretenden Ruhetremor wird bei CBS ein Haltungs- und Aktionstremor oder auch eine „Mischung“ verschiedener Tremorarten beobachtet [11, 18, 19]. Kortikale Sensibilitätsverluste, Muskelzuckungen (Myoklonie) und Demenz können ebenfalls auftreten, wobei die Demenz mittlerweile als Frühsymptom gilt [11, 20].

In den ersten Jahren nach deren Erstbeschreibung schien CBS/CBD eine Erkrankung mit klar definierter klinischer Manifestation zu sein und man vermutete

te, dass diese bereits aufgrund der klinischen Symptomatik diagnostiziert werden kann [10]. In späteren Studien fand man jedoch heraus, dass die Symptomkonstellation dieser Erkrankung keineswegs klar umschrieben werden kann, sondern eine für neurodegenerative Erkrankungen typische Heterogenität vorliegt. So beschrieben Boeve und Kollegen 13 Fälle von klinisch diagnostizierter CBS, von denen jedoch nur sieben Fälle pathologische Eigenschaften von CBD aufzeigten [21]. Ähnlich beschrieben Ling und Kollegen 19 CBD-Fälle, von denen lediglich fünf zu Lebzeiten als solche diagnostiziert wurden [14]. Mit dem Ziel, eine klinische Diagnosestellung zu ermöglichen, stellten Armstrong und Kollegen CBS-spezifische Merkmale zusammen. So konnten zwei Diagnosen „wahrscheinlich krank“ (höhere Spezifität) und „möglicherweise krank“ (Einschluss anderer Erkrankungen mit Tauopathie möglich) unterschieden werden. Allerdings kommen auch Armstrong und Kollegen zu dem Schluss, dass die Kriterien weiterentwickelt werden müssen und trotz allem eine klare Diagnosestellung wahrscheinlich erst erfolgen kann, wenn Biomarker oder assoziierte Mutationen bekannt sind [18].

Bis heute ist CBS/CBD, wie alle neurodegenerativen Erkrankungen, nicht heilbar. Es kann lediglich versucht werden, die Symptome pharmakologisch zu mindern, wobei aussagekräftige, den Therapieerfolg evaluierende, Studien noch fehlen [6]. Die Symptome des CBS sind im Gegensatz zu Parkinson nicht oder allenfalls kurzzeitig/gering L-Dopamin responsiv (atypische Parkinson-Erkrankung) [11]. Vereinzelt wurde jedoch berichtet, dass die Gabe von L-Dopamin eine mäßige allerdings nicht anhaltende Verbesserung der Symptome erzielte [13, 14]. Nach einer Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie soll daher hochdosiert L-Dopa verabreicht werden (bis zu 1000mg/Tag). Zur weiteren symptomatischen Behandlung werden Benzodiazepine (Myoclonie), Betablocker (Halte- bzw. Aktionstremor) und Botulinum-Toxin A (Dystonie) empfohlen. Unterstützend zur erwähnten medikamentösen Therapie sind Physiotherapie und Logopädie sinnvoll [6].

1.3.3 Pathologie

Makroskopisch auffällig ist die Atrophie des posterioren frontalen und parietalen Kortex sowie der Basalganglien. Diese Atrophie ist typischerweise asymmetrisch verteilt und dient auch zu Lebzeiten bildgebend als diagnostisches Kriterium [22]. Bei der mikroskopischen Betrachtung der betroffenen Regionen des Kortex und der Substantia nigra fallen ein Neuronenmangel und eine daraus resultierende Astrogliose auf [23]. Sowohl im Kortex als auch im Gyrus cinguli, der Amygdala, Insula und des Claustrums findet man geschwollene, achromatische oder ballonierete Neurone [23]. Des Weiteren wurden durch spezielle histologische Färbungen weit verbreitete Ablagerungen von hyperphosphoryliertem 4R-Tau in Neuronen und Glia-Zellen entdeckt, was zu der Bildung astrozytärer Plaques führt. Aufgrund dieser histopathologischen Merkmale zählt CBD zu den Tauopathien, einer Gruppe von Demenz-assoziierten Erkrankungen, zu denen auch die Alzheimer-Krankheit gehört [23]. Dickson und Kollegen stellten pathologischen Kriterien auf, die für die Diagnosestellung CBD mindestens erfüllt sein müssen. Diese sind „tau-positive Defekte in Neuronen und Gliazellen des Kortex und Striatums, wie beispielsweise astrozytäre Plaques und strangartige Läsionen in der weißen und grauen Substanz. Zusätzlich treten Neuronenverluste in zentralen kortikalen Regionen und der Substantia nigra auf“ [23].

1.3.4 Genetische Ursachen des CBS

Untersuchungen stellten zwischenzeitlich Mutationen in verschiedenen Genen in Zusammenhang mit CBS. Zu diesen Genen zählen Progranulin (PGRN), *Leucine Rich Repeat Kinase 2* (LRRK2), *Chromatin-Modifying Protein 2B* (CHMP2B) und *Microtubule-Associated Protein Tau* (MAPT).

Mutationen in LRRK2 sind die häufigste Ursache für eine autosomal-dominant vererbte Parkinson-Krankheit, werden jedoch auch bei sporadisch auftretender Parkinson-Krankheit gefunden [24, 25]. Besonders ist, dass sie sowohl eine Synucleinopathie als auch eine Tauopathie auslösen können [26]. Die bekannteste Mutation (G2019S) wurde in einer Screening-Untersuchung bei einer Patientin mit CBS gefunden [27]. Ein weiteres Screening von Patienten mit diag-

nostizierter frontotemporaler Lobärdegeneration (FTLD), CBS und progressiver supranukleärer Blickparese (PSP) brachte bei einer CBS-Patientin die Mutation N143S in dem Gen CHMP2B hervor [28]. Mutationen in diesem Gen stehen im Zusammenhang mit der Frontotemporalen Demenz (FTD3) [29] und der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) [30, 31] und sollen zur Beeinträchtigung bei der Verschmelzung von Endosomen und Lysosomen führen [32]. Dass ein und dieselbe Mutation zu verschiedenen Krankheitsbildern führen kann, zeigten auch Untersuchungen in dem Gen MAPT, welches das Tau-Protein encodiert. Hier wurde zum einen eine Mutation (P301S) sowohl beim Vater als auch bei dessen Sohn gefunden, wobei der Vater an Frontotemporaler Demenz (FTD) und der Sohn an CBS erkrankt war [33]. Zum anderen wurde eine weitere Mutation (G389R) bei drei Patienten mit FTD und einem mit CBS gefunden. Der 87-jährige Vater des CBS-Patienten wies interessanterweise keinerlei Auffälligkeiten auf, obwohl er ebenfalls Träger derselben Mutation ist [34]. Es lässt sich also daraus schließen, dass in diesen zwei Beispielen sowohl eine Heterogenität der Phänotypen als auch eine unvollständige Penetranz vorlag. Das Protein des Gens Progranulin (PGRN) ist ein Wachstumsfaktor. Es nimmt unter anderem Einfluss auf die Wundheilung und die Abwehrreaktion bei Entzündungsgeschehen. Untersuchungen zeigten, dass PGRN sowohl die Tumorgenese als auch das Fortschreiten von Tumoren beschleunigt [35]. Pathogene Mutationen stehen im Zusammenhang mit FTD [36, 37]. Masellis und Kollegen fanden jedoch eine neue heterozygote Mutation (IVS7+1 G>A) bei zwei Schwestern mit CBS [38]. Diskutiert wird noch, ob die Variation rs5848 in demselben Gen, die homozygot bei einem Patienten mit CBS vorgefunden wurde [39], auch als Risikofaktor für FTLD gelten kann [40-42].

1.4 Das Gen *SLC9A6* und sein Protein NHE6

Das Gen *SLC9A6* (*solute carrier family 9, subfamily A, member 9*) ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert (Xq26.3, OMIM). Mutationen in diesem Gen stehen in direktem Zusammenhang mit dem Christianson-Syndrom [43]. Zu Beginn des Projektes konnte das *SLC9A6* Protein in drei verschiede-

nen Splice-Varianten vorliegen. Je nach Splice-Variante unterscheiden sich sowohl die Anzahl der Exons (16 bzw. 17) als auch die Peptidsequenz (649-701 Aminosäuren). In der Zwischenzeit sind laut Ensembl 15 Varianten bekannt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwar die Exons nach der Variante 3 (Ensembl ENST00000370701) mit 17 Exons und einer Proteinelänge von 649 Aminosäuren zugrundegelegt, es wurde allerdings durch die Positionierung der Oligonukleotide und die Zusammenfassung von Exon 1+2 sichergestellt, dass alle kodierenden Abschnitte von *SLC9A6* untersucht wurden.

Das Gen *SLC9A6* kodiert das Protein NHE6 (Na^+/H^+ *Exchanger* 6). Dessen Familie sind bisher 9 Proteine zugeordnet worden, die sich in ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle unterscheiden. NHE1-5 findet man meist in Plasmamembranen, NHE 6-9 dagegen in den Zellorganellen [44, 45]. Das genaue Vorkommen von NHE6 wurde eine Zeit lang in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Erkenntnis, dass NHE6 in Mitochondrien zu finden ist [46], wurde zwischenzeitlich durch Untersuchungen widerlegt, bei denen NHE6 in Recycling-Endosomen und vorübergehend in der Plasmamembran gefunden wurde, nicht jedoch in Mitochondrien, Lysosomen bzw. im Golgi oder Trans-Golgi-Netzwerk [47]. NHE7 wurde im Trans-Golgi-Netzwerk, NHE8 in medialen Zisternen und Trans-Golgi und NHE9 in späten Recycling-Endosomen ausgemacht, wobei partiell auch Überschneidungen festgestellt wurden [45]. NHE6 wird in nahezu jedem Gewebe exprimiert, vor allem jedoch im Gehirn, der Skelettmuskulatur und dem Herzen [46].

Was bisher über die Struktur von NHE6 bekannt ist, basiert auf Vorhersagen, die sich aus der Aminosäuresequenz und der Homologie zu anderen Mitgliedern der NHE-Proteinfamilie ergeben. Danach besteht NHE6 aus 12 hydrophoben Transmembrandomänen in α -Helix-Form am N-Terminus und einem hydrophilen in das Cytoplasma reichenden Schwanz am C-Terminus (s. Abb. 1) [46, 48]. Vergleicht man die Primärstrukturen innerhalb der verschiedenen Mitglieder der NHE-Familie so ist zwischen 24% und 68% Übereinstimmung zu finden, wobei die Transmembrandomänen eine vergleichsweise geringe Varia-

bilität aufweisen [46]. Die mit 68% größte Ähnlichkeit besteht zwischen NHE6 und NHE7 [49].

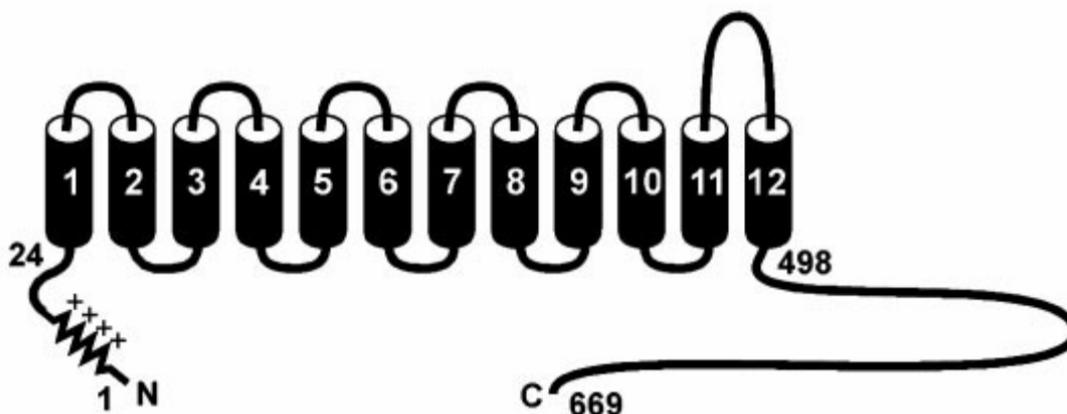


Abbildung 1: Aufgrund eines Hydrophobizitätsplots prognostiziertes Modell der Sekundärstruktur von NHE6. Zu sehen sind 12 Transmembrandomänen am N-Terminus sowie der hydrophile Schwanz am C-Terminus (nach Numata und Kollegen, 1998) [46].

NHE6 gehört zu der Familie der Natrium-Wasserstoff-Austauscher. Diese transportieren H^+ im Austausch gegen Na^+ und/oder K^+ aus der Zelle (im Fall von NHE1-5) oder aus intrazellulären Organellen (NHE6-9) heraus. Wobei Untersuchungen zeigten, dass NHE1-5 lediglich Na^+ , NHE6-9 dagegen auch K^+ im Austausch transportieren [50]. Für die Funktion der Organellen des Endosomen-Lysosomen-Systems ist es essentiell, dass in ihrem Lumen spezifische pH-Werte vorliegen (s. Abb. 2A) [51]. Es wird vermutet, dass an der Einstellung und der Konstanterhaltung dieses pH-Wertes die sogenannte vacuoläre H^+ -ATPase (V-ATPase), NHEs sowie ein Cl^- -Kanal oder ein H^+/Cl^- -Austauscher beteiligt sind. Wie in Abbildung 2B dargestellt, führt nach diesem Modell die V-ATPase durch ihren ATP-abhängigen Transport von H^+ -Ionen in das Lumen zu einem Abfall des pH-Wertes. Der gleichgerichtete Transport von Cl^- -Ionen soll dem Ladungsausgleich dienen und die Entstehung eines Membranpotentials verhindern. Das „fine-tuning“ des pH-Wertes soll letztendlich das, der V-ATPase entgegen gerichtete, NHE-Protein übernehmen [52]. Untersuchungen zeigten, dass ein Verlust von NHE6 zu einer Übersäuerung

des endosomalen Kompartiments führt [53]. Im Gegenzug bewirkte eine Überexpression von NHE8 und 9 ein Ansteigen des pH-Werts, das Lumen wurde alkalischer [45].

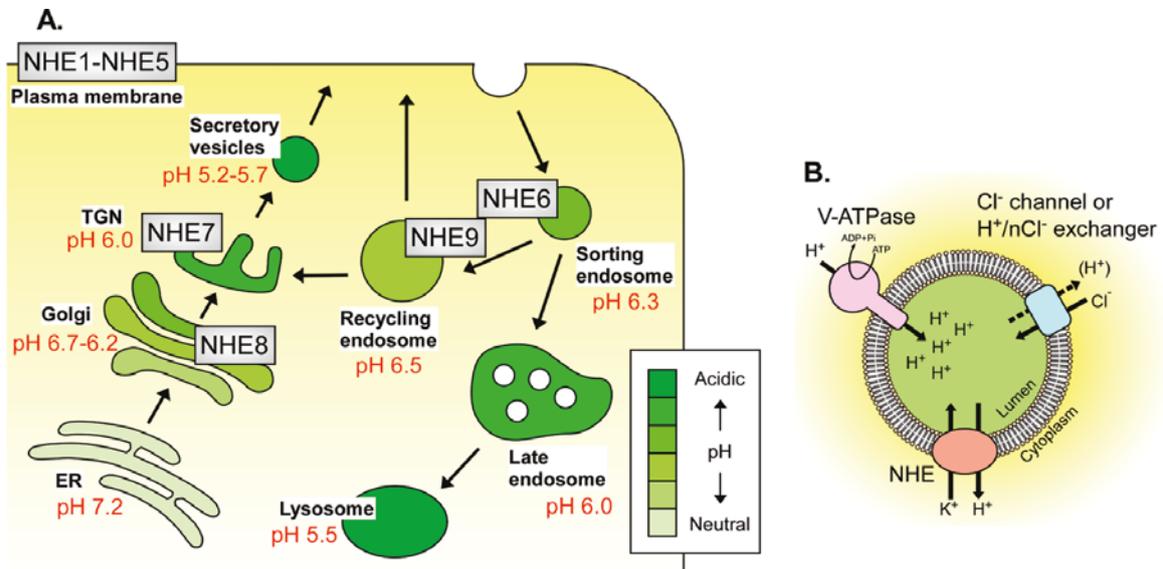


Abbildung 2: **A** Auftreten von NHE1-9 innerhalb einer Zelle und pH-Werte der einzelnen Organellen des Endosomen-Lysosomen-Systems. **B** Modell eines Organells mit V-ATPase, NHE und Cl⁻-Kanal bzw. H⁺/Cl⁻-Austauscher, gezeigt wird die pH-Regulation (nach Ohgaki und Kollegen, 2011) [52].

1.5 Die Bedeutung des Gens *SLC9A6* als Kandidatengen für CBS

2008 stellten Gilfillan und Kollegen eine Familie vor, in der drei männliche Mitglieder an derselben Erkrankung litten. Die klinische Untersuchung führte zunächst zu der Verdachtsdiagnose Angelman Syndrom. Durch genetische Untersuchungen konnte dies jedoch ausgeschlossen werden, da keine Veränderungen in der Sequenz von für das Angelman Syndrom verantwortliche UBE3A festgestellt werden konnten. Des Weiteren war die DNA-Methylierung in der Region 15q11-q13 unauffällig, womit ein fehlerhaftes Imprinting als Ursache des Angelman Syndroms ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte [43]. Es wurde daraufhin vermutet, dass eine genetische Veränderung auf dem X-Chromosom krankheitsverursachend sein könnte. Bei der systematischen Sequenzierung mehrerer auf dem X-Chromosom lokalisierter Gene wurde eine „Deletion von 6 Basenpaaren im codierenden Abschnitt von *SLC9A6* gefunden“

[43]. Diagnostiziert wurde folglich eine X-chromosomale mentale Retardierung. Die Kohorte wurde um weitere 71 Familien erhöht, von denen jeweils die DNA der Männer auf Mutationen in *SLC9A6* untersucht wurde. Außerdem zweier am Christianson-Syndrom [54] erkrankter Männer. Es wurden 3 weitere Mutationen in *SLC9A6* gefunden. Seither stehen Mutationen im *SLC9A6* Gen als Ursache des Christianson-Syndroms mit X-chromosomaler mentaler Retardierung fest [43]. Bei der histopathologischen Untersuchung von Gehirnen zweier Männer, die betroffene Mutationsträger im *SLC9A6* Gen waren, fand man in den allgemein atrophierten Gehirnen einen ausgeprägten Neuronenmangel in Telencephalon (Pallidum und Putamen), Mesencephalon (Substantia nigra) und Cerebellum (Cortex) [55]. Diese Hirnregionen steuern und koordinieren Bewegungsabläufe [56]. Des Weiteren wurde bei biochemischen Untersuchungen Tauablagerungen überwiegend der Isoform 4R in Neuronen und Gliazellen gefunden. So wurde erstmals ein Zusammenhang von Mutationen im *SLC9A6* Gen und Tauopathien hergestellt. Außerdem ähnelte die vorgefundene Pathologie der von Dickson und Kollegen beschriebenen Pathologie der corticobasalen Degeneration [23, 55]. Die Auswirkung eines durch Mutationen verursachten Funktionsverlustes des Natrium-Wasserstoff-Austauschers in vivo wurde experimentell anhand von knockout-Mäusen untersucht. Dabei fand man sowohl in späten Endosomen als auch in Lysosomen von Neuronen Auffälligkeiten. Zum einen Ablagerungen von GM2-Gangliosiden und unverestertem Cholesterol. Zum anderen Dystrophien von Nervenzellfortsätzen und ein Fehlen von Purkinjezellen, sowie Tauablagerungen [57]. Die Vermutung, dass ein Ausfall des NHE6 sowohl Auswirkungen auf die Funktion von Endosomen und Lysosomen haben könnte als auch zu Veränderungen der Neuronen führen könnte, wurde damit bestätigt [57]. Die Brücke von in der ersten Dekade auftretenden Erkrankungen (X-chromosomale mentale Retardierung, Christianson-Syndrom) zu der meist erst in der 6. Dekade manifestierenden CBS/CBD schlug schließlich die Familienanamnese eines Jungen, der an dem Christianson-Syndrom erkrankt war. Auch bei ihm wurde eine Mutation in *SLC9A6* gefunden. Auffällig war, dass bei der Großmutter als heterozygote Trägerin dieser Mutation mit 55 Jahren erstmals Symptome auftraten, die an

Parkinson-Erkrankungen erinnerten. Bei einer neurologischen Untersuchung durch einen Neurologen der Universitätsklinik Tübingen wurde CBS diagnostiziert [58]. Die Mutter dieser CBS-Patientin als obligate Trägerin der Mutation litt ebenfalls an einem CBS und war in der Neurologie Tübingen in Behandlung.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, durch ein erstmals durchgeführtes Mutationsscreening im *SLC9A6* Gen eine postulierte Assoziation von Mutationen mit CBS bzw. CBD nachzuweisen. Die zu untersuchende Patienten-Kohorte mit CBS und CBD Fällen aus Deutschland, England und den USA ist die größte Kohorte, die bisher auf Mutationen in einem Kandidatengen für CBS bzw. CBD untersucht wurde. Erkenntnisse aus dieser Arbeit können zur Aufklärung der Ursachen und Heterogenität des CBS beitragen und wichtige Einblicke in die Bedeutung gestörter endosomaler und lysosomaler Abbauwege im Rahmen der Neurodegeneration geben, welche einen Ansatzpunkt für effektive Therapieformen dieser bislang nicht behandelbaren Erkrankung darstellen können.

Im ersten Schritt wurden mit Hilfe der Gene Scanning Software des LightCycler® 480 für jedes Exon die in einer real-time-PCR amplifizierten Produkte auf Veränderungen ihres Schmelzverhaltens untersucht. Die Nukleotidabfolge der in diesem Verfahren auffällig gewordenen Proben wurden im zweiten Schritt mittels Sequenzierung bestimmt und auf Abweichungen der Basensequenz untersucht. Wenn Mutationen bzw. Variationen gefunden wurden, schloss sich eine Bestätigung mit Hilfe einer zweiten von der ersten unabhängigen Methode an. Dafür standen der Nachweis mittels Restriktion (Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus, RFLP) im Falle einer Änderung der Erkennungssequenz eines Restriktions-Enzyms oder die SNaPshot Technologie zur Verfügung. Um eine mögliche pathologische Relevanz des gefundenen Basenaustauschs festzustellen, wurde eine gesunde Kontrollgruppe auf die gefundenen Mutationen bzw. Variationen untersucht. Abweichungen in der Häufigkeit der Mutation erlaubten dabei Rückschlüsse auf deren pathogenetische Bedeutung im Sinne einer Assoziation.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: verwendete Chemikalien

Name	Hersteller, Sitz
acetic acid (glacial) 100%	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Dimethylsulfoxid Rotipurán® ≥ 99,8 p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
EDTA-Solution pH 8,0 (0,5M) Molecular biology grade	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Ethanol absolut zur Analyse EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Ethidiumbromid Lösung 1%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
Glycerol 99,5+% ACS	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis (USA)
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems Inc, Foster City (USA)
Wasser dest. für die Chroma- tographie (LiChrosolv)	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Milli-Q	EMD Millipore Corporation, Billerica (USA)
3M Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
Tris ultrapure	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)
Xylencyanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)

2.1.2 Puffer

Tabelle 2: verwendete Puffer

Name	Hersteller, Sitz
BigDye Terminator v1.1 & v3.1 5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems Inc, Foster City (USA)
5x colorless GoTaq Reaction Buffer	Promega Corporation, Madison (USA)
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50x)	2M Tris 5,71% (v/v) Eisessig 0,05M EDTA ad 1l H ₂ O
0,1x Tris-EDTA-Puffer	0,01M Tris 1mM Na ₂ EDTA (pH 8,0) ad 1l H ₂ O
10x Ladepuffer	0,0025% (w/v) Bromphenolblau 0,0025% (w/v) Xylencyanol 50mM Tris (pH 7,6) 60% (v/v) Glycerol ad 100ml H ₂ O
10x Ladepuffer ohne Bromphenolblau	0,0025% (w/v) Xylencyanol 50mM Tris (pH 7,6) 60% (v/v) Glycerol ad 100ml H ₂ O
Purified BSA 100x	New Englandf Biolabs, Ipswich (USA)
NEBuffer 3 10x	New Englandf Biolabs, Ipswich (USA)
NEBuffer4 10x	New Englandf Biolabs, Ipswich (USA)
NEBuffer CutSmart	New Englandf Biolabs, Ipswich (USA)
6x Orange DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)

2.1.3 Reagenzien für PCR

Tabelle 3: verwendete Reagenzien für die PCR

Name	Konzentration	Hersteller, Sitz
Betain Enhancer Solution	5M	Ampliqon A/S, Odense M (Dänemark)
dNTPs	100mM	Life Technologies, Carlsbad (USA)
GoTaq®DNA Polymerase	5U/µl	Promega Corporation, Madison (USA)
LightCycler®480 High Resolution Melting H ₂ O	-	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland)
LightCycler®480 High Resolution Melting MgCl ₂	25mM	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland)

2.1.4 Längenstandards

Tabelle 4: verwendete Längenstandards

Name	Banden	Hersteller, Sitz
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	20.000, 10.000, 7000, 5000 , 4000, 3000, 2000, 1500 , 1000, 700, 500 , 400, 300, 200, 75 b	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)
GeneRuler 50bp DNA Ladder	1000, 900, 800, 700, 600, 500 , 400, 300, 250 , 200, 150, 100, 50 b	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)
GeneScan™ 120 LIZ® Size Standard	15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110, 120	Applied Biosystems Inc, Foster City (USA)
O'Range Ruler 50bp DNA Ladder	1000 , .., 500 , 450, 400, 350, 300, 250, 200 , 150, 100, 50 b	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)

2.1.5 Enzyme

Tabelle 5: verwendete Enzyme

Name	Hersteller, Sitz
BanI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
BspEI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
CviKI-1	New England Biolabs, Ipswich (USA)
ExoI	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)
FastAP	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)
HpyCH4III	New England Biolabs, Ipswich (USA)
MbolI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
MwoI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
PfIMI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
PleI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
SmlI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
TspRI	New England Biolabs, Ipswich (USA)

2.1.6 Kits

Tabelle 6: verwendete Kits

Name	Hersteller, Sitz
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems Inc, Foster City (USA)
LightCycler®480 High Resolution Melting Master (Mastermix, MgCl ₂ , H ₂ O)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland)
SNaPshot® Multiplex Kit	Applied Biosystems Inc, Foster City (USA)
REPLI-g® Mini Kit	QIAGEN NV., Venlo (Holland)

2.1.7 Geräte

Tabelle 7: DNA-Konzentrationsmessung

Name	Hersteller, Sitz
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland)

Tabelle 8: Elektrophorese

Name	Hersteller, Sitz
Elektrophoresekammer Perfect Blue Gelsystem Maxi S Plus	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland)
Elektrophoresekammer Thermo EC Classic™ CSSU 911	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)
Elektrophoresis Power Supply E861	Consort bvba, Turnhout (Belgien)
Kamera und UV-Tisch	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée (Frankreich)
Mikrowelle Super Crousty 1100W	Moulinex, Vertrieb durch KRUPS GmbH, Offenbach/Main (Deutschland)
Power Supply 3000-90	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)

Tabelle 9: Pipetten

Name	Hersteller, Sitz
Electronic Multichannel Pipetten (EDP3-Plus) 2-20µl, 20-200µl	Rainin, Oakland (USA)
Eppendorf Reference Pipetten 0,5-10µl, 2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Multipette® Plus	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)

Tabelle 10: Sequenzierung

Name	Hersteller, Sitz
3500 xL Genetic Analyzer	Applied Biosystems Inc, Foster City (USA)
3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems Inc, Foster City (USA)

Tabelle 11: Thermocycler

Name	Hersteller, Sitz
DNA Engine DYAD™	MJ Research Inc., Waltham (USA)
LightCycler®480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland)
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research Inc., Waltham (USA)
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)

Tabelle 12: Vakuumpumpe

Name	Hersteller, Sitz
CVC 2000 II	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim (Deutschland)

Tabelle 13: Vortex

Name	Hersteller, Sitz
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York (USA)

Tabelle 14: Waage

Name	Hersteller, Sitz
GJ 4100-2M	Kern & Sohn GmbH, Balingen (Deutschland)

Tabelle 15: Zentrifugen

Name	Hersteller, Sitz
Biofuge Pico	Heraeus GmbH, Hanau (Deutschland),
Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)
Spectrafuge Mini Centrifuge 230V	Bio-Rad, Hercules (USA)

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller, Sitz
96-Well Non-Skirted PCR Plates	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham (USA)
Safe-Lock Tubes 1,5µl	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Safe-Lock Tubes 2,0µl	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Flat Cap Stripes farblos	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland)
LightCycler®480 Multiwell Plate 96, white	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland)
LightCycler®480 Sealing Foil	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland)
Microtestplatte (Terasaki-Platte) 60 Well, Glasklar mit Abdeckplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Multiply®-µStripPro 8er Kette mit anhängendem Deckel	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf (Deutschland)
Pipettenspitzen 10µl	Biozym Biotech Trading GmbH, Wien (Österreich)
Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf (Deutschland)
Pipettenspitzen 50-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Pipettenspitzen RC-L 10, 20µl	Rainin, Oakland (USA)
Pipettenspitzen RC-L 250, 200µl	Rainin, Oakland (USA)

2.1.9 DNA

Für diese Untersuchungen standen 223 Proben zur Verfügung, wovon 81 von männlichen und 133 von weiblichen CBS/CBD-Patienten stammten. Bei neun Patienten war das Geschlecht unbekannt. Das Zustandekommen dieser großen Kohorte ermöglichten uns Kooperationspartner aus Gießen (14 Proben), London (86 Proben) und Pennsylvania (77 Proben). 46 Proben stammten aus der Biobank der Universität Tübingen. Bei 163 Patienten war CBS, bei 60 CBD diagnostiziert worden. Das mittlere Erkrankungsalter der untersuchten Kohorte betrug 59,35 Jahre, zum Zeitpunkt des Todes waren sie durchschnittlich 68,29 Jahre alt.

Die DNA aus der Tübinger Biobank, Gießen und der Kontrollgruppe lag in einer Konzentration von 50ng/µl vor. Die DNA aus Pennsylvania war ursprünglich ebenfalls auf 50ng/µl konzentriert, wurde aber zur Steigerung des Gesamtvolumens auf 30ng/µl verdünnt. Die DNA-Konzentrationen aus London zeigten sich bei einer stichprobenartigen Überprüfung different, wobei die mittlere DNA-Konzentration bei 42ng/µl lag. Da die Menge der von den Kooperationspartnern stammenden DNA limitiert war, mussten wir diese mittels einer *whole genome amplification* vermehren. Diese wurde von Frau Brigitte Maurer nach Herstellerangaben durchgeführt und anschließend auf 50ng/µl verdünnt.

Die Kontrollgruppe umfasste 272 Proben (146 männlich, 126 weiblich) zwischen 65 und 83 Jahren zum Zeitpunkt der Probeentnahme. Das Kollektiv entstammt der MEMO-Studie, einer Folgestudie der WHO-MONICA-Studie (Augsburg) [59]. Ziel der MEMO-Studie war es, Zusammenhänge zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen zu erforschen. In diesem Zuge wurden alle Patienten nach einem standardisierten Verfahren neurologisch untersucht [60].

Dieses Projekt ist vorab von der Ethikkommission der Universität Tübingen geprüft und genehmigt worden. Die Projektnummer lautet 287/2004V.

2.1.10 Oligonukleotide

2.1.10.1 Oligonukleotide zur Verwendung in PCR, LightCycler und Sequenzierung

Das Designen der Oligonukleotide wurde mit Hilfe des Internet-Programms Primer3Plus durchgeführt. Dabei sollten folgende Punkte beachtet werden. Die Lage der Oligonukleotide sollte so gewählt werden, dass die gesamte kodierende DNA amplifiziert wird. Außerdem sollte der Abstand zum Exon so gering wie möglich sein, da zum einen das Hauptaugenmerk auf Mutationen im Exon, sog. kodierende Mutationen, lag und zum anderen, um das sich daraus ergebende PCR-Produkt möglichst klein zu halten, was die Sensitivität erhöht. Des Weiteren sollten die Schmelztemperaturen der Oligonukleotid-Paare nahe beieinander liegen, um bei der Etablierung der PCR eine gemeinsame Schmelztemperatur ermitteln zu können. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion international AG (Martinsried, Deutschland) synthetisiert, HPLC bereinigt, lyophilisiert und in einer Konzentration von 100 pmol/µl wieder in LiChrosolv aufgenommen. Deren Verwendung erfolgte in einer 1:10 Verdünnung.

Tabelle 17: verwendete Oligonukleotide

Exon	Forward	Reverse
Exon 1+2	5'-CCC TTT AAG AGC GGC GG-3'	5'-AGG GGC TGA CAA GGG TTG-3'
Exon 1+2 Neu2	5'-CAG AGC GAG CTT GGG ATG-3'	5'-AAT TAG AAG GGG AGC CGA AC-3'
Exon 1+2 Neu3	5'-CGT GTG ACC TGG GAC AGA G-3'	5'-CCA GCA GAG GAG GCG AAG-3'
Exon 3	5'-ATC CAT AGT TAT GCG TGG GG-3'	5'-CTC CTG GAT CAT TTT GCT GC-3'
Exon 4+5	5'-TGG AAT ATG AGG TCT TCT AGG G-3'	5'-GAA GGC CAC AAA GTA TTT TAA GC-3'
Exon 4 Sequ	-	5'-CCA GTT ACT TGA AAA AGA AAA GGT T-3'
Exon 5 Sequ	5'-TCT TAA ACT CAG TGG GCT TTG-3'	-

Exon 5	5'-TGC ATT TCA TAT TAG	5'-GCA AAA GTC TTT AGA CCC
Sequ Neu	CAT AGC ATA GA-3'	AGT CA-3'
Exon 6	5'-CAG TAA ACC CAT CTT	5'-GCA AAA CAA TGC ACC TCA
	CTT ACT TTA TCC-3'	AG-3'
Exon 7	5'-AAA ATT ACG GGG TCT	5'-AAT GCC TCA TTC TTC CAA
	TTA ATA TGG-3'	ATG-3'
Exon 7 Neu	5'-CAG AGT CAT CTA CTG	5'-CTT TCA GTT CCT AGT ACC
	AGG AGA ATA TGT-3'	CTC ACA-3'
Exon 8	5'-GGT TGT TTT CAG AAG	5'-CAA CGG AAT ACA GCA TTC
	TAA AAG CAG-3'	AAC-3'
Exon 9+10	5'-TGG TTG CCT TGC TTA	5'-CCA AAA TGA GTA GAT AGC
	AAC TG-3'	ATC TTG AAC-3'
Exon 9	5'-CTT TCA TGG TTG CCT	5'-TGA CTG GCA AAG TCA CTC
	TGC TT-3'	CTT-3'
Exon 10	5'-AAG GTG GGA ACC ATC	5'-TGC TGA AAG AAG GAA AAG
	CTT TT-3'	CCT-3'
Exon 11	5'-TGT CGT CTC CAC ATT	5'-TCA AAA CCC ACA TGA AAA
	TGC TC-3'	TCT C-3'
Exon 11	5'-CTT TAT TTG CTG GAC	5'- AAC CAC ATA CTC AAA ACC
Neu	TAA TCT TTT ACA-3'	CAC A-3'
Exon 12	5'-TGA GTT CCC TAA AAT	5'-GCA TTG TGA ATG GTT GCT TG-
	AGT CTT TCA CC-3'	3'
Exon 13	5'-TGA AGC TTG CAT TGG	5'-TGA AAA CAG GCA GAA AAA
	TAA TGA G-3'	TAA ACC-3'
Exon 14	5'-TGG CTT CAA AAT CTC	5'-CAT TTG ACA GAA ATG CCA
	ATT TGC-3'	GG-3'
Exon 14	5'-CCA TAG CTT CTG TGT	5'-GAG GCA AAG AGG ACA GGA
Sequ	TGA GAA AA-3'	TCT-3'
Exon 15	5'-GCC TCT ATT TCT GAT	5'-CAA AAC ACT TGT TCC ATT AAA
	TCT CCA AAG-3'	CTG-3'
Exon 15	5'-TCT CCA AAG GAA TGG	5'-TGC TCC AGG AAG AGA ATA
Neu	CTC TAA-3'	GTC A-3'
Exon 15	5'-CCC TTG TTG GAG AGT	5'-CCA TTA AAC TGT AAT TAT CTA
Neu2	GTC TTA T-3'	TGT CCA-3'

Exon 16	5'-CTT TGC TGT CCT CCG	5'-CCA GTG ACT CAT CCA CAG
	AAG TG-3'	AGC-3'
Exon 16	5'-GGT GAT TAT TAT CAA	5'-GTG ACT CAT CCA CAG AGC
Neu	ACG AGT TGC T-3'	AGA-3'
Exon 17	5'-GGG ATC CTC GAA AAT	5'-TCA GAG ACA TGC ACT GGG
	ACT CC-3'	AC-3'

Die Oligonukleotide wurden folgendermaßen bezeichnet: Gen-ExonNr.-For/Rev-ggf.Neu/Neu2/Neu3/Sequ (Bsp.: SLC9A6-Exon16-For-Neu), wobei die Primer mit dem Zusatz „Sequ“ für die Sequenzierung benutzt wurden.

2.1.10.2 Oligonukleotide zur Verwendung in *SNaPshot*

Das Ziel der *SNaPshot*-Reaktion ist, lediglich eine Base an die Oligonukleotide anzuhängen und diese mittels Farbmarkierung zu detektieren. Da diese Base am 3'-Ende angehängt wird und der Position der erwarteten Variation entsprechen sollte, mussten *Forward*-Primer direkt vor der Variation enden und entsprechend *Reverse*-Primer direkt nach der Variation beginnen. Außerdem mussten sie eine Mindestlänge von 15bp haben und sich untereinander um mindestens 5bp in ihrer Länge unterscheiden, um mehrere Variationen in einem Schritt untersuchen zu können. Des Weiteren sollte die Schmelztemperatur der Oligonukleotide 50°C betragen. Beim Designen der Oligonukleotide wurde im ersten Schritt die Länge der Primer so gewählt, dass die Schmelztemperatur circa 50°C betrug. Durch zusätzliches Anhängen von Thymin bzw. Adenin am 5'-Ende also der, der Variation gegenüberliegenden, Position wurde dann die gewünschte Länge eingestellt (s. Abb.3).

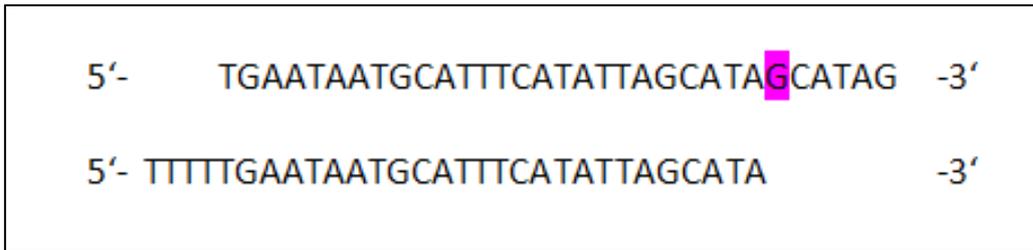


Abbildung 3: Zeile 1 zeigt einen Ausschnitt der Basensequenz. Die Variation ist pink markiert. Zeile 2 zeigt das generierte Oligonukleotid: am 3'-Ende endet das Oligonukleotid exakt mit der letzten Base vor der Variation, am 5'-Ende sind 4 Thymine angehängt worden.

Da diese zusätzlich angehängten Nukleotide nicht an der DNA binden, blieb die zuvor eingestellte Schmelztemperatur davon unbeeinflusst. Die Schmelztemperatur (T_m) wurde mit Hilfe des Programms OligoCalcs ermittelt (*BasicTemp*).

Tabelle 18: Bezeichnungen, Längen, Sequenzen und ermittelte Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide für *SNaPshot*.

	Bezeichnung	Länge	Sequenz	T_m
Exon 4+5	SLC9A6_SnaPshot	30bp	5'-TTT TTG AAT AAT GCA	49
	Ex4_Forw		TTT CAT ATT AGC ATA-3'	
	SLC9A6_SnaPshot	30bp	5'-TTT TAC TTG AAA AAG	51
	Ex4_Rev		AAA AGG TTT TCT ATG-3'	
Exon 11	SLC9A6_SNaPshot	19bp	5'-TCA GCC CCA TGT AGG	51
	Ex11_Rev		AGA A-3'	
Exon 13	SLC9A6_SNaPshot	35bp	5'-TTT TTT TTT TTT TTA	47
	Ex13_For		CGC TTC TGA TTG TGT TTT TT-3'	
Exon 15	SLC9A6_SNaPshot	25bp	5'-TTT TTG ATC AAA GTT	49
	Ex15_Rev		GTA CCA CAT C-3'	

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Alle in dieser Arbeit verwendeten Methoden begannen mit einer Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), wobei es sich hierbei nicht nur auf Standard-PCRs beschränkte, sondern auch eine *realtime*-PCR mit *Touchdown* und eine *Nested*-PCR zur Verwendung kamen. Die PCR dient der Amplifikation eines durch die Lage der Oligonukleotide definierten DNA-Abschnitts. Das klassische PCR-Programm durchläuft dabei mehrere Schritte. Zunächst werden die Doppelstränge der eingesetzten DNA bei 95°C in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt lagern sich die Oligonukleotide bei deren spezifischer Annealingtemperatur an die DNA an (Annealing). An diese werden im dritten Schritt durch die Taq-Polymerase Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) angebaut und somit die Ziel-DNA im ersten Zyklus dupliziert, im zweiten vervierfacht usw. (Elongation) [61, 62].

Tabelle 19: verwendetes PCR-Programm

Denaturierung	95°C	5'
Denaturierung	95°C	1'
Annealing	57-59°C	45"
Elongation	72°C	45"
Elongation	72°C	7'
Kühlung	4°C	∞

} 40x

Der Etablierung aller PCRs, ausgenommen der Experimente im LightCycler und den SNaPshot-Analysen, lag das in Tabelle 20 aufgeführte Standardprotokoll zu Grunde.

Tabelle 20: verwendetes Standard-PCR-Protokoll

		Volumen [µl]
Puffer	5x	3
Primer Forward	10µM	0,75
Primer Reverse	10µM	0,75
dNTPs	10µM	0,75
GoTaq	5U/µl	0,25
MgCl₂	25mM	0,3
Betain	5M	3
H₂O		5,2
DNA	ca. 50ng/µl	1
Gesamtvolumen		15

Tabelle 21: Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide laut Hersteller (Metabion) und die ermittelten Annealingtemperaturen bei PCR

* konnten nicht zufriedenstellend etabliert werden und wurden daher nicht verwendet

** zur Sequenzierung verwendet

*** nur in der Sequenzier-PCR verwendet

Exon	Forward Schmelztemp. Tm	Reverse Schmelztemp. Tm	Annealing- Temperatur
Exon 1+2	57°C	58°C	54°C
Exon 1+2 Neu2	58°C	58°C	58°C *
Exon 1+2 Neu3	62°C	61°C	59°C
Exon 3	58°C	58°C	58°C
Exon 4+5	60°C	59°C	58°C
Exon 4 Sequ	-	59°C	- ***
Exon 5 Sequ	57°C	-	- *
Exon 5 Sequ Neu	60°C	61°C	58°C **
Exon 6	64°C	56°C	58°C
Exon 7	58°C	55°C	57°C **
Exon 7 Neu	65°C	64°C	60°C
Exon 8	60°C	57°C	58°C
Exon 9+10	56°C	64°C	62°C *
Exon 9	56°C	59°C	58°C

Exon 10	56°C	58°C	58°C
Exon 11	58°C	57°C	60°C *
Exon 11 Neu	61°C	58°C	58°C
Exon 12	63°C	56°C	58°C
Exon 13	58°C	58°C	58°C
Exon 14	55°C	56°C	56°C
Exon 14 Sequ	59°C	61°C	58°C **
Exon 15	62°C	58°C	58°C
Exon 15 Neu	57°C	60°C	59°C *
Exon 15 Neu2	60°C	61°C	60°C *
Exon 16	60°C	63°C	58°C *
Exon 16 Neu	61°C	61°C	58°C
Exon 17	58°C	60°C	58°C

2.2.2 LightCycler® 480

Im ersten Schritt wurde die Patienten-DNA mit Hilfe des *Gene Scanning Experiments* im LightCycler® 480 auf mögliche Mutationen untersucht. Zu Beginn eines jeden Experiments wurde die Zielsequenz mittels *realtime*-PCR amplifiziert, wobei eine *Touchdown*-PCR die Spezifität der Amplifikate erhöhte. Diese hohe Spezifität wird erreicht, indem die *Annealing*-Temperaturen in den ersten Zyklen weit über der *Annealing*-Temperatur der Oligonukleotide gelegt werden. Die Oligonukleotide binden mit höchster Spezifität und die dabei entstehenden Amplifikate werden in den folgenden Zyklen bei stetig sinkenden *Annealing*-Temperaturen weiter vervielfältigt. Nach der Amplifikation schloss sich das *High Resolution Melting* als eigentlicher Analyseschritt an. Das erstmalige Erhitzen des PCR-Produkts auf 95°C bewirkt dabei zunächst das Auftrennen der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge, die sich anschließend neu zusammenfinden und so im Falle einer vorliegenden Variation Heteroduplices bilden. Diese Heteroduplices dissoziieren bei steigenden Temperaturen früher und sind so in der Schmelzkurve von der Wildtyp-DNA unterscheidbar. Wichtig für das gesamte Experiment ist der im entsprechenden Mastermix enthaltene Farbstoff. Dieser bindet nur an Doppelstränge und macht somit den Fortschritt bei der Amplifikation sowie beim Schmelzen sichtbar. Um auch homozygote Varianten sicher

detektieren zu können, wurden zwei DNA-Proben unterschiedlicher Patienten zusammen pipettiert. Da wir aufgrund der anzunehmenden Seltenheit Parkinson-assoziiertes Varianten davon ausgehen können, dass nicht beide DNA-Proben dieselbe Variation tragen, bilden sich so im Falle einer homozygoten Variation in der Mischung mit der Wildtyp-DNA ebenso Heteroduplexe [63].

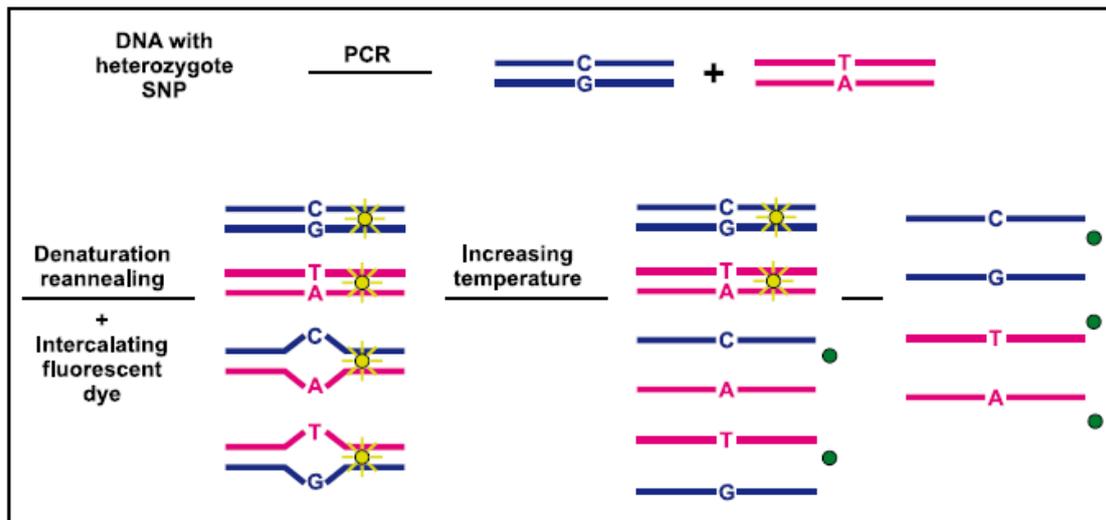


Abbildung 4: Das Verhalten beim Schmelzen im Falle eines heterozygoten SNPs. Die erste Zeile stellt die zwei Basenpaare C/G und T/A nach der Vervielfältigung mittels einer PCR dar. Im unteren Teil der Abbildung ist zu erkennen, wie sich daraus nach der Denaturierung sowohl Homo- (C/G und T/A) als auch Heteroduplexe (C/A und T/G) bilden (*Denaturation, reannealing*). Im Bereich der Doppelstränge bindet der Farbstoff (gelbes Symbol) (*Intercalating fluorescent dye*). Beim Schmelzen (*Increasing temperature*) trennen sich die Heteroduplexe früher auf, die Bindung des Farbstoffs löst sich. Später trennen sich auch die Homoduplexe [63].

2.2.2.1 Etablierung von Exon 3-14, 16 und 17

Als Grundlage der Etablierung diente ein im Zuge eines anderen Projekts etabliertes Protokoll [64]. Im ersten Testlauf wurden pro Oligonukleotid-Paar zwei verschiedene DNA-Proben zusammen pipettiert. Die Oligonukleotide wurden einzeln dazugegeben, die anderen Reagenzien wurden dagegen zuvor in ausreichender Menge in einem Eppendorf-Gefäß vermischt und dann mittels einer Multipipette zugegeben.

Tabelle 22: Standardprotokoll LightCycler

	Konzentrationen	Volumen [μ l]
High Resolution Mastermix		7,5
Primer Forward	10 μ M	0,5
Primer Reverse	10 μ M	0,5
High Resolution MgCl ₂	25mM	1,8
High Resolution H ₂ O		0,7
DNA	ca. 50ng/ μ l	2x2
Gesamtvolumen		15

Tabelle 23: Standardeinstellungen am LightCycler® 480

Ziel-temp. [°C]	Messungsmodus	Dauer [hh:mm:ss]	Beheizungsrate [°C/s]	Messungen [pro °C]	Sek. Zieltemp. [°C]	Temperaturänderung [°C]	Zyklen
Prä-Inkubation							1
95	kein	00:05:00	4,4	-			
Amplifikation							45-55
95	kein	00:00:20	2	-			
65	kein	00:00:20	2	-	53	0,5	1
72	einzel	00:00:20	2	-			
High Resolution Melting							1
95	kein	00:01:00	4,4	-			
40	kein	00:01:00	2,2	-			
65	kein	00:00:01	4,4	-			
95	kontinuierlich		0,02	25			
Kühlung							1
40	kein	00:00:30	2,2	-			

Die Beurteilung der Ergebnisse wurde mittels LightCycler® 480 Software 1.5 im Programm „*Tm Calling*“ durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass es einen eindeutigen Schmelzpunkt mit möglichst wenig Nebenprodukt gibt und die Schmelzkurve einen harmonischen Verlauf zeigt. Abbildung 5 zeigt den optimalen Kurvenverlauf am Beispiel von Exon 14.

Für die Exons 3, 4+5, 6, 8, 12, 13, 14 und 17 wurden diese Kriterien unter Verwendung des Standardprotokolls erfüllt.

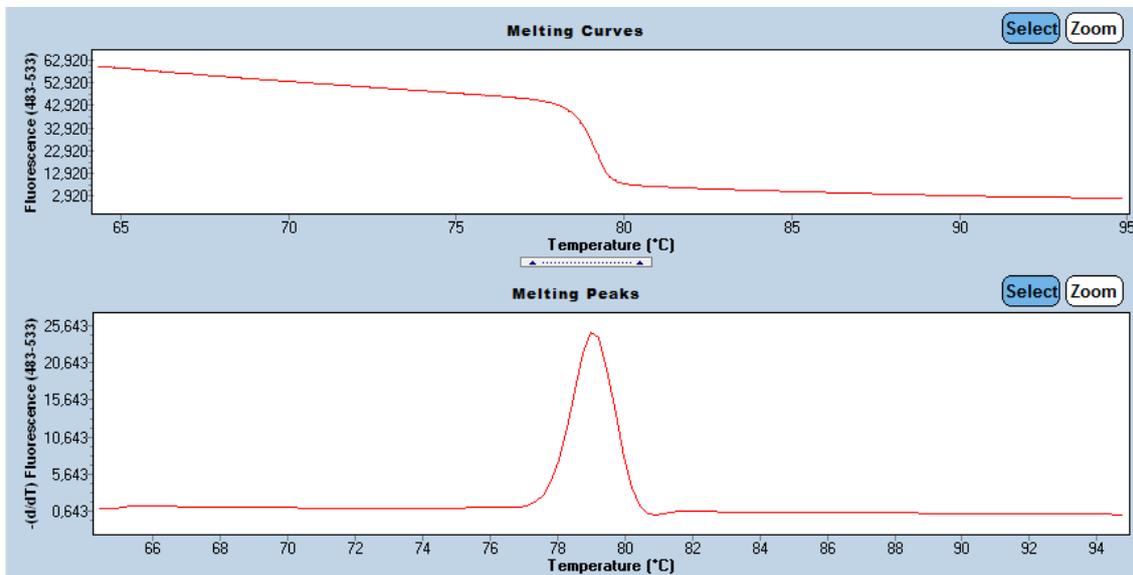


Abbildung 5: HRM-Lauf von Exon 14, Programm: *Tm Calling*. In der oberen Graphik ist die Fluoreszenz gegen die Temperatur [°C] aufgetragen. Die zunehmende Auftrennung der Doppelstränge bei steigender Temperatur ist an der Abnahme der Fluoreszenz zu erkennen. In der unteren Graphik ist $-(d/dT)$ Fluoreszenz gegen die Temperatur [°C] aufgetragen. Sie stellt folglich die (negative) Ableitung der oberen Graphik dar. An der Spitze des Graphen ist die Abnahme der Fluoreszenz am größten, hier liegt der Schmelzpunkt (ca 79°C).

Da die Testläufe der Exons 7, 11, 15 und 16 zwei und der Exons 9+10 drei Schmelzpunkte vorwiesen, wurde als erstes durch eine grobe Veränderung des Temperaturintervalls der *Touchdown*-PCR versucht, die Bindungsspezifität der Oligonukleotide zu erhöhen. Das Temperaturintervall wurde dabei zunächst noch relativ groß gehalten (61-52°C, 66-56°C, 67-58°C). Gleichzeitig wurde mit der Zugabe von 5% DMSO und 0,3M und 0,9M Betain variiert, wodurch ebenfalls die Stringenz der Amplifikation erhöht werden kann. Es stellte sich heraus, dass lediglich die Zugabe von 0,3M Betain eine Verbesserung ergab. Die Spezifität nahm zu, es waren allerdings immer noch zwei Schmelzpunkte vorhanden. Der nächste Schritt war, den Temperaturbereich genauer einzugrenzen. Dazu wurde für jedes Exon eine Gradienten-PCR durchgeführt. Das Ergebnis von Exon 11 ist beispielhaft in Abbildung 6 aufgezeigt.

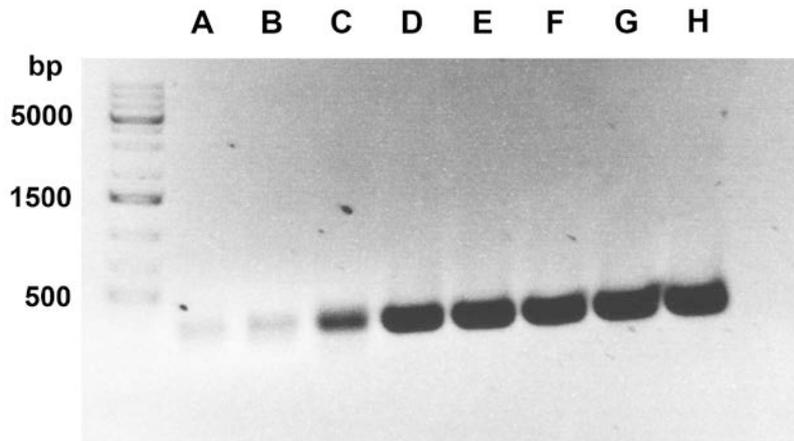


Abbildung 6: Auf ein Agarose-Gel aufgetragenes Ergebnis der Gradienten-PCR von Exon 11. Gezeigt wird die Zunahme der Spezifität und die Abnahme der Amplifikatmenge bei steigenden Annealing-Temperaturen. Annealingtemperaturen: A: 64°C, B: 63,1°C, C:61,6°C, D: 59,3°C, E: 56,6°C, F: 54,3°C, G: 52,8°C H: 52°C; Ladder: 1kb Plus

Aus den durchgeführten Gradienten-PCRs ergaben sich für die zu untersuchenden Amplifikate drei verschiedene Temperaturbereiche: 64-61°C (Exon 9+10, 11, 16), 59-56°C (Exon 7) und 57-54°C (Exon 15). Mit diesem Wissen wurden die Primer erneut am LightCycler getestet, wobei jeweils dieselbe DNA einmal nach dem Standardprotokoll und einmal mit 0,23M Betain vorbereitet wurde. Da jedoch durch all diese Maßnahmen die Spezifität nicht soweit erhöht werden konnte, dass am LightCycler nur noch ein Schmelzpunkt zu sehen war, wurden neue Primer generiert, wobei Exon 9 und 10 dieses Mal getrennt amplifiziert wurden.

Beim Testlauf mit den neuen Primern (bezeichnet mit Neu) stellte sich heraus, dass Exon 7, 9, 10, 11 und 16 deutlich bessere Schmelzkurvenverläufe ergaben und somit ebenfalls nach dem Standardprotokoll verwendet werden konnten.

Für Exon 1+2 und 15 waren noch weitere Etablierungsschritte notwendig, die im Folgenden dargelegt werden.

2.2.2.2 Etablierung von Exon 1+2

Auch bei Exon 1+2 wurde zunächst mittels einer Gradienten-PCR die optimale Schmelztemperatur der Primer ermittelt. Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, war die PCR in dem gesamten Temperaturbereich von 54-58°C erfolgreich. Da die Bande in Spur A das sauberste PCR Produkt aufwies und somit die PCR die höchste Spezifität hatte, wurde diese Temperatur als optimal eingestuft.

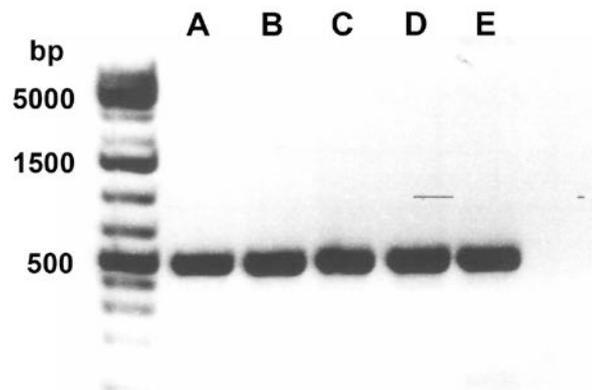


Abbildung 7: Auf ein Agarose-Gel aufgetragenes Ergebnis der Gradienten-PCR von Exon 1+2. Annealingtemperaturen A: 54°C, B: 55°C, C: 56°C, D: 57°C, E: 58°C; Ladder: 1kb Plus

Am LightCycler wurden die Primer also nach folgendem Aufbau getestet: Es wurden sowohl das Standardprotokoll (s. Tab. 22) als auch die Variante mit 0,7µl Betain statt H₂O (folglich 0,23M Betain) im gleichen Lauf eingesetzt. Die *Touchdown*-PCR wurde im Temperaturintervall von 56-53°C in 0,2°C-Schritten und 45 Zyklen durchgeführt. Die Analyse durch das Programm „*Tm Calling*“ zeigte jedoch mehrere Schmelzpunkte und einen in mehreren Stufen abfallenden Schmelzkurvenverlauf. Die Primer von Exon 1+2 wurden auch im Zuge der Etablierung von Exon 15 bei deren durch eine Gradienten-PCR ermittelten Schmelztemperaturen mitgeführt (61-58°C, 64-61°C). Doch auch diese Temperaturintervalle brachten kein besseres Ergebnis. Es wurden daher neue Primer-Paare generiert.

Die neuen Primer (Ex1+2-Neu2) ergaben im LightCycler nach Standardprotokoll einen optimalen Schmelzkurvenverlauf, allerdings zeigte das auf ein Agarose-Gel aufgetragene Produkt nicht die erwartete Länge des PCR Produkts von 596bp sondern nur von circa 75bp.

Den wichtigsten Schritt für die letzte Etablierung des Exons 1+2 erbrachte die Durchführung einer *Nested-PCR*. Hierzu wurden ein drittes Mal Primer generiert. Diese lagen außerhalb des Gen-Abschnitts, der zuvor generierten Primer (SLC9A6-Exon 1+2-For/Rev) und wurden mit Exon1+2-For/Rev-Neu3 bezeichnet.

Zur Etablierung der PCR wurden zwei Protokolle verwendet: zum einen das Standard-Protokoll mit 1M Betain und zum anderen ein Protokoll mit 5% DMSO. Für beide Protokolle wurde die $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5M bis 4,5M in 1M-Schritten austitriert.

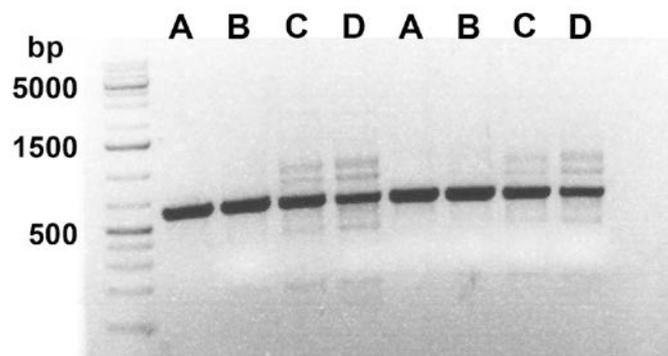


Abbildung 8: Titrationsreihe des Standard-Protokolls mit 1M Betain. Es wurde zweimal dieselbe Titrationsreihe mit verschiedener DNA durchgeführt (2xA-D). Man sieht eine Abnahme der Spezifität ab einer $MgCl_2$ -Konzentration von 3,5M. Spur A: 1,5M $MgCl_2$, B: 2,5M $MgCl_2$, C: 3,5M $MgCl_2$, D: 4,5M $MgCl_2$; Ladder: 1kb Plus

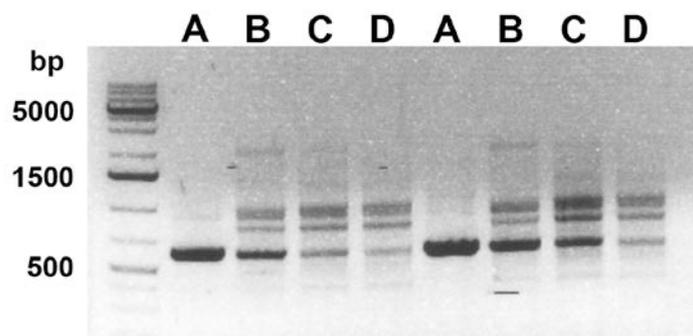


Abbildung 9: Titrationsreihe des Protokolls mit 5% DMSO. Es wurde zweimal dieselbe Titrationsreihe mit verschiedener DNA durchgeführt (2xA-D). Man sieht eine Abnahme der Spezifität ab einer $MgCl_2$ -Konzentration von 2,5M. Spur A: 1,5M $MgCl_2$, B: 2,5M $MgCl_2$, C: 3,5M $MgCl_2$, D: 4,5M $MgCl_2$; Ladder: 1kb Plus

Es ergaben sich also folgende mögliche Protokolle (alle bei einer Annealingtemperatur von 59°C):

Tabelle 24: PCR-Protokolle, * kein zusätzliches MgCl₂, da es bereits im Puffer enthalten ist

	Betain und 1,5M MgCl₂	Betain und 2,5M MgCl₂	DMSO und 1,5M MgCl₂
Puffer	3	3	3
Primer Forward	0,75	0,75	0,75
Primer Reverse	0,75	0,75	0,75
dNTPs	0,75	0,75	0,75
GoTaq	0,25	0,25	0,25
MgCl₂	- *	0,6	-*
DMSO	-	-	0,75
Betain	3	3	-
H₂O	5,5	4,9	7,75

Der nächste Schritt war, die *Nested-PCR* am LightCycler zu testen. Da hier jedoch keine genomische DNA, sondern ein PCR-Produkt, eingesetzt wurde, musste in diesem Schritt auch dessen einzusetzende Produktmenge ermittelt werden. Es wurde dazu jeder Ansatz in vierfacher Anzahl pipettiert und jeweils 2x 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0µl des PCR-Produkts zugegeben (2x weil auch hier jeweils zwei verschiedene Patienten-DNA-Proben zusammen pipettiert wurden). Der LightCycler-Lauf zeigte, dass maximal 0,5µl des PCR-Produkts eingesetzt werden dürfen, um einen eindeutigen Schmelzpunkt im Programm „*TmCalling*“ zu erhalten. Zwischen den anderen Variablen (1,5M MgCl₂ und Betain, 2,5M MgCl₂ und Betain, 1,5M MgCl₂ und DMSO) war nur ein minimaler Unterschied zu erkennen.

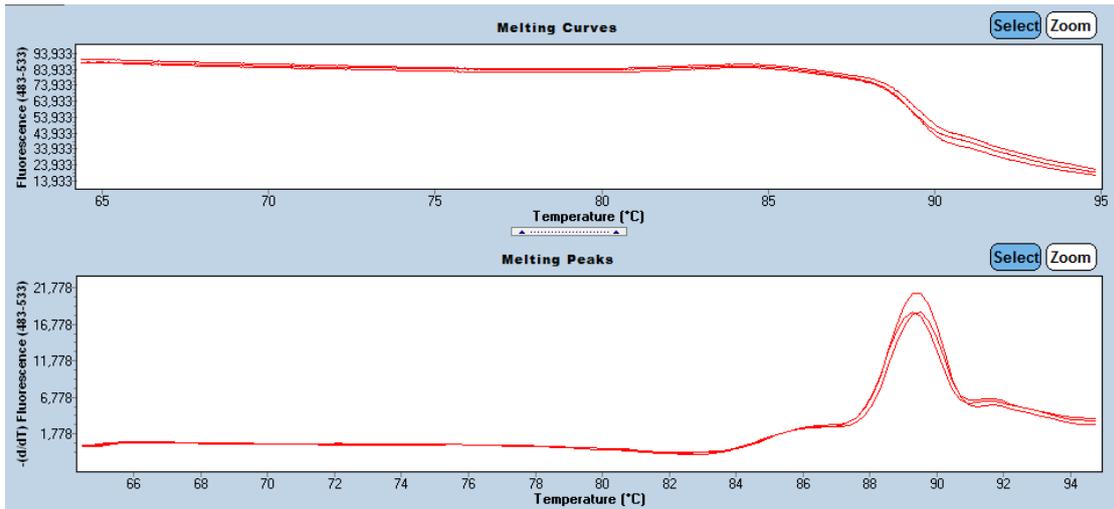


Abbildung 10: HRM-Lauf der *Nested-PCR* unter Einsatz von 0,5µl des PCR-Produktes. Es wurden die PCR-Produkte nach den zuvor etablierten Protokollen (1,5M MgCl₂ und Betain, 2,5M MgCl₂ und Betain, 1,5M MgCl₂ und DMSO) verwendet. Programm: *Tm Calling*. In der oberen Graphik ist die Fluoreszenz gegen die Temperatur [°C] aufgetragen. Die zunehmende Auftrennung der Doppelstränge bei steigender Temperatur ist an der Abnahme der Fluoreszenz zu erkennen. In der unteren Graphik ist $-(d/dT)$ Fluoreszenz gegen die Temperatur [°C] aufgetragen. Sie stellt folglich die (negative) Ableitung der oberen Graphik dar. An der Spitze des Graphen ist die Abnahme der Fluoreszenz am größten, hier liegt der Schmelzpunkt.

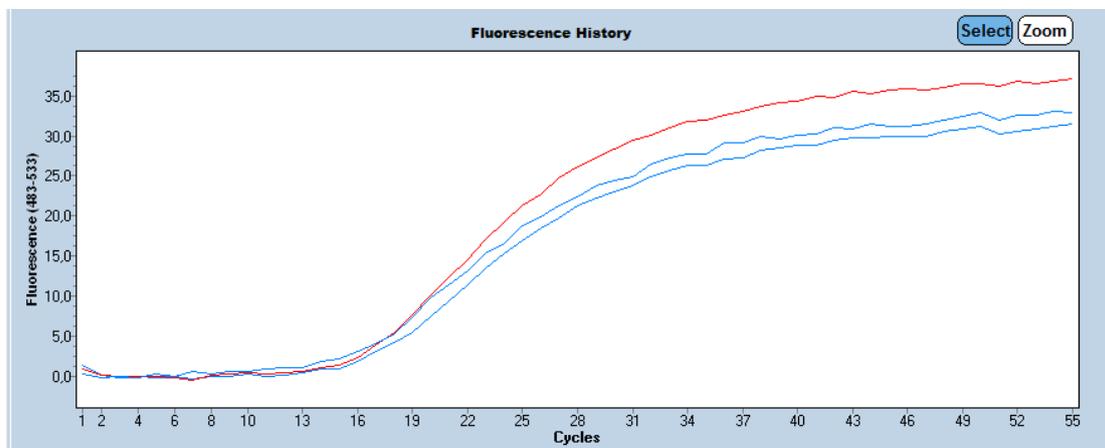


Abbildung 11: HRM-Lauf der *Nested-PCR* unter Einsatz von 0,5µl des PCR-Produktes, Programm: *Gene Scanning*, Unterprogramm „*Negatives*“. Zu sehen ist die Zunahme der Fluoreszenz und somit der Amplifikat-Menge (y-Achse) mit steigender Zyklen-Zahl (x-Achse). Je ein *sample* wurde mit dem PCR-Produkt der zuvor etablierten Protokolle (1,5M MgCl₂ und Betain, 2,5M MgCl₂ und Betain, 1,5M MgCl₂ und DMSO) angesetzt. Roter Graph: 2,5M MgCl₂ und Betain, blauer Graph (oben): 1,5M MgCl₂ und DMSO, blauer Graph (unten): 1,5M MgCl₂ und Betain.

Für das Screening von Exon 1+2 wurde somit folgendes Protokoll etabliert:

Tabelle 25: Protokoll Nested-PCR Exon 1+2

1. Schritt: PCR bei einer Annealing-Temperatur von 59°C, Primer SLC9A6-Exon1+2-For/Rev-Neu3

Puffer	3,00µl
Primer Forward	0,75µl
Primer Reverse	0,75µl
dNTPs	0,75µl
GoTaq	0,25µl
MgCl₂	0,60µl
Betain	3,00µl
H₂O	4,90µl
DNA	1,00µl
Gesamtvolumen	15,00µl

2. Schritt: LightCycler, Primer SLC9A6-Exon1+2-For/Rev

High Resolution Mastermix	7,5µl
Primer Forward	0,5µl
Primer Reverse	0,5µl
High Resolution MgCl₂	1,8µl
High Resolution H₂O	3,7µl
PCR-Produkt aus 1.Schritt	2x0,5µl

2.2.2.3 Etablierung von Exon 15

Für die Etablierung von Exon 15 wurden insgesamt drei verschiedene Primer-Paare generiert, es konnte jedoch mit keinem eine Bedingung gefunden werden, bei der mittels des Programms „*Tm Calling*“ nur ein Schmelzpunkt sichtbar war. Es wurde daraufhin entschieden, die Bedingung für das Screening zu verwenden, bei der das amplifizierte Produkt am spezifischsten ist. Im Folgenden wird dargelegt, wie diese Bedingung ermittelt wurde.

Zunächst wurden die Primer SLC9A6-Exon15-For/Rev am LightCycler bei Standardbedingungen getestet. Da das Ergebnis jedoch nicht zufriedenstellend war, wurde durch Wahl verschiedener Temperaturbereiche für die Annealing-Temperatur und durch Zugabe von 5% DMSO oder 0,3M Betain an Stelle von H₂O versucht, die Spezifität des Produkts zu steigern. Es stellte sich heraus, dass sich sowohl höhere Temperaturen als auch die Zugabe von 0,3M Betain (1µl) positiv auswirkten (s. Abb. 12). Um das Temperaturintervall optimal auf den Primer einstellen zu können, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die PCR war bei einer Annealing-Temperatur von 54°C am spezifischsten. Das war zwar ein überraschendes Ergebnis, da die vom Hersteller angegebenen Annealing-Temperaturen bei 62°C und 58°C lagen und sich in einem vorherigen Experiment eine Erhöhung der Temperatur positiv auswirkte. Im LightCycler bestätigte sich diese Temperatur jedoch als mindestens gleichwertig.

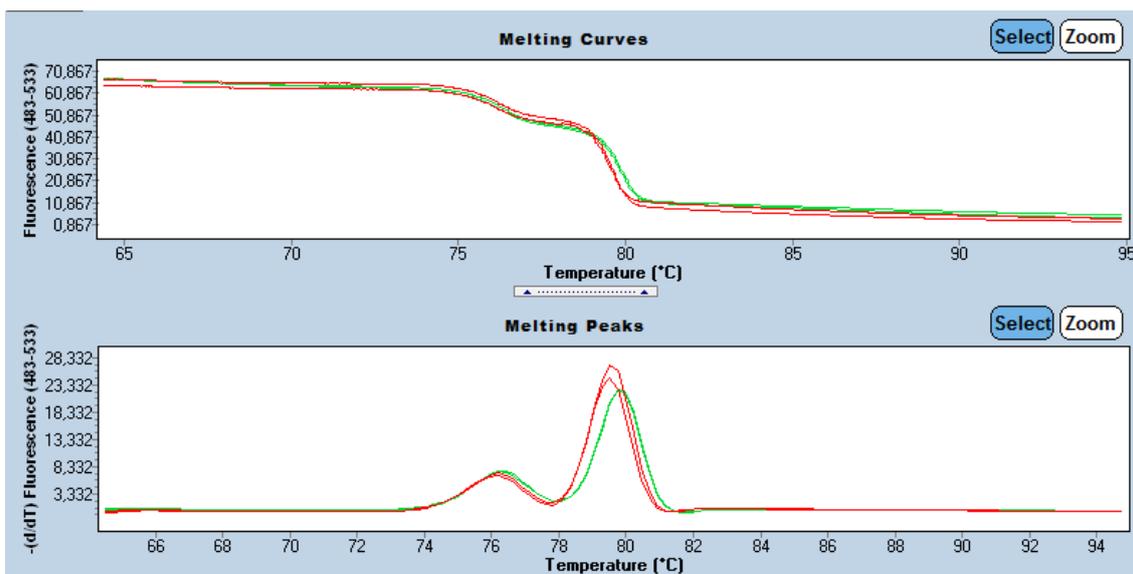


Abbildung 12: HRM-Lauf von Exon 15 bei 59-56°C. Programm: *Tm Calling*. In der oberen Graphik ist die Fluoreszenz gegen die Temperatur [°C] aufgetragen. Die zunehmende Auftrennung der Doppelstränge bei steigender Temperatur ist an der Abnahme der Fluoreszenz zu erkennen. In der unteren Graphik ist $-(d/dT)$ Fluoreszenz gegen die Temperatur [°C] aufgetragen. Sie stellt folglich die (negative) Ableitung der oberen Graphik dar. An der Spitze des Graphen ist die Abnahme der Fluoreszenz am größten, hier liegt der Schmelzpunkt. Zu erkennen sind zwei Schmelzpunkte. Grüner Graph: Ansatz nach Standardprotokoll, roter Graph: Ansatz mit 1µl Betain.

In der Hoffnung, mit anderen Primern ein spezifisches Produkt zu erhalten, wurden nacheinander insgesamt zwei neue Primerpaare kreiert (SLC9A6-Exon15-Neu und -Neu2). Es stellte sich jedoch heraus, dass deren Produkte

bei Standardbedingungen ebenfalls keinen eindeutigen Schmelzpunkt haben und weder die Zugabe von 0,23M Betain noch die Optimierung des Temperaturintervalls mittels Gradienten-PCR die Spezifität der Produkte steigerte. In einem weiteren Experiment wurde die MgCl₂-Konzentration für alle drei Primerpaare austitriert (1,5mM bis 4,0mM) und die Produkte der LightCycler-Läufe auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Bei den Primern Exon15 und Exon15-Neu2 ergab dies optimale MgCl₂-Konzentrationen von 2,5mM oder 3,0mM. Bei der Analyse der Agarose-Gele war pro aufgetragene Probe eine spezifische Bande von gesuchter Länge ohne Nebenprodukt oder Primer-Dimer zu sehen. Bei Exon15-Neu war bei allen MgCl₂-Konzentrationen sowohl der Schmelzkurvenverlauf als auch das Agarose-Gel-Bild ungenügend.

In einem letzten Testlauf wurden nochmals die zwei verbleibenden Primer (SLC9A6-Exon15, Exon15-Neu2) bei jeweils 2,5mM und 3,0mM MgCl₂ gegenübergestellt. Dabei war jeweils ein Ansatz nach Standardprotokoll, einer mit 5% DMSO, einer mit 2% Formamid und einer mit 0,25M Betain (0,75µl) angesetzt worden. In diesem Experiment zeigte der Ansatz mit Betain bei beiden Primern und beiden MgCl₂-Konzentrationen das beste Ergebnis. Der Primer SLC9A6-Exon15 war etwas besser als SLC9A6-Exon15-Neu2, wobei die MgCl₂-Konzentration kaum eine Änderung erkennbar machte.

Das Screening des Exons 15 wurde zusammenfassend folgendermaßen durchgeführt:

Tabelle 26: Protokoll für Exon 15

	Volumen [µl]
High Resolution Mastermix	7,5
Primer SLC9A6-Exon15-For	0,5
Primer SLC9A6-Exon15-Rev	0,5
High Resolution MgCl ₂	1,5
Betain	1
H ₂ O	0
DNA	2x2

Die Starttemperatur der *Touchdown*-PCR betrug 59°C und wurde in 0,3°C-Schritten auf 56°C abgesenkt. Dies wiederholte sich in 50 Zyklen.

2.2.2.4 Auswertung

Die Auswertung der LightCycler-Läufe wurde anhand des Analyse-Programms „*Gene Scanning*“ (LightCycler® 480 Software, Roche) durchgeführt. Zunächst werden von diesem Programm alle Proben herausgefiltert, bei denen die Fluoreszenz zu gering ist um aussagekräftige Schmelzkurven zu ergeben („*Negatives*“). Um das Schmelzverhalten der einzelnen Amplifikate miteinander vergleichen zu können, werden im zweiten Schritt die unterschiedlich hohen Fluoreszenz-Werte normalisiert. Dafür werden die Werte in einem neuen Diagramm jeweils zu einem Zeitpunkt vor und einem nach dem Schmelzen auf 100% bzw. 0% normiert. Der gewählte Zeitpunkt ist dabei modifizierbar (s. Abb. 13).

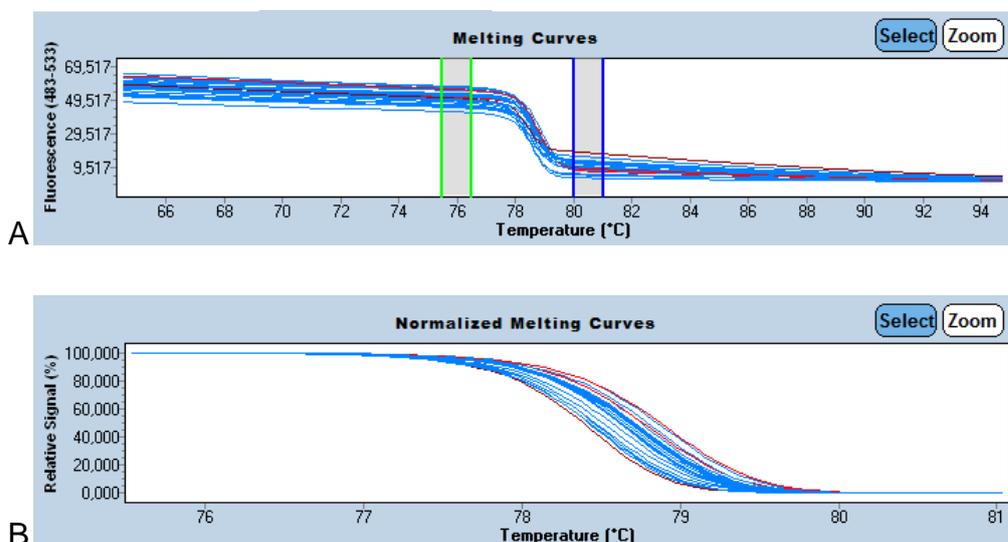


Abbildung 13: **A** Gemessene Fluoreszenz-Werte der einzelnen Proben in Abhängigkeit steigender Temperaturen. In **B** werden zu einem Zeitpunkt vor dem Schmelzen (grüner Bereich in A) die Fluoreszenzwerte mit 100% und nach dem Schmelzen (blauer Bereich in A) mit 0% gleichgesetzt. Es entsteht eine normalisierte Schmelzkurve.

In einem nächsten Analyseschritt werden die Schmelzkurven entlang der Temperaturachse verschoben („Temperature Shift“). Dafür wird ein Punkt gewählt, an dem die Produkte vollständig geschmolzen sind, also nur noch in Einzelsträngen vorliegen. Die Schmelzkurven werden so verschoben, dass sie an diesem Punkt deckungsgleich sind. Aus dem daraus entstehenden Diagramm lassen sich Abweichungen im Schmelzverhalten einzelner Proben ablesen und so heterozygote Variationen detektieren (s. Abb.14). Abschließend werden im „Difference Plot“ Proben, die ein ähnliches Schmelzverhalten zeigen, graphisch in Gruppen zusammengefasst [63]. Dies soll helfen, PCR-Produkte verschiedener zugrundeliegender DNA-Proben mit gleicher Basenfolge anhand eines vergleichbaren Schmelzverhaltens zu identifizieren und möglichen Proben mit veränderter Basensequenz aufgrund von Mutationen gegenüberzustellen.

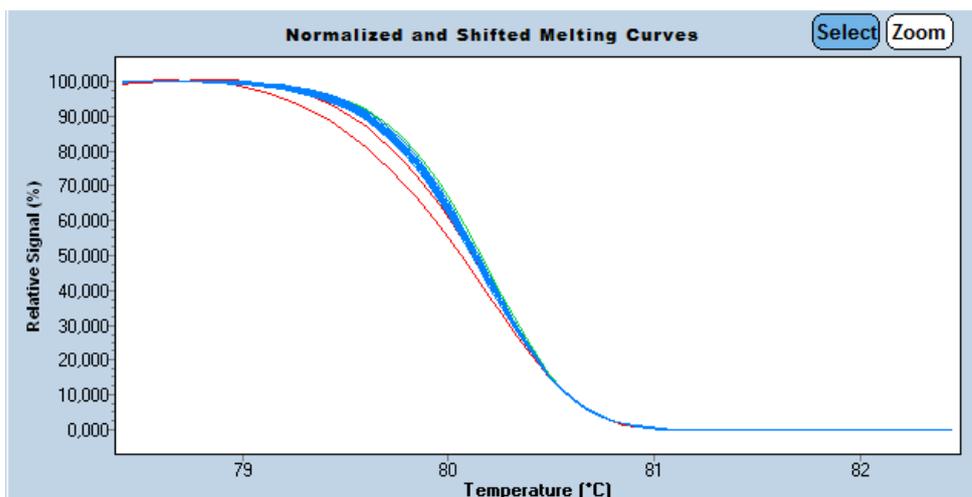


Abbildung 14: Verlauf der Schmelzkurven von verschiedenen Amplifikaten des Exons 10 (Patienten-Platte 1). Die Schmelzkurve ist zur Analyse normalisiert und verschoben. Die zwei roten Kurven zeigen im Vergleich zu den blauen ein verändertes Schmelzverhalten. Das Schmelzen bei geringeren Temperaturen deutet auf die Bildung von Heteroduplices hin. Im Diagramm aufgetragen ist die relative Signalstärke [%] (x-Achse) zur Temperatur [°C] (y-Achse).

2.2.3 Sequenzierung

Die Nukleotidabfolge der Proben, die im LightCycler durch ein verändertes Schmelzverhalten auffielen, wurden mittels Sequenzierung dargestellt. Dabei wurde die auf Sanger [65] zurückzuführende Didesoxysequenzierung verwendet. Die Sequenzier-PCR unterscheidet sich hier in zwei wesentlichen Punkten von herkömmlichen PCRs. Zum einen wird dem Sequenzier-Ansatz nur ein Primer zugegeben, wodurch die Amplifizierung in nur eine Richtung erfolgt und zum anderen beinhaltet das BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit neben dNTPs auch Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTPs). Das Fehlen der Hydroxyl-Gruppe an deren 3'-Ende führt dazu, dass nach dessen Anbau kein weiteres dNTP oder ddNTP mehr ansetzen kann. Die Amplifikation bricht ab. Das Produkt der Sequenzier-PCR besteht folglich aus unterschiedlich langen Amplifikaten, deren Beginn immer derselbe ist und an dessen Ende immer ein ddNTP steht. Die Markierung der vier ddNTPs mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht anschließend deren Detektion in Korrelation mit der Amplifikatlänge, während sie ein Gel oder Glaskapillaren durchlaufen [66]. Somit kann die Basenfolge des zu untersuchenden Amplifikats bestimmt werden.

2.2.3.1 Aufreinigung

Ausgangsprodukt für die Sequenzierungen waren PCR-Produkte der zu sequenzierenden Proben. Da bei der Sequenzier-PCR nur ein Primer im Ansatz vorhanden sein darf und Rückstände von Reagenzien der PCR die Sequenzierung stören könnten, musste das PCR-Produkt vor der Sequenzierung aufgereinigt werden. Dies wurde mit Hilfe einer Ethanol-fällung erreicht, in deren erstem Schritt 11 µl des PCR-Produkts mit jeweils 1 µl 3M Natriumacetat (pH4,8) und 25 µl 100%igem Ethanol versetzt wurden. Nach zehn-minütiger Inkubationszeit wurde das gesamte Produkt mindestens 45 Minuten bei 4600U/min zentrifugiert. Da sich dadurch die ausgefallenen PCR-Pellets am Boden absetzen, konnte von oben der Überstand vorsichtig abgesaugt werden. Für das anschließende Waschen wurden 50 µl 70%igen Ethanols hinzugegeben, das Produkt resuspendiert und danach bei gleicher Drehzahl für 15 Minuten zentrifu-

giert. Nach erneutem Absaugen des Überstands wurde dieser Schritt wiederholt. Nach dem letzten Entfernen des Überstands wurde das Pellet bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Durch die Zugabe von 15µl H₂O wurde das gereinigte PCR Produkt aufgenommen und stand nachfolgend Sequenzierungen zur Verfügung.

2.2.3.2 Sequenzier-PCR

Für die Sequenzier-PCR wurden zu 5,5µl des zuvor gelösten Pellets 0,5µl eines Oligonukleotids und jeweils 2µl beider Komponenten des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (BigDye und 5x Puffer) zugegeben. Im PCR-Cycler wurde folgendes Programm verwendet:

94°C	1'		
94°C	10"	}	30x
50°C	5"		
60°C	4'		
8°C	∞		

Im Anschluss wurde dieses Produkt erneut mittels einer Ethanolfällung aufgereinigt und getrocknet.

2.2.3.3 Denaturierung

Um die Amplifikate der Sequenzier-PCR in Einzelstränge aufzuteilen, wurden jeweils 7µl der Probe 10µl Formamid zugegeben. Danach erfolgte die Analyse im Sequenzier-Gerät.

2.2.3.4 Auswertung

Die Auswertung der Sequenzen wurde mit Hilfe der Programme pregap4 und gap4 (Staden Packages) durchgeführt.

2.2.3.5 verwendete Oligonukleotide

Im Allgemeinen wurden für die Sequenzierung dieselben Oligonukleotide verwendet wie für das LightCycler-Screening. Bei der Sequenzierung einzelner Exons musste davon abgewichen werden:

- Exon 1+2: SLC9A6-Exon1+2-For/Rev-Neu3
- Exon 4: PCR mit SLC9A6-Exon4+5-For/Rev,
Sequenzier-PCR mit SLC9A6-Exon4-Rev-Sequ
- Exon 5: SLC9A6-Exon5-For/Rev-SequNeu
- Exon 7: SLC9A6-Exon7-For/Rev
- Exon 14: SLC9A6-Exon14-For/Rev-Sequ
- Exon 15: SLC9A6-Exon15-For/Rev

2.2.4 Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Um bei der Sequenzierung gefundene Variationen mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurde, soweit geeignete Enzyme gefunden werden konnten, ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dabei macht man sich den natürlichen Schutzmechanismus von Bakterien zunutze. Diese besitzen Restriktionsendonukleasen (Enzyme), die Bakterien gegen eindringende fremde DNA durch deren Verdau (Restriktion) schützen. Endonukleasen erkennen spezifische Abfolgen von Nukleotiden (Erkennungssequenz), schneiden daraufhin entweder direkt an dieser Stelle oder etwas versetzt und zerstören so die eingedrungene DNA [67]. Diese Eigenschaft kann man für den Nachweis von Variationen verwenden. Voraussetzung dafür ist, dass die die Variation enthaltende Position innerhalb der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym liegt und diese so verändert wird, dass das Enzym spezifisch entweder die Nukleotid-Abfolge des Wildtyps oder der Variation erkennt. Die dadurch entstehenden Fragmente kann man mit Hilfe einer Gelelektrophorese sichtbar machen.

2.2.4.1 Auswahl der Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden mit Hilfe des NEBcutter V2.0 ermittelt. Dafür wurden sowohl die Wildtyp-Sequenz als auch die die Variation enthaltende Sequenz des PCR-Produkts eingesetzt. Aus der Menge der übermittelten Enzyme wurden die Enzyme herausgesucht, deren Erkennungssequenz die zu untersuchende Position enthielt. Konnten mehrere verwendbare Enzyme gefunden werden, wurde nach folgenden Kriterien entschieden: Zum einen musste der Längenunterschied der durch den Verdau entstehenden Fragmente mindestens 25bp groß sein, um sie auf dem Agarosegel später erkennen zu können und zum anderen wurde eine Inkubationstemperatur von 37°C bevorzugt, um gegebenenfalls diese im Inkubator durchführen zu können.

Tabelle 27: verwendete Restriktionsenzyme; rot: zu untersuchendes Nukleotid

Name	Erkennungssequenz
SmlI	5' CTYRAG 3'
HpyCH4III	5' ACNGT 3'
CviKI-1	5' RGCY 3'
BanI	5' GGYRCC 3'
PleI	5' GAGTC(N) ₄ 3'
BspEI	5' TCCGGA 3'
PfIMI	5' CCANNNNNTGG 3'
MboII	3' CTTCT(N) ₇ 5'
MwoI	5' GCNNNNNNNGC 3'
TspRI	5' NNCASTGNN 3'

Tabelle 28: Variablen und deren Bedeutungen

Variable	Bedeutung
N	A, C, G oder T
R	A oder C
Y	C oder T
S	C oder G

2.2.4.2 Etablierung der Restriktion

Für die Etablierung der verschiedenen Restriktionen standen durch Sequenzierung gesicherte Positiv- und Negativ-DNA-Proben zur Verfügung. Im ersten Schritt wurde mittels PCR der Bereich dieser DNA-Proben amplifiziert, der die Variation enthält. Nun musste herausgefunden werden, wieviel Enzymmenge pro PCR-Produkt eingesetzt werden muss, um eine eindeutige Restriktion zu erhalten. Das Ergebnis des jeweils ersten Verdau gab dabei den Hinweis, ob die einzusetzende Enzymmenge erhöht werden musste oder bereits weniger Enzymmenge ausreichte.

Zusammenfassend wurden folgende Protokolle für den Nachweis von Variationen etabliert:

Tabelle 29: Restriktionsprotokolle Teil 1

	SmlI	HpyCH4III	CvklI-1	BanI	PleI
PCR-Produkt [µl]	15	15	15	10	10
H₂O [µl]	2,55	2,8	2,8	2,6	2,7
Puffer [µl] , Name	2, NEBuffer 4	2, NEBuffer 4	2, NEBuffer 4	2, NEBuffer 4	2, NEBuffer 4
BSA [µl]	0,3	-	-	0,3	-
Enzym [µl]	0,15 \triangleq 1,5U	0,2 \triangleq 1U	0,2 \triangleq 1U	0,1 \triangleq 2U	0,3 \triangleq 1,5U
Inkubation	55°C 2'	37°C 2'	37°C 2'	37°C 2'	37°C 2'
Gel [%]	3	2	2	2	2
Loading Puffer	ø Bromphenolblau				
Ladder	50 bp Ladder				

Tabelle 30: Restriktionsprotokolle Teil 2

	MbolI	PfIMI	BspEI	MwoI	TspRI
PCR-Produkt [µl]	10	15	15	11	11
H₂O [µl]	2,9	1,7	2,8	1,5	1,85
Puffer [µl] , Name	1,5, CutSmart Buffer	2, NEBuffer 3	2, NEBuffer3	1,5, NEBuffer 3	1,5, NEBuffer 4
BSA [µl]	-	0,3	-	-	0,15
Enzym [µl]	0,6 \triangleq 3U	1 \triangleq 8U	0,2 \triangleq 2U	1 \triangleq 5U	0,5 \triangleq 5U
Inkubation	37°C 15“	37°C 2‘	37°C 2‘	60°C 2‘	65°C 2‘
Gel [%]	2	2	2	2	2
Loading Puffer	ø Bromphenolblau				
Ladder	50 bp Ladder				

2.2.5 SNaPshot

Bei der Sequenzierung wurden auch Variationen gefunden, die nicht mittels des unter 2.2.4 beschriebenen Restriktionsfragment-Längen-Polymerismus bestätigt werden konnten. In diesen Fällen wurde für deren Bestätigung und die spätere quantitative Untersuchung aller Patienten- und Kontroll-Proben SNaPshot® Multiplex angewandt. Vorteil dieser Methode ist, dass die Proben zeitgleich auf mehrere Variationen untersucht werden können. Das Prinzip dieser Methode ist der Sequenzierung ähnlich, allerdings wird bedingt durch die alleinige Anwesenheit von ddNTPs immer nur eine Base in der Elongations-Phase angehängt, danach erfolgt der Kettenabbruch (s. Kap. 2.2.3). Diese eine Base trägt die zu untersuchende Variation und ist fluoreszenzmarkiert. Mittels der anschließenden Kapillarelektrophorese können die untersuchten Proben genotypisiert werden [68].

2.2.5.1 Protokoll

Die Etablierung sowie die Durchführung dieser SNaPshot-Analysen wurden von Frau Brigitte Maurer, technische Assistentin im Labor für Funktionelle Neurogenomik des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung, durchgeführt. Untersucht wurden zwei in diesem Projekt vorgefundene Variationen in Exon 4+5 und Exon 15 und eine im Zuge eines anderen Projektes auffällig gewordene Mutation p.Thr489TyrfsX23 [58]. Im Folgenden wird das Protokoll dargelegt.

Zunächst wurden die Exons 4+5, 13 und 15 von jedem DNA-Sample amplifiziert. Dafür wurde ein Protokoll mit 5% DMSO und 2mM MgCl₂ etabliert. Das PCR-Programm entsprach dem Standard-Programm (s. Tab. 19).

Tabelle 31: PCR für SNaPshot

		Volumen [µl]
Puffer	5x	3
Primer Forward	10µM	0,75
Primer Reverse	10µM	0,75
dNTPs	10µM	0,75
GoTaq	5U/µl	0,25
MgCl₂	25mM	0,3
DMSO	100%	0,75
H₂O		7,45
DNA	ca. 50ng/µl	1
Gesamtvolumen		15

Um alle drei Variationen in einem Schritt untersuchen zu können, wurden nun die drei PCR-Produkte der jeweils selben DNA gepoolt (jeweils 3µl). 9µl des daraus resultierenden PCR-Produkts wurden mit 2µl FastAP (1U/µl) und 1µl Exol (2U/µl) eine Stunde bei 37°C und 15 Minuten bei 75°C aufgereinigt. Ziel war das rückstandslose Entfernen der in der ersten PCR verwendeten Oligonukleotide und dNTPs bzw. ddNTPs.

Im nächsten Schritt wurde die SNaPshot Multiplex PCR nach unten stehendem Protokoll (s. Tab. 32) durchgeführt.

Tabelle 32: SNaPshot ® Multiplex PCR

Volumen [μ l]				
PCR-Produkt	6	94°C	1'	} 25 Zyklen
H₂O	0,8	96°C	10''	
Mix (ABI)	2	52°C	5''	
Primer SNAP	je 0,4 insges. 1,2	60°C	30''	
Gesamtvolumen	10	10°C	∞	

Auch dieses PCR-Produkt wurde durch Zugabe von 1 μ l FastAP (1U/ μ l) eine Stunde bei 37°C und 15 Minuten bei 75°C aufgereinigt. Vor der Sequenzierung wurde jeweils einem μ l des PCR-Produktes 10 μ l Formamid und 0,2 μ l des LIZ-Standards zugegeben.

Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass die Mutation in Exon 13 besser detektierbar ist, wenn sie nicht mit den anderen Exons gepoolt wurde. Das Protokoll zur getrennten Analyse unterschied sich lediglich in der SNaPshot Multiplex PCR mit einem Gesamtvolumen von 8 μ l (s. Tab. 33).

Tabelle 33: SNaPshot ® Multiplex PCR für Exon 13

Volumen [μ l]				
PCR-Produkt	6	94°C	1'	} 25 Zyklen
		96°C	10''	
Mix (ABI)	1,6	52°C	5''	
Primer SNAP	0,4	60°C	30''	
Gesamtvolumen	8	10°C	∞	

2.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde in Kooperation mit Frau Lisa Wang, Abteilung für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen, durchgeführt. Mit Hilfe des logistischen Regressionsmodells wurde der Zusammenhang zwischen dem „Krankheitsstatus“ (erkrankt ja/nein) als Zielvariable und den beiden Einflussfaktoren „Geschlecht“ (0: weiblich, 1: männlich) und „Vorliegen des SNPs“ (0: nein, 1: ja) analysiert. Anschließend wurde das logistische Regressionsmodell nach getrennten Geschlechtern mit dem „Krankheitsstatus“ (erkrankt ja/nein) als Zielvariable und dem Einflussfaktor „Vorliegen des SNPs“ (0: nein, 1: ja) durchgeführt. Für die statistische Analyse wurde das Programm R (Version 3.0.2) verwendet. Die Odds Ratios und deren Konfidenzintervalle (95%) (KI) wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Odds ratio} = e^{\text{Estimates}} \quad \text{KI} = e^{(\text{Estimates} \pm 1,96 * \text{Standardfehler})}$$

Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert. Zur weiteren Überprüfung wurde der exakte Test nach Fisher eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Nicht validierte Auffälligkeiten aus der Screeninguntersuchung mittels HRM

Wichtig in dem ersten Schritt des Screenings ist es, eine Methode mit einer möglichst hohen Sensitivität zu wählen. Falsch positive Testergebnisse werden in Kauf genommen und im nächsten Untersuchungsschritt, der Sequenzierung, herausgefiltert. Im Folgenden wird eine Auswahl an falsch positiven *High-Resolution-Melting*-Läufen dargestellt.

3.1.1 Analyse des Exons 3

Abbildung 15 zeigt den HRM-Lauf von Patienten-Platte 1. Untersucht wurde hier Exon 3. Die Software markierte bereits selbstständig drei Proben (rote Kurven).

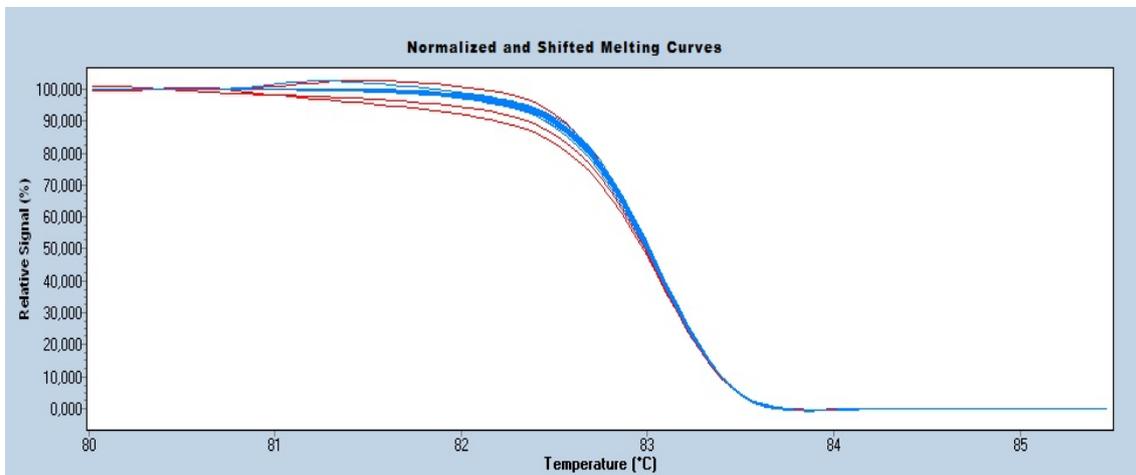


Abbildung 15: HRM-Lauf der Patienten-Platte 1 in Exon 3. Es ist die relative Signalstärke (x-Achse) gegen die Temperatur (y-Achse) beim HRM aufgetragen. Das Schmelzverhalten der drei roten Kurven ist im Vergleich zu den restlichen Proben (blaue Kurven) deutlich verändert. Die unterste rote Kurve stellt das Schmelzverhalten der Proben A3 und B3 dar, die mittlere rote Kurve G2 und H2 und die oberste A1 und B1.

Bei der anschließenden Sequenzierung konnte bei keiner der sechs Patienten-Proben eine Veränderung in deren Basensequenz festgestellt werden. Sie gelten als falsch positiv im initialen Screening.

3.1.2 Analyse des Exons 10

Ein weiteres Beispiel für falsch positive HRM-Kurven zeigt Abbildung 16. Hier wurde das Exon 10 auf der Patienten-Platte 2 untersucht. Dieses Beispiel soll veranschaulichen, dass auch von der Software als nicht auffällig gekennzeichnete Proben sequenziert wurden, um ein Übersehen von Mutationen auszuschließen.

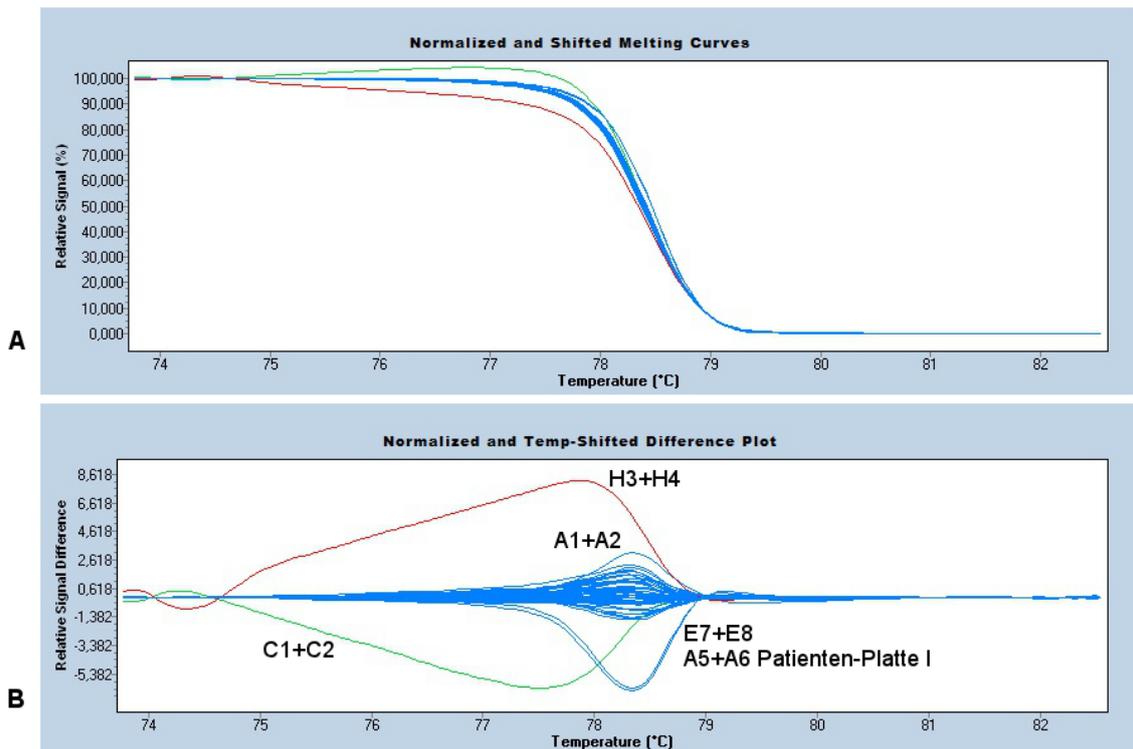


Abbildung 16: HRM-Lauf der Patienten-Platte 2 (Exon 10). Es ist die relative Signalstärke (x-Achse) gegen die Temperatur (y-Achse) beim HRM aufgetragen. **A** Zwei Schmelzkurven zeigen ein deutlich verändertes Schmelzverhalten (rote und grüne Kurve), außerdem setzt sich eine kleine Gruppe blauer Kurven von der Masse ab, deren Anzahl nicht genau differenzierbar ist. **B** Darstellung im „Difference Plot“. Hier ist erkennbar, dass sich drei blaue Kurven leicht von der Masse abheben (A1+A2 und E7+E8 der Patienten-Platte 2 und A5+A6 der Patienten-Platte 1).

Es wurden folglich die Proben A1, A2, C1, C2, E7, E8, H3 und H4 der Patienten-Platte 2 und A5, A6 der Patienten-Platte 1 sequenziert. Keine der Proben zeigte eine Veränderung in deren Basensequenz.

Die Auswertung des *Screenings* erfolgte mittels der in Kapitel 2.2.2.4 beschriebenen Analyseprogramme. Gesucht wurden Proben, deren Schmelzverhalten eine Abweichung im Vergleich zu den anderen Proben aufwies. Insgesamt wurden in den 17 untersuchten Exons 320 Patienten-Proben als auffällig gewertet und sequenziert. Zehn Proben wurden zusätzlich sequenziert, da im LightCycler eine zu geringe Anzahl an Amplifikaten produziert werden konnten und somit das HRM nicht genug Aussagekraft hatte. Bei der Sequenzierung wurde in 254 Proben kein Hinweis auf eine veränderte Basensequenz festgestellt. 76 Proben benötigten eine weitere Überprüfung.

3.2 Nicht validierte Auffälligkeiten aus der Screeninguntersuchung mittels HRM und der Sequenzierung

War eine Probe im LightCycler auffällig und die durch direkte Sequenzierung dargestellte Nukleotidabfolge zeigte ebenfalls eine Veränderung im Vergleich zur Wildtypsequenz, wurde diese noch durch eine dritte, von den ersten Methoden unabhängige, Methode überprüft. In zwei Fällen hat diese dritte Methode den Verdacht nicht bestätigt, was im Folgenden dargestellt wird.

3.2.1 Exon 17

Der HRM-Lauf der Patienten-Platte 1 in Exon 17 ergab zwei auffällige Kurvenverläufe (s. Abb. 17).

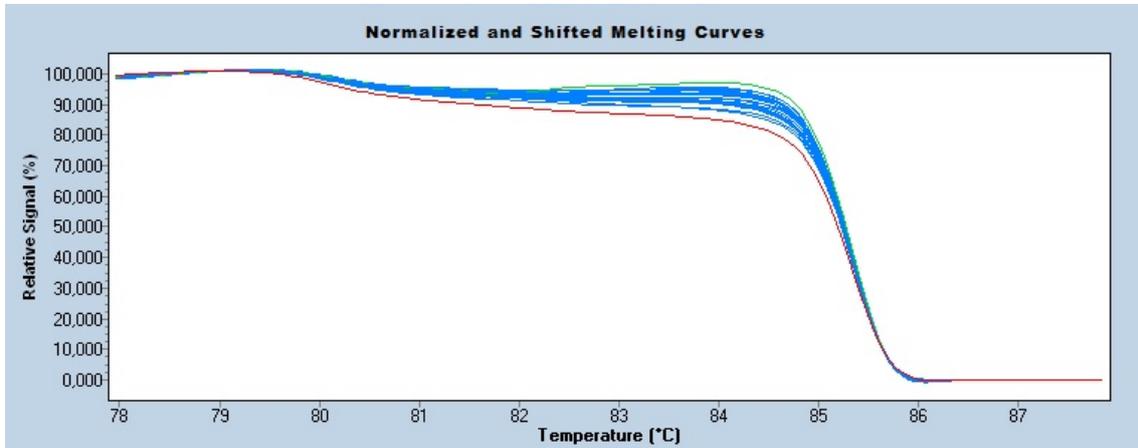


Abbildung 17: HRM-Lauf der Patienten-Platte 1 in Exon 17. Es ist die relative Signalstärke (x-Achse) gegen die Temperatur (y-Achse) beim HRM aufgetragen. Die Schmelzkurven zweier *samples* (rote und grüne Kurve) zeigen einen im Vergleich zur Masse (blaue Kurven) leicht veränderten Verlauf. Die rote Kurve stellt das Schmelzverhalten der Patienten-Probe H5 und einer zufällig gewählten nicht aus dem Patienten- oder Kontrollen-Kollektiv stammenden DNA-Probe dar. Die grüne Kurve H1 und H2.

Da eines dieser *samples* nicht mit einer zweiten Patienten-DNA gepoolt wurde, sondern mit einer zufällig ausgewählten DNA, die weder zu den Patienten noch zu den Kontrollen zählte, wurden im nächsten Schritt drei DNA-Proben (H1, H2 und H5) sequenziert.

In der Probe H1 und etwas schwächer in H5 war an der Position c.1853 ein zusätzliches Thymin-Signal zu sehen (s. Abb. 18).

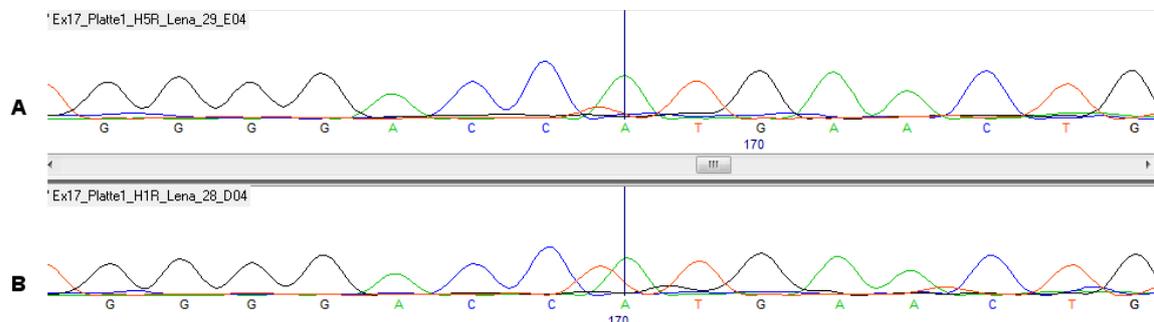


Abbildung 18: Auszug aus der direkten Sequenzierung der Patienten-Proben H5 (A) und H1 (B). Beide Sequenzierungen wurden mit dem Reverse-Primer durchgeführt.

Da sich dieser hauptsächlich mit dem Adenin-Signal überschneidet und eine Insertion aufgrund der links und rechts anschließenden gleichmäßigen singulären Signalen ausgeschlossen werden konnte, wurde ein Restriktionsenzym für den Basenaustausch c.1853A>T gesucht. Das Enzym PflMI stellte sich für diese Variation als geeignet heraus. Beim Vorliegen des Wildtyps soll es das PCR-Produkt in zwei Fragmente von 260bp und 185bp schneiden. Es wurden die Patienten-Probe H1, die in der Sequenzierung das stärkere Thymin-Signal zeigte und zwei in der Sequenzierung unauffällige Proben verdaut (Protokoll s. Tab. 30).

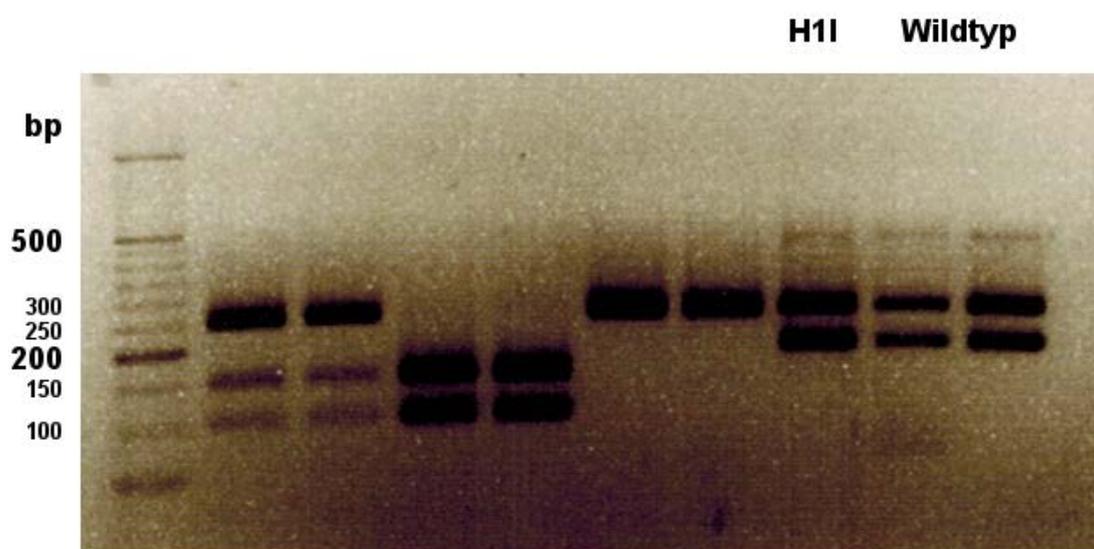


Abbildung 19: Restriktion mit 5U HpyCH4III und 8U des Enzyms PflMI, aufgetragen auf ein 2%iges Agarose-Gel. Links wurde eine 50bp Leiter als Marker aufgetragen, rechts daneben sechsmal Restriktionen mit dem Enzym HpyCH4III (s. Kap. 3.4.5) und dreimal mit dem Enzym PflMI. In der 8. Spalte befindet sich die Restriktion der Probe mit der möglichen Variation (Probe H1). In Spalte 9 und 10 sind Restriktionen zwei verschiedener DNA-Proben aufgetragen, bei denen an der zu untersuchenden Position eine Wildtyp-Sequenz vorliegt (durch direkte Sequenzierung gesichert). Die Erkennungssequenz des Enzyms PflMI entspricht der Wildtypsequenz. Bei deren Vorliegen wird folglich das 445bp große PCR-Produkt in zwei Fragmente zu 260bp und 185bp geschnitten. Es ist deutlich zu sehen, dass sowohl die Proben mit der Wildtyp-Sequenz als auch die mit der möglichen Variation geschnitten werden. Ein Vorliegen der vermuteten Variation konnte somit nicht bestätigt werden.

Die Restriktion zeigte jedoch, dass sowohl das PCR-Produkt der Patienten-Probe H1 als auch die PCR-Produkte der in den Sequenzierungen unauffälligen Proben von dem Restriktionsenzym geschnitten wurden. Das Vorliegen der vermuteten Mutation konnte somit nicht bestätigt werden.

3.2.2 Exon 17 und Intron 17

Der HRM-Lauf der Patienten-Platte 3 in Exon 17 ergab drei auffällige Kurvenverläufe (s. Abb. 20).

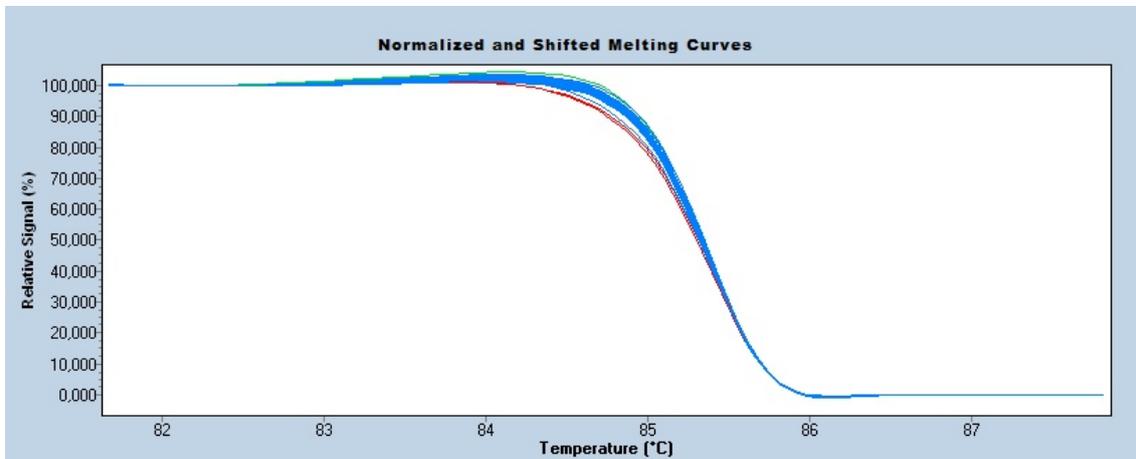


Abbildung 20: HRM-Lauf der Patienten-Platte 3 in Exon 17. Es ist die relative Signalstärke (x-Achse) gegen die Temperatur (y-Achse) beim HRM aufgetragen. Die zwei roten Kurven stellen das Schmelzverhalten der Proben G1/G2 und G3/G4, die grüne Kurve das Schmelzverhalten der Probe A11 dar. Sie weisen ein im Vergleich zu den anderen Proben (blaue Kurven) verändertes Schmelzverhalten auf.

Es wurden im nächsten Schritt fünf aus den drei Kurven resultierende DNA-Proben (G1, G2, G3, G4 und A11) sequenziert. G1, G2, G3 und A11 waren unauffällig.

Das *sample* G4 war schon zuvor bei der Konzentrations- und Rationsmessung am Nanodrop (Spectrophotometer ND-100) aufgefallen. Die Ratio 260/230 lag mit 0,74 weit unter dem Referenzwert für reine DNA von 2,0-2-2. Vermutlich aufgrund dessen musste dieses Sample mehrmals sequenziert werden, bis ein einziges Mal ein auswertbares Ergebnis erhalten wurde. Die Sequenz zeigt an zwei Positionen eine Auffälligkeit. Die erste (s. Abb. 21) befindet sich im Exon 17 (p.641), die zweite (s. Abb. 22) in Intron 17 (c. 1950+18). Es wird beide Male ein heterozygoter Austausch von Thymin zu Cytosin vermutet, an p.641 bewirkt dies keinen Aminosäureaustausch.

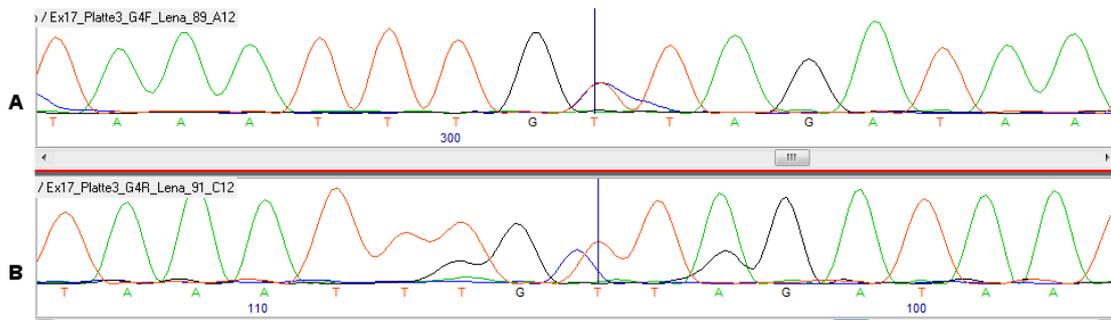


Abbildung 21: Auszug der direkten Sequenzierung der Probe G4 der Patienten-Platte 3. Oben sequenziert mit dem Forward-Primer, unten mit dem Reverse-Primer. Die Position mit dem vermuteten Basenaustausch ist durch die senkrechte Linie in der Mitte der Sequenz gekennzeichnet.

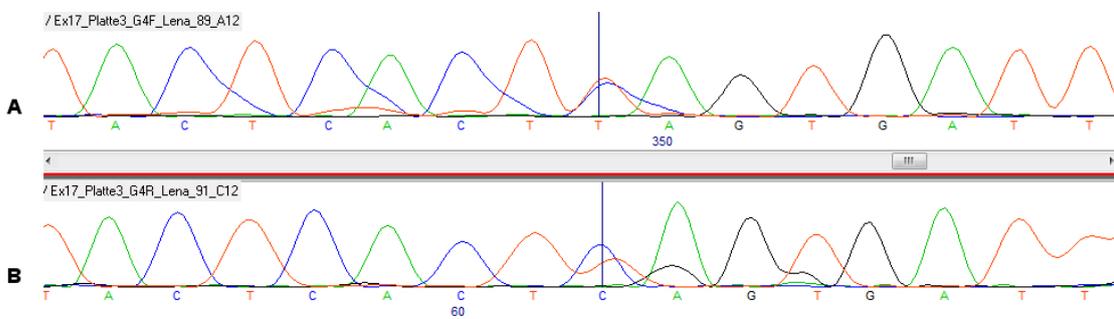


Abbildung 22: Auszug der direkten Sequenzierung der Probe G4 der Patienten-Platte 3. Oben sequenziert mit dem Forward-Primer, unten mit dem Reverse-Primer. Die Position mit dem vermuteten Basenaustausch ist durch die senkrechte Linie in der Mitte der Sequenz gekennzeichnet.

Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten wurde uns von der Universität London, von der wir diese Probe ursprünglich erhalten hatten, eine neue Probe desselben Patienten zur Verfügung gestellt. Mit dieser wurde das tatsächliche Vorliegen der vermuteten Variationen untersucht. Für die Bestätigung konnten zwei geeignete Restriktionsenzyme gefunden werden. MwoI für die im Exon 17 liegende Mutation und TspRI für die in Intron 17.

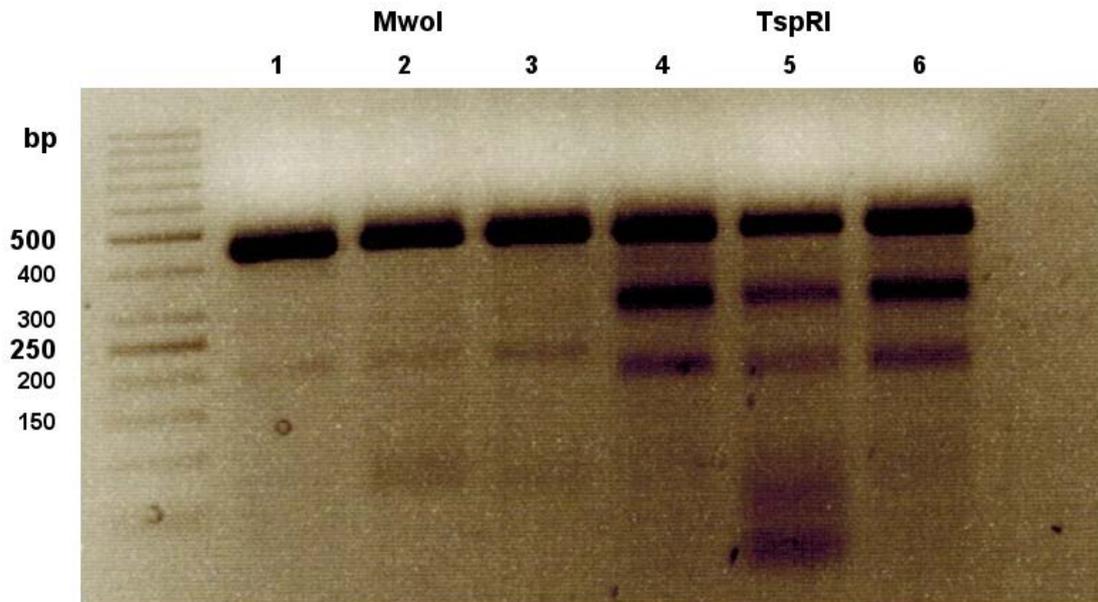


Abbildung 23: Restriktion mit 10U MwoI und 20U TspRI, aufgetragen auf ein 2%iges Agarosegel. Links wurde eine 50bp Leiter als Marker aufgetragen, rechts daneben drei Restriktionen mit dem Enzym MwoI und drei mit dem Enzym TspRI. Jeweils die erste Probe (Spur 1 und 4) zeigt die Restriktion von G4, die zwei weiteren Proben (Spuren 2+3 und 5+6) die von durch Sequenzierung gesicherten Negativ-Kontrollen. Die Erkennungssequenz des Enzyms MwoI entspricht der mutierten Nukleotid-Abfolge/Sequenz. Bei Vorliegen der vermuteten Mutation schneidet dieses das 445bp große PCR-Produkt in zwei Fragmente von 320bp und 125bp. Die Erkennungssequenz des Enzyms TspRI entspricht ebenfalls der mutierten Nukleotid-Abfolge/Sequenz. Bei Vorliegen der vermuteten Mutation wird das 445bp große PCR-Produkt an drei Stellen geschnitten, es entstehen vier Fragmente (204bp, 173bp, 59bp und 9bp). Liegt die Mutation nicht vor, schneidet TspRI das PCR-Produkt an zwei Stellen, es entstehen drei Fragmente (263bp, 173bp und 9bp).

Die RFLP konnte das Vorliegen der vermuteten Mutationen nicht bestätigen.

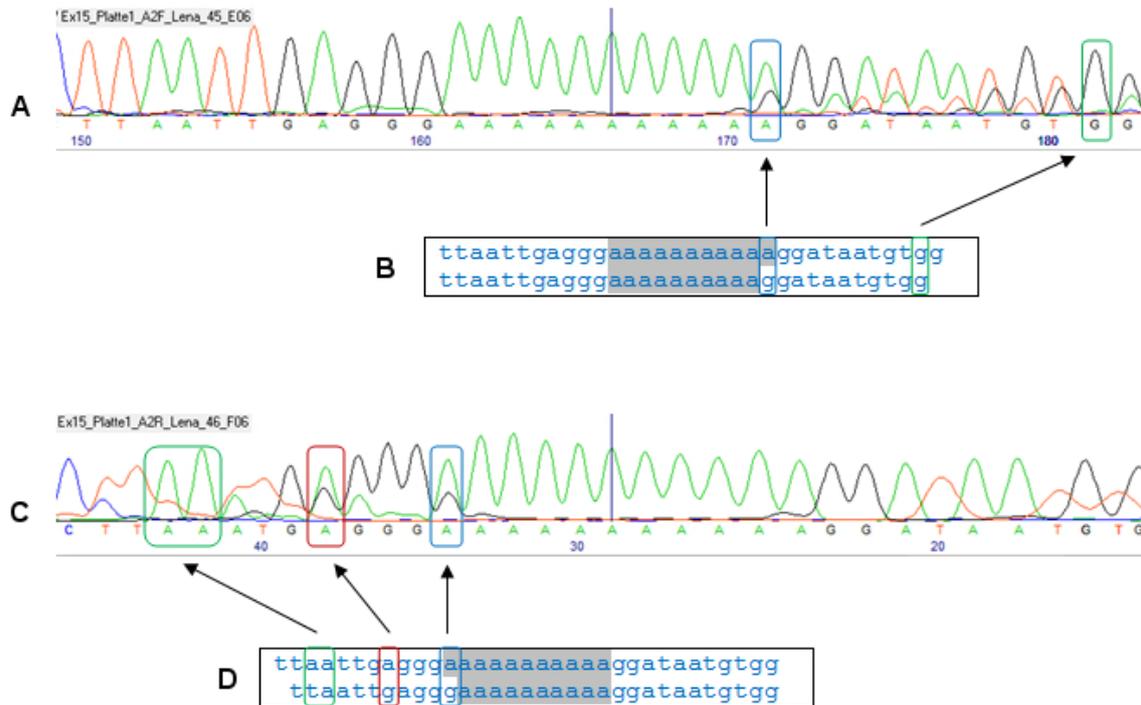


Abbildung 25: Ausschnitte aus der Sequenzierung der Probe A2 der Patienten-Platte 1 (Exon 15). **A und C** Signale der direkten Sequenzierung **A** Forward **C** Reverse Primer **B und D** Ausschnitt der Sequenz von Intron 15, elf sich wiederholende Adenin-Basen (grau hinterlegt), jeweils erste Zeile Wildtypsequenz, zweite Zeile mögliche Variation (Deletion von einer der elf Adenin-Basen). In den drei eingerahmten Bereichen (blau, rot, grün) sind jeweils die Signale der Wildtyp-Sequenz und der möglichen Variations-Sequenz zu sehen.

Diese Dopplung der Signale deutet in Intron 4 auf eine heterozygote Insertion einer Thymin-Base und in Intron 15 auf eine heterozygote Deletion einer Adenin-Base hin. Dagegen spricht jedoch, dass diese Auffälligkeit in jeder sequenzierten Patienten-Probe zu finden war. Unglaublich macht diese Vermutung außerdem, dass diese auch bei DNA-Proben männlicher Patienten gefunden wurden. Bei diesen ist jedoch ein Auftreten einer heterozygoten Variation wegen der Lage von *SLC9A6* auf dem X-Chromosom nicht möglich.

3.4 Validierte Auffälligkeiten aus der Screeninguntersuchung mittels HRM

3.4.1 Intron 4

Bei dem Light-Cycler-Lauf (*High Resolution Melting*) von Exon 4+5 fielen in Patienten-Platte 2 und 3 insgesamt 3 Kurvenverläufe durch ein verändertes Schmelzverhalten auf. Die frühere/stärkere Abnahme der relativen Signalstärke beim Schmelzvorgang weist auf eine zuvorige Bildung von Heterodublexen und somit auf eine mögliche Veränderung der Basenfolge hin.

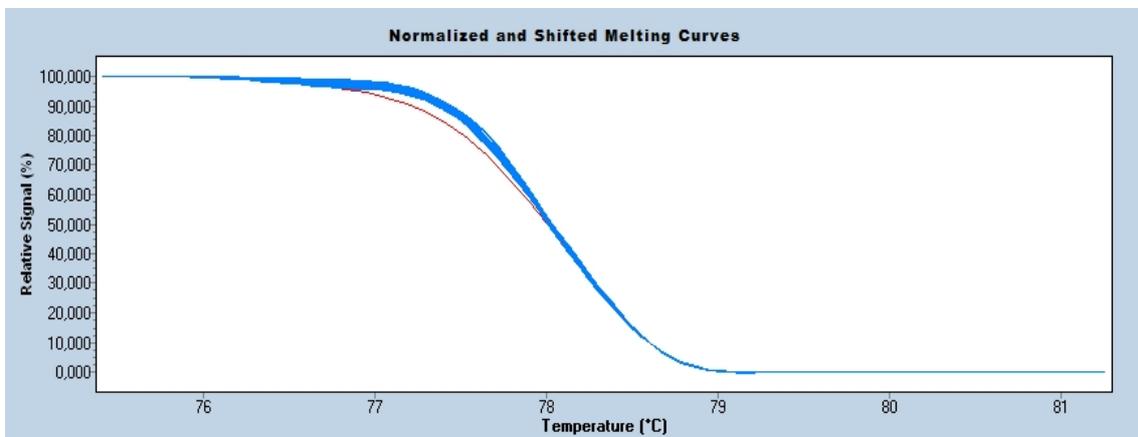


Abbildung 26: HRM-Lauf der Patienten-Platte 3 in Exon 4+5. Es ist die relative Signalstärke (x-Achse) gegen die Temperatur (y-Achse) beim HRM aufgetragen. Die rote Kurve stellt hier das Schmelzverhalten der Proben F7 und F8 der Patienten-Platte 3 dar. Sie weist ein im Vergleich zu den anderen Proben (blaue Kurven) deutlich verändertes Schmelzverhalten auf.

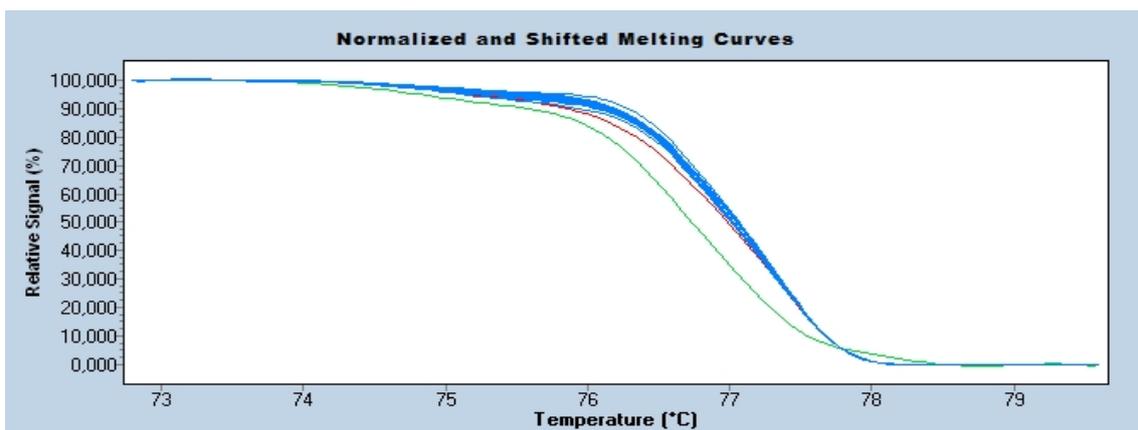


Abbildung 27: HRM-Lauf der Patienten-Platte 2 in Exon 4+5. Es ist die relative Signalstärke (x-Achse) gegen die Temperatur (y-Achse) beim HRM aufgetragen. Die rote Kurve stellt hier das Schmelzverhalten der Proben H7 und H8, die grüne der Proben G5 und G6 der Patienten-Platte 2 dar. Sie weisen ein im Vergleich zu den anderen Proben (blaue Kurven) deutlich verändertes Schmelzverhalten auf.

In der anschließenden direkten Sequenzierung wurden die Amplifikate der sechs DNA-samples auf eine Veränderung in deren Basenfolge untersucht. H7, G5 und G6 der Patienten-Platte 2 und F8 der Patienten-Platte 3 zeigen keine Auffälligkeiten. Die samples H8 der Patienten-Platte 2 und F7 der Patienten-Platte 3 zeigen dagegen an Position c.448-71 einen Basenaustausch von G nach C.

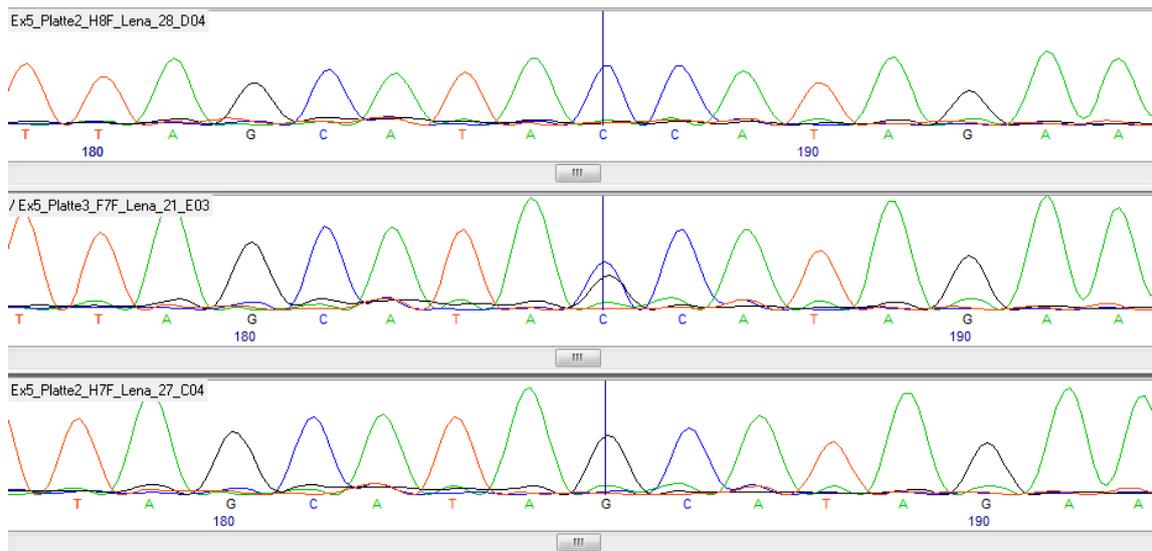


Abbildung 28: Auszug der direkten Sequenzierung der Proben H8 (oben) und H7 (unten) der Patienten-Platte 2 und F7 (Mitte) der Patienten-Platte 3. Die Position mit dem vermuteten Basenaustausch ist durch die senkrechte Linie in der Mitte der Sequenz gekennzeichnet. Die Basenfolge in der untersten Reihe entspricht der des Wildtyps, H8 lässt auf einen homo- oder hemizygoten Austausch schließen, F7 auf einen heterozygoten.

Der Basenaustausch von Guanin zu Cytosin bewirkt keinen Aminosäureaustausch und ist somit „still“ (c.448-71G>C). Es handelt sich um einen bekannten SNP, der unter der rs-Nummer 116275343 gelistet ist.

Im nächsten Schritt wurde das Vorliegen des oben genannten SNPs mit Hilfe von SNaPshot® Multiplex bestätigt.

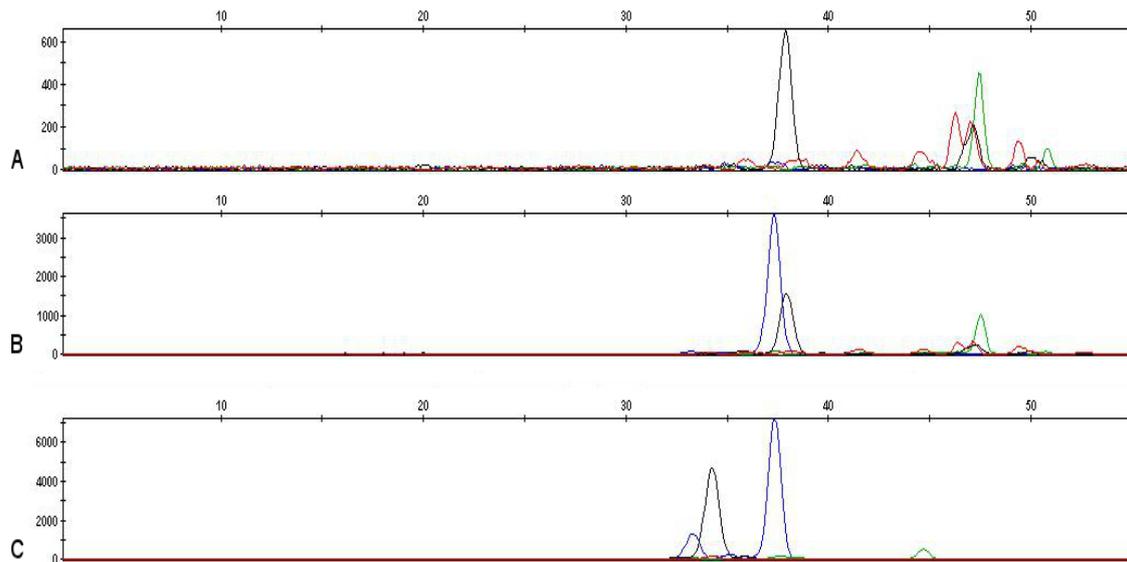


Abbildung 29: Auszug aus der SNaPshot-Analyse. Guanin ist blau kodiert, Cytosin schwarz. Der in diesem Falle zu beurteilende Peak befindet sich auf der Y-Achse zwischen 35 und 40. **A** zeigt an dieser Position einen schwarzen Peak. Der SNP liegt folglich homozygot vor. In **B** ist sowohl ein schwarzer als auch ein blauer Peak zu sehen. Der SNP liegt heterozygot vor. In **C** ist ein einzelner blauer Peak zu sehen. Es liegt die Wildtyp-Sequenz vor.

Um zum Abschluss eine mögliche Assoziation zwischen identifizierten genetischen Varianten im *SLC9A6* Gen und CBS/CBD herstellen zu können, wurden mit Hilfe von SNaPshot® Multiplex alle DNA-samples der Patienten- und Kontrollgruppe auf diese Variation untersucht.

Tabelle 36: Ergebnis der Überprüfung aller Patienten- und Kontroll-Proben auf c.448-71G>C mittels SNaPshot.

	Genotyp					Allelträger	
	männlich		weiblich			G	C
	G	C	GG	GC	CC		
Patientengruppe (n=206)	77	0	128	1	0	334	1
Kontrollgruppe (n=227)	120	0	107	0	0	334	0

Acht Patienten-Proben mit unbekanntem Geschlecht ergaben den Genotyp G bzw. GG, eine den Genotyp C bzw. CC. Sie sind in der statistischen Auswertung nicht enthalten.

Tabelle 37 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung. Die Analyse erfolgte in einem logistischen Regressionsmodell mit dem „Krankheitsstatus“ (erkrankt ja/nein) als Zielvariable und den beiden Einflussfaktoren „Geschlecht“ (0: weiblich, 1: männlich) und „Vorliegen des SNPs“ (0: nein, 1: ja). Wie die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle zeigen, wurden sowohl bei der Analyse der gesamten Kohorte als auch in der nach Geschlechtern getrennten Analyse keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen des SNPs und dem Krankheitsstatus festgestellt. Mit dem anschließend durchgeführten exakten Test nach Fisher konnten ebenfalls keine Zusammenhänge festgestellt werden.

Tabelle 37: Statistische Auswertung des gefundenen SNPs. Dargestellt sind die Odds Ratios, deren Konfidenzintervalle (95%) und die p-Werte des SNPs, aufgelistet nach den analysierten Gruppen (nur Frauen, nur Männer, gesamte Kohorte). Odds Ratios über 1 könnten einen Risikofaktor, unter 1 einen Schutzfaktor vermuten lassen. Allerdings zeigen die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle, dass diese Ergebnisse als nicht signifikant (n.s.) einzustufen sind.

SNP	Gruppen	Odds ratio	Konfidenzintervall (95%)		p-Wert
rs 116275343	Frauen	1,57	0,59	4,19	0,37 n.s.
	Männer	-	-	-	-
	gesamt	1,57	0,60	4,15	0,36 n.s.

3.4.2 Exon 10

Bei der Beurteilung des Schmelzverhaltens der Proben von Patienten-Platte 1 in Exon 10 setzten sich zwei Kurven von den restlichen ab (s. Abb. 30). Sie zeigen bereits bei niedrigeren Temperaturen einen deutlichen Signlrückgang, was ein Hinweis auf das Vorliegen von Heterodublices ist.

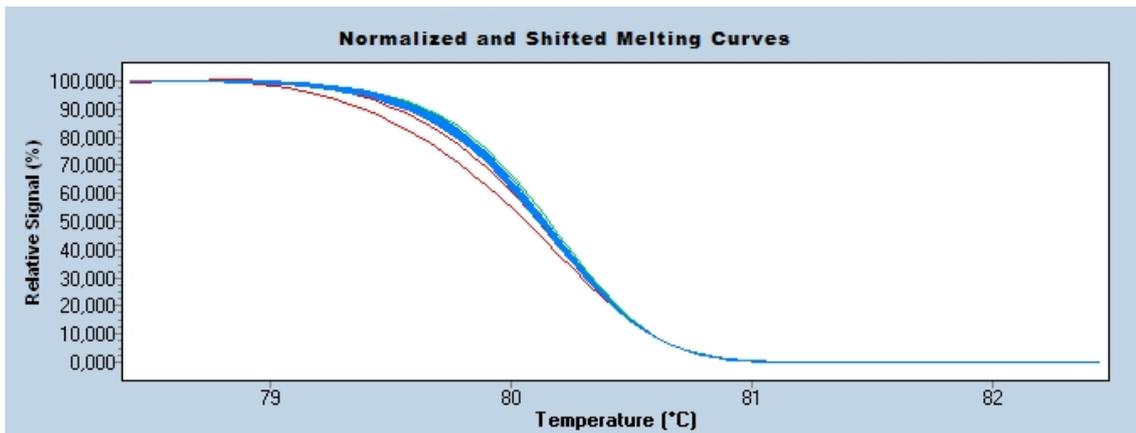


Abbildung 30: HRM-Lauf der Patienten-Platte 1 in Exon 10. Es ist die relative Signalstärke (x-Achse) gegen die Temperatur (y-Achse) beim HRM aufgetragen. Die Signalstärke der Proben, die die beiden roten Kurven darstellen, nimmt im Vergleich zu den restlichen Proben (blaue Kurven) bereits bei deutlich niedrigeren Temperaturen ab. Die untere rote Kurve stellt das Schmelzverhalten der Proben B3 und B4 dar, die obere rote Kurve B1 und B2 und die grüne Kurve A5 und A6.

Im nächsten Schritt wurden diese sechs DNA-Proben sequenziert. Die sich nur schwach von den blauen Kurven abhebenden Proben A5 und A6 (grüne Kurve in Abb. 30) wiesen keine Auffälligkeiten in der Nukleotidabfolge auf. Bei den beiden anderen Paaren B1/B2 und B3/B4 war jeweils eine Probe unauffällig (B1 und B3), bei B2 und B4 wurde dagegen ein Basenaustausch an Position c.1029 gefunden (s. Abb. 31).

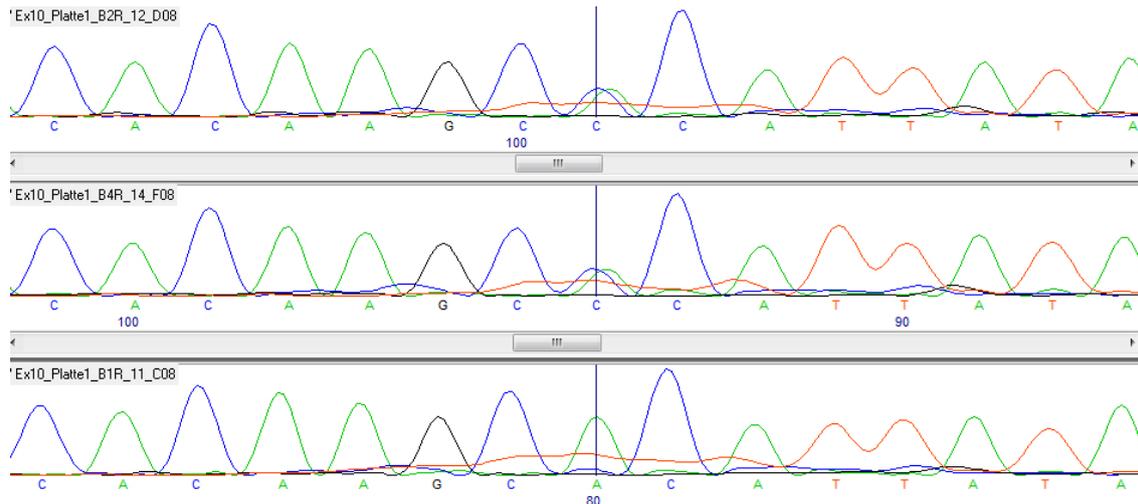


Abbildung 31: Auszug der direkten Sequenzierung der Proben B2 (oben) und B4 (Mitte) und B1 (unten) der Patienten-Platte 1. Die Position mit dem vermuteten Basenaustausch ist durch die senkrechte Linie in der Mitte der Sequenz gekennzeichnet. Die Basenfolge in der untersten Reihe entspricht der des Wildtyps, B2 und B4 lassen auf einen heterozygoten Austausch schließen.

Der Basenaustausch von Adenin zu Cytosin bewirkt keinen Aminosäureaustausch, es ist ein sogenannter stiller Austausch (p.A343A). Es handelt sich um einen bekannten SNP, der unter der rs-Nummer 142049079 gelistet ist.

Nun erfolgte noch die Bestätigung des Basenaustauschs mittels Restriktion. Es wurde das Enzym Cvikl-1 gefunden, dessen Erkennungssequenz der Nukleotid-Abfolge der Variation entspricht und somit nur bei Vorliegen des Basenaustausches das 187bp große PCR-Produkt in drei Fragmente zu je 86bp, 83bp und 18bp schneidet (s. Abb 32).

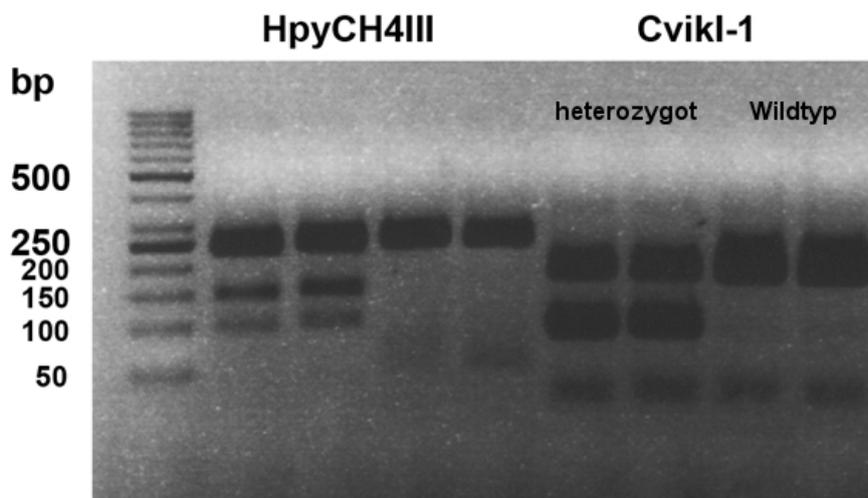


Abbildung 32: Restriktion mit 1U HpyCH4III und 1U Cvikl-1, aufgetragen auf ein 2%iges Agarose-Gel. Links wurde eine 50bp Leiter als Marker aufgetragen, rechts daneben viermal Restriktionen mit dem Enzym HpyCH4III (s. Kap. 3.4.5) und viermal mit dem Enzym Cvikl-1. Jeweils zwei Proben waren dabei heterozygote Variationsträger und zwei Wildtyp. Die Erkennungssequenz des Enzyms Cvikl-1 entspricht der mutierten Nukleotid-Abfolge/Sequenz. Diese schneidet an zwei Stellen, wodurch drei Fragmente in Länge von 86bp, 83bp und 18bp (auf dem Gel nicht sichtbar) entstehen. Das ungeschnittene PCR-Produkt des Wildtyps hat eine Länge von 187bp. Die Restriktion mit HpyCH4III diente der Bestätigung einer in dem Kapitel 3.4.5 aufgeführten Variation.

Um eine mögliche Assoziation dieses SNPs mit CBS/CBD zu überprüfen, wurden nun sowohl alle Patienten-Proben als auch die gesunden Kontroll-Proben mit Hilfe der Restriktion überprüft.

Tabelle 38: Ergebnis der Überprüfung aller Patienten- und Kontroll-Proben auf p.A343A mittels Restriktion.

	Genotyp					Allelträger	
	männlich		weiblich			A	C
	A	C	AA	AC	CC		
Patientengruppe (n= 214)	81	0	131	2	0	345	2
Kontrollgruppe (n= 188)	101	1	83	3	0	270	4

Neun Patienten-Proben mit unbekanntem Geschlecht ergaben den Genotyp A bzw. AA. Sie sind in der statistischen Auswertung nicht enthalten.

Tabelle 39 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung. Die Analyse erfolgte in einem logistischen Regressionsmodell mit dem „Krankheitsstatus“ (erkrankt ja/nein) als Zielvariable und den beiden Einflussfaktoren „Geschlecht“ (0: weiblich, 1: männlich) und „Vorliegen des SNPs“ (0: nein, 1: ja). Wie die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle zeigen, wurden sowohl bei der Analyse der gesamten Kohorte als auch in der nach Geschlechtern getrennten Analyse keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen des SNPs und dem Krankheitsstatus festgestellt. Mit dem anschließend durchgeführten exakten Test nach Fisher konnten ebenfalls keine Zusammenhänge festgestellt werden.

Tabelle 39: Statistische Auswertung des gefundenen SNPs. Dargestellt sind die Odds Ratios, deren Konfidenzintervalle (95%) und die p-Werte des SNPs, aufgelistet nach den analysierten Gruppen (nur Frauen, nur Männer, gesamte Kohorte). Odds Ratios über 1 könnten einen Risikofaktor, unter 1 einen Schutzfaktor vermuten lassen. Allerdings zeigen die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle, dass diese Ergebnisse als nicht signifikant (n.s.) einzustufen sind.

SNP	Gruppen	Odds ratio	Konfidenzintervall (95%)		p-Wert
rs 142049079	Frauen	0,81	0,52	1,25	0,34 n.s.
	Männer	0,64	0,24	1,71	0,37 n.s.
	gesamt	0,78	0,52	1,16	0,22 n.s.

3.4.3 Exon 11

Der HRM-Lauf der Proben von Patienten-Platte 2 in Exon 11 ergab zwei durch ein verändertes Schmelzverhalten auffällig gewordene Kurven (rote Kurven, s. Abb. 33).

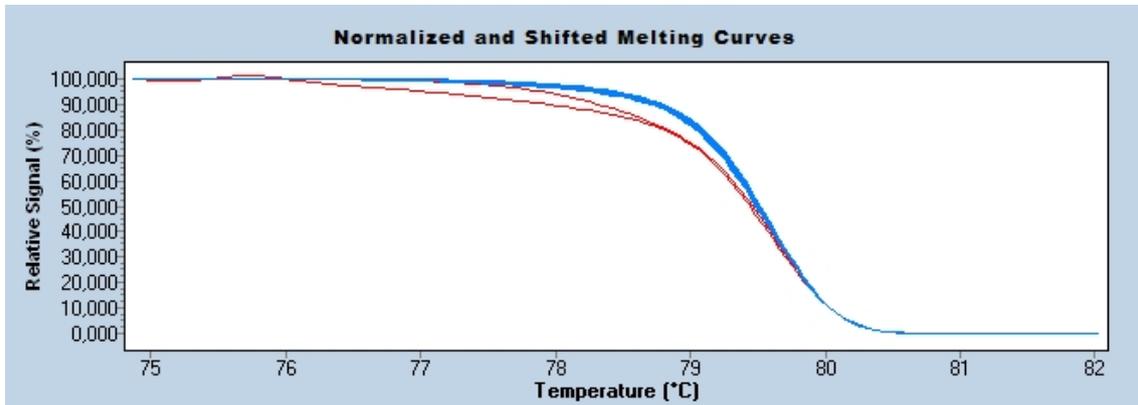


Abbildung 33: HRM-Lauf der Patienten-Platte 2 in Exon 11. Es ist die relative Signalstärke (x-Achse) gegen die Temperatur (y-Achse) beim HRM aufgetragen. Die Signalstärke der Proben, die die beiden roten Kurven darstellen, nimmt im Vergleich zu den restlichen Proben (blaue Kurven) bereits bei deutlich niedrigeren Temperaturen ab. Die untere rote Kurve stellt das Schmelzverhalten der Proben A9 und A10 dar, die obere rote Kurve B1 und B2.

Es wurden im nächsten Schritt folglich vier DNA-Proben (A9, A10, B1 und B2) sequenziert. Drei dieser Proben zeigten eine dem Wildtyp entsprechende Nukleotidabfolge, in Probe B1 war an Position c.1119 ein Basenaustausch zu sehen (s. Abb. 34).

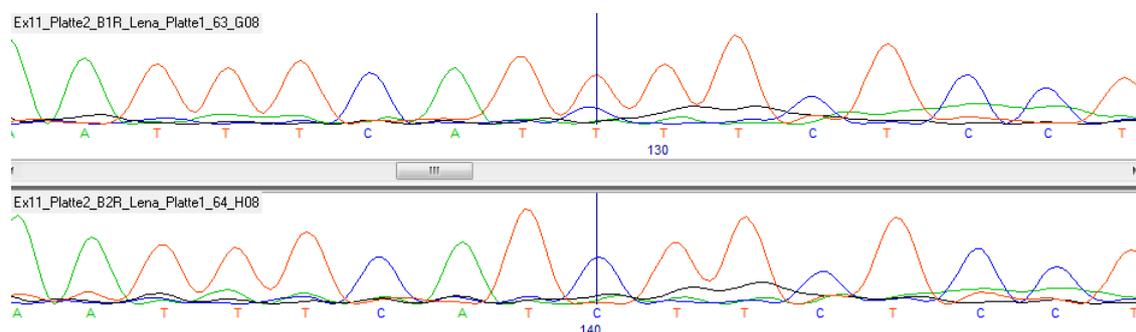


Abbildung 34: Auszug der direkten Sequenzierung der Probe B1 (oben) und B2 (unten) der Patienten-Platte 2. Die Position mit dem vermuteten Basenaustausch ist durch die senkrechte Linie in der Mitte der Sequenz gekennzeichnet. Die Basenfolge in der unteren Reihe entspricht der des Wildtyps, die obere lässt auf einen Basenaustausch schließen. Ob dieser homo-, hemi- oder heterozygot ist, ist nicht eindeutig zu erkennen.

An Position c.11119 wurde ein Basenaustausch von Cytosin zu Thymin festgestellt. Diese Variation bewirkt keinen Aminosäureaustausch (p.I373I) und ist als SNP mit der rs-Nummer rs 140158476 gelistet.

Für die Bestätigung des Basenaustausches konnte ebenfalls ein Restriktionsenzym (MbolI) gefunden werden, dessen Erkennungssequenz durch den Basenaustausch in der Variation verloren geht und daher nur in der Wildtyp-Sequenz schneidet. Das 227bp große PCR-Produkt wird in zwei Fragmente zu 159bp und 69bp geschnitten (s. Abb. 35).

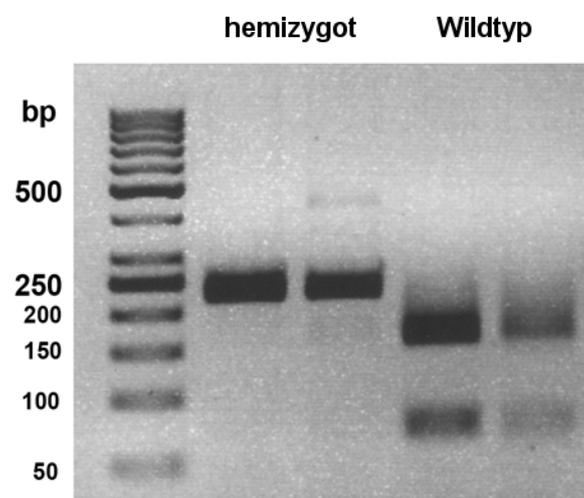


Abbildung 35: Restriktion mit 2U des Enzyms MbolI, aufgetragen auf ein 2%iges Agarose-Gel. Links wurde eine 50bp Leiter als Marker aufgetragen, rechts daneben vier Restriktionen, wovon die zwei linken hemizygote Variationsträger waren und die zwei rechten Wildtyp. Die Erkennungssequenz des Enzyms entspricht der Nukleotid-Abfolge des Wildtyps. Das PCR-Produkt des hemizygoten Variationsträgers bleibt somit mit einer Länge von 227bp unverändert, die Wildtyp-Sequenz wird in zwei Fragmente zu 159bp und 69bp aufgeteilt.

Um eine mögliche Assoziation dieses SNPs mit CBS/CBD zu überprüfen, wurden nun sowohl alle Patienten-Proben als auch die gesunden Kontroll-Proben mit Hilfe der Restriktion überprüft.

Tabelle 40: Ergebnis der Überprüfung aller Patienten- und Kontroll-Proben auf p.I373I mittels Restriktion.

	Genotyp					Allelträger	
	männlich		weiblich			C	T
	C	T	CC	CT	TT		
Patientengruppe (n=210)	78	1	131	0	0	340	1
Kontrollgruppe (n=194)	97	0	97	0	0	291	0

Neun Patienten-Proben mit unbekanntem Geschlecht ergaben den Genotyp C bzw. CC. Sie sind in der statistischen Auswertung nicht enthalten.

Tabelle 41 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung. Die Analyse erfolgte in einem logistischen Regressionsmodell mit dem „Krankheitsstatus“ (erkrankt ja/nein) als Zielvariable und den beiden Einflussfaktoren „Geschlecht“ (0: weiblich, 1: männlich) und „Vorliegen des SNPs“ (0: nein, 1: ja). Wie die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle zeigen, wurden sowohl bei der Analyse der gesamten Kohorte als auch in der nach Geschlechtern getrennten Analyse keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen des SNPs und dem Krankheitsstatus festgestellt. Mit dem anschließend durchgeführten exakten Test nach Fisher konnten ebenfalls keine Zusammenhänge festgestellt werden.

Tabelle 41: Statistische Auswertung des gefundenen SNPs. Dargestellt sind die Odds Ratios, deren Konfidenzintervalle (95%) und die p-Werte des SNPs, aufgelistet nach den analysierten Gruppen (nur Frauen, nur Männer, gesamte Kohorte). Odds Ratios über 1 könnten einen Risikofaktor, unter 1 einen Schutzfaktor vermuten lassen. Allerdings zeigen die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle, dass diese Ergebnisse als nicht signifikant (n.s.) einzustufen sind.

SNP	Gruppen	Odds ratio	Konfidenzintervall (95%)		p-Wert
rs 140158476	Frauen	-	-	-	-
	Männer	1,75	0,66	4,66	0,26 n.s.
	gesamt	1,75	0,66	4,62	0,26 n.s.

3.4.4 Intron 11 und 12

Die HRM-Läufe von Exon 12 ergaben in allen drei Patienten-Platten auffällige Schmelzkurvenverläufe. Beispielhaft zeigt dies Abbildung 36.

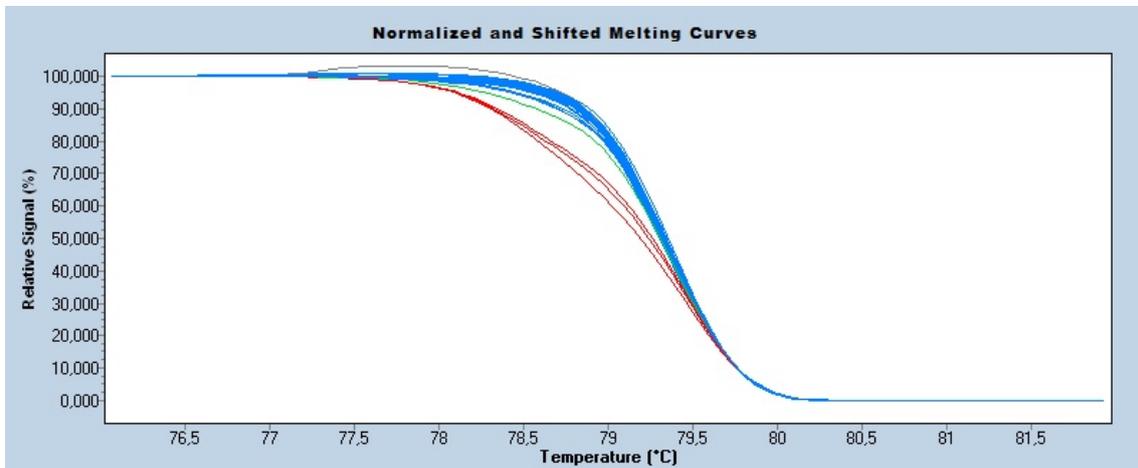


Abbildung 36: HRM-Lauf der Patienten-Platte 3 in Exon 12. Es ist die relative Signalstärke (x-Achse) gegen die Temperatur (y-Achse) beim HRM aufgetragen. Die Signalstärke der Proben, die die drei roten und die einzelne grüne Kurve darstellen, nimmt im Vergleich zu den restlichen Proben (blaue Kurven) bereits bei deutlich niedrigeren Temperaturen ab. Die unterste rote Kurve stellt das Schmelzverhalten der Proben D3/D4, die mittlere rote E11/E12, die oberste rote F7/F8 dar. Grün ist die Probe F11/F12, grau die Probe A7/A8.

Es wurden von der in Abbildung 36 dargestellten Patienten-Platte 3 zehn auffällige Proben sequenziert, bei Platte 1 waren es 11 und in Platte 2 waren es 15. In den Sequenzen wurde an den Positionen c.1195-63 und c.1306+8 jeweils ein Austausch von Guanin zu Adenin gefunden. Auffällig war, dass diese Basenaustausche stets gemeinsam auftraten, in keiner Probe war nur eine der beiden Basenaustausche vorzufinden. Es liegt ein Kopplungs-Ungleichgewicht vor (*linkage disequilibrium*).

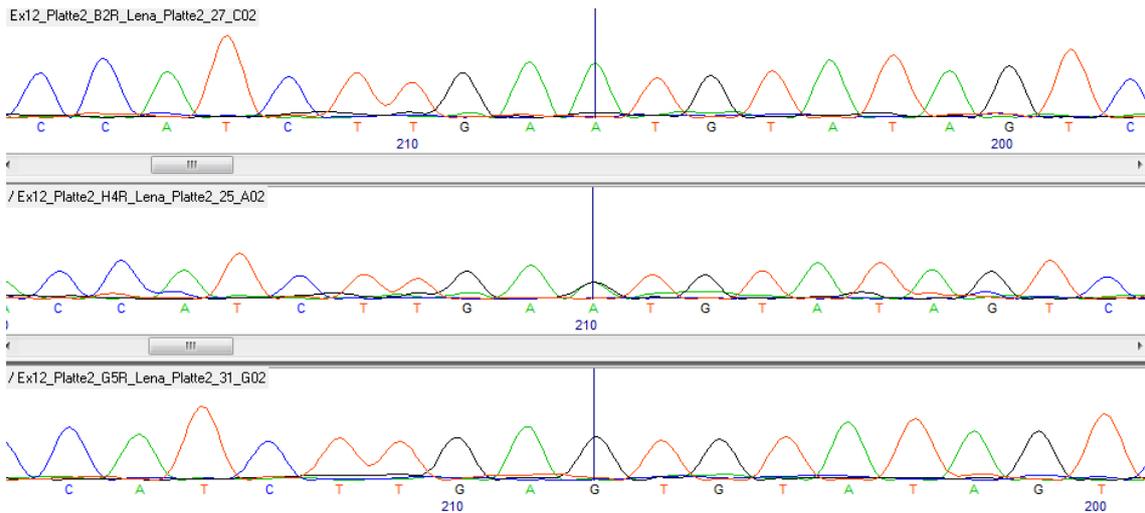


Abbildung 37: Auszug der direkten Sequenzierung der Probe B2 (oben), H4 (Mitte) und G5 (unten) der Patienten-Platte 2. Die Position mit dem vermuteten Basenaustausch (c.1195-63, Intron 11) ist durch die senkrechte Linie in der Mitte der Sequenz gekennzeichnet. Die Basenfolge in der untersten Reihe entspricht der des Wildtyps, B2 lässt auf einen homo- oder hemizygoten Austausch schließen, H4 auf einen heterozygoten.

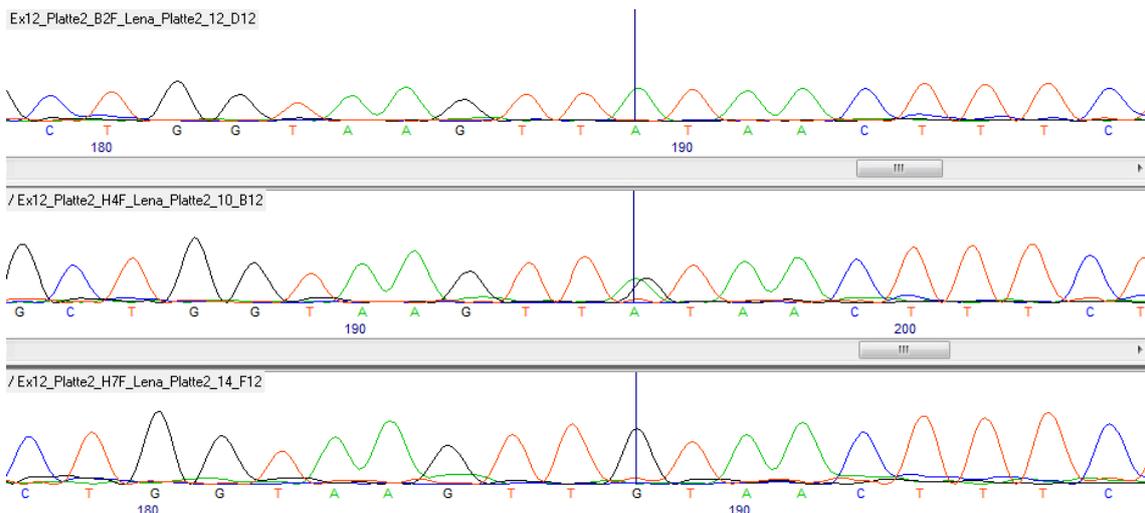


Abbildung 38: Auszug der direkten Sequenzierung der Probe B2 (oben), H4 (Mitte) und H7 (unten) der Patienten-Platte 2. Die Position mit dem vermuteten Basenaustausch (c.1306+8, Intron 12) ist durch die senkrechte Linie in der Mitte der Sequenz gekennzeichnet. Die Basenfolge in der untersten Reihe entspricht der des Wildtyps, B2 lässt auf einen homo- oder hemizygoten Austausch schließen, H4 auf einen heterozygoten.

Die in den Abbildungen 37 und 38 dargestellten Basenaustausche liegen in Intron 11 und 12 und sind als SNPs mit den rs-Nummern 6654309 (Intron 11) und 6654310 (Intron 12) gelistet.

Wegen des stets gemeinsamen Auftretens der beiden SNPs genügte zu deren Bestätigung ein Restriktionsenzym, dessen Erkennungssequenz einen der beiden SNPs enthielt (hier rs6654309). Die Erkennungssequenz des Enzyms SmlI entsprach der Wildtyp-Sequenz, schnitt folglich bei Vorliegen des SNPs nicht.

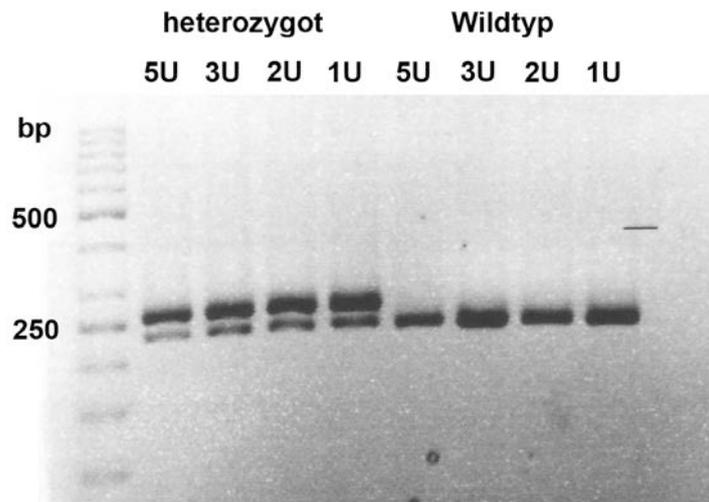


Abbildung 39: Titrationsreihe des Enzyms SmlI, aufgetragen auf ein 3%iges Agarose-Gel. Links wurde eine 50bp Leiter als Marker aufgetragen, rechts daneben viermal die Restriktion einer heterozygoten Probe und viermal die des Wildtyps. Für den Verdau eingesetzt wurden jeweils 5, 3, 2 und 1U des Enzyms. Das Enzym schnitt das 258bp große PCR-Produkt im Wildtyp in zwei Fragmente zu 229bp und 29bp (auf dem Gel nicht sichtbar), in der variierten Sequenz fand keine Restriktion statt. Die heterozygote Probe stellte sich also mit zwei Banden dar (258bp und 229bp), im Wildtyp war nur die 229bp-Bande zu sehen.

Um eine mögliche Assoziation dieses SNPs mit CBS/CBD zu überprüfen, wurden nun sowohl alle Patienten-Proben als auch die gesunden Kontroll-Proben mit Hilfe der Restriktion überprüft.

Tabelle 42: Ergebnis der Überprüfung aller Patienten- und Kontroll-Proben auf c.1195-63G>A und c.1306+8G>A mittels Restriktion.

	Genotyp					Allelträger	
	männlich		weiblich			G	A
	G	A	GG	GA	AA		
Patientengruppe (n= 206)	74	2	123	7	0	327	9
Kontrollgruppe (n= 181)	98	2	74	7	0	253	9

Acht Patienten-Proben mit unbekanntem Geschlecht ergaben den Genotyp G bzw. GG, eine den Genotyp A bzw. AA. Sie sind in der statistischen Auswertung nicht enthalten.

Tabelle 43 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung. Die Analyse erfolgte in einem logistischen Regressionsmodell mit dem „Krankheitsstatus“ (erkrankt ja/nein) als Zielvariable und den beiden Einflussfaktoren „Geschlecht“ (0: weiblich, 1: männlich) und „Vorliegen des SNPs“ (0: nein, 1: ja). Wie die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle zeigen, wurden sowohl bei der Analyse der gesamten Kohorte als auch in der nach Geschlechtern getrennten Analyse keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen des SNPs und dem Krankheitsstatus festgestellt. Mit dem anschließend durchgeführten exakten Test nach Fisher konnten ebenfalls keine Zusammenhänge festgestellt werden.

Tabelle 43: Statistische Auswertung des gefundenen SNPs. Dargestellt sind die Odds Ratios, deren Konfidenzintervalle (95%) und die p-Werte des SNPs, aufgelistet nach den analysierten Gruppen (nur Frauen, nur Männer, gesamte Kohorte). Odds Ratios über 1 könnten einen Risikofaktor, unter 1 einen Schutzfaktor vermuten lassen. Allerdings zeigen die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle, dass diese Ergebnisse als nicht signifikant (n.s.) einzustufen sind.

SNP	Gruppen	Odds ratio	Konfidenzintervall (95%)		p-Wert
rs 6654309/10	Frauen	0,88	0,68	1,15	0,36 n.s.
	Männer	1,07	0,65	1,76	0,78 n.s.
	gesamt	0,92	0,73	1,17	0,51 n.s.

3.4.5 Exon 16

Bei den HRM-Läufen von Exon 16 zeigten in allen drei Patienten-Platten mehrere Proben ein verändertes Schmelzverhalten. Beispielhaft zeigt das der HRM-Lauf von Patienten-Platte 2 (s. Abb. 40).

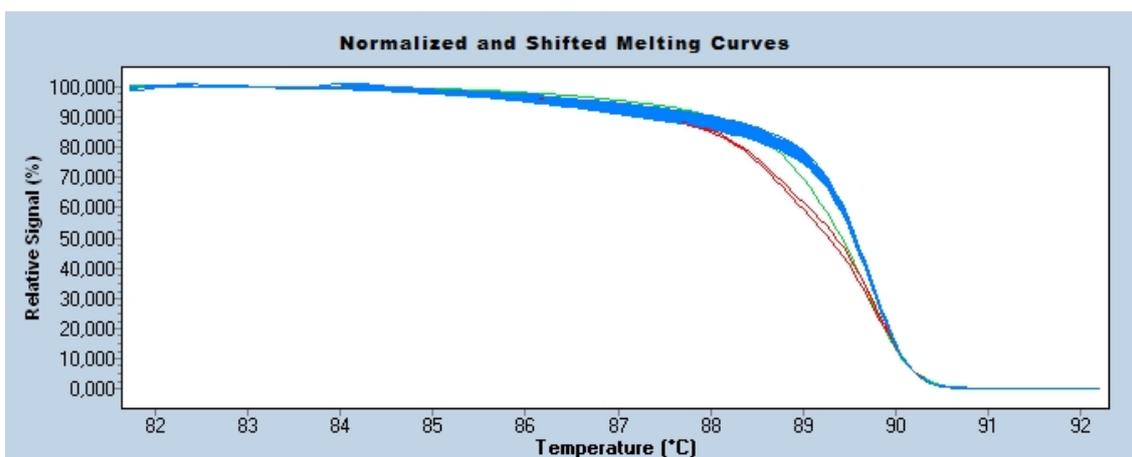


Abbildung 40: HRM-Lauf der Patienten-Platte 2 in Exon 16. Es ist die relative Signalstärke (x-Achse) gegen die Temperatur (y-Achse) beim HRM aufgetragen. Die Signalstärke der Proben, die die zwei roten und die einzelne grüne Kurve darstellen, nimmt im Vergleich zu den restlichen Proben (blaue Kurven) bereits bei deutlich niedrigeren Temperaturen ab. Die untere rote Kurve stellt das Schmelzverhalten der Proben G7 (gepoolt mit einer Wildtyp-DNA), die obere die Proben G5/G6 dar. Grün sind die Proben B1/B2.

Bei der anschließenden direkten Sequenzierung konnte eine Variation der Basensequenz dargestellt werden (s. Abb. 41).

Der Austausch von Cytosin durch Thymin an der Position c.1599 bewirkt keinen Aminosäureaustausch (p.S533S) und ist mit der rs-Nummer 2307131 als SNP gelistet.

Die Bestätigung des SNPs erfolgte mittels RFLP. Das Enzym HpyCH4III schnitt das PCR-Produkt bei Vorliegen der Variation in zwei Fragmente zu 148bp und 100bp (s. Abb. 42).

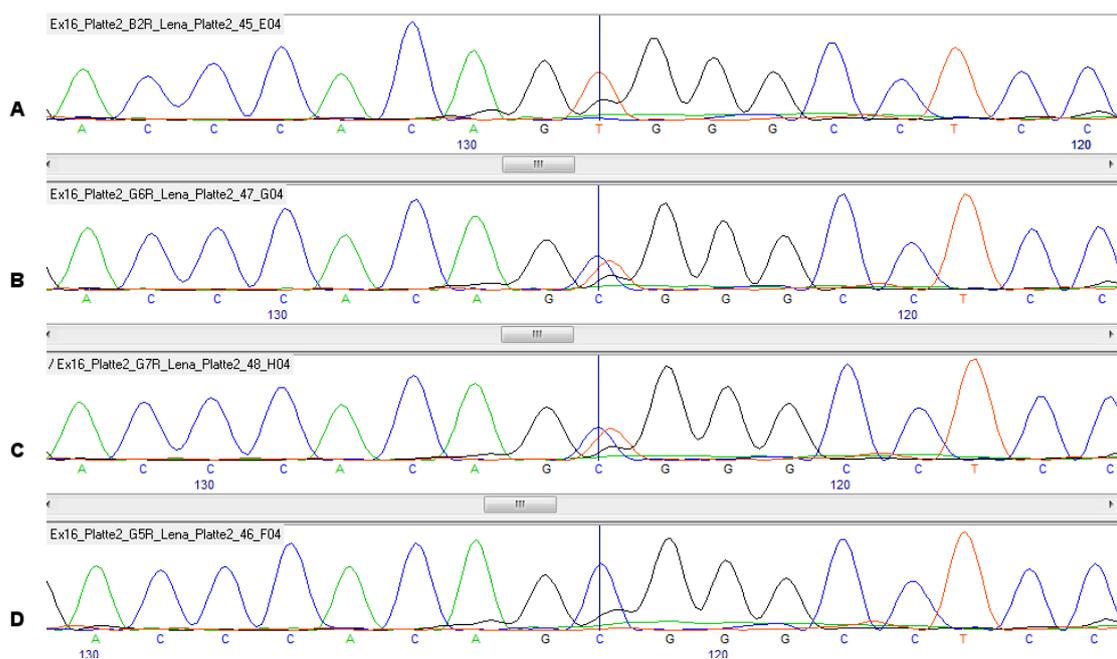


Abbildung 41: Auszug der direkten Sequenzierung der Probe B2 (A), G6 (B), G7 (C) und G5 (D) der Patienten-Platte 2. Die Position mit dem vermuteten Basenaustausch ist durch die senkrechte Linie in der Mitte der Sequenz gekennzeichnet. Die Basenfolge in der untersten Reihe entspricht der des Wildtyps, B2 lässt auf einen homo- oder hemizygoten Austausch schließen, G6 und G7 auf einen heterozygoten.

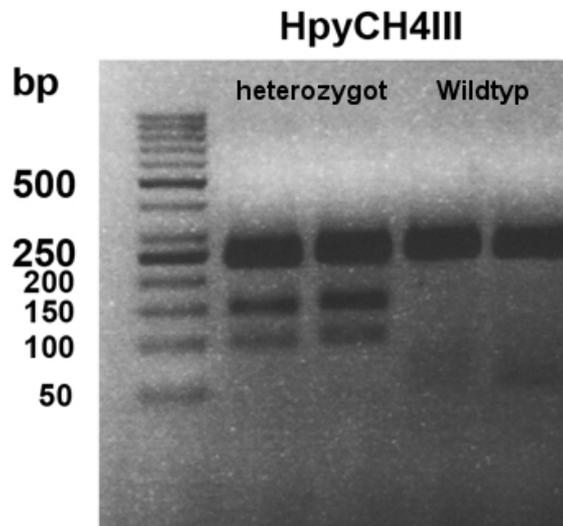


Abbildung 42: Restriktion mit 1U HpyCH4III, aufgetragen auf ein 2%iges Agarose-Gel. Links wurde eine 50bp Leiter als Marker aufgetragen, rechts daneben viermal Restriktionen mit dem Enzym HpyCH4III. Jeweils zwei Proben waren dabei heterozygote Variationsträger und zwei Wildtyp. Die Erkennungssequenz des Enzyms HpyCH4III entspricht der mutierten Nukleotid-Abfolge. Das PCR-Produkt des Wildtyps wird folglich nicht geschnitten und hat eine Größe von 248bp. Liegt die Variation vor, wird das PCR-Produkt in zwei Fragmente zu 100bp und 148bp geschnitten.

Um eine mögliche Assoziation dieses SNPs mit CBS/CBD zu überprüfen, wurden nun sowohl alle Patienten-Proben als auch die gesunden Kontroll-Proben mit Hilfe der Restriktion überprüft.

Tabelle 44: Ergebnis der Überprüfung aller Patienten- und Kontroll-Proben auf p.S533S mittels Restriktion.

	Genotyp					Allelträger	
	männlich		weiblich			C	T
	C	T	CC	CT	TT		
Patientengruppe (n= 213)	78	2	128	5	0	339	7
Kontrollgruppe (n= 188)	100	2	83	3	0	269	5

Neun Patienten-Proben mit unbekanntem Geschlecht ergaben den Genotyp C bzw. CC. Sie sind in der statistischen Auswertung nicht enthalten.

Tabelle 45 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung. Die Analyse erfolgte in einem logistischen Regressionsmodell mit dem „Krankheitsstatus“ (erkrankt ja/nein) als Zielvariable und den beiden Einflussfaktoren „Geschlecht“ (0: weiblich, 1: männlich) und „Vorliegen des SNPs“ (0: nein, 1: ja). Wie die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle zeigen, wurden sowohl bei der Analyse der gesamten Kohorte als auch in der nach Geschlechtern getrennten Analyse keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen des SNPs und dem Krankheitsstatus festgestellt. Mit dem anschließend durchgeführten exakten Test nach Fisher konnten ebenfalls keine Zusammenhänge festgestellt werden.

Tabelle 45: Statistische Auswertung des gefundenen SNPs. Dargestellt sind die Odds Ratios, deren Konfidenzintervalle (95%) und die p-Werte des SNPs, aufgelistet nach den analysierten Gruppen (nur Frauen, nur Männer, gesamte Kohorte). Odds Ratios über 1 könnten einen Risikofaktor, unter 1 einen Schutzfaktor vermuten lassen. Allerdings zeigen die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle, dass diese Ergebnisse als nicht signifikant (n.s.) einzustufen sind.

SNP	Gruppen	Odds ratio	Konfidenzintervall (95%)		p-Wert
rs 2307131	Frauen	1,02	0,72	1,44	0,92 n.s.
	Männer	1,06	0,65	1,74	0,81 n.s.
	gesamt	1,03	0,78	1,37	0,82 n.s.

3.5 Unabhängig gefundene Variationen durch Kooperationspartner in Florida/USA

Unsere Kohorte konnte durch die zur Verfügungstellung von DNA mehrerer internationaler Labore enorm vergrößert werden. Zudem haben Wissenschaftler der Mayo Clinic, College of Medicine in Jacksonville (Florida, USA) in Form einer Kooperation DNA von 63 an CBS/CBD erkrankter Patienten auf Mutationen in dem Gen *SLC9A6* untersucht. Deren Datenerhebung erfolgte auf Grundlage eines anderen Transcripts (ENST 00000370695), welches im Folgenden verwendet wird.

Zusätzlich zu den in Kapitel 3.4 aufgeführten SNPs haben die Wissenschaftler der Mayo Clinic drei weitere Variationen gefunden. Mit Hilfe der uns zugesandten Positiv-Kontrollen konnten wir Nachweismethoden etablieren (RFLP oder SNaPshot) und unsere Patienten- und Kontroll-Proben gezielt auf diese Variationen hin untersuchen.

3.5.1 Exon 1

In Exon 1 wurden zwei Variationen gefunden. An Position c.25 wurde ein Basenaustausch von Guanin zu Thymin festgestellt. Dieser befindet sich im Exon und bewirkt einen Aminosäuren-Austausch von Alanin zu Serin (p.A9S). Diese Variation ist unter der rs-Nummer 201523857 als SNP gelistet. Die zweite Variation wurde an Position c.148 gefunden. Der Basenaustausch ist ebenfalls von Guanin zu Thymin und er bewirkt auch ebenfalls einen Aminosäuren-Austausch von Alanin zu Serin (p.A50S). Auch diese Variation ist unter der rs-Nummer 367724979 als SNP gelistet.

Für den Nachweis der beiden SNPs konnten Restriktionsenzyme gefunden werden. Für den SNP p.A9S wurde die Restriktion mit dem Enzym BanI etabliert. Dieser schnitt spezifisch beim Vorliegen der Wildtyp-Sequenz (s. Abb. 43).

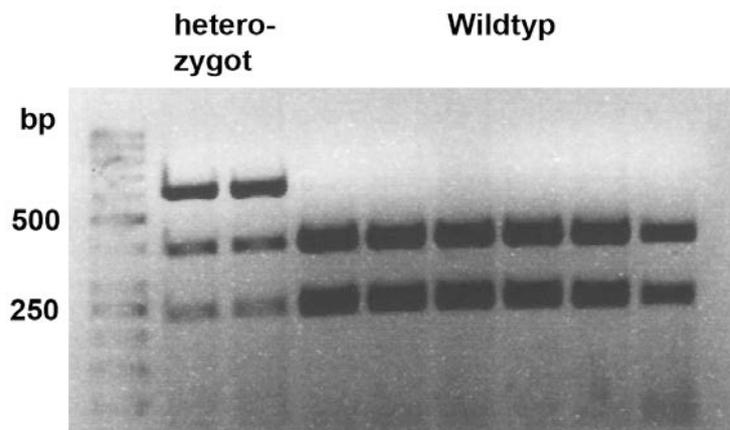


Abbildung 43: Restriktion mit 2U des Enzyms BanI, aufgetragen auf ein 2%iges Agarose-Gel. Links wurde eine 50bp Leiter als Marker aufgetragen, rechts daneben acht Restriktionen mit BanI, wovon die ersten zwei heterozygote Variationsträger waren, gefolgt von sechs Wildtyp-Proben. Die Erkennungssequenz von BanI entspricht der Nukleotid-Abfolge des Wildtyps und schneidet hier folglich das 596bp große PCR-Produkt in zwei Fragmente zu 412bp und 184bp. In der heterozygoten Probe sind alle drei Banden zu sehen (596bp, 412bp und 184bp).

Für den Nachweis des SNPs A50S wurde die Restriktion mit dem Enzym PfiI etabliert, das spezifisch beim Vorliegen der Variation das PCR-Produkt in zwei Fragmente schnitt (s. Abb. 44).

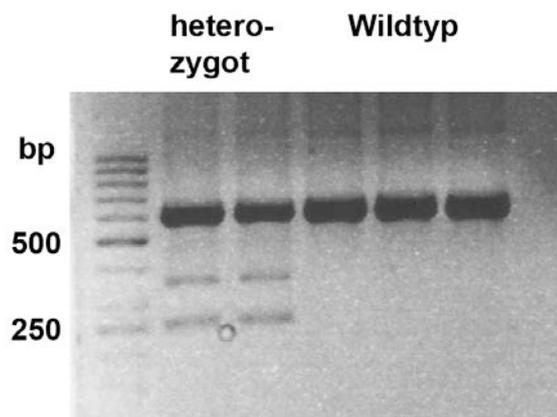


Abbildung 44: Restriktion mit 1U des Enzyms PfiI, aufgetragen auf ein 2%iges Agarose-Gel. Links wurde eine 50bp Leiter als Marker aufgetragen, rechts daneben fünf Restriktionen mit PfiI, wovon die ersten zwei heterozygote Variationsträger waren, gefolgt von 3 Wildtyp-Proben. Hier entspricht die Erkennungssequenz des Enzyms der mutierten Nukleotid-Abfolge. Folglich bleibt die Wildtyp-Probe unverändert (596bp), bei der heterozygoten Probe sind zwei zusätzliche Banden zu sehen (312bp und 284bp).

Beim Screening aller unserer Patienten- und Kontroll-Proben konnten weder unter den Patienten noch unter den Kontrollen einer der beiden SNPs vorgefunden werden. Die Untersuchung von p.A9S schloss 196 Patienten und 216 Kontrollen ein, bei p.A50S waren es 203 Patienten und 190 Kontrollen.

3.5.2 Exon 14

Ein weiterer Basenaustausch von Guanin zu Adenin wurde an der Position c.1703 gefunden. Er befindet sich im Exon und bewirkt einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin (p.R568Q). Es handelt sich um einen mit der rs-Nummer 146263125 gelisteten SNP.

Auch für diese Variation konnte mit Hilfe der Positiv-Kontrolle eine Nachweismethode etabliert werden. Abbildung 45 zeigt das Resultat des SNaPshot-Laufes der Positiv-Kontrolle. Es ist deutlich zu sehen, dass sowohl ein C (komplementär G) als auch ein T (komplementär A) angehängt wurde. Der SNP lag folglich heterozygot vor.

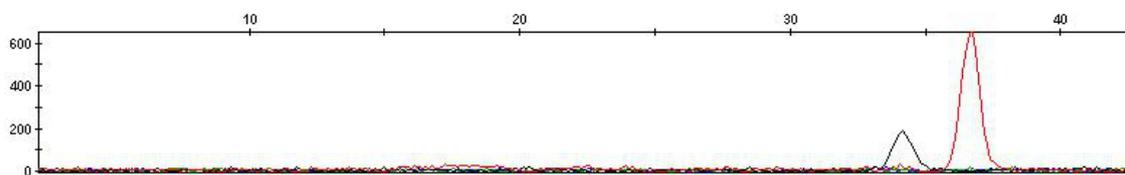


Abbildung 45: Auszug aus der SNaPshot-Analyse. Es sind sowohl ein rotes Signal (Thymin, komplementär A) als auch ein schwarzes Signal (Cytosin, komplementär G) zu sehen. Der SNP lag folglich heterozygot vor.

Beim Screening aller unserer Patienten- und Kontroll-Proben konnte der SNP in zwei Kontroll-Proben gefunden werden. Zur doppelten Absicherung wurden diese noch einmal mittels RFLP mit dem Enzym BspEI bestätigt (s. Abb. 46).

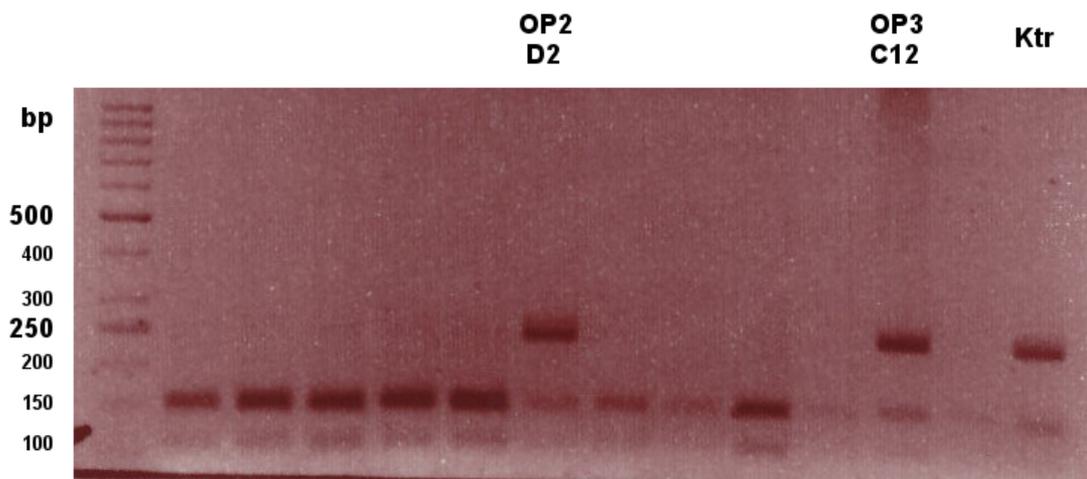


Abbildung 46: Restriktion mit 2U des Enzyms BspEI, aufgetragen auf ein 2%iges Agarose-Gel. Links wurde eine 50bp Leiter als Marker aufgetragen, rechts daneben 13 Restriktionen mit BspEI. Die Erkennungssequenz des Enzyms entspricht der Nukleotid-Abfolge des Wildtyps. Beim Vorliegen der Wildtyp-Sequenz wird das 245bp große PCR-Produkt in zwei Fragmente zu 142bp und 103bp geschnitten. Deutlich zu erkennen ist, dass die Proben 6 (OP2 D2), 11 (OP3 C12) und 13 (Positiv-Kontrolle) trotz ausreichender Enzymmenge nicht vollständig verdaut wurden. Es handelt sich um heterozygote Variationsträger.

Tabelle 46: Ergebnis der Überprüfung aller Patienten- und Kontroll-Proben auf p.R568Q mittels SNaPshot und Restriktion.

	Genotyp					Allelträger	
	männlich		weiblich			C	T
	C	T	CC	CT	TT		
Patientengruppe (n= 205)	76	0	129	0	0	334	0
Kontrollgruppe (n= 254)	138	0	114	2	0	368	2

Neun Patienten-Proben mit unbekanntem Geschlecht ergaben den Genotyp C bzw. CC. Sie sind in der statistischen Auswertung nicht enthalten.

Tabelle 47 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung. Die Analyse erfolgte in einem logistischen Regressionsmodell mit dem „Krankheitsstatus“ (erkrankt ja/nein) als Zielvariable und den beiden Einflussfaktoren „Geschlecht“ (0: weiblich, 1: männlich) und „Vorliegen des SNPs“ (0: nein, 1: ja). Wie die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle zeigen, wurden sowohl bei der Analyse der gesamten Kohorte als auch in der nach Geschlechtern getrennten Analyse keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen des SNPs und dem Krankheitsstatus festgestellt. Mit dem anschließend durchgeführten exakten Test nach Fisher konnten ebenfalls keine Zusammenhänge festgestellt werden.

Tabelle 47: Statistische Auswertung des gefundenen SNPs. Dargestellt sind die Odds Ratios, deren Konfidenzintervalle (95%) und die p-Werte des SNPs, aufgelistet nach den analysierten Gruppen (nur Frauen, nur Männer, gesamte Kohorte). Odds Ratios über 1 könnten einen Risikofaktor, unter 1 einen Schutzfaktor vermuten lassen. Allerdings zeigen die gegenüber dem Signifikanzlevel von 0,05 deutlich höheren p-Werte und die von < 1 bis > 1 reichenden Konfidenzintervalle, dass diese Ergebnisse als nicht signifikant (n.s.) einzustufen sind.

SNP	Gruppen	Odds ratio	Konfidenzintervall (95%)		p-Wert
rs 146263125	Frauen	0,59	0,29	1,18	0,14 n.s.
	Männer	-	-	-	-
	gesamt	0,59	0,30	1,16	0,13 n.s.

3.6 Unabhängig gefundene Mutation

Riess und Kollegen entdeckten bei einer CBS-Patientin und ihrer Mutter eine bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt Mutation in Exon 12 (Transkript ENST 00000370698) [58].

CACCACGCTTCTGATTGTGTTTTTT[-/T]ACCGTG

Es handelte sich um die Insertion des Nukleotids Thymin, welches zu einem *Frameshift* führt (p.T489YfsX23, c.1464_1465insT). Um zu prüfen, ob diese Mutation bei weiteren CBS-Patienten oder gesunden Kontrollproben vorkommt, etablierten wir SNaPshot als Nachweismethode. Das Oligonukleotid musste so gestaltet sein, dass es mit dem sechsten Thymin endete und dann, falls die Mu-

tation vorliegt, ein weiteres T oder, falls die Wildtyp-Sequenz vorliegt, ein Adenin angehängt wurde. Der Testlauf mit einer Positiv-Probe zeigte, dass diese Methode zuverlässig funktionierte (s. Abb. 47).

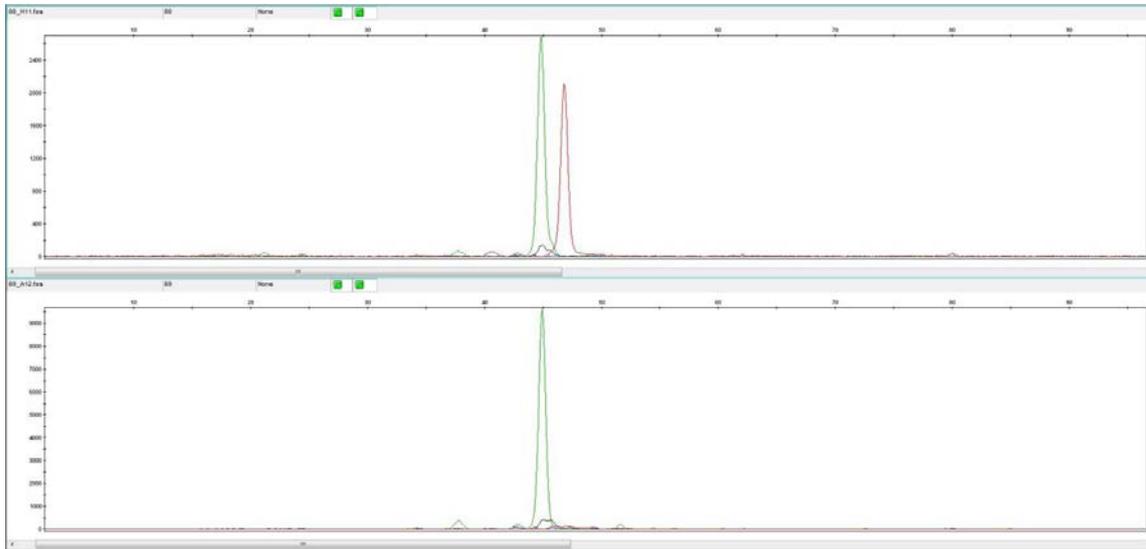


Abbildung 47: Auszug aus der SNaPshot-Analyse. Thymin ist rot kodiert, Adenin grün. Der in diesem Falle zu beurteilende Peak befindet sich auf der Y-Achse zwischen 45 und 50. **oben:** Ergebnis der Positiv-Kontrolle. Es sind deutlich zwei Peaks zu sehen (grün und rot). Die Mutation liegt heterozygot vor. **unten:** Ergebnis einer Negativ-Kontrolle. Es ist nur ein grüner Peak zu sehen.

Die Mutation wurde weder in den Patienten- noch in den Kontrollproben gefunden. Die Untersuchung umfasste 206 Patienten- und 263 Kontrollproben.

4. Diskussion

Das Corticobasale Syndrom (CBS) bzw. die Corticobasale Degeneration (CBD) ist eine sehr selten auftretende, schwierig zu diagnostizierende und bis heute nicht heilbare Erkrankung [12], [18], [6]. In den letzten Jahren wurden Mutationen in verschiedenen Genen (bspw. PGRN, LRRK2, CHMP2B und MAPT, s. Kap. 1.3.4) im Zusammenhang mit CBS/CBD nachgewiesen, ohne dass in jedem Einzelfall die Kausalität von Mutationen klar herausgearbeitet und experimentell belegt werden konnte. Diese Gene sind jedoch nur für einen geringen Bruchteil der Fälle erklärend. Es kann daher von einer großen Heterogenität ausgegangen werden. Das in dieser Studie untersuchte Gen *SLC9A6* steht seit der Veröffentlichung einer von Riess und Kollegen gefundenen Mutation bei einer CBS-Patientin in Verdacht, ebenfalls ursächlich in Verbindung mit der Erkrankung zu stehen [58]. Daher war es Ziel der Arbeit, die Bedeutung von Mutationen im *SLC9A6* Gen für das CBS zu bestimmen.

4.1 Diskussion von Material und Methoden

Für die Durchführung unserer Assoziationsstudie stand uns eine Kohorte von insgesamt 223 DNA-Proben zur Verfügung (81 Männer, 133 Frauen und 9 Personen ohne Geschlechtsangabe). Diese außergewöhnlich große Gruppe an CBS/CBD-Patienten (CBS n=163, CBD n=60) untersuchen zu können, ermöglichten uns Kooperationenspartner aus Gießen (Prof. U. Müller), London (Prof. H. Houlden) und Pennsylvania (Prof. J. Trojanowski). Sie stellten uns DNA von Patienten mit klinisch bzw. neuropathologisch diagnostiziertem CBS oder CBD zur Verfügung. Zusätzlich führten Kollegen in Florida vor Ort an weiteren 63 Patientenproben eine Mutationsanalyse im *SLC9A6* Gen durch. Die Aussagekraft dieser Studie und die Wahrscheinlichkeit eine noch unbekannt Mutation finden zu können, konnte durch die Untersuchung dieser großen Kohorte von CBS/CBD-Patienten gesteigert werden.

Wir erhielten von unseren Kooperationspartnern DNA, die aus Blut- oder Gehirnproben extrahiert wurde. Die Proben der Tübinger Biobank wurden aus Blut

extrahiert. Die Grundlage jeder in dieser Untersuchung verwendeten Methode (*LightCycler*, Sanger-Sequenzierung, RFLP und SNaPshot) war die Vervielfältigung kleinerer spezifischer DNA-Abschnitte (*templates*) mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Bei deren Durchführung fiel auf, dass sich aus Gehirn extrahierte DNA-Proben weniger zuverlässig vervielfältigen ließen, als aus Blut extrahierte. Zurückgeführt werden kann dies auf mehrere Faktoren. Eine Untersuchung von Wang und Kollegen zeigt, dass eine längere Lagerungszeit des Gewebes in Formalin signifikant in Zusammenhang mit einer sinkenden Erfolgsrate der DNA-Extraktion und der anschließenden Amplifikation steht [69]. Die DNA liegt durch die Fixierung des Gewebes fragmentiert vor, wodurch eine Amplifikation von großen DNA-Abschnitten unmöglich wird. Lehmann und Kollegen sprechen von einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 300-400 bp [70]. Beim *High Resolution Melting* im *Lightcycler* ist bei in Formalin und Paraffin fixierten Proben mit einer reduzierten Sensitivität zu rechnen. Dies ermittelten Pichler und Kollegen bei der Etablierung eines Protokolls für die Detektion der Mutation V600E in BRAF bei Patienten mit colorectalem Tumor. Trotzdem schätzen sie diese Methode auch dann als zuverlässig ein [71]. Desweiteren ist der Ertrag an DNA bei deren Extraktion aus Gehirn reduziert [72]. Verschiedene Optimierungen der Extraktionsmethoden wie beispielsweise durch die Inkubation mit Proteinase K oder Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) können dieses Problem jedoch minimieren [73].

Die PCR ist die Grundlage aller in dieser Arbeit verwendeten Methoden. Zu Beginn dieser Assoziationsstudie stand eine Mutationsanalyse. Um sicher zu stellen, dass in diesem ersten Schritt möglichst alle Proben mit Abweichungen von der Wildtyp-Sequenz erkannt werden (also Kranke als krank), musste die dafür ausgewählte Analyse-Methode mit einer hohen Sensitivität ausgezeichnet sein. Wir entschieden uns für das *Gene Scanning* Experiment im *LightCycler*® 480 (*High Resolution Melting*, HRM). In mehreren Veröffentlichungen wurde deren hohe Sensitivität bereits bestätigt. Pichler und Kollegen testeten diese anhand einer Verdünnungsreihe. Sie konnten Proben, die nur 1% mutierte DNA und 99% Wildtyp-DNA beinhalteten, zuverlässig detektieren. Bei Gorniak war dies bei 10% mutierter DNA möglich und Chou und Kollegen haben eine Sensitivität

von 100% ermittelt [71, 74, 75]. Eine andere Messgröße eines Tests ist die Spezifität. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit einen Gesunden als gesund zu erkennen an. In unserer Versuchsreihe können wir die Spezifität der HRM-Methode, bezogen auf die von uns detektierten Variationen, wie folgt bewerten. An die HRM-Analyse und die Sequenzierung der dabei auffällig gewordenen Proben schloss sich eine Untersuchung aller vorhandenen Proben mittels RFLP oder SNaPshot an. Ziel war zum einen die Bestätigung der gefundenen Variationen und zum anderen der Ausschluss einer falsch negativen Aussortierung bezogen auf die bereits gefundenen Auffälligkeiten. Keiner Patientenprobe, die im *LightCycler* als unauffällig gewertet wurde, konnte in diesem Untersuchungsschritt eine Variation nachgewiesen werden. Es wurden folglich alle Gesunden als gesund erkannt. Da jedoch nicht alle vorhandenen Proben prinzipiell sequenziert wurden, kann sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des *LightCyclers* nicht abschliessend beurteilt werden. Ein weiterer Vorteil der *LightCycler*-Analyse ist die Möglichkeit des hohen Probendurchsatzes. Es können bei Verwendung einer 96er-Platte unter Berücksichtigung einer Leerprobe 95x2 also 190 DNA-Proben in einem Lauf maximal gescreent werden. Ein Nachteil des ersten Screening-Schrittes ist die Möglichkeit der falsch negativen Aussortierung [76], was das Übersehen einer Mutation bedeuten würde. Dass dies geschehen ist, kann nicht ausgeschlossen werden, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit aufgrund der zuvor beschriebenen hohen Sensitivität der Methodik sehr gering [71, 74, 75]. Laut des Human-Genom-Projekts ist ein SNP pro 2132 Basenpaaren auf dem X-Chromosom zu erwarten [77]. Die Gesamtlänge der in dieser Untersuchung gescreenten DNA beträgt ca. 4600 Basenpaare pro Patient. Die in diesem Zusammenhang auf den ersten Blick geringe Anzahl von 32 gefundenen Variationen unter 223 Patienten hat mehrere Ursachen. Zum einen wurden in dieser Arbeit fast ausschließlich die Protein kodierenden Bereiche der Exons untersucht. Innerhalb der Exons zeigt sich jedoch eine weit geringere Variabilität in der Nukleotid-Abfolge, als in den nicht-kodierenden Bereichen der Introns. Zurückzuführen ist dies auf den größeren negativen Selektionsdruck in den kodierenden Bereichen [77]. Außerdem lag das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung auf selten auftretenden Veränderungen der Nukleo-

tid-Abfolge, da diesen eine größere Pathogenität zugesprochen wird [78]. Die oben aufgeführte Häufigkeit bezieht sich jedoch auf alle SNPs, also auch auf die häufig auftretenden und daher ggf. nicht detektierten SNPs. Trotz der Seltenheit von CBS konnte mit 223 CBS-Patienten eine vergleichsweise große Kohorte untersucht werden. Eine weitere Vergrößerung der Kohorte könnte die Anzahl der detektierten Variationen um ein Vielfaches steigern [79].

Wichtig bei der Durchführung jedes Experiments ist das Erkennen möglicher Fehlerquellen, sodass diese vermieden werden können. Die verwendeten Oligonukleotide sollten laut Herstellerangaben HPLC bereinigt sein [63]. HPLC steht für Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*) und ist ein Verfahren zur Trennung einzelner Substanzen [80]. Bei der Synthese von Oligonukleotiden entstehen neben den gewünschten Produkten auch verkürzte Abbruchsequenzen [81]. Diese werden im Zuge der Aufreinigung entfernt. Auch die Amplifikatgröße ist bei der Projektplanung zu beachten. Amplifikate einer Größe von bis zu 250bp gelten als optimal, aber auch bis 500bp Größe können sie noch analysiert werden. Dies hat zwei Gründe. Beim Vorliegen einer Variation kommt es zur Bildung von Heteroduplices (s. Kap. 2.2.2). Diese dissoziieren bei steigenden Temperaturen früher, was zur Veränderung des Schmelzkurvenverlaufs führt. Sind die Amplifikate kürzer, sind der Anteil nicht gebundener Abschnitte an der Gesamtmenge und somit auch die Auswirkungen auf das Schmelzverhalten größer. Des Weiteren kann es bei großen Amplifikaten zum Auftreten mehrerer Schmelzpunkte kommen. Dies kann die Beurteilung der Schmelzanalyse erschweren oder unmöglich machen [82]. Da das untersuchte Gen *SLC9A6* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, ist neben den seltener zu erwartenden homozygoten Variationen in weiblichen Proben vor allem mit dem Auftreten von hemizygoten Variationen bei männlichen Proben zu rechnen. Beim *High Resolution Melting* bilden sich in diesem Fall Homoduplices. Der Schmelzkurvenverlauf von mutierten Homoduplices zeigt im Vergleich zu der Wildtyp-Sequenz jedoch lediglich eine leichte x-Achsen-Verschiebung und ist somit, wenn überhaupt, schwer zu erkennen [63]. Einen deutlich veränderten Schmelzkurvenverlauf erhält man durch die Bildung von Heteroduplices. Um dies auch bei homo- bzw. hemizygoten Variationen zu

erreichen, wurden jeweils zwei DNA-Proben in einem Ansatz getestet. Hemi- und homozygote Variationen stellten sich folglich wie heterozygote dar. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurde ein „Mastermix“ für das gesamte anzusetzende Experiment erstellt und dieses der zuvor in der Platte einsortierten DNA zugegeben. Ein Experiment umfasste dabei je nach Patienten-Platte und zu untersuchenden Exons eine variable Anzahl von Proben. Meist lag es zwischen 24 und 47 Proben pro Ansatz. Da die Polymerase wärmeempfindlich und der HRM-Farbstoff (HRM Dye) lichtempfindlich ist, wurde der Ansatz stets auf Eis gekühlt und vor Licht geschützt (Alufolie) verarbeitet [63].

Alternativen zu dem Scening mittels *High Resolution Melting* sind die vollständige direkte Sequenzierung aller Proben oder ein Screening mittels *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (dHPLC). Mehrere Studien stellten diese Methoden bereits bezogen auf deren Sensitivität gegenüber und kamen zu dem Schluss, dass die Sensitivität mit *High Resolution Melting* am höchsten ist. Zudem sind die alternativen Methoden zeit- und kostspieliger [71, 74, 75].

Schwierigkeiten machte die Etablierung des Protokolls für die Untersuchung der DNA-Proben in Exon 1+2. Es wurde mit verschiedenen Oligonukleotiden als Primer und Versuchsbedingungen experimentiert, um optimale Schmelzkurvenverläufe zu erhalten (s. Kap. 2.2.2.2). Der Schmelzkurvenverlauf unter Verwendung der zuerst designten Oligonukleotiden (SLC9A6-Exon1+2-For/Rev) zeigte zwei Schmelzpunkte. Dies kann daran liegen, dass das Amplifikat aufgrund der Zusammenfassung von Exon 1 und 2 sehr groß war. Bei Amplifikaten von 500bp kann es zur Entstehung mehrerer Schmelzpunkte kommen [63]. Das im zweiten Anlauf gewählte Primer-Paar (SLC9A6-Exon1+2-For/Rev-Neu2) zeigte im HRM zwar den gewünschten Schmelzkurvenverlauf, beim Auftragen auf ein Agarose-Gel wurde allerdings eine Amplifikatgröße von lediglich circa 75bp statt der erwarteten 596bp ermittelt. Eine unspezifische Bindung der Primer im Genom und somit die Amplifikation eines unbekanntes DNA-Abschnitts kann nach dessen Überprüfung mittels Primer BLAST als wenig wahrscheinlich eingeschätzt werden. Es bleibt die Möglichkeit übrig, dass es sich um Primer-Dimere

gehandelt hat. Diese können sich teilweise miteinander verbinden und somit auch Größen von ca. 75bp aufweisen [83]. Da die Primer folglich nicht den gewünschten DNA-Abschnitt amplifizierten, konnten diese ebenfalls nicht verwendet werden. Durch die Etablierung einer *Nested-PCR* wurde das Problem behoben. Bei einer *Nested-PCR* werden zwei PCRs nacheinander durchgeführt, wobei die Oligonukleotide der zweiten PCR innerhalb der Oligonukleotide der ersten PCR liegen. Bei der zweiten, der sogenannten *Nested-PCR* wird statt der DNA das Produkt der ersten PCR verwendet. Die Oligonukleotide haben somit einen sehr viel kleineren DNA-Abschnitt an den sie binden können. Untersuchungen ergaben, dass sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität dadurch gesteigert wird [84, 85]. Lediglich bei dem HRM-Lauf von Platte 3 fielen wieder mehrere Proben bereits bei der Amplifikation aus, was auf die bereits zuvor diskutierten Schwierigkeiten bei aus Gehirn extrahierter DNA zurückzuführen ist. Nach mehrmaliger Wiederholung konnten alle Proben bis auf ein Paar ausgewertet werden. Diese beiden DNA-Proben wurden daraufhin sequenziert und zeigten keine Auffälligkeiten in deren Basensequenz.

Zur Darstellung der Nukleotidabfolge der mittels HRM positiv gewerteten Proben wurde die Sanger-Sequenzierung gewählt [65]. Diese gilt als gut etablierte und zuverlässige Methode [86]. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, waren Unregelmäßigkeiten in der Basensequenz von Intron 4 und 15 aufgefallen. Da sich die Signale nach Abschnitten mit häufiger Repetition einzelner Basen (Thymin- oder Adenin-*Stretches*) doppelten, wurden zunächst heterozygote Insertionen bzw. Deletionen dieser Basen vermutet. Dieses Phänomen wurde jedoch in jeder sequenzierten Probe vorgefunden, auch bei männlichen Proben, in welchen sich Variationen nur hemizygot darstellen können. Eine Erklärung findet man in dem Kapitel „Troubleshooting“ des Handbuchs von Applied Biosystems. Nach einer sogenannten „homopolymeren Region“ kann es zu einem „Stottern“ der Polymerase kommen [87]. Wie in Kapitel 2.2.1 allgemein beschrieben ist, läuft eine PCR in mehreren Schritten ab. Es teilen sich Doppelstränge in Einzelstränge (Denaturierung), die Oligonukleotide legen sich an das *Template* an (*Annealing*) und werden mit Hilfe der Polymerase verlängert (Elongation). Diese Schritte werden in 40 bis 50 Zyklen wiederholt. Homopolymere Regionen er-

schweren den „wachsenden“ Amplifikaten sich im neuen Zyklus nach der Denaturierung wieder richtig zu positionieren. Es kommt zu Amplifikaten unterschiedlicher Länge, die sich bei der Sequenzierung als doppelte Signale darstellen [87].

Die Bestätigung der übrigen in der Sequenzierung auffällig gewordenen Basenabfolgen erfolgte mittels Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) oder SNaPshot. Beide Methoden gelten als zuverlässig und können bei einem hohen Durchsatz kostensparend eingesetzt werden [88, 89].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Das im Zuge dieser Arbeit untersuchte Gen *SLC9A6* encodiert das Protein *NHE6*. Wie in Kapitel 1.1.4 bereits beschrieben gehört es zur Familie der Natrium-Wasserstoff-Austauscher. *NHE6* ist in verschiedenen Geweben exprimiert, unter anderem im Gehirn [46]. Auf zellulärer Ebene ist *NHE6* in den Endosomen vorzufinden [47] und regelt deren intraluminalen pH-Wert [52]. Ein Ausfall dieser Pumpfunktion führt zur Übersäuerung des Endosomenlumens [53] und kann so das pH-sensitive System im Extremfall zum Erliegen bringen. Das Endosomen-Lysosomen-System ist essenziell für den Abbau nicht mehr benötigter Proteine, die entweder der Zelle selbst entstammen oder in diese aufgenommen wurden. In einem Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass eine gestörte Autophagie zu Proteinablagerungen führt, die mit dem neurodegenerativen Prozess in Verbindung gebracht werden [90]. Diese jeweiligen hauptsächlich aggregierenden Proteine sind charakteristisch für die neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson (alpha-Synuclein), Alzheimer (Tau), CBS (Tau) oder die Lewy-Körper-Demenz (alpha-Synuclein) [23, 91]. In Patienten mit Mutationen in *SLC9A6* wurden Ablagerungen des Proteins Tau im Gehirn gefunden [55], was eine interessante Gemeinsamkeit mit der CBS-Pathologie darstellt [23].

Im Zuge dieser Untersuchung wurden in Tübingen sechs und von den Kooperationspartnern in Florida drei weitere SNPs gefunden. Parallel dazu wurden un-

sere Patienten- und Kontrollproben noch auf die von Riess und Kollegen veröffentlichte Mutation untersucht. Drei der in Tübingen gefundenen SNPs (rs 6654309, rs 6654310 und rs 116275343) liegen im Intron, drei (rs 2307131, rs 142049079, rs 140158476) im Exon. Die im Exon liegenden SNPs sind stille Variationen, es findet kein Aminosäureaustausch statt. Die mögliche Pathogenität jedes SNPs wurde mit dem Vorhersageprogramm *MutationTaster* getestet. Dies ergab bei fünf SNPs (rs 6654309, rs 6654310, rs 116275343, rs 2307131 und rs 142049079), dass diese mit einer Wahrscheinlichkeitsrate von 0,7 (1 gilt als sicher) nicht funktionell relevante Polymorphismen sind. Dem in Exon 11 lokalisierten SNP (rs 140158476) wurde dagegen mit einer Wahrscheinlichkeitsrate von 1 eine Pathogenität vorhergesagt. Laut *MutationTaster* könnte dies durch ein verändertes Splicing und/oder eine Veränderung der Proteinstruktur bedingt sein. Der SNP wurde unter 210 Patienten einmal in hemizygoter Form gefunden, in 194 Kontroll-Proben war er nicht nachweisbar. Der SNP ist laut den Datenbanken „ensembl“ und „ncbi“ äußerst selten, sodass in „ncbi“ keine MAF (*minor allelic frequency*) und in „ensembl“ ein 100%iges Vorkommen des Wildtyps angegeben ist. Die zusätzlich von den Wissenschaftlern aus Florida gefundenen SNPs bewirken alle einen Aminosäureaustausch (p.A9S, p.A50S, p.R568Q), wobei p.A9S und p.A50S laut *MutationTaster* mit hoher Wahrscheinlichkeit (0,99) als nicht funktionell relevante Polymorphismen einzustufen sind. Interessant ist p.R568Q. Ihm wird eine mögliche Pathogenität (Wahrscheinlichkeitsrate 0,99) vorhergesagt, die eventuell auf ein verändertes Splicing und/oder Veränderung der Proteinstruktur zurückgeführt werden kann. Der SNP p.R568Q liegt im mittleren Abschnitt des Exons. Der Basenaustausch hat folglich keine Auswirkungen auf die GT/AG-Dinukleotide, welche die Spleißstellen an Anfang und Ende des Introns darstellen. Allerdings können auch Veränderungen der Nukleotidsequenz im Exon Auswirkungen auf das Splicing haben. Es können beispielsweise direkt neue Spleißstellen geschaffen oder das Splicing initiiierende Enhancer-Sequenzen aktiviert oder inaktiviert werden [92]. Alternativ könnte ebenso der Aminosäuren-Austausch selbst zu Funktionsstörungen des Proteins führen. Bei der an diese Arbeit anschließenden Familienanalyse der p.R568Q-Trägerin wurde eine weitere CBS-Patientin mit der

p.R568Q Variation in derselben Familie gefunden. Auch dies spricht für eine mögliche pathogenetische Bedeutung dieser Variation. Die Häufigkeit des Auftretens der Allele A in p.R568Q wurde im Zuge des 1000-Genome-Projekts ermittelt. Es zählt mit einer MAF (*minor allelic frequency*) von $A=0,0005$ zu den sehr selten auftretenden SNPs [93]. Laut Kondapalli und Kollegen liegt dieser im C-terminalen Ende des Proteins. Dieses in das Cytoplasma reichende Segment ist nicht für den Ionentransport zuständig [94]. Ob Veränderungen in diesem Segment Auswirkungen auf die Funktion des Natrium-Wasserstoff-Austauschers haben können, müsste funktionell untersucht werden.

Unabhängig von den in dieser Arbeit angestellten Untersuchungen wurden Varianten, Polymorphismen und Mutationen in *SLC9A6* in mehreren anderen Untersuchungen in Zusammenhang mit verschiedenen klinischen Erscheinungsbildern gebracht. Dies sind u.a. das Christianson-Syndrom [43, 54, 95], das Angelman-like-Syndrom [43], Schizophrenie [96], XLMR [97] und CBS [55, 58, 98]. Fünf unserer gefundenen Polymorphismen (p.A9S, p.R568Q, rs 66543010, p.A343A und p.S533S) und die Mutation p.T521YfsX23 wurden bereits in der Literatur diskutiert. Fichou und Kollegen untersuchten DNA von 59 Jungen mit der auf klinische Kriterien gestützten Diagnose Angelman-like Syndrom. Bei einem Jungen wurde der Polymorphismus p.A9S gefunden. Seine Mutter ist heterozygote Überträgerin des Polymorphismus. Von ihr ist nur bekannt, dass diese selbst unbeeinträchtigt ist. Angaben zu ihrem Alter liegen nicht vor. Ob sie das durchschnittliche Erkrankungsalter für CBS erreicht hat, ist folglich unbekannt. Fichou und Kollegen untersuchten 400 gesunde männliche Kontrollpatienten auf diesen SNP, wobei ein weiterer Träger der p.A9S Variante gefunden wurde. Es handelt sich somit nach Fichou und Kollegen mit der für ihre Untersuchung ermittelten Häufigkeit von ca. 0,4% um eine sehr selten auftretende Variante. Auch der in unseren Untersuchungen vorgefundene SNP c.1306+8G>A (rs 66543010) wurde bei einem männlichen Patienten mit der auf klinische Kriterien gestützten Diagnose Angelman-like Syndrom nachgewiesen [99].

Piton und Kollegen gingen der Vermutung nach, dass seltene Variationen in X-chromosomalen Genen das Auftreten von autistischen Spektrumsstörungen

(*autism spectrum disorder*, ASD) und Schizophrenie verursachen können. Im Zuge dieser Untersuchung fanden sie in 111 Genen über 200 Variationen, die einen Aminosäureaustausch bedingen, darunter auch p.R568Q. Sie fanden in der Gruppe der an Schizophrenie erkrankten Patienten diese Variation bei einer weiblichen Probandin in heterozygoter Form, ihre Mutter war die Überträgerin. Über die neurologischen Symptome und das Alter der Patientin und ihrer Mutter liegen leider keine Informationen vor. Piton und Kollegen teilten p.R568Q in die Gruppe der „30 vielversprechendsten seltenen Varianten mit Veränderung der Aminosäuresequenz“ ein. Grundlage dieser Einteilung war das Ergebnis von den drei Vorhersageprogrammen Panther, SIFT und Polyphen [96]. Da keine funktionellen Untersuchungen zur möglichen pathologischen Wirkung der Variation durchgeführt wurden, ist der Zusammenhang von p.R568Q und Schizophrenie nicht bestätigt. Falls die Trägerin und deren Mutter das Erkrankungsalter von CBS noch nicht erreicht haben, wäre auch dessen Auftreten und damit der Zusammenhang von p.R568Q und CBS möglich. Tarpey und Kollegen untersuchten 208 Familien mit X-chromosomaler mentaler Retardierung (*X-linked mental retardation*, XLMR) auf Veränderungen auf dem X-Chromosom. Ihr Screening umfasste 718 X-chromosomale Gene. 203 der untersuchten Patienten waren männlich und mental retardiert, 5 waren obligate Trägerinnen ohne phänotypische Auffälligkeiten. Bei der Sequenzierung aller kodierenden Abschnitte des X-Chromosoms fanden sie im *SLC9A6* Gen sechs Variationen, wovon sich drei mit den Ergebnissen dieser Untersuchung überschneiden. In einer Probe konnten sie p.R568Q nachweisen, in einer p.A343A und in neun p.S533S. Das Geschlecht der positiven Proben wurde leider nicht angegeben. Aufgrund des Überschusses an männlichen Patienten waren sie vermutlich männlich. Bei der Auswertung dieses umfangreichen Screenings teilten Tarpey und Kollegen die vorgefundenen Variationen nach ihrer möglichen pathologischen Wirkung ein. Der Variation p.R568Q sprachen sie eine mögliche krankheitsverursachende Wirkung zu. Auffällig war, dass in der Familie des Variationsträgers das Auftreten der Variation p.R568Q mit dem Auftreten von XLMR korrelierte und bei allen betroffenen Personen nachgewiesen wurde, nicht jedoch bei den gesunden männlichen Familienangehörigen. Die Tatsache, dass

neben p.R568Q noch eine weitere in unserer Untersuchung nicht aufgetretene möglich pathogene Variation gefunden wurde, veranlassen Tarpey und Kollegen *SLC9A6* zu den XLMR-verursachenden Genen zu zählen [97].

Die meisten der in unserer Untersuchung gefundenen SNPs traten sowohl in den Patienten- als auch den Kontrollproben auf. Um herauszufinden, ob ein SNP ein Risikofaktor (Auftreten des SNPs in der Patientengruppe signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe) für CBS/CBD ist oder eine mögliche protektive Wirkung (Auftreten des SNPs in der Kontrollgruppe signifikant häufiger als in der Patientengruppe) hat, wurden die Variationen im Rahmen einer Assoziationsstudie an 223 Patienten und 272 Kontrollen analysiert. Mit Hilfe des logistischen Regressionsmodells wurde der Zusammenhang zwischen dem Krankheitsstatus als dichotome abhängige Variable und den unabhängigen Variablen SNP und Geschlecht untersucht. Die Verwendung der logistischen Regression ist angezeigt, da die Frage nach einem möglichen Zusammenhang von mehr als zwei Variablen gestellt wurde, welche nominalskaliert sind. Aufgrund der wenigen Ereignisse wurde zur Überprüfung dieses Ergebnisses der Exakte Test nach Fisher herangezogen. Es wurden alle sechs im Zuge unserer Untersuchungen vorgefundenen SNPs und der SNP p.R568Q statistisch ausgewertet. In keinem der Tests wurde eine signifikante Assoziation zwischen Auftreten eines dieser sieben SNPs und der Diagnose CBS/CBD festgestellt. Bewertet man diese SNPs rein nach deren statistischer Auswertung, sind diese als nicht krankheitsassoziiert einzuordnen. Jedoch sollte man keine SNPs rein aufgrund der Statistik ausschließen, da es sich um sehr selten auftretende genetische Varianten handelt und man nicht von einer 100%igen Penetranz bei weiblichen Mutationsträgern ausgehen kann. Davor wäre es sinnvoll, die Aussagekraft der statistischen Analyse durch eine Erhöhung der Fallzahl zu verbessern, was jedoch bei der Seltenheit von CBS/CBD schwer zu realisieren ist.

Zieht man die vorhergesagte Pathogenität der SNPs in die Bewertung mit ein, bleiben die SNPs p.R568Q (rs 146263125) und p.I373I (rs 140158476) sowie die von Riess und Kollegen beschriebene Mutation p.T521YfsX23 interessant.

Diese wurde in dieser Arbeit auch untersucht und weder in den Patienten- noch in den Kontrollproben vorgefunden. Zwar ist aufgrund der geringen Frequenz der seltenen Variante eine pathogenetische Relevanz als Ursache für CBS genetisch nicht belegbar, allerdings handelt es sich aufgrund der trunkierenden Mutation um einen wahrscheinlichen Funktionsverlust, der aufgrund von Haploinsuffizienz bzw. bei Inaktivierung des intakten Allels bei Frauen zu einem relevanten Funktionsverlust führen könnte. In der von Riess und Kollegen beschriebenen Familie wurde beobachtet, dass der Indexpatient (IV:3) als Mutationsträger das Christianson-Syndrom entwickelte, dessen Großmutter (II:2) als obligate Trägerin jedoch mit 55 Jahren an CBS erkrankte. Ebenso traten bei deren Mutter (I:2) in ihrem siebten Lebensjahrzehnt parkinsonähnliche Symptome auf. Es wurde aufgrund der Symptomkonstellation am gleichen Zentrum die Diagnose einer CBS gestellt.

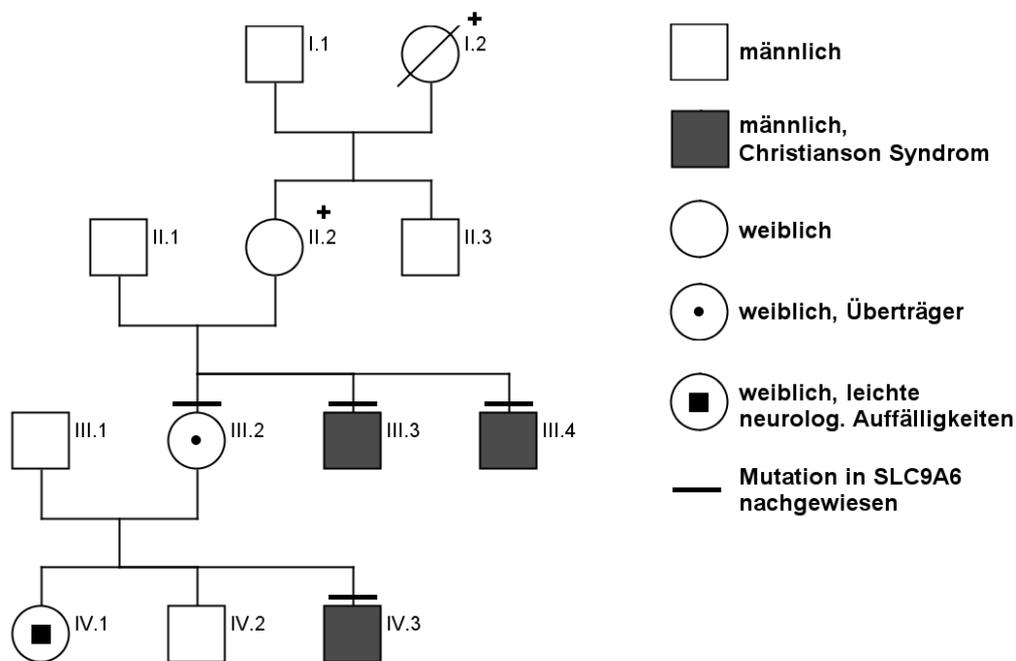


Abbildung 48: Stammbaum der von Riess und Kollegen untersuchten Familie. Das + kennzeichnet die an CBS erkrankten Patientinnen (Groß- und Urgroßmutter des Index-Patienten IV.3) (nach Riess und Kollegen, 2013) [58]

Neben dieser Familie berichten Sinajon und Kollegen im Zuge einer Phenotypisierungsuntersuchung weiblicher Mutationsträgern in *SLC9A6* von einer obligaten Trägerin der Mutation p.E64X, welche mit 60 Jahren Symptome von CBS mit asymmetrischen Atrophien im frontalen und parietalen Kortex im MRT entwickelte. Die drei beschriebenen männlichen Familienangehörige sind dagegen am Christianson-Syndrom erkrankt [98]. Diese Familie scheint eine Parallele zu der von Riess und Kollegen beschriebenen Familie darzustellen und untermauert folgende Hypothese. Dass Veränderungen in *SLC9A6* im Zusammenhang mit mehreren Krankheiten diskutiert werden, lässt die oben beschriebenen Ergebnisse der Literaturrecherche erkennen. Nun kann man basierend auf diese Familienanamnesen die Hypothese aufstellen, dass eine hemizygote Mutation im *SLC9A6* Gen bereits in der frühen Kindheit das Christianson-Syndrom bedingt oder im heterozygotem Zustand, der eine (Teil-)Kompensation durch das exprimierte Wild-Typ Allel ermöglicht, eine im höheren Lebensalter manifestierende neurodegenerative Erkrankung wie die CBS/CBD bedingen kann. Einen großen Einfluss hätten dabei durch die Lokalisierung des Gens auf dem X-Chromosom das Geschlecht des betroffenen Individuums und bei Frauen der X-Inaktivierungsstatus. Vergleichbar mit männlichen Variations-trägern wären dann Frauen, die homozygot für die Veränderung im *SLC9A6* Gen sind. Die von uns untersuchte Kohorte enthält keine sicher homozygote Allelträgerin. In einer DNA-Probe eines CBD-Falls, welche sowohl die Variation c.448-71G>C (rs 116275343) als auch c.1195-63G>A und c.1306+8G>A (rs 6654309 und rs 6654310) enthält, ist das Geschlecht leider unbekannt. Die Probe könnte folglich homo- oder hemizygot sein. In hemizygoter Form wurden folgende SNPs in den Patienten-Proben gefunden: Exon 11 (rs 140158476) (1x), Intron 11 und 12 (rs 6654309/10) (2x) und Exon 16 (rs 2307131) (2x). Kontrollpersonen wiesen hemizygote Varianten in Exon 10 (rs 142049079) (1x), Intron 11 und 12 (rs 6654309/10) (2x) und Exon 16 (rs 2307131) (2x) auf. Folgt man dem ersten Teil der Hypothese, müsste man alle bei männlichen CBS/CBD-Patienten in hemizygoter Form vorgefundenen Variationen als nicht pathogen einschätzen. Diese müssten – postuliert man einen ähnlich starken Effekt wie für die publizierten Mutationen für das Christianson-Syndrom – sonst

das Christianson-Syndrom (zumindest bei Männern) entwickelt haben. Das Vorliegen von hemizygoten Allelträgern, die kein Christianson-Syndrom entwickeln, sondern möglicherweise ein CBS, wäre dann mit einer geringeren Expressivität bzw. Penetranz der Mutation bei Männern zu erklären. Ein hemizygoter Träger einer Mutation mit nur geringer Funktionsbeeinträchtigung des enkodierten Proteins könnte dabei das Krankheitsbild CBS/CBD in späten Lebensjahren entwickeln, der Träger einer hochpathogenen Mutation dagegen das Christianson-Syndrom im Kindesalter. In unserer Untersuchung wäre denkbar, dass die Variation in Exon 11 eine solch niedrigpathogene und somit CBS/CBD-verursachende Mutation wäre. Die Variation wurde lediglich in einer Patienten-Probe und zwar in hemizygoter Form gefunden, jedoch in keiner der Kontroll-Proben. Laut *MutationTaster* ist dieser SNP möglicherweise pathogen und laut den Datenbanken (ensembl, ncbi) extrem selten, was diskutieren lässt, ob es ein SNP oder doch eine Mutation ist. Die anderen bei Tübinger Patienten gefundenen SNPs sind tendenziell als nicht-pathogen einzuschätzen. In rs 142049079 (Exon 10), rs 6654309/10 (Intron11/12) und rs 2307131 (Exon 16) sind Auffälligkeiten sowohl in Patienten- als auch Kontrollproben vorgefunden worden, außerdem kategorisiert das Vorhersageprogramm *MutationTaster* die Variationen als nicht-pathogene Polymorphismen. Die Variation in Intron 4 (rs 116275343) wurde nur in Patienten-Proben vorgefunden, allerdings ist auch diese laut *MutationTaster* als Polymorphismus einzuschätzen. Die in Florida gefundenen SNPs p.A9S und p.A50S und die Mutation p.T489YfsX23 wurden in unserer Untersuchung nicht nachgewiesen. Die Variation p.R568Q, die in Florida im Screening bei einem Patienten nachgewiesen wurde, war bei uns in zwei weiblichen Kontrollen zu finden (heterozygot). Die vom *MutationTaster* vorhergesagte Pathogenität bleibt funktionell nachzuweisen.

Ein Präzedenzfall für die oben geschilderte Hypothese einer graduellen Pathogenität von *SLC9A6* Varianten wäre das auf Chromosom 1 lokalisierte und autosomal vererbte Gen *GBA* (*Glucosidase, Beta, Acid*). Das enkodierte Enzym wird für den lysosomalen Abbau von Glucocerebrosiden benötigt [100]. *GBA* greift also wie *SLC9A6* in den lysosomalen Abbau ein. Wird der Abbau der Glucocerebrosiden durch einen Funktionsverlust des Enzyms in Folge einer

homozygoten Mutation in GBA gestört, spricht man von der Gaucher Erkrankung [101]. Es wurde jedoch beim Vorliegen von heterozygoten Mutationen im GBA Gen das häufigere Auftreten von Parkinson beobachtet, was in zahlreichen unterschiedliche ethnische Gruppen umfassenden Studien bestätigt wurde [102-105]. Die Penetranz, also die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Parkinson bei vorliegender GBA-Mutation, liegt bei ca. 30% [106]. Charakteristisch sind in diesen Fällen das frühere Auftreten der Parkinson-Erkrankung [107, 108] und die häufigeren kognitiven Defizite [108]. GBA hat mit NHE6 das Vorkommen im Endosomen-Lysosomen-System gemeinsam. Das von GBA encodierte Enzym lysiert Glucocerebroside [100]. Ein Funktionsverlust von GBA führt zur Akkumulation von Glucocerebroside in Lysosomen des retikuloendothelialen Systems. Die Zellen (Makrophagen) nehmen an Größe zu (Gaucher-Zellen) und lagern sich in inneren Organen ab, v.a. Milz, Leber und Knochenmark [109]. Mit Hilfe von Zellkulturen und iPS-Zellen (Neuronen) wurde das Auftreten von alpha-Synuclein-Akkumulation bei funktionsunfähiger Glucocerebrosidease bestätigt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das nicht abgebaute Glucocerebroside das lösliche alpha-Synuclein stabilisiert und so die Akkumulation und die Entstehung der Lewy-Körper ermöglicht. Alpha-Synuclein wiederum soll die Glucocerebrosidease hemmen, somit also eine verstärkende Wirkung haben [110]. Zusammenfassend kann man sagen, dass GBA nicht nur ein Beispiel für eine graduelle Pathogenität ist, sondern auch aufzeigt, dass Funktionsverluste des Endosomen-Lysosomen-Systems Proteinakkumulationen nach sich ziehen können. Die Parallele zur Akkumulation von alpha-Synuclein bei funktionsunfähigem GBA könnten die Tau-Ablagerungen beim Verlust von NHE6 sein. Interessant ist, dass in einer aktuellen Untersuchung bei 2 von 39 untersuchten möglichen CBS-Patienten die heterozygote Mutation N370S in GBA vorgefunden wurde, CBS allerdings keine alpha-Synuclein-Pathologie aufweist [111].

Die Zusammenhänge zwischen Genetik und klinischer Phänotypen neurodegenerativer Erkrankungen sind komplex und zeigen Heterogenitäten auf. Es bedarf noch einiger wissenschaftlicher Erkenntnisse um diese vollständig zu entschlüsseln. Um die Richtigkeit der im Zuge dieser Arbeit aufgestellten These

bestätigen zu können, benötigt man funktionelle Untersuchungen und gegebenenfalls eine breiter angelegte Analyse von Familienanamnesen. An diese Arbeit anschließend werden gerade in unserer Arbeitsgruppe funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Es stehen Fibroblasten der heterozygoten Trägerin der Mutation p.T489YfsX23 (Großmutter des Indexpatienten, s. Abb. 48: II.2) und ein knockdown Zellmodell hierfür zur Verfügung. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass ein Funktionsverlust von NHE6 zur Übersäuerung und Störung des Endosomen-Lysosomen-Systems führt. Außerdem wurden Auffälligkeiten in deren Funktion festgestellt.

4.3 Schlussfolgerung

Genveränderungen im *SLC9A6* Gen können als häufige Ursache für das Auftreten des Corticobasalen Syndroms bzw. der Corticobasalen Degeneration ausgeschlossen werden. Allerdings wurden seltene Varianten einschließlich der von Riess und Kollegen beschriebenen p.T489YfsX23 Mutation gefunden, die mit der CBS kosegregieren und daher nun funktionell untersucht werden, um eine Bedeutung im Rahmen der Pathogenese einer spät manifestierenden neurodegenerativen Erkrankung zu belegen.

5. Zusammenfassung

In der stetig alternden Gesellschaft rücken neurodegenerative Erkrankungen immer mehr in den Fokus. Das klinisch diagnostizierte corticobasale Syndrom (CBS) tritt meist im 6. Lebensjahrzehnt auf. Die fortschreitenden typischerweise einseitig ausgeprägten Hauptsymptome sind Rigidity, Dystonie und das *Alien-Limb*-Phänomen. Die Diagnose wird post mortem durch den Nachweis von Tau-Proteinen in betroffenen Hirnarealen bestätigt (corticobasale Degeneration, CBD). CBS/CBD zählen damit zu den Tauopathien. Der Nachweis der Mutation p.T489YfsX23 bei einem am Christianson-Syndrom (CS) erkrankten Jungen und der an CBS erkrankten Großmutter (heterozygot) brachte das bisher im Zusammenhang mit dem X-chromosomal vererbten CS stehende Gen *SLC9A6* erstmals in Verbindung mit CBS/CBD. Das Gen encodiert NHE6, welches für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes in den Endosomen und somit für die Funktion des Endosomen-Lysosomen-Abbauweges verantwortlich ist. Eine gestörte Autophagie könnte zu Neurodegeneration und Proteinablagerungen führen. *Knockout* Tiermodelle bestätigen Tau-Ablagerung bei NHE6-Verlust, analog zur Pathologie bei CBD-Patienten. In dieser Arbeit wurden 223 CBS/CBD-Patienten mit Hilfe des *High Resolution Meltings* auf Mutationen bzw. Variationen im *SLC9A6* Gen untersucht. Es schloss sich die Sequenzierung der auffälligen Proben und die Bestätigung von gefundenen Mutationen mittels RFLP und SNaPshot, sowie die Untersuchung einer 272 Proben umfassenden Kontrollgruppe auf die gefundenen Variationen an. Parallel untersuchten Kooperationspartner 63 US-amerikanische CBS/CBD-Patienten. Wir fanden insgesamt sechs genetische Varianten, die Kollegen in den USA drei weitere sehr selten auftretende SNPs. Zusätzlich wurden die Patienten- und Kontroll-Proben auf die Mutation p.T489YfsX23 untersucht, welche jedoch in keiner der Gruppen nachgewiesen werden konnte. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede der Frequenzen zwischen Patienten und Kontrollen. Die Mutation p.T489YfsX23 steht aufgrund der Veränderung im Leseraster sowie der Familienanalyse weiter im Verdacht, krankheitsverursachend für CBS zu sein. Ebenso wird die in einer Familie mit CBD kosegregierende p.R568Q Variation in anschließenden funktionellen Studien auf eine mögliche Pathogenität untersucht.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Forman, M.S., J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee, *Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs*. Nat Med, 2004. **10**(10): p. 1055-63.
- [2] Gregersen, N., *Protein misfolding disorders: pathogenesis and intervention*. J Inherit Metab Dis, 2006. **29**(2-3): p. 456-70.
- [3] Jellinger, K.A., *Recent advances in our understanding of neurodegeneration*. J Neural Transm, 2009. **116**(9): p. 1111-62.
- [4] Bower, J.H., et al., *Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976–1990*. Neurology, 1999. **52**(6): p. 1214.
- [5] Brookmeyer, R., S. Gray, and C. Kawas, *Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset*. Am J Public Health, 1998. **88**(9): p. 1337-42.
- [6] Eggert, K.M., *Leitlinie Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie*. 2012: Thieme.
- [7] Krüger, R. and C. Klein, *Genetik der Parkinson-Krankheit*. medizinische genetik, 2013. **25**(2): p. 215-220.
- [8] Rebeiz, J.J., E.H. Kolodny, and E.P. Richardson, Jr., *Corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia: a progressive disorder of late adult life*. Trans Am Neurol Assoc, 1967. **92**: p. 23-6.
- [9] Gibb, W.R., P.J. Luthert, and C.D. Marsden, *Corticobasal degeneration*. Brain, 1989. **112** (Pt 5): p. 1171-92.
- [10] Riley, D.E., et al., *Cortical-basal ganglionic degeneration*. Neurology, 1990. **40**(8): p. 1203.
- [11] Boeve, B.F., A.E. Lang, and I. Litvan, *Corticobasal degeneration and its relationship to progressive supranuclear palsy and frontotemporal dementia*. Ann Neurol, 2003. **54** Suppl 5: p. S15-9.

- [12] Bak, T.H. and J.R. Hodges, *Corticobasal degeneration: clinical aspects*. Handbook of clinical neurology, 2008. **89**: p. 509-521.
- [13] Wenning, G.K., et al., *Natural history and survival of 14 patients with corticobasal degeneration confirmed at postmortem examination*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1998. **64**(2): p. 184-9.
- [14] Ling, H., et al., *Does corticobasal degeneration exist? A clinicopathological re-evaluation*. Brain, 2010. **133**(7): p. 2045-2057.
- [15] Murray, R., et al., *Cognitive and motor assessment in autopsy-proven corticobasal degeneration*. Neurology, 2007. **68**(16): p. 1274-83.
- [16] Josephs, K.A., et al., *Clinicopathologic analysis of frontotemporal and corticobasal degenerations and PSP*. Neurology, 2006. **66**(1): p. 41-8.
- [17] Rebeiz, J.J., E.H. Kolodny, and E.P. Richardson, Jr., *Corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia*. Arch Neurol, 1968. **18**(1): p. 20-33.
- [18] Armstrong, M.J., et al., *Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration*. Neurology, 2013. **80**(5): p. 496-503.
- [19] Kompoliti, K., et al., *Clinical presentation and pharmacological therapy in corticobasal degeneration*. Arch Neurol, 1998. **55**(7): p. 957-61.
- [20] Grimes, D.A., A.E. Lang, and C.B. Bergeron, *Dementia as the most common presentation of cortical-basal ganglionic degeneration*. Neurology, 1999. **53**(9): p. 1969-74.
- [21] Boeve, B.F., et al., *Pathologic heterogeneity in clinically diagnosed corticobasal degeneration*. Neurology, 1999. **53**(4): p. 795-800.
- [22] Boxer, A.L., et al., *Patterns of brain atrophy that differentiate corticobasal degeneration syndrome from progressive supranuclear palsy*. Arch Neurol, 2006. **63**(1): p. 81-6.

- [23] Dickson, D.W., et al., *Office of Rare Diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(11): p. 935-46.
- [24] Di Fonzo, A., et al., *A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease*. Lancet, 2005. **365**(9457): p. 412-5.
- [25] Berg, D., et al., *Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease**. Brain, 2005. **128**(Pt 12): p. 3000-11.
- [26] Wszolek, Z.K., et al., *Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology*. Neurology, 2004. **62**(9): p. 1619-22.
- [27] Chen-Plotkin, A.S., et al., *Corticobasal syndrome and primary progressive aphasia as manifestations of LRRK2 gene mutations*. Neurology, 2008. **70**(7): p. 521-7.
- [28] van der Zee, J., et al., *CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(2): p. 313-22.
- [29] Skibinski, G., et al., *Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia*. Nat Genet, 2005. **37**(8): p. 806-8.
- [30] Parkinson, N., et al., *ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B)*. Neurology, 2006. **67**(6): p. 1074-7.
- [31] Cox, L.E., et al., *Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9872.
- [32] Urwin, H., et al., *Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(11): p. 2228-38.

- [33] Bugiani, O., et al., *Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(6): p. 667-77.
- [34] Rossi, G., et al., *The G389R mutation in the MAPT gene presenting as sporadic corticobasal syndrome*. Mov Disord, 2008. **23**(6): p. 892-5.
- [35] He, Z. and A. Bateman, *Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis*. J Mol Med (Berl), 2003. **81**(10): p. 600-12.
- [36] Baker, M., et al., *Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 916-9.
- [37] Cruts, M., et al., *Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 920-4.
- [38] Masellis, M., et al., *Novel splicing mutation in the progranulin gene causing familial corticobasal syndrome*. Brain, 2006. **129**(Pt 11): p. 3115-23.
- [39] Tartaglia, M.C., et al., *Sporadic corticobasal syndrome due to FTL-DTP*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(3): p. 365-74.
- [40] Rademakers, R., et al., *Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(23): p. 3631-42.
- [41] Rollinson, S., et al., *No association of PGRN 3'UTR rs5848 in frontotemporal lobar degeneration*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(4): p. 754-5.
- [42] Simon-Sanchez, J., et al., *Variation at GRN 3'-UTR rs5848 is not associated with a risk of frontotemporal lobar degeneration in Dutch population*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7494.
- [43] Gilfillan, G.D., et al., *SLC9A6 mutations cause X-linked mental retardation, microcephaly, epilepsy, and ataxia, a phenotype mimicking Angelman syndrome*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(4): p. 1003-10.

- [44] Brett, C.L., M. Donowitz, and R. Rao, *Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(2): p. C223-39.
- [45] Nakamura, N., et al., *Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1561-72.
- [46] Numata, M., et al., *Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6951-9.
- [47] Brett, C.L., et al., *Human Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(5): p. C1031-41.
- [48] Orłowski, J. and S. Grinstein, *Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 549-65.
- [49] Numata, M. and J. Orłowski, *Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17387-94.
- [50] Hill, J.K., et al., *Vestibular hair bundles control pH with (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchangers NHE6 and NHE9*. J Neurosci, 2006. **26**(39): p. 9944-55.
- [51] Casey, J.R., S. Grinstein, and J. Orłowski, *Sensors and regulators of intracellular pH*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(1): p. 50-61.
- [52] Ohgaki, R., et al., *Organellar Na⁺/H⁺ exchangers: novel players in organelle pH regulation and their emerging functions*. Biochemistry, 2011. **50**(4): p. 443-50.
- [53] Ouyang, Q., et al., *Christianson syndrome protein NHE6 modulates TrkB endosomal signaling required for neuronal circuit development*. Neuron, 2013. **80**(1): p. 97-112.
- [54] Christianson, A.L., et al., *X linked severe mental retardation, craniofacial dysmorphology, epilepsy, ophthalmoplegia, and cerebellar atrophy in a large South African kindred is localised to Xq24-q27*. J Med Genet, 1999. **36**(10): p. 759-66.

- [55] Garbern, J.Y., et al., *A mutation affecting the sodium/proton exchanger, SLC9A6, causes mental retardation with tau deposition*. Brain, 2010. **133**(Pt 5): p. 1391-402.
- [56] Trepel, M., *Neuroanatomie: Struktur und Funktion ; mit 27 Tabellen*. 2003: Urban & Fischer.
- [57] Stromme, P., et al., *X-linked Angelman-like syndrome caused by Slc9a6 knockout in mice exhibits evidence of endosomal-lysosomal dysfunction*. Brain, 2011. **134**(Pt 11): p. 3369-83.
- [58] Riess, A., et al., *Novel SLC9A6 mutations in two families with Christianson syndrome*. Clin Genet, 2013. **83**(6): p. 596-7.
- [59] Lowel, H., et al., *The MONICA Augsburg surveys--basis for prospective cohort studies*. Gesundheitswesen, 2005. **67 Suppl 1**: p. S13-8.
- [60] Rothdach, A.J., et al., *Prevalence and risk factors of RLS in an elderly population: the MEMO study. Memory and Morbidity in Augsburg Elderly*. Neurology, 2000. **54**(5): p. 1064-8.
- [61] Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. 2009: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- [62] White, T.J., N. Arnheim, and H.A. Erlich, *The polymerase chain reaction*. Trends Genet, 1989. **5**(6): p. 185-9.
- [63] *Handbuch LightCycler480_GeneScanningSoftware_V1.5*. 2008, Roche Diagnostics GmbH.
- [64] Wüst, R., *Mutationsscreening und Assoziationsstudien im presenilin-assoziierten rhomboid-like (PARL)-Gen bei Patienten mit Parkinson-Krankheit*. 2014.
- [65] Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
- [66] Strachan, T., A.P. Read, and L. Seidler, *Molekulare Humangenetik*. 2005: Elsevier, Spektrum, Akad. Verlag.

- [67] Knippers, R., *Molekulare Genetik: 614 farbige Abbildungen, 68 Tabellen*. 2006: Thieme Georg Verlag.
- [68] AppliedBiosystems. *ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit Protocol*. 2010 [18.09.2016; 12:40];
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041203.pdf.
- [69] Wang, J.H., et al., *DNA extraction from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded human brain tissue*. *Neurosci Bull*, 2013. **29**(5): p. 649-54.
- [70] Lehmann, U. and H. Kreipe, *Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 409-18.
- [71] Pichler, M., et al., *Evaluation of high-resolution melting analysis as a diagnostic tool to detect the BRAF V600E mutation in colorectal tumors*. *J Mol Diagn*, 2009. **11**(2): p. 140-7.
- [72] Saldanha, J., A. Gannicliffe, and R.F. Itzhaki, *An improved method for preparing DNA from human brain*. *J Neurosci Methods*, 1984. **11**(4): p. 275-9.
- [73] Jackson, D.P., et al., *Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction*. *J Clin Pathol*, 1990. **43**(6): p. 499-504.
- [74] Gorniak, P., et al., *Comparison of high resolution melting analysis with direct sequencing for the detection of recurrent mutations in DNA methyltransferase 3A and isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes in acute myeloid leukemia patients*. *Eur J Haematol*, 2015.
- [75] Chou, L.-S., E. Lyon, and C.T. Wittwer, *A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model*. *American journal of clinical pathology*, 2005. **124**(3): p. 330-338.
- [76] Laurie, A.D., M.P. Smith, and P.M. George, *Detection of factor VIII gene mutations by high-resolution melting analysis*. *Clin Chem*, 2007. **53**(12): p. 2211-4.

- [77] Cichon, S., *Variabilität im menschlichen Genom: Bedeutung für die Krankheitsforschung*. Dtsch Arztebl International, 2002. **99**(46): p. 3091-.
- [78] Lupski, J.R., et al., *Clan genomics and the complex architecture of human disease*. Cell, 2011. **147**(1): p. 32-43.
- [79] Kiezun, A., et al., *Exome sequencing and the genetic basis of complex traits*. Nat Genet, 2012. **44**(6): p. 623-30.
- [80] Snyder, L.R., J.J. Kirkland, and J.L. Glajch, *Practical HPLC method development*. 2012: John Wiley & Sons.
- [81] Temsamani, J., M. Kubert, and S. Agrawal, *Sequence identity of the n-1 product of a synthetic oligonucleotide*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(11): p. 1841-4.
- [82] *LightCycler® 480 Real-Time PCR System Technical Note No. 1*, in *High Resolution Melting: Optimization Strategies*. 2008, Roche Diagnostics GmbH.
- [83] Brownie, J., et al., *The elimination of primer-dimer accumulation in PCR*. Nucleic acids research, 1997. **25**(16): p. 3235-3241.
- [84] Kim, E.J., et al., *Improved PCR/nested PCR approaches with increased sensitivity and specificity for the detection of pathogens in hard ticks*. Ticks Tick Borne Dis, 2013. **4**(5): p. 409-16.
- [85] Jalouli, M., et al., *Comparison between single PCR and nested PCR in detection of human papilloma viruses in paraffin-embedded OSCC and fresh oral mucosa*. In Vivo, 2015. **29**(1): p. 65-70.
- [86] Naue, J., et al., *Factors affecting the detection and quantification of mitochondrial point heteroplasmy using Sanger sequencing and SNaPs-hot minisequencing*. Int J Legal Med, 2011. **125**(3): p. 427-36.
- [87] *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Chemistry Guide*, in *Chapter 8: Troubleshooting*. 2009, Applied Biosystems.

- [88] Norton, N., et al., *Universal, robust, highly quantitative SNP allele frequency measurement in DNA pools*. Hum Genet, 2002. **110**(5): p. 471-8.
- [89] Sharafi, H., et al., *Development and Validation of a Simple, Rapid and Inexpensive PCR-RFLP Method for Genotyping of Common IL28B Polymorphisms: A Useful Pharmacogenetic Tool for Prediction of Hepatitis C Treatment Response*. Hepat Mon, 2012. **12**(3): p. 190-5.
- [90] Hara, T., et al., *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 885-889.
- [91] Ross, C.A. and M.A. Poirier, *Protein aggregation and neurodegenerative disease*. 2004.
- [92] Read, A. and D. Donnai, *Angewandte Humangenetik*. 2008: Walter de Gruyter.
- [93] National Center for Biotechnology Information. *Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs146263125* [cited 30.11.2015; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs146263125].
- [94] Kondapalli, K.C., H. Prasad, and R. Rao, *An inside job: how endosomal Na⁺/H⁺ exchangers link to autism and neurological disease*. Frontiers in cellular neuroscience, 2014. **8**.
- [95] Masurel-Paulet, A., et al., *A new family with an SLC9A6 mutation expanding the phenotypic spectrum of Christianson syndrome*. Am J Med Genet A, 2016. **170**(8): p. 2103-10.
- [96] Piton, A., et al., *Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(8): p. 867-80.
- [97] Tarpey, P.S., et al., *A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation*. Nat Genet, 2009. **41**(5): p. 535-43.

- [98] Sinajon, P., D. Verbaan, and J. So, *The expanding phenotypic spectrum of female SLC9A6 mutation carriers: a case series and review of the literature*. Hum Genet, 2016. **135**(8): p. 841-50.
- [99] Fichou, Y., et al., *Mutation in the SLC9A6 gene is not a frequent cause of sporadic Angelman-like syndrome*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(11): p. 1378-80.
- [100] Brady, R.O., J. Kanfer, and D. Shapiro, *THE METABOLISM OF GLUCOCEREBROSIDES. I. PURIFICATION AND PROPERTIES OF A GLUCOCEREBROSIDE-CLEAVING ENZYME FROM SPLEEN TISSUE*. J Biol Chem, 1965. **240**: p. 39-43.
- [101] Beutler, E., *Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment*. Science, 1992. **256**(5058): p. 794-9.
- [102] Lwin, A., et al., *Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism*. Mol Genet Metab, 2004. **81**(1): p. 70-3.
- [103] Sato, C., et al., *Analysis of the glucocerebrosidase gene in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2005. **20**(3): p. 367-70.
- [104] Neumann, J., et al., *Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease*. Brain, 2009. **132**(Pt 7): p. 1783-94.
- [105] Sidransky, E., et al., *Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2009. **361**(17): p. 1651-61.
- [106] Mielke, C. and K. Krüger, *Aktuelles zu den genetischen Ursachen der Parkinson-Krankheit: Implikationen für die molekulare Pathogenese und Diagnostik*. Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie, 2013. **15**(1): p. 16-19.
- [107] Mitsui, J., et al., *Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease*. Arch Neurol, 2009. **66**(5): p. 571-6.
- [108] Chahine, L.M., et al., *Clinical and biochemical differences in patients having Parkinson disease with vs without GBA mutations*. JAMA neurology, 2013. **70**(7): p. 852-858.

- [109] Westbroek, W., A.M. Gustafson, and E. Sidransky, *Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and parkinsonism*. Trends in molecular medicine, 2011. **17**(9): p. 485-493.
- [110] Mazzulli, J.R., et al., *Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies*. Cell, 2011. **146**(1): p. 37-52.
- [111] Pilotto, A., et al., *GBA-associated parkinsonism and dementia: beyond alpha-synucleinopathies?* Eur J Neurol, 2015.

Verwendete Software:

- Ensembl: <http://www.ensembl.org>
- Mutationtaster: <http://www.mutationtaster.org/>
- NEBCutter: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>
- Primer3: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
- OligoCalcs: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
- PrimerBLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>;
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/reverse.cgi>
- Pregap4 version 1.5
- Gap v.4.10
- LightCycler® 480 Software release 1.5.0
- R version 3.0.2

7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der neurologischen Universitätsklinik, Abteilung für Neurodegeneration, unter Betreuung von Prof. Dr. med. Rejko Krüger durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Rejko Krüger. LightCycler-Analysen, Sequenzierungen, Etablierungen aller verwendeten RFLPs sowie die Durchführung der Restriktionen in Exon 10, 11, 16 und Intron 11 wurden nach Einarbeitung durch Brigitte Maurer und David Scheibner von mir eigenständig durchgeführt. Die unter Kapitel 2.2.5 aufgeführten Nachweise mittels SNaPshot, die Durchführung der Restriktionen von p.A9S und p.A50S, sowie die benötigten *whole genome amplifications* wurden von Brigitte Maurer durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde von Lisa Wang, Abteilung für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen durchgeführt. Die Odds-Ratios sowie die Konfidenzintervalle habe ich selbstständig errechnet (s. Kap. 2.2.6 und Tab. 37, 39, 41, 43, 45, 47). Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 18.09.2016

Lena Loeffler

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen ganz herzlich danken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Als Erstes einen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Rejko Krüger für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas, die hervorragende Betreuung in allen Phasen meiner Dissertation sowie die Begutachtung der Dissertationschrift und den Vorsitz bei der Disputation.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Neumann für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Peter Bauer danke ich für meine Vermittlung an Herrn Prof. Dr. Rejko Krüger und die Anregung bei der Diskussion der Ergebnisse.

Für die Einarbeitung in die in dieser Arbeit verwendeten Methoden danke ich Frau Brigitte Maurer und Herrn David Scheibner. Ein besonderer Dank geht dabei an Frau Brigitte Maurer für jegliche Hilfe bei methodischen Schwierigkeiten und für die Durchführung der SNaPshot-Analysen.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung möchte ich Frau Lisa Wang, Abteilung für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen, danken.

Herzlich danken möchte ich zudem Frau Dr. Julia Fitzgerald, Frau Katharina Stegen, Frau Dr. Carolin Obermaier, Frau Dr. Dajana Grossmann, Frau Ann-Kathrin Hauser und Frau Dr. Claudia Schulte für die Unterstützung im Labor. Und natürlich noch einen großen Dank an die Kooperationspartner aus Gießen (Prof. U. Müller), London (Prof. H. Houlden) und Pennsylvania (Prof. J. Trojanowski), die uns DNA-Proben von Patienten mit dieser seltenen Erkrankung zur Verfügung gestellt haben, sowie an die Kollegen in der Mayo Clinic, College of Medicine in Jacksonville (Florida, USA), für den Austausch der Daten und der Zusendung der Positiv-Kontrollen.

Zu guter Letzt ein riesiges Dankeschön an meine Familie für jegliche Unterstützung und Motivation!